นีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาเพื่อส่งเสริมการเจริญของเส้นผม

ธนิสสา รามฤทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

TRIPHALA EXTRACT LOADED NIOSOMES FOR HAIR GROWTH PROMOTION

THANISSA RAMRIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF PHARMACY IN PHARMACEUTICAL AND NATURAL PRODUCTS

FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2014

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์

เรื่อง นีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาเพื่อส่งเสริมการเจริญของเส้นผม

ผู้วิจัย นางสาวธนิสสา รามฤทธิ์

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วริษฎา ศิลาอ่อน	ประธานกรรมกา ร
รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา	กรรมการ
ดร.บัญชา ยิ่งงาม	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุต	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.บัญชา ยิ่งงาม)

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา) (รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์ รักษาราชการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2557

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ความช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์ การตรวจทานแก้ไข จนได้รูปเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์เล่มนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.บัญชา ยิ่งงาม ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ในการทำปฏิบัติการ รวมถึงความช่วยเหลือในการตรวจทานวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วริษฎา ศิลาอ่อน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ ทุกท่านที่ช่วยกรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณเงินทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และบริษัทออร์แกนิก ไวต้า จำกัด ภายใต้การเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว. อุตสาหกรรม ที่ให้ความอนุเคราะห์ค่าใช้จ่ายตลอดการวิจัย ขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์ พี่ๆ น้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับ Mr.Hosam Elmetaher ที่เป็นแรงบันดาลใจให้เรียนในหลักสูตรนี้

ธนิสสา รามฤทธิ์

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง	: นีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาเพื่อส่งเสริมการเจริญของเส้นผม
ผู้วิจัย	: ธนิสสา รามฤทธิ์
ชื่อปริญญา	: เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	: เภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	: รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ดร.บัญชา ยิ่งงาม
คำสำคัญ	: นีโอโซม, ตรีผลา, การเจริญของเส้นผม, 5α-รีดักเทส, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตรีผลาเป็นตำรับยาอายุรเวทที่ใช้รักษาอาการท้องผูก ภาวะดีซ่าน ภาวะโลหิตจาง หอบหืด อาการไข้ และแผลในกระเพาะอาหารรื้อรัง ตรีผลาประกอบด้วยผลไม้ 3 ชนิด คือ สมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม ในอัตราส่วนที่เท่ากัน โดยน้ำหนัก เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีรายงานการศึกษาว่า สารสกัดแต่ละชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ 5α-รีดักเทสได้ แต่ยังขาดข้อมูลสนับสนุนกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลาที่ช่วยหยุดการหลุดร่วงของเส้นผม งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลาในการยับยั้งการหลุดร่วงของเส้นผม พัฒนาตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลา และศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการงอกของเส้นผมของสูตรตำรับนีโอโซม การเตรียมสารสกัด นำผลไม้ 3 ชนิด สกัดด้วยเอทานอล 95% ด้วยวิธีการหมัก จากนั้น วิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดตรีผลา และสารสกัดแต่ละชนิด โดยใช้กรดแกลลิกและกรดเอลลาจิกเป็นสารเครื่องหมาย การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS $^{\cdot+}$, DPPH$^{\cdot}$ และ FRAP ทดสอบกลไกของตรีผลาในการยับยั้ง 5α-รีดักเทส พัฒนาและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว ศึกษาการปลดปล่อยและการซึมผ่านผิวหนังของสารเครื่องหมายจากระบบนำส่งนีโอโซมโดยการใช้ถุงไดอะไลซีส และวิธี Franz diffusion cell ตามลำดับ ทดสอบความคงตัวของตำรับที่ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส 90 วัน ทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกของเส้นขนในหนูถีบจักรสายพันธุ์ C57BL/6Mlac และทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในกระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zealand ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดตรีผลามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 888.02±29.52 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และ 692.13±23.00 มิลลิกรัมสมมูลเอลลาจิกต่อกรัมสารสกัด มีปริมาณสารกรดแกลลิกและกรดเอลลาจิก เท่ากับ 105.93±0.39 และ 8.06±0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด สารสกัดตรีผลามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 318.06±3.59 และ 484.27±12.98 มิลลิกรัมสมมูลวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด และ 56.11±0.41 ไมโครโมลาร์เฟอริกไอออนต่อกรัมสารสกัด (ABTS $^{\cdot+}$, DPPH$^{\cdot}$ และ

FRAP) ตามลำดับ สารสกัดตรีผลาสามารถยับยั้งเอนไซม์ 5α-รีดักเทส เท่ากับ 56.46±3.02 มิลลิกรัมสมมูลฟินาสเทอไรด์ต่อกรัมสารสกัดหยาบ สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนีโอโซมคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาณคอเลสเตอรอลร้อยละ 10 ของไขมันรวม และปริมาณสารสกัดร้อยละ 0.10 ให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมเท่ากับ 180.10±16.34 นาโนเมตร และร้อยละการกักเก็บสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด เท่ากับ 46.43±4.20 ขนาดอนุภาคนีโอโซมไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน ร้อยละการกักเก็บกรดแกลลิกและเอลลาจิกเท่ากับ 44.16 ±0.03 และ 79.21±0.06 ตามลำดับ การศึกษาการปลดปล่อยกรดแกลลิกและเอลลาจิกพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยนีโอโซมช่วยเพิ่มอัตราการปลดปล่อยกรดแกลลิกและเอลลาจิกจากระบบนำส่งนีโอโซมเมื่อเทียบกับสารละลาย กรดแกลลิกและเอลลาจิกสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนัง เท่ากับ 218.64±0.31 และ 17.00±0.01 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ซึมผ่านชั้นสตราตัม คอร์เนียม เท่ากับ 0.39±0.11 และ 17.25±2.11 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร และซึมผ่านชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้เท่ากับ 0.29±0.13 และ 3.12±0.56 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ สารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมความเข้มข้นร้อยละ 1, 2.5 และ 5 สามารถกระตุ้นการงอกของเส้นขนในหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac โดยเพิ่มอัตราการงอกของเส้นขน ทำให้เส้นขนยาวเร็วกว่ากลุ่มที่ทดสอบด้วยไมนอกซิดิล และเมื่อศึกษาเนื้อเยื่อผิวหนังในหนูถีบจักร พบว่า สารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เพิ่มขนาดและจำนวนเซลล์รากขนได้มากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมไม่พบการระคายเคืองผิวหนัง สรุปผลการศึกษาสูตรตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาสามารถกระตุ้นการงอกและลดการหลุดร่วงของเส้นผมด้วยกลไกการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ 5α-รีดักเทส

ABSTRACT

TITLE	:	TRIPHALA EXTRACT LOADED NIOSOMES FOR HAIR GROWTH PROMOTION
AUTHOUR	:	THANISSA RAMRIT
DEGREE	:	MASTER OF PHARMACY
MAJOR	:	PHARMACEUTICAL AND NATURAL PRODUCTS
ADVISOR	:	ASSOC. PROF. WANDEE RUNGSEEVIJITPRAPA, Dr.rer.nat.
CO-ADVISOR	:	BANCHA YINGNGAM, Ph.D.
KEYWORDS	:	NIOSOMES, TRIPHALA, HAIR GROWTH PROMOTION, 5α-REDUCTASE, ANTIOXIDANT ACTIVITY

Triphala is an Ayurvedic medicine that is frequently used to treat constipation, jaundice, anemia, asthma, fever and chronic ulcers. The preparation contains fruit from *Terminalia chebula, Terminalia bellirica*, and *Phyllathus emblica* in equal weight proportions. Recently, there have been reports that the fruit extracts could inhibit hair loss, yet there has been no specific information on Triphala and its activities to hair loss inhibition. The purposes of this study are to investigate the mechanism in Triphala extracts associated with hair loss inhibition, develop Triphala extract loaded niosomes and investigate the hair growth promotion of the formulations. Fruits from *T. chebula, T. bellirica*, and *P. em*blica were extracted in 95 % ethanol through the maceration process and the active content of Triphala and its individual were analyzed using gallic acid and ellagic acid as the standard markers. A comparative study was done on the total phenolic content and antioxidant activity of Triphala and each fruit extract was analyzed by using ABTS $^{\bullet+}$, DPPH$^{\bullet}$ and FRAP methods. The mechanism in Triphala that effected the inhibition of 5α- reductase activity was investigated *in vitro*. Niosome formulations loaded Triphala extract was developed and optimized by using the response surface methodology. *In vitro* drug release study was investigated using dialysis bags and the skin penetration was analyzed using Franz diffusion cells. The stability of niosomes's formulation was conducted at 4, 25 and 45 °C for 90 days.

The stimulation of triphala extract on hair growth promotion and skin irritation was investigated in C57BL/6Mlac mice and New Zealand white rabbits, respectively. Results showed that the Triphala extract contained a total phenolic content of 888.02±29.52 mg GAE/g sample and 692.13±23.00 mg EAE/g sample. The Triphala extract also exhibited a gallic acid content of 105.93±0.39 and ellagic acid content of 8.06±0.03 mg/g sample. Antioxidant activities in the Triphala extract was 318.06±3.59, 484.27±12.98 mg vit C/g sample (ABTS, DPPH assay) and 56.11±0.41 µmol/g sample (FRAP assay). Triphala extract inhibited 5α- reductase 56.46±3.02 mg finasteride/g crude extract. Optimize formulation of niosomes loaed Triphala extract was 50 mM total lipid, 10% cholesterol and 0.10% plant extract. The obtained niosomes had an average vesicle size of 180.10 ± 16.34 nm and exhibited the entrapment efficiency of total phenolic content at 46.43±4.20%. Niosomes vesicle size showed no significant alteration following a stability study at 4, 25 and 45 °C for 90 days. The entrapment efficiency value for gallic acid was 44.16±0.03 and 79.21±0.06% for ellagic acid. In vitro drug released in gallic acid and ellagic acid from niosomes were enhanced compared to the release in extract solutions. The skin penetration of gallic acid and ellagic acid from the loaded niosomes at 24 hours was 218.64±0.31 and 17.00±0.01 µg/cm^2, respectively while the levels were 0.39±0.11, 17.25±2.11 µg/cm^2 for stratum corneum and 0.29±0.13, 3.12±0.56 µg/cm^2 for epidermis and dermis, respectively. The concentration 1, 2.5 and 5 % Triphala extract loaded niosomes could promote hair growth in C57BL/6Mlac more effectively than the 2%w/v minoxidil solution. The concentration of 2.5% Triphala extract loaded niosomes significantly increased the number and size of hair follicle compared to the negative and positive control groups (p<0.05). Triphala extract loaded niosomes displayed no signs of skin irritation. In conclusion, Triphala extract loaded niosomes can promote hair growth and inhibit hair loss through antioxidant activity and 5α- reductase inhibition.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 อุบัติการณ์การเกิดภาวะผมร่วง	5
2.2 สาเหตุภาวะผมร่วงผิดปกติ	5
2.3 วัฏจักรชีวิตการงอกของเส้นผม	6
2.4 การศึกษาการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในสัตว์ทดลอง	7
2.5 ยาที่ใช้ในการรักษาภาวะผมร่วง	7
2.6 กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม	10
2.7 ทฤษฎีการแก่ (ageing theory)	19
2.8 การศึกษาการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม	19
2.9 สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาผมร่วง	20
2.10 สารสกัดพืชที่ใช้ในการศึกษา	21
2.11 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพิกัดตรีผลาสำหรับส่งเสริมการเจริญของเส้นผม	23
2.12 การนำส่งผ่านทางรูขุมขน	24
2.13 ข้อจำกัดของการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ และการใช้ในรูปแบบนีโอโซม	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.14 ระบบนำส่งนีโอโซม	25
2.15 ปัจจัยที่มีผลต่อการตั้งตำรับนีโอโซม	27
2.16 การประเมินคุณลักษณะของนีโอโซม	28
2.17 โครงสร้างของผิวหนัง	31
2.18 โครงสร้างและชนิดของเส้นผม	32
2.19 ช่องทางการซึมผ่านของสารทางผิวหนัง	33
2.20 การศึกษากลไกการดูดซึมของตำรับนีโอโซม	34
2.21 การทดสอบการระคายเคือง	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัสดุและสารเคมี	36
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย	37
บทที่ 4 ผลการศึกษา และการอภิปรายผล	
4.1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic compounds)	51
4.2. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเครื่องหมายในสารสกัด	52
4.3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด	57
4.4. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase	58
4.5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับนีโอโซม	64
4.6. การวิเคราะห์หาร้อยละการเก็บกักสารเครื่องหมายในนีโอโซม	84
4.7. การศึกษาการปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม	86
4.8. การศึกษาการซึมผ่านผิวของ gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม ด้วยหนังสุกรแรกเกิด	88
4.9. การทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซม	92
4.10. การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในหนูถีบจักรสายพันธุ์ C57BL/6Mlac	97

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.11. ทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation) ในกระต่ายขาว สายพันธุ์ New Zeland	105
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการศึกษา	107
5.2 ข้อเสนอแนะ	111
เอกสารอ้างอิง	112
ภาคผนวก	128
ประวัติผู้วิจัย	131

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase II	11
2.1	สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้าง cytokines และ growth factors	13
2.2	สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ต่อวงชีวิตการเจริญของเส้นผม	14
2.3	สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์กระตุ้น dermal papilla cell และ hair follicle	16
2.4	กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม	20
3.1.	ระบบ gradient elution ของวัตภาคเคลื่อนที่	39
3.2.	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว และปริมาณคอเลสเตอรอล จากการคำนวณปริมาณไขมันทั้งหมด	44
3.3.	ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารลดแรงตึงผิว ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืช	44
3.4.	ปริมาณสารสกัดที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืช	45
3.5	เกณฑ์การให้คะแนนการงอกของเส้นผม (hair growth score) ของหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac	48
3.6	เกณฑ์ในการประเมินการระคายเคืองผิว	49
3.7	ดัชนีการระคายเคืองผิว (primary irritation index)	49
4.1.	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด	57
4.2	ร้อยละการกักเก็บสารสกัดในนีโอโซมจากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ	73
4.3	ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค ร้อยละการกักเก็บสารสกัด ที่ได้จากการศึกษาปัจจัยต่างเบื้องต้น	74
4.4	ค่าประจุไฟฟ้าของสารสกัดตรีผลาความเข้มข้นต่าง ๆ ในน้ำปราศจากไอออน (n=3)	75
4.5	ขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืชที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RSM-CCD, โดยการแสดงผลจากค่าเฉลี่ย	76
4.6	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ regression coefficient ของขนาดอนุภาค และร้อยละการกักเก็บสารสกัด	78
4.7	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการพหุนามกำลังสองของขนาดอนุภาค และร้อยละการกักเก็บสารสกัด	79

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.8	กำหนดเกณฑ์ระดับปัจจัยที่มีผลต่อค่าตอบสนองเพื่อวิเคราะห์หาค่าที่เหมาะสม	80
4.9	เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (n=3)	83
4.10	คุณสมบัติทางกายภาพของตำรับนิโอโซมเมื่อเก็บไว้ที่ 4, 25 และ 45 °C	93
4.11	ร้อยละการกักเก็บปริมาณ total phenolic content เมื่อเก็บไว้ที่ 4, 25 และ 45°C เป็นเวลา 90 วัน	93
4.12	คุณสมบัติทางกายภาพสารสกัดตรีผลานิโอโซมความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ที่ 25°C	95
4.13	ร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid ของสารสกัดตรีผลานิโอโซมความเข้มข้นต่าง ๆ	95
4.14	ระดับคะแนนการระคายเคืองผิวในกระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zealand	106
4.15	ระดับการระคายเคืองผิวในกระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zealand	106

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	วงชีวิตการเจริญของเส้นผม	6
2.2	สูตรโครงสร้าง finasteride	7
2.3	กลไกการออกฤทธิ์ของ finasteride	8
2.4	สูตรโครงสร้าง minoxidil	9
2.5	โครงสร้างของเส้นผม	33
2.6	ช่องทางการซึมผ่านของยาทางผิวหนัง	34
2.7	กลไกที่คาดว่าจะเป็นการออกฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลา	35
4.1	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัด *T. bellirica, T. chebula, P. emblica* และ triphala	51
4.2	โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน gallic acid และ ellagic acid	53
4.3	โครมาโทแกรม (A) *T. chebula*, (B) *T. bellirica*, (C) *P. emblica*	54
4.4	โครมาโทแกรมสารสกัดตรีผลา	55
4.5	ปริมาณ gallic acid และ ellagic cid ที่พบในสารสกัดแต่ละชนิด	56
4.6	สูตรโครงสร้าง (A) gallic acid และ (B) ellagic acid	58
4.7	โครมาโทแกรม (A) complete reaction control และ (B) enzyme blank	59
4.8	โครมาโทแกรม 0.5 μM finasteride	60
4.9	โครมาโทแกรม (A) *T. chebula*, (B) *T. bellirica* และ (C) *P. emblica*	61
4.10	โครมาโทแกรมสารสกัดตรีผลา	62
4.11	ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase ของสารสกัดชนิดต่าง ๆ	63
4.12	ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ	65
4.13	ร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ	65
4.14	ร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณไขมันทั้งหมด	67
4.15	ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เกิดจากปริมาณไขมันทั้งหมด	67
4.16	ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เกิดจากปริมาณคอเลสเตอรอลต่าง ๆ	69
4.17	ร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่ได้จากปริมาณคอเลสเตอรอลต่าง ๆ	69

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.18	ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เกิดจากปริมาณสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ	71
4.19	ร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่ได้จากปริมาณสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ	71
4.20	กราฟสามมิติ และกราฟโครงร่าง (A) การตอบสนองของขนาดอนุภาคที่เกิดจากปริมาณคอเลสเตอรอล (X_2) กับปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), (B) การตอบสนองของขนาด อนุภาคที่เกิดจากปริมาณสารสกัด (X_3) กับปริมาณไขมัน X_1), (C) การตอบสนองของขนาดอนุภาคที่เกิดจากปริมาณสารสกัด (X_3) กับปริมาณคอเลสเตอรอล (X_2)	81
4.21	กราฟสามมิติ และกราฟโครงร่าง (A) การตอบสนองของร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณคอเลสเตอรอล(X_2) กับปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), (B) การตอบสนองของร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณสารสกัดพืช (X_3) กับปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), (C) การตอบสนองของร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณสารสกัดพืช (X_3) กับปริมาณคอเลสเตอรอล (X_2)	82
4.22	ร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid	84
4.23	ร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid สูตรตำรับนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5%	85
4.24	การปลดปล่อยสารเครื่องหมายจากระบบนำส่งนีโอโซมกับสารละลาย (A) สารเครื่องหมาย gallic acid, (B) สารเครื่องหมาย ellagic acid	87
4.25	ปริมาณสารเครื่องหมายที่ซึมผ่านชั้นผิวหนัง (A) สารเครื่องหมาย gallic acid, (B) สารเครื่องหมาย ellagic acid	89
4.26	ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum	90
4.27	ปริมาณ gallic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น epidermis และ dermis	91
4.28	ภาพถ่ายการเจริญของเส้นขนในหนูหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac	98
4.29	การเจริญของเส้นขนในหนู C57BL/6Mlac mice ประเมินตามเกณฑ์การเจริญของเส้นผม	101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.30	ภาพตัดขวางผิวหนังหนูถีบจักรเมื่อ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; นีโอโซมเปล่า) (ข) 2% minoxidil solution (ค) 1% triphala solution (ง) 1% tirphala niosomes (จ) 2.5% tirphala niosomes (ฉ) 5% tirphala niosomes ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่าในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง	102
4.31	ภาพตัดตามยาวผิวหนังของหนูถีบจักรเมื่อ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; นีโอโซมเปล่า) (ข) 2% minoxidil solution (ค) 1% triphala solution (ง) 1% tirphala niosomes (จ) 2.5% tirphala niosomes (ฉ) 5% tirphala niosomes ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่าในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง	103
4.32	จำนวน hair follicle ในหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบต่าง ๆ	104

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากคำแถลงนโยบายของคณะรัฐมนตรีที่ได้กล่าวว่า ยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 11 เพื่อการพัฒนาประเทศ โดยให้ความสำคัญกับการการส่งเสริมการลดปัจจัยเสี่ยงด้านสุขภาพอย่างเป็นองค์รวม โดยสร้างเสริมสุขภาวะคนไทยให้มีความสมบูรณ์แข็งแรงทั้งร่างกายและจิตใจ พัฒนาความรู้และทักษะในการดูแลสุขภาพของตนเองครอบครัว ชุมชน สร้างการมีส่วนร่วมในการพัฒนานโยบายสาธารณะที่เอื้อต่อสุขภาพ ควบคู่กับการพัฒนาระบบบริการสาธารณสุขให้มีคุณภาพ พร้อมทั้งการส่งเสริมการแพทย์ทางเลือก การพัฒนาระบบฐานข้อมูลสุขภาพของประเทศ โครงการวิจัยนี้ได้เล็งเห็นความสำคัญในด้านปัญหาสุขภาพของประชาชน ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่มีผลต่อสุขภาพจิต จึงได้หยิบยกการแก้ไขปัญหาสุขภาพในการลดและแก้ปัญหาผมร่วงในประชาชน ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพประการหนึ่งที่มีผลเสียต่อสุขภาพจิตของประชาชนจำนวนมาก

ผมร่วงแม้จะไม่เป็นปัญหาสุขภาพที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต แต่เป็นอาการที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพจิตและบุคลิกภาพของบุคคลจำนวนมากโดยตรง ประชากรทั่วโลกมีอาการภาวะผมร่วงประมาณร้อยละ 0.2 ถึง 2 (Olsen, 1993) หากอาการดังกล่าวลุกลามจนกลายเป็นศีรษะล้านก่อให้เกิดเป็นปมด้อยไปตลอดชีวิต ผู้ประสบปัญหาดังกล่าวอาจเกิดภาวะเครียด วิตกกังวล ซึมเศร้าและเสียบุคลิกภาพ จึงเป็นผลให้บุคคลแสวงหาวิธีการรักษาและป้องกันอาการดังกล่าวอย่างมาก สาเหตุของผมร่วงเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น กรรมพันธุ์ ฮอร์โมนเพศ โรคติดเชื้อ โรคเรื้อรัง การอักเสบ ในการรักษาโรคผมร่วง ยังมีความสับสนจากการใช้ยารักษาในปัจจุบันอยู่มาก เนื่องจากผู้ใช้ไม่ทราบสาเหตุแท้จริงของอาการผมร่วงดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ผมร่วงที่เกิดจากพันธุกรรม (androgenic alopecia) เป็นภาวะผมร่วงที่พบบ่อยที่สุด ในเพศชาย ภาวะนี้เรียกว่าผมร่วงศีรษะล้านในผู้ชาย (male pattern baldness) โดยจะเริ่มเกิดในวัยรุ่นตอนปลาย (Nicole et al., 2008) ทั้งนี้ผมร่วง androgenic alopecia มีความรุนแรงมากน้อยต่างกันไปในแต่ละบุคคล พบได้ทั้งแบบอาการผมร่วงหรือเส้นผมค่อย ๆ บางลงจนหลุดร่วงไป แต่ในเพศหญิงภาวะโรคนี้มักจะไม่มีอาการ และจะเกิดในลักษณะผมบางลง ทั้งนี้อาการ ในทางคลินิกในชายและหญิงจะเริ่มต้นเมื่ออายุ 30 ปี กลไกลสำหรับ

อาการผมร่วงแบบนี้ยังไม่แน่ชัด แต่คาดว่าเกิดจากอิทธิผลของฮอร์โมนเพศชาย ไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (dihydrotestosterone; DHT)

ยารักษาผมร่วงที่ผ่านการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administation; FDA) ในปัจจุบันมี 2 ชนิด คือ minoxidil และ finasteride) สำหรับ minoxidil เดิมใช้เป็นยาลดความดันโลหิต แต่มีผลข้างเคียงคือ สามารถกระตุ้นการงอกของเส้นผม จึงนำมาใช้เพื่อลดภาวะผมร่วง การใช้ยานี้ต้องระวังการใช้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตต่ำ และอาจเกิดอาการข้างเคียง คือ ระคายเคืองบริเวณที่ทา คัน หนังศีรษะแห้ง และเกิดผื่นแดงได้ นอกจากนี้แล้วยังก่อให้เกิดอาการข้างเคียงทั้งระบบ คือ วิงเวียน หัวใจเต้นเร็ว ซึ่งเป็นอาการข้างเคียงที่รุนแรง (Abramowicz, 1998) ส่วน finasteride เป็นยารักษาต่อมลูกหมากโต มีคุณสมบัติลดการหลุดร่วงของเส้นผมโดยจับกับเอนไซม์ 5α-reductase II ที่บริเวณเส้นผม ทำให้ผมหลุดร่วงน้อยลง และเร่งการงอกของเส้นผม ผลข้างเคียงของยานี้คือ ความต้องการทางเพศลดลง อวัยวะเพศไม่แข็งตัว ปริมาณอสุจิลดลง เต้านมโต เจ็บอัณฑะ การเจริญของกล้ามเนื้อผิดปกติและทำให้ปวดกล้ามเนื้อรุนแรง (Lacy et al., 2008) นอกจากนี้การใช้ยาดังกล่าวต้องใช้อย่างต่อเนื่อง เพราะหากหยุดใช้ยาจะทำให้กลับมาสู่ภาวะผมร่วงดังเดิม

ดังนั้น การใช้สมุนไพรเพื่อรักษาโรคและฟื้นฟูสุขภาพ จึงได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันด้วยเหตุผลประการหนึ่งเนื่องจากความปลอดภัย ที่มีมากกว่ายาสังเคราะห์ทางเคมี รวมทั้งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่สืบทอดต่อกันมา ผนวกกับความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยิ่งของพืชสมุนไพรภายในประเทศไทย จึงทำให้การวิจัยครั้งนี้ให้ความสนใจในการทดลองใช้ตรีผลาซึ่งประกอบด้วยผลสมอไทย ผลสมอพิเภก และผลมะขามป้อม มุ่งเน้นศึกษากลไกการยับยั้งสาเหตุผมร่วงจากฮอร์โมน และจากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดสมุนไพรจากมะขามป้อม สมอไทย และสมอพิเภก สามารถยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase II (Kumar et al., 2011 และ Kumar et al., 2012) ได้ และยังไม่มีการศึกษาการนำสารสกัดของสมุนไพรทั้งสามชนิดที่อยู่ในตำรับตรีผลามาใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นผม ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีความเป็นไปได้สูงมากที่จะนำตำรับตรีผลามาพัฒนาเป็นเครื่องสำอางเพื่อลดการหลุดร่วง และกระตุ้นการเจริญของเส้นผม

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของตรีผลาซึ่งเป็นยาอายุวัฒนะในการรักษาแบบอายุรเวทของอินเดีย โดยรูปแบบดั้งเดิมนั้นจะเป็นการนำผลไม้ 3 ชนิดคือ ผลของสมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 โดยน้ำหนัก แล้วจึงนำไปรับประทาน แต่ตรีผลาในงานวิจัยนี้เป็นการนำผลไม้แต่ละชนิดมาสกัด เพื่อให้ง่ายต่อการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแต่ละชนิด จากนั้นจึงนำสารสกัดของผลไม้แต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 โดยน้ำหนัก สารสกัดตรีผลาหากนำมาใช้ในรูปแบบตามธรรมชาติ จะมีปัญหาการซึมผ่านผิวหนัง เนื่องจากสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดตรีผลา โดยเฉพาะสาร gallic acid เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ และมีปริมาณจำกัด เพื่อแก้ไข

ปัญหาดังกล่าว จึงเลือกเตรียมตำรับให้อยู่ในรูปแบบอนุภาคนีโอโซม เพื่อช่วยในการนำส่งสารสกัดไปยังเป้าหมายการออกฤทธิ์ และช่วยในการซึมผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น เนื่องจากอนุภาคนีโอโซมประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็น lipid bilayer สามารถกักเก็บทั้งสารที่ละลายน้ำได้และละลายในไขมัน (อรัญญา มโนสร้อย, 2550)

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลาในการยับยั้งการหลุดร่วงของเส้นผม

1.2.2 พัฒนาตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลา

1.2.3 ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการงอกของเส้นผม และการระคายเคืองต่อผิวหนังของผลิตภัณฑ์ในสัตว์ทดลอง

1.2 ขอบเขตงานวิจัย

ส่วนที่ 1 การพัฒนาสูตรตำรับนีโอโซมโดยการใช้วิธีการตอบสนองพื้นผิว (response surface method; RSM) เพื่อหาสูตรตำรับที่เหมาะสม (optimized formulation) ที่ให้ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100 – 400 nm ที่ให้ร้อยละการกักเก็บสารสกัดในนีโอโซมมากที่สุด และศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับ

ส่วนที่ 2 นำสูตรตำรับนีโอโซมที่เหมาะสมจากส่วนที่ 1 มาพัฒนาต่อเพื่อให้ได้ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญในปริมาณที่สูงขึ้น ศึกษาการปลดปล่อยสารเครื่องหมายจากระบบนำส่งนีโอโซม ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังสุกรแรกเกิดของสารเครื่องหมายจากระบบนำส่งนีโอโซม ศึกษากลไกการยับยั้งการหลุดร่วงของเส้นผม และศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม และทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทย โดยนำมาพัฒนาในรูปแบบเครื่องสำอางนาโน และเป็นแนวทางเลือกใหม่สำหรับผู้ประสบปัญหา ผมหลุดร่วง ผมบาง

1.4.2 ลดการนำเข้าสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์รักษาผมร่วงจากต่างประเทศ ทำให้เงินตราไม่ไหลออกไปยังต่างประเทศ เป็นการช่วยเศรษฐกิจของชาติ

1.4.3 ทราบข้อมูลทางด้านความปลอดภัยและประสิทธิภาพของสมุนไพรไทย ในการลดผมร่วงและเร่งการงอกของเส้นผม อันเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์สำหรับผู้บริโภค นักวิจัย และผู้ผลิต ในการส่งเสริมให้เป็นผลิตภัณฑ์ระดับชาติต่อไป

1.4.4 ได้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรูปแบบอนุภาคนาโนต้นแบบ ในการพัฒนาเพื่อผลิตในเชิงอุตสาหกรรม

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 อุบัติการณ์การเกิดภาวะผมร่วง

ภาวะผมร่วงเป็นภาวะความผิดปกติอย่างหนึ่งของผิวหนัง พบประมาณร้อยละ 0.2 ถึง 2 ของประชากรโลก (Betolino, 2000; Olsen, 1993; Madoni and Shapiro, 2000) แม้จะไม่เป็นปัญหาสุขภาพที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต แต่ส่งผลเสียต่อสุขภาพจิตและบุคลิกภาพ ทำให้เกิดความกังวล ความเครียด androgenic alopecia ภาวะผมร่วงที่เกิดจากพันธุกรรมชนิดที่ขึ้นกับฮอร์โมนเพศชาย พบมากที่สุด ซึ่งส่งผลกระทบทั้งในผู้ชายและผู้หญิง ปัญหาผมร่วงร้อยละ 14 เริ่มมีอาการ ในผู้ชายอายุ 15 -17 ปี ที่มีสุขภาพแข็งแรง ร้อยละ 30 พบในผู้ชายที่มีอายุน้อยกว่า 30 ปี และร้อยละ 50 พบในผู้ชายที่มีอายุมากกว่า 50 ปี และในผู้หญิงพบเกือบร้อยละ 50 (Trancik et al., 2001)

2.2 สาเหตุภาวะผมร่วงผิดปกติ

2.2.1 androgenetic alopecia เป็นผมร่วงที่เกิดจากพันธุกรรม เส้นผมมีระยะอนาเจน (anagen) สั้นลง เส้นผมมีขนาดเล็กลง เรียกว่า follicular miniaturization ซึ่งเส้นผมยังคงเจริญได้ทั้ง 3 ระยะ แต่อีก 2 ระยะ ยาวขึ้น เทียบเวลา anagen : telogen จาก 12:1 เป็น 5:1 ทำให้ขนาดของผมใหม่จะสั้นและเล็กลงเรื่อยๆ และมีเส้นผมในระยะเทโลเจน (telogen) ร่วงมากขึ้นกระบวนการ follicular miniaturization เกิดจากฮอร์โมนเพศชาย testosterone เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดไหลเวียนทั่วร่างกาย ที่หนังศีรษะฮอร์โมนนี้จะเปลี่ยนเป็นได DHT โดยเอนไซม์ 5α-reductase เป็นกระบวนการธรรมชาติ จากนั้น DHT จับกับแอนโดรเจนรีเซฟเตอร์ (androgen receptor) ที่ hair follicle ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเส้นผมปกติ ทำให้เส้นผมใหม่ที่งอกมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ (จาก 0.08 mm เหลือน้อยกว่า 0.06 mm) และบางลงเรื่อย ๆ รวมทั้งสีซีดลง จนในที่สุดเกิดภาวะผมบางและศีรษะล้าน

2.2.2 alopecia areata ผมจะร่วงเป็นหย่อม ๆ มักเป็นรูปกลมหรือรี สาเหตุยังไม่ทราบแน่ชัด ปัจจุบันเชื่อว่าเกิดจากภูมิคุ้มกันผิดปกติ เฉพาะที่เซลล์รากผม โดยสุขภาพร่างกายปกติ ผมอาจร่วงหย่อมเดียวหรือหลายหย่อมก็ได้ ในรายที่เป็นมากอาจมีผมร่วงได้ทั้งศีรษะ หรือมีผมร่วงบริเวณอื่นของร่างกายร่วมด้วย บางครั้งหายเองได้ภายใน 1 ปี หรือบางทีสามารถกลับมาเป็นใหม่ได้อีก การรักษา

นี้มีหลายวิธี เช่น ฉีดยาในกลุ่มสเตียรอยด์ที่บริเวณผมร่วงทุก 3 ถึง 4 สัปดาห์ อาจใช้ยาทาในกลุ่มสเตียรอยด์ หรือยาทา minoxidil เป็นต้น

2.2.3 telogen effluvium เป็นภาวะผมร่วงที่เกิดภายหลังจากมีภาวะเครียดที่รุนแรงต่อร่างกาย หรือจิตใจ เช่น การเจ็บป่วย ไข้สูง การผ่าตัด หลังคลอดบุตร เป็นต้น มักเกิดผมร่วงหลังเหตุการณ์ดังกล่าวประมาณ 2 ถึง 3 เดือน เมื่อพ้นสภาวะความเครียดดังกล่าว เส้นผมจะงอกใหม่เป็นปกติภายใน 6 เดือน ถึง 1 ปี

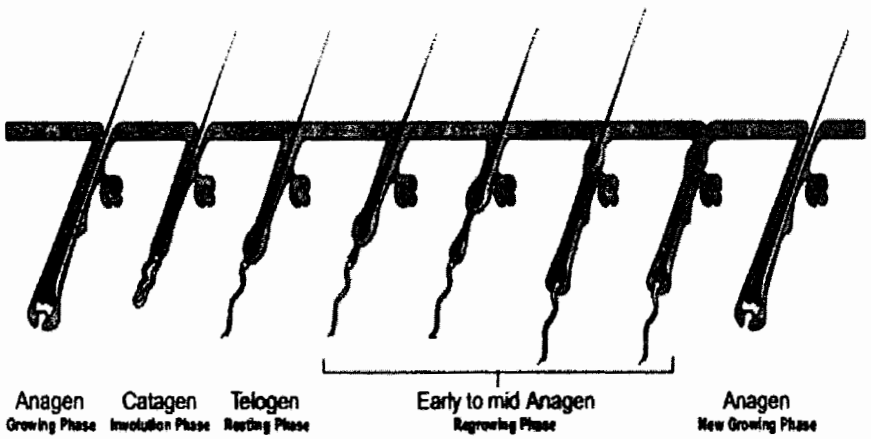
2.3 วัฏจักรชีวิตการงอกของเส้นผม (hair cycle)

เส้นผมจะมีการงอกในช่วงเวลาหนึ่งแล้วจะหยุดงอก หลุดร่วงไป หลังจากนั้นจะกลับมางอกใหม่เป็นวงจร แบ่งเป็น 3 ระยะ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (Andrea et al., 1995)

2.3.1 ระยะเจริญ (anagen phase) เป็นระยะเวลางอกของเส้นผม ซึ่งมีระยะเวลายาวนานประมาณ 3 ปี หรืออาจถึง 7 ปี เมื่อคนเราอายุมากขึ้นระยะอนาเจนจะสั้นลงเรื่อย ๆ ในระยะนี้ผมของคนเราจะงอกเร็วประมาณ 1 เซนติเมตรต่อเดือน

2.3.2 ระยะหลุด (catagen phase) เป็นระยะหยุดการงอกของเส้นผม ในระยะนี้ส่วนของเนื้อเยื่อ dermal papilla จะแยกออกจาก matrix ทำให้เส้นผมขาดอาหารมาเลี้ยง ทำให้ต่อมผมหดเล็กลง แล้วจะหยุดทำงานนานประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะเทโลเจน

2.3.3 ระยะพัก (telegen phase) เป็นระยะพักซึ่งมีระยะเวลาประมาณ 3 เดือน ในระยะนี้ผมจะหลุดร่วงออกไป ซึ่งปกติแล้วต่อมผมมีประมาณ 100,000 ต่อม ในจำนวนนี้ประมาณร้อยละ 10 จะอยู่ในระยะเทโลเจนในทุกช่วงของชีวิตคนเรา จึงทำให้ผมของมนุษย์ร่วงไม่พร้อมกัน



ภาพที่ 2.1 วงชีวิตการเจริญของเส้นผม

ที่มา: Andrea et al., 1995

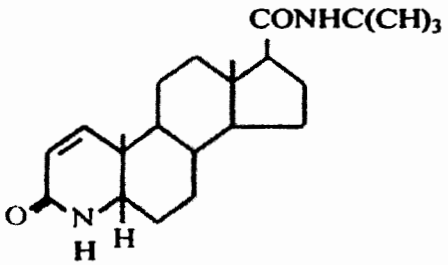
2.4 การศึกษาการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในสัตว์ทดลอง

การศึกษาการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในสัตว์ทดลอง โดยการทดสอบฤทธิ์ในหนูถีบจักรสายพันธุ์ C57BL/6Mlac เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม (Datta et al., 2009) เนื่องจากมีขนสีดำทำให้สังเกตการเจริญของเส้นขนได้ง่าย มีวงชีวิตการเจริญของเส้นผมคล้ายกับในมนุษย์ การทดสอบจึงเลือกศึกษาในเพศผู้เนื่องจากการทดสอบนี้ต้องการทราบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน testosterone ให้เป็น dihydrotestosterone เป็นแอนโดรเจนที่มีฤทธิ์แรง ที่ทำให้เกิดผมร่วง หนูที่ใช้ในการศึกษาควรมีอายุหนูอยู่ในช่วง 7-8 สัปดาห์ เนื่องจากเป็นช่วงที่มีวงชีวิตการเจริญของเส้นขนอยู่ในระยะเทโลเจนเป็นช่วงที่เหมาะสมในการศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผมจากระยะเทโลเจน เข้าสู่ระยะอนาเจน และการศึกษาส่วนใหญ่ทำการทดสอบที่ 4 สัปดาห์ (Kumar et al., 2011; Kumar et al., 2012 และ Lee et al., 2010) เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่เส้นขนในสัตว์ทดลองงอกเต็มพื้นที่ทดสอบ

2.5 ยาที่ใช้ในการรักษาภาวะผมร่วง

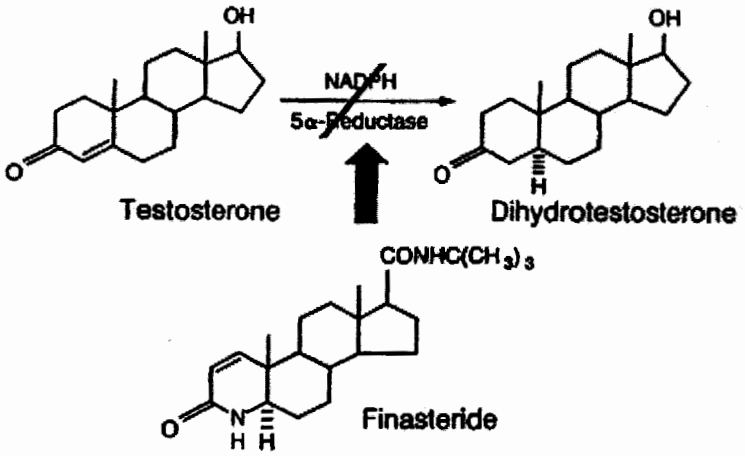
ยาที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา เพื่อใช้ในการรักษาผมร่วงมี 2 ชนิด (Muller et al., 2001) คือ

2.5.1 finasteride มีจำหน่ายเป็นยาเม็ดรับประทาน ขนาด 5 mg ออกฤทธิ์โดยการลดระดับฮอร์โมน dihydrotestosterone โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase II ทำให้ระดับของ dihydrotestosterone ในกระแสเลือดและบริเวณเซลล์สร้างเส้นผมลดลงกว่าร้อยละ 60 จึงสามารถช่วยป้องกันไม่ให้เส้นผมมีขนาดเล็กลง และยังอาจทำให้เส้นผมมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งผลการรักษามีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการตอบสนองของยาในแต่ละคน จากรายงานทางการแพทย์ระบุว่า finasteride ทำให้ผมหยุดร่วง หรือผมขึ้นใหม่ได้อยู่ระหว่างร้อยละ 66-88 สูตรโครงสร้าง กลไกการออกฤทธิ์ แสดงดังภาพที่ 2.2 และ 2.3



ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้าง finasteride

ที่มา: Drake et al., 1994



ภาพที่ 2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของ finasteride

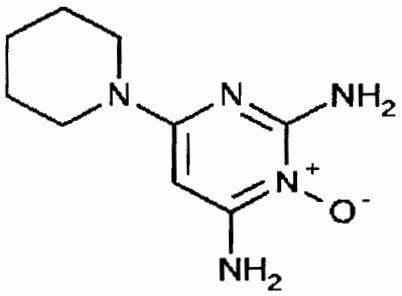
ที่มา: Drake et al., 1994

การศึกษาของ Kaufman et al., (1998) โดยใช้ finasteride 1 mg ในผู้ชายอายุ 18–41 ปี พบว่า จำนวนเส้นผมเพิ่มขึ้น 16.9 และ -4.1 เส้นต่อตารางเซนติเมตร ใน finasteride 1 mg และยาหลอก ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบภาพถ่ายพบการเจริญของเส้นผมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อรักษาที่ 24 เดือน เส้นผมยาวขึ้นและหนาขึ้นร้อยละ 50 และ 66 ในผู้ชายอายุ 18 - 41 ปี ใน 1 ปี และ 2 ปี ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาหลอกพบร้อยละ 7 ใน 1 ปี และ 2 ปี ส่วนในผู้ชายอายุ 41-60 ปี พบร้อยละ 39 และ 3 เมื่อมีการใช้ finasteride เปรียบเทียบกับยาหลอกที่ 2 ปี

การศึกษาของ Drake et al., (1994) การใช้ยา finasteride ในผู้ป่วย 249 คน ขนาดยาที่ใช้ 0.01-5 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่า ระดับ DHT ในกระแสเลือดและที่หนังศีรษะลดลง และหลังใช้ขนาด 0.2 มิลลิกรัมต่อวัน 6 สัปดาห์ ลดระดับ DHT ที่หนังศีรษะได้ร้อยละ 60 – 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมน testosterone ในกระแสเลือด ขนาดยาที่แนะนำคือ 0.2 – 1 มิลลิกรัมต่อวัน สำหรับการรักษาภาวะผมร่วงที่เกิดจากฮอร์โมนเพศชาย

อาการข้างเคียงของการใช้ finasteride คือ หย่อนสมรรถนะทางเพศ ความต้องการทางเพศลดลง ปริมาณอสุจิลดลง อวัยวะเพศไม่แข็งตัว เต้านมโต โดยพบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 3 ที่ใช้ยาจะมีอาการข้างเคียงดังกล่าว และต้องใช้อย่างน้อย 3 เดือน เพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นผม และใช้ต่อเนื่อง 12 เดือน หากหยุดการใช้ยาจะทำให้ผมร่วงเหมือนเดิม (Kaufman et al., 1998) และ finasteride ไม่มีจำหน่ายในรูปแบบทา เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของ finasteride ยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase II ที่ hair follicle แต่ที่ผิวหนังเป็นเอนไซม์ 5α-reductase I

2.5.2 minoxidil มีจำหน่ายในรูปแบบยาเม็ด ขนาด 2.5 และ 10 mg และรูปแบบใช้ภายนอก ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 5 รูปแบบที่นิยมใช้รักษาภาวะผมร่วงคือ รูปแบบใช้ภายนอก ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 5 เดิมเป็นยาลดความดันโลหิต แต่พบว่าทำให้เส้นผมงอกได้ กลไกการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัด ยาถูกเปลี่ยนเป็น minoxidil sulfate โดยเอนไซม์ sulfotransferase ที่อยู่บริเวณหนังศีรษะ minoxidil เพิ่มระยะอนาเจนให้นานขึ้น และทำให้เซลล์เส้นผมมีขนาดใหญ่ขึ้น โดย minoxidil มีสูตรโครงสร้าง ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 สูตรโครงสร้าง minoxidil

ที่มา: Balakrishnan et al., 2009

การทดสอบโดยการเลี้ยงเซลล์ human epidermal ด้วย 5% minoxidil solution พบว่าเซลล์สามารถเจริญอยู่ได้นานมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Baden et al., 1983) โดย minoxidil เพิ่มการเจริญของเซลล์ dermal papilla เพิ่มระดับของ Erk และ Akt phosphorylation ซึ่งอัตราการเพิ่มของ Bcl-2/Bax ทำให้ระยะอนาเจนยาวนานขึ้น ป้องกันการตายของเซลล์ที่เกิดจากกระบวนการ apoptotic และทำให้เซลล์รากผมยาวขึ้น

การทดสอบยา minoxidil ที่หางของลิงแสมที่ไม่มีขน (Uno et al., 1986) พบว่า minoxidil เพิ่มสัดส่วนของ hair follicle ในระยะอนาเจน ลดจำนวนของ hair follicle ในระยะเทโลเจน และเพิ่มขนาดของ hair follicle

การศึกษาของ Abell (1988) ทดสอบการใช้ minoxidil ในผู้ชายที่หัวล้าน พบว่า อัตราส่วนของระยะอนาเจนต่อระยะเทโลเจน เพิ่มขึ้นหลังจากใช้ 12 เดือน โดย minoxidil เพิ่มขนาดของเส้นผมเมื่อใช้ไปแล้ว 4 เดือน จากขนาด 0.029 mm เพิ่มเป็น 0.043 mm ใน 12 สัปดาห์ และเพิ่มเป็น 0.042 mm ใน 24 สัปดาห์

การศึกษาของ Olsen et al., (2002) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้ 5 และ 2% minoxidil เปรียบเทียบกับยาหลอกในผู้ชายที่มีปัญหาผมร่วง พบว่า การใช้ 5% minoxidil จำนวนเส้นผมเพิ่มขึ้น 18.6 เส้นต่อตารางเซนติเมตร 12.7 เส้นต่อตารางเซนติเมตร ใน 2% minoxidil และ 3.9 เส้นต่อ

ตารางเซนติเมตรในยาหลอก เมื่อใช้ไปแล้ว 48 สัปดาห์ และเมื่อดูภาพถ่ายพบการเพิ่มจำนวนการเจริญของเส้นผมร้อยละ 57.9, 40.8 และ 23.2 ใน 5, 2% minoxidil และยาหลอกที่ 1 ปี

ข้อเสียของ minoxidil คือ รบกวนต่อการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น หลังการใช้ทำให้เกิดการคันระคายเคืองหนังศีรษะ ซึ่งเป็นอาการข้างเคียงจากการใช้ยา ราคาแพง ไม่อยู่ในประกันสุขภาพ เพราะการใช้ในด้านนี้เกี่ยวกับความงาม ไม่ได้ใช้เพื่อการรักษาโรคความดันโลหิตสูง จึงไม่ได้รวมอยู่ในประกันสุขภาพ และมีอาการข้างเคียงจากการใช้ยา เช่น ระคายเคืองหนังศีรษะ คันหนังศีรษะ หนังศีรษะแห้ง เป็นผื่นแดง ปวดศีรษะ วิงเวียน หัวใจเต้นผิดจังหวะ พบใน 5% minoxidil มากกว่า 2% minoxidil แม้ว่าจะใช้เป็นยาทา แต่มีบางส่วนที่สามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ ทำให้หลอดเลือดขยายตัว จึงไม่แนะนำให้ใช้ในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับหัวใจ

ทั้ง finasteride และ minoxidil ต้องใช้อย่างต่อเนื่องเพื่อให้ผลการรักษามีประสิทธิภาพ และควรจะใช้ประมาณ 12 เดือนเพื่อตัดสินใจเกี่ยวกับประสิทธิผลของยา หากหยุดการใช้ยาจะทำให้ผลการรักษาลดลง 4-6 เดือน (Olsen, 1987) และความหนาแน่นของเส้นผมลดลง

2.6 กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม

กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม ประกอบด้วย การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α – reductase II ที่บริเวณรากผม ทำให้ testosterone ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น DHT ได้ การเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงหนังศีรษะ ทำให้เส้นผมมีความหนาและแข็งแรง กระตุ้นการทำงานของเซลล์รากผม กระตุ้นวงชีวิตการเจริญของเส้นผม เช่น ทำให้เส้นผมเข้าสู่ระยะอนาเจนจากเทโลเจนเร็วขึ้น ทำให้ระยะอนาเจนนานขึ้น กระตุ้นการสร้างไซโตไค การสร้าง growth factors กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม ประกอบด้วยกลไกต่าง ๆ

2.6.1 ยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase II

การยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase II ทำให้ testosterone ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น DHT ซึ่ง DHT เป็นแอนโดรเจนที่มีฤทธิ์แรง และเป็นสาเหตุที่ทำให้ผมร่วง สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase II แสดงดังตารางที่ 2.1 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase II เป็นกลไกที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากไม่มีแอนโดรเจนไปกระตุ้นให้เกิดผมร่วง

ตารางที่ 2.1 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase II

ชื่อพฤษศาสตร์, สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
Carthamus tinctorius L.	extract	1%w/w	male Sprague-Dawley rats male C56BL/6Mlac mice	สามารถยับยั้ง 5α-reductase ได้เท่ากับ 24.30 ± 1.64 mg finasteride/g crude extract	Kumar et al., 2012
Phyllanthus emblica L.	extract	1%w/w		สามารถยับยั้ง 5α-reductase ได้เท่ากับ 218.99 ± 0.40 mg finasteride/g crude extract	
Ocimum basilicum L.	extract		male Sprague-Dawley	สามารถยับยั้ง 5α-reductase ได้เท่ากับ 217.59 ± 1.00 mg finasteride/g crude extract	Kumar et al., 2011
Oryza sativa L.	extract			สามารถยับยั้ง 5α-reductase ได้เท่ากับ 216.72 ± 0.95 mg finasteride/g crude extract	
Ecklonia cava Hassk.	extract	0.5% *E. cava* enzymatic extract	Male Wistar rats, Female C57BL/6 male Spargue-Dawley rats	Eckol และ dieckol มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase ขึ้นกับขนาดที่ได้รับ	Kang et al., 2012

ตารางที่ 2.1 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase II (ต่อ)

ชื่อพฤษศาสตร์, สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) from green tea	pure EGCG	10% EGCG	Human hair follicles	EGCG กระตุ้นการเจริญของ hair growth และยับยั้งการตายของ dermal papilla cell	Kwon et al., 2007
Thujae occidentalis L.	extract	1% TOS extract	fuzzy rat B6CBAF1/j hybrid mouse	สารสกัด TOS ยับยั้ง 5α-reductase type 2 (IC = 2.6 mg/ml) ได้ดีกว่า γ-linolenic acid แต่ต่ำกว่า finasteride ความรุนแรงของผมร่วงที่ได้รับการรักษาด้วย TOS และ cyproterone acetate เกิดน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ	Park et al., 2003
Polygonum multiflorum Thunberg.	extract		male Sprague-Dawley rats	มีฤทธิ์แรงในการยับยั้ง 5α-reductase	Chul-Ho et al., 2010
Sophora flavescens Ait.	extract	1% *S. flavescens*	female C57BL/6	ยับยั้ง 5α-reductase II.	Roh et al., 2002

2.6.2 เพิ่มการสร้าง cytokines และ growth factors

cytokines และ growth factors ทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างรูปร่างเส้นผมและการเจริญของเส้นผม เช่น epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-α (TNF-α), (TNF-β), keratinocyte growth factor (KGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I),

interleukin-I (IL-1), basic fibroblast growth factor (Bfgf), vascular endothelial growth factor (VEGF) และ hepatocyte growth factor (HGF) มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้าง cytokines และ growth factors แสดงดังตารางที่ 2.2 การศึกษาโดยการเพิ่มการสร้าง cytokines และ growth factors เป็นวิธีการศึกษาที่น่าสนใจ เนื่องจากสารเหล่านี้อยู่ในร่างกาย และควบคุมการสร้างรูปร่างของเส้นผมและการเจริญของเส้นผม

ตารางที่ 2.2 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้าง cytokines และ growth factors

ชื่อพฤษศาสตร์ สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
Capsaicin Capsaicin + Isoflavone Capsaicin + Isoflavone	Injection Injection Oral	1mg/kg 1mg/kg 6mg/day+ 75mg/day	male C57BL/6 mice male C57BL/6 mice Human volunteers with alopecia	เพิ่มการสร้าง dermal GF-I ระดับ IGF-I ในเลือดเพิ่มใน อาสาสมัคร 31 คน ภายใน 5 เดือน	Harada et al., 2007
Raspberry ketone	Solution	0.01 % 0.01%	Male C57BL/6 mice BALB/c mouse Human volunteers with alopecia	เพิ่ม dermal IGF-I มีการเจริญของเส้นผม ใน อาสาสมัคร 5 คน ภายใน 5 เดือน	Harada et al., 2008
Chamaecyparis obtusa	essential oils	1% solution *C. obtusa* extract	Male C57BL/6 mice Cell culture	กระตุ้นVEGF mRNA expression, กระตุ้น VEGF	Lee et al., 2010

ตารางที่ 2.2 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้าง cytokines และ growth factors (ต่อ)

ชื่อพฤษศาสตร์ สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
Sophora flavescens Ait.	extract	1% *S. flavescens* extract in 50% ethanol	female C57BL/6	กระตุ้น IGF-1 และ KGF mRNA ใน Dermal papila cells.	Roh et al., 2002

2.6.3 ออกฤทธิ์ต่อวงชีวิตการเจริญของเส้นผม

วงชีวิตการเจริญของเส้นผม ประกอบด้วย 3 ระยะ คือ อนาเจน เป็นระยะที่มีการเจริญของเส้นผม ใช้เวลา 2-6 ปี ระยะคาเอเจน เป็นระยะที่เส้นผมหยุดการเจริญ และระยะเทโลเจนเป็นระยะพัก การกระตุ้นการเจริญของเส้นผม โดยทำให้ระยะอนาเจนยาวนานขึ้น หรือทำให้ระยะเทโลเจนเข้าสู่ระยะอนาเจนเร็วขึ้น สารจากธรรมชาติที่มีออกฤทธิ์ต่อวงชีวิตการเจริญของเส้นผม แสดงดังตารางที่ 2.3 การศึกษากลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผมที่ออกฤทธิ์ต่อวงชีวิตการเจริญของเส้นผมมีการศึกษามากที่สุด เพราะการทดสอบส่วนใหญ่ทำในหนู ซึ่งหนูที่ใช้ทดสอบมีเส้นขนสีดำ เส้นขนอยู่ในระยะเทโลเจน ซึ่งง่ายต่อการศึกษาและการติดตาม

ตารางที่ 2.3 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ต่อวงชีวิตการเจริญของเส้นผม

ชื่อพฤษศาสตร์ สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
Asiasari radix	Solution	1 % solution	female C57BL/6 and C3H mice	กระตุ้นให้เข้าสู่ระยะอนาเจนเร็วขึ้น เพิ่มความเข้มของสีและขนาดของเส้นผม เพิ่มการนำเข้า cysteine	Roh et al., 2005
Eclipta alba Hassk.	Extract	1.6 mg/15 cm^2 and 3.2 mg/15 cm^2	C57BL/6 mice	เพิ่มความหนาและการเกิดของ follicles ในชั้น subcutaneous เปลี่ยน follicles	Datta et al., 2009

ตารางที่ 2.3 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ต่อวงชีวิตการเจริญของเส้นผม (ต่อ)

ชื่อพฤษศาสตร์ สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
				จากระยะเทโลเจนเข้าสู่ระยะอนาเจน 87.5% ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัด *E. alba* 3.2 mg/15 cm^2	
Fructus panax ginseng	Extract	1 mg/ml FPG extract	Male C57BL/6 mice	กระตุ้นการเจริญของ hair follicles กระตุ้นการเจริญของเส้นผมจากระยะเทโลเจนให้เข้าสู่ระยะอนาเจนเร็วขึ้นในหนู C57BL/6	Park et al., 2011

2.6.4 กระตุ้นการเจริญของเซลล์เดอร์มัล แปปิลลา (dermal papilla cell) และรูขุมขน (hair follicle)

การกระตุ้นการทำงานของ dermal papilla cell จะช่วยกระตุ้นให้เส้นผมเจริญได้ เนื่องจาก dermal papilla เป็นส่วนที่มีเส้นเลือด อาหารมาหล่อเลี้ยง สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ dermal papilla และ hair follicle แสดงดังตารางที่ 2.4 การกระตุ้นการเจริญของ dermal papilla และ hair follicle

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ตารางที่ 2.4 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์กระตุ้น dermal papilla และ hair follicle

ชื่อพฤษศาสตร์ สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
Ecklonia cava	Extract	0.5% *E. cava* enzymatic extract	Male Wistar rats Female C57BL/6 male spargue-Dawley (SD) rats	สารสกัดของ *E. cava* enzymatic เพิ่มการเจริญของ dermal papilla cells	Kang et al., 2012
Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) from green tea	Pure EGCG	10% EGCG	Human hair follicles	EGCG กระตุ้นการเจริญของ human hair growth และยับยั้งการตายของ dermal papillar cell	Kwon et al., 2007
Medicine plant extracts	lotion of medicinal plants extract	0.0 -1.0 %	68 patients alopecia, 16 Healthy patients	กระตุ้นการทำงานของ hair follicle ที่ไม่ทำงานให้ทำงานดีขึ้น	Eskander et al., 2012
Polygonum multiflorum Thunberg.	Extract	4.7mg/12 cm^2	C57BL/6 mice	เพิ่มจำนวนและขนาดของ hair follicles กระตุ้นการเจริญของเส้นผมจากระยะเทโลเจนให้เข้าสู่ระยะอนาเจนเร็วขึ้นในหนู C57BL/6	Park et al., 2011

ตารางที่ 2.4 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์กระตุ้น dermal papilla และ hair follicle (ต่อ)

ชื่อพฤษศาสตร์ สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
Hibiscus rosa-sinensis Linn.	Extract	1% petroleum ether extract of leaves and flowers	Female Wistar albino rats	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบเส้นผมมีความยาวมากกว่า (67%) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากดอก (60%)	Adhirajan et al., 2003
Glycyrrhiza glabra L.	Extract	*2% petroleum ether root extract of G. glabra*	Female Wistar albino rats	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากรากของ *G. glabra* เส้นผมมีความยาวมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ minoxidil และกลุ่ม control ระยะเวลาที่เส้นผมเริ่มเจริญและเจริญสมบูรณ์ใช้เวลา 5-13 วัน ส่วนกลุ่มที่ได้รับ minoxidil ใช้เวลา 6-19 วัน กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากรากของ *G. glabra*, hair follicles อยู่ในระยะอนาเจน 76 % และ 66 and 45 % ในกลุ่มที่ได้รับ minoxidil-treated และกลุ่ม control	Upadhyay et al., 2012

ตารางที่ 2.4 สารสกัดพืชที่มีฤทธิ์กระตุ้น dermal papilla และ hair follicle (ต่อ)

ชื่อพฤษศาสตร์ สารสำคัญ	รูปแบบที่ใช้	ขนาดที่ใช้	การทดสอบ	ผลการศึกษา	อ้างอิง
				G. glabra, hair follicles อยู่ในระยะอนาเจน 76 % และ 66 and 45 % ในกลุ่มที่ได้รับ minoxidil-treated และกลุ่ม control	
Cuscuta reflexa (Roxb.), *Citrullus colocynthis* (Schrad.), *Eclipta alba* (Hassk.)	Extracts	5% (w/w) of all the three proportionate extracts	Wistar strain albino rats	เพิ่มการเจริญของเส้นผมในระยะอนาเจน เพิ่มความยาวของ hair follicle (>0.5mm) ลดเวลาที่เส้นผมเริ่มงอก และเจริญอย่างสมบูรณ์ ทำให้เส้นผมนุ่ม เป็นเงา	Roy et al., 2006
Zizyphus jujube	Essential oil	0.1,1,10% *Z. jujube* essential oil	Female BALB/mice	จำนวนของ hair follicles อยู่ในระยะอนาเจนเมื่อใช้ 1% และ 10%	Yoon et al., 2010

2.6.5 เพิ่มการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงหนังศีรษะ

สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เส้นเลือดขยายตัวช่วยเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงหนังศีรษะ ทำให้เส้นผมมีการเจริญ จากการศึกษาของ Semalty et al., (2010) การตั้งตำรับจากสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผมในหนู Wistar albino เพศผู้ ขนาดที่ใช้คือ 10% ปิโตรเลียมอีเทอร์ พบว่า ตำรับที่มีส่วนผสมของสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ จากลูกชัดใช้เวลา 5 วัน เส้นผมเริ่มงอกและเจริญสมบูรณ์ใช้เวลา 18 วัน และเส้นผมมีความยาวดีที่สุด สารสกัดลูกชัดสามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นผมโดยเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงหนังศีรษะ

การศึกษากลไกการเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงหนังศีรษะ มีการศึกษาน้อย เนื่องจากการศึกษาอาจไม่สะดวกในการติดตามผล

2.7 ทฤษฎีการแก่ (ageing theory)

ภาวะผมร่วง จัดได้ว่าเป็นภาวะหนึ่งที่สัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้น (Kligman, 1988) ซึ่งเมื่ออายุมากขึ้นทำให้สีของเส้นผมเปลี่ยนแปลง โครงสร้างและคุณสมบัติของเซลล์ต่าง ๆ เปลี่ยน การทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ลดลง สาเหตุหนึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดจากร่างกายมีการสะสม อนุมูลอิสระมากขึ้น จนเกิดเป็นสารหรือโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทำลาย อนุมูลอิสระเกิดจากกระบวนการ เมทาบอลิซมของร่างกาย หรือเกิดจากการรับสารจากภายนอก ทำให้เกิดปฏิกิริยากับไขมันไม่อิ่มตัวภายในเซลล์ ได้แก่ ไมโตคอนเดรีย ไลโซโซม และเยื่อหุ้มนิวเคลียส ทำให้มีการใช้ออกซิเจนมากขึ้น เกิดเป็นอนุมูลอิสระมากขึ้น ก่อให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ส่งผลให้การทำงานของร่างกายลดลง ทำให้เซลล์เสียหาย และทำงานผิดปกติ ดังนั้น ในปัจจุบันจึงมีการนำสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาใช้ โดยเฉพาะสารที่มาจากธรรมชาติ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายถูกทำลาย ไม่เกิดโรคต่างๆ และที่สำคัญช่วยชะลอความแก่ และพิกัดตรีผลาเป็นตำรับอายุวัฒนะที่ใช้ในทางการแพทย์อายุรเวทมานาน ประกอบด้วยวิตามินซี สารประกอบฟีนอลิก เช่น gallic acid และ ellagic acid สารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดมะเร็ง ทำให้อายุยืนยาว ทำให้สุขภาพร่างกายแข็งแรง ชลอความแก่ อวัยวะและเซลล์ต่าง ๆ ไม่เสื่อมโทรม เซลล์ของเส้นผมไม่ถูกทำลาย และยังช่วยเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงหนังศีรษะ ป้องกันผมร่วง และกระตุ้นการเจริญของเส้นผม

2.8 การศึกษาการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม

การศึกษาการทดสอบการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม ทำการศึกษาโดยเซลล์เพาะเลี้ยง (tissue culture) (Harada et al., 2007; Harada et al., 2008; Lee et al., 2010; Roh et al., 2002) การศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* study) (Kumar et al., 2011) การศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo* study) (Rho et al., 2005; Park et al., 2011; Soojin et al., 2011; Kang et al., 2012) และการศึกษาในอาสาสมัคร (human volunteers) (Neste et al., 2000) ในการทดสอบการกระตุ้นการเจริญของเส้นผมในสัตว์ทดลอง มีการใช้สัตว์ทดลองหลายชนิด ได้แก่ หนูถีบจักร หนูตะเภา หนูแฮมสเตอร์ แกะ ลิง แต่ที่นิยมคือ ทดสอบในหนูถีบจักร โดยสายพันธุ์ที่นิยมใช้ทดสอบได้แก่ หนูถีบจักรเพศผู้หรือเพศเมีย สายพันธุ์ C57BL/6, C56BL/6Mlac เพศเมีย C3H เพศเมีย BALB/c, Albino หนูตะเภา สายพันธุ์ที่นิยมคือ Wistar albino เพศเมีย และหนู Sprague Dawley เพศผู้ ประเมินผลโดยใช้ การถ่ายภาพการงอกของเส้นขน การวัดความยาวของเส้นขน การวัดน้ำหนัก

ของเส้นขน ช่วงเวลาที่เส้นผมเริ่มงอกและงอกจนสมบูรณ์ การวัดขนาดของต่อมไขมัน ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase ความสามารถในการยับยั้ง dihydrotestosterone receptor ขนาดของ hair follicle จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ ส่วนการศึกษาที่เป็น *in vitro* ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase II พบว่า สารสกัดสมอไทย สารสกัดสมอพิเภก (Kumar et al., 2011) และสารสกัดมะขามป้อม (Kumar et al., 2012) เทียบเท่ากับ 12.74±0.84, 11.58±0.84 และ 18.99±0.40 mg finasteride/g crude extract ตามลำดับ

2.9 สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาผมร่วง

จากตำรายาอายุรเวทของอินเดีย และการใช้สมุนไพรของจีน มีสมุนไพรหลายชนิดที่มีการรายงานและมีหลักฐานแสดงถึงฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหลายชนิดมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผมได้มากกว่ายาที่ได้จากการสังเคราะห์ และมีการทดสอบฤทธิ์ทางคลินิกของสารสำคัญที่ได้จากธรรมชาติ และการรักษาภาวะผมร่วงโดยการใช้ finasteride และ minoxidil ทำให้เกิดอาการข้างเคียงจากการใช้ยา และต้องใช้ยาอย่างต่อเนื่องทำให้เกิดความไม่สะดวก และไม่ปลอดภัย ดังนั้นการนำสมุนไพรมาใช้ในการป้องกันผมร่วงและกระตุ้นการเจริญของเส้นผมจึงได้รับความนิยมมากขึ้น มีความปลอดภัยมากกว่า ราคาไม่แพง อาการข้างเคียงน้อย หาได้ง่าย สมุนไพรที่นำมาใช้ในการป้องกันผมร่วงและกระตุ้นการเจริญของเส้นผมมีด้วยกันหลายชนิด และกลไกการทำงานแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.5 ดังนี้

ตารางที่ 2.5 กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม

กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม	ชื่อพฤษศาสตร์ / สารสำคัญ	อ้างอิง
ยับยั้งเอนไซม์ 5α - reductase II	*Polygonum multiflorum* green tea *Carthamus tinctorius* L. *Ocimum basilicum* L. *Thujae occidentalis* semen	Chul-Ho et al., 2010 Kwon et al., 2007 Kumar et al., 2012 Kumar et al., 2011 Park et al., 2003
สารต้านอนุมูลอิสระ	Polyphenol	Kwon et al., 2007
เพิ่มการไหลเวียนเลือดที่หนังศีรษะ	*Hibiscus rosa-sinensis*	Adhirajan et al., 2012

ตารางที่ 2.5 กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม (ต่อ)

กลไกการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม	ชื่อพฤษศาสตร์ / สารสำคัญ	อ้างอิง
กระตุ้นการเจริญของรากผม dermal papilla cells	Cysteine *Fructus panax ginseng* *Polygonum multiflorum* *Ecklonia cava*	Rho et al., 2005 Park et al., 2011 Soojin et al., 2011 Kang et al., 2012
กระตุ้นการสร้าง cytokines, growth factors	capsaicin, Isoflavones Raspberry ketone *Chamaecyparis obtuse* *Sophora flavescens*	Harada et al., 2007 Harada et al., 2008 Lee et al., 2010 Roh et al., 2002

2.10 สารสกัดพืชที่ใช้ในการศึกษา

2.10.1 สมอไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia chebula* Retz. วงศ์ Combretaceae จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ใบเดี่ยว สีเขียวกลม ปลายใบหนา ดอกเป็นช่อ มีผลลักษณะเป็นเหลี่ยม ออกเป็นพวง ภายในมีเมล็ดรูปรี มีขนาดใหญ่ ผลสมอไทยมีการนำมาใช้ทางการแพทย์แผนไทยดังนี้ ผลอ่อนมีรสเปรี้ยว มีฤทธิ์เป็นยาระบาย ช่วยขับเสมหะและแก้ไข้ ผลแก่ มีฤทธิ์เป็นยาฝาดสมาน ใช้อมกลั้วคอแก้เจ็บคอ ผลสมอไทยมีสาร gallic acid ในปริมาณสูง จึงนิยมใช้สารนี้เป็นสารเครื่องหมายในการควบคุมมาตรฐานสารสกัด (Ponnusakar et al., 2011)

2.10.2 สมอพิเภก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. วงศ์ Combretaceae เป็นไม้ยืนต้นสูง 15-30 เมตร เป็นไม้ผลัดใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ ใบเป็นรูปวงรีกว้างถึงเกือบกลมแกมไข่ โคนใบกลมกว้าง ปลายใบกลมถึงเว้าตื้น ดอกออกที่ซอกใบ ผลเป็นรูปกระสวยเกือบกลม มีสันเหลี่ยม ผลแก่มีรสเปรี้ยว ฝาดหวาน เป็นยาระบาย บำรุงธาตุ แก้โรคเกี่ยวกับตา แก้ไข้ แก้ริดสีดวงทวารหนัก แก้ท้องร่วง และแก้เสมหะติดลำคอ สารเคมีที่พบในสมอพิเภกได้แก่ gallic acid และ gallate เช่น methyl gallate, 1,6-di-o-galloyl-β-D-glucose,3,4,6-tri-o-galloyl-β-d-glucose,1,3,4,6-tetra-o-galloyl-β-d-glucose สารกลุ่ม chebulic acid และ chebulic ellagitannins เช่น chebulic acid และสารกลุ่ม ellagic acid และอนุพันธุ์ (Pfundstein et al., 2010)

2.10.3 มะขามป้อม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* L. วงศ์ Euphorbiaceae เป็นไม้ยืนต้น สูง 10-12 เมตร เปลือกต้นสีเทาอมน้ำตาล แตกเป็นร่องตามยาว กิ่งก้านแข็ง เหนียว ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับในระนาบเดียวกัน รูปขอบขนาน ปลายใบเป็นติ่งแหลม โคนใบมนหรือเว้าเข้า ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบ สีเขียว ดอกออกเป็นช่อ ดอกสีเหลืองอ่อนออกเขียว กลีบดอกมี 5-6 กลีบ

มะขามป้อมมีคุณสมบัติต้านไวรัส (Ryu et al., 2010) ต้านแบคทีเรีย (Matito et al., 2003) ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Poltanov et al., 2009) ใช้ทาฝีและจุดด่างดำ (Jayaweera, 1980) ลดการแดงของผิวหนังที่เกิดจากแสงแดดโดยการลดอนุมูลอิสระ และจับกับโลหะเหล็กและทองแดงได้ดี (Chaudhuri et al., 2003) ใช้เป็นยาระบายบรรเทาอาการท้องผูก (Thakur et al., 1989) บรรเทาอาการปวดฟัน ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดโดยได้จากใบและเมล็ด (Sabu and Kuttan, 2002) บรรเทาอาการท้องเสีย โดยผสมเกลือและนม ช่วยขับปัสสาวะ แก้ไข้และบรรเทาอาการปวดศีรษะ ช่วยบำรุงเส้นผม (Stuart, 1911) ต้านการอักเสบ (Sultana et al., 2004) ลดการคลื่นไส้และอาเจียน (Treadway, 1994) ช่วยให้เลือดกำเดาหยุดไหล บรรเทาอาการคัน รักษาโรคเลือดออกตามไรฟัน ใช้น้ำมันหอมระเหยจากใบเป็นน้ำหอม และทำให้ผิวขาวหรือลดจุดด่างดำที่เพิ่มขึ้นตามอายุ (Chaudhuri et al., 2004)

ผลมะขามป้อม เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่นิยมใช้เพื่อชะลอความแก่ (rejuvenation herb) ในการแพทย์ไทยได้นำผลมะขามป้อมมาใช้เพื่อบำรุงหัวใจ ขับปัสสาวะ ช่วยระบาย บำรุงตับ บรรเทาอาการปวดท้อง แก้ไข้ บำรุงและกระตุ้นการงอกของเส้นผม ผลของมะขามป้อมมีสารประกอบฟีนอลิกปริมาณสูง ได้แก่ สารกลุ่ม hydrolysable tannins เช่น emblicanin A, emblicanin B, punigluconin, pednuculagin (Ghosal et al., 1996) สารกลุ่ม flavonoids (kaempferol-3-o-alpha-L-(6"methyl) rhamnoside, kaempferol-3-o-alpha-L-(6"ethyl) rhamnoside), alkaloids (phyllantidine และ phyllantine), gallic acid, ellagic acid, 1-o-galloyl-beta-D-glucose, 3,6-di-o-galloyl-D-glucose, chebulinic acid, quercetin, chebulagic acid, corilagin และ isostrictinnin (Zhang et al., 2003) โดยสารที่พบในปริมารสูง คือ gallic acid และ ellagic acid (Krishnaveni and Mirunalini, 2011)

2.10.4 ตรีผลา (Triphala) เป็นพิกัดยาอินเดียที่ประกอบด้วย การนำผลของพืช 3 ชนิดที่มีสรรพคุณเหมือนกันมาปรุงเป็นเครื่องยา ได้แก่ ผลสมอไทย ผลสมอพิเภก และผลมะขามป้อม ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยน้ำหนัก เป็นสูตรตำรับอายุวัฒนะที่ใช้ทางอายุรเวชอินเดีย กระตุ้นการทำงานของร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกัน (Jagetia et al., 2002) มีรายงานการศึกษาว่า ตำรับตรีผลาเป็นแหล่งของ vitamin C, ellagic acid, gallic acid, chebulinic acid, bellericanin, β-sitosterol and flavanoids (Jagetia et al., 2002) ตรีผลามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Takagi and Sanasshiro.,

1996) ต้านการเกิดภูมิคุ้มกันบกพร่อง (El-Mekkawey and Merelhy, 1995) บรรเทาอาการผิดปกติของระบบย่อยอาหาร ช่วยลดอาการท้องผูกเรื้อรัง (Mukherjee et al., 2008) ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Sabu and Kuttan, 2002) มีผลต่อหัวใจและหลอดเลือด ควบคุมความดันโลหิต ควบคุมคอเลสเตอรอล (Mukherjee et al., 2006) ลดอาการปวดศีรษะ และปรับสภาพผิวพรรณ ต้านการแก่ (Nadkarni AK, 1976) (Rastogi and Mehrotra, 1993) นอกจากนี้ในตำราแพทย์แผนไทยและตำรับอายุรเวทของอินเดียยังมีการนำพิกัดยานี้สำหรับใช้ปรับปรุงเส้นผมและกระตุ้นการงอกของเส้นผม จากการค้นคว้าพบว่า ยังไม่พบรายงานการใช้สารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนิโอโซม

2.11 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพิกัดตรีผลาสำหรับส่งเสริมการเจริญของเส้นผม

การดูแลเส้นผมของสตรีตามภูมิปัญญาไทยในอดีตที่ผ่านมามีหลายวิธี หนึ่งในวิธีดังกล่าวคือ การใช้สมุนไพรในพิกัดตรีผลาซึ่งถือปฏิบัติกันมาว่า ให้นำผลสมอไทยและมะขามป้อมมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นแบ่งมาโดยใช้สัดส่วนที่เท่ากันแล้วนำมาทอดในน้ำมันมะพร้าว 2 ส่วน จนเหลืองกรอบแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำมากรองผ่านผ้าขาวบางแล้วเก็บในภาชนะที่แห้ง เมื่อจะใช้จะแบ่งมาหมักผมทิ้งไว้ 10 -15 นาที ก่อนสระผมจะทำให้ผมนุ่มสลวย มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและน่าสัมผัส ส่วนการแพทย์อายุรเวทจะนำสมุนไพรพิกัดตรีผลามาบดเป็นผงแล้วเติมน้ำอุ่นลงไปให้มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลวแล้วทาลงหนังศีรษะโดยตรง ปล่อยทิ้งไว้สักพักแล้วล้างออก นอกจากนี้แล้วพิกัดตรีผลายังมีคุณสมบัติเป็นสารชะล้างได้ดีด้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณหนังศีรษะและเส้นผมที่มีความมันมากกว่าปกติ

จากการศึกษา Kumar et al., (2011 และ 2012) ได้มีการคัดกรองสมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมการเจริญของเส้นผม พบว่า สมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในพิกัดตรีผลาเมื่อนำมาสกัดด้วยเอทานอล 95% ซึ่งเป็นสารสกัดที่สามารถใช้ในเครื่องสำอางได้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase ได้ดีมาก โดยค่าดังกล่าวเทียบสมมูลกับฤทธิ์ของยา finasteride ซึ่งใช้เป็นยามาตรฐานในการรักษาภาวะผมร่วงในเพศชายที่มีจำหน่ายในปัจจุบันดังนี้ สารสกัดสมอไทยเทียบเท่ากับ 12.74±0.84 mg finasteride/g crude extract สารสกัดสมอพิเภกเทียบเท่ากับ 11.58±0.84 mg finasteride/g crude extract และสารสกัดมะขามป้อมเทียบเท่ากับ 18.99±0.40 mg finasteride/g crude extract ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องและยืนยันว่าการใช้สมุนไพรในทางการแพทย์แผนไทยสามารถยับยั้งการหลุดร่วงของเส้นผมได้ ดังนั้น การใช้สารสกัดที่มีอยู่ในตำรับพิกัดตรีผลาจึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะนำมาพัฒนาเป็นเครื่องสำอางเพื่อลดการหลุดร่วงและกระตุ้นการเจริญของเส้นผม และเพิ่มทางเลือกสำหรับผู้บริโภคต่อไป

นอกจากนี้แล้วสารสกัดตรีผลายังมีคุณสมบัติอื่น ๆ ที่ใช้บำรุงเส้นผมและหนังศีรษะได้ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Ahmad et al., 1998) และฤทธิ์ช่วยในการสมานแผล (Kumar et al.,

2008) โดยมีการทดลองเตรียมขี้ผึ้งที่ผสมสารสกัดตรีผลา 10% พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการปิดของแผล เพิ่มปริมาณการสังเคราะห์เส้นใยคอลลาเจนและลดการแสดงออกของเอนไซม์ metalloproteinase ในสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Kumar et al., 2008)

2.12 การนำส่งผ่านทางรูขุมขน และปัจจัยที่มีผลต่อการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขน

ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ส่งเสริมการเจริญของเส้นผม สามารถทำได้โดยการนำส่งผ่านทางรูขุมขน ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการซึมผ่านทางรูขมุขน ดังนี้

2.12.1 คุณสมบัติและสภาวะของรูขุมขน

2.12.1.1 ชนิดของเส้นผม พบว่า เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นผมจะมีผลต่อการส่งผ่านของสารที่มีขนาดประมาณ 10-70 μm หากเส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาดใหญ่จะสามารถเพิ่มการนำส่งสารได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่า ชนิดเส้นผมที่เป็น terminal hair มีอัตราการซึมผ่านของสารมากกว่า vellus hair (Toll et al., 2004)

2.12.1.2 วงจรชีวิตของเส้นผมมีผลต่อการซึมผ่านของสาร พบว่า ระยะการเจริญของเส้นผมที่เหมาะสมในการนำส่ง DNA ไปสู่รูขุมขน คือระยะ anagen (Domashenko et al., 2000)

2.12.1.3 รูเปิดของรูขุมขน มี 2 ชนิด คือ รูขุมขนแบบเปิดและแบบปิด โดยรูขุมขนแบบปิดสารจะไม่สามารถซึมผ่านได้ต้องมีการเปิดรูของรูขุมขนก่อน อาจใช้การเปิดรูขุมขน (stripping technique) (Ladmann et al., 2001)

2.12.2 สมบัติของสาร

2.12.2.1 ขนาดอนุภาค อนุภาคของสารหรือยาต้องมีขนาดเหมาะสม หากมีขนาดที่ใหญ่เกินไปจะค้างอยู่บนผิวหนัง หากมีขนาดเล็กเกินไปจะแทรกผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียมลงไปยังชั้นผิวหนังที่ลึกกว่า ขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมเท่านั้นที่จะอยู่ในบริเวณ hair follicles โดยพบว่าขนาด 320 nm สามารถซึมผ่านเข้าสู่ hair follicular ได้ (Lademann et al., 2007)

2.12.2.2 ประจุของอนุภาค (Jung et al., 2006) ได้ศึกษาการนำส่งลิโพโซมที่มีประจุผ่านทางรูขุมขน พบว่า ลิโพโซมที่มีประจุบวก (cationic liposome) หรือมีทั้งประจุลบและประจุบวก (amphoteric liposome) สามารถซึมผ่านลงไปในรูขุมขนได้ดีกว่าลิโพโซมที่มีประจุลบ (anionic liposome)

2.12.2.3 ความสามารถการละลายในไขมันและน้ำของสาร (Ogiso et al., 2002) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการซึมผ่านของยาที่ละลายในน้ำและที่ละลายในไขมัน พบว่า ยาที่ละลายในน้ำสามารถซึมผ่านเข้าไปในรูขุมขนโดยผ่านทาง outer root sheath เพื่อลงไปยังชั้นหนังแท้ (dermis) โดยระยะเวลาในการซึมผ่านของยาที่ละลายในน้ำจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อเทียบกับยาที่ละลายใน

ไขมันซึ่งซึมผ่านทาง lipoidal pathway ซึ่งเป็นเส้นทางที่ขับไขมันออกมาจากต่อมไขมัน ดังนั้นยาที่ละลายในไขมันจะซึมผ่านทั้ง inner และ outer root sheath

การนำนิโอโซมมาช่วยในการนำส่งสารสกัดจะช่วยให้สารสกัดสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ดีขึ้น เนื่องจากส่วนประกอบของนิโอโซมมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและชอบไขมัน อนุภาคมีประจุ และอนุภาคมีขนาดเล็ก

2.13 ข้อจำกัดของการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ และการใช้ในรูปแบบนิโอโซม

การใช้สารสกัดที่ได้จากธรรมชาติทาลงบนหนังศีรษะเพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นผมโดยตรง ทำให้เกิดความไม่สะดวก มีปัญหาเรื่องการซึมผ่านทางผิวหนัง เนื่องจากสารสกัดสามารถละลายน้ำได้ ทำให้การซึมผ่านผิวหนังได้น้อย และผิวหนังมีโครงสร้างเป็น lipid bilayer สารที่สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีจะต้องมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและชอบไขมัน สารสกัดมีปริมาณจำกัดทำให้การนำส่งไม่ถึงเป้าหมายที่ต้องการ และสารสกัดที่ได้ไม่คงตัวเมื่อสัมผัสกับแสง ซึ่งระบบการนำส่งสารผ่านผิวหนังมีหลายระบบด้วยกัน ได้แก่ liposomes, neosomes, phytosomes, nanoemulsion/ microemulsion, nanostructured lipid carriers และ solid lipid nanoparticle การศึกษานี้เลือกใช้นิโอโซมเพื่อนำส่งสารสกัดไปยังเป้าหมาย ซึ่งมีข้อดี ดังนี้ นิโอโซมเหมาะสำหรับการนำมาใช้ในทางเครื่องสำอาง และใช้ในการนำส่งสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ สามารถนำส่งสารสกัดทั้งที่สามารถละลายน้ำและละลายในไขมัน เพิ่มความคงตัวของสารสกัด เพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง สามารถกักเก็บสารที่มีค่าการละลายแตกต่างกันได้ เพิ่มชีวประสิทธิผลของยา ระดับยาอยู่ในกระแสเลือดนานขึ้น สารลดแรงตรึงผิวที่ใช้ในการเตรียมนิโอโซมสามารถเข้ากับสารในร่างกาย สลายตัวได้ และไม่ก่อให้เกิดการแพ้ สามารถควบคุมคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ขนาดของอนุภาค จำนวนชั้น ประจุที่ผิวของอนุภาค ปริมาตรของอนุภาค และความเข้มข้นของยาได้ มีการควบคุมการปลดปล่อยสาร

2.14 ระบบนำส่งนิโอโซม

ระบบนำส่งนิโอโซม เป็นระบบนำส่งที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในทางเครื่องสำอาง และนำส่งสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ และทำให้สารสกัดมีความคงตัว

2.14.1 นิโอโซม (niosomes)

นิโอโซม (niosomes หรือ non-ionic surfactant vesicle) มีลักษณะเป็นถุงกลมขนาดเล็กคล้ายกระเปาะ เก็บกักสารต่างๆ ไว้ภายใน เรียกอนุภาคนิโอโซมว่า เวสซิเคิล (vesicle) มีลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นผนังสองชั้น (bilayer membrane) ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวได้เอง (self assembly) ของโมเลกุลของสารที่มีคุณสมบัติมีขั้ว และไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (amphiphile) เกิดการจัดเรียงตัวโดยนำส่วนที่มีขั้วเข้าหากัน การซ้อนกันเป็นผนังสองชั้นนี้อาจเกิดได้

มากกว่าหนึ่งชั้น จัดอยู่ในรูปแบบ lipid-based formulation ชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับลิโพโซม นีโอโซม สามารถกักเก็บสารได้ทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้ว สารที่มีคุณสมบัติมีขั้ว (polar substance) จะถูกกักเก็บในบริเวณส่วนที่มีขั้ว (polar head group) ส่วนสารที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้ว (non-polar substance) จะถูกกักเก็บไว้บริเวณส่วนไม่มีขั้ว (lipid bilayer)

2.14.2 องค์ประกอบของนีโอโซม

2.14.2.1 สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) นีโอโซมเกิดจากการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่นิยมใช้ ได้แก่ glucosyl dialkyl ethers, crown ethers, Ester linked surfactant, polyoxyethylenealkyl ethers (เช่น Tween®) และ sorbitan esters (เช่น Span®) เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้สามารถจัดเรียงตัวรวมกันได้เอง มีลักษณะทรงกลม จัดเรียงตัวเป็นชั้นเดียวหรือหลายชั้นก็ได้

2.14.2.2 สารเพิ่มความแข็งแรงของผนังนีโอโซม ที่ผิวของอนุภาคหรือผนังอนุภาคจะมีการเสริมความแข็งแรงโดยการใช้คอเลสเตอรอล และสารประเภท"poly (oxyethylene) cholesteryl ether" ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า "Solulan C24®" เป็นต้น มีรายงานพบว่า นีโอโซมที่มีองค์ประกอบของ Solulan C24® ซึ่งเป็นสารที่มีส่วนที่ชอบน้ำขนาดใหญ่ จะสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นานและเพิ่มการสะสมของยาหรือนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น (Uchegbu et al., 1995) คอเลสเตอรอลมีผลยับยั้งการเปลี่ยนสถานะของผนังอนุภาคเนื่องจากหากอุณหภูมิสูง ผนังอนุภาคนีโอโซมจะอยู่ในลักษณะผลึกเหลว (liquid crystal) มากกว่าสถานะเจล ดังนั้นการใช้สารในกลุ่มคอเลสเตอรอลทำให้ผนังอนุภาคยังคงอยู่ในสถานะเจลที่มีการลื่นไหลได้ (Cable, 1989)

2.14.2.3 สารเพิ่มความคงตัว องค์ประกอบที่สำคัญของนีโอโซมประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ และสารเพิ่มความแข็งแรงในผนังนีโอโซมเป็นหลัก อย่างไรก็ตามยังอาจมีสารที่ทำให้เกิดประจุของอนุภาคได้ เพื่อให้ผิวอนุภาคเกิดมีแรงผลักกันทางประจุไฟฟ้าเพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับอนุภาค (electrostatic stabilization) เช่น dicetyl phosphate และ phosphotidic acid ที่มีประจุลบ และ stearylamine และ stearyl pyridinium chloride ที่มีประจุเป็นบวก เป็นต้น โดยทั่วไปนิยมสารเพิ่มประจุความเข้มข้น 2.5-5% (w/w) หากใช้ในปริมาณมากเกินไปอาจจะไปยับยั้งการเกิดนีโอโซมได้ นอกจากนี้ยังมีสารเพิ่มความคงตัวที่เป็นสารพอลิเมอร์ซึ่งเคลือบที่ผิวเพื่อทำให้ผนังของอนุภาคนีโอโซมไม่มารวมตัวกัน (steric stabilization) โดยพบว่าพอลิเมอร์ชนิดที่มีหมู่ poly (oxyethylene) สามารถป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาคได้ ทำให้ระบบนี้มีความคงตัวมากขึ้น (Beugin-Deroo et al., 1998)

2.14.3 การเตรียมนีโอโซม

การเตรียมนีโอโซมมีหลายวิธี โดยทั่วไปแล้วกระบวนการเตรียมนีโอโซมมักใช้พลังงาน

มาเกี่ยวข้อง เช่น ความร้อนและแรงเขย่า เป็นต้น วิธีการเตรียมมีผลต่อลักษณะของนีโอโซม โดยนีโอโซมอาจมีลักษณะเป็นถุงอนุภาคชั้นเดียวหรือหลายชั้นก็ได้ ซึ่งนีโอโซมอาจมีขนาดเล็กได้ถึงระดับนาโนเมตร นอกจากวิธีการเตรียมมีผลต่อจำนวนชั้นของอนุภาค ยังมีผลต่อขนาด การกระจายตัวของขนาดอนุภาค ประสิทธิภาพในการกักเก็บยา และความสามารถในการซึมผ่านเมมเบรนของอนุภาค วิธีการเตรียมนีโอโซมมีหลายวิธี ดังนี้ 1) การเตรียมนีโอโซมโดยการฉีดสารละลายอีเธอร์ (ether injection method) 2) การเตรียมนีโอโซมโดยทำให้เกิดฟิล์มและเขย่าด้วยมือ (hand-shaking method) 3) การเตรียมนีโอโซมโดยการใช้คลื่นเสียง (Sonication method) 4) การเตรียมนีโอโซมโดยการใช้เครื่องไมโครฟลูอิดไดเซอร์ (microfluidizer) 5) การเตรียมนีโอโซมโดยการใช้แรงดันผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาดเล็ก (multiple membrane extrusion method) 6) การเตรียมนีโอโซมโดยวิธีการกลับวัฏภาค (reverse phase evaporation technique: REV) 7) การเตรียมนีโอโซมโดยกักเก็บยาจากความแตกต่างของสภาวะความเป็นกรดด่าง 8) การเตรียมนีโอโซมโดย “The Bubble Method” 9) การเตรียมนีโอโซมจากโปรนีโอโซม (proniosomes) การศึกษานี้ใช้วิธีการเตรียมนีโอโซมแบบ ethanol injection ดัดแปลงมาจากวิธี ether injection เนื่องจากเป็นวิธีการเตรียมที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาน้อยในการเตรียม เครื่องมือที่ใช้ไม่ซับซ้อน ซึ่งสามารถถ่ายทอดให้กับผู้ประกอบการได้ง่าย

2.15 ปัจจัยที่มีผลต่อการตั้งตำรับนีโอโซม

2.15.1 ตัวยาสำคัญ

การกักเก็บตัวยาสำคัญในอนุภาคนีโอโซมจะทำให้ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการจับกันของตัวยากับส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิว การเพิ่มประจุและแรงผลักกันภายในชั้นของสารลดแรงตึงผิว นอกจากนี้ ความชอบน้ำหรือไขมันของตัวยาสำคัญยังมีผลต่อการกักเก็บยาภายในอนุภาคนีโอโซมด้วย

2.15.2 ปริมาณและชนิดของสารลดแรงตึงผิว

การเลือกชนิดสารลดแรงตึงผิวจะคำนึงถึงในแง่ความปลอดภัยและความคงตัวของระบบ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิด ether type surfactants ที่มีหนึ่งสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (alkyl ether chain) จะมีความเป็นพิษมากกว่าชนิดที่มีสองสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (dialkyl ether chain) และพบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิด ester type surfactant (เช่น Span®) จะมีความคงตัวทางเคมีและความเป็นพิษน้อยกว่าชนิด ether type surfactants เนื่องจากหมู่เอสเทอร์ของสารลดแรงตึงผิวชนิด ester type surfactant จะสามารถสลายตัวได้โดยเอนไซม์เอสเทอเรสเกิดเป็นไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันภายในร่างกาย (Hunter et al., 1988) Span® ที่มีค่าความชอบน้ำ ต่อไขมัน (Hydrophilic - lipophilic Balance; HLB) ระหว่าง 4-8 สามารถเกิดเป็นถุงอนุภาคได้

(Yoshioka et al., 1994) แต่สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ระหว่าง 14-17 ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการเตรียมนีโอโซม ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคนีโอโซมจะเพิ่มขึ้นตามความชอบน้ำหรือการเพิ่มขึ้นของค่าความชอบน้ำต่อไขมันของสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากค่าพลังงานอิสระที่ผิวลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความชอบไขมันของสารลดแรงตึงผิว นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความชอบน้ำต่อไขมันมีผลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บยาโดยการลดลงของค่าดังกล่าวจาก 8.6 ไปยัง 1.7 มีผลทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บยาลดน้อยลงตามลำดับ (Shahiwala and Misra, 2002) ส่วนใหญ่สารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้เตรียมนีโอโซมจะมีความยาวของสายโซ่คาร์บอน 12-18 คาร์บอนอะตอม (Nasseri and Florence, 2003; Ozer et al., 1991) มีการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีสายคาร์บอนยาว 18 อะตอม (stearyl chain) จะแสดงความสามารถในการกักเก็บยาได้มากกว่าที่มีสายคาร์บอนยาว 12 อะตอม (lauryl chain) ถุงอนุภาคที่เกิดจาก Span ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีโอกาสเกิดการรั่วน้อยและมีความคงตัวมากขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติค (Bouwstra et al., 1997)

โดยทั่วไปปริมาณของสารลดแรงตึงผิวต่อไขมันมากที่สุดในการเตรียมระบบนำส่งนีโอโซม คือ 10-30 mM เมื่อสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อไขมันมากขึ้นจะส่งผลเพิ่มความสามารถในการกักเก็บยา ซึ่งจะมีผลทำให้ระบบมีความหนืดเพิ่มขึ้นด้วย (Uchegbu and Vyas, 1998) การจัดเรียงตัวเป็นชั้นของอนุภาคนีโอโซมอาจจะอยู่ในสถานะของเหลวหรือเจล ขึ้นกับอุณหภูมิ ชนิดของไขมัน หรือสารลดแรงตึงผิว และองค์ประกอบอื่น เช่น คอเลสเตอรอล เป็นต้น ดังนั้น อุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะ (Tc) ซึ่งเป็นอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะของสารลดแรงตึงผิว จึงมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาด้วย เช่น Span® 60 ที่มีค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะสูงจะช่วยทำให้การกักเก็บสารดีขึ้น

2.16 การประเมินคุณลักษณะของนีโอโซม

2.16.1 ความสามารถในการกักเก็บยา

ทำการแยกสารสกัดที่ไม่ถูกกักเก็บภายในอนุภาคนีโอโซมออกด้วยถุงไดอะไลซิสแล้ววิเคราะห์ปริมาณสารสกัดที่ถูกกักเก็บไว้ภายในอนุภาคนีโอโซม โดยการทำให้อนุภาคนีโอโซมแตกด้วย dimethylsulphoxide หรือ 50% (v/v) *n*-propanol หรือ 0.1% (w/v) Triton® X-100 หรือ 2.5% (w/v) sodium lauryl sulfate (Balasubramaniam et al., 2002) วิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนีโอโซม คำนวณดังสมการที่ 2.1

$$\text{ร้อยละการกักเก็บยา} = \frac{\text{ปริมาณของสารสกัดที่ถูกกักเก็บในนีโอโซม} \times 100}{\text{ปริมาณของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้}} \quad (2.1)$$

ความสามารถในการกักเก็บสารสกัดที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียม โดยพบว่า การเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีการฉีดสารละลายอีเธอร์ จะสามารถกักเก็บยาได้ดีมากกว่าการเตรียมโดยวิธีการทำให้เกิดฟิล์มและเขย่าด้วยมือ นอกจากนี้ ยังพบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บยาจะลดลงเมื่อมีการใช้คอเลสเตอรอลมากขึ้นในนีโอโซมที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิด glycerol surfactant (Baillie et al., 1985)

2.16.2 ขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค

โดยทั่วไปอนุภาคนีโอโซมมีลักษณะเป็นทรงกลม จึงมีการวัดขนาดอนุภาคจากเส้นผ่านศูนย์กลางซึ่งทำได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ เช่น กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM) และกล้องจุลทรรศน์ชนิด freeze fracture electron microscopy เป็นต้น ปัจจุบันมีเครื่องมือที่ใช้แสงเลเซอร์ในการวัดขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค โดยเทคนิคการกระเจิงของแสง (dynamic light scattering) (เช่น เครื่อง Zetasizer ของบริษัท Malvern instrument) และเทคนิคการเลี้ยวเบนของแสง (laser diffraction) (เช่น เครื่อง Mastersizer® ของบริษัท Malvern instrument) เป็นต้น ซึ่งทำให้วัดได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว การวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคสามารถนำมาใช้ในการประเมินความคงตัวของตำรับนีโอโซมได้ โดยอาจเก็บยาเตรียมในสภาวะแช่แข็งที่ -20 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการให้ความร้อนเพื่อทำให้ยาเตรียมเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง (freeze thawing) แล้วทำการวัดขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคเพื่อประเมินความคงตัวของยาเตรียม โดยพิจารณาจากการรวมตัวกันของอนุภาคทำให้ขนาดอนุภาคใหญ่มากขึ้น

2.16.3 ประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (surface charge)

นีโอโซมอาจมีองค์ประกอบเป็นสารอิเล็คโตรไลต์ที่เพิ่มประจุบนผิวอนุภาค ศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (zeta potential) เป็นค่าที่บ่งบอกความคงตัวของนีโอโซมได้ ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.2

$$f = \mu E \pi \eta / \Sigma \qquad (2.2)$$

เมื่อกำหนดให้

f คือ ค่าศักย์ไฟฟ้า (Zeta potential)

μE คือ การเคลื่อนที่อิเล็คโตรโฟริซิส (Electrophoretic mobility)

η คือ ความหนืดของตำรับ

Σ คือ ค่าคงที่ไดอิเลคทริค (dielectric constant)

การลดประจุไฟฟ้าที่ผิวจะเพิ่มอัตราเร็วในการเกิดการจับกลุ่มอย่างหลวมและรวมตัวกันของอนุภาคได้ ปัจจุบันสามารถวัดค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคได้ง่ายและรวดเร็วด้วยการใช้เครื่องมือ เช่น เครื่อง Zetasizer ของบริษัท Malvern เป็นต้น

2.16.4 การศึกษาการปลดปล่อยยาออกจากถุงอนุภาค

การศึกษาการปลดปล่อยยาทำได้โดยการใช้วิธีถุงไดอะไลซิส ที่แช่ด้วยอัตราคงที่ควบคุมอุณหภูมิ และทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยวิธีที่เหมาะสม

2.16.5 การตรวจสอบการจัดเรียงตัวเป็นชั้น

นิโอโซมและจำนวนชั้นที่จัดเรียงตัวเป็นถุงอนุภาค เกิดจากการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว สามารถตรวจสอบได้โดยการตัดแบ่งนิโอโซม (cross section) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โพลาไรท์ (light polarization microscopy) จำนวนชั้นที่จัดเรียงตัวสามารถตรวจสอบได้โดยการใช้เครื่องมือ NMR spectroscopy, small angle X-ray scattering และ electron microscopy เป็นต้น

2.16.6 ความคงตัวและความเป็นพิษของนิโอโซม

นิโอโซมเป็นระบบนำส่งยาที่อยู่ในรูปแบบสารแขวนลอย จึงมักเกิดปัญหาด้านความไม่คงตัวทางกายภาพได้ เช่น การเกาะกลุ่มกันของอนุภาค การรวมตัวกัน และการรั่วของผนังอนุภาค เป็นต้น ปัญหานี้อาจแก้ไขโดยการเติมสารเพิ่มความคงตัว นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ คุณสมบัติของสารที่เก็บกักภายในถุงอนุภาค ปริมาณสารลดแรงตึงผิว และไขมัน รวมทั้งอุณหภูมิ

การศึกษาความคงตัวของนิโอโซม อาจทำโดยการเก็บรักษาตำรับในสภาวะปกติหรือสภาวะเร่งเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วนำมาวิเคราะห์ หาปริมาณสารสำคัญในตำรับ มีการศึกษาความคงตัวของนิโอโซมชนิด Sucrose stearate พบว่า ขนาดอนุภาคนิโอโซมไม่เปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการกักเก็บยาลดลงร้อยละ 10 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน

90 วัน (Abd-Elbary et al., 2008) สารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้เตรียมนีโอโซมอาจก่อพิษต่อร่างกายได้ อย่างไรก็ตามรูปแบบยาเตรียมนี้ไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียง (Azmin et al., 1985) และพบว่าเมื่อทดสอบความเป็นพิษในหนู รูปแบบยาเตรียมนี้ลดพิษหรืออาการข้างเคียงที่เกิดจากตัวยาได้ (Rogerson et al., 1987)

2.17 โครงสร้างของผิวหนัง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกาย (Escobar et al., 2008; Potts et al., 1991; Potts et al., 1992) โดยคิดเป็นน้ำหนักประมาณร้อยละ 16 ของน้ำหนักตัว มีหน้าที่ปกคลุมห่อหุ้มร่างกายทั้งหมด ซึ่งภายในมีปลายประสาทรับความรู้สึกมากมาย เพื่อรับรู้การสัมผัส การกดความเจ็บ และอุณหภูมิร้อนเย็น ผิวหนังมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย ชั้น stratum corneum เป็นชั้นนอกสุดของผิวหนัง ทำหน้าที่ในการควบคุมอัตราการซึมผ่าน ขับเหงื่อและไขมัน ชั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์แบนที่ตายแล้ว เคราติน เซลล์เคราตินที่ตายแล้ว เป็นชั้นที่มีโครงสร้างการจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ และมีความสำคัญมากที่สุดของชั้นหนังกำพร้า ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ประกอบด้วยเซลล์ตายซึ่งมีลักษณะแบนเรียบ ลึกลงไปจะเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตและมีขนาดใหญ่กว่า ยิ่งลึกเซลล์จะยิ่งมีลักษณะกลมและใหญ่มากขึ้น โดยชั้นในสุดจะมีการสร้างเซลล์เติบโตดันขึ้นสู่ชั้นบนเรื่อย ๆ และเมื่อขึ้นสู่ด้านบน เซลล์จะค่อยๆ ปรับตัวเองให้แบนราบลงและขับน้ำออกทำให้เซลล์แห้ง ชั้นหนังพร้าเป็นชั้นที่บางที่สุดของผิวหนัง โดยหนาเฉลี่ยเพียง 0.25 mm และส่วนที่หนาที่สุดจะหนาเพียง 1 mm เท่านั้น คือ ฝ่ามือ ฝ่าเท้า และบางสุดที่เปลือกตา หนังกำพร้ายังเป็นตัวสร้างผม ขน และเล็บ ชั้นหนังกำพร้าสามารถแบ่งออกได้เป็นชั้นย่อย 5 ชั้น ชั้นที่มีความสำคัญและเป็นชั้นที่ต้องการให้ตำรับนีโอโซมซึมผ่าน คือ ชั้น stratum corneum หรือ horny layer เป็นเซลล์ไม่มีสี ไม่มีนิวเคลียส เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว ไม่มีกระบวนการเมตาโบลิซึมเกิดขึ้น มีความชื้นต่ำ เรียก corneal cell หรือ corneocytes ส่วนประกอบใหญ่ คือ เคราติน (keratin) ซึ่งประกอบด้วย insoluble cysteine-rich disulfide crosslinked protein ร้อยละ 65 เป็นโปรตีนที่แปรสภาพมาจากเซลล์ชั้นอื่นที่อยู่ลึกลงไป ไม่ละลายน้ำ ทนต่อสารเคมี จึงทำหน้าที่สำคัญในการป้องกันผิวหนังจากสารพิษ เซลล์เหล่านี้ถูกเชื่อมให้ต่อกันได้ด้วย waxlike substances คล้ายกาวเรียกว่า skin fat ซึ่งได้จากการสลายตัวของเซลล์ในกระบวนการผลัดเปลี่ยนเซลล์ผิว (keratinization) ของเซลล์ชั้นล่าง skin fat นี้ ประกอบด้วยกรดไขมัน (15-25%), ceramides (40-50%), cholesterol (20-25%), cholesterol sulphate (5-10%) (Gray et al., 1982; Long et al., 1985; Wertz et al., 1985)

2.18 โครงสร้างและชนิดของเส้นผม

2.18.1 โครงสร้างของเส้นผม

เส้นผมงอกมาจากเซลล์ที่เรียกว่า เดอร์มัล แปปิลลา (dermal papilla) ซึ่งจะเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ hair follicle และแบ่งตัวสร้างเส้นผม สีผม ความหยิกของผม ฯลฯ หนังศีรษะของคนเรามีต่อมผม ประมาณ 80,000 ถึง 1,200,000 ต่อม พันธุกรรมเป็นตัวกำหนดจำนวนชนิด และสีของเส้นผม หน้าที่หลักของ เส้นผม คือ ป้องกันผิวหนัง หรือศีรษะไม่ให้เสียความร้อนมากเกินไป เส้นผมแต่ละเส้นงอกจากเดอร์มัล แปปิลลา ไปเป็นเซลล์ที่เรียกว่า แมทริกซ์ (matrix) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ผลิตเซลล์ผม เมื่อเซลล์นี้แบ่งตัวมากขึ้น จะดันเซลล์นี้ขึ้นไปข้างบนจนอยู่เหนือผิวหนัง เซลล์ผมที่ถูกผลักขึ้นมาเรื่อย ๆ จะค่อย ๆ ตาย ขณะเดียวกันก็ผลิตสารเคราติน (keratin) พอกพูนขึ้น สารเคราตินนี้จะเรียงตัวเป็นเส้นขนาน แต่ละเส้นของเคราตินจะถูกยึดติดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์บอด์น (disulfide bond) เมื่อสารเคราตินถูกผลักให้สูงขึ้น ๆ จะมีการเรียงตัวแบ่งออกเป็น 3 ชั้นชัดเจนขึ้น ชั้นแกนกลางเรียกว่า เมดุลลา (medulla) ชั้นถัดออกไปเรียกว่า คอร์เท็กซ์ (cortex) ส่วนชั้นผิวนอกสุด เรียกว่า คิวติเคิล (cuticle)

2.18.2 ชนิดของเส้นผม (hair)

2.18.2.1 lanugo hair เป็นผมเส้นเล็ก ๆ ไม่มีสี เช่น ผมชุดแรกเกิดในทารก ช่วงอายุครรภ์ระหว่าง 16 – 20 สัปดาห์ ปกติจะร่วงหลุดไป 4 สัปดาห์ก่อนคลอด

2.18.2.2 vellus hair เป็นขนอ่อนๆ เกิดขึ้นแทน lanugo hair มักไม่มีสี เส้นเล็กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 30 μm ความยาวไม่เกิน 2 cm ไม่มีแกนกลางของผม เช่น ขนบริเวณหัวหน่าว รักแร้ หนวด เครา แขน และขา

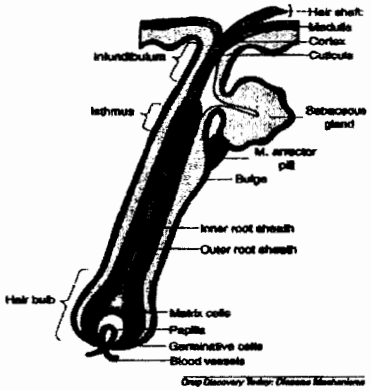
2.18.2.3 terminal hair ขนและผมเส้นใหญ่ หยาบ และยาวกว่า vellus hair มีสีตามเชื้อชาติของแต่ละคน เช่น ผมบริเวณศีรษะ คิ้ว แขน และขา

2.18.3 โครงสร้างของเส้นผม (hair follicle) ดังแสดงในภาพที่ 2.5 เส้นผมประกอบด้วย

2.18.3.1 เส้นผม (hair shaft) ประกอบด้วย medulla อยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วย cortex และ cuticle หุ้มอยู่

2.18.3.2 กระเปราะผม (hair bulb) เป็นส่วนต่ำสุดของต่อมผม โป่งออกเป็นกระเปราะผม มีกลุ่มเซลล์ที่แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว คือ matrix ซึ่งมีหน้าที่สร้างเส้นผมและขน

2.18.3.3 dermal papilla คือ ส่วนของหนังแท้ที่ประกอบด้วยเส้นประสาท และหลอดเลือด ยื่นเข้าไปหล่อเลี้ยงเซลล์ผมบริเวณ hair bulb ซึ่งขนาดของ dermal papilla มีความสัมพันธ์กับขนาดของเส้นผม ถ้า dermal papilla มีขนาดใหญ่ เส้นผมจะมีขนาดใหญ่ด้วย



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของเส้นผม

ที่มา: Alexa et al., 2008

การศึกษาของ Rho et al., (2005) ทดสอบโดยใช้สารสกัด *Asiasari radix* ทาหลังของหนู C57BL/6 พบว่า สามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นผม โดยกระตุ้นจากระยะเทโลเจนให้เข้าสู่ระยะอนาเจนเร็วขึ้น เพิ่มความเข้มของสีและขนาดของเส้นผม การศึกษาของ Park et al., (2011) พบว่า สารสกัด *Fructus panax ginseng* กระตุ้นการเจริญของ hair follicles และกระตุ้นการเจริญของเส้นผมจากระยะเทโลเจนให้เข้าสู่ระยะอนาเจนเร็วขึ้นในหนู C57BL/6 และการศึกษาของ Roy et al., 2006 พบว่า การใช้สารสกัดของ *Cuscuta reflexa* (Roxb.), *Citrullus colocynthis* (Schrad.) และ *Eclipta alba* (Hassk.) ช่วยเพิ่มการเจริญของเส้นผมในระยะอนาเจน เพิ่มความยาวของ hair follicle (>0.5 mm.) และทำให้เส้นผมเจริญอย่างรวดเร็ว

2.19 ช่องทางการซึมผ่านของสารทางผิวหนัง

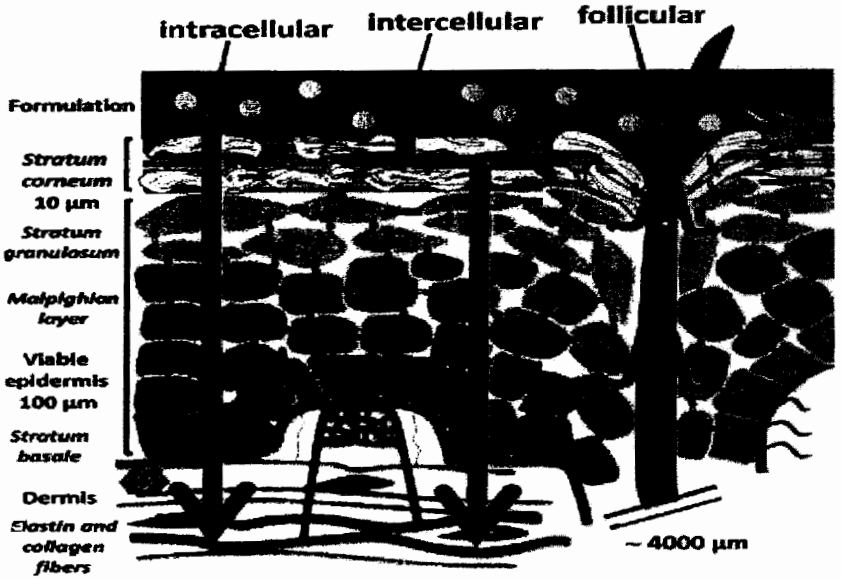
ชั้นผิวหนังประกอบด้วย hair follicle ต่อมเหงื่อ (sweat grand) ซึ่งเป็นช่องทางของสารที่จะกระจายเข้าสู่ชั้นหนังแท้ ยาที่ต้องซึมผ่านชั้นผิวหนังจะถูกจำกัดโดยชั้น stratum corneum โดยช่องทางการซึมผ่านผิวหนังประกอบด้วย 3 ช่องทาง (Bolzinger et al., 2012) ดังแสดงในภาพที่ 2.6 คือ

2.19.1 ผ่านเซลล์ของผิวหนัง (transcellular, transcorneocytes หรือ intracellular route) โดยเซลล์ของ stratum corneum มีเส้นใยโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีทั้งส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารที่จะแพร่ผ่านได้ดีควรจะละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน

2.19.2 ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular route) ซึ่งในระหว่างเซลล์ในชั้น stratum corneum ประกอบด้วยของเหลวที่เป็นไขมัน สารที่จะซึมผ่านได้ดีจะต้องละลายได้บ้างในไขมัน แต่ต้องไม่ละลายในไขมันดีจนเกินไป มิฉะนั้นตัวยาจะถูกจับไว้ในชั้นผิวหนัง ไม่ปล่อยให้ยาผ่าน

ไปยังผิวหนังชั้นถัดไป สารที่ผ่านผิวได้ดีควรจะมีค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งวัตภาค (partition coefficient) ใกล้เคียงกัน

2.19.3 ผ่านทางรูเปิดหรือท่อบนผิวหนัง (trans appendageal) ได้แก่ ต่อมไขมัน รูขุมขน และต่อมเหงื่อ hair follicles เป็นช่องทางที่จะนำยาหรือสารไปยังตำแหน่งออกฤทธิ์ และเป็นช่องทางที่น่าสนใจมากที่สุดในการรักษาโรคทางผิวหนัง และ hair follicles ยังเป็นเป้าหมายการซึมผ่านของของยาหรือสารที่มีอนุภาคขนาดเล็ก (nanoparticles และ microparticles) (Jacobi et al., 2005) เนื่องจาก hair follicles ประกอบด้วยเส้นเลือดขนาดเล็กและมีช่องทางผ่านเข้าต่อมไขมัน ที่จะผ่านเข้าสู่เส้นผม ดังนั้น สารที่ซึมผ่าน hair follicle จะสามารถผ่านเข้าเซลล์เนื้อเยื่อและระบบไหลเวียนเลือด หลีกเลี่ยงการผ่านชั้น stratum corneum เช่น การศึกษาของ Hanna et al., (2010) โดยใช้คาเฟอีนในรูปแบบแชมพู พบว่า หลังจากใช้ทา 5 นาที มีการตรวจพบระดับคาเฟอีนในกระแสเลือด



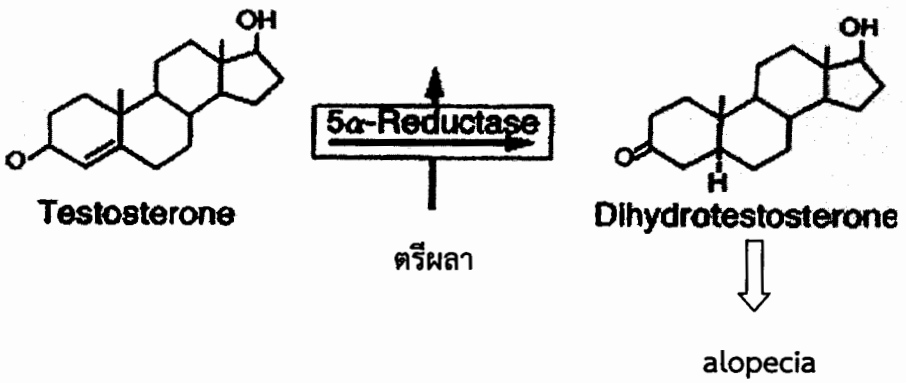
ภาพที่ 2.6 ช่องทางการซึมผ่านของยาทางผิวหนัง

ที่มา: Bolzinger et al., 2012

2.20 การศึกษากลไกการดูดซึมของสารสกัดตรีผลา

มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด สมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม สามารถยับยั้ง 5α-reductase II ได้ (Kumar et al., 2011; Kumar et al., 2012) ดังนั้น นีโอโซมที่กักเก็บตรีผลาน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase II ได้เช่นกัน และอีกกลไกคือ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (antioxidant) และคาดว่าน่าจะนำส่งสารผ่านทางรูขุมขน ซึ่งต้องมีขนาดของอนุภาค

ที่เหมาะสมคือ 100 – 400 nm ซึ่งกลไกที่คาดว่าจะเป็นการออกฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลา ดังแสดงใน ภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กลไกที่คาดว่าจะเป็นการออกฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลา

2.21 การทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง

การระคายเคืองผิวหนังเป็นอาการข้างเคียงหนึ่งที่อาจพบจากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของตัวยาสำคัญ สารช่วยต่าง ๆ ในตำรับ การเกิดการระคายเคืองผิวหนังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของยา ระยะเวลาที่สัมผัส ความถี่ในการสัมผัส ตำแหน่งของผิวหนัง อัตราการซึมผ่าน และความเป็นพิษของสารที่ใช้ (Shisombat et al., 2007)

ระบบนิโอโซม ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ และคอเลสเตอรอล ซึ่งอาจส่งผลต่อการระคายเคืองผิวหนัง และสารสกัดตรีผลา เป็นสารสกัดของผลไม้ 3 ชนิด ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรด อาจเกิดการระคายเคืองผิวหนังได้ ในการทดสอบการระคายเคืองผิวหนังนิยมทำในกระต่ายขาว สายพันธุ์ New Zealand

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลาในการยับยั้งการหลุดร่วงของเส้นผม พัฒนาตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลา ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการงอกของเส้นผมและการระคายเคืองต่อผิวหนังของผลิตภัณฑ์ในสัตว์ทดลอง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา

ผลแห้งของสมอไทย (*T. chebula*) สมอพิเภก (*T. bellirica*) และมะขามป้อม (*P. emblica*) (บริษัท ออร์แกนิค ไวต้า จำกัด จังหวัดเชียงใหม่)

3.1.2 การเตรียมตำรับนีโอโซม

span®20 (Sigma-Aldrich, Inc., USA), dimethylsulphoxide, cholesterol, ethanol absolute (Carlo Erba Reagenti SpA, Italy), 95% ethanol (Italmar Co. Ltd., Thailand)

3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

gallic acid, ellagic acid (ACROS organics, USA), folin-ciocalteu's reagent (Carlo Erba Reagenti SpA, dialysis tubing cellulose (cellu Sep T4® MW cut off 12,000-14,000, Membrane Filatratoin Product, Inc., USA),

3.1.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, Inc., USA), 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) (Wako Pure Chemical Industries, ltd., , Japan), potassium persulfate, vitamin C, vitamin E, methanol, acetic glacial acid glacial (Carlo Erba Reagenti SpA, MI, Italy), gallic acid, ellagic acid (ACROS organics, USA), ferrous sulphate (J.T. Baker Inc, USA), sodium acetate-3-hydrate, sodium acetate 3-hydrate (VWR International Ltd, England)

3.1.5 การวิเคราะห์สารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ด้วยวิธี HPLC

gallic acid, ellagic acid (ACROS organics, USA), acetonitrile (RCI Labscan limited, Thailand), orthophosphoric acid (VWR International Ltd, England)

3.1.6 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase

testosterone, β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduce (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), dithiothreitol, propyl *p*–hydroxybenzoate (ACROS organics, USA), finasteride (S. tong chemicals co., LTD, Thailand), dichloromethane (Carlo Erba Reagenti SpA, MI, Italy)

3.1.7 การศึกษาการปลดปล่อยสารเครื่องหมายจากระบบนำส่งนีโอโซม

dialysis tubing cellulose (cellu Sep T4® MW cut off 12,000-14,000, Membrane Filatratoin Product, Inc., USA), polyethylene glycol 400 (Witthayasom Co. Ltd, Thailand), dipotassium peroxodisulphate, di-potassium hydrogen phosphate anhydrous, sodium chloride, potassium dihydrogenphosphate, Disodium Hydrogenphosphate (Carlo Erba Reagenti SpA, MI, Italy), potassium chloride (VWR International Ltd, England)

3.1.8 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนัง

Franz diffusion cell (Crown glass company, Inc., USA), ผิวหนังบริเวณท้องของลูกสุกรแรกเกิด (คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี)

3.1.9 การทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นการเจริญของเส้นขนในหนูถีบจักร

minoxidil (Regaine®, Johnson & Johnson), zolitil® (Virbac, Thailand), หนูสายพันธุ์ C57BL/6Mlac (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.1.10 การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในกระต่าย

sodium lauryl sulfate (Carlo Erba Reagenti SpA, Milan, Italy) กระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zealand (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดพืช

ในการสกัดพืชใช้วิธีการหมัก ซึ่งดัดแปลงจา Kumar et al., (2011) พืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ ผงแห้งของผล มะขามป้อม สมอไทย และสมอพิเภก นำผงแห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl alcohol 95% โดยวิธีการหมัก (maceration) โดยใช้อัตราส่วนผงแห้ง 1 ส่วน ต่อตัวทำลาย 4 ส่วน จำนวน 3 รอบ ๆ ละ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนที่ได้จากการหมักมากรองด้วยผ้าขาวบาง

และกระดาษกรอง ขนาด 0.22 µm ตามลำดับ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator (BUCHI R205, Switzerland) จนได้สารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิด และทำการเตรียมสารสกัดตรีผลาโดย นำสารสกัดหยาบของผลไม้ทั้ง 3 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 โดยน้ำหนัก บรรจุสารสกัดในขวดสีชา และปิดผนึก และเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอการศึกษาต่อไป

3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม (total phenolic compounds) ทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Onanong et al., 2011) โดยการเตรียมสารละลาย folin-ciocalteu reagent สารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) สารตัวอย่างที่จะทดสอบ เติมสารละลาย folin-ciocalteu reagent ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 เก็บให้พ้นแสง 40 นาที วัดการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Biomate 3, Genesys 10, USA) ที่ความยาวคลื่น 725 nm สร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid และ ellagic acid เพื่อเทียบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สมมูลกับ gallic acid (mg GAE/g sample) และที่สมมูลกับ ellagic acid (mg EAE/g sample)

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารเครื่องหมายในสารสกัด

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญจากพืช เลือกใช้ gallic acid และ ellagic acid เป็นสารเครื่องหมาย (marker) สำหรับควบคุมมาตรฐานสารสกัด วิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) (Thermo Dionex UV/Vis, USA) column: Novapack® C18 (150 nm x 3.9 mm, id 5 µm) วิเคราะห์ด้วยระบบ gradient elution ของ mobile phase; solvent A: acetonitrile, solvent B: 0.1% v/v phosphoric acid in DI อัตราเร็ว (flow rate) 0.8 ml/min และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย gallic acid และ ellagic acid กับพื้นที่ใต้พีก แล้วหาสมการเส้นตรง และหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) จากนั้นนำสารสกัดพืชมาวิเคราะห์ การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ ละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัด จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.22 µm แล้วนำพื้นที่ใต้พีก คำนวณหาปริมาณสารเครื่องหมายจากพื้นที่ใต้พีคที่เป็นสารมาตรฐาน โดยมีระบบ gradient elution ของ mobile phase แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ระบบ gradient elution ของวัตภาคเคลื่อนที่

เวลา (min)	0.1% v/v phosphoric acid in deionized (%)
0	90
5	90
6	70
14	60
22	60
30	90
55	90

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

3.2.4.1 การทดสอบด้วยวิธี ABTS $^{\cdot+}$

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid; ABTS ดัดแปลงวิธีศึกษาโดย Roberta et al., (1999) โดยการเตรียม ABTS reagent 1 ml โดยชั่ง $K_2S_2O_8$ 0.66 mg เติมน้ำกลั่น (deionization water; DI) 1 ml เติมลงใน ABTS 3.60 mg ทิ้งไว้ 12 – 16 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น จนครบ 100 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ 0.7±0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm เตรียมตัวอย่างสารสกัดแต่ละชนิดให้ได้ 20 µl เติมน้ำกลั่น 100 µl เติม ABTS$^{\cdot+}$ reagent 2,000 µl ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Biomate 3, Genesys 10, USA) ที่ความยาวคลื่น 734 nm สร้างกราฟมาตรฐานของวิตามินซี คำนวณหา vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) จากกราฟมาตรฐาน

3.2.4.2 การทดสอบด้วยวิธี DPPH$^{\cdot}$

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\cdot}$ ดัดแปลงวิธีศึกษาโดย Kriengsak et al., (2006) ละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.069 mg/ml เตรียมสารสกัดพืชแต่ละชนิด โดยละลายใน methanol จากนั้นเติม methanol ทิ้งไว้ในที่มืดให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Biomate 3, Genesys 10, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 nm สร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซี แล้วนำค่าที่ได้มาแทนในสมการที่ 3.1

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100 \quad (3.1)$$

เมื่อกำหนดให้

% inhibition คือ ร้อยละการยับยั้ง

Abs control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารเปรียบเทียบ

Abs sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

3.2.4.3 การทดสอบด้วยวิธี FRAP

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดัดแปลงวิธีศึกษาโดย Ronald et al., (2005) โดยการเตรียม FRAP reagent เตรียม acetate buffer pH 3.6 โดยใช้ sodium acetate-3-hydrate 1.5 g ละลายใน glacial acetic acid 8 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml การเตรียม 20 mM ferric chloride โดยใช้ ferric chloride 0.054 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml การเตรียม 10 mM TPTZ (TPTZ 62.4 mg โดยละลายใน 40 mM HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 20 ml ด้วย 40 mM HCl อัตราส่วนในการเตรียม FRAP reagent คือ 10:1:1, acetate buffer: ferric chloride: TPTZ เก็บให้พ้นแสง การเตรียมสารมาตรฐาน ferrous sulfate 5 mM โดยใช้ ferrous sulfate 0.6950 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 ml เตรียมสารสกัดพืชแต่ละชนิด จากนั้นนำมาเติม FRAP reagent, DI และ ferrous sulfate ในอัตราส่วน 10:1:1 ทิ้งไว้ในที่มืด 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Biomate 3, Genesys 10, USA) ที่ความยาวคลื่น 593 nm สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate

3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง 5α-reductase II

เตรียม rat microsomal suspension ตามวิธีที่ได้อธิบายโดย Kumar et al., (2011) โดยตัดตับของหนู Sprague Dawley ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นเติม sucrose 0.32 M และ 1 mM dithiothreitol ใน 0.02 M phosphate buffer pH 6.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 x g, 0 °C 30 นาที 2 รอบ เก็บ supernatants และเก็บไว้ที่ -50 °C การทดสอบการยับยั้ง 5α-reductase โดยเตรียมสารละลาย 3.0 ml ซึ่งประกอบด้วย 0.2 ml ของสารสกัดใน 50% ethanol, 1.0 ml 0.02 mM phosphate buffer pH 6.5, 0.3 ml 500 ppm testosterone ใน 50% ethanol และ 1.0 ml microsomal suspension การเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 0.5 ml 0.77 mg/ml NADPH ใน phosphate buffer ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หยุดการเกิดปฏิกิริยาโดยเติม 5 ml dichloromethane จากนั้นเติม 0.5 ml 100 ppm propyl *p*-hydroxybenzoate

ใน 50% ethanol เตรียมตัวอย่างโดยการเขย่า 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400 x g 10 นาที จากนั้นแยกเอาส่วนตัวทำละลายจำนวน 4 ml ระเหยให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator (BUCHI R205, Switzerland) ละลายส่วนที่เหลือด้วย 5.0 ml methanol จากนั้นวิเคราะห์ด้วย HPLC (Hypersil®-ODS column (Thermo Scientific, USA) 250 x 4.6 mm, i.d. diameter 5 µm) ใช้ testosterone เป็นสารมาตรฐาน วัตภาคเคลื่อนที่คือ 65% methanol อัตราเร็ว 1 ml/min ตรวจวัดด้วยความยาวคลื่นที่ 242 nm ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 °C จากนั้นคำนวณร้อยละการยับยั้ง ดังสมการที่ 3.5

$$\% \text{ inhibition} = [(r_{sample} - r_{rxn})/r_{ctrl} - r_{rxn})]x100 \quad (3.2)$$

เมื่อกำหนดให้

% inhibition	คือ ร้อยละการยับยั้ง
r_{sample}	คือ อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก testosterone/internal standard) ของตัวอย่าง
r_{rxn}	คือ อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก testosterone/internal standard) ของปฏิกิริยาที่เกิดสมบูรณ์ (complete reaction)
r_{ctrl}	คือ อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก testosterone/internal standard) ของปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ (enzyme blank)

ใช้ finasteride เป็นสารมาตรฐาน คำนวณปริมาณสารที่ทำให้ความเข้มข้นของ finasteride ที่ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) จาก testosterone ที่เหลืออยู่ในตัวอย่าง ให้อยู่ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ (mg finasteride/g crude extract)

3.2.6 การเตรียมนิโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีลา

การเตรียมนิโอโซมโดยใช้วิธี ethanol injection โดยดัดแปลงวิธีการเตรียมจาก Maitani et al., (2001) ดังนี้คือ ชั่งคอเลสเตอรอล สารสกัด และสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ละลายด้วยเอทานอล จากนั้นฉีดสารละลายผ่านเข็มเบอร์ 21 ลงในน้ำร้อนปริมาตร 20 ml ที่อุณหภูมิ 60 °C คนที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที จากนั้นปล่อยให้หมุนเป็นเวลา 30 นาที ลดขนาดของนิโอโซม 5 นาที ด้วยเครื่อง probe sonicator (VC 50T, USA)

3.2.7 การประเมินคุณสมบัติของนิโอโซม

3.2.7.1 **การวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคนิโอโซม**

นำนิโอโซม 100 µl เจือจางในน้ำปราศจากไอออน 900 µl **แล้วนำไปวัดขนาดอนุภาคนิโอโซม ค่าการกระจายอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค โดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค** (Malverns/Zetasizer NanoZS, England) **โดยการวัด** 3 **ซ้ำ** (n=3) **การคำนวณหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคได้จากสมการของสโตกและไอสไตน์** (stokes-Einstein) (Washinton, 1992; Finsey, 1994; Allen, 1997) **ดังสมการที่** 3.3

$$d = \frac{kT}{3\pi\rho D} \qquad (3.3)$$

เมื่อกำหนดให้

d **คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคทรงกลม**

D **คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่**

ρ **คือ ค่าความหนืดของสารตัวกลางที่อนุภาคแขวนลอยอยู่**

k **คือ ค่าคงที่ของโบลทซ์มาน** (Boltzmann's constant)

T **คือ ค่าองศาสัมบูรณ์**

3.2.7.2 **การวัดประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค**

นำนิโอโซม 100 µl **เจือจางในน้ำปราศจากไอออน** 900 µl **จากนั้นนำไปวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค โดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค** (Malvern/Zetasizer NanoZS, England) **วัด** 3 **ซ้ำ** (n=3) **จากนั้นคำนวณค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคด้วยสมการของ** Helmholtz Smoluchowski

3.2.7.3 **การวิเคราะห์หาร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืชในนิโอโซม** (% entrapment efficiency; EE)

การวิเคราะห์ร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืชในนิโอโซมใช้วิธี direct method **ซึ่งประกอบด้วย** 2 **ส่วน คือ ส่วนของสารสกัดที่ถูกกักเก็บในนิโอโซม โดยปิเปตนิโอโซม** 1,000 µl **ใส่ในถุงไดอะไลซิส เติม** release media **ทิ้งไว้** 18 **ชั่วโมง จากนั้นปิเปตนิโอโซม** 100 µl **เติม** dimethylsulphoxide 900 µl **เพื่อทำให้นิโอโซมแตก นำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเทียบกับสารมาตรฐาน** gallic acid **และ** ellagic acid **ส่วนที่** 2 **คือ การหาปริมาณของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้ โดยปิเปตนิโอโซม** 100 µl **เติม** dimethylsulphoxide 900 µl **วิเคราะห์ปริมาณ** gallic

acid โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และ ellagic acid คำนวณหาร้อยละการกักเก็บสารสกัดในนีโอโซม จากสมการที่ 3.4 และ 3.5

1) จากการคำนวณ total phenolic content

ร้อยละการกักเก็บสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมที่ถูกกักเก็บในนีโอโซม x100/ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมทั้งหมด (3.4)

2) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

$$\text{ร้อยละการกักเก็บ} = \frac{\text{ปริมาณของสารเครื่องหมายที่ถูกกักเก็บในนีโอโซม} \times 100}{\text{ปริมาณของสารเครื่องหมายทั้งหมด}} \quad (3.5)$$

3.2.8 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับนีโอโซม

ในการพัฒนานีโอโซมเพื่อบรรจุสารสกัดตรีผลา ในช่วงแรกจะเป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมนีโอโซมเบื้องต้น โดยการศึกษาที่ละตัวแปร (one variable at a time) ได้แก่ ชนิดสารลดแรงตึงผิว ปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารสกัด ซึ่งมีผลต่อขนาดอนุภาค การกระจายอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค และร้อยละการกักเก็บสารสกัด จากนั้นนำปัจจัยที่ศึกษาเบื้องต้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว (response surface methadology; RSM) โดยทำการศึกษาปัจจัยที่ละตัวแปร และศึกษาโดยวิธี RSM

3.2.8.1 การศึกษาปัจจัยที่ละตัวแปร

1) ชนิดสารลดแรงตึงผิว

ในการศึกษาจะใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุจำนวน 2 ชนิด คือ Span® 20, Span® 60 โดยใช้ความเข้มข้น 15 mM โดยกำหนดให้ปริมาณคอเลสเตอรอลคงที่เท่ากับ 15 mM และสารสกัดพืช เท่ากับร้อยละ 0.5

2) ปริมาณไขมันทั้งหมด (total lipid content)

ปริมาณไขมันทั้งหมดคือ ปริมาณของสารลดแรงตึงผิว และคอเลสเตอรอล โดยศึกษาปริมาณไขมันทั้งหมดอยู่ช่วง 0.5 – 50 mM ปริมาณสารลดแรงตึงผิว และปริมาณคอเลสเตอรอล แสดงดังตารางที่ 3.2 โดยกำหนดให้สารสกัดคงที่ เท่ากับร้อยละ 0.5

ตารางที่ 3.2 ปริมาณสารลดแรงตึงผิว และปริมาณคอเลสเตอรอล จากการคำนวณปริมาณไขมันทั้งหมด

ปริมาณไขมันทั้งหมด (mM)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว		ปริมาณคอเลสเตอรอล	
	(mM)	(mg)	(mM)	(mg)
0.5	0.25	1.73	0.25	1.93
1.0	0.50	3.46	0.50	3.86
10	5.00	34.60	5.00	38.66
25	12.50	86.50	12.50	96.66
50	25.00	173.00	25.00	193.32

3) ปริมาณคอเลสเตอรอล (cholesterol content)

ปริมาณคอเลสเตอรอลที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืช โดยกำหนดให้ปริมาณสารสกัดคงที่ เท่ากับร้อยละ 0.5 และปริมาณไขมันทั้งหมดเท่ากับ 50 mM ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารลดแรงตึงผิว แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารลดแรงตึงผิว ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืช

ปริมาณคอเลสเตอรอล (%)	ปริมาณสารลดแรงตึงผิว		ปริมาณคอเลสเตอรอล	
	(mM)	(mg)	(mM)	(mg)
0	50	346.0	0	0.00
15	42.5	294.1	7.5	57.99
30	35	242.2	15	115.99
45	27.5	190.3	22.5	173.99
60	20	138.4	30	231.99

4) ปริมาณสารสกัดพืช (plant extract content)

ปริมาณสารสกัดที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัด โดยกำหนดให้ ปริมาณไขมันทั้งหมดคงที่ เท่ากับ 50 mM ปริมาณคอเลสเตอรอล เท่ากับร้อยละ 15 (7.5 mM เท่ากับ 57.99 mg) และสารลดแรงตึงผิว เท่ากับ 42.5 mM (294.1 mg) ปริมาณสารสกัดที่ศึกษา แสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ปริมาณสารสกัดที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืช

ปริมาณสารสกัดตรีผลา	
(%)	(mg)
0.01	2
0.10	20
0.25	50
0.50	100
1.00	200

3.2.8.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว

เมื่อได้ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับนีโอโซมแล้ว นำปัจจัยตัวแปรต้นที่ศึกษา คือ ปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารสกัด มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนีโอโซม โดยกำหนดปัจจัยตัวแปรตามที่ต้องการคือ 1) ร้อยละการกักเก็บสารสกัดในนีโอโซม (% entrapment efficiency) 2) ขนาดอนุภาคของนีโอโซม (size) ด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว โดยใช้โปรแกรม Design-Expert ® version 7 (Stat – Ease, USA)

3.2.9 การศึกษาการปลดปล่อยสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม

นำนีโอโซมที่กักเก็บสารสกัด ปริมาตร 1 ml บรรจุลงในถุงไดอะไลซีส (Cellu Sep T4® MW cut off 12,000-14,000, Membrane Filtration Product, Inc., USA) ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายตัวกลาง (release medium) คือ 30% polyethylene glycol 400 ใน phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 50 ml เขย่าด้วย incubators shaker ที่อุณหภูมิ 32 °C อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 ml ที่เวลา 15 นาที 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เติม 30% polyethylene glycol 400 ใน phosphate buffer pH 7.4 1 ml ทุกครั้ง แล้วนำสารละลายไปกรอง และวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ด้วยเครื่อง HPLC (n=4)

3.2.10 การศึกษาการซึมผ่านผิวของ gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม

3.2.10.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านผิวหนังใส่สารสกัดตรีผลาที่ละลายด้วย 30% polyethylene glycol 400 ใน

phosphate buffer pH 7.4 และสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมลงใน donor chamber และปิด donor chamber ด้วยหนังสุกรแรกเกิด จากนั้นนำไปทดสอบด้วยเครื่อง Franz diffusion cells (Crown glass company, Inc., USA) (Aranya et al., 2012) โดยใช้ 30% polyethylene glycol 400 ใน phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 14 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เก็บตัวอย่างปริมาตร 300 µl ที่เวลา 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เติม 30% polyethylene glycol 400 ใน phosphate buffer pH 7.4 300 µl ทุกครั้ง แล้วนำสารละลายกรองและวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ด้วยเครื่อง HPLC (n=3)

3.2.10.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum

ล้างหนังหมูด้านบนผิวด้วย phosphate buffer pH 7.4 จำนวน 5 ครั้ง จากนั้น ทำ tape striping ด้วยเทปใส (3M #600 ขนาด 3/4", 1" x 36 หลา, 3M, ประเทศไทย) ขนาด 2x2 cm จำนวน 20 ครั้ง โดยครั้งแรกที่ strip ให้ทิ้งไป จากนั้นนำไปสกัดด้วย 30% polyethylene glycol 400 ใน phosphate buffer pH 7.4 วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC

3.2.10.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น epidermis และ dermis

ตัดหนังหมูให้มีขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มพื้นที่การละลาย จากนั้นนำไปสกัดใน 30% polyethylene glycol 400 ใน phosphate buffer pH 7.4 และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC

3.2.11 ทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซม

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตำรับนีโอโซม โดยนำตำรับที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C จากนั้นวัดคุณสมบัติทางกายภาพของสูตรตำรับนีโอโซม ได้แก่ การวัดขนาดอนุภาค การกระจายอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค และร้อยละการกักเก็บสารสกัด ในวันที่ 1, 7, 15, 30, 60 และที่ 90 วัน

3.2.12 ทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในหนูถีบจักร

3.2.12.1 ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเส้นขนจากภาพถ่าย (Photographic evaluation)

โดยโปรโตคอลได้รับการรับรองจากคณะกรรมการสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี หนูที่ใช้ในการศึกษาคือ หนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เพศผู้ อายุประมาณ 6 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว เลี้ยงในอุณหภูมิ 23 ± 2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 35–60 ระยะเวลาที่สัมผัสแสงคือ มีแสงสว่าง 12 ชั่วโมง และไม่มีแสง 12 ชั่วโมง แบ่งหนูเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ดังนี้ คือ

กลุ่มที่ 1 negative control : blank niosomes

กลุ่มที่ 2 positive control : 2% minoxidil solution

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดสอบ 1% triphala in propylene glycol, ethanol, DI

กลุ่มที่ 4 กลุ่มทดสอบ 1% triphala niosomes

กลุ่มที่ 5 กลุ่มทดสอบ 2.5 % triphala niosomes

กลุ่มที่ 6 กลุ่มทดสอบ 5 % triphala niosomes

สลบหนูถีบจักร จำนวน 30 ตัว ก่อนด้วย Zoletil®100 (tiletamina 250 mg และ Zolazepam 250 mg) ขนาดที่ใช้ 50-75 mg/kg และโกนขนบริเวณ หลังให้มีพื้นที่กว้างขนาด 2 cm ยาว 4 cm ทาสารทดสอบลงบริเวณหลังหนูประมาณ 0.1 ml โดยใช้ swaps ช่วยในการทาให้ทั่วบริเวณที่ทดสอบ โดยหนูในกลุ่มควบคุมจะแบ่งพื้นที่เป็น ซ้ายและขวา โดยข้างซ้ายไม่ทาสารใด ส่วนข้างขวาทา blank niosomes สำหรับกลุ่มทดสอบจะทาเต็มพื้นที่ทดสอบ จากนั้นสังเกตความเข้มของสีขนที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 ให้ระดับสเกลการเจริญของเส้นขนตามเกณฑ์การเจริญของเส้นขน (Naphatsorn et al., 2012) โดยนำภาพถ่ายมาเปรียบเทียบกับสเกลที่กำหนดเพื่อคำนวณหาร้อยละพื้นที่การงอกของเส้นขนในสัตว์ทดลองและหาค่าเฉลี่ย (n=5)

3.2.12.2 ศึกษาการเจริญของเส้นผมจากเนื้อเยื่อสัตว์ทดลอง (Histological evaluation)

เมื่อเสร็จสิ้นการศึกษาในหัวข้อ 3.2.12.1 ทำการการุณยฆาตด้วยการรมอีเทอร์ และตัดผิวหนังของหนูให้มีขนาดความหนา 5 cm จากนั้นจึงแช่ใน 10% neutral formalin แล้วตรึงด้วย paraffin wax ตัดขนาดให้ได้ 5 μm และย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อของผิวหนัง (Soojin et al., 2011)

เกณฑ์การประเมินผลใช้วิธีการให้คะแนนตามการงอกของเส้นขน โดยจะพิจารณาจากขนที่งอกขึ้นมา แสดงดังตารางที่ 3.5 ดังนี้

ตารางที่ 3.5 เกณฑ์การให้คะแนนการงอกของเส้นขน (hair growth score) ของหนูถีบจักรสายพันธุ์ C57BL/6Mlac

คะแนน	การงอกของเส้นขนเมื่อเทียบกับพื้นที่ที่ทดสอบ
0	ไม่พบการงอกของเส้นขน
1	เส้นขนงอกน้อยกว่าร้อยละ 20
2	เส้นขนงอกมากกว่าร้อยละ 20 แต่น้อยกว่าร้อยละ 40
3	เส้นขนงอกมากกว่าร้อยละ 40 แต่น้อยกว่าร้อยละ 60
4	เส้นขนงอกมากกว่าร้อยละ 60 แต่น้อยกว่าร้อยละ 80
5	เส้นขนงอกมากกว่าร้อยละ 80

ที่มา: Naphatsorn et al., 2012

3.2.13 ทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation) ในกระต่ายขาว

โดยโปรโตคอลได้รับการรับรองจากคณะกรรมการสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในกระต่ายด้วยเทคนิค closed patch test (Schmitt et al., 2008) นำกระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zealand จำนวน 3 ตัว เพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว โกนขนบริเวณหลังของกระต่ายให้มีขนาดประมาณ 6 cm^2 ทำการตัดผ้าทำแผลให้ได้ขนาด 1 x 1 cm กำหนดให้กระต่าย 1 ตัว ทาตำรับทั้งหมด 6 กลุ่มทดลอง คือ

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุมผลลบ (negative control: gauze pad)

กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มควบคุมผลลบ (negative control: blank niosomes)

กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มควบคุมผลบวก (positive control: 5% sodium lauryl sulphate)

กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มทดสอบ 1% triphala niosomes

กลุ่มที่ 5 คือ กลุ่มทดสอบ 2.5% triphala niosomes

กลุ่มที่ 6 คือ กลุ่มทดสอบ 5% triphala niosomes

นำตำรับทั้ง 6 กลุ่ม ปริมาณกลุ่มละ 0.1 ml ทาลงบนหลังกระต่าย ปิดทับด้วย guaze pad ที่เตรียมไว้แล้วปิดด้วยแผ่นพลาสติกที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิว นำกระต่ายกลับเข้ากรงเหมือนเดิมทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง ล้างบริเวณผิวกระต่ายด้วยน้ำสะอาด ประเมินอาการแดง (erythema) และอาการบวม (edema) ด้วยการสังเกต (visual scoring) ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และให้คะแนนตามเกณฑ์ในการประเมินการระคายเคืองผิว แสดงดังตารางที่ 3.6 แล้วนำผล

การทดสอบที่ได้ไปคำนวณ ตามสมการที่ 3.6 เพื่อประเมินการระคายเคืองผิวตามเกณฑ์ primary irritation index แสดงดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.6 เกณฑ์ในการประเมินการระคายเคืองผิว

ระดับการระคายเคืองผิว	สเกล
ไม่เกิดการระคายเคืองผิวหนัง	0
อาจจะเกิดการระคายเคืองผิวหนัง	±1/2
มีอาการแดงและบวมเล็กน้อย	1
มีอาการแดงชัดเจนและอาการบวมเล็กน้อย	2
มีอาการแดงระดับปานกลางถึงรุนแรงและอาการบวมปานกลาง ขนาดประมาณ 1 mm	3
มีอาการแดงรุนแรงและมีอาการบวมมากกว่า 1 mm	4

ที่มา: Kirwin C.J., 1984

ตารางที่ 3.7 ดัชนีการระคายเคืองผิว (primary irritation index)

ระดับการระคายเคืองผิว	primary irritation index
ไม่เกิดการระคายเคือง	0.0 – 0.4
เกิดการระคายเคืองเล็กน้อย	0.5 – 1.9
เกิดการระคายเคืองปานกลาง	2.0 – 4.9
เกิดการระคายเคืองรุนแรง	5.0 – 8.0

ที่มา: Kirwin C.J., 1984

$$\text{Primary Dermal Irritation Index (PDII)} = \frac{\text{PDI for 1, 24, 48 and 72 hour}}{4} \qquad (3.6)$$

เมื่อกำหนดให้

Primary Dermal Irritation Index (PDII) คือ ระดับการระคายเคืองผิว

PDI คือ ระดับการระคายเคืองผิวที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3.2.14 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลจากการทดลองที่ได้จะแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ ได้แก่ การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเครื่องหมายในสารสกัด การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับ การวัดขนาดอนุภาคนีโอโซม ประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค การวิเคราะห์หาร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืชในนีโอโซมจากการคำนวณ total phenolic content การวิเคราะห์หาร้อยละการกักเก็บสารเครื่องหมายในนีโอโซมจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม การทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation) ในกระต่าย และการทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซม

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนีโอโซม โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วย ANOVA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design – Expert version 7.0 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่แสดงความแตกต่างที่ $p < 0.05$ ทดสอบความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) และวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของสมการทางคณิตศาสตร์ที่คำนวณได้โดยใช้วิธี Student – Fisher's test

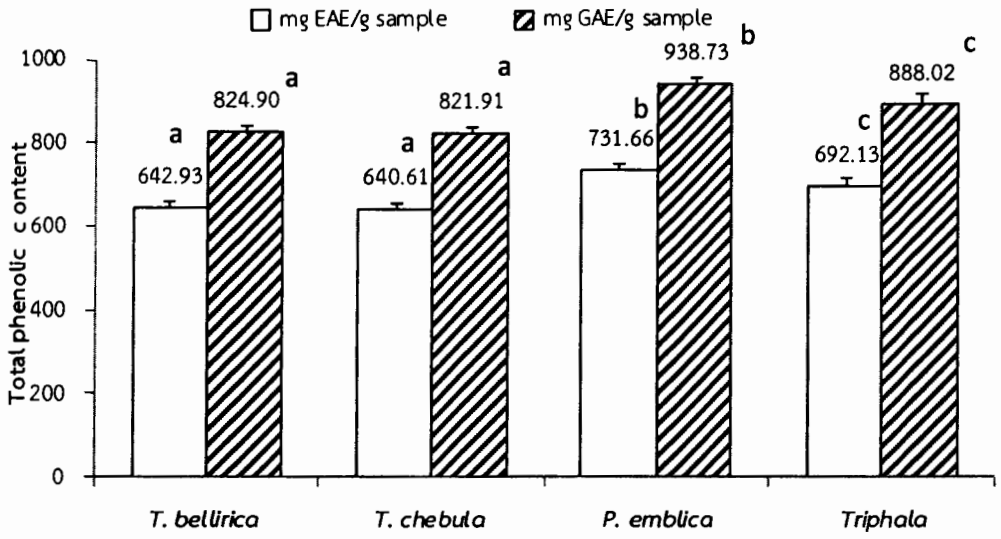
การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกของเส้นขนในหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac แสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนจากส่วนกลาง (standard error of measurement; S.E.M)

การศึกษาเนื้อเยื่อผิวหนังของหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac โดยวิเคราะห์ด้วย Dunn's Multiple Comparison Test วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Kruskal-Wallis โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่แสดงความแตกต่างที่ $p < 0.05$

บทที่ 4
ผลการศึกษา และการอภิปรายผล

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic content)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ ต้านการเกิดมะเร็ง ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารที่พบมากที่สุดในสารสกัดตรีผลา (Singh et al., 2008) การศึกษาในครั้งนี้จึงได้วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด และในสารสกัดรวม 3 ชนิด ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยน้ำหนัก ที่เรียกว่าสารสกัดตรีผลา วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu สร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid และ ellagic acid เพื่อเทียบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สมมูลกับ gallic acid mg GAE/gsample และที่สมมูลกับ ellagic acid mg EAE/g sample ผลการวิเคราะห์ แสดงดังภาพที่ 4.1



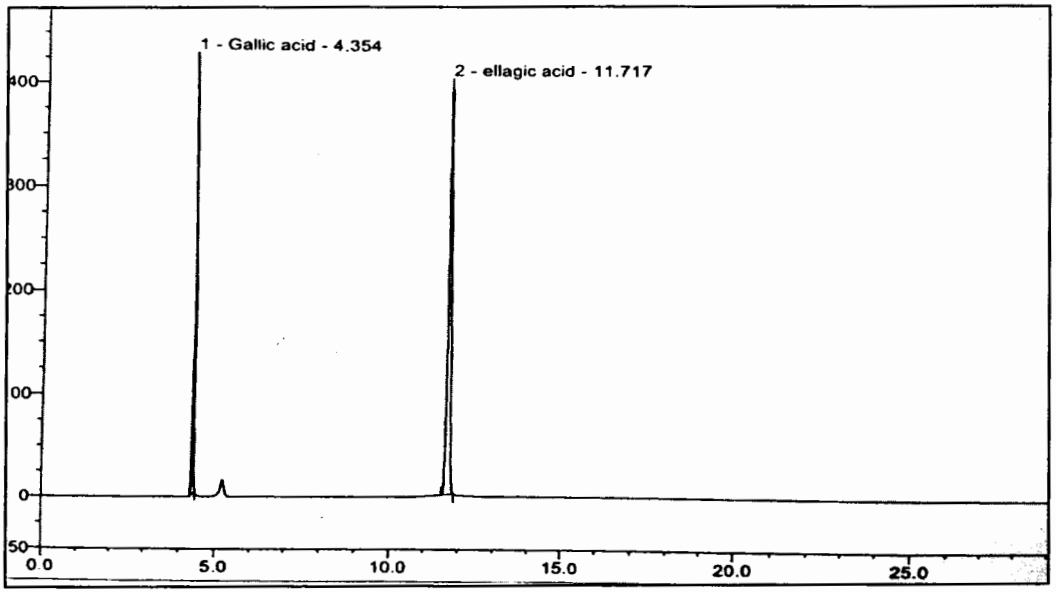
ภาพที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัด *T. bellirica, T. chebula, P. emblica* และ triphala, *p<0.05, [a]p<0.01, [b]p<0.001, [c]NS not significant

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด *T. bellirica*, *T. chebula* และ *P. emblica* มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 640±11.69, 642.93±15.23, 731.66±13.72 mg EAE/g sample และ 821.91±15.00, 824.90±19.55, 938.73±17.60 mg GAE/g sample โดย *P.emblica* มีปริมาณฟีนอลิกแตกต่างจาก *T. bellirica*, *T. chebula* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) แต่ไม่แตกต่างจากสารสกัดตรีผลา ($p>0.073$) ซึ่งในสารสกัดตรีผลามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณใกล้เคียงกับสารสกัดเดี่ยว คือ 692.13±23 mg EAE/g sample และ 888.02±29.52 mg GAE/g sample ตามลำดับ

สารสกัดมะขามป้อมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาที่รายงานโดย Kumar et al., (2011) พบว่า สมอพิเภก และสมอไทย มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 370.85±26.80 และ 286.04±3.37 mg GAE/g sample ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งที่มาของสมุนไพรและวิธีการสกัดสารแตกต่างกัน ทำให้ปริมาณสารที่วิเคราะห์แตกต่างกัน

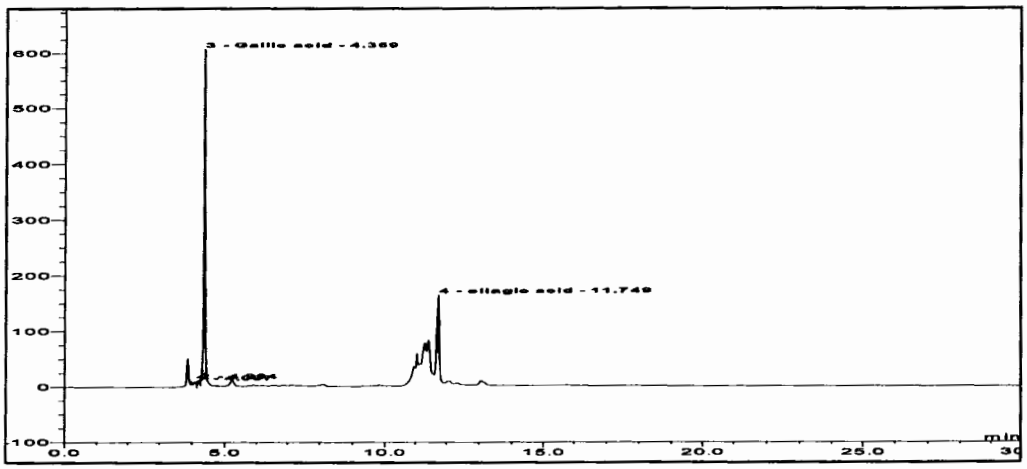
4.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเครื่องหมาย (marker) ในสารสกัด

การนำสารสกัดตรีผลามาเตรียมตำรับ จำเป็นต้องควบคุมคุณภาพของสารเครื่องหมาย ซึ่งมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือก gallic acid และ ellagic acid เป็นสารเครื่องหมาย และตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยวิเคราะห์ด้วยระบบ gradient elution สร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น gallic acid และ ellagic acid กับพื้นที่ใต้พีก สมการเส้นตรง และหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ผลการศึกษาลายพิมพ์โครมาโทกราฟีของสารมาตรฐาน gallic acid และ ellagic acid, *T. chebula*, *T. bellirica*, *P. emblica* และ Triphala extract แสดงดังภาพที่ 4.2 – 4.4 และผลการศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic cid ที่พบในสารสกัดแต่ละชนิด แสดงดังภาพที่ 4.5

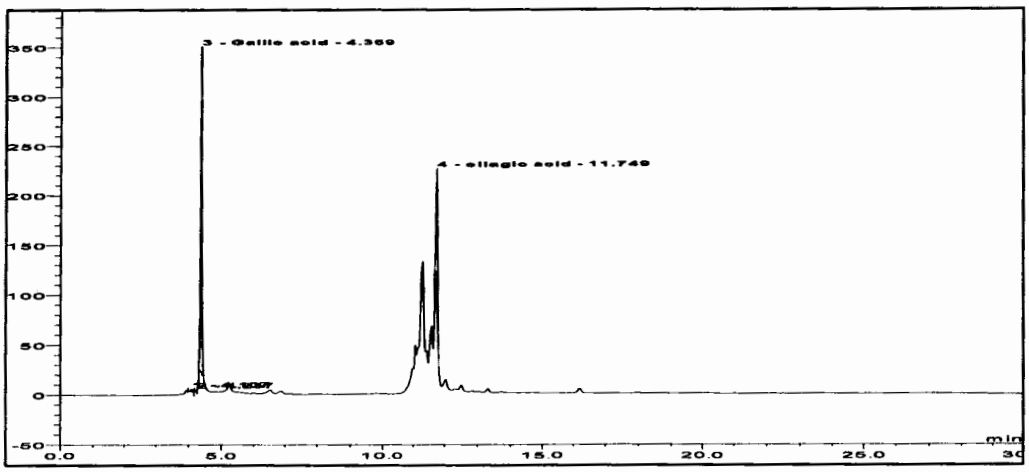


ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน gallic acid และ ellagic acid

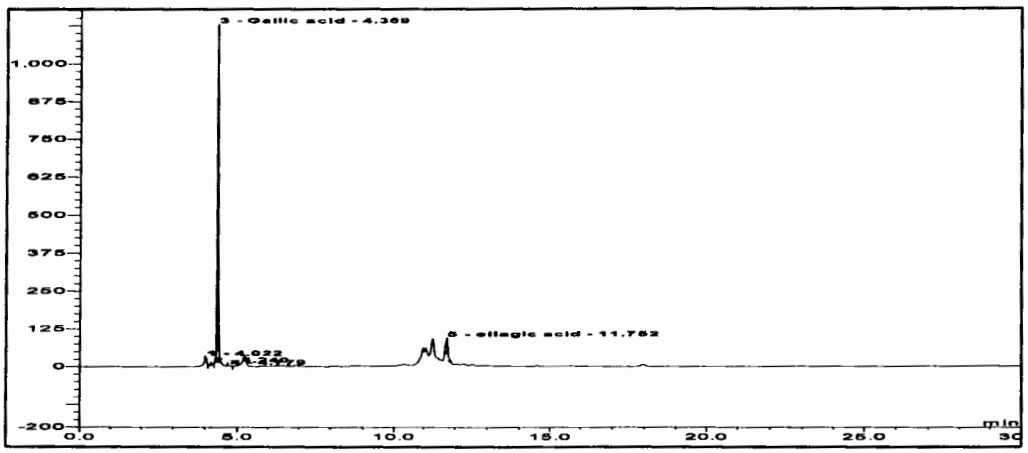
A.



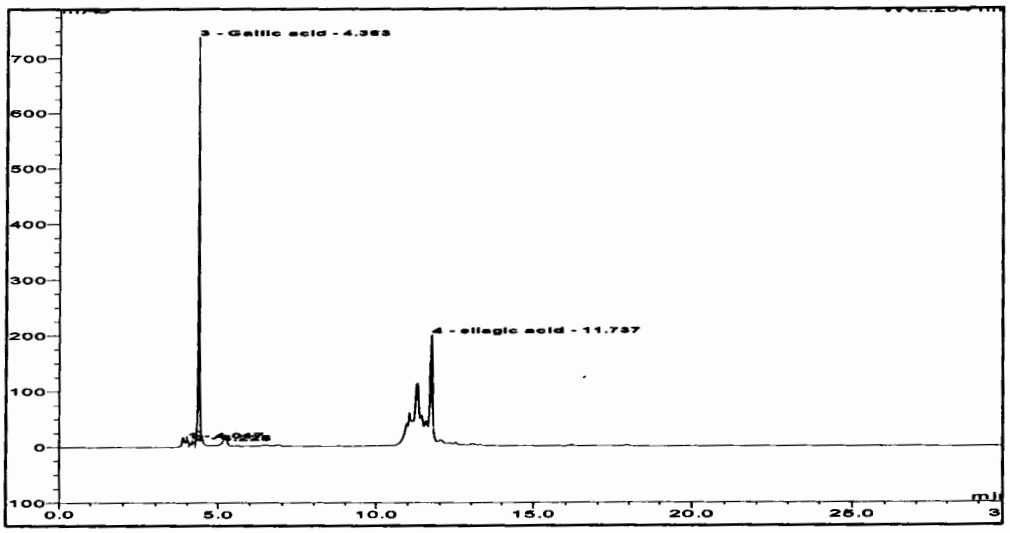
B.



C.

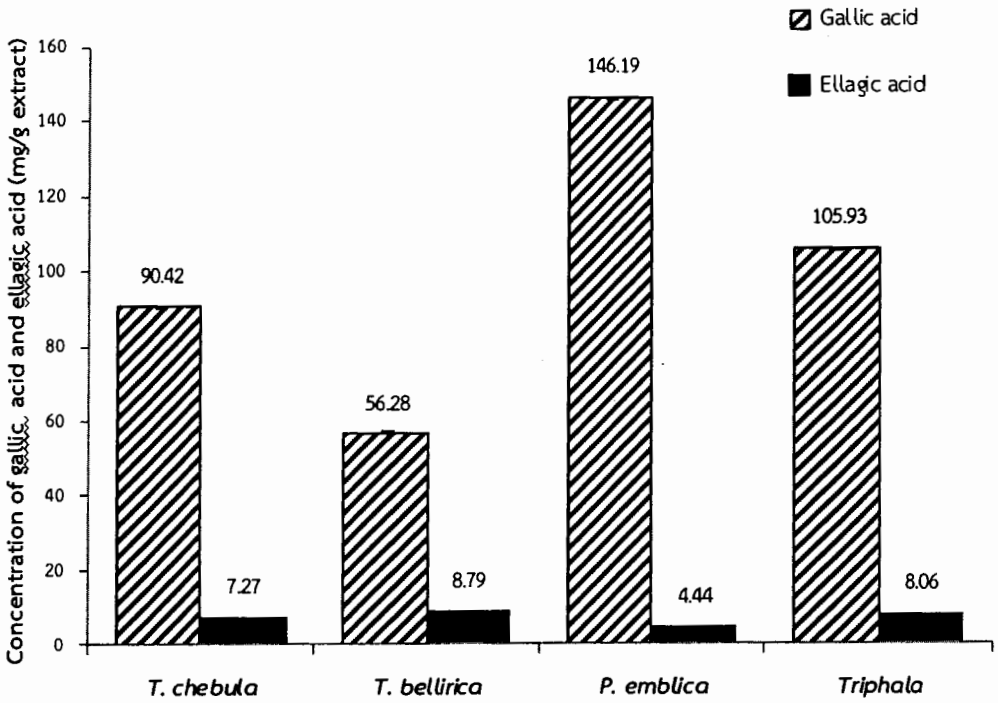


ภาพที่ 4.3 โครมาโทแกรม (A) *T. chebula*, (B) *T. bellirica*, (C) *P. emblica*



ภาพที่ 4.4 โครมาโทแกรมสารสกัดตรีผลา

ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน gallic acid และ ellagic acid โดยใช้ gallic acid และ ellagic acid ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.045 – 1.56 และ 0.002 - 2 µg/ml ค่าสมการเชิงเส้นตรง เท่ากับ y=0.5044x + 0.157 และ y = 3.6417x + 0.0687 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9982 และ 0.9985 มีค่า retention time ของ gallic acid และ ellagic acid เท่ากับ 4.4 และ 11.7 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 ปริมาณ gallic acid และ ellagic cid ที่พบในสารสกัดแต่ละชนิด

โครมาโทกราฟีของสาร gallic acid และ ellagic acid ที่เป็นสารมาตรฐาน และที่พบในสารสกัด *T. bellirica, T. chebula, P. emblica* และสารสกัด triphala มี retention time เท่ากับ 4.3 และ 11.7 ตามลำดับ ปริมาณสารเครื่องหมายที่พบในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่า *T. bellirica, T. chebula, P. emblica* มีปริมาณสาร gallic acid และ ellagic acid เท่ากับ 56.28±1.07, 90.42±0.77, 146.19±0.24 และ 8.79±0.01, 7.27±0.00, 4.44±0.01 mg/g extract ตามลำดับ และในสารสกัด triphala มีปริมาณ gallic acid และ ellagic acid เท่ากับ 105.93±0.39 และ 8.06±0.03 mg/g extract ตามลำดับ

ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิด และสารสกัดตรีผลา มีปริมาณ gallic acid ตั้งแต่ 56.28 – 146.19 mg/g extract และ ellagic acid 4.44 – 8.06 mg/g extract ซึ่งมีปริมาณ gallic acid สูงกว่าปริมาณ ellagic acid สอดคล้องกับการศึกษาของ Mahdi et al., (2009) ที่พบว่าปริมาณ gallic acid ในผลไม้ 3 ชนิด *P. emblica* มีปริมาณ gallic acid มากที่สุด (ร้อยละ 1.79 - 2.1) รองลงมา คือ *T. bellirica* (ร้อยละ 0.79-1.01) และ *T. chebula* (ร้อยละ 0.28-0.80) ตามลำดับ

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งของการเกิดผมร่วง เกิดจากการมีอายุมากขึ้น ซึ่งจะทำให้ระบบการทำงานเซลล์ต่าง ๆ ทำงานได้ลดลง สาเหตุหนึ่งเกิดจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย และจากการศึกษา พบว่า สารสกัดทั้งสมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม ประกอบด้วย gallic acid และ ellagic acid ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (antioxidation) และคาดว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทั้ง 2 ชนิดที่พบในสารสกัดตรีผลาอาจช่วยกระตุ้นการเจริญของเส้นผม โดยช่วยชะลอการแก่ของเซลล์ (Nadkarni, 1976) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้ทำการศึกษา 3 วิธี คือ $ABTS^{\cdot+}$, $DPPH^{\cdot}$ และ FRAP ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด และในสารสกัดตรีผลา โดยเปรียบเทียบกับสารเครื่องหมาย 2 ชนิด คือ gallic acid และ ellagic acid แสดงดังตารางที่ 4.1

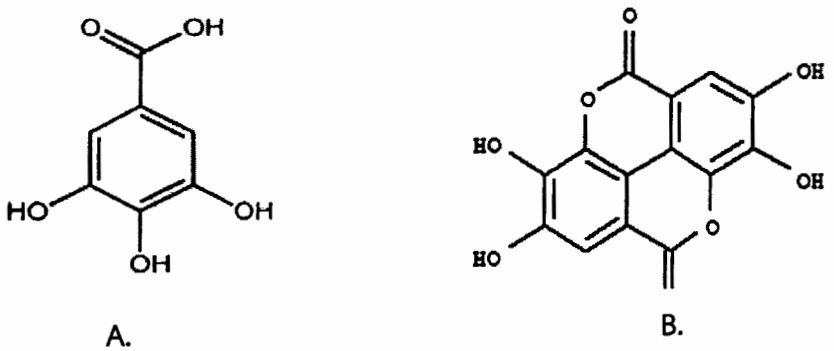
ตารางที่ 4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

Antioxidant	$ABTS^{\cdot+}$	$DPPH^{\cdot}$	FRAP
	(mg vitC/g sample)	(mg vit C/g sample)	(μmol Fe^{2+}/g sample)
Gallic acid	2,123.50±21.02	2,393.95±66.30	163.75±6.17
Ellagic acid	1,758.32±71.66	3,166.65±84.94	161.07±1.65
T. chebula	264.09±7.54	370.00±5.02	37.17±0.62
T. bellirica	287.50±3.68	406.09±10.23	54.54±1.30
P. emblica	410.53±8.15	642.67±3.58	66.13±2.44
Triphala	318.06±3.59	484.27±12.98	56.11±0.41

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ทดสอบ 3 วิธี โดยสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่า *T. chebula*, *T. bellirica* และ *P. emblica* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น ตามลำดับ ส่วนในสารสกัดตรีผลา พบว่ามีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัดเดี่ยวแต่ละชนิด

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก ขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ จำนวน hydroxyl group ในโมเลกุล ระดับการเชื่อมของ galloyl units และจำนวนการหมุนของกลุ่ม galloyl อิสระ (Hatano et al., 1990; Pulido et al., 2000) จากผลการศึกษา พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิด และสารสกัดตรีผลามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากสารสกัดแต่ละชนิดประกอบด้วย gallic acid และ ellagic

acid ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลิก เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้ง gallic acid และ ellagic acid มีจำนวน hydroxyl group แสดงดังภาพที่ 4.6 ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง gallic acid และ ellagic acid เกิดจากที่ hydroxyl group ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอน และให้อิเล็คตรอนกับอนุมูลอิสระ (Sepulveda et al., 2011) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด และในสารสกัดตรีผลา ดังนั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตรีผลา น่าจะเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่ช่วยในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม



A. B.

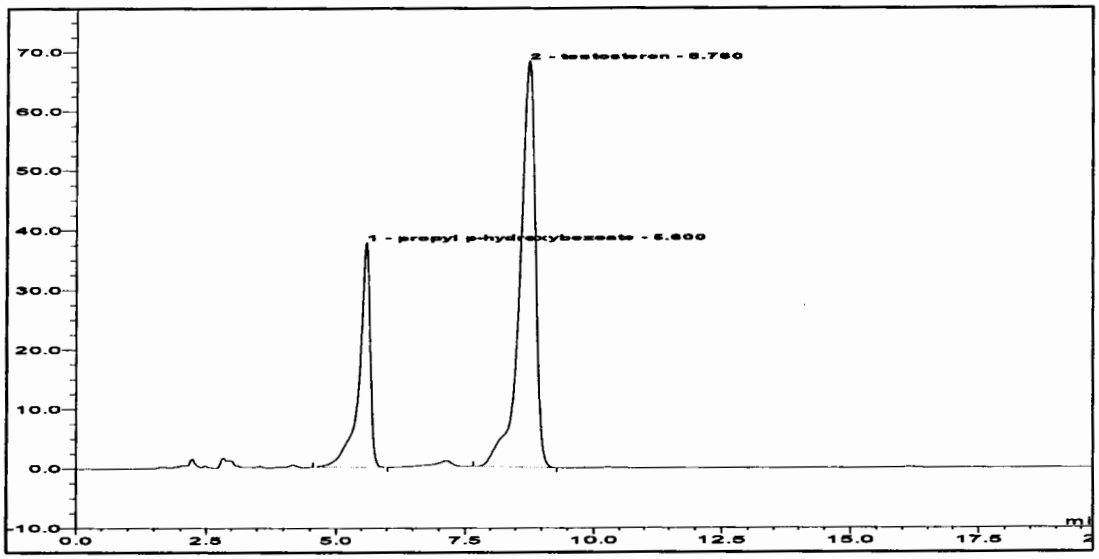
ภาพที่ 4.6 สูตรโครงสร้าง (A) gallic acid และ (B) ellagic acid
ที่มา: Salcedo et al., 1838

4.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase

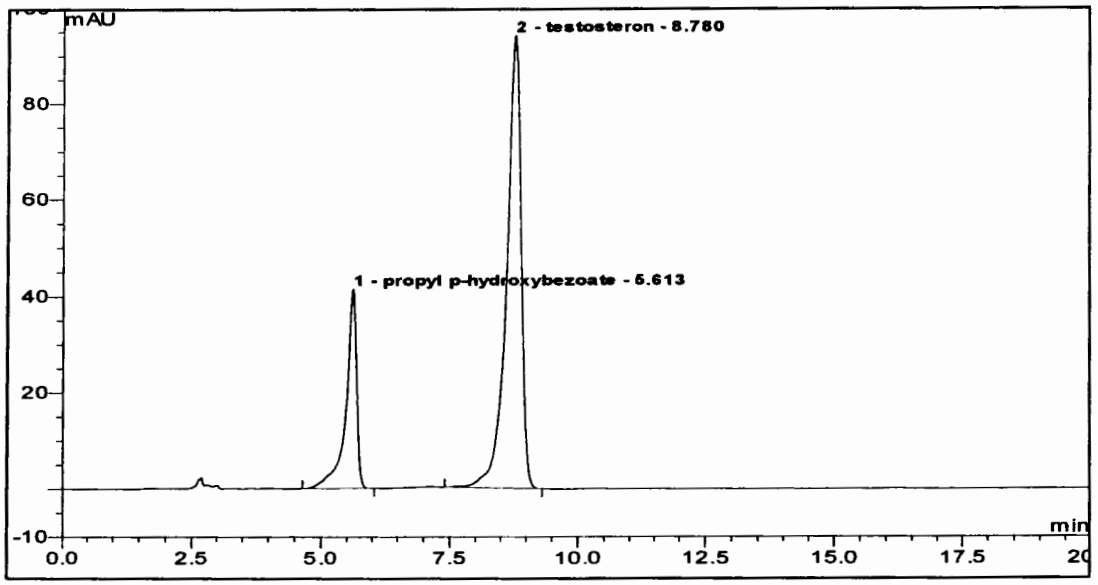
การเกิดผมร่วงมีหลายประการ ที่มีการศึกษากันมาก คือ เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยน testosterone ให้เป็น dihydrotestosterone และ DHT เป็น androgen ที่มีฤทธิ์แรง เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผมร่วง โดยทำให้ hair follicle มีขนาดเล็ก ทำให้เส้นผมที่เจริญขึ้นมาใหม่ ไม่แข็งแรง และในที่สุดจะทำให้เส้นผมร่วงได้ หากมีสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวนี้ จะทำให้ dihydrotestosterone ลดลง ช่วยลดการหลุดร่วงของเส้นผม การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase เป็นการศึกษาแบบ *in vitro* ของ Matsuda et al., (2001) โดยมีหลักการคือ นำสารสกัดมาทำปฏิกิริยากับ testosterone และเอนไซม์ 5α-reductase (rat microsomal suspension) ได้จากการสกัดตับของหนู Sprage-Dawley วิเคราะห์ปริมาณ testosterone ด้วยเทคนิค HPLC คำนวณปริมาณการยับยั้ง (% inhibition) จากอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีก testosterone ต่อ internal standard จากนั้นคำนวณความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase จากกราฟมาตรฐาน finasterone โดยรายงานผลในรูปแบบ finasteride equivalent anti-5α-reductase activity;

FEA (mg finasteride/g sample) ผลการศึกษาลายพิมพ์โครมาโทกราฟี complete reaction control, enzyme blank, finasteride, *T. chebula*, *T. bellirica*, *P. emblica* และ Triphala extract แสดงดังภาพที่ 4.7 - 4.10 และฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase แสดงดังภาพที่ 4.11

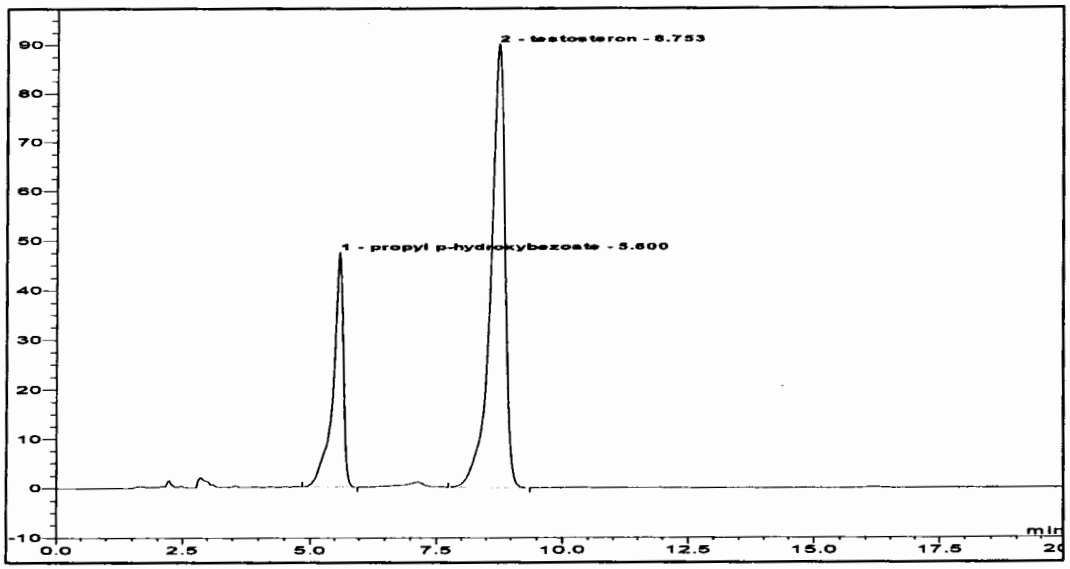
A.



B.

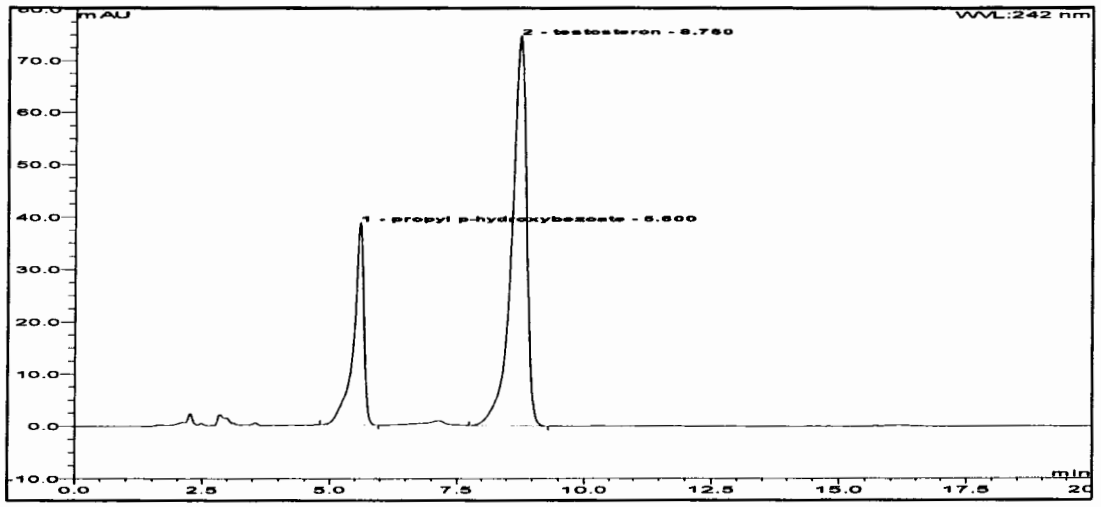


ภาพที่ 4.7 โครมาโทแกรม (A) complete reaction control และ (B) enzyme blank

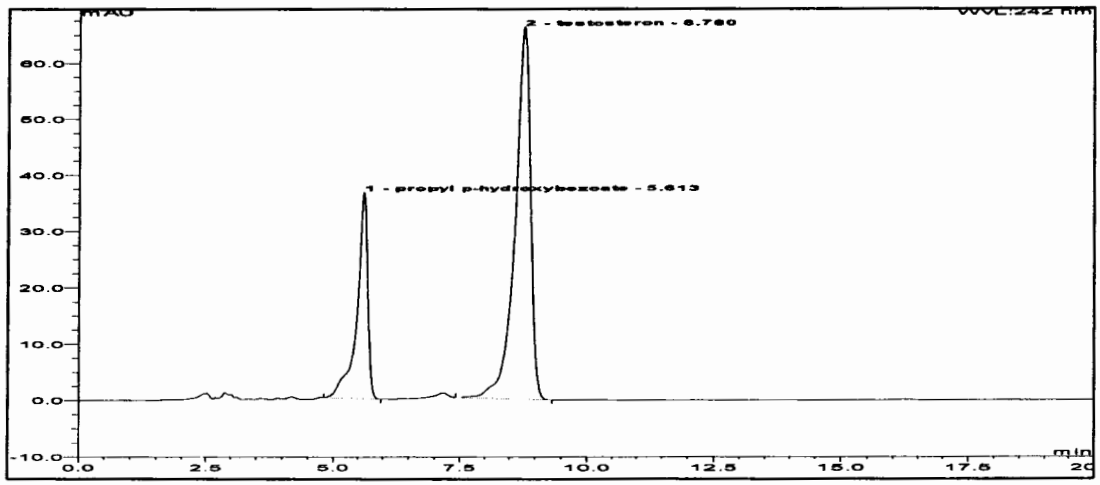


ภาพที่ 4.8 โครมาโทแกรม 0.5 µM finasteride

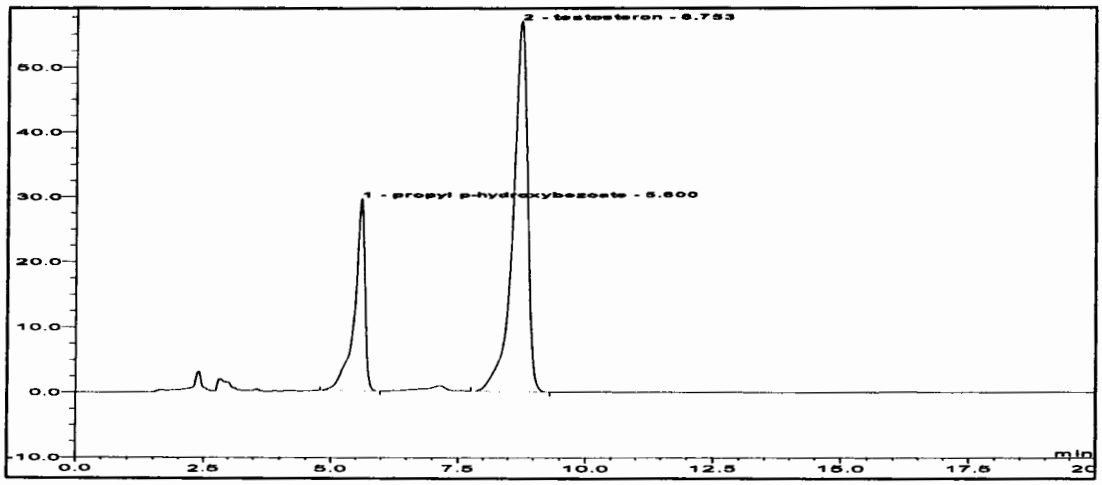
A.



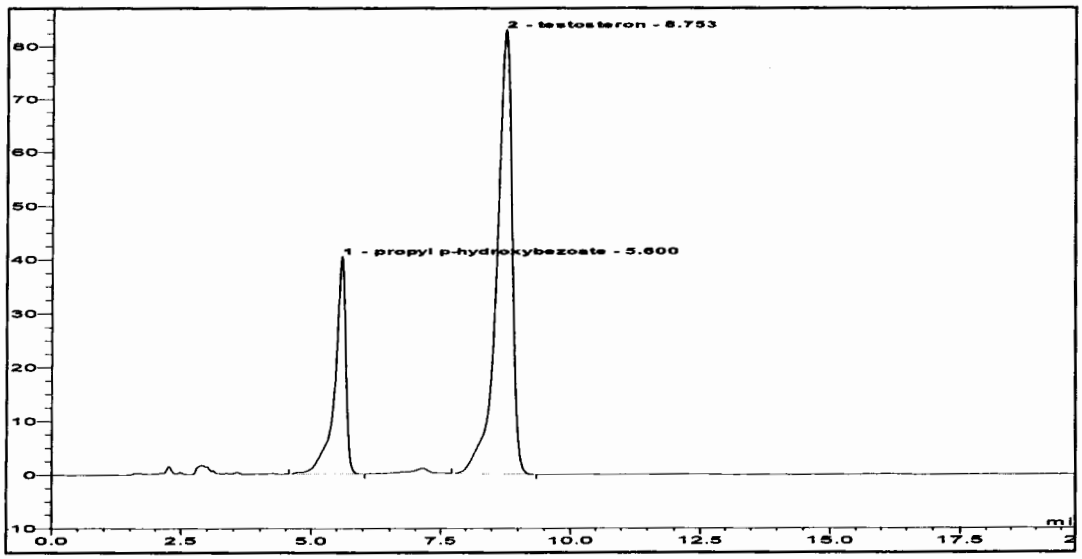
B.



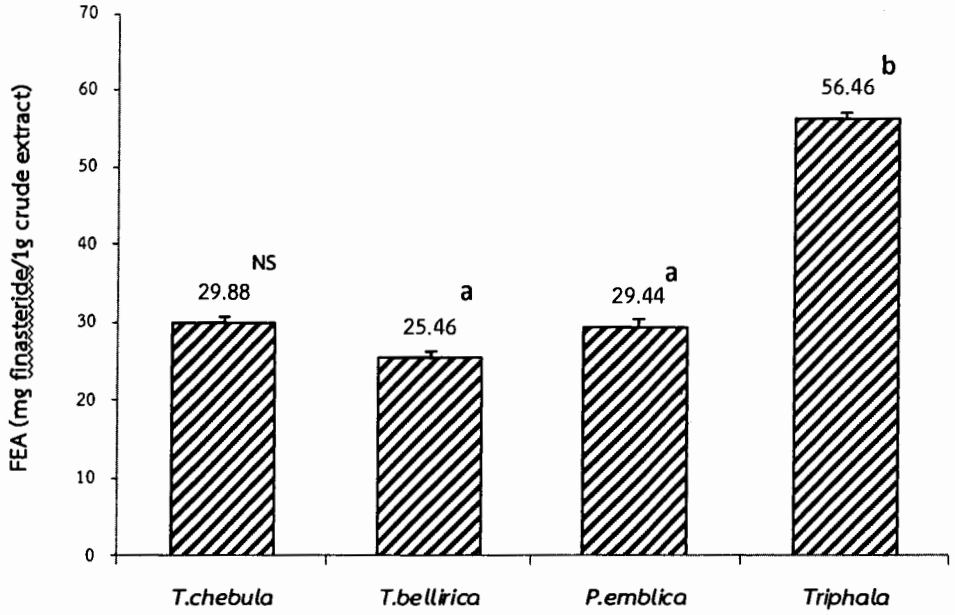
C.



ภาพที่ 4.9 โครมาโทแกรม (A) *T. chebula*, (B) *T. bellirica* และ (C) *P. emblica*



ภาพที่ 4.10 โครมาโทแกรมสารสกัดตรีผลา



ภาพที่ 4.11 ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase ของสารสกัดชนิดต่าง ๆ
***p<0.05, [a]p<0.01, [b]p<0.001, NS not significant**

ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase โดยโครมาโทแกรม propyl *p*-hydoxybenzoate (internal standard) และ testosterone มี retention time นาทีที่ 5.5 และ 8.7 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับที่มีรายงานการศึกษา มี IC_{50} ของ finasteride เท่ากับ 0.31 μM การศึกษา (Kumar et al., 2011) เท่ากับ 0.39 μM และการศึกษา (Park et al., 2003) เท่ากับ 0.34 μM การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน finasteride ในหน่วย finasteride equivalent 5α-reductase inhibition activity (FEA) หากสารที่มีค่า FEA สูง แสดงว่าสารนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สูงเช่นกัน ผลการศึกษา พบว่า *P. emblica* แตกต่างจาก *T.bellirica* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่ต่างจาก *T. chebulla* ($p>0.05$) แต่สารสกัด triphala มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุดแตกต่างจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$)

จากผลการศึกษา ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด และสารสกัดตรีผลา พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase ไม่แตกต่างกัน แต่สารสกัดตรีผลามีฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด ซึ่งสารที่คาดว่าน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase ที่พบในสารสกัดตรีผลา คือ gallic acid และ ellagic acid โดยสารทั้ง 2 ชนิดมีกลุ่มแคทีคอล (catechol) อยู่ในสูตรโครงสร้าง แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นแบบอ่อน (IC_{50} >100 μM) (Richad et al., 2002) ดังนั้น สารสกัดตรีผลาอาจจะมีสารชนิดอื่น ๆ ที่ช่วยในการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase

การศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Kumar et al., (2011; 2012) พบว่า *T. bellirica*, *T. chebula* และ *P. emblica* มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase เท่ากับ 11.58 ± 0.84, 12.74 ± 0.84 และ 18.99 ± 0.40 mg finasteride/g crude extract ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งที่มาของสารแตกต่างกัน และส่วนประกอบในสารสกัดตรีผลา อาจมีสารชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ได้ศึกษา ช่วยในการเสริมฤทธิ์การยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase ทำให้สารสกัดตรีผลามีฤทธิ์มากที่สุด ดังนั้น ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นการสนับสนุนการใช้สารสกัดตรีผลามากกว่าการใช้สารสกัดเดี่ยว ๆ และผลดังกล่าวน่าจะช่วยลดการหลุดร่วงของเส้นผม กระตุ้นการเจริญของเส้นผมได้

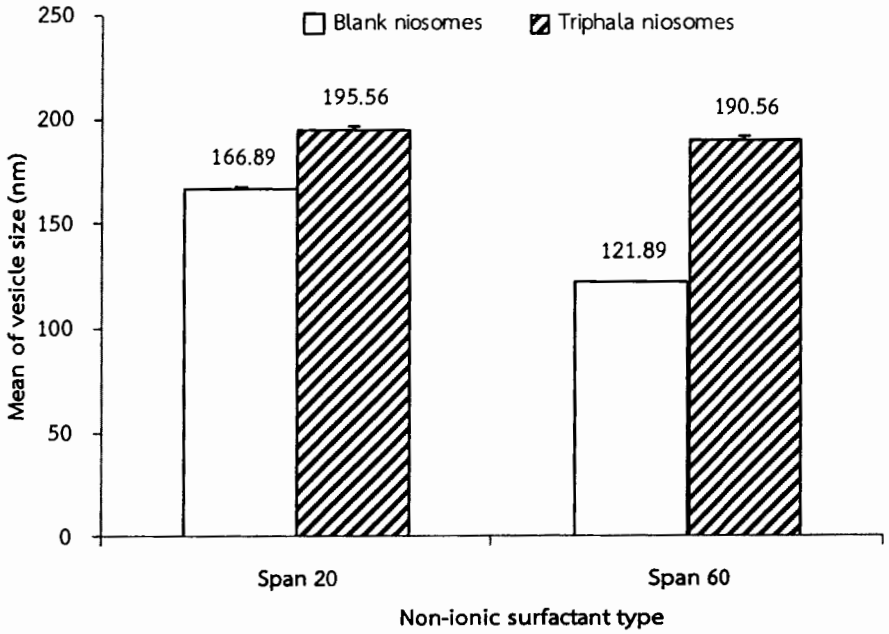
4.5 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับนีโอโซม

สารสกัดจากธรรมชาติ เป็นสารที่มีประโยชน์ แต่หากนำมาใช้ในรูปแบบตามธรรมชาติ จะมีปัญหาเรื่องความไม่สะดวกในการนำมาใช้ การซึมผ่านผิวหนังได้น้อย สารสกัดมีปริมาณจำกัด ดังนั้น การเตรียมสารสกัดให้อยู่ในรูปอนุภาคนีโอโซม จะช่วยในการกักเก็บสารสกัดทั้งที่ละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ ช่วยให้สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น และช่วยนำส่งสารสกัดไปยังตำแหน่งการออกฤทธิ์ ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ของสารสกัด ระบบนำส่งนีโอโซมเป็นระบบที่พัฒนามาจากลิโพโซม ซึ่งมีข้อดีมากกว่าหลายประการ เช่น ระบบนีโอโซมมีความคงตัวทางเคมีสูง มีความปลอดภัย เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุสามารถสลายตัวในร่างกายได้ ต้นทุนในการเตรียมไม่สูง เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุราคาถูกกว่า phospholipid สามารถกักเก็บได้ทั้งสารที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ การเตรียมนีโอโซมสามารถเตรียมได้หลายวิธี ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาสูตรตำรับนีโอโซมเพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคที่เหมาะสม และสามารถกักเก็บสารสกัดให้ได้มากที่สุด จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบในการเตรียมตำรับนีโอโซม แบ่งการศึกษาเป็น 2 ช่วง โดยช่วงแรกเป็นการศึกษาทีละตัวแปร จากนั้นนำปัจจัยที่ศึกษาเบื้องต้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว (response surface methadology; RSM)

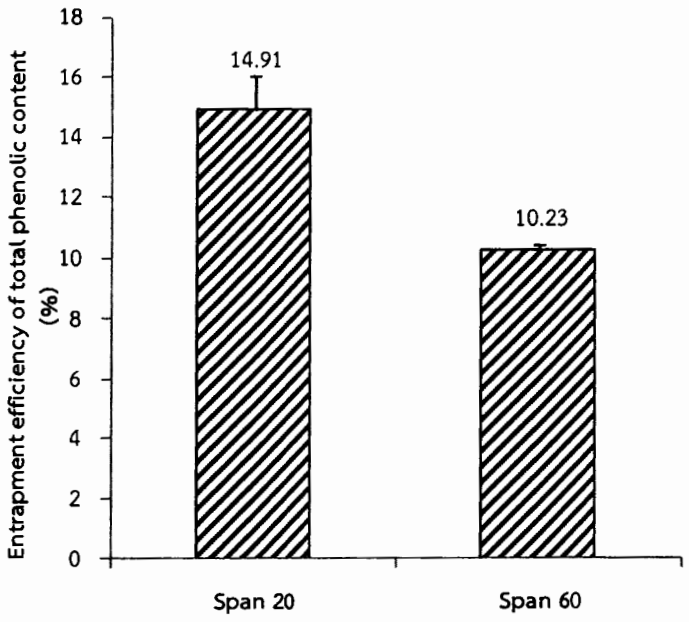
4.5.1 การศึกษาปัจจัยที่ละตัวแปร

4.5.1.1 ชนิดสารลดแรงตึงผิว (surfactant type)

จากการศึกษาเบื้องต้น ใช้สารลดแรงตึงผิวในกลุ่ม tween และ span เป็นส่วนประกอบในการเตรียมนีโอโซม พบว่า span ให้คุณสมบัติของอนุภาคนีโอโซมดีกว่า ดังนั้น จึงเลือกใช้ span นำมาศึกษาต่อ และการศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้ span®20 และ span®60 ผลการศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และความสามารถในการกักเก็บสารสกัด แสดงดังภาพที่ 4.12 และ 4.13



ภาพที่ 4.12 ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ



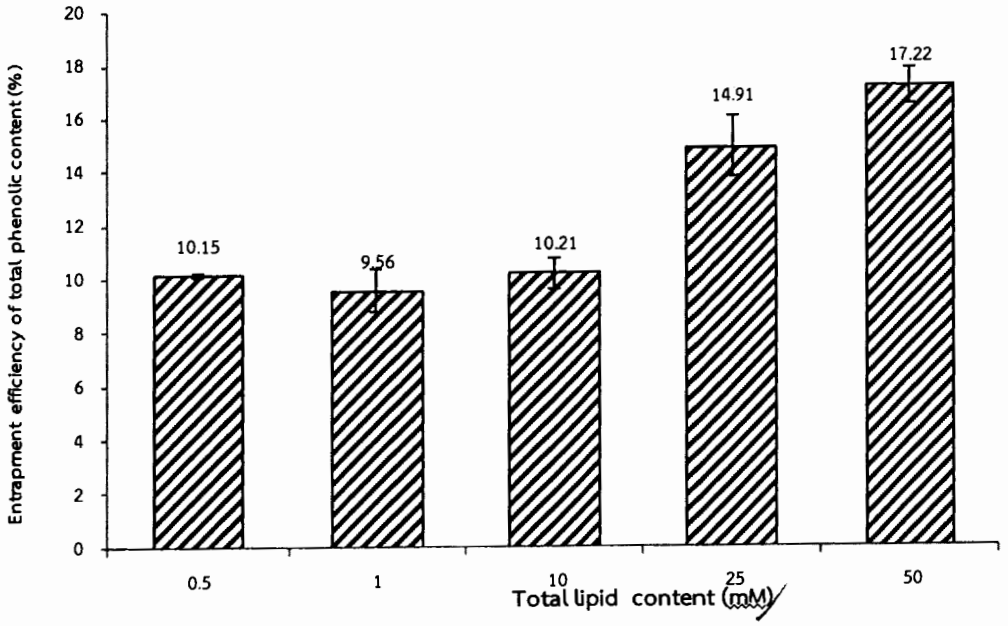
ภาพที่ 4.13 ร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ

จากการศึกษาปัจจัยในเรื่องชนิดของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ส่งผลต่อขนาดของอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัด พบว่า span®20, span®60 มีขนาดอนุภาคนีโอโซมเท่ากับ 195.56±3.21 และ 190.56±3.17 nm เมื่อเทียบกับนีโอโซมเปล่า Span®20 และ Span®60 เท่ากับ 166.89±2.09 และ 121.89±1.22 nm ตามลำดับ ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่มีผลต่อร้อยละการกักเก็บสารเครื่องหมายพบว่า Span®20 ร้อยละการกักเก็บมากที่สุด

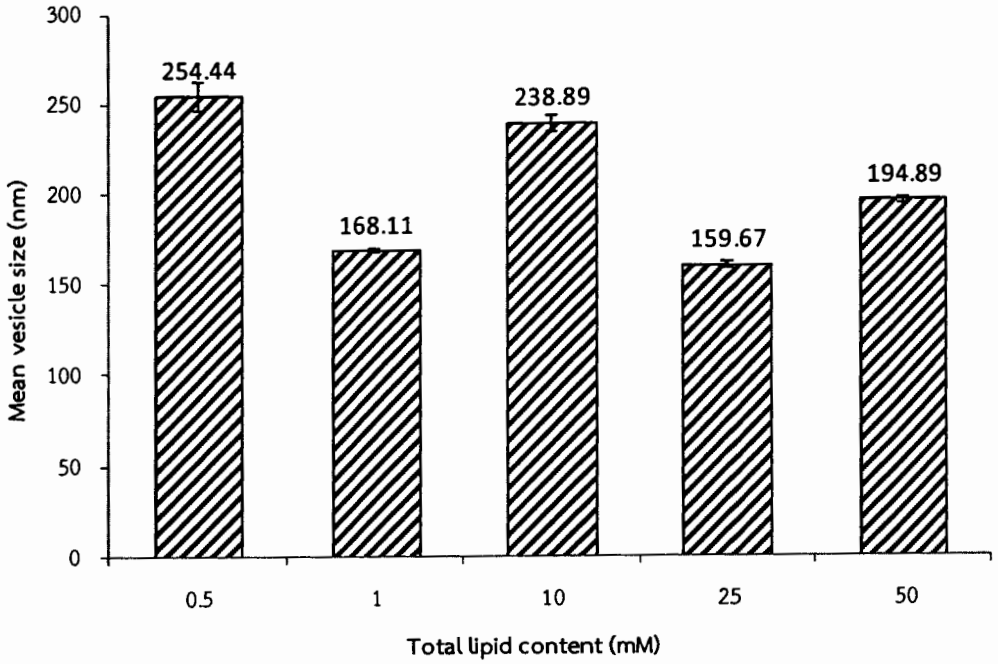
จากการศึกษาชนิดสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุต่อขนาดอนุภาคนีโอโซมและร้อยละการกักเก็บสารสกัด พบว่า ทั้ง Span®20 และ Span®60 ที่มีสารสกัดตรีผลา (0.5%) มีขนาดนีโอโซมเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับนีโอโซมเปล่า (blank niosomes) ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดตรีผลาประกอบด้วย gallic acid และ ellagic acid ซึ่ง gallic acid จะถูกกักเก็บไว้ในส่วนของ polar head group ส่วน ellagic acid ถูกกักเก็บไว้ในส่วน lipid bilayer ทำให้อนุภาคนีโอโซมมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนร้อยละการกักเก็บสารสกัด พบว่า Span®20 สามารถกักเก็บสารสกัดได้ดีกว่า Span®60 ทั้งนี้เนื่องจาก Span®20 มีค่า Hydrophilic-lipophilic balance (HLB) สูงกว่า Span®60 คือ 8.6 และ gallic acid เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ ถูกกักเก็บในส่วน polar head group การเพิ่ม hydrophobicity ของ Span®60 จึงไม่มีผลต่อการกักเก็บสารสกัด

4.5.1.2 ปริมาณไขมันทั้งหมด (total lipid content)

ปริมาณไขมันที่เป็นส่วนประกอบของอนุภาคนีโอโซม ประกอบด้วย คอเลสเตอรอล และ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ผลการศึกษาปริมาณของไขมันทั้งหมดที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และความสามารถในการกักเก็บสารสกัด แสดงดังภาพที่ 4.14 และ 4.15



ภาพที่ 4.14 ร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณไขมันทั้งหมด



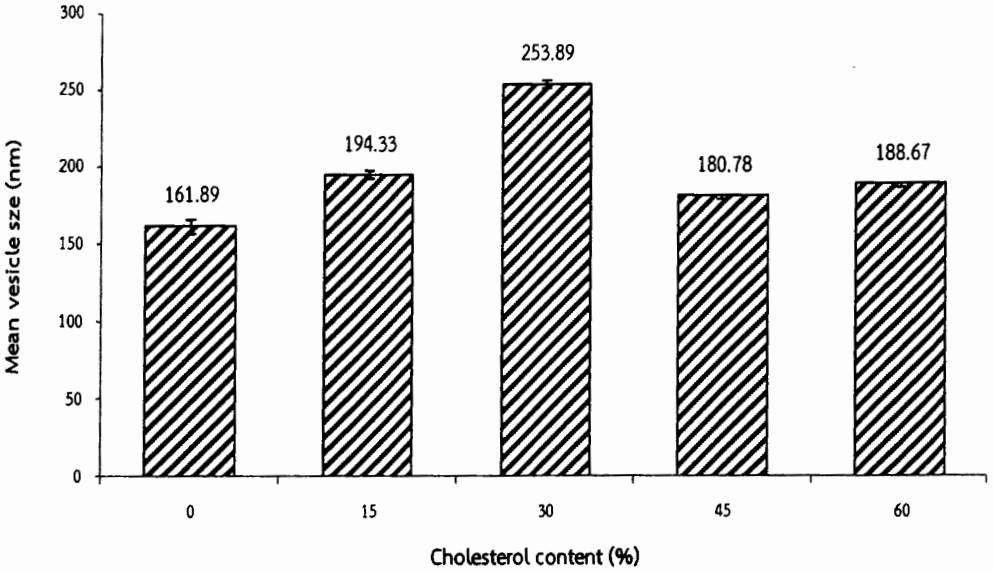
ภาพที่ 4.15 ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เกิดจากปริมาณไขมันทั้งหมด

ปริมาณไขมันทั้งหมด ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอล ที่มีผลต่อร้อยละการกักเก็บ พบว่า ปริมาณไขมันทั้งหมด 1, 0.5, 10, 25 และ 50 mM สามารถกักเก็บได้เพิ่มขึ้น ตามลำดับ ส่วนปริมาณไขมันที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม พบว่า ปริมาณไขมัน 25, 1, 50, 10 และ 0.5 mM ให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมเพิ่มขึ้น ตามลำดับ

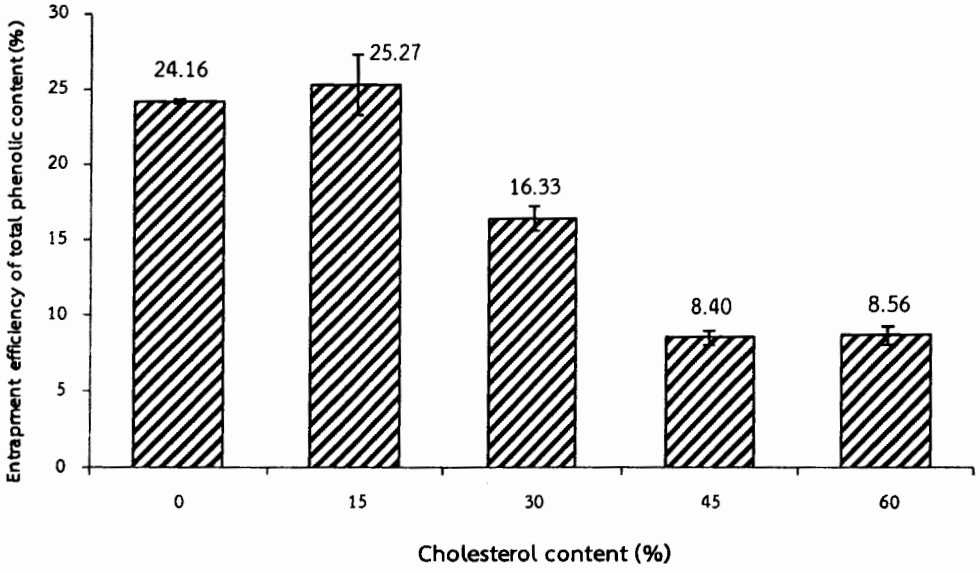
การเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดจาก 0 - 10 mM จะทำให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมเพิ่มขึ้น เนื่องจากคอเลสเตอรอลจะเข้าไปแทรกในส่วน lipid bilayer ของอนุภาคนีโอโซม และการกักเก็บสารสกัดจะถูกกักเก็บในส่วนของ lipid bilayer และ polar head group ทำให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมใหญ่ขึ้น แต่ร้อยละการกักเก็บสารสกัดไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณคอเลสเตอรอลยังมีปริมาณต่ำ ทำให้ผนังอนุภาคนีโอโซมไม่แข็งแรง จึงทำให้การกักเก็บสารสกัดได้น้อย และเมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมด 25 - 50 mM ขนาดอนุภาคนีโอโซมใหญ่ขึ้น และการกักเก็บสารสกัดเพิ่มขึ้น เนื่องจากจำนวนอนุภาคของนีโอโซมมีมากขึ้นสำหรับการกักเก็บสาร (Uchegbu and Vyas, 1998)

4.5.1.3 ปริมาณคอเลสเตอรอล (cholesterol content)

ปริมาณคอเลสเตอรอลเป็นส่วนประกอบอนุภาคนีโอโซม โดยทำให้อนุภาคนีโอโซมมีความคงตัวได้ดีขึ้น ทำให้ผนังอนุภาคนีโอโซมมีความแข็งแรง การศึกษาปริมาณคอเลสเตอรอลที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซมและความสามารถในการกักเก็บสารสกัด แสดงดังภาพที่ 4.16 และ 4.17



ภาพที่ 4.16 ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เกิดจากปริมาณคอเลสเตอรอลต่าง ๆ



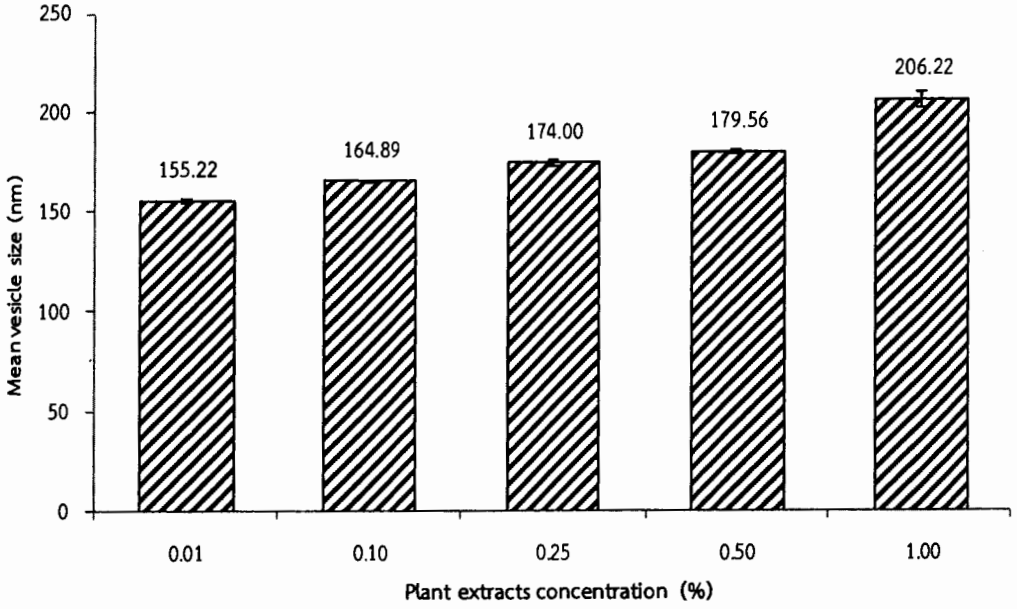
ภาพที่ 4.17 ร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณคอเลสเตอรอลต่าง ๆ

จากการศึกษาปริมาณคอเลสเตอรอลที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม พบว่า คอเลสเตอรอลร้อยละ 0, 45, 60, 15 และ 30 ทำให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมเพิ่มขึ้น ตามลำดับ ส่วนปริมาณคอเลสเตอรอลที่มีผลต่อร้อยละการกักเก็บสารสกัด พบว่า คอเลสเตอรอลร้อยละ 45, 60, 30, 0 และ 15 สามารถกักเก็บสารเครื่องหมายได้เพิ่มขึ้น ตามลำดับ

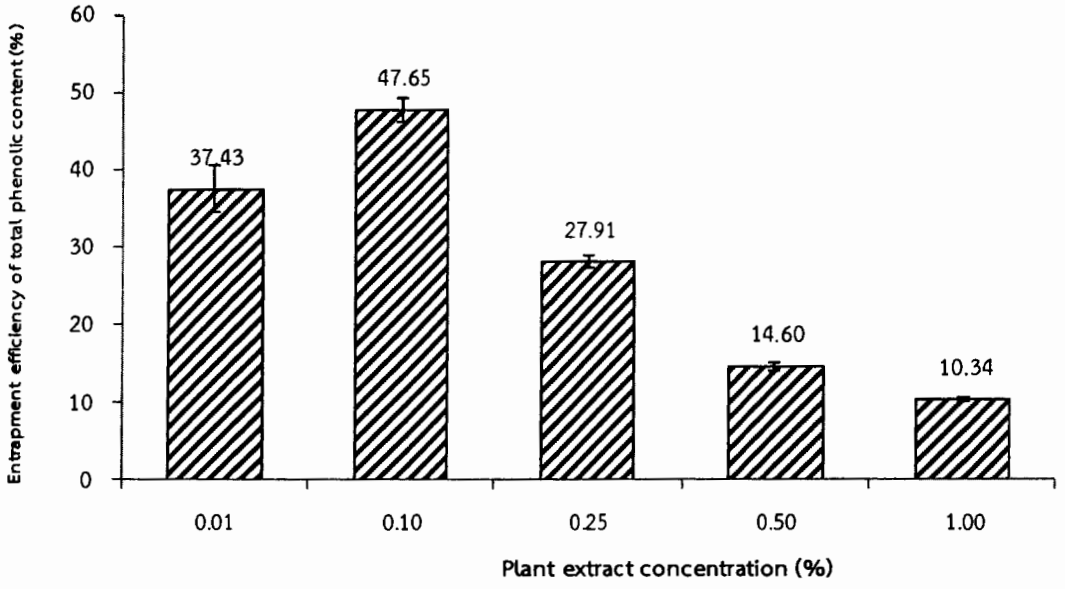
จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอล ตั้งแต่ร้อยละ 0 – 30 จะทำให้ขนาดนีโอโซมเพิ่มขึ้น เนื่องจากคอเลสเตอรอลที่เพิ่มขึ้นจะเข้าไปแทรกในส่วน lipid bilayer และการกักเก็บสารสกัดที่ lipid bilayer และ polar head group ทำให้อนุภาคนีโอโซมมีขนาดใหญ่ขึ้น ร้อยละการกักเก็บสารสกัดเพิ่มขึ้น เนื่องจากคอเลสเตอรอลที่เข้าไปแทรกในส่วน lipid bilayer ทำให้ lipid bilayer มีความเป็น hydrophobicity และทำให้อนุภาคมีความคงตัวเพิ่มขึ้น (Bernsdorff et al., 1997; Gregoriadis and Davis, 1979) จึงสามารถกักเก็บสารสกัดได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลตั้งแต่ร้อยละ 45 – 60 กลับพบว่า ขนาดอนุภาคนีโอโซมไม่แตกต่างกัน แต่ร้อยละการกักเก็บสารสกัดลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณคอเลสเตอรอลที่เพิ่มขึ้นจะเข้าไปแทรกในส่วน lipid bilayer เกิดการแข่งขันกันระหว่างคอเลสเตอรอลกับสารสกัดในการแทรกเข้าไปในพื้นที่ว่างของ lipid bilayer และการเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลเกินขีดจำกัด อาจไปรบกวนโครงสร้างเมมเบรนที่เป็นเส้นตรงปกติของอนุภาคได้ (EL-Samaligy et al., 2006) ทำให้อนุภาคนีโอโซมไม่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอล

4.5.1.4 ปริมาณสารสกัด (plant extract content)

เมื่อศึกษาส่วนประกอบในการเตรียมอนุภาคนีโอโซมทั้งชนิดสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ปริมาณไขมันทั้งหมด และปริมาณคอเลสเตอรอล ส่วนที่สำคัญคือการศึกษาปริมาณสารสกัดที่สามารถกักเก็บได้ในระบบนีโอโซม ซึ่งตามปกติอนุภาคนีโอโซมสามารถกักเก็บสารสกัดได้ทั้งชนิดที่ละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ ผลการศึกษาปริมาณสารสกัดที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม และความสามารถในการกักเก็บสารสกัด แสดงดังภาพที่ 4.18 และ 4.19



ภาพที่ 4.18 ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เกิดจากปริมาณสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4.19 ร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการศึกษาปริมาณสารสกัดที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม พบว่า สารสกัดร้อยละ 0.01, 0.10, 0.25, 0.5 และ 1.0 ให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมเพิ่มขึ้น ตามลำดับ ปริมาณสารสกัดที่มีผลต่อร้อยละการกักเก็บสารสกัด พบว่า สารสกัดร้อยละ 1.0, 0.5, 0.25, 0.01 และ 0.10 สามารถกักเก็บสารสกัดได้เพิ่มขึ้น ตามลำดับ

จากการศึกษาการเพิ่มร้อยละของสารสกัดตั้งแต่ 0.01 – 0.10 พบว่า ขนาดอนุภาคนีโอโซมเพิ่มขึ้น ร้อยละการกักเก็บสารสกัดมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดที่ประกอบด้วย gallic acid ถูกกักเก็บในส่วน polar head group ส่วน ellagic acid ถูกกักเก็บในส่วน lipid bilayer ทำให้อนุภาค นีโอโซมมีขนาดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณร้อยละของสารสกัดตั้งแต่ 0.25 – 1.00 กลับพบว่า ขนาดอนุภาคนีโอโซมเพิ่มขึ้น แต่ร้อยละการกักเก็บสารสกัดลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดมีปริมาณของสารสกัดที่ละลายน้ำมาก แต่พื้นที่ในการกักเก็บสารสกัดในส่วนของ polar head group มีพื้นที่จำกัด ทำให้การกักเก็บสารสกัดลดลง ส่วนปริมาณสารสกัดที่ไม่ละลายน้ำมีปริมาณน้อย แต่พื้นที่ในการกักเก็บสารสกัดใน lipid bilayer มีพื้นที่มาก ทำให้ยังสามารถกักเก็บสารสกัดไว้ได้ ซึ่งการศึกษานี้คล้ายกับการศึกษาของ Pham et al., (2012) ศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมลิโพโซมและนีโอโซมเพื่อกักเก็บ caffeine ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ และ spironolactone ซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำได้น้อย พบว่า ร้อยละการกักเก็บ caffeine อยู่ระหว่าง 2.5 - 9.7

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับนีโอโซม เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 100 - 400 nm ซึ่งเป็นขนาดที่มีความเหมาะสมในการนำส่งทางรูขุมขน และร้อยละการกักเก็บสารสกัดให้ได้ปริมาณมากที่สุด ผลการศึกษาร้อยละการกักเก็บสารสกัดในอนุภาคนีโอโซมจากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการกักเก็บสารสกัดในอนุภาคนีโอโซมจากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ

ปัจจัยที่ศึกษา		ร้อยละการกักเก็บสารสกัด
ชนิดสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ	span 20	14.91±1.14
	span 60	10.23±0.22
ปริมาณไขมัน (mM)	0.50	9.55±0.37
	1.00	10.15±0.07
	10.00	9.56±0.80
	25.00	10.21±0.58
	30.00	14.91±1.14
	50.00	17.22±0.70
ปริมาณคอเลสเตอรอล (%)	0.00	24.16±0.13
	15.00	25.27±2.04
	30.00	16.33±0.79
	45.00	8.40±0.47
	80.00	8.56±0.67
ปริมาณสารสกัดตรีผลา (%)	0.01	37.43±2.97
	0.10	47.65±1.56
	0.25	27.91±0.82
	0.50	14.60±0.48
	1.00	10.34±0.31

ตารางที่ 4.3 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค และร้อยละการกักเก็บสารสกัด ที่ได้จากการศึกษาปัจจัยเบื้องต้น

ปัจจัยการศึกษาที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมนีโอโซม	ขนาดอนุภาค	การกระจายอนุภาค	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค	ร้อยละการกักเก็บสารสกัด
	(nm)		(mV)	(%)
ปริมาณไขมันทั้งหมด 30 mM สารสกัดตรีผลา 0.5%	195.56±1.52	0.07±0.03	-38.47±0.98	14.91±1.14
ปริมาณไขมันทั้งหมด 50 mM สารสกัดตรีผลา 0.5 %	194.89±1.70	0.08±0.02	-40.68±0.25	17.22±0.70
ปริมาณไขมันทั้งหมด 50 mM สารสกัดตรีผลา 0.5% คอเลสเตอรอล 15%	194.33±2.54	0.19±0.03	-38.13±0.76	25.27±2.04
ปริมาณไขมันทั้งหมด 50 mM คอเลสเตอรอล 15% ปริมาณสารสกัดตรีผลา 0.1%	164.89±0.47	0.20±0.01	-36.68±0.70	47.65±1.56

ผลการศึกษาปัจจัยเบื้องต้น ที่มีผลต่อการเตรียมตำรับนีโอโซมเพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคนีโอโซมอยู่ในช่วง 100 – 400 nm และให้ได้ร้อยละการกักเก็บสารสกัดมากที่สุด พบว่า สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่เหมาะสม คือ span®20 ปริมาณไขมันทั้งหมด เท่ากับ 50 mM ปริมาณคอเลสเตอรอล ร้อยละ 15 และปริมาณสารสกัดร้อยละ 0.10 ตามลำดับ ได้ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค และร้อยละการกักเก็บสารสกัด แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 ค่าประจุไฟฟ้าของสารสกัดตรีผลาความเข้มข้นต่าง ๆ ในน้ำปราศจากไอออน (n=3)

ความเข้มข้นสารสกัดตรีผลา (mg/ml)	ค่าประจุไฟฟ้าสารสกัดตรีผลา (mV)
0.20	-18.90± 4.49
0.40	-19.57±10.21
0.80	-19.23±3.11
1.00	-22.90±7.37
2.00	-22.70±1.85
20.00	-21.27±2.91

เมื่อนำสารสกัดตรีผลาวัดค่าประจุไฟฟ้า พบว่า สารสกัดตรีผลามีค่าประจุไฟฟ้าเป็นลบ อยู่ในช่วง (-18.90) – (-22.90) mV ซึ่งประจุไฟฟ้าของสารสกัดตรีผลาเกิดจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนจากหมู่ไฮดรอกซี (OH group) ที่อยู่ในโครงสร้างของสาร gallic acid และ ellagic acid และการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดไม่มีผลต่อค่าประจุไฟฟ้าของสารสกัดตรีผลา ดังนั้น เมื่อนำสารสกัดตรีผลามากักเก็บในนิโอโซม จะทำให้ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคนิโอโซมเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ กับคอเลสเตอรอล (Huh et al., 1996) และพันธะไฮโดรเจนที่เกิดจากสารสกัดตรีผลา

4.5.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนิโอโซมด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว

เมื่อได้ข้อมูลปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับนิโอโซมแล้ว จึงนำปัจจัยตัวแปรต้นที่ศึกษา คือ ปริมาณไขมันทั้งหมด คอเลสเตอรอล และสารสกัดพืช มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนิโอโซม โดยกำหนดปัจจัยตัวแปรตามที่ต้องการคือ 1) ร้อยละการกักเก็บสารเครื่องหมายในนิโอโซม (% entrapment efficiency) 2) ขนาดอนุภาคนิโอโซม (particle size) ด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว โดยใช้โปรแกรม Design-Expert ® version 7 วิธีนี้มีข้อดีกว่าวิธีเดิมคือ สามารถศึกษาตัวแปรหลายๆ ชนิดพร้อมกัน ทราบผลกระทบที่เกิดจากตัวแปรที่ศึกษาร่วมกัน และใช้เวลาไม่นานในการศึกษา โดยการเตรียมสูตรตำรับนิโอโซมทั้งหมด 20 สูตรตำรับ แสดงผลค่าตอบสนองเป็นค่าเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 4.5 จากนั้นนำเข้าสู่โปรแกรม Design-Expert ® version 7 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนิโอโซมด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 ขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RSM – CCD, โดยการแสดงผลจากค่าเฉลี่ย

สูตรตำรับ	ไขมันทั้งหมด	คอเลสเตอรอล	สารสกัดพืช	ขนาดอนุภาค	การกักเก็บสารสกัดพืช
	(mM)	(%)	(%)	(nm)	(%)
1	32.50	25.00	0.20	194.56	22.81
2	32.50	25.00	0.20	194.00	20.83
3	50.00	40.00	0.30	203.56	12.22
4	32.50	25.00	0.20	207.00	19.14
5	32.50	25.00	0.20	195.44	15.71
6	15.00	10.00	0.10	137.44	11.09
7	32.50	0.00	0.20	154.44	18.3
8	32.50	25.00	0.20	204.89	25.23
9	32.50	25.00	0.20	211.00	22.14
10	15.00	40.00	0.30	207.78	10.26
11	50.00	10.00	0.10	168.22	47.54
12	32.50	50.23	0.20	169.67	16.33
13	32.50	25.00	0.03	155.33	38.3
14	32.50	25.00	0.37	207.67	10.16
15	50.00	40.00	0.10	190.00	25.56
16	15.00	40.00	0.10	156.44	19.35
17	61.93	25.00	0.20	245.78	38.34
18	15.00	10.00	0.30	135.00	10.98
19	50.00	10.00	0.30	196.11	34.48
20	3.07	25.00	0.20	126.00	9.36

การพัฒนาตำรับนีโอโซมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของสูตรตำรับนีโอโซมโดยวิธีตอบสนองพื้นผิวด้วยวิธีการออกแบบส่วนผสมกลาง (Response surface methodology with Central composite design; RSM – CCD) โดยมีตัวแปรอิสระ คือปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), ปริมาณคอเลสเตอรอล (X_2) และปริมาณสารสกัด (X_3) โดย X_1 มีค่าอยู่ระหว่าง 15 – 50 mM, X_2 มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 10 - 40 และ X_3 มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 0.1 – 0.3 ค่าของตัวแปรเหล่านี้ได้จากการทดสอบเบื้องต้น และประเมินค่าการตอบสนองจากขนาดอนุภาค (Y_1) และร้อยละการกักเก็บสารสกัด (Y_2) จากการทดลอง พบว่า สภาวะจากการเตรียมสูตรตำรับนีโอโซม 20 สูตรตำรับ โดยมีขนาดอนุภาคนีโอโซมอยู่ระหว่าง 126 - 245 nm และร้อยละการกักเก็บสารสกัดอยู่ระหว่าง 10.26 - 47.54 ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสูตรตำรับนีโอโซมโดยวิธีตอบสนองพื้นผิว ด้วยวิธีการออกแบบส่วนผสมกลาง (Response surface methodology with Central composite design; RSM – CCD) สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของตัวแปรอิสระคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของคอเลสเตอรอล และความเข้มข้นของสารสกัด กับค่าการตอบสนองเป็นสมการพหุนามกำลังสอง คือ ขนาดอนุภาค และร้อยละการกักเก็บสารสกัด และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.8546 และ 0.8971 ตามลำดับ ดังนี้

ขนาดอนุภาค = $201.20+23.63X_1+10.74X_2+13.06X_3-7.82X_1X_2-0.93X_1X_3+4.93X_2X_3$
$5.55X_1^2-13.97X_2^2-7.10X_3^2$

ร้อยละการกักเก็บสารสกัด = $21.41+8.56X_1-2.93X_2-6.07X_3-6.47X_1X_2-2.15X_1X_3-1.16X_2X_3$

สมการพหุนามกำลังสอง (quadratic) ที่แสดงข้างต้น เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมที่สุด สามารถพิจารณาได้จากค่า R^2 ค่า R^2_{adj} ค่า p-value ของ Lack of fit แสดงดังตารางที่ 4.6 และ 4.7

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ regression coefficient ของขนาดอนุภาค และร้อยละการกักเก็บสารสกัด

Source	ขนาดอนุภาค		ร้อยละการกักเก็บสารสกัด	
	Regression coefficients	*F*-value	Regression coefficients	*F*-value
β_0	201.20		21.41	
Linear				
X_1	23.63	28.53*	8.56	56.57*
X_2	10.74	5.89*	-2.93	6.63*
X_3	13.06	12.38*	-6.07	28.49*
Quadratic				
X_1^2	-5.55	1.66^{NS}		
X_2^2	-13.97	10.53^{*}		
X_3^2	-7.10	2.72^{NS}		
Interaction				
X_1X_2	-7.82	1.83^{NS}	-6.47	18.96 *
X_1X_3	-0.93	0.026^{NS}	-2.15	2.09^{NS}
X_2X_3	4.93	0.73^{NS}	-1.16	0.61^{NS}
R^2	0.8546		0.8971	
R^2_{adj}	0.7236		0.8496	
C.V. %	-0.0635		0.6873	

หมายเหตุ; NS = not significant

ตารางที่ 4.6 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับแล้ว (R^2_{adj}) พบว่า ในทุกค่าการตอบสนองทั้งขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดมีค่ามากกว่า 0.7 แสดงว่า ตัวแปรอิสระมีผลต่อค่าการตอบสนอง และเมื่อพิจารณาค่า *F*-value ของค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร ปัจจัยของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม จากสมการเส้นตรง พบว่า การ

เพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารสกัด มีผลทำให้อนุภาคนีโอโซมมีขนาดเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสมการพหุนามกำลังสอง พบว่า การเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอล มีผลทำให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมลดลง อย่างมีนัยสำคัยทางสถิติ และผลกระทบที่เกิดจากปัจจัยตัวแปรอิสระต่ออนุภาคนีโอโซม พบว่า ไม่แตกต่างกัน ปัจจัยที่มีผลต่อร้อยละการกักเก็บสารสกัด จากสมการเส้นตรง พบว่า ปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารสกัด มีผลต่อร้อยละการกักเก็บสารสกัด คือ เมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมด จะทำให้การกักเก็บสารสกัดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารสกัด จะทำให้ร้อยละการกักเก็บสารสกัดลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาผลกระทบจากตัวแปรที่ศึกษา พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดและคอเลสเตอรอล จะทำให้ร้อยละการกักเก็บสารสกัดลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการพหุนามกำลังสองของขนาดอนุภาคและร้อยละการกักเก็บสารสกัด

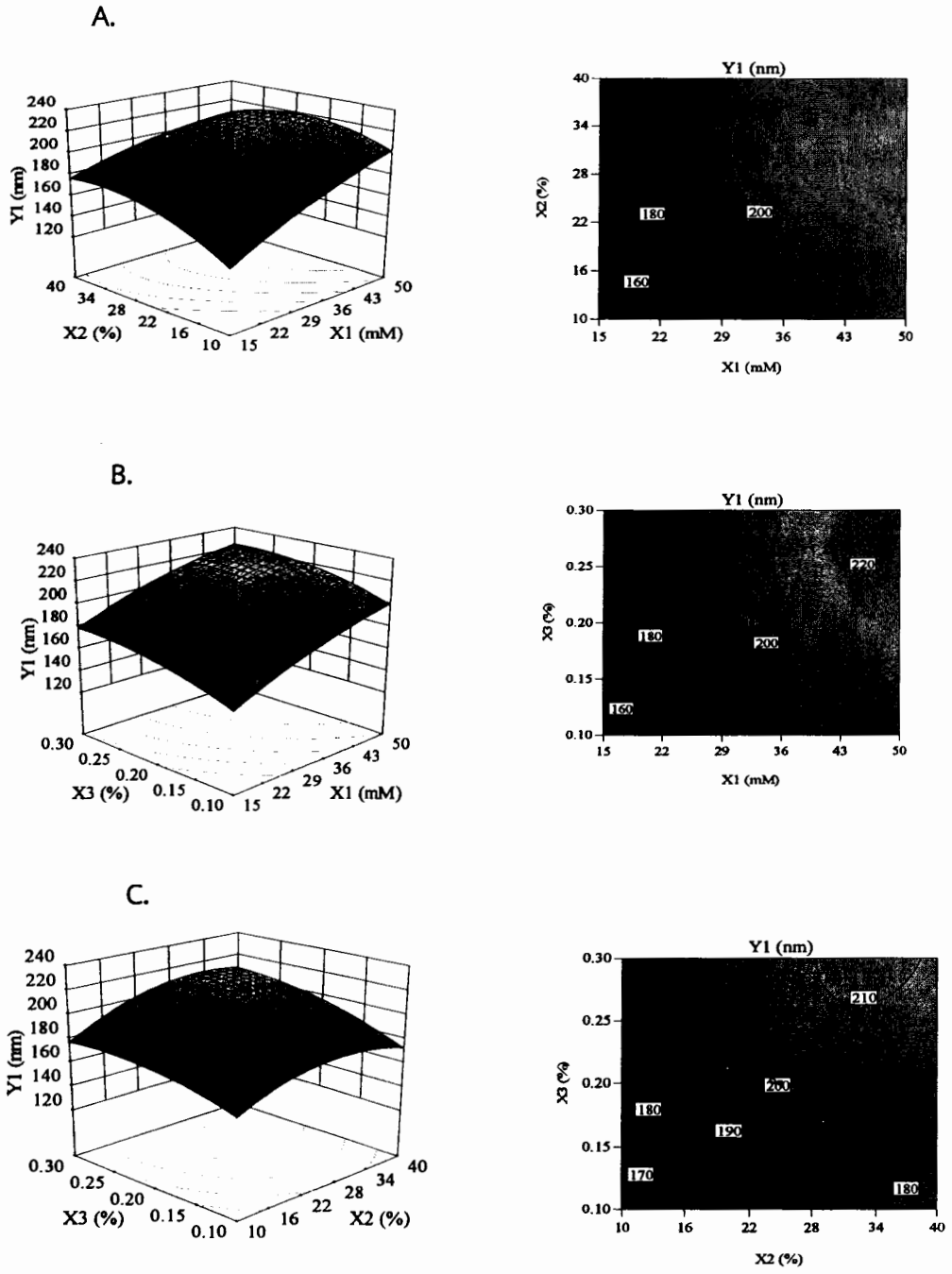
Source	ขนาดอนุภาค					ร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืช				
	DF	SS	MS	*F* value	p-value	DF	SS	MS	*F* value	p-value
Model	9	15701.63	1744.63	6.53	0.0035	6	2003.54	333.92	18.89	<0.0001
A-A	1	7623.96	7623.96	28.53	0.0003	1	999.93		56.57	<0.0001
B-B	1	1574.19	1574.19	5.89	0.0356	1	117.23		6.63	0.0231
C-C	1	2329.79	2329.79	8.72	0.0145	1	503.53		28.49	0.0001
AB	1	489.06	489.06	1.83	0.2059	1	335.15		18.96	0.0008
AC	1	6.94	6.94	0.026	0.8752	1	36.98		2.09	0.1718
BC	1	194.54	194.54	0.73	0.4135	1	10.72		0.61	0.4501
A^2	1	443.28	443.28	1.66	0.2268					
B^2	1	2813.75	2813.75	10.53	0.0068					
C^2	1	726.11	726.11	2.72	0.1303					
Residual	10	2672.52	267.25			13	17.68			
Lack of fit	5	2400.59	480.12	8.83	0.016*	8	175.86	21.98	2.04	0.2246
Pure error	5	271.93	54.39			5	53.94	10.79		
Cor total	19	18374.15				19	2233.34			

เมื่อพิจารณาค่า *P*-value ของ Lack of fit พบว่า ค่าการตอบสนองขนาดอนุภาคนีโอโซมที่ได้นั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนค่าการตอบสนองร้อยละการกักเก็บสารสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.7 เมื่อนำสมการถดถอยมาหาอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุด ภายใต้การกำหนดเงื่อนไข แสดงดังตารางที่ 4.8

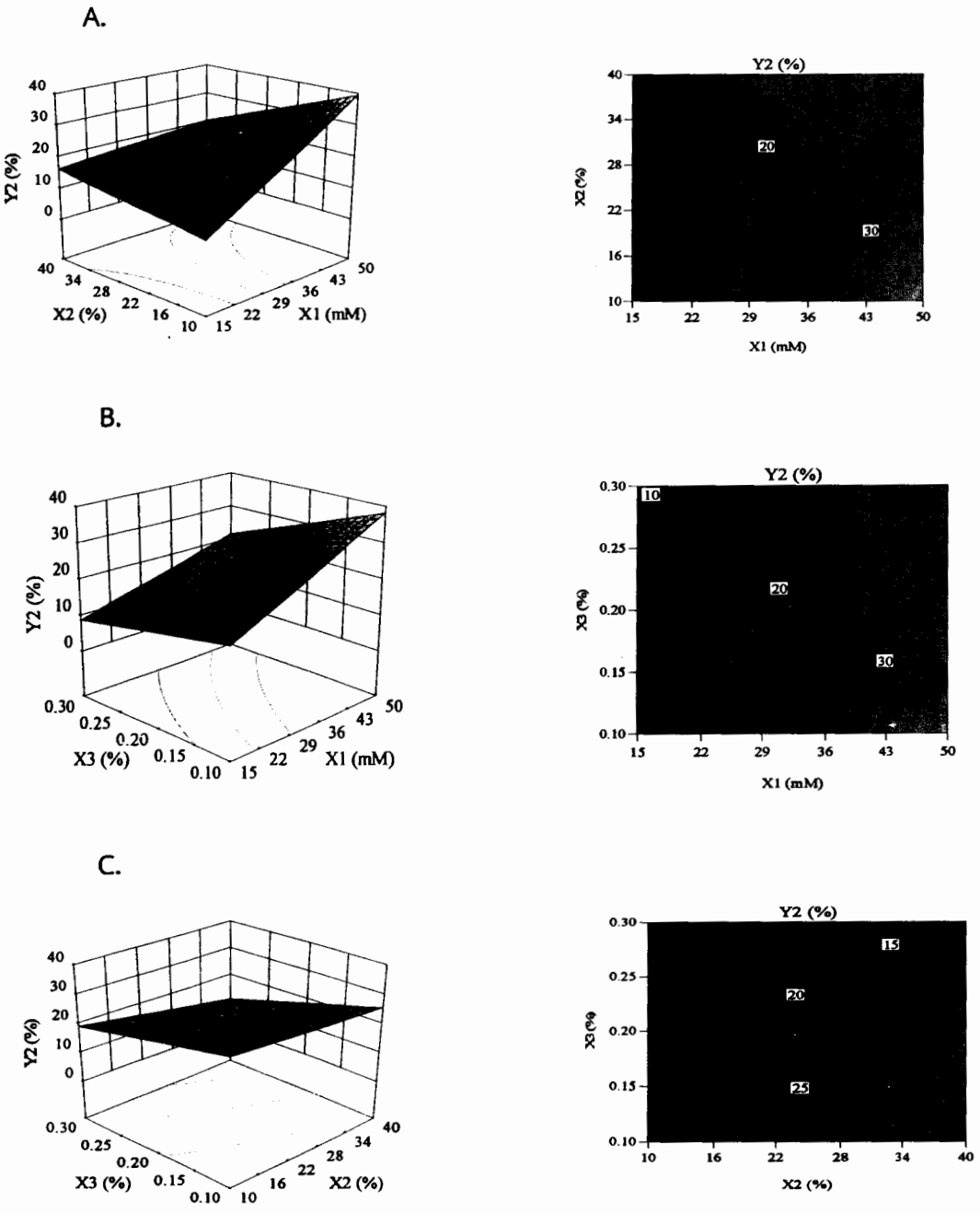
ตารางที่ 4.8 กำหนดเกณฑ์ระดับปัจจัยที่มีผลต่อค่าตอบสนองเพื่อวิเคราะห์หาค่าที่เหมาะสม

ปัจจัยที่ศึกษา	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด
<u>ตัวแปรอิสระ</u>		
ปริมาณไขมันทั้งหมด (mM)	15	50
ปริมาณคอเลสเตอรอล (%)	10	40
ปริมาณสารสกัดตรีผลา (%)	0.1	0.3
<u>ตัวแปรตาม</u>		
ขนาดอนุภาคนีโอโซม (nm)	126	245.78
ร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืช (%)	9.36	47.54

เมื่อพิจารณาสมการถดถอยตามเงื่อนไขดังกล่าว สรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับนีโอโซมให้มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100 – 400 nm และให้ปริมาณร้อยละการกักเก็บสารสกัดมากที่สุดคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดเท่ากับ 50 mM ปริมาณคอเลสเตอรอลเท่ากับร้อยละ 10 และปริมาณสารสกัดเท่ากับร้อยละ 0.1 ให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมเท่ากับ 188.10 ± 16.34 nm และร้อยละการกักเก็บสารสกัดเท่ากับ 46.43 ± 4.20 ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมนี้ สามารถแสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของตัวแปรอิสระกับค่าการตอบสนองเป็นกราฟสามมิติ และกราฟโครงร่าง (contour) แสดงดังภาพที่ 4.20 และ 4.21



ภาพที่ 4.20 กราฟสามมิติและกราฟโครงร่าง (A) การตอบสนองของขนาดอนุภาคที่เกิดจากปริมาณคอเลสเตอรอล (X_2) กับปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), (B) การตอบสนองของขนาดอนุภาคที่เกิดจากปริมาณสารสกัด (X_3) กับปริมาณไขมัน (X_1), (C) การตอบสนองของขนาดอนุภาคที่เกิดจากปริมาณสารสกัด (X_3) กับปริมาณคอเลสเตอรอล (X_2)



ภาพที่ 4.21 กราฟสามมิติและกราฟโครงร่าง (A) การตอบสนองของร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณคอเลสเตอรอล (X_2) กับปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), (B) การตอบสนองของร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณสารสกัดพืช (X_3) กับปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), (C) การตอบสนองของร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่เกิดจากปริมาณสารสกัดพืช (X_3) กับปริมาณคอเลสเตอรอล (X_2)

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสูตรตำรับนีโอโซมโดยวิธีตอบสนองพื้นผิว ด้วยวิธีการออกแบบส่วนผสมกลาง (Response surface methodology with Central composite design; RSM – CCD)

ภาพที่ 4.20 แสดงปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารสกัด ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคนีโอโซม พบว่า การเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอล ปริมาณไขมันทั้งหมด และการเพิ่มปริมาณสารสกัด ทำให้นีโอโซมมีขนาดเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในสมการ และผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนโดยจุดที่แสดงในกราฟสามมิติและกราฟโครงร่างจะแสดงสภาวะที่เหมาะสมของตำรับนีโอโซม

ภาพที่ 4.21 แสดงปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารสกัด ที่มีผลต่อร้อยละการกักเก็บสารสกัด พบว่า การเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมด ทำให้ร้อยละการกักเก็บสารสกัดเพิ่มขึ้น ส่วนการเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอล และการเพิ่มปริมาณสารสกัด จะทำให้ร้อยละการกักเก็บสารสกัดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในสมการ และผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนโดยจุดที่แสดงในกราฟสามมิติและกราฟโครงร่างจะแสดงสภาวะที่เหมาะสมของตำรับนีโอโซม

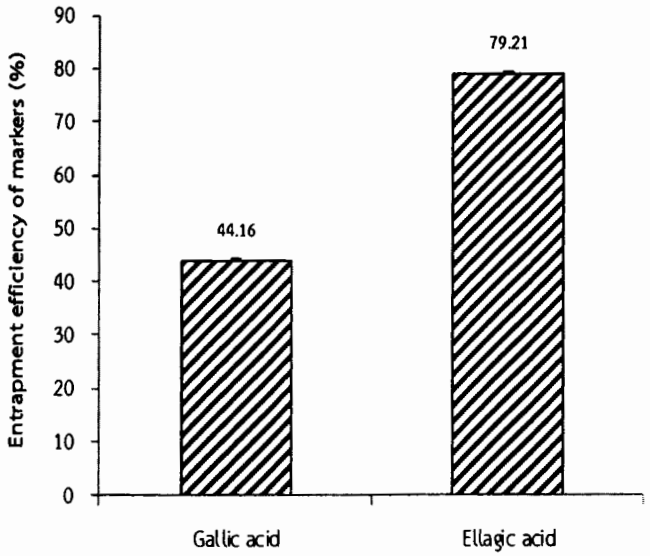
จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมไปทดลองซ้ำ เปรียบเทียบค่าที่ได้จริงกับค่าที่ได้จากการทำนาย ซึ่งผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.9 พบว่า ขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัดที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (n=3)

ค่าตอบสนองปัจจัย	ค่าที่ได้จากการทำนาย	ค่าที่ได้จากการทดลอง
ขนาดอนุภาค (nm)	180.10 ± 16.34	163.89 ±4.43
ร้อยละการกักเก็บสารสกัด (%)	46.43 ± 4.20	47.68 ± 4.68

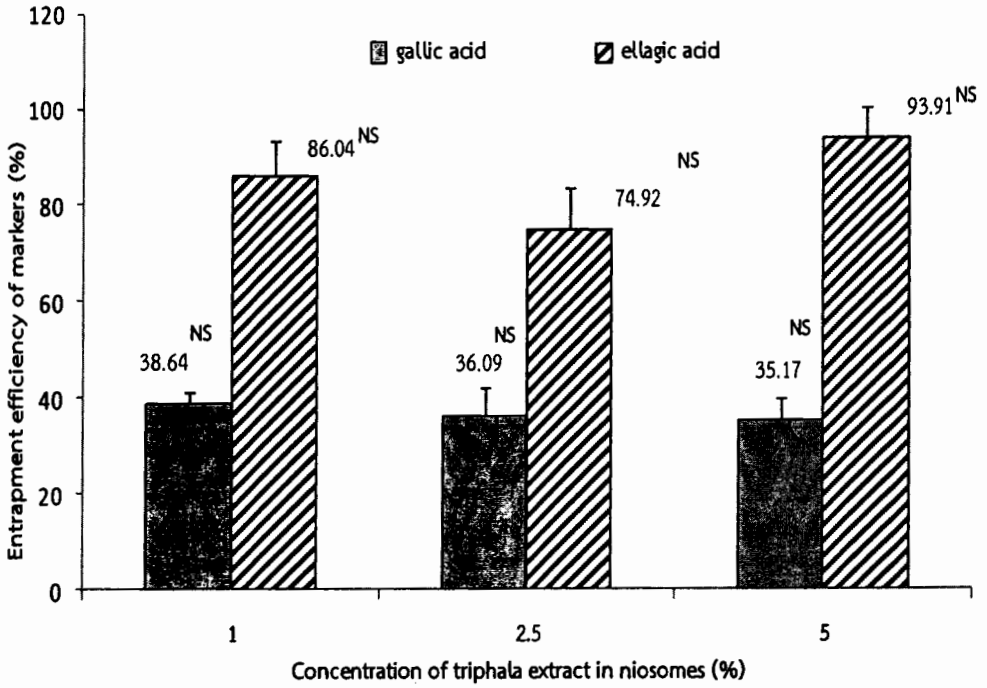
4.6 การวิเคราะห์หาร้อยละการเก็บกักสารเครื่องหมายในนีโอโซม

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับนีโอโซม โดยใช้วิธีการตอบสนองพื้นผิวแล้ว ได้มีการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารเครื่องหมายที่ตำรับนีโอโซมสามารถกักเก็บได้ คือ gallic acid และ ellagic acid วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ผลการศึกษาร้อยละการเก็บกักสารเครื่องหมายทั้ง 2 ชนิดในนีโอโซม แสดงดังภาพที่ 4.22 และร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid ของสูตรตำรับนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5% แสดงดังภาพที่ 4.23 ซึ่งเป็นสูตรตำรับที่พัฒนาจากการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว เพื่อให้สามารถกักเก็บสารเครื่องหมายให้ได้มากที่สุด และเพื่อนำไปทดสอบ การปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของ gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซมด้วยหนังหมูแรกเกิด การทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในสัตว์ทดลอง และทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation) ในสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 4.22 ร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid

จากการศึกษาร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid พบว่า สามารถกักเก็บได้เท่ากับร้อยละ 44.16±0.03 และ 79.21±0.06 ตามลำดับ ซึ่งการกักเก็บ ellagic acid สูงกว่า gallic acid ประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้เนื่องมาจากคุณสมบัติของสารทั้ง 2 ชนิด แตกต่างกัน คือ gallic acid เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ จะถูกกักเก็บในส่วนของ polar head group ส่วน ellagic acid เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำจะถูกกักเก็บในส่วนของ lipid bilayer และปริมาณสารเครื่องหมายทั้ง 2 ชนิด ในสารสกัดตรีผลามีปริมาณไม่เท่ากัน ทำให้ร้อยละการกักเก็บสารสกัดแตกต่างกันได้



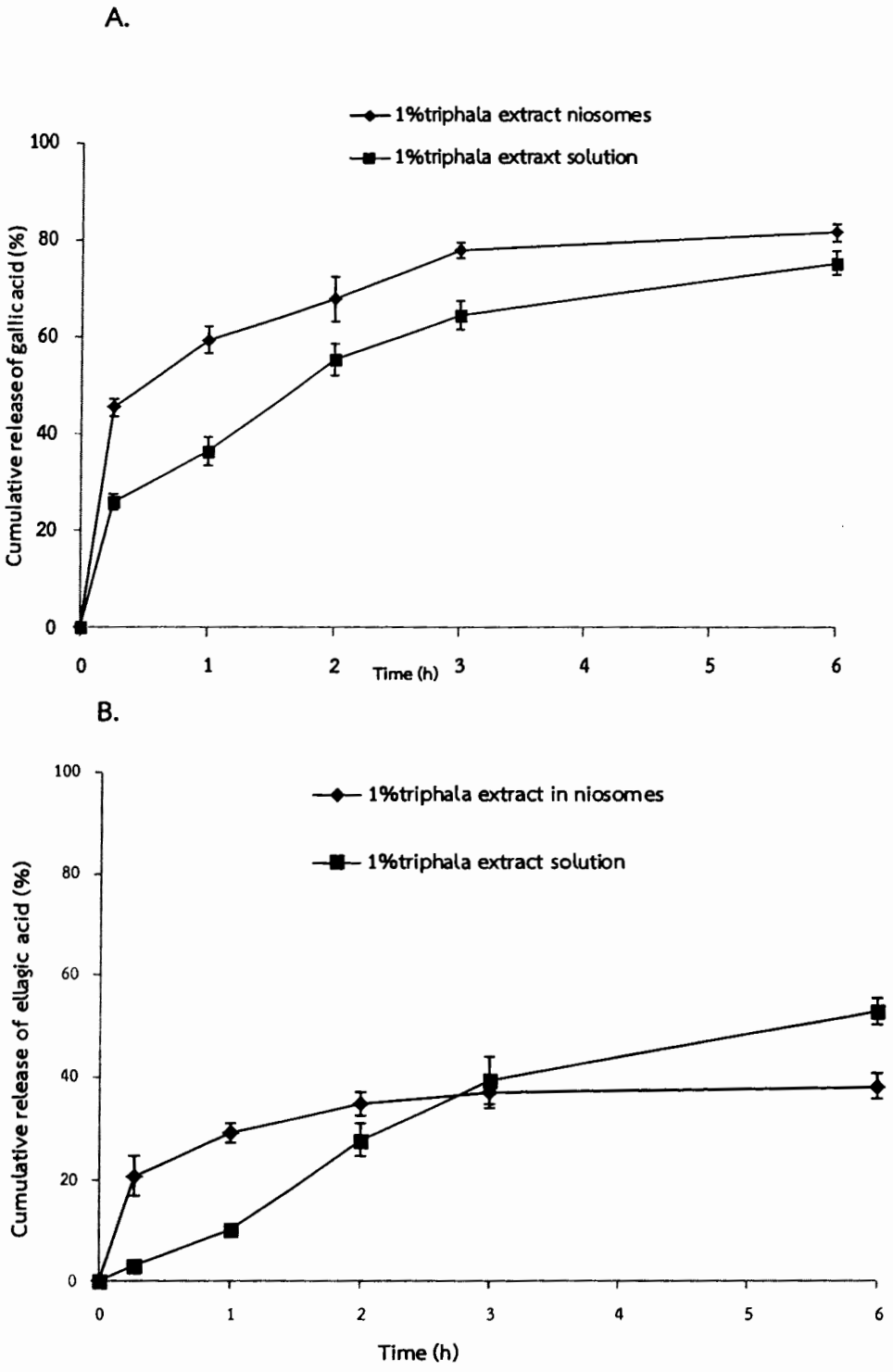
ภาพที่ 4.23 ร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid สูตรตำรับนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5%

เมื่อเตรียมนีโอโซม โดยมีร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid ของสูตรตำรับนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5% ซึ่งเป็นสูตรตำรับที่พัฒนามาจากการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว เพื่อให้สามารถกักเก็บสารเครื่องหมายได้มากพอที่จะเตรียมตำรับเพื่อทดสอบในสัตว์ทดลองได้ พบว่า สูตรตำรับนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % สามารถกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid ได้เท่ากับร้อยละ 38.64±2.19, 36.09±5.63,35.17±4.28 และ 86.04±7.41, 74.92±8.63, 93.91±6.64 ตามลำดับ

จากผลการศึกษาร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid ของสูตรตำรับนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % สามารถกักเก็บสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ได้ ดังนั้น สูตรตำรับทั้ง 3 ความเข้มข้น สามารถนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของเส้นขน และทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation) ในสัตว์ทดลอง ศึกษาการปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของ gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซมด้วยผิวหนังหน้าท้องของสุกรแรกเกิด

4.7 การศึกษาการปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม

จากการศึกษาอัตราเร็วในการปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม เปรียบเทียบกับสารสกัดที่อยู่ในรูปสารละลาย โดยใช้ถุงไดอะไลซิส (molecular weight cut off 12,000-14,000 Daltons) ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายตัวกลาง (release medium) คือ 30% polyethylene glycol 400 ใน phosphate buffer pH 7.4 เพื่อช่วยเพิ่มการละลายของ ellagic acid เขย่าด้วย incubators shaker ที่อุณหภูมิ 32 ℃ อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ผลการศึกษาการปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม แสดงดังภาพที่ 4.24



ภาพที่ 4.24 การปลดปล่อยสารเครื่องหมายจากระบบนำส่งนีโอโซมกับสารละลาย (A) สารเครื่องหมาย gallic acid, (B) สารเครื่องหมาย ellagic acid

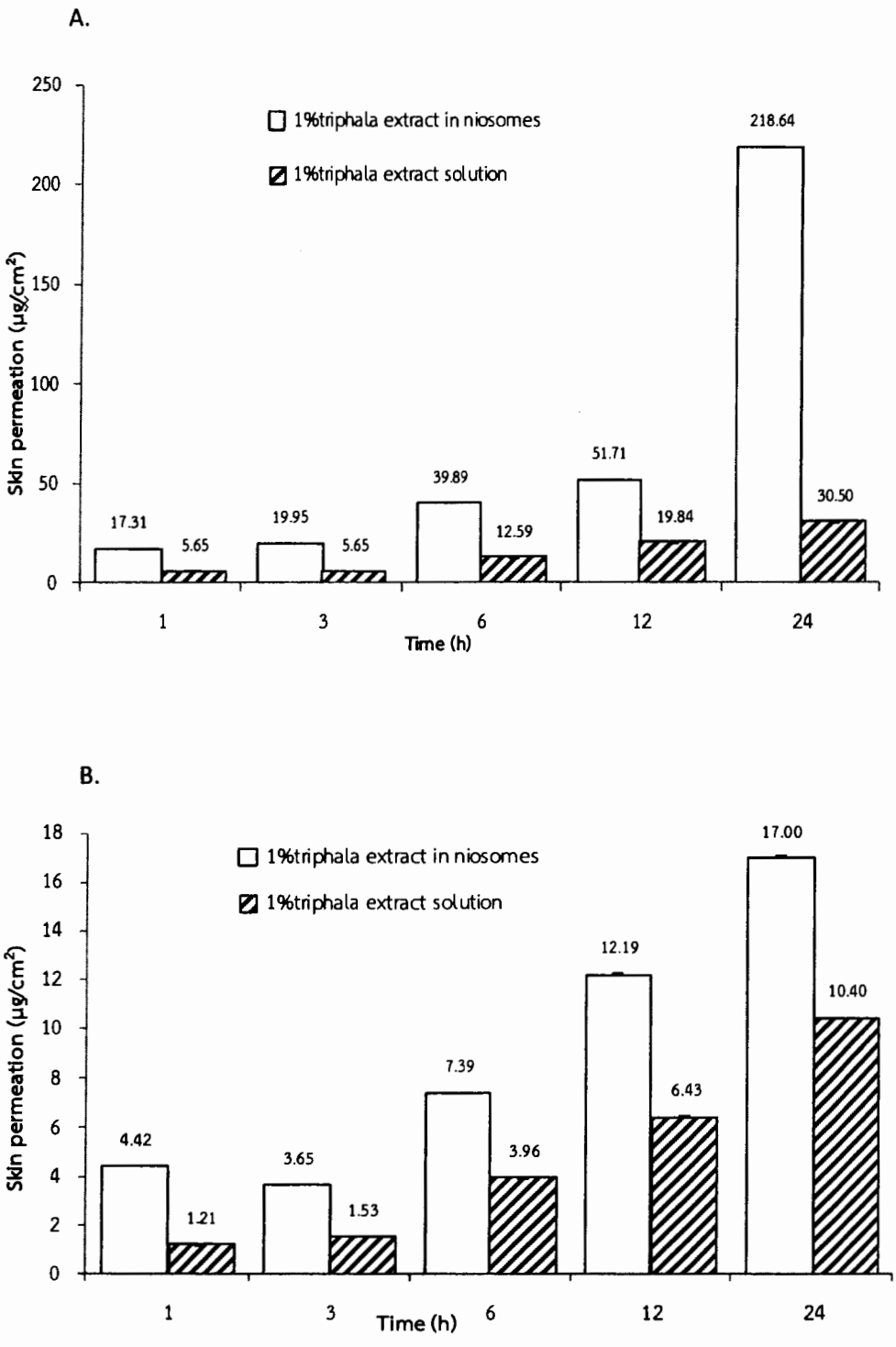
จากการศึกษาการปลดปล่อยสารเครื่องหมายจากระบบนำส่งนีโอโซม พบว่า การปลดปล่อยแบ่งเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกใน 15 นาทีแรก อัตราการปลดปล่อยเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจากสารเครื่องหมายที่ไม่ถูกกักเก็บในนีโอโซม จึงมีการละลายออกมาในตัวกลางที่ทำการศึกษาทันที และหลังจาก 15 นาที อัตราการปลดปล่อยจะเกิดอย่างช้า ๆ ซึ่งการปลดปล่อยนี้เกิดจากสารเครื่องหมายที่ถูกกักเก็บในนีโอโซม ในขณะที่การปลดปล่อยสารเครื่องหมายในรูปสารละลาย พบว่าอัตราการปลดปล่อยสารเครื่องหมายเกิดช้าทั้งใน gallic acid และ ellagic acid

เมื่อเปรียบเทียบการปลดปล่อยสารเครื่องหมายที่กักเก็บในนีโอโซม และในรูปสารละลาย พบว่า อัตราการปลดปล่อยสารเครื่องหมายที่กักเก็บในนีโอโซมมีอัตราเร็วกว่าในรูปสารละลาย เนื่องจาก สารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มอัตราการละลายของสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zaki et al., (2014) โดยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (span® 20) จะเพิ่มการละลายของยาที่ละลายน้ำได้น้อย และการปลดปล่อยสารสกัดขึ้นกับจำนวน alkyl chain ที่อยู่ในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว คือ จำนวน alkyl chain สั้น อัตราการปลดปล่อยสูงกว่าจำนวน alkyl chain สายยาว

4.8 การศึกษาการซึมผ่านผิวของ gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม ด้วยหนังสุกรแรกเกิด

4.9.1 การศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านชั้นผิวหนัง

การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังมีความสำคัญ เพื่อให้ทราบถึงช่องทางในการซึมผ่านผิวหนังของสารสกัด การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังใช้วิธี franz diffusion cell โดยใช้ผิวหนังของสุกรแรกเกิดเป็นแบบจำลอง เนื่องจากมีโครงสร้างของผิวหนังและความสามารถในการซึมผ่านคล้ายกับผิวหนังชั้น stratum corneum ของมนุษย์ (Michnial-Kohn et al, 2005) โดยใช้ 30% polyethylene glycol 400 ใน phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 14 ml เป็น receptor medium ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณการซึมผ่านผิวหนังด้วยวิธี HPLC ผลการศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านชั้นผิวหนัง แสดงดังภาพที่ 4.25

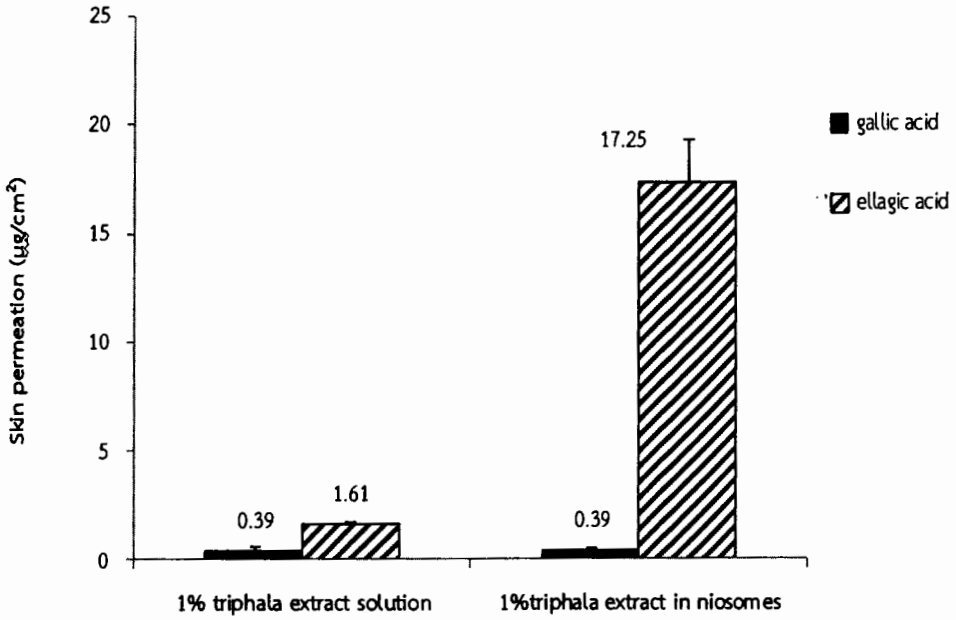


ภาพที่ 4.25 ปริมาณสารเครื่องหมายที่ซึมผ่านชั้นผิวหนัง (A) สารเครื่องหมาย gallic acid, (B) สารเครื่องหมาย ellagic acid

จากการศึกษาปริมาณสารเครื่องหมายที่ซึมผ่านผิวหนัง พบว่า สารเครื่องหมาย gallic acid ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนีโอโซม ที่ 24 ชั่วโมง สามารถซึมผ่านผิวหนังได้มากกว่า gallic acid ที่อยู่ในรูปสารละลาย 7 เท่า แสดงดังภาพที่ 4.25 (A) ปริมาณการซึมผ่าน ellagic acid ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนีโอโซม ที่ 24 ชั่วโมง ได้มากกว่า ellagic acid ที่อยู่ในสารละลาย 1.7 เท่า แสดงดังภาพที่ 4.25 (B)

4.9.2 ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum

การศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum โดย tape striping ผลการศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum แสดงดังภาพที่ 4.26

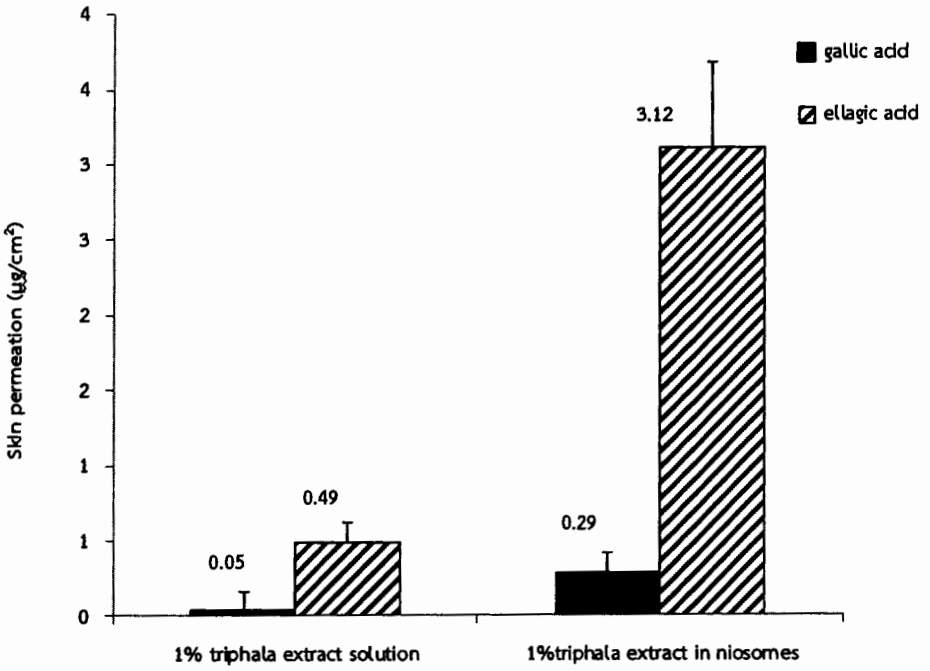


ภาพที่ 4.26 ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum

การศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum พบว่า gallic acid และ ellagic acid ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนีโอโซม สามารถซึมผ่านชั้น stramtum corneum ได้เท่ากับ 0.39±0.11 และ 17.25±2.11 µg/cm^2 ตามลำดับ ซึ่งการซึมผ่าน ellagic acid สูงกว่า gallic acid ประมาณ 43 เท่า

4.9.3 ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านในชั้น epidermis และ dermis

การศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านในชั้น epidermis และ dermis ทำการศึกษาโดยตัดหนังหมูให้มีขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มพื้นที่การละลาย ผลการศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านในชั้น epidermis และ dermis แสดงดังภาพที่ 4.27



ภาพที่ 4.27 ปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น epidermis และ dermis

ผลการศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่กักเก็บในอนุภาคนิโอโซม ที่ซึมผ่านไปในชั้น epidermis และ dermis มีค่าเท่ากับ 0.29±0.13 และ 3.12±0.56 µg/cm^2 ตามลำดับ ซึ่งการซึมผ่าน ellagic acid สูงกว่า gallic acid ประมาณ 10 เท่า

อนุภาคนิโอโซมประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็น lipid bilayer ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ส่วนประกอบของนิโอโซมทั้งสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุและคอเลสเตอรอล จะช่วยในการซึมผ่านผิวหนังของสารเครื่องหมาย (Sarpotdar and Zatz, 1986) ได้ดีขึ้น จากการศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านชั้นผิวหนัง พบว่า gallic acid สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่า ellagic acid ทั้งนี้เนื่องจาก gallic acid เป็นสารที่ละลายน้ำได้ ถูกกักเก็บในส่วนของ polar head group ของอนุภาคนิโอโซม เมื่อซึมผ่านผิวหนังจะไม่ถูกกักเก็บไว้ และขนาดอนุภาค

นีโอโซมอยู่ในช่วง 0.2 – 7 μm สามารถซึมผ่าน transappendageal ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Lademann et al., (1999), Lademann et al., (2001), Lademann et al., (2006) และ Schaefer et al., (2001) พบว่า ขนาดอนุภาคนีโอโซมตั้งแต่น้อยกว่า 3 -10 μm สามารถซึมผ่านเข้า transappendageal ผ่านรูขุมขน ซึ่งจะช่วยเพิ่มการนำส่งสารเครื่องหมายไปยังตำแหน่งการออกฤทธิ์ ส่วนปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum พบว่า ellagic acid จะมีปริมาณมากในชั้น stratum corneum ทั้งนี้เนื่องจาก ellagic acid ถูกกักเก็บในส่วนของ lipid bilayer และเป็นสารที่ชอบไขมัน ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายในน้ำและน้ำมัน (partition coefficient) มากกว่า 1 จะทำให้ ellagic acid ยังคงอยู่ในชั้น stratum corneum ปริมาณมาก ส่วน gallic acid เป็นสารที่ชอบน้ำ จะไม่ถูกกักเก็บในชั้น stratum corneum เช่นเดียวกับปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น epidermis และ dermis พบว่า ellagic acid ยังคงพบปริมาณมากในชั้น epidermis และ dermis ส่วน gallic acid พบปริมาณน้อย เนื่องจากซึมผ่านเข้าชั้น hypodermis และ hair follicle

4.9 การทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซม

จากการทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซม โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นระยะเวลา 3 เดือน และนำมาประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของตำรับนีโอโซม ได้แก่ การวัดขนาดอนุภาค การวัดการกระจายขนาดอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค และความสามารถในการกักเก็บสารสกัด เพื่อศึกษาความคงตัว และการเก็บรักษาตำรับนีโอโซม ผลการศึกษาความคงตัวของตำรับนีโอโซม แสดงดังตารางที่ 4.10 ร้อยละการกักเก็บสารสกัด แสดงดังตารางที่ 4.11 ความคงตัวของสูตรตำรับนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % เป็นการพัฒนาสูตรตำรับเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเส้นขนในหนู C57BL/6Mlac และร้อยละการกักเก็บสารสกัด แสดงดังตารางที่ 4.12 และ 4.13

ตารางที่ 4.10 คุณสมบัติทางกายภาพของตำรับนีโอโซมเมื่อเก็บไว้ที่ 4, 25 และ 45 °C

ระยะเวลาการทดสอบ (วัน)	คุณสมบัติทางกายภาพ	อุณหภูมิที่ทดสอบ		
		4 °C	25 °C	45 °C
1	ขนาดอนุภาค (nm)	166.22±2.84	166.22±2.84	166.22±2.84
	การกระจายอนุภาค	0.20±0.04	0.20±0.04	0.20±0.04
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	34.41±0.26	34.41±0.26	34.41±0.26
7	ขนาดอนุภาค (nm)	170.07±2.15	174.41±2.07	168.85±3.43
	การกระจายอนุภาค	0.19±0.03	0.25±0.02	0.21±0.02
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	36.60±1.64	36.51±0.91	36.25±1.16
15	ขนาดอนุภาค (nm)	173.48±3.86	178.19±2.06	164.11±2.58
	การกระจายอนุภาค	0.18±0.02	0.23±0.03	0.17±0.02
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	35.00±0.97	35.20±1.64	35.97±0.99
30	ขนาดอนุภาค (nm)	172.89±3.42	168.07±2.41	161.52±2.90
	การกระจายอนุภาค	0.19±0.03	0.23±0.02	0.17±0.04
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	37.36±1.10	36.07±1.36	32.21±1.75
60	ขนาดอนุภาค (nm)	178.63±2.81	168.37±2.84	158.37±2.87
	การกระจายอนุภาค	0.23±0.02	0.22±0.03	0.15±0.04
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	35.11±2.32	37.62±1.31	33.80±1.45
90	ขนาดอนุภาค (nm)	200.93±6.21	170.19±3.36	166.78±2.73
	การกระจายอนุภาค	0.30±0.03	0.22±0.11	0.11±0.04
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	36.18±2.56	37.71±0.79	35.24±1.54

ตารางที่ 4.11 ร้อยละการกักเก็บปริมาณ total phenolic content เมื่อเก็บไว้ที่ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาการทดสอบ (วัน)	ร้อยละการกักเก็บสารสกัดพืช		
	4 °C	25 °C	45 °C
1	48.84±2.00	48.84±2.00	48.84±2.00
30	52.47±4.03	51.97±5.85	54.35±4.79
60	51.03±3.51	52.73±6.78	46.75±5.76
90	52.01±4.43	52.59±3.10	44.24±2.89

ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซมเมื่อเก็บไว้ที่ 90 วัน ที่ 4, 25 และ 45 ºC โดยประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของตำรับนีโอโซม ในด้าน ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค แสดงดังตารางที่ 4.10 และร้อยละการกักเก็บสารสกัดของตำรับนีโอโซม แสดงดังตารางที่ 4.11

ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลา ภายใต้สภาวะที่ควบคุมที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 ºC เป็นระยะเวลา 90 วัน โดยประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของตำรับนีโอโซม พบว่า นีโอโซมมีลักษณะสีน้ำนมขาว สีไม่เปลี่ยนแปลง ไม่มีการตกตะกอนของสารสกัด แสดงว่าอุณหภูมิและความชื้นไม่มีผลต่อความคงตัวทางกายภาพของตำรับนีโอโซม และเมื่อนำไปวัดขนาดอนุภาค ค่าการกระจายขนาดของอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค โดยขนาดอนุภาคของนีโอโซมควรมีขนาดใกล้เคียงกัน เพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค ค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเป็นค่าที่บอกถึงขนาดของอนุภาคในตำรับว่ามีค่าใกล้เคียงกันมากน้อยเพียงใด และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเป็นค่าที่บอกถึงความคงตัวของตำรับนีโอโซม ค่านี้จะวัดปริมาณของอิเล็กตรอนที่ผิวบริเวณ shear plane ถ้าค่านี้มากกว่า 30 mV หมายความว่าตำรับมีความคงตัวดี และถ้าค่านี้สูงถึง 60 mV หมายความว่าตำรับมีความคงตัวดีมาก (Mehnert and Mader, 2001) จากผลการทดสอบพบว่า ทุกอุณหภูมิที่ทดสอบ มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 150 - 200 nm ค่าการกระจายขนาดของอนุภาค 0.203 ± 0.042 และมีค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคเฉลี่ยตลอดระยะเวลา 3 เดือน พบว่า ทุกอุณหภูมิมีค่ามากกว่า -30 mV แสดงว่าระบบนีโอโซมมีความคงตัวดี การฟอร์มตัวของสารลดแรงตึงผิวเกิดเป็นอนุภาค โดยมีการแทรกตัวของคอเลสเตอรอล ที่ผนังของอนุภาค ทำให้อนุภาคมีความแข็งแรงมากขึ้น เนื่องจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง span®20 กับคอเลสเตอรอล จะทำให้ไอออนประจุตรงกันข้ามในระบบเกิดการดูดซับที่ผิวของอนุภาค จึงทำให้แสดงประจุลบที่ผิวของอนุภาค ทำให้ผนังของอนุภาคนีโอโซมมีความแข็งแรง อนุภาคนีโอโซมมีความคงตัว และตำรับนีโอโซมทุกอุณหภูมิสามารถกักเก็บสารสกัดได้มากกว่าร้อยละ 45

ตารางที่ 4.12 คุณสมบัติทางกายภาพสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ที่ 25 °C

ระยะเวลาการทดสอบ (วัน)	คุณสมบัติทางกายภาพ	นีโอโซมเปล่า	ความเข้มข้นสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซม		
			1%	2.5%	5%
1	ขนาดอนุภาค (nm)	172.89±1.31	232.33±1.75	413.89±6.97	6722.22±669.22
	การกระจายอนุภาค	0.141±0.01	0.274±0.02	0.355±0.08	0.253±0.07
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	-31.36±0.26	-37.1±1.06	-38.17±0.21	-39.09±0.73
30	ขนาดอนุภาค (nm)	167.67±1.63	254.67±6.09	459.22±5.29	5686.56±429.95
	การกระจายอนุภาค	0.242±0.01	0.253±0.01	0.362±0.02	0.232±0.03
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	-37.62±0.23	-37.5±0.65	-33.28±0.18	-36.01±0.37
60	ขนาดอนุภาค (nm)	171.89±2.49	255.33±2.96	451.78±4.58	7096.22±313.91
	การกระจายอนุภาค	0.165±0.01	0.212±0.01	0.384±0.02	0.252±0.04
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	-33.53±0.39	-37.73±0.47	-37.91±1.47	-35.23±0.41
90	ขนาดอนุภาค (nm)	181.53±1.50	622.78±53.97	2703.33±79.36	5727.11±151.89
	การกระจายอนุภาค	0.255±0.05	0.367±0.04	0.396±0.04	0.825±0.18
	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	-37.21±2.85	-40.59±0.56	-49.68±1.17	-38.84±2.12

ตารางที่ 4.13 ร้อยละการกักเก็บ gallic acid และ ellagic acid ของสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้นต่าง ๆ

สารสกัดตรีผลานีโอโซม (%)	gallic acid	ellagic acid
1.0	38.64±2.19	86.04±7.41
2.5	36.09±5.63	74.92±8.63
5.0	35.17±4.28	93.91±6.64

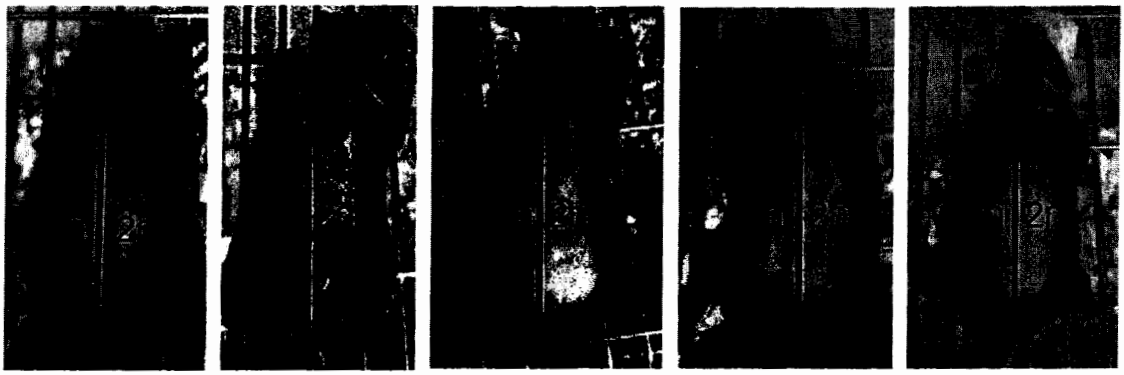
ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5% เมื่อเก็บไว้ที่ 90 วัน ที่ 25 ºC โดยประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และการค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค แสดงดังตารางที่ 4.12 และร้อยละการกักเก็บสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid แสดงดังตารางที่ 4.13

การเพิ่มปริมาณสารสกัดตรีผลา ทำให้ขนาดอนุภาคนีโอโซมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ร้อยละการกักเก็บสารเครื่องหมายไม่ต่างกัน สูตรตำรับที่มีความคงตัวมากที่สุดคือ นีโอโซมความเข้มข้น 1% รองลงมา คือ 2.5 และ 5 % ตามลำดับ โดยขนาดอนุภาคนีโอโซมอยู่ในช่วง 0.2–7 μm ขนาดอนุภาคนีโอโซมนี้สามารถที่จะซึมผ่านเข้าสู่ transappendageal เข้าสู่ hair follicle ได้ ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Lademann et al., (1999), Lademann et al., (2001), Lademann et al., (2006) และ Schaefer et al., (2001) ศึกษาขนาดอนุภาคนีโอโซมเพื่อนำส่งเข้าสู่ transappendageal พบว่า ขนาดอนุภาคนีโอโซมตั้งแต่น้อยกว่า 3-10 μm สามารถผ่านเข้า transappendageal ได้ ทั้งนี้ขนาดอนุภาคนีโอโซมจะผ่านเข้าถึง hair follicle ลึก ๆ ได้ ขึ้นอยู่กับช่วงการทำงานของ hair follicle เช่น เส้นผมกำลังงอก และมีการผลิตน้ำมัน จะมีส่วนช่วยในการซึมผ่านของอนุภาคได้ การนำส่งทาง transappendageal มีข้อดี คือ สารสกัดสามารถเข้าถึงตำแหน่งการออกฤทธิ์ที่ hair follicle ได้โดยตรง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพสารสกัด และเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคยังมากกว่า -30 mV แต่สูตรตำรับนีโอโซมความเข้มข้นร้อยละ 5 เริ่มไม่คงตัวตั้งแต่เดือนที่สองเป็นต้นไป เริ่มมีการตกตะกอนของสารสกัด ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารสกัดที่มากเกิน ทำให้อนุภาคนีโอโซมกักเก็บได้ไม่ทั้งหมด และทำให้ค่าการกระจายขนาดอนุภาคมีหลายขนาด ดังนั้น ตำรับนีโอโซมที่ควรนำไปพัฒนาเป็นเครื่องสำอางเพื่อส่งเสริมการเจริญของเส้นผม คือ นีโอโซมความเข้มข้น 1 และ 2.5 % ส่วนร้อยละการกักเก็บ gallic acid มากกว่าร้อยละ 35 ทั้ง 3 สูตรตำรับ และการกักเก็บ ellagic acid มากกว่าร้อยละ 80

4.10 การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในหนูถีบจักรสายพันธุ์ C57BL/6Mlac

การทดสอบฤทธิ์ของตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาเพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นผมในสัตว์ทดลอง การศึกษานี้ผ่านการอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เลขที่ใบอนุมัติ ID #6 /2556 /Thesis โดยทดสอบในหนูถีบจักรสายพันธุ์ C57BL/6Mlac อายุ 7 สัปดาห์ เพศผู้ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาทดสอบการเจริญของเส้นผม เนื่องจากหนูสายพันธุ์นี้มีขนสีดำ ทำให้สังเกตการเจริญของเส้นขนได้ง่าย มีวงชีวิตการเจริญของเส้นขนคล้ายกับในมนุษย์ อายุหนูอยู่ในช่วง 7-8 สัปดาห์ เป็นช่วงที่มีวงชีวิตการเจริญของเส้นขนอยู่ในระยะเทโลเจน เป็นช่วงที่เหมาะสมในการศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเส้นผมจากระยะเทโลเจน เข้าสู่ระยะอนาเจน และการศึกษาส่วนใหญ่ทำการทดสอบที่ 4 สัปดาห์ (Kumar et al., 2011; Kumar et al., 2012; Lee et al., 2010) เนื่องจากเส้นขนในสัตว์ทดลองงอกเต็มพื้นที่ทดสอบ การศึกษาประสิทธิภาพในการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในสัตว์ทดลอง เป็นการเปรียบเทียบสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในอนุภาคนีโอโซมกับผลิตภัณฑ์ที่มีในท้องตลาด โดยใช้ 2% minoxidil solution เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก (positive control) และการศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในอนุภาคนีโอโซม ไม่ใช่เป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลา โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) กลุ่มควบคุมผลบวก (positive control) กลุ่มทดสอบ 3 กลุ่ม คือ สูตรตำรับสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % และสารละลายสารสกัดตรีผลาความเข้มข้น 1 % โดยกลุ่มควบคุมลบแบ่งพื้นที่ทดสอบบนหลังของหนูเป็นซ้ายและขวา ด้านซ้ายไม่ทาสาร ส่วนด้านขวาทานีโอโซมเปล่าในกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มทดสอบ โดยทาสารทดสอบเต็มพื้นที่ทดสอบ การศึกษาประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของเส้นขนในสัตว์ทดลอง และสังเกตความเข้มของสีขนที่เกิดขึ้นใหม่ ศึกษาเนื้อเยื่อผิวหนังของหนู เพื่อประเมินระยะการเจริญของเส้นขน (hair cycle) และจำนวน hair follicle ที่พบในผิวหนัง โดยทำการทดลอง 4 สัปดาห์ ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการกระตุ้นการงอกของเส้นขนในสัตว์ทดลอง แสดงดังภาพที่ 4.28

(ก) Negative control 1ก): ไม่ทาสารใด 2ก): ทา blank niosomes



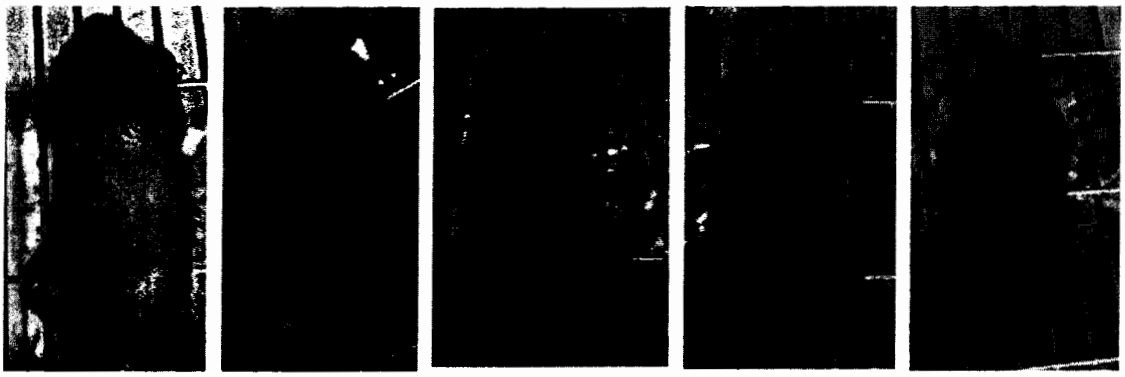
(ข) Positive control

(ค) 1% Triphala solution

สัปดาห์ที่ 0 สัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4

ภาพที่ 4.28 ภาพถ่ายการเจริญของเส้นขนในหนูหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac

(ง) 1% Triphala niosomes



(จ) 2.5 % Triphala niosomes

(ฉ) 5% Triphala niosomes

สัปดาห์ที่ 0 สัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4

ภาพที่ 4.28 ภาพถ่ายการเจริญของเส้นขนในหนูหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac **(ต่อ)**

จากผลการทดลองการศึกษาประสิทธิภาพของตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาเพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นผมในสัตว์ทดลอง พบว่า ในสัปดาห์ที่ 0 ไม่มีการเจริญของเส้นขนในทุกกลุ่มการทดลอง

ในสัปดาห์ที่ 1 พบว่า หนูถีบจักรในกลุ่มที่ทาตำรับความเข้มข้น 5% เริ่มมีการงอกของเส้นขนน้อยกว่าร้อยละ 20 ของพื้นที่ทดสอบ โดยมีขนสีดำเริ่มงอก และเริ่มมีขนสีดำ ในบริเวณพื้นที่ทดสอบ ส่วนในกลุ่มทดสอบอื่น ๆ ยังไม่พบการงอกของเส้นขน

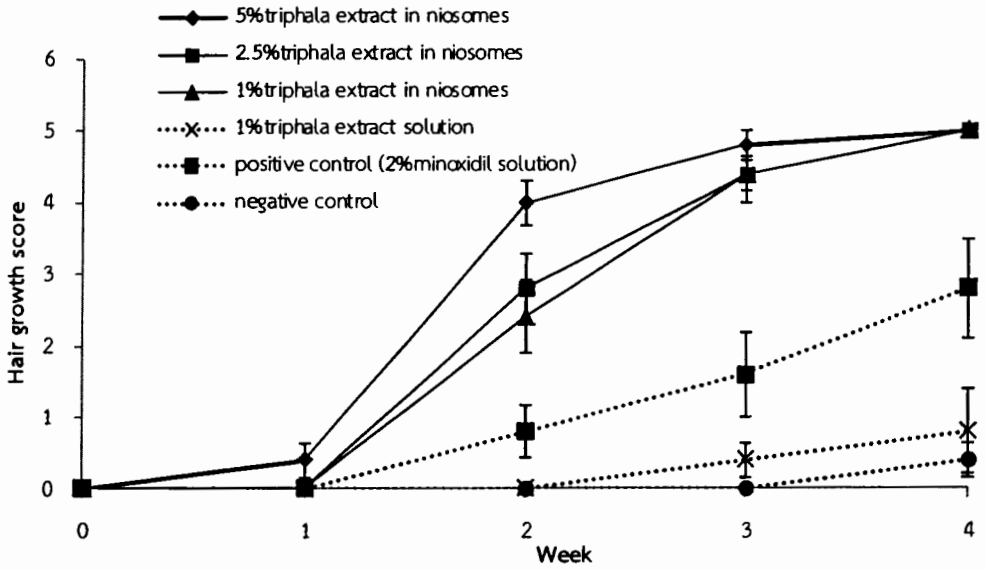
ในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า กลุ่มควบคุมผลลบและกลุ่มที่ทาด้วยสารละลายความเข้มข้น 1 % ของสารสกัดตรีผลายังไม่พบการงอกของเส้นขน กลุ่มที่ทาด้วย 2% minoxidil solution พบการงอกของเส้นขนน้อยกว่าร้อยละ 20 ของพื้นที่ทดสอบ กลุ่มที่ทาด้วยสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้น 1 และ 2.5 % พบการงอกของเส้นขน ร้อยละ 20 – 40 ของพื้นที่ทดสอบ ส่วนกลุ่มที่ทาด้วยสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้น 5% พบการงอกของเส้นขนร้อยละ 60 – 80 ของพื้นที่ทดสอบ โดยเส้นขนที่งอกสามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน และขนมีสีดำเข้ม

ในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า กลุ่มที่ทาด้วย 2% minoxidil solution พบการงอกของเส้นขนร้อยละ 20 – 40 ของพื้นที่ทดสอบ กลุ่มที่ทาด้วยสารละลาย 1% ของสารสกัดตรีผลาพบการงอกของเส้นขนน้อยกว่าร้อยละ 20 ของพื้นที่ทดสอบ กลุ่มที่ทาด้วยสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % พบการงอกของเส้นขนร้อยละ 60 – 80 ของพื้นที่ทดสอบ โดยเส้นขนที่งอกสามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน และขนมีสีดำเข้ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งยังไม่พบการงอกของเส้นขน

ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า กลุ่มควบคุมพบการงอกของเส้นขนน้อยกว่าร้อยละ 20 ของพื้นที่ทดสอบ กลุ่มที่ทาด้วย 2% minoxidil solution พบการงอกของเส้นขนร้อยละ 20 – 40 ของพื้นที่ทดสอบ กลุ่มที่ทาด้วยสารละลาย 1% ของสารสกัดตรีผลาพบการงอกของเส้นขนน้อยกว่าร้อยละ 20 ของพื้นที่ทดสอบ ส่วนกลุ่มที่ทาด้วยสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % พบการงอกของเส้นขนเต็มพื้นที่ทดสอบ เส้นขนมีสีดำเข้ม มีการงอกของเส้นขนมากกว่าร้อยละ 80 ของพื้นที่ทดสอบ

ผลการสังเกตการงอกของเส้นขนในหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้น 5% พบว่า อัตราการงอกของเส้นขนสูงกว่าสารสกัดตรีผลาความเข้มข้น 1 และ 2.5% เนื่องจากสารสกัดตรีผลาความเข้มข้น 5% มีขนาดอนุภาคนีโอโซม 6.27±0.66 μm ซึ่งขนาดอนุภาคนี้สามารถซึมผ่านเข้าทาง transappendageal สอดคล้องกับการศึกษาของ Lademann et al., (1999); Lademann et al., (2001); Lademann et al., (2006); Schaefer et al., (2001) ผ่านเข้าสู่ hair follicle โดยเข้าไปกระตุ้น hair bulb โดยตรง

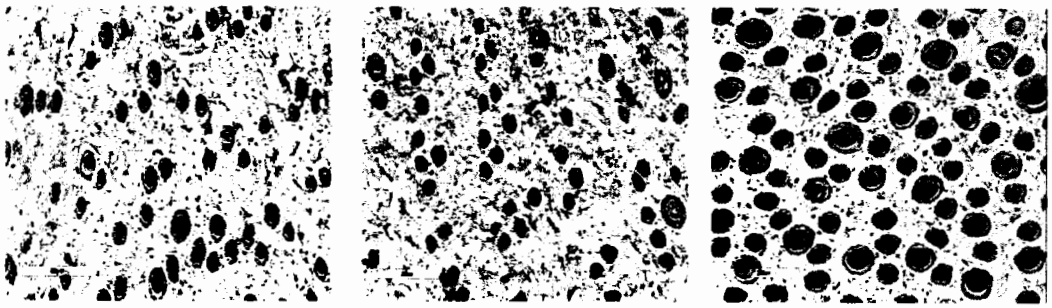
และเมื่อนำมาประเมินตามเกณฑ์การเจริญของเส้นขน แสดงดังในภาพที่ 4.29 และผลการศึกษาเนื้อเยื่อผิวหนังของหนูถีบจักรสายพันธุ์ C57BL/6Mlac เพื่อศึกษาระยะการเจริญ จำนวนและขนาดของ hair follicle แสดงดังภาพที่ 4.30 – 4.31



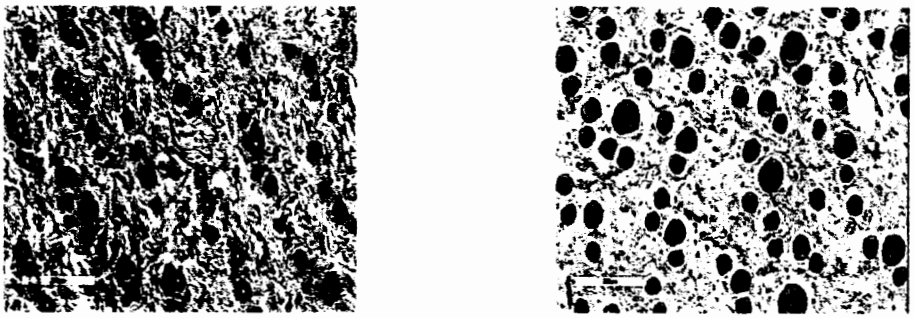
ภาพที่ 4.29 การเจริญของเส้นขนในหนู C57BL/6Mlac mice ประเมินตามเกณฑ์การเจริญขนเส้นผม, mean±S.E.M, n=5

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกระตุ้นการเจริญของเส้นขนประเมินตามเกณฑ์การเจริญของเส้นขนของตำรับนิโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5% (triphala niosomes) สารละลาย 1 % สารสกัดตรีผลา (1% triphala solution) กลุ่มควบคุมบวก (positive control) และกลุ่มควบคุมลบ (blank niosomes) ในหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เพศผู้ พบว่า สารสกัดตรีผลานิโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % สามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นขนเพิ่มขึ้นตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบ

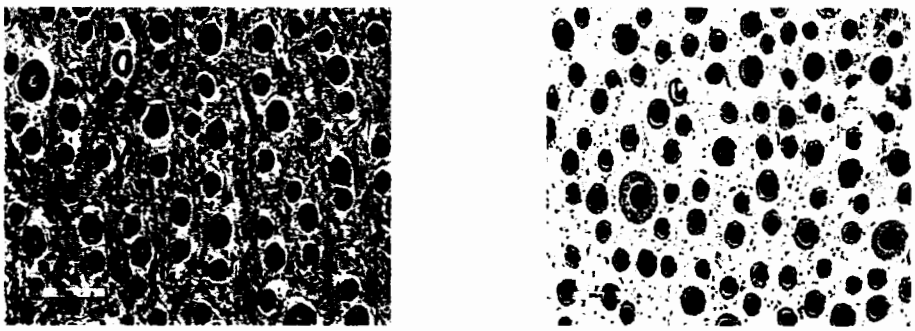
จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการกระตุ้นการเจริญของเส้นผมประเมินตามเกณฑ์การเจริญของเส้นผม เส้นกราฟที่บอกการเจริญของเส้นขนตามปกติคือ เส้นกราฟในหนูที่ไม่ได้ทาสารใด ๆ ส่วนการเจริญของเส้นขนในหนูที่ทาด้วย 2% minoxidil solution การเจริญของเส้นขนจะเป็นแบบคงที่ ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ในกลุ่มหนูที่ทาด้วยสารสกัดตรีผลานิโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % จะกระตุ้นการเจริญของเส้นขน โดยจะเพิ่มอัตราการเจริญของเส้นขน ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar et al., (2012)



(1ก) (2ก) (ข)

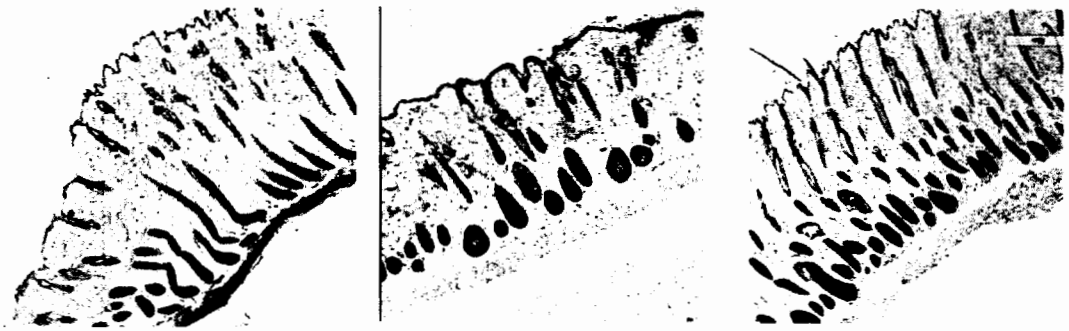


(ค) (ง)

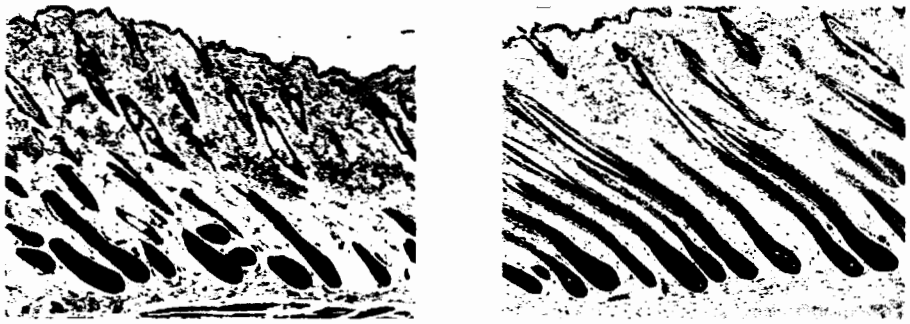


(จ) (ฉ)

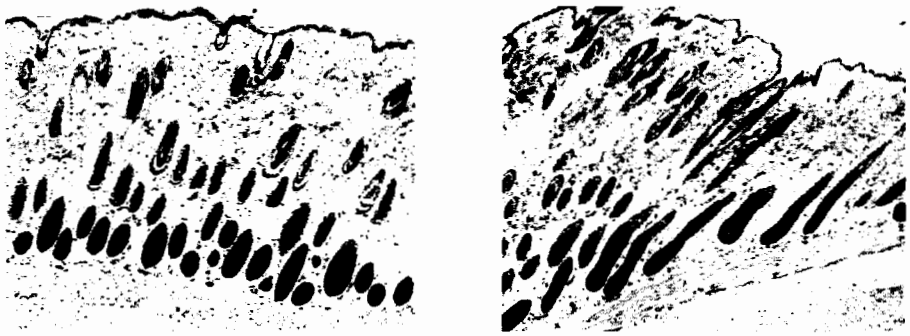
ภาพที่ 4.30 ภาพตัดขวางผิวหนังหนูถีบจักรเมื่อ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; นีโอโซมเปล่า) (ข) 2% minoxidil solution (ค) 1% Triphala solution (ง)1% Tirphala niosomes (จ) 2.5% Tirphala niosomes (ฉ) 5% Tirphala niosomes ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง



(1ก) (2ก) (ข)

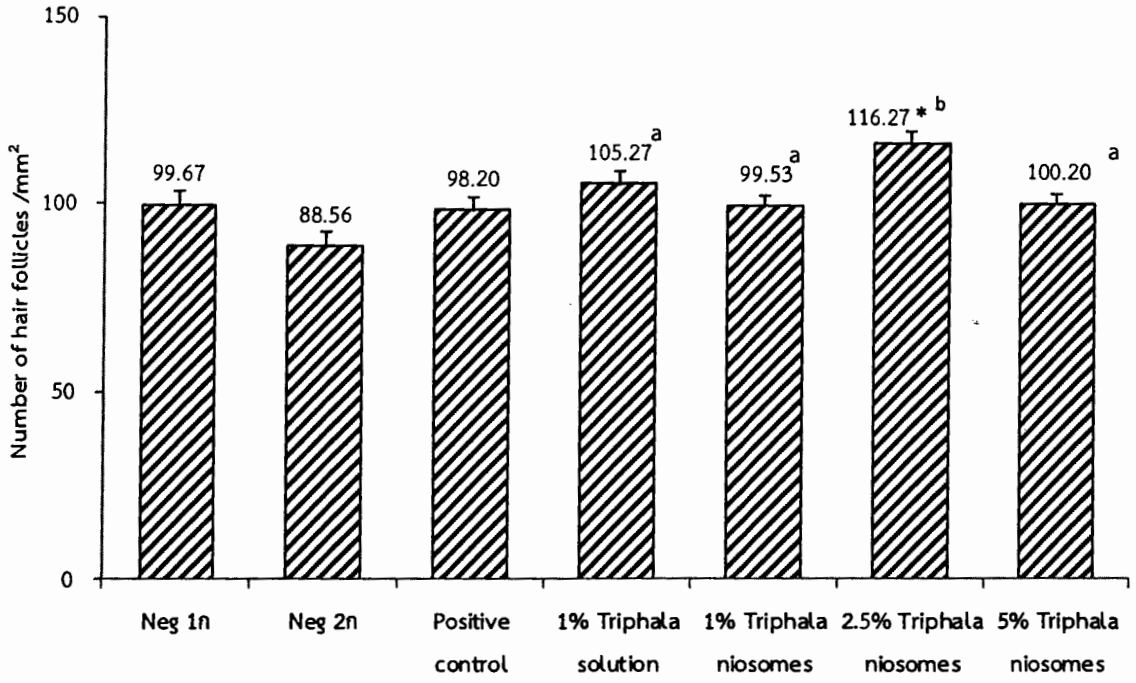


(ค) (ง)



(จ) (ฉ)

ภาพที่ 4.31 ภาพตัดตามยาวผิวหนังของหนูถีบจักรเมื่อ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; นีโอโซมเปล่า) (ข) 2% minoxidil solution (ค) 1% Triphala solution (ง) 1% tirphala niosomes (จ) 2.5% Tirphala niosomes (ฉ) 5% Tirphala niosomes ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4x ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง



ภาพที่ 4.32 จำนวน hair follicle ในหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบต่าง ๆ mean±SEM, (n=5)

*** แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติที่ $p < 0.05$ (n=5)**

a; ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ (n=5)

b; แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (n=5)

ภาพที่ 4.30, 4.31 และภาพที่ 4.32 ภาพตัดตามขวาง ภาพตัดตามยาวผิวหนังหนู และจำนวน hair follicle ของกลุ่มทดสอบในหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เพื่อศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อผิวหนังเมื่อทดสอบด้วย (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; นีโอโซมเปล่า) (ข) 2% minoxidil solution (ค) 1% triphala solution (ง) 1% tirphala niosomes (จ) 2.5% tirphala niosomes (ฉ) 5% tirphala niosomes โดยการศึกษาภาพตัดขวางสามารถบอกจำนวน hair follicle ที่พบได้ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x ส่วนภาพตัดตามยาวผิวหนังสามารถบอกระยะการเจริญของเส้นขนได้ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4x ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง พบว่า จำนวน hair follicle ในกลุ่มที่ทดสอบด้วย 2.5% tirphala niosomes พบมากที่สุด รองลงมาคือ 1% triphala solution, 5% tirphala niosomes, 1% tirphala niosomes และ 2% minoxidil solution ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า กลุ่มที่ทดสอบด้วย 2.5%

tirphala niosomes มีจำนวน hair follicle แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วย 2% minoxidil solution พบว่า กลุ่มที่ทดสอบด้วย 2.5% tirphala niosomes มีจำนวน hair follicle แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และผลการศึกษาภาพตัดตามยาวของผิวหนัง พบว่า ระยะการเจริญของเส้นขนในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5% อยู่ในระยะอนาเจน เนื่องจากมีจำนวน hair follicle เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผลบวก

กลุ่มหนูที่ทดสอบด้วยสารสกัดตรีผลานีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5% สามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นขนได้ เนื่องจาก สารสกัดตรีผลาน่าจะไปเพิ่มการทำงานของ hair follicle และกระตุ้นระยะเทโลเจนให้เข้าสู่ระยะอนาเจน และเอนไซม์ 5α-reductase ในเซลล์รากผมเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์รากผมมีขนาดเล็กลง (Sinclair., 2004) และจากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase พบว่า สารสกัดตรีผลาสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้ ทำให้ระดับเอนไซม์ 5α-reductase ในเซลล์รากผมลดลง ทำให้ปริมาณ DHT ลดลง จะทำให้ hair follicle มีขนาดใหญ่ขึ้น และทำให้เส้นขนที่เจริญขึ้นมาใหม่มีขนาดใหญ่ขึ้น แข็งแรงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar et al., (2012) การอธิบายนี้ สามารถอธิบายได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า FEA กับฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเส้นขน คือ สารสกัดที่มีค่า FEA สูง จะเพิ่มจำนวนของ hair follicle และนำไปสู่การเพิ่มการเจริญของเส้นขน

4.11 ทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation) ในกระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zeland

การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในกระต่ายขาว สายพันธุ์ New Zeland โดยการศึกษานี้ผ่านการอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เลขที่ใบอนุมัติ ID #6 /2556 /Thesis การระคายเคืองผิวหนังเป็นอาการข้างเคียงหนึ่งที่อาจพบจากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของตัวยาสำคัญ สารช่วยต่าง ๆ ในตำรับ การเกิดการระคายเคืองผิวหนังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของยา ระยะเวลาที่สัมผัส ความถี่ในการสัมผัส ตำแหน่งของผิวหนัง อัตราการซึมผ่าน และความเป็นพิษของสารที่ใช้ (Jeeratikorn et al., 2007) การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในการศึกษานี้ จำเป็นต้องทดสอบ เนื่องจากสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ที่ใช้ในการศึกษา มีฤทธิ์เป็นกรด และเป็นการศึกษาความปลอดภัยขนาดของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบการกระตุ้นการเจริญของเส้นผม การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลองด้วยเทคนิค closed patch test (Schmitt et al., 2008) โดยแบ่งกลุ่มทดสอบออกเป็น 6 กลุ่ม ผลการทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.14 และ 4.15

ตารางที่ 4.14 ระดับคะแนนการระคายเคืองผิวในกระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zealand

กลุ่มทดสอบ	ระยะเวลาที่ทดสอบจนถึงการแสดงการระคายเคือง							
	1 ชั่วโมง		24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม
gauze pad	0	0	0	0	0	0	0	0
5% sodium lauryl sulphate	1.7	0	2.0	0	1.0	0	1.0	0
blank niosomes	0	0	0	0	0	0	0	0
1% triphala niosomes	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5% triphala niosomes	0	0	0	0	0	0	0	0
5% triphala niosomes	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 4.15 ระดับการระคายเคืองผิวในกระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zealand

กลุ่มทดสอบ	Primary irritation index	ระดับการระคายเคืองผิว
gauze pad	0.00	ไม่ระคายเคือง
5% sodium lauryl sulphate	1.42	ระคายเคืองเล็กน้อย
blank niosomes	0.00	ไม่ระคายเคือง
1% triphala in niosomes	0.00	ไม่ระคายเคือง
2.5% triphala in niosomes	0.00	ไม่ระคายเคือง
5% triphala in niosomes	0.00	ไม่ระคายเคือง

จากผลการศึกษาการระคายเคืองผิวหนัง พบว่า ไม่พบการระคายเคืองผิวหนังในสูตรตำรับนิโอโซมที่ทำการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (5% sodium lauryl sulphate) โดยมีค่าคะแนนการระคายเคืองผิวหนัง เท่ากับ 0.00 หมายความว่า ไม่เกิดการระคายเคืองผิวหนัง

จากผลการทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในกระต่าย ไม่พบการระคายเคืองจากตำรับที่ทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบของตำรับนิโอโซมประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และยังสามารถสลายตัวในร่างกายได้ ส่วนสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ถูกกักเก็บในส่วนของ polar head group และ lipid bilayer ของอนุภาคนิโอโซม ซึ่งจะไม่สัมผัสกับผิวหนังโดยตรง จะช่วยลดอาการไม่พึงประสงค์ และการระคายเคืองผิวหนังได้

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

5.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

สารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ สมอพิเภก สมอไทย และมะขามป้อม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 640±11.69, 642.93±15.23, 731.66±13.72 mg EAE/g sample และ 821.91±15.00, 824.90±19.55, 938.73±17.60 mg GAE/g sample ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากการนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิดมารวมกันในรูปของสารสกัดตรีผลา พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอกลิก เท่ากับ 692.13±23 mg EAE/g sample และ 888.02±29.52 mg GAE/g sample ตามลำดับ

5.1.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเครื่องหมาย (marker) ในสารสกัด

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดสมอพิเภก สมอไทย และมะขามป้อม มีปริมาณสาร gallic acid และ ellagic acid เท่ากับ 56.28±1.07, 90.42±0.77, 146.19±0.24 และ 8.79±0.01, 7.27±0.00, 4.44±0.01 mg/g extract ตามลำดับ และในสารสกัดตรีผลามีปริมาณ gallic acid และ ellagic acid เท่ากับ 105.93±0.39 และ 8.06±0.03 mg/g extract ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดทั้ง 3 ชนิด และสารสกัดตรีผลามีปริมาณ gallic acid สูงกว่า ellagic acid

5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด และสารสกัดตรีผลา โดยทดสอบ 3 วิธี คือ $DPPH^{\cdot}$, $ABTS^{\cdot+}$ และ FRAP พบว่า ให้ผลการศึกษาเหมือนกัน คือ สารสกัดมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด สารสกัดตรีผลามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับสารสกัดมะขามป้อม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยสารที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน ซึ่งการศึกษานี้ให้ผลการศึกษาสอดคล้องกัน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตรีผลาเป็นอีกฤทธิ์หนึ่งที่อาจจะไปกระตุ้นการเจริญของเส้นผม ด้วยการป้องกันขัดขวาง และการเปลี่ยนแปลงอายุของเส้นผม (Chao-Chum et al., 2014)

5.1.4 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase พบว่า สารสกัดมะขามป้อมแตกต่างจากสารสกัดสมอพิเภก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่ต่างจากสารสกัดสมอไทย ($p>0.05$) ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้ง 5α-reductase ของสารสกัดตรีผลาแตกต่างจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) สารสกัดตรีผลามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ 5α-reductase มากกว่าสารสกัดเดี่ยว เนื่องจากสารสกัดตรีผลาอาจมีสารอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์เสริมการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase ที่ยังไม่ได้ศึกษา ซึ่งผลการศึกษานี้สนับสนุนการใช้สารสกัดตรีผลาที่เหนือกว่าการใช้สารสกัดเดี่ยว และฤทธิ์ดังกล่าวนี้จะทำให้ปริมาณ DHT ลดลง ซึ่งจะช่วยลดการหลุดร่วงของเส้นผมได้

5.1.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว โดยกำหนดตัวแปรอิสระคือ ปริมาณไขมันทั้งหมด ปริมาณคอเลสเตอรอล และปริมาณสารสกัด ตัวแปรตอบสนอง คือ ขนาดอนุภาคนีโอโซม และร้อยละการกักเก็บสารสกัด พบว่า ต้องใช้ปริมาณไขมันทั้งหมดเท่ากับ 50 mM ปริมาณคอเลสเตอรอลเท่ากับร้อยละ 10 และปริมาณสารสกัดเท่ากับร้อยละ 0.1 ได้ค่าการตอบสนองขนาดอนุภาคนีโอโซมเท่ากับ 188.10 ± 16.34 nm และร้อยละการกักเก็บสารสกัดเท่ากับ 46.43 ± 4.20 ซึ่งค่าที่ได้จากการทำนายด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลองจริง คือ ขนาดอนุภาคนีโอโซมเท่ากับ 163.89 ± 4.43 และร้อยละการกักเก็บสารสกัดเท่ากับ 47.68 ± 4.68 ดังนั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ และมีข้อดีคือ สามารถศึกษาตัวแปรหลาย ๆ ตัวแปรพร้อมกันและทราบผลกระทบที่เกิดจากตัวแปรที่ทำการศึกษา

5.1.6 การวิเคราะห์หาร้อยละการเก็บกักสารเครื่องหมายในนีโอโซม

ผลการวิเคราะห์ร้อยละการกักเก็บสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ในอนุภาคนีโอโซม พบว่า สามารถกักเก็บ gallic acid และ elllagic acid ได้เท่ากับร้อยละ 44.16±0.03 และ 79.21±0.06 ตามลำดับ ในนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % สามารถกักเก็บ gallic acid ได้มากกว่าร้อยละ 35 และ elllagic acid ได้มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่ง gallic acid จะถูกกักเก็บในส่วน polar head group และ ellagic acid จะถูกกักเก็บไว้ที่ lipid bilayer ในอนุภาคนีโอโซม ซึ่งสารเครื่องหมายทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase ทำให้ testosterone ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น DHT ทำให้ปริมาณ DHT ลดลง ซึ่งจะช่วยลดการหลุดร่วงของเส้นผมได้

5.1.7 การศึกษาการปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม

ผลการการศึกษาการปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซม พบว่า การปลดปล่อยสาร gallic acid และ ellagic acid ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนีโอโซมจะถูกปลดปล่อยได้ดีกว่าในรูปสารละลาย และการปลดปล่อยเป็นแบบค่อย ๆ ปลดปล่อยสารเครื่องหมายออกมา ส่วน gallic acid และ ellagic acid ที่อยู่ในรูปสารละลายจะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็ว จึงสรุปได้ว่าตำรับนีโอโซมที่กักเก็บสารสกัดตรีผลามีการปลดปล่อยสารเครื่องหมายแบบออกฤทธิ์เนิ่น ซึ่งมีข้อดีคือ ลดจำนวนครั้งในการใช้ และลดอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดการระคายเคืองผิวหนัง

5.1.8 การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของ gallic acid และ ellagic acid จากระบบนำส่งนีโอโซมด้วยหนังสุกรแรกเกิด

ผลการศึกษาปริมาณสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านชั้นผิวหนังที่ 24 ชั่วโมง พบว่า gallic acid ที่กักเก็บในนีโอโซม สามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้มากกว่า gallic acid ที่อยู่ในรูปสารละลาย และ ellagic acid ที่ถูกกักเก็บในนีโอโซมสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้มากกว่า ellagic acid ที่อยู่ในรูปสารละลาย

ผลการศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านไปในชั้น stratum corneum พบว่า ellagic acid ที่ถูกกักเก็บในนีโอโซม สามารถซึมผ่านเข้าไปในชั้น stratum corneum ได้มากกว่า gallic acid และซึมผ่านได้มากกว่า ellagic acid ที่อยู่ในรูปสารละลาย

ผลการศึกษาปริมาณ gallic acid และ ellagic acid ที่ซึมผ่านในชั้น epidermis และ dermis พบว่า ellagic acid ที่ถูกกักเก็บในนีโอโซม สามารถซึมผ่านเข้าไปในชั้น epidermis และ dermis ได้มากกว่า gallic acid และซึมผ่านได้มากกว่า ellagic acid ที่อยู่ในรูปสารละลาย

ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ระบบนำส่งนีโอโซมสามรถนำส่งสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid ได้ทั้งทางผิวหนัง และทางรูขุมขน (transfollicular) ซึ่งเป็นข้อดีของการนำส่งสารเครื่องหมายไปยังตำแหน่งการออกฤทธิ์โดยตรง และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารเครื่องหมาย

5.1.9 การทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซม

การทดสอบความคงตัวของตำรับนีโอโซมเมื่อเก็บไว้ที่ 4, 25 และ 45 °C เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า อนุภาคนีโอโซมที่กักเก็บสารสกัดตรีผลามีความคงตัวดี โดยมีขนาดอนุภาคนีโอโซมทุกอุณหภูมิอยู่ในช่วง 150 - 200 nm ค่าการกระจายขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 0.203 ± 0.042 และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเฉลี่ยตลอดระยะเวลา 90 วัน ทุกอุณหภูมิมีค่ามากกว่า -30 mV และร้อยละการกักเก็บสารสกัดมากกว่าร้อยละ 45

ผลการศึกษาความคงตัวของสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5% พบว่า ขนาดอนุภาคนีโอโซมอยู่ในช่วง 0.2 – 7 μm ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคมากกว่า -30 mV แต่สารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมความเข้มข้น 5% เริ่มไม่คงตัวในเดือนที่ 2 เป็นต้นไป โดยเริ่มมีการตกตะกอนของสารสกัด และขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนร้อยละการกักเก็บสารเครื่องหมายสามารถกักเก็บสารเครื่องหมาย gallic acid ได้มากกว่าร้อยละ 35 และ ellagic acid ได้มากกว่าร้อยละ 80 ดังนั้น สารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมความเข้มข้น 1 และ 2.5 % เป็นสูตรตำรับที่ควรจะพัฒนาในทางเครื่องสำอางที่ลดการหลุดร่วงของเส้นผม และช่วยกระตุ้นการเจริญของเส้นผมต่อไป

5.1.10 การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกของเส้นผมในสัตว์ทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกของเส้นขนในหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 6 กลุ่ม โดยใช้ 2% minoxidil solution เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก ทำการศึกษา 4 สัปดาห์ สังเกตการงอกของเส้นขนจากภาพถ่าย โดยการให้คะแนนการงอกของเส้นขน ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 พบว่า กลุ่มการทดลองที่ทดสอบด้วยสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5% พบการงอกของเส้นขนมากกว่าร้อยละ 80 ในสัปดาห์ที่ 4 ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดตรีผลาเพิ่มอัตราการงอกของเส้นขน ทำให้เส้นขนยาวเร็วขึ้น ซึ่งยาวเร็วกว่ากลุ่มควบคุม และผลการศึกษาเนื้อเยื่อผิวหนังของหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เมื่อสิ้นสุดการสังเกตการงอกของเส้นขนในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า กลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมความเข้มข้น 2.5% มีจำนวนและขนาดของ hair follicles เพิ่มขึ้น แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนระยะการงอกเส้นขนสามารถบอกได้จากภาพเนื้อเยื่อตัดตามยาว พบว่า ระยะการงอกของเส้นขนในกลุ่มที่ทดสอบทั้งหมดอยู่ในระยะอนาเจน เนื่องจากพบการงอกของเซลล์รากขนจำนวนมาก ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมสามารถกระตุ้นการงอกของเส้นขนได้ โดยกระตุ้นการเจริญของเส้นขนจากระยะเทโลเจนให้เข้าสู่ระยะอนาเจน กระตุ้นการทำงานของเซลล์รากขนในระยะอนาเจน เพิ่มขนาดของเซลล์รากขน ทำให้เส้นขนที่งอกขึ้นมาใหม่มีขนาดใหญ่ขึ้น และแข็งแรงขึ้น

5.1.11 ทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation) ในสัตว์ทดลอง

ผลการทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในกระต่ายขาวสายพันธุ์ New Zealand แบ่งกลุ่มการทดสอบเป็น 6 กลุ่ม โดยใช้ 5% sodium lauryl sulphate เป็นกลุ่มควบคุม สังเกตการระคายเคืองผิวหนังที่ 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมความเข้มข้น 1, 2.5 และ 5 % ไม่พบการระคายเคืองผิวหนัง ทั้งนี้เนื่องจากสารเครื่องหมาย gallic acid และ ellagic acid บางส่วนถูกกักเก็บในอนุภาคโอโซม ทำให้สารเครื่องหมายทั้ง 2 ชนิด ไม่สัมผัสกับผิวหนังโดยตรง จึงไม่เกิดการระคายเคืองผิวหนัง นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่เป็นส่วนประกอบของอนุภาคนีโอโซม เป็นสารที่ไม่เป็นพิษ สามารถสลายตัวในร่างกายได้

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สารสกัดตรีผลาช่วยลดการหลุดร่วงของเส้นผมได้ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน testosterone ให้เป็น DHT ทำให้ปริมาณ DHT ลดลง ซึ่งจะช่วยลดการหลุดร่วงของเส้นผมได้ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตรีผลาอาจมีส่วนช่วยชะลอการแก่ของเซลล์ ช่วยลดการหลุดร่วงของเส้นผมได้เช่นกัน สารสกัดตรีผลาสามารถเตรียมให้กักเก็บในนีโอโซมได้ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซม ได้ขนาดอนุภาคนีโอโซมที่เหมาะสมในการนำส่งทางรูขุมขน และได้ร้อยละการกักเก็บสารเครื่องหมาย gallic acid มากกว่าร้อยละ 35 และ ellagic acid มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งสารเครื่องหมายทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ 5α-reductase ทราบฤทธิ์ของสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมที่สามารถกระตุ้นการงอกของเส้นผมได้ โดยสารสกัดตรีผลาทำให้ระยะเทโลเจนเข้าสู่ระยะอนาเจน กระตุ้นการทำงานของ hair follicle ในระยะอนาเจน เพิ่มจำนวนและขนาดของ hair follilce ทำให้เส้นผมที่งอกขึ้นมาใหม่มีขนาดใหญ่ขึ้น และแข็งแรงขึ้น และสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมมีความปลอดภัย ไม่เกิดการระคายเคืองผิวหนัง ดังนั้นสารสกัดตรีผลาที่กักเก็บในนีโอโซมควรจะนำไปพัฒนาต่อในทางอุตสาหกรรม เพื่อลดการหลุดร่วงของเส้นผม กระตุ้นการงอกของเส้นผม และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ที่มีปัญหาผมร่วง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดจากระบบนำส่งนีโอโซมควรทำด้วยวิธี franz diffusion cell เนื่องจากตำรับที่พัฒนาขึ้นเป็นรูปแบบนำส่งทางผิวหนัง ส่วนการศึกษาการปลดปล่อยด้วย dialysis bag สารสกัดจะแพร่ในทุกทิศทางที่สัมผัสกับ release medium

5.2.2 ควรมีการศึกษาสารชนิดอื่น ๆ ในสารสกัดตรีผลา เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

5.2.3 ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตำรับนีโอโซมที่บรรจุสารสกัดตรีผลาเพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นผมในอาสาสมัครที่มีปัญหาผมร่วงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

อรัญญา มโนสร้อย และคณะ. "การประยุกต์เทคโนโลยีนาโนในการนำส่งสารผ่านทางราก", สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2008.

อรนุช ธนเขตไพศาล. "ระบบนำส่งนีโอโซมในทางเภสัชกรรม", วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 8(2) : 12-26, 2555.

Abd-Elbary, A., El-laithy, H.M. and Tadros, M.I. "Sucrose stearate-based proniosome-derived niosomes for the nebulisable delivery of cromolyn sodium", **International Journal Pharm.** 357(1-2): 189-198, 2008.

Abramowicz, M. "Propecia and rogain extra strength for alopecia", **The Medical Letter.** 40: 25–27, 1998.

Abell, E. "Histologic response to topically applied minoxidil in male-pattern alopecia", **Clinical Dermatology.** 6: 191–4, 1988.

Adhirajan, N., and et al. "In *vivo* and in *vitro* evaluation of hair growth potential of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn." **Journal Ethnopharmacol.** 88(2–3): 235–239, 2003.

Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F. "Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties", **Journal of Ethnopharmacology.** 62(2): 183-193, 1998.

Alexa, P., and et al. "Hair follicles,their disorders and their opportunities", **Drug Discovery Today: Disease Machanisms.** 5(2): 173-180, 2008.

Allen, T. "Photon correlation spectroscopy in particle size measurement",1. Allen T., Chapman & Hall. London. 426, 1997.

Andrea, C.L., and et al. "Transfollicular drug delivery", **Pharmaceutical Research.** 12(2): 179-186, 1995.

Aranya, M., and et al. "Transfollicular enhancement of gel containing cationic niosomes loaded with unsaturated fatty acid in rice (Oryza sativa) bran semi-purified fraction", **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** 81(2): 303-313, 2012.

Arora, S., Kaur, K. and Kaur, S. "Indian medicinal plants as a reservoir of protective phytochemicals", **Teratogenic Carcinogen Mutagen.** 23(1): 295-300, 2003.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Azmin, M.N., and et al. "The effect of non-ionic surfactant vesicle (niosome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice", **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 37(4): 237-242, 1985.

Babu, D., Gurumurthy, P. and Cherian, S. "Antioxidant and free radical scavenging activity of triphala determined by using different in vitro models", **Journal Medicinal Plant Research.** 7(39): 2898 – 2905, 2013.

Baden, P., and Kubilus, J. "Effect of minoxidil on cultured keratinocytes", **Journal of Investigative Dermatological.** 81(6): 558-60, 1983.

Bahulikar, S., Kashalkar, V., and Pundlik, D. "HPLC in standardization of herbal drugs: studies on Triphala powder", **Asian Journal of Chemistry.** 15: 229 – 234, 2003.

Baillie A.J., and et al. "The preparation and properties of niosomes- Non-ionic surfactant vesicles", **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 37(12): 863-868, 1985.

Balakrishnan, P., and et al. "Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery", **International Journal of Pharmaceutics.** 377(2): 1–8, 2009.

Barry, B. "Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery", **European Journal of Pharmaceutical Science.** 14: 101 – 114, 2001.

Basketter, A., et al. "Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test", **Contact Dermatitis**. 51(1): 1–4, 2004.

Basketter, D., Jirova, D. and Kandárová, H. "Review of skin irritation/corrosion Hazards on the basis of human data: a regulatory perspective", **Interdisciplinary Toxicology.** 5(2): 98–104, 2012.

Balasubramaniam, A., Kumar, V.A., and Pillai, K.S. "Formulation and *in vivo* evaluation of niosome encapsulated daunorubicin hydrochloride", **Drug Development and Industrial Pharmacy.** 28(10): 1181-1193, 2002.

Bertolino, A.P. "Alopecia areata: A clinical overview", **Postgraduate Medical Journal.** 107(7): 81-90, 2002.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Bernsdorff, C., and et al. "Effect of hydrostatic pressure on water on penetration and rotation dynamics in phospholipids-cholesterol bilayer", **Biophysical Journal.** 72: 1264-1277, 1997.

Beugin-Deroo, S., Ollivon, M., and Lesieur, S. "Bilayer stability and impermeability of nonionic surfactant vesicles sterically stabilized by PEG- cholesterol conjugates", **Journal Colloid Interface Science.** 202: 324-333, 1998.

Bolzinger, M., and et al. "Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane", **Current Opinion in Colloid & Interface Science.** 17: 156–165, 2012.

Bouwstra, J.A., VanHal, D.A. and Hofland, H.J. "Preparation and characterization of nonionic surfactant vesicles", **Colloids and Surfaces *A:* Physicochemical and Engineering Aspects.** 71-80, 1997.

Cable, C. "An examination of the effects of surface modifications on the physicochemical and biological properties of non-ionic surfactant vesicles", Doctor's Thesis: The University of Strathclyde Glasgow, 1989.

Chao-Chum.Y., Chin-Chian, C. and Wen-Chich, C. "Aging and anti-aging in hair and hair loss", Rechearch and clinical intervention. 231-246, 2014.

Chaudhuri, R. K. "Standardised extract of Phyllanthus emblica: A skin lightener with anti-aging benefits", **In Proceedings PCIA Conference**, Guangzhou, China, 2004.

Chaudhuri, R.K. Guttierez, G. and Serrar, Mustafa. "Low Molecular-Weight Tannins of Phyllanthus emblica: A New Class of AntiAging Ingredients", **In Proceedings Active Ingredients Conference,** Paris, 2003.

Chul-Ho, C., Jong-Sup, B. and Yong-Ung, K. "5-Reductase Inhibitory Components as Antiandrogens From Herbal Medicine", **Journal of Acupuncture and Meridian Studies.** 3(2): 116-118, 2010.

Datta, K., and et al. "Eclipta alba extract with potential for hair growth promoting activity", **Journal of Ethnopharmacology.** 124: 450–456, 2009.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Deepali, J., and et al. "Effect of Tectona grandis Linn. seeds on hair growth activity of albino mice", **International Journal of Ayurveda Research.** 1(4), 2010.

Diani, A.R., and et al. "Hair growth effects of oral administration of finasteride, a steroid 5-alphareductase inhibitor, alone and in combination with topical minoxidil in the balding stumptail macaque", **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** 74: 345–350, 1992.

Drake, L., and et al. "The effect of finasteride on scalp skin and serum androgen level in men with androgenetic alopecia", **Journal American Academy Dermatology.** 41: 555-63, 1999.

Domashenko, A., and et al. "Efficient delivery of transgenes to human hair follicles progenitor cells using topical lipoplex", **Nature Biotechnology.** 18(4): 420-423, 2000.

El- Mekkawey, M., and Merelhy, M. "Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase", **Chemical and Pharmaceutical Bulletin.** 43: 641-648, 1995.

EL-Samaligy, M. S., Afifi, N.N., and Mahmoud, E.A. "Increasing bioavailability of silymarin using a buccal liposomal delivery system: preparation and experimental design investigation", **International Journal of Pharmacology.** 308: 140-148, 2006.

Escobar, R. J., and et al. "The tape stripping technique as a method for drug quantification in skin", **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** 11(1): 104-130, 2008.

Finsey, R. "Particle sizing by quasi-elastic light scattering", **Advanced Colloid Interface Science:** 52: 79-143, 1994.

Gray, M., and et al. "Lipid composition of the superficial stratum corneum cells of the epidermis", **British of Journal Dermatology.** 106: 59–63, 1982.

Gregoriadis, A., and Davis, C. "Stability of iposomes in vvo and in vitro is promoted by their cholesterol content in the presence of blood cells", Biochemistry and Biophysical research communication. 90: 1287-1293, 1979.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Ghosal, S., Tripathi, V.K., and Chanhau, S. "Active constituent of *Emblica officinalis*: part 1 the chemistry and antioxidant effect of two new hydrolysable tannins, emblicanin A and B", **Indian Journal of Chemistry**. 35: 941-948, 1996.

Gormley, J. "Finasteride : A clinical review", **Biomed and Pharmacotherapy**. 49: 319 – 324, 2010.

Hanna, W., and Krzysztof, C. "Targeting to the hair follicles: Current status and potential", **Journal of Dermatological Science**. 57: 83–89, 2010.

Harada, N., and et al. "Administration of capsaicin and isoflavone promotes hair growth by increasing insulin-like growth factor-I production in mice and in humans with alopecia", **Growth Hormone & IGF Research**. 17: 408-415, 2007.

Harada, N., and et al. "Effect of topical application of raspberry ketone on dermal production of insulin-like growth factor-I in mice and on hair growth and skin elasticity in human", **Growth Hormone & IGF Research**. 18: 335-344, 2008.

Huh N.W., and et al. "The interaction of polyphenols with bilayer: conditions for increasing bilayer adhesion", **Biophysical Journal**. 71: 3261-3277, 1996.

Hunter, C.A., and et al. "Vasicular systems (niosomes and liposomes) in experimental murine visceral leishmaniasis for delivery of sodium stibogluconate", **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 40: 161- 165, 1988.

Jacobi, U. and et al. "Follicles play a role as penetration pathways in in vitro studies on porcine skin? An optical study", **Laser Physics 2005**. 15: 1594-98, 2005.

Jagetia, G.C., and et al. "The evaluation of the radioprotective effect of Triphala (an Ayurvedic rejuvenating drug) in the mice exposed to radiation", **International Journal of Phytomedicine**. 9: 99–108, 2002.

Jayaweera, D.M. "Medicinal Plants used in Ceylon Part 2", **National Science Council of Sri Lanka.** Colombo, 1980.

Jose, E., and et al. "Nanocarrier Systems for Transdermal Drug Delivery"

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Jung, S., and et al. "Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system : penetration into porcine hair follicles", **Journal of Investigative Dermatology**. 126(8): 1728-1732, 2006.

Junlatat, J., and Sripanidkulcha, B. "Hair growth promotion, cytotoxicity and skin permeability evaluations of *Carthamus tinctorius* floret extract"

Kang, J., and et al. "Effect of Dieckol, a component of *Ecklonia cava*, on the Promotion of Hair Growth", **International Journal Molecular Science**. 13: 6407-6423, 2012.

Kaufman, D., and et al. "Finasteride in treatment of men with androgenetic alopecia", **Journal American Academy Dermadology**. 39: 578-89, 1998.

Kim, H.J., and et al. "Influence of Amla (Emblica Officinalis Gaertnl) on hypercholesterolemia and lipid peroxidation in cholesterol-fed rats", **Journal Nutritional Science and Vitaminology**. 51: 413-418, 2005.

Kirwin, C.J. "Eye and skin local toxicity testing in toxicology: principle and practice", vol 2 edited by Sperling F. a Wiley-Interscience publication. 169-175, 1984.

Kligman, A.M. "The comparative histopathology of male-pattern baldness and senescent baldness", **Clinical Dermatology**. 6(4): 108–118, 1988.

Krishnaveni, M., and Mirunalini, S. "Amla-the role of Ayurvedic therapeutic herb in cancer", **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. 4(3): 13-17, 2011.

Kriengsak, T., and et al. "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts", **Journal of Food Composition and Analysis**. 19(-): 669–675, 2006.

Krause, K. and Foitzik, K. "Biology of the hair follicle:the basics", **Seminar in Cutaneous Medicine and Surgery**. 25(1): 2–10, 2006.

Kumar, N., and et al. "Effects of Ionizing Radiation on Microbial Decontamination, Phenolic Contents, and Antioxidant Properties of Triphala", **Journal of food science**. 74: 3, 2009.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Kumar, T., and et al. "Screening of steroid 5α-reductase inhibitory activity and total phenolic content of Thai plants", **Journal of Medicinal Plants Research**. 5(7): 1265-1271, 2011.

Kumar, T., and et al. "5α-reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment", **Journal of Ethnology and pharmacology**. 139: 765–771, 2012.

Kwon, O.S., and et al. "Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG)", **International Journal of Phytomedicine.** 14: 551-555, 2007.

Lacy, C.F., and et al. "Drug Information Handbook with International Trade Names Index", 17th ed. LexiComp Inc., United States: 652–653, 2008.

Ladmann, J., and et al. "Investigation of follicular penetration of topically applied substances", **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**. 14(1): 17-22, 2001.

Ladmann, J., and et al. "Hair follicles-A long-term reservoir for drug delivery", **Skin Pharmacology and Physiology**. 19(4): 232-236, 2006.

Ladmann, J., and et al. "Penetratation of Titanium Dioxide Microparticles in a Sunscreen Formulation into the Horny Layer and the Folliculare Orifice", **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**. 12(5): 247-256, 1999.

Lademann, J., and et al. "Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles", **European of Journal Pharmaceutical and Biopharmaceutics.** 66(2): 159–164, 2007.

Lee, G., and et al. "The essential oils of *Chamaecyparis obtusa* promote hair growth through the induction of vascular endothelial growth factor gene", **Fitoterapia.** 81: 17–24, 2010.

Long, A., and et al. "Human stratum corneum polar lipids and desquamation", **Archives in Dermatology Research**. 277: 284-87, 1985.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Nadkarni, A.K. "Indian Materia Medica, 3rd ed. Mumbai, India: Popular Press Ltd., 1976

Naik, G.H., Priyadarsini, K.I. and Mohan, H. "Free radical scavenging reactions and phyochemical analysis of triphala, an ayurvedic formulation", **Current Science.** 90(8): 1100–5, 2006.

Namdeo, A., and Jain, K. "Niosomal delivery of 5-fluorouracil", **Journal of Microencapsulation.** 16(6): 731-740, 1999.

Naphatson, K., and et al. "5α-reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment", **Journal of Ethnopharmacology.** 139(3): 765-771, 2012.

Neste, V., and et al. "Finasteride increase anagen hair in men with androgenetic alopecia", **British Journal of Dermatology**. 143: 804-810, 2000.

Nasseri, B., and Florence, A.T. "Microtubules formed by capillary extrusion and fusion of surfactant vesicles", **International Journal of Pharmaceutic.** 266: 91-98, 2003.

Ogiso, T., and et al. "Transfollicular Drug Delivery: Penetration of Drugs Through Human Scalp Skin and Comparison of Penetration Between Scalp and Abdominal Skins *In Vitro*", **Journal of Drug Targeting**. 10(5): 369-378, 2002.

Olsen, A., and et al. "A randomized clinical trial of 5% topical minoxidil versus 2% topical minoxidil and placebo in the treatment of androgenic alopecia in men", **Journal of the American Academy of Dermatological**. 47: 377-85, 2002.

Olsen, A. "Androgenetic alopecia. In: Olsen EA (ed). Disorders of hair growth: Diagnosis and treatment", New York: McGraw-Hil. 257–287, 1993.

Olsen, A., and Weine, R.S. "Topical minoxidil in male pattern baldness: Effect of discontinuation of treatment", **Journal of the American Academy of Dermatological**. 17: 97-101, 1987.

Onanong, K., and et al. "Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand", **Journal of functional foods**. 3(-): 88 –99, 2011.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Ozer, A.Y., Hincal, A.A. and Bouwstra, J.A. "A novel drug delivery system nonionic surfactant vesicles", **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 37: 75-79, 1991.

Park, S., Shin, W. and Ho, J. "*Fructus panax ginseng* extract promotes hair regeneration in C57BL/6 mice", **Journal of Ethnopharmacology**. 138: 340–344, 2011.

Park, H., Zhang, N. and Park, D. "Toppical application of *Polygonum multiflorum* extract induces hair growth of resting hair follicles through upregulating Shh and β-catenin expressin in C57BL/6 mice", **Journal of Ethnopharmacology**. 135: 369-375, 2011.

Park, W., and et al. "The extract of *Thujae occidentalis* semen inhibited 5α-reductase and androchronogenetic alopecia of B6CBAF1/j hybrid mouse", **Journal of Dermatological Science**. 31: 91-98, 2003.

Pfundstein, B., and et al. "Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (Terminalia bellerica, Terminalia chebula and Terminalia horrida): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities", **Phytochemistry**. 71(10): 1132-1148, 2010.

Pham, T.T. and et al. "Liposome and noisome preparation using a membrane contactor for scale-up", **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 94: 12-21, 2012.

Pinto, A.S., Couri, G. and Goncalves, E.B. "Replacement of methanol by ethanol on gallic acid determinationby rhodanine and its impacts on the tannase assay", **Electronic Journal of environmental agricultural and food chemistry**. 5: 1560 – 1568, 2006.

Poltanov, E. A., and et al. "Chemical and antioxidant evaluation of Indian gooseberry (Emblica officinalis Gaertn., syn. Phyllanthus emblica L.) supplements", **Journal of Phytotherapy Research**. 23: 1309–1315, 2009.

Ponnusankar, S., and et al. "Cytochrome P450 inhibition assay for standardized extract of *Terminalia chebula* Retz", **Phytotherapy Research**. 25(1): 151-154, 2011.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Potts, O., and Francoeur, L. "The influence of stratum corneum morphology on water permeability", **Journal of Investigative Dermatology**. 96: 495-499, 1991.

Potts, O., and Guy, H. "Predicting skin permeability", **Pharmaceutical Research**. 9(5): 663-669, 1992.

Rastogi, R.P. and Mehrotra, B.N. "Compendium of Indian Medicinal Plants, Vol. 1–3. New Delhi, India", **Publications and Information Directorate**, 1993.

Richard. A., and et al. "Structure-activity relationships for inhibition of human 5α-reductases by polyphenols", **Biochemical Pharmacology**. 63: 1165-1176, 2002.

Roberta, R., and et al. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", **Free radical biology and medicine**. 26(-): 1231–1237, 1999.

Rho, S.S., and et al. "The hair growth promoting effect of Asiasari radix and it molecular regulation", **Journal of Dermatology science**. 38(2): 89-97, 2005.

Rho, S.S., and et al. "The hair growth promoting effect of Sophora flavescens extract and it molecular regulation", **Journal of Dermatology science**. 38(1): 43-49, 2002.

Robinson, K., Whittle, E., and Basketter, A. "A two-center study of the development of acute irritation responses to fatty acids", **American Journal Contact Dermatology**. 10: 136–145, 1999.

Ronald, L.P., and et al. "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements", **Journal of agricultural and food chemistry,** 2005.

Roh, S., and et al. "The hair growth promoting effect of *Sophora flavescens* extract and its molecular regulation", **Journal of Dermatological Science.** 30: 43-49, 2002.

Rogerson, A., Cummings, J., and Florence, A.T. "Adriamycin-loaded niosomes- drug entrapment , stability and release" **Journal of Microencapsulation**. 4: 321-328, 1987.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Roy R.K., Thakur, M., and Dimix, V.K. "Effect of Cuscuta reflexa Roxb. On hair growth in albino rats", **Indian drug**. 43(12); 951-956, 2006.

Ryu, Y. B., and et al. "Inhibition of neuraminidase activity by polyphenol compounds isolated fromthe roots of Glycyrrhiza uralensis", **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.** 20: 971–974, 2002.

Sabu, M.C., and Kuttan, R. "Antidiabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property", **Journal of Ethnopharmacology**. 81: 155–160, 2002.

Salcedo, L.L., and et al. "Antiradical activity of gallic acid in lipid interphase", **Biochemical et Biophysical Acta**. 2656-2661, 1838.

Sarportar, P., and Zatz, J. "Percutaneous absorption enhancement by nonionic surfactants. Drug Dev", **Indian Journal Pharmaceutical**. 12: 1625–1647, 1986.

Satturwar, M., and et al. "Formulation and Evaluation of Ketoconazole Niosomes", **Indian Journal Pharmaceutical**. 64(21): 145-153, 2002.

Schaefer, H. and et al. "The role of follicular penetration", **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**. 14(1): 23-27, 2001.

Schmitt, D., and et al. "Toxicologic evaluation of modified gum acacia: Mutagenicity, acute and subchronic toxicity", **Food and Chemical Toxicological**. 46(3): 1048-1054, 2008.

Semalty, M., amd et al. "In vivo hair growth activity of herbal formulations", **International Journal of Pharmacology**. 6(1) : 53-57, 2010.

Sepulveda, L., and et al. "Ellagic acid :Biological properties and biotechnological development for production processes", **African Journal of Biotechnology**. 10(22): 4518-4523, 2011.

Shahiwala, A., and Misra, A. "Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide", **Journal of Pharmaceutical Science.** 5: 220-225, 2002.

Shisombat N., and et al. "Skin Irritation test of Curcuminoids Facial Mask Containing Chitosan As A Binder", 140-47, 2007.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Singh, P., Govindarajan, R. and Rawat, A.S. "High Performance Liquid Chromatography as a tool for the Chemical Standardisation of Triphala – an Ayurvedic Formulation", **Phytochemical Analysis.** 19: 164 – 168, 2008.

Sinclair, D. "Male androgenic alopecia", **Journal of Men'Health and Gender.** 1: 319-327, 2004.

Soojin, P., Weon, S.S. and Jinnyoung, H. "Fructus panax ginseng extract promotes hair regeneration in C57BL/6 mice", **Journal of Ethnopharmacology**. 138(2): 340-344, 2011.

Stuart, G.A. "Chinese Materia Medica Vegetable Kingdom", **American Presbyterian Mission Press,** Shanghai. 558, 1911.

Sukirti, U., Ashoke, K., and Vijender, S. "Hair Growth Promotant Activity of Petroleum Ether Root Extract of *Glycyrrhiza Glabra* L (Fabaceae) in Female Rats", **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 11(5): 753-758, 2012.

Sultana, S., and et al. "Emblica officinalis thioacetamide-induced oxidative stress and early promotional primary hepatocarcinogenesis", **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 1573–1579, 2004.

Takagi, N., and Sanasshiro, T. "Health foods containg antioxidantive and antiallergy food materials", Jpn. Tokk. KohoTrancik J, Spindler R, Rose S et al. Incidence of androgenic alopecia in males 15-17 years of age. Post presented at 3rd Intercontinental Meeting of the Hair Research Societies. 13-15, 1996.

Thakur, R.S., Puri, H.S., and Husain, A. "Major Medicinal Plants of India", Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow, India, 1989.

Toll, R., and et al. "Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles", **Journal of Investigative Dermatology**. 123(1): 168-176, 2004.

Trancik, R.J., and et al. "Incidence of androgenetic alopecia in males 15-17 years of age", Poster presented at 3rd Intercontinental Meeting of the Hair Research Societies, June 13-15, Tokyo, Japan, 2001.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Treadway, L. "Amla Traditional food and medicine. HerbalGram; 31: 26. HerbalGram", **The Journal of the American Botanical Council**. 31: 26, 1994.

Uchegbu, I.F., and Florence, A.T. "Nonionic surfactant vesicles (Niosomes) - physical and pharmaceutical chemistry", **Advance College Interface Science**. 58: 1-55, 1995.

Uchegbu, I.F., and Vyas, S.P. "Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery", **International Journal Pharmaceutical**. 172: 33-70, 1998.

Uno, H., Cappas, A. and Brigham, P. "Action of topical minoxidil in the bald stumptailed macaque", **Journal of the American Academy of Dermatology**. 16: 657–668, 1987.

Vora, B., Khopade, A. and Jane, N. "Proniosome base on transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception", **Journal of Controlled Release**. 54(2): 149-165, 1998.

Vyas, P., and Khar, R. "Niosomes Targeted and Controlled Drug delivery", 249-279, 2008.

Washington, C. "Photon correlation spectroscopy, in particle size analysis in pharmaceutics and orther industries", **Ellis Horwood**. New York. 135, 1992.

Wertz, W., and et al. "The composition of ceramides from human stratum corneum and from comedones", **Journal of Investigative Dermatology**. 84: 410–12, 1985.

Yoshioka, T., Sternberg, B., and Florence, A.T. "Preparation and properties of vesicles (niosomes) of sorbitan monoesters (Span-20, span-40, span-60 and span-80) and a sorbitan triester (span-85)", **International Journal of Pharmaceutics**. 105: 1-6, 1994.

Yoon, J., Al-Reza, S., and Kang, S. "Hair growth promoting effect of Zizyphus jujube essential oil", **Food and Chemical Toxicology**. 48: 1350–1354, 2010.

Zaccheo, T., Giudici, D. and Salle, D.E. "Effect of the dual 5a-reductase inhibitor Pnu 157706 on the growth of dunning R3327 prostatic carcinoma in the rat", **Journal of Steroid Biochemistry and Molecule Biological**. 64(3–4): 193–198, 1998.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Zaki R.M., and et al. "Formulation and in vitro evaluation of diacerein loaded niosomes", **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**. 6(2): 515-521, 2014.

Zhang, L.Z., and et al. "Studies on chemical constituents in fruits of Tibetan medicine Phyllanthus emblica", **Zhouggno Zhoug Yao ZaZhi**. 28: 940-943, 2003.

ภาคผนวก

การคำนวณการเตรียมตำรับนีโอโซม

ตำรับนีโอโซมประกอบด้วย

1) 50 mM total lipid (span20, cholesterol)
2) 10% cholesterol
3) 0.10% plant extract

วิธีการคำนวณ

50 mM total lipid (100% =50 mM)

Cholesterol 10%., 100% = 50 mM

10% = 50x10/100

=5 mM

หมายความว่า 50 mM total lipid ใช้ cholesterol เท่ากับ 5 mM, span 20 เท่ากับ 45 mM

1) Span 20

Span 20 มี MW=346 mg., 10 mM ใช้ span20 =346 mg

45 mM ใช้ span20 =346x45/25

= 1,557 mg

เตรียม 100 ml ใช้ span 20 = 1,557 mg

เตรียม 20 ml ใช้ span 20 = 1,557 mg x20/100

= 311.40 mg

2) 10% cholesterol

Cholesterol มี MW=386.65 mg., 10 mM ใช้ cholesterol =386.65 mg

5 mM ใช้ cholesterol =386.65 x5/10

=193.32 mg

เตรียม 100 ml ใช้ cholesterol =193.32 mg

เตรียม 20 ml ใช้ cholesterol =193.32x20/100

=38.66 mg

3) 0.10% plant extract

plant extract., เตรียม 100 ml ใช้ plant extract =100 mg

เตรียม 20 ml ใช้ plant extract =100x20/100

=20 mg

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวธนิสสา รามฤทธิ์
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนเพ็ญพิทยาคม
	ระดับปริญญาตรี เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์
	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2549 – ปัจจุบัน
	ภาควิชาเทคนิคเภสัชกรรม วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร
	จังหวัดอุบลราชธานี 187 หมู่ 3
	ตำบลเมืองศรีไค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี
ตำแหน่ง	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาเทคนิคเภสัชกรรม วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร
	จังหวัดอุบลราชธานี 187 หมู่ 3
	ตำบลเมืองศรีไค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี
	โทรศัพท์ (045) 288041