

การพัฒนาและศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมบรรจุเคออสติน
และครีมไลโปโซมบรรจุเคออสติน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มิถุนายน 2559

การพัฒนาและศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมบรรจุเคอวอซิทิน
และครีมไลโปโซมบรรจุเคอวอซิทิน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

มิถุนายน 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาและศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมบรรจุเคออสติน
และครีมไลโปโซมบรรจุเคออสติน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มิถุนายน 2559

รัฐพรรณ พลรัฐ. (2559). การพัฒนาและศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมบรรจุเคอซีทินและครีมไลโปโซมบรรจุเคอซีทิน. ปรินญาณพนธ์ วท.ม.(วิทยาการเภสัชภัณฑ์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทราวดี บุรณตระกูล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี, ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อมุ่งเน้นการพัฒนาไลโปโซมบรรจุเคอซีทิน และตั้งตำรับครีมไลโปโซมบรรจุเคอซีทินสำหรับเครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ยาวนานขึ้น โดยนำเอาสารเคอซีทินมากักเก็บในไลโปโซมก่อนที่จะนำไปผสมในครีม ทดสอบปริมาณเคอซีทินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเคอซีทินเปรียบเทียบกับครีมผสมเคอซีทินที่ไม่ได้กักเก็บในไลโปโซม โดยการพัฒนาตำรับไลโปโซมบรรจุเคอซีทินอาศัยวิธี Hydration of thin film และนำไปทดสอบความคงสภาพของไลโปโซมที่บรรจุเคอซีทินในการศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ และสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) 6 cycles พบว่าไลโปโซมมีขนาด (Z-Average) ที่ดีที่สุดอยู่ในช่วง 378.9 ± 0.38 - 481.0 ± 6.67 nm ไลโปโซมเคอซีทินมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซีทินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดในอุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) เมื่อนำไลโปโซมที่บรรจุเคอซีทินไปตั้งเป็นตำรับครีมไลโปโซม และนำไปศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ และในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) 6 cycles พบว่าครีมไลโปโซมเคอซีทินมีปริมาณเคอซีทินคงเหลือในครีมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเคอซีทิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส ดังนั้นการนำเคอซีทินบรรจุลงในไลโปโซมจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในแง่ของปริมาณและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ : ไลโปโซม, เคอซีทิน, ประสิทธิภาพในการกักเก็บ, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

DEVELOPMENT AND STABILITY STUDY OF LIPOSOMES QUERCETIN AND CREAM
LIPOSOMES QUERCETIN



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science in Pharmaceutical Product Development
at Srinakharinwirot University

June 2016

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาและศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมบรรจุเคอซีทีนและครีมไลโปโซมบรรจุเคอซีทีน
ของ
รัฐพรรณ พลรัฐ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)
วันที่เดือนพ.ศ 2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์คณะกรรมการสอบปากเปล่า
.....ที่ปรึกษาหลักประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทราวดี บุรณตระกูล) (อาจารย์ ดร.อภิรดา สุคนธ์พันธุ์)
.....ที่ปรึกษาร่วมกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทราวดี บุรณตระกูล)
.....ที่ปรึกษาร่วมกรรมการ
(อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี)
.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



Ruthaphan Polrut. (2015). *Development and stability study of liposomes quercetin and cream liposome quercetin*. Master thesis, M.S. (Pharmaceutical Product Development).

Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee:

Asst. Prof. Dr. Patravadee Buranatrakul., Asst. Prof. Dr. Wattanaporn

Pattanapukdee., Dr. Vipaporn Sareedenchai.

The objective of this study was the development of liposome encapsulation quercetin and formulation of cream liposome quercetin for antioxidant activities. In this study comparison was made of antioxidant activities between cream liposome quercetin and cream quercetin, including a valuation of quercetin in products. The hydration of thin film method was used for developing liposomes quercetin. Liposomes quercetin were tested for long-term stability for 12 weeks, heating cooling testing for 6 cycles, and antioxidants activities. The result from previous experiment showed that the best size (Z-Average) of liposome-quercetin was in the range of 378.9 ± 0.38 - 481.0 ± 6.67 nm. Moreover, liposomes-quercetin (%entrapment efficiency) were significantly (p -value < 0.05), and antioxidants activities in the chamber temperature at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ and room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$). In addition, cream liposomes quercetin and cream quercetin were long-term stability tested for 12 weeks and heating cooling tested for 6 cycles and the result was that cream liposomes-quercetin gave better value quercetin and antioxidant activities than cream quercetin in all conditions, excepted in temperature at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ gave non-available. By the way, quercetin loaded in liposome was more increased the efficiency of value and antioxidant activity than quercetin.

Keyword: liposome, quercetin, entrapment efficiency, antioxidants activity

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือ คำแนะนำอย่างดียิ่งจาก คณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทราวดี บุรณตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี และดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้การชี้แนะวิธีการศึกษาวิจัย ให้คำปรึกษาในการศึกษาค้นคว้างานวิจัย ชิ้นนี้ เพื่อปรับปรุงให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์และถูกต้อง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ทั้งสามท่านที่ไม่ได้ให้แค่เพียงคำแนะนำในการศึกษาวิจัย แต่ยังให้คำแนะนำการดำเนินชีวิตแก่ผู้วิจัยในระหว่างที่ผู้วิจัยเกิดปัญหาในระยะเวลาของการดำเนินงานวิจัย และได้เสียสละเวลาอันมีค่าทุ่มเทให้กับงานด้านการวิจัยและพัฒนาอย่างไม่เหน็ดเหนื่อย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัยในการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยมีความรู้และความสามมารถที่จะนำไปใช้ในชีวิตเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษยชาติ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่นทั้ง 3 ท่าน และรุ่นพี่รุ่นน้องในคณะเภสัชศาสตร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่คณะเภสัชศาสตร์ทุกท่าน ในการให้ความช่วยเหลือด้านจิตใจและสนับสนุนอุปกรณ์ในการทำปริญญานิพนธ์นี้ด้วยดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดี และเชื่อมั่นในตัวผู้วิจัยตลอดมา

รัฐพรรณ พลรัฐ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
วัตถุประสงค์ ปัจจัยและตัวแปรที่ศึกษา กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2 แนวคิด ทฤษฎี และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับผิวหนัง.....	3
ไลโปโซม.....	6
กลไกการเกิดไลโปโซม.....	7
ประเภทของไลโปโซม.....	8
การตรวจสอบสมบัติและการควบคุมคุณภาพของไลโปโซม.....	8
ข้อดีและข้อเสียของไลโปโซม.....	9
ครีม.....	10
ชนิดของครีม.....	10
การตั้งตำรับครีม.....	11
การทดสอบคุณภาพครีมหลังการเตรียม.....	11
สารต้านอนุมูลอิสระ.....	12
อนุมูลอิสระ.....	12
สารต้านอนุมูลอิสระ.....	12
DPPH Scavenging Capacity Assay.....	12
สารเคอซิทิน.....	13
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี.....	16
อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....	16
สารเคมี.....	16
วิธีการทดลอง.....	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
ตั้งตำรับไลโปโซม.....	17
ตั้งตำรับไลโปโซมเคอควิทิน (Liposome Quercetin).....	18
เตรียมครีม.....	20
การศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมเคอควิทิน.....	22
ศึกษาความคงสภาพของครีมไลโปโซมเคอควิทิน เปรียบเทียบกับ ครีมเคอควิทิน.....	24
วิเคราะห์และสรุปผลความคงสภาพ.....	26
4 ผลการทดลอง.....	27
ผลการพัฒนาการตั้งสูตรตำรับไลโปโซม.....	27
ผลการพัฒนาการตั้งสูตรตำรับไลโปโซมเคอควิทิน.....	29
ผลการศึกษาขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index), Zeta potential และประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอควิทิน (%Entrapment efficiency) ของไลโปโซมเคอควิทิน.....	29
ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพ (morphology) ของไลโปโซมเคอควิทิน...	29
วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DDPH Radical Scavenging Capacity Assay....	29
ผลการศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมเคอควิทิน.....	30
ผลการศึกษาของไลโปโซมเคอควิทินในความคงสภาพสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle).....	30
ผลการศึกษาของไลโปโซมเคอควิทินในความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์.....	32
ผลการศึกษาความคงสภาพของครีมไลโปโซมเคอควิทิน และครีมเคอควิทิน.....	38
ผลของการศึกษาลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซม เคอควิทิน และครีมเคอควิทิน.....	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
ผลการศึกษาของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคออลิทินและครีมเคออลิทิน หลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles.....	39
ผลการศึกษาของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคออลิทิน และครีมเคออลิทิน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์.....	42
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ.....	51
บรรณานุกรม	55
ภาคผนวก	60
ประวัติย่อผู้วิจัย	66

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบ DPPH radical scavenging assay ของเคออสติน.....	20
2 แสดงส่วนประกอบของสูตรตำรับครีมพื้นฐาน, ครีมเคออสติน และ ครีมไลโปโซม เคออสติน.....	21
3 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบ DPPH radical scavenging assay ของ ไลโปโซมเคออสติน.....	23
4 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบ DPPH radical scavenging assay ของครีม.....	26
5 ขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index) และ Zeta potential ของไลโปโซมที่เตรียม ด้วยวิธี Hydration of thin-film เปรียบเทียบ วันที่ 1 กับสัปดาห์ที่ 4 ของการเตรียมไลโปโซม F1, F2 และ F3 (w:w) (n = 3).....	27
6 ผลการศึกษา ขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index), Zeta potential และร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บเคออสติน (%entrapment efficiency) ของการพัฒนาการตั้งสูตรตำรับไลโปโซม เคออสติน 70:30:1 (w: w: v) (n = 3).....	28
7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเคออสตินด้วยวิธี DDPH Radical Scavenging Capacity Assay.....	29
8 ผลการศึกษาขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index), Zeta potential, ร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคออสติน (% Entrapment Efficiency) และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ในความคงสภาพสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) ของไลโปโซมเคออสติน 70:30:1 (w: w: v) (n = 3).....	32
9 ผลการศึกษาขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index) และ Zeta potential ในความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ ของไลโปโซมเคออสติน 70:30:1 (w:w:v) (n = 3).....	33
10 ปริมาณเคออสตินและร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคออสติน (%Entrapment Efficiency) ของไลโปโซมเคออสติน ในการศึกษาความคง สภาพระยะยาว (Long term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	35

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
11	ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ของไลโปโซมเคอควิทินในการศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	36
12	ลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคอควิทิน และครีมเคอควิทิน หลังเตรียมเสร็จทันที (n = 3).....	39
13	ลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคอควิทิน และครีมเคอควิทินหลังการศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) (n = 3).....	40
14	ร้อยละปริมาณเคอควิทินที่คงเหลือ (%Remaining of quercetin) ในครีมไลโปโซมเคอควิทิน และครีมเคอควิทินหลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) (n = 3).....	41
15	ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ของครีมไลโปโซมเคอควิทินและครีมเคอควิทิน หลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) (n = 3).....	42
16	ลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Heating cooling testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	44
17	ลักษณะทางกายภาพของครีมไลโปโซมเคอควิทิน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Heating cooling testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	45
18	ลักษณะทางกายภาพของครีมเคอควิทิน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Heating cooling testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	46
19	ร้อยละปริมาณเคอควิทินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin) ในครีมไลโปโซมเคอควิทินและครีมเคอควิทิน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	47

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
20	ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) ของครีมไลโปโซมเคอซีตินและครีมเคอซีติน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	49
21	ปริมาณเคอซีตินและร้อยละปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ (%Remaining of quercetin) ในครีมไลโปโซมเคอซีติน และครีมเคอซีตินหลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles จำนวน 6 cycles (4±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) (n = 3).....	62
22	ร้อยละการยับยั้ง DPPH (%Inhibition) และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ของครีมไลโปโซมเคอซีตินและครีมเคอซีตินหลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) (n = 3).....	63
23	ปริมาณเคอซีติน และร้อยละปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin) ในครีมไลโปโซมเคอซีติน และครีมเคอซีตินหลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	63
24	ร้อยละการยับยั้ง DPPH (%Inhibition) และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (% Remaining DPPH Inhibition) ของครีมไลโปโซมเคอซีตินและครีมเคอซีติน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3).....	64

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงชั้นผิวหนัง (Skin).....	4
2 แสดงชั้นของไลโปโซม (Liposome).....	6
3 แสดงไลโปโซม (Liposome).....	7
4 แสดงการเปลี่ยนแปลงอนุมูล DPPH ภายหลังเกิดปฏิกิริยารีดักชัน.....	13
5 แสดงโครงสร้างเคออสติน.....	15
6 (A.), (B.), (C.) ไลโปโซมเคออสติน เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM).....	29
7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเคออสตินและการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH.....	30
8 กราฟ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) และร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคออสติน (%Entrapment Efficiency) ในการศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long term testing) 12 สัปดาห์.....	37
9 (A.) ไลโปโซมหลังเตรียมเสร็จทันที, (B1-B3) ไลโปโซมที่อุณหภูมิ 4, 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องสัปดาห์ที่ 2, (C1-C3) ไลโปโซมที่อุณหภูมิ 4, 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องสัปดาห์ที่ 4, (D1-D3) ไลโปโซมที่อุณหภูมิ 4±1, 45±1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องสัปดาห์ที่ 8, (E1-E3) ไลโปโซมที่อุณหภูมิ 4±1, 45±1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องสัปดาห์ที่ 12, (D.) ไลโปโซมที่ ทดสอบในความคงสภาพสภาวะเร่ง จำนวน 6 cycles.....	38
10 (A) ครีมพื้นฐาน, (B) ครีมเคออสติน, (C) ครีมไลโปโซมเคออสติน หลังเตรียมเสร็จทันที.....	39
11 (A) ครีมพื้นฐานทดสอบ, (B) ครีมเคออสตินทดสอบ, (C) ครีมไลโปโซมเคออสตินหลังการศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง จำนวน 6 cycles.....	40
12 (A1, B1, C1, D1/ A4, B4, C4, D4/ A7, B7, C7, D7) ครีมพื้นฐานสัปดาห์ที่ 2-12 ที่อุณหภูมิ 4±1, 45±1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 ±1°C), (A2, B2, C2, D2, A5, B5, C5, D5, A8, B8, C8, D8) ครีมเคออสตินสัปดาห์ที่ 2-12 ที่อุณหภูมิ 4±1, 45±1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 ±1°C), (A3, B3, C3, D3, A6, B6, C6, D6, A9, B9, C9, D9) ครีมไลโปโซมเคออสตินสัปดาห์ที่ 2-12 ที่อุณหภูมิ 4±1, 45±1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 ±1°C).....	43

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) และร้อยละปริมาณเคอควิทินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin)	50
14 ความยาวคลื่นของไลโปโซมเคอควิทินสูตร 70:30:1 (สีเขียว), 80:20:1 (สีแดง) และ 90:20:1 (สีเขียว) (w:w:v)	61
15 ความยาวคลื่นของไลโปโซมเคอควิทินสูตร 70:30:1 (สีเหลือง) (w:w:v) เปรียบเทียบกับเคอควิทินมาตรฐาน (สีแดง)	61
16 ความยาวคลื่นของครีมไลโปโซมเคอควิทิน (สีเหลือง) และครีมเคอควิทิน (สีฟ้า) เปรียบเทียบกับเคอควิทินมาตรฐาน.....	62
17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราคั้นเนื้อของ ครีมไลโปโซมเคอควิทิน (C.) และ (D.) ครีมเคอควิทิน ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์.....	64
18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราคั้นเนื้อของ ครีมไลโปโซมเคอควิทิน (F.) และครีมเคอควิทิน (G.) ที่อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์.....	65

สัญลักษณ์และคำย่อ

IC50	=	ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50
°C	=	องศาเซลเซียส
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
nm	=	นาโนเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
w: w	=	น้ำหนักต่อน้ำหนัก
w: w: v	=	น้ำหนักต่อน้ำหนักต่อปริมาตร
g	=	กรัม
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
DPPH	=	อนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
%EE	=	%Entrapment efficiency
PdI	=	Polydispersity index
TEM	=	Transmission electron microscope
PBS	=	Phosphate buffer saline
CB	=	Cream base
CQ	=	Cream quercetin
CLQ	=	Cream Liposomes Quercetin

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันความนิยมในการใช้ผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลผิวพรรณได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในกลุ่มผู้ใช้โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีสรรพคุณช่วยในการชะลอวัย มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอะตอมหรือกลุ่มของอะตอมที่มีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) มีความไม่เสถียรและว่องไวมาก (reactive) ในเซลล์ของสัตว์อนุมูลอิสระสามารถทำลายเซลล์เป็นเหตุให้เกิดโรคได้⁽³⁰⁾ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือด และโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของร่างกายหรือสุขภาพ จึงมีผู้ประกอบการมากมายในท้องตลาดได้พัฒนาการผลิตครีมที่มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีสรรพคุณชะลอวัยและลดริ้วรอยที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระในร่างกาย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือ⁽¹⁶⁾ สารที่ทำลายอนุมูลอิสระทำหน้าที่ป้องกันสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน (lipid) และเอนไซม์ที่สำคัญ (regulatory enzymes) นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เป็นลำดับโดยกระบวนการการออกฤทธิ์ที่จุดต่างๆ ของการสร้างอนุมูลอิสระ สารชีวโมเลกุลที่มีหน้าที่ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้⁽⁴³⁾ เช่น อัลบูมิน (albumin), กลูโคส (glucose), คาร์โนซีน (carnosine), ทอรีน (taurine), กรดยูริก (uric acid) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารในธรรมชาติที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid), กรดไฟติก (phytic acid), โพลีฟีนอล (polyphenol) เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าในผลิตภัณฑ์ครีมที่มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระนิยมใช้สารที่ได้จากการสังเคราะห์⁽¹⁵⁾ เช่น วิตามินเอ (vitamin A), วิตามินซี (vitamin C), วิตามินอี (vitamin E), โคเอนไซม์คิวเทน (coenzyme Q10), ซิงค์ (zinc), คอปเปอร์ (copper), เบต้าแคโรทีน (beta carotene) และ กรดแอสคอร์บิก (L-Ascorbic Acid) เป็นต้น ร่วมกับการนำสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนำมาเป็นส่วนประกอบของครีม เช่น สารสกัดจากชาเขียว (green tea), ทับทิม (pomegranates), กาแฟ (coffee berries), เมล็ดองุ่น (grape seeds), มะกอก (olives) และเห็ด (mushrooms) เป็นต้น แต่ปัญหาหลักของเครื่องสำอางบำรุงผิวที่มีส่วนประกอบสารต้านอนุมูลอิสระคือความคงตัวต่ำและมีประสิทธิภาพลดลงอย่างรวดเร็วในเวลาอันสั้นเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ หรือบรรจุภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสม มีการออกแบบและศึกษาระบบนำส่งที่ช่วยเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระได้ยาวนานมากยิ่งขึ้น อาศัยการใช้ระบบนำส่งด้วยอนุภาคขนาดนาโน (nano vesicles) ทั้งนี้ได้มีการทดลองในรูปแบบของไลโปโซม (liposomes)⁽³⁴⁾ ที่มีลักษณะคล้ายเป็นถุงที่ได้จากการเตรียมด้วยฟอสโฟลิพิดที่มีความคล้ายคลึงกับผนังเซลล์ ไลโปโซมมีคุณสมบัติคือสามารถกักเก็บสารสำคัญหรือตัวยา เพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญหรือตัวยาให้ยาวนานมากยิ่งขึ้น ไลโปโซมช่วยป้องกันไม่ให้สารต้านอนุมูลอิสระไม่ให้

สลายตัวจากสภาวะภายนอก มีการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการผลิตยาและเครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการพัฒนาไลโปโซมบรรจุเคอซีทิน และครีมไลโปโซมบรรจุเคอซีทินสำหรับเครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ยาวนานขึ้น โดยนำเอาสารเคอซีทินนั้นมากักเก็บในไลโปโซมก่อนที่จะนำไปผสมในครีม ทดสอบปริมาณเคอซีทินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเคอซีทินเปรียบเทียบกับครีมผสมเคอซีทินที่ไม่ได้กักเก็บในไลโปโซม

วัตถุประสงค์

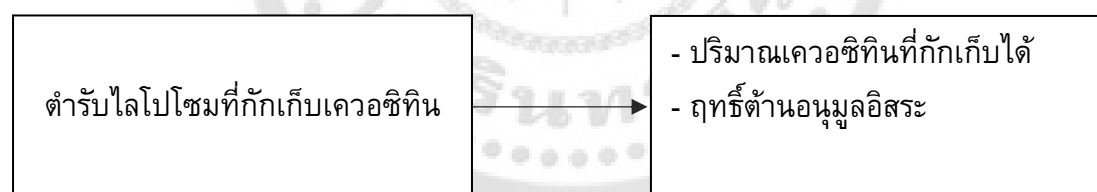
1. เพื่อพัฒนาตำรับไลโปโซมที่กักเก็บเคอซีทิน
2. เพื่อพัฒนาตำรับครีมผสมไลโปโซมที่กักเก็บเคอซีทินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ยาวนานขึ้น
3. เพื่อศึกษาความคงสภาพของตำรับครีมผสมไลโปโซมที่กักเก็บเคอซีทิน

ปัจจัยและตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรอิสระ : ตำรับไลโปโซมที่กักเก็บเคอซีทิน

ตัวแปรตาม : ปริมาณเคอซีทินที่กักเก็บ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

กรอบแนวคิดงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ตำรับไลโปโซมบรรจุเคอซีทิน และครีมไลโปโซมบรรจุเคอซีทินสำหรับเครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ยาวนานขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับผิวหนัง

ผิวหนัง (Skin) เป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่และทำหน้าที่ห่อหุ้มร่างกาย ประกอบไปด้วยต่อมเหงื่อ (sweat gland) และต่อมไขมัน (sebaceous gland) ผิวหนังมีหน้าที่สำคัญ คือ ป้องกันอันตรายต่างๆจากสิ่งแวดล้อม เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความชื้น และเชื้อโรค ควบคุมอุณหภูมิร่างกายโดยการทำงานของต่อมเหงื่อและรูขุมขน รับความรู้สึกต่างๆ เช่น ความร้อน-เย็น และความเจ็บปวด เป็นต้น ผิวหนังประกอบไปด้วย 2 ส่วนสำคัญคือ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และชั้นหนังแท้ (dermis) ⁽¹⁾

ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ⁽¹⁾ จะแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ หนังกำพร้าชนิดหนา (thick epidermis) พบที่ฝ่ามือและฝ่าเท้า หนังกำพร้าชนิดบาง (thin epidermis) พบบริเวณอื่นๆของร่างกาย เช่น ตามลำตัว แขน ขา และใบหน้า เป็นต้น ส่วนประกอบของชั้นหนังกำพร้าที่สำคัญได้แก่

1. เคอราติโนไซต์ (keratiocyte) เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสร้างสารเคราติน (keratin) สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชั้นจากชั้นที่ลึกที่สุดคือ เบซัล เลเยอร์ (basal layer), พิคเคิล เลเยอร์ (prickle layer), แกรนูลลา เลเยอร์ (granular layer) และสตราตัม คอrneียม (stratum corneum) ที่จะอยู่ชั้นบนสุด

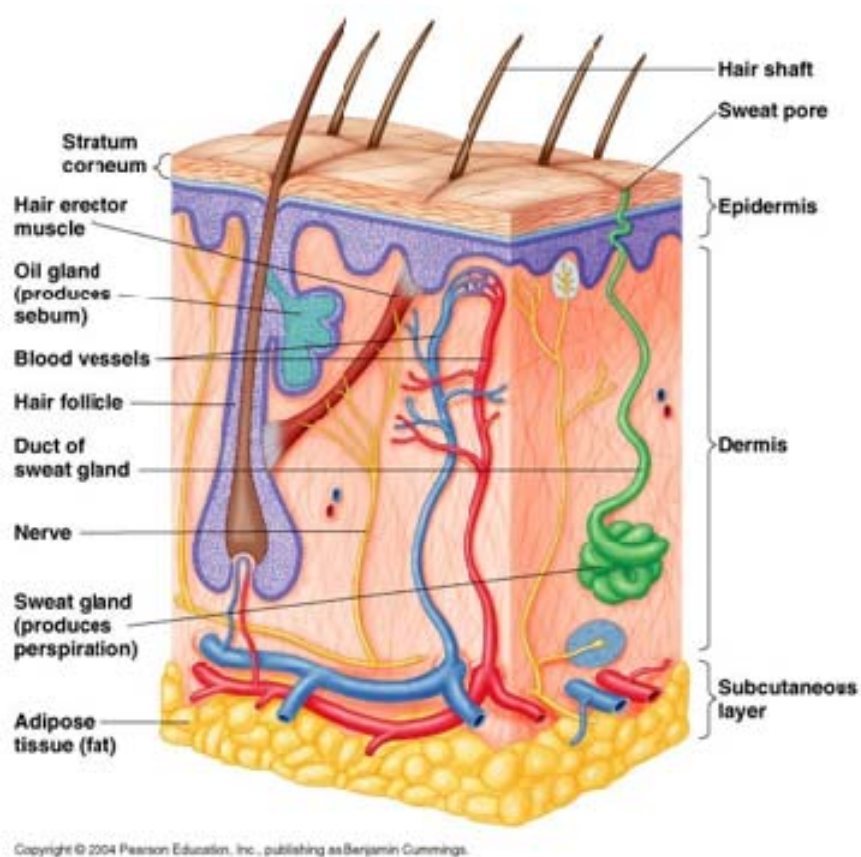
2. Epidermal appendage เป็นอวัยวะที่ออกจากชั้นหนังกำพร้าลึกลงไปชั้นหนังแท้ ได้แก่ Eccrine Sweat Unit, Apocrine Unit, Hair Follicle และ Sebaceous Gland Unit

3. เซลล์อื่นๆ ได้แก่ เซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhans cell) เป็นเซลล์ในระบบต้านทานผิวหนัง และเซลล์เมลานোসายต์ (melanocyte) เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสร้างเซลล์เม็ดสีผิว

ชั้นหนังแท้ (dermis) ⁽¹⁾ เป็นชั้นที่อยู่ลึกลงมาจากชั้นหนังกำพร้า บริเวณรอยต่อของทั้ง 2 ชั้น โดยจะมีส่วนของหนังกำพร้าที่ยื่นลงไปชั้นหนังแท้เรียกว่า Epidermal appendage และส่วนของชั้นหนังแท้ที่ยื่นเข้าไปในชั้นหนังกำพร้าเรียกว่า Dermal papillae ซึ่งบริเวณชั้นหนังแท้จะแบ่งออกเป็น 2 ชั้น ได้แก่

1. Papillary layer เป็นชั้นที่พบหลอดเลือดจำนวนมาก

2. Reticular layer เป็นชั้นที่ประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจน (collagen) และอีลาสติก (elastic) ซึ่งชั้นนี้จะพบหลอดเลือดน้อยกว่าชั้น Papillary layer ⁽¹⁾



ภาพประกอบ 1 ชั้นผิวหนัง (Skin)⁽³³⁾

ผิวหนังจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพของผิวเป็นไปตามอายุ เพศ และสิ่งแวดล้อมภายนอกผิว ซึ่งผิวบริเวณใบหน้าสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด⁽²⁾ ได้แก่

1. ผิวธรรมดา (normal skin) คือ ผิวที่เรียบเนียนและอ่อนนุ่ม รูขุมขนเล็ก
2. ผิวมัน (oily skin) คือ ผิวหยาบมักจะเกิดสิหัวดำ เนื่องจากเกิดการอุดตันของไขมันบริเวณรูขุมขน หลังตื่นนอนมักพบร่องรอยของน้ำมันบนผิว
3. ผิวแห้ง (dry skin) คือ ผิวที่ละเอียด ค่อนข้างบอบบาง และเกิดริ้วรอยได้ง่าย
4. ผิวผสม (combination skin) คือ ผิวผสมระหว่างผิวธรรมดา ผิวมัน และผิวแห้ง หลังตื่นนอนมักพบร่องรอยของน้ำมันบริเวณ T-zone คือบริเวณคาง จมูก และหน้าผาก

ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซึมของตัวยาผ่านชั้นผิวหนัง^{(3), (4)}

1. ช่องทางการซึมผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนัง มีทั้งหมด 3 ช่องทางหลัก คือ
 - 1.1. ทางท่อและต่อม (Appendageal route) คือ การซึมผ่านของตัวยาผ่านต่อมเหงื่อ, ต่อมไขมัน และทางท่อเปิดของรูขุมขน มีการซึมผ่านของตัวยาผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้สูงในช่องทางนี้โดยมีพื้นที่ซึมผ่านคิดเป็น 0.1% ของผิวหนังทั้งหมด และยังเป็นช่องทางที่สำคัญสำหรับการซึมผ่านของไอออนและสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ในการเข้าสู่ชั้นผิวหนัง

1.2. ทางเซลล์ (Transcellular route) คือ การซึมผ่านของตัวยาเข้าสู่ผิวหนัง โดยผ่านทางเซลล์คอร์นีโอไซต์ในชั้นสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) แล้วถูกดูดซึมผ่าน เซลล์ชั้นต่างๆ ต่อไปเรื่อยๆ ซึ่งต้องผ่านทั้งส่วนที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันสลับกันไป ยาที่ละลายใน ไขมันจะซึมผ่านโปรตีนประเภทเคราติน (keratin) ซึ่งอยู่ในเซลล์คอร์นีโอไซต์

1.3. ทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (Intercellular route) คือ การซึมผ่านของยาผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งมีไขมันที่มีขั้วหลายชนิด เรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ และมีน้ำกักเก็บอยู่ภายในไขมันสารที่ซึมผ่านจะต้องไม่ละลายดีจนเกินไป เพราะจะทำให้ยาที่ถูกกักเก็บไว้ในชั้นนี้ไม่กระจายตัวไปยังผิวหนังชั้นถัดไป ดังนั้น ยาที่ผ่าน ช่องทางนี้ควรมีความสมดุลระหว่างการละลายในน้ำและน้ำมัน ซึ่งค่าที่ซึมผ่านดีควรมีค่าสัมประสิทธิ์ การแบ่งภาคระหว่างน้ำและน้ำมันประมาณ 1

2. โครงสร้างของผิวหนัง แบ่งเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้น หนังแท้ (dermis) และชั้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) โดยส่วนใหญ่ตัวยาจะผ่านทาง หนังกำพร้ามากกว่าทางต่อมไขมันและต่อมเหงื่อ เพราะที่หนังกำพร้ามีเนื้อที่ผิวมากกว่าต่อมไขมัน และต่อมเหงื่อ 100 ถึง 1000 เท่า แต่ในบางกรณีจะมีการดูดซึมของตัวยาเข้าสู่ผิวหนังโดยผ่านทาง ต่อมไขมันและต่อมเหงื่อสำหรับตัวยาที่สามารถละลายได้ในน้ำมัน

3. สถานะของผิวหนัง ผิวหนังในสภาพปกติมีการต้านทานต่อการดูดซึมของตัวยา ผ่านเข้าสู่ผิวหนังค่อนข้างสูง ถ้าผิวหนังมีรอยขีดข่วนหรือเป็นแผล การดูดซึมของสารสำคัญจะมีมาก ขึ้น

4. องค์ประกอบของผิวหนัง ผิวหนังที่ชุ่มชื้นเต็มที่มียอดประกอบทางเคมี คือ น้ำ 75% โปรตีน 20% และไขมัน 5% สารของผิวหนังที่ดูดน้ำได้ดี คือ ไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) มีประมาณ 30% ถ้าสารนี้ถูกเปลี่ยนแปลงปริมาณไป การดูดซึมผ่านผิวหนัง ก็เปลี่ยนแปลงไปด้วย

5. อายุของผิวหนัง ผิวหนังเด็กจะมีความต้านต่อการดูดซึมต่ำกว่าผู้ใหญ่ ความหนา ของ สตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) จะมีมากที่สุดเมื่ออายุ 35 ปี และลดลงเมื่ออายุ มากกว่า 65 ปี

6. อุณหภูมิของผิวหนัง ถ้าอุณหภูมิของผิวหนังสูง จะมีการดูดซึมของสารสำคัญ มากขึ้น

7. ความชุ่มชื้นของผิวหนัง ผิวหนังธรรมดามีน้ำอยู่ประมาณ 10 - 20% ถ้ามีน้อยกว่า 10% ผิวหนังจะแห้งเป็นขุย ในสภาพที่ชุ่มชื้นเต็มที่ปริมาณของน้ำจะสูงเป็น 50 - 75% การดูด ซึมของสารสำคัญจะเพิ่มได้มากกว่าปกติถึง 5 เท่าตัว เนื่องจากทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม มีลักษณะ คล้ายฟองน้ำ เพิ่มขนาดรูขุมขน ทำให้ตัวยาผ่านได้มากขึ้น ทั้งนี้เพราะสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) เมื่อแห้งจะมีความหนาประมาณ 15 ไมครอน ถ้าเปียกชื้นด้วยน้ำจะขยายความหนาเป็น 48 ไมครอน การที่ผิวหนังจะชุ่มชื้นด้วยน้ำมาน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับอัตราการเกิดเหงื่อด้วยเช่นกัน

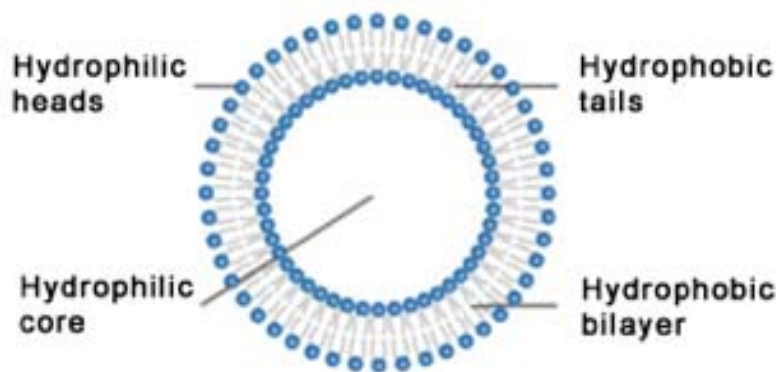
8. การไหลเวียนของโลหิต ในชั้นของหนังแท้ที่มีโลหิตมาหล่อเลี้ยง ถ้ามีการไหลเวียนของโลหิตเพิ่มขึ้น ตัวยาจะถูกพาไปจากชั้นของหนังแท้มากขึ้นทำให้การดูดซึมของสารสำคัญจากหนังกำพร้าเข้าสู่ผิวหนังแท้ได้มากขึ้นด้วย

9. บริเวณที่ทาอัตราการดูดซึมของสารสำคัญผ่านผิวหนังจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาและเนื้อที่ของผิวหนังที่ปกคลุมด้วยครีม พบว่าที่สันเท้าและฝ่ามือ หนังกำพร้ามีความหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร ที่บริเวณหน้าและลำตัวหนาประมาณ 0.1 มิลลิเมตร

10. สูตรโครงสร้างของโมเลกุลและขนาดของสารสำคัญที่มีขนาดเล็ก จะช่วยเพิ่มการดูดซึมของสารสำคัญผ่านเข้าสู่ผิวหนัง

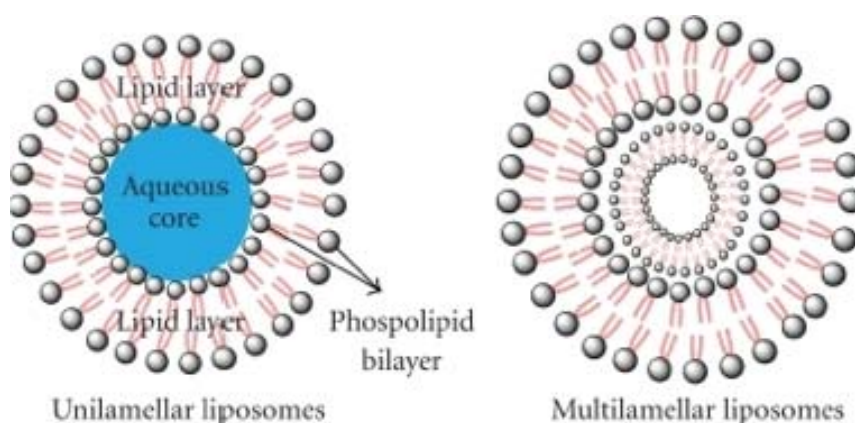
2. ไลโปโซม

ไลโปโซม (liposomes) คือ อนุภาคขนาดเล็กหรือถุงขนาดเล็ก มีการกล่าวถึงไลโปโซมในครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1961 โดย Dr. Alec D Bangham FRS ⁽⁵⁾ ซึ่งไลโปโซมมีไขมันเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ได้จากการเตรียมด้วยฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ⁽³⁷⁾ ที่ได้จากธรรมชาติ เช่น ไข่ขาว (yolk egg) และถั่ว (soybean) หรือได้จากการสังเคราะห์ เช่น DOPE (dioylphosphatidyl ethanolamine), DSPC (Dipalmitoyl phosphatidyl choline) ⁽⁶⁾ ซึ่งโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดจะทำการเรียงตัวสลับกับชั้นน้ำมีลักษณะการเรียงตัวแบบ 2 ชั้น คือจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เข้ากันและหันส่วนที่ชอบน้ำออก (hydrophilic) ภายในทรงกลมจะเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic)



ภาพประกอบ 2 ชั้นของไลโปโซม (Liposome) ⁽³²⁾

ไลโปโซมที่มี Double layer สามารถอยู่ในรูปที่มีชั้นไขมันเพียงชั้นเดียว ที่เรียกว่า Unilamellar liposomes หรือจะอยู่ในรูปที่มีชั้นไขมันหลายชั้น ที่เรียกว่า Multilamellar liposomes ไลโปโซมโดยทั่วไปจะมีขนาดอนุภาค 20 นาโนเมตร ถึง 10 ไมโครเมตร



ภาพประกอบ 3 ไลโปโซม (Liposome) ⁽³²⁾

จากการศึกษาพบว่าการเตรียมไลโปโซมต้องอาศัยอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยมีองค์ประกอบ 2 ส่วน คือ ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) และส่วนประกอบอื่นๆ เช่น โคเลสเตอรอล (cholesterol) สารลดแรงตึงผิว (detergent) น้ำ และเอทานอล (ethanol) ซึ่งฟอสโฟลิพิดจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักให้กับไลโปโซม และโคเลสเตอรอล สารลดแรงตึงผิว และเอทานอล จะเป็นส่วนประกอบที่ทำให้ผนังของไลโปโซมมีความแข็งแรง เพิ่มความคงสภาพให้กับไลโปโซม เพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง หรือเพื่อให้ไลโปโซมมีประจุที่ผิว ⁽⁴⁾ โคเลสเตอรอล (cholesterol) มีความนิยมใช้เป็นส่วนประกอบของไลโปโซม ทำให้ผนังของไลโปโซมแข็งแรงและมีความคงสภาพดี ^{(7), (8)}

2.1 กลไกการเกิดไลโปโซม

เกิดจากปัจจัยดังต่อไปนี้ ⁽⁹⁾

1. แรงที่มีผลทำให้โมเลกุลไขมันเรียงตัว ได้แก่

1.1. Hydrophobic effect คือ แรงจากความไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำของสายไฮโดรคาร์บอน ทำให้เกิดแรงดูด

1.2. Hydrophilic effect คือแรงที่เกิดจากส่วนมีขั้วหรือชอบน้ำทำให้เกิดการทำปฏิกิริยากับน้ำทำให้เกิดแรงผลัก จากแรงที่เกิดขึ้นทำให้เกิดสมดุลระหว่างแรงทั้ง 2 ประเภททำให้เกิดการกำหนดขนาดและโครงสร้างของไขมันในน้ำ

2. ความสมดุลระหว่างขั้วของไขมัน หรือ HLB (hydrophilic lipophilic balance) ความสมดุลระหว่างส่วนมีขั้ว (hydrophilic) และส่วนไม่มีขั้ว (lipophilic)

3. อัตราส่วนของไขมัน น้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ ที่เหมาะสม

โดยสรุปแล้วการเตรียมไลโปโซมประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักดังนี้

1. ละลายฟอสโฟลิพิดในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม
2. แยกตัวทำละลายออกจากฟอสโฟลิพิด
3. กระจายฟอสโฟลิพิดในตัวกลางที่เป็นน้ำ
4. แยกยาหรือสารที่ไม่ถูกกักเก็บออกจากยาหรือสารที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม

การเตรียมไลโปโซมสามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น Hydration of a Thin-film method, Solvent (Ether or Ethanol) Injection Technique, Detergent Dialysis และ Reverse-Phase Evaporation (REV) เป็นต้น⁽⁹⁾ เทคนิค Hydration of a Thin-film เป็นตัวอย่างการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธี การกระจายตัวทางกายภาพ (physical dispersion) คือ การเตรียมไลโปโซมโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ให้ไลโปโซม โดยทั่วไปตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้คือ คลอโรฟอร์ม (chloroform) หรือไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) หลังจากกระเหยตัวทำละลายออกจะเหลือไขมันแห้งเป็นแผ่นฟิล์มเคลือบภายในขวดแก้ว สามารถเติมสารสกัดหรือตัวยาลงไปในชั้นตอนนี้ จากนั้นเติมสารละลายน้ำที่อาจมีตัวยาหรือไม่มีตัวยาลงบนแผ่นฟิล์มแล้วเขย่าให้เข้ากันจะได้คอลลอยด์ของไลโปโซม จากนั้นนำไลโปโซมที่เตรียมได้พองตัว (Swelling) ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิทรานสิชัน (Tc) ของไขมัน (อุณหภูมิ ณ จุดวิกฤต) โดยใช้เวลาประมาณ 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง^{(8), (9)} เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่เตรียมแล้วจะได้ไลโปโซมชนิดที่มีผนัง 2 ชั้นหลายชุด (MLV; Multilamellar Vesicle) เป็นเทคนิคที่ง่ายในการเตรียมไลโปโซมระดับห้องปฏิบัติการ ยาหรือสารสกัดที่ละลายได้ดีในน้ำหรือเป็นสารประเภทมีขั้วหรือมีประจุ จะถูกกักเก็บในชั้นที่ขอบน้ำของไลโปโซม ส่วนของยาหรือสารสกัดที่ละลายในน้ำได้ไม่ดีหรือยาที่ละลายในไขมันหรือสารประเภทไม่ชอบน้ำ จะถูกกักเก็บในชั้นที่ขอบไขมันของไลโปโซม คือบริเวณผนัง 2 ชั้นของไลโปโซม (double layer)

2.2 ประเภทของไลโปโซม⁽³⁴⁾

สามารถจำแนกตามขนาดและจำนวนชุดของผนังสองชั้น แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. ไลโปโซมขนาดเล็กที่มีผนัง 2 ชั้นชุดเดียว ขนาด 25 - 100 นาโนเมตร (SUV; Small Unilamellar Vesicle)
2. ไลโปโซมขนาดใหญ่ ที่มีผนัง 2 ชั้นชุดเดียว ขนาด 100 - 400 นาโนเมตร (LUV; Large Unilamellar Vesicle)
3. ไลโปโซมที่มีผนัง 2 ชั้นหลายชุด ขนาด 0.2 - 10 ไมโครเมตร (MLV; Multilamellar Vesicle)

2.3 การตรวจสอบสมบัติและการควบคุมคุณภาพของไลโปโซม

1. ลักษณะชั้นของไลโปโซม (lamellarity determination) ซึ่งจำนวนชั้นผนังของไลโปโซมมีผลต่อปริมาณการกักเก็บและปลดปล่อยยาหรือสารสำคัญของไลโปโซม

2. ขนาดอนุภาคของไลโปโซม (size) และการกระจายขนาด (Polydispersity index) สามารถศึกษาได้หลายวิธี เช่น

- 2.1. Microscopy techniques ^{(35), (36)}
- 2.2. Dynamic light Scattering (DLS) ⁽¹⁰⁾
- 2.3. HPLC (high performance liquid chromatography) ⁽⁸⁾
3. ค่า Zeta-Potential คือค่าประจุผิวของอนุภาคของไลโปโซม
4. การทดสอบความคงตัวของไลโปโซม (stability test) ได้แก่
 - 4.1. ความคงตัวทางกายภาพ (physical stability)
 - 4.2. ความคงตัวทางเคมี (chemical stability)
 - 4.3. ความคงตัวทางชีวภาพ (biological stability)

2.4 ข้อดีและข้อเสียของไลโปโซม

ข้อดีของไลโปโซม คือ

1. สามารถกักเก็บตัวยาหรือสารสกัดที่สามารถละลายน้ำหรือน้ำมัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ ไลโปโซมคือสามารถกักเก็บสารที่มีความชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (lipophilic) ได้ทั้ง 2 ประเภท ⁽⁹⁾
2. ไลโปโซมที่ได้จากการเตรียมด้วยฟอสโฟลิปิดจะสามารถเปลี่ยนแปลงเภสัชจลนศาสตร์ของยา (pharmacokinetics) สารสกัดสมุนไพร วิตามิน และเอนไซม์ที่ถูกกักเก็บในไลโปโซมโดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ ลดความเป็นพิษของสารสกัดที่ถูกกักเก็บโดยไลโปโซมสามารถปรับเปลี่ยนเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) และการกระจายของยาหรือสารสกัด ⁽¹¹⁾
3. คุณสมบัติเฉพาะของไลโปโซมคือมีความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของตัวยาหรือสารสกัดที่กักเก็บไว้ภายในไลโปโซม ⁽³⁴⁾ ไลโปโซมไม่มีความเป็นพิษเมื่อนำไปเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ เนื่องจากไลโปโซมได้จากการเตรียมด้วยไขมันซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับชั้นผิวหนัง ⁽⁶⁾
4. มีการศึกษาในการนำส่งสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่นำส่งด้วยไลโปโซมพบว่าสามารถทำให้ผลการรักษาที่ดีในภาวะออกซิเดทีฟ สเตรส (oxidative Stress) (ภาวะที่อนุมูลอิสระมีมากจนสารต้านอนุมูลอิสระมีไม่เพียงพอและจากสาเหตุดังกล่าวส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ (DNA), โปรตีน (protein), ไขมัน (lipid) และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระ ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มพลาสมา (plasma membrane) ของเซลล์ได้ มีความคงตัวต่ำและค่าครึ่งชีวิตสั้นในพลาสมา การนำส่งสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้นและสามารถให้ผลทั้งในการป้องกันและรักษาภาวะที่เกิดจากออกซิเดทีฟ สเตรส (oxidative stress) เป็นสาเหตุได้

ข้อเสียของไลโปโซม คือ ^{(12), (13)}

1. ต้นทุนในการผลิตสูง
2. การเตรียมไลโปโซม บางครั้งอาจเกิดการรั่วซึมและการหลอมละลายของตัวยา หรือสารสกัดที่ถูกกักเก็บไว้ในไลโปโซม
3. ไลโปโซมมีขีดจำกัดในการละลายที่ต่ำ

3. ครีม

ครีม (cream) คือ ผลิตภัณฑ์อิมัลชันชนิดกึ่งแข็ง-กึ่งเหลว (semi-solid emulsion) นิยมนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และยารักษาโรคผิวหนัง ⁽⁴⁴⁾ การตั้งสูตรตำรับครีมมีส่วนประกอบ ดังนี้ น้ำมันพืช (oil), ขี้ผึ้งธรรมชาติ (wax), Lanolin, Wool fat, Wool wax, เจลาติน (gelatin), เลซิธิน (lecithin), สารกันเสีย (preservative), น้ำหอม (essential oil) และวิตามิน (vitamin) โดยจะแบ่งส่วนผสมออกเป็น 2 วัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคน้ำ (water phase) และวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) ⁽¹⁴⁾ ลักษณะทางกายภาพที่ดีของครีม ได้แก่ เนื้อสัมผัสที่เนียนนุ่ม เนื้อครีมแผ่กระจายได้ง่ายเมื่อทา ทำให้เกิดความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง ล้างน้ำออกง่าย และสามารถคงตัวได้ในอุณหภูมิปกติ ⁽³¹⁾

3.1 ชนิดของครีม ⁽³⁾

ครีมแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. ครีมที่ใช้เป็นยา (medicated Creams) ส่วนมากจะมีตัวยาละลาย หรือกระจายตัวในยาพื้นแบบอิมัลชัน (emulsion) ชนิด Oil in Water (O/W) หรือ Water in Oil (W/O)
 - 1.1. ชนิด Oil in Water (O/W) เป็นครีมที่ล้างน้ำได้
 - 1.2. ชนิด Water in Oil (W/O) เป็นครีมชนิดมัน (มักใช้กับตัวยาหรือสารสำคัญที่มีฤทธิ์บำบัดรักษา)
 2. ครีมที่ใช้เป็นเครื่องสำอาง (cosmetic creams) ปัจจุบันมีความนิยมใช้มาก เรียกชื่อต่างกันตามประโยชน์ที่นำไปใช้ เช่น ครีมล้างหน้า (cleansing cream) ครีมป้องกันผิว (barrier cream) ครีมทำให้ผิวนุ่ม (emollient cream) และครีมบำรุงผิว (nourishing cream) เป็นต้น
- ความแตกต่างของครีมที่ใช้ในเครื่องสำอาง คือ ไม่ต้องการให้ซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนัง วัตถุประสงค์ใช้ทางป้องกันผิวหนัง (protective) แต่ถ้าเป็นครีมที่ใช้ในทางยาต้องการทั้งการซึมผ่านและการป้องกันผิวหนัง เพื่อให้ได้ผลในการรักษาโรคผิวหนัง

3.2 การตั้งตำรับครีม⁽³⁾

ในการตั้งตำรับครีมทั่วไปจะประกอบไปด้วย 2 วัฏภาค คือวัฏภาคที่เป็นน้ำ (water phase) และวัฏภาคที่เป็นน้ำมัน (oil phase) การตั้งตำรับครีมขึ้นอยู่กับทางเลือกตัวยาในวัฏภาคที่เป็นน้ำมัน และวัฏภาคที่เป็นน้ำให้มีคุณสมบัติเหมาะสมและให้ผลดีในระหว่างใช้และภายหลังใช้สิ่งที่ต้องพิจารณาในหัวข้อใหญ่ๆ คือ

1. เกี่ยวกับความแข็ง ต้องการความแข็งมากน้อยเพียงใด
2. เกี่ยวกับการไหล ต้องให้มีการไหลได้ง่ายเพื่อช่วยในการแผ่กระจายไปบน

ผิวหนัง

3. เกี่ยวกับการติดผิว เมื่อทาที่ผิวหนังควรมีการติดผิวได้ดี

3.3 การทดสอบคุณภาพครีมหลังการเตรียม

การทดสอบคุณภาพครีมหลังการเตรียม มีวัตถุประสงค์เพื่อดูความคงสภาพของครีมที่เตรียม ก่อนนำสู่ท้องตลาด มีรายการดังต่อไปนี้⁽¹⁵⁾

1. การทดสอบทางกายภาพของครีม (organoleptic evaluation) ได้แก่ ค่า pH, สี, กลิ่น, เนื้อครีมเนื้อสัมผัสของครีม และการกระจายตัวของเนื้อครีม
2. การทดสอบความคงสภาพของครีม (stability Studies) สามารถทำตามข้อกำหนด ICH (ICH guidelines) ซึ่งประกอบไปด้วยหลายวิธี เช่น Freeze thaw cycling หรือ Heating cooling cycle เป็นการศึกษาคงสภาพผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการทดสอบในสภาวะเร่ง (accelerated testing) โดยการเก็บตัวอย่างที่ทดสอบในสภาวะที่รุนแรงมากกว่าความเป็นจริง, Long-testing เป็นการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ระยะยาว เพื่อที่จะยืนยันถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ตลอดระยะเวลาที่น่าออกจำหน่าย, Mechanical test หรือ Centrifuge เป็นการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะรุนแรง (severe testing) ซึ่งอาจพบได้ในระหว่างที่ผลิตภัณฑ์ถูกวางจำหน่ายในท้องตลาดหรือระหว่างการขนส่งผลิตภัณฑ์ เป็นต้น
3. การเข้ากันได้ระหว่างครีมและบรรจุภัณฑ์ (compatibility studies) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ และป้องกันการรั่วซึมของผลิตภัณฑ์เมื่อถูกบรรจุและวางขายในท้องตลาด
4. การทดสอบการเจริญของเชื้อในครีม (test for microbial growth) เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อและประสิทธิภาพของสารที่ป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อในผลิตภัณฑ์เมื่อถูกวางจำหน่ายในท้องตลาด เพื่อกำหนดวันหมดอายุของผลิตภัณฑ์

4. สารต้านอนุมูลอิสระ

4.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือโมเลกุล อะตอม หรือไอออน ที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว ไม่มีคู่ อยู่รอบนอก จึงทำให้อนุมูลอิสระมีสมบัติเป็นโมเลกุล อะตอม หรือไอออนที่ไม่เสถียรและมีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่นๆ เพื่อดึงอิเล็กตรอนเข้าหาตัวมันเองทำให้เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบต่างๆของเซลล์ภายในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การทำลายเซลล์ภายในร่างกาย และการเปลี่ยนแปลงสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น กระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ในร่างกายเป็นปัจจัยหลัก ที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ⁽¹⁶⁾

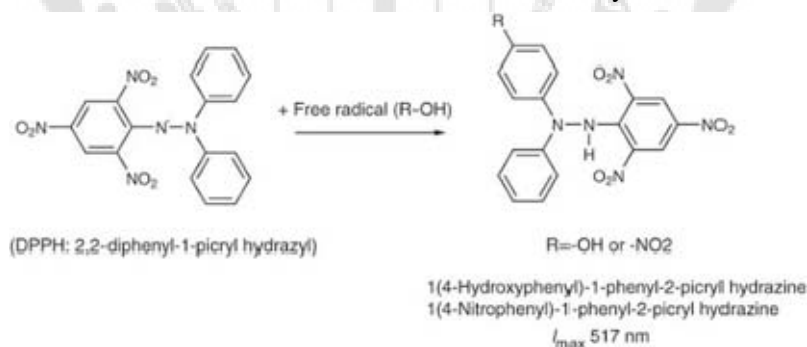
4.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารประกอบที่ป้องกันและชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระโดยจะเกิดกลไกหลายรูปแบบ เช่น ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระโดยกลไกการดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง หรือป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระด้วยกลไกการเข้าจับ (chelate) กับโลหะ ⁽¹⁶⁾ และการลดพลังงานของอนุมูลอิสระ หรือขัดขวางปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) เพื่อทำให้เกิดการทำลายเซลล์น้อยที่สุด ⁽⁴⁰⁾ ซึ่งสามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ เช่น สารประกอบฟีนอลิก(phenolic compound), สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compound), แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ⁽¹⁶⁾ สารต้านอนุมูลอิสระที่มักนิยมใช้ในครีมที่มีสรรพคุณชะลอวัยและลดริ้วรอย ซึ่งนิยมใช้สารที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น วิตามินเอ (vitamin A), วิตามินซี (vitamin C), วิตามินอี (vitamin E), โคเอนไซม์ คิวเท็น (coenzyme Q10), ซิงค์ (zinc), คอปเปอร์ (copper), เบต้าแคโรทีน (beta carotene) และ กรดแอสคอร์บิก (L-Ascorbic Acid) เป็นต้น ร่วมกับการนำสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนำมาเป็นส่วนประกอบของครีม เช่น ชาเขียว (green tea), ทับทิม (pomegranates), กาแฟ (coffee berries), เมล็ดองุ่น (grape seeds), มะกอก (olives) และเห็ด (mushrooms) เป็นต้น ⁽¹⁷⁾

4.3 DPPH Scavenging Capacity Assay

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Capacity Assay ซึ่ง Radical Scavenging Capacity Assay คือ การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารใดๆ ที่สามารถกำจัดโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระได้โดยตรง ซึ่งมักเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว (stable radical) ถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยาทางเคมีของสารต่างๆ อนุมูล DPPH (DPPH radical, DPPH) มีคุณสมบัติที่โดดเด่น คือ เป็นอนุมูลอิสระชนิด Organic nitrogen radical ที่มีความคงตัวและสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV-vis ที่มีความยาวคลื่น 517 นาโน

เมตร เมื่อ DPPH เกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือได้รับอิเล็กตรอนจะมีการเปลี่ยนสี คือ สีม่วงของ DPPH จะจางลงเป็นสีเหลือง ซึ่งการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นนี้สามารถติดตามวัดได้ด้วยเครื่องมือ Spectrophotometer วิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay ทำได้โดยการเตรียมสารละลาย DPPH (ละลาย DPPH ในเมทานอล) ผสมกับสารทดสอบและวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่คลื่นความยาว 517 นาโนเมตร หลังตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จากนั้นคำนวณฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารทดสอบในรูปร้อยละความสามารถในการกำจัด DPPH หรือเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน⁽¹⁸⁾ ข้อดีของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay⁽¹⁸⁾ เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในการเตรียม ส่วนข้อเสีย คือ DPPH เป็นสารอนุมูลไนโตรเจน (nitrogen radical) ที่มีอายุค่อนข้างยาวเมื่อเทียบกับอนุมูลอิสระทั่วไป จึงมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปบ้างจากอนุมูลอิสระที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาสูงรวมถึง Peroxyl radical ที่พบได้ในปฏิกิริยาลิพิด เปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) เป็นเหตุให้สารต้านออกซิเดชันหลายตัวสามารถทำปฏิกิริยากับ Peroxyl radical ได้อย่างรวดเร็วแต่ไม่ทำปฏิกิริยาหรือทำปฏิกิริยาช้ามากกับ DPPH จึงทำให้ได้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริงเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay นอกจากนี้สารต้านออกซิเดชันบางตัวแสดงจลนศาสตร์การเกิดรีดักชันของ DPPH แบบที่ไม่เป็นเส้นตรง (non-linear kinetic) ทำให้ค่า EC50 ที่ได้อาจคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ และสารต้านออกซิเดชันบางตัว เช่น Eugenol สามารถทำปฏิกิริยากับ DPPH และเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ทำให้ความสามารถต้านออกซิเดชันของยูจีนอล (eugenol) หรือฟีนอล (phenol) อื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกันที่ประเมินโดยใช้วิธี DPPH assay มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริงได้

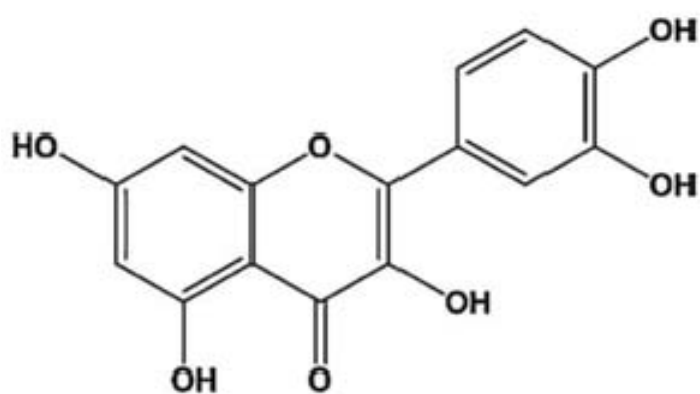


ภาพประกอบ 4 การเปลี่ยนแปลงอนุมูล DPPH ภายหลังเกิดปฏิกิริยารีดักชัน⁽⁴¹⁾

4.4 สารเคอซีทิน

สารเคอซีทิน (quercetin) เป็นสารประกอบที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Bioactive flavonoid⁽²²⁾ มีสูตรโครงสร้างประกอบไปด้วย C₁₅H₁₀O₇ สามารถพบได้ในธรรมชาติ ซึ่งสารเคอซีทินจะพบมากในผักและผลไม้ ได้แก่ แอปเปิ้ล, หอมหัวใหญ่, สตอเบอร์รี่, เชอร์รี่, มะเขือเทศ, องุ่นแดง, ถั่วและธัญพืชต่างๆ⁽²³⁾ และยังสามารถพบสารเคอซีทินในพืชสมุนไพรจำพวก *Ginkgo biloba* (แปะก๊วย), *Apocynum venetum*, *Poacynum hendersonii* และ *Opuntia ficus-indica* เคอซีทินยังสามารถพบในสารโพรพอลิส (propolis) ที่ได้จากขี้ผึ้ง (beehives) และน้ำมันมะกอก (olive oil)⁽²⁴⁾ สารเคอซี

ทินมีลักษณะทางกายภาพ คือ เป็นผงสีเหลือง (yellow crystalline powder) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 316.5 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของไอ (vapor density) มีค่าเท่ากับ 8.1 มีจุดวาบไฟ (flash point) ที่อุณหภูมิ 112 องศาเซลเซียส มีความคงสภาพที่เมื่อเก็บในที่แห้งและไม่มี ความชื้น⁽²⁵⁾ สารเคอซิทินมีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ไม่ดี (practically insoluble) แต่สามารถละลายได้ดีใน แอลกอฮอล์ (alcohol), ไขมัน (lipid), สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) และสารละลาย ประเภทอัลคาไลน์ (alkaline solution) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้แก่ ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ด้านการเกิดมะเร็ง (anti-tumor), ต้านไวรัส (anti-viral) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งโดยทั่วไปจากการศึกษาสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เคอซิทินมี คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของหมู่แทนที่ไฮดรอกซิลที่ ตำแหน่ง C₃ บนวง C ซึ่งลักษณะโครงสร้างของเคอซิทินจะประกอบไปด้วยหมู่ 3-OH ในโครงสร้าง (ภาพประกอบที่ 5) ทำให้เคอซิทินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (4.7 ± 0.10) มากกว่าสารใน กลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น Luteolin (2.1 ± 0.05) และ Rutin (2.4 ± 0.12) เกือบ 2 เท่า⁽³⁰⁾ เคอซิทิน สามารถดักจับอนุมูลอิสระ และยับยั้งปฏิกิริยาลิพิด เปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation)⁽²⁸⁾ ซึ่งสาร เคอซิทินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะช่วยป้องกัน ชะลอ และฟื้นฟูสภาพของเซลล์ที่ถูกทำลาย ด้วย กระบวนการดักจับ (scavenge) และเข้าจับ (chelate) อนุมูลอิสระ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งปฏิกิริยา ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) และปฏิกิริยาเข้าจับ (chelation)⁽¹⁹⁾ รวมถึงการลด oxidative neuronal cell และการทำลาย DNA⁽²⁹⁾ เคอซิทินยังมีคุณสมบัติสามารถป้องกันการถูก ทำลายของผิวหนังจากรังสี UVA⁽²⁴⁾ จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำสารเคอซิทินใช้ในรูปแบบของยา รับประทานจะมีค่าเภสัชจลนศาสตร์ต่ำ เนื่องจากสารเคอซิทินไม่สามารถทนต่อสภาวะเป็นกรดใน กระเพาะอาหารได้^{(19), (26)} และยังมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็น กรด ในกระเพาะอาหารและในลำไส้เป็นเหตุให้มีการดูดซึมต่ำในระบบทางเดินอาหาร ความสามารถในการละลายน้ำของ เคอซิทินที่ต่ำมีผลต่อการจำกัดการออกฤทธิ์ของเคอซิทินทำให้เคอซิทิน มีประสิทธิภาพต่ำในการซึมผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนัง^{(22), (27)} เมื่อนำมาเป็นส่วนประกอบของเภสัชภัณฑ์ และเครื่องสำอางที่ใช้ทาเฉพาะที่พบว่ามีการดูดซึมผ่านผิวหนังต่ำทำให้ประสิทธิภาพในการใช้งาน ลดลง⁽²⁷⁾ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในสารเคอซิทิน (quercetin) และพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากสารเคอซิทินในรูปแบบของไลโปโซม (liposomes) เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพของสารเคอซิทินโดยนำคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) พัฒนาเป็นยารักษาโรคตับ⁽¹⁹⁾ และการนำส่งยาไปยังสมอง (Blood Brain Barrier) ผ่านระบบนำส่ง ยาทางจมูก (Nasal administration)⁽²⁰⁾ เพื่อรักษาโรคทางสมอง เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)⁽²¹⁾



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างเคออสติน⁽³⁰⁾



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี (Material, Instrument and Reagent)

1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. Zetasizer	MALVERN Instruments, U.K.
2. Rotary evaporator (Rotavapor R-114)	BUCHI, Switzerland
3. Water bath	BUCHI, Switzerland
4. Vacuum controller	BUCHI, Switzerland
5. Cooling bath	CRAI, Thailand
6. High speed Refrigerated Micro centrifuge	TOMY Seiko co.,LTD, Japan
7. UV-161 UV-Visible spectrophotometer	SHIMADZU, Japan
8. Transmission Electron Microscope	JEOL, JEM-2200FS, USA
9. Sonicator Ultrasonic bath	Hwashin Technology, Korea
10. LAMBDATM PLUS Pipette	Coring, USA
11. pH Meter	Orion, Eutech Instrument
12. Analytical balance	Sartorius, Germany
13. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	Mitsubishi, Thailand
14. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany
15. Cuvette Type 1	Starma Scientific Ltd., U.K
16. Microplate reader	AnthosZenyth, Austria
17. Rheometer	THERMO Scientific, USA
18. Hand Homogenizer	Ultra-Turrax IKA Labortechnik, USA
19. Centrifuge Tube ขนาด 15 ml	Corning, USA
20. Evaporator Flask ขนาด 250 ml	BUCHI, Germany

1.2 สารเคมี

1. Soybean lecithin (L- α -Phosphatidylcholine)	SIGMA life science®, USA
2. Cholesterol	CARLO ERBA reagent®, France
3. Quercetin	Sigma Life Science, India
4. Chloroform AR	RCI Labscan, Thailand
5. Methanol AR	RCI Labscan, Thailand
6. KCl	Ajax Finechem Pty Ltd, New Zealand
7. NaCl	Ajax Finechem Pty Ltd, New Zealand

8. KH_2PO_4	Carlo Erba Reagent, France
9. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	RCI Labscan, Thailand
10. Mineral oil	P.C. drug center, Thailand
11. Pretolatum	P.C. drug center, Thailand
12. Cetyl alcohol	P.C. drug center, Thailand
13. Stearyl alcohol NAA-4	P.C. drug center, Thailand
14. Span 80	P.C. drug center, Thailand
15. Tween 80	P.C. drug center, Thailand
16. Methylparaben	P.C. drug center, Thailand
17. Propylparaben	P.C. drug center, Thailand
19. 2, 2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH)	Sigma-Aldrich, USA

2. วิธีการทดลอง

2.1 ตั้งตำรับไลโปโซม

1. กำหนดอัตราส่วนของไขมันเพื่อตั้งสูตรตำรับของไลโปโซมระหว่าง ซอยบีนเลซิทิน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) ⁽³⁹⁾ โดยกำหนดอัตราส่วนไขมันทั้งหมดจำนวน 3 สูตร น้ำหนักรวมของไขมันในแต่ละสูตร เท่ากับ 100 mg ได้แก่ 70:30 (F1), 80:20 (F2) และ 90:10 (F3) (w:w) ⁽³⁹⁾

2. เตรียมไลโปโซมด้วยวิธี Hydration of a thin-film ⁽³⁸⁾ มีรายละเอียดดังนี้

2.1. ชั่งสารตามอัตราส่วนที่กำหนด นำมาละลายด้วย คลอโรฟอร์ม (AR grade) 10 ml

2.2. ใช้เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (rotary evaporator) เพื่อทำการระเหย คลอโรฟอร์ม เมื่อคลอโรฟอร์มถูกระเหยออกจนหมดจะได้ฟิล์มใสเคลือบภายในขวดก้นกลม (evaporator flask) ให้อุณหภูมิอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาทีในการระเหยคลอโรฟอร์ม

3. นำขวดก้นกลม (evaporator flask) ที่มีฟิล์มเคลือบภายในซึ่งน้ำหนัก เติม phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ⁽⁴²⁾ ปริมาณ 10 ml ซึ่งน้ำหนัก เติมลูกแก้วขนาดเล็ก (glass bead) จำนวน 20 เม็ด และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เนื่องจากหลังการ hydration อาจมีสารละลาย PBS บางส่วนที่หายไป

4. นำขวดก้นกลม (evaporator flask) ในข้อ 3. ทำการ hydration ไลโปโซมด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (rotary evaporator) (ไม่เปิดปั๊ม เพื่อทำการ hydrate ฟิล์มออกมา) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (อุณหภูมิอ่างควบคุมอุณหภูมิ = 55 องศาเซลเซียส) ได้ไลโปโซม (liposomal suspension) สีขาวขุ่น

5. นำขวดก้นกลม (evaporator flask) ที่บรรจุคอลลอยซ์ของไลโปโซมซึ่งน้ำหนักและแยกลูกแก้วขนาดเล็ก (glass bead) ออกจากได้ไลโปโซมแขวนตะกอน (liposomal suspension) ซึ่งน้ำหนักอีกครั้ง หากน้ำหนักของไลโปโซม (liposomal suspension) หลังจากแยกลูกแก้วขนาดเล็ก (glass bead) ออกหายไปจากการเติม PBS ก่อนทำการ hydration ให้เติม PBS (pH 7.4) เพื่อให้น้ำหนักเท่ากับก่อนการทำ hydration

6. ย้ายไลโปโซมแขวนตะกอน (liposomal suspension) จากขวดก้นกลม (evaporator flask) ไปยังหลอดทดลองปิดฝา ให้สนิทและนำไปแช่ตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 คืน

7. นำไลโปโซมแขวนตะกอน (liposomal suspension) ที่บรรจุในหลอดทดลอง ทำการลดขนาดของไลโปโซมด้วยอ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) 60 นาที

8. ประเมินคุณสมบัติคุณสมบัติทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมได้ ดังนี้

8.1. วัดขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Pdl) และ Zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

8.2. ลักษณะไลโปโซมภายนอก เช่น การตกตะกอน, ความคงตัวเมื่อ ตั้งทิ้งไว้

9. เลือกตำรับที่มีคุณสมบัติทางกายภาพดีที่สุด มาทำการทดลองต่อไป

2.2 ตั้งตำรับไลโปโซมเคอควิทิน (Liposome Quercetin)

1. หาปริมาณเคอควิทินที่ใส่ในไลโปโซม (สูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 1) โดยชั่งสารเคอควิทิน 20 mg ละลายด้วยเมทานอล (AR grade) 10 ml บีบอัดสารละลายเคอควิทิน 1 ml, 2 ml หรือ 5 ml ลงในไลโปโซมสูตรที่ได้จากข้อ 3.2.1 ในแต่ละขวดก้นกลม (evaporator flask)

2. เตรียมไลโปโซมด้วยวิธี Hydration of a thin-film method ⁽³⁸⁾ ใช้เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (rotary evaporator) เพื่อทำการระเหยคลอโรฟอร์มและเมทานอล

3. ดูลักษณะของฟิล์มที่เคลือบเคลือบภายในขวดก้นกลม (evaporator flask) ในแต่ละขวด เลือกขวดที่มีฟิล์มใสไม่ตกตะกอน เพื่อทำการ hydration ไลโปโซมเช่นเดียวกับวิธีการตั้งตำรับไลโปโซมในข้อ 2.1

4. ประเมินคุณสมบัติของไลโปโซมเคอควิทินที่เตรียมได้ ดังนี้

4.1. ลักษณะทางกายภาพ (morphology) ลักษณะพื้นผิว (ภาพถ่ายผ่าน TEM) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopy) และจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) โดยอาศัยเทคนิค negative staining

4.2. วัดขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Pdl) และ Zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

4.3. ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซีทิน (%entrapment efficiency)

ด้วยวิธี ดังนี้

4.3.1. นำไลโปโซมเคอซีทินจำนวน 1.5 ml ใส่ใน Eppendorf หมุนเหวี่ยง Eppendorf ด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแยกตะกอนไลโปโซมเคอซีทินออกจากส่วนที่ใส (supernatant)

4.3.2. นำตะกอนไลโปโซมเคอซีทินที่ได้เติมเมธานอล 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายไลโปโซม 2 ml ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 5 ml จากนั้นนำไปวัดด้วย UV spectrophotometry สแกนคลื่นความยาวแสงในช่วง 200 - 500 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 378 นาโนเมตร (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

4.3.3. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้แต่ละครั้ง มาคำนวณด้วยวิธีการเทียบบัญญัติไตรยาง โดยให้ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเคอซีทินที่ความยาวคลื่นสูงสุด 378 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.2885 ดังสมการต่อไปนี้

$$\begin{aligned} \text{ค่าดูดกลืนแสงสารมาตรฐานเคอซีทิน} &= 0.2885 \text{ คิดเป็นความเข้มข้นเคอซีทิน} = A \text{ } \mu\text{g/ml} \\ \text{ค่าดูดกลืนแสงไลโปโซมเคอซีทิน} &= B \text{ คิดเป็นความเข้มข้นเคอซีทิน} = \frac{A \times B}{0.2885} \text{ } \mu\text{g/ml} \\ &= C \text{ } \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

หมายเหตุ: A คือ ความเข้มข้นของเคอซีทินเริ่มต้น

B คือ ค่าดูดกลืนแสงของไลโปโซมเคอซีทิน

C คือ ความเข้มข้นของเคอซีทินที่กักเก็บในไลโปโซมเคอซีทิน

4.3.4. นำความเข้มข้นของเคอซีทินที่กักเก็บในไลโปโซมเคอซีทิน มาคำนวณด้วยวิธีการเทียบบัญญัติไตรยาง เพื่อหาปริมาณเคอซีทินที่กักเก็บในไลโปโซมเคอซีทิน

4.3.5. นำปริมาณเคอซีทินที่กักเก็บในไลโปโซมเคอซีทินที่ได้ มาคำนวณหาประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซีทิน (%entrapment efficiency) ดังสมการ

$$\%EE = \frac{\text{ปริมาณเคอซีทินที่กักเก็บในไลโปโซม}}{\text{ปริมาณเคอซีทินเริ่มต้น}} \times 100$$

5. นำไลโปโซมเคอซีทินที่ได้ทำการทดลองต่อไป

2.3 เตรียมครีม

1. หาค่า IC₅₀ จากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารละลายเคอซีทิน ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ดังนี้

1.1. เตรียมสารละลายเคอซีทินที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น

1.2. เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลความเข้มข้น 0.3 mM โดยชั่ง DPPH 0.12 mg ละลายในเมทานอล 10 เก็บในภาชนะที่ป้องกันแสง

1.3. ผสมสารละลายเคอซีทินกับสารละลาย DPPH อัตราส่วน 1:1 (v/v) ใน microtiter plate ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำเทียบกับ blank (ใช้เมทานอลกับสารละลาย DPPH) โดยแต่ละการทดลองของ microtiter plate มีปริมาตรเท่ากับ 200 μ l ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ)

กลุ่มที่ 1 Sample คือ สารละลายเคอซีทิน 5 ความเข้มข้นกับสารละลาย DPPH

กลุ่มที่ 2 Blank sample คือ เมทานอลกับสารละลายเคอซีทิน 5 ความเข้มข้น

กลุ่มที่ 3 Blank คือ เมทานอลกับสารละลาย DPPH

ซึ่งในแต่ละการทดลองของ microtiter plate ประกอบด้วยสารต่างๆ และปริมาณ ดังนี้

ตาราง 1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบ DPPH radical scavenging assay ของเคอซีทิน

ตัวอย่าง	สารละลาย DPPH (μ l)	Methanol (μ l)	สารละลายเคอซีทินในแต่ละความเข้มข้น (μ l)
Sample	100	-	100
Blank sample	-	100	100
Blank	100	100	-

1.4. หลัง 30 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ใน microtiter plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยเครื่อง microplate reader

1.5. คำนวณหา %DPPH inhibition เพื่อนำค่าที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารละลายเคอซีทิน คำนวณได้จากสูตร

$$\%DPPH \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

1.6. คำนวณหาค่า IC₅₀ จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารละลายเคอซีทิน

2. คำนวณหาปริมาณเคอซีทินที่ต้องการใส่ในครีม โดยต้องการใส่เคอซีทินความเข้มข้น 2 เท่าของค่า IC₅₀ คือ 0.02 mg/ml ต่อน้ำหนักครีม 1 g (IC₅₀ = 0.01 mg/ml)

3. สูตรครีมพื้นฐาน (cream base), ครีมเคอซีทิน (Cream Quercetin) และ ครีมไลโปโซมเคอซีทิน (Cream Liposome Quercetin) ดังตาราง 1

ตาราง 2 แสดงส่วนประกอบของสูตรตำรับครีมพื้นฐาน, ครีมเคอซีทิน และ ครีมไลโปโซมเคอซีทิน

สารเคมี	ครีมพื้นฐาน (cream base)	ครีมเคอซีทิน (Cream Quercetin)	ครีมไลโปโซมเคอซีทิน (Cream Liposome Quercetin)
Mineral oil	22 g	22 g	22 g
Pretolatum	12.5 g	12.5 g	12.5 g
Cetyl alcohol	5 g	5 g	5 g
Stearyl alcohol	5 g	5 g	5 g
Span 80	1.25 g	1.25 g	1.25 g
Tween 80	3.5 g	3.5 g	3.5 g
Conc. Paraben	1 g	1 g	1 g
Purified Water	49.75 g	49.75 g	24.75 g
Quercetin solution	-	1 g (Quercetin = 0.02 mg/ml)	-
Liposome Quercetin	-	-	12.5 g (Quercetin = 0.02 mg/ml)
Total	100 g	100 g	100 g

3. วิธีเตรียมครีม

3.1. ครีมพื้นฐาน เตรียมด้วยวิธี beaker method โดยอุ่นวัฏภาคน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส และอุ่นวัฏภาคน้ำมันโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำคนอย่างสม่ำเสมอ

3.2. ครีมเคอซีทิน หลังจากเตรียมครีมด้วยวิธี beaker method เติมเคอซีทินลงไปในครีม คนให้เข้ากันด้วยพายตักสาร

3.3. ครีมไลโปโซมเคอซีทิน หลังจากเตรียมครีมด้วยวิธี beaker method เติมไลโปโซมเคอซีทินลงไปในครีม คนให้เข้ากันด้วยพายตักสาร

2.4 การศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมเคอซิทิน

1. สภาวะที่ศึกษาความคงสภาพ ดังนี้

1.1. ความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating Cooling Cycle) เก็บไลโปโซมในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และย้ายไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็น 1 cycle ทำซ้ำจำนวน 6 cycles

1.2. ความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) และ 45 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ (physical properties) โดยการวัดขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Pdl) และค่า Zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

3. ทดสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซิทิน (%Entrapment Efficiency) ในแต่ละช่วงเวลา โดยใช้วิธีการดังนี้

3.1. นำไลโปโซมเคอซิทินจำนวน 1.5 ml ใส่ใน Eppendorf หมุนเหวี่ยง Eppendorf ด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแยกตะกอนไลโปโซมเคอซิทินออกจากส่วนที่ใส (supernatant)

3.2. นำตะกอนไลโปโซมเคอซิทินที่ได้เติมเมธานอล 1 ml เขย่าให้เข้ากัน บีบอัดสารละลายไลโปโซมเคอซิทิน 2 ml ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 5 ml จากนั้นนำไปวัดด้วย UV spectrophotometry สแกนคลื่นความยาวแสงที่ช่วง 200 - 500 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 378 นาโนเมตร (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3.3. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้แต่ละครั้ง มาคำนวณด้วยวิธีการเทียบบัญญัติไตรยาง โดยให้ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเคอซิทินที่ความยาวคลื่นสูงสุด 378 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.2885 คำนวณได้จากวิธีการดังนี้

ค่าดูดกลืนแสงสารมาตรฐานเคอซิทิน = 0.2885 คิดเป็นความเข้มข้นเคอซิทิน = A $\mu\text{g/ml}$

ค่าดูดกลืนแสงไลโปโซมเคอซิทิน = B คิดเป็นความเข้มข้นเคอซิทิน = $\frac{A \times B}{0.2885} \mu\text{g/ml}$

0.2885

= C $\mu\text{g/ml}$

หมายเหตุ: A คือ ความเข้มข้นของเคอซิทินเริ่มต้น

B คือ ค่าดูดกลืนแสงของไลโปโซมเคอซิทิน

C คือ ความเข้มข้นของเคอซิทินที่กักเก็บไลโปโซมเคอซิทิน

3.4. นำความเข้มข้นของเคอซิทินที่กักเก็บไลโปโซมเคอซิทิน มาคำนวณด้วยวิธีการเทียบบัญญัติไตรยาง เพื่อหาปริมาณเคอซิทินที่กักเก็บในไลโปโซมเคอซิทิน

3.5. นำปริมาณเคอวซิทินที่กักเก็บในไลโปโซมเคอวซิทินที่ได้ มาคำนวณหาประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวซิทิน (%entrapment efficiency) คำนวณได้จากสูตร

$$\%EE = \frac{\text{ปริมาณเคอวซิทินที่กักเก็บในไลโปโซม}}{\text{ปริมาณเคอวซิทินเริ่มต้น}} \times 100$$

4. ทดสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants activity) ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay ในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

4.1. เตรียมตัวอย่างไลโปโซมเคอวซิทิน โดยใช้ตัวอย่างสารละลายไลโปโซมเคอวซิทินหลอดเดียวกับข้อ 3.

4.2. เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลความเข้มข้น 0.3 mM โดยชั่ง DPPH 0.12 mg ละลายในเมทานอล 10 เก็บในภาชนะที่ป้องกันแสง

4.3. ผสมสารละลายไลโปโซมเคอวซิทินกับสารละลาย DPPH อัตราส่วน 1:1 (v/v) ใน microtiter plate ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำเทียบกับ blank (ใช้เมทานอลกับสารละลาย DPPH) โดยแต่ละการทดลองของ microtiter plate มีปริมาตรเท่ากับ 200 μ l ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ)

กลุ่มที่ 1 Sample คือ สารละลายไลโปโซมเคอวซิทินตัวอย่าง กับสารละลาย DPPH

กลุ่มที่ 2 Blank sample คือ ไลโปโซมเปล่า

กลุ่มที่ 3 Blank คือ เมทานอล กับสารละลาย DPPH

ซึ่งในแต่ละการทดลองของ microtiter plate ประกอบด้วยสารต่างๆ และปริมาณ ดังนี้

ตาราง 3 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบ DPPH radical scavenging assay ของไลโปโซมเคอวซิทิน

ตัวอย่าง	สารละลาย DPPH (μ l)	Methanol (μ l)	ไลโปโซมเปล่า (μ l)	สารละลายไลโปโซมเคอวซิทิน (μ l)
Sample	100	-	-	100
Blank sample	-	-	200	-
Blank	100	100	-	-

4.4. หลัง 30 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ใน microtiter plate วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยเครื่อง microplate reader

4.5. คำนวณหา %DPPH inhibition ของไลโปโซมเควอซิทิน

$$\%DPPH \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

2.5 ศึกษาความคงสภาพของครีมไลโปโซมเควอซิทิน เปรียบเทียบกับครีมเควอซิทิน

1. สภาวะที่ศึกษาความคงสภาพ ดังนี้

1.1. ความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating Cooling Cycle) เก็บครีมในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และย้ายไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำจำนวน 6 รอบ (6 cycles)

1.2. ความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1), 4 ± 1 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของครีม (physical properties)

2.1. สี (color)

2.2. การแยกชั้น (separation)

2.3. pH

2.4. ความหนืด (viscosity)

3. หาปริมาณเควอซิทินในครีม ด้วยวิธีการดังนี้

3.1. นำครีมตัวอย่าง 1 g เติมนีออนอล 10 ml ใส่ใน Eppendorf นำไป Sonicate 20 นาที ใน Sonicator bath จากนั้นนำ Eppendorf ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ในสภาวะดังนี้

- ครีมไลโปโซมเควอซิทินและครีมพื้นฐาน ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- ครีมเควอซิทิน ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

3.2. จากนั้นแยกส่วนที่ใส (supernatant) ออก ได้สารละลายครีม นำไปในภาชนะที่ป้องกันแสง

3.3. นำตัวอย่างสารละลายครีมในภาชนะที่ป้องกันแสงวัดด้วย UV spectrophotometry สแกนคลื่นความยาวแสงที่ช่วง 200 - 500 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 378 นาโนเมตร (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3.4. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้แต่ละครั้ง มาคำนวณด้วยวิธีการเทียบบัญญัติไตรยาง โดยให้ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเคออสตินที่ความยาวคลื่นสูงสุด 378 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.2885 คำนวณได้จากวิธีการดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ค่าดูดกลืนแสงสารมาตรฐานเคออสติน} &= 0.2885 \text{ คิดเป็นความเข้มข้นเคออสติน} = A \text{ } \mu\text{g/ml} \\ \text{ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายครีม} &= (B) - (CB) \text{ คิดเป็นความเข้มข้นเคออสติน} = \frac{A \times B \text{ } \mu\text{g/ml}}{0.2885} \\ &= C \text{ } \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

หมายเหตุ: A คือ ความเข้มข้นของเคออสตินเริ่มต้น

B คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายครีมตัวอย่าง

CB คือ ค่าดูดกลืนแสงของครีมพื้นฐาน (cream base)

C คือ ความเข้มข้นของเคออสตินในครีมตัวอย่าง

3.5. นำความเข้มข้นของเคออสตินที่กักเก็บไลโปโซมเคออสติน มาคำนวณด้วยวิธีการเทียบบัญญัติไตรยาง เพื่อหาปริมาณเคออสตินที่กักเก็บในไลโปโซมเคออสติน

4. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants activity) ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay ในแต่ละช่วงเวลา ดังวิธีการดังนี้

4.1. เตรียมตัวอย่างสารละลายครีม โดยใช้ตัวอย่างหลอดเดียวกับข้อ 3.

4.2. เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลความเข้มข้น 0.3 mM โดยชั่ง DPPH 0.12 mg ละลายในเมทานอล 10 เก็บในภาชนะที่ป้องกันแสง

4.3. ผสมเตรียมตัวอย่างสารละลายครีมกับสารละลาย DPPH อัตราส่วน 1:1 (v/v) ใน microtiter plate ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำเทียบกับ blank (ใช้เมทานอลกับสารละลาย DPPH) โดยแต่ละการทดลองของ microtiter plate มีปริมาตรเท่ากับ 200 μl ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ)

กลุ่มที่ 1 Sample คือ สารละลายครีมตัวอย่าง กับสารละลาย DPPH

กลุ่มที่ 2 Blank sample คือ สารละลายครีมตัวอย่าง กับเมทานอล

กลุ่มที่ 3 Blank คือ เมทานอล กับสารละลาย DPPH

ซึ่งในแต่ละการทดลองของ microtiter plate ประกอบด้วยสารต่างๆ และปริมาณ ดังนี้

ตาราง 4 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบ DPPH radical scavenging assay ของครีม

ตัวอย่าง	สารละลาย DPPH (μl)	Methanol (μl)	สารละลายครีมตัวอย่าง (μl)
Sample	100	-	100
Blank sample	-	100	100
Blank	100	100	-

1.4. หลัง 30 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ใน microtiter plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยเครื่อง microplate reader

1.5. คำนวณหา %DPPH inhibition ของครีมตัวอย่าง

$$\%DPPH \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

2.6 วิเคราะห์และสรุปผลความคงสภาพ

นำข้อมูลปริมาณแควอซิทินในครีมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในแต่ละช่วงเวลามาวิเคราะห์ด้วยสถิติ Pair t-test โดยข้อมูลที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Pair t-test ผลการวิเคราะห์มีค่า $p\text{-value} < 0.05$ จะมีนัยสำคัญทางสถิติ และ $p\text{-value} > 0.05$ จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการพัฒนาการตั้งสูตรตำรับไลโปโซม

เนื่องจากการตั้งสูตรตำรับไลโปโซม มีอัตราส่วนของขอยบีนเลซิธิน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) มีอัตราส่วนที่แตกต่างกันจำนวน 3 สูตร ด้วยวิธี Hydration of thin-film จึงต้องมีการวัดขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index) และ Zeta potential โดยเริ่มวัดไลโปโซมวันที่ 1 เปรียบเทียบกับไลโปโซมอายุ 4 สัปดาห์ (เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เพื่อหาสูตรไลโปโซมที่ดีที่สุดใช้ในการตั้งตำรับไลโปโซมเคออสติน ผลการศึกษาพบว่าไลโปโซมที่มีอัตราส่วนขอยบีนเลซิธิน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) สูตร 70:30 (F1) (w:w) เป็นสูตรที่ดีที่สุด เพราะไลโปโซมอายุ 4 สัปดาห์มีขนาด (Z-Average) มีการเปลี่ยนแปลงของขนาดน้อยที่สุดคือ 23% (360.1 ± 0.57 nm เป็น 444.0 ± 4.60 nm) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร 80:20 (F2) และ 90:10 (F3) ที่มีการเปลี่ยนแปลงขนาด 80% (379.1 ± 0.24 nm เป็น 677.3 ± 7.00 nm) และ 63% (452.7 ± 0.78 nm เป็น 740.8 ± 13.80 nm) ตามลำดับ รวมถึงมีค่าการกระจายขนาด (Pdl) (เกณฑ์การกระจายขนาดที่ดีอยู่ในช่วง 0.2 – 0.7) และ Zeta potential (เกณฑ์ Zeta potential ที่ดีคือ ≤ 30 mV) ⁽⁴⁵⁾ อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index) และ Zeta potential ของไลโปโซมที่เตรียม ด้วยวิธี Hydration of thin-film เปรียบเทียบวันที่ 1 กับสัปดาห์ที่ 4 ของการเตรียมไลโปโซม F1, F2 และ F3 (w:w) (n = 3)

การทดสอบ	Soy-bean lecithin: Cholesterol (w:w)					
	70:30 (F1)		80:20 (F2)		90:10 (F3)	
	1 st day	4 th wk	1 st day	4 th wk	1 st day	4 th wk
Z-Average (nm)	360.1	444.0	379.1	677.3	452.7	740.8
	± 0.57	± 4.60	± 0.24	± 7.00	± 0.78	± 13.80
Polydispersity index	0.387	0.487	0.491	0.525	0.598	0.646
	± 0.02	± 0.04	± 0.03	± 0.03	± 0.58	± 0.02
Zeta potential (mV)	-17.2	-18.8	-14.7	-16.4	-14.4	-15.8
	± 0.35	± 0.60	± 0.35	± 1.80	± 0.86	± 0.60

2. ผลการพัฒนากการตั้งสูตรตำรับไลโปโซมเคอควิทิน

2.1 ผลการศึกษาขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index), Zeta potential และประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอควิทิน (%Entrapment efficiency) ของไลโปโซมเคอควิทิน

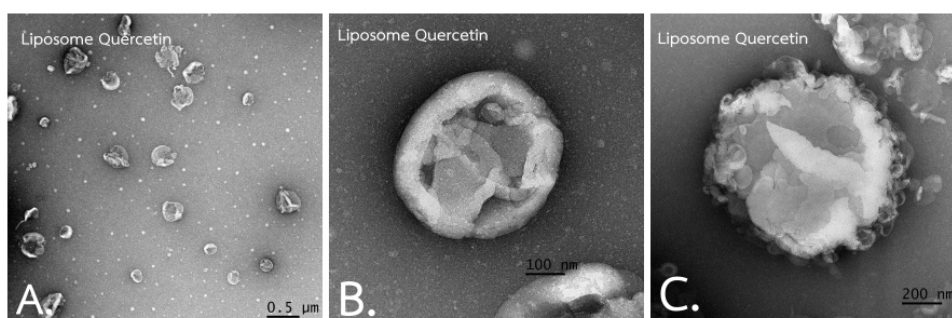
จากการศึกษาการพัฒนาสูตรตำรับไลโปโซม พบว่าไลโปโซมที่มีอัตราส่วนของ ซอยบีน เลซิธิน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) สูตร 70:30 (F1) (w: w) เป็นสูตรที่มีขนาดเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นตำรับไลโปโซมเคอควิทิน โดยนำสารละลายเคอควิทิน 1 ml (มีความเข้มข้น 2 mg/ml) มากักเก็บในไลโปโซม ด้วยวิธี Hydration of thin-film ทำให้เกิดอัตราส่วนระหว่าง ซอยบีนเลซิธิน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol): เคอควิทิน คือ 70: 30: 1 (w: w: v) ผลจากการศึกษาอัตราส่วนของเคอควิทินที่นำไปกักเก็บในไลโปโซมพบว่า เคอควิทิน ปริมาณ 2 (มีความเข้มข้น 4 mg/ml) และ 5 ml (มีความเข้มข้น 10 mg/ml) เมื่อนำไปรวมกับซอเยบีน เลซิธิน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) สูตร 70:30 (F1) (w: w) ผลหลังจาก ขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายออกไปแล้วทำให้เกิดฟิล์มใสบริเวณก้นแก้ว พบว่ามีการตกตะกอนของเคอควิทินบริเวณก้นแก้ว ฉะนั้นปริมาณเคอควิทินที่เหมาะสมที่สุดในการตั้งสูตรตำรับไลโปโซม เคอควิทินคือ 1 ml (มีความเข้มข้น 2 mg/ml) เนื่องจากฟิล์มที่ได้จากการเติมเคอควิทิน 1 ml มีลักษณะใสไม่ตกตะกอน และผลจากการศึกษาพบว่าไลโปโซมเคอควิทินมีขนาด (Z-Average) 351.5 ± 3.90 nm, การกระจายขนาด (Pdl) 0.403 ± 0.001 (อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้คือ 0.2 – 0.7)⁽⁴⁵⁾, Zeta potential -17.1 ± 1.44 mV (Pdl) (อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้คือ ≤ 30 mV)⁽⁴⁵⁾ และประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอควิทิน (%Entrapment efficiency) เท่ากับร้อยละ 45 ± 0.01 รายละเอียดดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ผลการศึกษา ขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index), Zeta potential และร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอควิทิน (%entrapment efficiency) ของการ พัฒนาการตั้ง สูตรตำรับไลโปโซมเคอควิทิน 70:30:1 (w: w: v) (n = 3)

การทดสอบ	Liposome quercetin 70:30:1 (w: w: v)
Z-Average (nm)	351.5 ± 3.90
Polydispersity index	0.403 ± 0.001
Zeta potential (mV)	-17.1 ± 1.44
%entrapment efficiency	$45\% \pm 0.01$

2.2 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพ (morphology) ของไลโปโซมเคอควิทิน

ผลการศึกษาไลโปโซมเคอควิทินเมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ด้วยเทคนิค Negative staining พบว่าไลโปโซมเคอควิทินมีขนาดที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง $0.5\ \mu\text{m}$ – $200\ \text{nm}$ โดยมีลักษณะเป็นทรงกลมผิวไม่เรียบ มีชั้นผนังเป็นชนิด Multilamellar ดังแสดงในภาพประกอบ 6



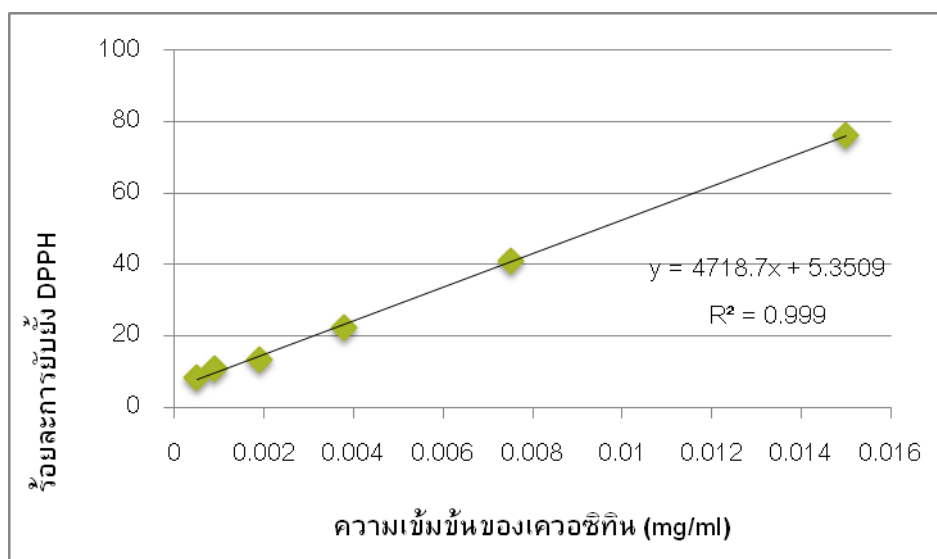
ภาพประกอบ 6 (A.), (B.), (C.) ไลโปโซมเคอควิทิน เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)

3. วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DDPH Radical Scavenging Capacity Assay

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเคอควิทินด้วยวิธี DDPH Radical Scavenging Capacity Assay พบว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเคอควิทินด้วยวิธี DDPH Radical Scavenging Capacity Assay

ความเข้มข้นของเคอควิทิน (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้ง DPPH (%Inhibition)
0.015	76.31
0.0075	40.92
0.0038	22.46
0.0019	13.21
0.0009	10.67
0.0005	8.21



ภาพประกอบ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเคอคูมินและการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

จากภาพประกอบ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเคอคูมินและการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ทำให้เกิดสมการ $y = 4718.7x + 5.3509$ ($R^2 = 0.999$) มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} คือ 0.01 mg/ml

4. ผลการศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมเคอคูมิน

4.1 ผลการศึกษาของไลโปโซมเคอคูมินในความคงสภาพสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle)

4.1.1 ขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index) และ Zeta potential ของไลโปโซมเคอคูมิน

ผลการศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สลับกับอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ไลโปโซมเคอคูมินมีขนาด (Z-Average) ใน cycle 6th มีการเปลี่ยนแปลงของขนาดซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของไลโปโซมใน cycle 0th อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) โดยใน cycle 6th มีขนาด (Z-Average) เท่ากับ 746.0 ± 9.79 nm รวมถึงมีค่าการกระจายขนาด (Pdl) และค่า Zeta potential ใน cycle 6th ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับไลโปโซมใน cycle 0th คือ 0.666 ± 0.05 (เกณฑ์การกระจายขนาดที่ดีอยู่ในช่วง 0.2 – 0.7) และ -23.97 ± 0.35 (เกณฑ์ Zeta potential ที่ดีคือ ≤ 30 mV)⁽⁴⁵⁾ ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามค่าการกระจายขนาด (Pdl) และค่า Zeta potential ที่เพิ่มขึ้นยังอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงในตาราง 8

4.1.2 ผลการศึกษาปริมาณเคอวิชทินที่กักเก็บในไลโปโซมเคอวิชทิน

ผลการศึกษาความคงสภาพสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส สลับกับอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงของ ร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวิชทิน (%Entrapment Efficiency) ของไลโปโซมเคอวิชทินใน cycle ที่ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับไลโปโซมเคอวิชทินใน cycle 0th โดยมีร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวิชทิน (%Entrapment Efficiency) ของไลโปโซม เคอวิชทินลดลงใน cycle 6th เหลือเพียง ร้อยละ 14 ± 0.03 ดังแสดงในตาราง 8

4.1.3 ผลของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ของไลโปโซมเคอวิชทิน ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay

ผลของการศึกษาความคงสภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส สลับกับอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส พบว่าร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) ใน cycle 6th คือ ร้อยละ 44 ± 0.01 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ cycle 0th ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 ผลการศึกษาขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index), Zeta potential, ร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคออซิทีน (%Entrapment Efficiency) และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ในความคงสภาพสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) ของไลโปโซมเคออซิทีน 70:30:1 (w: w: v) (n = 3)

ผลการทดสอบ	Cycle 0 th	Cycle 6 th
Z-Average (nm)	378.9 $\pm$ 0.38	746.0 $\pm$ 9.79 *
Polydispersity index	0.431 $\pm$ 0.01	0.666 $\pm$ 0.05 *
Zeta potential (mV)	-17.43 $\pm$ 1.10	-23.97 $\pm$ 0.35 *
% Entrapment Efficiency	45 $\pm$ 0.032	14 $\pm$ 0.030 *
% Remaining of DPPH Inhibition	100 $\pm$ 0.003	44 $\pm$ 0.01 *

* แตกต่างจากข้อมูลที่ Cycle 0th อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)

4.2 ผลการศึกษาของไลโปโซมเคออซิทีนในความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์

4.2.1 ขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index) และ Zeta potential ของไลโปโซมเคออซิทีน

จากการศึกษาไลโปโซมเคออซิทีนหลังการศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าไลโปโซมเคออซิทีนมีความคงสภาพดีที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนของขนาด (Z-Average) ไลโปโซมเคออซิทีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 – 12 เมื่อเปรียบเทียบกับไลโปโซมที่ทำเสร็จใหม่ แต่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ในสัปดาห์ที่ 12 มีการเปลี่ยนแปลงของขนาดไลโปโซมน้อยที่สุดคือ 481.0 ± 6.67 nm เมื่อเปรียบเทียบกับไลโปโซมเคออซิทีนที่อุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) ไลโปโซมเคออซิทีนมีขนาด 936.0 ± 4.10 nm และ 1329.7 ± 0.48 nm ตามลำดับ

การกระจายขนาด (Pdl) ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส ของสัปดาห์ที่ 12 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (เกณฑ์การกระจายขนาดที่ดีอยู่ในช่วง 0.2 – 0.7) คือ 0.414±0.001 และมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ การกระจายขนาดของไลโปโซมที่ทำเสร็จทันที อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 45±1 องศาเซลเซียส มีค่าการกระจายขนาดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไลโปโซมที่ทำเสร็จทันทีตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ในส่วนของค่า zeta potential มีการลดลงอย่างต่อเนื่องในทุกอุณหภูมิ

ค่า zeta potential ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ในสัปดาห์ที่ 12 แต่ที่อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 45±1 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงของค่า zeta potential อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 และ 2 ตามลำดับ รายละเอียดดังตาราง 9

ตาราง 9 ผลการศึกษาขนาด (Z-Average), การกระจายขนาด (Polydispersity index) และ Zeta potential ในความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ ของไลโปโซมเคออสิติน 70:30:1 (w:w:v) (n = 3)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	4±1°C	อุณหภูมิห้อง (30±1°C)	45±1°C
Z-Average (nm)			
0 th	378.9 ±0.38	378.9 ±0.38	378.9 ±0.38

ตาราง 9 (ต่อ)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	4±1°C	อุณหภูมิห้อง (30±1°C)	45±1°C
nd			
2	443.2 ±0.90 *	1112.0 ±9.30 *	645.5 ±3.66 *
th			
4	457.9 ±8.94 *	1114.0 ±2.07 *	638.2 ±2.68 *
th			
8	461.6 ±0.92 *	1178.3 ±0.30 *	650.6 ±1.64 *
th			
12	481.0 ±6.68 *	1329.7 ±0.48 *	936.0 ±4.10 *
Polydispersity index			
th			
0	0.431 ±0.01	0.431 ±0.01	0.431 ±0.01
nd			
2	0.534 ±0.00	0.787 ±0.08 *	0.734 ±0.05 *
th			
4	0.417 ±0.03	0.911 ±0.06 *	0.630 ±0.02 *
th			
8	0.419 ±0.07	0.903 ±0.01 *	0.705 ±0.041 *
th			
12	0.414 ±0.01	0.945 ±0.05 *	0.612 ±0.02 *
Zeta potential (mV)			
th			
0	-17.43 ±1.10	-17.43 ±1.10	-17.43 ±1.10
nd			
2	-16.92 ±0.33	-18.70 ±0.70	-12.23 ±0.90 *
th			
4	-15.77 ±1.45	-8.78 ±0.95 *	-12.57 ±0.64 *
th			
8	-10.86 ±2.15 *	-2.77 ±1.64 *	-1.02 ±0.25 *
th			
12	-1.77 ±0.35 *	-1.36 ±0.38 *	-0.59 ±0.01 *

* แตกต่างจากข้อมูลที่ 0th โดยเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเดียวกันของแต่ละสัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05)

4.2.2 ผลการศึกษาปริมาณเคอวอซิทีนที่กักเก็บในไลโปโซมเคอวอซิทีน

จากการศึกษาไลโปโซมเคอวอซิทีนศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ พบว่าในทุกอุณหภูมิตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 – 12 มีร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวอซิทีน (%Entrapment Efficiency) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) โดยเปรียบเทียบข้อมูลจากสัปดาห์ที่ 0 ที่อุณหภูมิเดียวกันของแต่ละสัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 12 อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) มีร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวอซิทีน (%Entrapment Efficiency) ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 34 ± 0.025 และที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส มีร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวอซิทีน (%Entrapment Efficiency) เท่ากับร้อยละ 31 ± 0.019 ในส่วนของอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส มีร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวอซิทีน (%Entrapment Efficiency) ที่น้อยที่สุดเท่ากับร้อยละ 6 ± 0.004 ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ปริมาณเคอวอซิทีนและร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวอซิทีน (%Entrapment Efficiency) ของไลโปโซมเคอวอซิทีน ในการศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอวอซิทีน (%EE)		
	$4 \pm 1^{\circ}\text{C}$	อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^{\circ}\text{C}$)	$45 \pm 1^{\circ}\text{C}$
0 th	45 ± 0.032	45 ± 0.032	45 ± 0.032
2 nd	$42 \pm 0.046^*$	$40 \pm 0.001^*$	$12 \pm 0.086^*$
4 th	$37 \pm 0.067^*$	$39 \pm 0.055^*$	$11 \pm 0.002^*$
8 th	$37 \pm 0.030^*$	$37 \pm 0.082^*$	$10 \pm 0.0056^*$
12 th	$31 \pm 0.019^*$	$34 \pm 0.025^*$	$6 \pm 0.004^*$

* แตกต่างจากข้อมูลที่ 0th โดยเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเดียวกันของแต่ละสัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05)

4.2.3 ผลของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ของไลโปโซมเคอวอซิทีน ด้วยวิธี DDPH Radical Scavenging Capacity Assay

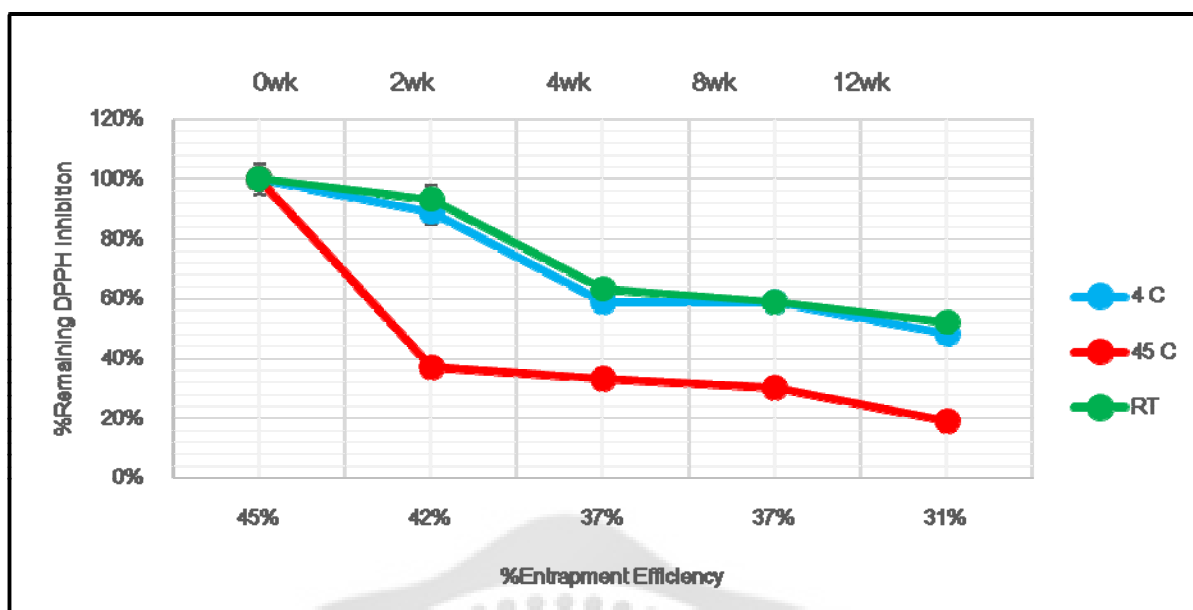
ผลของการศึกษาความคงสภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ระยะยาว (Long-term testing) ของไลโปโซมเคอวอซิทีน 12 สัปดาห์ ด้วยวิธี DDPH Assay พบว่าในทุกอุณหภูมิตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 – 12 มีร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH

Inhibition) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) โดยเปรียบเทียบข้อมูลจากสัปดาห์ที่ 0 ที่อุณหภูมิเดียวกันของแต่ละสัปดาห์ อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 12 อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) มีร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ดีที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 52 ± 0.055 และที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ร้อยละ 48 ± 0.010 แต่ที่อุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส มีร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) น้อยที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 19 ± 0.032 ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ของไลโปโซม เควอซิทินในการศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ ($n = 3$)

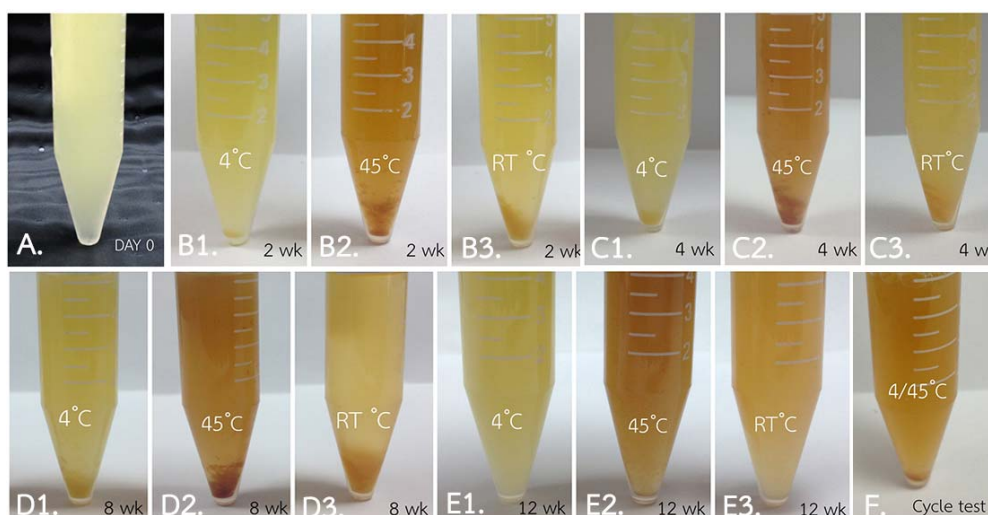
ระยะเวลา (สัปดาห์)	ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition)		
	$4 \pm 1^{\circ}\text{C}$	อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^{\circ}\text{C}$)	$45 \pm 1^{\circ}\text{C}$
0 th	100 ± 0.015	100 ± 0.015	100 ± 0.015
2 nd	$89 \pm 0.017^*$	$93 \pm 0.090^*$	$37 \pm 0.009^*$
4 th	$59 \pm 0.052^*$	$63 \pm 0.010^*$	$33 \pm 0.001^*$
8 th	$59 \pm 0.039^*$	$59 \pm 0.016^*$	$30 \pm 0.014^*$
12 th	$48 \pm 0.010^*$	$52 \pm 0.055^*$	$19 \pm 0.032^*$

* แตกต่างจากข้อมูลที่ 0th โดยเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเดียวกันของแต่ละสัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05)



ภาพประกอบ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) และร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคออสติน (%Entrapment Efficiency) ในการศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long term testing) 12 สัปดาห์

จากภาพประกอบ 8 จะเห็นได้ชัดว่าร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) และร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคออสติน (%Entrapment Efficiency) ในการศึกษาความคงสภาพระยะยาว ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 - 12 มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัดในทุกๆ อุณหภูมิ แต่ที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) มีร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ และร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคออสตินดีที่สุด



ภาพประกอบ 9 (A.) โลโปโซมหลังเตรียมเสร็จทันที, (B1-B3) โลโปโซมที่อุณหภูมิ 4, 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องสัปดาห์ที่ 2, (C1-C3) โลโปโซมที่อุณหภูมิ 4, 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องสัปดาห์ที่ 4, (D1-D3) โลโปโซมที่อุณหภูมิ 4±1, 45±1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องสัปดาห์ที่ 8, (E1-E3) โลโปโซมที่อุณหภูมิ 4±1, 45±1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องสัปดาห์ที่ 12, (D.) โลโปโซมที่ทดสอบในความคงสภาพสภาวะเร่งจำนวน 6 cycles

จากภาพประกอบ 9 โลโปโซมเควอซิทีนหลังเตรียมเสร็จใหม่มีลักษณะทางกายภาพคือมีสีเหลืองอ่อนขุ่น แต่เมื่อถูกนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4±1, อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) และ 45±1 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 สัปดาห์ และในสภาวะเร่ง จำนวน 6 cycles พบว่าโลโปโซมเควอซิทีนมีสีเข้มขึ้นจากสีเหลืองอ่อนขุ่น เป็นสีน้ำตาล และมีการตกตะกอน

5. ผลการศึกษาความคงสภาพของครีมโลโปโซมเควอซิทีน และครีมเควอซิทีน

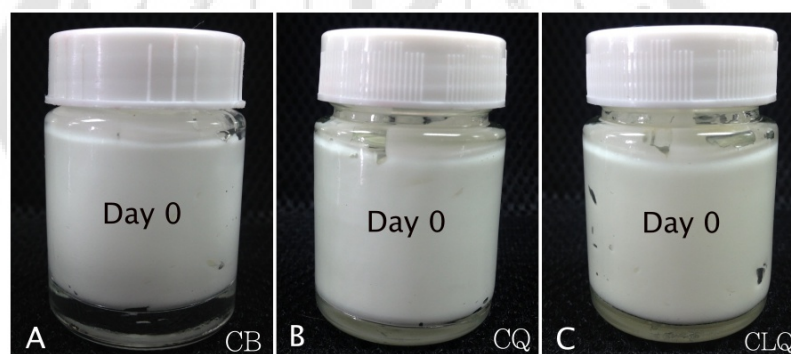
5.1 ผลของการศึกษาลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน, ครีมโลโปโซมเควอซิทีน และครีมเควอซิทีน

ผลจากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของครีมโลโปโซมเควอซิทีน และครีมเควอซิทีนหลังเตรียมเสร็จทันที พบว่าครีมทั้ง 2 ชนิดมีสีเหลืองอ่อน ไม่พบการแยกชั้นของครีม ครีมโลโปโซมเควอซิทีน มีค่า pH = 7.17 ± 0.10 และครีมเควอซิทีน มีค่า pH = 6.57 ± 0.00 ในส่วนของครีมพื้นฐานมีสีขาว ไม่พบการแยกชั้นของครีม มีค่า pH = 6.57 ± 0.01 โดยครีมทั้ง 3 ชนิดมีความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเค้นเฉือน (Rheology) พบลักษณะเป็น Pseudoplastic ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 ลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคอวซิทิน และครีมเคอวซิทิน หลังเตรียมเสร็จทันที ($n = 3$)

ลักษณะ	ครีมพื้นฐาน	ครีมไลโปโซมเคอวซิทิน	ครีมเคอวซิทิน
สี	ขาว	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	-
pH	6.64 ± 0.21	7.17 ± 0.10	6.57 ± 0.01
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid

หมายเหตุ - ไม่มี + มี



ภาพประกอบ 10 (A) ครีมพื้นฐาน, (B) ครีมเคอวซิทิน, (C) ครีมไลโปโซมเคอวซิทิน หลังเตรียมเสร็จทันที

5.2 ผลการศึกษาของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคอวซิทินและครีมเคอวซิทิน หลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles

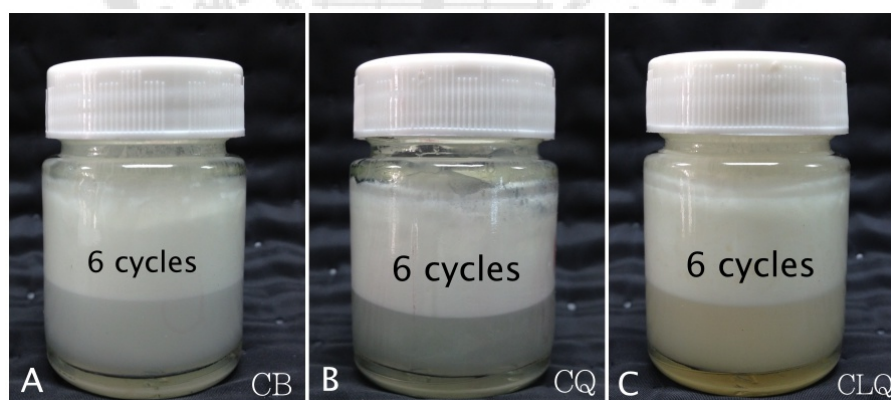
5.2.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคอวซิทิน และครีมเคอวซิทินหลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles พบว่าครีมไลโปโซมเคอวซิทิน และครีมเคอวซิทินมีสีเหลืองอ่อน พบการแยกชั้นของครีมครีมไลโปโซมเคอวซิทิน มีค่า $pH = 7 \pm 0.01$ และครีมเคอวซิทิน มีค่า $pH = 6.01 \pm 0.05$ ในส่วนของครีมพื้นฐานมีสีขาว พบการแยกชั้นของครีม มีค่า $pH = 6.07 \pm 0.50$ โดยครีมทั้ง 3 ชนิดมี

ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเค้นเฉือน (Rheology) พบลักษณะเป็น Non - available เนื่องจากพบการแยกชั้นของครีมดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 ลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคอวอซิทิน และครีมเคอวอซิทินหลังการศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) (n = 3)

ลักษณะ	ครีมพื้นฐาน	ครีมไลโปโซมเคอวอซิทิน	ครีมเคอวอซิทิน
สี	ขาว	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	+	+	+
pH	6.07 ± 0.05	7 ± 0.01	6.01 ± 0.50
Rheology	Non - available	Non - available	Non - available

หมายเหตุ - ไม่มี + มี



ภาพประกอบ 11 (A) ครีมพื้นฐานทดสอบ, (B) ครีมเคอวอซิทินทดสอบ, (C) ครีมไลโปโซมเคอวอซิทิน หลังการศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง จำนวน 6 cycles

5.2.2 ผลการศึกษาปริมาณเคอควิซิทินในครีมไลโปโซมเคอควิซิทิน และครีมเคอควิซิทินหลังการศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles พบว่าในครีมไลโปโซมเคอควิซิทินมีร้อยละปริมาณเคอควิซิทินที่คงเหลือ (%Remaining of quercetin) มากกว่าครีม เคอควิซิทิน อย่างนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) โดยมีปริมาณเคอควิซิทินที่คงเหลือร้อยละ 65 ± 0.064 และร้อยละ 35 ± 0.031 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 ร้อยละปริมาณเคอควิซิทินที่คงเหลือ (%Remaining of quercetin) ในครีมไลโปโซมเคอควิซิทิน และครีมเคอควิซิทินหลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) ($n = 3$)

Cycles	ร้อยละปริมาณเคอควิซิทินที่คงเหลือ (%Remaining of quercetin)	
	ครีมไลโปโซมเคอควิซิทิน	ครีมเคอควิซิทิน
0 th	100 ± 0.014	100 ± 0.014
6 th	$65 \pm 0.064^*$	$35 \pm 0.031^*$

* แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคอควิซิทิน กับครีมเคอควิซิทิน ใน Cycle 6 อย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05)

5.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของครีมไลโปโซมเคอควิซิทินและครีมเคอควิซิทินหลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles พบว่าครีมไลโปโซมเคอควิซิทินมีร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) มากกว่าครีมเคอควิซิทิน อย่างนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.5) โดยมีการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือร้อยละ 74 ± 0.013 และร้อยละ 50 ± 0.098 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 15

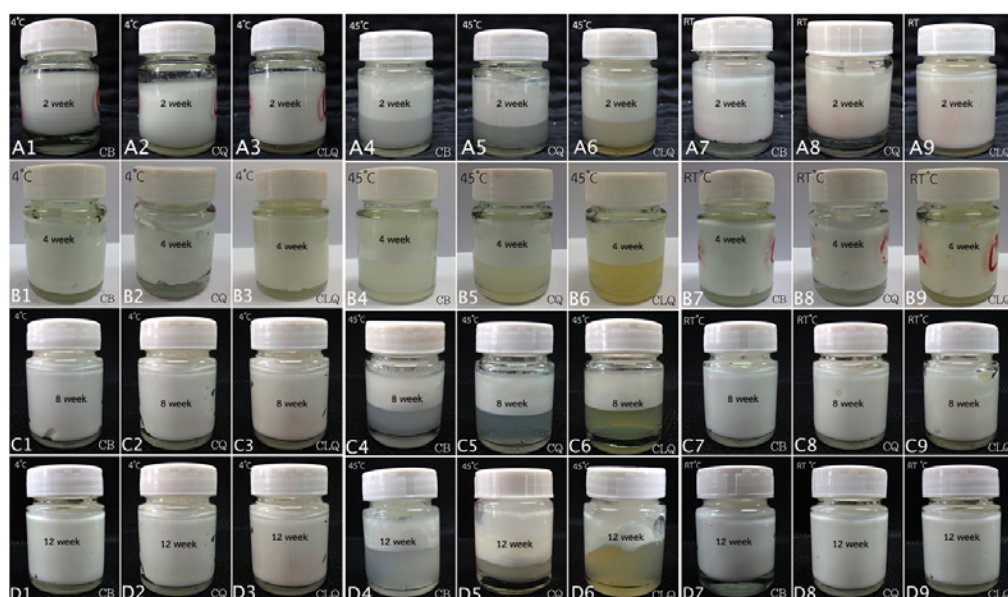
ตาราง 15 ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ของครีมไลโปโซมเคอวซิทินและครีมเคอวซิทิน หลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) (n = 3)

Cycles	ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition)	
	ครีมไลโปโซมเคอวซิทิน	ครีมเคอวซิทิน
0 th	100 $\pm$ 0.056	100 $\pm$ 0.056
6 th	74 $\pm$ 0.013 *	50 $\pm$ 0.098 *

* แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคอวซิทิน กับครีมเคอวซิทิน ใน Cycle 6 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)

5.3 ผลการศึกษาของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคอวซิทิน และครีมเคอวซิทิน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์

5.3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน, ครีมไลโปโซมเคอวซิทิน และครีมเคอวซิทินหลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ พบว่าครีมไลโปโซมเคอวซิทิน และครีมเคอวซิทินมีสีเหลืองอ่อน ครีมไลโปโซมเคอวซิทิน มีค่า pH ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียสเท่ากับ 6.59 ± 14.2 , 45 ± 1 องศาเซลเซียสเท่ากับ 6.27 ± 0.04 และอุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) เท่ากับ 6.34 ± 0.75 และครีมเคอวซิทิน มีค่า pH ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียสเท่ากับ 6.22 ± 1.44 , 45 ± 1 องศาเซลเซียสเท่ากับ 3.91 ± 0.001 และอุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) เท่ากับ 5.09 ± 0.07 ในส่วนของครีมพื้นฐานมีสีขาว มีค่า pH ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียสเท่ากับ 6.12 ± 0.88 , 45 ± 1 องศาเซลเซียสเท่ากับ 3.75 ± 0.06 และอุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) เท่ากับ 6.35 ± 0.04 ครีมทั้ง 3 ชนิดไม่พบการแยกชั้นของครีมที่อุณหภูมิ 4 ± 1 และอุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) มีความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเค้นเฉือน (Rheology) พบลักษณะเป็น Pseudoplastic fluid แต่พบการแยกชั้นของครีมที่อุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส จึงทำให้มีความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเค้นเฉือน (Rheology) พบลักษณะเป็น Non – available ดังแสดงในตาราง 16, 17 และ 18



ภาพประกอบ 12 (A1, B1, C1, D1/ A4, B4, C4, D4/ A7, B7, C7, D7) ครีมพื้นฐานสัปดาห์ที่ 2-12 ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 , 45 ± 1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), (A2, B2, C2, D2, A5, B5, C5, D5, A8, B8, C8, D8) ครีมเคอซีทินสัปดาห์ที่ 2-12 ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 , 45 ± 1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), (A3, B3, C3, D3, A6, B6, C6, D6, A9, B9, C9, D9) ครีมลิโปโซม เคอซีทินสัปดาห์ที่ 2-12 ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 , 45 ± 1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ($30 \pm 1^\circ\text{C}$)

ตาราง 16 ลักษณะทางกายภาพของครีมพื้นฐาน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Heating cooling testing) 12 สัปดาห์ (n = 3)

การทดสอบ	4 ±1°C	อุณหภูมิห้อง (30 ±1°C)	45 ±1°C
สัปดาห์ที่ 2			
สี	ขาว	ขาว	ขาว
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.4 ±0.25	6.22 ±0.04	5.78 ±0.05
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 4			
สี	ขาว	ขาว	ขาว
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.96 ±0.02	6.57 ±1.36	5.72 ±0.33
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 8			
สี	ขาว	ขาว	ขาว
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.15 ±0.36	6.7 ±0.01	4.05 ±0.84
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 12			
สี	ขาว	ขาว	ขาว
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.12 ±0.88	6.35 ±0.04	3.75 ±0.06
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available

หมายเหตุ - ไม่มี + มี

ตาราง 17 ลักษณะทางกายภาพของครีมไลโปโซมเคอซีทีน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว
(Heating cooling testing) 12 สัปดาห์ (n = 3)

การทดสอบ	4 ±1°C	อุณหภูมิห้อง (30 ±1°C)	45 ±1°C
สัปดาห์ที่ 2			
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	7.07 ±0.003	7 ±0.01	6.92 ±0.78
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 4			
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	7.07 ±0.25	6.74 ±0.28	6.75±2.03
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 8			
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.76 ±1.46	6.42 ±0.09	6.41±0.001
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 12			
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.59 ±14.2	6.34 ±0.75	6.27±0.04
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available

หมายเหตุ - ไม่มี + มี

ตาราง 18 ลักษณะทางกายภาพของครีมเคอวอซีทิน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว
(Heating cooling testing) 12 สัปดาห์ (n = 3)

การทดสอบ	4 ±1°C	อุณหภูมิห้อง (30 ±1°C)	45 ±1°C
สัปดาห์ที่ 2			
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.54 ±1.38	6.41 ±0.08	5.48 ±1.11
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 4			
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.47 ±0.005	6.48 ±0.002	5.16 ±1.60
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 8			
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.42 ±0.77	6.27 ±2.04	4.28 ±3.01
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available
สัปดาห์ที่ 12			
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	-	-	-
การแยกชั้น	-	-	+
pH	6.22 ±1.14	5.09 ±0.07	3.91 ±0.001
Rheology	Pseudoplastic fluid	Pseudoplastic fluid	Non – available

หมายเหตุ - ไม่มี + มี

5.3.2 ผลการศึกษาปริมาณเคอซีตินในครีมไลโปโซมเคอซีติน และครีมเคอซีติน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ พบว่าครีมไลโปโซมเคอซีติน และครีมเคอซีติน มีความคงสภาพดีที่อุณหภูมิ 4 ±1 องศาเซลเซียส โดยในสัปดาห์ที่ 12 มีปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin) ร้อยละ 100 ±0.020 และร้อยละ 100 ±0.010 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ ในครีมทั้ง 2 ชนิดหลังการศึกษาความคงสภาพระยะยาว 12 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิห้อง (30±1 เซลเซียส) ครีมไลโปโซมเคอซีติน มีร้อยละปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin) มากกว่าครีมเคอซีตินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 – 12 โดยในสัปดาห์ที่ 12 ครีมไลโปโซมเคอซีตินมีปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือร้อยละ 35 ±0.032 และครีมเคอซีตินมีปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือร้อยละ 10 ±0.098 เช่นเดียวกับในอุณหภูมิ 45 ±1 องศาเซลเซียส ครีมไลโปโซมเคอซีติน มีร้อยละปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin) มากกว่าครีมเคอซีตินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 – 12 ซึ่งในสัปดาห์ที่ 12 ครีมไลโปโซมเคอซีตินมีปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือร้อยละ 15 ±0.013 และครีมเคอซีตินมีปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือร้อยละ 5 ±0.022 ดังแสดงในตาราง 19

ตาราง 19 ร้อยละปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin) ในครีมไลโปโซมเคอซีติน และครีมเคอซีติน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ร้อยละปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin)		
	4±1°C	อุณหภูมิห้อง (30±1°C)	45±1°C
ครีมไลโปโซมเคอซีติน			
0 th	100 ±0.012	100 ±0.012	100 ±0.012
2 nd	100 ±0.058	70 ±0.067	45 ±0.042**
4 th	100 ±0.310	50 ±0.019*	25 ±0.070**
8 th	100 ±0.045	45 ±0.009*	25 ±0.084**
12 th	100 ±0.020	35 ±0.032*	15 ±0.013**

ตาราง 19 (ต่อ)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ร้อยละปริมาณเคอควิซีนที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin)		
	4±1 °C	อุณหภูมิห้อง (30±1 °C)	45±1 °C
ครีมเคอควิซีน			
0th	100 ±0.021	100 ±0.021	100 ±0.021
2nd	100 ±0.009	70 ±0.057	25 ±0.055**
4th	100 ±0.010	42 ±0.006*	17 ±0.038**
8th	100 ±0.092	30 ±0.023*	10 ±0.078**
12th	100 ±0.010	10 ±0.098*	5 ±0.022**

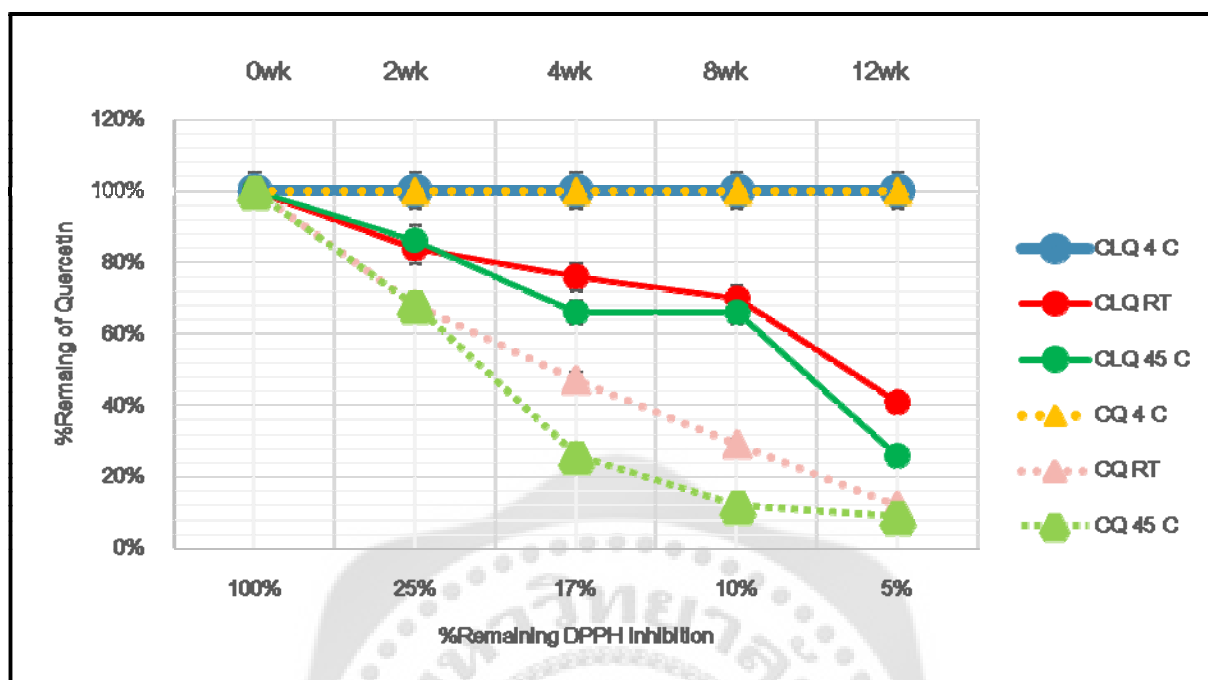
* แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคอควิซีน กับครีมเคอควิซีน ในแต่ละสัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง (30±1 เซลเซียส) อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05), ** แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคอควิซีน กับครีมเคอควิซีน ในแต่ละสัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 45 ±1 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)

5.3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของครีมไลโปโซมเคอควิซีน และครีมเคอควิซีนหลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ พบว่าครีมไลโปโซมเคอควิซีน และครีมเคอควิซีน มีความคงสภาพดีที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส มีการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) ในสัปดาห์ที่ 12 ร้อยละ 100 ±0.003 และร้อยละ 100 ±0.056 ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของการยับยั้ง DPPH ในครีมทั้ง 2 ชนิดหลังการศึกษาคงสภาพระยะยาว 12 สัปดาห์ ในส่วนของอุณหภูมิห้อง (30±1 เซลเซียส) ครีมไลโปโซมเคอควิซีน มีร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) มากกว่าครีมเคอควิซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 – 12 โดยในสัปดาห์ที่ 12 ครีมไลโปโซมเคอควิซีนมีการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ ร้อยละ 41 ±0.061 และครีมเคอควิซีนมีการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ ร้อยละ 10 ±0.033 เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 45±1 องศาเซลเซียส ครีมไลโปโซมเคอควิซีน มีร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) มากกว่าครีมเคอควิซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 – 12 โดยในสัปดาห์ที่ 12 ครีมไลโปโซมเคอควิซีนมีการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ ร้อยละ 26 ±0.003 และครีมเคอควิซีนมีการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ ร้อยละ 5 ±0.006 ดังแสดงในตาราง 20

ตาราง 20 ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) ของครีมไลโปโซม
เคออสตินและครีมเคออสติน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์
(n = 3)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition)		
	4±1°C	อุณหภูมิห้อง (30±1°C)	45±1°C
ครีมไลโปโซมเคออสติน			
0 th	100 ±0.008	100 ±0.008	100 ±0.008
2 nd	100 ±0.024	84 ±0.002*	86 ±0.003**
4 th	100 ±0.002	76 ±0.002*	66 ±0.003**
8 th	100 ±0.004	70 ±0.007*	66 ±0.008**
12 th	100 ±0.003	41 ±0.061*	26 ±0.003**
ครีมเคออสติน			
0th	100 ±0.008	100 ±0.008	100 ±0.008
2nd	100 ±0.044	70 ±0.008*	25 ±0.011**
4th	100 ±0.021	42 ±0.012*	17 ±0.034**
8th	100 ±0.069	30 ±0.074*	10 ±0.077**
12th	100 ±0.056	10 ±0.033*	5 ±0.006**

* แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคออสติน กับครีมเคออสติน ในแต่ละสัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง (30±1 เซลเซียส) อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05), ** แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคออสติน กับครีมเคออสติน ในแต่ละสัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 45 ±1 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining DPPH Inhibition) และร้อยละปริมาณเคอซีตินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin)

จากภาพประกอบ 13 จะเห็นได้ชัดว่าในการศึกษาความคงสภาพระยะยาวในสัปดาห์ที่ 12 ครีมไลโปโซมเคอซีตินมีปริมาณคงเหลือของเคอซีตินมากกว่าครีมเคอซีตินที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 เซลเซียส) และอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส แต่ในทางกลับกันที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ครีมทั้ง 2 ชนิดไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเคอซีตินตลอดทั้ง 12 สัปดาห์ ดังนั้นครีมไลโปโซมเคอซีตินควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้นำเสนอการพัฒนาไลโปโซมบรรจุเคอซีทีน ด้วยวิธี Hydration of thin film⁽³⁹⁾ และครีมไลโปโซมบรรจุเคอซีทีนสำหรับเครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ยาวนานขึ้น โดยนำเอาสารเคอซีทีนนั้นมากักเก็บในไลโปโซมก่อนที่จะนำไปผสมในครีม ทดสอบปริมาณเคอซีทีนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเคอซีทีนเปรียบเทียบกับครีมผสมเคอซีทีนที่ไม่ได้กักเก็บในไลโปโซม

ผลของการศึกษาการพัฒนาไลโปโซมบรรจุเคอซีทีน ด้วยวิธี Hydration of thin film โดยอ้างอิงการใช้อัตราส่วนของ ซอยบีนเลซิทีน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ranjit S.⁽³⁹⁾ ได้ใช้อัตราส่วนของ ซอยบีนเลซิทีน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) ที่มีน้ำหนักรวม 100 mg ซึ่งในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาตำรับไลโปโซมด้วยวิธี Hydration of thin film โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายไขมัน และทำการ Hydrate โดยใช้ phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ใช้วิธีการลดขนาดด้วยด้วยอ่างส่งคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) เป็นเวลา 60 นาที ผู้วิจัยได้ทำการกำหนดอัตราส่วนไขมันทั้งหมดจำนวน 3 สูตร น้ำหนักรวมของไขมันในแต่ละสูตร เท่ากับ 100 mg ได้แก่ 70:30 (F1), 80:20 (F2) และ 90:10 (F3) (w:w) ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธีการดังกล่าวคือ ซอยบีนเลซิทีน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) คือ 70: 30 (F1) (w:w) เพราะหลังจากเตรียมไลโปโซมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไลโปโซมขนาด (Z-Average) อยู่ในช่วง 360.1±0.57 nm ถึง 444.0±4.60 nm ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของขนาดไลโปโซมน้อยที่สุดคือ 23% เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร 80:20 (F2) และ 90:10 (F3) ที่มีการเปลี่ยนแปลงขนาด 80% และ 63% ตามลำดับ รวมไปถึงมีค่าการกระจายขนาด (PDI) (เกณฑ์การกระจายขนาดที่ดีอยู่ในช่วง 0.2 – 0.7) และ Zeta potential (เกณฑ์ Zeta potential ที่ดีคือ ≤30 mV)⁽⁴⁵⁾ อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้

เมื่อนำเคอซีทีนมาบรรจุในไลโปโซมด้วยวิธี Hydration of thin film ผู้วิจัยได้พัฒนาไลโปโซมเคอซีทีนโดยทำการบรรจุเคอซีทีนที่มีปริมาณแตกต่างกันได้แก่ 1 ml (มีความเข้มข้น 2 mg/ml), 2 (มีความเข้มข้น 4 mg/ml) และ 5 ml (มีความเข้มข้น 10 mg/ml) ลงไปในไขมันที่มีอัตราส่วนของ ซอยบีนเลซิทีน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol) เท่ากับ 70: 30 (w:w) ด้วยวิธี Hydration of thin film เช่นเดียวกับการเตรียมไลโปโซมที่ไม่บรรจุเคอซีทีน ผลการศึกษาพบว่า การเตรียมไลโปโซมเคอซีทีนด้วยวิธีนี้สามารถบรรจุเคอซีทีนในไลโปโซมที่มีปริมาณ 1 ml (มีความเข้มข้น 2 mg/ml) โดยผู้วิจัยได้ทำการกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกสูตรตำรับไลโปโซมเคอซีทีนในขั้นตอนนี้คือ หลังจากการระเหยสารละลายออกจากไขมันและเคอซีทีนจนทำ

#

ให้เกิดฟิล์มใส โดยฟิล์มที่เกิดขึ้นต้องเป็นฟิล์มที่มีลักษณะใสไม่ตกตะกอน ซึ่งหลังทำการระเหยสารละลายออกจนเกิดฟิล์มพบว่าเกิดการตกตะกอนของเคอซีทีนในสูตรที่ใส่เคอซีทีนที่มีปริมาณ 2 ml (มีความเข้มข้น 4 mg/ml) และ 5 ml (มีความเข้มข้น 10 mg/ml) ดังนั้นทั้ง 2 สูตรจึงเป็นสูตรที่ไม่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก ฉะนั้นสูตรตำรับไลโปโซมเคอซีทีนจึงถูกกำหนดให้มีอัตราส่วนระหว่างชอยบินเลซิธิน (soy-bean lecithin): โคเรสเตอรอล (cholesterol): เคอซีทีน คือ 70: 30: 1 (w: w: v) (เคอซีทีน 1 ml มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 mg/ml) เนื่องจากสูตรตำรับนี้หลังจากการระเหยสารละลายออก ลักษณะฟิล์มที่เกิดขึ้นเป็นฟิล์มใสไม่มีการตกตะกอนของเคอซีทีน ผลการศึกษาพัฒนาสูตรตำรับไลโปโซมเคอซีทีน พบว่าไลโปโซมเคอซีทีนมีขนาด (Z-Average) 351.5 ± 3.90 nm, การกระจายขนาด (PDI) 0.403 ± 0.001 เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (เกณฑ์การกระจายขนาดที่ดีอยู่ในช่วง 0.2 – 0.7), ค่า Zeta potential -17.1 ± 1.44 mV เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (เกณฑ์ Zeta potential ที่ดีคือ ≤ 30 mV) และมีร้อยละ 45 $\pm$ 0.01 ของประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซีทีน (%Entrapment efficiency) เมื่อนำไลโปโซมเคอซีทีนดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) พบว่าไลโปโซมมีลักษณะเป็นทรงกลมผิวไม่เรียบ มีขนาดไม่สม่ำเสมอ คาดว่าสาเหตุที่ทำให้ไลโปโซมเคอซีทีนมีขนาดไม่สม่ำเสมอเกิดจากกระบวนการลดขนาดของไลโปโซมเคอซีทีนที่อาศัยวิธีลดขนาดด้วยอ่างสั่นคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) จึงทำให้เกิดขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามในการพัฒนาไลโปโซมเคอซีทีนในอนาคตควรเลือกวิธีการที่สามารถกำหนดขนาดของไลโปโซมเคอซีทีนให้มีขนาดที่สม่ำเสมอ เช่น การลดขนาดโดยอาศัยเครื่องมือ Extruder ที่อาศัยหลักการให้ไลโปโซมลดขนาดผ่านเมมเบรนที่มีขนาดเท่าๆกันของแต่ละช่องเมมเบรน เป็นต้น

ผลของการศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมเคอซีทีนในการศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ และในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles จากการศึกษาคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สลับกับอุณหภูมิ 45 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พบว่า ขนาดของไลโปโซมเคอซีทีนมีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ค่าการกระจายขนาดยังอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (เกณฑ์การกระจายขนาดที่ดีอยู่ในช่วง 0.2 – 0.7) และ ค่า Zeta potential อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (เกณฑ์ Zeta potential ที่ดีคือ ≤ 30 mV) ในส่วนของร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซีทีน และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือของไลโปโซมเคอซีทีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซีทีน และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือมีแนวโน้มที่ลดลงหลังจากศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles แต่อย่างไรก็ตามขนาดของไลโปโซมเคอซีทีนกลับมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นหลังจากศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่งจำนวน 6 cycles ดังนั้นผลจากการทดลองจึงแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาดไลโปโซมเคอซีทีน และประสิทธิภาพ

#

ในการกักเก็บสารเคอซิทิน รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้ง DPPH เช่นเดียวกับการศึกษาความคงสภาพของไลโปโซมเคอซิทินในระยะยาว (Long-term testing) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบขนาดของไลโปโซมเคอซิทินในอนุภาคน้ำเดียวกัน (อนุภาคน้ำ 4±1 องศาเซลเซียส, อนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) และ 45±1 องศาเซลเซียส) ไลโปโซมเคอซิทินมีการเปลี่ยนแปลงของขนาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 – 12 มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของไลโปโซมเคอซิทินน้อยที่สุดที่อนุภาคน้ำ 4±1 องศาเซลเซียส และมีการเปลี่ยนแปลงของขนาดมากที่สุดที่อนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) อนุภาคน้ำที่สูงขึ้นจึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของไลโปโซม แต่เมื่อเปรียบเทียบขนาดของไลโปโซมที่อนุภาคน้ำ 45±1 องศาเซลเซียส พบว่ามีขนาดเล็กกว่าที่อนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) คาดว่าการทดลองดังกล่าวอาจเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคน้ำไขมันที่ใช้ในการเตรียมไลโปโซมกับอนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) จึงทำให้เกิดการรวมตัวกันของไลโปโซมเคอซิทินทำให้มีขนาดของไลโปโซมเคอซิทินที่ใหญ่ขึ้น รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของค่าการกระจายขนาด (Pdl) ที่อนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) ไม่ได้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (เกณฑ์การกระจายขนาดที่ดีอยู่ในช่วง 0.2 – 0.7) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 – 12 และมีการเปลี่ยนแปลงของค่า Zeta potential อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบในอนุภาคน้ำเดียวกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ของการศึกษา จากข้อมูลดังกล่าวคาดว่าค่าการกระจายขนาดและค่า Zeta potential ของไลโปโซมเคอซิทินจะเป็นปัจจัยส่งเสริมทำให้ไลโปโซมเคอซิทินที่อยู่ในอนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) มีขนาดที่ใหญ่ที่สุด แต่ในทางกลับกันประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซิทินและร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือของไลโปโซมเคอซิทินที่อนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไลโปโซมที่เก็บไว้ในอนุภาคน้ำ 4±1, 45±1 องศาเซลเซียส ดังนั้นขนาดที่ใหญ่ขึ้นของไลโปโซมเคอซิทินที่เก็บไว้ในอนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) จึงไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซิทินและฤทธิ์การยับยั้ง DPPH ผลการศึกษาความคงสภาพระยะยาว 12 สัปดาห์พบว่าเมื่อไลโปโซมเคอซิทินมีขนาดใหญ่มากขึ้นจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซิทินและฤทธิ์ในการยับยั้ง DPPH ที่ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับไลโปโซมเคอซิทินที่อยู่ในอนุภาคน้ำ 45±1 องศาเซลเซียส ที่มีขนาดของไลโปโซมเล็กกว่าที่อยู่ในอนุภาคน้ำห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) แต่มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซิทินและฤทธิ์ในการยับยั้ง DPPH ที่น้อยกว่า

ผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเคอซิทินด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay ก่อนการตั้งสูตรตำรับครีมไลโปโซมเคอซิทิน พบว่าเคอซิทินมีความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} คือ 0.01 mg/ml ดังนั้นในการตั้งสูตรตำรับไลโปโซมเคอซิทินผู้วิจัยจึงกำหนดให้มีปริมาณเคอซิทินในครีมไลโปโซมเคอซิทินและครีมเคอซิทินที่ความเข้มข้น 0.02 mg/ml หรือ 2 เท่าของค่า IC_{50} โดยผู้วิจัยคาดหวังว่าหลังการศึกษาความคงสภาพของครีมไลโปโซมเคอซิทินในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles และระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ จะมีร้อยละปริมาณเคอซิทินที่

#

คงเหลือ (%Remaining of quercetin) และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) อยู่ที่ร้อยละ 50 อีกทั้งมีปริมาณคงเหลือของเคอซิทินและฤทธิ์ในการยับยั้ง DPPH มากกว่าครีมไม่บรรจุไลโปโซมเคอซิทินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) จากการศึกษาพบว่าหลังการศึกษาความคงสภาพของครีมไลโปโซมเคอซิทินในสภาวะเร่ง จำนวน 6 cycles มีร้อยละปริมาณเคอซิทินที่คงเหลือและร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือมากกว่าร้อยละ 50 รวมถึงมีปริมาณคงเหลือของเคอซิทินและฤทธิ์ในการยับยั้ง DPPH มากกว่าครีมไม่บรรจุไลโปโซมเคอซิทินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ซึ่งเป็นไปตามที่กำหนดไว้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่ได้ศึกษาความคงสภาพของครีมไลโปโซมเคอซิทินระยะยาว 12 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส มีร้อยละปริมาณเคอซิทินที่คงเหลือและร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือมากกว่าร้อยละ 50 เป็นไปตามที่กำหนดไว้ แต่ไม่มีความแตกต่างของร้อยละปริมาณเคอซิทินที่คงเหลือและร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือระหว่างครีมไลโปโซมเคอซิทินและครีมไม่บรรจุไลโปโซมเคอซิทิน แต่ในการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) และ 45 ± 1 องศาเซลเซียส มีร้อยละปริมาณเคอซิทินที่คงเหลือและร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 50 ไม่เป็นไปตามที่กำหนดไว้ อย่างไรก็ตามครีมไลโปโซมเคอซิทินมีร้อยละปริมาณเคอซิทินที่คงเหลือและร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือที่มากกว่าครีมไม่บรรจุไลโปโซมเคอซิทินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) เป็นไปตามที่กำหนดไว้ ดังนั้นครีมไลโปโซมเคอซิทินจึงมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าครีมไม่บรรจุไลโปโซมเคอซิทินแต่มีร้อยละปริมาณเคอซิทินที่คงเหลือและร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 50 ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ในการทดลองในอนาคตจึงต้องมีการพัฒนาสูตรตำรับครีมโดยเพิ่มสารช่วยในการตั้งสูตรตำรับครีมหรือเปลี่ยนแปลงไขมันที่ใช้ในการเตรียมไลโปโซมเคอซิทินเพื่อให้ครีมไลโปโซมเคอซิทินมีประสิทธิภาพเพิ่มมากยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้ได้แสดงถึงประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเคอซิทินในไลโปโซม และนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ครีมไลโปโซมเคอซิทิน ที่มีความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ในด้านของปริมาณสารเคอซิทินที่อยู่ในครีมและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของครีมที่ดีกว่าครีมไม่บรรจุไลโปโซมเคอซิทิน แต่ยังคงต้องพัฒนาต่อไปอีกในอนาคตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของครีมให้มีความคงสภาพที่ยาวนานมากกว่า 12 สัปดาห์ รวมถึงมีปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ยาวนานมากยิ่งขึ้นในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น



บรรณานุกรม

1. วิไล ชินธเนศ และคณะ. กายวิภาคศาสตร์ของมนุษย์. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ: หจก.สามลดา; 2550.
2. ศศิธร แทนทอง, ปรียาภรณ์ มลารักษ์, นิชาภัทร ลิ้มสุข. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ประติณผิวจาก มะขาม[รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์]. เพชรบูรณ์: มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์; 2554.
3. สุธี เวคะวากยานนท์, วชิร คุณกิตติ. เทคนิคการตั้งตำรับยาเตรียม. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: โรงพิมพ์พระธรรมขันธ์; 2541.
4. สุริวัลย์ ดวงจิตต์, ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์. ไลโปโซม: ระบบนำส่งยาเพิ่มการซึมผ่าน ผิวหนัง และการประยุกต์ใช้ (Liposomes: skin permeation enhancement drugdelivery system and application). วารสารฟาร์มาไทม์ (Pharmatime) 2553;1:39-45.
5. Dua J.S, Rana A.C, Bhandari A.K. Review Article; Liposome: Methods of preparation and applications. International Journal of Advance in Pharmaceutical Research 2012;3(2): 4-20.
6. Eskandar M, Somayeh H. Utilization of thin film method for preparation at celecoxib loaded liposomes. Advance Pharmaceutical Bullentin 2010;2(1):93-98.
7. Olga P, Jana S, Zoran K, Vesna R. Review article; an overview: Methods for Preparation and Characterization of liposomes as drug delivery systems. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research 2013;2(3).
8. Sureewan D, Thanasate Y. Liposomes: skin permeation enhancement drug delivery system and application. Pharmatime 2011;1:39-44.
9. อรัญญา มโนสร้อย, จีรเดช มโนสร้อย. ไลโปโซมสำหรับยาผ่านทางผิวหนังและเครื่องสำอาง. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์; 2550.
10. Elhissi A.M.A, O'Neill M.A.A, Roberts S.A, Taylor K.M.G. A calorimetric study of dimyristoylphosphatidylcholine phase transitions and steroid-liposome interactions for liposomes prepared by thin film and proliposome methods. International Journal of Pharmaceutics 2006;320:124-130.
11. Ajazuddin, S. Saraf. Application of novel drug delivery system for herbal formation. Fitoterapia 2010;81:680-689.
12. Himanshu A, Sitasharan P, Singhai A.K. Liposome- as drug carrier. International Journal of Pharmacy & Life Sciences 2001;2(7):945-951.
13. Kant S, Kumar S, Prashar B. A complete review on: Liposomes. International Research Journal of Pharmacy 2012;3(7):10-16.

#

14. พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. *อิมัลชันทางเครื่องสำอาง*. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรินต์ติ้ง เฮ้าส์; 2540.
15. Surya P.M, Santhosh A.M, Gulshan MD, Raghavamma S.T.V, Rama R.N. Formulation and Evaluation of Anti Aging Poly Herbal Cream. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2014;22:133-136.
16. เจนจิรา จิรัมย์, ประสงค์ สีหนาม. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์* 2554;1(1):59-70.
17. Anne Mullens. The trust about antioxidants and your skin. [Retrieved August 2014]. Available from <http://www.besthealthmag.ca/best-looks/skin/the-truth-about-antioxidants-and-your-skin#ECmWe9BytoLHps9m.97>.
18. สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. เชียงใหม่: สมาร์ท โค้ดดิ้ง แอนด์ เซอร์วิส; 2555.
19. Jessy S, Sheha L. Novel double loaded Quercetin liposomes: evidence of superior therapeutic potency against CCL4 induced hepatotoxicity a comparative study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2012;5(2):104-108.
20. Terdthai Tong-un, Muchimapura S, Phachonpai W, Wattanathorn J. Effect of Quercetin encapsulated liposomes via nasal administration: A novel cognitive enhancer. *American Journal of Applied Sciences* 2010;7(7):906-913.
21. Phachonpai W, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tong-Un T, Preechagoon D. Neuroprotective effect of Quercetin encapsulated liposomes: A move; therapeutic strategy against Alzheimer's disease. *American Journal of Applied Sciences* 2010;4(7):480-485.
22. Antonella S, Antonio T, Domenico T, Maria LP, Beatrice T, Chiara M, et al. 'In vivo' antioxidant and Photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2003;56:167-174.
23. Murat U, Mustafa T, Serpil O, Yusuf M, Gulten K. Apoptotic and necrotic effects of carboxylated quercetin/ polyethylenimine complex on Hela cells. *African Journal of Pharmacology* 2011;5(7):894-902.
24. Leslie Baumann. *Dermatologic Therapy "Cosmeceutical Critique Quercetin"*. Skin & Allergy News; 2005.
25. Nathiya, Durga and Devasena. Quercetin, Encapsulated Quercetin and it's application - A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 2014;6(10): 20-26.

#

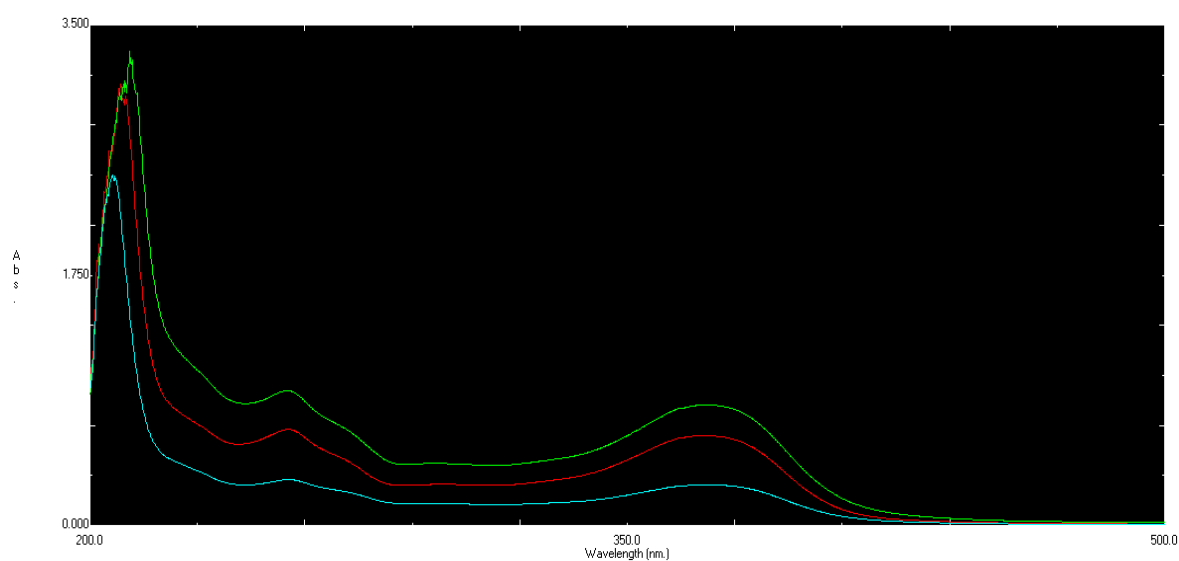
26. Ying Z, Lan S. H, Zhong Z, Moes S.S. C, Albert H.L C. Physiochemical and structural characterization of Quercetin-B-Cyclodextrin complexes. Wiley Inter Science 2014.
27. Maura C, Carla C, Donatella V, Maria M, Chiara S, Anna M. F.. Effect of penetration enhancer containing vesicles on the percutaneous delivery of quercetin through new born pig skin. *Pharmaceutics* 2011;3:497-509.
28. Guo Chen-yu, et al. Development of Quercetin-loaded nanostructure lipid carrier formulation for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2012;430:292-298.
29. Gabrielska J, Soczynska-Kordala M, Przestalski S. Quercetin reduces prooxidant action of organometallic compounds on liposome membranes irradiated with UV. *Journal of environmental studies* 2004;13(5):509-514.
30. โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พรินท์; 2549.
31. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. เครื่องสำอางสำหรับผิวแห้ง. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรินต์ติ้ง เฮ้าส์; 2551.
32. Structure of Liposome [Internet]. [Cited 2014 August 21]. Available from <http://openi.nlm.nih.gov>
33. Skin [Internet]. 2014 [Cited 2014 August 21]. Available from <http://www.pingofhealth.com/2011/11/culprits-of-premature-aging-and-secret.html>
34. อรัญญา มโนสร้อย, จีรเดช มโนสร้อย. โลโปโซมทางยาและเครื่องสำอาง. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรินต์ติ้ง เฮ้าส์; 2545.
35. Yan C, Qingqing W, Zhenghai Z, Ling Y, Xuan L, Lei Z. Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. *Molecules* 2012;17: 5972-5987.
36. Chetanachan P, Akarachalanon P, Worawirunwong D, Dararutana P, Bangtrakulnonth A, Bunjop M, Kongmuang S. Ultrastructural Characterization of Liposomes Using Transmission Electron Microscope. *Advanced Materials Research* 2008;55-57:709-711.
37. ปลื้มจิตต์ โรจนพันธุ์, พรรณวิภา กฤษณาพงษ์, วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, กอบชัย สติรกุล. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เจล: ตำรับยาผิวแห้งและเครื่องสำอาง. กรุงเทพฯ: ภาควิชาสัณกรรม คณะเภสัชกรรม มหาวิทยาลัยมหิดล; 2537.
38. YASMIN BEGUM M, ABBULU K, SUDHAKAR M. Preparation, Characterization and In-Vitro Release Study of Flurbiprofen Loaded Stealth Liposomes. *Chem Sci Trans* 2012;1(1):201-209.

#

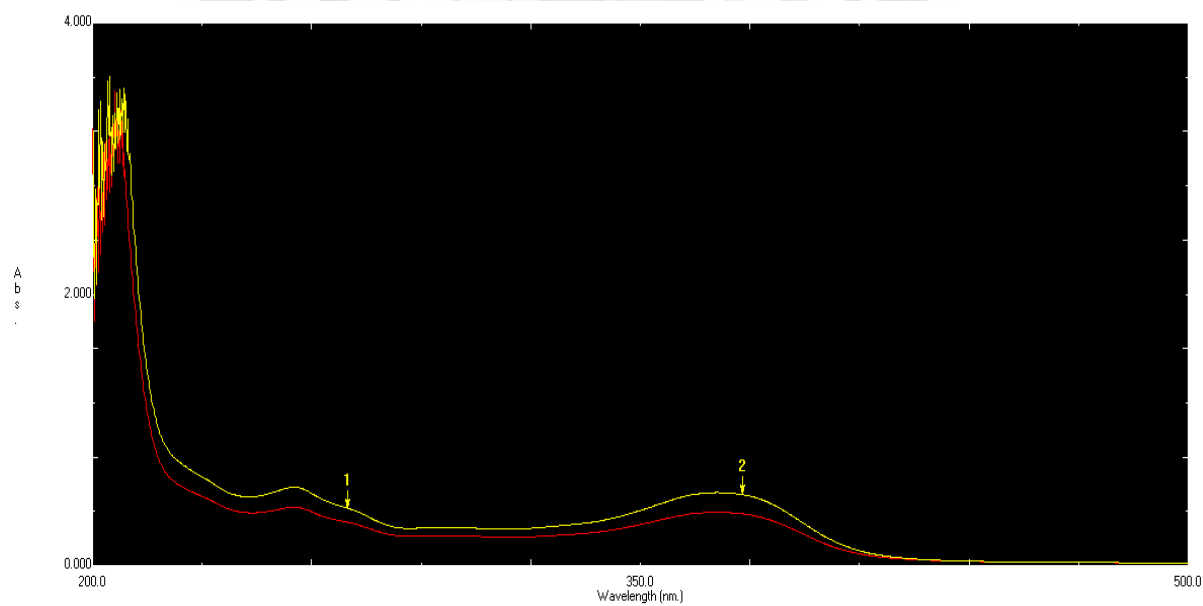
39. Ranjit S, Sankar C. FORMULATION OF HERBAL LIPOSOMES CONTAINING GREEN TEA AND GAULTHERIA PROCUMBENS FOR ANTI ACNE ACTIVITY. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Research* 2012;3(10):1211-1216.
40. บุหรณ์ พันธุ์สุวรรณ. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 2556;21(3):275-86.
41. การเปลี่ยนแปลงอนุมูล DPPH ภายหลังเกิดปฏิกิริยารีดักชัน [Internet]. 2015 [Cited 2014 August 17]. Available from <http://www.nature.com>.
42. Lakshmi N.R, Swaminathan S, Udaykumar R, Uma M.K. RDeseevrceh lopment of a liposomal nanodelivery system for nevirapine. *Journal of Biomedical Science* 2010;17(57):1-9.
43. Agnes W.B, Guido R.M.M. Haenen, Aalt B. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* 2008;585:325-337.
44. อัสวชัย ช่วยพรหม และคณะ. การพัฒนาตำรับเวชสำอางบำรุงผิวผสม Embelin. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย* 2553;2(2):69-77.
45. Dynamic light scattering common terms defined [Internet]. 2014 [Cited 2014 December 7]. Available from <http://www.malvern.com/contact>.



ภาคผนวก



ภาพประกอบ 14 ความยาวคลื่นของไลโปโซมเคออสตินสูตร 70:30:1 (สีเขียว), 80:20:1 (สีแดง) และ 90:10:1 (สีน้ำเงิน) (w:w:v)

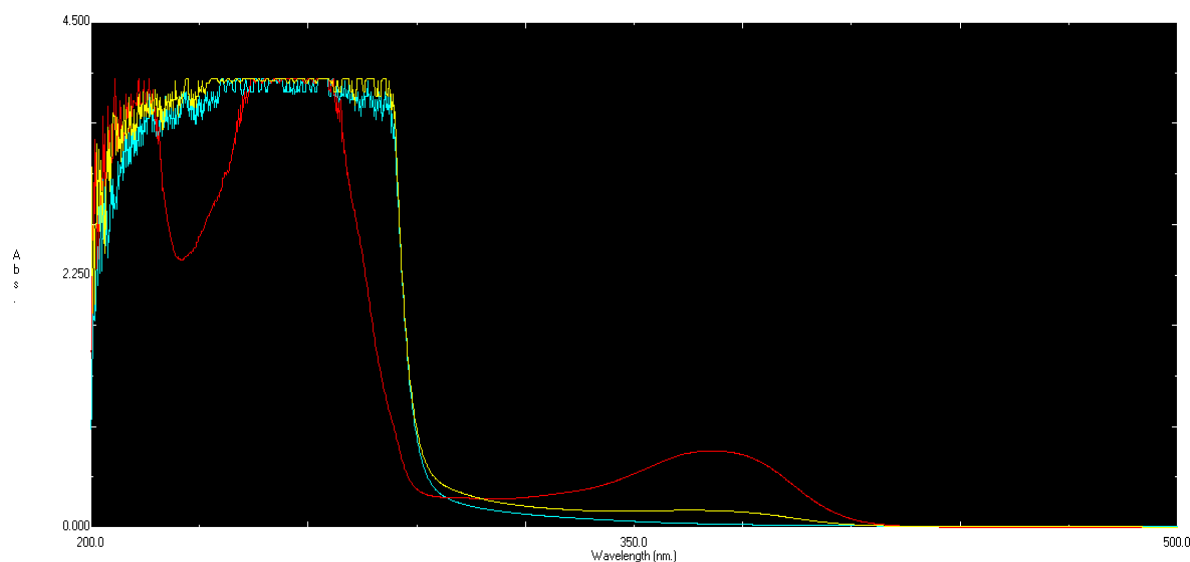


ภาพประกอบ 15 ความยาวคลื่นของไลโปโซมเคออสตินสูตร 70:30:1 (สีเหลือง) (w:w:v) เปรียบเทียบกับเคออสตินมาตรฐาน (สีแดง)

ตาราง 21 ปริมาณเคอควิซิทินและร้อยละปริมาณเคอควิซิทินที่คงเหลือ (%Remaining of quercetin) ในครีมไลโปโซมเคอควิซิทิน และครีมเคอควิซิทินหลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles จำนวน 6 cycles (4 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45 ± 1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) ($n = 3$)

Cycles	ครีมไลโปโซมเคอควิซิทิน		ครีมเคอควิซิทิน	
	ปริมาณเคอควิซิทิน (mg)	ร้อยละปริมาณเคอควิซิทินที่คงเหลือ	ปริมาณเคอควิซิทิน (mg)	ร้อยละปริมาณเคอควิซิทินที่คงเหลือ
0 th	0.02 ± 0.017	100 ± 0.014	0.02 ± 0.034	100 ± 0.25
6 th	0.013 ± 0.01 *	65 ± 0.064 *	0.007 ± 0.004 *	35 ± 0.031 *

* แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคอควิซิทิน กับครีมเคอควิซิทิน ใน Cycle 6 อย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05)



ภาพประกอบ 16 ความยาวคลื่นของครีมไลโปโซมเคอควิซิทิน (สีเหลือง) และครีมเคอควิซิทิน (สีฟ้า) เปรียบกับเคอควิซิทินมาตรฐาน

ตาราง 22 ร้อยละการยับยั้ง DPPH (%Inhibition) และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition) ของครีมไลโปโซมเคอซีทินและครีมเคอซีทิน หลังศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง (Heating cooling testing) จำนวน 6 cycles (4±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง/ 45±1 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง = 1 cycle) (n = 3)

Cycles	ครีมไลโปโซมเคอซีทิน	ครีมเคอซีทิน
ร้อยละการยับยั้ง DPPH (%Inhibition)		
0 th	34 ±0.010	34 ±0.010
6 th	25 ±0.011 *	17 ±0.030 *
ร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (%Remaining of DPPH Inhibition)		
0 th	100 ±0.056	100 ±0.017
6 th	74 ±0.013 *	50 ±0.098 *

* แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคอซีทิน กับครีมเคอซีทิน ใน Cycle 6 อย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05)

ตาราง 23 ปริมาณเคอซีทิน และร้อยละปริมาณเคอซีทินที่คงเหลือ (%Remaining of Quercetin) ในครีมไลโปโซมเคอซีทิน และครีมเคอซีทินหลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ปริมาณเคอซีทิน (mg)		
	4±1°C	อุณหภูมิห้อง (30±1°C)	45±1°C
ครีมไลโปโซมเคอซีทิน			
0 th	0.02 ±0.010	0.02 ±0.010	0.02 ±0.010
2 nd	0.02 ±0.014	0.014 ±0.011	0.009 ±0.020**
4 th	0.02 ±0.021	0.01 ±0.013*	0.005 ±0.022**
8 th	0.02 ±0.002	0.009 ±0.002*	0.005 ±0.012**
12 th	0.02 ±0.002	0.007 ±0.002*	0.003 ±0.031**

ตาราง 23 (ต่อ)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ปริมาณเคออสิทิน (mg)		
	4±1°C	อุณหภูมิห้อง (30±1°C)	45±1°C
ครีมเคออสิทิน			
0 th	0.02 ±0.271	0.02 ±0.271	0.02 ±0.271
2 nd	0.02 ±0.002	0.014 ±0.021	0.005±0.013**
4 th	0.02 ±0.004	0.008 ±0.001*	0.003±0.012**
8 th	0.02 ±0.001	0.006 ±0.012*	0.002±0.001**
12 th	0.02 ±0.001	0.002 ±0.007*	0.001±0.002**

* แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคออสิทิน กับครีมเคออสิทิน ในแต่ละสัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง (30±1 เซลเซียส) อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05), ** แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคออสิทิน กับครีมเคออสิทิน ในแต่ละสัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 45 ±1 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)

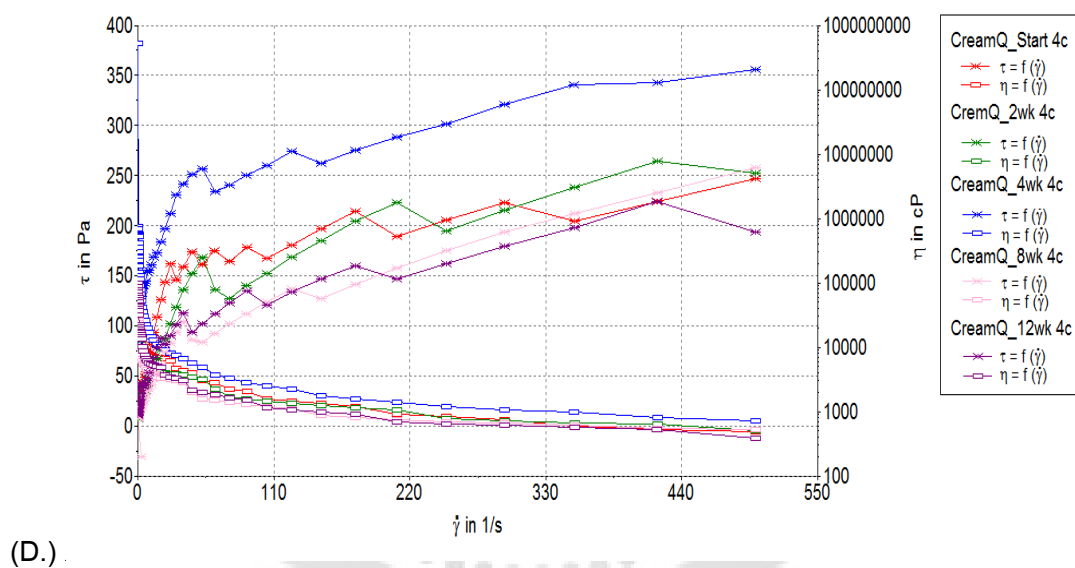
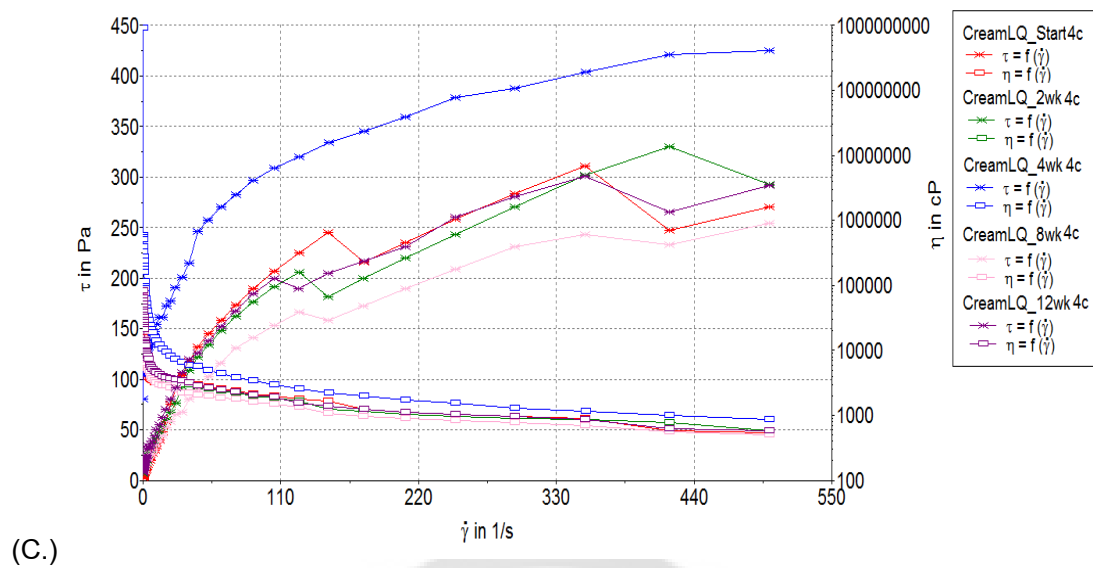
ตาราง 24 ร้อยละการยับยั้ง DPPH (%Inhibition) และร้อยละการยับยั้ง DPPH ที่คงเหลือ (% Remaining DPPH Inhibition) ของครีมไลโปโซมเคออสิทินและครีมเคออสิทิน หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์ (n = 3)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ร้อยละการยับยั้ง DPPH (%Inhibition)		
	4±1°C	อุณหภูมิห้อง (30±1°C)	45±1°C
ครีมไลโปโซมเคออสิทิน			
0 th	34 ±0.008	34 ±0.008	34 ±0.008
2 nd	34 ±0.023	27 ±0.010*	24 ±0.018**
4 th	34 ±0.059	26 ±0.034*	21 ±0.061**
8 th	34 ±0.012	24 ±0.089*	21 ±0.074**
12 th	34 ±0.002	14 ±0.038*	9 ±0.009**

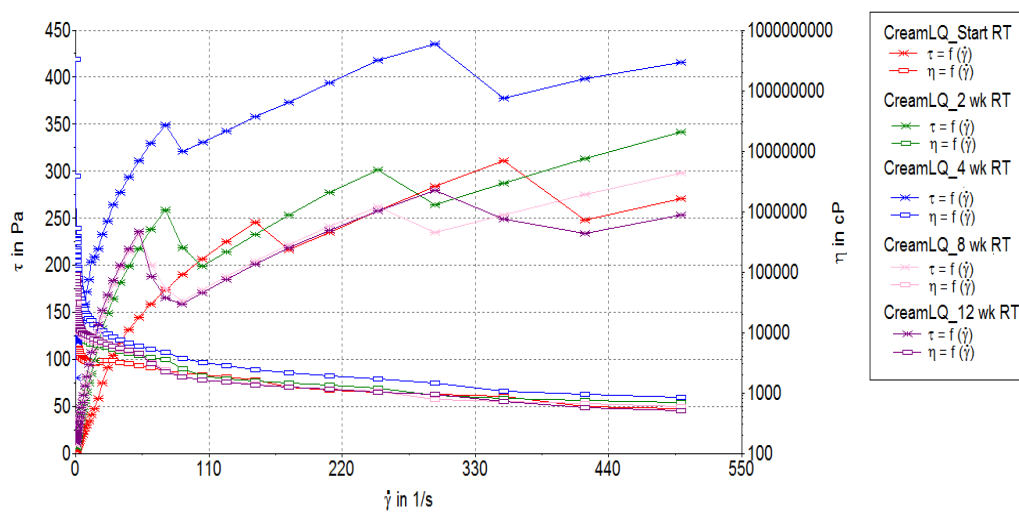
ตาราง 24 (ต่อ)

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ร้อยละการยับยั้ง DPPH (%Inhibition)		
	4±1°C	อุณหภูมิห้อง (30±1°C)	45±1°C
ครีมเคออสติน			
0 th	34 ±0.005	34 ±0.005	34 ±0.005
2 nd	34 ±0.007	23 ±0.014*	21 ±0.022**
4 th	34 ±0.006	16 ±0.003*	9 ±0.076**
8 th	34 ±0.003	10 ±0.003*	4 ±0.031**
12 th	34 ±0.003	4 ±0.007*	3 ±0.091**

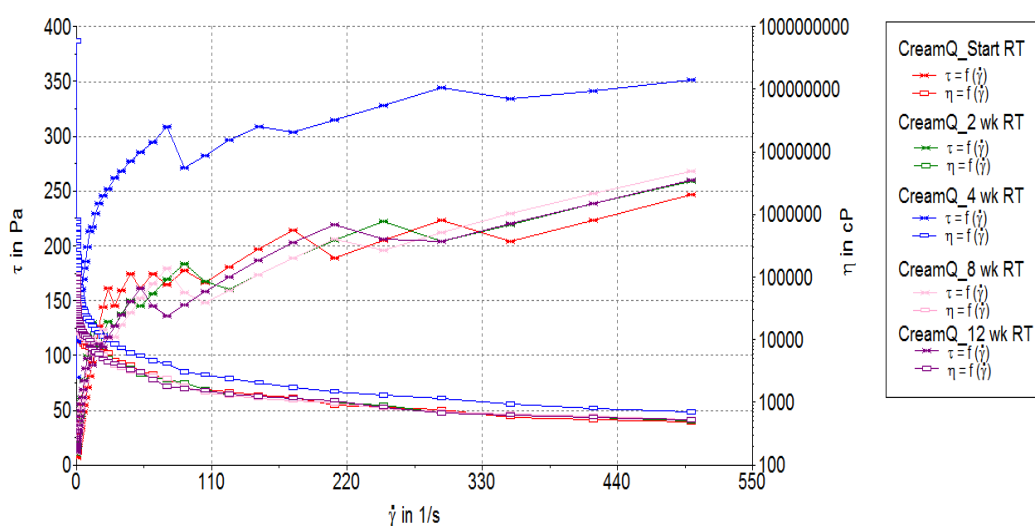
* แตกต่างจากข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคออสติน กับครีมเคออสติน ในแต่ละสัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง (30±1 เซลเซียส) อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05), ** แตกต่างจากข้อมูลเมื่อ เปรียบเทียบระหว่างครีมไลโปโซมเคออสติน กับครีมเคออสติน ในแต่ละสัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 45 ±1 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนของครีมไลโปโซมเคออสทิน (C.) และ (D.) ครีมเคออสทิน ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์



(F.)



(G.)

ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนของครีมไลโปโซมเคออสทิน (F.) และครีมเคออสทิน (G.) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) หลังศึกษาความคงสภาพระยะยาว (Long-term testing) 12 สัปดาห์



ประวัตย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวรัฐพรรณ พลรัฐ
วันเดือนปีเกิด	5 สิงหาคม 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	26 หมู่ 2 ตำบลตลาดใหญ่ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ 50220
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเครื่องสำอาง
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยนอร์ท-เชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จาก โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่
พ.ศ. 2554	ปริญญาตรี แพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต (พทป.บ.) จาก มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย
พ.ศ. 2559	ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ