



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาตำรับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม
เพื่อใช้ในการต้านเชื้อจุลชีพบริเวณผิวหนัง

Development of ethosome loaded with *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Rhizome
extract for topical antimicrobial application

โดย

- | | |
|-------------------------------|---------------------|
| 1. นสภ.กฤษกร นันทโสภา | รหัสบัณฑิต 60210101 |
| 2. นสภ.ชญญา ไทยอุทิศ | รหัสบัณฑิต 60210109 |
| 3. นสภ.สุวิมล จรัสศรีโชติช่วง | รหัสบัณฑิต 60210166 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาตำรับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม
เพื่อใช้ในการต้านเชื้อจุลชีพบริเวณผิวหนัง

Development of ethosome loaded with *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Rhizome
extract for topical antimicrobial application

โดย

- | | |
|-------------------------------|--------------------|
| 1. นสภ.กฤษกร นันทโสภา | รหัสสถิติ 60210101 |
| 2. นสภ.ชญญา ไทยอุทิศ | รหัสสถิติ 60210109 |
| 3. นสภ.สุวิณี จรัสศรีโชติช่วง | รหัสสถิติ 60210166 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

โรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อรา สามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการใช้ยาต้านเชื้อรา แต่ในปัจจุบันพบว่าปัญหาการดื้อยาของเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงมีการศึกษามากมายค้นคว้าวิธีรักษาโรคผิวหนังนี้ แต่อย่างไรก็ตามยังคงเน้นการใช้ตัวยารักษาเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราเพื่อทดแทนการใช้ยา ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถช่วยแก้ปัญหานี้ได้ สารสกัดหนึ่งที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้แก่ สารสกัดจากเหง้ากระทือ สารสกัดชนิดนี้มีสารสำคัญที่ชื่อ Zerumbone สารสำคัญนี้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ ทางกลุ่มวิจัยจึงสนใจการพัฒนาตำรับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ ซึ่งตำรับเอทโทโซมเป็นระบบการนำส่งสารทางผิวหนังที่มีขนาดเล็ก และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บและการนำส่งผ่านผิวหนัง ให้มีความปลอดภัย อีกทั้งตำรับเอทโทโซมเป็นตำรับที่ผลิตง่าย ไม่ใช้เทคนิคที่ซับซ้อน จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยมีจุดมุ่งหมายนำสมุนไพรภายในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยพัฒนาเภสัชภัณฑ์ทางเลือกที่มีสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติในการรักษาการติดเชื้อจุลชีพที่ผิวหนัง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอทโทโซม ศึกษาการกักเก็บสารสกัดจากเหง้ากระทือของเอทโทโซม และศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อราของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ

คณะผู้วิจัย

- | | | |
|---------------|-----------------|---------------------|
| 1. นสภ.กฤษอร | นันทโสภา | รหัสสนิสิต 60210101 |
| 2. นสภ.ชญญา | ไทยอุทิศ | รหัสสนิสิต 60210109 |
| 3. นสภ.สุปวิณ | จรัสศรีโชติช่วง | รหัสสนิสิต 60210166 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การพัฒนาตำรับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือเพื่อใช้ในการต้านเชื้อจุลชีพบริเวณผิวหนัง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.กฤษกร นันทโสภา รหัสนิสิต 60210101
2. นสภ.ชญญา ไทยอุทิศ รหัสนิสิต 60210109
3. นสภ.สุปวีณ์ จรัสศรีโชติช่วง รหัสนิสิต 60210166

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญญ.ผศ.ดร. ธนิกานต์ แสงน้อม (ที่ปรึกษาหลัก)
2. ภก.รศ.ดร. กัมปนาท หวลบุตรตา (ที่ปรึกษาร่วม)
3. อ.ดร.กุลธิดา เหลืองประดิษฐ์กุล (ที่ปรึกษาร่วม)

บทคัดย่อ

ปัจจุบันโรคติดเชื้อราที่ผิวหนังยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขที่มีผู้ติดเชื้อเป็นจำนวนมาก แม้จะมียาที่สามารถรักษาโรคติดเชื้อราที่ผิวหนังได้แต่อุบัติการณ์การดื้อยาเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และการเข้าถึงยารักษายังจำกัดในบางพื้นที่ การใช้สมุนไพรรักษาโรคผิวหนังเชื้อราที่ผิวหนังจึงเป็นหนึ่งทางเลือกในการรักษา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรตำรับเอทโทโซม (ethosome) ที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือเพื่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสกัดในยับยั้งการเจริญของเชื้อราในผิวหนังชั้นที่ลึกขึ้นที่ยากต่อการรักษา จากการทดลองเอทโทโซมสามารถเตรียมได้ด้วยวิธีเย็น (cold method) ตำรับที่ดีที่สุดประกอบด้วย Phosphatidylcholine ร้อยละ 30 น้ำหนักต่อปริมาตร และเอทานอลร้อยละ 40 น้ำหนักต่อน้ำหนัก จากภาพกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านพบว่าเอทโทโซมที่ได้มีลักษณะเป็นถุงทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 205.6 ถึง 368.5 นาโนเมตร สามารถกักเก็บสารสกัดกระทือได้ร้อยละ 31.58 และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* ได้ที่ความเข้มข้นสารสกัด 312.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการบรรจุสารสกัดเหง้ากระทือให้ในรูปเอทโทโซมและนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาและแทรกผ่านผิวหนังต่อไป

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Senior project academic year 2022

: Development of ethosome loaded with *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Rhizome extract for topical antimicrobial application

- | | |
|------------------------------------|-------------|
| 1. Miss Kritchaon Nantasopa | ID 60210101 |
| 2. Miss Chanya Thaiutid | ID 60210109 |
| 3. Miss Supawee Jarassrichodchoung | ID 60210166 |

Advisor

1. Assistant Professor Tanikan Sangnim, Ph.D
 2. Associate Professor Kampanart Huanbutta, Ph.D
 3. Kunlathida Luangpraditkun, Ph.D
-

ABSTRACT

Currently, skin fungal infection disease still be a serious public health problem due to high number of the infected patients. Even there is medicines available for this disease, but the drug resistant problem tends to be increased. Moreover, the access of medicine is restricted in some area. Therefore, use of herbal medicine is one of the therapeutic options. The aim of this study is to develop ethosome formulation loaded with *Zingiber Zerumbet* (L.) Smith. rhizome extract for enhancing of the extract antifungal activity in deep skin layer which is difficult to cure. Form the experiment, ethosome were successfully prepared by the cold method. The optimized formulation was composed of 30% (w/v) phosphatidylcholine and 40% (w/w) ethanol. The transmission electron microscope (TEM) images revealed that the ethosomes were in vesicle shape with diameter of 205.6 to 368.5 nm. The extracts entrapment of the system was 31.58% and they could inhibit growth of *C. albicans* at concentration of 312.5 $\mu\text{g/mL}$. These results demonstrate possibility of *Zingiber Zerumbet* (L.) Smith. rhizome extract loading in ethosome and carry to the next step of the therapeutic efficacy and the extract skin transmission tests.

Advisor

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 เลขที่สัญญา 2/2564 เพื่อสนับสนุนการทำวิจัยแก่บุคลากรของมหาวิทยาลัยบูรพา คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากเภสัชกรหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนิกานต์ แสงนิ่ม เภสัชกร รองศาสตราจารย์ ดร. กัมปนาท หวลบุตตา เภสัชกรหญิง ดร.นปภัช รัตนะชิตวัช เภสัชกรหญิง ดร.สุกฤษฎิ์ ทับทิมศรี และอาจารย์ ดร.กุลธิดา เหลืองประดิษฐ์กุล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยคอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ จึงกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งห้าท่านเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นางสาววิภาดา ศิริตันหยง ที่คอยสนับสนุนให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

- | | | |
|---------------|-----------------|--------------------|
| 1. นสภ.กฤษฎอร | นันทโสภา | รหัสนิสิต 60210101 |
| 2. นสภ.ชญญา | ไทยอุทิศ | รหัสนิสิต 60210109 |
| 3. นสภ.สุปวิณ | จรัสศรีโชติช่วง | รหัสนิสิต 60210166 |

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
สมมติฐานของโครงการวิจัย	3
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	36
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	59
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก	67

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การใช้ยารักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง	10
2. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Soya lecithin	29
3. การหาปริมาณของตัวทำละลายที่เหมาะสม	30
4. ปริมาณของสารสกัดจากเหง้ากระทือที่บรรจุลงในตำรับเอทโทโซม	31
5. แสดงความเข้มข้นของเอทโทโซมบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่ถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ	33
6. แสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือเมื่อเปลี่ยนน้ำหนักของฟอสโฟลิปิด	37
7. แสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่เอทานอลปริมาณต่าง ๆ	40
8. แสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือเมื่อทำการ sonicate ณ เวลาต่าง ๆ	42
9. แสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ	46
10. ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระทือ	51
11. แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (% Entrapment efficiency)	54
12. ผลการทดสอบการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดกระทือที่สามารถยับยั้งเชื้อรา <i>C. albicans</i>	57
13. การคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดกระทือที่บรรจุเอทโทโซม	58
14. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Agar well diffusion method แต่ละความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือที่สามารถยับยั้งเชื้อรา <i>C. albicans</i> (n=3)	58

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1. ตันกระทือ	6
2. เหง้ากระทือ	6
3. รอยโรคเกลื้อน	9
4. รอยโรคกลาก	9
5. โครงสร้างของผิวหนัง	14
6. เส้นทางการดูดซึมทางผิวหนัง	15
7. ระบบนำส่ง Liposomes, Ethosomes, Transfersomes และ Neosomes	20
8. ขั้นตอนเตรียมเอทโทโซมด้วยวิธี Classical cold method	21
9. ขั้นตอนเตรียมเอทโทโซมด้วยวิธี Thin-film hydration	22
10. ขั้นตอนเตรียมเอทโทโซมด้วยเทคนิค Transmembrane pH-gradient method	24
11. สารสกัดจากเหง้ากระทือ	36
12. แผนภูมิแท่งแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเปลี่ยนน้ำหนักของฟอสโฟลิปิด	38
13. แผนภูมิแท่งแสดงค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเปลี่ยนน้ำหนักของฟอสโฟลิปิด	39
14. แผนภูมิแท่งแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่เอทานอลปริมาณต่าง ๆ	41
15. แผนภูมิแท่งแสดงค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่เอทานอลปริมาณต่าง ๆ	41
16. แผนภูมิแท่งแสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือเมื่อทำการ sonicate ณ เวลาต่าง ๆ	43
17. แผนภูมิแท่งแสดงค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อทำการ sonicate ณ เวลาต่าง ๆ	43
18. กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือเมื่อเตรียมด้วยฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที	44

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
19. กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจาก เหง้ากระเทียม เมื่อเตรียมด้วยฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที	45
20. ดำรับเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที	45
21. ดำรับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 0.125, 0.3125, 0.625, 1.25 และ 1.875 มก./มล. ตามลำดับ	47
22. ดำรับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 3.125 และ 6.25 มก./มล. ตามลำดับ	47
23. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone	47
24. กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	48
25. โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 1 มก./มล.	49
26. โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.	49
27. โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 0.25 มก./มล.	50
28. โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 มก./มล.	50
29. โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625 มก./มล.	51
30. โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม ที่ความเข้มข้น 3.125 มก./มล.	53
31. โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม ที่ความเข้มข้น 6.25 มก./มล.	53
32. Morphology ของเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัด โดยส่องผ่านกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 55000x, 89000x, 175000x	55
33. Morphology ของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 0.125 มก./มล. โดยส่องผ่านกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 10000x, 55000x, 89000x	55

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อจุลชีพ เช่น เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย เนื่องจากเป็นโรคที่พบได้มากในเขตอากาศร้อนชื้น และสามารถพบได้ง่ายในชีวิตประจำวัน จากการเก็บข้อมูลการเกิดโรคผิวหนังในโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในประเทศไทย ระหว่างปีพุทธศักราช 2558 ถึง 2562 พบว่า ความถี่ในการเข้ารับรักษาโรคผิวหนังมาจากการติดเชื้อจุลชีพบริเวณผิวหนังมากที่สุด (1) นอกจากนี้ยังพบอุบัติการณ์ที่แสดงถึงการติดเชื้อจุลชีพบริเวณผิวหนังในประเทศอื่น ๆ โดยเชื้อจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังมากที่สุด ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย (2) การติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง มักเกิดจากการเสียสมดุลของระบบผิวหนังหรือผิวหนังเกิดการเสียสภาพ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรค ได้แก่ *S. Epidermidis* และ *S. Aureus* โดยการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังมักก่อให้เกิดแผลพุพอง (Impetigo) ฝี (Furuncles) ตุ่มหนอง (Ecthyma) รูขุมขนอักเสบ (Folliculitis) และเนื้อเยื่ออักเสบ (Cellulitis) (3) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีการติดเชื้อรา ซึ่งเป็นจุลชีพก่อโรคที่ผิวหนังรองจากเชื้อแบคทีเรีย โดยการติดเชื้อราบริเวณผิวหนังแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ การติดเชื้อราบริเวณผิวหนังชนิดตื้น (Superficial fungal infection) เป็นการติดเชื้อราในชั้น Stratum corneum ของหนังกำพร้า ก่อให้เกิดโรคเกลื้อน (Tinea versicolor) ซึ่งเกิดจากเชื้อรากลุ่มยีสต์ *Malassezia spp.* และประเภทที่สองคือการติดเชื้อราบริเวณชั้นผิวหนัง (Cutaneous fungal infection) ซึ่งเป็นการติดเชื้อที่ชั้นเคราตินของหนังกำพร้ารวมถึงการติดเชื้อที่เล็บ และผม ได้แก่ โรคกลากที่ผิวหนัง (Dermatophytosis) และ โรคกลากที่เล็บ (Onychomycosis) โดยเกิดจากเชื้อรากลุ่ม Dermatophytes 3 ชนิด ชนิดแรกคือ *Trichophyton spp.* ชนิดที่ 2 คือ *Microsporum spp.* และชนิดที่ 3 คือ *Epidermophyton spp.* นอกจากนี้ยังมีโรคติดเชื้อแคนดิดา (candidiasis) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *C. albicans* (4) โดยเชื้อรบางชนิดสามารถบุกรุกเข้าไปเจริญอยู่ในร่างกายของคนได้ อาจเป็นการเจริญเฉพาะบริเวณผิวหนัง หรือเข้าสู่อวัยวะภายใน ซึ่งการติดเชื้อราในลักษณะดังกล่าว เรียกว่า Mycoses หรือ Mycosis ทั้งนี้ยังสามารถแบ่งความรุนแรงของการเกิดโรคติดเชื้อราตามความลึกของการเจริญในร่างกายคนออกได้เป็น 4 ชนิด คือ Superficial mycoses, Cutaneous mycoses, Subcutaneous mycoses และ Systemic (deep) mycoses (11)

โรคติดเชื้อจุลชีพที่ผิวหนังสามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการใชยาต้านจุลชีพ ซึ่งปัจจุบันยา

ด้านเชื้อราหรือยาต้านเชื้อแบคทีเรียมีการนำเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ยาและตัวยาสำคัญสำหรับการผลิตจากต่างประเทศ โดยตัวยาที่เป็นสารเคมีอาจก่อให้เกิดพิษ และผลข้างเคียงแก่ร่างกายได้ นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่สนับสนุนการดื้อยาของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย หากใช้อย่างไม่ถูกต้องเหมาะสม และอาจทำให้เชื้อสามารถหลบหลีกยาเคมีลงไปในชั้นผิวหนังที่ลึกกว่าเดิมได้ ทำให้ยากต่อการรักษา ซึ่งในปัจจุบันการรักษาตามวิธีพื้นบ้านดั้งเดิมของไทยโดยใช้สมุนไพร เช่น ขมิ้นชัน ไพลดำ กระชาย ข่า เปลือกทับทิม ใบฝรั่ง ใบพลู และเปลือกมังคุด สามารถรักษาอาการของโรคผิวหนังได้ สมุนไพรที่มีหลักฐานในการใช้รักษาอาการของโรคผิวหนังมากที่สุด ได้แก่ พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) โดยกระเทียมถือเป็นพืชวงศ์ขิงชนิดหนึ่งที่พบได้มากในภาคตะวันออกของประเทศไทย และมีรายงานสรรพคุณด้านการต้านจุลชีพ จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากกระเทียม มาพัฒนาเป็นสารสำคัญในการต้านเชื้อจุลชีพในระบบนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังได้ เทคโนโลยีระบบนำส่งสารทางผิวหนัง (Transdermal delivery systems) เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่นิยมใช้ในปัจจุบันสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บและนำส่งผ่านผิวหนัง มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่ผิวหนังในชั้นลึกขึ้น ปัจจุบัน Liposome, Niosome, Transfersome และ Ethosome ซึ่งเป็นระบบนำส่งยาที่เป็นลักษณะของถุง ได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยาผ่านชั้น Stratum corneum ของผิวหนัง โดยรูปแบบเอทโทโซม เป็นเทคโนโลยีการส่งสารทางผิวหนังที่มีขนาดเล็ก สามารถแทรกผ่านผิวหนังลงไปในชั้นที่ลึกได้ ใช้นำส่งสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น peptides และ proteins มีความปลอดภัย และผลิตได้ง่ายไม่ใช้เทคนิคที่ซับซ้อน ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาตำรับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมเพื่อพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์ทางเลือกมีสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติในการรักษาการติดเชื้อจุลชีพที่ผิวหนัง ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการใช้และเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรของภาคตะวันออก เพื่อนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาสูตรตำรับเอทโทโซมบรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ
2. ศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อจุลชีพของเอทโทโซมบรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ
3. เพื่อประเมินสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอทโทโซมบรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ

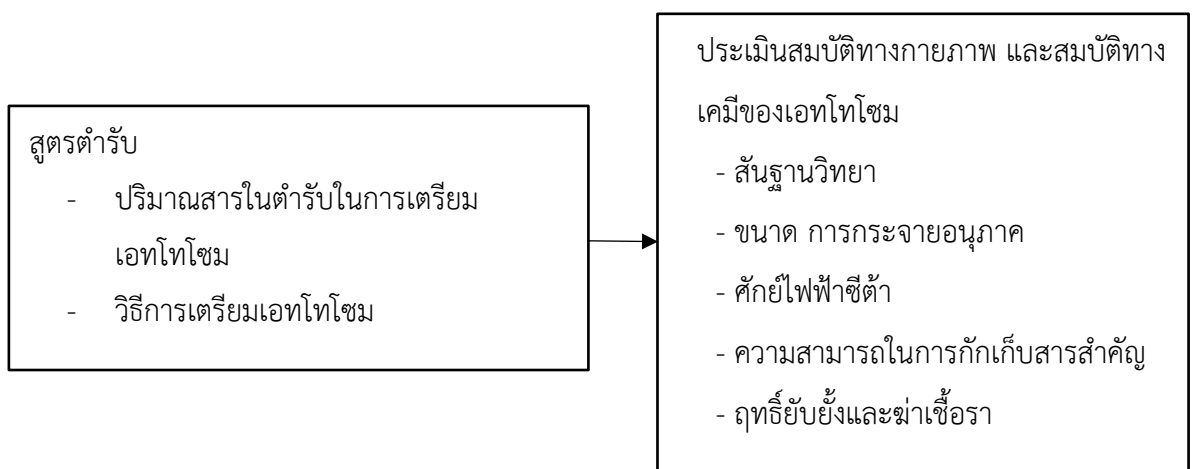
สมมติฐาน

เอทโทโซมบรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพที่อยู่บริเวณผิวหนังได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเตรียม, สมบัติทางเคมี และสมบัติทางกายภาพของเอทโทโซมบรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ
2. สนับสนุนการใช้สมุนไพรภายในประเทศให้สามารถขายผลผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเภสัชภัณฑ์ทางการแพทย์
3. เพิ่มเภสัชภัณฑ์ทางเลือกที่มีสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติให้ผู้บริโภค

กรอบแนวคิด



นิยามศัพท์

1. เอทโทโซม คือ liposome ที่มีเอทานอลปริมาณมาก (20 – 45%) เป็นอนุภาคที่มีลักษณะอ่อนและยืดหยุ่น เป็นระบบนำส่งสารหรือยาผ่านผิวหนังที่สามารถแทรกผ่านผิวหนังลงไปในระดับที่ลึกได้ และอาจนำส่งถึงระบบไหลเวียนโลหิตเพื่อให้ฤทธิ์ทั่วร่างกาย
2. Transdermal delivery systems คือ เทคโนโลยีระบบนำส่งสารทางผิวหนัง
3. Skin penetration คือ การแพร่ของตัวยาสำคัญเข้าไปในผิวหนัง โดยมีนัยสำคัญว่าผิวหนังคืออวัยวะเป้าหมายในการออกฤทธิ์
4. *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. คือ กระเทียม วงศ์ Zingiberaceae
5. Zerumbone คือ สารสกัดที่ได้จากกระเทียม มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ในภาคตะวันออกถือเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีพืชพันธุ์หลากหลายชนิด มีเอกลักษณ์เฉพาะท้องถิ่น เช่น พืชล้มลุกสกุลเร็ว ได้แก่ เร่ว กระวาน กระตือ ซึ่งมีสรรพคุณทางยา ได้แก่ ขับเสมหะ แก้พิษผื่นคันตามร่างกาย ลดไขมันในเลือด เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าการนำพืชท้องถิ่นสกุลนี้มาสกัดเพื่อนำสารสำคัญไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ อาทิ การศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของชีรัมบอนจากกระตือและฤทธิ์ทางชีวภาพ (5) การศึกษาการพัฒนาพืชสมุนไพรท้องถิ่นในจังหวัดจันทบุรี เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในพืช (6) เป็นต้น

2.1 สมุนไพรที่ใช้ศึกษา

2.1.1 กระตือ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.

วงศ์ Zingiberaceae

ชื่อสามัญ Shampoo ginger, Wild ginger

ชื่ออื่น ๆ เหี่ยวแดง กระตือป่า กะแวน แสมดำ เหี่ยวดำ และแหวดำ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้นกระตือ มีถิ่นกำเนิดในอินเดีย ต่อมาภายหลังได้แพร่กระจายมายังทวีปเอเชีย รวมถึงประเทศไทย จัดเป็นไม้ล้มลุก มีลำต้นอยู่เหนือดินสูงราว 0.9 - 1.5 เมตร ดังแสดงตามรูปที่ 1 มีเหง้าอยู่ใต้ดินเรียกว่า "เหง้ากระตือ" หรือ "หัวกระตือ" ดังแสดงตามรูปที่ 2 เปลือกนอกของเหง้ามีสีน้ำตาลแกมเหลือง ส่วนเนื้อในมีสีเหลืองอ่อน กลิ่นหอม มีรสขม และเผ็ดเล็กน้อย ต้นจะโผล่ในหน้าแล้ง แล้วจะงอกขึ้นใหม่ในหน้าฝน กระตือใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับในระนาบเดียวกัน ใบสีเขียวเข้มลักษณะของใบคล้ายรูปหอก แกมขอบขนาน ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ขอบและแผ่นใบเรียบ ด้านล่างของใบมักมีขนนุ่ม ใบกว้าง ประมาณ 5 - 7.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 20 เซนติเมตร ที่ก้านใบเป็นกาบหุ้มลำต้น กระตือออกดอกเป็นช่อแทงออกมาจากเหง้าขึ้นมา ช่อดอกเป็นรูป ทรงกระบอก มีกลีบดอกสีขาวนวลออกเหลือง มีใบประดับขนาดใหญ่สีเขียว แกมแดง เรียงซ้อนกันหนาแน่นและเป็นระเบียบ โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ผลมีลักษณะเป็นเมล็ดสีดำ ค่อนข้างกลม แห้งแตกติดอยู่ในใบประดับ และมีเนื้อสีขาวบางหุ้มเมล็ดอยู่ (7)

กระเทียมมีสรรพคุณในการช่วยบรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ขับลม แก้อาการเสียด ขี้ บวม ช่วยย่อยอาหาร แก้ปวดมวนในท้อง แก้บิด บำรุงธาตุ ขับปัสสาวะ ในส่วนของเหง้าแก่ มีน้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบของ methylgingerol, zingerone และ citral (7)



รูปที่ 1 ต้นกระเทียม (Reference: www.phargarden.com)



รูปที่ 2 เหง้ากระเทียมสด (Reference: www.thaicrudedrug.com)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 การพัฒนาพืชสมุนไพรท้องถิ่นในจังหวัดจันทบุรี เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในพืช

จากการศึกษาการพัฒนาพืชสมุนไพรท้องถิ่นในจังหวัดจันทบุรี เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในพืช ได้ผลการศึกษาว่า การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจาก ใบชะมวง เหง้าเร่ง เหง้ากระวาน ต้นกระทือ และหัวกลอย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia sp.* ได้ดีมากเฉลี่ยร้อยละ 90.74, 82.67, 94.44, 99.00 และ 94.44 ตามลำดับ (6)

2.2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าพืชวงศ์ขิง

การศึกษากฎฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าพืชวงศ์ขิง ให้ผลการศึกษาว่ากระทือสามารถยับยั้งเชื้อ *T. mentagrophytes* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50 มก./มล. (8)

2.3 การดื้อยาของเชื้อรา

เชื้อราบางชนิดมีความทนทานต่อการรักษาด้วยยาต้านเชื้อราบางประเภท เช่น fluconazole ไม่สามารถรักษาการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus* ได้ และการดื้อยาของเชื้อ *Aspergillus* นั้นยังสามารถพัฒนาต่อไปได้อีก โดยการดื้อยาสามารถเกิดขึ้นเมื่อใช้ยาต้านเชื้อราอย่างไม่เหมาะสมในการรักษา เช่น การใช้ยาที่มีปริมาณยาต่ำเกินไป ใช้ยารักษาไม่นานเพียงพอ หรือแม้แต่มิการใช้ยาต้านเชื้อราอย่างเหมาะสมแล้ว ก็สามารถทำให้เชื้อดื้อยาได้เช่นกัน นอกจากนี้การใช้สารฆ่าเชื้อราในการเกษตรเพื่อรักษาโรคเชื้อราในพืช ยังสามารถนำไปสู่การดื้อยาในผู้ที่สัมผัสกับสารฆ่าเชื้อราเหล่านั้นได้อีกด้วย (9)

นอกจากนี้บางการศึกษาระบุว่ายาปฏิชีวนะ รวมถึงยาต้านเชื้อรา มีส่วนทำให้เกิดการดื้อต่อเชื้อ *Candida* การดื้อยานี้ อาจเกิดขึ้นได้ในหลายวิธี เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะที่มีผลทำลายเชื้อโรคที่ดีและไม่ดีในลำไส้ ซึ่งส่งผลให้เชื้อ *Candida* สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (9)

ในปัจจุบันพบว่าเชื้อราที่ดื้อยาด้านเชื้อรา ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus*, *Candida* บางชนิด และ *Candida auris* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่พบว่าการดื้อยาด้านเชื้อรา เป็นเชื้อที่สามารถแพร่กระจายในสถานพยาบาลได้ ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดนี้ พบการต่อต้านการรักษาจากยารักษาเชื้อรา เช่น ฟลูโคนาโซล และเชื้อราได้พัฒนาตัวเองขึ้นเพื่อเอาชนะยารักษาโรคด้วย นอกจากนี้ ยังพบติเอ็นเอต่อต้านยารักษาเชื้อราใน *Candida auris* ยังมีความคล้ายคลึงกับที่พบในเชื้อยาดื้อยากลุ่มเดียวกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อราดื้อยาได้พัฒนาสายพันธุ์ขึ้นมาอีกชนิดหนึ่ง และจะวิวัฒนาการการดื้อยาด้านเชื้อราต่อไปได้ในอนาคต วิธีเฝ้าระวังที่ดีที่สุดคือการใช้ยาต้านเชื้อราอย่างถูกต้องและเหมาะสม (9)

2.4 โรคเชื้อราที่ผิวหนัง

โรคผิวหนังจากการติดเชื้อราเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยที่สุด ประมาณร้อยละ 20 – 25 และมักจะเกิดชุกชุมมากในเขตร้อนชื้น และมักเกิดในบริเวณที่อับชื้น ทั้งยังพบว่าถ้าอุณหภูมิและความชื้นเพิ่มขึ้น เชื้อราจะมีโอกาสเกิดและเจริญเติบโตที่ผิวหนังได้มากขึ้นเช่นกัน

โรคผิวหนังจากเชื้อราที่พบได้บ่อย ได้แก่

เกลื้อน (*Tinea versicolor* / *Pityriasis versicolor*) มีสาเหตุจากเชื้อกลุ่ม *Malassezia spp.* ระยะเริ่มแรกของโรค จะเป็นจุดเล็ก ๆ มีขุยบาง ๆ กระจายกระจายไปทั่ว หรือเป็นที่บริเวณรูขุมขน ต่อมาจุดจะค่อย ๆ ขยายขึ้นเป็นผื่นราบ วงสี จางกว่าผิวหนังปกติ เกิดเป็นรอยต่าง มีขอบเขตชัดเจนแน่นอน และเป็นมากในบริเวณที่มีต่อมไขมันหนาแน่น เช่น ลำตัว ต้นแขน ต้นขา เป็นต้น แสดงรอยโรคดังรูปที่ 3

กลาก (Ring worm หรือ *Dermatophytosis*) เกิดจากการติดเชื้อรากลุ่ม *Dermatophyte* ได้แก่ *Microsporum spp.*, *Trichophyton spp.*, และ *Epidermophyton spp.* เชื้อราทั้งสามชนิดจะติดเชื้อบริเวณผิวหนัง เส้นผม และเล็บ เจริญเติบโตในผิวหนังชั้น *Stratum corneum* โดยเชื้อราจะกินเคราตินที่ผิวหนังเป็นอาหาร มีอาการคันมาก รอยโรคมักจะเป็นวงนูนแดง มีขอบชัดเจน วงขอบจะประกอบด้วยจุดแดง หรือตุ่มแดงเล็ก บางครั้งตุ่มนี้จะมีน้ำอยู่ข้างใน ตรงกลางของวงไม่แดงเท่าขอบ อาจแบนและเป็นขุย ลักษณะผิวหนังตรงกลางมักเหี่ยวย่น ถ้าเป็นนาน ๆ จะแห้งเป็นสะเก็ด และมักเป็นข้างใดข้างหนึ่งของร่างกาย (*Asymmetry*) ซึ่งสามารถแสดงรอยโรคได้ดังรูปที่ 4

การติดเชื้อแคนดิดา (*Candidiasis*) เชื้อราที่เป็นสาเหตุ ได้แก่ *Candida albicans* ซึ่งเป็น *normal flora* ที่เยื่อช่องปาก ทางเดินอาหาร และช่องคลอด มักเกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง และเล็บ เป็นเดียวกันกับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคตกขาวในผู้หญิง รอยโรคที่ผิวหนังของการติดเชื้อแคนดิดา มักพบตามซอก มีอาการคันหรือแสบมาก ๆ มีลักษณะเป็นปื้นหรือตุ่มแดงจัด เยิ้มแฉะ บางครั้งผิวลอกขาวเป็นแผ่นออกมา อาจพบการกระจายของตุ่มน้ำได้ (4, 10, 11)



รูปที่ 3 รอยโรคเกลื้อน (Reference: <https://ihealzy.com/tinea-versicolor-0447/>)



รูปที่ 4 รอยโรคกลาก (Reference: <https://ihealzy.com/ringworm-0087/>)

2.5 การรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง

ยาที่ใช้รักษาโรคเชื้อราแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ ดังนี้ กลุ่มที่หนึ่ง คือยาใช้เฉพาะที่ หรือยาใช้ภายนอก ประกอบด้วย ยาสระผม หรือแชมพู ได้แก่ 2.5% ของ Selenium Sulfide, 1 - 2% ของ Zinc pyrithione หรือ 2% ของ Ketoconazole shampoo ยาทา ได้แก่ 20 - 25% ของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (sodium thiosulfate) ชนิดเตรียม หรือ 40 - 50% ของ Propylene glycol, clotrimazole, econazole, miconazole หรือ bifonazole เป็นต้น กลุ่มที่สอง คือยารับประทาน เหมาะสำหรับในรายที่เป็นบริเวณกว้าง หรือ บริเวณที่ทายาได้ลำบาก เช่น แผ่นหลัง โดยมียาให้เลือก 3 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 (4)

ตารางที่ 1 แสดงการใช้ยารักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง

ยาใช้เฉพาะที่		ยารับประทาน
ยาสระผม	ยาทา	
2.5% Selenium sulfide	20 - 25% ของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Sodium thiosulfate)	Ketoconazole ชนิดเม็ด ขนาด 200 มก.
1 - 2% Zinc pyrithione	40 - 50% ของ Propylene glycol	Itraconazole ชนิดแคปซูล ขนาด 200 - 400 มก.
2% Ketoconazole shampoo	Clotrimazole	Fluconazole ชนิดแคปซูล ขนาด 400 มก.
	Econazole	
	miconazole	
	bifonazole	

นอกจากนี้ทางกรมการแพทย์แผนไทย ยังมีการแนะนำให้ใช้สมุนไพรมารักษาโรคนี้ได้ด้วย เช่น ข่า ขมิ้นชัน ทองพันชั่ง โดยการนำส่วนเหง้า มาทุบพอให้มันน้ำ แล้วนำมาทาบริเวณที่มีอาการ แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สมุนไพรในการรักษาเชื้อราได้ (12)

2.6 ระบบผิวหนัง

2.6.1 ผิวหนัง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีพื้นที่ใหญ่ที่สุด มีพื้นที่ประมาณร้อยละ 16 ของน้ำหนักตัว ปกคลุมอยู่ภายนอกร่างกาย มีความหนา 0.5 - 4.0 มม. ในสภาวะปกติผิวหนังมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน pH 4.0 - 5.6 มีหน้าที่หลัก 3 หน้าที่ ได้แก่ 1. ผิวหนังเป็นอวัยวะปกคลุมร่างกาย จึงมีหน้าที่หลักในการป้องกันหรือจำกัดการผ่านของสิ่งแวดล้อมภายนอกไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ สารเคมี สารพิษ ความร้อน ความเย็น แสง และรังสีต่าง ๆ เป็นต้น 2. การรักษาสมดุลของร่างกาย ได้แก่ ควบคุมอุณหภูมิและความดันภายในร่างกาย เมตาบอลิซึมของเสีย สังเคราะห์สารชีวเคมี แสดงลักษณะเฉพาะบุคคล สีผิว สีส้ม กลิ่นตัว และดึงดูดอารมณ์ทางเพศ 3. การรับรู้ความรู้สึก ผิวหนังทำหน้าที่ในการสัมผัสสัมผัสจากแรงกด แรงกระแทก ความรู้สึกร้อน-เย็นและความเจ็บปวด นอกจากนี้ผิวหนังยังแสดงออกถึงอารมณ์ เช่น หน้าแดง เหงื่อตก เป็นต้น

2.6.2 โครงสร้างผิวหนัง

ผิวหนังประกอบไปด้วยชั้นผิวหนังต่าง ๆ 3 ชั้น ได้แก่ ชั้น epidermis, dermis, subcutaneous และพบ appendages ตามชั้นผิวหนังดังแสดงในรูปที่ 5

1. Epidermis เป็นผิวหนังชั้นนอกสุด มีความหนาประมาณ 50 – 150 ไมครอน. ไม่มีหลอดเลือดมาเลี้ยง สารอาหารและของเสียต่าง ๆ อาศัยกระบวนการแพร่ข้ามระหว่างชั้น Dermis และ Epidermis ชั้น Epidermis ประกอบด้วยชั้น Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum และ Stratum basale โดยแต่ละชั้นพัฒนาขึ้นมาตามลำดับจากด้านล่างขึ้นมาสู่ผิวหนังด้านนอก และหลุดลอกออกเป็นขี้ไคลต่อไป ตั้งแต่ชั้น Stratum basale ขึ้นมาจนถึงชั้น Stratum lucidum เป็นเซลล์ผิวหนังที่ยังคงมีชีวิตอยู่ จึงเรียกรวมกันอีกชื่อหนึ่งว่า viable epidermis ซึ่งมีเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น Cytochrome P450, Esterases และ Serineproteases เป็นต้น จึงสามารถเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึม ยาที่เป็น prodrug สามารถเปลี่ยนเป็น active drug ได้ และอาจจะทำลายยา ทำให้ลดปริมาณของตัวยาที่สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ ส่วนชั้น Stratum corneum เป็นเซลล์ผิวหนังที่ตายแล้ว โดยทั่วไปเซลล์ผิวหนังจะใช้เวลาประมาณ 14 วัน ในการพัฒนาจากเซลล์ในชั้น Stratum basale ไปเป็นชั้น Stratum corneum และใช้เวลาต่ออีก 14 วันที่จะทำให้เซลล์ในชั้น Stratum corneum จะหลุดลอกออกไปเป็นขี้ไคล

1.1 Stratum basale เป็นชั้นผิวหนังที่อยู่ล่างสุดของชั้น Epidermis ชั้นนี้จะเป็นที่อยู่ของเซลล์ผิวหนังที่เกิดการแบ่งตัวใหม่โดยวิธีไมโทซิส (Mitosis) เรียกว่า Basal cells ทำหน้าที่แบ่งตัวขึ้นไปทดแทนเซลล์ผิวหนังที่ตายแล้วในชั้น Stratum

corneum ที่หลุดลอกออกเป็นขี้ไคล Basal cells เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างสมบูรณ์ มีลักษณะเป็นทรงกระบอก มีนิวเคลียสภายในเซลล์ นอกจากนี้ชั้นนี้ยังมีเซลล์เม็ดสี (Melanocytes) ทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานิน (Melanin) โดยที่ชนิด Eumelanin ซึ่งพบปริมาณมากกว่า จะสร้างเม็ดสีน้ำตาลหรือดำ และชนิด Pheomelanin ซึ่งพบน้อยกว่าจะสร้างเม็ดสีแดงหรือเหลือง นอกจากนี้ Basal cells แล้วในชั้นนี้ยังมี Langerhan cells ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ส่งสัญญาณจากแอนติเจนไปยังเม็ดเลือดขาว หรือการแพ้ผื่นสัมผัส และ Merkel cells ทำหน้าที่เป็นเซลล์ประสาทสัมผัส รับรู้ความรู้สึกสัมผัสต่าง ๆ พบมากที่บริเวณปลายนิ้ว และริมฝีปาก

1.2 Stratum spinosum เซลล์ในชั้นนี้เจริญขึ้นมาจาก Basal cells ในชั้น Stratum basale โดยมีลักษณะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เซลล์บางชั้น นิวเคลียสภายในเซลล์หดตัวลงเล็กน้อย มีรูปร่างหลายเหลี่ยม มีลักษณะคล้ายหนามยื่นไปสัมผัสกับเซลล์ข้างเคียง จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Prickle cells หรือ Prickly cell layer

1.3 Stratum granulosum หรือ Granular layer เซลล์ในชั้นนี้มีลักษณะที่แบน และบางลง เป็นเซลล์ที่พัฒนาขึ้นมาจากชั้น Stratum spinosum เริ่มมี keratohyalin granules สะสมอยู่ปริมาณมาก ทำหน้าที่สร้างโปรตีน และเชื่อมเส้นใยต่าง ๆ บริเวณผิวหนัง ให้กลายเป็นเส้นใยเคอราตินที่มีพันธะแข็งแรงต่อไป

1.4 Stratum lucidum เซลล์ในชั้นนี้มีลักษณะแบนมากยิ่งขึ้น เริ่มมองไม่เห็น นิวเคลียส และโปร่งใส

1.5 Stratum corneum ชั้นนี้เป็นชั้นนอกสุดของผิวหนัง เป็นเซลล์ที่พัฒนาขึ้นมาจากชั้น Stratum lucidum ซึ่งมีเคอราตินสะสมในเซลล์จำนวนมาก จึงเรียกว่า keratinized cells เซลล์มีลักษณะแบนมากเรียงกัน 15 - 20 ชั้น เรียงตัวกันแน่น มีไขมันแทรกอยู่ระหว่างชั้น คล้ายก้อนอิฐที่มีปูนอยู่รอบ ๆ ลักษณะนี้เรียกเฉพาะว่า Brick and mortar model ผิวหนังบริเวณที่บางที่สุดมีความหนาเพียง 10 – 20 ไมครอน ผิวหนังบริเวณที่หนาที่สุด ได้แก่ ฝ่ามือ และฝ่าเท้า มีความหนาประมาณ 100 ไมครอน เซลล์ผิวหนังในชั้นนี้เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว และไม่มีนิวเคลียส ซึ่งหลุดลอกออกไป ตลอดเวลากลายเป็นขี้ไคล ชั้น Stratum corneum ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 40 ไขมันร้อยละ 40 และน้ำร้อยละ 20 ไขมันที่พบ เช่น Ceramides, Free fatty acids, Triglycerides, Cholesterol และ Sterol เป็นต้น การสูญเสียน้ำจะทำให้เห็นเป็นผิวหนังแห้งหรือแตก เป็นขุย ชั้นไขมันใน Stratum

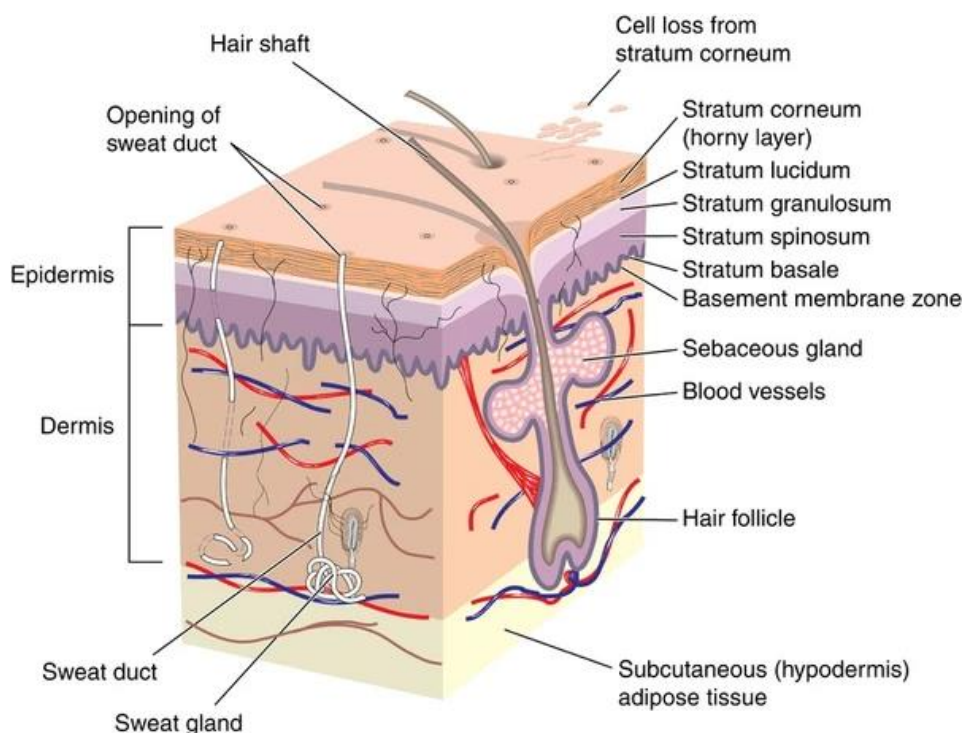
corneum จะหดตัว เปราะ และน้ำซึมผ่านยาก ในทางกลับกันเมื่อผิวหนังสัมผัสกับความชื้นชั้น Stratum corneum จะบวม และน้ำซึมผ่านได้ เนื่องจากเป็นชั้นนอกสุดของร่างกาย ผิวหนังชั้นนี้จึงทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดอัตราการซึมผ่านของสารต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกายทางผิวหนัง (Rate limiting barriers) นั่นคือ สารชนิดใดที่สามารถผ่านผิวหนังชั้นนี้เข้าไปได้ จะสามารถเข้าไปยังผิวหนังชั้นอื่น ๆ และเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดได้

2. Dermis (ชั้นหนังแท้) ผิวหนังชั้นนี้อยู่ถัดลงมาจากชั้น Epidermis มีความหนาประมาณ 3 - 5 มม. เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissues) ที่เป็นเส้นใยโปรตีน ได้แก่ Collagen (75%), Elastin (4%) และ Reticulin (0.4%) โดยที่ Collagen ทำหน้าที่พยุงหรือค้ำจุนอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกาย Elastin มีหน้าที่พยุงโครงสร้างผิวหนังเพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่ผิวหนัง ชั้น Dermis มีเลือดไหลเวียนมาเลี้ยงเซลล์ ให้สารอาหารและออกซิเจนแก่เซลล์ นำของเสียออกจากเซลล์ ควบคุมความดัน และอุณหภูมิของร่างกาย นอกจากนี้ยังมีเส้นประสาท ท่อน้ำเหลือง และมีบางส่วนของ appendages ได้แก่ ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ และขนแทรกอยู่ในชั้นนี้

3. Subcutaneous หรือ Hypodermis ชั้นนี้เป็นผิวหนังชั้นที่อยู่ถัดลงมาจากชั้น dermis มีส่วนประกอบหลักเป็นเนื้อเยื่อไขมัน และเป็นที่สะสมของไขมันในร่างกาย ทำหน้าที่หลักในการพยุงผิวหนังชั้น Epidermis และ dermis นอกจากนี้ไขมันในชั้นนี้ยังช่วยป้องกันแรงกระแทกหรือสั่นสะเทือนจากภายนอก และควบคุมอุณหภูมิภายในร่างกาย ภายในชั้นนี้มีเส้นเลือดสำหรับขนส่งสารอาหาร ออกซิเจน และขับของเสียออกจากผิวหนัง และมีเส้นประสาทมากมายสำหรับรับรู้สักรู้สึกต่อแรงกด (13)

ในส่วนของ appendages หรือ skin appendages หมายถึง อวัยวะที่กำเนิดมาจากผิวหนัง ได้แก่

- 1) ผมหรือขน และรูขุมขน (Hairs and hair follicles)
- 2) ต่อมไขมัน (Sebaceous glands)
- 3) ต่อมเหงื่อ (Sweat glands) มี 3 ชนิด คือ
 - 3.1 Eccrine sweat gland
 - 3.2 Apoeccrine sweat gland
 - 3.3 Apocrine sweat gland
- 4) เล็บ (Nails)



รูปที่ 5 โครงสร้างของผิวหนัง (Reference: Tortora GJ. and Grabowski SR. (1993) Principles of anatomy and physiology. Harpercollins College Publishers.)

2.7 การแพร่ผ่านของยาผ่านที่ผิวหนัง

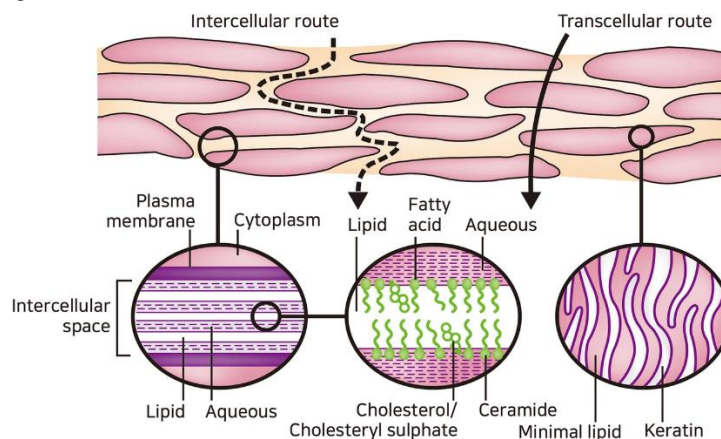
การแพร่ผ่านของยาผ่านเข้าไปยังชั้นผิวหนังอาศัยช่องทางการซึมผ่านหลายเส้นทาง ได้แก่

1. เส้นทางผ่านผิวหนัง (Transepidermal route) คือ เส้นทางผ่านเซลล์ผิวหนัง เป็นช่องทางหลักในการดูดซึมสารผ่านทางผิวหนัง
2. เส้นทางผ่านระยางค์ผิวหนัง (Appendageal route หรือ Shunt pathway) สำหรับเส้นทางผ่านผิวหนังนั้นสามารถแบ่งได้ 2 ช่องทาง ดังแสดงในรูปที่ 6 ประกอบด้วย

1.1 เส้นทางผ่านเซลล์โดยตรง (Transcellular route) คือการซึมผ่านของยาโดยตรงผ่านเซลล์ผิวหนังเส้นทางนี้เป็นเส้นทางหลักในการดูดซึมทางผิวหนัง โดยที่ตัวยาสสำคัญที่ชอบไขมัน จะแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรน ของเซลล์ผิวหนังที่เป็นไขมันได้ดี นอกจากนี้โปรตีนที่แทรกอยู่ในชั้นผิวหนังซึ่งทำให้เกิดรูเล็ก ๆ ที่ทำให้ยาที่ไม่ชอบไขมัน ยาที่มีประจุหรือยาที่มีขั้วสามารถซึมผ่านได้ โดยช่องทางรูนี้สามารถขยายใหญ่ขึ้นได้ ในสภาวะที่ผิวหนังชุ่มน้ำ

1.2 เส้นทางผ่านระหว่างเซลล์ (Intercellular route) คือ ในชั้นผิวหนังซึ่งมีการเรียงตัวของเซลล์ผิวหนัง และมีช่องว่างระหว่างเซลล์ซึ่งมีลักษณะของชั้นน้ำมันเรียงตัวสลับ

กับชั้นน้ำ และมี fatty acid, cholesterol และ ceramide แทรกอยู่ ตัวยาสำคัญจะเกิดการแพร่ผ่านระหว่างช่องว่างของเซลล์นี้ เป็นเส้นทางหลักเส้นทางการซึมผ่านของยาผ่านผิวหนังยาที่มีคุณสมบัติทั้งชอบไขมัน ไม่ชอบไขมันหรืออัมฟิโพล์สามารถใช้ช่องทางการนี้ในการซึมผ่านได้ ทั้งนี้อัตราเร็วในการซึมผ่านต้องพิจารณาถึงค่า $\log P$ (Partition coefficient) ของตัวยาสำคัญด้วย ยาจะต้องละลายได้บ้างในไขมัน แต่ต้องไม่ละลายดีเกินไปไม่เช่นนั้นยาจะถูกกักไว้ในชั้นนี้ไม่ถูกปลดปล่อยหรือดูดซึมในชั้นที่ลึกลงไป ยาที่จะถูกดูดซึมผ่านช่องทางนี้ได้ ควรมีค่า $\log P$ ประมาณ 1



รูปที่ 6 เส้นทางการดูดซึมทางผิวหนัง (Reference: Kim et al. Biomedical Dermatology (2020) 4:10 <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0058-7>)

2. เส้นทางผ่านระยางค์ผิวหนัง (Appendageal route หรือ Shunt pathway) เส้นทางนี้ไม่ใช่เส้นทางหลักในการแพร่ผ่านยาเข้าสู่ผิวหนัง เพราะมีพื้นที่ผิวน้อยมากเพียงร้อยละ 0.1 ของพื้นที่ผิวหนังทั่วร่างกาย และยังสวนทางกับทางเดินปกติของสารคัดหลั่ง ได้แก่ เหงื่อหรือไขมันอีกด้วย ตัวยาสำคัญที่สามารถแพร่ผ่านเส้นทางนี้ได้คือยาที่มีคุณสมบัติมีขั้ว มีประจุ หรือชอบไขมัน (ผ่านต่อมไขมัน) ยาที่มีขนาดเล็กมาก ๆ สามารถสะสมที่รูขุมขนแล้วค่อย ๆ ปลดปล่อยออกมา และออกฤทธิ์แบบเนิ่นได้ ตัวยาสำคัญที่ผ่านช่องทางนี้เหมาะสำหรับการรักษาโรคที่เกิดที่รูขุมขนหรือต่อมไขมัน เช่น สิว ผดผื่น และรูขุมขนอักเสบ เป็นต้น

โดยวัตถุประสงค์การนำส่งยาทางผิวหนัง มี 2 รูปแบบ ได้แก่ skin penetration หมายถึง การแพร่ของตัวยาสำคัญเข้าไปในผิวหนัง และ skin permeation หมายถึง การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาสำคัญเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านสารผ่านผิวหนัง (13)

ตัวยาสำคัญซึมผ่านผิวหนังโดยอาศัยเส้นทางการซึมผ่านร่วมกันทั้ง 3 เส้นทาง แต่จะใช้เส้นทางใดเป็น เส้นทางหลักนั้นขึ้นอยู่กับค่า $\log P$ ของตัวยาสำคัญเป็นสำคัญ ตัวยาสำคัญที่ชอบไขมันมีแนวโน้มใช้เส้นทาง Transdermal route เป็นเส้นทางหลัก ตัวยาสำคัญที่ชอบน้ำมีแนวโน้มใช้เส้นทาง Intercellular route ผ่านรู โปรตีนระหว่างเซลล์ และ Appendageal route เป็นเส้นทางในการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนัง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการซึมผ่านของยาด้วย ได้แก่

2.8.1 ผิวหนัง

2.8.1.1 Skin hydration หรือการชุ่มน้ำของผิวหนัง เกิดได้จากการคลุมผิวหนังด้วยแผ่นแปะ แผ่นพลาสติกหรือไขมันหรือน้ำมันในตำรับ ทำให้ปิดกั้นการระเหยของน้ำในผิวหนัง (Occlusive effect) ส่งผลให้ ปริมาณน้ำที่ผิวหนังเพิ่มจากร้อยละ 5 - 15 เป็นร้อยละ 50 ผิวหนังที่ชุ่มน้ำจะทำให้รูที่เป็นช่องว่างของโปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างชั้นของผิวหนังขยายใหญ่ขึ้น ผิวหนังพองตัว ลดความแน่นหนาของโครงสร้างผิวหนัง ทำให้เพิ่ม อัตราเร็วในการแพร่ผ่านของยาได้

2.8.1.2 อุณหภูมิที่ผิวหนัง ผิวหนังที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น เช่น การปิดกั้นการระเหยของน้ำในผิวหนังหรือ การถนอมจะทำให้ผิวหนังมีอุณหภูมิสูงขึ้นได้ และอัตราการดูดซึมทางผิวหนังเร็วขึ้นและดีขึ้น เพราะความร้อนจะช่วยเพิ่มอัตราการแพร่กระจาย เพิ่มการเคลื่อนที่ของโมเลกุล เพิ่มการละลายของตัวยาสำคัญ ลดความหนืดของตำรับ เพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดทำให้พาตัวยาวออกไปได้ดีขึ้น และเกิดความต่างระดับของความเข้มข้นมากขึ้น

2.8.1.3 ลักษณะของผิวหนัง ได้แก่ ความหนาของผิวหนังบริเวณต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน อายุของผู้ป่วย ผู้สูงอายุจะมีผิวแห้งกว่า การผลัดเซลล์ผิวเกิดน้อย การไหลเวียนเลือดมาที่ผิวหนังน้อยลง ทำให้การดูดซึมทาง ผิวหนังต่ำ นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาวะโรคของผิวหนังหรือผิวหนังถลอกลอก ทำให้ชั้น Stratum corneum บางลงการดูดซึมทางผิวหนังดีขึ้น สัตว์แต่ละชนิดมีอัตราการซึมผ่านผิวหนังที่แตกต่างกัน โดยพบว่ากระต่ายดูดซึมยาได้ดีกว่าหนู หมู ลิง และคน ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาการดูดซึมทางผิวหนังจึงนิยมใช้หนู เพราะหาได้ง่าย และมีความใกล้เคียงกับมนุษย์มากกว่ากระต่ายหรือหนู

2.8.2 ตัวยาสำคัญและรูปแบบตำรับ

2.8.2.1 คุณสมบัติของตัวยาสำคัญ ได้แก่ ค่า $\log P$ โดยทั่วไปตัวยาสำคัญมีค่า $\log P$ อยู่ในช่วง 1-3 (ชอบไขมัน) การซึมผ่านผิวหนังจะดี ตัวยาสำคัญที่อยู่ในรูปแบบไม่แตกตัว น้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 500 Da มีขนาดอนุภาคเล็กสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดี

2.8.2.2 ปริมาณ และความเข้มข้นของยาในตำรับ หากมีปริมาณยาในตำรับมาก จะทำให้ความต่างระดับของความเข้มข้นมาก การซึมผ่านยาเข้าสู่ผิวหนังมากตามไปด้วย

2.8.2.3 รูปแบบตำรับ มีผลต่อการปลดปล่อยตัวยาสำคัญออกจากตำรับ แล้วดูดซึมผ่านผิวหนัง การปลดปล่อยของตัวยาออกจากตำรับขึ้นอยู่กับค่าการละลายของตัวยาสำคัญในตำรับ และสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของตัวยาสำคัญระหว่างชั้นผิวหนังและรูปแบบตำรับยา ดังนั้นคุณสมบัติของยาพื้นหรือกระสายยา และ ส่วนประกอบในตำรับมีผลต่อการซึมผ่านยาเข้าสู่ผิวหนัง

2.8.3 สารเพิ่มการแทรกผ่าน (Penetration enhancer)

2.8.3.1 ทางเคมี (Chemical penetration enhancers) คือการใช้สารเคมีเพิ่มการดูดซึมยาผ่านผิวหนังแบบไม่ทำลายผิวหนังถาวร (reversible) โดยทำให้ผิวหนังชุ่มน้ำมากขึ้น เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวหนัง ลดไขมันที่เป็นโครงสร้างของผิวหนัง ทำให้ไขมันที่ผิวหนังอ่อนตัวลง (fluidization) หรือ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างช่องว่างระหว่างเซลล์ในทางทฤษฎีสารเคมีที่ใช้สำหรับเพิ่มการดูดซึมทางผิวหนังจะต้องไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคือง ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ทำลายผิวหนังแบบไม่ถาวร เข้ากันได้ดีกับสารอื่น ๆ ในตำรับ เป็นตัวทำละลายที่ดีของตัวยาสำคัญ สามารถแผ่กระจายบนผิวหนังได้ดี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ไม่มีสี และราคาถูก สารเคมีที่ใช้แบ่งกลุ่มได้ดังนี้

2.8.3.2 ทางกายภาพ (Physical penetration enhancers) ได้แก่

1) Iontophoresis คือ การกระตุ้นให้ตัวยาสำคัญซึ่งมีประจุหรือแตกตัวเป็นไอออนหรือมีขั้ว เคลื่อนที่ผ่านผิวหนังตามแรงขับของกระแสไฟฟ้าโดยไม่ทำให้เกิดเส้นทางใหม่ในการนำส่งทางผิวหนัง หากตัวยาสำคัญมีขั้วบวก ให้ทายาที่ด้านขั้วบวก เมื่อให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปจะทำให้เกิดการผลักดันตัวยาสำคัญเข้าสู่ ผิวหนังได้

2) Electroporation คือ การกระตุ้นผิวหนังด้วยความต่างศักย์ที่สูงมาก ๆ (10-1000 Volts) ในช่วงสั้น ๆ ทำให้โครงสร้างผิวหนังเกิดการเปลี่ยนแปลง สูญเสียความต้านทานการซึมผ่านของยา และเกิดเส้นทางใหม่ในการซึมผ่านจากการจัดเรียงตัวใหม่ของชั้น lipid bilayer ของผิวหนัง ทำให้ตัวยาสำคัญซึมผ่าน ผิวหนังได้ดีขึ้น

3) Sonophoresis คือ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงไปรบกวนชั้น lipid bilayers ของผิวหนัง และ เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวหนัง ทำให้ตัวยาสำคัญซึมผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น เพิ่มการดูดซึมของยาผ่านรูขุมขน ต่อมาเหงื่อ คลื่นเสียงความถี่ต่ำ (20 kHz) เพิ่มการนำส่งยาผ่านผิวหนังได้ดีกว่าคลื่นเสียงความถี่สูง (10 MHz)

4) Phonophoresis คือ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงรวมกับการนวดที่ผิวหนังด้วย

5) Microfabricated microneedle technology คือ การใช้เข็มขนาดเล็กมาก ๆ นำส่งยาผ่าน ชั้นผิวหนังเข้าไปในชั้นที่ลึกลงไปโดยตรง (by pass) เข็มจะถูกเคลือบด้วยยา หรือบรรจุในช่องตรงกลางของ เข็ม ปริมาณยาที่สามารถนำส่งได้ขึ้นอยู่กับขนาดและความยาวของเข็ม โดยทั่วไปเข็มมีขนาดตั้งแต่ 0.15 - 0.5 มม.

6) ระบบนำส่งยาอนุภาคนาโน ซึ่งตัวยาสําคัญในตำรับจะมีขนาดเล็กมาก ๆ ในระดับนาโนเมตร จึงสามารถแพร่ผ่านชั้นผิวหนังได้ง่ายและดีขึ้น

2.9 เทคโนโลยีระบบนำส่งทางผิวหนัง

เทคโนโลยีระบบนำส่งสารทางผิวหนัง (Transdermal delivery systems) เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่นิยมใช้ใน ปัจจุบันสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บและนำส่งผ่านผิวหนัง เนื่องจากระบบดังกล่าวอาศัยหลักการไมโคร/นาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ซึ่งเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีที่กำลังอยู่ในความสนใจของทั่วโลก โดยมีข้อดีหลายประการ ตัวอย่างเช่น สามารถเพิ่มอัตราการดูดซึมของสารสำคัญให้นำส่งสารไปยังบริเวณเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยปกป้องสารสำคัญ ซึ่งอาจถูกทำลายจากเอนไซม์เพิ่มความปลอดภัยโดยลดความเป็นพิษของสาร และยังสามารถป้องกันการเสื่อมสลายหรือเสียความคงตัวของสารสกัด จากปัจจัยภายนอก ได้แก่แสงแดด อุณหภูมิและความชื้น เป็นต้น ในปัจจุบัน Liposomes, Niosomes, Transfersomes และ Ethosomes ซึ่งเป็นระบบนำส่งยาที่เป็นลักษณะของถุงหรือ vesicular ได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยาผ่านชั้น Stratum corneum ของผิวหนังเพื่อให้ยาซึมผ่านเข้าสู่ร่างกายได้มากขึ้น และลงไปถึงถึงเข้าสู่ระบบหลอดเลือดในร่างกาย

2.9.1 ไลโปโซม (Liposome)

ไลโปโซม (Liposome) หมายถึง อนุภาคที่มีเมมเบรนหรือผนัง 2 ชั้น เกิดจาก amphiphiles เช่น ฟอสโฟลิพิด (สารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่มีส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ) กระจายอยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำ มักมีขนาดในช่วง 50 - 5,000 nm ผนังส่วนชอบน้ำสัมผัสกับน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่เป็นสายคาร์บอนเข้าหากัน การกระจายยาภายในอนุภาคขึ้นกับความสามารถในการละลายหรือความชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำของยา โมเลกุลยาที่ละลายน้ำได้จะกระจายอยู่ในส่วนที่มีน้ำ เช่น ช่องกลางอนุภาคหรือน้ำที่อยู่ระหว่างชั้นเมมเบรน ส่วนยาที่ไม่ชอบน้ำจะกระจายอยู่ในสายคาร์บอน ดังนั้นความสามารถในการกักเก็บยาได้ทั้งที่ละลายน้ำและละลายในไขมันได้นี้จึงเป็นคุณสมบัติที่เป็นข้อดีเด่นอันหนึ่งของไลโปโซม

2.9.2 นีโอโซม (Niosomes)

นีโอโซม (Niosomes) เป็นถุงสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแกนน้ำล้อมรอบด้วยชั้นนอกของสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีไอออน ที่นี้เลเยอร์อาจเป็น unilamellar หรือ multilamellar ซึ่งหมายความว่า bilayers เดี่ยวหรือหลายตัวตามลำดับ ขนาดของนีโอโซมอยู่ในระดับจุลภาค นีโอโซมเป็นระบบการจัดส่งที่คล้ายกันมากกับ Liposomes ซึ่งสามารถนำโมเลกุลที่ชอบน้ำในแกนกลางน้ำและโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำในระหว่าง bilayer ในการเปรียบเทียบกับ Liposomes นีโอโซมนั้นมีความเสถียรมากกว่า นอกจากนี้นอกจากสารลดแรงตึงผิวที่ไม่ใช่ไอออนิกแล้วชั้นนอกของนีโอโซมยังมีคอเลสเตอรอลซึ่งให้ความแข็งแรงและรูปร่างที่เหมาะสม เราสามารถเห็นการใช้งานของ Niosomes ใน Leishmaniasis, adjuvants ภูมิคุ้มกัน เนื่องจากการส่งยาเสพติด transdermal และช่องปากและการถ่ายภาพเพื่อการวินิจฉัย

2.9.3 ทรานสเฟอร์โซม (Transferosomes)

ทรานสเฟอร์โซม (Transferosomes) หรือเรียกว่า Ultradeformable liposomes หรือ Deformable liposomes เป็นไลโปโซมที่ใช้น้ำส่งทางผิวหนังซึ่งถูกพัฒนาเพื่อปรับปรุงการซึมผ่านผิวหนังเมื่อให้โดยการทา โดยเมมเบรนของไลโปโซมจะมีความยืดหยุ่นทำให้อนุภาคสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (deformation) ทำให้ผ่าน Stratum corneum เข้าสู่ผิวหนังที่ลึกลงไปได้

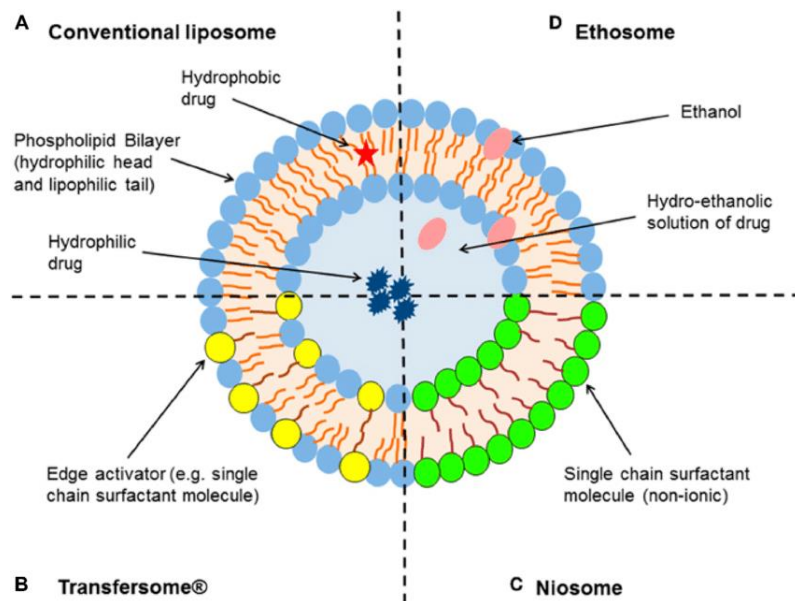
2.9.4 เอทโทโซม (Ethosomes)

เอทโทโซม (Ethosomes) เป็นไลโปโซมที่มี เอทานอล ปริมาณสูง (20 - 45%) เป็นอนุภาคที่มีลักษณะอ่อนและยืดหยุ่น เป็นระบบนำส่งสารหรือยาผ่านผิวหนังที่สามารถแทรกผ่านผิวหนังลงไปในพื้นที่ลึกได้ และอาจนำส่งถึงระบบไหลเวียนโลหิตเพื่อให้ฤทธิ์ทั่วร่างกาย ซึ่ง Touitou และคณะฯ ได้บรรยายไว้ในปี ค.ศ. 2000 เป็นระบบนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนัง โดยจากการทดลองพบว่า เอทานอล และ ฟอสโฟลิพิด กระจายในทุกชั้นของผิวหนังและใน receiver ของ Franz diffusion cell ด้วย ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ดังนี้คือ 1. เอทานอล ซึ่งเป็น permeation enhancer ไปรบกวนการจัดเรียงตัวของไขมันใน Stratum corneum 2. อนุภาคไลโปโซมกระทำกับไขมันทำให้เกิดความไม่เป็นระเบียบ ทำให้เกิดช่องทางที่ผ่านลงสู่ผิวหนังที่ลึกลงไป 3. เอทานอล ทำให้อนุภาคมีความยืดหยุ่นมากขึ้น (14-16)

2.9.4.1 องค์ประกอบของเอทโทโซม

เอทโทโซม ประกอบด้วย hydroalcoholic หรือ hydro/alcoholic/glycolic phospholipid ซึ่งมีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ค่อนข้างสูง โดยปกติแล้วเอทโทโซมจะมีฟอสโฟลิพิดซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีหลายชนิด เช่น phosphatidyl-

choline (PC), hydrogenated PC, phosphatidic acid (PA), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PPG), hydrogenated PC phosphatidylinositol (PI) แอลกอฮอล์ (ethanol หรือ isopropyl alcohol) น้ำ และ propylene glycol ส่วนประกอบดังกล่าวช่วยให้ส่งผ่านยาหรือสารที่มีความเข้มข้นสูงผ่านผิวหนังสำหรับสัดส่วนของส่วนประกอบต่าง ๆ เช่น phospholipon 90 (PL-90) ซึ่งมักจะใช้ในช่วง 0.5 – 10% w/w คลอเรสเตอรอลจะใช้ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.1 – 1% ส่วนแอลกอฮอล์ที่สามารถใช้ได้ ได้แก่ เอทานอล และ isopropyl alcohol ส่วนสารลดแรงตึงผิวสามารถใช้สารลดแรงตึงผิวที่ไม่ใช่ไอออนิก (PEG - alkyl ethers) ได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ cationic lipids เช่น cocoamide, POE alkyl amines, dodecylamine และ cetrimide ได้เช่นกัน (17) โดยสรุปแล้วความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์อาจอยู่ในช่วง 20% ถึง 50% และความเข้มข้น ของ non-aqueous phase อาจอยู่ในช่วงระหว่าง 22% ถึง 70%



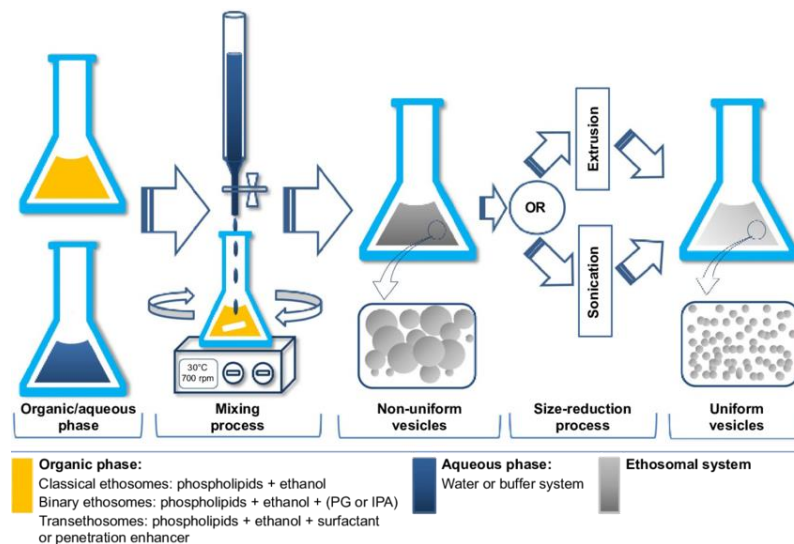
รูปที่ 7 ระบบนำส่ง Liposomes, Ethosomes, Transfersomes และ Niosomes

(Reference: Rahman HS, Othman HH, Hammadi NI, Yeap SK, Amin KM, Abdul Samad N, Alitheen NB. Novel Drug Delivery Systems for Loading of Natural Plant Extracts and Their Biomedical Applications. Int J Nanomedicine. 2020 Apr 15; 15: 2439-2483.)

2.9.4.2 หลักการเตรียมเอทโทโซม

1. The classical cold method

เป็นวิธีที่นิยมใช้เตรียมเอทโทโซม แบ่งการเตรียมเป็นสองวัฏภาค โดยวัฏภาคที่หนึ่ง คือ organic phase และวัฏภาคที่สอง คือ aqueous phase ซึ่ง organic phase จะประกอบไปด้วยการละลายฟอสโฟลิพิดในเอทานอล หรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่น เช่น PG และตัวยาที่ละลายได้ใน organic phase ส่วน aqueous phase จะประกอบไปด้วยน้ำ buffer solution, normal saline solution และตัวยาที่ละลายได้ใน aqueous phase เมื่อเตรียมทั้งสองวัฏภาคเรียบร้อยแล้ว ให้เติม aqueous phase ลงใน organic phase อย่างช้า ๆ พร้อมกับคนตลอดเวลาด้วยอัตราเร็วคงที่ 700 - 2000 รอบต่อนาที ประมาณ 5 - 30 นาที จนได้เป็น ethosomal suspension ดังแสดงในรูปที่ 8 (17)



รูปที่ 8 ขั้นตอนการเตรียมเอทโทโซมด้วยวิธี classical cold method

2. The ethanol injection-sonication method

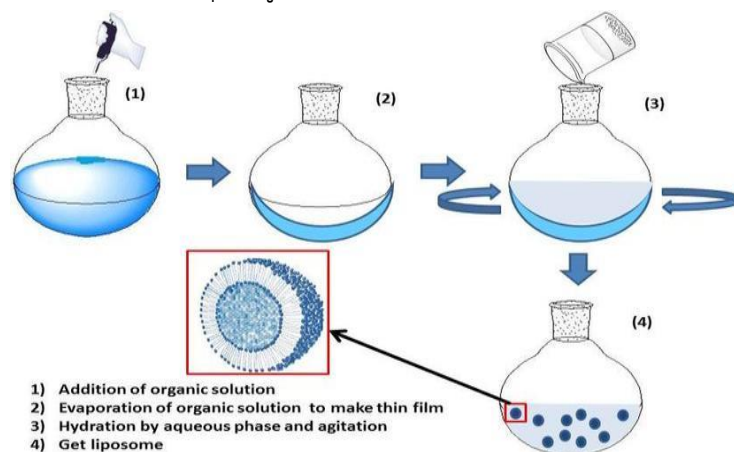
วิธีนี้จะเตรียมแยก phase เช่นเดียวกับ the classical cold method แต่จะฉีด organic phase ลงใน aqueous phase ด้วยอัตราเร็ว 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ แล้วใช้ ultrasonic probe ผสมให้เข้ากัน

3. The hot method

วิธีนี้จะเตรียมแยกวัฏภาคใน vessel โดย vessel ที่หนึ่ง ประกอบด้วย ฟอสโฟลิพิดที่ถูกกระจายในน้ำใน water bath ที่อุณหภูมิ 40°C จนได้เป็น colloidal suspension ส่วน vessel ที่สอง จะประกอบไปด้วยเอทานอล ที่ถูกให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 40°C จากนั้นค่อย ๆ เติมเอทานอล จาก vessel ที่สอง ลงใน organic phase พร้อมกับคนตลอดเวลา จนได้เป็น เอทโทโซม ส่วนตัวยานั้นละลายได้ทั้งใน organic phase และ aqueous phase ขึ้นกับคุณสมบัติของตัวยา

4. The thin-film hydration method

วิธีนี้จะละลายฟอสโฟลิพิดใน chloroform หรือ chloroform - methanol mixture (สัดส่วน 3:1, 2:1) ใน round-bottom flask จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิสูงกว่า lipid - phase transition temperature แล้ววางภายใต้ vacuum ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำ lipid film ไปกำจัดน้ำด้วยการให้ความร้อนอย่างช้าๆ ถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับฟอสโฟลิพิดที่ใช้ ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 ขั้นตอนการเตรียมเอทโทโซมด้วยวิธี Thin-film hydration method

5. Evaporation method

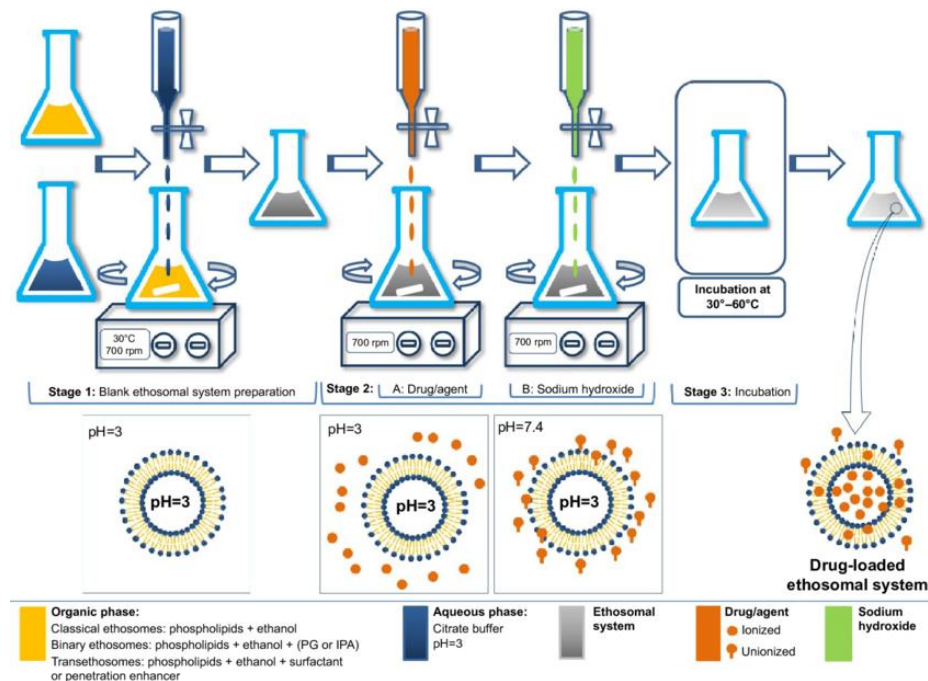
เป็นวิธีที่จำเพาะต่อเอทโทโซม ที่มีขนาดใหญ่ โดยละลายฟอสโฟลิพิดใน diethyl ether แล้วผสมใน aqueous phase ด้วยสัดส่วน 3:1 v/v ใน ultrasonic bath อุณหภูมิ 0°C นาน 5 นาทีจนได้ water-in-oil emulsion จากนั้นลดความดันลงจนเกิดการก่อเจลซึ่งขั้นตอนนี้จะทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์ถูกกำจัดไป และสารจะอยู่ในสภาวะ colloidal dispersion

6. Transmembrane pH-gradient method

เป็นวิธีที่แตกต่างจากวิธีที่กล่าวมาทั้งสิ้น โดย 5 วิธีก่อนหน้านี้เป็นการนำตัวยาใส่ในระบบเอทโทโซม แบบ passive ส่วน transmembrane pH-gradient method จะเป็นการนำตัวยาใส่ในระบบเอทโทโซมแบบ active โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างความเป็นกรดของวัฏภาคภายในกับความเป็นด่างของวัฏภาคภายนอก ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้กับตัวยาที่มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำและมีหมู่ amine ที่สามารถให้โปรตอนได้เท่านั้น กระบวนการเตรียมแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน (ดังแสดงในรูปที่ 10) ประกอบด้วย
 ขั้นที่ 1 เตรียม เอทโทโซม ด้วยวิธีใดก็ได้จาก 5 วิธีข้างต้น โดยใช้ acidic buffer (นิยมใช้ citrate buffer, pH 3) ในขั้นตอนที่ใช้น้ำ หรือใน Aqueous phase

ขั้นที่ 2 นำยาเข้าสู่ เอทโทโซม suspension และเติมสารละลาย 0.5 M sodium hydroxide เพื่อให้ external phase มีความเป็นด่าง (pH 7.4)

ขั้นที่ 3 นำระบบ ethosomal เข้า incubate ที่อุณหภูมิ 30°C - 60°C ระยะเวลาที่เหมาะสมกับตัวยาและระบบ ethosomal ขั้นตอนนี้จะทำให้ยาสามารถเข้าแทรก bilayer และจับกับถุง เอทโทโซม ได้ (17)



รูปที่ 10 ขั้นตอนการเตรียมเอทโทโซมด้วยเทคนิค Transmembrane pH-gradient method

2.10 การประเมิน เพื่อศึกษาสมบัติของเอทโทโซมสำหรับนำส่งยาทางผิวหนัง

ปัจจุบันมีการศึกษาคุณสมบัติของเอทโทโซมเพื่อการนำส่งยาทางผิวหนังอย่างแพร่หลาย โดยสมบัติที่สำคัญที่ส่งผลหรือใช้อธิบายกลไกการนำส่งสารสำคัญ ได้แก่ (18)

2.10.1 การศึกษาลักษณะภายในและภายนอกของอนุภาคเอทโทโซม (Visualization)

สามารถศึกษาได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งมี 2 ชนิด ได้แก่

1. กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) ใช้ในการศึกษาโครงสร้างหรือรายละเอียดขององค์ประกอบภายในของอนุภาค โดยลำแสงอิเล็กตรอนพลังงานสูงจะส่องผ่านอนุภาคหรือวัตถุตัวอย่างที่ศึกษาผ่านแผ่นตัวอย่างที่ตัดบางพิเศษ และเกิดภาพที่จอเรืองแสง (screen) ซึ่งบันทึกเป็นไฟล์ (digital camera)

2. กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM) ใช้ศึกษาลักษณะพื้นผิวของอนุภาคหรือผิวของตัวอย่างวัตถุที่นำมาศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอกของวัตถุที่ศึกษาได้อีกด้วยโดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องกราดไปบนผิวของวัตถุ ทำให้ได้ภาพซึ่งมีลักษณะเป็นภาพ 3 มิติ

2.10.2 ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซม (Vesicle size, Size distribution, and Zeta potential)

ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคสามารถศึกษาได้โดยใช้เครื่องมือ Dynamic Light Scattering (DLS) ซึ่งเป็นเทคนิควัดการกระเจิงของความเข้มแสง หรือที่เรียกว่า Photon correlation spectroscopy (PCS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วัดขนาดของสารตัวอย่างในระดับนาโนเมตรตั้งแต่ 0.005 – 5 ไมโครเมตร การเคลื่อนที่ของอนุภาคตลอดเวลาแบบบราวเนียนส่งผลกระทบต่อความเข้มของแสงที่กระเจิงจากอนุภาค อนุภาคขนาดใหญ่ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เลื่อนตำแหน่ง (translational diffusion coefficient) ต่ำ จะเคลื่อนที่ช้ากว่าอนุภาคขนาดเล็ก หรืออาจกล่าวได้ว่าอนุภาคขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้า ทำให้เกิดการความถี่ในการกระเจิงขึ้น-ลงของแสงที่กระเจิงต่ำ และอนุภาคขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็ว มีความถี่ในการกระเจิงของแสงที่กระเจิงสูงกว่า ดังนั้นอัตราการเปลี่ยนแปลงของแสงที่กระเจิงจะช้ากว่าสัญญาณที่ได้จากการวัดความเข้มแสงในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ของอนุภาคขนาดเล็กและความถี่ในการกระเจิงขึ้น-ลงของความเข้มแสงนี้จะถูกส่งไปยัง correlator โดยสารตัวอย่างต้องผ่านการเตรียมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เจือจางอย่างเหมาะสมเนื่องจากมีผลต่อสัญญาณที่ได้ สำหรับค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคมีความสัมพันธ์กับประจุบนผิวของอนุภาค ซึ่งส่งผลต่อการตกตะกอนและการเกาะตัวกัน การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าอาศัยเทคนิคการวัดความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคในของเหลวภายใต้สนามไฟฟ้า โดยเมื่อให้สนามไฟฟ้าเข้าไปในเซลล์ อนุภาคจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วตรงข้ามกับชนิดของประจุ โดยความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคภายใต้สนามไฟฟ้า จะส่งผลต่อค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่วัดได้

2.10.3 การศึกษาการกักเก็บยาหรือสารในอนุภาคเอทโทโซม (Entrapment measurement)

สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคการหมุนเหวี่ยง (Ultracentrifugation) เพื่อเร่งอัตราการตกตะกอนของอนุภาคที่ไม่ละลายออกจากของเหลว หรือใช้แยกของเหลวหลาย ๆ ชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ต่างกันออกจากกัน จากนั้นจึงวัดปริมาณยาทั้งในส่วนเหนือตะกอนและส่วนตะกอนเพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณการกักเก็บยาต่อไป

2.10.4 การศึกษาปริมาณยาของอนุภาคเอทโทโซม (Drug content)

สามารถวิเคราะห์ปริมาณยาได้โดยใช้เครื่องมือ UV Spectrophotometer เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารโดยใช้หลักการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลต สารตัวอย่างจะดูดกลืนแสงบางส่วนไว้ ส่วนแสงที่ไม่ถูกดูดกลืนจะสามารถผ่านออกมายังเครื่องวัดแสง (photomultiplier tube) ซึ่งจะทำการวัดปริมาณแสงที่ออกมา โดยการหักลบกับปริมาณ

ของแสงก่อนดูดกลืนจากนั้นจึงทำการประมวลผลแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นของสาร

2.10.5 การศึกษาระดับยาหรือสารวาวแสงที่สามารถซึมผ่านเข้าไปในชั้นผิวหนัง (Skin permeation studies)

สามารถศึกษาได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล ชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (Confocal Laser Scanning Microscopy; CLSM) เป็นกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลที่ใช้สำหรับงานที่ต้องการภาพความละเอียดสูงและสามารถเลือกชั้นความลึกที่ต้องการเก็บภาพได้ตามความต้องการ ซึ่งคุณสมบัติหลักของกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน คือ มีความสามารถในการเก็บภาพเฉพาะบริเวณจุดโฟกัสโดยสามารถเลือกระดับความลึกได้ ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า การตัดด้วยแสง (optical sectioning) การบันทึกภาพของกล้องชนิดนี้เป็นการเก็บสัญญาณแสงจากจุดโฟกัสที่ละจุด แล้วนำสัญญาณทั้งหมดมาสร้างเป็นภาพด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ ด้วยกระบวนการดังกล่าว ทำให้สามารถสร้างภาพ 3 มิติของวัตถุที่ซับซ้อนได้ ภาพที่ได้จะมีคุณภาพดีกว่าใช้กล้องทั่วไป เพราะภาพที่ได้จากระดับความลึกที่เราต้องการนั้นจะไม่ถูกซ้อนทับโดยภาพที่ระดับความลึกอื่น ในขณะที่ภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาจะเป็นภาพของแสงสะท้อนทั้งหมด จากทุกชั้นความลึกที่แสงสามารถทะลุผ่านลงไปได้

2.10.6 ความคงตัวของอนุภาค (Vesicular stability)

สามารถศึกษาได้โดยวัดขนาดของอนุภาคโดยใช้เครื่องมือ Dynamic Light Scattering (DLS) เมื่อเก็บดำรับไว้เป็นระยะเวลาานาน ๆ หรือสภาวะเร่งต่าง ๆ จากนั้นจึงดูลักษณะภายในของอนุภาคเอทโทโซมอีกครั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเพื่อยืนยันผลความคงตัว ซึ่งมีความสำคัญเนื่องจากระบบนำส่งยาที่มีความคงตัวต่ำ อาจเก็บดำรับไม่ได้นาน จึงต้องทดสอบความคงตัวของอนุภาคก่อนนำไปพัฒนาสูตรดำรับต่อไป (18)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมี

- 1) สารสกัดเหง้ากระเทียม (*Zingiber zerumbet* rhizome) จังหวัดตราด
- 1) ฟอสฟาทีดิลโคลีน (Phosphatidylcholine, Lot No. มม.3032, MySkinRecipes®)
- 2) โพลีเอธิลีนไกลคอล 4000 (Polyethylene glycol 4000)
- 3) เอทานอล (เอทานอล, Batch No. 20060068, RCI Labsan)
- 4) เมทานอล (เมทานอล, Batch No. 19090033, RCI Labsan)
- 5) เฮกเซน (Hexanes, Batch No. 21070007, RCI Labsan)
- 6) อะซิโตนไทรล์ (Acetonitrile, Batch No. 21090454, RCI Labsan)
- 7) สารมาตรฐาน Zerumbone (Cat No. CFN91066CFS202002, ChemFaces)
- 8) Sabouraud 4% Dextrose Agar (Lot No. VM584538, HIMEDIA®)
- 9) Sabouraud Dextrose Broth (Sabouraud Liquid medium) (Lot No. 0000454546, HIMEDIA®)
- 10) คีโตโคนาโซล (Ketoconazole)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balances, QUINTIX224-1S, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG Goettingen, Germany)
- 2) เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Zetasizer, MAL1070387, Malvern, England)
- 3) โซนิเคเตอร์ (Sonicator, GT-SONIC-20, PASTEL, China)
- 4) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, Tecni20, Phillip)
- 5) เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer, IKA® C-MAG HS7, Germany)
- 6) เครื่องเขย่าสาร (Vortex, ISOLAB®, Germany)
- 7) เครื่องบ่มเชื้อ (Incubator, RI12-12493, BINDER, Germany)
- 8) เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, SPD-M20A, Shimadzu, Japan)
- 9) คอลัมน์สำหรับเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography Column, ACE5C18, V17-1586, UK)
- 10) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, MPW-260R, MPW MED. Instruments, USA)
- 11) ไมโครปิเปตต์ (Micropipette, Pipet-Lite XLS+, Mettler Toledo, USA)
- 12) เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator, R-100, Buchi, Japan)
- 13) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave, HVA-85/110, HIRAYAMA, Japan)

3.2 การสกัดสารจากเหง้ากระเทียม

3.2.1 การเตรียมสมุนไพร

นำเหง้าของกระเทียม (*Zingiber zerumbet*) จากจังหวัดตราด อายุ 8 เดือน -1 ปี เก็บเกี่ยวช่วงเวลา 13.00-16.00 น. (BUU 22/01/2565) มาย่อยเป็นชิ้นเล็กและอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่งัว 24 ชั่วโมง จนแห้งสนิท จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น

3.2.2 การสกัดสารจากสมุนไพร

นำเหง้าของกระเทียมที่บดลดขนาดมาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาส่วนตัวอย่างฟุ้งออกด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) บันทึกน้ำหนักที่ได้ แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบ (% yield) แสดงดังสมการที่ 1 จากนั้นเก็บสารสกัดได้ในอุณหภูมิ 2 – 8 °C

$$\text{ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบ} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดจากการระเหยแห้ง}}{\text{น้ำหนักเหง้ากระเทียมแห้งที่ใช้}} \times 100 \text{ (สมการที่ 1)}$$

3.3 การเตรียมเอทโทโซม

3.3.1 Cold Method

ใช้ฟอสโฟลิพิด คือ Soya lecithin โดยเตรียมที่น้ำหนัก 100, 200, 300, 400 มก. และใช้ เอทานอล เป็นตัวทำละลาย แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Soya lecithin

Ingredients	formulations			
	F1	F2	F3	F4
Soya lecithin (มก.)	100	200	300	400
เอทานอล (มล.)	7	7	7	7
Polyethylene glycol 4000 (มก.)	100	100	100	100
Water (มล.)	qs.	qs.	qs.	qs.

3.3.2 การเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของระบบเอทโทโซม

ละลาย Polyethylene glycol 4000 100 มก. และ Soya lecithin ในเอทานอล 7 มล. ที่น้ำหนักต่าง ๆ ได้แก่ 100, 200, 300 และ 400 มก. โดยการปั่นกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer จนได้สารละลายเนื้อเดียวสมบูรณ์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 20 มล. จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และพัก 5 นาที เป็นจำนวน 3 รอบ รวมระยะเวลา 30 นาที

3.3.3 การหาชนิดและปริมาณตัวทำละลาย

ศึกษาผลของปริมาณตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย เอทานอล ในการละลาย Soya lecithin ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้อ 3.3.2 ด้วยสัดส่วนและปริมาณตัวทำละลายดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การหาปริมาณของตัวทำละลายที่เหมาะสม

Ingredients	formulations				
	F5	F6	F7	F8	F9
Soya lecithin (มก.)	200	200	200	200	200
เอทานอล (มล.)	5	6	7	8	9
Polyethylene glycol 4000 (มก.)	100	100	100	100	100
Water (มล.)	qs.	qs.	qs.	qs.	qs.

3.3.4 การหา sonication time ที่เหมาะสมของการเกิดเอทโทโซม

จากขั้นตอนที่ 3.3.3 ของการทดลองการเตรียมเอทโทโซม เลือกสารละลายเอทโทโซมที่มีสมบัติเหมาะสม เพื่อนำมาทดสอบหา sonication time โดยแบ่งส่วนเวลา sonication ที่ 0, 5, 10, และ 15 นาที

3.4 การเตรียมเอทโทโซมที่มีสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

เลือกสูตรตำรับจากขั้นตอนที่ 3.3.4 ที่มีขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคที่เหมาะสม จากนั้นนำมาใส่สารสกัดจากเหง้ากระเทียมตามอัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 4 อ้างอิงจากความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อ *C. albicans* ได้จากการศึกษาท่อน้ำเชื้อประโยชน์ทางเภสัชกรรมของพืชสมุนไพรภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระเทียมมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา *C. albicans* ได้ที่ความเข้มข้น 62.5 มก./มล. (Minimum Fungicidal Concentration; MFC)

ตารางที่ 4 ปริมาณของสารสกัดจากเหง้ากระทือที่บรรจุลงในตำรับเอทโทโซม

สารสกัด	formulations						
	2X	5X	10X	20X	30X	50X	100X
สารสกัดจากเหง้ากระทือ (มคก./มล.)	125	312.5	625	1250	1875	3125	6250
สารสกัดจากเหง้ากระทือ (มก./20 มล.)	2.5	6.25	12.5	25	37.5	62.5	125

โดยการละลาย Polyethylene glycol 4000, Soya lecithin และสารสกัดจากเหง้ากระทือน้ำหนัก 2.5, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 62.5 และ 125 มก. ตามลำดับ ลงใน เอทานอล ปั่นกวนด้วยเครื่อง magnetic bar จนได้สารละลายเนื้อเดียวสมบูรณ์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 20 มล. จากนั้นนำไป sonicate

3.5 การประเมินลักษณะทางกายภาพของเอทโทโซม

3.5.1 การศึกษาลักษณะภายในและภายนอกของอนุภาคเอทโทโซม (Ethosome morphology)

การศึกษาลักษณะภายในและลักษณะภายนอกของอนุภาคเอทโทโซม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM) ในการศึกษาโครงสร้าง หรือรายละเอียดขององค์ประกอบภายในอนุภาค โดยการนำตัวอย่างมาย้อมด้วยสาร 2% Uranium acetate และปล่อยให้แห้งก่อนหยดลงกริด จากนั้นนำไปวัดที่กำลังขยายขนาดต่าง ๆ

3.5.2 การศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคของเอทโทโซม (Vesicle size, Size distribution and Zeta Potential)

ศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของเอทโทโซม โดยใช้เครื่อง Zetasizer ทำการหยดตำรับเอทโทโซมลงใน cuvette ที่ใช้สำหรับการวัด และตั้งวิธีวัดค่าโดยเลือกพารามิเตอร์ตัวทำละลายคือน้ำ และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C ขณะวัด

3.5.3 การศึกษาการกักเก็บสารสกัดจากเหง้ากระทือในอนุภาคเอทโทโซม (% Entrapment efficacy)

3.5.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Zerumbone

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Zerumbone ในช่วงความ 0.05 - 0.5 มก./มล. โดยชั่งน้ำหนักสารมาตรฐาน 5 มก. ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มล. ใช้ตัวทำละลายภายในเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในการปรับปริมาตร และผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จากความเข้มข้น 0.5 มก./มล. เป็น 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 และ 0.01 มก./มล. ตามลำดับ จะได้สารละลายมาตรฐานทั้งหมด 6 ความเข้มข้น และกรองสารละลายด้วย membrane filter ขนาด 0.45 µm ก่อนบรรจุลงใน HPLC vial

3.5.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระทือ

เตรียมตัวอย่างสารสกัดเหง้ากระทือที่มีความเข้มข้น 1 มก./มล. โดยชั่ง crude extract ของสารสกัดเหง้ากระทือ 1 มก. ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มล. ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 µm ก่อนบรรจุลงใน HPLC vial

3.5.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในเอทโทโซม

การศึกษากักเก็บสารสกัดจากเหง้ากระทือในอนุภาคเอทโทโซม โดยนำสารละลายเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ 1.2 มล. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำส่วน supernatant 100 มล. เจือจางด้วย mเอทานอล 900 มล. และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatogram-phy; HPLC) ซึ่งมีปริมาตรฉีด 20 มล. โดยใช้ mobile phase (ตัวทำละลายเคลื่อนที่) 2 ชนิด คือ acetonitrile และน้ำ กำหนด flow rate เท่ากับ 1.2 มล./นาที ไล่อัตราส่วน (gradient elution) mobile phase จาก acetonitrile 65% - 75% โดยความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญจะคำนวณได้ดังแสดงในสมการที่ 2

$$\text{ร้อยละความสามารถในการกักเก็บสาร} = \frac{\text{สารสกัดเหง้ากระทือที่ใส่เข้าไป} - \text{สารสกัดเหง้ากระทือที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC}}{\text{สารสกัดเหง้ากระทือที่ใส่เข้าไป}} \times 100 \text{ (สมการที่ 2)}$$

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ของสารสำคัญจากเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ

3.6.1 การคำนวณหาสารสกัดจากเหง้ากระทือที่ทำการบรรจุลงในตำรับเอทโทโซมเมื่อถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้ากระทือดังขั้นตอนที่ 3.4 เพื่อนำมาทดสอบการหาฤทธิ์การต้านเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการเจือจางเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 9000 มคล. ผสมกับเชื้อ 100 มคล. จะสามารถคำนวณความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา *C. albicans* เทียบกับค่า MFC ดังแสดงในสมการที่ 3 และแสดงค่าที่ได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของเอทโทโซมบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ ที่ถูกเจือจางด้วยอาหาร

สารสกัด	formulations						
	2X	5X	10X	20X	30X	50X	100X
สารสกัดจากเหง้ากระทือ (มคก./มล.)	125	312.5	625	1250	1875	3125	6250
ความเข้มข้นของเอทโทโซมบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่ถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (มคก./มล.)	6.25	15.625	31.25	62.5	93.75	156.25	312.5
จำนวนเท่าเมื่อเทียบกับค่า MFC ที่ 62.5 มคก./มล.	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2	5

$$C_1V_1 = C_2V_2 \text{ (สมการที่ 3)}$$

เมื่อ $C_1 = \text{MFC} \times \text{จำนวนเท่าของสารสกัดที่ต้องการบรรจุลงในเอทโทโซม}$

$C_2 = \text{ความเข้มข้นของเอทโทโซมบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่ถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ}$

$V_1 = \text{ปริมาตรของตำรับเอทโทโซมบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ ที่ถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาปิเปตลงในอาหาร เพื่อดูฤทธิ์การต้านเชื้อรา (100 \mu\text{l})}$

$V_2 = \text{ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจือจางตำรับเอทโทโซมบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ (1,900 \mu\text{l}) ผสมกับเชื้อ 100 \mu\text{l} \text{ (รวมทั้งหมด 2,000 \mu\text{l})}$

3.5.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ในอาหารเหลว

นำอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) โดยมีอัตราส่วนของอาหาร 30 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มล. ที่เตรียมไว้มาใส่ในหลอดทดลอง ปิดด้วยฟรอยด์ จากนั้นปิเปตเชื้อราที่ผ่านการเทียบความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard แล้วมาผสมให้เข้ากันเตรียมหลอดทดลอง ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง และฆ่าเชื้อราของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ โดยการปิเปตเชื้อรา และเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 ใส่ในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน จะมี 2 หลอดที่เป็นหลอดควบคุม สำหรับหลอดที่ 1 จะเป็นหลอด positive control ซึ่งจะทำให้การปิเปตเชื้อที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำเอทโทโซมสำเร็จที่ไม่ถูกบรรจุสารใด ๆ มาใส่ และในหลอดที่ 2 จะเป็นหลอด negative control ซึ่งจะทำให้การปิเปตอาหารเหลวที่ไม่ได้ผสมเชื้อราใส่ในหลอดทดลองผสมกับเอทโทโซมสำเร็จที่ไม่ถูกบรรจุสารใด ๆ จากนั้นนำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มในตู้อบ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นเทียบกับ control

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ในอาหารแข็ง

นำหลอดทดลองจากข้อ 3.6.1.1 แต่ละหลอดมาทำการ streak บน plate ในอาหารแข็ง Sabouraud 4% dextrose agar (SDA) โดยมีอัตราส่วนของอาหาร 65 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มล. ที่เตรียมไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Agar well diffusion method เตรียมสารแขวนลอยเชื้อราจากโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SDA โดยมีอัตราส่วนของอาหาร 65 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มล. แล้วนำเชื้อ *C. albicans* ไปป้ายให้ทั่วพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นกำหนดตำแหน่งที่จะเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ไม้พินสำลีปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard Swab ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยเริ่มจากเส้นผ่านศูนย์กลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร หมุนจานเพาะเชื้อประมาณ 60 °C แล้วป้ายด้วยวิธีการเดิม ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อรากระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3 - 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง ทำการปิเปตเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 0, 2, 5, 10, 20 และ 30 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Fungicidal Concentration; MFC) ลงในแต่ละหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังกล่าว ปริมาตรหลุมละ 20 มคก. และยา Ketoconazole ความเข้มข้น 50 มคก./มล.

นำไปต้มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสรอบห่ออาหารเลี้ยงเชื้อ (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

การแปลผล คือความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเห้้ากระทือ ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะของโคโลนี แสดงว่าความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเห้้ากระทือ ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ จากนั้นนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อราเจริญ (inhibition zone) โดยวัดจากขอบโซนข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของหลุม บันทึกเป็นหน่วยมิลลิเมตร

3.7 สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ขนาดอนุภาค, การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้า โดยทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) แสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการเปรียบเทียบความแตกต่าง

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดสอบด้วย Tukey's test กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p\text{-value} < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระทือ

4.1.1 ลักษณะของสารสกัดจากเหง้ากระทือ

สารสกัดเหง้ากระทือที่สกัดด้วยเฮกเซนโดยการนำเหง้าของกระทือที่บดลดขนาดมาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาส่วนตัวอย่างฟุ้งออกและระเหยตัวทำละลายออก สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสารข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม แสดงดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 สารสกัดจากเหง้ากระทือ

4.1.2 การคำนวณหาปริมาณสารสกัดจากเหง้ากระทือ (% yield of crude extract)

การคำนวณหาปริมาณสารสกัดจากเหง้ากระทือตามสมการที่ 1 พบว่าปริมาณสารสกัดมีค่าร้อยละ 3.8 สารสกัดกระทือที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นำไปใช้ในการพัฒนาตำรับเอทโทโซมต่อไป

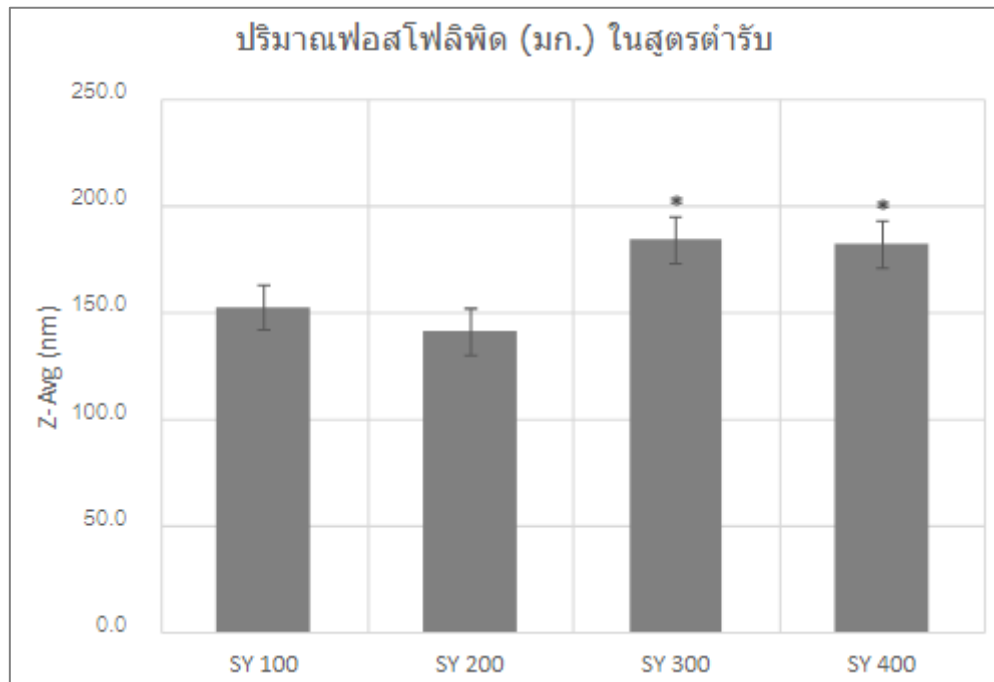
4.2 การศึกษาขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ

4.2.1 การหาน้ำหนักของฟอสโฟลิพิดที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับเอทโทโซม

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดที่เหมาะสมในการเตรียมเอทโทโซม โดยการ พบว่าที่ขนาดฟอสโฟลิพิด 100 มก. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 152.5 ± 4.8 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.453 ± 0.051 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -27.73 ± 1.66 mV ส่วนฟอสโฟลิพิด 200 มก. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 140.8 ± 0.9 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.404 ± 0.010 nm มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -32.40 ± 0.53 mV ในขณะที่ปริมาณฟอสโฟลิพิด 300 มก. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 184.1 ± 0.3 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.279 ± 0.076 มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -30.30 mV และที่ปริมาณฟอสโฟลิพิด 400 มก. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 182.0 ± 3.8 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.427 ± 0.208 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -31.57 ± 1.24 mV ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเปลี่ยนน้ำหนักของ ฟอสโฟลิพิด

ฟอสโฟลิพิด (Soya lecithin)	เอทานอล (มล.)	Size mean $\pm$ SD (nm)	PDI mean $\pm$ SD (nm)	Zeta potencial mean $\pm$ SD (nm)
100 มก.	7	152.5 ± 4.8	0.453 ± 0.051	-27.73 ± 1.66
200 มก.		140.8 ± 0.9	0.404 ± 0.010	-32.40 ± 0.53
300 มก.		184.1 ± 0.3	0.279 ± 0.076	-30.30 ± 1.20
400 มก.		182.0 ± 3.8	0.427 ± 0.208	-31.57 ± 1.24



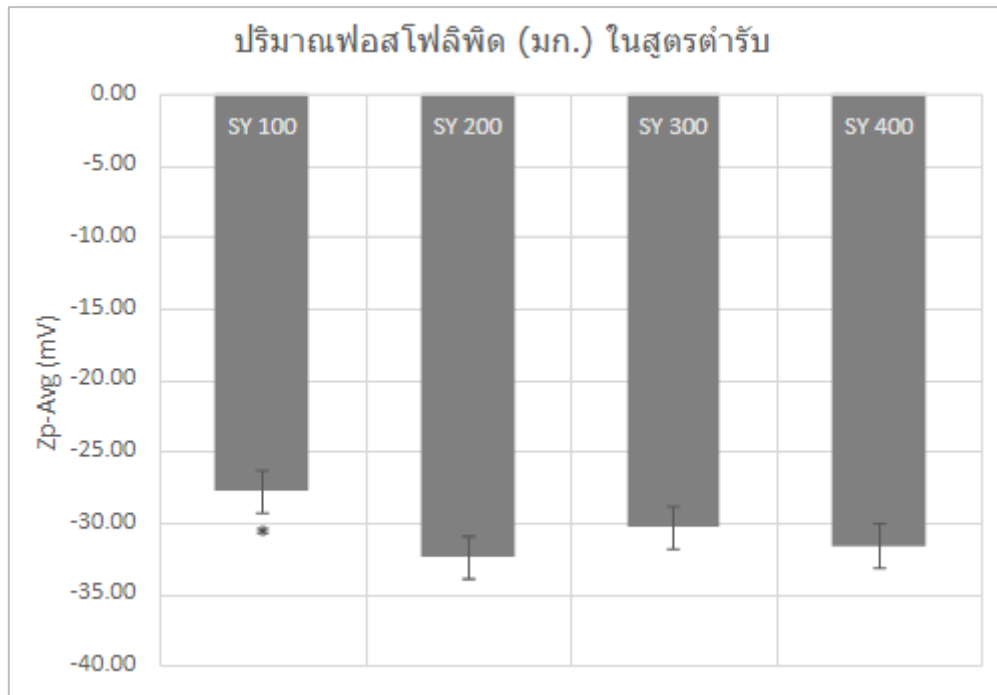
รูปที่ 12 แผนภูมิแท่งแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ยังไม่ได้บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเปลี่ยนน้ำหนักของ ฟอสโฟลิพิด (* $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับน้ำหนัก SY 200 มก.)

** หมายถึง SY 100 หมายถึง ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ที่ใส่ในสูตรตำรับ 100 มก.

SY 200 หมายถึง ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ที่ใส่ในสูตรตำรับ 200 มก.

SY 300 หมายถึง ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ที่ใส่ในสูตรตำรับ 300 มก.

และ SY 400 หมายถึง ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ที่ใส่ในสูตรตำรับ 400 มก.



รูปที่ 13 แผนภูมิแท่งแสดงค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ยังไม่ได้บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม เมื่อเปลี่ยนน้ำหนักของฟอสโฟลิพิด (* $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับน้ำหนัก SY 200 มก.)

** หมายถึง SY 100 หมายถึง ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ที่ใส่ในสูตรตำรับ 100 มก.

SY 200 หมายถึง ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ที่ใส่ในสูตรตำรับ 200 มก.

SY 300 หมายถึง ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ที่ใส่ในสูตรตำรับ 300 มก.

และ SY 400 หมายถึง ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ที่ใส่ในสูตรตำรับ 400 มก.

จากการวัดผลด้วยเครื่อง Zetasizer แสดงให้เห็นว่าที่ขนาดของเอทโทโซมที่มีส่วนประกอบเป็นฟอสโฟลิพิด 200 มก. มีขนาดที่ได้เล็กที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเป็นค่าลบจำนวนมากที่สุดอีกด้วย ดังนั้นการใช้ฟอสโฟลิพิดขนาด 200 มก. ในการเตรียมตำรับเอทโทโซมจึงมีความเหมาะสมในการนำพัฒนาสูตรตำรับเพื่อหาปริมาณของตัวทำละลาย และ sonication time ที่เหมาะสมของตำรับต่อไป

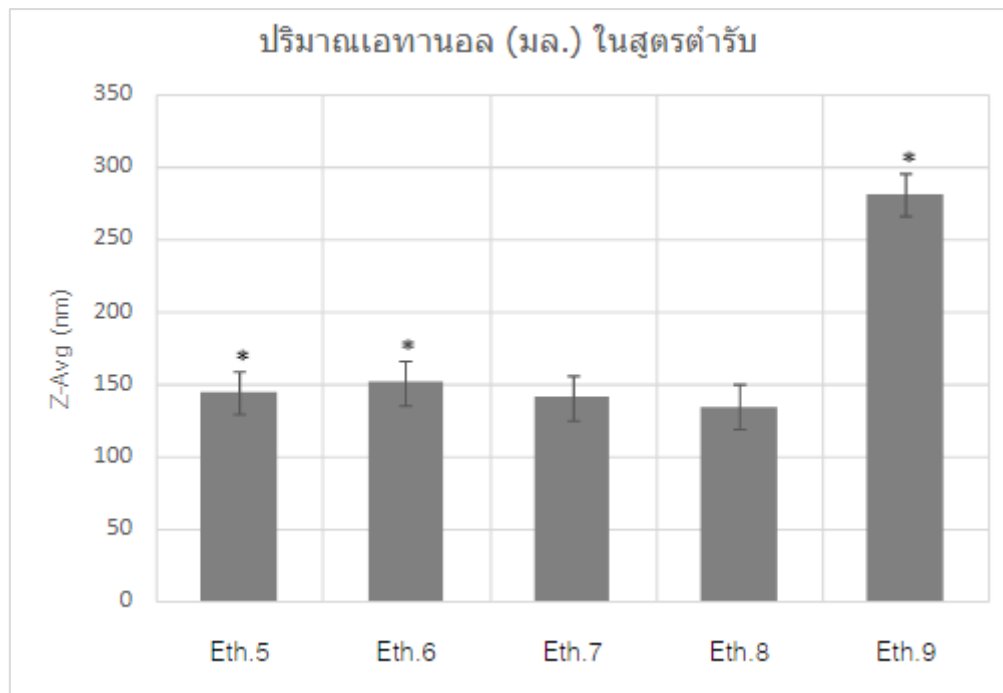
4.2.2 การหาปริมาณตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับเอทโทโซม

จากการวิเคราะห์หาปริมาณตัวทำละลายเอทานอลที่เหมาะสมในการเตรียมเอทโทโซม เมื่อใช้ฟอสโฟลิพิด 200 มก. พบว่าที่ปริมาณเอทานอล 5 มล. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 144.4 ± 2.1 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.331 ± 0.018 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -47.67 ± 0.74 mV ส่วนที่ปริมาณเอทานอล 6 มล. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย

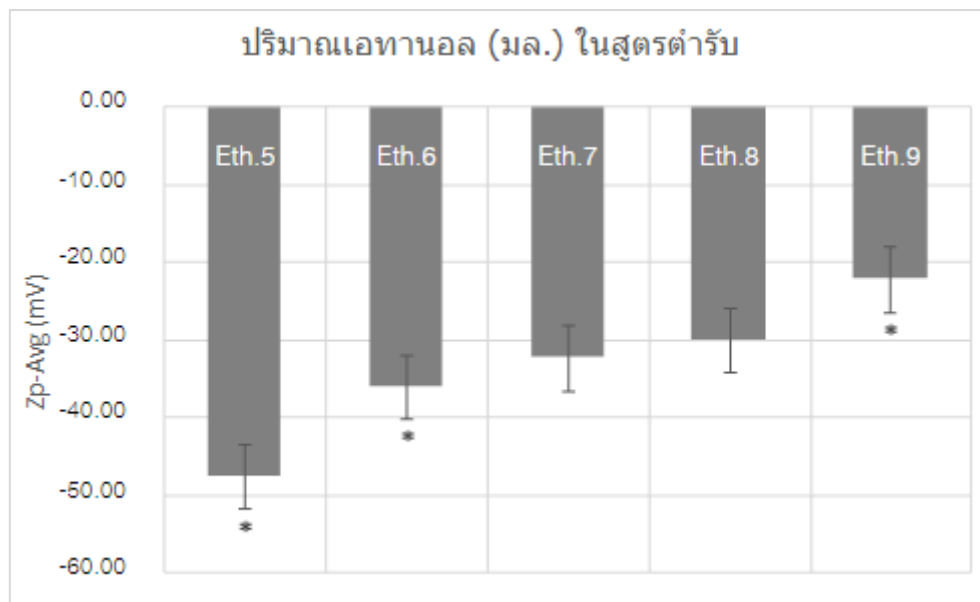
151.3±1.2 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.417±0.013 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซิต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -36.07±1.04 mV ในขณะที่ปริมาณเอทานอล 7 มล. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 140.8±0.8 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.404±0.101 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซิต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -32.40±0.53 mV ที่ปริมาณเอทานอล 8 มล. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 134.5±1.1 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.245±0.005 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซิต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -30.13±0.87 mV และที่ปริมาณเอทานอล 9 มล. ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 280.9±1.7 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.267±0.015 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซิต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -22.27±1.01 mV ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซิต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่เอทานอลปริมาณต่าง ๆ

ฟอสโฟลิพิด (Soya lecithin)	เอทานอล (มล.)	Size mean± SD (nm)	PDI mean± SD (nm)	Zeta potential mean± SD (nm)
200 มก.	5	144.4±2.1	0.331±0.018	-47.67±0.74
	6	151.3±1.2	0.417±0.013	-36.07±1.04
	7	140.8±0.8	0.404±0.101	-32.40±0.53
	8	134.5±1.1	0.245±0.005	-30.13±0.87
	9	280.9±1.7	0.267±0.015	-22.27±1.01



รูปที่ 14 แผนภูมิแท่งแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ยังไม่ได้บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่เอทานอลปริมาณต่าง ๆ (* $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับปริมาณเอทานอล 8 มล.)



รูปที่ 15 แผนภูมิแท่งแสดงค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่เอทานอล ปริมาณต่าง ๆ (* $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับปริมาณเอทานอล 8 มล.)

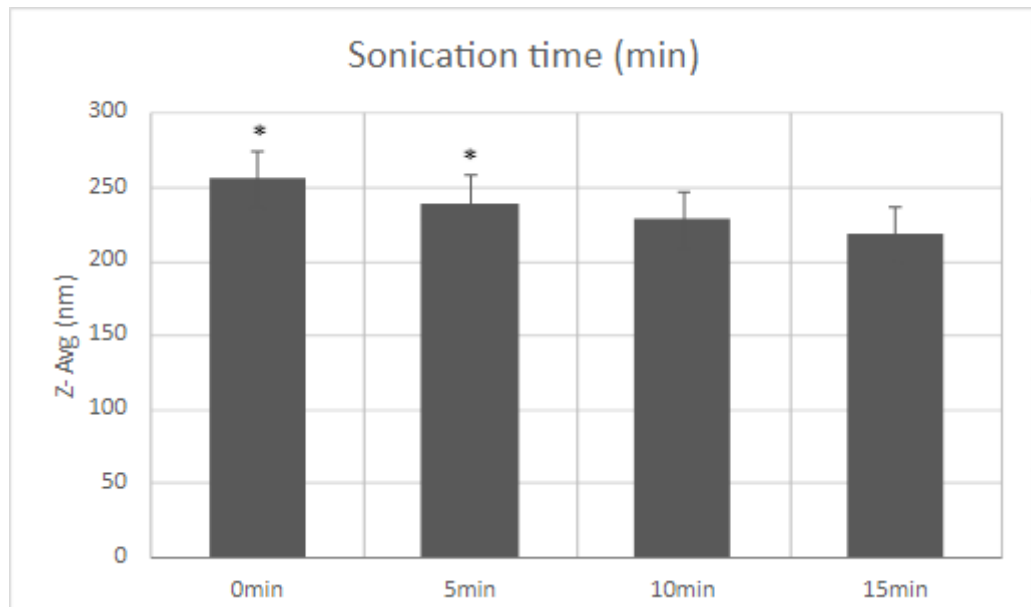
จากการวัดผลด้วยเครื่อง Zetasizer แสดงให้เห็นว่า ที่ปริมาณเอทานอล 8 มล. มีขนาดของเอทโทโซมที่ได้เล็กที่สุด และมีค่าการกระจายของขนาดอนุภาคน้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายเอทานอลปริมาณอื่น ๆ ในส่วนของศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคควรมีค่าศักย์ไฟฟ้าในช่วง -20.9 to -35.6 mV ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลาย เอทานอลที่ปริมาณ 8 มล. ในการเตรียมตำรับเอทโทโซมที่มีฟอสโฟลิพิด 200 มก. จึงมีความเหมาะสมในการนำมาหา sonication time ที่เหมาะสมของตำรับต่อไป

4.2.3 การหา sonication time ที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับเอทโทโซม

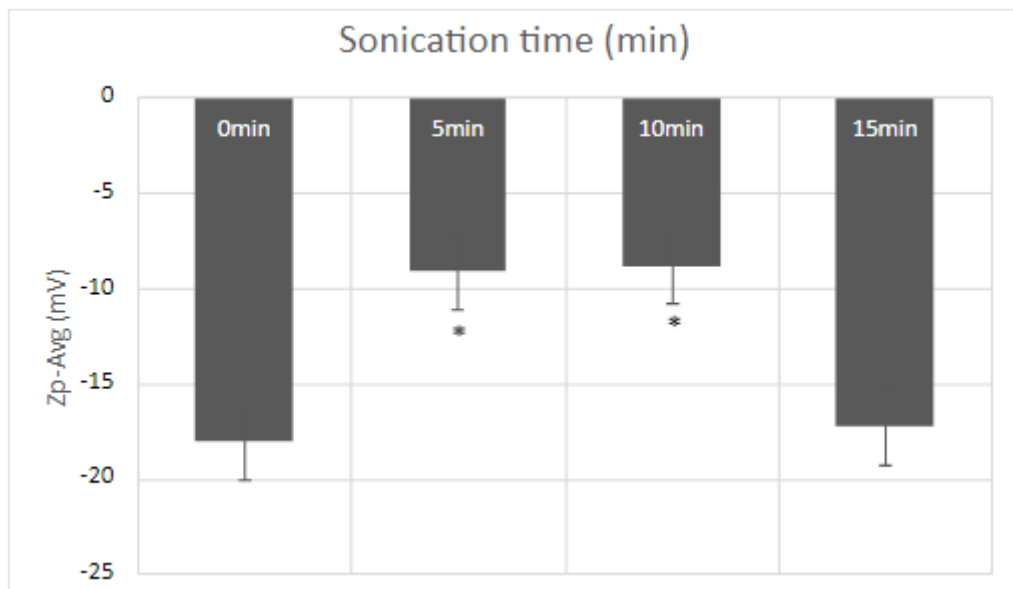
จากการวิเคราะห์หา sonication time ที่เหมาะสมในการเตรียมเอทโทโซม เมื่อใช้ฟอสโฟลิพิด 200 มก. และใช้เอทานอล 8 มล. ตำรับที่ไม่ได้ทำการ sonicate ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 255.6 ± 0.5 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.144 ± 0.018 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -18.00 ± 0.44 mV ที่เวลา 5 นาที ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 239.1 ± 5.7 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.185 ± 0.006 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -9.08 ± 0.54 mV ที่เวลา 10 นาที ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 228.0 ± 2.5 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.168 ± 0.022 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -8.84 ± 0.58 mV ที่เวลา 15 นาที ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 218.5 ± 4.0 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 0.223 ± 0.010 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยอยู่ที่ -17.27 ± 0.64 mV ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีต้าของเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม เมื่อทำการ sonicate ณ เวลาต่าง ๆ

Time of sonication (min)	Size mean $\pm$ SD (nm)	PDI mean $\pm$ SD (nm)	ศักย์ไฟฟ้าซีต้า mean $\pm$ SD (nm)
0	255.6 ± 0.5	0.144 ± 0.018	-18.00 ± 0.44
5	239.1 ± 5.7	0.185 ± 0.006	-9.08 ± 0.54
10	228.0 ± 2.5	0.168 ± 0.022	-8.84 ± 0.58
15	218.5 ± 4.0	0.223 ± 0.010	-17.27 ± 0.64



รูปที่ 16 แผนภูมิแท่งแสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ยังไม่ได้บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม เมื่อทำการ sonicate ณ เวลาต่าง ๆ (* $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับ sonication time 15 นาที)

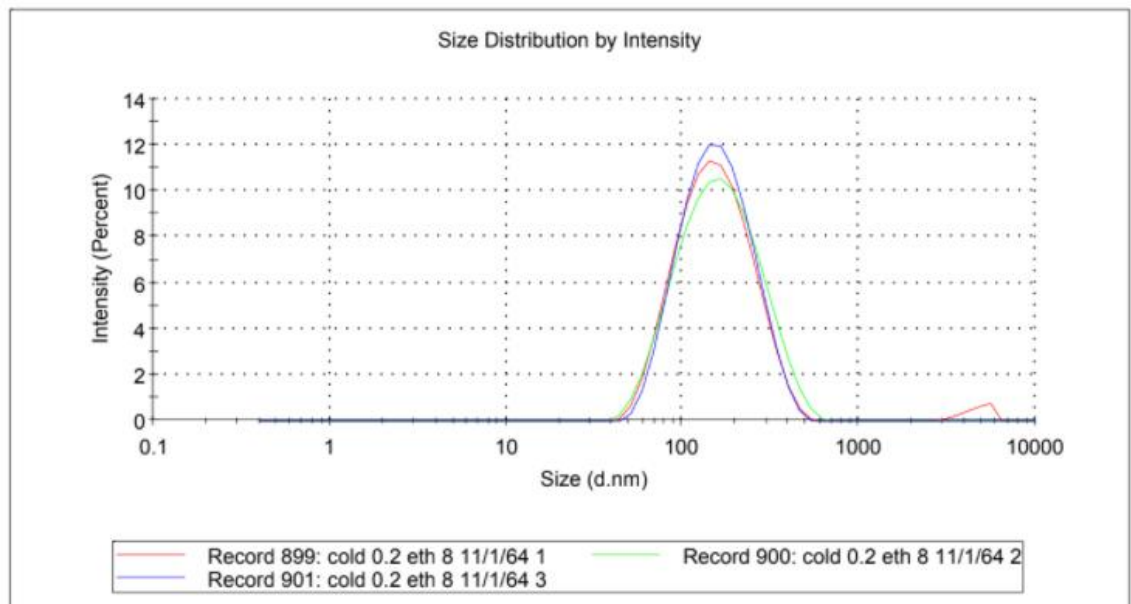


รูปที่ 17 แผนภูมิแท่งแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ยังไม่ได้บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม เมื่อทำการ sonicate ณ เวลาต่าง ๆ (* $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับ sonication time 15 นาที)

จากการวัดผลด้วยเครื่อง Zetasizer แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการ sonicate ที่ต่าง ๆ กัน การ sonicate สามารถลดขนาดของเอทโทโซมได้ดีกว่าการไม่ทำการ sonicate และขนาดอนุภาคของเอทโทโซมจะมีขนาดเล็กลงเมื่อเพิ่มเวลา sonicate มากขึ้น ดังนั้นการใช้ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. และทำการ sonicate ที่เวลา 15 นาที จึงมีความเหมาะสมสำหรับการเตรียมตำรับเอทโทโซมเพื่อบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือต่อไป โดยให้ค่าเฉลี่ยของอนุภาคอยู่ที่ 134.6 nm ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ย -31.1 mV วัดด้วยเครื่อง Zetasizer ดังแสดงตามกราฟในภาพที่ 18 และ 19 ตามลำดับ และได้ตำรับเอทโทโซมเป็นคอลลอยด์โปร่งแสงสีเหลืองนวลดังแสดงในภาพที่ 20

Results

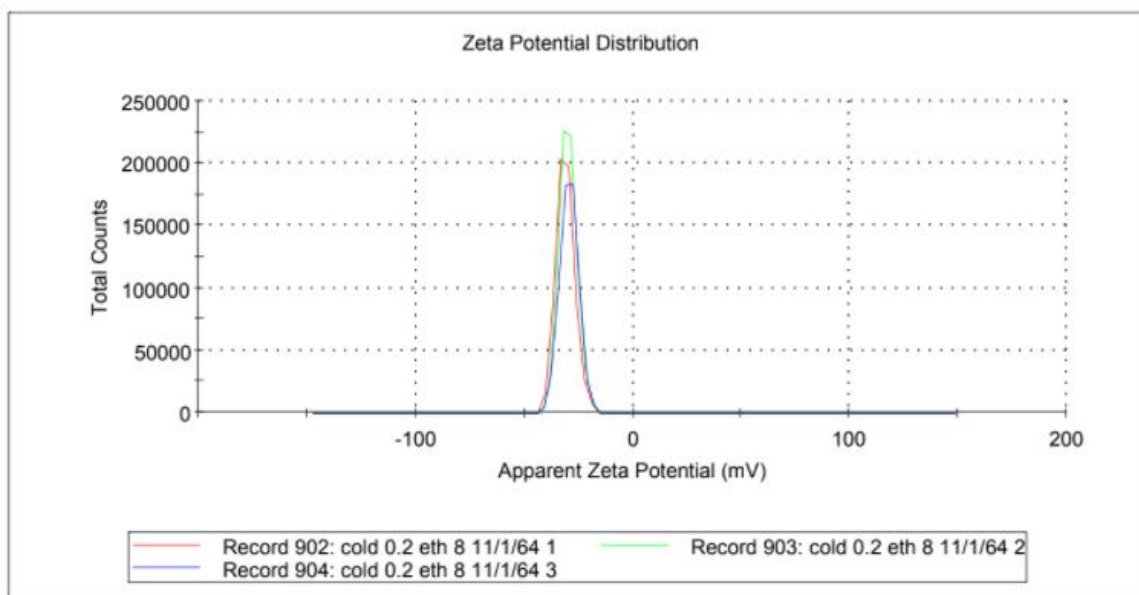
	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 134.6	Peak 1: 165.9	97.8	79.24
Pdl: 0.249	Peak 2: 4690	2.2	785.4
Intercept: 0.951	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



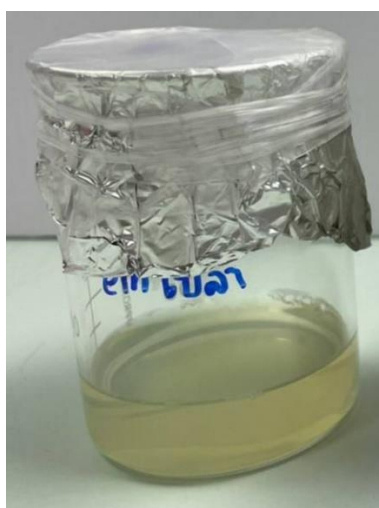
รูปที่ 18 กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ยังไม่ได้บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเตรียมด้วยฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -31.1	Peak 1: -31.1	100.0	4.20
Zeta Deviation (mV): 4.20	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0503	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			



รูปที่ 19 กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ยังไม่ได้บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเตรียมด้วยฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที



รูปที่ 20 ตำรับเอทโทโซมที่ยังไม่ได้บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

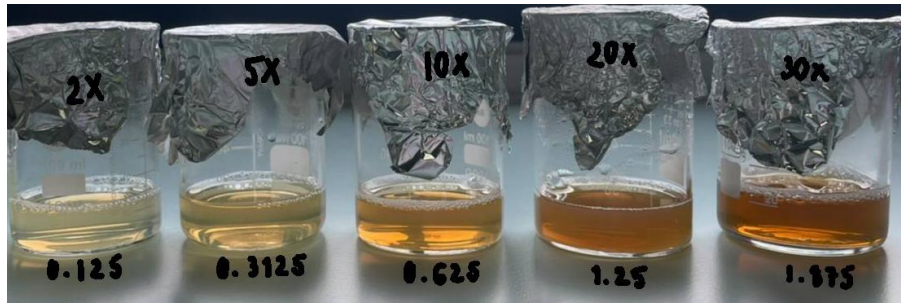
4.3 การศึกษาขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

จากการเลือกสูตรตำรับจากขั้นตอนที่ 3.3.4 ที่มีขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้า ซีต้าของอนุภาค ที่เหมาะสม เพื่อนำมาใส่สารสกัดจากเหง้ากระเทียมตามอัตราส่วนที่กำหนดได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9

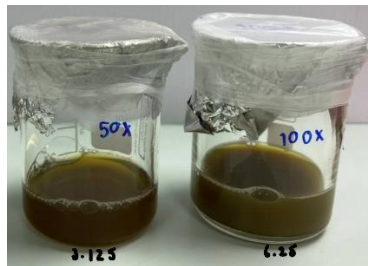
ตารางที่ 9 แสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่บรรจุลงในเอทโทโซม (มก./มล.)	Size mean± SD (nm)	PDI mean± SD (nm)	Zeta potential mean± SD (nm)
0.125	263.9±1.0	0.199±0.004	-24.37±0.45
0.3125	205.6±2.5	0.194±0.217	-27.17±1.32
0.625	235.0±4.9	0.193±0.026	-26.43±0.67
1.25	308.3±8.9	0.253±0.012	-26.23±1.88
1.875	306.4±5.0	0.245±0.014	-27.77±1.15
3.125	368.5±5.7	0.172±0.021	-24.27±1.10
6.25	354.2±3.6	0.118±0.017	-30.53±0.78

จากการทดลองบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมลงในเอทโทโซมพบว่า ขนาดที่ได้อยู่ในช่วงที่ต้องการคือ 100 – 300 nm และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าน้อยกว่า -20 mV ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับตำรับเอทโทโซม และตำรับที่เตรียมได้มีสีน้ำตาลเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 21 และ 22



รูปที่ 21 ตั้รับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 0.125, 0.3125, 0.625, 1.25 และ 1.875 มก./มล. ตามลำดับ

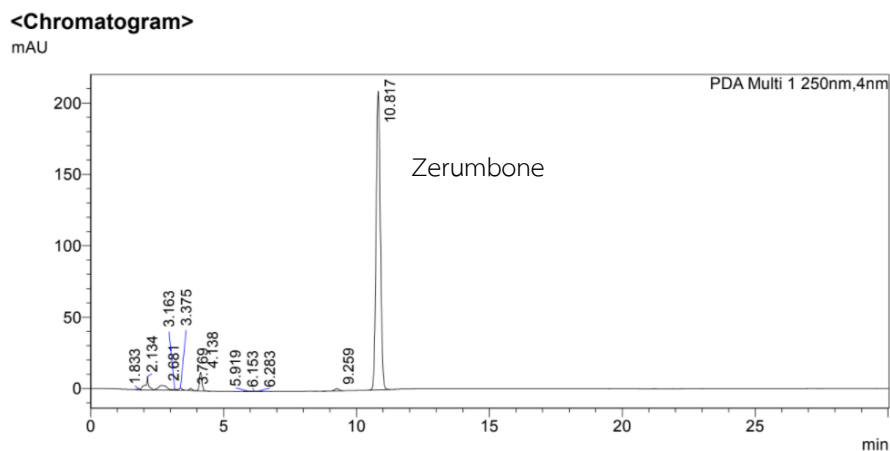


รูปที่ 22 ตั้รับเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 3.125 และ 6.25 มก./มล. ตามลำดับ

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของเหง้ากระเทียม ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

4.4.1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารละลายมาตรฐาน Zerumbone ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สารมาตรฐาน Zerumbone จะถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 10-11 นาทีจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ดังโครมาโตแกรม ในรูปที่ 23

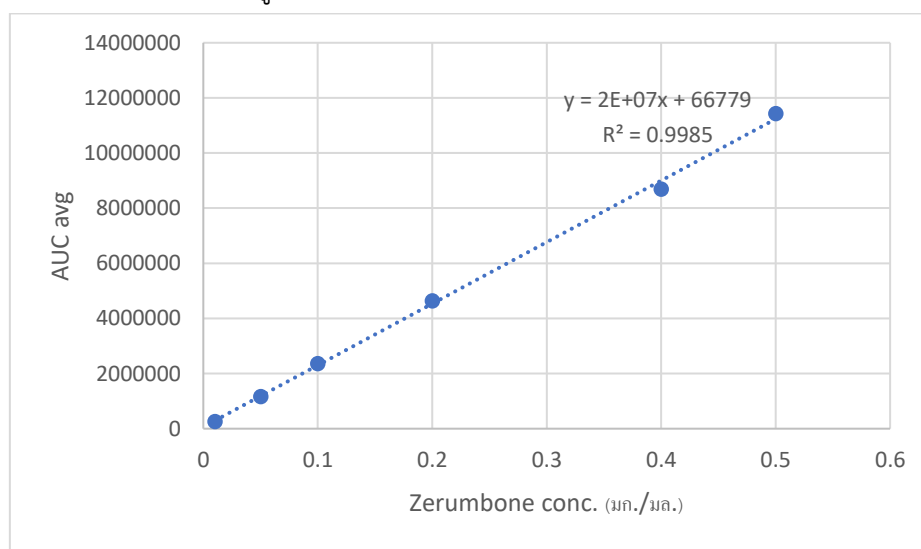


รูปที่ 23 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

4.4.2 กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน

1) สารละลายมาตรฐาน Zerumbone

จากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone ในช่วงความเข้มข้น 0.05-0.5 มก./มล. จากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง พบว่ากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone มีค่า correlation coefficient, R^2 เท่ากับ 0.9985 และสมการความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสาร Zerumbone คือ $y = 2E+07x + 66779$ ดังรูปที่ 24



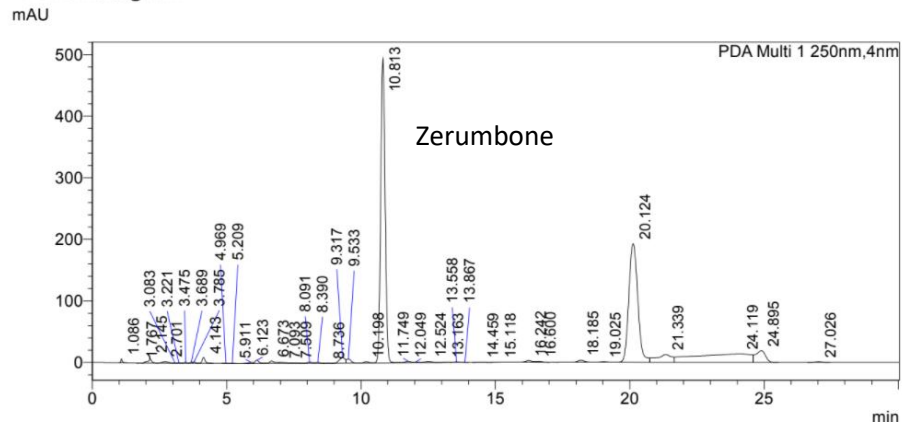
รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

4.4.3 โครมาโตแกรมของสารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม

1) การวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม 1 มก./มล. (1000 ppm) พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ะออกมาในเวลาประมาณ 10 นาที ตามรูปที่ 25

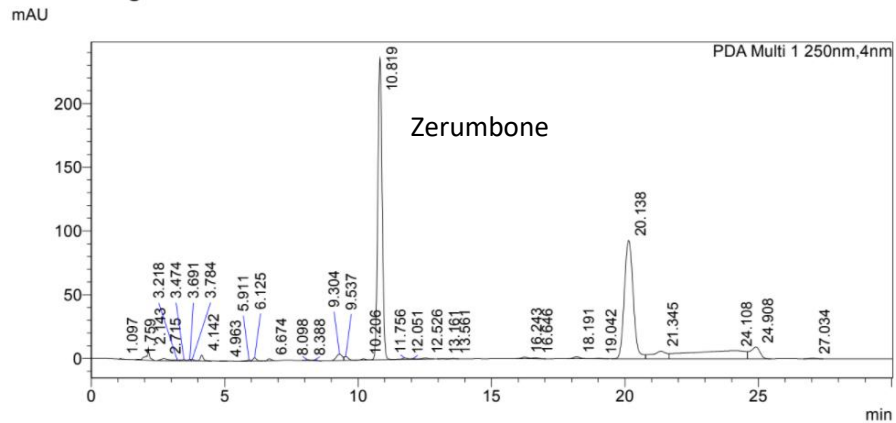
<Chromatogram>



รูปที่ 25 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 1 มก./มล.

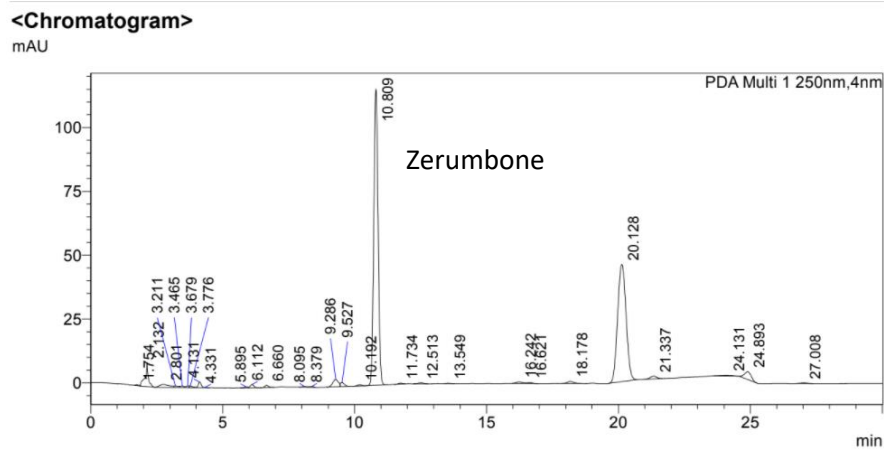
การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม 0.5 มก./มล. (500 ppm) พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ะออกมาในเวลาประมาณ 10 นาที ตามรูปที่ 26

<Chromatogram>



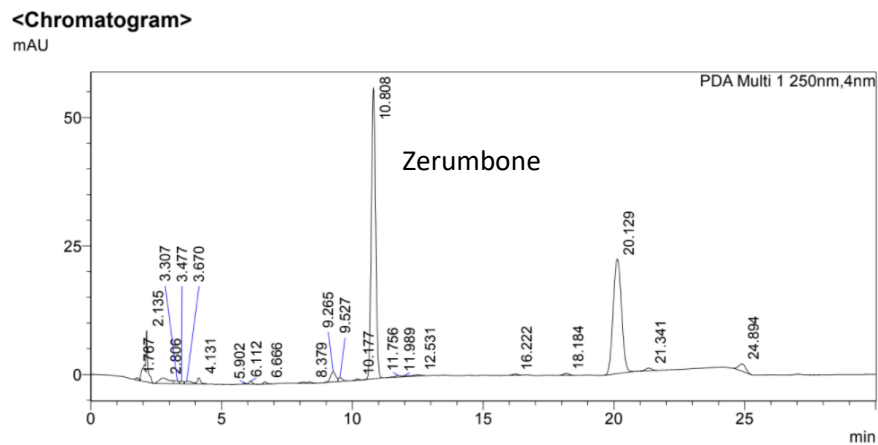
รูปที่ 26 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม 0.25 มก./มล. (250 ppm) พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ะออกมาในเวลาประมาณ 10 นาที ตามรูปที่ 27



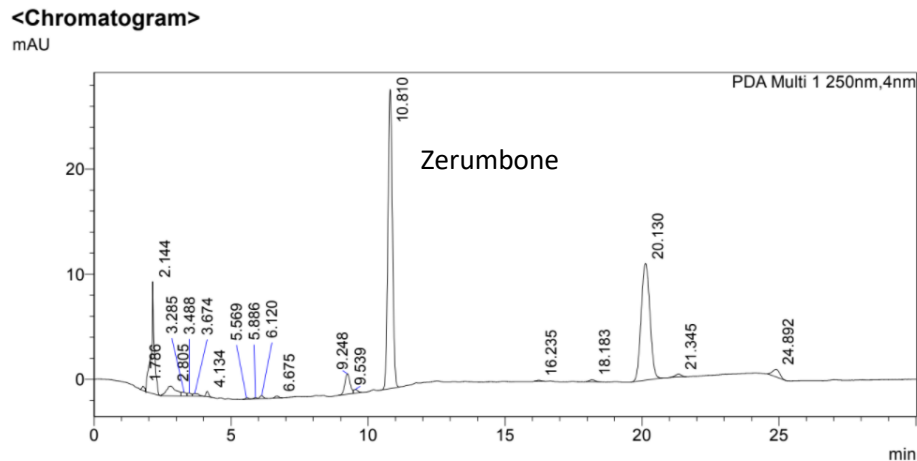
รูปที่ 27 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 0.25 มก./มล.

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม 0.125 มก./มล. (125 ppm) พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ะออกมาในเวลาประมาณ 10 นาที ตามรูปที่ 28



รูปที่ 28 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 0.125 มก./มล.

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม 0.0625 มก./มล. (62.5 ppm) พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ะออกมาในเวลาประมาณ 10 นาที ตามรูปที่ 29



รูปที่ 29 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 0.0625 มก./มล.

4.4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC ในสารสกัดเหง้ากระเทียม 5 ความเข้มข้นได้แก่ 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มก./มล. จากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง มีพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณสารสำคัญ แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียม

ความเข้มข้นสารสกัดเหง้ากระเทียม (มก./มล.)	AUC	ความเข้มข้นสารสำคัญ Zerumbone (มก./มล.)	ความเข้มข้นสารสำคัญ Zerumbone เฉลี่ย (มก./มล.) $\pm$ SD
1	5617100	0.27751605	0.27701238 $\pm$ 0.000448
	5604077	0.27686490	
	5599903	0.27665620	
0.5	2678187	0.13057040	0.13080770 $\pm$ 0.000280
	2681497	0.13073590	

	2689115	0.13111680	
0.25	1302850	0.06180355	0.06205350 ± 0.000217
	1310109	0.06216650	
	1310588	0.06219045	
0.125	635406	0.02843135	0.02846233 ± 2.766230
	636201	0.02847110	
	636470	0.02848455	
0.0625	320754	0.01269875	0.01268755 ± 9.704120
	320412	0.01268165	
	320424	0.01268225	

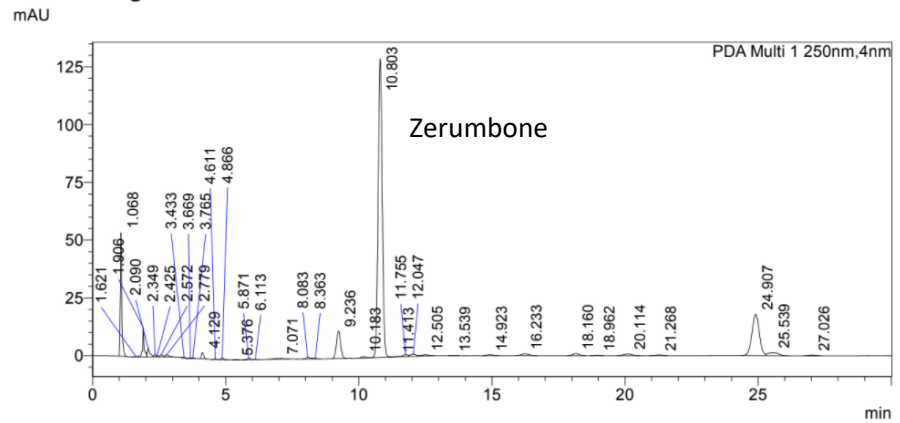
การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียม 5 ความเข้มข้นได้แก่ 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มก./มล. จากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 2E+07x + 66779$ พบว่ามีปริมาณ Zerumbone เฉลี่ย เท่ากับ 0.277012383, 0.1308077, 0.0620535, 0.02846233 และ 0.01268755 ตามลำดับ

4.4.5 โครมาโตแกรมของสารสำคัญในเอทโทโซม

1) การวิเคราะห์สารสำคัญในเอทโทโซม

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในเอทโทโซม 3.125 มก./มล. (50X) พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ะออกมาในเวลาประมาณ 10 นาที รูปที่ 30

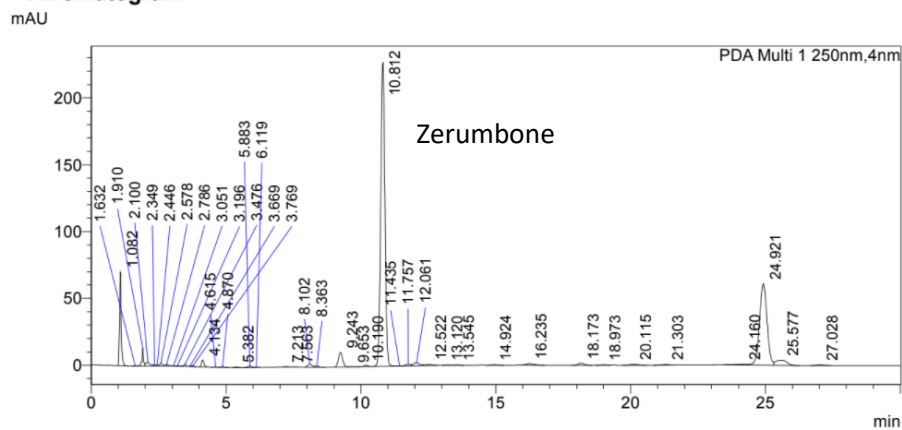
<Chromatogram>



รูปที่ 30 โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 3.125 มก./มล.

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในเอทโทโซม 6.25 มก./มล. (100X) พบว่ามีสารสำคัญ Zeurumbone ะออกมาในเวลาประมาณ 10 นาที รูปที่ 31

<Chromatogram>



รูปที่ 31 โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 6.25 มก./มล.

4.4.6 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในเอทโทโซม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (% Entrapment efficiency) ด้วยเครื่อง

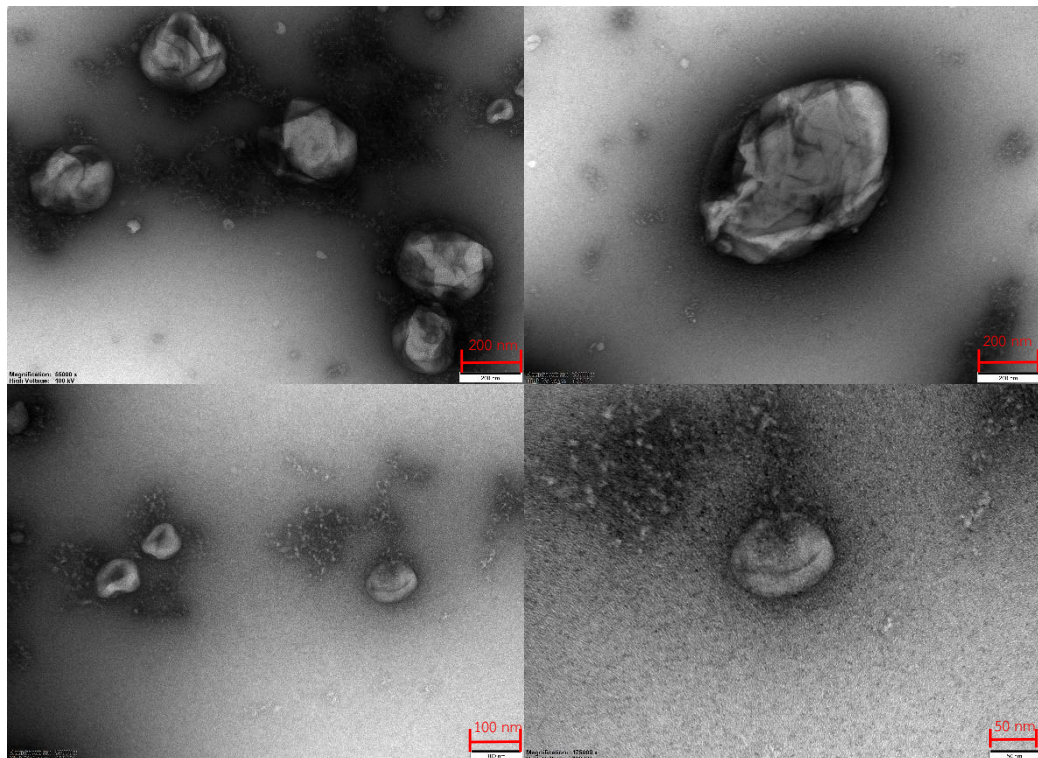
HPLC

ตารางที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (% Entrapment efficiency)

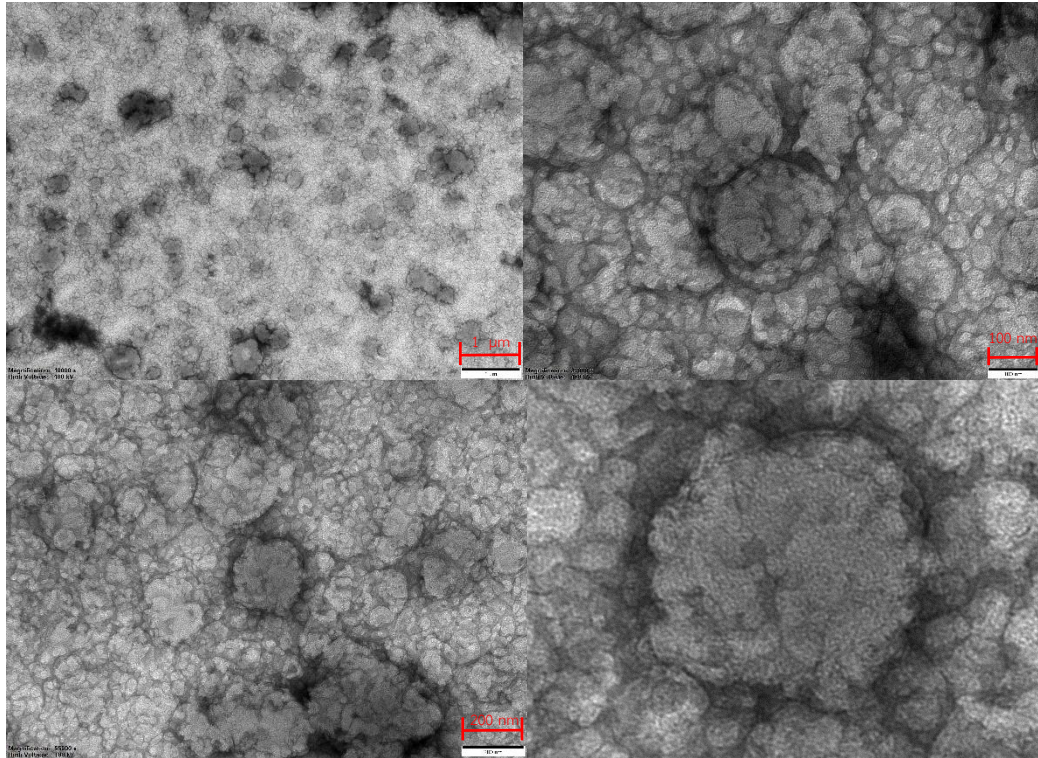
ความเข้มข้นสารสกัดแห้ง กระตือในเอทโทโซม (มก./ มล.)	AUC	% Entrapment	% Entrapment เฉลี่ย $\pm$ SD
3.125 (50X)	1374972	24.44	24.42 $\pm$ 0.04
	1376145	24.37	
	1374863	24.45	
6.25 (100X)	2435582	31.59	31.58 $\pm$ 0.05
	2434374	31.62	
	2437676	31.53	

4.5 การศึกษาลักษณะภายในและภายนอกของอนุภาคเอทโทโซม (เอทโทโซม morphology)

ศึกษาลักษณะภายในและภายนอกโดยนำตัวอย่างไปส่องด้วยกล้อง Transmission electron microscopy (TEM) ดังแสดงในรูปที่ 31 และ 32



รูปที่ 32 แสดง Morphology ของเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัด โดยส่องผ่านกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 55000x, 89000x, 175000x



รูปที่ 33 แสดง Morphology ของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือความเข้มข้น 0.125 มก./มล. โดยส่องผ่านกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 10000x, 55000x, 89000x,

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยการส่องกล้อง Transmission electron microscopy (TEM) ด้วยเทคนิค negative staining พบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100 - 300 nm และจากรูปจะสังเกตได้ว่าเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือและเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือมีลักษณะเป็นถุงมีขอบซึ่งเป็นลักษณะของ เอทโทโซมชนิด unilamellar vesicle โดยเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือมีการกระจายขนาดที่มากกว่าเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ของสารสำคัญจากเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ

จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากเหง้ากระทือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* โดยใช้การอ่านผล MFC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารแข็ง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้สังเกตหลอดทดลองที่มีลักษณะไม่ขุ่น/ใสเมื่อเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ ถือได้ว่าเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากเหง้ากระทือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ซึ่งพบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 3.9-1000 มก./มล. สารในหลอดทดลองมีลักษณะไม่ขุ่น ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ คือ 62.5 มก./มล. รูปผลการทดลองแสดงในตารางที่ 12

การคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดจากเหง้ากระทือที่บรรจุเอทโทโซมเนื่องจากเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อคำนวณได้จากสมการที่ 3

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = มาจากการบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ 100 เท่าเมื่อเทียบกับค่า MFC ซึ่งเท่ากับ 62.5 มก./มล. $\times 100 = 6,250$ มก./มล.

V_1 = ปริมาตรของตำรับเอทโทโซมบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ ที่ถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาปิเปตลงในอาหาร เพื่อดูฤทธิ์การต้านเชื้อรา ซึ่งเท่ากับ 100 มล.

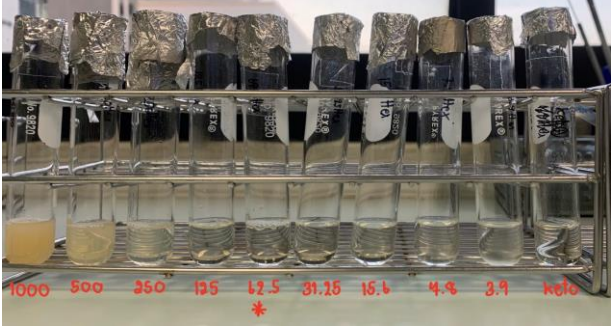
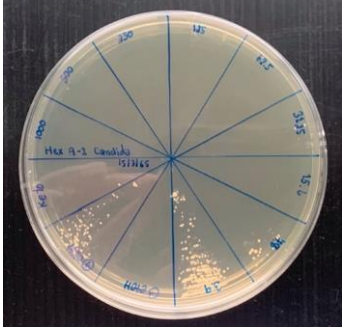
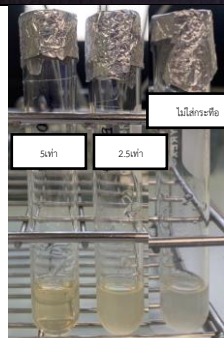
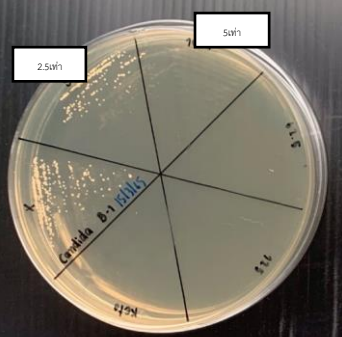
V_2 = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจือจางตำรับเอทโทโซมบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ ผสมกับเชื้อ ซึ่งเท่ากับ 1,900 มล. + 100 มล. = 2,000 มล.

จะได้ว่า $(6,250 \text{ มก./มล.})(100 \text{ มล.}) = C_2 (2000 \text{ มล.})$

$$C_2 = 312.5 \text{ มก./มล.}$$

ดังนั้น 312.5 มก./มล. คิดเป็น 5 เท่าของ MFC

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. albicans*

ตัวอย่างการวิเคราะห์	ผลการทดสอบ	ภาพประกอบ
การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม 3.9-1000 มก./มล. ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา <i>C. albicans</i> ได้เทียบกับ Ketoconazole	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ (MFC) คือ 62.5 มก./มล.	 
การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถยับยั้งเชื้อรา <i>C. albicans</i> ได้	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีที่สุดคือ 5 เท่าของ MFC เท่ากับ 6.250 มก./มล.	 

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Agar well diffusion method แต่ละความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* รูปผลการทดลองแสดงในตารางที่ 14

การคำนวณความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ โดยมีค่า MFC 62.5 มก./มล. แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การคำนวณความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ

สารสกัด	Formulations						
	2X	5X	10X	20X	30X	50X	100X
เอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ (มก./มล.)	125	312.5	625	1250	1875	3125	6250
เอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ (มก./ μ l)	0.125	0.3125	0.625	1.250	1.875	3.125	6.250
หยดลงหลุม 20 μ l ดังนั้นจะมีเนื้อสาร (มก.)	2.5	6.25	12.5	25	37.5	62.5	125

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Agar well diffusion method แต่ละความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* (n=3)

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	พื้นที่การยับยั้งเชื้อ $\pm$ SD (มม.)	ภาพประกอบ
Ketoconazole (50 มก./มล.)	16.7 $\pm$ 0.6	
ความเข้มข้นของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เป็น 2, 5, 10, 20, 30 เท่า ของ MFC และเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดเหง้ากระทือ	ไม่มีฤทธิ์การยับยั้ง	

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

สกัดสารจากเหง้ากระเทียมโดยวิธีการแช่หมักด้วยเฮกเซน และระเหยสารสกัดจนแห้งจะได้สารสกัดมีลักษณะขุ่นหนืด สีน้ำตาลเข้ม และมีปริมาณสารสกัดเหง้ากระเทียมเท่ากับร้อยละ 3.8 จากงานวิจัย ประโยชน์ทางเภสัชกรรมของพืชสมุนไพรภาคตะวันออกของประเทศไทย พบว่าการสกัดส่วนของเหง้ากระเทียมด้วยเฮกเซนให้ร้อยละผลผลิตมากกว่าไคคโลโรมีเทน และเมทานอล และจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา พบว่าสารสกัดด้วยเฮกเซนให้ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และ MFC (Minimum Fungicidal Concentration) น้อยกว่าไคคโลโรมีเทน และเมทานอล

5.2 การศึกษาขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

5.2.1 การหาสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับทำเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

เมื่อทำการเตรียมตำรับเอทโทโซมด้วยวิธี cold method เริ่มแรกโดยการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักฟอสโฟลิพิด คือ Soya lecithin พบว่าที่น้ำหนักฟอสโฟลิพิด 200 มก. ให้ขนาดอนุภาคของเอทโทโซมเล็กที่สุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับฟอสโฟลิพิด 300 และ 400 มก. ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับฟอสโฟลิพิด 100 มก. เมื่อทำการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าพบว่าที่ ฟอสโฟลิพิด 200 มก. ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเป็นลบน้อยที่สุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการใส่ฟอสโฟลิพิดน้ำหนัก 100 มก. แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับฟอสโฟลิพิด 300 และ 400 มก. ตามลำดับ ดังนั้นการเลือกตำรับเอทโทโซมที่มีฟอสโฟลิพิดน้ำหนัก 200 มก. จึงมีความเหมาะสมมากที่สุด โดยเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้า (28) พบว่าการใช้ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin ให้ขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วง 100 – 200 nm และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อใส่ฟอสโฟลิพิดเพิ่มขึ้น โดยการศึกษาท่อน้ำได้เลือกสูตรที่ดีที่สุดเป็นน้ำหนักฟอสโฟลิพิด 200 มก. เช่นกัน การที่อนุภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อใส่ฟอสโฟลิพิดเพิ่มขึ้นนั้น เนื่องจากเอทโทโซมเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดเรียงตัวซ้อนกันสองชั้นสลับกับชั้นน้ำ โดยส่วนหัวเป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ดี และส่วนหางเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (18) ดังนั้นเมื่อใส่ฟอสโฟลิพิดปริมาณมากขึ้นส่งผลให้เอทโทโซมเรียงตัวซ้อนกันมากขึ้น ทำให้เกิดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ในการศึกษาอื่น ๆ ยังพบว่าการเพิ่มปริมาณฟอสโฟลิพิด

ส่งผลให้เอทโทโซมมีขนาดใหญ่ขึ้น (17, 19, 20) และปริมาณ ฟอสโฟลิพิดอาจส่งผลต่อค่า ศักย์ไฟฟ้าซีต้าได้อีกด้วย (21) สำหรับค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าสามารถใช้เป็นพารามิเตอร์บอกถึง ระดับความเสถียรของอนุภาคคอลลอยด์ได้ โดยระบบคอลลอยด์ที่มีเสถียรภาพสูงจะมีค่า ศักย์ไฟฟ้าซีต้าสูงโดยไม่ขึ้นกับประจุ ซึ่งส่งผลให้อนุภาครวมตัวและตกตะกอนลงมาได้ยาก (22) ดังนั้นจึงควรเลือกตำรับที่มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าสูงโดยไม่ขึ้นกับค่าประจุที่ปรากฏ จากนั้น ได้ทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเอทานอลในตำรับพบว่าเมื่อใส่ฟอสโฟลิพิดน้ำหนัก 200 มก. และตัวทำละลายเอทานอล 8 มล. จะให้ขนาดอนุภาคเล็กที่สุด ซึ่งแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ การใส่ตัวทำละลายเอทานอลปริมาณ 5, 6 และ 9 มล. เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (28) พบว่าการใช้ฟอสโฟลิพิดชนิด Soya lecithin และใส่ ปริมาณเอทานอลในจำนวนหนึ่งจะทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กลงกว่าการใส่ฟอสโฟลิพิด น้ำหนัก 100 มก. เนื่องจากเอทานอลจะรบกวนการจัดเรียงตัวของชั้นไขมัน ทำให้ฟอสโฟ ลิพิดที่กำลังรวมตัวกันมีขนาดอนุภาคเล็กได้ (29) เมื่อดูที่ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าพบว่า การใช้ ปริมาณเอทานอลที่แตกต่างกัน ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการใช้เอทานอล 8 มล. ไม่ได้ให้ขนาดซีต้าที่มากที่สุดโดยไม่ขึ้นกับประจุ แต่ยังมีค่าอยู่ ในช่วงที่ต้องการคือน้อยกว่า -20 mV เนื่องจากสารละลายเอทานอลในตำรับเอทโทโซม ทำ ให้อนุภาคบนพื้นผิวของถุงเปลี่ยนเป็นประจุลบ ดังนั้นอนุภาคใด ๆ ที่มีเอทานอลเป็น องค์ประกอบจะมีค่าศักย์ไฟฟ้าติดลบ และพบได้ในช่วง -20.9 ถึง -35.6 mV (20) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กลงอีกด้วย (17) ดังนั้นการเลือกปริมาณเอทานอลที่เหมาะสมสำหรับตำรับนี้คือ 8 มล. เมื่อพิจารณาเวลา sonicate ของตำรับ พบว่าเมื่อทำการ sonicate 15 นาที ส่งผลให้ขนาดของอนุภาคแตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเวลา 0 และ 5 นาที ในด้านของซีต้าโพ เทนเชียล เมื่อทำการ sonicate ที่เวลา 15 นาที ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเวลา 5 และ 10 นาที ตามลำดับ โดยที่เวลา 15 นาที ให้ค่า ศักย์ไฟฟ้ามากขึ้นโดยไม่ขึ้นกับประจุ ในการ sonicate จะทำให้เกิดแรงในอนุภาคให้เกิดเป็น ฟองภายในเอทโทโซม ส่งผลให้เอทโทโซมที่มีขนาดใหญ่แตกออก และจะรวมตัวกันใหม่เป็น เอทโทโซมที่มีขนาดเล็กลง (23,29) ดังนั้นการเลือก sonicate ที่เวลา 15 นาที จึงเหมาะสม สำหรับตำรับมากที่สุด

5.2.2 การหาสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับทำเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

เมื่อนำสูตรตำรับเอทโทโซมที่ได้มาบรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมพบว่าเมื่อความ เข้มข้นของเหง้ากระเทียมเพิ่มขึ้น ทำให้ขนาดของอนุภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจาก อนุภาคเอทโทโซมอาจมีการกักเก็บสารสกัดจากเหง้ากระเทียมด้วยหลักการ like dissolve

like ทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่ได้อยู่ในช่วงน้อยกว่า -20 mV ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม แต่เมื่อเทียบกับเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม ยังให้ค่าที่เป็นลบน้อยกว่า ซึ่งอาจทำให้เอทโทโซมมีเสถียรภาพไม่ดีได้ เมื่อตั้งทิ้งไว้ มีโอกาสที่จะรวมกันเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น ดังนั้นอาจต้องมีการพัฒนาตำรับโดยการใส่สารที่ช่วยเพิ่มประจุลบบนพื้นผิวของถุงเอทโทโซมให้มีค่ามากขึ้น เพื่อให้เกิดแรงผลักระหว่างประจุชนิดเดียวกัน เพื่อลดโอกาสที่จะทำให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคลงได้

5.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา

ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) *C. albicans* คือ 62.5 มก./มล. และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC) *C. albicans* คือ 62.5 มก./มล. ซึ่งมีค่าความเข้มข้นเท่ากันเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้เรื่องประโยชน์ทางเภสัชกรรมของพืชสมุนไพรภาคตะวันออกของประเทศไทย

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของเหง้ากระเทียมและเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระเทียม ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography)

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มก./มล. และสารสำคัญจากเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 3.125 และ 6.25 มก./มล. พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ซึ่งถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 10-11 นาทีจากการอ้างอิง Akhtar และ คณะ (24) พบว่าในการสกัดสารสำคัญ Zerumbone จากเหง้ากระเทียมโดยการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ปริมาตรฉีด 20 ไมโครลิตร flow rate 1.2 มล./min ใช้คอลัมน์ C_{18} และตัวทำละลายภายในเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) 2 ชนิด คือ acetonitrile และ น้ำแบบไล่อัตราส่วน (gradient elution) จาก acetonitrile 65% - 75% ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 3 มก./มล. มีสารสำคัญ Zerumbone ชะออกมาในเวลา 9.745 นาที และมีปริมาณอยู่ในช่วง 125 - 1000 มก./มล.

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มก./มล. พบว่ามีปริมาณ เท่ากับ 0.277 (± 0.00), 0.131 (± 0.00), 0.062 (± 0.00), 0.028 (± 0.00) และ 0.013 (± 0.00) มก./มล. ตามลำดับ และการวิเคราะห์สารสำคัญจากเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 3.125 และ 6.25 มก./มล. พบว่ามีปริมาณ

zerumbone เท่ากับ $0.654 (\pm 0.00)$ และ $1.185 (\pm 0.00)$ มก./มล. ตามลำดับ เพื่อนำไปศึกษาการกักเก็บสารสกัดจากเหง้ากระเทียมในอนุภาคเอทโทโซม

5.5 การศึกษาการกักเก็บสารสกัดจากเหง้ากระเทียมในอนุภาคเอทโทโซม (% Entrapment efficacy)

การศึกษาการกักเก็บของอนุภาคเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 3.125 และ 6.25 มก./มล. พบว่ามี % Entrapment efficacy เท่ากับ $24.42 (\pm 0.04)$ และ $31.58 (\pm 0.05)$ ตามลำดับ % Entrapment efficacy เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม โดยการกักเก็บสารสกัดเหง้ากระเทียมอาศัยหลักการ “like dissolves like” คือกระเทียมละลายอยู่ในชั้นไขมัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดเหง้ากระเทียมมากขึ้น ทำให้ละลายในไขมันได้มากขึ้น เป็นผลให้การกักเก็บเพิ่มขึ้น (18)

5.6 การศึกษาลักษณะภายในและภายนอกของอนุภาคเอทโทโซม (Ethosome morphology)

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยการส่องกล้อง Transmission electron microscopy (TEM) ด้วยเทคนิค negative staining พบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100 - 300 nm และจากรูปจะสังเกตเห็นว่ามีลักษณะเป็นถุงมีขอบซึ่งเป็นลักษณะของเอทโทโซม ชนิด unilamellar vesicle โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะอนุภาคจากงานวิจัย Eun Jung An และคณะ (25) พบว่าลักษณะของอนุภาคเอทโทโซม เป็นชนิด multilamellar vesicle และมีขนาดใหญ่กว่า 500 nm ซึ่งใหญ่กว่าเอทโทโซมชนิด unilamellar โดยขนาดของอนุภาคที่เล็กสามารถแพร่ผ่านชั้นผิวหนังได้ง่ายและดีขึ้น

5.7 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สารสกัดเหง้ากระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางผิวหนัง คือ *Candida albicans* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ได้เท่ากับ 62.5 มก./มล. และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ได้เท่ากับ 62.5 มก./มล.

จากการพัฒนาสูตรตำรับเอทโทโซมแสดงให้เห็นว่า การใช้น้ำหนักของ ฟอสโฟลิพิด 200 มก. ปริมาณ เอทานอล 8 มล. ใช้เวลา sonicate 15 นาที และใช้การประเมินขนาดของอนุภาค ร่วมกับผลของศักย์ไฟฟ้าศักย์ไฟฟ้าซีต้า เป็นสูตรตำรับที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปทดลองในขั้นต่อไป ในการใส่สารสกัดจากเหง้ากระเทียม พบว่าเอทโทโซมสามารถกักเก็บสารสกัดจากเหง้ากระเทียมความเข้มข้น 3.125 มก./มล. และ 6.25 มก./มล. ได้ร้อยละ 24.42 และ 31.58 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามควรมีการประเมินการทดสอบการซึมผ่านของสารทางรูขุมขนในผิวหนัง (19) ซึ่งมีความสำคัญสำหรับการประเมินประสิทธิภาพของระบบการนำส่งยาเพราะเป็นการแสดงถึงการนำส่งของยาเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายที่ต้องการและสามารถออกฤทธิ์ที่อวัยวะนั้นได้ โดยมีการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบนอกร่างกาย (*In vitro* skin permeation study) โดยนิยมใช้เครื่องมือการทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง (Diffusion cell) ซึ่งมีอยู่ 2 ประเภท ได้แก่ เครื่องทดสอบการซึมผ่านผิวหนังแนวนอน (Side by side diffusion cell หรือ Horizontal cell) และเครื่องทดสอบการซึมผ่านผิวหนังแนวตั้ง (Franz diffusion cell หรือ Vertical cell) และการทดลองโดยใช้เทคนิคการลอกผิวหนังชั้นนอก (Skin stripping) (26) หลังจากทดลองการซึมผ่านทางผิวหนังแบบนอกร่างกายเสร็จแล้ว ผิวหนังจะถูกลอกชั้นนอกออกเพื่อหาปริมาณยาที่สะสมอยู่ในชั้นผิวหนังด้วยเทคนิคลอกเทป (Tape stripping technique) ซึ่งจะวางแปะแผ่นเทปที่ผิวหนังด้านบนและดึงลอกเทปออกต่อเนื่องกันประมาณ 20 ครั้ง โดยชั่งน้ำหนักของแผ่นเทปก่อนและหลังทำการลอกเทปเพื่อให้ทราบน้ำหนักของผิวหนังชั้น stratum corneum ที่ถูกลอกออกมากับเทปแต่ละแผ่น และควรมีการศึกษาความคงตัวของอนุภาค (vesicular stability) ศึกษาได้โดยวัดขนาดของอนุภาค (27) โดยใช้เครื่องมือ Dynamic Light Scattering (DLS) เมื่อเก็บตัวรับไว้เป็นระยะเวลาสั้น ๆ หรือสภาวะแรงต่าง ๆ จากนั้นจึงดูลักษณะภายในของอนุภาคเอทโทโซมอีกครั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่านเพื่อยืนยันผลความคงตัว

จากการทดลองจึงสรุปได้ว่าการเตรียมเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือที่พัฒนาขึ้น มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อได้ และมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อไปด้านการรักษาอื่น ๆ ได้ คณะผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะในการพัฒนาตัวรับโดยทำการประเมินการทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง และการศึกษาความคงตัวเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Chaiyamahapurk S, Warnnissorn P. Prevalence and Pattern of Diseases of The Skin and Subcutaneous Tissue in A Primary Care Area in Thailand. Siriraj Medical Journal. 2021;73(6):357-62.
2. Organization WH. Epidemiology and Management of Common Skin Diseases in Children in Developing Countries. Epidemiology and Management of Skin Diseases. 2005;3(12).
3. กัญญลักษณ์ มั่นพรหม. โรคผิวหนังติดเชื้อแบคทีเรีย. คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. [Internet]. 2020. [cited 2021 Sep. 3]. Available from: https://www.si.mahidol.ac.th/th/division/HpH/admin/download_files/36_49_1.
4. เชิดชัย สุนทรภาส. แนวทางปฏิบัติการติดเชื้อราในร้านยาสาขาวิชาเภสัชกรรมคลินิก. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. [Internet]. 2019. [cited 2021 Sep. 3]. Available from: <https://ccpe.pharmacycouncil.org>
5. อุไรวรรณ ส่งเสียง, จริยา หาญจนวงศ์, ชนกพร เผ่าศิริ. Structural Modification of Zerumbone From Zingiber zerumbet Smith and Their Biological Activities. (การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของซีรัมโบนจากกะทือและฤทธิ์ทางชีวภาพ). [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep. 3]. Available from: <https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/gskku/article/view/24016>.
6. ณัฏฐิรา สมารักษ์. การพัฒนาพืชสมุนไพรท้องถิ่นในจังหวัดจันทบุรี เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในพืช [Internet]. 2016 [Cited 2021 Sep. 1]. Available From: http://Digital_Collect.Lib.buu.ac.th/Research/2563_346.Pdf
7. กระทือ - ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ ม.อุบล; phargarden.com [Internet]. 2019. [cited 2021 Oct. 24]. Available from: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=200>
8. ปฐมาพร ปรีกษากร, นันทวรรณ เมฆา, รินทร์ลภัส อรรถเจียรไชย. ฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยสารสกัดจากเอทานอลในพืชวงศ์ขิง. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2559;14(3):286-95.
9. Centers for Disease Control and Prevention. [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep. 5]. Available from: <https://www.cdc.gov/fungal/antifungal-resistance.html>.

10. วิรัตน์ ทองรอด. โรคผิวหนังจากเชื้อราที่พบบ่อย. เกสัชกรรมสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ [Internet]. 2018. [cited 2021 Sep. 3]. Available from: <https://ccpe.pharmacycouncil.org>
11. พรพรรณ ภูมิรัตน์, นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ. เชื้อราทางการแพทย์. Journal of Medicine and Health Sciences. 2013;20(2):31-44.
12. แพทย์แผนไทยเห่าซ่าแก่สมุนไพรรักษาโรคน้ำกัดเท้า ตามศาสตร์ภูมิปัญญา การแพทย์แผนไทย [Internet]. Dtam.moph.go.th. 2021 [cited 2021 Sep. 7]. Available from: <https://www.dtam.moph.go.th/index.php/th/dtam-news/dn/7546-dn0048.html>.
13. คัทลียา เมฆจรัสกุล. การดูดซึมทางผิวหนัง (Percutaneous absorption). คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
14. Kim, B., Cho, HE., Moon, S.H. et al. Transdermal delivery systems in cosmetics. biomed dermatol 4, 10 (2020). <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0058-7>.
15. Allen LV, Popovich NG, Ansel HC. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 2011. 9th ed: Wolters Kluwer; China.
16. ผศ.ดร.ภญ.ลลนา คงคาเนรมิตร. บทความวิชาการเพื่อการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์ เรื่อง โกลโปโซม : พัฒนาการจากอดีตจนถึงปัจจุบันและการใช้ประโยชน์. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
17. Abdulbaqi IM, Darwis Y, Khan NA, Assi RA, Khan AA. Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. Int J Nanomedicine. 2016;11:2279-304.
18. บุณณดา ภูมิปฐมกุล และ ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์.เอทโทโซมสำหรับระบบนำส่งยาทางผิวหนัง (ETHOSOME FOR TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEMS). TBPS 10(1);2015: 48-60
19. Jain S TA, Sapra B, Jain NK. Formulation and evaluation of เอทโทโซม for transdermal delivery of Lamivudine. AAPS PharmSciTech. 2007;8(4).
20. Limsuwan T, Boonme P, Khongkow P, Amnuakitt T. เอทโทโซม of Phenylethyl Resorcinol as Vesicular Delivery System for Skin Lightening Applications. Biomed Res Int. 2017;2017:8310979.

21. Parkhe G, Jain P, Ray SK, Dangsi S, Upmanyu N, Zahid SR. เอทโทโซม: a novel vesicular carrier for transdermal drug delivery. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2018;8(6):318-26.
22. เกศินี ศรีรัตนโชติ. ผลของชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ต่อคุณลักษณะทางกายภาพของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน (Effects of Emulsifiers on Physical Properties of β -Carotene Nanoemulsion). *Thai Journal of Science and Technology*. 2019;8(620-632).
23. Zhang H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. *Methods Mol Biol*. 2017;1522:17-22. doi: 10.1007/978-1-4939-6591-5_2. PMID: 27837527.
24. Akhtar nmY, Jantan, I., Arshad, L. et al. Standardized ethanol extract, essential oil and zerumbone of Zingiber zerumbet rhizome suppress phagocytic activity of human neutrophils. *BMC Complement Altern Med* 19, 331 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2748-5>.
25. Eun Jung An JS, Jang Won Choi, Jin-Woong Kim, Won Seok Park, Han-Kon Kim et al. Enhanced Transdermal Delivery of Drug Compounds Using Scalable and Deformable ethosome. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* Vol. 36, No. 2, June 2010, 105-113.
26. Ossadnik M CV, Teichmann A, Sterry W, Tietz H-J, Lademann J, et al. Differential stripping: Introduction of a method to show the penetration of topically applied antifungal substances into the hair follicles. *Mycoses*. 2007;50(6):457–62. .
27. Godin B TE. ethosome: New prospects in transdermal delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2003;20(1):63–102.
28. Paliwal S, Tilak A, Sharma J, Dave V, Sharma S, Yadav R, et al. Flurbiprofen loaded ethosomes - transdermal delivery of anti-inflammatory effect in rat model. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):133.
29. สุริวัลย์ ดวงจิตต์ และ ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์. การเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังด้วยไลโปโซมและสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านทาง. *วัคซีนวาระแห่งชาติดิยทุทธศาสตร์เพื่อการวิจัย-ผลิต* 1(1);2011: 37-42

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเปลี่ยน
น้ำหนักของ ฟอสโฟลิปิด

ฟอสโฟลิพิด	เอทานอล	Size			PDI			Zeta potencial		
			mean	SD		mean	SD		mean	SD
100	7	156.0	152.5	4.8	0.429	0.453	0.051	-27.50	-27.73	1.66
		147.0			0.511			-26.20		
		154.5			0.419			-29.50		
200		141.7	140.8	0.8	0.415	0.404	0.010	-32.80	-32.40	0.53
		140.6			0.402			-31.80		
		140.1			0.395			-32.60		
300		183.8	184.1	0.3	0.274	0.279	0.008	-29.10	-30.30	1.20
		184.3			0.276			-31.50		
		184.1			0.288			-30.30		
400		186.4	182.0	3.8	0.412	0.427	0.021	-30.80	-31.57	1.24
		180.2			0.419			-33.00		
		179.4			0.451			-30.90		

ตารางแสดงสถิติของค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม เมื่อเปลี่ยนน้ำหนักของพอสโพลิทิด

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zavg	0.1	3	152.5	4.82183	2.78388	140.5219	164.4781	147	156
	0.2	3	140.8	0.81854	0.47258	138.7666	142.8334	140.1	141.7
	0.3	3	184.0667	0.25166	0.1453	183.4415	184.6918	183.8	184.3
	0.4	3	182	3.83145	2.21209	172.4822	191.5178	179.4	186.4
	Total	12	164.8417	19.67996	5.68112	152.3376	177.3457	140.1	186.4
	0.1	3	-27.7333	1.66233	0.95975	-31.8628	-23.6039	-29.5	-26.2
	0.2	3	-32.4	0.52915	0.30551	-33.7145	-31.0855	-32.8	-31.8
	0.3	3	-30.3	1.2	0.69282	-33.281	-27.319	-31.5	-29.1
	0.4	3	-31.5667	1.24231	0.71725	-34.6527	-28.4806	-33	-30.8
	Total	12	-30.5	2.11875	0.61163	-31.8462	-29.1538	-33	-26.2

Multiple Comparisons

Dependent variable		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Zavg	0.2	11.7	2.82371	0.146	-8.5634	31.9634
	0.3	-31.56667*	2.78767	0.023	-52.7451	-10.3882
	0.1	0.4	-29.50000*	0.006	-45.4555	-13.5445
	0.1	0.1	-11.7	2.82371	-31.9634	8.5634
	0.3	0.3	-43.26667*	0.49441	-46.4174	-40.1159
	0.2	0.4	-41.20000*	2.26201	-56.8968	-25.5032
	0.1	0.1	31.56667*	2.78767	10.3882	52.7451
	0.2	0.2	43.26667*	0.49441	40.1159	46.4174
	0.3	0.4	2.06667	2.21685	-14.7137	18.847
	0.1	0.1	29.50000*	3.55575	13.5445	45.4555
	0.2	0.2	41.20000*	2.26201	25.5032	56.8968
	0.4	0.3	-2.06667	2.21685	-18.847	14.7137
	0.2	0.2	4.66667*	1.00222	1.4572	7.8761
	0.3	0.3	2.56667	1.00222	-0.6428	5.7761
	0.1	0.4	3.83333*	1.00222	0.6239	7.0428
	0.1	0.1	-4.66667*	1.00222	-7.8761	-1.4572
	0.3	0.3	-2.1	1.00222	-5.3095	1.1095
	0.2	0.4	-0.83333	1.00222	-4.0428	2.3761
	0.1	0.1	-2.56667	1.00222	-5.7761	0.6428
	0.2	0.2	2.1	1.00222	-1.1095	5.3095
ศักย์ไฟฟ้าซีต้า	0.3	0.4	1.26667	1.00222	-1.9428	4.4761
	0.1	0.1	-3.83333*	1.00222	-7.0428	-0.6239
	0.2	0.2	0.83333	1.00222	-2.3761	4.0428
	0.4	0.3	-1.26667	1.00222	-4.4761	1.9428

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

ตารางแสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม ที่ เอทานอล ปริมาณต่าง ๆ

ฟอสโฟลิปิด	เอทานอล	Size			PDI			ศักย์ไฟฟ้าซีต้า		
			mean	SD		mean	SD		mean	SD
200	5	143.2	144.4	2.1	0.348	0.331	0.018	-47.10	-47.67	0.74
		143.2			0.332			-47.40		
		146.9			0.312			-48.50		
	6	151.9	151.3	1.2	0.427	0.417	0.013	-36.40	-36.07	1.04
		149.9			0.402			-36.90		
		152.0			0.422			-34.90		
	7	141.7	140.8	0.8	0.415	0.404	0.010	-32.80	-32.40	0.53
		140.6			0.402			-31.80		
		140.1			0.395			-32.60		
	8	134.6	134.5	1.1	0.249	0.245	0.005	-31.10	-30.13	0.87
		135.6			0.247			-29.90		
		133.4			0.239			-29.40		
	9	282.9	280.9	1.7	0.250	0.267	0.015	-22.80	-22.27	1.01
		280.0			0.271			-22.90		
		279.9			0.280			-21.10		

ตารางแสดงสถิติของค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม ที่ เอทานอล ปริมาณต่าง ๆ

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zavg2	5.00	3	144.4333	2.13620	1.23333	139.1267	149.7399	143.20	146.90
	6.00	3	151.2667	1.18462	.68394	148.3239	154.2094	149.90	152.00
	7.00	3	140.8000	.81854	.47258	138.7666	142.8334	140.10	141.70
	8.00	3	134.5333	1.10151	.63596	131.7970	137.2696	133.40	135.60
	9.00	3	280.9333	1.70392	.98376	276.7006	285.1661	279.90	282.90
	Total	15	170.3933	57.49730	14.84574	138.5524	202.2343	133.40	282.90
Zeta2	5.00	3	-47.6667	.73711	.42557	-49.4978	-45.8356	-48.50	-47.10
	6.00	3	-36.0667	1.04083	.60093	-38.6522	-33.4811	-36.90	-34.90
	7.00	3	-32.4000	.52915	.30551	-33.7145	-31.0855	-32.80	-31.80
	8.00	3	-30.1333	.87369	.50442	-32.3037	-27.9630	-31.10	-29.40
	9.00	3	-22.2667	1.01160	.58405	-24.7796	-19.7537	-22.90	-21.10
	Total	15	-33.7067	8.63874	2.23051	-38.4906	-28.9227	-48.50	-21.10

Multiple Comparisons

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Zavg	5.00	6.00	-6.83333*	1.19740	.001	-10.7741	-2.8926
		7.00	3.63333	1.19740	.074	-.3074	7.5741
		8.00	9.90000*	1.19740	.000	5.9592	13.8408
		9.00	-136.50000*	1.19740	.000	-140.4408	-132.5592
	6.00	5.00	6.83333*	1.19740	.001	2.8926	10.7741
		7.00	10.46667*	1.19740	.000	6.5259	14.4074
		8.00	16.73333*	1.19740	.000	12.7926	20.6741
		9.00	-129.66667*	1.19740	.000	-133.6074	-125.7259
	7.00	5.00	-3.63333	1.19740	.074	-7.5741	.3074
		6.00	-10.46667*	1.19740	.000	-14.4074	-6.5259
		8.00	6.26667*	1.19740	.003	2.3259	10.2074
		9.00	-140.13333*	1.19740	.000	-144.0741	-136.1926
	8.00	5.00	-9.90000*	1.19740	.000	-13.8408	-5.9592
		6.00	-16.73333*	1.19740	.000	-20.6741	-12.7926
		7.00	-6.26667*	1.19740	.003	-10.2074	-2.3259
		9.00	-146.40000*	1.19740	.000	-150.3408	-142.4592
	9.00	5.00	136.50000*	1.19740	.000	132.5592	140.4408
		6.00	129.66667*	1.19740	.000	125.7259	133.6074
		7.00	140.13333*	1.19740	.000	136.1926	144.0741
		8.00	146.40000*	1.19740	.000	142.4592	150.3408
Zeta	5.00	6.00	-11.60000*	.70174	.000	-13.9095	-9.2905
		7.00	-15.26667*	.70174	.000	-17.5762	-12.9572
		8.00	-17.53333*	.70174	.000	-19.8428	-15.2238
		9.00	-25.40000*	.70174	.000	-27.7095	-23.0905
	6.00	5.00	11.60000*	.70174	.000	9.2905	13.9095
		7.00	-3.66667*	.70174	.003	-5.9762	-1.3572
		8.00	-5.93333*	.70174	.000	-8.2428	-3.6238
		9.00	-13.80000*	.70174	.000	-16.1095	-11.4905
	7.00	5.00	15.26667*	.70174	.000	12.9572	17.5762
		6.00	3.66667*	.70174	.003	1.3572	5.9762
		8.00	-2.26667	.70174	.055	-4.5762	.0428
		9.00	-10.13333*	.70174	.000	-12.4428	-7.8238
	8.00	5.00	17.53333*	.70174	.000	15.2238	19.8428
		6.00	5.93333*	.70174	.000	3.6238	8.2428
		7.00	2.26667	.70174	.055	-.0428	4.5762
		9.00	-7.86667*	.70174	.000	-10.1762	-5.5572
	9.00	5.00	25.40000*	.70174	.000	23.0905	27.7095
		6.00	13.80000*	.70174	.000	11.4905	16.1095
		7.00	10.13333*	.70174	.000	7.8238	12.4428
		8.00	7.86667*	.70174	.000	5.5572	10.1762

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

ตารางแสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อทำการ sonicate ณ เวลาต่าง ๆ

Time of sonication	Size			PDI			ศักย์ไฟฟ้าซีต้า		
		mean	SD		mean	SD		mean	SD
0	255.2	255.6	0.5	0.162	0.144	0.018	-18.30	-18.00	0.44
	256.1			0.145			-17.50		
	255.4			0.126			-18.20		
5	245.4	239.1	5.7	0.186	0.185	0.006	-9.56	-9.08	0.54
	237.5			0.19			-9.19		
	234.3			0.178			-8.49		
10	225.1	228.0	2.5	0.194	0.168	0.022	-9.40	-8.84	0.58
	229.2			0.157			-8.24		
	229.7			0.154			-8.87		
15	222	218.5	4.0	0.232	0.223	0.010	-18.00	-17.27	0.64
	219.4			0.212			-16.80		
	214.2			0.226			-17.00		

ตารางแสดงสถิติของค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม เมื่อทำการ sonicate ณ เวลาต่าง ๆ

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Etha8Zavg	0	3	255.5667	0.47258	0.27285	254.3927	256.7406	255.2	256.1
	5	3	239.0667	5.71343	3.29865	224.8737	253.2596	234.3	245.4
	10	3	228	2.52389	1.45717	221.7303	234.2697	225.1	229.7
	15	3	218.5333	3.97157	2.29298	208.6674	228.3992	214.2	222
	Total	12	235.2917	14.7341	4.25337	225.9301	244.6533	214.2	256.1
	0	3	-18	0.43589	0.25166	-19.0828	-16.9172	-18.3	-17.5
	5	3	-9.08	0.54342	0.31374	-10.4299	-7.7301	-9.56	-8.49
	10	3	-8.8367	0.58072	0.33528	-10.2793	-7.3941	-9.4	-8.24
	15	3	-17.2667	0.64291	0.37118	-18.8637	-15.6696	-18	-16.8
	Total	12	-13.2958	4.56403	1.31752	-16.1957	-10.396	-18.3	-8.24

Multiple Comparisons

Dependent Variable		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Etha8Zavg	5	16.50000*	3.02793	0.003	6.8035	26.1965
	10	27.56667*	3.02793	0	17.8702	37.2632
	0 15	37.03333*	3.02793	0	27.3368	46.7298
	0	-16.50000*	3.02793	0.003	-26.1965	-6.8035
	10	11.06667*	3.02793	0.027	1.3702	20.7632
	5 15	20.53333*	3.02793	0.001	10.8368	30.2298
	0	-27.56667*	3.02793	0	-37.2632	-17.8702
	5	-11.06667*	3.02793	0.027	-20.7632	-1.3702
	10 15	9.46667	3.02793	0.056	-0.2298	19.1632
	0	-37.03333*	3.02793	0	-46.7298	-27.3368
	5	-20.53333*	3.02793	0.001	-30.2298	-10.8368
	15 10	-9.46667	3.02793	0.056	-19.1632	0.2298
	5	-8.92000*	0.45385	0	-10.3734	-7.4666
	10	-9.16333*	0.45385	0	-10.6167	-7.71
	0 15	-0.73333	0.45385	0.422	-2.1867	0.72
	0	8.92000*	0.45385	0	7.4666	10.3734
	10	-0.24333	0.45385	0.948	-1.6967	1.21
	5 15	8.18667*	0.45385	0	6.7333	9.64
	0	9.16333*	0.45385	0	7.71	10.6167
	5	0.24333	0.45385	0.948	-1.21	1.6967
	10 15	8.43000*	0.45385	0	6.9766	9.8834
Etha8Zeta	0	0.73333	0.45385	0.422	-0.72	2.1867
	5	-8.18667*	0.45385	0	-9.64	-6.7333
	15 10	-8.43000*	0.45385	0	-9.8834	-6.9766

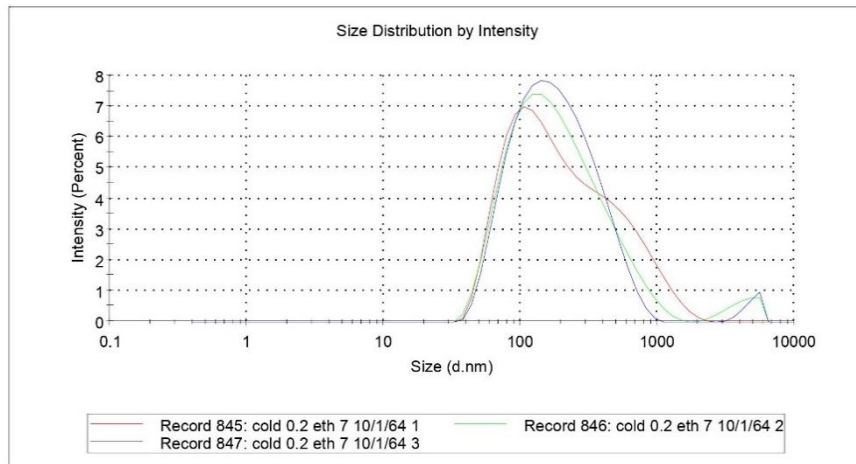
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางแสดงค่าการวัดขนาดของอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

	Size			PDI			ศักย์ไฟฟ้าซีต้า		
		mean	SD		mean	SD		mean	SD
0.125	263.8	263.9	1.0	0.202	0.199	0.004	-23.90	-24.37	0.45
	265.0			0.199			-24.80		
	263.0			0.195			-24.40		
0.3125	208.5	205.6	2.5	0.183	0.194	0.022	-26.90	-27.17	1.32
	204.0			0.180			-26.00		
	204.4			0.219			-28.60		
0.625	240.6	235.0	4.8	0.178	0.193	0.026	-27.20	-26.43	0.67
	232.0			0.223			-26.00		
	232.4			0.179			-26.10		
1.25	318.5	308.3	8.9	0.266	0.253	0.012	-28.40	-26.23	1.88
	304.0			0.246			-25.00		
	302.3			0.246			-25.30		
1.875	312.2	306.4	5.0	0.254	0.245	0.014	-27.80	-27.77	1.15
	303.2			0.229			-26.60		
	303.8			0.251			-28.90		
3.125	362.2	368.5	5.7	0.162	0.172	0.021	-23.10	-24.27	1.11
	370.1			0.158			-25.30		
	373.2			0.196			-24.40		
6.25	358.4	354.2	3.6	0.138	0.118	0.017	-29.90	-30.53	0.78
	352.0			0.110			-31.40		
	352.2			0.107			-30.30		

Results

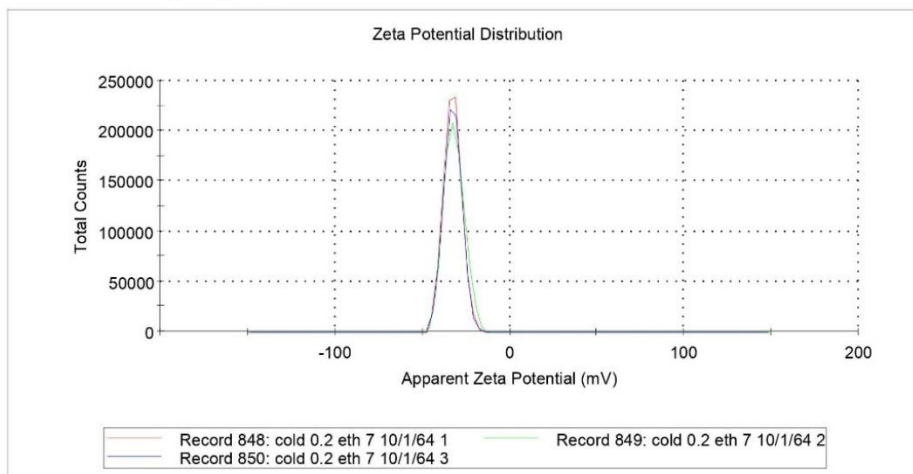
	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 141.7	Peak 1: 293.9	100.0	295.6
Pdl: 0.415	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเตรียมด้วย
ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 7 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

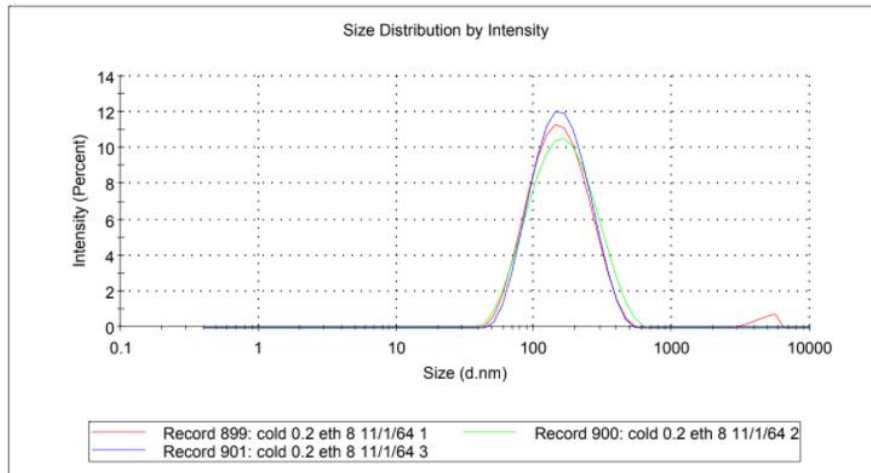
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -32.8	Peak 1: -32.8	100.0	5.09
Zeta Deviation (mV): 5.09	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0677	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			



กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเตรียมด้วย
ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 7 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

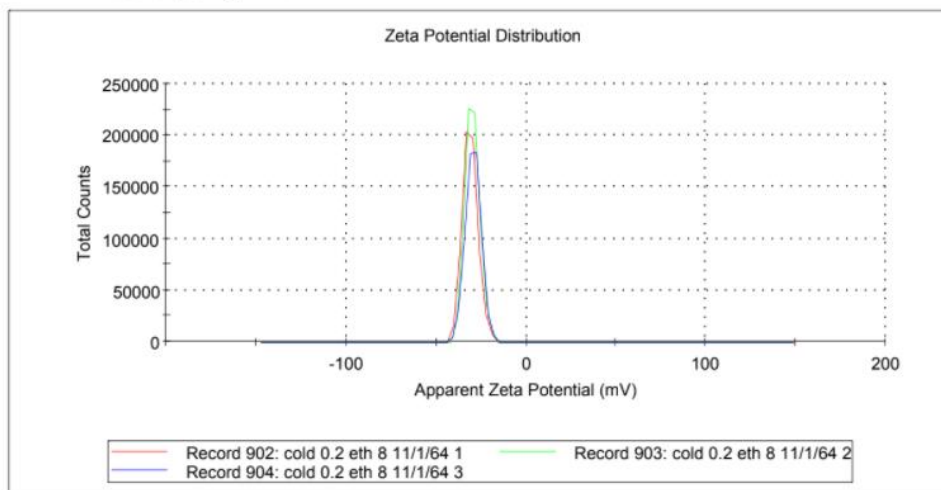
	Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 134.6	Peak 1: 165.9	97.8	79.24
Pdl: 0.249	Peak 2: 4690	2.2	785.4
Intercept: 0.951	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเตรียมด้วย
ฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

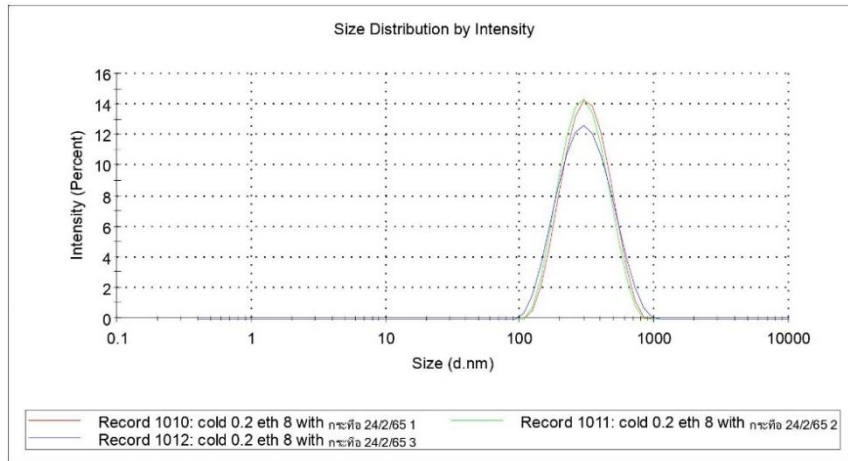
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -31.1	Peak 1: -31.1	100.0	4.20
Zeta Deviation (mV): 4.20	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0503	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			



กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระทือ เมื่อเตรียมด้วย
ฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 263.8	Peak 1: 328.4	100.0	124.3
Pdl: 0.202	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

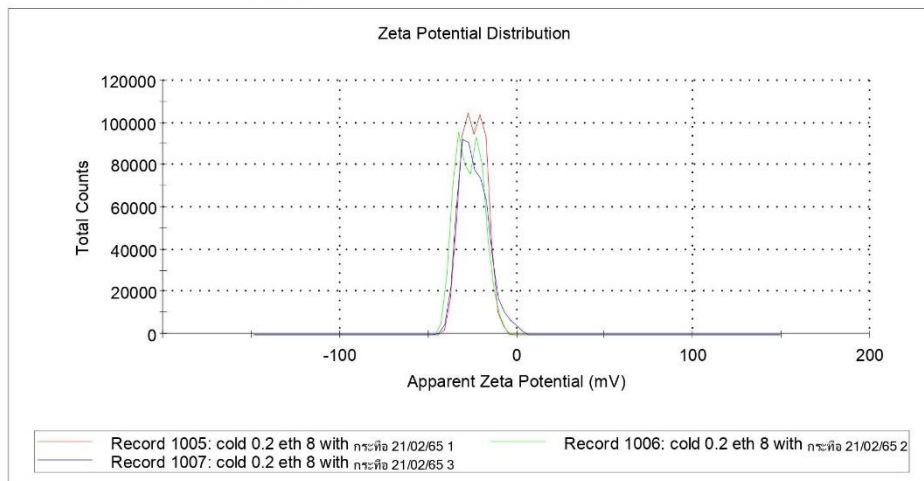


กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 0.125 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -24.4	Peak 1: -29.1	51.0	3.97
Zeta Deviation (mV): 6.61	Peak 2: -19.6	49.0	3.90
Conductivity (mS/cm): 0.0663	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			

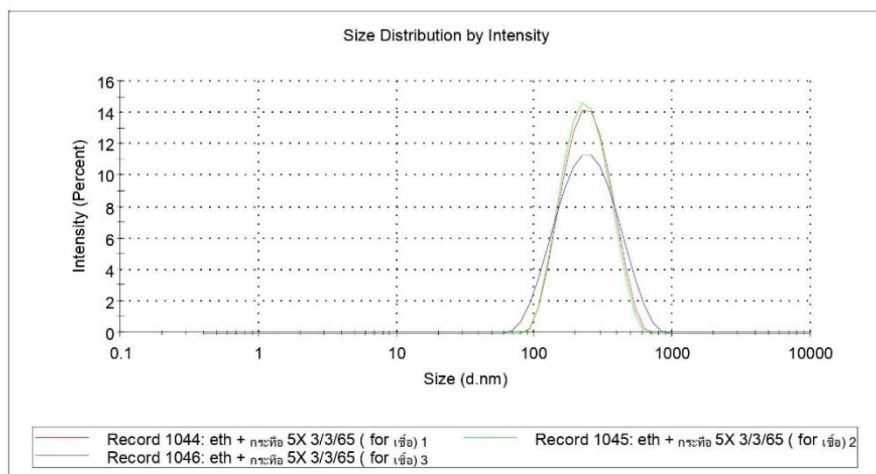


กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 0.125 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 208.5	Peak 1: 253.4	100.0	96.44
Pdl: 0.183	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.928	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

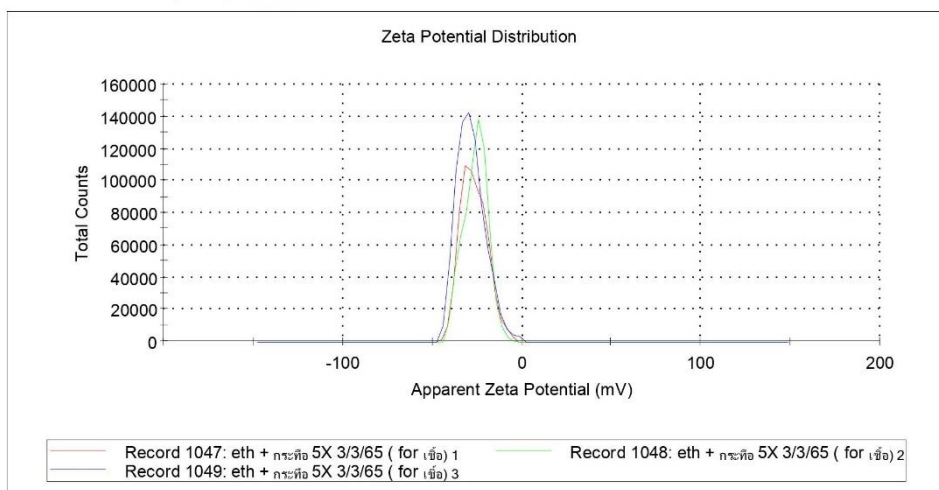


กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 0.3125 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -26.9	Peak 1: -26.9	100.0	7.33
Zeta Deviation (mV): 7.33	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0485	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			

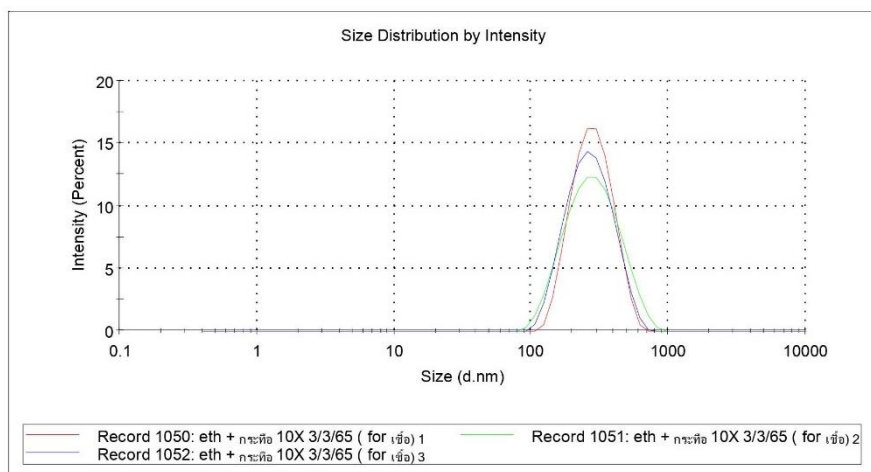


กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 0.3125 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

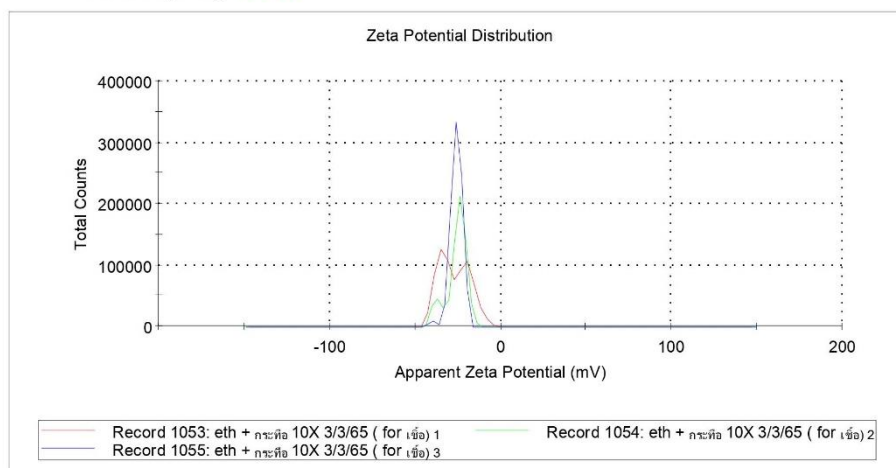
	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 240.6	Peak 1: 288.9	100.0	94.80
Pdl: 0.178	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.914	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 0.625 มก./มล.
เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

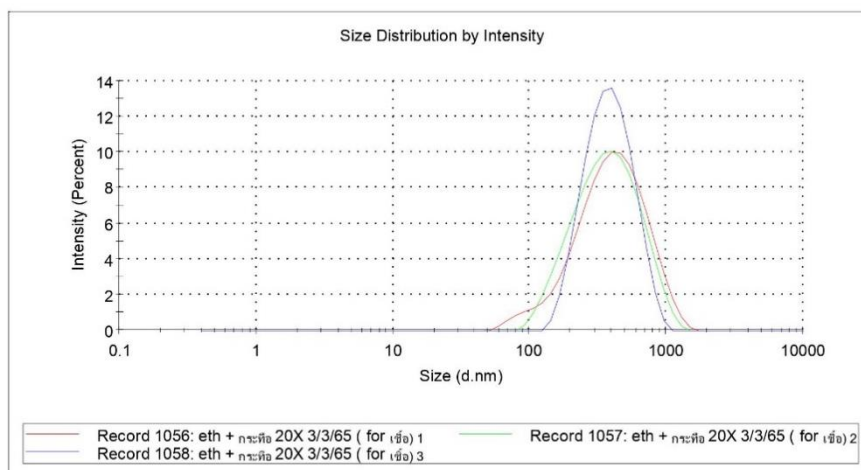
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -27.2	Peak 1: -33.8	51.6	4.44
Zeta Deviation (mV): 8.83	Peak 2: -20.1	48.4	5.35
Conductivity (mS/cm): 0.0557	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			



กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 0.625 มก./มล.
เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 318.5	Peak 1: 443.0	100.0	245.6
Pdl: 0.266	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.927	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

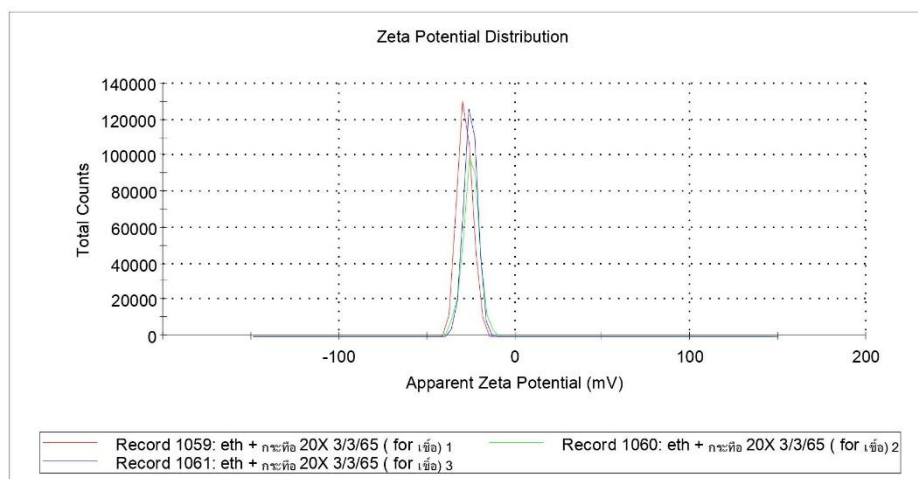


กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 1.25 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -28.4	Peak 1: -28.4	100.0	4.22
Zeta Deviation (mV): 4.22	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0552	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			

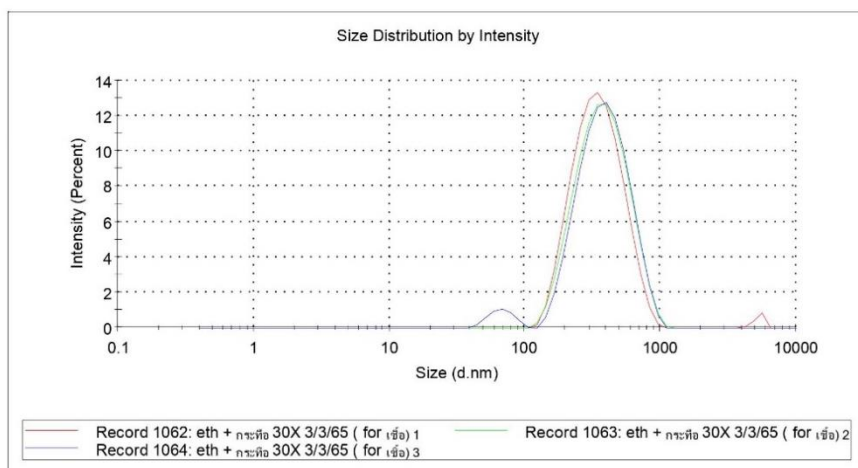


กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 1.25 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 312.2	Peak 1: 365.4	98.7	147.7
Pdl: 0.254	Peak 2: 5264	1.3	431.8
Intercept: 0.908	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

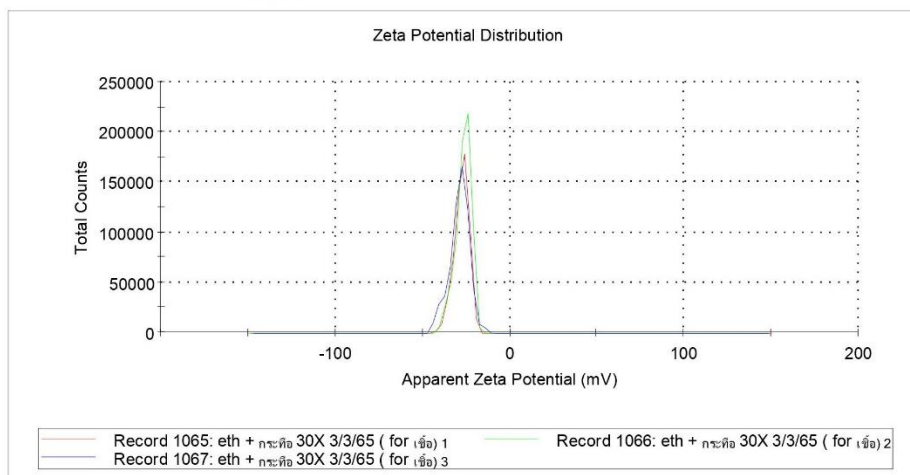


กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 1.875 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -27.8	Peak 1: -27.8	100.0	4.28
Zeta Deviation (mV): 4.28	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0463	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			

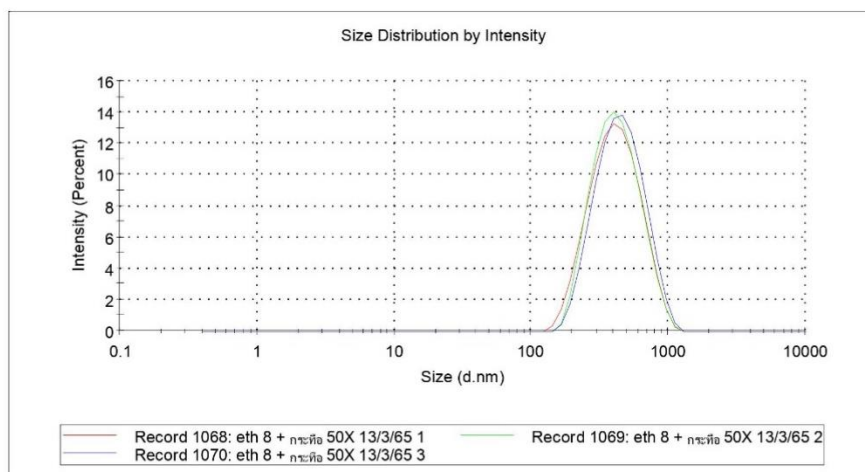


กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 1.875 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิปิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 362.2	Peak 1: 434.2	100.0	177.0
Pdl: 0.162	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.908	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

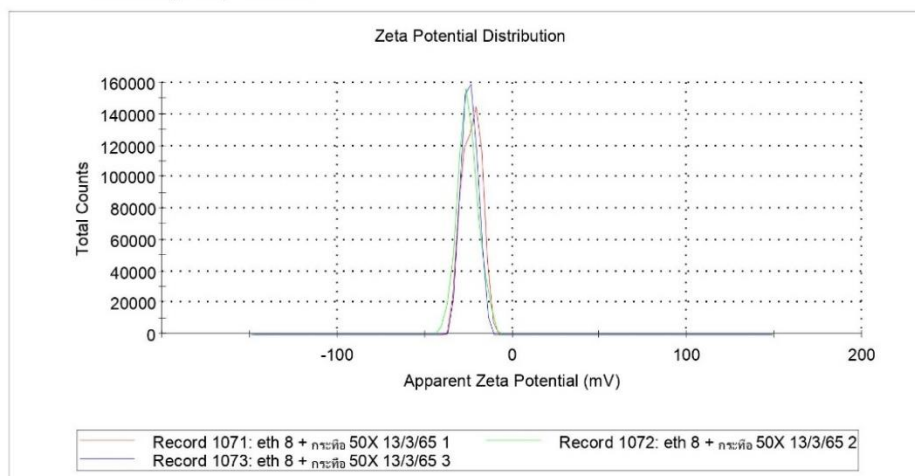


กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 3.125 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -25.3	Peak 1: -25.3	100.0	5.90
Zeta Deviation (mV): 5.90	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0762	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			

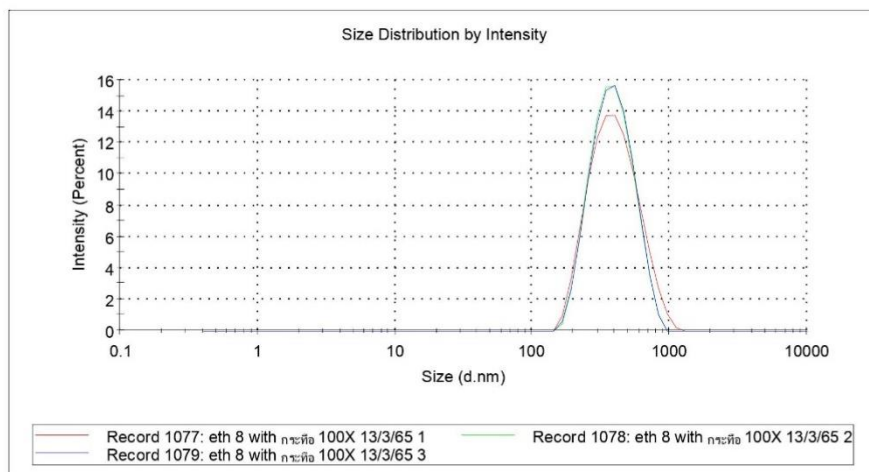


กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 3.125 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 358.4	Peak 1: 415.9	100.0	166.9
Pdl: 0.138	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.930	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

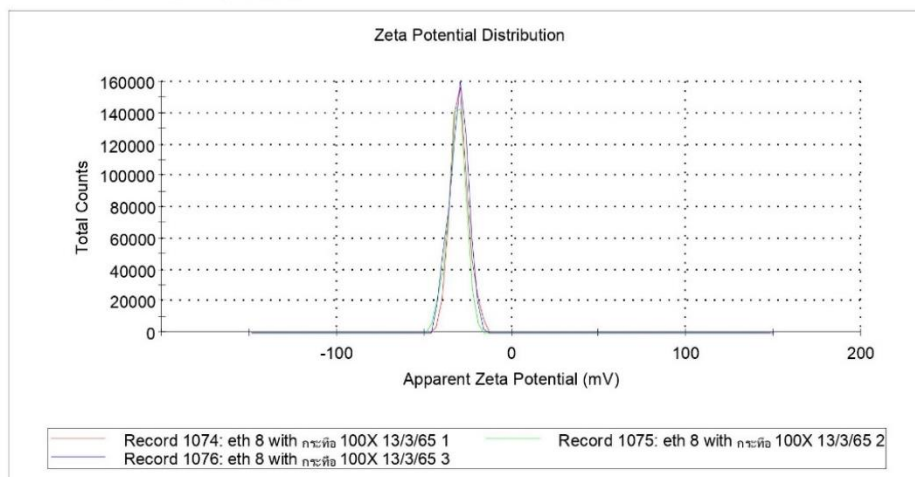


กราฟแสดงขนาดของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 6.25 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -29.9	Peak 1: -29.9	100.0	5.14
Zeta Deviation (mV): 5.14	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0769	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality Good			



กราฟแสดงศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคเอทโทโซมที่ไม่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียม 6.25 มก./มล.

เมื่อเตรียมด้วย ฟอสโฟลิพิด 200 มก. เอทานอล 8 มล. ทำการ sonicate 15 นาที

ตารางแสดงค่า AUC และปริมาณสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียม

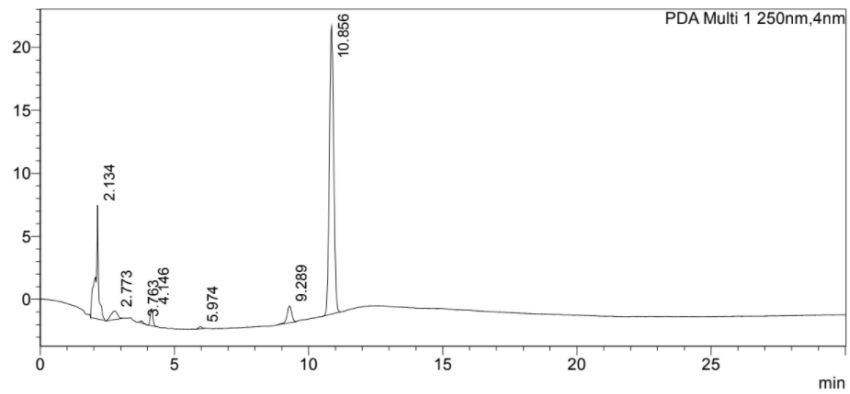
สารสกัด กระเทียม (มก./ มล.)	AUC1	Zerumbone conc. (มก./มล.)	AUC2	Zerumbone conc. (มก./มล.)	AUC3	Zerumbone conc. (มก./มล.)	Zerumbone conc. (มก./มล.) Avg	SD
1	5617100	0.27751605	5604077	0.2768649	5599903	0.2766562	0.27701238	0.000458
0.5	2678187	0.1305704	2681497	0.1307359	2689115	0.1311168	0.13080770	0.000281
0.25	1302850	0.06180355	1310109	0.0621665	1310588	0.06219045	0.06205350	0.000227
0.125	635406	0.02843135	636201	0.0284711	636470	0.02848455	0.02846233	2.766230
0.0625	320754	0.01269875	320412	0.01268165	320424	0.01268225	0.01268755	9.704120

ตารางแสดงค่า AUC และปริมาณสารสำคัญ Zerumbone ในเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดเหง้ากระเทียม

formulation	AUC1	Zerumbone conc. (มก./0.1มล.)	AUC2	Zerumbone conc. (มก./0.1มล.)	AUC3	Zerumbone conc. (มก./0.1มล.)	Zerumbone conc. (มก./มล.) Avg	SD
50X loaded Ethosome	1374972	0.06540965	1376145	0.06546830	1374863	0.06540420	0.06542738	3.553950
100X loaded Ethosome	2435582	0.11844015	2434374	0.11837975	2437676	0.11854485	0.11845492	8.353470

<Chromatogram>

mAU

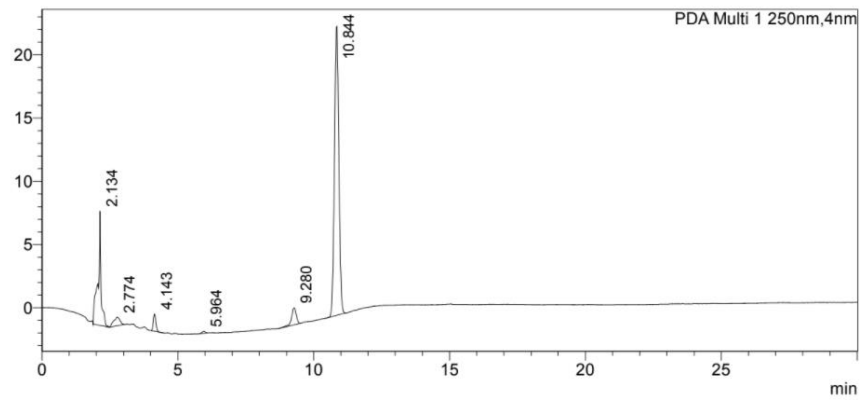


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.01 มก./มล. ครั้งที่ 1

<Chromatogram>

mAU

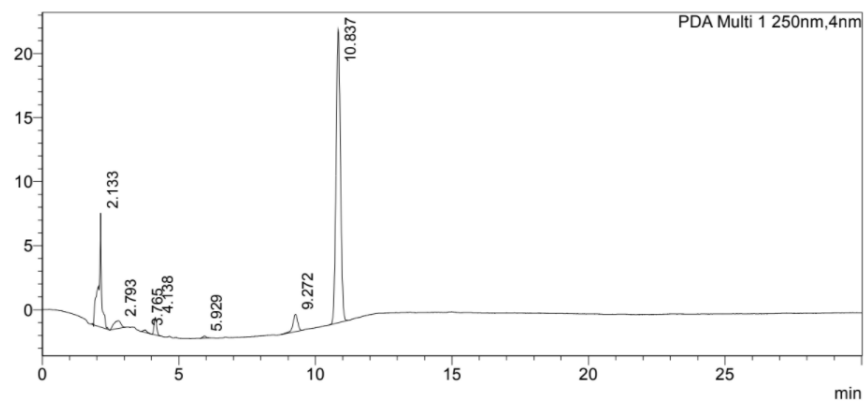


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.01 มก./มล. ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

mAU

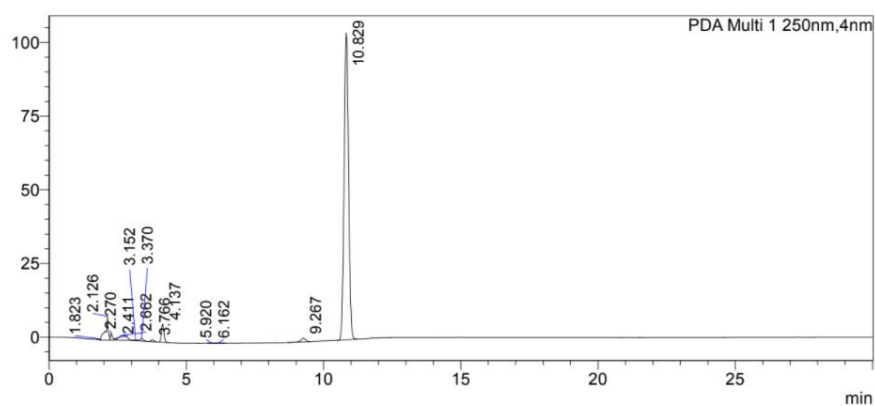


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.01 มก./มล. ครั้งที่ 3

<Chromatogram>

mAU

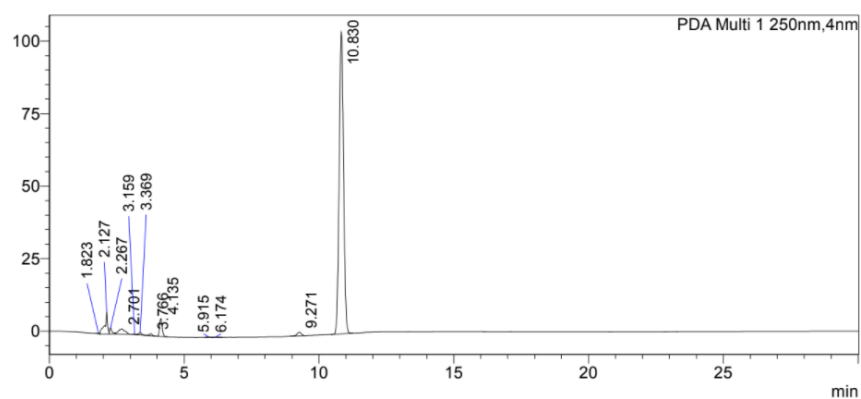


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.05 มก./มล. ครั้งที่ 1

<Chromatogram>

mAU

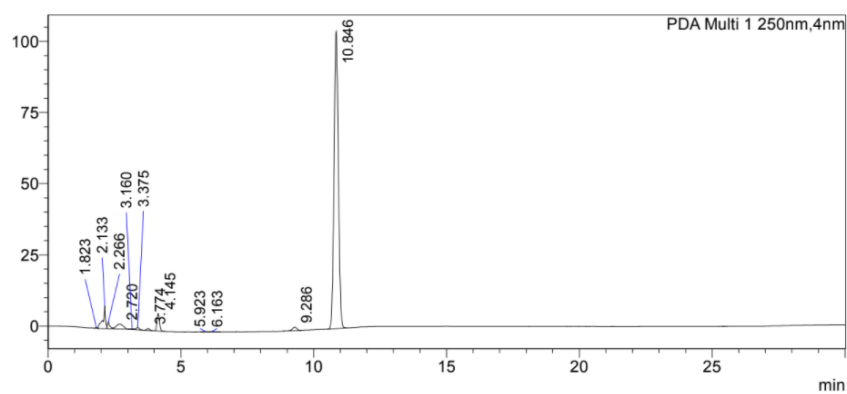


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.05 มก./มล. ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

mAU

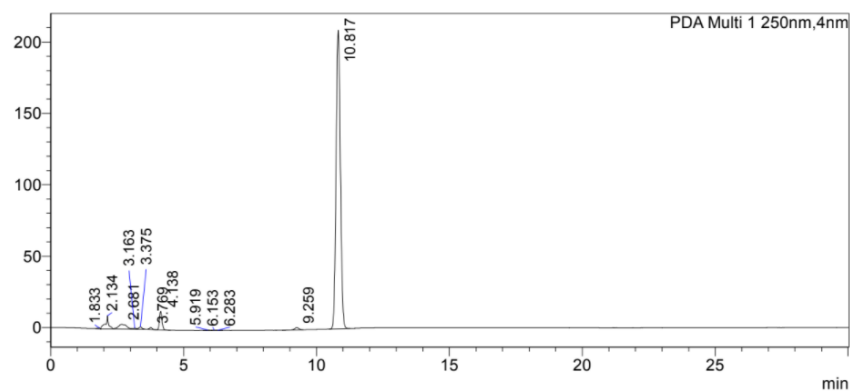


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.05 มก./มล. ครั้งที่ 3

<Chromatogram>

mAU

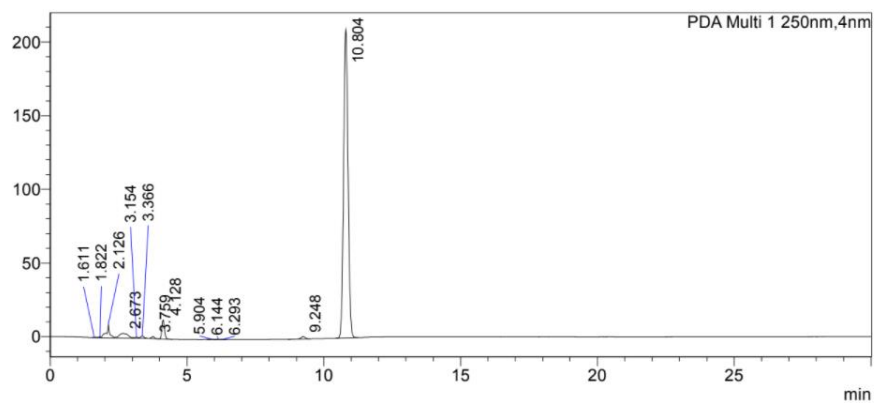


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ครั้งที่ 1

<Chromatogram>

mAU

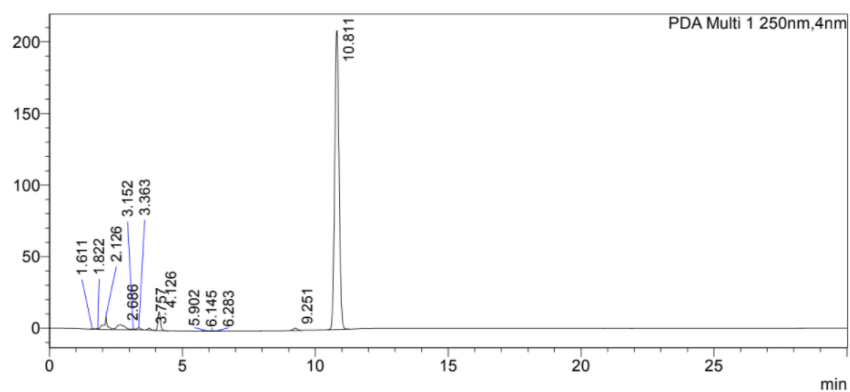


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

mAU

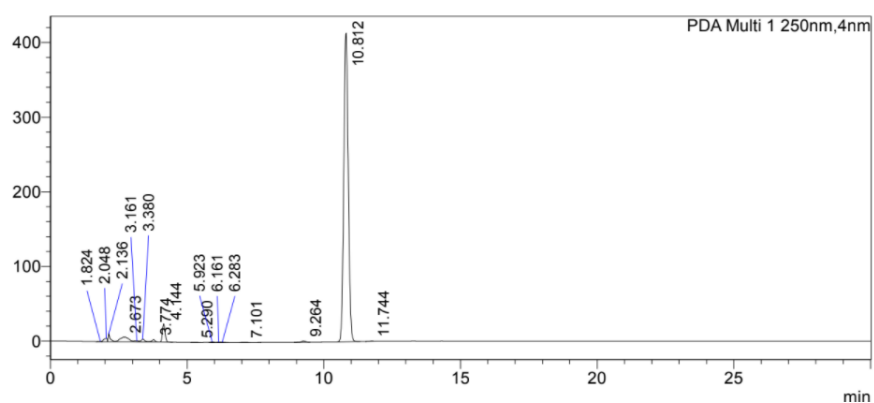


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ครั้งที่ 3

<Chromatogram>

mAU

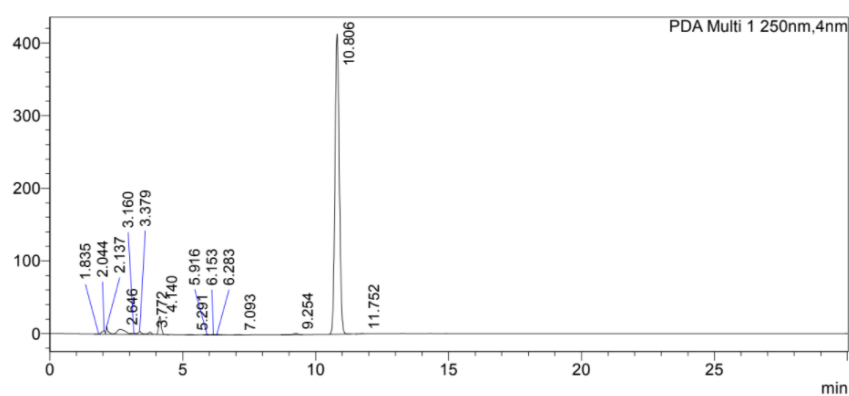


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ครั้งที่ 1

<Chromatogram>

mAU

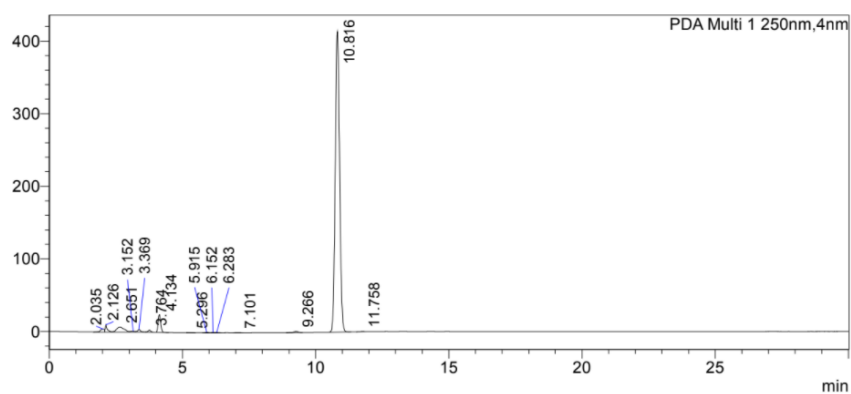


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

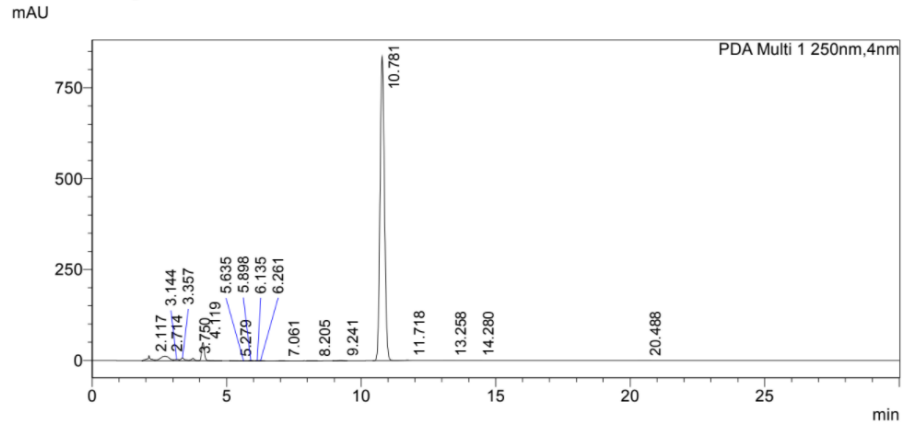
mAU



โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ครั้งที่ 3

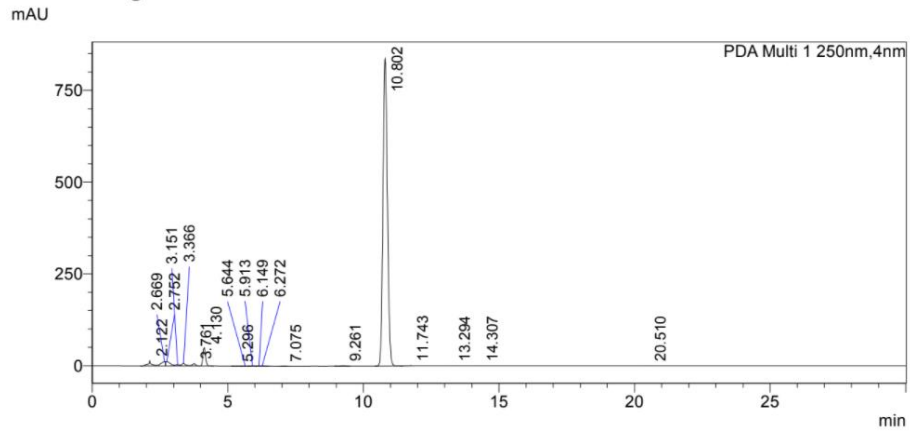
<Chromatogram>



โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. ครั้งที่ 1

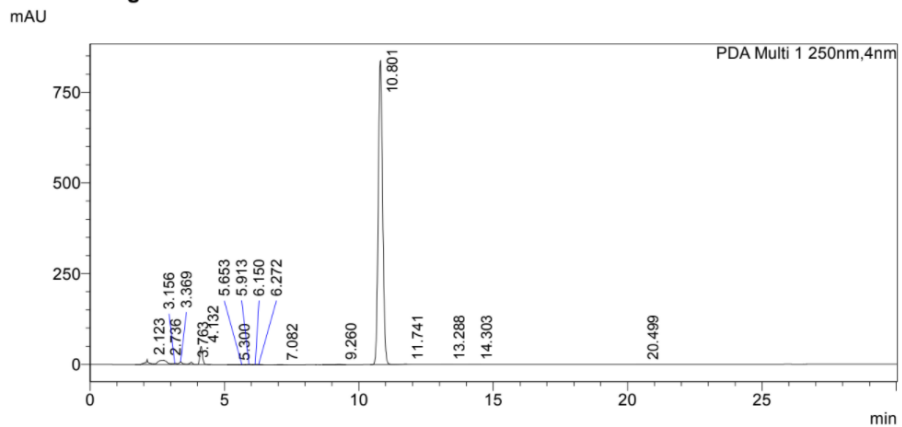
<Chromatogram>



โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. ครั้งที่ 2

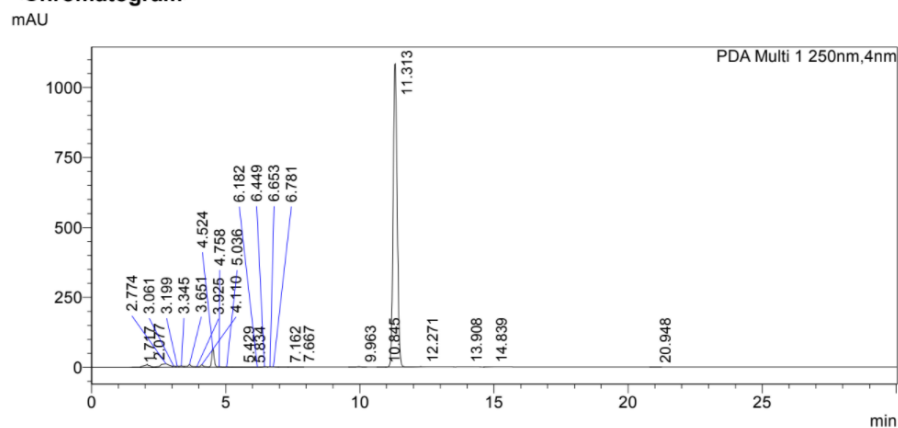
<Chromatogram>



โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. ครั้งที่ 3

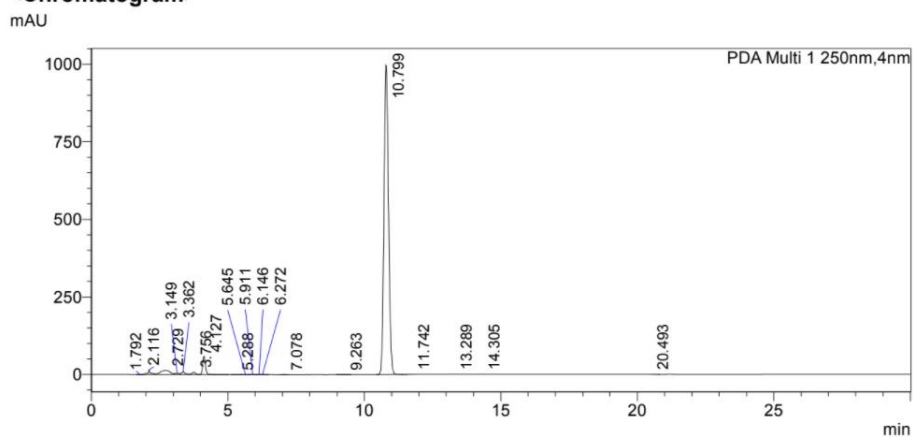
<Chromatogram>



โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ครั้งที่ 1

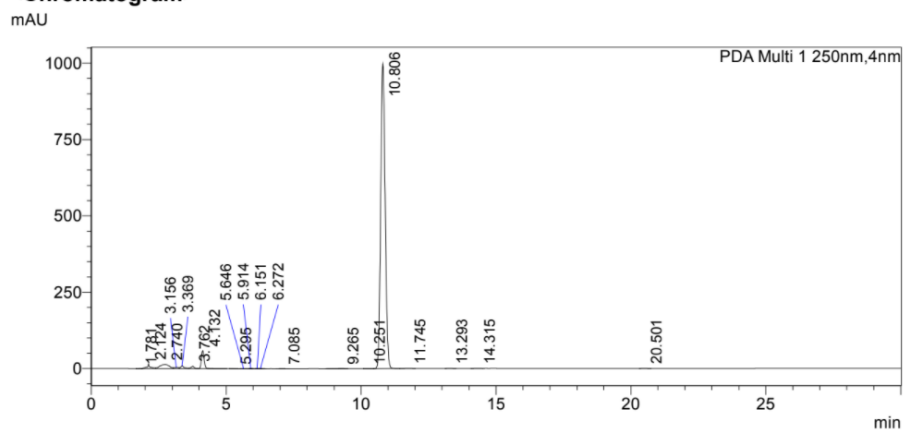
<Chromatogram>



โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

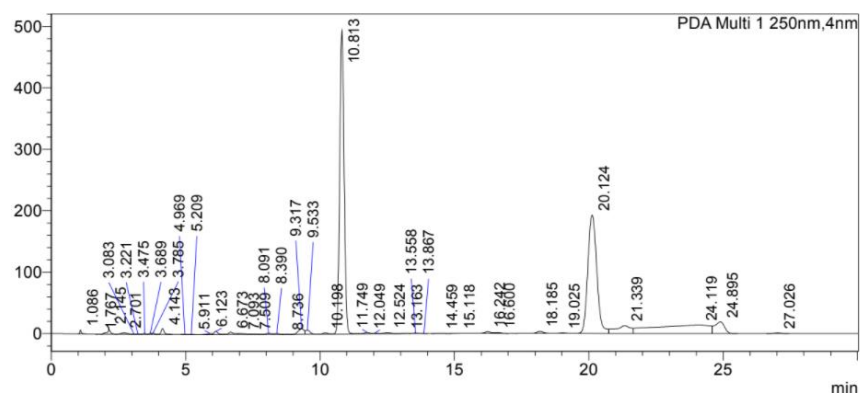


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone

ที่ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ครั้งที่ 3

<Chromatogram>

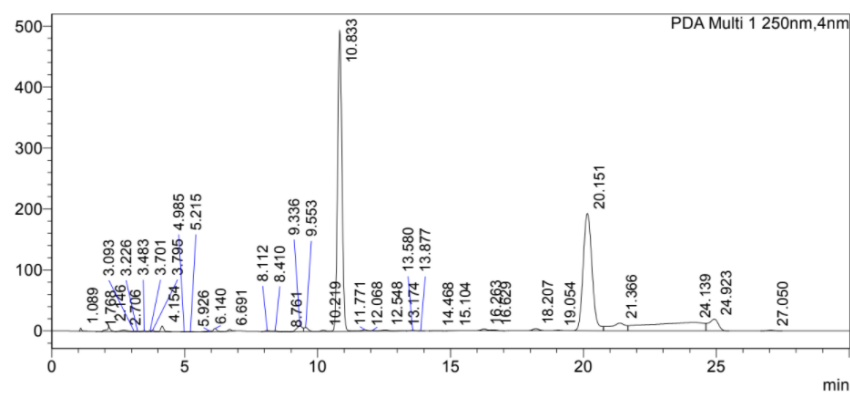
mAU



โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ครั้งที่ 1

<Chromatogram>

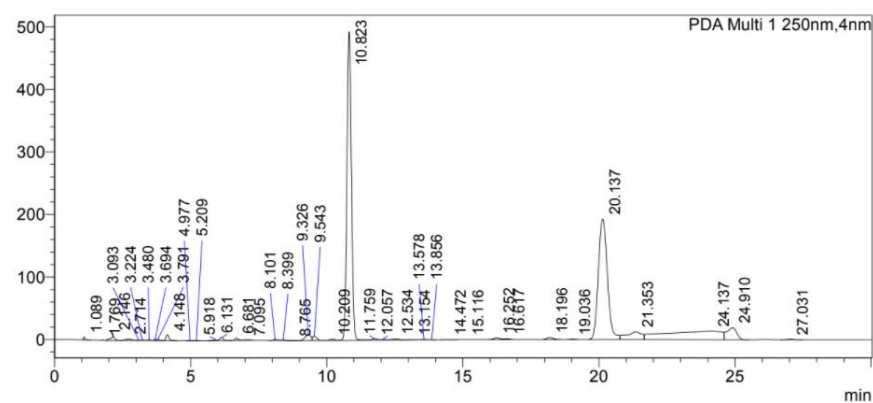
mAU



โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

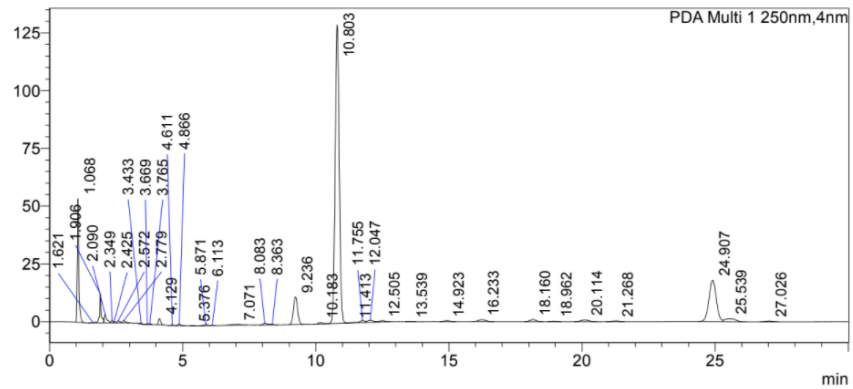
mAU



โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ครั้งที่ 3

<Chromatogram>

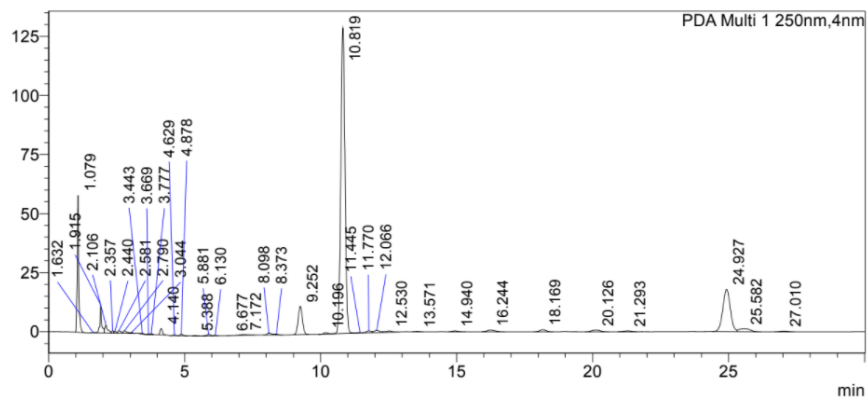
mAU



โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 3.125 มก./มล. ครั้งที่ 1

<Chromatogram>

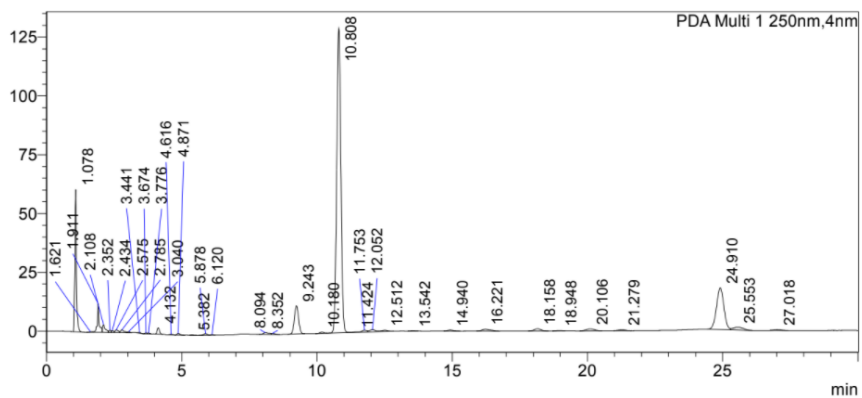
mAU



โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 3.125 มก./มล. ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

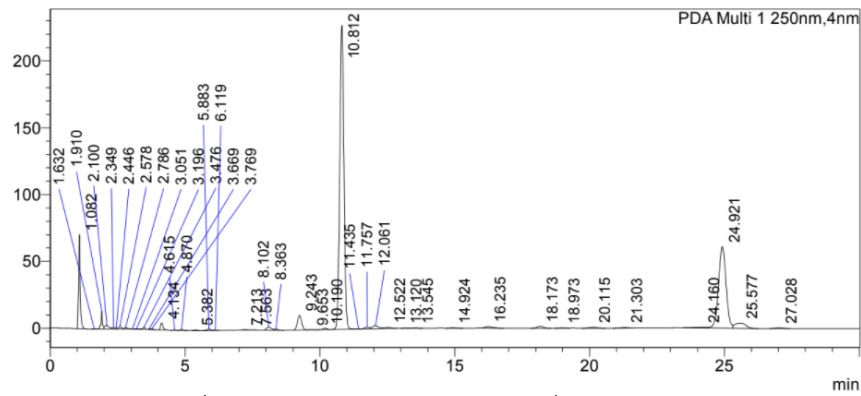
mAU



โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 3.125 มก./มล. ครั้งที่ 3

<Chromatogram>

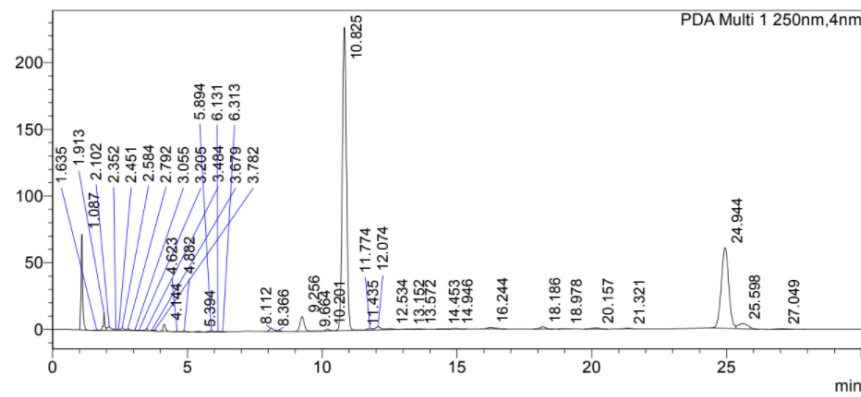
mAU



โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 6.25 มก./มล. ครั้งที่ 1

<Chromatogram>

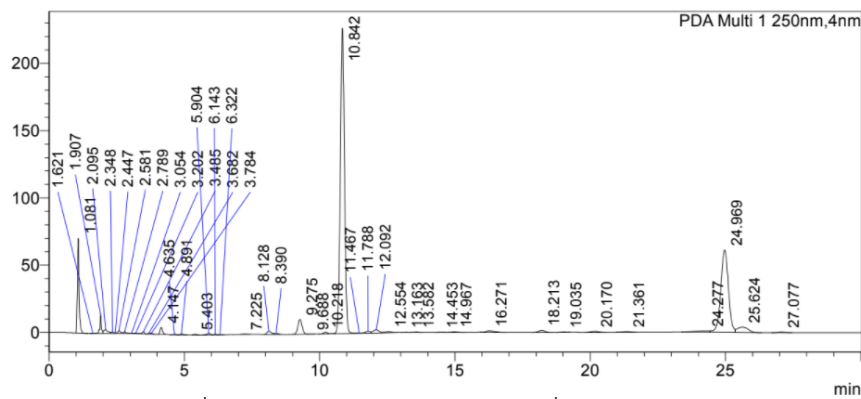
mAU



โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 6.25 มก./มล. ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

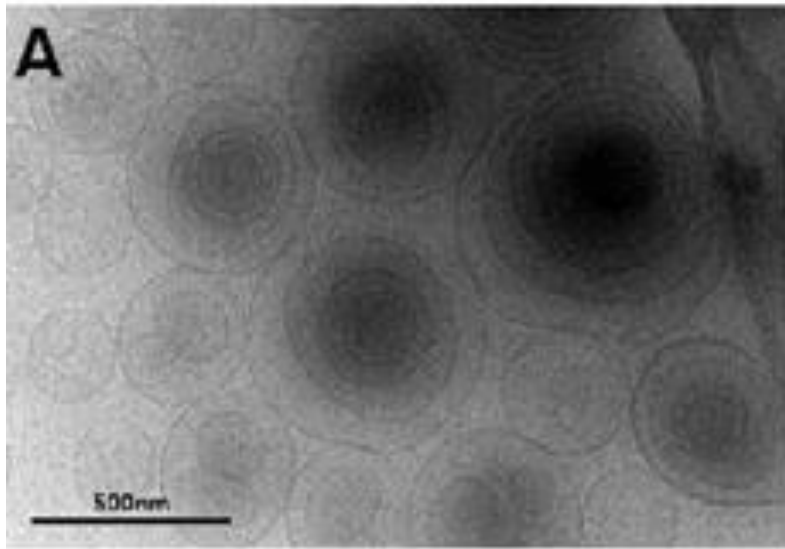
mAU



โครมาโตแกรมของเอทโทโซมที่บรรจุสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่ความเข้มข้น 6.25 มก./มล. ครั้งที่ 3

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (% Entrapment efficiency)

Formulation	Zerumbone conc. (มก./มล.)	สารสกัดกระทือ (มก./มล.)	สารสกัดกระทือที่ใส่เข้าไป (มก./มล.)	% EE	AVG	SD
50X loaded เอทโทโซม	0.6540965	2.361253646	3.125	24.44	24.42	0.04
	0.6546830	2.363370879	3.125	24.37		
	0.6540420	2.361056903	3.125	24.45		
100X loaded เอทโทโซม	1.1844015	4.275626547	6.25	31.59	31.58	0.05
	1.1837975	4.273446139	6.25	31.62		
	1.1854485	4.279406161	6.25	31.53		



รูปแสดงตัวอย่างลักษณะอนุภาคเอทโทโซมชนิด Multilamellar vesicles (25)

ตารางแสดงสรุปผลการทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อ้างอิงจากงานวิจัยประโยชน์ทางเภสัชกรรมของพืชสมุนไพรภาคตะวันออกของประเทศไทย

ตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารสกัด เหง้ากระเทียม	MIC (มกก./มล.)	MFC (มกก./มล.)
เฮกเซน	31.25	62.5
ไดคลอโรมีเทน	62.5	62.5
เอทานอล	-	-
คีโตโคนาโซล	125	125

จากผลการทดสอบพบว่า กระเทียมในส่วนสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* ได้โดยมีค่า MIC คือ 31.25 และ 62.5 มกก./มล. ตามลำดับ และสามารถฆ่าเชื้อได้โดยมีค่า MFC เท่ากันคือ 62.5 มกก./มล. อย่างไรก็ตาม กระเทียมในส่วนสกัดเอทานอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ และไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ในส่วนของยา Ketoconazole สามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125 มกก./มล. และ MFC เท่ากับ 125 มกก./มล.

ภาคผนวก ข

รายงานสรุปการเงิน
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2564 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสำหรับต้านจุลชีพบริเวณผิวหนัง
 ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ) ภาณุ.ผศ.ดร.ธนิกานต์ แสงนันทน์
 รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1/มิถุนายน/2564 ถึงวันที่ 22/มีนาคม/2565
 ระยะเวลาดำเนินการ - ปี 10 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1/มิถุนายน/2564

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100 %) 15,000 บาท เมื่อ 24 มกราคม 2565

รายจ่าย

รายงาน	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1.ค่าตอบแทน	0	0	0
2.ค่าจ้าง	0	0	0
3.ค่าวัสดุ	0	0	0
4.ค่าใช้สอย	15,000	15,000	0
5.ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6.ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	0	0	0
รวม	15,000	15,000	0

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานวิจัย