



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อกักเก็บ
สารกลุ่มแซนโทฟิลล์สำหรับนำส่งทางผิวหนัง

Development of Non-alcoholic Microemulsions Formulation for Entrapment of
Xanthophylls for Transdermal Delivery

โดย

นสภ. พรระพล	เกิดทรัพย์	รหัสประจำตัวนิสิต 58210081
นสภ. จิตรีรัตน์	พิกุลแก้ว	รหัสประจำตัวนิสิต 58210137
นสภ. ภูมินทร์	เกียรติรัมย์	รหัสประจำตัวนิสิต 58210274

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิตปีการศึกษา 2562

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อกักเก็บ
สารกลุ่มแซนโทฟิลล์สำหรับนำส่งทางผิวหนัง

Development of Non-alcoholic Microemulsions Formulation for Entrapment of
Xanthophylls for Transdermal Delivery

โดย

นสภ. พระพรพล	เกิดทรัพย์	รหัสประจำตัวนิสิต 58210081
นสภ. จิตรีรัตน์	พิกุลแก้ว	รหัสประจำตัวนิสิต 58210137
นสภ. ภูมินทร์	เกียรติรัมย์	รหัสประจำตัวนิสิต 58210274

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิตปีการศึกษา 2562

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์สำหรับนำส่งทางผิวหนัง ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต ระดับปริญญาตรี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ปัจจุบันการใช้สารสำคัญจากธรรมชาติในเครื่องสำอางเพื่อการบำรุงผิวได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสามารถสังเกตได้จากผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารจากธรรมชาติมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าและก่อให้เกิดการระคายเคืองน้อยกว่าสารสังเคราะห์ ซึ่งสารสำคัญจากธรรมชาติมีหลายชนิดที่นิยมในเครื่องสำอาง เช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids), สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นต้น โดยสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันเนื่องจากพบว่าให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มแคโรทีน (carotenes) และกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) สำหรับสารแซนโทฟิลล์ไม่สามารถละลายในน้ำ ความคงตัวต่ำ แต่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

คณะผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาตำรับเพื่อกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์สำหรับการนำส่งทางผิวหนัง ในรูปแบบตำรับไมโครอิมัลชัน เพื่อเพิ่มความคงตัว การละลายและการซึมผ่านทางผิวหนัง รวมถึงศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีของตำรับ ทางผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจ

คณะผู้วิจัย

นสภ. พรชพล เกิดทรัพย์

นสภ. จูติรัตน์ พิกุลแก้ว

นภส. ภูมินทร์ เกียรติรัมย์

22 พฤศจิกายน พ.ศ.2562

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2562

เรื่อง การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์สำหรับ
นำส่งทางผิวหนัง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|-------------------|--------------|----------------------------|
| 1. นสภ. พรระพพล | เกิดทรัพย์ | รหัสประจำตัวนิสิต 58210081 |
| 2. นสภ. สิริรัตน์ | พิกุลแก้ว | รหัสประจำตัวนิสิต 58210137 |
| 3. นสภ. ภูมินทร์ | เกียรติรัมย์ | รหัสประจำตัวนิสิต 58210274 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภญ.ดร.นปภัช รัตนะชิตวัช ที่ปรึกษาหลัก

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์สำหรับกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ในการนำส่งทางผิวหนัง โดยระบบไมโครอิมัลชัน ประกอบด้วยน้ำ cinnamon oil และสารลดแรงตึงผิวผสม (ทวิน20และโพโพลีนไกลคอล ในอัตราส่วน 4:1) ซึ่งให้พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุดและพบว่าที่อัตราส่วนในตำรับได้แก่ น้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวผสม ในอัตราส่วน 5:20:75 มีขนาดอนุภาคภายในเล็กที่สุดเท่ากับ 77.63 ± 31.56 nm ซึ่งแตกต่างจากตำรับอื่นอย่างมีนัยสำคัญ การกระจายของขนาดอนุภาคเท่ากับ 0.47 ± 0.20 การนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.0135 ± 0.0086 $\mu\text{S/cm}$ และความหนืดเท่ากับ 0.0740 ± 0.0168 Pa.s จากนั้นทำการกักเก็บสารแอสตาแซนทินและฟูโคแซนทินซึ่งเป็นสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ ในตำรับของแอสตาแซนทินและฟูโคแซนทินมีขนาดอนุภาคในช่วงน้อยกว่า 100 nm เท่ากับ 12.66% และ 1.09% ตามลำดับ จากการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS⁺ พบว่าค่า IC₅₀ เท่ากับ 16.33 ± 0.65 และ 8.96 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับซึ่งแตกต่างจากสารแอสตาแซนทินที่ไม่ถูกกักเก็บในไมโครอิมัลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ตำรับฟูโคแซนทินและตำรับไมโครอิมัลชันไม่พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Heating-cooling จำนวน 6 รอบ พบว่าทั้งไมโครอิมัลชันเปล่าและไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์มีความคงตัวดี ไม่เกิดตะกอนหรือการแยกชั้น แต่การทดสอบด้วยวิธีการเร่งโดยใช้แรงโน้มถ่วงโลก พบว่าตำรับแอสตาแซนทินเกิดการแยกชั้นเล็กน้อย

(.....)

ภญ.ดร. นปภัช รัตนะชิตวัช

อาจารย์ที่ปรึกษา

Senior Project Academic Year 2019

: Development of Non-alcoholic Microemulsions Formulation for Entrapment of Xanthophylls for Transdermal Delivery

By

Mr. Punsapon Kirdsub ID 58210081

Miss Thitirat Phikulkaew ID 58210137

Mr. Pumin Kiatrassmee ID 58210274

Advisor

Dr. Napapat Rattanchitthawat

Abstract

This study was aimed to develop the xanthophylls loaded non-alcoholic microemulsions (ME) for transdermal delivery. The ME systems consisted of water, cinnamon oil and surfactant mixture (S_{mix}) (Tween[®] 20 and propylene glycol with weight ratio 4:1) which showed the biggest area of ME in pseudo-ternary phase diagram was selected. The ME was prepared with the mixture (deionized water, oil, S_{mix}) at ratio 5:20:75 and it had the droplet size range of 77.63 ± 31.56 nm which showed significantly difference from the other ratio. The polydispersity index (PDI) was 0.47 ± 0.20 , the electrical conductivity was $0.0135 \pm 0.0086 \mu S/cm$ and the viscosity was 0.0740 ± 0.0168 Pa.s. Therefore, this ME systems was selected to entrapped the xanthophylls substances, astaxanthin and fucoxanthin. The droplet size of astaxanthin loaded- ME and fucoxanthin-loaded ME that had the smaller size than 100 nm was 12.66% and 1.09% respectively. The antioxidants activity of astaxanthin loaded- ME presented in IC_{50} value by using the DPPH and ABTS⁺ method were 16.33 ± 0.65 and $8.96 \pm 0.08 \mu g/ml$ respectively while the fucoxanthin-loaded ME and blank ME did not showed the antioxidant activity. The ME system had good stability when using the heating-cooling cycle evaluation. However, the astaxanthin-loaded ME had a little separation when using the centrifugation test.

(.....)

Dr. Napapat Rattanchitthawat

Advisor

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์
สำหรับนำส่งทางผิวหนัง สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือด้านงบประมาณจากคณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา และคำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือจาก ญญ.ดร.นปภัช รัตนะชิตวัช ซึ่งให้ความรู้คอยดูแล
ถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนโครงการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.อ.ขวัญชฎานวิศ มาชะนา ที่ให้คำแนะนำในและช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ รวมถึง
อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ในโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์สิริเชษฐ์ รัตนะชิตวัช ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำด้านสถิติในการทำโครงการวิจัย
ครั้งนี้

ขอบคุณนางสาวกนกพร ก้อนทรัพย์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำเรื่องการทดสอบฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ

ขอขอบพระคุณบริษัทโกเวลจำกัด ที่อนุเคราะห์สารแอสตาแซนทินสำหรับใช้ในโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้
เครื่องมือต่าง และผู้ที่เกี่ยวข้องที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการวิจัยนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

นสภ. พรชพล เกิดทรัพย์

นสภ. จูติรัตน์ พิกุลแก้ว

นภส. ภูมินทร์ เกียรติวัศมี

22 พฤศจิกายน พ.ศ.2562

สารบัญ

คำนำ.....	๗
บทคัดย่อ	ค
Abstract.....	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
สมมติฐาน.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
กรอบแนวคิด	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid)	4
2.2 ข้อมูลทั่วไปของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	7
2.3 ผีเสื้อ.....	11
2.4 การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	21
3.1 การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชัน.....	23
3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของตำรับไมโครอิมัลชัน	23
3.3 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย	24

3.4 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography)	25
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	25
3.6 การวิเคราะห์โดยใช้สถิติ.....	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	26
4.1 การพัฒนาสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน.....	26
4.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสูตรตำรับ.....	30
4.3 การศึกษาสูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์	34
4.4 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่กักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชันในหลอดทดลอง.....	35
4.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์	35
4.6 การศึกษาความคงตัว	38
บทที่ 5 สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง.....	53
เอกสารอ้างอิง	57
ภาคผนวก.....	61

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างระหว่างไมโครอิมัลชันกับอิมัลชันทั่วไป	14
ตารางที่ 2 แสดงชนิดของน้ำมันที่มีการนำมาใช้ในตำรับไมโครอิมัลชันชนิดใช้เฉพาะที่	16
ตารางที่ 3 ตารางแสดงปริมาณน้ำมัน, S_{mix} และน้ำ ซึ่งเลือกจาก pseudo-ternary phase diagram	30
ตารางที่ 4 แสดงผลขนาดอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ	31
ตารางที่ 5 แสดงผลการกระจายของขนาดอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ	32
ตารางที่ 6 แสดงผลการนำไฟฟ้าของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ	32
ตารางที่ 7 แสดงผลความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ	33
ตารางที่ 8 แสดงผลความเป็นกรด-ด่างของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ	34
ตารางที่ 9 แสดงผลการศึกษาขนาดอนุภาคตำรับไมโครอิมัลชันของ astaxanthin และ fucoxanthin	35
ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของตัวอย่าง	36
ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของ Astrol [®]	37
ตารางที่ 12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของตัวอย่าง	38
ตารางที่ 13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของ Astrol [®]	38
ตารางที่ 14 แสดงผลการศึกษาความคงตัวโดยวิธี Heating-Cooling ของตำรับไมโครอิมัลชันในอัตราส่วนต่างๆ	39
ตารางที่ 15 แสดงผลทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Centrifuge	52

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเบต้าแคโรทีน	4
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของลูทีนและซีแซนทีน	5
รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแอสตาแซนทีน	5
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของฟูโคแซนทีน	6
รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	9
รูปที่ 6 แสดงการเกิดการปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสารต้านออกซิเดชันแล้วเกิดการเปลี่ยนจากสีม่วงเป็น เหลือง	9
รูปที่ 7 แสดงการเกิดปฏิกิริยา DPPH กับสารต้านออกซิเดชันแล้วส่งผลให้สารสีม่วงจางลงเป็นสีเหลือง และดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 515-517 nm	9
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	10
รูปที่ 9 แสดงการเกิดปฏิกิริยาเคมีของ ABTS	10
รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของผิวหนัง	11
รูปที่ 11 แสดงเส้นทางการซึมผ่านผิวหนังของสาร	12
รูปที่ 12 Vertical diffusion cell	13
รูปที่ 13 Horizontal diffusion cell	13
รูปที่ 14 แสดงวิธีการเพิ่มซึมผ่านผิวหนัง	15
รูปที่ 15 แสดงชนิดของสารลดแรงตึงผิวประเภทต่างๆ	17
รูปที่ 16 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Tween® 80	17
รูปที่ 17 แสดงโครงสร้าง polyethylene glycol	18
รูปที่ 18 แสดงแผนไตรภาคเทียมของ Coconut oil , S _{mix} (Tween® 80 และ PEG 400) โดย A, B,C และ D แสดงอัตราส่วน S _{mix} 1:1, 2:1,3:1 และ 4:1 ตามลำดับ	27
รูปที่ 19 แสดงแผนไตรภาคเทียมของ MCT oil , S _{mix} (Tween® 80 และ PEG 400) โดย A, B,C และ D แสดงอัตราส่วน S _{mix} 1:1, 2:1,3:1 และ 4:1 ตามลำดับ	28

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 20 แสดงแผนไตรภาคเทียมของ Cinnamon oil , S_{mix} (Tween [®] 20 และ PG) โดย A, B,C และ D	
แสดงอัตราส่วน S_{mix} 1:1, 2:1,3:1 และ 4:1 ตามลำดับ	29
รูปที่ 21 แสดงการเลือกจุด A,B และ C ใน pseudo-ternary phase diagram	30
รูปที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง shear rate และ shear stress ของตำรับไมโครอิมัลชัน ตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บ 1% astaxanthin และตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บ 1% fucoxanthin	33
รูปที่ 23 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี DPPH ของตำรับ 1% astaxanthin ในไมโครอิมัลชัน	36
รูปที่ 24 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี DPPH ของ Astrol [®]	36
รูปที่ 25 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี ABTS ของตำรับ1% astaxanthin ในไมโครอิมัลชัน	37
รูปที่ 26 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี ABTS ของ Astrol [®]	38

นิยามศัพท์เฉพาะ

สัญลักษณ์	นิยาม
<	น้อยกว่า
>	มากกว่า
%	เปอร์เซ็นต์
°C	หน่วยองศาเซลเซียส
w/w	weight by weight
w/v	Weight by volume
pH	ค่าแสดงสภาพกรดต่าง
PBS	Phosphate buffer saline
g/cm ³	กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
g/mol	กรัมต่อโมล
R ²	Coefficient of determination
HPLC	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
nm	นาโนเมตร
ME	ไมโครอิมัลชัน
o/w	น้ำมันในน้ำ
w/o	น้ำในน้ำมัน
ml	มิลลิลิตร
μl	ไมโครลิตร

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการใช้สารสำคัญจากธรรมชาติในเครื่องสำอางเพื่อการบำรุงผิวได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสามารถสังเกตได้จากผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น(1) เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารจากธรรมชาติมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่าและก่อให้เกิดการระคายเคืองน้อยกว่าสารสังเคราะห์

กลุ่มสารจากธรรมชาติที่นิยมใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิวนั้นมีหลายชนิดเช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นต้น โดยสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันเนื่องจากพบว่าให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์นี้สามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มแคโรทีน (carotenes) และกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) สำหรับสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ สามารถละลายในสารอินทรีย์ชนิดน้ำมันแต่ไม่ละลายในน้ำมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ตัวอย่างเช่น ลูทีน (lutein) ซีแซนทีน (zeaxanthin) แอสตาแซนทีน (astaxanthin) และฟูโคแซนทีน (fucoxanthin) เป็นต้น(2) ซึ่งแอสตาแซนทีนมีสีชมพูหรือสีแดงพบได้ในผลิตภัณฑ์จากทะเลเช่น สาหร่ายทะเล หอยทะเลและปลาทะเล มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การรักษามะเร็งผิวหนังด้วย(3) สำหรับฟูโคแซนทีนมีสีแดงหรือสีส้ม พบได้ในสาหร่ายสีน้ำตาล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบและอยู่ระหว่างการศึกษากับฤทธิ์การต้านมะเร็งอีกด้วย(4) แต่ปัญหาของสารกลุ่มนี้คือไม่ละลายน้ำและมีความคงตัวต่ำ จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจการพัฒนาตำรับสำหรับการกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์เพื่อการนำส่งทางผิวหนัง โดยคณะผู้วิจัยสนใจศึกษาตำรับไมโครอิมัลชันสำหรับการนำส่งทางระบบผิวหนัง เนื่องจากไมโครอิมัลชันมีข้อดี คือ มีความคงตัวทางอุณหภูมิ สามารถเพิ่มการละลายของสารที่ไม่ละลายน้ำ และยังสามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารสำคัญทางผิวหนังได้ดี(5)

ในการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันสำหรับการกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ มีองค์ประกอบสำคัญ 4 ส่วน ได้แก่ น้ำ น้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยที่ผ่านมานิยมใช้แอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล (ethanol) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม แต่เนื่องจากแอลกอฮอล์อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ ดังนั้นผู้วิจัยสนใจเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันที่ปราศจากแอลกอฮอล์โดยใช้สารกลุ่มโพลีออล (poly-ol) เช่น โพลีลีนไกลคอล (propylene glycol) หรือโพลีเอธีลีน ไกลคอล (polyethylene glycol) ทดแทนการใช้แอลกอฮอล์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์สำหรับกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์เพื่อนำส่งทางผิวหนัง
2. เพื่อประเมินคุณลักษณะต่างๆ เช่น ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด ประจุ ความสามารถในการนำไฟฟ้า ความเป็นกรดต่าง ความสามารถในการบรรจุยา ความสามารถในการซึมผ่านทางผิวหนังของตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์ที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์ที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์

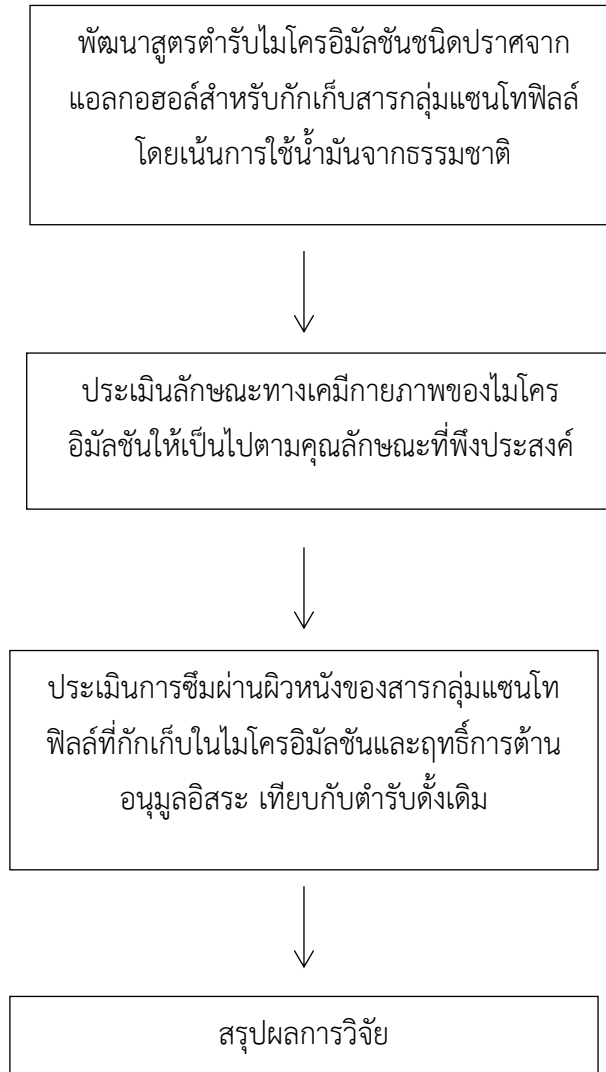
สมมติฐาน

1. น้ำมันจากธรรมชาติสามารถใช้เป็นวัตถุดิบน้ำมันในตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ได้
2. ตำรับไมโครอิมัลชันสามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ผ่านทางผิวหนังได้ดีกว่ารูปแบบดั้งเดิม
3. การกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ในไมโครอิมัลชัน ไม่ลดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสำคัญ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับความรู้เกี่ยวกับการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์
2. สามารถเพิ่มการซึมผ่านสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ทางผิวหนัง
3. เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้กับสารจากธรรมชาติ

กรอบแนวคิด



บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

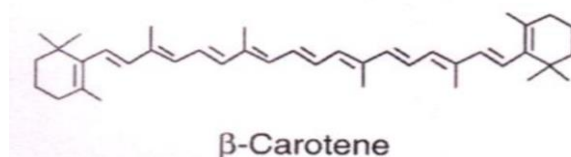
2.1 สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid)

แคโรทีนอยด์เป็นสารธรรมชาติ ซึ่งเป็นรงควัตถุที่สามารถพบในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และโครโมพลาสต์ (chromoplast) ของพืช นอกจากนี้ยังสามารถพบในสาหร่าย จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ จุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้และยังสามารถพบได้ในยีสต์หรือรา โดยมีบทบาทสำคัญหลายอย่าง เช่น ป้องกันการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระ (free radical) แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีสีส้ม สีเหลืองและแดงของพืช อีกทั้งสามารถพบสีเหล่านี้ได้ในนกบางชนิด แมลง ปลาและสัตว์จำพวกครัสเตเชียน (crustaceans)

แคโรทีนอยด์กว่า 600 ชนิดสามารถพบได้ในธรรมชาติ โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) จำนวน 8 หน่วยที่เกิดพันธะโคเวเลนต์กันแล้วทำให้เกิดคอนจูเกชันของพันธะคู่เป็นสายยาว (extensive conjugated double bond)(6-7)

แคโรทีนอยด์สามารถจำแนกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่(7-9)

1. กลุ่มแคโรทีน (carotenes หรือ hydrocarbon carotenoids) เป็นสารสีแดงหรือส้มมีโครงสร้างเป็นไฮโดรคาร์บอนซึ่งในโมเลกุลประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น ทำให้เป็นสารที่ไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมันตัวอย่างของแคโรทีนในกลุ่มนี้เช่น เบต้าแคโรทีน (β -carotene) เบต้าแคโรทีนเป็นสารชนิดหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ มีสีส้มถึงแดง มีคุณสมบัติไม่ละลายทั้งในน้ำและในแอลกอฮอล์ แต่สามารถละลายได้ดีในคลอโรฟอร์มและไขมัน โครงสร้างทางเคมีของเบต้าแคโรทีนจะประกอบด้วยโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วยโมเลกุล isoprene 8 unit ต่อกัน ดังรูปที่ 1 ซึ่งเบต้าแคโรทีนเป็นโมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 536.7 g/mol(10)



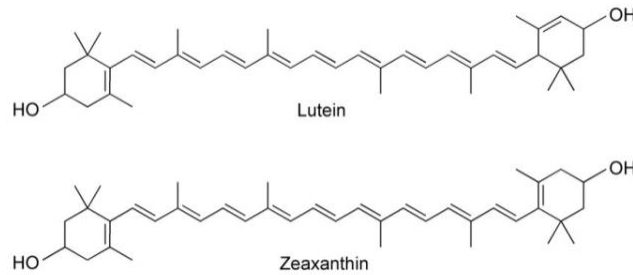
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเบต้าแคโรทีน

2. กลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls หรือ oxygenated carotenoids) เป็นสารสีเหลืองหรือสีน้ำตาล ในโครงสร้างประกอบไปด้วยอะตอมของออกซิเจนอยู่อย่างน้อย 1 อะตอม จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่ากลุ่มแคโรทีนอยด์ แคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทีน (zeaxanthin) ฟูโคแซนทีน (fucoxanthin) และแอสตาแซนทีน (astaxanthin)

2.1 ลูทีน (Lutein) และซีแซนทีน (Zeaxanthin)

ลูทีนและซีแซนทีนเป็นสารแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแซนโทฟิลล์ มีสีเหลืองถึงส้ม สามารถพบลูทีนได้ในผักใบเขียวเช่นผักขม ผักชี ผักชีฝรั่ง ผักคะน้าหรือในไข่แดงที่สุกและสามารถพบซีแซนทีนได้ในแป้งข้าวโพด พริก ส้ม และไข่แดงที่สุก ลูทีนและซีแซนทีนมีโครงสร้างที่คล้ายกัน ดังรูปที่ 2

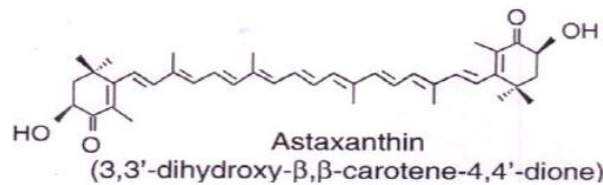
ลูทีนมีบทบาทสำคัญในการลดอัตราการเกิดและลดความรุนแรงของโรคที่เกี่ยวข้องกับตาได้ เช่น การเสื่อมของดวงตาในผู้สูงอายุ (age-related macular degeneration, AMD) และต้อกระจก(11-12)



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของลูทีนและซีแซนทีน⁽¹²⁾

2.2 แอสตาแซนทีน (astaxanthin)

เป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีสีชมพูถึงแดงและสามารถละลายได้ดีในไขมัน มีสูตรเคมีคือ 3, 3'-dihydroxy- β , β -carotene-4, 4'-dione ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแอสตาแซนทีน(10)

แอสตาแซนทีนมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{40}H_{52}O_4$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 596.84 g/mol สามารถพบแอสตาแซนทีนได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีสีชมพูถึงแดง เช่น ปลาแซลมอน กุ้งมังกร กุ้งน้ำจืด ปู รวมไปถึงนกฟลามิงโกสีชมพูและนกกระสา อีกทั้งยังสามารถพบในพืช สาหร่าย ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถสร้างแอสตาแซนทีน ในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* พบว่ามีปริมาณการสร้างและสะสมของแอสตาแซนทีนมากที่สุดในสภาวะเครียด เช่น ภาวะการขาดสารอาหารอย่างเฉียบพลัน, ภาวะมีปริมาณเกลือมากหรือ pH สูงและการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ(13) โดยแอสตาแซนทีนที่พบในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* จะมี 70–90% ในรูป conjugated กับ monoesters 8% ในรูป conjugated กับ diester และ 2% ในรูป free form นอกจากนี้แอสตาแซนทีนยังมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระผ่านกลไกที่แตกต่างกัน เช่น ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของออกซิเจนโมเลกุล

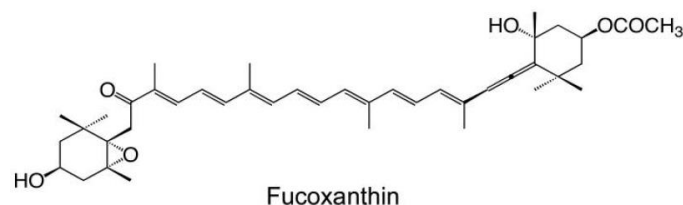
เดี่ยว การกำจัดอนุมูลอิสระ การเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน การยับยั้ง lipid peroxidation (LPO) และการควบคุมการแสดงออกของยีน (3,10,13,14)

จากงานวิจัยของ Wataru Miki และคณะ(15) ที่ศึกษาถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนทินด้วยวิธี Singlet oxygen quenching activities พบว่าแอสตาแซนทินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว ($^1\text{O}_2$) มากกว่าสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ เช่น ลูทีน ซีแซนทินและเบต้าแคโรทีนถึง 10 เท่า

จากงานวิจัยของ Nobuyoshi Shimidzu และคณะ(16) พบว่าแอสตาแซนทินสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว ($^1\text{O}_2$) โดยมีประสิทธิภาพสูงกว่าเบต้าแคโรทีนถึง 40 เท่าและพบว่าสารกลุ่มแคโรทีนอยด์มีประสิทธิภาพสูงกว่าเบต้าแคโรทีนถึง 35-540 เท่า

2.3 ฟุโคแซนทิน (fucoxanthin)

เป็นสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ มีสีส้มถึงแดง พบมากในสาหร่ายสีน้ำตาลเช่น *Undaria pinnatifida* (Japanese Wakame) *Saccharina japonica* (Japanese Makonbu) และ *Sargassum fulvellum* (Japanese Hondawara) ซึ่งนิยมรับประทานเป็นอาหารในประเทศแถบเอเชีย นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม diatoms (Bacillariophyta) และ Chromophyta (Heterokontophyta หรือ Ochrophyta)(17) ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับฟุโคแซนทินเพิ่มขึ้นแล้วพบว่ามีฤทธิ์ที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ การยับยั้งการเกิดภาวะโรคอ้วน การยับยั้งการเกิดภาวะโรคเบาหวาน ฤทธิ์ต้านมะเร็ง(18) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(4,18-20) ซึ่งฟุโคแซนทินมีโครงสร้างทางเคมีที่เป็นเอกลักษณ์ได้แก่ allene bond, 5,6-monoepoxide และ กลุ่ม acetylated ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของฟุโคแซนทิน(21)

ฟุโคแซนทินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยการกำจัด reactive oxygen species ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ของฟุโคแซนทิน ทำโดยสกัดสารจาก *H. fusiformis* *C. okamuranus* *U. pinnatifida* และ *S. Fulvellum* พบว่ามีการแสดงถึงฤทธิ์ในการกำจัด DPPH radical ที่สูง(22,23)

จากการศึกษาของ Airanthi และ คณะ(24) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับ total phenolic content fucoxanthin content radical scavenging activities (DPPH peroxy radical ABTS and nitric oxide), และฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ในระบบ liposome ของสาหร่ายสีน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด โดยใช้เมทานอล (methanol) ในการสกัด พบว่า *C. hakodatensis* เป็นแหล่งที่สามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณฟีนอลิกที่สูงและยังรวมถึงปริมาณของฟูโคแซนทินที่แสดงให้เห็นถึงการทำงานร่วมกันในการต้านอนุมูลอิสระของฟีนอลและฟูโคแซนทิน นอกจากนี้ในการศึกษาของ Sachindra et al. และคณะ(25) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของฟูโคแซนทินและmetabolites ได้แก่ ฟูโคแซนทินอล (fucoxanthinol) และ ฮาลอซินเทียแซนทิน (halocynthiaxanthin) ในหลอดทดลองที่ดูฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ(DPPH, ABTS, hydroxyl radical and superoxide radical) และการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว ($^1\text{O}_2$) พบว่า fucoxanthin และ fucoxanthinol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหรือเท่ากับ α -tocopherol และ halocynthiaxanthin แต่ฟูโคแซนทินมีฤทธิ์ในการกำจัด hydroxyl radical มากกว่า fucoxanthinol halocynthiaxanthin และ α -tocopherol 7.9 16.3 และ 13.5 เท่าตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าฤทธิ์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว ($^1\text{O}_2$) ของฟูโคแซนทินน้อยกว่า β -carotene

2.2 ข้อมูลทั่วไปของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

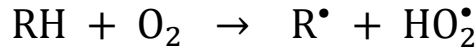
2.1 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ หมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล ซึ่งพบในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์โดยจะสามารถพบอย่างมากในกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์หรือกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยอนุมูลอิสระจะมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆภายในร่างกาย แล้วยังสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอกสามารถกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระได้ เช่น ความเครียดหรือมลพิษต่างๆ

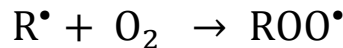
สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่สามารถยับยั้งกระบวนการออกซิไดซ์ของอนุมูลอิสระหรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) หรือการเสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เป็นต้น(26)

การเกิดสารอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 3 ระยะ

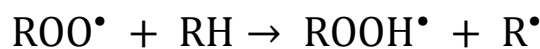
1. Initiation เป็นระยะแรกในการก่อตัวของสารอนุมูลอิสระโดยมีสิ่งกระตุ้นคือ ความร้อน แสงและรังสี ดังสมการ



2. Propagation เป็นช่วงที่เพิ่มจำนวนของสารอนุมูลอิสระโดยสารอนุมูลอิสระไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจนและเกิดเป็น peroxy ดังสมการ



3. Termination เป็นระยะสุดท้ายของการเกิดสารอนุมูลอิสระโดย peroxy จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระแต่จะเข้าจับกับไฮโดรเจนทำให้ตัวสารอนุมูลอิสระเสถียรขึ้น ดังสมการ



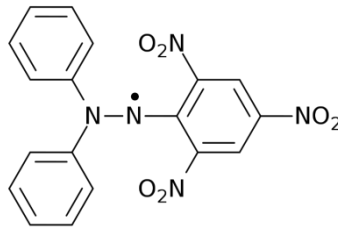
สารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นสารที่ทำการยับยั้งกระบวนการเกิดออกซิเดชันโดยสารเหล่านี้มีกลไก แตกต่างกันไปหลายแบบ เช่น การดักจับ (scavenger) สารอนุมูลอิสระโดยตรงและยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นต้น โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะถูกแบ่งเป็น 2 ประเภทตามการออกฤทธิ์

1. สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (primary antioxidant) จะไปรบกวนกระบวนการในขั้นตอน propagation โดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน เพื่อไปเพิ่มความเสถียรของอนุมูลอิสระโดยตัวอย่างของสารที่ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว คือสารกลุ่ม phenolic เช่น flavonoids eugenols เป็นต้น

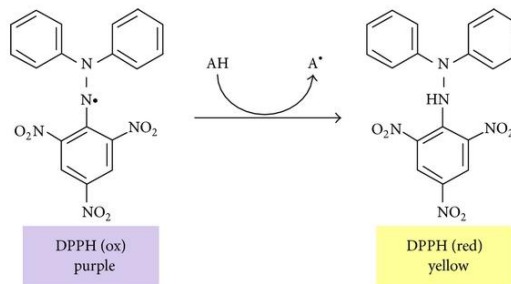
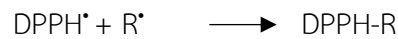
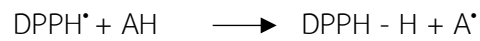
2. สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ (secondary antioxidant) จะไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงแต่จะช่วยในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในรูปแบบต่าง ๆ เช่น จับกับ เหล็ก (Fe^{2+}) ดักจับออกซิเจน แต่สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ สามารถจับอนุมูลอิสระที่เกิดจากแสงและUV ได้

2.1.1 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระ(26)

2.1.1.1 วิธีที่ 1 DPPH assay (scavenging capacity assay) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable free radical ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง DPPH เป็นสารที่ไม่ชอบน้ำจึงเกิดปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ เกิดปฏิกิริยากับ radicals ทำให้สารสีม่วงจางลงเป็นสีเหลือง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 nm

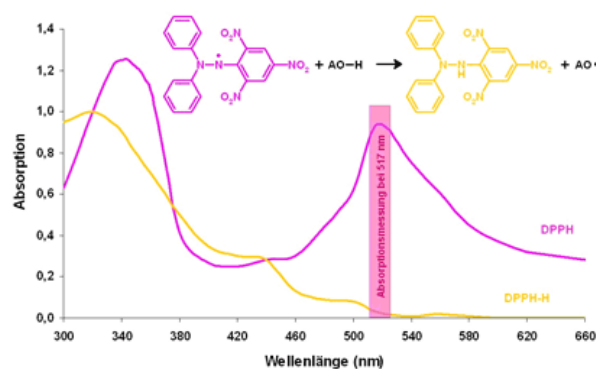


รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl โดย DPPH จะทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชัน (AH) ได้ดังสมการนี้



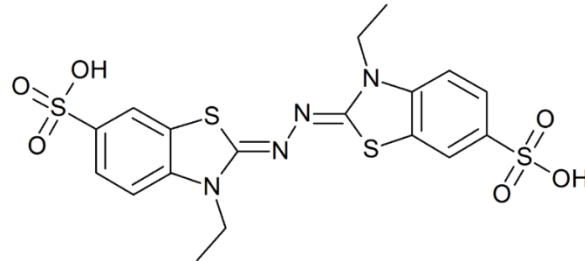
รูปที่ 6 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH กับสารต้านออกซิเดชันแล้วเกิดการเปลี่ยนสีจากสีม่วง เป็นสีเหลือง

ถ้าสารตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงสีม่วงจะจางลง โดยจะรายงานการทดลองเป็นค่า 50% Inhibitory Concentration (IC_{50}) แสดงถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ $\text{DPPH}^\bullet$ เหลืออยู่ 50%



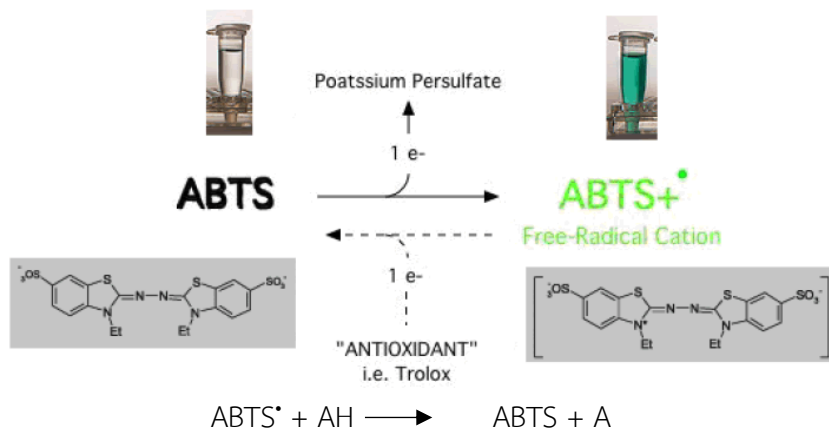
รูปที่ 7 แสดงการเกิดปฏิกิริยา DPPH กับสารต้านออกซิเดชันแล้วส่งผลให้สารสีม่วงจางลงเป็นสีเหลืองและดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 515-517 nm

2.1.1.2 วิธีที่ 2 ABTS assay หรือ 2, 2-Azino-bis (3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical scavenging assay เป็นสารสังเคราะห์สารที่มีสีเขียวสามารถดูดกลืนแสงได้ที่มีความยาวคลื่น 734 nm



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของ 2, 2 -Azino-bis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

โดยสารต้านออกซิเดชัน (AH) จะทำกับปฏิกิริยากับ ABTS ดังนี้

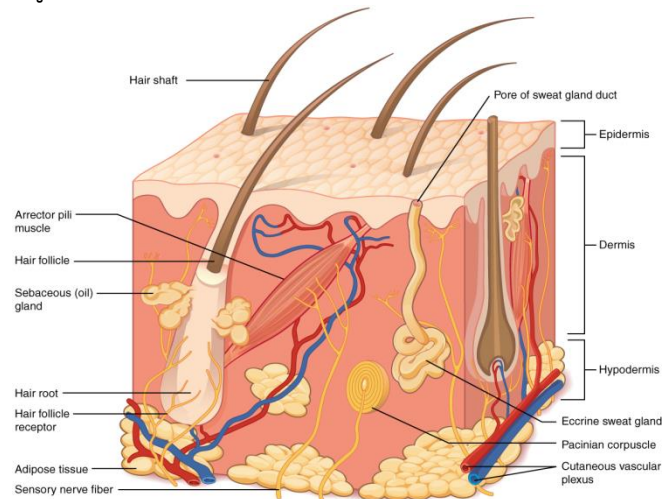


รูปที่ 9 แสดงการเกิดปฏิกิริยาเคมีของ ABTS

ในการรายงานผลการทดลองความเข้มข้นของสารละลายสีเขียวลดลง โดยจะรายงานผลการทดลองหมายความว่า ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS•+ เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลการทดลองเป็น Inhibitory concentration (IC₅₀) จากนั้นจะนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทร็อกซ์จะได้ค่าต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐานโทร็อกซ์ (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)

2.3 ผิวหนัง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกายมีพื้นที่ประมาณ 1.6 - 1.9 ตารางเมตร มีโครงสร้างซับซ้อนและมีหน้าที่สำคัญต่างๆ เช่น ปกป้องร่างกายจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่อาจก่อให้เกิดอันตราย รักษาสมดุลของร่างกาย โดยผิวหนังจะห่อหุ้มร่างกาย ปกป้องการสูญเสียน้ำออกจากร่างกาย และทำหน้าที่รับรู้ความรู้สึกต่างเช่น ความร้อน ความเจ็บปวด เป็นต้น(27,28)



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของผิวหนัง (28)

โครงสร้างของผิวหนัง(28) ประกอบไปด้วย 3 ชั้น ได้แก่

1.หนังกำพร้า (Epidermis)

เป็นผิวหนังที่อยู่ด้านบนสุดของชั้นผิวหนังทั้งหมด ประกอบไปเนื้อเยื่อแตกต่างกัน 5 ชั้น จากชั้นด้านในสุดถึงด้านนอกสุด ได้แก่ 1.สตราตัมเบเซล (stratum basale) 2.สตราตัมสไปโนซั่ม (stratum spinosum) 3.สตราตัมแกรนูโลซั่ม (stratum granulosum) 4. สตราตัมลูซิเดียม (stratum lucidum) และ 5.สตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) โดยที่เซลล์ใหม่จะถูกสร้างจากชั้นล่างสุดติดกับหนังแท้และเจริญเติบโตขึ้นแล้วเคลื่อนตัวมาทดแทนเซลล์ที่อยู่ชั้นบนจนถึงชั้นบนสุดแล้วก็กลายเป็นซีไคล (corneocyte) หลุดลอกออกไป นอกจากนี้ในชั้นหนังกำพร้ายังมีเซลล์ เรียกว่า เมลาโนไซต์ (melanocyte) ปะปนอยู่ด้วย เมลาโนไซต์จะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับบุคคลและเชื้อชาติ จึงทำให้สีผิวของคนแตกต่างกันไป

2. หนังแท้ (Dermis)

เป็นชั้นที่อยู่ระหว่างชั้นหนังกำพร้ากับชั้นไขมันใต้ผิวหนัง เป็นชั้นที่กำหนดความหนาของผิวหนังบริเวณต่างๆของร่างกาย ดังนั้นจึงเป็นส่วนสำคัญในการพัฒนาความรู้ด้านเครื่องสำอาง ชั้นหนังแท้จะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เชื่อมโยงกัน โดยมีเส้นใยคอลลาเจน (collagen) เป็น

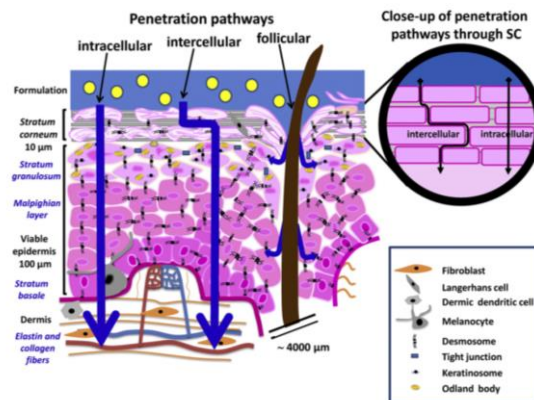
องค์ประกอบหลัก ที่ทำหน้าที่พยุงผิวหนังให้มีความแข็งแรง และเส้นใยอีลาสติน (elastin) ที่ทำหน้าที่เพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่ผิวหนัง นอกจากนี้ ยังมีโครงสร้างอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น ปลายประสาท เส้นเลือด ท่อน้ำเหลือง และ ต่อมเหงื่อ เป็นต้น

3. ชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (Hypodermis หรือ subcutaneous fat)

เป็นผิวหนังที่อยู่ด้านในสุดถัดจากชั้นหนังแท้และองค์ประกอบอื่นๆ ภายในร่างกาย ชั้นใต้ผิวหนังนี้จะมียูอยู่เกือบทั่วทุกบริเวณของร่างกาย ยกเว้นบางบริเวณ เช่น เปลือกตา ชั้นใต้ผิวหนังนี้จะประกอบไปด้วย fat cells เป็นหลัก โดยมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจัดเรียงตัวแบบหลวมๆ

ซึ่งการให้ยาทางผิวหนังจะมีการแพร่ผ่านเข้าไปในชั้นผิวหนังต่างๆ (27,29) ตามเส้นทางดังต่อไปนี้

1. ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของผิวหนังกำพร้า (intercellular pathway)
2. ผ่านทางเซลล์ของผิวหนังกำพร้า (intracellular pathway หรือ Transcellular pathway)
3. ผ่านทางรูเปิดหรือท่อบนผิวหนัง (transappendageal pathway หรือ follicular pathway) เช่น รูขุมขน ท่อของต่อมเหงื่อ เป็นต้น



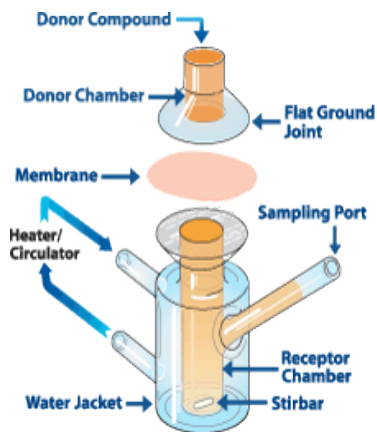
รูปที่ 11 แสดงเส้นทางการซึมผ่านผิวหนังของสาร (30)

ระบบนำส่งยาทางผิวหนังถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญในปัจจุบัน นอกเหนือจากการให้ยาในรูปแบบรับประทานและการให้ยาโดยการฉีด ซึ่งมีข้อดี เช่น สามารถหลีกเลี่ยงการถูกทำลายของยาที่ทางเดินอาหาร จากความเป็นกรดของกระเพาะอาหารหรือจากเอนไซม์ต่างๆ สามารถหลีกเลี่ยงการถูกทำลายของยาที่ตับ (first-pass metabolism) ลดอาการข้างเคียง เช่น อาการคลื่นไส้อาเจียน อีกทั้งผู้ป่วยยังสามารถบริหารยาได้ด้วยตนเอง (32)

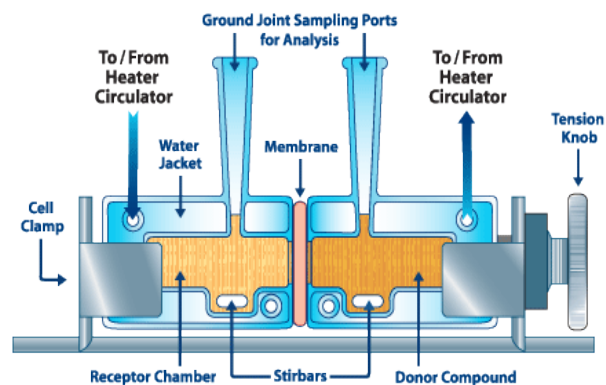
3.1 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนัง (5,28)

ปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับการซึมผ่านผิวหนังเพื่อนำส่งยาและเครื่องสำอางอย่างกว้างขวางในการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสารแบ่งได้เป็น วิธีที่ 1 การศึกษาในร่างกาย (*in vivo*) จะมีข้อดีกว่าการศึกษานอกร่างกาย (*in vitro*) เนื่องจากให้ผลในการศึกษาตรงกับสภาพความเป็นจริงมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังในมนุษย์นั้นทำได้ยาก และวิธีที่ 2 การศึกษานอกร่างกาย (*in vitro*) เป็นวิธีที่สะดวกมากกว่า โดยการนำผิวหนังที่ตัดออกมาจากมนุษย์หรือสัตว์ทดลองที่สามารถนำมาอนุมานผลการศึกษาจากสัตว์ทดลองไปสู่มนุษย์ โดยการทดลองจะใช้การแพร่ผ่านเซลล์ (diffusion cell) ซึ่งการศึกษานอกร่างกาย (*in vitro*) จะมีความยุ่งยากซับซ้อนของการทำการวิจัยน้อยกว่าการศึกษาในร่างกาย (*in vivo*) ถึงแม้ว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโดยวิธีการศึกษานอกร่างกายอาจไม่สามารถใช้ในการสรุปเกี่ยวกับการศึกษาการซึมผ่านได้ทุกประเด็น แต่สามารถทำนายแนวโน้มของการซึมผ่านผิวหนังของยาในสิ่งมีชีวิตได้

การศึกษาการแพร่ผ่านเซลล์ (diffusion cell) โดยใช้อุปกรณ์มีอยู่ด้วยกันหลายประเภท แต่นิยมใช้มี 2 ชนิดได้แก่ 1.Vertical diffusion cell และ 2.Horizontal diffusion cell ดังรูปที่ 12 และ 13 ซึ่งอุปกรณ์ประกอบไปด้วย Donor phase Receptor phase Skin temperature jacket control และ sampling port หลักการทำงานของอุปกรณ์คือ วางผิวหนัง (membrane) ระหว่างส่วนผู้ให้ (donor chamber) และส่วนตัวรับ (receptor chamber) โดยให้หนังกำพร้าสัมผัสกับส่วนผู้ให้ ซึ่งใช้บรรจุสารละลายผู้ให้หรือตำรับยา และหนังแท้สัมผัสกับส่วนตัวรับ ซึ่งบรรจุสารละลายตัวรับเช่นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 หรืออะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5 และใช้แท่งแม่เหล็กคนเพื่อให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันตลอดเวลาและควบคุมอุณหภูมิของการทดสอบโดยใช้น้ำที่มาจากเครื่องควบคุมอุณหภูมิไหลเวียนผ่านด้านนอกภาชนะบรรจุสารละลายที่ทำจากแก้วสองชั้น หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างจากสารละลายตัวรับที่เวลาต่างๆ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารที่ซึมผ่านผิวหนังและเติมสารละลายตัวรับใหม่ทดแทนในปริมาณที่เท่ากัน



รูปที่ 12 Vertical diffusion Cell



รูปที่ 13 Horizontal diffusion Cell

3.2 ปัจจัยที่ส่งผลเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนัง (28)

ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมเป็นชั้นบนสุดของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า ที่มีบทบาทมากที่สุดในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ดังนั้นจึงมีวิธีการต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาผ่านทางผิวหนัง มี 5 วิธี ดังรูปที่ 14

2.4 การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชัน เป็นระบบการกระจายตัวของของเหลวสองชนิดที่ไม่เข้ากัน โดยของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวเป็นหยดเล็กที่มีขนาดประมาณ 10 – 100 นาโนเมตรที่อยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเห็นเป็นของเหลวที่มีเนื้อเดียวกัน และมีลักษณะโปร่งใสเมื่อมองด้วยตาเปล่า โดยไมโครอิมัลชันมีส่วนประกอบเป็น น้ำมัน น้ำ สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ซึ่งเป็นระบบจตุรภาค โดยไมโครอิมัลชันสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ

1. ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water (o/w))
2. ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil (w/o))
- และ 3. โครงสร้างต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous structure) (5)

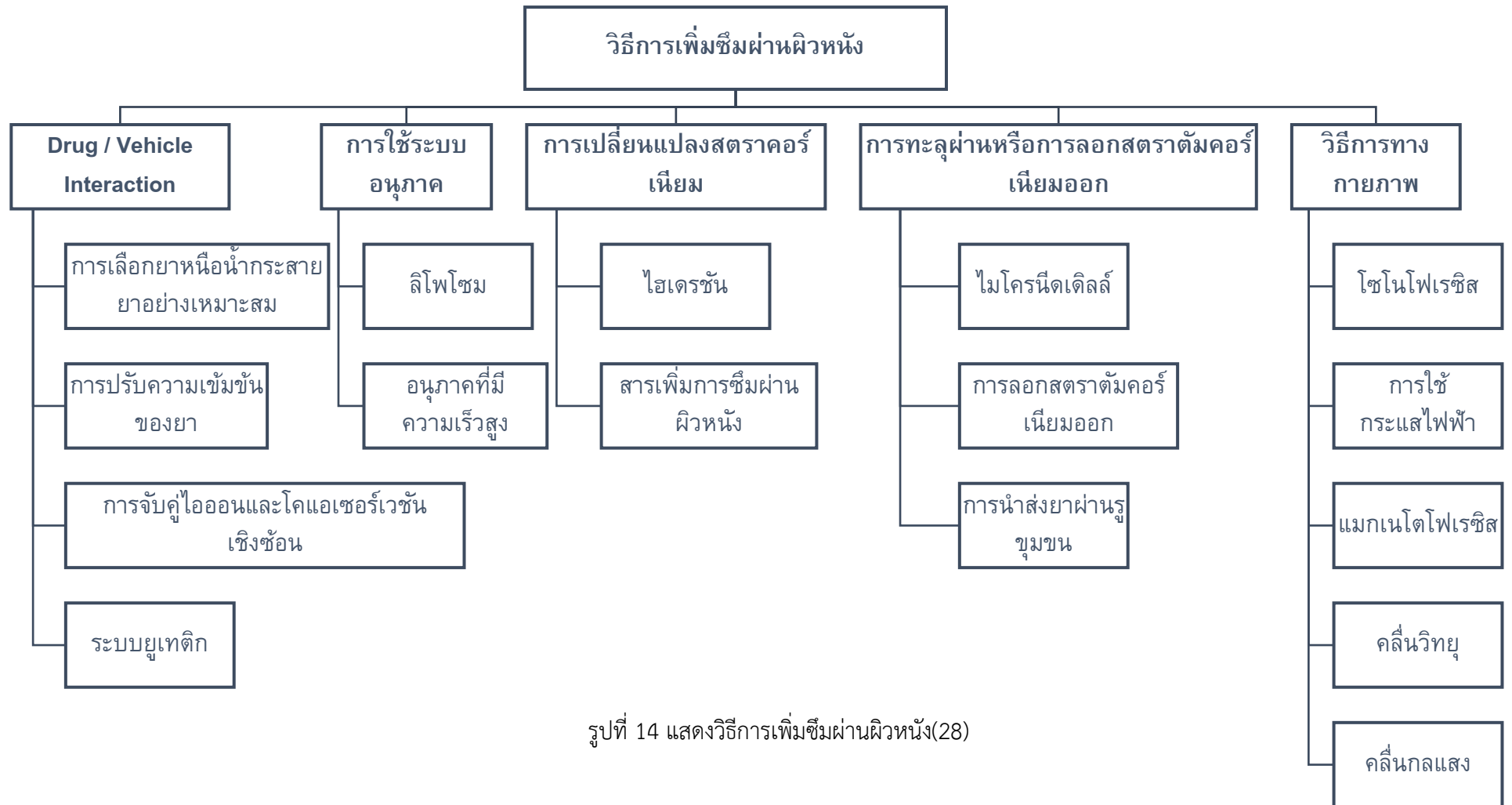
ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างระหว่างไมโครอิมัลชันกับอิมัลชันทั่วไป

ไมโครอิมัลชัน	อิมัลชัน
มีเสถียรภาพทางอุณหพลศาสตร์ (Thermodynamically stable)	ไม่มีเสถียรภาพทางอุณหพลศาสตร์ (Thermodynamically unstable)
มีความคงตัวสูงกว่า ไม่เกิด Coalescence	เสถียรภาพคงตัวง่าย เกิด Coalescence
ของเหลวใส (clear / transparent)	ของเหลวขุ่น (milky white)
ขนาด 10 – 100 nm	ขนาด 250 – 10,000 nm
เตรียมง่าย เกิดขึ้นเองโดยไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานจากภายนอก	เตรียมโดยใช้พลังงานจากภายนอก
กระจายแสงไปในทิศทางเดียวกัน (single optically isotropic)	กระเจิงแสง (light scattering)

ข้อดีและข้อเสียของไมโครอิมัลชัน

ข้อดี

1. สามารถเพิ่มการละลายของยาทั้งยาละลายน้ำน้อยและยาที่ละลายน้ำได้ดี
2. ใช้พลังงานในการเตรียมต่ำเป็นระบบที่มีความเสถียรภาพทางอุณหพลศาสตร์ และมีความคงตัวที่ดีโดยไม่ขึ้นกับกระบวนการเตรียม
3. เพิ่มอัตราการดูดซึมยาและเพิ่มชีวประสิทธิภาพ
4. บริหารยาเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง
5. ช่วยป้องกันตัวยาที่ถูกทำลายได้ง่ายจากการเกิดไฮโดรลิซิสโดยน้ำหรือออกซิเดชันโดยอากาศ โดยการห่อหุ้มยาไว้ในวัสดุภาวภายใน
6. ขนาดอนุภาคภายใน 10- 100 nm สามารถทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 μm ได้



ข้อเสีย

1. ไมโครอิมัลชันจำเป็นต้องใช้สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมในปริมาณมาก
2. มีข้อจำกัดในการช่วยการเพิ่มการละลายยาที่มีจุดหลอมเหลวสูง
3. สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ต้องไม่เป็นพิษ
4. ความคงตัวของไมโครอิมัลชันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและpH

4.1 การเลือกน้ำมัน

น้ำมันถือเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของตำรับไมโครอิมัลชันโดยส่วนมากจะเป็นน้ำมันที่ได้มาจากธรรมชาติ ทั้งน้ำมันและน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากมีความปลอดภัยและเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์ อย่างไรก็ตามน้ำมันกึ่งสังเคราะห์จากธรรมชาติก็สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบน้ำมันได้เช่นกัน

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของน้ำมันที่มีการนำมาใช้ในตำรับไมโครอิมัลชันชนิดใช้เฉพาะที่ (32)

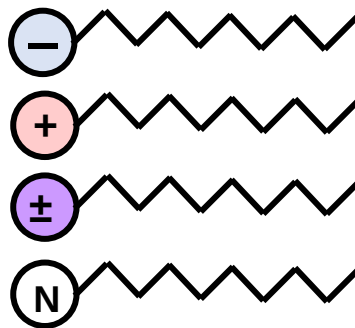
Natural oil
Teatree oil
Soyabean oil
Jojoba oil
Eucalyptus oil
Seasame oil
Babchi oil
Semi-synthetic oil
Medium chain triglycerides (cap/cpyl)
Isopropyl myristate
Ethyl oleate
Lauryl alcohol
Tocopherol acetate
PEG-40 hydrogenated castor oil
Oleic oil

4.2 การเลือกสารลดแรงตึงผิวและการเลือกสารลดแรงตึงผิวร่วม

สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) หรือ surface active agents เป็นสารเพิ่มการซึมผ่านของผิวหนังที่โครงสร้างหลักประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนไฮโดรคาร์บอนสายตรงที่ชอบไขมันต่ออยู่กับส่วนหัวที่ชอบน้ำ สารลดแรงตึงผิวสามารถจำแนกตามชนิดของประจุได้ 4 ชนิด(28) ได้แก่

1. สารลดแรงตึงผิวประจุลบ (anionic surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประจุไฟฟ้าบน hydrophilic สามารถให้ประจุลบ เช่น Sodium dodecyl sulphate (SDS) Sodium lauryl sulfate(SLS) Sodium oleate (NaO) และ Hexadecyl dihydrogen phosphate

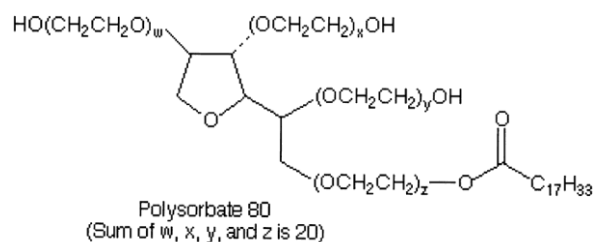
2. สารลดแรงตึงผิวประจุบวก (cationic surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประจุไฟฟ้าบน hydrophilic สามารถให้ประจุบวก เช่น Cetrimonium bromide (CTAB) Cetylpyridinium chloride (CPC) และ Benzalkonium chloride (BAC) เป็นต้น
3. สารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและลบ (zwitterionic surfactant หรือ amphoteric surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประจุที่ไฟฟ้าบน hydrophilic สามารถให้ได้ทั้งประจุบวกและลบ โดยจะแสดงคุณสมบัติได้ขึ้นอยู่กับ pH เช่น Dodecyl betaine และ Lecithin เป็นต้น
4. สารลดแรงตึงผิวไร้ประจุ (non-ionic surfactant) เป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุ เช่น Sorbitan ester Polysorbate Glycol และ Polyoxalkols ทั้งนี้ข้อดีของสารกลุ่มนี้คือไม่เป็นพิษ มีอันตรกิริยากับยาหรือสารอื่นน้อย ตลอดจนกับผิวหนังน้อยกว่า ทำให้เกิดความปลอดภัยมากกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุ



รูปที่ 15 แสดงชนิดของสารลดแรงตึงผิวประเภทต่างๆ

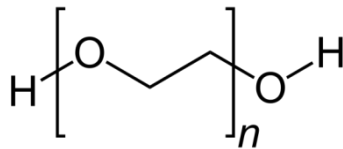
ดังนั้นผู้วิจัยที่มีความสนใจในการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวไร้ประจุในการศึกษาครั้งนี้โดย Tween® 80 เป็นหนึ่งในสารลดแรงตึงผิวไร้ประจุที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมกันมากที่สุด โดยเฉพาะในตำรับไมโครอิมัลชันที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการเพิ่มการละลายของยาที่มีค่าการละลายต่ำ โดยโครงสร้าง Tween® 80 ดังรูปที่ 16 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 1,310 g/mol มีรสขม สีเหลืองอำพัน ปริมาณที่ใช้เป็นสารก่ออิมัลชัน (Emulsifying agent) ประมาณ 1-15% ของความเข้มข้นรวม มี Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) เท่ากับ 15 ซึ่ง Tween® เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ทนต่อ electrolytes และ กรด-ด่างอ่อน (33)

จากการศึกษา Gurpreet Kaur และคณะ(34) พบว่า ในตำรับที่ใช้ Polysorbate เป็นสารลดแรงตึงผิวในตำรับไมโครอิมัลชันนั้นมีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดอันตราย อีกทั้งสามารถเพิ่มความสามารถในการละลาย เพิ่ม bioavailability และเพิ่มการซึมผ่านของยา



รูปที่ 16 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Tween® 80 (35)

PEG 400 หรือ polyethylene glycol มีลักษณะเป็นของเหลว หนืดและใส สามารถละลายได้ดีในน้ำ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 380-420 g/mol ความหนาแน่นประมาณ 1.120 g/cm³ จุดเยือกแข็งประมาณ 4-8 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้ดีในน้ำและละลายได้ใน acetone alcohol benzene glycerin และ glycol แต่ไม่สามารถละลายได้ในไขมัน น้ำมันที่ระเหยยาก (fixed oil) และ mineral oil



รูปที่ 17 แสดงโครงสร้าง polyethylene glycol

PEG 400 สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัยทางเภสัชภัณฑ์เนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีพิษและไม่ระคายเคืองผิว(33) โดยการศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวและแรงตึงผิวร่วมระหว่าง PEG 400 และ Tween®80 จากงานวิจัยของ Jianfei He และคณะ(36) การเพิ่มการละลายของ oxyresveratrol โดย Tween®80 และ PEG400 สามารถทำให้ oxyresveratrol ละลายด้วยค่าการละลายสูงสุด จึงนำไปพัฒนาต่อเพื่อตั้งตำรับไมโครอิมัลชันโดยการเลือกตำรับที่ดีที่สุดจะเลือกโดยมีเกณฑ์คือ ตำรับต้องโปร่งใส มีความคงตัว การประเมินตำรับต่างๆ เช่น ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และดูความเหมาะสมของแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudoternary phase diagram) โดยใช้ Tween®80 และ PEG 400 เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมในอัตราส่วน 2:1 และ ethyl butyrate ในอัตราส่วน S_{mix} : ethyl butyrate เท่ากับ 4:1 ได้ตำรับไมโครอิมัลชันที่โปร่งใส มีการไหลที่ดี มีกลิ่นไม่ฉุน และมีการประเมินตำรับในหัวข้อต่างๆได้ในระดับที่พอใจ แล้วการใช้ Tween®80 และ PEG 400 ยังเพิ่มการละลายของ oxyresveratrol ได้ถึง 22 เท่าเมื่อเทียบกับน้ำ เมื่อศึกษาด้านความคงตัวพบว่าตำรับ oxyresveratrol ไมโครอิมัลชันเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีเหลืองเข้ม คณะผู้วิจัยจึงเติม ascorbic acid เพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับตำรับ เมื่อศึกษาด้านฤทธิ์ anti-browning effect พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันของ oxyresveratrol นั้นยังคงมีฤทธิ์ anti-browning แต่เมื่อเพิ่ม ascorbic acid พบว่ามีฤทธิ์ anti-browning เพิ่มขึ้น

4.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตั้งตำรับ

จากการศึกษาของ Nauman Khalid และคณะ(37) ได้มีการศึกษาการเตรียมตำรับ o/w nanoemulsions โดยเป็นการเปรียบเทียบระหว่าง sodium caseinate กับ Modified lecithin เป็นสารก่ออิมัลชันโดยมีการเตรียมเป็นวัตถุดิบน้ำมันที่ใช้ refined soybean oil แล้วละลาย 4% (w/w) Zanthin® (Astaxanthin purity 10%) รวมกับน้ำมัน ส่วนวัตถุดิบน้ำจะละลาย 2.0% (w/w) สารก่ออิมัลชัน รวมกับ deionized water ที่มี 0.02% (w/w) sodium azide และปั่นผสมด้วยเครื่อง high-pressure homogenizer ในอัตราส่วนวัตถุดิบน้ำมันกับวัตถุดิบน้ำ 1:9 จนเกิด o/w nanoemulsions พบว่ามีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของนาโนอิมัลชันที่ใช้ modified lecithin และ sodium caseinate เท่ากับ 163 ± 5 and 144 ± 12 nm นาโนอิมัลชันที่ใช้ modified lecithin นั้นมีความคงตัวมากกว่า โดยช่วงของ pH ที่กว้างและสามารถทนความร้อนได้ในช่วง 60–120 องศาเซลเซียส แต่นาโนอิมัลชันที่ใช้ modified lecithin มี droplet growth ที่สูงเมื่อเพิ่มความเข้มข้น NaCl ในทางตรงกันข้าม นาโนอิมัลชันที่ใช้ sodium caseinate มีความคงตัวที่ pH 4 และที่มีความเสถียรเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl สูงขึ้น (500 mM) นาโนอิมัลชันที่ใช้ sodium caseinate นั้นมีความคงตัวทางกายภาพและเคมีที่ดีกว่าหลังจากเก็บไว้ 30 วัน แต่ความเข้ากันของแอสตาแซนทินใน modified lecithin (33%) มากกว่า sodium caseinate (6%) อย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาของ Gaofeng Shua และคณะ(38) ได้มีการศึกษาเตรียมตำรับและลักษณะต่างๆ ของ o/w nanoemulsions โดยใช้ ginseng saponins เทียบกับ Tween®20 เป็นสารก่ออิมัลชัน โดยมีการเตรียมเป็นวัตถุดิบน้ำมันที่ใช้ refined soybean oil แล้วละลาย 2% (w/w) Zanthin® (Astaxanthin purity 10%) รวมกับน้ำมัน ส่วนวัตถุดิบน้ำจะละลาย 1.0% (w/w) สารก่ออิมัลชัน รวมกับ deionized water ที่มี 0.02% (w/w) NaN_3 และปั่นผสมด้วยเครื่อง high-pressure homogenizer ในอัตราส่วนวัตถุดิบน้ำมันกับวัตถุดิบน้ำ 0.5:9.5 จนเกิด o/w nanoemulsions พบว่า มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของนาโนอิมัลชันที่ใช้ ginseng saponins เทียบกับ Tween® 20 เท่ากับ 125 ± 2 nm และ 145 ± 6 nm นาโนอิมัลชันที่ใช้ ginseng saponins มีขนาดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 30–120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และมีช่วง pH ที่แคบ (ช่วง 6-8) นั้นมีความคงตัวและไม่มีการรวมตัวของ droplet แต่ไม่คงตัวเมื่อมีสภาวะเป็นกรด (pH 3-5) และความเข้มข้นของ NaCl (> 25 mM NaCl) อีกทั้งยังมีความคงตัวเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 30 วัน

อย่างไรก็ตามปริมาณของแอสตาแซนทินขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของเก็บรักษาเป็นอย่างมากโดยมีอัตราการสลายแอสตาแซนทินที่เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

จากการศึกษาของ Jing Dai และคณะ(39) ได้มีการศึกษาการเตรียมตำรับและความคงตัวของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่บรรจุสารสารฟิโคแซนทิน ซึ่งมีการใช้ medium chain triglyceride (MCT) เป็นวัตถุดิบน้ำมัน ในปริมาณต่ำกว่า 0.2 ใน 10 กรัมจะมีขนาดของ droplet size เล็กและเกิดการแยกชั้นน้อยที่สุด การใช้ Tween® 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว และใช้ polyethylene glycol 400 (PEG 400) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วม ในอัตราส่วน 4:1 ซึ่งใช้ปริมาณ 3.5 ใน 10 กรัม จากไมโครอิมัลชันข้างต้นสามารถบรรจุสารฟิโคแซนทิน ได้ปริมาณ 0.02 ใน

10 กรัม ซึ่งทำให้สารฟูโคแซนทินมีความคงตัวถึงร้อยละ 95 จากการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการศึกษาของ Qingxin Zhon และคณะ(40) ได้มีการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ต่อการสลายตัวของแอสตาแซนทินในตำรับ o/w microemulsions โดยมีการเตรียมเป็นวัฏภาคน้ำมันที่ใช้ ethyl butyrate oil แล้วละลาย 3% (w/v) Esterified astaxanthin รวมกับน้ำมัน ส่วนวัฏภาคน้ำ (15.0% (w/v) Tween® 80 เป็นสารก่ออิมัลชัน และมี 7.0% (w/v) ethanol รวมกับ buffer solution (pH 7) ในอัตราส่วนวัฏภาคน้ำมันกับวัฏภาคน้ำ 1:9 ด้วย High-Pressure *microfluidizer* จนเกิด o/w microemulsions จากนั้นจะมีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ (EDTA ascorbic acid และ Vitamin E acetate) พบว่า EDTA > ascorbic acid > Vitamin E acetate สามารถช่วยลดการสลายตัวของแอสตาแซนทินได้จากมากไปน้อยตามลำดับ โดยมีการวัดด้วย UV-visible spectrophotometry ($\lambda=485$ nm) และ colorimetry

จากการศึกษาของ Wantida Chaiyana และคณะ (41) ได้มีการศึกษาการพัฒนาระบบการนำส่งยาโดยใช้ไมโครอิมัลชันที่มีการใช้น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าของ *Zingiber cassumunar* เพื่อปรับปรุงความคงตัวและฤทธิ์ในการต้านอาการอักเสบ โดยมีการใช้สารลดแรงตึงผิวที่หลากหลาย เช่น Tween® 20 Triton X-114 สารผสมของ Tween® 20 กับ Span® 20 และ สารผสมของ Triton® X-114 กับ Span® 20 และใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมเป็น ethanol propan-1-ol propan-2-ol glycerin propylene glycol and polyethylene glycol และหลากหลายอัตราส่วนระหว่างวัฏภาคน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว โดยพบว่าการใช้ Tween® 20 และ propylene glycol มีความเหมาะสมมากที่สุด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

1. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
2. 2, 2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
3. Acetonitrile
4. Astrol[®] 5% w/w
5. Cinnamon oil
6. Coconut oil
7. Deionized water
8. Dichloromethane
9. Disodium hydrogen Phosphate
10. Ethanol 100%
11. Medium-chain triglyceride oil (MCT oil)
12. Methanol
13. Phosphate buffer
14. Polysorbate 80 (Tween[®] 80)
15. Polysorbate 20 (Tween[®] 20)
16. Polyethylene glycol 400 (PEG 400)
17. Potassium Chloride
18. Potassium dihydrogen orthophosphate
19. Propylene glycol (PG)
20. Purified water
21. Sodium Chloride
22. Wakame extract (Myskin receipt)

เครื่องมือ

1. Aluminum foil
2. Analytical balance (Mettler Toledo รุ่น MS 3002S)
3. Burette 100 mL
4. Beaker 25, 50, 100,150, 250, 500, 1000 mL
5. C18 reversed-phase column
6. Centrifuge
7. Cramp
8. Cylinder 10, 100, 500, 1000 mL
9. Dynamic light scattering (DLS) particle size analyzer (Zetasizer Nano-ZS; Malvern Instrument)
10. Eppendorf®
11. High-Performance Liquid Chromatography (Agilent Technologies)
12. Hot air oven (Memmert รุ่น Une)
13. Magnetic stirrer (DLAB, MS-M-S10)
14. Magnetic bar
15. Micropipette 100-1,000 μ l
16. Particle size analyzer (Mastersizer3000, Malvern Instrument)
17. Parafilm
18. Rheometer (Kinexus+Malvern)
19. Vortex mixer (รุ่น G5560E)
20. Sonicator bath (WiseClean, Wisd Laboratory Instrument)
21. Stirring rod
22. Strand
23. Suction tube No.8
24. Syringe
25. Zetasizer cells

3.1 การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชัน

3.1.1. การเลือกน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว

ในการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันจำเป็นต้องทำ Pseudo-ternary phase diagram ที่มีพื้นที่ที่กว้างจึงจำเป็นต้องศึกษาสารที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดตำรับมีขนาดเล็กจนมีเป็นไมโครอิมัลชัน โดยน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวและเลือกจากบทความวิจัย Nauman Khalid และคณะ⁽³⁷⁾ Jing Dai และคณะ⁽³⁹⁾ และสารที่ทำให้เกิดพื้นที่ Pseudo-ternary phase diagram มากที่สุดโดยได้เลือกใช้ Polysorbate 80 Polysorbate 20 และสารลดแรงตึงผิวร่วมเป็น Polyethylene glycol 400 (PEG 400) และ Propylene glycol (PG) กำหนดอัตราส่วนที่ 1:1 2:1 3:1 และ 4:1 ในการสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ทำโดยการไทเทตหยดน้ำที่ละหยดจนได้ไมโครอิมัลชัน

3.1.2 การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram

ชั่งสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมผสมให้เข้ากันจะได้สารลดแรงตึงผิวผสม (Surfactant Mixture) จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวผสมในอัตราส่วน 1:1 2:1 3:1 และ 4:1 ให้เข้ากับวัฏภาคน้ำมันโดยไทเทตน้ำที่ละหยดพร้อมกับผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer พร้อมทั้งบันทึกจำนวนหยดน้ำและสังเกตความใสของตำรับ

3.1.3 การคำนวณพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชัน

หาพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันจาก pseudo-ternary phase diagram ที่ได้โดยใช้โปรแกรม ImageJ

3.1.4 การเตรียมสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ในตำรับไมโครอิมัลชัน

การเตรียมสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ได้แก่แอสตาแซนทินและฟูโคแซนทิน โดยนำสารมาละลายในวัฏภาคน้ำมันก่อน จากนั้นเติม Surfactant mixture ลงในวัฏภาคน้ำมัน แล้วจึงเติมน้ำที่ปราศจากไอออนลงในตำรับจากนั้นและผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic stirrer เป็นระยะเวลา 10 นาที

3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของตำรับไมโครอิมัลชัน

3.2.1. การวัดขนาดอนุภาค (Particle size) การกระจายขนาด (Size distribution) ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity) และการวัดศักย์ซีตา (Zeta potential)

การวัดขนาดอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันที่ปราศจากสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารฟูโคแซนทินใช้ Dynamic Light Scattering (DLS) Particle size analyzer (Zetasizer) โดยทำการวัดอย่างน้อย 3 ครั้งต่อสูตรตำรับ ในการวัดตำรับที่กักเก็บสารแอสตาแซนทินไม่สามารถใช้เครื่องมือในการวัดเดียวกันตำรับอื่นได้โดยในการวัดตำรับที่กักเก็บสารแอสตาแซนทินจึง Mastersizer ในการวัดตำรับแทน

3.2.2 การศึกษาความหนืด (Rheometer)

การวัดความหนืดของทุกตำรับใช้เครื่อง Rheometer ในการวัดโดยใช้รอบในการวัดอยู่ที่ 0.100-1000 s⁻¹ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2.3 การทดสอบความคงตัว (Stability test)

3.2.3.1 การเร่งโดยใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูง โดยการทดสอบใช้อุณหภูมิสูงเท่ากับ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและใช้อุณหภูมิต่ำเท่ากับ 8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทดสอบอย่างละ 6 รอบ

3.2.3.2 การเร่งโดยใช้แรงโน้มถ่วงโลก โดยใช้รอบที่ 3,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ที่

3.2.4 การวัดค่า pH

วัดค่า pH โดยใช้กระดาษ pH indicator strip

3.3 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย

3.3.1 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังของตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิล

ทดสอบโดยใช้ Franz diffusion cell โดยใช้ผิวหนังลูกหมูที่ตายด้วยสาเหตุทางธรรมชาติ เป็นเยื่อเลือกผ่านโดยเอาผิวหนังส่วนท้องมาลอกออกให้เหลือแต่ชั้น Epidermis จากนั้น นำผิวหนังไปวางบน Receiving compartment โดยให้ชั้น Stratum corneum อยู่ด้านบน Donor compartment ของ Franz diffusion cell ควบคุมอุณหภูมิของ Circulating bath ไว้ที่ 32 องศาเซลเซียส โดยส่วนของ Donor compartment ใส่ไมโครอิมัลชันที่บรรจุสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่จะทำการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วน Receiving chamber จะบรรจุสารละลาย 1X Phosphate buffer saline ใน 50% Ethanol จากนั้นดูดสารละลายในชั้น Receiving chamber ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรตามเวลาที่กำหนด ได้แก่ 0.5 1 2 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำสารที่เก็บไปละลายด้วย Methanol : Dichloromethane ในอัตราส่วน 75:25 แล้วนำไปวัดหาปริมาณสารแอสตาแซนทินและฟูโคแซนทินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.3.2 การวิเคราะห์สารกลุ่มแซนโทฟิลล์ในผิวหนัง

ทดสอบโดยใช้หนังหมูที่ผ่านการทำ Franz diffusion cell มาแล้วมาหั่นให้มีขนาดเล็ก จากนั้นนำไปละลายด้วย Methanol : Dichloromethane ในอัตราส่วน 75:25 เพื่อนำสารที่สะสมบนผิวหนังไปตรวจสอบปริมาณสารที่ยังติดอยู่ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.4 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography)(42)

การวิเคราะห์หาปริมาณ Astaxanthin & Fucoxanthin โดยมีการใช้ระบบดังนี้ วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย Methanol Acetonitrile Water และ Dichloromethane ในอัตราส่วน 80:7.5:7.5:5 วัฏภาคคงที่ (stationary phase) คือคอลัมน์ C18 – Reverse Phase โดยมีอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1ml/min ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และใช้ Detector เป็น UV-visible ที่ 480 nm

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(43)

3.5.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH radical (3 mg ใน 50 ml เอทานอล) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.2 จากนั้นดูดสารที่ใช้ในการทดสอบปริมาตร 100 μl และเติมสารละลาย DPPH ลงไป 100 μl โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารที่ใช้ทดสอบมีค่าเท่ากับ 0.39-100 $\mu\text{g/ml}$ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm จากนั้นคำนวณ %inhibition และค่า IC_{50} จากสมการ

$$\% \text{inhibition} = ((A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0) \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ผสมกับเอทานอล

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

A_2 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับเอทานอล

3.5.2 การทดสอบด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS radical ด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย ABTS เข้มข้น 4 mM และสารละลาย 4.9 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ด้วยน้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 16-20 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน หลังจากนั้นให้เจือจางสารละลายด้วยเอทานอล ในอัตราส่วน 1:50 ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.2 ที่ความยาวคลื่น 734 nm แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ใช้ทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารเท่ากับ 200-500 $\mu\text{g/ml}$ มา 20 μl เติมสารละลาย ABTS 180 μl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาทีในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm คำนวณ %inhibition และหาค่า IC_{50} จากสมการในข้อ 3.5.1

3.6 การวิเคราะห์โดยใช้สถิติ

3.6.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมี

โดยใช้ Complete randomized design (CRD)

3.6.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

โดยใช้ Analysis of variance (One way ANOVA)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

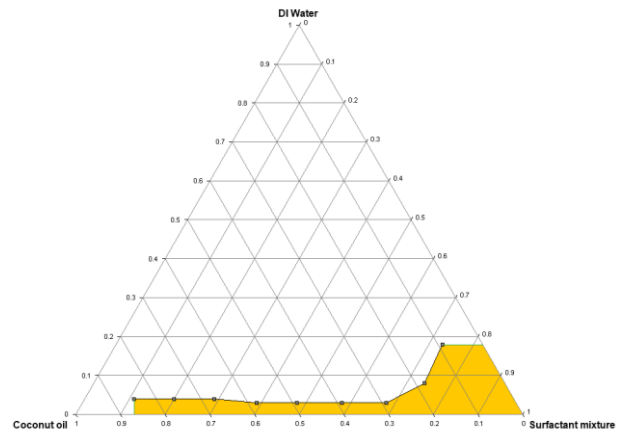
4.1 การพัฒนาสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน

4.1.1 การสร้างแผนภาพไตรภาคเทียม (pseudo-ternary phase diagram)

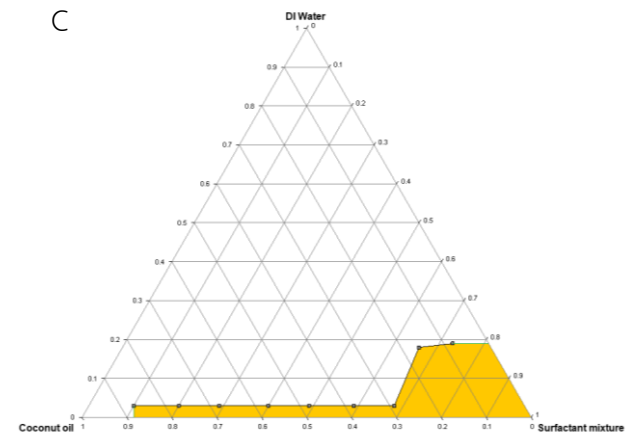
สร้าง pseudo-ternary phase diagram โดยวิธีไทเทรตด้วยน้ำ (water titration method) โดยแสดงดังรูปที่ 18 19 และ 20 ซึ่งบริเวณสีเหลืองแสดงพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันโดยใช้โปรแกรม ImageJ ในการหาพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชัน พบว่าการใช้วัตถุน้ำมันเป็น Coconut oil และ S_{mix} เป็น Tween[®]80 และ PEG 400 ได้พื้นที่ในอัตราส่วน 1:1 เท่ากับ 24431 2:1 เท่ากับ 24854 3:1 เท่ากับ 27768 และ 4:1 เท่ากับ 30162 สำหรับวัตถุน้ำมันเป็น MCT oil และ S_{mix} เป็น Tween[®]80 และ PEG 400 ได้พื้นที่ในอัตราส่วน 1:1 เท่ากับ 46447 2:1 เท่ากับ 50839 3:1 เท่ากับ 54121 และ 4:1 เท่ากับ 45134 สำหรับวัตถุน้ำมันเป็น Cinnamon oil และ S_{mix} เป็น Tween[®]20 และ PG ได้พื้นที่ในอัตราส่วน 1:1 เท่ากับ 90411 2:1 เท่ากับ 82636 3:1 เท่ากับ 83401 และ 4:1 เท่ากับ 107346

จาก pseudo-ternary phase diagram ทำให้สามารถเลือกวัตถุน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นตำรับไมโครอิมัลชันสำหรับกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ได้โดยคัดเลือกจากพื้นที่ที่เกิดเป็นไมโครอิมัลชัน พบว่าวัตถุน้ำมันเป็น Cinnamon oil และ S_{mix} (Tween[®]20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1) มีพื้นที่ที่เกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุด จึงนำสูตรตำรับนี้ไปพัฒนาสำหรับกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์

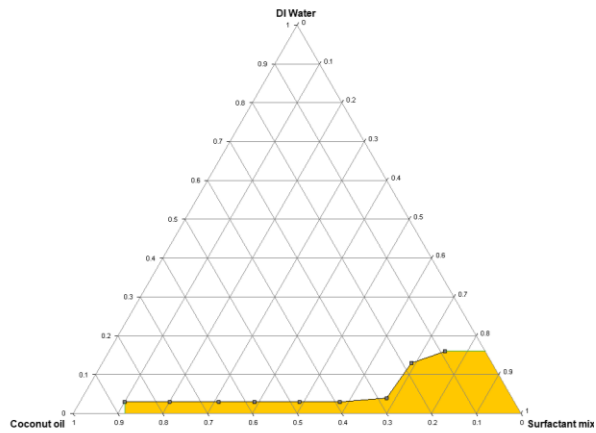
A



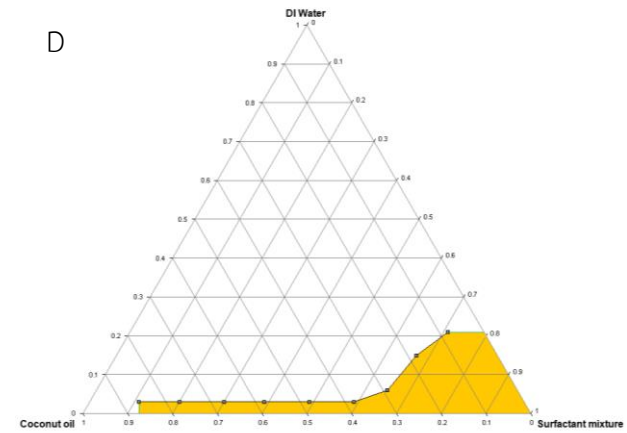
C



B

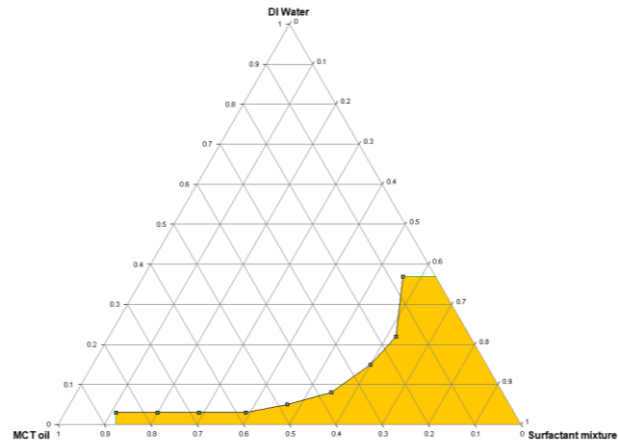


D

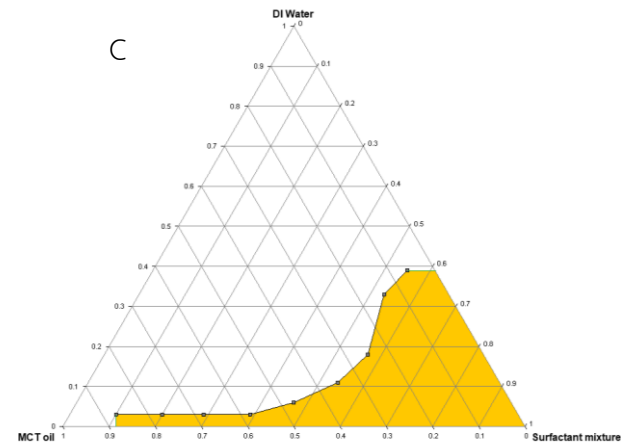


รูปที่ 18 แสดงแผนไตรภาคเทียมของ Coconut oil , S_{mix} (Tween[®]80 และ PEG400) โดย A, B, C และ D แสดงอัตราส่วน S_{mix} 1:1 2:1 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ

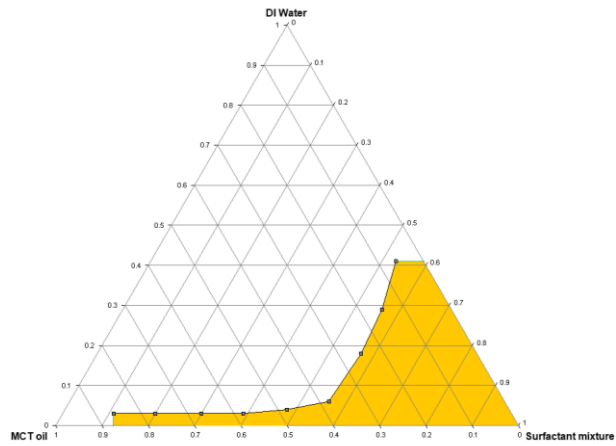
A



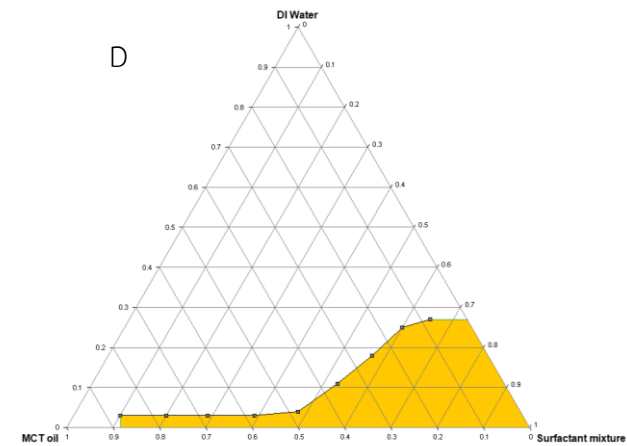
C



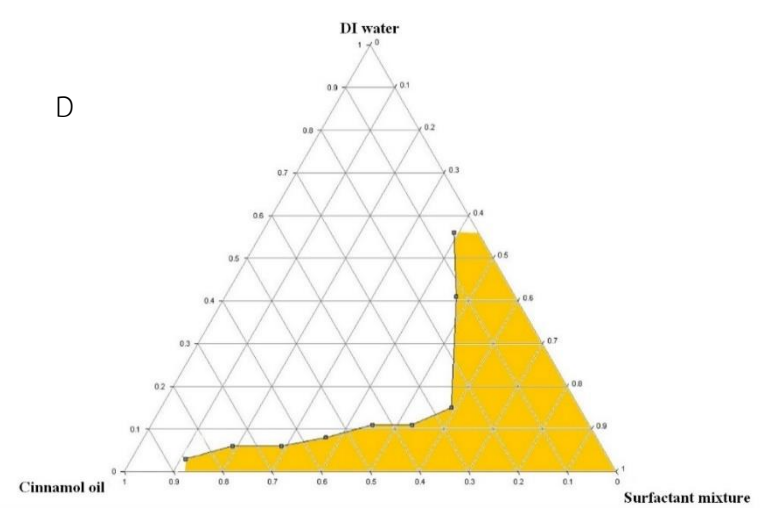
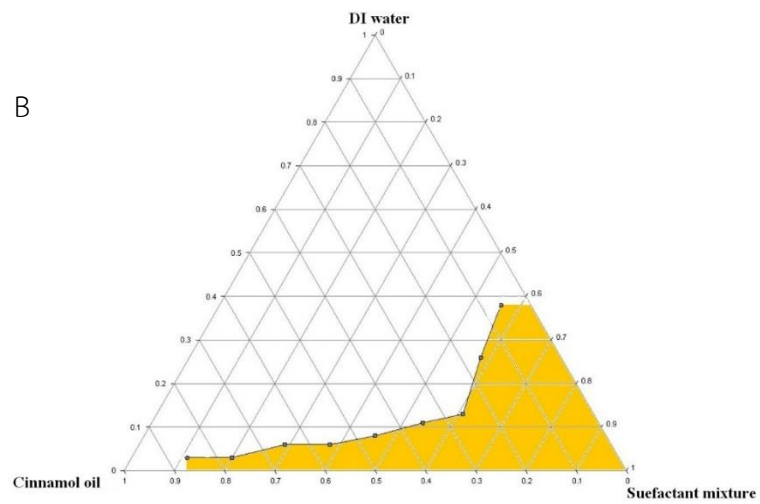
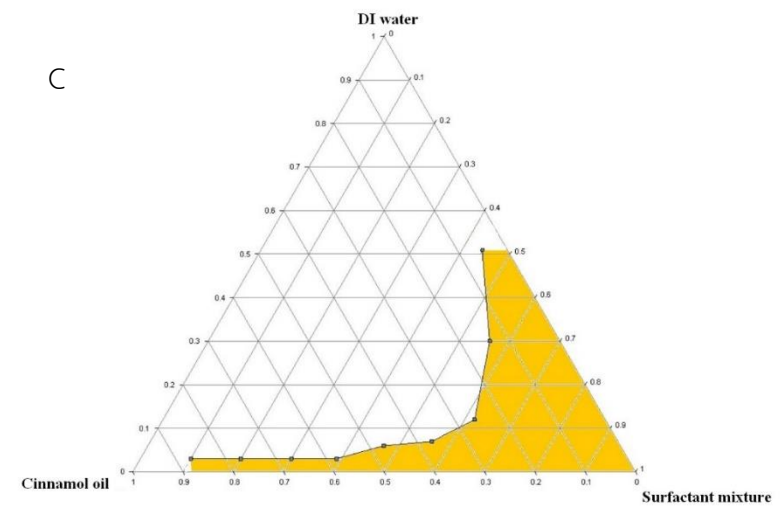
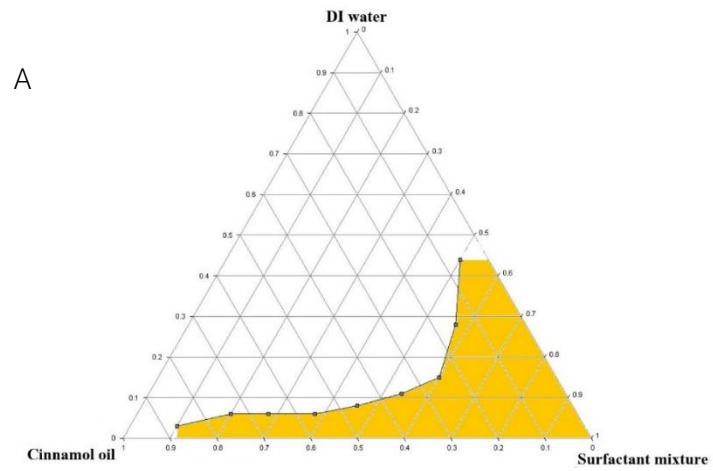
B



D



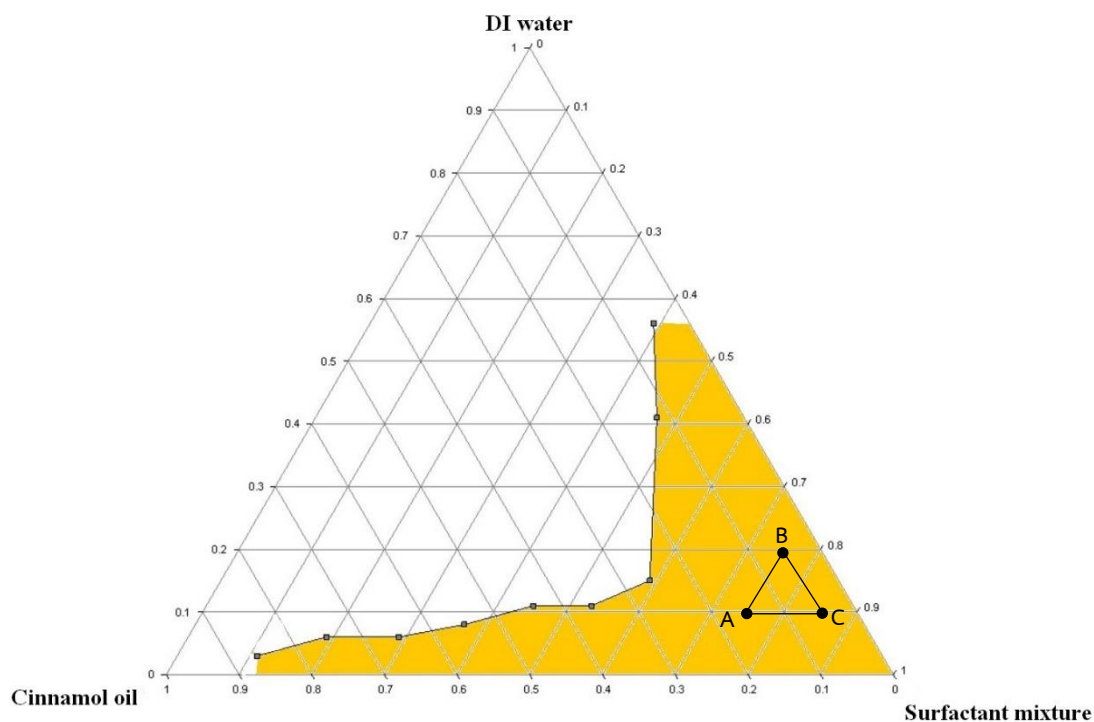
รูปที่ 19 แสดงแผนไตรภาคเทียมของ MCT oil , S_{mix} (Tween[®]80 และ PEG400) โดย A, B, C และ D แสดงอัตราส่วน S_{mix} 1:1 2:1 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ



รูปที่ 20 แสดงแผนไตรภาคเทียมของ Cinnamom oil , S_{mix} (Tween[®]20 และ PG) โดย A, B, C และ D แสดงอัตราส่วน S_{mix} 1:1 2:1 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ

4.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสูตรตำรับ

จากการศึกษาพบว่าการใช้ Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1 ที่ให้พื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุด จึงเลือก 3 จุด (A, B และ C) ดังแสดงรูปที่ 21 ซึ่งเป็นตัวแทนจาก pseudo-ternary phase diagram ในการศึกษาก่อนหน้า โดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3 แล้วใช้สถิติแบบ Complete Randomized design (CRD) ในการอธิบายผลการวิจัยโดยใช้โปรแกรม SPSS



รูปที่ 21 แสดงการเลือกจุด A, B และ C ใน pseudo-ternary phase diagram

ตารางที่ 3 ตารางแสดงปริมาณน้ำมัน, S_{mix} และน้ำ ซึ่งเลือกจาก pseudo-ternary phase diagram

จุด	ปริมาณน้ำมัน (%)	ปริมาณ S_{mix} (%)	ปริมาณน้ำ (%)
A	10	75	15
B	20	75	5
C	10	85	5

4.2.1 การศึกษาขนาดอนุภาค (Particle size)

ศึกษาขนาดของอนุภาคโดยใช้เครื่อง Zetasizer พบว่าการใช้ส่วนผสมน้ำมันเป็น Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1 จุด B มีขนาดเท่ากับ 77.63 ± 31.56 nm ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลขนาดอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ

S _{mix} Ratio		Size (nm)
1:1	A	293.03±39.64 ^f
	B	110.48±19.78 ^{a,b}
	C	182.21±16.57 ^{c,d}
2:1	A	204.37±17.57 ^{d,e}
	B	114.48±22.71 ^{a,b}
	C	231.23±49.28 ^e
3:1	A	155.20±9.18 ^{b,c}
	B	113.56±37.44 ^{a,b}
	C	278.82±57.32 ^f
4:1	A	312.08±45.86 ^{f,g}
	B	77.63±31.56*
	C	351.43±63.70 ^g

mean±SD; n=6

* Significant ที่ p-value < 0.05

4.2.2 การศึกษาการกระจายของขนาดอนุภาค (Size distribution)

ศึกษาการกระจายของขนาดอนุภาคโดยใช้เครื่อง Zetasizer โดยวัดเป็นค่า Polydispersity index (PDI) พบว่าการใช้วัตถุน้ำมันเป็น Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween[®]20 และ PG ในอัตราส่วน 3:1 จุด C มีการกระจายของขนาดอนุภาคเท่ากับ 0.38±0.04 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value < 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 5

4.2.3 การนำไฟฟ้า (Electrical conductivity)

ศึกษาการนำไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Zetasizer โดยวัดค่าออกมาให้หน่วยไมโครซีเมนต์ต่อเซนติเมตร (μS/cm) พบว่าการใช้วัตถุน้ำมันเป็น Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween[®]20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1 จุด C มีค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.0122±0.0009 μS/cm ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value < 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 แสดงผลการกระจายของขนาดอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ

S _{mix} Ratio		Polydispersity index (PDI)
1:1	A	0.46±0.42 ^a
	B	0.57±0.03 ^b
	C	0.57±0.04 ^b
2:1	A	0.40±0.08 ^a
	B	0.38±0.04 ^a
	C	0.41±0.04 ^a
3:1	A	0.69±0.05 ^c
	B	0.45±0.18 ^a
	C	0.38±0.04*
4:1	A	0.39±0.04 ^a
	B	0.47±0.20 ^a
	C	0.41±0.03 ^a

mean±SD; n=6

* Significant ที่ p-value < 0.05

ตารางที่ 6 แสดงผลการนำไฟฟ้าของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ

S _{mix} Ratio		Electrical conductivity(μS/cm)
1:1	A	0.0278±0.0072 ^{c,d}
	B	0.0152±0.0012 ^a
	C	0.0141±0.0022 ^a
2:1	A	0.0261±0.0050 ^{c,d}
	B	0.0152±0.0022 ^a
	C	0.0126±0.0016 ^a
3:1	A	0.0296±0.0066 ^d
	B	0.0146±0.0034 ^a
	C	0.0200±0.0026 ^b
4:1	A	0.0247±0.0148 ^c
	B	0.0135±0.0086 ^a
	C	0.0122±0.0009*

mean±SD; n=6

* Significant ที่ p-value < 0.05

4.2.4 ความหนืด (Viscosity)

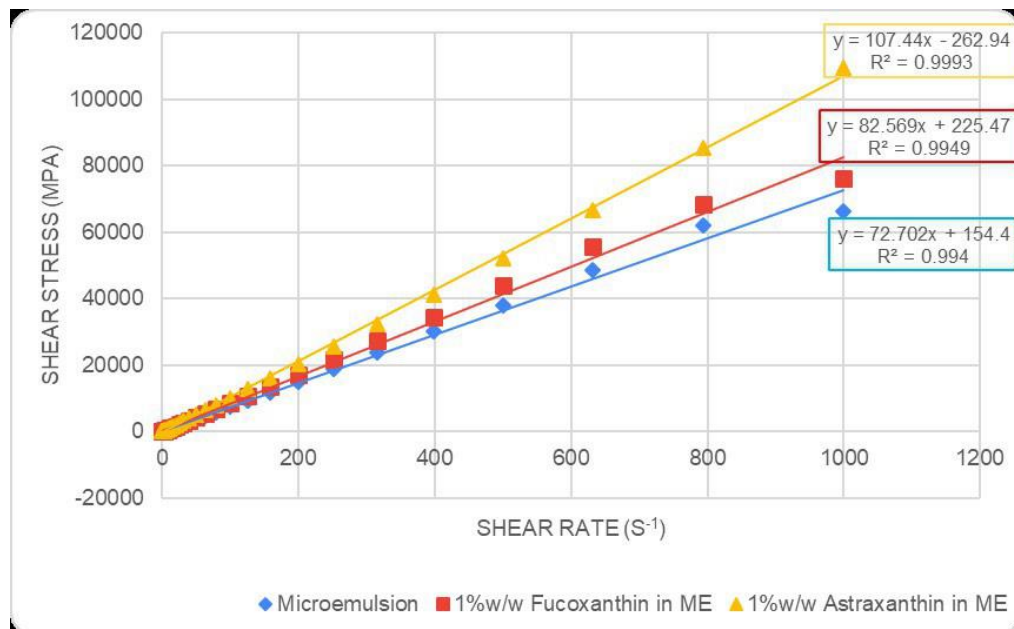
ศึกษาความหนืดโดยใช้เครื่อง Rheometer วัดค่าออกมาในหน่วยปาสคาลวินาที (Pa.s)

ตารางที่ 7 แสดงผลความหนืดของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ

S _{mix} Ratio		Viscosity (Pa.s)
1:1	A	0.0554±0.0078 ^a
	B	0.0446±0.0114 ^a
	C	0.0604±0.0091 ^a
2:1	A	0.0645±0.0233 ^a
	B	0.0631±0.0093 ^a
	C	0.1648±0.0838 ^b
3:1	A	0.0753±0.0307 ^a
	B	0.0699±0.0110 ^a
	C	0.0101±0.0260 ^{a,b}
4:1	A	0.0103±0.0178 ^{a,b}
	B	0.0740±0.0168 ^a
	C	0.1102±0.0348 ^{a,b}

mean±SD; n=6

* Significant ที่ p-value < 0.05



รูปที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง shear rate และ shear stress ของตำรับไมโครอิมัลชัน ตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บ 1% astaxanthin และตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บ 1% fucoxanthin

4.2.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH indicator strips ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 ตารางที่ 8 แสดงผลความเป็นกรด-ด่างของตำรับไมโครอิมัลชันที่อัตราส่วนและจุดต่างๆ

S _{mix} Ratio		pH
1:1	A	4
	B	4
	C	4
2:1	A	5
	B	4
	C	5
3:1	A	5
	B	5
	C	5
4:1	A	5
	B	5
	C	5

4.3 การศึกษาสูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์

โดยสูตรตำรับที่เลือกใช้วัตถุดิบน้ำมันเป็น Cinnamon oil ใช้ surfactant mixture ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1 และน้ำ ในอัตราส่วน 5:20:75 ซึ่งสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่นำมาทำศึกษาคือ Astaxanthin ปริมาณ 1%, 2% และ 3% ของวัตถุดิบน้ำมัน และ Fucoxanthin 1% ของตำรับและ 2% ของวัตถุดิบน้ำมัน

4.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

ศึกษาการวัดขนาดของตำรับโดยเครื่อง Mastersizer3000 พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันของ astaxanthin ที่ความเข้มข้น 1% ของวัตถุดิบน้ำมันมีขนาดอยู่ในช่วง น้อยกว่า 100 100-1,000 1,000-10,000 และ 10,000-100,000 nm เท่ากับ 12.66% 6.71% 52.52% และ 28.09% ตามลำดับ ในตำรับไมโครอิมัลชันของ fucoxanthin ที่ความเข้มข้น 2% ของวัตถุดิบน้ำมันมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 1.09%, 53.26%, 26.96% และ 18.66% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการศึกษานาโนอนุภาคตำรับไมโครอิมัลชันของ astaxanthin และ fucoxanthin

ช่วงของขนาดอนุภาค (nm)	ปริมาณของขนาดอนุภาค (%)	
	Astaxanthin in ME	Fucoxanthin in ME
< 100	12.66%	1.09%
100-1,000	6.71%	53.26%
1,000-10,000	52.52%	26.96%
10,000-100,000	28.09%	18.66%

Astaxanthin in ME หมายถึงตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารแอสตาแซนทิน

Fucoxanthin in ME หมายถึงตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารฟูโคแซนทิน

ศึกษาความหนืดโดยใช้เครื่อง Rheometer พบว่าตำรับ 1% astaxanthin ในไมโครอิมัลชันเท่ากับ 0.0876 ± 0.0223 Pa.s และตำรับ 1% fucoxanthin ในไมโครอิมัลชันเท่ากับ 0.0848 ± 0.0184 Pa.s

ศึกษา pH ของตำรับด้วย pH indicator strips พบว่าตำรับ 1% fucoxanthin ในไมโครอิมัลชันเท่ากับ 4 ในตำรับ 2% fucoxanthin ในไมโครอิมัลชันเท่ากับ 5 แต่ตำรับไมโครอิมัลชันของ astaxanthin ไม่สามารถวัดได้ด้วย pH indicator strips

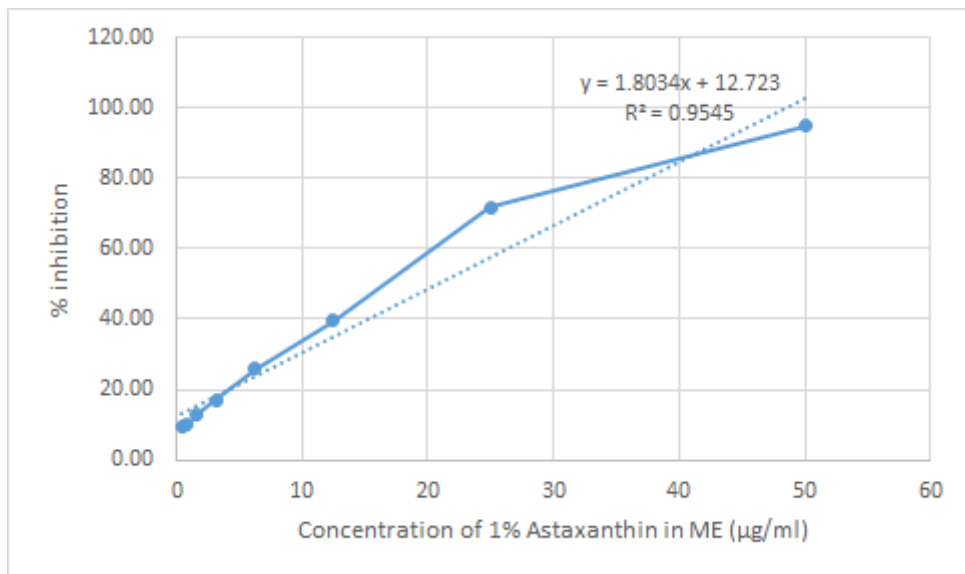
4.4 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่กักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชันในหลอดทดลอง

จากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังด้วยวิธี Franz diffusion cell ไม่พบการซึมผ่านทางผิวหนังของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์

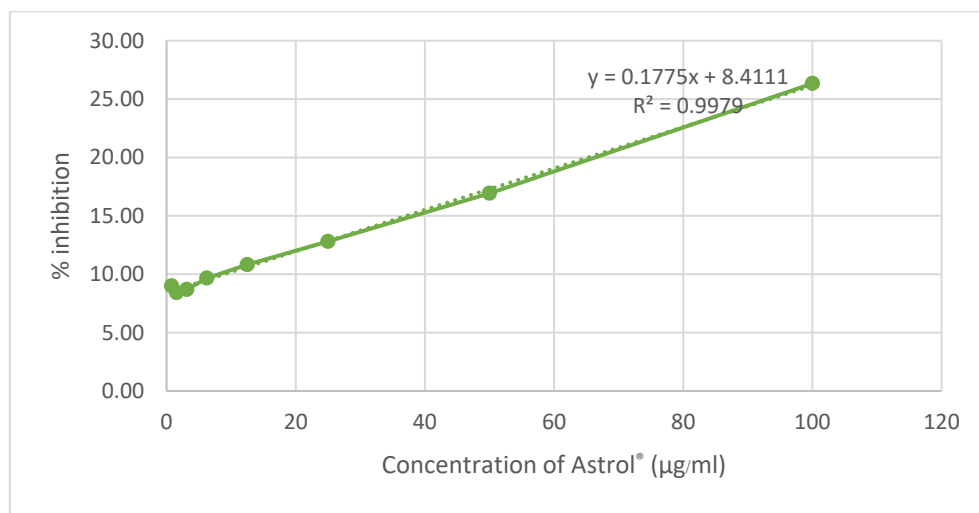
4.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์

4.5.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการศึกษาพบว่าตำรับ 1% astaxanthin ในไมโครอิมัลชัน มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชันที่ไม่มีการกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.33 ± 0.65 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ Astrol® มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยมาก โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 $\mu\text{g/ml}$ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งได้ $26.33 \pm 0.48\%$ และตำรับไมโครอิมัลชันไม่มีการกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเลย ดังแสดงในตารางที่ 10 และ 11



รูปที่ 23 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี DPPH ของตำรับ 1% astaxanthin ในไมโครอิมัลชัน



รูปที่ 24 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี DPPH ของ Astrol®

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของตัวอย่าง

Sample	DPPH assay IC ₅₀ (µg/ml)
1% astaxanthin in ME	16.33±0.65*
1% fucoxanthin in ME	IN
2% fucoxanthin in ME	IN
Microemulsions	IN

mean±SD; n=3

* Significant ที่ p-value < 0.05

** IN = Inactive

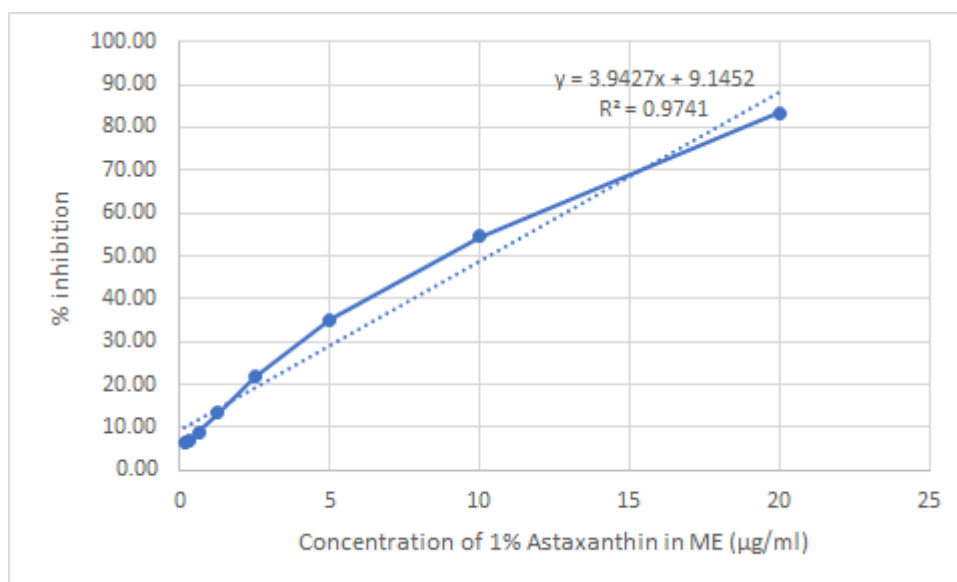
ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของ Astrol®

Sample	%inhibition
Astrol®	26.33±0.48%

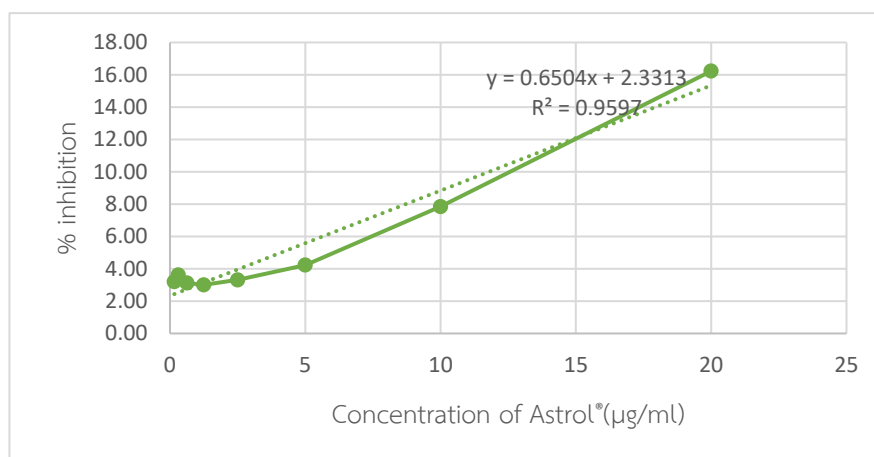
mean±SD; n=3

4.5.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการศึกษาพบว่าตำรับ 1% astaxanthin ในไมโครอิมัลชัน ที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชันที่ไม่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ $8.69 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ ส่วน Astrol® ก็พบว่ามียุทธียับยั้งอนุมูล ABTS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งได้ $16.03 \pm 0.12\%$ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $30 \mu\text{g/ml}$ และตำรับไมโครอิมัลชันไม่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เช่นเดียวกันกับอนุมูลอิสระ DPPH ดังแสดงในตารางที่ 12 และ 13



รูปที่ 25 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี ABTS ของตำรับ 1% astaxanthin ในไมโครอิมัลชัน



รูปที่ 26 กราฟแสดงการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี ABTS ของ Astrol®

ตารางที่ 12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของตัวอย่าง

สารทดสอบ	ABTS assay IC ₅₀ (µg/ml) or %inhibition
1% astaxanthin in ME	8.69±0.08*
Microemulsions	IN

mean±SD; n=3

* Significant ที่ p-value < 0.05

** IN = Inactive

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของ Astrol®

สารทดสอบ	%inhibition
Astrol®	16.03±0.12%

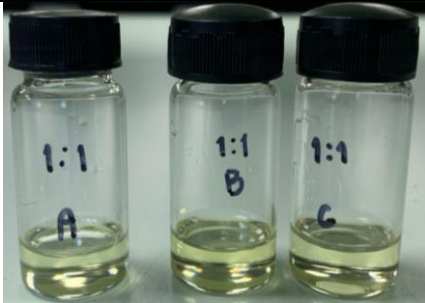
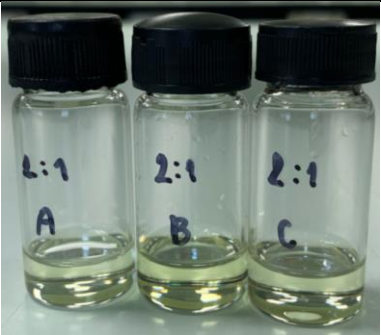
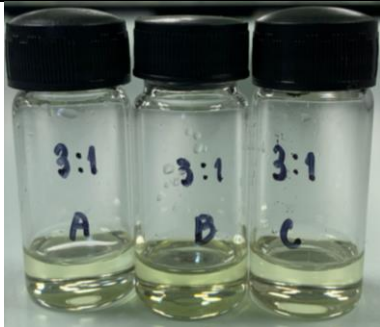
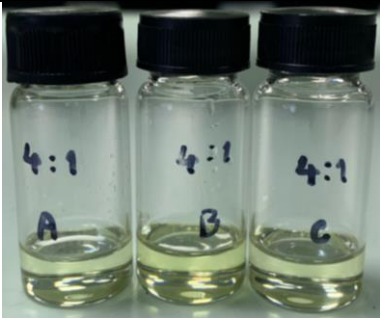
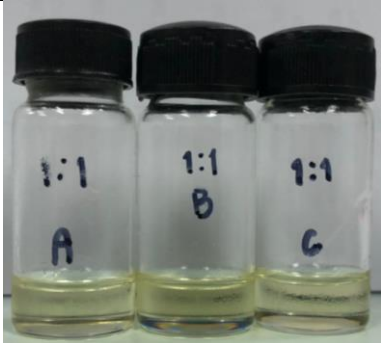
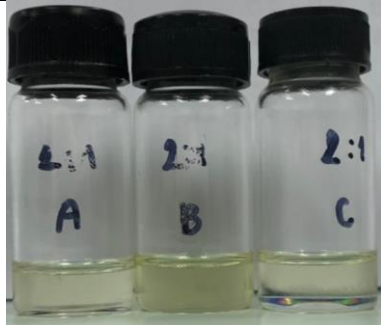
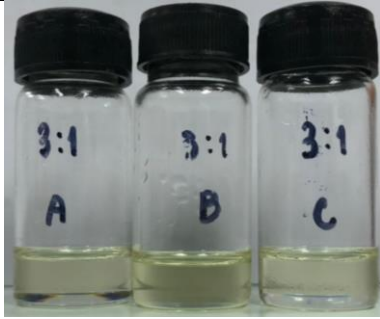
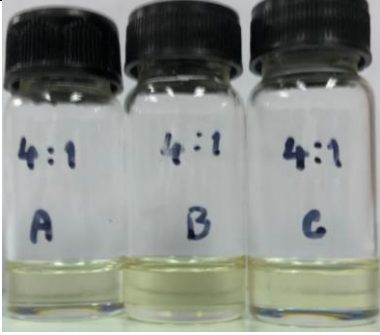
mean±SD; n=3

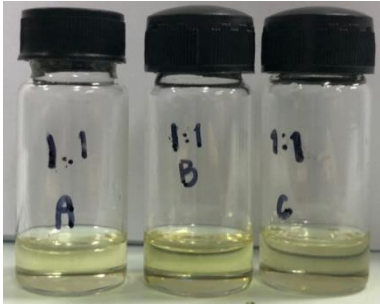
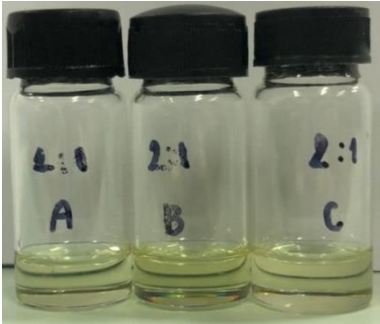
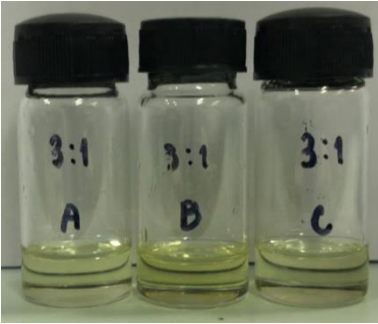
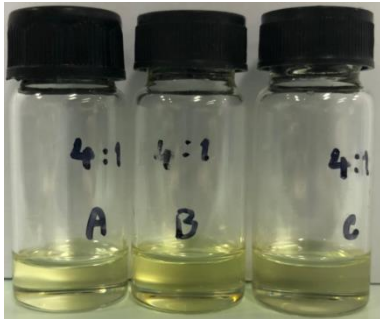
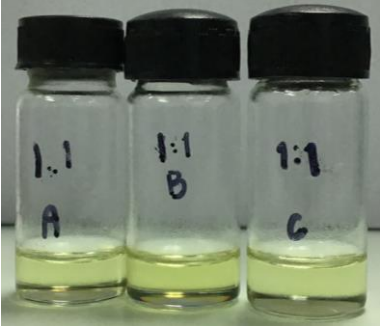
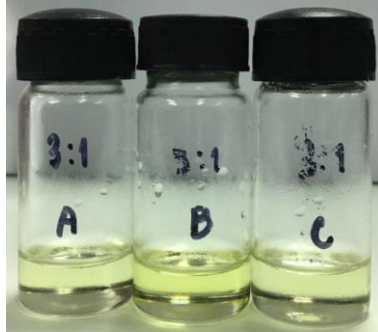
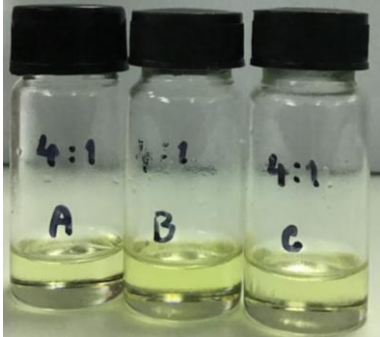
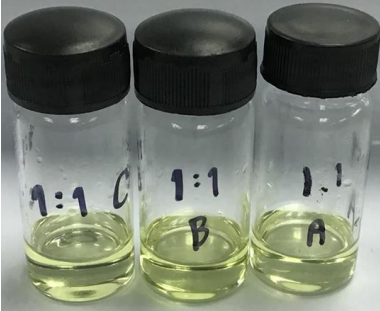
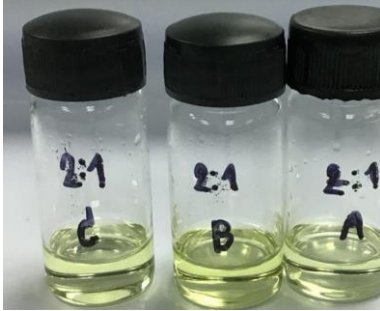
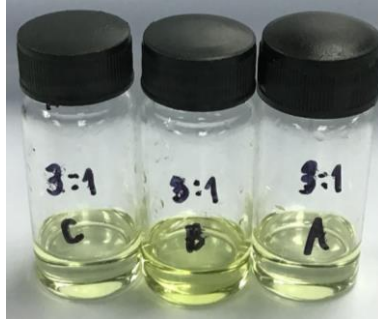
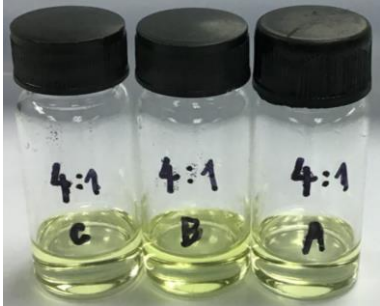
4.7 การศึกษาความคงตัว

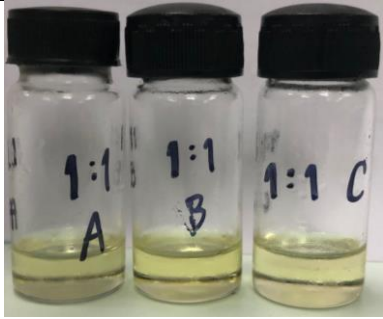
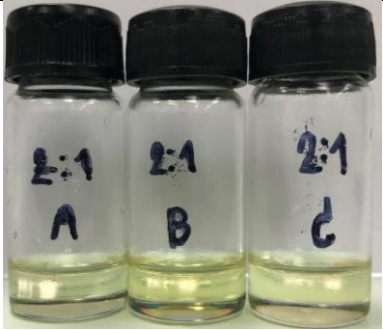
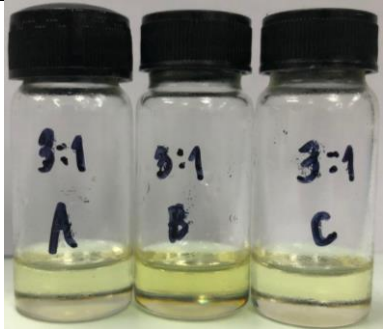
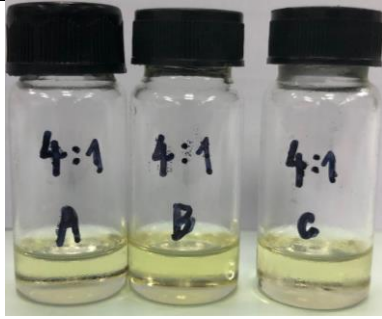
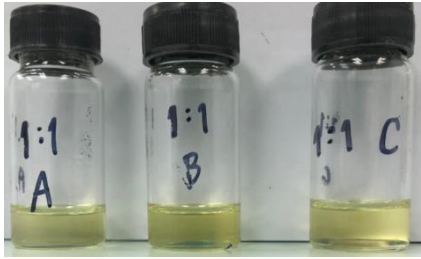
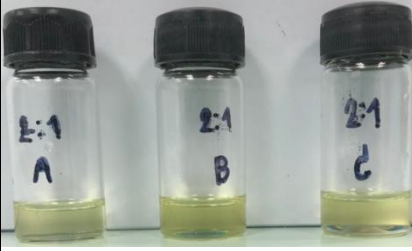
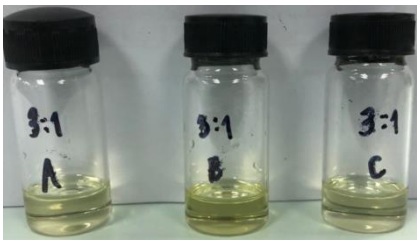
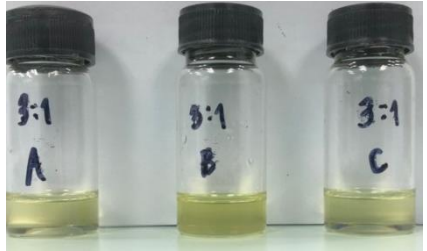
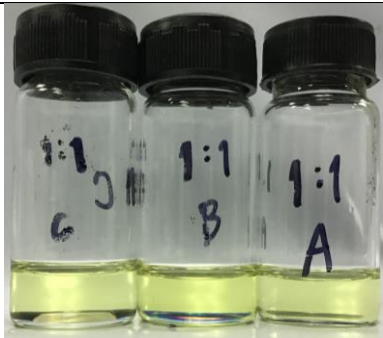
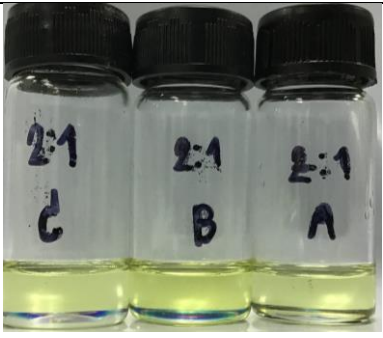
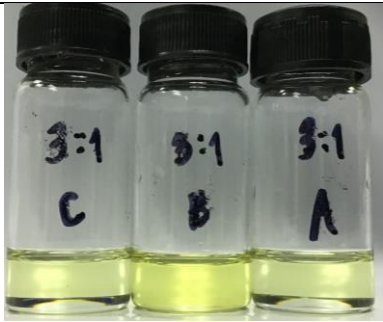
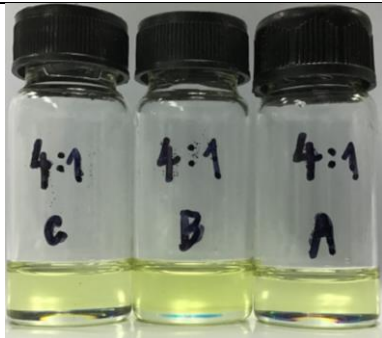
4.7.1 การเร่งโดยใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูงด้วยวิธี Heating-Cooling

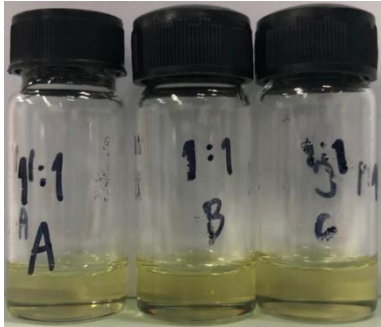
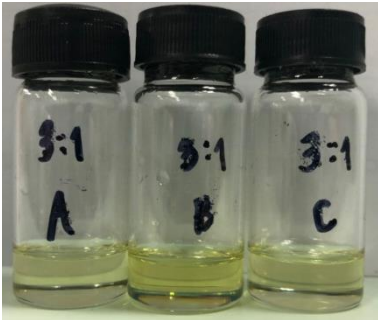
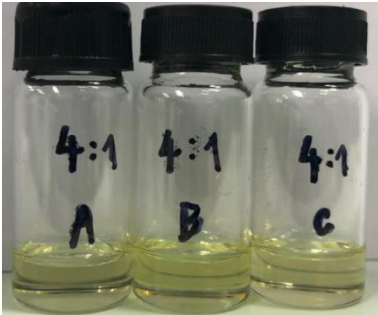
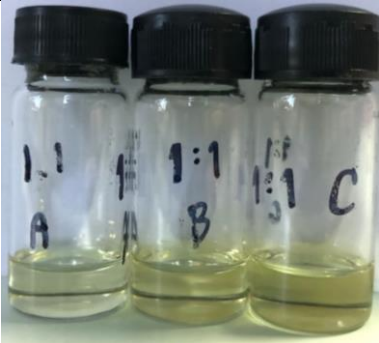
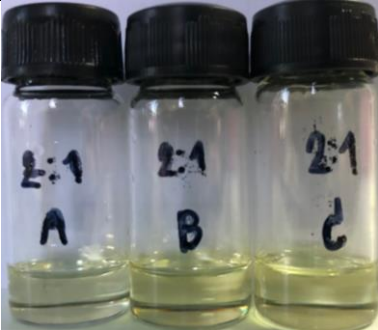
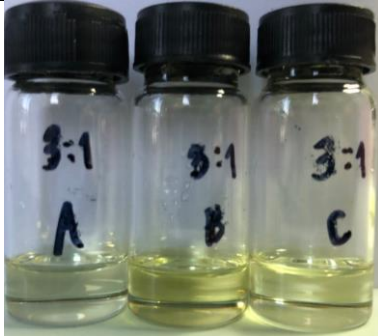
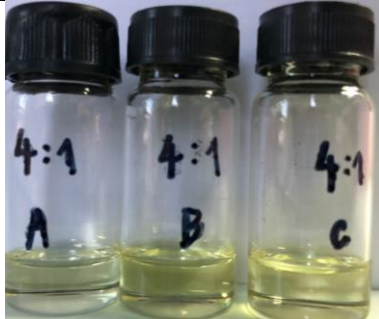
ศึกษาโดยการนำตัวอย่างทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 14 พบว่าผลการศึกษาความคงตัวของไมโครอิมัลชันและตำรับ fucoxanthin พบว่ามีความคงตัวดีในทุกอัตราส่วน ไม่พบการตกตะกอนหรือการแยกชั้น แต่การศึกษาความคงตัวของตำรับ astaxanthin พบว่าเกิดการแยกชั้นของอัตราส่วน S_{mix} 1:1 ทั้งจุด A, B และ C ตั้งแต่รอบ Heating ครั้งที่ 2 ในอัตราส่วน 2:1 จุด A และ C พบว่าเกิดการแยกชั้นที่รอบ Cooling ครั้งที่ 2 และเกิดการแยกชั้นที่จุด B ที่รอบ Heating ครั้งที่ 3 ในอัตราส่วน 3:1 ที่จุด A พบว่าเกิดการแยกชั้นที่รอบ Cooling ครั้งที่ 6 อย่างไรก็ตามไม่พบการเกิดแยกชั้นที่อัตราส่วน 3:1 จุด B และ C และอัตราส่วน 4:1 ทั้งจุด A, B และ C

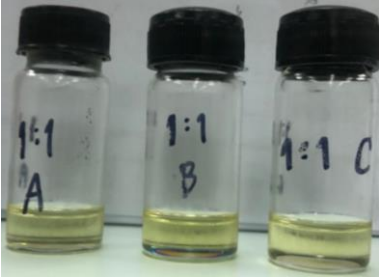
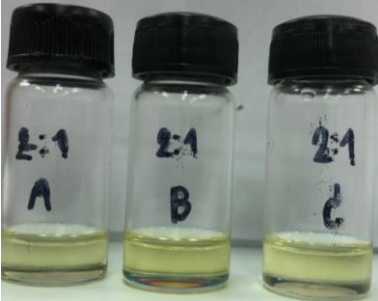
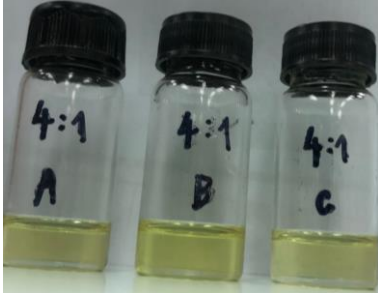
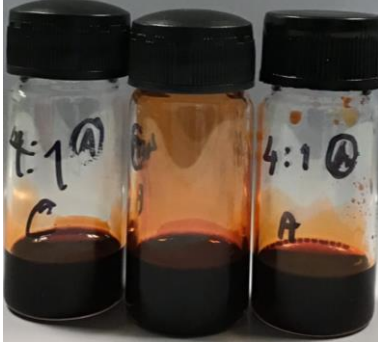
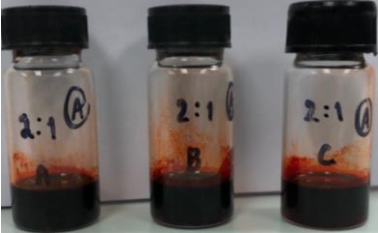
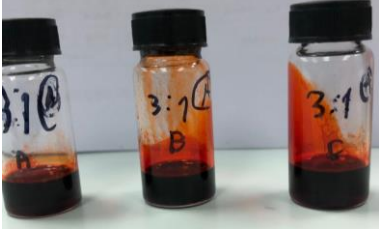
ตารางที่ 14 แสดงผลการศึกษาความคงตัวโดยวิธี Heating-Cooling ของตำรับไมโครอิมัลชันและตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ในอัตราส่วนต่างๆ

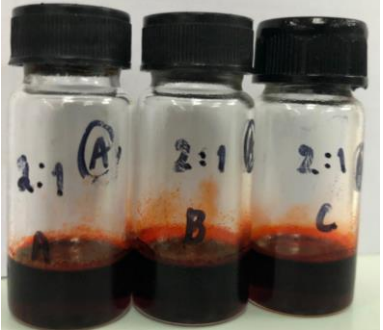
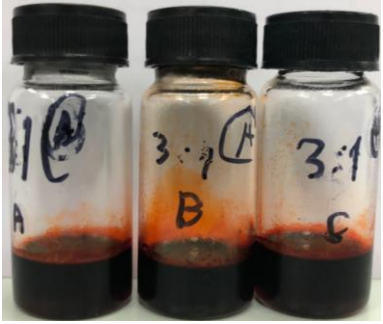
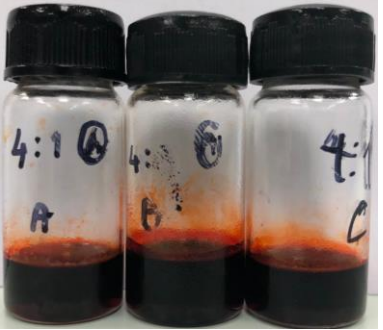
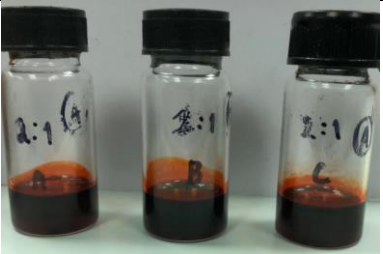
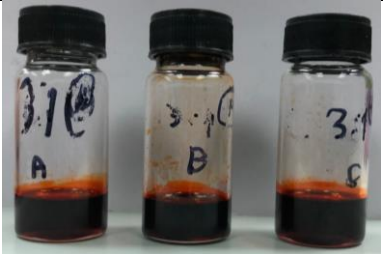
Microemulsions				
	1:1	2:1	3:1	4:1
Heating ครั้งที่ 1				
Cooling ครั้งที่ 1				

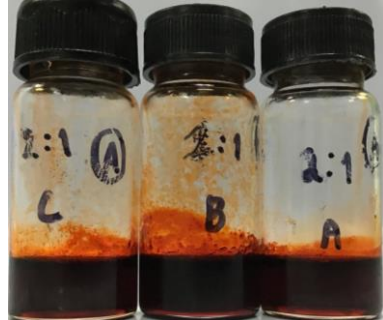
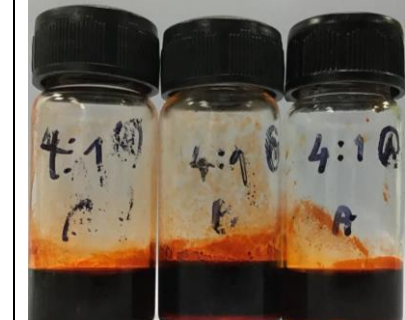
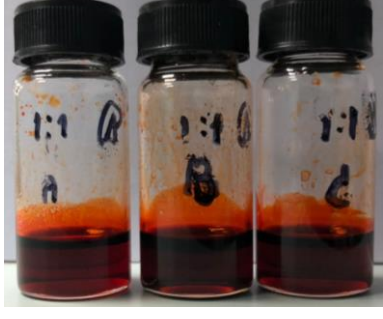
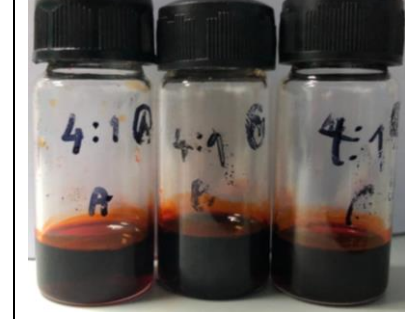
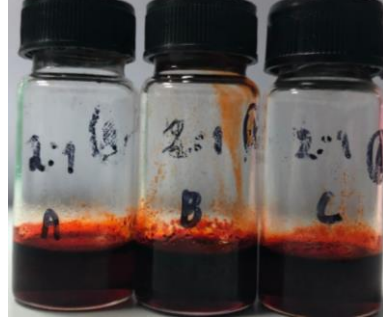
Heating ครั้งที่ 2				
Cooling ครั้งที่ 2				
Heating ครั้งที่ 3				

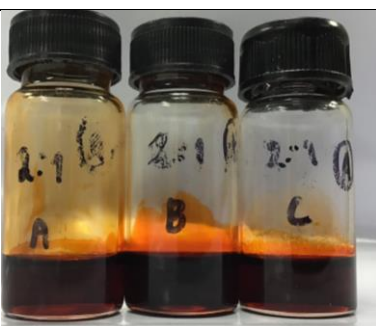
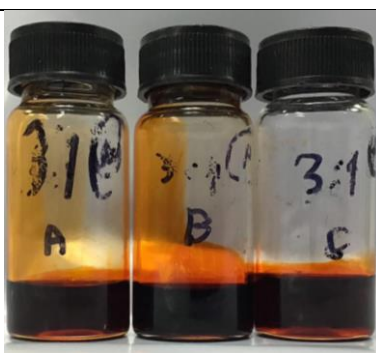
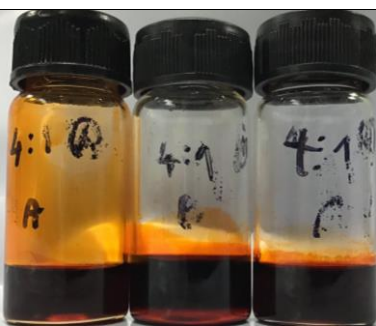
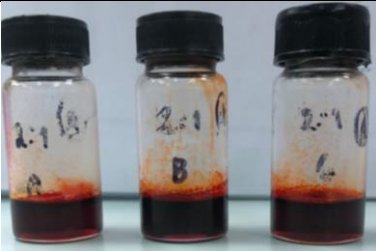
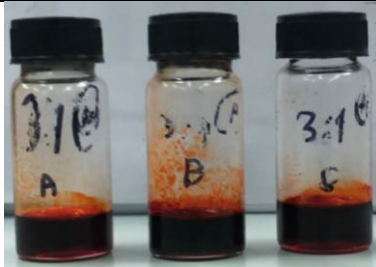
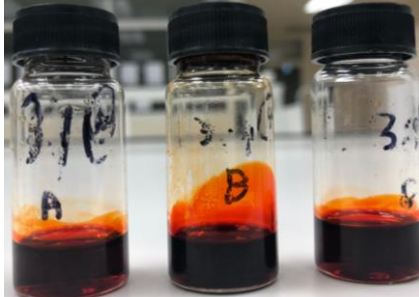
Cooling ครั้งที่ 3				
Heating ครั้งที่ 4				
Cooling ครั้งที่ 4				

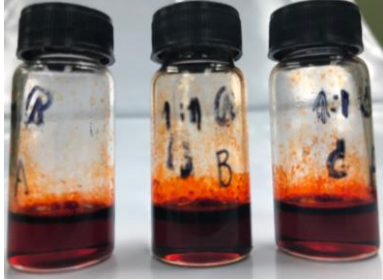
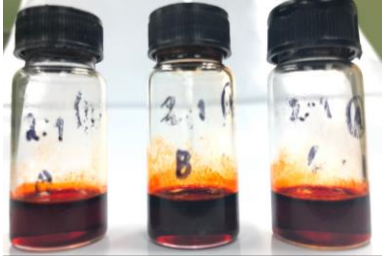
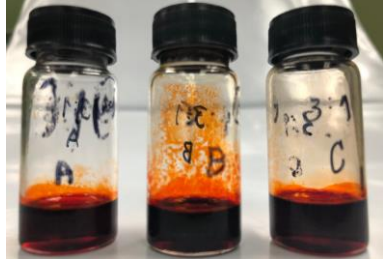
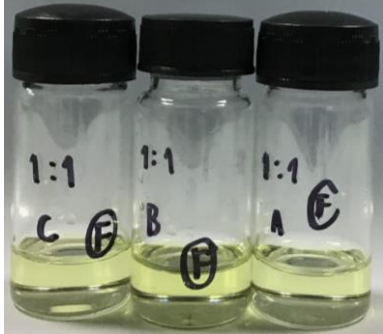
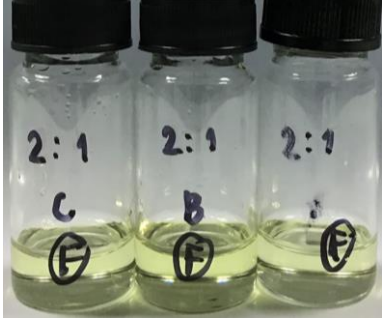
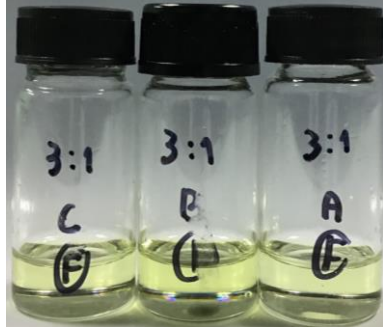
Heating ครั้งที่ 5				
Cooling ครั้งที่ 5				
Heating ครั้งที่ 6				

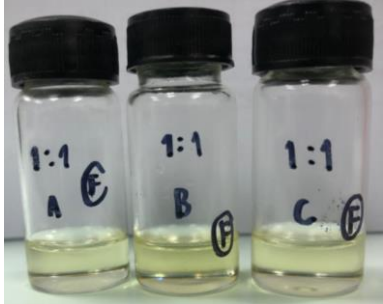
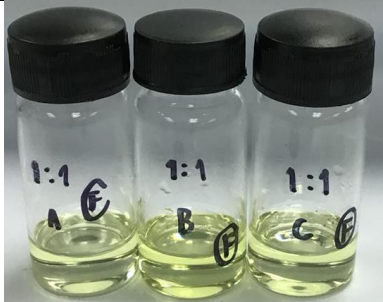
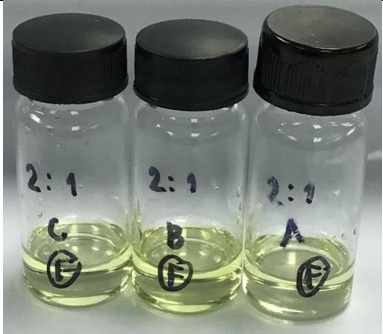
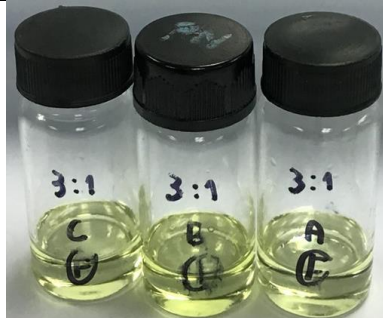
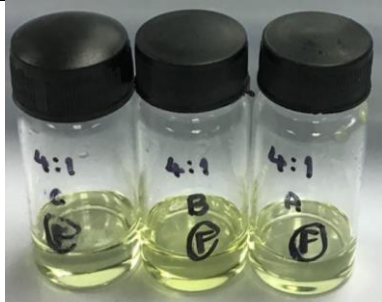
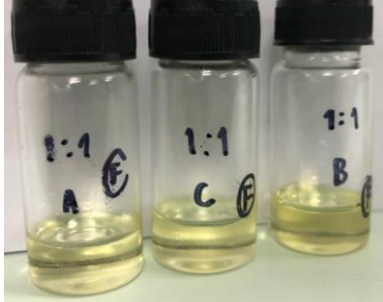
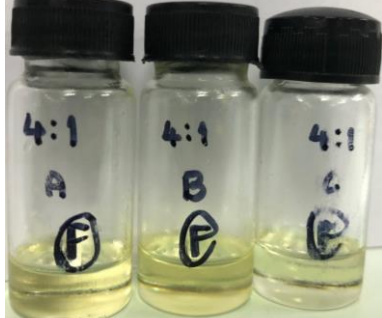
Cooling ครั้งที่ 6				
Astaxanthin				
	1:1	2:1	3:1	4:1
Heating ครั้งที่ 1				
Cooling ครั้งที่ 1				

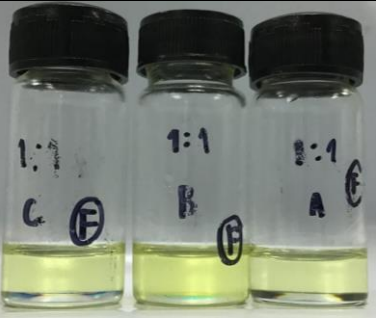
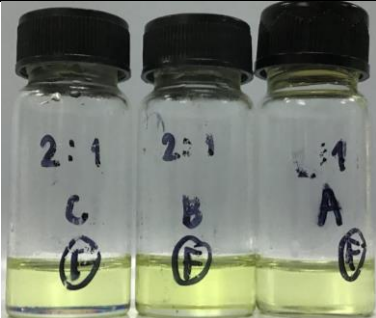
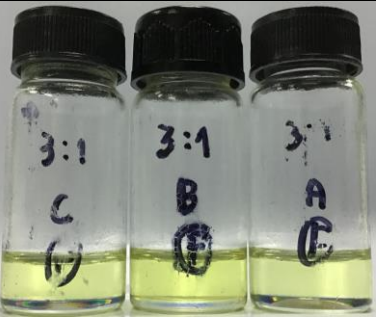
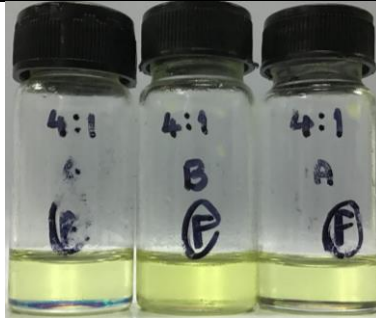
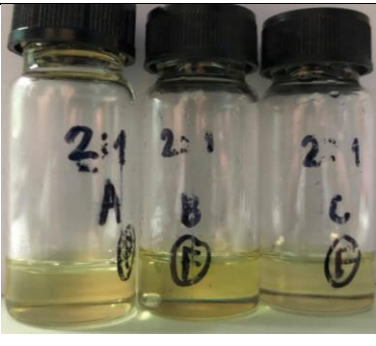
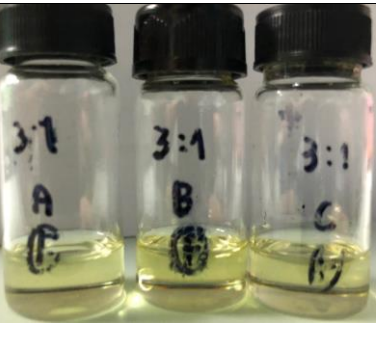
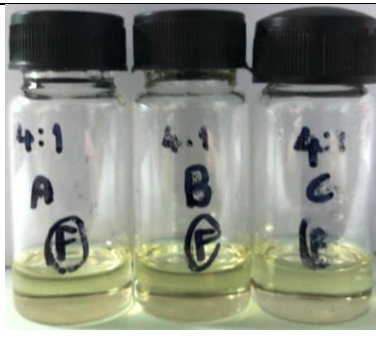
Heating ครั้งที่ 2				
Cooling ครั้งที่ 2				
Heating ครั้งที่ 3				

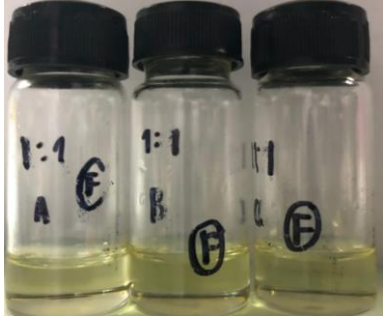
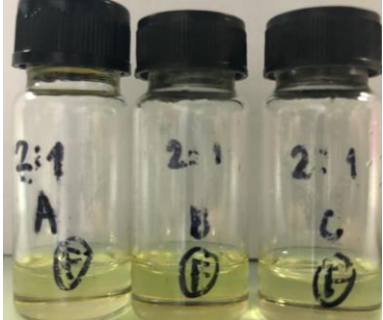
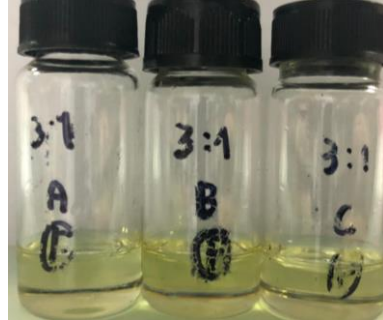
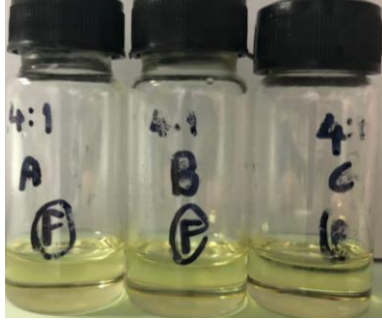
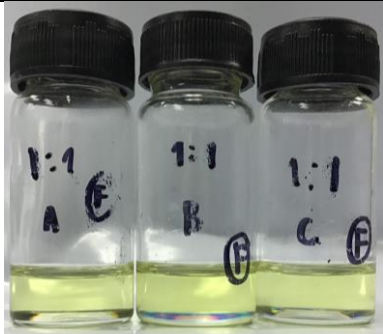
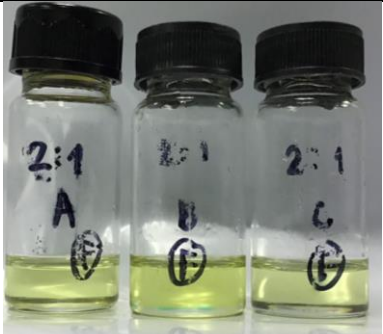
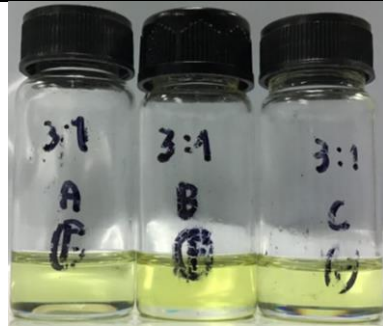
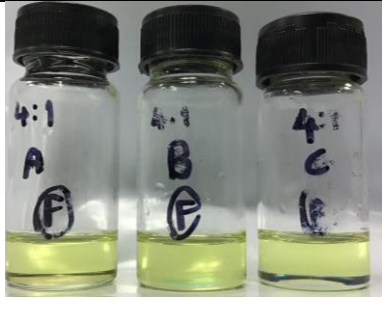
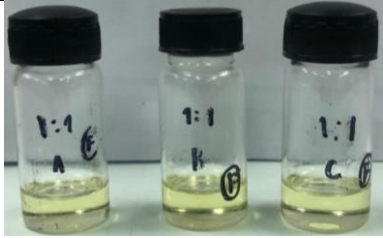
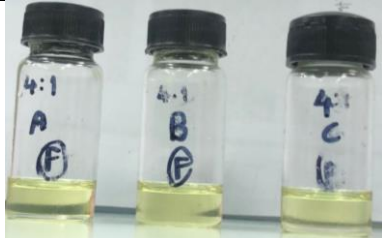
Cooling ครั้งที่ 3				
Heating ครั้งที่ 4				
Cooling ครั้งที่ 4				

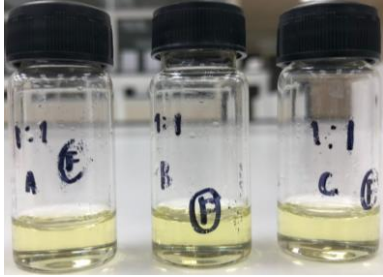
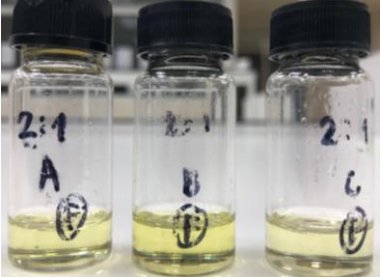
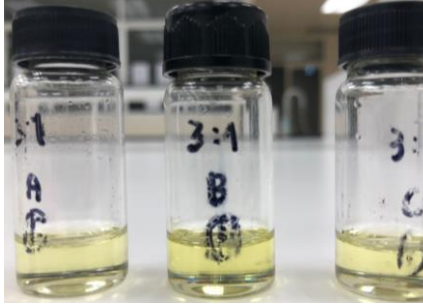
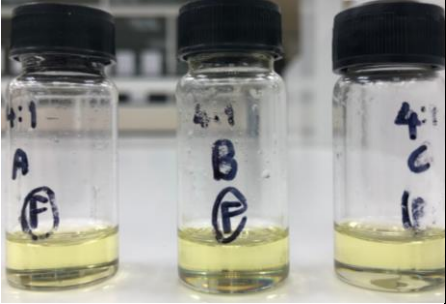
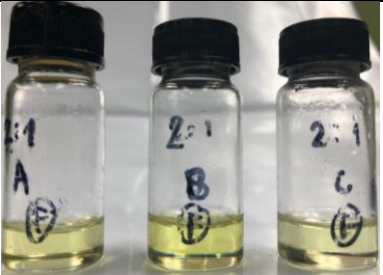
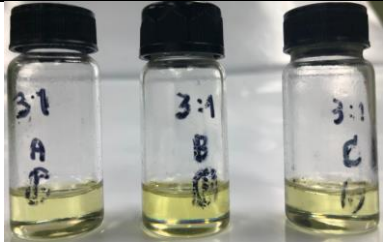
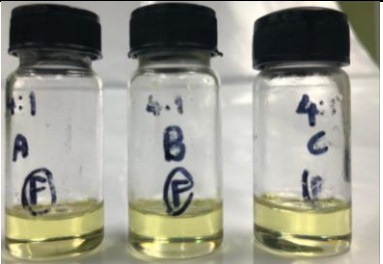
Heating ครั้งที่ 5				
Cooling ครั้งที่ 5				
Heating ครั้งที่ 6				

Cooling ครั้งที่ 6				
Fucoxanthin				
	1:1	2:1	3:1	4:1
Heating ครั้งที่ 1				

Cooling ครั้งที่ 1				
Heating ครั้งที่ 2				
Cooling ครั้งที่ 2				

Heating ครั้งที่ 3				
Cooling ครั้งที่ 3				
Heating ครั้งที่ 4				

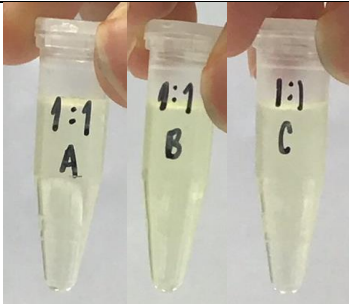
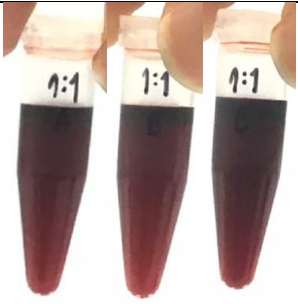
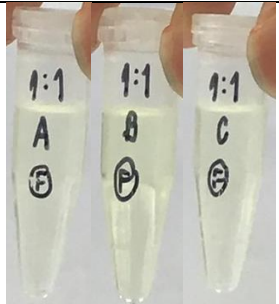
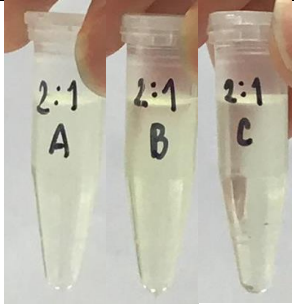
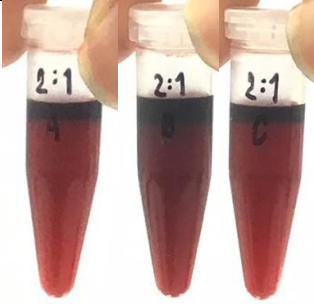
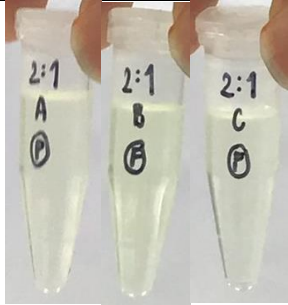
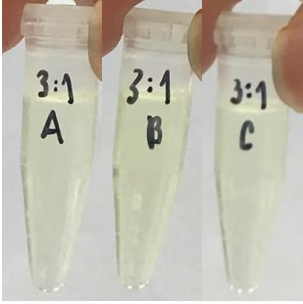
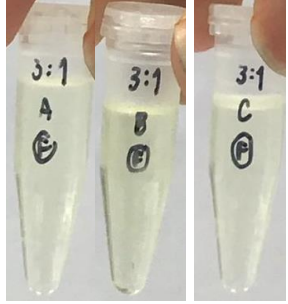
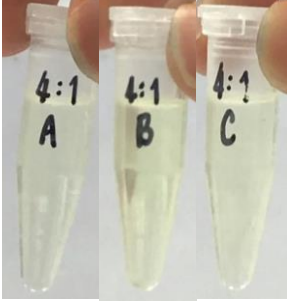
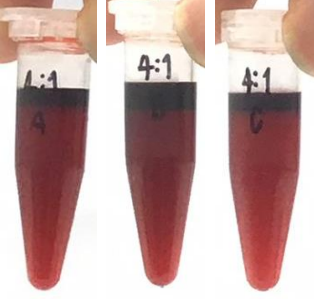
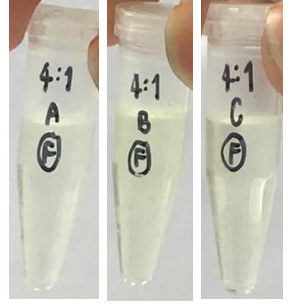
Cooling ครั้งที่ 4				
Heating ครั้งที่ 5				
Cooling ครั้งที่ 5				

Heating ครั้งที่ 6				
Cooling ครั้งที่ 6				

4.7.2 การเร่งโดยใช้แรงโน้มถ่วงโลกด้วยวิธี Centrifuge

ศึกษาโดยการนำตัวอย่างทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง centrifuge ซึ่งผลการศึกษาดังตารางที่ 15 แสดงผลการศึกษาความคงตัวด้วยวิธี centrifuge พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันและตำรับ fucoxanthin ไม่เกิดการแยกชั้น แต่ตำรับ astaxanthin พบว่าเกิดการแยกชั้นทุกอัตราส่วนและทุกจุด A, B และ C

ตารางที่ 15 แสดงผลทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Centrifuge

อัตราส่วน S_{mix}	Microemulsions	Astaxanthin	Fucoxanthin
1:1			
2:1			
3:1			
4:1			

บทที่ 5

สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 การเลือกน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว

การเลือกน้ำมันจากธรรมชาติเช่น Coconut oil, MCT oil และ Cinnamon oil ซึ่งจากการวิจัยของ Jun Chen และคณะ (44) พบว่า Cinnamon oil มีส่วนช่วยเพิ่มการซึมผ่าน มีค่า Permeation ratio เท่ากับ 56.74% การเลือกสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงรวมจะเลือกจากงานวิจัยที่ศึกษาซึ่งจากงานวิจัยของ Jianfei He และคณะ(36) ใช้ Tween®80 และ PEG 400 และจากงานวิจัยของ Wantida Chaiyana และคณะ (41) ใช้ อัตราส่วน ต่าง ๆ ของ Tween®20 และ PG

5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

5.3.1 การศึกษาขนาดอนุภาค (Particle size)

จากการศึกษาขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Zetasizer โดยวัดค่ารับทุกอัตราส่วน พบว่าการใช้ไขมัน น้ำมันเป็น Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween® และ PG ในอัตราส่วน 4:1 จุด B มีขนาดเท่ากับ 77.63 ± 31.56 nm แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$

5.3.2 การศึกษาการกระจายของขนาดอนุภาค (size distribution)

จากการศึกษาการศึกษาการกระจายของขนาดอนุภาคโดยใช้เครื่อง Zetasizer โดยวัดเป็นค่า Polydispersity index (PDI) พบว่าการใช้ไขมันน้ำมันเป็น Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween® และ PG ในอัตราส่วน 3:1 จุด C มีการกระจายของขนาดอนุภาคเท่ากับ 0.38 ± 0.04 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$ เนื่องจากจุด C มีสัดส่วนของ S_{mix} มากที่สุด

5.3.3 การนำไฟฟ้า (Electrical conductivity)

จากการศึกษาการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Zetasizer พบว่าการใช้ไขมันน้ำมันเป็น Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1 จุด C มีค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.0122 ± 0.0009 $\mu\text{S/cm}$ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$ เนื่องจากจุด C มีสัดส่วนของ S_{mix} มากที่สุด

5.3.4 ความหนืด (Viscosity)

จากรูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Shear rate และ Shear stress พบว่าจากลักษณะความชันของเส้นกราฟ (Flow curve) แสดงให้เห็นว่า ทั้งสามตำรับมีพฤติกรรมการไหลที่เหมือนกัน คือเมื่อให้แรงกระทำจะส่งผลให้ความหนืดของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้น ซึ่งตรงกับสมบัติของของไหลประเภท Newtonian

5.3 การศึกษาปริมาณตัวยาสำคัญในตำรับไมโครอิมัลชันโดยใช้โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography (HPLC))

จากการทดลองการศึกษากำหนดปริมาณตัวยาสำคัญในตำรับไมโครอิมัลชันโดยใช้โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า ผลความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบมีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้อยู่ที่ $R^2 \geq 0.995$ แต่ค่า R^2 ของสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินและฟูโคแซนทินเท่ากับ 0.6145 และ 0.9982 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ เนื่องจากสารมาตรฐานมีปริมาณที่จำกัดและมีการเตรียมไว้นานเกินไป จึงทำให้สารอาจสลายตัวจนทำให้ปริมาณในการวิเคราะห์ผิดพลาด

5.4 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่กักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชันในหลอดทดลอง

จากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่กักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชันพบว่า ไม่พบสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ เนื่องจากการวัดขนาดอนุภาคพบว่าตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารแอสตาแซนทินนั้นมีการกระจายของขนาดร้อยละ 52.52 ซึ่งมีขนาดอนุภาคอยู่ที่ 1,000-10,000 nm ซึ่งเป็นขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ จึงเป็นหนึ่งปัจจัยที่ทำให้ไมโครอิมัลชันมีการซึมผ่านผิวหนังที่ยาก อีกทั้งจากการศึกษาของ Marc Schneider และคณะ(45) ที่มีศึกษาเกี่ยวกับขนาดของอนุภาคที่จะสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ พบว่าขนาดอนุภาคที่มีขนาดประมาณ 300 nm จะไม่สามารถซึมผ่านเข้าผิวหนังของมนุษย์ได้ภายใน 6 ชั่วโมง หลังจากทาบริเวณผิวหนัง และจากการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังนั้นมีการใช้ 1X PBS เป็น receiving chamber ซึ่งอาจเป็นผลทำให้สารกลุ่มแซนโทฟิลล์นั้นไม่ซึมผ่าน เนื่องจากสารกลุ่มแซนโทฟิลล์มีค่า logP เท่ากับ 11 จึงอาจทำให้สารกลุ่มแซนโทฟิลล์มีความชอบไขมันที่สูงและถูกกักเก็บอยู่ที่ชั้น stratum corneum แทน ดังนั้นเราจึงมีการศึกษาโดยการนำผิวหนังบริเวณที่สัมผัสกับสารตัวอย่างที่เรานำมาทดสอบ ไปศึกษาด้วยการสกัดสารกลุ่มแซนโทฟิลล์จากผิวหนังพบว่ามีการสกัดสารแอสตาแซนทินสะสมอยู่ เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วพบว่ามี peak บริเวณ retention time ตรงกับสารมาตรฐาน แต่ไม่สามารถคำนวณปริมาณสารได้ เนื่องจากมีปริมาณต่ำมาก จนไม่สามารถวัดปริมาณได้ (LOQ) และไม่พบสารฟูโคแซนทิน ทั้งนี้อาจเกิดมาจากระยะเวลาระหว่างการทำ franz diffusion cell กับเวลาที่นำมาทดสอบด้วย HPLC มีระยะเวลาที่นาน จึงทำให้สารอาจเกิดการสลายตัว

5.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์

5.6.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS assay

จากการการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ ซึ่งผลการทดสอบพบว่า ตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บแอสตาแซนทินในปริมาณร้อยละ 1 ของวัฏภาคน้ำมัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า Astrol[®] และไมโครอิมัลชันที่ปราศจากสารกลุ่มแซนโทฟิลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ โดยตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บแอสตาแซนทินในปริมาณร้อยละ 1 ของวัฏภาคน้ำมันมีค่า IC_{50} ของวิธี DPPH เท่ากับ $16.33 \pm 0.65 \mu\text{g/ml}$ และ IC_{50} ของวิธี $ABTS^+$ เท่ากับ $8.69 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ แต่ Astrol[®] ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ มีค่า %inhibition ด้วยวิธี DPPH เท่ากับ $26.33 \pm 0.48 \%$ และ Astrol[®] ที่ความเข้มข้น $20 \mu\text{g/ml}$ มีค่า %inhibition ด้วยวิธี $ABTS^+$ เท่ากับ $16.03 \pm 0.12 \%$ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ ช่วยเพิ่มความคงตัวของสารแอสตาแซนทินได้ จึงทำให้สารแอสตาแซนทินที่กักเก็บในไมโครอิมัลชันมีปริมาณที่สูงกว่า Astrol[®]

โดยจากการศึกษา Jian Chen และคณะ(46) ที่มีการศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิว, สารลดแรงตึงผิวร่วม และความคงตัวของตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) โดยจากการทดสอบความคงตัวซึ่งมีการทดสอบโดยผลกระทบจากแสงและอุณหภูมิต่อสารกลุ่มแอนโทไซยานินที่กักเก็บในไมโครอิมัลชันและสารกลุ่มแอนโทไซยานินที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชัน โดยวัด retention rate ซึ่งพบว่าสารกลุ่มแอนโทไซยานินที่กักเก็บไว้ในไมโครอิมัลชัน มี retention rate ที่สูงกว่าสารกลุ่มแอนโทไซยานินที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

5.7 การศึกษาความคงตัว

จากการศึกษาความคงตัวด้วยวิธีการเร่งโดยใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูง (Heating-Cooling) และวิธีการเร่งโดยใช้แรงโน้มถ่วงโลก (Centrifuge) พบว่าไมโครอิมัลชันและไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารฟุโครแซนทิน ในทุกอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม มีความคงตัว แต่ไมโครอิมัลชันที่กักเก็บแอสตาแซนทิน มีความคงตัวเฉพาะอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ 4:1 ในวิธีการเร่งโดยใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูง (Heating-Cooling) แต่ในวิธีการเร่งโดยใช้แรงโน้มถ่วงโลก (Centrifuge) พบว่าไมโครอิมัลชันที่กักเก็บแอสตาแซนทิน เกิดการแยกชั้นเป็น 2 วัฏภาค โดยในส่วนนี้อาจเกิดจากสารวัตุดุติบ (Astrol[®]) เป็นแอสตาแซนทินที่ละลายใน MCT oil จึงอาจทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างไมโครอิมัลชันและ MCT oil

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัย

1. ควรมีการศึกษาน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวที่จะใช้เป็นองค์ประกอบของไมโครอิมัลชันเพิ่มเติม เพื่อให้เกิดไมโครอิมัลชันที่เหมาะสม เช่น การทดสอบการละลายของแอสตาแซนทินและฟูโคแซนทินในสารข้างต้นก่อน
2. ควรมีการศึกษากลไกการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติม เช่น Lipid – peroxidation
3. ควรมีการศึกษาความสามารถในการละลายของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ในสารละลายที่เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

1. Market Research Report. California: Organic Personal Care Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Skin Care, Hair Care, Cosmetics, Oral Care) (Internet). Grand View Research. 2018 (cited 2562 Feb 1). p. 140. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/organic-personal-care-market>
2. Preejith P., Vachali Brian M. BS. Carotenoids and Age-Related Macular Degeneration. Handbook of Nutrition, Diet and the Eye. 2014. 77-4 p.
3. Fakhri S, Abbaszadeh F, Dargahi L, Jorjani M. Astaxanthin : A mechanistic review on its biological activities and health benefits. Pharmacol Res J. 2018;136(August):1–20.
4. Satomi Y. Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin : A Marine Carotenoid. Anticancer Res. 2017;1562:1557–62.
5. รศ.ดร.ปราณีต โอปนะโสภิต. ระบบนำส่งยา. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2013. 1-325 p.
6. Niyomdecha A, Sc M. Metabolism and Nutritional Values of Carotenoids on Egg Yolk Color. Thai J. 2013;5:112–21.
7. Eldahshan OA, Singab ANB. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. J Pharmacogn Phytochem Carotenoids Omayma. 2013;2(1):225–34.
8. Journal T, Nutrition C. แคโรทีนอยด์และปัจจัยที่มีผลต่อการทำหน้าที่เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ของแคโรทีนอยด์. Thai J Clin Nutr. 2008;2(2):82–92.
9. Betz JM, Blackman MR, Levine M. Encyclopedia of Dietary Supplements Encyclopedia of Dietary Supplements. 2005. 1-920 p.
10. Dhankhar J, Sharma A. Astaxanthin : A potential carotenoid. Int J Pharm Sci Res. 2016;3(5):1246–59.
11. Nwachukwu ID, Udenigwe CC, Aluko RE. Lutein and zeaxanthin: production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. Trends Food Sci Technol (Internet). 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.005>
12. López-cervantes J, Sánchez-machado DI. Chapter 2.2 - Astaxanthin, Lutein, and Zeaxanthin (Internet). Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements. Elsevier Inc.; 2019. 19-25 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00003-5>
13. Zuluaga M, Gueguen V, Letourneur D. Chemico-Biological Interactions Astaxanthin-antioxidant impact on excessive Reactive Oxygen Species generation induced by ischemia and reperfusion injury. Chem Biol Interact (Internet). 2018;279(November 2017):145–58. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.012>

14. Review AC. Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutr J.* 2018;1–12.
15. Miki W. Biological Functions and Activities of Animal Carotenoids Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem J.* 1991;63(July):141–6.
16. Laboratories S. Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms. *Fish Sci J.* 1996;62(1):134–7.
17. Wu H, Fu X, Cao W, Xiang W, Wu H, Fu X, et al. Fucoxanthin induces apoptosis in human glioma cells by triggering ROS- mediated oxidative damage and regulating MAPKs and PI3K / AKT pathways Fucoxanthin induces apoptosis in human glioma cells by triggering ROS-mediated oxidative damage and regulating MA. *J Agric Food Chem.* 2019;1–29.
18. Kumar SR, Hosokawa M, Miyashita K. Fucoxanthin: A Marine Carotenoid Exerting Anti-Cancer Effects by Affecting Multiple Mechanisms. *Mar Drugs.* 2013;11:5130–47.
19. Ravishankar GA. E ff ective Inhibition of Skin Cancer, Tyrosinase, and Antioxidative Properties by Astaxanthin and Astaxanthin Esters from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *J Agric Food Chem.* 2013;61:3842–51.
20. Maeda H, Fukuda S, Izumi H, Saga N. Anti-Oxidant and Fucoxanthin Contents of Brown Alga *Ishimozuku (Sphaerotrichia divaricata)* from. *Mar Drugsarine drugs.* 2018;16:1–10.
21. Peng J, Yuan J, Wu C, Wang J. Fucoxanthin , a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms : Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Mar Drugs.* 2011;9:1806–28.
22. Mise T, Ueda M, Yasumoto T. Production of Fucoxanthin-Rich Powder from *Cladosiphon okamuranus*. *Adv J Food Sci Technol.* 2011;3(1):73–6.
23. Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis* , a Common Edible Seaweed. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;8451(May):1347–6947.
24. Airanthi MKW, Hosokawa M, Miyashita K. Comparative Antioxidant Activity of Edible Japanese Brown Seaweeds. *Food Chem.* 2011;76(1).
25. Osokawa MAH, Iwano YON, Ohno MAK, Iyashita KAM. Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Marine Carotenoid Fucoxanthin and Its Metabolites. *J Agric Food Chem.* 2007;55:8516–22.
26. Boligon AA, Machado MM, Athayde ML. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. 2014;4:517–22.
27. พญ.รศญา เหลาเรืองธนา. Basic Concepts of Skin Science (Internet). คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2019 (cited 2019 Feb 23). p. 1–10. Available from: <http://www.med.nu.ac.th/pathology/405314/book54/skin.pdf>
28. ณะเศรษฐ จาวหิรัญพัฒน์. เทคโนโลยีการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะ

- เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2560. 154 p.
29. Thanos K, Wiley DD, Chapman T. Structure and Function of Skin (Internet). Lumen learning. 2019 (cited 2019 Feb 22). p. Available from: <https://courses.lumenlearning.com/wmopen-biology2/chapter/structure-and-function-of-skin/>
 30. Ng KW, Lau WM. Skin deep:The basics of human skin structure and drug. springer. 2015;1–7.
 31. Bolzinger M, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Current Opinion in Colloid & Interface Science Penetration of drugs through skin , a complex rate-controlling membrane. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2012;17(3):156–65.
 32. Contents OA, Kumar A, Kushwaha V, Sharma PK. Pharmaceutical Microemulsion: Formulation, Characterization and Drug deliveries across skin. 2014;6(1):1–21.
 33. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th ed. The Pharmaceutical Press; 2009. 449-553 p.
 34. Kaur G, Mehta SK. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, Toxicity and antimicrobial applications. Int J Pharm (Internet). 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.059>
 35. Nair LM, Stephens N V, Vincent S, Raghavan N, Sand PJ. performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection D etermination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. J Chromatogr A. 2018;1012(October 2003):80–6.
 36. He J, Zhu Q, Dong X, Pan H, Chen J, Zheng Z. Oxyresveratrol and ascorbic acid O / W microemulsion : Preparation , characterization , anti-isomerization and potential application as antibrowning agent on fresh-cut lotus root slices. Food Chem (Internet). 2017;214:269–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.095>
 37. Khalid N, Shu G, Holland BJ, Kobayashi I, Nakajima M, Barrow CJ. Formulation and characterization of O / W nanoemulsions encapsulating high concentration of astaxanthin. Food Res Int (Internet). 2017;(April):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.019>
 38. Chen Z, Shu G, Taarji N, Barrow CJ, Nakajima M. Gypenosides as natural emulsi fi ers for oil-in-water nanoemulsions loaded with astaxanthin : Insights of formulation , stability and release properties. Food Chem (Internet). 2018;261(October 2017):322–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.054>
 39. Dai J, Moo S, Shin I, Dai J, Yong H, Cheol W, et al. Journal of Industrial and Engineering Chemistry Preparation and stability of fucoxanthin-loaded microemulsions. J Ind Eng Chem. 2014;20(4):2103–10.

40. Zhou Q, Xu J, Yang S, Xue Y, Zhang T, Wang J. The Effect of Various Antioxidants on the Degradation of O / W Microemulsions Containing Esterified Astaxanthins from *Haematococcus pluvialis*. 2015;525(5):515–25.
41. Chaiyana W, Anuchapreeda S, Leelapornpisid P, Phongpradist R, Viernstein H, Mueller M. Development of Microemulsion Delivery System of Essential Oil from *Zingiber cassumunar* Roxb . Rhizome for Improvement of Stability and Anti-In fl ammatory Activity. AAPS PharmSciTech (Internet). 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-016-0603-2>
42. Lu M, Zhang Y, Zhao C, Zhou P, Yu L. Analysis and Identifi cation of Astaxanthin and its Carotenoid Precursors from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by High-Performance Liquid Chromatography. 2010;
43. Chintong S, Phatvej W, Rerk-am U, Waiprib Y. In Vitro Antioxidant , Antityrosinase , and Cytotoxic Activities of Astaxanthin from Shrimp Waste. 2019;1–11.
44. Chen J, Jiang Q, Wu Y, Liu P, Yao J, Lu Q, et al. Potential of Essential Oils as Penetration Enhancers for Transdermal Administration of Ibuprofen to Treat Dysmenorrhoea. 2015;18219–36.
45. Schneider M, Stracke F, Hansen S, Schaefer UF. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. 2009;(August):197–206.
46. Chen J, Ma X, Yao G, Zhang W, Zhao Y. Microemulsion-based anthocyanin systems : effect of surfactants , cosurfactants , and its stability. Int J Food Prop (Internet). 2018;21(1):1152–65. Available from: <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1485032>

ภาคผนวก

ภาคผนวก (1)

1. การสร้าง pseudo-ternary phase diagram

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณของ Coconut oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®80 และ PEG 400 ในอัตราส่วน 1:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Coconut oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ยน้ำ (g)
1:9	0.21	1.81	0.46
2:8	0.41	1.61	0.17
3:7	0.61	1.41	0.06
4:6	0.82	1.22	0.06
5:5	1.02	1.02	0.06
6:4	1.20	0.82	0.06
7:3	1.42	0.61	0.08
8:2	1.62	0.42	0.08
9:1	1.81	0.22	0.08

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณของ Coconut oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®80 และ PEG 400 ในอัตราส่วน 2:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Coconut oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ยน้ำ (g)
1:9	0.21	1.81	0.40
2:8	0.43	1.61	0.29
3:7	0.60	1.45	0.08
4:6	0.81	1.22	0.06
5:5	1.01	1.02	0.06
6:4	1.21	0.82	0.06
7:3	1.42	0.65	0.06
8:2	1.61	0.41	0.06
9:1	1.80	0.21	0.06

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณของ Coconut oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween[®]80 และ PEG 400 ในอัตราส่วน 3:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Coconut oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ยน้ำ (g)
1:9	0.21	1.85	0.48
2:8	0.41	1.62	0.44
3:7	0.61	1.41	0.06
4:6	0.80	1.22	0.06
5:5	1.01	1.03	0.06
6:4	1.20	0.84	0.06
7:3	1.40	0.61	0.06
8:2	1.61	0.41	0.06
9:1	1.81	0.22	0.06

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณของ Coconut oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween[®]80 และ PEG 400 ในอัตราส่วน 4:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Coconut oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ยน้ำ (g)
1:9	0.21	1.81	0.54
2:8	0.41	1.63	0.38
3:7	0.62	1.40	0.13
4:6	0.80	1.22	0.06
5:5	1.01	1.02	0.06
6:4	1.21	0.82	0.06
7:3	1.40	0.61	0.06
8:2	1.60	0.41	0.06
9:1	1.81	0.22	0.06

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณของ MCT oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween[®]80 และ PEG 400 ในอัตราส่วน 1:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย MCT oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.22	1.81	1.17
2:8	0.41	1.62	0.55
3:7	0.60	1.43	0.33
4:6	0.81	1.21	0.18
5:5	1.02	1.01	0.10
6:4	1.21	0.82	0.06
7:3	1.40	0.61	0.06
8:2	1.60	0.42	0.06
9:1	1.80	0.23	0.06

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณของ MCT oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween[®]80 และ PEG 400 ในอัตราส่วน 2:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย MCT oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.20	1.81	1.36
2:8	0.41	1.61	0.82
3:7	0.61	1.42	0.43
4:6	0.82	1.22	0.14
5:5	1.01	1.01	0.08
6:4	1.22	0.83	0.06
7:3	1.40	0.62	0.06
8:2	1.61	0.42	0.06
9:1	1.81	0.23	0.06

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณของ MCT oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®80 และ PEG 400 ในอัตราส่วน 3:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย MCT oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.22	1.81	1.27
2:8	0.41	1.61	1.01
3:7	0.61	1.41	0.44
4:6	0.80	1.21	0.24
5:5	1.01	1.01	0.12
6:4	1.21	0.82	0.06
7:3	1.42	0.60	0.06
8:2	1.60	0.42	0.06
9:1	1.81	0.21	0.06

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณของ MCT oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®80 และ PEG 400 ในอัตราส่วน 4:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย MCT oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.21	1.81	0.74
2:8	0.42	1.61	0.66
3:7	0.61	1.41	0.44
4:6	0.81	1.23	0.26
5:5	1.02	1.01	0.08
6:4	1.23	0.81	0.06
7:3	1.42	0.61	0.06
8:2	1.63	0.42	0.06
9:1	1.82	0.21	0.06

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณของ Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 1:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Cinnamon oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ยน้ำ (g)
1:9	0.21	1.81	1.58
2:8	0.41	1.59	0.77
3:7	0.60	1.41	0.34
4:6	0.80	1.21	0.24
5:5	1.02	1.03	0.18
6:4	1.22	0.80	0.12
7:3	1.43	0.61	0.12
8:2	1.60	0.43	0.12
9:1	1.80	0.21	0.06

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณของ Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 2:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Cinnamon oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ยน้ำ (g)
1:9	0.22	1.80	1.08
2:8	0.42	1.62	0.63
3:7	0.61	1.42	0.29
4:6	0.82	1.27	0.23
5:5	1.02	1.05	0.17
6:4	1.21	0.81	0.11
7:3	1.42	0.62	0.11
8:2	1.61	0.41	0.06
9:1	1.83	0.22	0.06

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณของ Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 3:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Cinnamon oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ยน้ำ (g)
1:9	0.21	1.83	2.25
2:8	0.40	1.62	0.94
3:7	0.61	1.45	0.31
4:6	0.80	1.22	0.19
5:5	1.01	1.03	0.13
6:4	1.20	0.82	0.06
7:3	1.41	0.60	0.06
8:2	1.61	0.42	0.06
9:1	1.82	0.22	0.06

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณของ Cinnamon oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Cinnamon oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ยน้ำ (g)
1:9	0.21	1.80	2.46
2:8	0.41	1.61	1.37
3:7	0.60	1.42	0.34
4:6	0.81	1.21	0.23
5:5	1.02	1.02	0.23
6:4	1.21	0.81	0.17
7:3	1.42	0.62	0.11
8:2	1.61	0.41	0.11
9:1	1.82	0.22	0.06

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณของ Coconut oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 1:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Coconut oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.21	1.82	0.06
2:8	0.41	1.61	0.06
3:7	0.62	1.41	0.06
4:6	0.82	1.21	0.06
5:5	1.02	1.02	0.06
6:4	1.20	0.81	0.06
7:3	1.41	0.61	0.06
8:2	1.61	0.43	0.06
9:1	1.81	0.22	0.06

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณของ Coconut oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 2:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Coconut oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.21	1.80	0.06
2:8	0.41	1.61	0.06
3:7	0.61	1.43	0.06
4:6	0.82	1.21	0.06
5:5	1.02	1.00	0.06
6:4	1.21	0.83	0.06
7:3	1.41	0.61	0.06
8:2	1.62	0.43	0.06
9:1	1.82	0.22	0.06

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณของ Coconut oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 3:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Coconut oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.20	1.81	0.06
2:8	0.42	1.60	0.06
3:7	0.61	1.41	0.06
4:6	0.79	1.22	0.06
5:5	1.00	1.00	0.06
6:4	1.20	0.82	0.06
7:3	1.41	0.60	0.06
8:2	1.60	0.41	0.06
9:1	1.80	0.21	0.06

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณของ Coconut oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย Coconut oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.21	1.81	0.13
2:8	0.41	1.62	0.06
3:7	0.61	1.41	0.06
4:6	0.80	1.22	0.06
5:5	1.02	1.02	0.06
6:4	1.21	0.81	0.06
7:3	1.42	0.62	0.06
8:2	1.61	0.41	0.06
9:1	1.80	0.22	0.06

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณของ MCT oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 1:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย MCT oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.22	1.81	0.09
2:8	0.41	1.61	0.06
3:7	0.62	1.43	0.06
4:6	0.82	1.20	0.06
5:5	1.03	1.02	0.06
6:4	1.23	0.82	0.06
7:3	1.41	0.61	0.06
8:2	1.61	0.42	0.06
9:1	1.81	0.22	0.06

ตารางที่ 18 แสดงปริมาณของ MCT oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 2:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย MCT oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.21	1.81	0.21
2:8	0.41	1.60	0.13
3:7	0.63	1.40	0.08
4:6	0.81	1.21	0.06
5:5	1.07	1.01	0.06
6:4	1.21	0.82	0.06
7:3	1.41	0.61	0.06
8:2	1.61	0.43	0.06
9:1	1.82	0.23	0.06

ตารางที่ 19 แสดงปริมาณของ MCT oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 3:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย MCT oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.20	1.80	0.15
2:8	0.41	1.62	0.06
3:7	0.61	1.40	0.06
4:6	0.81	1.20	0.06
5:5	1.00	1.01	0.06
6:4	1.21	0.79	0.06
7:3	1.41	0.60	0.06
8:2	1.60	0.40	0.06
9:1	1.80	0.21	0.06

ตารางที่ 20 แสดงปริมาณของ MCT oil และ S_{mix} ระหว่าง Tween®20 และ PG ในอัตราส่วน 4:1

อัตราส่วน Oil: S_{mix}	ปริมาณเฉลี่ย MCT oil (g)	ปริมาณเฉลี่ย S_{mix} (g)	ปริมาณเฉลี่ย น้ำ (g)
1:9	0.20	1.80	0.25
2:8	0.42	1.61	0.14
3:7	0.61	1.41	0.09
4:6	0.81	1.20	0.06
5:5	1.02	1.01	0.06
6:4	1.21	0.81	0.06
7:3	1.41	0.62	0.06
8:2	1.62	0.42	0.06
9:1	1.81	0.21	0.06

2. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสูตรตำรับ
ตารางที่ 21 แสดงผลทางสถิติของขนาดอนุภาค

Duncan a.,b

		Subset
Treatment2	N	1
BSmix4_1	6	77.628333

Duncan a.,b

		Subset				
Treatment2	N	1	2	3	4	5
BSmix1_1	6	110.480000	110.480000			
BSmix3_1	6	113.561667	113.561667			
BSmix2_1	6	114.478333	114.478333			
ASmix3_1	6		155.200000	155.200000		
CSmix1_1	6			182.216667	182.216667	
ASmix2_1	6				204.366667	204.366667
CSmix2_1	6					231.233333
CSmix3_1	6					
ASmix1_1	6					
ASmix4_1	6					
CSmix4_1	6					
Sig.		.132	.067	.224	.318	.227

Duncan a.,b

	Subset	
Treatment2	6	7
CSmix3_1	278.816667	
ASmix1_1	293.033333	
ASmix4_1	312.083333	312.083333
CSmix4_1		351.433333
Sig.	.159	.079

ตารางที่ 22 แสดงผลทางสถิติของการกระจายอนุภาค

Duncan a.,b

		Subset
Treatment2	N	1
CSmix3_1	6	.376667

Duncan a.,b

		Subset		
Treatment2	N	1	2	3
BSmix2_1	6	.378667		
ASmix4_1	6	.386667		
ASmix2_1	6	.404000		
CSmix4_1	6	.410667		
CSmix2_1	6	.414667		
BSmix3_1	6	.451333		
ASmix1_1	6	.461167		
BSmix4_1	6	.466333		
BSmix1_1	6		.571667	
CSmix1_1	6		.573500	
ASmix3_1	6			.691000
Sig.		.134	.971	1.000

ตารางที่ 23 แสดงผลทางสถิติของการนำไฟฟ้า

Duncan a.,b

		Subset
Treatment2	N	1
CSmix4_1	6	.012200

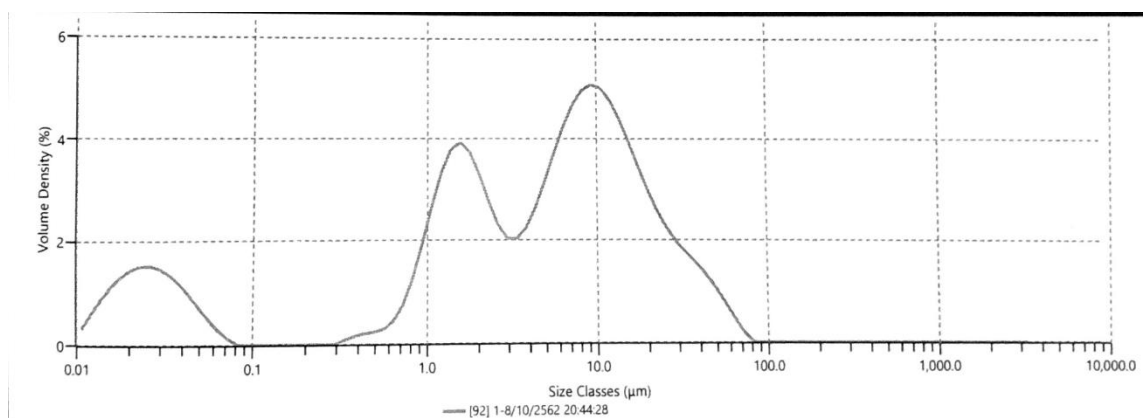
Duncan a.,b

		Subset			
Treatment2	N	1	2	3	4
CSmix2_1	6	.012567			
BSmix4_1	6	.013483			
CSmix1_1	6	.014050			
BSmix3_1	6	.014567			
BSmix1_1	6	.015200			
BSmix2_1	6	.015217			
CSmix3_1	6		.020033		
ASmix4_1	6			.024717	
ASmix2_1	6			.026183	.026183
ASmix1_1	6			.027850	.027850
ASmix3_1	6				.029817
Sig.		.220	1.000	.161	.104

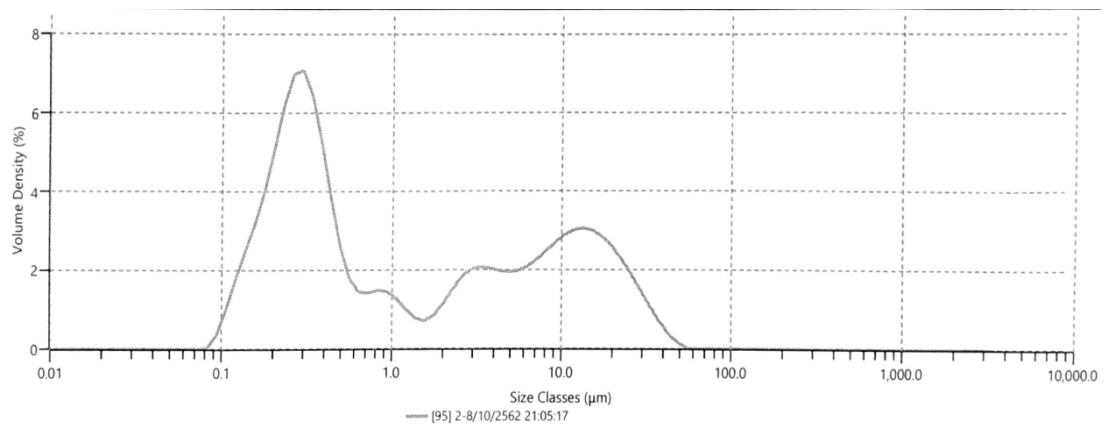
ตารางที่ 24 แสดงผลทางสถิติของความหนืด

Duncan a.,b			
Treatment\Visco	N	Subset	
		1	2
B1_01	2	.044600	
A1_01	2	.055450	
C1_01	2	.060350	
B2_01	2	.063050	
A2_01	2	.064500	
B3_01	2	.069900	
B4_01	2	.074000	
Me4_01	2	.074000	
A3_01	2	.075300	
Fuco1%4_01	2	.084850	
Asta1%4_01	2	.087550	
C3_01	2	.100500	.100500
A4_01	2	.103400	.103400
C4_01	2	.110250	.110250
C2_01	2		.164850
Sig.		.067	.057

3. การศึกษาสูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์

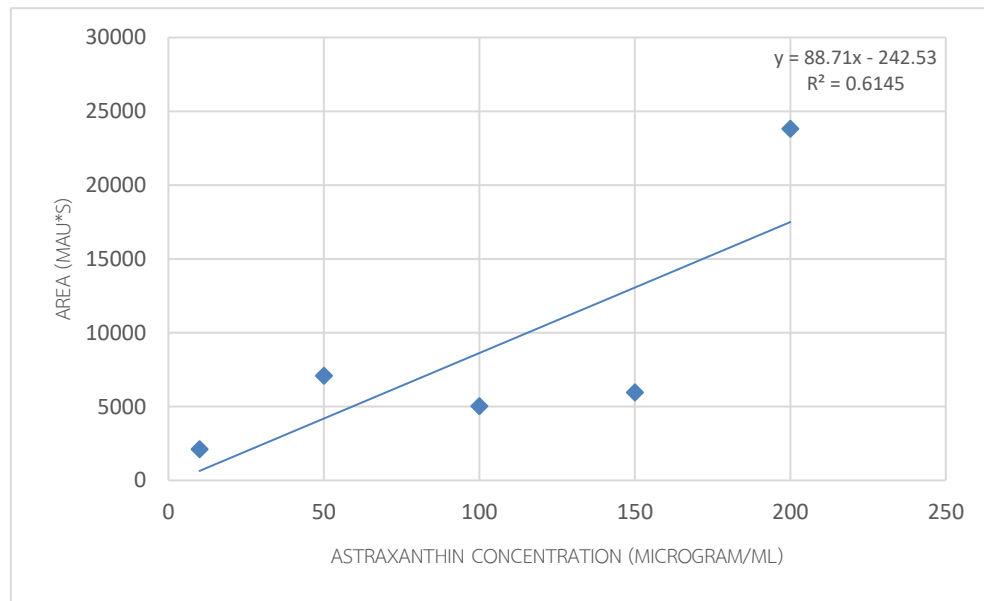


รูปที่ 1 แสดงขนาดอนุภาคและปริมาณของอนุภาคในไมโครอิมัลชันที่กักเก็บแอสตาแซนทิน

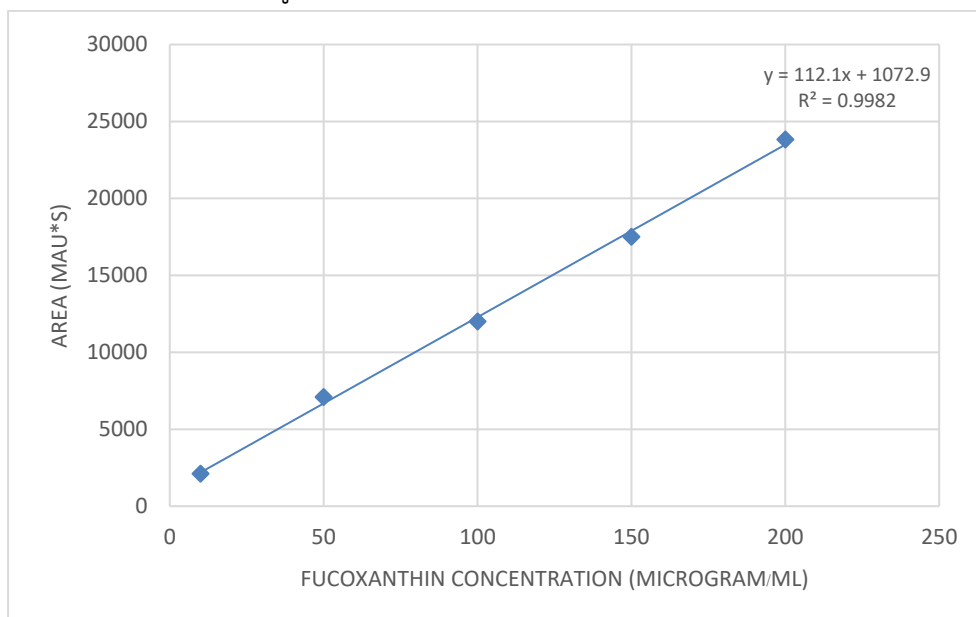


รูปที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคและปริมาณของอนุภาคในไมโครอิมัลชันที่กักเก็บฟูโคแซนทิน

4. การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่กักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชันในหลอดทดลอง



รูปที่ 3 แสดง Standard cuver ของแอสตาแซนทิน



รูปที่ 4 แสดง Standard cuver ของฟูโคแซนทิน

5. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์

ตารางที่ 25 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

สารทดสอบ	final conc. (µg/ml)	Abs - Blank			%Inhibition			IC50 (µg/ml) or %inhibition			Mean	SD
		1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1% ASX	50.00	0.012	0.048	0.056	98.40	93.62	92.55	15.65	16.39	16.95	16.33	0.65
	25.00	0.212	0.203	0.222	71.81	73.01	70.48					
	12.50	0.425	0.47	0.468	43.48	37.50	37.77					
	6.25	0.539	0.56	0.571	28.32	25.53	24.07					
	3.13	0.608	0.631	0.634	19.15	16.09	15.69					
	1.56	0.632	0.668	0.667	15.96	11.17	11.30					
	0.78	0.66	0.686	0.689	12.23	8.78	8.38					
	0.39	0.657	0.69	0.691	12.63	8.24	8.11					
ASX RM	100.00	0.553	0.551	0.558	26.46	26.73	25.80	26.46	26.73	25.80	26.33	0.48
	50.00	0.623	0.644	0.607	17.15	14.36	19.28					
	25.00	0.653	0.668	0.646	13.16	11.17	14.10					
	12.50	0.662	0.685	0.665	11.97	8.91	11.57					
	6.25	0.672	0.696	0.67	10.64	7.45	10.90					
	3.13	0.681	0.699	0.68	9.44	7.05	9.57					
	1.56	0.682	0.705	0.679	9.31	6.25	9.71					
	0.78	0.677	0.698	0.678	9.97	7.18	9.84					
Micro EM	100.00	0.753	0.759	0.759	-0.13	-0.93	-0.93				IN	IN
	50.00	0.762	0.758	0.759	-1.33	-0.80	-0.93					
	25.00	0.756	0.753	0.752	-0.53	-0.13	0.00					
	12.50	0.764	0.768	0.761	-1.60	-2.13	-1.20					
	6.25	0.769	0.771	0.774	-2.26	-2.53	-2.93					
	3.13	0.779	0.778	0.767	-3.59	-3.46	-1.99					
	1.56	0.776	0.771	0.773	-3.19	-2.53	-2.79					
	0.78	0.767	0.766	0.761	-1.99	-1.86	-1.20					
negative control	—	0.755	0.747	0.753	—	—	—	—	—	—	—	—

ตารางที่ 26 แสดงผลการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS⁺ assay

สารทดสอบ	final conc. (µg/ml)	Abs - Blank			%Inhibition			IC50 (µg/ml) or %inhibition			Mean	SD
		1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1% ASX	20.00	0.146	0.146	0.147	83.31	83.31	83.20	8.60	8.72	8.76	8.69	0.08
	10.00	0.394	0.398	0.4	54.97	54.51	54.29					
	5.00	0.562	0.574	0.565	35.77	34.40	35.43					
	2.50	0.657	0.679	0.718	24.91	22.40	17.94					
	1.25	0.741	0.757	0.776	15.31	13.49	11.31					
	0.63	0.766	0.813	0.814	12.46	7.09	6.97					
	0.31	0.79	0.818	0.835	9.71	6.51	4.57					
	0.16	0.805	0.819	0.835	8.00	6.40	4.57					
ASX RM	20.00	0.734	0.733	0.732	16.11	16.23	16.34	16.11	16.23	16.34	16.23	0.12
	10.00	0.805	0.803	0.811	8.00	8.23	7.31					
	5.00	0.832	0.841	0.841	4.91	3.89	3.89					
	2.50	0.842	0.85	0.846	3.77	2.86	3.31					
	1.25	0.844	0.851	0.851	3.54	2.74	2.74					
	0.63	0.849	0.85	0.844	2.97	2.86	3.54					
	0.31	0.848	0.84	0.842	3.09	4.00	3.77					
	0.16	0.841	0.848	0.852	3.89	3.09	2.63					
Micro EM	20.00	0.883	0.882	0.886	-0.91	-0.80	-1.26	-	-	-	IN	IN
	10.00	0.886	0.885	0.889	-1.26	-1.14	-1.60					
	5.00	0.883	0.889	0.88	-0.91	-1.60	-0.57					
	2.50	0.88	0.888	0.887	-0.57	-1.49	-1.37					
	1.25	0.882	0.897	0.891	-0.80	-2.51	-1.83					
	0.63	0.884	0.891	0.896	-1.03	-1.83	-2.40					
	0.31	0.887	0.893	0.892	-1.37	-2.06	-1.94					
	0.16	0.882	0.893	0.885	-0.80	-2.06	-1.14					
negative control	-	0.879	0.869	0.878	-	-	-	-	-	-	-	-

ภาคผนวก (2)
แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันชนิดปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อกักเก็บสารกลุ่มแซนโทฟิลล์สำหรับ
นำส่งทางผิวหนัง

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ญญ.ดร.นปภัช รัตนะชิตธวัช

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 5 มกราคม 2562 ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) 25 พฤศจิกายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 0 ปี 11 เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 5 มกราคม 2562

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ 9,000 บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี 5 มกราคม 2562

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ
1.ค่าวัสดุและสารเคมี	7,000	7,000	0
2.ค่าใช้สอย	2,000	2,000	0
รวม	9,000	9,000	0

(.....)

ญญ.ดร.นปภัช รัตนะชิตธวัช
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย