



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์
เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล
(Development of polymeric micelles with ethanol and terpenes
for dermal delivery improvement of resveratrol)

โดย

นสภ. สุทธธบถ	วรรณคำ	58210134
นสภ. คุณวุฒิ	ทิพย์ทวีชัย	58210156
นสภ. ธัญญกัญจน์	จันทระประสิทธิ์	58210267

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ก

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์
เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล
(Development of polymeric micelles with ethanol and terpenes
for dermal delivery improvement of resveratrol)

โดย

นสภ. สุทธบถ	วรรณคำ	58210134
นสภ. คุณวุฒิ	ทิพย์ทวีชัย	58210156
นสภ. ธัญญกัญจน์	จันทร์ประสิทธิ์	58210267

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมเครื่องสำอางมีความเจริญก้าวหน้าในหลาย ๆ ด้าน รวมทั้งการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากขึ้น เนื่องจากผู้คนส่วนใหญ่มีความเชื่อว่าการใช้สารสกัดที่ได้จากธรรมชาติจะมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยมากกว่าสารสังเคราะห์หรือสารที่ถูกดัดแปลงขึ้น

ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาสูตรตำรับเครื่องสำอางโดยใช้สารสกัดที่ได้มาจากธรรมชาติคือเรสเวอราทรอลซึ่งเป็นสารที่สามารถสกัดได้จากพืชตระกูลองุ่น เนื่องจากสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ช่วยเพิ่มความขาวให้กับผิวหน้าและลดเลือนริ้วรอยได้ จึงเหมาะสมที่จะนำมาเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง แต่เนื่องจากเรสเวอราทรอลมีคุณสมบัติซึมผ่านผิวหนังได้น้อย ไม่คงตัวต่อแสงและความร้อนจึงทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะพัฒนาระบบนำส่งยาเพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่าน (Transdermal drug delivery systems) เข้าสู่ผิวหนังได้ โดยนำนาโนเทคโนโลยีในรูปแบบพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ (Polymeric micelle) มาช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว ร่วมกับการใช้เอทานอลและเทอร์พีนส์เพื่อศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหน้า การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการเพื่อสนับสนุนเกี่ยวกับระบบการนำส่งและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ให้กับผู้ที่มีความสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะสร้างประโยชน์ให้กับผู้ที่มีความสนใจไม่มากนัก

คณะผู้วิจัย

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2562

เรื่อง การพัฒนาพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์ เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของ
เรสเวอราทรอล

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | | |
|--------------------|-----------------|------|----------|
| 1. นสภ. สุทธภณ | วรรณคำ | รหัส | 58210134 |
| 2. นสภ. คุณวุฒิ | ทิพย์ทวีชัย | รหัส | 58210156 |
| 3. นสภ. ธัญญกัญจน์ | จันทร์ประสิทธิ์ | รหัส | 58210267 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภก.ผศ.ดร. ถิรพิทย์ สุ่มงกช

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์ ได้แก่ ดี-ลิโมนีน ซิทราล และซีเนโอล เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล พอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่เตรียมได้ประกอบด้วยเทอร์พีนส์ร้อยละ 1 พอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 25 เอทานอลร้อยละ 5 และน้ำร้อยละ 69 โดยสามารถบรรจุเรสเวอราทรอลได้ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่เตรียมได้มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 26.33 ถึง 31.06 นาโนเมตร มีประจุพื้นผิวเป็นกลาง และมีการกระจายขนาดที่แคบ จากการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกายพบว่า พอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและดี-ลิโมนีนสามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมคือเรสเวอราทรอลในสารละลายเอทานอล

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2019

: Development of polymeric micelles with ethanol and terpenes for dermal delivery
improvement of resveratrol

By

- | | | |
|-------------------|--------------|-------------|
| 1. Mr. Suttabot | Wannakham | ID 58210134 |
| 2. Mr. Khunnawut | Tiptaveechai | ID 58210156 |
| 3. Miss Thanyakan | Chanprasit | ID 58210267 |

Advisor:

Assistant Professor Dr. Thirapit Subongkot (Ph.D.)

ABSTRACT

This study was aimed to develop novel polymeric micelles with ethanol and terpenes to improve skin penetration of resveratrol. The terpenes used for this study were d-limonene, citral and cineole. The prepared polymeric micelles composed of 1 % terpenes, 25 % poloxamer 184, 5 % ethanol and 69 % water. Resveratrol could be loaded in the polymeric micelles at a concentration of 25 mg/ml. The obtained polymeric micelles with ethanol and terpenes were characterized for their size, surface charge and size distribution. The obtained polymeric micelles with ethanol and terpenes had average particle size from 26.33 to 31.06 nm, neutral surface charge with narrow size distribution. The *in vitro* skin penetration study revealed that polymeric micelles with ethanol and d-limonene could significantly increase skin penetration of resveratrol compared to resveratrol in ethanolic solution as control.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2562 เรื่องการพัฒนาพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอลนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากการสนับสนุนและความช่วยเหลือจาก ภก.ผศ.ดร. ถิรพิทย์ สุนทกข อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ผู้ซึ่งได้ให้คำแนะนำ ให้ความรู้ ให้แนวคิดและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้ นอกจากนี้ยังช่วยแก้ไขปัญหที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำโครงการวิจัยอีกด้วย จึงทำให้โครงการวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ทางคณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนในการขอเข้าใช้สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อดำเนินการทำการทดลองภายในห้องปฏิบัติการทางเภสัชกรรม คณะกรรมการอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้น ทางคณะผู้วิจัยขอน้อมรับผิดแต่เพียงผู้เดียว รวมถึงยินดีรับฟังข้อเสนอแนะเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

นสภ. สุทธชล	วรรณคำ
นสภ. คุณวุฒิ	ทิพย์ทวีชัย
นสภ. ธัญญกัญจน์	จันทรประสิทธิ์
วันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2562	

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
คำนำ	ข
บทคัดย่อ	ค
ABSTRACT	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฌ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
1 บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 กรอบแนวคิด	2
1.4 สมมติฐาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
3 บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	20
3.1 สารเคมีและเครื่องมือ	20
3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของเรสเวอร่าทรอลโดยใช้ HPLC	21
3.3 การหาค่าการละลายของเรสเวอร่าทรอลในสารละลายเอทานอลที่มี ความเข้มข้นร้อยละ 5 ในน้ำ โดยปริมาตรต่อปริมาตร	22
3.4 การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram โดยใช้วิธีไทเทรตด้วยน้ำ (Water titration method)	22
3.5 การเตรียมพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์	22
3.6 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของพอลิเมอร์ริกไมเซลล์	23

3.6.1	การศึกษาขนาดอนุภาคและประจุพื้นผิว	23
3.7	การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (<i>in vitro</i> skin penetration test)	24
3.7.1	การเตรียมผิวหนัง	24
3.7.2	การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนัง	24
3.8	การวิเคราะห์เชิงปริมาณ	25
3.9	การวิเคราะห์เชิงสถิติ	25
4	บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	26
4.1	การพัฒนาสูตรตำรับพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล	26
4.1.1	การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram โดยใช้วิธีไทเทรตด้วยน้ำ (Water titration method)	26
4.2	การศึกษาค่าการละลายของเรสเวอราทรอลในสารละลายเอทานอลร้อยละ 5 v/v	35
4.3	ผลการศึกษาคูณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของพอลิเมอร์ริกไมเซลล์	35
4.3.1	ผลการศึกษาการวัดขนาด การกระจาย และประจุพื้นผิวของอนุภาคโดยใช้เครื่อง Dynamic Light Scattering (DLS)	35
4.4	ผลการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (<i>in vitro</i> skin penetration test)	36
5	บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	38
	เอกสารอ้างอิง	39
	ภาคผนวก	44

สารบัญตาราง

หัวข้อ	หน้า
ตารางที่ 1 การใช้นาโนเทคโนโลยีในการพัฒนาสูตรตำรับของเรสเวอราทรอล	14
ตารางที่ 2 การออกแบบและพัฒนา resveratrol-loaded colloidal system ในรูปแบบ Compritol ATO-based resveratrol colloidal carriers (CCCs)	17
ตารางที่ 3 สูตรตำรับของพอลิเมอร์ริกไมเซลล์	23
ตารางที่ 4 การวัดขนาด การกระจาย และประจุพื้นผิวของอนุภาคโดยใช้เครื่อง Dynamic Light Scattering (DLS)	36
ตารางที่ 5 ปริมาณเรสเวอราทรอลที่แพร่ผ่านผิวหนังในชั้นต่าง ๆ	37

สารบัญรูปภาพ

หัวข้อ	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของทรานส์-เรสเวอราทรอลและซิส-เรสเวอราทรอล	5
รูปที่ 2 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอยล์ โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 2:1	26
รูปที่ 3 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอยล์ โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:1	27
รูปที่ 4 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอยล์ โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:2	27
รูปที่ 5 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอยล์ โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:3	28
รูปที่ 6 Pseudo-ternary phase diagram ของซีทราล โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 2:1	28
รูปที่ 7 Pseudo-ternary phase diagram ของซีทราล โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:1	29
รูปที่ 8 Pseudo-ternary phase diagram ของซีทราล โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:2	29
รูปที่ 9 Pseudo-ternary phase diagram ของซีทราล โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:3	30
รูปที่ 10 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีน โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 2:1	30
รูปที่ 11 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีน โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:1	31
รูปที่ 12 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีน โดยมีพอลออกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:2	31

รูปที่ 13 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีนโดยมีพอลลอกซาเมอร์ 184	
กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:3	32
รูปที่ 14 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอลโดยมีพอลลอกซาเมอร์ 184	
กับเอทานอลที่อัตราส่วน 5:1	33
รูปที่ 15 Pseudo-ternary phase diagram ของซีทราลโดยมีพอลลอกซาเมอร์ 184	
กับเอทานอลที่อัตราส่วน 5:1	34
รูปที่ 16 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีนโดยมีพอลลอกซาเมอร์ 184	
กับเอทานอลที่อัตราส่วน 5:1	34

สารบัญภาคผนวก

หัวข้อ	หน้า
ตาราง	
ตารางที่ 1 การตรวจสอบความแม่นยำของกระบวนการทดลอง	45
ตารางที่ 2 การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการทดลอง	47
ตารางที่ 3 การหากราฟมาตรฐาน	48
ตารางที่ 4 การหา LOD และ LOQ	50
ตารางที่ 5 ขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ	52
ตารางที่ 6 การกระจายอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ	52
ตารางที่ 7 ประจุพื้นผิวของอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ	53
ตารางที่ 8 ปริมาณเรสเวอราทรอลที่แพร่ผ่านผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียมและ Deeper skin ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเทอร์พีนส์ชนิดดี-ลิโมนีน	54
ตารางที่ 9 การวิเคราะห์สถิติ One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS 26	55
รูปภาพ	
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของเรสเวอราทรอลที่สร้างได้จากความเข้มข้นและค่า AUC เฉลี่ย	49
รูปที่ 2 HPLC โครมาโทแกรมของเรสเวอราทรอล	54

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เรสเวราทรอล (resveratrol) เป็นสารสกัดหลักที่ได้จากพืชตระกูลองุ่น (grapes) สายพันธุ์ *Vitis vinifera* เรสเวราทรอลเป็นสารที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นสารสำคัญของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยมีรายงานว่าเรสเวราทรอลมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-Inflammation) [1] มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคทางระบบประสาท (neuroprotective) [2] มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) [3] รวมทั้งมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความขาวให้กับผิวหนัง (skin whitening) [4,5] และลดเลือนริ้วรอย (Anti-aging) [6] ได้ ในทางทฤษฎีแล้วคุณสมบัติของสารที่สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ดีนั้น ควรมีมวลโมเลกุลไม่เกิน 500 ดาลตัน และมีค่า log partition coefficient (log P) อยู่ระหว่าง 1 ถึง 3 [7] อย่างไรก็ตามเรสเวราทรอลมีมวลโมเลกุล 228.25 ดาลตัน และมีค่า log partition coefficient (log P) เท่ากับ 3.1 [8] ทำให้แพร่ผ่านผิวหนังได้น้อย จึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบนำส่งเพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวราทรอลให้มากขึ้น

พอลิเมอร์ไมเซลล์ (Polymeric micelles) เป็นระบบนำส่งยาประเภทคอลลอยด์รูปแบบหนึ่งที่มีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรที่เตรียมโดยใช้พอลิเมอร์ที่เป็นแอมฟิพอลิเมอร์ (amphipolymer) ซึ่งสามารถก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้ด้วยตัวเองเช่นเดียวกับไมเซลล์ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิว ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) โดยแกนด้านในเป็นแบบไม่ชอบน้ำจึงสามารถกักเก็บยาที่ละลายน้ำได้น้อยไว้ในอนุภาคได้ [9]

อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์ไมเซลล์ยังมีข้อจำกัดบางประการคือ ไม่สามารถบรรจุสารได้ในปริมาณมาก อีกทั้งการทำพอลิเมอร์ไมเซลล์ชนิดเดียวไม่สามารถนำส่งสารได้ดีเท่าที่ควรและสารที่บรรจุในไมเซลล์จะไปสะสมบริเวณสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) [10] เท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มสารช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังให้กับพอลิเมอร์ไมเซลล์ จากรายงานการวิจัยของ Kahraman และคณะ [10] ซึ่งใช้พอลิเมอร์ไมเซลล์ (พอลอกซาเมอร์ 407 และ พอลอกซาเมอร์ 181) ร่วมกับสารเพิ่มการแพร่ผ่านในกลุ่มเทอร์ปีนส์ (terpenes) ในการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของ Tacrolimus รายงานว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเทอร์ปีโนลิน (terpinolene) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 v/v สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านได้ดีกว่ายูคาลิปทอล (Eucalyptol) ลิโมนีน (Limonene) ซึ่งอยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์ปีนส์ (monoterpenes) และนีโรลิดอล (Nerolidol) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเซสควิเทอร์ปีนส์

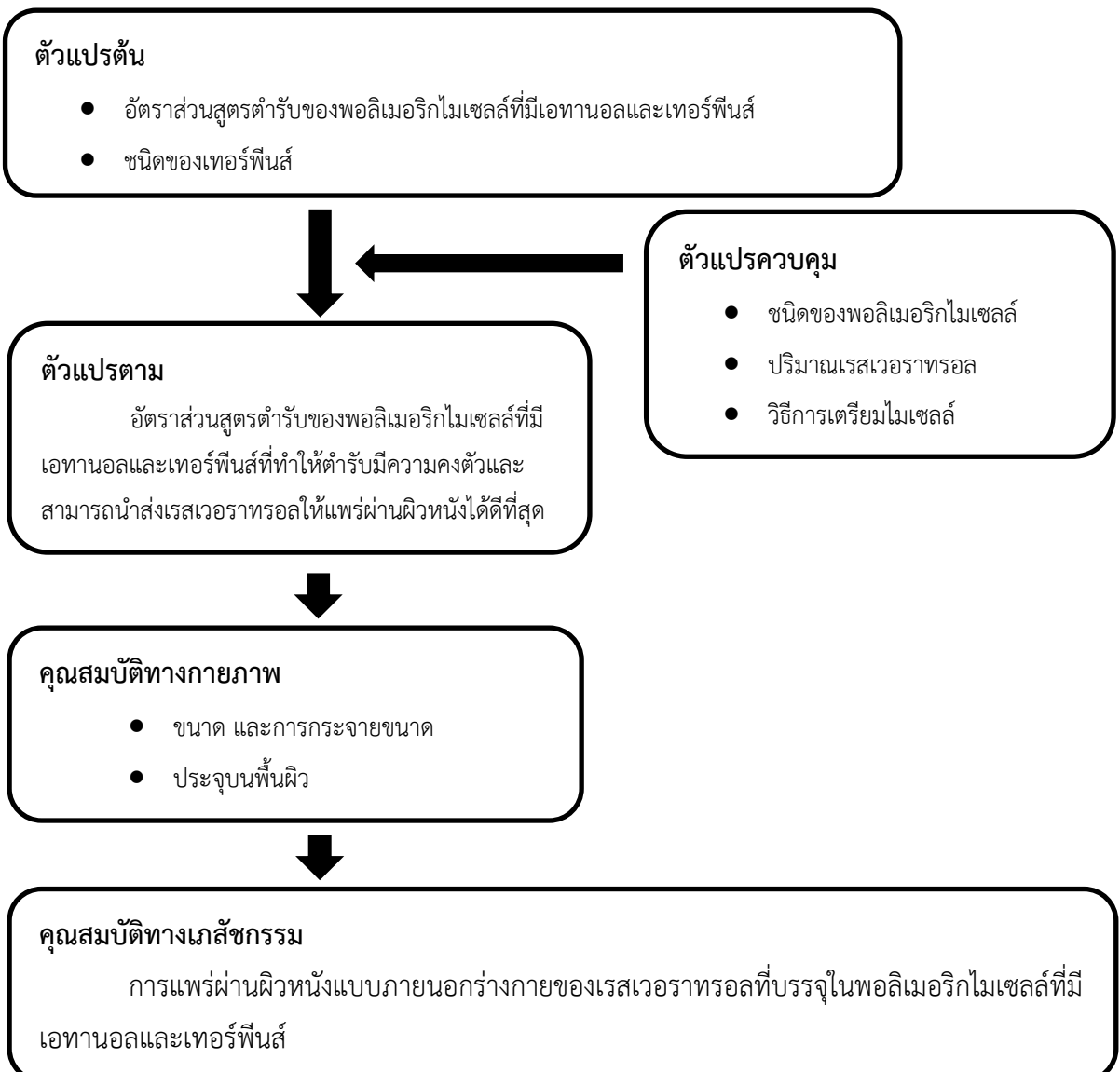
(sesquiterpenes) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีสารช่วยเพิ่มการแพร่ผ่าน 2 ชนิดร่วมกัน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการพัฒนาระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีสารช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านร่วมกัน 2 ชนิด เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านเรสเวอราทรอลทางผิวหนัง โดยใช้พอล็อกซาเมอร์ 184 ร่วมกับเอทานอลและโมโนเทอร์พีนส์ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยมาก่อน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาสูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์เป็นสารเพิ่มการแพร่ผ่านเพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์

กรอบแนวคิด



สมมติฐาน

คาดว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์จะสามารถช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอลได้มากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สูตรตำรับที่มีลักษณะที่ดีของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์ซึ่งเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล
2. เพื่อเป็นองค์ความรู้ทางวิชาการในการศึกษาประสิทธิภาพของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์ซึ่งเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังของเรสเวอราทรอล
3. ได้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีฤทธิ์เพิ่มความกระจ่างใสให้กับผิวหนัง
4. เพื่อนำผลที่ได้จากงานวิจัยไปพัฒนาและประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยใช้ความรู้ทางนาโนเทคโนโลยีและเผยแพร่เพื่อเป็นข้อมูลให้ผู้ที่สนใจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เมื่อปีคริสต์ศักราช 1940 มีการรายงานการพบเรสเวอราทรอลเป็นครั้งแรก ซึ่งสกัดได้จากรากของต้นอเมริกันเฮลเลบอร์ (White hellebore) สายพันธุ์ *Veratrum grandiflorum* O. Loes [11–13] ต่อมา มีการค้นพบเรสเวอราทรอลในรากของ *Polygonum cuspidatum* ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่นนำมาใช้เป็นยารักษาโรคกันอย่างแพร่หลาย [8,13,14] ดังนั้นจึงมีการศึกษาฤทธิ์ทางการรักษาของเรสเวอราทรอลโดยพบว่าเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-Inflammation) [1] มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคทางระบบประสาท (neuroprotective) [2] มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) [3] รวมทั้งมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความขาวให้กับผิวหนัง (skin whitening) [4,5] และลดเลือนริ้วรอย (anti-aging) [6] ได้ ซึ่งมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเรสเวอราทรอล ดังนี้

เรสเวอราทรอลมีกลไกการออกฤทธิ์ช่วยเพิ่มความขาวให้กับผิวหนังโดยเรสเวอราทรอลสามารถยับยั้ง Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) และไทโรซิเนส (Tyrosinase) แบบ down regulation ผ่าน ERK pathway ซึ่งเพิ่มการแสดงออกของยีน SIRT1 และ FOXO3a โดยยีน SIRT1 จะเกี่ยวข้องกับการป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์และยีน FOXO3a จะยับยั้งการสร้างเมลานิน (melanin) โดย MITF เป็นตัวควบคุมหลักของการสร้างเมลานินซึ่งมีไทโรซิเนสทำหน้าที่เป็นเอนไซม์สำคัญของกระบวนการสร้างเม็ดสีโดยเอนไซม์จะทำการเปลี่ยนไทโรซีน (tyrosine) ให้เป็นเลโวโดปา (levodopa) หลังจากนั้นจะถูกออกซิไดซ์กลายเป็นโดปาคิวโนน (dopaquinone) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน หากมีเมลานินจำนวนมากจะทำให้สีผิวเปลี่ยนเป็นลักษณะสีแทนมากขึ้น ดังนั้นจึงต้องยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสเพื่อลดกระบวนการสร้างเม็ดสี [5]

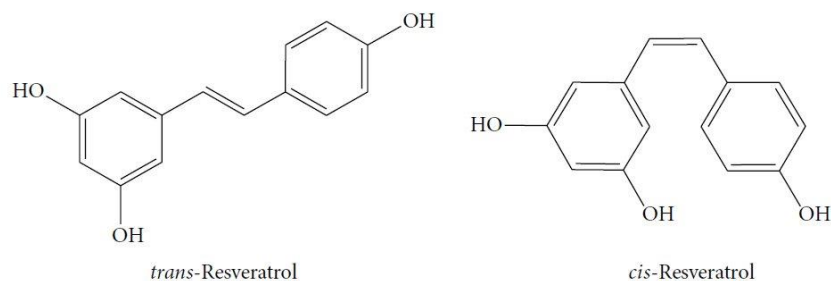
เรสเวอราทรอลจะไปยับยั้งที่ตำแหน่ง active site ของไทโรซิเนสโดยยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) แล้วทำให้โครงสร้างและกลไกของไทโรซิเนสสูญเสียการทำงานไปอย่างถาวร ดังนั้นผลจาก down regulation ของ MITF และไทโรซิเนสจะยับยั้งการสร้างเมลานิน ส่งผลให้ผิวขาวหรือดูกระจ่างใสขึ้น อีกทั้งยังพบว่าสามารถลดการสะสมของเม็ดสีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยรังสี UVB ในหมู่ยูคาทาน (Yucatan) ในรัฐของประเทศเม็กซิโก อย่างไรก็ตามการใช้เรสเวอราทรอลแบบเดี่ยวอาจให้ฤทธิ์ด้านการเพิ่มความขาวและความกระจ่างใสไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากกลไกการทำงานของเรสเวอราทรอลเอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องผสมกับสารสกัดตัวอื่นร่วมด้วย

เช่น หม่อน (*Morus alba*) เพื่อเสริมฤทธิ์ของเรสเวราทรอลให้ดีขึ้น [4,5] นอกจากนี้เรสเวราทรอลสามารถเพิ่มการทำงานของ Nuclear factor-E2-related factor-2 หรือ Nrf2 ส่งผลให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์กลูตาไธโอน (glutathione synthetase หรือ GSH) โดยกลูตาไธโอนเป็นสารที่มีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความขาวให้กับผิวหนังได้ [6]

เรสเวราทรอลมีกลไกการออกฤทธิ์ช่วยลดเลือนริ้วรอยได้ เนื่องจากเรสเวราทรอลมีกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน AP-1 และยีน NF-kB ซึ่งทั้งคู่จัดเป็น transcription factor ที่สำคัญ โดยยีน AP-1 เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเอนไซม์เมทัลโลโปรตีนเนส (metalloproteinases หรือ MMPs) ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการทำลายโครงสร้างคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดริ้วรอย ส่วนยีน NF-kB เป็นตัวสร้างสารก่อการอักเสบ ส่งผลให้ผิวหนังถูกทำลายและก่อให้เกิดริ้วรอยได้ นอกจากนี้เรสเวราทรอลสามารถป้องกันการดำเนินงานที่ผิดปกติของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dysfunction) ที่เกิดจากการกระตุ้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species หรือ ROS) ส่งผลให้เกิดการชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ [6,13]

เรสเวราทรอลจัดเป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenol) ที่สกัดได้จากพืชตระกูลถั่ว (Peanuts) สายพันธุ์ *Arachis hypogaea* พืชตระกูลบลูเบอร์รี่ (blueberries) สายพันธุ์ *Vaccinium spp.* พืชตระกูลแบล็คเบอร์รี่ (blackberries) สารพันธุ์ *Morus spp.* นอกจากนี้เรสเวราทรอลยังเป็นสารหลักที่สามารถพบได้ในไวน์องุ่นแดง ซึ่งได้มาจากพืชตระกูลองุ่น (grapes) สายพันธุ์ *Vitis vinifera* [15] (Vitaceae) โดยสามารถสกัดได้จาก เปลือกองุ่น เมล็ดองุ่น ก้านใบ และเปลือกไม้ อีกทั้งยังมีรายงานว่าปริมาณเรสเวราทรอลในองุ่นแดง มีปริมาณมากกว่าในองุ่นขาวอีกด้วย [12]

เรสเวราทรอลมีชื่อทางเคมีว่า 3,5,4'-trihydroxystilbene เลข CAS 501-36-0 มีโครงสร้างทางเคมีทั้งหมด 2 รูปแบบ คือซิส (cis- หรือ Z) และทรานส์ (trans- หรือ E) ดังรูปที่ 1 มีสูตรมวลโมเลกุลเป็น $C_{14}H_{12}O_3$ มีมวลโมเลกุล 228.25 ดาลตัน มีจุดหลอมเหลวประมาณ 253 องศาเซลเซียส ถึง 255 องศาเซลเซียส [13]



รูปที่ 1 โครงสร้างของทรานส์-เรสเวราทรอลและซิส-เรสเวราทรอล [13]

เรสเวอราทรอลมีลักษณะเป็นผงแห้งสีขาว สามารถละลายได้ในไขมัน สามารถละลายได้ในเอทานอลที่ปริมาณประมาณ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 200 มิลลิโมลาร์) สามารถละลายได้ใน DMSO (dimethyl sulfoxide) ที่ปริมาณประมาณ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 70 มิลลิโมลาร์) และมีค่าการละลายน้ำที่ต่ำ โดยสามารถละลายได้ปริมาณประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (ประมาณ 0.13 มิลลิโมลาร์) ซึ่งมีค่า log partition coefficient (log P) เท่ากับ 3.1 [8]

จากการศึกษาของ Rakhma และคณะ [13] รายงานว่าเรสเวอราทรอลที่มีโครงสร้างในรูปแบบทรานส์-เรสเวอราทรอลเป็นรูปแบบที่ออกฤทธิ์ (active form) และมีความคงตัวมากกว่ารูปแบบซิส-เรสเวอราทรอล อีกทั้งยังพบว่าเมื่อโครงสร้างรูปแบบทรานส์-เรสเวอราทรอลถูกกระตุ้นด้วย แสง ความร้อน และรังสีเหนือม่วง (ultraviolet radiation หรือ UVR) จะเปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส-เรสเวอราทรอลได้ ซึ่งเป็นรูปแบบที่ไม่คงตัวและไม่มีฤทธิ์ อีกทั้งยังมีการศึกษาของ Abdelaziz และคณะ [12] รายงานว่า แสง หรือ รังสีเหนือม่วงที่มีความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร หรือ 366 นาโนเมตร สามารถกระตุ้นให้โครงสร้างรูปแบบทรานส์-เรสเวอราทรอลสามารถเปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส-เรสเวอราทรอลได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Tosato และคณะ [16] รายงานว่าทรานส์-เรสเวอราทรอลสามารถสลายตัวเมื่อสัมผัสกับรังสี UVA ที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และรังสี UVB ที่มีความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร โดยอัตราการสลายตัวขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของตัวทำละลายด้วย ซึ่งในการศึกษารายงานว่าทรานส์-เรสเวอราทรอลสามารถละลายในเอทานอลได้ดีกว่าการละลายในน้ำและเมื่อทำการทดสอบการสลายตัวมีการรายงานว่ทรานส์-เรสเวอราทรอลที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เมื่อสัมผัสกับรังสี UVA และรังสี UVB พบว่าเกิดการสลายตัวเปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส-เรสเวอราทรอลได้ทั้งในรังสี UVA และรังสี UVB ส่วนการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายพบว่า เมื่อสัมผัสกับรังสี UVA ไม่พบการสลายตัวของสารแต่เมื่อสัมผัสกับรังสี UVB พบว่ามีการสลายตัวเปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส-เรสเวอราทรอล นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ทรานส์-เรสเวอราทรอลที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะมีความคงตัวสูงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลางหรือกรดและจะเริ่มสลายตัวเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี pH เท่ากับ 9

จากการศึกษาของ Amri และคณะ [8] รายงานว่ทรานส์-เรสเวอราทรอลมีการสลายตัวเปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส-เรสเวอราทรอลประมาณร้อยละ 80 ถึงร้อยละ 90 เมื่อมีการสัมผัสกับแสงเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และเมื่อสัมผัสกับรังสี UV ที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เป็นเวลานาน 120 นาที พบว่รังสี UV สามารถเหนี่ยวนำให้ทรานส์-เรสเวอราทรอลเปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส-เรสเวอราทรอลร้อยละ 90.6 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าหากป้องกันไม่ให้ทรานส์-เรสเวอราทรอลสัมผัสกับแสงจะทำให้ทรานส์-เรสเวอราทรอลมีความคงตัวอยู่ที่ประมาณ 42 ชั่วโมง และถ้าป้องกันไม่ให้ทรานส์-เรสเวอราทรอลสัมผัสกับแสงในช่วง pH 1 ถึง pH 7 ด้วยพบว่าสารจะมีความคงตัวอยู่ประมาณ 28 วัน

จากการศึกษาของ Lavric และคณะ [17] ได้รายงานการทดลองเกี่ยวกับความคงตัวและค่าการละลายของทรานส์-เรสเวราทรอล ได้รายงานว่าทรานส์-เรสเวราทรอลสามารถคงตัวอยู่ได้ 28 วัน เมื่อมี pH เป็น 1, 3.5 และ 7 ในขณะที่ทรานส์-เรสเวราทรอลสามารถคงตัวอยู่ได้ 1.6 ชั่วโมง เมื่อมี pH เป็น 10 อีกทั้งยังได้ทำการศึกษาเพื่อดูการสลายตัวของทรานส์-เรสเวราทรอลที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ทรานส์-เรสเวราทรอลพบการสลายตัวเปลี่ยนเป็นรูปแบบ ซิส-เรสเวราทรอลประมาณร้อยละ 17 ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ทรานส์-เรสเวราทรอลพบการสลายตัวเปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส-เรสเวราทรอลประมาณร้อยละ 39 และที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส ทรานส์-เรสเวราทรอลพบการสลายตัวเปลี่ยนเป็นรูปแบบซิส-เรสเวราทรอลประมาณร้อยละ 70 นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีการสลายตัวมากกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 30 วัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าความคงตัวของทรานส์-เรสเวราทรอลขึ้นอยู่กับค่า pH และอุณหภูมิโดยค่า pH ในสภาวะที่เป็นกรดจะทำให้ทรานส์-เรสเวราทรอลมีความคงตัวที่ดีกว่าสภาวะที่เป็นเบสและจะเริ่มสลายตัวหรือเปลี่ยนโครงสร้างเป็นรูปแบบซิส-เรสเวราทรอลเมื่อมีค่า pH มากกว่า 6.8 อีกทั้งพบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ทรานส์-เรสเวราทรอลมีความคงตัวลดลง โดยสามารถทำการทดสอบเพื่อดูความคงตัวของเรสเวราทรอล ด้วยเครื่อง UV/VIS spectroscopy เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และใช้เครื่อง Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) สำหรับการวิเคราะห์แยกโครงสร้างของเรสเวราทรอล

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้นพบว่าเรสเวราทรอลมีคุณสมบัติที่จำกัด คือมีค่าการละลายที่ต่ำซึ่งสามารถละลายในเอทานอลได้ดีกว่าละลายในน้ำ อีกทั้งยังมีความไวต่อแสง (photosensitivity) โดยขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายและความยาวคลื่นของรังสีโดยสามารถสลายตัวที่ร้อยละ 80 ถึงร้อยละ 90 เมื่อสัมผัสกับรังสี UV เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง โดยรังสี UV ประกอบไปด้วย รังสี UVC (ความยาวคลื่นช่วง 280 นาโนเมตร ถึง 100 นาโนเมตร) UVB (ความยาวคลื่นช่วง 315 นาโนเมตร ถึง 280 นาโนเมตร) แต่ไม่พบการสลายตัวเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและรังสี UVA (ความยาวคลื่นช่วง 400 นาโนเมตร ถึง 315 นาโนเมตร) ซึ่งสามารถสลายตัวได้ที่ร้อยละ 90.6 เมื่อมีการสัมผัสเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ดังนั้นจึงควรป้องกันทรานส์-เรสเวราทรอลไม่ให้สัมผัสกับแสงซึ่งช่วยให้ทรานส์-เรสเวราทรอลสามารถคงตัวได้นาน 42 ชั่วโมง และควรเก็บทรานส์-เรสเวราทรอลให้อยู่ในช่วง pH 1 ถึง pH 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความคงตัวให้ทรานส์-เรสเวราทรอล โดยสามารถคงตัวอยู่ได้นานเป็นเวลา 28 วัน นอกจากนี้ทรานส์-เรสเวราทรอลยังสามารถเกิดการเมแทบอลิซึม (metabolism) ที่ตับได้ง่าย รวมทั้งมีค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ที่ต่ำมาก ดังนั้นเพื่อลดข้อจำกัดที่เกิดจากการสลายตัวของเรสเวราทรอลเมื่อสัมผัสแสงและอุณหภูมิจึงได้มีการพัฒนารูปแบบการนำส่งเรสเวราทรอลเข้าสู่ร่างกายในรูปแบบต่าง ๆ โดยในงานวิจัยฉบับนี้จะทำการ

ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการส่งยาผ่านทางผิวหนัง (transdermal drug delivery systems) โดยมีรายงานการวิจัย ดังนี้

จากการศึกษาของ Scalia และคณะ [18] ได้รายงานการทดลองเพื่อดูการสลายตัวหลังจากสัมผัสแสงของทรานส์-เรสเวอราทรอลเปรียบเทียบกับ Complex Lipid microparticles (LMs) - trans-resveratrol ทั้งในรูปแบบตำรับครีมและตำรับเจล (hydrogel) โดยใช้การเตรียมอนุภาคในรูปแบบอนุภาคไขมันในระดับไมโคร (lipid microparticles หรือ LMs) เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวต่อการสัมผัสแสง (photostability) ของตำรับยาทา (topical formulations) ซึ่งเตรียมด้วยเทคนิคอิมัลชันโดยใช้ไตรสเตียรีน (tristearin) เป็นผลึกของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) โดยทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งของไขมัน ใช้ไฮโดรจีเนชัน ฟอสฟาทีดิลโคลีน (hydrogenated phosphatidylcholine) ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวและใช้ทรานส์-เรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10.8 w/w จากการทดลองมีรายงานว่าตำรับครีมทรานส์-เรสเวอราทรอลมีค่าการสลายตัวร้อยละ 34.3 ส่วน Complex Lipid microparticles (LMs) - trans-resveratrol มีค่าการสลายตัวร้อยละ 19.9 และในตำรับเจลได้รายงานค่าการสลายตัวร้อยละ 15.4 ส่วน Complex Lipid microparticles (LMs) - trans-resveratrol มีค่าการสลายตัวร้อยละ 9.4 ซึ่งกล่าวได้ว่าการทำ Complex Lipid microparticles (LMs) - trans-resveratrol สามารถลดการสลายตัวจากรังสี UV ในรูปแบบตำรับครีมได้ร้อยละ 42 และในรูปแบบตำรับเจลได้ร้อยละ 39 อีกทั้ง Scalia และคณะ [18] ได้รายงานเพิ่มเติมว่า จากการทบทวนวรรณกรรมจำนวนมากพบว่าการทำ Complex Lipid microparticles (LMs) - trans-resveratrol ช่วยลดการสลายตัวได้ดีกว่าการทำ Complex Cyclodextrin-trans-resveratrol และ Complex Lipid nanoparticles-trans-resveratrol ทั้งในรูปแบบตำรับเจลและอิมัลชัน นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (*in vitro*) และฤทธิ์ต้านการอักเสบในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ได้รายงานค่า Complex Lipid microparticles (LMs) - trans-resveratrol ในรูปแบบตำรับครีม ยังคงมีฤทธิ์ทางารรักษาหรือไม่มีผลลดประสิทธิภาพของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบอีกด้วย

จากการศึกษาของ Juskaite และคณะ [19] มีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบการเพิ่มความคงทนต่อการสลายตัวจากการสัมผัสกับแสงของเรสเวอราทรอลด้วยการทำในรูปแบบไมโครอิมัลชัน (microemulsion) รวมทั้งดูฤทธิ์ของเรสเวอราทรอลที่มีผลต่อเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) ของมนุษย์ภายใต้สภาวะที่สัมผัสกับรังสี UV โดยมีรายงานว่าไมโครอิมัลชันช่วยเพิ่มความคงตัวต่อการสัมผัสแสงของเรสเวอราทรอลได้ รวมทั้งยังสามารถช่วยชะลอระยะเวลาในการสลายตัวเมื่อสัมผัสกับแสงได้อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังได้รายงานว่าการทำในรูปแบบไมโครอิมัลชันสามารถปลดปล่อยเรสเวอราทรอลปริมาณร้อยละ 60 ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมงโดยมี

อัตราการปลดปล่อยแบบคงที่ อีกทั้งยังพบผลการทดสอบที่บ่งบอกว่าเรสเวราทรอลมีฤทธิ์เป็นสารอนุมูลอิสระและช่วยเพิ่มความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ได้

จากการศึกษาของ Naik และคณะ [7] มีการรายงานวาระบบนำส่งยาผ่านผิวหนังเป็นการนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้โดยอัตราการแพร่เข้าสู่ผิวหนังชั้นกับผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียม ซึ่งเป็นผิวหนังชั้นนอกสุดของชั้นหนังกำพร้าที่ทำหน้าที่ปกป้องร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีจึงทำให้การแพร่ผ่านผิวหนังเกิดขึ้นได้น้อย โดยคุณสมบัติของสารหรือตัวยาที่สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ ควรมีค่า log partition coefficient (log P) อยู่ระหว่าง 1 ถึง 3 มีโมเลกุลไม่เกิน 500 ดาลตัน รวมถึงควรมีขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร มีความสามารถในการละลายในน้ำมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณในการนำส่งของสาร (dose deliverable) น้อยกว่า 10 มิลลิกรัมต่อวัน และมีค่าความเป็นกรดต่างของสารเมื่อละลายในน้ำโดยมีค่าอยู่ระหว่างช่วง pH 5 ถึง pH 9 นอกจากนี้ยังมีการรายงานเพิ่มเติมว่าการเพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่านสู่ผิวหนังสามารถทำได้ 2 วิธีหลัก ได้แก่ การเหนี่ยวนำด้วยเครื่องมือ (physical enhancers) และสารเคมี (chemical enhancers) โดยสารเคมีที่มักนิยมนำมาใช้ เช่น เอทานอล กรดไขมัน เทอร์ปีนส์ สารลดแรงตึงผิวและฟอสโฟลิพิด เป็นต้น ซึ่งกลไกการทำงานของสารเคมีที่ช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังเหล่านี้ คือการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของผิวหนังชั้นชั่วคราว จึงเพิ่มโอกาสในการแพร่ผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียมเข้าสู่ผิวหนังชั้นในได้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Wei และคณะ [20] มีการรายงานว่าในชั้นสตราตัมคอร์เนียมมีการสะสมของไขมันที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบอยู่จำนวนมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผิวหนังของมนุษย์นั้นจัดเป็นเนื้อเยื่อที่มีประจุลบ ดังนั้นตัวยาที่จะสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ดี ควรมีตัวยาที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกและเมื่อทำการทดลองโดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุต่าง ๆ มาเป็นส่วนผสมในตำรับพบว่า ตำรับที่ใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกสามารถเพิ่มการแพร่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังเพิ่มขึ้นและทำให้ยามีการออกฤทธิ์ยาวนานขึ้น อีกทั้งทำให้ระบบการนำส่งยามีประสิทธิภาพมากขึ้นอีกด้วย

อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้นพบว่า เรสเวราทรอลมีมวลโมเลกุล 228.25 ดาลตัน และมีค่า log partition coefficient (log P) เท่ากับ 3.1 จึงทำให้แพร่ผ่านผิวหนังได้น้อย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบนำส่งเพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวราทรอลให้มากขึ้นจากการศึกษาของ Tosato และคณะ [21] ได้มีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบหาเทคโนโลยีการนำส่งในระดับนาโนเมตร (nanocarriers) หรือระบบนำส่งผ่านทางผิวหนังของเรสเวราทรอล โดยการศึกษาเปรียบเทียบชนิดลิโปโซมในระดับนาโนเมตร (liposomal nanoparticles) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม รวมถึงยังมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับเยื่อหุ้มเซลล์ มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatibility) น้อยและเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ นอกจากนี้ยังมีการรายงาน

เพิ่มเติมว่าคอนเวนชันนอลลิโพโซม (conventional liposome) เป็นระบบที่ไม่เหมาะสมในการทำเป็นยาทาเพื่อแพร่ผ่านผิวหนัง เนื่องจากไม่สามารถผ่านเข้าไปในชั้นผิวหนังที่ลึกได้และจะไปกองรวมกันที่บริเวณส่วนบนของสตราตัมคอร์เนียมมากกว่าการแพร่ผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนัง ดีฟอร์มเมเบิลลิโพโซม (deformable liposome) หรือทรานสเฟอร์โซม (transfersome) มีการรายงานวาระบบนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของยาไฮโดรคอร์ติโซน (Hydrocortisone) เดกซาเมทาโซน (Dexamethasone) เมโธเทรกเซท (Methotrexate) ในการแพร่ผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนังชั้นที่ลึกได้ จึงทำให้ยาสามารถไปถึงระดับการรักษา (therapeutic level) ได้ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับผิวหนังจึงทำให้สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมได้มากขึ้นและเอทโธโซม (Ethosome) เป็นลิพิดเวสิเคิล (noninvasive lipid vesicles) ที่ผสมเอทานอลความเข้มข้นสูงเพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังให้ดีขึ้นซึ่งสามารถแพร่ผ่านได้ถึงชั้นผิวหนังแท้และสามารถเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต (circulatory system) ได้เนื่องจากมีเอทานอลเป็นส่วนผสมสามารถช่วยให้ชั้นสตราตัมคอร์เนียมนุ่มจึงสามารถแพร่กระจายได้มากขึ้นโดยไม่สูญเสียความคงตัว แต่จากการศึกษาของ Scognamiglio และคณะ [15] รายงานว่าเทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนเมตรที่มีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวสามารถทำให้เกิดพิษ (toxicity) ที่รุนแรงได้ โดยมีการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าการใช้พอลิซอร์เบต (Polysorbate 80) และเอทานอลเป็นสารลดแรงตึงผิวก่อให้เกิดอันตรายแก่เซลล์ได้ ดังนั้นจึงทำรายงานเกี่ยวกับการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการทดสอบเพื่อหาเทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนเมตรที่สามารถช่วยขนส่งเรสเวอราทรอลเข้าสู่ผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยเลือกศึกษาเทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนเมตรจำนวนสองชนิดคือ ทรานสเฟอร์โซมที่มีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวที่แตกต่างกัน ประกอบไปด้วย พอลิซอร์เบต 80 โซเดียมคลอเรต (sodium cholate) และโซเดียม ดีออกซิลคลอเรต (sodium deossicholate) ส่วนอีกชนิดคือ Ethanol-containing vesicle ที่มีส่วนผสมของลิพิดสองชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ สารสกัดฟอสฟาติดีลโคลีนที่สกัดได้จากถั่วเหลือง (soy phosphatidylcholine) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) โดยจากการศึกษามีการรายงานวาระบบเทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนที่เป็นชนิด Ethanol-containing vesicle ที่ใช้ฟอสฟาติดีลโคลีนที่สกัดได้จากถั่วเหลืองเท่านั้นที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเรสเวอราทรอลให้สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ นอกจากนี้ยังได้ทำรายงานเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อดูฤทธิ์ด้านการสร้างสารอนุมูลอิสระโดยมีการเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างเรสเวอราทรอลที่ใช้และไม่ใช้เทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนเมตร โดยรายงานวาระสเวอราทรอลที่ใส่เพียงพอลิซอร์เบต 80 หรือเอทานอล พบการเกิดพิษต่อเซลล์และส่งผลให้เกิดสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แต่พบว่าเรสเวอราทรอลที่ใช้เทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนเมตรสองชนิดคือ ทรานสเฟอร์โซม และ Ethanol-containing vesicle นั้นไม่พบการเกิดพิษต่อเซลล์และไม่พบการเพิ่มของสารอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเรสเวอราทรอลที่ใช้เทคโนโลยีการนำส่ง

ยาในระดับนาโนเมตรชนิด Ethanol-containing vesicle เป็นตำรับที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นระบบนำส่งผ่านทางผิวหนังได้ดีที่สุดและยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

จากการศึกษาของ Suktham และคณะ [22] ได้ทำการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาระบบนำส่งเรสเวอราทรอลเข้าสู่ผิวหนังโดยใช้ sericin protein nanoparticle ซึ่งจัดเป็นเทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนเมตรชนิดหนึ่งที่ใช้ใยไหม (silk protein) ในการเตรียมจากผีเสื้อกลางคืนชื่อ *Bombyx mori* หรือ *Antheraea mylitta* ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในวงการเครื่องสำอางอาหาร และสารชีวภาพที่ทำหน้าที่เป็นสารดูดซับความชุ่มชื้น อีกทั้งยังมีความเข้ากันได้กับผิวหนังของมนุษย์ได้เป็นอย่างดี โดยเมื่อนำใยไหมดังกล่าวมาผสมกับน้ำที่ผ่านกระบวนการกำจัดไอออนแล้ว (deionized water หรือ DI water) โดยตั้งตำรับเป็นรูปแบบเซรัม (serum) พบว่าจะทำให้เกิด shielding effect คือทำให้ขนาดของอะตอมใหญ่ขึ้น ซึ่งส่วนทางกับค่า zeta potential ที่ติดลบมากขึ้น จึงกล่าวได้ว่าการทำรูปแบบเซรัมที่มีส่วนผสมของใยไหมกับน้ำที่ผ่านขบวนการกำจัดไอออนแล้วจะทำให้ตำรับเกิดเป็นประจุลบในตำรับมากขึ้น ส่งผลให้ตำรับมีความคงตัวมากขึ้นอีกด้วย [23] จากนั้นจึงได้ทดลองนำใยไหมชนิด sericin protein nanoparticle ซึ่งนำมาทำให้มีคุณสมบัติเป็นประจุพื้นผิวลบ (negative surface charges) มาเติมพลูโรนิค (pluronic) ร้อยละ 0.5 w/v ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว แล้วนำไปทดสอบกับผิวหนังในบริเวณชั้นใต้หนัง (normal skin fibroblasts) ชนิด CRL-2522 มีรายงานว่าไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย อีกทั้งยังพบว่าการทำเทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนเมตรที่เตรียมได้จากใยไหม สามารถบรรจุขนาดอนุภาคได้ในช่วง 200 นาโนเมตร ถึง 350 นาโนเมตร โดยมีระดับการห่อหุ้มในรูปแคปซูล (encapsulation) ที่ร้อยละ 71 ถึงร้อยละ 75 และใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนที่ร้อยละ 0.6 w/v และร้อยละ 1.0 w/v ผลการทดสอบมีการรายงานว่าเรสเวอราทรอลยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์และมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งบริเวณลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (colorectal adenocarcinoma หรือ Caco-2 cell) โดยที่ไม่ทำลายผิวหนังในบริเวณชั้นหนังแท้ นอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมว่าการทำเทคโนโลยีการนำส่งยาในระดับนาโนเมตรที่เตรียมได้จากใยไหมกับเรสเวอราทรอลช่วยให้เกิดการออกฤทธิ์เนิ่น (sustained release) โดยมีระยะเวลาการปลดปล่อยมากกว่า 72 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับเรสเวอราทรอล ซึ่งโดยปกติจะใช้ระยะเวลาการปลดปล่อยสารออกมาทั้งหมดภายใน 8 ชั่วโมงรวมทั้งยังช่วยเพิ่มความคงตัว (stability) และช่วยเพิ่มค่าการละลาย (solubility) ของเรสเวอราทรอลได้อีกด้วย จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในทางอุตสาหกรรมยาทั้งด้านการรักษา การพัฒนาตำรับและด้านเครื่องสำอาง

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้นจะเห็นได้ว่าการใช้นาโนเทคโนโลยีเป็นรูปแบบหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับเรสเวอราทรอลเมื่อสัมผัสกับแสง ช่วยเพิ่มค่าการละลาย รวมถึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล อีกทั้งยังช่วยเพิ่มระยะเวลาในการปลดปล่อย

ของเรสเวอราทรอลได้อีกด้วย จากการศึกษาของ Summerlin และคณะ [24] ได้ทำการทบทวนวรรณกรรมจำนวนมากเกี่ยวกับการใช้นาโนเทคโนโลยีในการพัฒนาสูตรตำรับของเรสเวอราทรอลในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาได้รายงานว่ามีการศึกษามากมายและหลากหลายรูปแบบไม่ว่าจะเป็นการทำในรูปแบบของลิโปโซม (liposomes) อนุภาคนาโนจากพอลิเมอร์ (polymeric nanoparticles) อนุภาคนาโนไขมัน (solid lipid nanoparticles หรือ lipospheres) และพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ (polymeric micelles) เป็นต้น ดังตารางที่ 1 มีการรายงานวาลิโปโซมเป็นรูปแบบแรกที่น่าสนใจเกี่ยวกับระบบนำส่งยาของเรสเวอราทรอลโดยมีลักษณะเป็นถุงเวสิเคิลที่มีน้ำบรรจุอยู่ตรงแกนกลางแล้วหุ้มล้อมรอบด้วยฟอสโฟลิพิด ไบเลเยอร์ (phospholipid bilayer) เมื่อบรรจุเรสเวอราทรอลในลิโปโซมแล้วจากนั้นจึงนำไปทดลองโดยการเก็บเรสเวอราทรอลให้ผ่านแสงที่ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 4 องศาเซลเซียส ถึง 37 องศาเซลเซียส ได้รายงานการทดลองว่าไม่เกิดการสลายตัวของเรสเวอราทรอลภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อทำที่ปริมาณร้อยละ 70 ของการห่อหุ้มในรูปแบบแคปซูล พบว่าช่วยป้องกันการสลายตัวของเรสเวอราทรอลได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าเรสเวอราทรอลจะเริ่มพบการสลายตัวที่ประมาณร้อยละ 10 เมื่อมีการสัมผัสกับแสงเป็นระยะเวลานาน 16 นาที นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการทำอนุภาคนาโนจากพอลิเมอร์จะทำให้เกิดการปลดปล่อยแบบออกฤทธิ์เนิ่นได้ สามารถป้องกันการสลายตัว รวมทั้งเพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่านได้อีกด้วย โดยได้ทำการทดลองการห่อหุ้มในรูปแบบแคปซูลของเรสเวอราทรอลกับ poly (lactic-co-glycolic acid) หรือ PLGA ได้รายงานวาลิร้อยละ 42 ถึงร้อยละ 72 ของการห่อหุ้มในรูปแบบแคปซูลพบว่ามีประสิทธิภาพที่จะทำให้เรสเวอราทรอลค่อย ๆ ปลดปล่อยออกมาเป็นเวลานานกว่า 12 วัน และอนุภาคนาโนสามารถคงตัวอยู่ได้ยาวนานไม่ต่ำกว่า 6 เดือน

จากการศึกษาของ Jadhav และคณะ [25] ได้นำนาโนเทคโนโลยีในรูปแบบพอลิเมอร์ริกไมเซลล์มาช่วยเพิ่มค่าการละลาย เพิ่มค่าชีวประสิทธิผลและช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการรักษาของเรสเวอราทรอลได้ เนื่องจากพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำโดยตรงส่วนแกนกลางของโครงสร้างจะเป็นแบบไม่ชอบน้ำ ซึ่งสามารถนำตัวยาที่ไม่ชอบละลายในน้ำใสในชั้นนี้ได้และส่วนด้านนอกของโครงสร้างจะเป็นส่วนที่ชอบน้ำซึ่งจะช่วยในการป้องกันไม่ให้ตัวยาสำคัญถูกทำลายได้ อีกทั้งพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ยังมีขนาดเล็กมากกว่า 200 นาโนเมตร จึงทำให้สามารถถูกแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ทั่วทั้งร่างกาย แต่เนื่องจากการที่มีขนาดเล็กมากจึงทำให้พอลิเมอร์ริกไมเซลล์มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ ไม่สามารถบรรจุตัวยาสำคัญได้ในปริมาณมาก จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงทำให้มีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการพัฒนาพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ให้เป็นรูปแบบผสมพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ (mixed Polymeric micelles) โดยการใส่โคพอลิเมอร์ (copolymer) หลายชนิดลงไปในระบบของพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ เช่น พอลอกซาเมอร์ 407 ซึ่งจะช่วยให้สามารถบรรจุตัวยาสำคัญได้มากขึ้นและยังช่วยเพิ่มความคงตัวของไมเซลล์ได้อีกด้วย

อย่างไรก็ตาม ระบบนำส่งยาผ่านทางผิวหนังที่ศึกษากันในปัจจุบันทั้งในรูปแบบพอลิเมอร์ และรูปแบบลิพิดนั้นพบว่ามีข้อจำกัดในเรื่องของการเพิ่มค่าการละลายของตำรับในน้ำ การบรรจุตัวยาสำคัญลงไปโครงสร้าง รวมไปถึงความคงตัวที่เพิ่มขึ้นไม่มากนัก เนื่องด้วยสภาพโครงสร้างที่มีทั้งส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในโครงสร้างเดียวกันอาจทำให้เกิดภาวะความไม่เข้ากัน (incompatibility) ในตำรับรูปแบบน้ำ (aqueous solution) ได้ จากการศึกษาของ Pentek และคณะ [26] มีรายงานเกี่ยวกับการค้นคว้าเพิ่มเติมเรื่องการใช้ Multifunctional delivery system ซึ่งสารตัวอย่างในกลุ่มนี้คือเดนไดรเมอร์ (dendrimer) โดยมีจุดประสงค์ของการทดลองคือการนำเดนไดรเมอร์มาเตรียมตำรับร่วมกับเรสเวอราทรอลเพื่อช่วยเพิ่มค่าการละลาย ช่วยเพิ่มความคงตัว ช่วยลดการระคายเคือง และอันตรายต่อผิวหนังที่เกิดจากการเติมสารช่วย เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) หรือน้ำมัน (oil) ในตำรับเครื่องสำอางและในตำรับยาครีมได้ เนื่องจากการทำตำรับแบบรวมกันระหว่างเดนไดรเมอร์กับเรสเวอราทรอลจะช่วยป้องกันการสลายตัวของเรสเวอราทรอลในตำรับรูปแบบน้ำได้ จึงทำให้ตำรับในรูปแบบน้ำไม่จำเป็นต้องเติมสารช่วยเพิ่มเติมอีก ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยต่อผิวหนัง อีกทั้งการทำตำรับแบบรวมกันระหว่างเดนไดรเมอร์กับเรสเวอราทรอลยังช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังและยังสามารถเตรียมตำรับเป็นรูปแบบครีมน้ำ (aqueous cream) ซึ่งสามารถเพิ่มค่าความเข้มข้นของเรสเวอราทรอลได้ เพราะการทำเดนไดรเมอร์มีส่วนช่วยให้ตำรับสามารถบรรจุตัวยาสำคัญลงไปได้มากขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้ยังได้มีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบเพื่อดูความสามารถในการบรรจุยา โดยรายงานกล่าวว่า การทำตำรับรวมกันระหว่างเดนไดรเมอร์กับเรสเวอราทรอลสามารถบรรจุความเข้มข้นของตัวยาสำคัญได้มากกว่าตำรับทั่วไปที่วางขายตามท้องตลาดได้มากกว่า 5 เท่า กล่าวคือการเตรียมตำรับแบบรวมกันระหว่างเดนไดรเมอร์กับเรสเวอราทรอลมีปริมาณเรสเวอราทรอล 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่วนตำรับทั่วไปมีปริมาณเรสเวอราทรอลร้อยละ 1 หรือเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร อีกทั้งการรวมกันระหว่างเดนไดรเมอร์กับเรสเวอราทรอล ยังสามารถเตรียมตำรับได้ง่ายและไม่ต้องใช้ความร้อนในการเตรียมเหมือนกับระบบนำส่งยาในรูปแบบอื่น

ตารางที่ 1 การใช้นาโนเทคโนโลยีในการพัฒนาสูตรตำรับของเรสเวอราทรอล

รูปแบบนาโนเทคโนโลยี	ขนาด (size)	ส่วนประกอบ (composition)	สัณฐานวิทยา (morphology)	Zeta Potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)	คุณสมบัติ (properties)	เอกสารอ้างอิง
Liposomes	100 - 120 นาโนเมตร	P90G, DCP, CHOL, PC, DPPC, EPC, PEG	Spherical oligolamellar vesicles	-40	95	-ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของเรสเวอราทรอลได้ -ช่วยป้องกันการถูกทำลายจากแสงของเรสเวอราทรอลได้ -ช่วยให้เรสเวอราทรอลปลดปล่อยช้าลงและเป็นการออกฤทธิ์เนิ่น (Sustained release) -ช่วยเพิ่มค่าชีวประสิทธิผล (Bioavailability) ของเรสเวอราทรอล -มีความสามารถในการบรรจุยาที่ต่ำ สามารถบรรจุได้น้อยกว่าร้อยละ 3 -มีความคงตัวต่ำ -ช่วยลดความเป็นพิษของเรสเวอราทรอลได้	[8], [24], [27], [28]
Polymeric nanoparticles	90 – 365 นาโนเมตร	mPEG-PCL	Spherical shape, smooth surface	-5.5 ถึง -6.5	42 – 98	-ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของเรสเวอราทรอลโดยใช้ Carboxymethyl chitosan nanoparticles ได้ -มีความสามารถในการบรรจุยาปานกลาง -ช่วยเพิ่มค่าชีวประสิทธิผล (Bioavailability) ของเรสเวอราทรอล	[24], [27], [28]

Polymeric micelles / Micellar solution	10 - 200 นาโนเมตร	mPEG-PDLA	-	-	89	-มีความสามารถในการบรรจุยาดี -ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายเรสเวอราทรอลด้วย 3,7,12-triketocholic acid ได้	[24], [29]
Solid lipid nanoparticles (SLN)	150 – 586 นาโนเมตร	Compritol, phospholipon, lutrol	Spherical	-38	3 – 70	-สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายและมีต้นทุนต่ำ -มีความสามารถในการบรรจุยาต่ำ	[24], [27]
Lipospheres	200 – 350 นาโนเมตร	Soybean PC, CHOL, coconut, perfluorocar-bous	Spherical and homogeneous	-50 ถึง -80	75 – 99	-เพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของเรสเวอราทรอลได้ด้วยพอล็อกซาเมอร์ 188 -ช่วยเพิ่มความคงตัวให้เรสเวอราทรอลได้เป็นเวลานาน 2 เดือน	[24], [27]

หมายเหตุ P90G = phospholipon 90G DCP = dicetyl phosphate CHOL = cholesterol DPPC = dipalmitoyl phosphatidylcholine EPC = egg-phosphatidylcholine PEG = poly (ethylene glycol) mPEG-PCL = methoxy poly (ethylene glycol) -poly (caprolactone) mPEG-PDLA – =methoxypoly (ethylene glycol) -poly (d,l-lactide) copolymer PC = phosphatidylcholine

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการพัฒนาระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีสารช่วยเพิ่มการแพร่ผ่าน 2 ชนิด เพื่อเพิ่มการนำส่งเรสเวอราทรอลทางผิวหนัง โดยใช้พอลอกซาเมอร์ 184 ร่วมกับเอทานอลและโมโนเทอร์พีนส์

พอลอกซาเมอร์ 184 ประกอบด้วย สายพอลิโพรไพลีน (propylene chain หรือ PPO) ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนแกนกลางที่ไม่ชอบน้ำถูกต่อเข้ากับส่วนที่ชอบน้ำ คือเอทิลีนออกไซด์ (ethylene oxide หรือ PEO) ทำให้ได้โครงสร้างเป็น non-ionic triblock copolymer โดยมีเอทิลีนออกไซด์อยู่ที่ร้อยละ 47 และมีพอลิโพรไพลีนอยู่ที่ร้อยละ 53 และมีการจัดเรียงลำดับเป็นเอทิลีนออกไซด์-พอลิโพรไพลีน-เอทิลีนออกไซด์ (PEO-PPO-PEO) มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (amphiphilic) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แสดงความชอบทั้งน้ำและไขมัน โดยมีความสามารถในการละลายน้ำและเอทานอลได้ จึงทำหน้าที่เป็นตัวก่ออิมัลชัน (emulsifier) และช่วยเพิ่มความคงตัว (stabilizer)

องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US Food and Drug Administration หรือ USFDA) กำหนดให้พอลอกซาเมอร์ 184 จัดเป็นสารช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านทางเภสัชกรรมที่ปลอดภัย ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้เพิ่มการละลายและความคงตัวของตัวยาที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ โดยพอลอกซาเมอร์ 184 สามารถเกิดเป็นพอลิเมอร์ไมเซลล์ได้เองเมื่อมีความเข้มข้นมากกว่าค่า critical micelle concentration (CMC) โดยสามารถวัดค่า CMC ได้เท่ากับ 4.8×10^{-4} M ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส [30] ซึ่งจะเกิดการรวมตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำสร้างเป็นส่วนแกนของโครงสร้างและส่วนที่ไม่ชอบน้ำหันออกด้านนอกโครงสร้าง แล้วตัวยาจะเข้าไปสะสมในส่วนแกนกลางที่ไม่ชอบน้ำของพอลอกซาเมอร์ 184 และส่วนที่ชอบน้ำจะป้องกันตัวยาวอกจากแกนกลาง ช่วยเพิ่มค่าการละลายในน้ำของตัวยาและเพิ่มค่าชีวประสิทธิผลของเรสเวอราทรอลได้ อีกทั้งพอลิเมอร์ไมเซลล์สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านที่ผิวหนังของเรสเวอราทรอลได้ [31–34]

จากการศึกษาของ Abbas และคณะ [35] ได้มีรายงานเกี่ยวกับการออกแบบและพัฒนา resveratrol-loaded colloidal system โดยการทำในรูปแบบ compritol ATO-based resveratrol colloidal carriers (CCCs) ซึ่งเตรียมโดยการให้ oil phase เป็นคอมพริทอล (compritol) กับเรสเวอราทรอลและให้ aqueous phase เป็นสารก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิว เช่น ทวีน 80 พอลอกซาเมอร์ 407 พอลอกซาเมอร์ 188 และการจับคู่สารมาผสมร่วมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ดังตารางที่ 2 จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และเมื่อได้นาโนอิมัลชันแล้วจึงตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องที่มีสถานะแห้งแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต่าง ๆ ต่อไป

ตารางที่ 2 การออกแบบและพัฒนา resveratrol-loaded colloidal system

ในรูปแบบ Compritol ATO-based resveratrol colloidal carriers (CCCs)

Formula	Surfactant used	PS (nm)	PDI	Z (mV)
CCC1	T80	841.20±28.99	0.59±0.20	-35.1±7.20
CCC2	P188	270.40±7.07	0.13±0.04	-6.3±0.28
CCC3	P407	230.40±7.78	0.13±0.06	-16.6±5.23
CCC4	T80/P188	521.00±50.61	0.22±0.07	-20.00±5.23
CCC5	T80/P407	435.80±38.42	0.22±0.00	-27.20±5.30
CCC6	P188/P407	248.10±2.12	0.07±0.02	-28.23±6.15

T80 : Tween 80

P188 : Poloxamer 188

P407 : Poloxamer 407

Values = mean±SD

จากการทดสอบได้มีรายงานว่า Compritol ATO-based resveratrol colloidal carriers 6 (CCC6) คือการใส่สารพอลอกซาเมอร์ 407 และพอลอกซาเมอร์ 188 ผสมร่วมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งจัดเป็นสารลดแรงตึงผิวสองชนิดควบคู่กัน รายงานกล่าวว่าสารเหล่านี้ให้ผลดีในด้านการออกฤทธิ์ ทั้งในสิ่งมีชีวิตและในหลอดทดลอง อีกทั้งยังช่วยให้สามารถบรรจุตัวยาสำคัญได้มากขึ้น มีค่าแสดงประสิทธิภาพการปลดปล่อยตัวยาสำคัญที่ดีภายใน 24 ชั่วโมง มีฤทธิ์การรักษาความชุ่มชื้นภายใน 48 ชั่วโมง และยังมีรายงานว่าตำรับที่ได้มีฤทธิ์ในการปกป้องผิวหนังจากแสงแดดที่ดีมาก นอกจากนี้ยังได้มีการรายงานเกี่ยวกับการวัดค่าแสดงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่าง ๆ ทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ลดเลือนริ้วรอยผ่านการทดสอบในเซลล์สิ่งมีชีวิต รายงานกล่าวว่ามีค่าที่ดีขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ

ในส่วนของการขั้นตอนการเตรียมตำรับยาบรรจุในพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ โดยทั่วไปจะมีทั้งหมด 5 วิธีหลัก คือวิธีที่ 1 การละลายโดยตรง (direct dissolution) คือนำยากับพอลิเมอร์มาละลายร่วมกันในน้ำซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดและเหมาะกับตัวยาที่ชอบละลายน้ำ วิธีที่ 2 การกรอง (dialysis) คือการนำพอลิเมอร์และยาไปละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำสารละลายไปบรรจุใน dialysis bag จากนั้นนำมาละลายในน้ำ ซึ่งจะเกิดการกรองสารขึ้นเพื่อให้เกิดการบรรจุยา แล้วก่อตัวเป็นรูปร่างไมเซลล์ได้ โดยวิธีนี้เหมาะสำหรับตัวยาที่ไม่ชอบละลายน้ำ วิธีที่ 3 คือการทำอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion) คือการนำยากับพอลิเมอร์มาละลายร่วมกัน จากนั้นนำไปละลายในสารก่ออิมัลชันชนิดชอบน้ำซึ่งละลายในน้ำไว้แล้ว จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำมันแล้วคนผสมให้เข้ากัน วิธีที่ 4 การ

ใช้ตัวทำละลายร่วม (solvent evaporation) คือการใช้ตัวทำละลายที่สามารถระเหยได้มาใช้ในการละลายยากับพอลิเมอร์ เมื่อเริ่มก่อตัวเป็นรูปร่างแล้วจึงนำตัวทำละลายนั้นไประเหยออกด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อไป และวิธีที่ 5 คือกระบวนการทำแห้งโดยการแช่แบบเยือกแข็ง (freeze drying or lyophilization) คือการนำยากับพอลิเมอร์มาละลายร่วมกัน จากนั้นนำไปบรรจุในของเหลวผสมที่เตรียมในรูปแบบการทำแห้งโดยแช่แบบเยือกแข็งซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสถานะของน้ำและการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศปกติ [36]

จากการใช้นาโนเทคโนโลยีในรูปแบบพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ตามที่ได้บททวนวรรณกรรมข้างต้นจึงอาจกล่าวได้ว่าพอลิเมอร์ริกไมเซลล์สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอลได้ แต่จากการศึกษาของ Kahraman และคณะ [10] มีการรายงานว่านาโนไมเซลล์สามารถช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังได้ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการคือการทำพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ไม่สามารถนำส่งสารได้ดีเท่าที่ควรและสารที่บรรจุในไมเซลล์จะไปสะสมบริเวณสตราตัม คอร์เนียมของชั้นหนังกำพร้าเท่านั้น ส่งผลให้การออกฤทธิ์ไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการใส่สารอื่นเพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล

เทอร์ปีนส์ (terpenes) เป็นสารที่สกัดได้จากธรรมชาติชนิดหนึ่ง จัดเป็นสารที่สามารถช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังได้และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาว่ามีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อผิวหนังแล้วยังมีประสิทธิภาพที่ดีอีกด้วย [37] โครงสร้างของเทอร์ปีนส์เป็นการต่อกันลักษณะส่วนหัวและส่วนหางของไอโซพรีน (isoprene) โดยหนึ่งไอโซพรีนจะมีคาร์บอน 5 โมเลกุล ซึ่งการต่อกันของไอโซพรีนหลาย ๆ โมเลกุลจะมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันตามจำนวนของคาร์บอน สามารถจำแนกได้ดังนี้ คือคาร์บอน 10 โมเลกุล เรียกว่า โมโนเทอร์ปีนส์ (monoterpenes) คาร์บอน 20 โมเลกุล เรียกว่า ไดเทอร์ปีนส์ (diterpenes) คาร์บอน 30 โมเลกุล เรียกว่า ไตรเทอร์ปีนส์ (triterpenes) และคาร์บอน 40 โมเลกุล เรียกว่า เตตระเทอร์ปีนส์ (tetraterpenes)

จากการศึกษาของ Aqil และคณะ [38] มีรายงานว่าเทอร์ปีนส์มีลักษณะโครงสร้างที่มีความชอบไขมันสูงจึงสามารถเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังให้กับสารที่ชอบไขมันได้และเทอร์ปีนส์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังได้ดีกว่าเทอร์ปีนส์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่

จากการศึกษาของ Lason และคณะ [39] มีรายงานว่าการใช้โมโนเทอร์ปีนส์ ไดเทอร์ปีนส์ และไตรเทอร์ปีนส์ที่ผสมในตำรับอนุภาคนาโนไขมันสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับตำรับได้ทั้ง 3 ชนิด โดยมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังช่วยเรื่องการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ซึ่งในช่วงแรกจะปลดปล่อยแบบรวดเร็ว (burst release) เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านของตัวยาสำคัญ จนเวลาผ่านไปหลายชั่วโมงจะปลดปล่อยแบบออกฤทธิ์เนิ่น (sustained release) เพื่อช่วยให้ตัวยาสำคัญออกฤทธิ์ได้นานขึ้น อีกทั้งยังมีการศึกษาของ Kang และคณะ [40] มีรายงานว่าเทอร์ปีนส์ชนิดโมโนเทอร์ปีนส์หรือ

ไคเทอร์พีนส์ มีคุณสมบัติเป็นสารเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถทำให้อยู่ทั้งในรูปแบบสูตรเดี่ยวหรือรูปแบบสูตรผสมได้

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่างานวิจัยจำนวนมากสนับสนุนการใช้โมโนเทอร์พีนส์เป็นสารเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนัง โดยพบการศึกษาของ Kahraman และคณะ [10] ได้มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการนำเทอร์พีนส์มาเป็นสารเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนัง โดยการผสมในตำรับนาโนไมเซลล์ มีรายงานว่าตำรับที่มีขนาดประมาณ 25 นาโนเมตร ถึง 30 นาโนเมตร มีค่าการกระจายตัวต่ำ มีคุณสมบัติเป็นประจุลบเล็กน้อยและมีค่าประสิทธิภาพการกักเก็บตัวยา (encapsulation efficacy) ที่สูง โดยเมื่อทำการทดสอบโดยใช้วิธีการลอกผิวหนังด้วยเทปกาว (tape stripping) มีรายงานว่าการใช้เทอร์พีนส์ชนิดเทอร์พีนอลีน (terpinolene) ซึ่งจัดเป็นโมโนเทอร์พีนส์จะทำให้ยามีการสะสมในชั้นผิวหนังมากกว่าเมื่อผสมเทอร์พีนส์เข้าไปในตำรับและที่ความเข้มข้นเทอร์พีนอลีนร้อยละ 2 จะทำให้ตำรับมีความคงตัวมากที่สุด นอกจากนี้จากการศึกษาของ Lim และคณะ [41] มีรายงานว่าการใช้โมโนเทอร์พีนส์เป็นส่วนผสมในรูปแบบตำรับเจล (gel) สามารถช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนัง สามารถช่วยปรับความหนืดและการไหลของตำรับได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ส่งผลต่อความคงตัวทางด้านเคมีและโครงสร้างของตำรับ รวมไปถึงการศึกษาของ Liu และคณะ [42] มีรายงานว่าการใช้โมโนเทอร์พีนส์ชนิดต่าง ๆ มาเป็นส่วนผสมในตำรับไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ซึ่งมีส่วนผสมของพอลิซอร์เบต (Polysorbate) 80 น้ำ และเอทานอลรวมด้วยนั้น พบว่าลิโมนีน (Limonene) สามารถช่วยพาสารสำคัญชื่อเคอร์คิวมิน (Curcumin) แพร่ผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ดีกว่าซีเนโอล (1,8-cineole) และเทอร์พีนีโอล (Terpineol) ได้อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาของ Cal และคณะ [43] ได้มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการแพร่ผ่านทางผิวหนังในชั้นหนังแท้โดยการใช้โมโนเทอร์พีนส์ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม รายงานว่า การใช้เทอร์พีนส์แบบผสม เรียกว่า ไดเพนทีน (dipentene) ซึ่งเป็นการผสมระหว่างไอโซเมอร์ของลิโมนีนทั้งดีฟอร์ม (d-limonene) และแอลฟอร์ม (d-limonene) สามารถช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังได้ดีกว่าแบบเดี่ยว อีกทั้งยังมีการสะสมของตำรับในชั้นหนังกำพร้าที่ต่ำกว่าเทอร์พีนส์รูปแบบอื่น ซึ่งหมายความว่ามีการแพร่ผ่านเข้าผิวหนังในชั้นที่ลึกมากขึ้นนั่นเอง

จากการทบทวนวรรณกรรมจะพบว่าเทอร์พีนส์มีหลายชนิด ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการเพิ่มการแพร่ผ่านโดยการหาโมโนเทอร์พีนส์ที่เหมาะสมที่สุดที่ช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังให้แก่เรสเวอราทรอล

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

- 3.1.1.1 Ethanol (QReC, Auckland, New Zealand)
- 3.1.1.2 Methanol (Honeywell Burdick & Jackson, Cheoyong-ro Nam-gu, South Korea)
- 3.1.1.3 Acetic acid (Glacial acetic acid 100%) (Merck Life Science OY, Espoo, Finland)
- 3.1.1.4 Phosphate buffer (PBS; pH 7.4)
- 3.1.1.5 D-limonene (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- 3.1.1.6 Citral (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- 3.1.1.7 Cineole (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- 3.1.1.8 Citronellol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)
- 3.1.1.9 Resveratrol (Resveratrol > 99%) (Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd., Tokyo, Japan)
- 3.1.1.10 Poloxamer 184 (Synperonic PE/L64) (Croda International Plc, East Yorkshire, United Kingdom)

3.1.1 เครื่องมือ

- 3.1.1.1 Magnetic stirrer (IKA, Staufen, Germany)
- 3.1.1.2 Centrifuge (Sorvall™ Legend™ X1R Centrifuge) (ThermoScientific™, Massachusetts, USA)
- 3.1.1.3 HPLC (CTO – 10Asvp) (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan)
- 3.1.1.4 HPLC Column InertSustain C18 (4.6 x 150 mm; 5 µm) (GLSciences, Tokyo, Japan)

- 3.1.1.5 Sonicator bath (WUC-D22H) (DAIHAN Scientific, Gangwon-do, Korea)
- 3.1.1.6 Tape strip (Scotch 3M Transparent Tape 500, 24 mm x 33 m)
- 3.1.1.7 Dynamic light scattering (DLS) particle size analyzer (Zetasizer Nano-ZS) (Malvern Instrument, Malvern, UK)
- 3.1.1.8 Franz diffusion cells
- 3.1.1.9 Kimwipes task wipers (KIMTECH Science, 21 cm x 12 cm) (Kimberly-Clark Professional, Ontario, Canada)
- 3.1.1.10 Circulating water bath (WiseCircu) (DAIHAN Scientific, Gangwon-do, Korea)

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของเรสเวอร่าทรอลโดยใช้ HPLC

การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยการชั่งเรสเวอร่าทรอลในปริมาณที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนใช้เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์จากนั้นใส่เรสเวอร่าทรอลที่ชั่งได้ลงในขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเตรียมเป็น stock solution ที่มีความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography หรือ HPLC)

สำหรับ Condition ของการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 v/v ในสารละลายเมทานอลในน้ำซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 50 v/v ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีปริมาตรการฉีด (injection volume) 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิของคอลัมน์อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 303 นาโนเมตร

3.3 การหาค่าการละลายของเรสเวราทรอลในสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ในน้ำ โดยปริมาตรต่อปริมาตร

ซึ่งเรสเวราทรอลปริมาณมากเกินไปลงในตัวทำละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ในน้ำปริมาตรต่อปริมาตร แล้วคนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จึงเก็บสารละลายส่วนใส (supernatants) ไปวิเคราะห์หาปริมาณเรสเวราทรอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.4 การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram โดยใช้วิธีไทเทรตด้วยน้ำ (Water titration method)

ซึ่งพอลอกซาเมอร์ 184 ผสมกับเอทานอลให้เข้ากันซึ่งเป็นส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว (Sm) จากนั้นเติมเทอร์พีนส์แล้วคนให้เข้ากัน โดยมีอัตราส่วนน้ำหนักของเทอร์พีนส์ต่อส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว (Sm) ดังต่อไปนี้ 0.025:4.975, 0.05:4.95, 0.1:4.95, 0.2:4.8, 0.25:4.75, 0.5:4.5, 1:4, 1.5:3.5, 2:3 และ 2.5:2.5 โดยคิดเป็นน้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) จากนั้นหยดน้ำบริสุทธิ์ (RO water) ครึ่งละ 25 ไมโครลิตรลงในส่วนผสมดังกล่าวที่คนด้วย magnetic stirrer ตลอดเวลา จากนั้นสังเกตความใสและบันทึกปริมาณน้ำเพื่อหาปริมาณน้ำที่มากที่สุดที่ยังทำให้ลักษณะใส เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมไมเซลล์

3.5 การเตรียมพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์

เมื่อได้ pseudo-ternary phase diagrams ที่แสดงขอบเขตการเกิดพอลิเมอร์ริกไมเซลล์แล้ว จากนั้นนำ pseudo-ternary phase diagrams ดังกล่าวมาเลือกจุดเพื่อหาจุดที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่ทำให้ทุกตำรับที่มีเทอร์พีนส์แตกต่างกันมีลักษณะใสและไม่มีการแยกเฟส

ตารางที่ 3 สูตรตำรับของพอลิเมอร์ริกไมเซลล์

สูตร	Resveratrol (% w/v)	Poloxamer 184 (%w/v)	Ethanol (%w/v)	Terpenes (%w/v)	Water (ml)
Ethanolic Poloxamer (EP)	2.5	25	5	-	qs 100
EP with d-limonene	2.5	25	5	1	qs 100
EP with cineole	2.5	25	5	1	qs 100
EP with citral	2.5	25	5	1	qs 100

เตรียมพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ดังสูตรที่แสดงในตารางที่ 3 การเตรียมเอทานอลิกพอลลอกซาเมอร์ (Ethanolic Poloxamer หรือ EP) โดยชั่งพอลลอกซาเมอร์ 184 หนัก 25 กรัมลงในบีกเกอร์จากนั้นเติมเอทานอลลงไป 5 กรัม คนให้พอลิเมอร์กระจายตัว หลังจากนั้นเติมน้ำลงไป 70 กรัม แล้วคนให้เข้ากัน ทำการชั่งเรสเวราทรอล 2.5 กรัมลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลิกพอลลอกซาเมอร์ที่เตรียมได้ แล้วนำไปวางบน sonicator bath จนละลายหมด

สำหรับการเตรียมเอทานอลิกพอลลอกซาเมอร์ที่มีเทอร์พีนส์ชนิดต่าง ๆ สามารถเตรียมได้โดยการเติมเทอร์พีนส์ที่ต้องการลงในตำรับตามสัดส่วนตารางที่ 3 ก่อนปรับปริมาตรด้วยน้ำ จากนั้นนำไปผสมกับเรสเวราทรอลและปรับปริมาตร

3.6 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของพอลิเมอร์ริกไมเซลล์

3.6.1 การศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายขนาดและประจุพื้นผิว

ทำการวัดขนาด การกระจายขนาดและประจุพื้นผิวของพอลิเมอร์ริกไมเซลล์แต่ละตำรับโดยใช้เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) โดยการปิเปตตัวอย่างประมาณ 1 ml ลงในคิวเวทท์ (cuvette) จากนั้นจึงนำไปวัดโดยเครื่อง photon correlation spectroscopy (PCS) particle size analyzer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) โดยใช้มุมกระเจิงที่ 173 องศา

3.7 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro* skin penetration test)

3.7.1 การเตรียมผิวหนัง

ใช้ผิวหนังส่วนหน้าท้องของลูกหมูแรกเกิดที่เสียชีวิตตามธรรมชาติแล้ว จากนั้นลอกส่วนของชั้นไขมันใต้ผิวหนังออก โดยใช้กรรไกรและมีดผ่าตัด ซึ่งจะใช้เฉพาะส่วนที่เป็นหนังกำพร้าและหนังแท้ โดยทำการลอกออกมาให้มีความหนาประมาณ 0.6 มิลลิเมตร ถึง 0.7 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างผิวหนังที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทำการทดสอบการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกายให้นำผิวหนังของลูกหมูที่ทำการลอกแล้วและแช่แข็งไว้นามาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.7.2 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนัง

การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอลทำได้โดยใช้ Franz diffusion cells ในส่วนของ Receiver compartment เติมสารละลายร้อยละ 50 ของเอทานอลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ปริมาตร 6.5 มิลลิลิตร แล้วทำการคนด้วย Magnetic bar ที่อัตราเร็ว 500 รอบต่อนาที จากนั้นนำผิวหนังใส่ลงใน Diffusion chamber โดยให้ส่วนของชั้นสตราตัม คอร์เนียมสัมผัสกับ Donor compartment จากนั้นนำ Diffusion cell แต่ละเซลล์มาต่อกับ Circulating water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 32 องศาเซลเซียสตลอดเวลาที่ทำการทดลอง ในส่วนของ Donor compartment ทำการใส่สูตรตำรับที่ต้องการทดสอบและสูตรควบคุม (สารละลายของเรสเวอราทรอลความเข้มข้นร้อยละ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเอทานอลร้อยละ 5 ในน้ำ โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เมื่อครบเวลา 6 ชั่วโมง จึงเอาผิวหนังที่ได้รับการทดสอบมาวัดปริมาณเรสเวอราทรอลในผิวหนัง

ใช้กระดาษทิชชูซับผิวหนังหมูด้านสตราตัม คอร์เนียม จากนั้นทำการลอก (tape strip method) ชั้นสตราตัม คอร์เนียมด้วยเทปขาว (tape strip method) ทั้งหมด 40 ครั้ง หลังจากนั้นนำเทปขาวทั้งหมดใส่ลงในขวดแล้วเติมเมทานอล 5 มิลลิลิตร แล้วไปวาง Sonicator baths เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลาย methanol 1 มิลลิลิตรที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์หาปริมาณเรสเวอราทรอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

นำผิวหนังหมูที่เหลือจากการลอกสตราตัม คอร์เนียมออกซึ่งจะเหลือชั้น Viable epidermis และ Dermis นำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วเติมเมทานอล 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวาง

ลงใน Sonicator bath เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตรที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณเรสเวอราทรอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

$$SC \text{ (mcg/cm}^2\text{)} = \frac{\text{ปริมาณเรสเวอราทรอลที่อยู่ในผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียม (\mu\text{g})}}{\text{พื้นที่การแพร่ผ่านของ Donor compartment (cm}^2\text{)}} \quad (\text{สมการที่ 1})$$

$$\text{Deeper skin (mcg/cm}^2\text{)} = \frac{\text{ปริมาณเรสเวอราทรอลที่อยู่ใน Viable epidermis และ Dermis (\mu\text{g})}}{\text{พื้นที่การแพร่ผ่านของ Donor compartment (cm}^2\text{)}} \quad (\text{สมการที่ 2})$$

3.8 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

วิเคราะห์ปริมาณเรสเวอราทรอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตามวิธีซึ่งมีรายงานโดย Chen และคณะ [44] โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นสารละลายกรดอะซิติก (Acetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 v/v ในสารละลายเมทานอลในน้ำที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 v/v ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ความกว้างของคอลัมน์ 4.6 มิลลิเมตร ความยาวของคอลัมน์ 150 มิลลิเมตร ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีปริมาตรการฉีด (Injection volume) 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิของคอลัมน์อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 303 นาโนเมตร

3.9 การวิเคราะห์เชิงสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of variance (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS 26 ตามด้วย Post hoc test โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p -value ต่ำกว่า 0.05

บทที่ 4

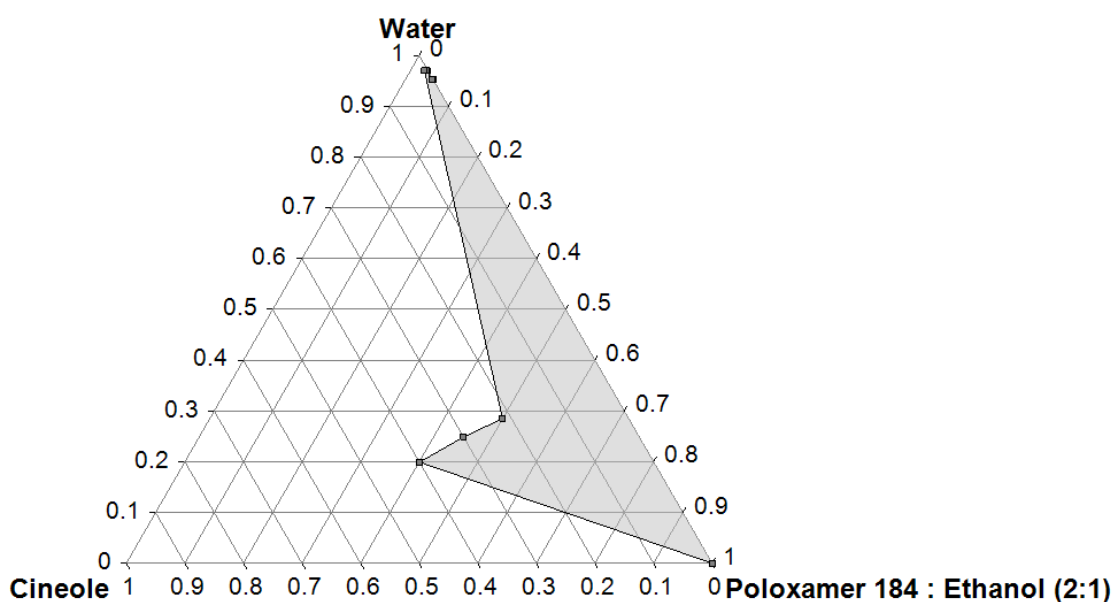
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การพัฒนาสูตรตำรับพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอล

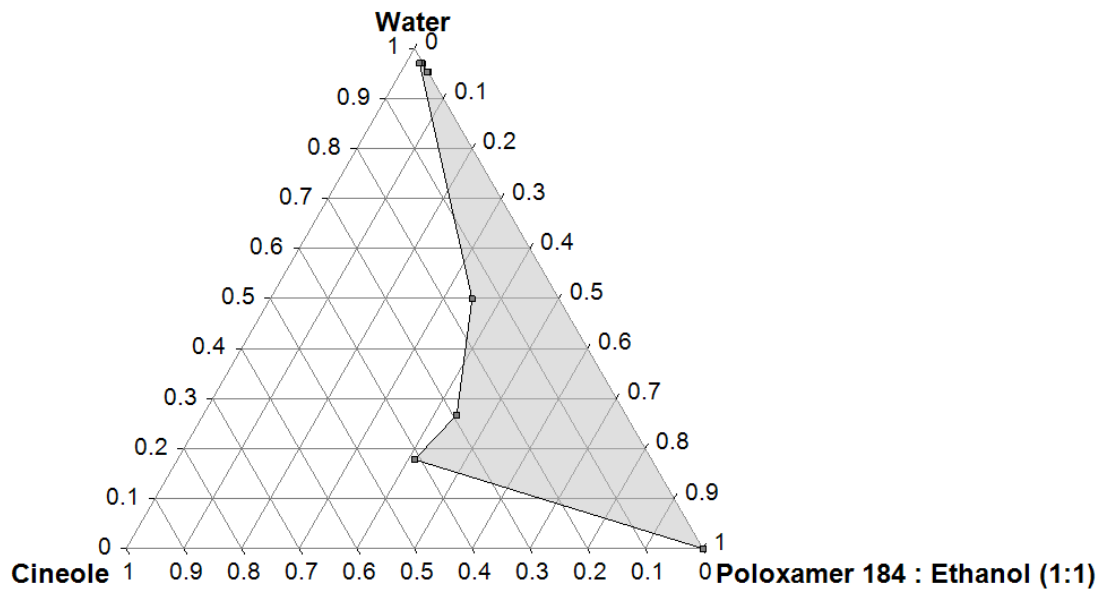
4.1.1 การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram โดยใช้วิธีไทเทรตด้วยน้ำ (Water titration method)

การศึกษาเพื่อเลือกอัตราส่วนของพอลอกซาเมอร์ 184 เอทานอลและเทอร์พีนส์ที่ทำให้ตำรับมีลักษณะใสและมีปริมาณเอทานอลในตำรับน้อยที่สุด ด้วยการสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ระหว่างส่วนผสมของพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลซึ่งมีอัตราส่วนเป็น 2:1, 1:1, 1:2 และ 1:3 กับเทอร์พีนส์ที่เป็นวัฏภาคน้ำมัน โดยมีทั้งหมด 3 ชนิด คือ ซีเนโอล ชิทรอล และดี-ลิโมนีน และใช้น้ำที่เป็นวัฏภาคน้ำ

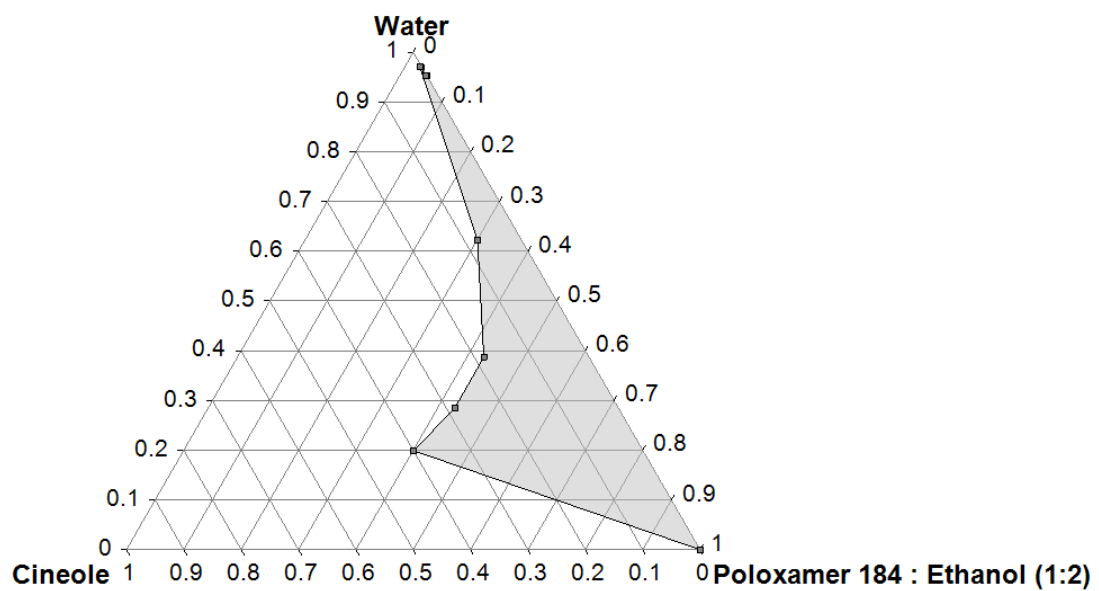
4.1.1.1 การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอล



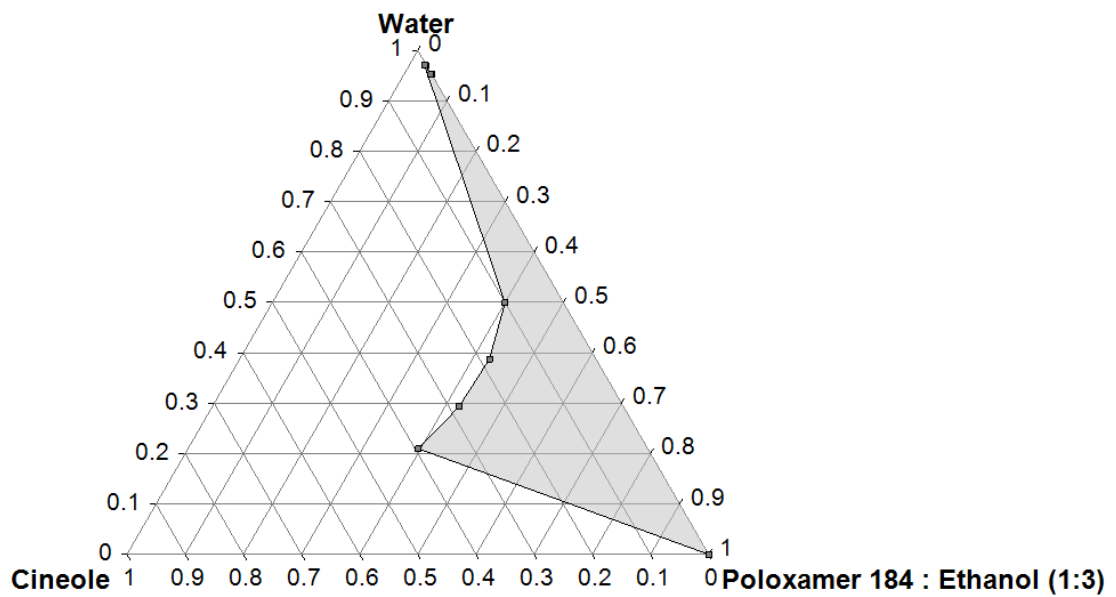
รูปที่ 2 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอล โดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 2:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ตำรับมีลักษณะใส)



รูปที่ 3 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอล โดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรับมีลักษณะใส)

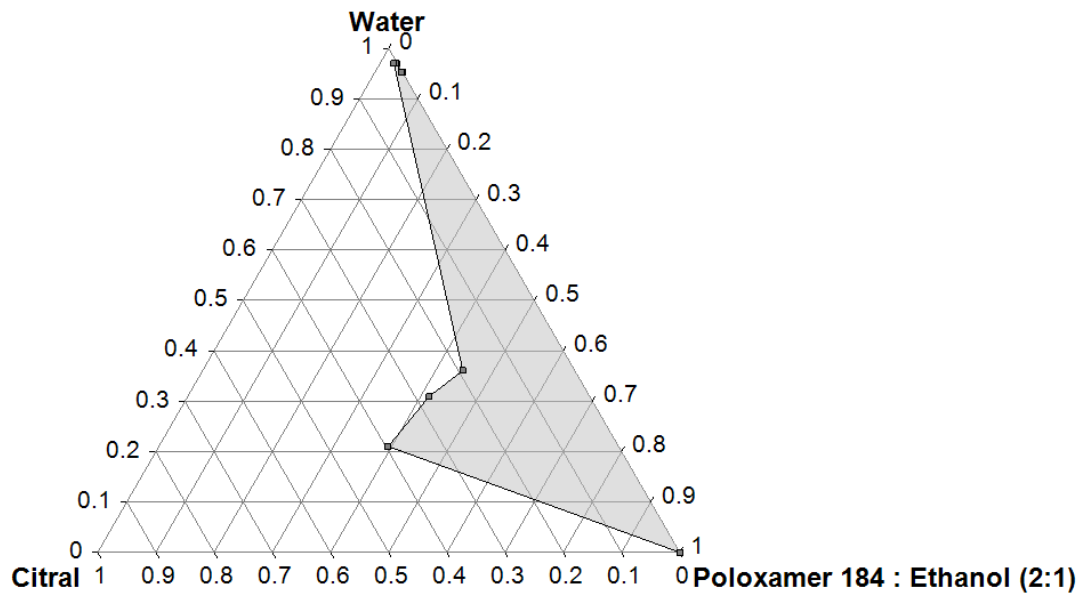


รูปที่ 4 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอล โดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:2 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรับมีลักษณะใส)

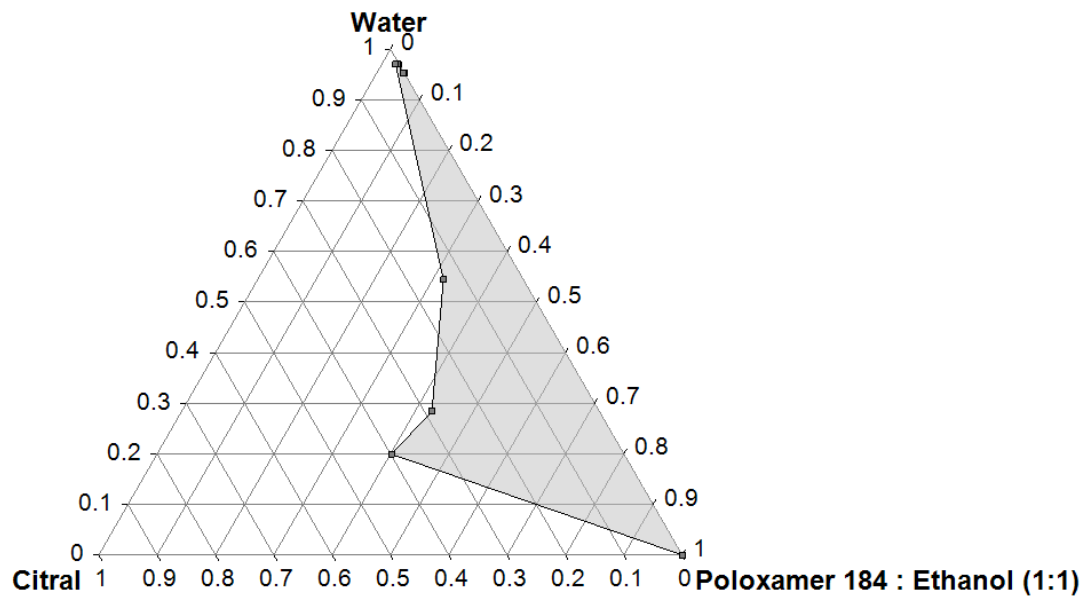


รูปที่ 5 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอล โดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:3 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรับมีลักษณะใส)

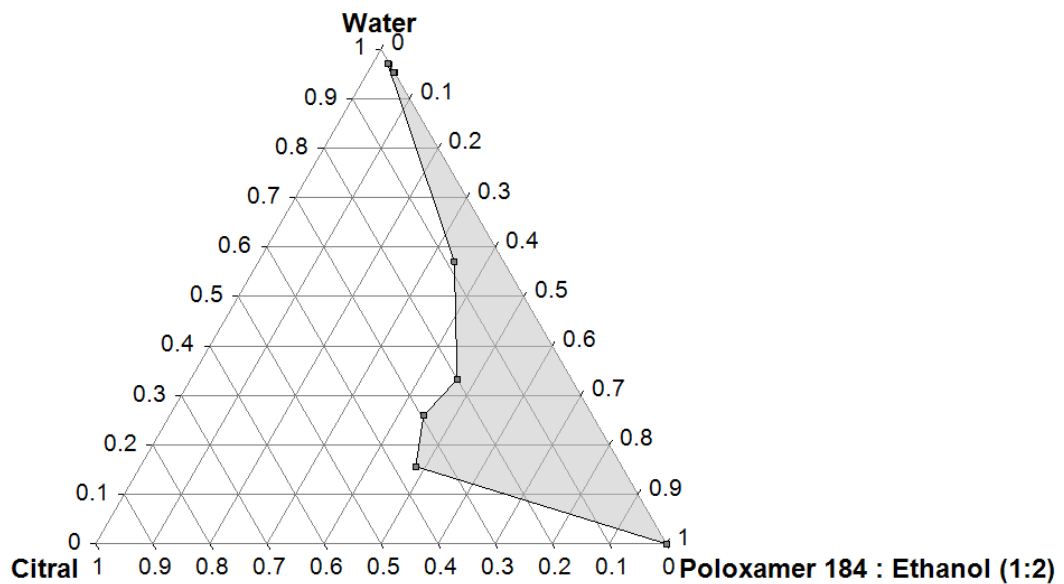
4.1.1.2 การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ของซิทรอล



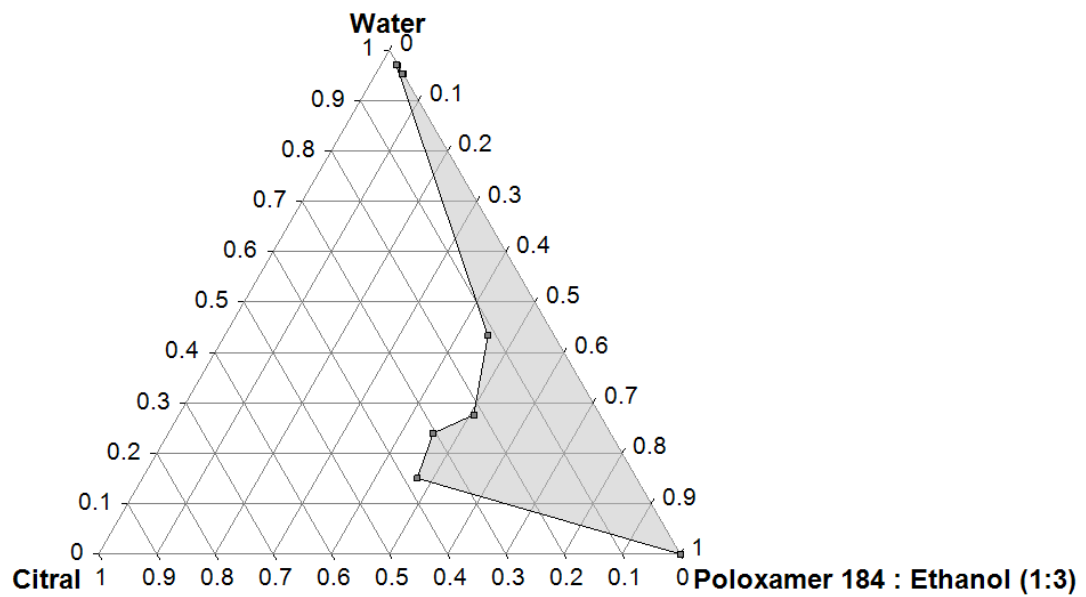
รูปที่ 6 Pseudo-ternary phase diagram ของซิทรอล โดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 2:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรับมีลักษณะใส)



รูปที่ 7 Pseudo-ternary phase diagram ของซิทรัลโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ตำรับมีลักษณะใส)

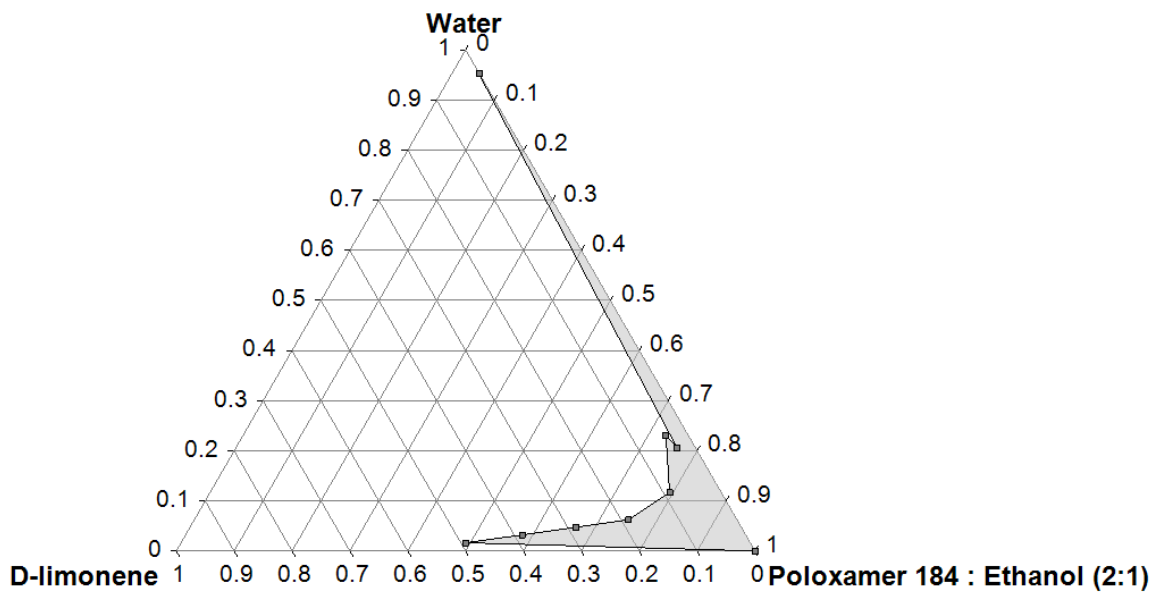


รูปที่ 8 Pseudo-ternary phase diagram ของซิทรัลโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:2 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ตำรับมีลักษณะใส)

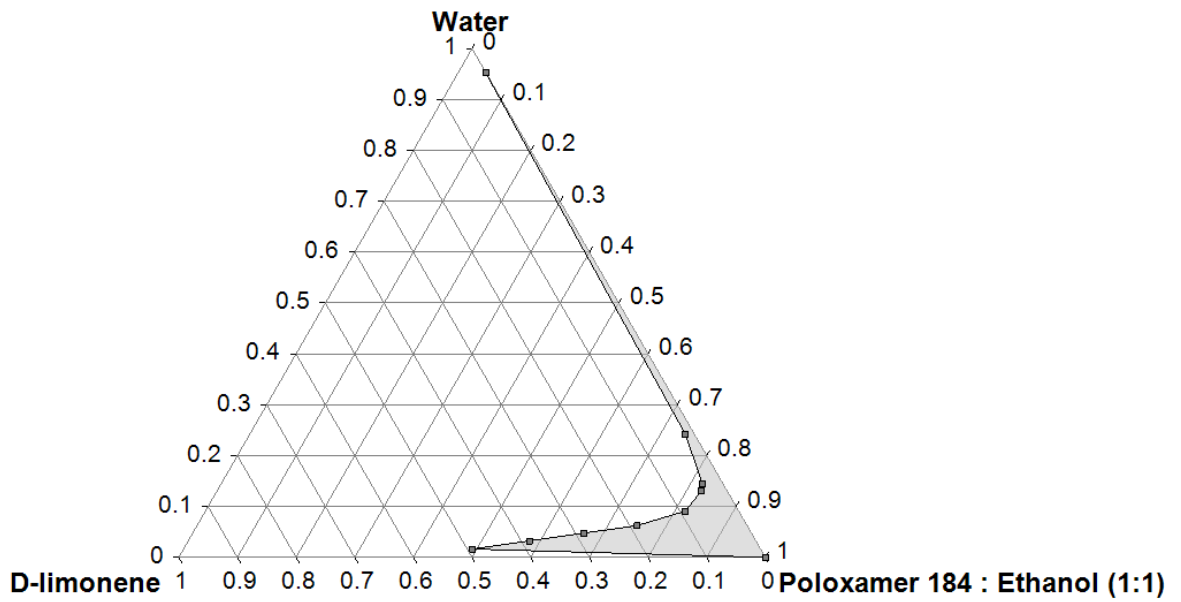


รูปที่ 9 Pseudo-ternary phase diagram ของซิทรัลโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:3 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรงมีลักษณะใส)

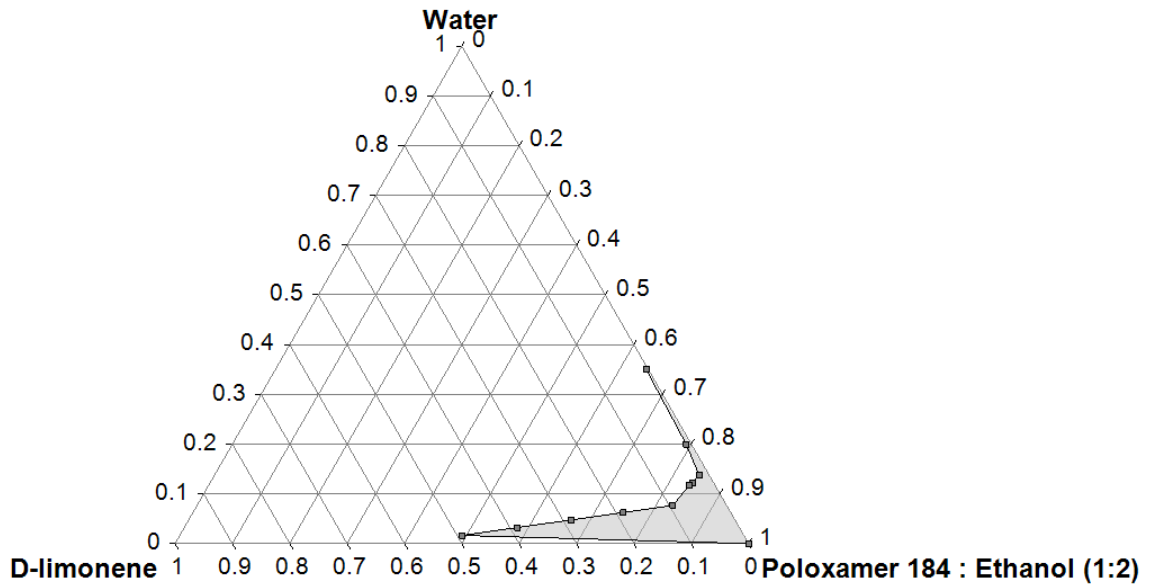
4.1.1.3 การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีน



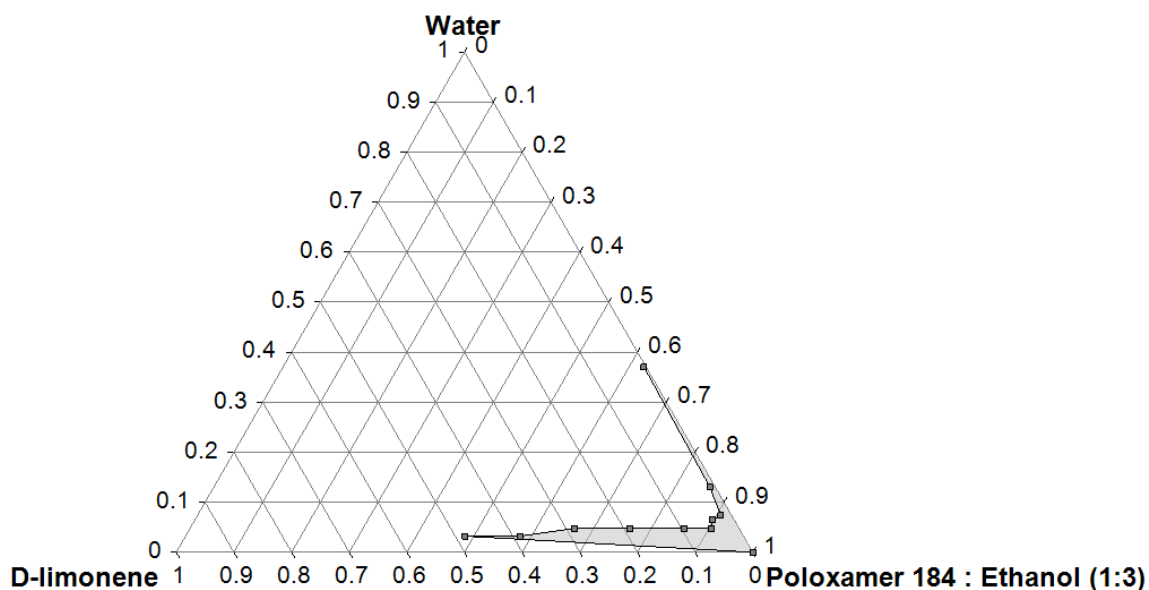
รูปที่ 10 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีนโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 2:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรงมีลักษณะใส)



รูปที่ 11 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีนโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรงมีลักษณะใส)



รูปที่ 12 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีนโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:2 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรงมีลักษณะใส)

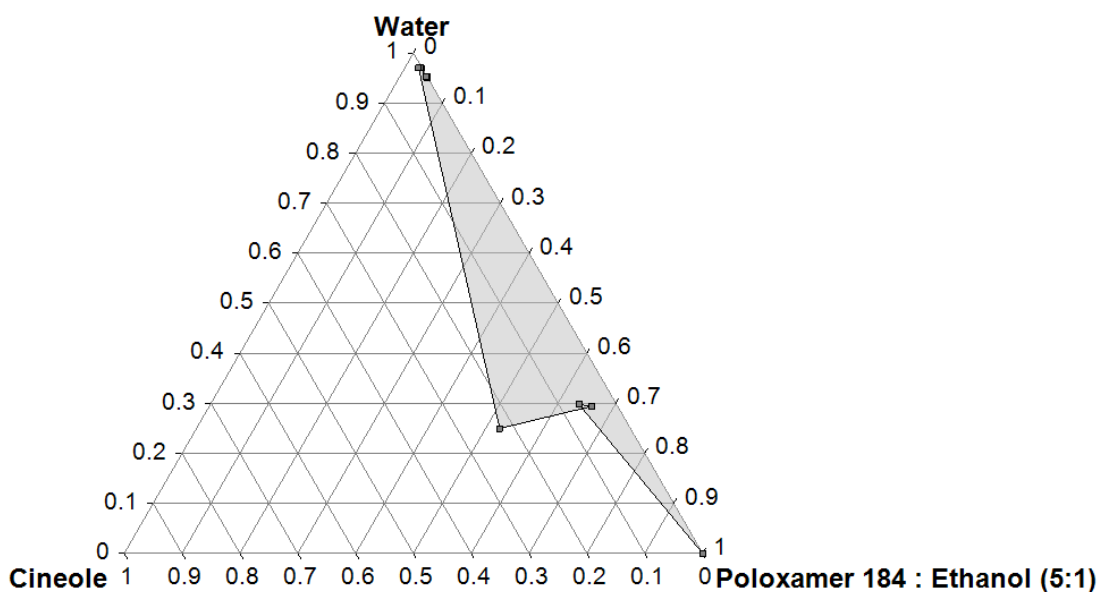


รูปที่ 13 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีนโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 1:3 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรงมีลักษณะใส)

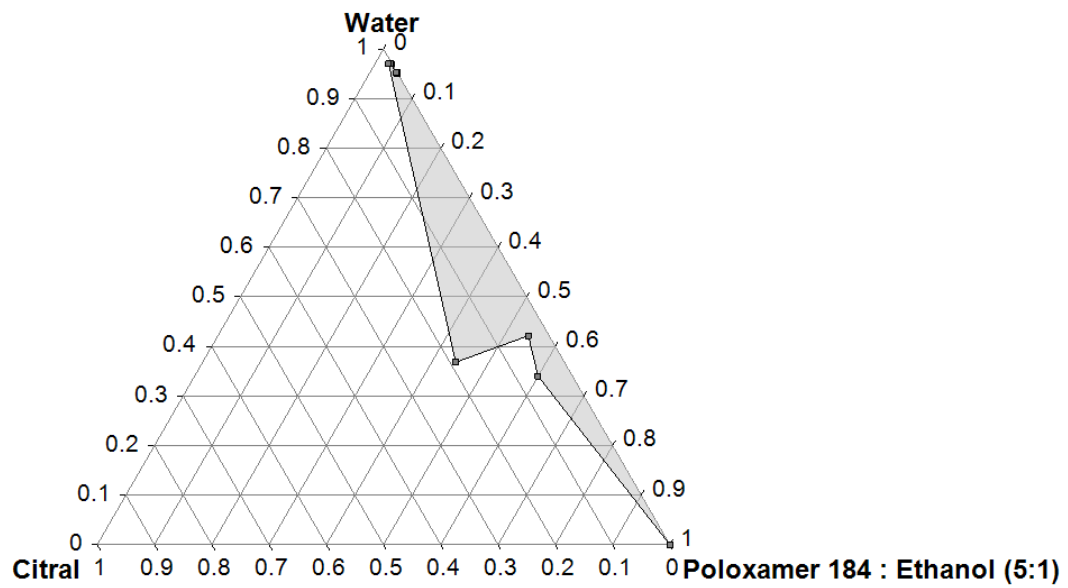
จากการศึกษา Pseudo-ternary phase diagram ของพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 2:1, 1:1, 1:2 และ 1:3 ดังรูปที่แสดงข้างต้น พบว่าการเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของพอลอกซาเมอร์ 184 และเอทานอลมีผลต่อการเพิ่มการละลายของเทอร์พีนส์ทั้ง 3 ชนิด โดยอัตราส่วนที่ดีที่สุดคือพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่ 2:1 เท่านั้นที่ทำให้เทอร์พีนส์ทั้ง 3 ชนิด มีพื้นที่แสดงการเกิดตำรับที่มีลักษณะใสมากที่สุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าตำรับที่ดีที่สุดประกอบด้วยพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 2:1 คิดเป็นพอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 10 ของตำรับเอทานอลร้อยละ 5 ของตำรับ และเทอร์พีนส์ร้อยละ 1 ของตำรับ

จากนั้นหาปริมาณการบรรจุเรสเวอราทรอลโดยการใส่เรสเวอราทรอลปริมาณมากเกินพอลงในสูตรตำรับที่ได้จากขั้นตอนการทำ Pseudo-ternary phase diagram ข้างต้น โดยสังเกตตะกอนที่เกิดขึ้นและทำการคนด้วย magnetic stirrer นาน 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าสูตรตำรับพอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 10 ของตำรับ เอทานอลร้อยละ 5 ของตำรับ และซีเนโอล์ร้อยละ 1 ของตำรับ สามารถบรรจุเรสเวอราทรอลได้เฉลี่ย 0.4124 มิลลิกรัม สูตรตำรับพอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 10 ของตำรับ เอทานอลร้อยละ 5 ของตำรับ และซีทรอลร้อยละ 1 ของตำรับ สามารถบรรจุเรสเวอราทรอลได้เฉลี่ย 0.4773 มิลลิกรัม สูตรตำรับพอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 10 ของตำรับ เอทานอลร้อยละ 5 ของตำรับ และดี-ลิโมนีนร้อยละ 1 ของตำรับ สามารถบรรจุเรสเวอราทรอลได้เฉลี่ย 0.5202 มิลลิกรัม จากการศึกษการบรรจุ

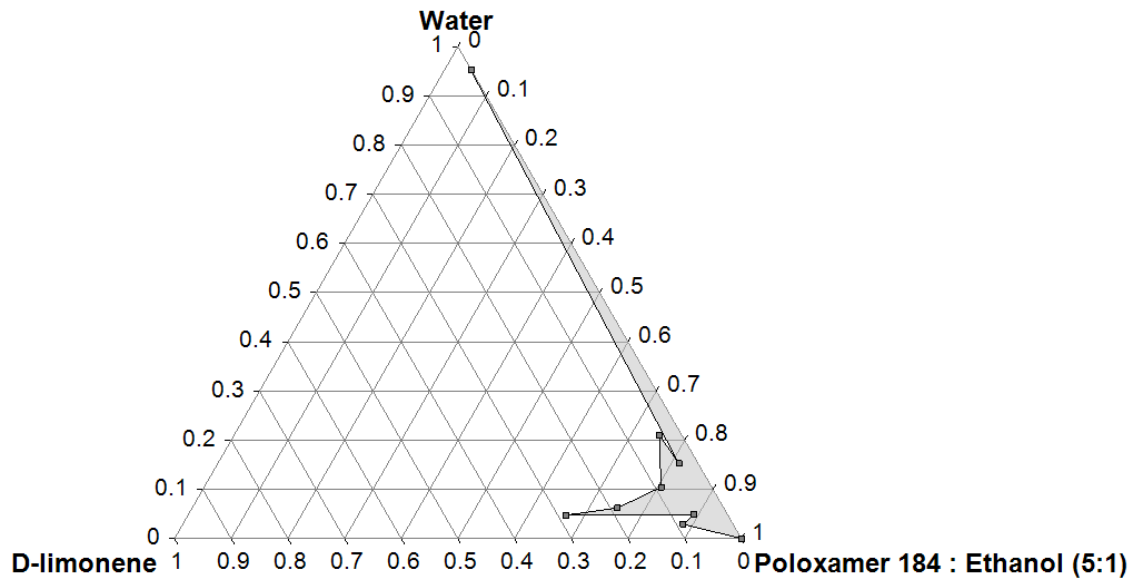
ปริมาณเรสเวราทรอลพบว่าสูตรตำรับพอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 10 ของตำรับ เอทานอลร้อยละ 5 ของตำรับและเทอร์พีนส์ร้อยละ 1 ของตำรับสามารถบรรจุเรสเวราทรอลได้ปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มอัตราส่วนของพอลอกซาเมอร์ 184 เป็นร้อยละ 15 ร้อยละ 20 ร้อยละ 30 และร้อยละ 40 ของสูตรตำรับ ด้วยการหาปริมาณการบรรจุเรสเวราทรอลโดยการใส่เรสเวราทรอลปริมาณมากเกินพอ พบว่าสามารถบรรจุปริมาณเรสเวราทรอลได้เพิ่มขึ้นจริงแต่พบว่าสูตรตำรับที่มีอัตราส่วนของพอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 40 ของสูตรตำรับมีลักษณะเป็นเจลใสและสูตรตำรับที่มีอัตราส่วนของพอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 30 ของสูตรตำรับมีลักษณะใสที่มีความหนืดสูง ดังนั้นจึงเลือกศึกษาเพิ่มเติมที่อัตราส่วนของพอลอกซาเมอร์ 184 ที่ร้อยละ 25 ของสูตรตำรับระหว่างส่วนผสมรวมของสารลดแรงตึงผิวพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 5:1 ได้ Pseudo-ternary phase diagram ดังแสดงในรูปที่ 14 เทอร์พีนส์ชนิดซีเนโอล รูปที่ 15 เทอร์พีนส์ชนิดซิทราล และรูปที่ 16 เทอร์พีนส์ชนิดดี-ลิโมนีน



รูปที่ 14 Pseudo-ternary phase diagram ของซีเนโอลโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 5:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ตำรับมีลักษณะใส)



รูปที่ 15 Pseudo-ternary phase diagram ของซิทรัลโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 5:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรงมีลักษณะใส)



รูปที่ 16 Pseudo-ternary phase diagram ของดี-ลิโมนีนโดยมีพอลอกซาเมอร์ 184 กับเอทานอลที่อัตราส่วน 5:1 (พื้นที่สีเทาแสดงอัตราส่วนที่ทำให้ดำรงมีลักษณะใส)

4.2 การศึกษาค่าการละลายของเรสเวราทรอลในสารละลายเอทานอลร้อยละ 5 v/v

จากการศึกษาโดยการเติมเรสเวราทรอลปริมาณมากเกินไปลงในสารละลายเอทานอลร้อยละ 5 v/v และคนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แล้วทำการเก็บสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเรสเวราทรอล ซึ่งพบว่าสารละลายเอทานอลร้อยละ 5 v/v สามารถละลายเรสเวราทรอลได้มากที่สุดปริมาณ 0.1252 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นการทดลองการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย จึงใช้ปริมาณของเรสเวราทรอลที่ความเข้มข้น 0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการเตรียมตำรับสูตรควบคุม

4.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของพอลิเมอร์ไมเซลล์

4.3.1 ผลการศึกษาการวัดขนาด การกระจาย และประจุพื้นผิวของอนุภาคโดยใช้เครื่อง

Dynamic Light Scattering (DLS)

ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด (PDI) และศักย์ซีตาของสูตร Blank polymeric micelles (EP with cineole, EP with citral และ EP with d-limonene) และสูตรตำรับ resveratrol loaded polymeric micelles (EP with cineole, EP with citral และ EP with d-limonene) แสดงดังตารางที่ 4

Blank polymeric micelles (EP with cineole, EP with citral และ EP with d-limonene) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 23.04 ถึง 28.53 นาโนเมตร ส่วน resveratrol loaded polymeric micelles (EP with cineole, EP with citral และ EP with d-limonene) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 26.33 ถึง 31.06 นาโนเมตร

ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด (PDI) และศักย์ซีตาของ Blank polymeric micelles (EP with cineole, EP with citral และ EP with d-limonene) ไม่แตกต่างกัน

ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด (PDI) และศักย์ซีตาของ resveratrol loaded polymeric micelles (EP with cineole, EP with citral และ EP with d-limonene) ไม่แตกต่างกัน

ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด (PDI) และศักย์ซีตาระหว่าง Blank EP with cineole และ resveratrol loaded EP with cineole ไม่แตกต่างกัน

ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด (PDI) และศักย์ซีตาระหว่าง Blank EP with cineole และ resveratrol loaded EP with citral ไม่แตกต่างกัน

ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด (PDI) และศักย์ซีตาระหว่าง Blank EP with cineole และ resveratrol loaded EP with d-limonene ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4 การวัดขนาด การกระจาย และประจุพื้นผิวของอนุภาคโดยใช้เครื่อง Dynamic Light Scattering (DLS)

Formulations	Particle size (nm)		Polydispersity index (PDI)		Zeta potential (mV)	
	Blank	Resveratrol loaded	Blank	Resveratrol loaded	Blank	Resveratrol loaded
EP with cineole	25.87±0.77	28.02±7.17	0.356±0.01	0.349±0.02	0.18±0.02	0.13±0.04
EP with citral	23.04±2.72	26.33±0.53	0.358±0.01	0.369±0.01	0.19±0.04	0.17±0.08
EP with d-limonene	28.53±1.23	31.06±1.45	0.345±0.01	0.346±0.01	0.15±0.02	0.15±0.05

Each value represents the mean±standard deviation (n=3)

4.4 ผลการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro* skin penetration test)

ปริมาณเรสเวราทรอลที่แพร่ผ่านผิวหนังของแต่ละสูตรได้รับแสดงในตารางที่ 5 โดยพบว่าสูตรควบคุม สูตรพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเทอร์พีนส์ชนิดซีเนโอลและสูตรพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีเทอร์พีนส์ชนิดซิทรัล ไม่พบปริมาณเรสเวราทรอลทั้งในชั้นสตราตัม คอร์เนียม รวมถึงViable epidermis และ dermis และมีเพียงสูตรพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ชนิดดี-ลิโมนีนเท่านั้นที่พบการแพร่ผ่านผิวหนังของปริมาณเรสเวราทรอล ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ามีเพียงพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ชนิดดี-ลิโมนีนเท่านั้นที่สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวราทรอลได้

ตารางที่ 5 ปริมาณเรสเวอราทรอลที่แพร่ผ่านผิวหนังในชั้นต่าง ๆ

Formulations	Stratum corneum (mcg/cm ²)	Deeper skin (mcg/cm ²)
resveratrol in 5 % v/v ethanol solution (resveratrol 0.12 mg/ml)	ND	ND
EP with cineole	ND	ND
EP with citral	ND	ND
EP with d-limonene	104.54±105.80	27.95±6.38

Each value represents the mean±standard deviation (n=3)

ND = Not detected

Deeper skin = viable epidermis and dermis

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

เรสเวอราทรอลเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพโดยมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความกระจ่างใสให้กับผิวหนังและช่วยลดริ้วรอยได้ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง แต่เนื่องจากคุณสมบัติของเรสเวอราทรอลที่ไม่คงทนต่อแสง ความร้อน และมีความการละลายน้ำที่ต่ำ จึงทำให้เรสเวอราทรอลไม่สามารถแพร่ผ่านผิวหนังได้ดีและสลายตัวได้ง่าย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาระบบนำส่งรูปแบบพอลิเมอร์ริกไมเซลล์โดยใช้พอลอกซาเมอร์ 184 ร่วมกับเอทานอลและโมโนเทอร์ฟินส์ เพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังและเพิ่มความคงตัวให้กับเรสเวอราทรอล

การศึกษานี้สามารถเตรียมพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีขนาดในระดับนาโนเมตรได้ โดยมีเทอร์ฟินส์ร้อยละ 1 และพอลอกซาเมอร์ 184 ร้อยละ 25 และเอทานอลร้อยละ 5 และน้ำร้อยละ 69 โดยสามารถบรรจุเรสเวอราทรอลได้ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่เตรียมได้มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 26.33 ถึง 31.06 นาโนเมตร มีประจุพื้นผิวเป็นกลาง และมีการกระจายขนาดที่แคบจากการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังพบว่า มีเพียงสูตรตำรับพอลิเมอร์ริกไมเซลล์ที่มีดี-ลิโมนีนเท่านั้นที่สามารถแพร่ผ่านผิวหนังของเรสเวอราทรอลเข้าสู่ชั้น viable epidermis และ dermis ได้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพของตำรับในอาสาสมัครต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- [1] Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA, Penning TM. Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: A mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J Biol Chem.* 2004;279:22727–37.
- [2] Anekonda TS. Resveratrol-A boon for treating Alzheimer’s disease. *Brain Res Rev.* 2006;52:316–26.
- [3] Jiang B-H, Stinefelt B, Xia C, Leonard SS, Klandorf H, Shi X, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309:1017–26.
- [4] Bernard P, Berthon JY. Resveratrol: An original mechanism on tyrosinase inhibition. *Int J Cosmet Sci.* 2000;22:219–26.
- [5] Kwon SH, Choi HR, Kang YA, Park KC. Depigmenting effect of resveratrol is dependent on FOXO3a activation without SIRT1 activation. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1–11.
- [6] Farris P, Krutmann J, Li Y-H, McDaniel D, Krol Y. Resveratrol: a unique antioxidant offering a multi-mechanistic approach for treating aging skin. *J Drugs Dermatol.* 2013;12:1389–94.
- [7] Naik A, Kalia YN, Guy RH, Guy RH. Rationale for transdermal drug delivery. 2000;3.
- [8] Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release.* 2012;158:182–93.
- [9] Chaturvedi K, Noolvi MN, Chauhan PN, Ganguly K, Nadagouda MN, Aminabhavi TM, et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm.* 2017;532:249–68.
- [10] Kahraman E, Nesetoglu N, Gungor S, Unal DS, Ozsoy Y. The combination of nanomicelles with terpenes for enhancement of skin drug delivery. *Int J Pharm.* 2018;551:133–40.
- [11] Oryza Oil & Fat Chemical Co. L. Resveratrol. for anti-ageing, anti-oxidation,

- neuron protection & metabolic syndrome. *Cardiovasc Dis*. 2008;5:0–29.
- [12] Abdelaziz KM, Gambini J, Ingles M, Borrás C, Gimeno-Mallench L, Vina J, et al. Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:1–13.
- [13] Rakhma DN, Rosita N, Soeratri W. The role of resveratrol as potent antioxidant for anti-aging formulation development : A Review. 2018;3:11–5.
- [14] Gescher AJ. Resveratrol from red grapes - Pedestrian polyphenol or useful anticancer agent? *Planta Med*. 2008;74:1651–5.
- [15] Scognamiglio I, De Stefano D, Campani V, Mayol L, Carnuccio R, Fabbrocini G, et al. Nanocarriers for topical administration of resveratrol: A comparative study. *Int J Pharm*. 2013;440:179–87.
- [16] Tosato MG, Vicendo P, Thomas AH, Lorente C. Clearing up the photochemistry of resveratrol: Effect of the solvent. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2018;367:327–31.
- [17] Lavric Z, Kristl J. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Stability and solubility of trans -resveratrol are strongly influenced by pH and temperature *ic*. 2015;93:196–204.
- [18] Scalia S, Zampino MR, Trotta V, Bianchi A. Enhancement of trans-resveratrol photostability by encapsulation in lipid microparticles: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharmazie*. 2017;72:200–4.
- [19] Juskaite V, Ramanauskiene K, Briedis V. Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress. *Acta Pharm*. 2017;67:247–56.
- [20] Wei X, Chen Y, Ban J, Xie Q, Lu Z, Huang X, et al. Increased skin permeation efficiency of imperatorin via charged ultradeformable lipid vesicles for transdermal delivery. *Int J Nanomedicine*. 2018;Volume 13:831–42.
- [21] Tosato MG, Maya Giron J V., Martin AA, Krishna Tippavajhala V, Fernandez Lorenzo de Mele M, Dixelio L. Comparative study of transdermal drug delivery systems of resveratrol: High efficiency of deformable liposomes. *Mater Sci Eng C*. 2018;90:356–64.

- [22] Suktham K, Koobkokkruad T, Wutikhun T, Surassmo S. Efficiency of resveratrol-loaded sericin nanoparticles: Promising bionanocarriers for drug delivery. *Int J Pharm.* 2018;537:48–56.
- [23] Kundu J, Chung Y Il, Kim YH, Tae G, Kundu SC. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *Int J Pharm.* 2010;388:242–50.
- [24] Summerlin N, Soo E, Thakur S, Qu Z, Jambhrunkar S, Popat A. Resveratrol nanoformulations: Challenges and opportunities. *Int J Pharm.* 2015;479:282–90.
- [25] Jadhav P, Bothiraja C, Pawar A. Resveratrol-piperine loaded mixed micelles: formulation, characterization, bioavailability, safety and *in vitro* anticancer activity. *RSC Adv.* 2016;6:112795–805.
- [26] Pentek T, Newenhouse E, O'Brien B, Singh Chauhan A. Development of a topical resveratrol formulation for commercial applications using dendrimer nanotechnology. *Molecules.* 2017;22.
- [27] R. Neves A, Lucio M, L.C. Lima J, Reis S. Resveratrol in medicinal chemistry: A critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. *Curr Med Chem.* 2012;19:1663–81.
- [28] Ruivo J, Francisco C, Oliveira R, Figueiras A. The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. *Brazilian J Pharm Sci.* 2015;51:499–513.
- [29] Guo X, Zhao Z, Chen D, Qiao M, Wan F, Cun D, et al. Co-delivery of resveratrol and docetaxel via polymeric micelles to improve the treatment of drug-resistant tumors. *Asian J Pharm Sci.* 2019;14:78–85.
- [30] Almeida M, Magalhaes M, Veiga F, Figueiras A. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *J Polym Res.* 2018;25.
- [31] Devi DR, Sandhya P, Hari BNV. Poloxamer : A novel functional molecule for drug delivery and gene therapy. 2013;5:159–65.
- [32] Jin X, Zhang Y, Zhang Z, Che D, Lv H. Juglone loaded poloxamer 188/phospholipid mixed micelles evaluated *in vitro* and *in vivo* in breast cancer. *Int J Pharm.* 2016;515:359–66.
- [33] Article R. Poly (ethylene oxide)– Poly (propylene oxide) -based copolymers for transdermal drug delivery : An Overview. 2012;11(January):855–66.

- [34] Croy S, Kwon G. Polymeric Micelles for Drug Delivery. *Curr Pharm Des.* 2006;12:4669–84.
- [35] Abbas H, Kamel R, El-Sayed N. Dermal anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-aging effects of Compritol ATO-based Resveratrol colloidal carriers prepared using mixed surfactants. *Int J Pharm.* 2018;541:37–47.
- [36] Cholkar K, Patel A, Vadlapudi AD, Mitra AK. Novel nanomicellar formulation approaches for anterior and posterior segment ocular drug delivery. *Recent Pat Nanomed.* 2012;2:82–95.
- [37] Vaddi HK, Ho PC, Chan SY. Terpenes in propylene glycol as skin-penetration enhancers: Permeation and partition of haloperidol, fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. *J Pharm Sci.* 2002;91:1639–51.
- [38] Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Ali A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discov Today.* 2007;12:1061–7.
- [39] Lason E, Sikora E, Ogonowski J, Tabaszewska M, Skoczylas L. Release study of selected terpenes from nanostructured lipid carriers. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2016;510:87–92.
- [40] Kang L, Yap CW, Lim PFC, Chen YZ, Ho PC, Chan YW, et al. Formulation development of transdermal dosage forms: Quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of terpenes that enhance drug penetration through human skin. *J Control Release.* 2007;120:211–9.
- [41] Lim PFC, Liu XY, Kang L, Ho PCL, Chan SY. Physicochemical effects of terpenes on organogel for transdermal drug delivery. *Int J Pharm.* 2008;358:102–7.
- [42] Liu CH, Chang FY, Hung DK. Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: Effects of terpenes and cosurfactants. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;82:63–70.
- [43] Cal K, Janicki S, Sznitowska M. *In vitro* studies on penetration of terpenes from matrix-type transdermal systems through human skin. *Int J Pharm.* 2001;224:81–8.

- [44] Chen X, He H, Wang G, Yang B, Ren W, Ma L, Yu Q. Stereospecific determination of *cis*- and *trans*-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. Biomed Chromatogr. 2007 Mar;21:257-65.

ภาคผนวก

1. การสร้างกราฟมาตรฐานของเรสเวอราทรอลโดยใช้ HPLC

1.1 การตรวจสอบความแม่นยำของกระบวนการทดลอง

ตารางที่ 1 การตรวจสอบความแม่นยำของกระบวนการทดลอง (The accuracy of assay method of resveratrol)

Resveratrol (g)	Methanol Vol. (ml)	Resveratrol Conc. (µg/ml)	AUC	Average	Standard Deviation	% RSD	Conc. Yield (µg/ml)	% Recovery
0.00001	0.25	0.50	27124	27247.00	112.28	0.00	0.50	99.03
			27273					
			27344					
0.00002	0.20	0.80	42276	42188.33	263.67	0.01	0.73	91.59
			41892					
			42397					
0.00002	0.25	1.00	55677	55385.33	441.00	0.01	0.94	94.26
			54878					
			55601					
0.00005	0.20	2.00	111734	112111.33	399.03	0.00	1.84	92.22
			112071					
			112529					
0.00005	0.25	2.50	138499	138312.00	242.50	0.00	2.26	90.44
			138399					
			138038					
0.0001	0.25	5.00	286105	285724.00	370.49	0.00	4.60	92.10
			285702					
			285365					
0.0001	0.50	10.00	612387	612424.67	286.36	0.00	9.80	97.99
			612728					

			612159					
0.0001	0.75	15.00	918395	918211.00	165.31	0.00	14.66	97.74
			918075					
			918163					
0.0001	1.00	20.00	1254932	1254420.00	1527.76	0.00	20.01	100.04
			1255626					
			1252702					

ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัด	% recovery ที่ยอมรับได้
10 – 100 %	98 – 102
≥ 1%	97 – 103
≥ 0.1 %	95 – 105
100 ppm (เท่ากับ 100 µg/ml)	90 – 107
10 ppm (เท่ากับ 10 µg/ml)	80 – 110
1 ppm (เท่ากับ 1 µg/ml)	80 – 110
100 ppb (เท่ากับ 0.1 µg/ml)	80 – 110
10 ppb (เท่ากับ 0.01 µg/ml)	60 - 115
1 ppb	40 - 120

% Recovery ควรอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ ระหว่างร้อยละ 80 ถึง ร้อยละ 110

1.2 การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการทดลอง

ตารางที่ 2 การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการทดลอง (The precision of assay method of resveratrol)

Average AUC	Calculated concentration from calibration curve ($\mu\text{g/ml}$)					
	No. 1	No. 2	No. 3	Average	SD	%RSD
3931.00	0.12	0.13	0.13	0.12	0.003	2.29
5132.33	0.14	0.14	0.15	0.14	0.002	1.12
5849.67	0.16	0.16	0.15	0.15	0.001	0.60
8114.67	0.19	0.19	0.20	0.19	0.004	2.05
13732.67	0.28	0.28	0.28	0.28	0.001	0.50
31089.67	0.55	0.56	0.56	0.56	0.002	0.36
46796.33	0.80	0.81	0.81	0.81	0.002	0.28
63072.67	1.07	1.06	1.06	1.06	0.008	0.77
114579.67	1.89	1.88	1.88	1.88	0.005	0.28
142547.00	2.33	2.33	2.33	2.33	0.002	0.10
288730.67	4.66	4.66	4.64	4.65	0.010	0.21
605368.67	9.67	9.69	9.70	9.69	0.017	0.17
948809.33	15.14	15.14	15.16	15.15	0.010	0.06
1263940.67	20.07	20.23	20.17	20.16	0.083	0.41

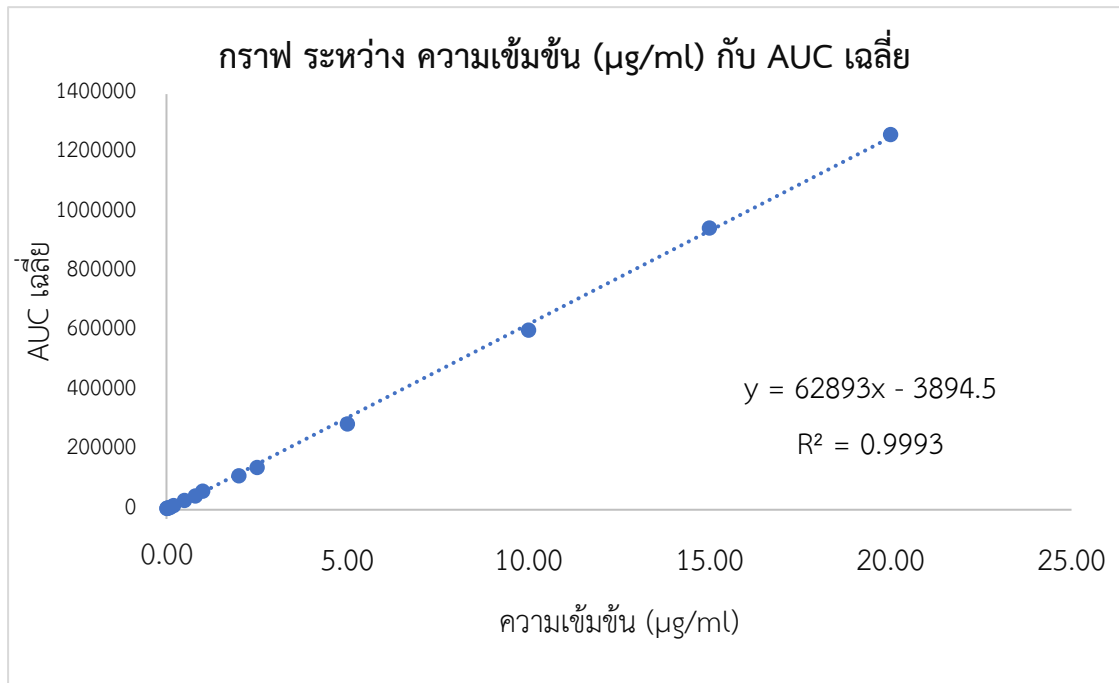
ความเข้มข้นของสารสำคัญ	% RSD ที่ยอมรับได้
100 %	1.3
10 %	2.8
1 %	2.7
0.1 %	3.7
100 ppm (เท่ากับ 100 $\mu\text{g/ml}$)	5.3
10 ppm (เท่ากับ 10 $\mu\text{g/ml}$)	7.3
1 ppm (เท่ากับ 1 $\mu\text{g/ml}$)	11
100 ppb (เท่ากับ 0.1 $\mu\text{g/ml}$)	15
10 ppb (เท่ากับ 0.01 $\mu\text{g/ml}$)	21
1 ppb	30

% RSD ควรอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ ระหว่างร้อยละ 5.3 ถึง ร้อยละ 21

1.3 การหากราฟมาตรฐาน (Standard curve)

ตารางที่ 3 การหากราฟมาตรฐาน (Calibration curve ของ resveratrol TCI source)

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	AUC 1	AUC 2	AUC 3	Average AUC
0.01	3732	4079	3982	3931.00
0.02	5105	5048	5244	5132.33
0.05	5859	5903	5787	5849.67
0.10	8094	7879	8371	8114.67
0.20	13828	13714	13656	13732.67
0.50	30968	31079	31222	31089.67
0.80	46636	46890	46863	46796.33
1.00	63628	62614	62976	63072.67
2.00	114945	114309	114485	114579.67
2.50	142690	142392	142559	142547.00
5.00	289141	289014	288037	288730.67
10.0	604205	605675	606226	605368.67
15.0	948337	948585	949506	948809.33
20.0	1258372	1268679	1264771	1263940.67



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของเรสเวอราทรอลที่สร้างได้จากความเข้มข้นและค่า AUC เฉลี่ย

1.4 การหาปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection - LOD) และการหาปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ที่สามารถตรวจหาเชิงปริมาณได้ (Limit of quantitation - LOQ)

ตารางที่ 4 การหา LOD และ LOQ (LOD and LOQ of resveratrol assay method)

Calibration curve	Conc. Of resveratrol (µg/ml)	Area under the Curve (AUC)	Calibration equation	Regression parameters		
				Slop	Intercept	R ²
No. 1	0.02	10733.00	$y = 65305x + 6897$	65305	6897	0.9997
	0.05	22671.50				
	0.10	16257.50				
	0.20	18093.50				
	0.80	50979.00				
	1.00	66580.00				
	2.00	139039.00				
	2.50	158234.00				
	5.00	338109.50				
	15.00	997463.50				
	20.00	1305512.00				
No. 2	0.02	6392.00	$y = 80526x - 8114.2$	80526	8114.2	0.9992
	0.05	2796.00				
	0.10	6139.50				
	0.20	12584.00				
	0.80	56751.00				
	1.00	69938.50				
	2.00	132083.50				
	2.50	159377.50				
	5.00	419656.50				
	15.00	1203662.00				
	20.00	1599534.50				
	0.02	5132.33				
	0.05	5849.67				
	0.10	8114.67				
	0.20	13732.67				

No. 3	0.80	46796.33	y = 63231x - 4517.6	63231	4517.6	0.9995
	1.00	63072.67				
	2.00	114579.67				
	2.50	142547.00				
	5.00	288730.67				
	15.00	948809.33				
	20.00	1263940.67				
Average				69687.33333	6509.60000	0.99947
Standard Deviation				9443.66933	1829.32828	0.00025
Average±SD				69687.33 ± 9443.67	6509.60 ± 1829.33	0.99947 ± 0.00025
Limit of detection (LOD) = 3.3($\frac{SD}{S}$) = 3.3($\frac{1829.33}{69687.33}$) = 0.087						
Limit of quantitation (LOQ) = 10 ($\frac{SD}{S}$) = 10 ($\frac{1829.33}{69687.33}$) =0.263						

SD = SD of intercept form calibration curve

S = slope of calibration curve

2. การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของพอลิเมอร์ริกไมเซลล์

2.1 การศึกษาการวัดขนาดของอนุภาคโดยใช้เครื่อง Dynamic Light Scattering (DLS)

ตารางที่ 5 ขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ

Formulation	Particle size (nm)		
	N1	N2	N3
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+cineole 1%	24.99	26.34	26.29
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+citral 1%	25.54	20.14	23.46
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+d-limonene 1%	29.03	27.12	29.43
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+cineole 1%	23.92	23.84	36.29
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+citral 1%	26.70	25.69	26.61
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+d-limonene 1%	32.71	30.52	29.96

RSV = Resveratrol

ตารางที่ 6 การกระจายของอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ

Formulation	Polydispersity index (PDI)		
	N1	N2	N3
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+cineole 1%	0.361	0.345	0.367
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+citral 1%	0.381	0.359	0.334
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+d-limonene 1%	0.341	0.324	0.370
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+cineole 1%	0.330	0.350	0.367
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+citral 1%	0.354	0.378	0.374
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+d-limonene 1%	0.347	0.350	0.340

RSV = Resveratrol

ตารางที่ 7 ประจุพื้นผิวของอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ

Formulation	Zeta potential (mV)		
	N1	N2	N3
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+cineole 1%	0.20	0.17	0.16
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+citral 1%	0.23	0.20	0.15
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+d-limonene 1%	0.13	0.14	0.17
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+cineole 1%	0.12	0.18	0.10
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+citral 1%	0.12	0.13	0.26
Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+RSV 25 mg/ml+d-limonene 1%	0.20	0.13	0.11

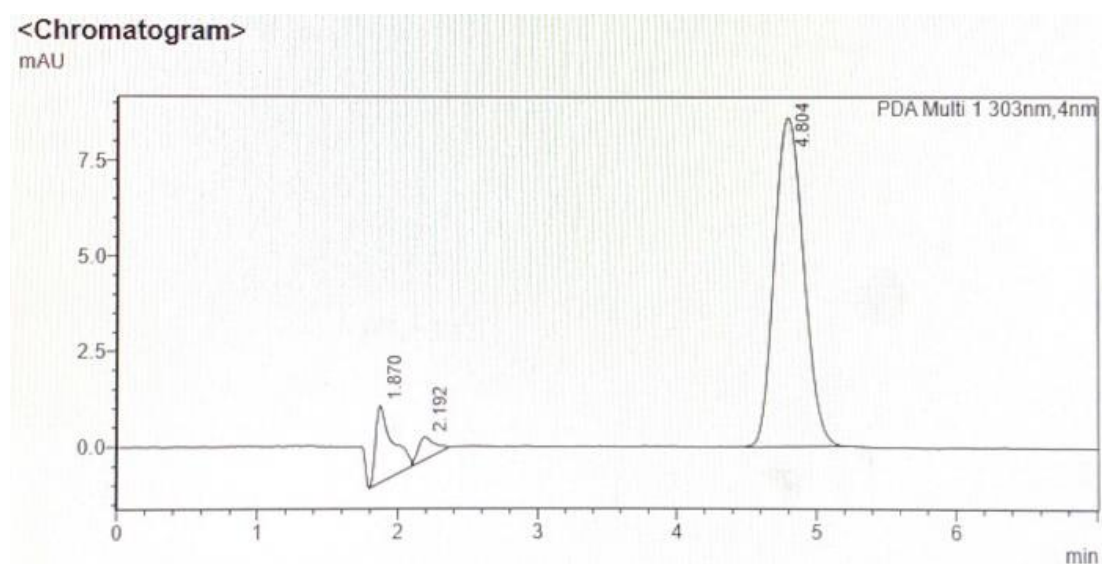
RSV = Resveratrol

3. การแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro* skin penetration study)

ตารางที่ 8 ปริมาณเรสเวราทรอลที่แพร่ผ่านผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียมและ Deeper skin ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีเทอร์พีนส์ชนิดดี-ลิโมนีน

Number	Stratum corneum			Deeper skin		
	Resveratrol (mcg/ml)	Surface area (cm ²)	Resveratrol/ Surface area (mcg/cm ²)	Resveratrol (mcg/ml)	Surface area (cm ²)	Resveratrol/ Surface area (mcg/cm ²)
N1	25.2974	1.6331	77.4507	10.0028	1.6331	30.6246
N2	62.5910	1.4145	221.2517	9.8973	1.4145	34.9859
N3	4.3270	1.4505	14.9150	5.9978	1.4505	20.6743

4. โครมาโทแกรมของเรสเวราทรอล



รูปที่ 2 HPLC โครมาโทแกรมของเรสเวราทรอล

5. การวิเคราะห์สถิติ One-way ANOVA

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์สถิติ One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS 26

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Samplotype	(J) Samplotype	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Zave	1	2	1.68333	2.65184	.537	-4.0945	7.4612
		3	-3.04667	2.65184	.273	-8.8245	2.7312
		4	2.14333	2.65184	.435	-3.6345	7.9212
		5	4.97000	2.65184	.085	-.8079	10.7479
		6	-.51000	2.65184	.851	-6.2879	5.2679
	2	1	-1.68333	2.65184	.537	-7.4612	4.0945
		3	-4.73000	2.65184	.100	-10.5079	1.0479
		4	.46000	2.65184	.865	-5.3179	6.2379
		5	3.28667	2.65184	.239	-2.4912	9.0645
		6	-2.19333	2.65184	.424	-7.9712	3.5845
	3	1	3.04667	2.65184	.273	-2.7312	8.8245
		2	4.73000	2.65184	.100	-1.0479	10.5079
		4	5.19000	2.65184	.074	-.5879	10.9679
		5	8.01667 [*]	2.65184	.011	2.2388	13.7945
		6	2.53667	2.65184	.358	-3.2412	8.3145
	4	1	-2.14333	2.65184	.435	-7.9212	3.6345
		2	-.46000	2.65184	.865	-6.2379	5.3179
		3	-5.19000	2.65184	.074	-10.9679	.5879
		5	2.82667	2.65184	.307	-2.9512	8.6045
		6	-2.65333	2.65184	.337	-8.4312	3.1245
	5	1	-4.97000	2.65184	.085	-10.7479	.8079
		2	-3.28667	2.65184	.239	-9.0645	2.4912
		3	-8.01667 [*]	2.65184	.011	-13.7945	-2.2388
		4	-2.82667	2.65184	.307	-8.6045	2.9512
		6	-5.48000	2.65184	.061	-11.2579	.2979
	6	1	.51000	2.65184	.851	-5.2679	6.2879
		2	2.19333	2.65184	.424	-3.5845	7.9712
		3	-2.53667	2.65184	.358	-8.3145	3.2412
		4	2.65333	2.65184	.337	-3.1245	8.4312
		5	5.48000	2.65184	.061	-.2979	11.2579

Zeta	1	2	-.03667	.03737	.346	-.1181	.0447
		3	-.01333	.03737	.727	-.0947	.0681
		4	-.04333	.03737	.269	-.1247	.0381
		5	-.06000	.03737	.134	-.1414	.0214
		6	-.01333	.03737	.727	-.0947	.0681
	2	1	.03667	.03737	.346	-.0447	.1181
		3	.02333	.03737	.544	-.0581	.1047
		4	-.00667	.03737	.861	-.0881	.0747
		5	-.02333	.03737	.544	-.1047	.0581
		6	.02333	.03737	.544	-.0581	.1047
	3	1	.01333	.03737	.727	-.0681	.0947
		2	-.02333	.03737	.544	-.1047	.0581
		4	-.03000	.03737	.438	-.1114	.0514
		5	-.04667	.03737	.236	-.1281	.0347
		6	.00000	.03737	1.000	-.0814	.0814
	4	1	.04333	.03737	.269	-.0381	.1247
		2	.00667	.03737	.861	-.0747	.0881
		3	.03000	.03737	.438	-.0514	.1114
		5	-.01667	.03737	.664	-.0981	.0647
		6	.03000	.03737	.438	-.0514	.1114
	5	1	.06000	.03737	.134	-.0214	.1414
		2	.02333	.03737	.544	-.0581	.1047
		3	.04667	.03737	.236	-.0347	.1281
		4	.01667	.03737	.664	-.0647	.0981
		6	.04667	.03737	.236	-.0347	.1281
	6	1	.01333	.03737	.727	-.0681	.0947
		2	-.02333	.03737	.544	-.1047	.0581
		3	.00000	.03737	1.000	-.0814	.0814
		4	-.03000	.03737	.438	-.1114	.0514
		5	-.04667	.03737	.236	-.1281	.0347

PDI	1	2	-.019667	.013976	.185	-.05012	.01078
		3	.003333	.013976	.816	-.02712	.03378
		4	-.008667	.013976	.547	-.03912	.02178
		5	-.009000	.013976	.532	-.03945	.02145
		6	.004000	.013976	.780	-.02645	.03445
	2	1	.019667	.013976	.185	-.01078	.05012
		3	.023000	.013976	.126	-.00745	.05345
		4	.011000	.013976	.447	-.01945	.04145
		5	.010667	.013976	.460	-.01978	.04112
		6	.023667	.013976	.116	-.00678	.05412
	3	1	-.003333	.013976	.816	-.03378	.02712
		2	-.023000	.013976	.126	-.05345	.00745
		4	-.012000	.013976	.407	-.04245	.01845
		5	-.012333	.013976	.395	-.04278	.01812
		6	.000667	.013976	.963	-.02978	.03112
	4	1	.008667	.013976	.547	-.02178	.03912
		2	-.011000	.013976	.447	-.04145	.01945
		3	.012000	.013976	.407	-.01845	.04245
		5	-.000333	.013976	.981	-.03078	.03012
		6	.012667	.013976	.383	-.01778	.04312
	5	1	.009000	.013976	.532	-.02145	.03945
		2	-.010667	.013976	.460	-.04112	.01978
		3	.012333	.013976	.395	-.01812	.04278
		4	.000333	.013976	.981	-.03012	.03078
		6	.013000	.013976	.371	-.01745	.04345
	6	1	-.004000	.013976	.780	-.03445	.02645
		2	-.023667	.013976	.116	-.05412	.00678
		3	-.000667	.013976	.963	-.03112	.02978
		4	-.012667	.013976	.383	-.04312	.01778
		5	-.013000	.013976	.371	-.04345	.01745

* = The mean difference is significant at the 0.05 level.

Zave = Particle size

Zeta = Zeta potential

PDI = Polydispersity index

1 = Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+Resveratrol 25 mg/ml+cineole 1%

2 = Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+Resveratrol 25 mg/ml+citral 1%

3 = Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+Resveratrol 25 mg/ml+d-limonene 1%

4 = Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+cineole 1%

5 = Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+citral 1%

6 = Polymeric micelle P184 25%+Ethanol 5%+d-limonene 1%

การตรวจสอบการคัดลอกของจุลินพันธ์โดยใช้โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์

Plagiarism Checking Report

Created on Nov 20, 2019 at 10:06 AM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
1445021	Nov 20, 2019 at 10:06 AM	58210134@go.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	Development of polymeric micelles with ethanol and terpenes for dermal delivery improvement of resveratrol.pdf	Completed	0.00 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
No data available in table				

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2562..... มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ.....การพัฒนาพอลิเมอร์รีกไมเซลล์ที่มีเอทานอลและเทอร์พีนส์เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่าน.....

.....

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ภาศ.ดร.ฉริพิทย์ สุนงกษ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่..... 01/01/2562ถึง..... 08/11/2562

ระยะเวลาดำเนินการ.....11.....เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี).....01/01/2562

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9,000 บาท เมื่อวันที่ 24/09/2562

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
ค่าวัสดุ	8,000	8,000	0
ค่าใช้สอย	1,000	1,000	0
รวม	9,000	9,000	0

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัย