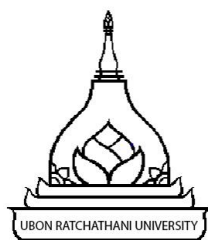


การผลิตและการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์เพิ่มความสดชื่นที่มี
ส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล

วิราวรรณท์ กนกนิษฐ์หิรัญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตร์แห่งเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



PRODUCTION AND EFFICACY STUDY OF REFRESHING SPRAY
CONTAINING MENTHOL-LOADED NANOCAPSULES

VIRAWANAN KANOKNITTHIRAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN SCIENCE OF COSMETICS AND HEALTH PRODUCTS
FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2020
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักคือ รองศาสตราจารย์ ดร.บุญชายิ่งงาม และ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา และ รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา ซึ่งได้ให้คำแนะนำตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่รวมทั้งการเป็นแบบอย่างที่ดีแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ และ ขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุริวัณย์ ดวงจิตต์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.อภิรุจ เขียงโสม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้เพื่อน ๆ นักศึกษาที่คอยให้กำลังใจขอขอบคุณทุนการศึกษาวิจัยสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยอุบลราชธานีภายใต้โครงการยกระดับสมรรถนะนักวิจัยไทยเพื่อสร้างขีดความสามารถในการแข่งขันประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 (รหัสโครงการ 05000008/050000080001)

ขอขอบพระคุณสถาบันการศึกษาแห่งนี้ที่ได้ให้ความรู้และประสบการณ์อันมีค่าในการศึกษาทำยสุดท้ายผู้วิจัยกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้กำลังใจส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการศึกษาที่ดีมีคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ขอขอบแต่ผู้ที่อยู่เบื้องหลังในการส่งเสริมความสำเร็จทั้งที่ได้กล่าวนามถึงและมีได้กล่าวนามถึงทุกท่านและขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

วิรารนนท์ กนกนิษฐ์หิรัญ

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง	: การผลิตและการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์เพิ่มความสดชื่นที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล
ผู้วิจัย	: วิรารักษ์ กนกนิษฐ์ศิริ
ชื่อปริญญา	: วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	: ศาสตร์แห่งเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	: รองศาสตราจารย์ ดร.บัญชา ยิ่งงาม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา
คำสำคัญ	: สเปรย์เพิ่มความสดชื่น, เมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล, ทดสอบการระคายเคือง, โครงข่ายประสาทเทียม

เมนทอลสามารถกระตุ้นตัวรับสัญญาณชั่วคราว M8 ซึ่งมาสิ้นสุดที่ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าด้านล่าง และทำให้รู้สึกเย็น สดชื่นชั่วขณะได้ นำเสียดายที่สารนี้มีข้อจำกัดคือ ละลายน้ำได้น้อยและระเหิดอย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะปกติการพัฒนาตัวพหุขนาดนาโนเมตร ที่สามารถกักเก็บสารชนิดนี้ไว้ภายในอนุภาคเพื่อให้ละลายน้ำได้ลดการระเหิด และเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังอย่างรวดเร็วจึงเป็นสิ่งจำเป็น ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเมนทอลในนาโนแคปซูลเพื่อปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำ ลดการระเหิด และส่งเสริมการส่งเมนทอลสู่ผิวอย่างรวดเร็วเพื่อใช้เป็นสเปรย์เพื่อความสดชื่น การผลิตระบบนำส่งนาโนแคปซูลกักเก็บเมนทอลใช้เทคนิคการตกตะกอนนาโน ตัวแปรอิสระที่ศึกษาประกอบด้วยสัดส่วนของ menthol poly (ϵ -caprolactone) และ poloxamer 188 ขณะที่ขนาดอนุภาค ศักย์ซีตา และร้อยละการกักเก็บสารกำหนดเป็นการตอบสนอง ออกแบบการทดลองด้วยแบบแผนบล็อก-เบห์นกัน ร่วมกับวิธีโครงข่ายประสาทเทียม และ K-fold cross-validation จากนั้นจึงนำฟังก์ชันความพอใจมาใช้เพื่อกำหนดเงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับสูตรตำรับ จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติของนาโนแคปซูล ได้แก่ คุณสมบัติเชิงอุณหภูมิจุดเยือกแข็งที่ผิวอนุภาค อันตรกิริยาระหว่างสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับ กลไกและระยะเวลาการดูดซึมเข้าสู่ผิวหนัง ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการระคายเคืองที่อาจเป็นไปได้

ผลการศึกษาพบว่าโครงสร้างของโครงข่ายประสาทเทียมที่เหมาะสมคือ 3-8-8-3 สำหรับชั้นนำเข้าข้อมูล ชั้นซ่อนที่หนึ่ง ชั้นซ่อนที่สอง และชั้นนำออก ตามลำดับ โดยส่วนประกอบที่เหมาะสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลประกอบด้วย menthol 150 mg. poly (ϵ -caprolactone) 84 mg. poloxamer 188 125 mg. caprylic/capric triglycerides 300 mg. sorbitanmonooleate

80 mg. acetone 25 mL polysorbate 80 80 mg. และ น้ำกลั่น 50 mL จะได้นาโนแคปซูลที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย เท่ากับ 205.11 ± 12.73 nm ศักย์ซีตาร์ท์ เท่ากับ -26.61 ± 2.32 mV และร้อยละการกักเก็บเมนทอล เท่ากับ 98.18 ± 0.15 ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าที่ทำนายไว้ ($p > 0.05$) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลมากที่สุดคือ ปริมาณ menthol รองลงมาคือ poly (ϵ -caprolactone) และ poloxamer 188 โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 59.7 59.3 และ 24.8 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงอุณหภูมิต่างกันแสดงให้เห็นว่านาโนแคปซูลมีประสิทธิภาพในการป้องกันการระเหิดของเมนทอล อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี บ่งชี้ว่าประจุลบของระบบนำส่งเป็นผลมาจากหมู่คาร์บอกซิลของพอลิเมอร์ห่อหุ้ม การทดสอบความสามารถในการซึมผ่านหนังสุกร พบว่า นาโนแคปซูลช่วยให้เมนทอลสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังเป้าหมายได้อย่างรวดเร็วภายใน 5 นาที ผ่านกลไก transepidermal และ transfollicular pathway การประเมินความเป็นพิษของนาโนแคปซูลในเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนังของมนุษย์ชนิดไฟโบรบลาสต์ พบว่า นาโนแคปซูลที่บรรจุเมนทอลและนาโนแคปซูลเปล่าเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ทดสอบที่ความเข้มข้นระหว่าง 3.125 ถึง 5,000 $\mu\text{g/mL}$

การประเมินการระคายเคืองที่อาจเกิดขึ้น พบว่า ผลิตภัณฑ์สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลกักเก็บในนาโนแคปซูลเข้ากันได้กับระบบหลอดเลือด คณะกรรมการระคายเคืองสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบและสเปรย์เปล่าเท่ากับ 2.15 ± 1.91 และ 2.84 ± 1.65 ตามลำดับในขณะที่สารละลายเมนทอลอิสระมีคะแนนการระคายเคืองสูงกว่า (3.92 ± 0.75) ($p < 0.05$) คะแนนการระคายเคืองของกลุ่มควบคุมที่เป็นบวก (0.1 N NaOH) เท่ากับ 17.63 ± 0.31 และของกลุ่มควบคุมลบ (น้ำเกลือปกติ) เท่ากับ 0.00 ± 0.00 ($p < 0.001$)

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมนทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูลโดยใช้วิธีการตกตะกอนนาโนประสบความสำเร็จ กระบวนการกักเก็บสารในอนุภาคนาโนเมตร ไม่เพียงช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารลงไปผิวหนัง แต่ยังช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์และลดการระเหิดของเมนทอลได้ โดยสเปรย์เพื่อเพิ่มความสดชื่นที่มีส่วนผสมของนาโนแคปซูลกักเก็บเมนทอลที่พัฒนาขึ้นนี้ มีการระคายเคืองต่ำต่อเยื่อหุ้มคอร์ริโออีลแลนโทอิกของไข่ไก่ฟัก ผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการขออนุมัติการวิจัยด้านจริยธรรมเกี่ยวกับประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีในอนาคต

ABSTRACT

TITLE : PRODUCTION AND EFFICACY STUDY OF REFRESHING
 SPRAYCONTAINING MENTHOL-LOADED NANOCAPSULES
 AUTHOR : VIRAWANAN KANOKNITTHIRAN
 DEGREE : MASTER OF SCIENCE
 MAJOR : COSMETICS AND HEALTH PRODUCTS
 ADVISOR : ASSOC. PROF. BANCHA YINGNGAM, Ph.D.
 CO-ADVISOR : ASST. PROF. CHUTINUN PRASITPURIPRECHA, Ph.D.
 ASSOC. PROF. WANDEE RUNGSEEVIJITPRAPA, Dr.rer.nat.
 KEYWORDS : REFRESHING SPRAY,MENTHOL-LOADED NANOCAPSULES,
 IRRITATION STUDY, ARTIFICIAL NEURAL NETWORK

Menthol can activate the transient potential receptor channel M8 at the end of the nerves located in the basal epidermal layer to provide a momentary cooling effect. Unfortunately, this substance has some limitations, as it has low aqueous solubility and quickly sublimates under ambient conditions. Therefore, it is essential to develop nanocarriers capable of incorporating this substance inside the particles to make it soluble, reduce sublimation and quickly increase skin permeability. This research aimed to fabricate menthol in nanocapsules to improve its water solubility, minimize evaporation, and promote rapid delivery of menthol to the skin for use as a refreshing spray. Menthol was encapsulated in nanocapsules using a nanoprecipitation method. The independent variables were the proportions of menthol, poly (ϵ - caprolactone) , and poloxamer 188, while particle size, zeta potential, and entrapment efficiency were defined as responses. A Box- Behnken design was implemented in the experiments. An artificial neural network and K- fold cross-validation were also used. The desirable functionality was then applied to determine the optimal conditions for the formulation. These nanocapsule properties were then characterized, including their thermal properties, surface charge attributes, interaction among formula ingredients, skin permeation pathway, cytotoxicity, and potential irritation.

The results showed that the best artificial neural network architecture was 3-8-8-3 for the input, first hidden, second hidden, and output layers, respectively. The optimum nanocapsule formulations contained 150 mg menthol, 84 mg poly (ϵ -caprolactone), 125 mg poloxamer 188, 300 mg caprylic/capric triglycerides, 80 mg sorbitan monooleate, 25 mL acetone, 80 mg polysorbate 80, and 50 mL distilled water. These proportions yielded nanocapsules with a mean particle size of 205.11 ± 12.73 nm, a zeta potential of -26.61 ± 2.32 mV and a menthol entrapment efficiency of $98.18 \pm 0.15\%$. These values were not statistically different from the predicted values ($p > 0.05$). The most important factors influencing the menthol-loaded nanocapsules were the amount of menthol, followed by poly (ϵ -caprolactone and poloxamer 188, with f_j values of 59.7%, 59.3%, and 24.8%, respectively

The results of thermogravimetric analysis demonstrated that the nanocapsules were effective in preventing menthol sublimation. Infrared spectroscopy indicated that the negative charge of the nanocarriers was the result of the actions group within the wall material and that the interaction among the substances were not detected in the test. The pigskin permeability test revealed that nanocapsules facilitate menthol to quickly penetrate the target skin layers within 5 min of application through the transepidermal and transfollicular pathways. The cytotoxicity of the nanocapsules was evaluated in normal human dermal fibroblasts. Both menthol-loaded nanocapsules and empty nanocapsules were found to be biocompatible with the test cells at concentrations between 3.125 and 5,000 $\mu\text{g/mL}$.

Potential irritant assessments showed that spray products containing menthol-loaded nanocapsules were compatible with the vascular system. The irritation scores for the tested product and the blank spray were 2.15 ± 1.91 and 2.84 ± 1.65 , respectively, while the free menthol solution had a higher irritation score (3.92 ± 0.75) ($p < 0.05$). Irritation scores of the positive control group (0.1 N NaOH) were 17.63 ± 0.31 and those of the negative control group (normal saline solution) was 0.00 ± 0.00 ($p < 0.001$).

In summary, the development of menthol loaded in nanocapsules using the nanoprecipitation method was successful. Nanoencapsulation not only facilitates the improvement of skin permeation but also reduces cytotoxicity with the reduction of

menthol sublimation. The developed refreshing spray containing menthol-loaded nanocapsules caused low irritation to the hen's egg chorioallantoic membrane. These findings will be useful in the future submission of the human ethical research protocol on cooling product efficacy in healthy volunteers.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ญ
สัญลักษณ์	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 คุณสมบัติของเมนทอล	4
2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของเมนทอลต่อการรับสัมผัสเย็น	5
2.3 กระบวนการเมตาบอลิซึมของเมนทอล	5
2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	5
2.5 พิษวิทยาของเมนทอล	7
2.6 โครงสร้างผิวหนังของมนุษย์	8
2.7 การดูดซึมสารผ่านผิวหนัง	10
2.8 นาโนแคปซูล	11
2.9 โครงข่ายประสาทเทียม	14
2.10 การทดสอบการระเคืองของสารต่อเยื่อบุไข่ฟัก	17
2.11 สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 สถานที่ทำการวิจัย	19
3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	19

3.3	วิธีดำเนินการวิจัย	21
บทที่ 4	ผลการศึกษาและอภิปรายผล	
4.1	การออกแบบสูตรตำรับเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล	31
4.2	การสร้างแบบจำลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของนาโนแคปซูลด้วยโครงข่ายประสาทเทียม	35
4.3	การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรต้นต่อคุณสมบัติของนาโนแคปซูล	41
4.4	การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล	46
4.5	การตรวจสอบคุณสมบัติของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล	47
4.6	การทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง	51
4.7	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	56
4.8	การผลิตสเปรย์เพื่อเพิ่มความสดชื่นและทดสอบการระคายเคืองของสเปรย์เพิ่มความสดชื่น	57
บทที่ 5	สรุปผล อภิปรายและข้อเสนอแนะ	62
	เอกสารอ้างอิง	63
	ภาคผนวก	67
	ประวัติผู้วิจัย	93

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ปริมาณส่วนประกอบของสารที่ใช้ผลิตเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลที่จะนำไปออกแบบการทดลองด้วยแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกิน	22
3.2	สภาวะของการทดลองด้วยแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกินสำหรับผลิตเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล	23
4.1	ปริมาณส่วนประกอบของสารที่ใช้ผลิตเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลที่จะนำไปออกแบบการทดลองด้วยแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกิน	33
4.2	การออกแบบการทดลองด้วยแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกินสำหรับผลิตเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล และคุณสมบัติของตำรับที่เตรียมได้	34
4.3	ค่าสถิติสำหรับการประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองโครงข่ายประสาทเทียม	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	โครงสร้างเคมีของเมนทอลชนิด (1R, 2S, 5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol หรือ (-)-menthol ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้	2
2.1	โครงสร้างออปติคัลไอโซเมอร์ของเมนทอล	4
2.2	ภาพโครงสร้างระบบประสาทสำหรับสร้างเป็นโครงข่ายประสาทเทียม	14
2.3	โครงข่ายประสาทแบบชั้นเดียว (single layer)	16
2.4	โครงข่ายประสาทแบบหลายชั้น (multiple layer)	16
3.1	การผลิตเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลด้วยเทคนิคการตกตะกอนนาโน	22
4.1	การเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของน้ำกลั่น (ภาพซ้าย) และตำรับเมนทอลกักเก็บในระบบนำส่งนาโนแคปซูล (ภาพขวา)	35
4.2	ผังโครงสร้างของโครงข่ายประสาทเทียมที่เหมาะสม (3-8-8-3) สำหรับสร้างแบบจำลองทำนายคุณสมบัติของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล	37
4.3	ค่า R ² ของชุดข้อมูลที่นำมาฝึกและข้อมูลสำหรับตรวจสอบความถูกต้องสำหรับสร้างแบบจำลองทำนายคุณสมบัติของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล	37
4.4	ค่าสัมพัทธ์ร้อยละความสำคัญของตัวแปร j ของตัวแปรต้นต่อคุณสมบัติของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล	42
4.5	ภาพสามมิติแสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล	43
4.6	ภาพสามมิติแสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อค่าศักย์ซีตาร์ของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล	44
4.7	กราฟสามมิติแสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อค่าร้อยละการกักเก็บเมนทอลในนาโนแคปซูล	45
4.8	การคำนวณค่าฟังก์ชันความพึงพอใจเพื่อหาสภาวะการผลิตระบบนำส่งนาโนแคปซูลบรรจุเมนทอล	46
4.9	การกระจายอนุภาคของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล 3 รุ่นการผลิต เมื่อวัดด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงเลเซอร์	47
4.10	การตรวจสอบโครงสร้างระดับนาโนเมตรของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	48
4.11	การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงอุณหภูมิจึงของระบบนำส่งโดยใช้เทคนิค thermal gravimetric analysis	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.12	การตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนรังสี infrared ของระบบนำส่งเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและส่วนประกอบของตำรับ	51
4.13	เปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังหุสุกรของ nile red	53
4.14	เปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังหุสุกรลงไปผิวหนังที่ระดับความลึกต่างกันของ nile red ที่อยู่ในรูปสารละลายอิสระใน caprylic/capric triglycerides และในนาโนแคปซูล ณ เวลาต่างกัน	54
4.15	เปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังหุสุกรลงไปผิวหนังที่ระดับความลึกต่างกันของเมนทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูล และผิวหนังปกติ ณ เวลา 30 นาทีภายหลังการบ่ม	55
4.16	เปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังหุสุกรของเมนทอลที่บรรจุไว้ในนาโนแคปซูลที่ชั้น stratum corneum และชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้ ณ เวลา 5 15 และ 30 นาทีภายหลังการบ่ม	56
4.17	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ normal human dermal fibroblasts ของระบบนำส่งเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและนาโนแคปซูลเปล่า ณ เวลา 24 ชั่วโมง	57
4.18	ภาพถ่ายหลอดเลือดของเยื่อไขไก่ฟักอายุ 9 วัน เมื่อทดสอบ ณ เวลา 0 30 120 และ 300 วินาที ตามลำดับ	60
4.19	คะแนนศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผลบวกและผลลบ ตามลำดับ	61

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์และอักษรย่อ

°C

HET-CAMHen's egg

FTIR

mg

mL

mV

คำอธิบาย

องศาเซลเซียส

chorioallantoic membrane

Fourier transform infrared spectroscopy

มิลลิกรัม

มิลลิลิตร

มิลลิโวล

บทที่ 1

บทนำ

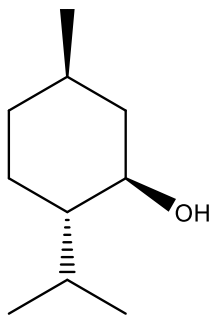
1.1 ที่มาและความสำคัญของการวิจัย

เมนทอล (menthol) (ภาพที่ 1.1) เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญชนิดหนึ่งที่มีราคาไม่สูง มีมูลค่าทางการตลาดสูงและได้รับความนิยมใช้อย่างมาก สารชนิดนี้เป็นที่ต้องการทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม น้ำหอม เครื่องสำอาง และการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชศาสตร์ เนื่องจากคุณสมบัติที่กระตุ้นให้รู้สึกเย็นและทำให้ผู้ใช้รู้สึกสดชื่นชั่วขณะซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ (Patel, Ishiuj, & Yosipovitch, 2007) ทำให้อุปสงค์ของเมนทอลเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ การใช้เมนทอลเพื่อเพิ่มความสดชื่นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ หนึ่งในนั้นคือ การเพิ่มความสดชื่นให้แก่ผู้ขับรถ แต่เมนทอลมีข้อจำกัดเรื่องค่าขีดการละลายน้ำที่ต่ำมากและเมื่อสัมผัสความร้อนจะเกิดการระเหยได้อย่างรวดเร็ว (Yingngam et al., 2019)

ปัญหาดังกล่าวทำให้เกิดแนวคิดเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเพิ่มความสดชื่นและกระตุ้นการตื่นตัวจากความเหนื่อยล้าให้แก่ผู้ขับรถ โดยใช้ฤทธิ์ในการสร้างความรู้สึกเย็นที่ผิวหนังของเมนทอล ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้ถูกออกแบบเพื่อตอบสนองความสะดวกในการใช้งานคือ สามารถใช้งานง่ายเพียงฉีดยาที่บริเวณใบหน้า อีกทั้งยังพกพาสะดวกขณะเดินทาง รวมถึงไม่มีส่วนประกอบที่จะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง โดยใช้สารองค์ประกอบที่ใช้ในเครื่องสำอางได้ ทั้งนี้เนื่องจากเมนทอลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผลิตภัณฑ์เป็นสารที่ไม่เข้ากันกับน้ำจึงได้มีการเตรียมตัวรับในรูปแบบนาโนแคปซูลโดยใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่เข้ากันได้กับร่างกาย คือ poly (ϵ -caprolactone) ทำหน้าที่เป็นสารห่อหุ้มนาโนแคปซูลที่มีความคงตัวสูงและบรรจุเมนทอลไว้ภายในอนุภาค กระจายตัวอยู่ในน้ำซึ่งเป็นวัฏภาคภายนอก จะทำให้ตัวรับมีลักษณะโปร่งแสง โดยกระบวนการผลิตทั้งหมดจะต้องเป็นกรรมวิธีที่ง่ายและใช้ต้นทุนต่ำ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการค้นคว้าและพัฒนาสถานะในการทดลองเพื่อให้ได้มาซึ่งกรรมวิธีที่เหมาะสม เพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ โดยใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่สำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์เพิ่มความสดชื่นแก่ผู้ขับรถ

งานวิจัยนี้มีความโดดเด่นและข้อแตกต่างจากงานวิจัยใกล้เคียง จากการสืบค้นวรรณกรรมที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในประเทศและต่างประเทศ รวมทั้งสิทธิบัตรพบว่า โครงการวิจัยมีความใหม่คือ การใช้วิธีผลิตนาโนแคปซูลที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่เตรียมให้เมนทอลอยู่ในรูปสารละลายในน้ำมันและเก็บไว้ในภาชนะในอนุภาคเพื่อให้พร้อมสำหรับออกฤทธิ์ สารองค์ประกอบที่ใช้จัดเป็น biodegradable polymer และวิธีที่ใช้สามารถขยายการผลิตจากระดับห้องปฏิบัติการเข้าสู่การผลิตขนาดกลางและขนาดอุตสาหกรรมได้ ความแตกต่างจากงานวิจัยที่มีการต่อยอดเทคโนโลยีเพื่อผลิตสินค้าภายใต้ชื่อสินค้า “ละอองเย็น” ซึ่งใช้เซลลูโลสเป็นสารห่อหุ้มเมนทอลและมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเย็นและคลายร้อนคือ ส่วนผสมที่ใช้เป็นคนละชนิด และกรรมวิธีการผลิตที่จะใช้ในการวิจัยนี้จะมีขั้นตอนการผลิตที่ง่าย รวด และได้ผลผลิตสูงกว่า อีกทั้งยังเปลี่ยนให้เมนทอลเปลี่ยนสถานะจากผลึกเป็นสารละลายเพื่อให้พร้อม

สำหรับออกฤทธิ์ที่ปลายประสาทรับสัมผัสความเย็นในชั้นหนังกำพวด (Journigan & Zaveri, 2013) และเป้าหมายของงานวิจัยมุ่งใช้ระบบนำส่งที่ผลิตขึ้นมาได้เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับเพิ่มความสดชื่นแก่ผู้ขับขี่รถ



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างเคมีของเมนทอลชนิด(1*R*, 2*S*, 5*R*) -2-isopropyl-5-methylcyclohexanol หรือ (-)-menthol ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาการผลิตนาโนแคปซูลกักเก็บเมนทอลโดยศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* study) ทดสอบคุณสมบัติของระบบนำส่ง ประสิทธิภาพการนำส่งสารเข้าสู่ชั้นผิวหนังและนำไปใช้ในการผลิตสเปรย์สำหรับเพิ่มความสดชื่น

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

การกักเก็บเมนทอลในนาโนแคปซูลจะช่วยทำให้เมนทอลละลายน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งจะช่วยลดการระเหยของเมนทอล ช่วยให้เมนทอลสามารถซึมเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังกำพวดที่มีชีวิตได้อย่างรวดเร็วเพื่อช่วยให้ผู้ใช้รู้สึกสดชื่นได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

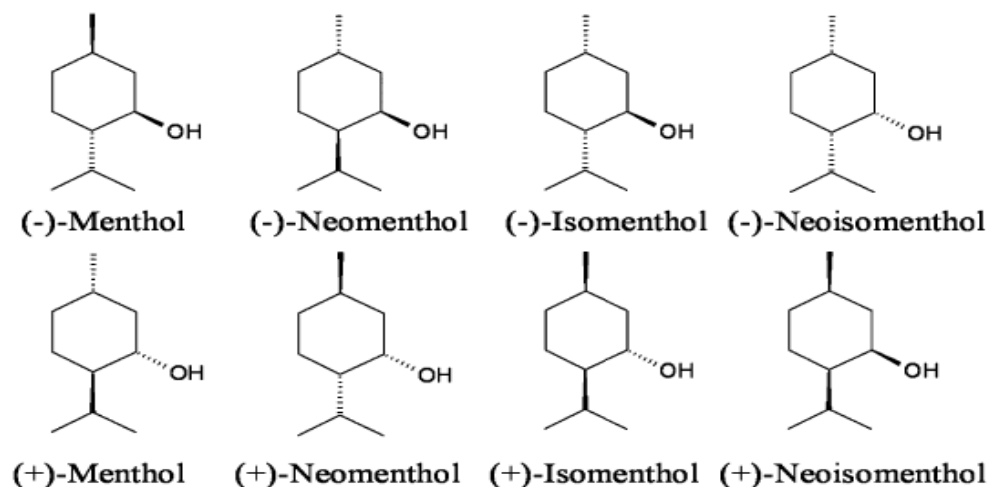
ได้กระบวนการในการพัฒนาสูตรตำรับสเปรย์เมนทอลนาโนแคปซูลที่ลดการระเหยของเมนทอลช่วยให้เมนทอลถูกดูดซึมผ่านชั้นผิวหนังกำพวดที่มีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 คุณสมบัติของเมนทอล

Menthol (*p*-menthan-3-ol; $C_{10}H_{20}O$) เป็นสารประเภท cyclic terpene alcohol ที่พบได้ทั้งในธรรมชาติจากพืชสกุล *Mentha* sp. และจากการสังเคราะห์ทางเคมีจาก α -pinene ซึ่งถูกใช้อย่างแพร่หลายมาเป็นเวลานาน โดยตั้งแต่อดีต เมนทอลนำมาใช้เพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในตำรับยา รวมไปถึงขนมหวาน เนื่องจากเป็นสารที่มีกลิ่นหอมและมีฤทธิ์ให้ความเย็น (Patel et al., 2007) โครงสร้างทางเคมีของเมนทอลนั้น ประกอบไปด้วยอะตอมคาร์บอนที่ไม่สมมาตร (asymmetric carbon) จำนวน 3 อะตอมในวงแหวน cyclohexane จึงทำให้โครงสร้างมีคุณสมบัติเป็นสเตอริโอไอโซเมอร์ (stereoisomer) โดยมีออปติคัลไอโซเมอร์ (optical isomer) จำนวน 4 คู่ ดังแสดงในภาพที่ 2 ออปติคัลไอโซเมอร์แต่ละโครงสร้างต่างมีฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไป โดยมีเฉพาะ (-)-menthol ที่มีกลิ่นหอมและฤทธิ์ให้ความเย็นรวมถึงสามารถกระตุ้นความสดชื่นได้ดี (Etzold, Jess, & Nobis, 2009) โดย *l*-(-)-menthol กระตุ้นให้เกิดความเย็นในการทดสอบแบบนอกร่างที่ค่า EC_{50} (effective concentration) เท่ากับ $66.7 \pm 3.3 \mu M$ (Journigan & Zaveri, 2013)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างออปติคัลไอโซเมอร์ของเมนทอล
ที่มา: Etzold et al. (2009)

2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของเมนทอลต่อการรับสัมผัสเย็น

กลไกการออกฤทธิ์ในการสร้างความเย็นบริเวณผิวหนังและเยื่อบุต่าง ๆ ของเมนทอลเกิดขึ้นผ่านการกระตุ้นตัวรับ cold-and menthol-sensitive receptor-1 (CMR1) หรือ transient receptor potential channel M8 (TRPM8) ซึ่งเป็นตัวรับชนิดเดียวกับที่ตอบสนองเมื่ออุณหภูมิภายนอกร่างกายต่ำกว่า 25°C ที่อยู่บริเวณปลายประสาทอิสระ (free nerve ending) ตามบริเวณต่างๆของร่างกาย ส่งผลให้เกิดการเปิดไอออนแชนแนล (ion channel) แคลเซียมไหลเข้าสู่เซลล์เกิดดีโพลาไรเซชันส่งสัญญาณประสาทไปตาม dorsal root ganglion (DRG) เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) จากไขสันหลังไปยังสมองเพื่อรับรู้ความรู้สึกเย็นนอกจากกระตุ้นให้แคลเซียมจากภายนอกเซลล์ไหลเข้าสู่เซลล์แล้ว เมนทอลยังสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งของแคลเซียมภายในเซลล์ (intracellular calcium) จากบริเวณ presynaptic neuron ส่งผลเพิ่มการหลั่งกลูตาเมต (glutamate) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่กระตุ้นการส่งสัญญาณประสาท (stimulatory neurotransmitter) (Journigan & Zaveri, 2013) เมนทอลยังสามารถลด threshold ของปฏิกิริยาการควบคุมอุณหภูมิของร่างกายการใช้ในความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการทำงานของ cold-sensitive peripheral vasoactive C nociceptive ทำให้หลอดเลือดขยายและเพิ่มการไหลเวียนของเลือด กระตุ้น cold-specific A-delta fibers ส่งสัญญาณความรู้สึกเย็นและลดความเจ็บปวด (counterirritant) ที่เกิดจากการอักเสบของปลายประสาท (Patel et al., 2007; Yin & Lee, 2020)

2.3 กระบวนการเมตาบอลิซึมของเมนทอล

เมนทอลเป็นสารที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หรือไขมันโดยเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้วจะถูกนำส่งไปที่ตับ โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ตับเริ่มต้นจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิล โดย microsomal enzyme (CYP2C9 และ CYP 3A4 เป็นหลัก) ได้เป็น *p*-menthane-3,8diol หรือ 3,8-dihydroxy-*p*-menthane-7-carboxylic acid เป็นหลัก แล้วจึงเกิดเมตาบอลิซึมโดยกระบวนการเติม glucuronic acid (glucuronidation) โดยเอนไซม์ UDP-glucuronyltransferase เพื่อให้ได้สารที่ละลายในน้ำได้ดีขึ้นแล้วถูกขับออกทางปัสสาวะนอกจากที่ตับแล้วยังพบว่ามีกระบวนการเมตาบอลิซึมบางส่วนเกิดขึ้นได้ที่บริเวณผิวหนังและทางเดินอาหารแต่ก็พบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.4.1 ระบบทางเดินหายใจ

เมนทอลเป็นสารที่ถูกใช้อยู่ในตำรับยาสำหรับบรรเทาอาการคัดจมูก และยังคงมีใช้อยู่ในปัจจุบันแม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการบรรเทาการขัดขวางทางเดินหายใจโดย Burrow และคณะ (1983) ที่พบว่าแท้จริงแล้ว เมนทอล การบูร รวมถึงยูคาลิปตัส ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าวจากการวัดข้อมูลแบบโดยเครื่องมือ rhinomanometer และวิธีที่ลดอาการคัดจมูกได้อย่างมีประสิทธิภาพคือการออกกำลังกาย แต่จากการสอบถามอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาพบว่าทั้งหมดให้ข้อมูลว่าการสูดดมเมนทอลและสาร

ดังกล่าวข้างต้นช่วยให้เกิดความรู้สึกเย็นและหายใจได้สะดวกขึ้น ต่อมาการศึกษาของ (Eccles et al., 2003) ซึ่งพบว่าเมนทอลมีฤทธิ์ในการลดอาการคัดจมูก ช่วยให้การหายใจสะดวกขึ้น และบรรเทาอาการหายใจไม่ปกติในผู้ป่วยปอดอุดกั้นเรื้อรังผ่านกลไกการจับกับตัวรับที่ trigeminal nerve บริเวณทางเดินหายใจส่วนบนและก่อให้เกิดสัมผัสเย็นขึ้น

2.4.2 ระบบผิวหนัง

ฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบผิวหนังที่สำคัญของเมนทอลคือฤทธิ์ในการกระตุ้นความรู้สึกเย็น นอกจากฤทธิ์ดังกล่าวแล้วเมนทอลยังสามารถออกฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดเฉพาะที่ได้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ voltage-gated Na^+ channel ที่บริเวณ dorsal root ganglion (DRG) โดยจากการกระตุ้น fast และ slow inactivation state (Eccles et al., 2003)

2.4.3 ระบบทางเดินอาหาร

ตำรับยาที่ใช้สำหรับรักษาอาการลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome) มักจะมีน้ำมันสะระแหน่ (peppermint oil) เป็นองค์ประกอบอยู่ โดยที่ในน้ำมันสะระแหน่นั้นมีเมนทอลเป็นสารสำคัญ จากการศึกษาของ Hills และคณะ (1991) ในหนูตะเภาที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของลำไส้โดย carbachol พบว่าน้ำมันสะระแหน่มีฤทธิ์ในการคลายกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ใหญ่ของหนูที่เกิดการหดตัวจากการตอบสนองฤทธิ์ของ acetylcholine, histamine, 5-hydroxytryptamine และ substance P โดยลดการเกิดดีโพลาไรเซชันจากการไหลออกของโพแทสเซียมและการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่เกิดจากการที่แคลเซียมไหลเข้าเซลล์ โดยการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับกลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม dihydropyridine calcium channel blockers และด้วยกลไกที่คลายกล้ามเนื้อเรียบบริเวณทางเดินอาหารและหูดนี้ทำให้เมนทอลมีฤทธิ์ในการขับลมอีกด้วย

2.4.4 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Karapinar et al. (1987) เกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio parahaemolyticus*) ในน้ำมันหอมระเหย 4 ชนิดได้แก่ eugenol, thymol, menthol และ anethole พบว่าน้ำมันทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยที่ eugenol มีฤทธิ์ดีที่สุดนอกจากนี้แล้วจากการศึกษาของ (Moleyaret al, 1992) เกี่ยวกับฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย cinnamic aldehyde, citral, geraniol, eugenol และ menthol ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. และ *Enterobacter* sp. พบว่าน้ำมันทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยที่ cinnamic aldehyde มีฤทธิ์ดีที่สุด

2.4.5 คุณสมบัติอื่นๆ

สารประกอบจำพวกเทอร์พีน (terpenes) ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในตำรับยาเฉพาะที่ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเป็นสารนำพา (penetration enhancer) จากการศึกษาเกี่ยวกับกลไกในการออกฤทธิ์โดยรวมพบว่าเทอร์พีนจะออกฤทธิ์โดยรบกวนการจัดเรียงตัวของไขมันในผิวหนังชั้น stratum corneum ทำให้โครงสร้างเกิดการแปรปรวนและเพิ่มสภาพความเป็นของไหล (fluidity) ของเซลล์บริเวณนั้น รวมถึงอาจรบกวนบริเวณเชื่อมต่อของเยื่อหุ้มเซลล์ (desmosome) นอกจากนี้สำหรับเมนทอลพบว่า

กลไกการเป็นสารนำพามีความเกี่ยวข้องกับ transientreceptor potential channel M8 (TRPM8) จากการศึกษาของ Amit และคณะ (2017) โดยทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของเจล 4 ตำรับ ที่ประกอบด้วย 1. ตำรับที่มีเฟียงยา (diphenhydramine หรือ lidocain) 2. ตำรับที่มียาและเมนทอล 3. ตำรับที่มียาเมนทอลและยาที่ปิดกั้นตัวรับของแคลเซียม (calcium channel blockers) ได้แก่ diltiazem หรือ verapamil 4. ตำรับที่มีเฟียงยาและยาที่ปิดกั้นตัวรับของแคลเซียม (calcium channel blockers) เพื่อพิสูจน์สมมติฐานเกี่ยวกับผลของแคลเซียมในการเพิ่มการซึมผ่านของสารสู่ผิวหนัง โดยพบว่าตำรับเจลที่มีเฟียงยาและเมนทอลมีระดับความเข้มข้นของยาในผิวหนังสูงกว่าตำรับที่ไม่มีเมนทอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ตำรับที่มียาปิดกั้นตัวรับของแคลเซียมด้วยจะมีระดับความเข้มข้นของยาในผิวหนังไม่ต่างจากตำรับที่มีเมนทอล จึงสรุปว่าการลดระดับของแคลเซียมนอกเซลล์ (extracellular calcium) อันเป็นผลจากการจับกับตัวรับของเมนทอลรบกวนการทำงานของ cadherin โปรตีนที่ทำหน้าที่ตรงบริเวณเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ในชั้นผิวหนัง (Joshi et al., 2017)

2.5 พิษวิทยาของเมนทอล

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ระบุปริมาณที่ยอมรับได้ในแต่ละวัน (acceptable daily intake) เท่ากับ 0-0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ข้อมูลจาก Martindale, The extra pharmacopoeia ได้ระบุขนาดที่ทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิต (fatal dose) ของเมนทอล ไว้ที่ 2 กรัม หรือประมาณ 28 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

จากการศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึมของเมนทอลในหนูของ (Madyastha et al, 1988) ทดสอบโดยป้อนหนูด้วย l-menthol ขนาด 800 มก./กก. พบว่าจากการกินต่อเนื่องติดต่อกัน 3 วันพบว่าหนูมีการเพิ่มขึ้นของการทำงานของเอนไซม์ตับ ได้แก่ liver microsomal cytochrome P-450 และ NADPH cytochrome c reductase ทั้งนี้ไม่พบความผิดปกติอื่นที่รุนแรงแม้ให้เมนทอลต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 20 วัน

จากการศึกษาของ Noriyasu et al. (2013) เกี่ยวกับพิษของบุหรี่ที่มีเมนทอลเป็นองค์ประกอบโดยใช้แบบจำลองในสิ่งมีชีวิต (bioassays model) 2 แบบจำลอง คือ plant cells (tobacco Bel-W3 cells) และ human cells (alveolar epithelial A549 cells) โดยให้เซลล์สัมผัสกับควันบุหรี่ชนิดที่มีและไม่มีเมนทอลเป็นส่วนประกอบ พบว่าในกลุ่มที่ได้รับบุหรี่ที่ผสมเมนทอล (mentholated cigarettes) และกลุ่มที่ได้รับบุหรี่ที่ไม่ได้ผสมเมนทอล (non-mentholated cigarettes) มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในเซลล์แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ต่อการตายของเซลล์ (%cell death) ในแบบจำลองทั้ง 2 ชนิด กลุ่มที่ได้รับบุหรี่ที่ผสมเมนทอล (mentholated cigarettes) มีเซลล์ตายมากกว่ากลุ่มที่ได้รับบุหรี่ที่ไม่ได้ผสมเมนทอล (non-mentholated cigarettes) ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ ขึ้นกับขนาดของควันบุหรี่ที่ให้ นอกจากนี้ใน tobacco Bel-W3 cells ยังพบว่ายิ่งขนาดสูงยิ่งมีความแตกต่างระหว่างเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ตายแตกต่างกันมากขึ้นในทั้ง 2 กลุ่ม เช่น ที่การให้บุหรี่ 3 มวน จำนวนของเซลล์ที่ตายของกลุ่มที่ได้รับบุหรี่ที่ไม่ได้ผสมเมนทอลเท่ากับร้อยละ 34 ขณะที่กลุ่มที่ได้รับบุหรี่ที่ผสมเมนทอลเท่ากับร้อยละ 69

ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่เมานทอลมีฤทธิ์ในเปลี่ยนแปลงความไว (sensitivity) ของเซลล์ต่อสารประกอบที่อยู่ในผิวหนัง

2.6 โครงสร้างของผิวหนังมนุษย์

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย เป็นสิ่งกีดขวางทางกายภาพ (physical barriers) ของเซลล์สิ่งมีชีวิตจากสภาพแวดล้อมภายนอกช่วยควบคุมสมดุลในร่างกายทั้งสมดุลน้ำและอุณหภูมิร่างกายผิวหนังจึงเป็นอีกหนึ่งอวัยวะที่มีประโยชน์ในการใช้นำส่งสารผ่านผิวหนังเพื่อเป็นประโยชน์ในการหลีกเลี่ยงการสลายของสารเมื่อให้ผ่านทาง ทางเดินอาหารหรือการลดการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ (Graaff, 2002) โดย การนำส่งของสารผ่านผิวหนังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด การทดสอบการซึมผ่านของสารในหลอดทดลองกับในสิ่งมีชีวิตพบว่ามีความแตกต่างกันเนื่องจากผิวหนังในตำแหน่งที่แตกต่างกันของร่างกายจะมีความหนาของชั้นผิวหนังไม่เหมือนกัน หลอดเลือดที่มาเลี้ยงบริเวณผิวหนังและอุณหภูมิต่างส่งผลต่อการซึมผ่านของสารผ่านผิวหนังที่แตกต่างกัน โครงสร้างผิวหนังที่มีความชุ่มชื้นหรือผิวแห้ง และการเกิด occlusion effect จะส่งผลต่อการซึมผ่านของสารผ่านผิวหนัง ถ้าหากผิวหนังเกิดบาดแผลจะทำให้สิ่งกีดขวางทางกายภาพถูกทำลายเป็นช่องทางให้สารสามารถผ่านเข้าสู่ร่างกายได้มากขึ้น และพบว่าชั้นผิวหนังจะมี ส่วนประกอบที่แตกต่างกันไปตามช่วงอายุที่แตกต่างกัน การหลุดลอกของผิวหนังโดยชั้น stratum corneumจะมีการผลัดเปลี่ยนผิวทุก 2 สัปดาห์จะส่งผลให้มีความแปรผันของการซึมผ่านของสารและคุณสมบัติของสารได้ทั้งความถี่ของการแตกตัวเป็นประจุความหนืดและขนาดโมเลกุลถึงแม้ว่าการนำส่งสารผ่านผิวหนังจะหลีกเลี่ยงการถูกสลายตัวที่ตับได้ (hepatic metabolism) แต่ในบริเวณชั้นของผิวหนังยังสามารถเกิดการสลายตัวได้ (skin metabolism) ส่งผลให้ระดับสารเมื่อซึมผ่านสู่ชั้นผิวหนังเปลี่ยนแปลงไป และหากมีการใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีผลทำให้โครงสร้างของชั้นผิวเกาะกลุ่มกันน้อยลงทำให้สามารถเพิ่ม การดูดซึมได้ (Brisson, 1974; Kissel et al., 2018)

2.6.1 ชั้นหนังกำพร้า

มีความหนา 0.007 ถึง 0.12 mm ส่วนใหญ่ประกอบด้วยชั้นที่ตายแล้วไม่มีหลอดเลือดมาเลี้ยง ชั้นล่างสุดคือ stratum basale เป็นชั้น single layer มีเซลล์ 4 ชนิดประกอบรวมอยู่ในชั้น และ Langerhans cells ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ชั้นถัดมาคือ stratum spinosum เจริญมาจากชั้น stratum basale ต่อมาเป็นชั้น stratum granulosum เป็นชั้นที่มีลักษณะแบนและบางประกอบด้วย keratohyalin granule ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เคราตินสะสมอยู่ ถัดมาเป็นชั้น stratum lucidum เป็นชั้นที่เริ่มมีลักษณะโปร่งใส ไม่มีนิวเคลียสมีขนาดแบนมากขึ้น keratinocytes อยู่อย่างหนาแน่นร่วมกับ eleidin ชั้นนอกสุดคือชั้น stratum corneum เป็นชั้นที่ตายแล้ว ไม่มีนิวเคลียส ประกอบด้วยชั้นที่มีขนาดแบนมากเรียงกัน 25-30 ชั้น เป็นชั้นนอกสุดคอยหลุดลอกออกเป็นขี้ไคลทำหน้าที่ปกป้องผิวมีเคราตินสะสมอยู่เป็นจำนวนมากเพื่อลดการสูญเสียน้ำ (Graaff, 2002)

2.6.2 ชั้นหนังแท้

เป็นชั้นที่อยู่ลึกและหนากว่าชั้นหนังแท้ภายในประกอบด้วยเส้นใยโปรตีน collagen และ elastin โดยจะพบ elastic fibers มากในช่วงวัยหนุ่มและจะลดลงในวัยชรา ในชั้นนี้มีหลอดเลือดมา

ไหลเวียนเพื่อเลี้ยงเซลล์ที่มีชีวิต และยังมีต่อมเหงื่อต่อมไขมันรูขุมขน และเส้นประสาท อยู่ในชั้นนี้ด้วย (Graaff, 2002)

2.6.3 ชั้นใต้ผิวหนัง

เป็นชั้นที่อยู่ถัดลงมาจากชั้นหนังแท้ประกอบด้วย loose connective tissue และ เนื้อเยื่อไขมัน(adipose cells)เป็นส่วนใหญ่และยังมีเส้นเลือดและเส้นประสาทมาเลี้ยง เป็นตำแหน่งที่มีการบริหารยาทางผิวหนังโดยเป็นยาฉีดเข้าใต้ผิวหนังและฝังอุปกรณ์ทางการแพทย์ (Graaff, 2002)

ผิวหนังยังมีส่วนประกอบเพิ่มเติมประกอบด้วย เส้นผมหรือขนที่ปกคลุมตามร่างกายซึ่งเป็นการรวมตัวกันของ keratinized cells ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วนคือเส้นขน (shaft) และรากขน (root) รูขุมขนมีลักษณะเป็นทรงกระบอกยืดยาวลงไปถึงชั้น epidermis ในชั้น stratum basaleมีหลอดเลือดมาเลี้ยงจำนวนมากจะมีการสร้างเส้นขนหรือผมเส้นใหม่ ในบริเวณรูขุมขนจะมีกล้ามเนื้อเรียบ arrector pili muscles ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยึดจับส่งผลต่อการตอบสนองต่อการอุณหภูมิร่างกายด้วยการเกิดภาวะขนลุก (Saladin, 2014) นอกจากนี้แล้วผิวหนังยังมีต่อมมีท่อ(exocrine glands) ที่อยู่บริเวณผิวหนังมีหลายชนิดคือ ต่อมไขมัน(sebaceous gland)ทำหน้าที่สร้างไขมันที่เรียกว่า sebum ซึ่งช่วยให้ผิวหนังและขนมีความอ่อนนุ่ม ต่อมเหงื่อ(sudoriferous gland)ทำหน้าที่สร้างเหงื่อซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมอุณหภูมิของร่างกายและต่อมน้ำมัน(ceruminous gland) ทำหน้าที่สร้างไขในการปกคลุมผิวหนังที่เรียกว่า cerumen (Saladin, 2014)

2.7 การดูดซึมสารผ่านผิวหนัง

การนำสารผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนัง stratum corneum ที่เป็นชั้นที่สำคัญที่สุดในการควบคุมการนำสารเข้าสู่ร่างกายผ่านผิวหนังเนื่องจากเป็นชั้นที่กำหนดอัตรา (rate-determining layer) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างคล้าย bricks and mortar wall (Bolzinger et al., 2012) กระบวนการแพร่ของสารจะผ่านได้ 3 ช่องทางที่แตกต่างกัน คือ 1). ช่องทางระหว่างเซลล์ (intercellular route) คือการที่สารจะเคลื่อนผ่านบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ที่มีการเรียงตัวสลับไปมาเกาะกันอย่างหลวมๆและจะมีการแพร่ผ่าน lipid matrix ที่มีทั้งชั้นของเหลวที่ละลายในน้ำและน้ำมัน 2). ช่องทางผ่านเซลล์ (intracellular route, transcellular route) คือสารจะเคลื่อนผ่านจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่งต่อไปเรื่อยๆโดยสารที่สามารถผ่านทางช่องทางนี้ได้ดีจะมีลักษณะละลายได้ทั้งน้ำและน้ำมัน 3). ช่องทางผ่านรูขุมขนและต่อมมีท่อ (transappendageal route) คือสารจะสามารถผ่านไปในบริเวณรูขุมขนต่อมเหงื่อต่อมไขมันแต่จะเกิดขึ้นน้อยมากเนื่องจากหากเทียบสัดส่วนจะมีปริมาณน้อยกว่าพื้นที่ผิวหนังทั้งหมดโดยในช่องทางนี้สารจะผ่านทะลุลงไปสู่ชั้น dermis ได้โดยตรง (Ehrhardt and Kim, 2008) อัตราเร็วในการดูดซึมทางผิวหนังอธิบายจากสมการ Fick's law of diffusion (Idson, 1975) ดังสมการที่ 2.1

$$J = \frac{DD}{\delta \delta} \Delta C \quad (2.1)$$

เมื่อ J คือ อัตราการแพร่ผ่านของสารต่อหนึ่งตารางหน่วย (flux) D คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของสาร ΔC คือ ความต่างของระดับความเข้มข้นของสารคือ ความหนาของชั้น stratum corneum ทำให้ทราบว่าสารที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้ดีจะต้องมีคุณสมบัติคือมีขนาดโมเลกุลเล็ก มีความสามารถในการละลายน้ำและไขมัน ความเป็นกรด-ด่างของสารที่ส่งผลต่อการแตกตัวเป็นประจุ ณ ตำแหน่งที่ดูดซึม และสามารถเพิ่มการดูดซึมของได้ถ้าหากมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารแต่ต้องคำนึงถึงความเป็นพิษของสารชนิดนั้นด้วย

2.8 นาโนแคปซูล

นาโนแคปซูล (nanocapsules) เป็นระบบนำส่งสารที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 10-1000 นาโนเมตร (Kothamasu et al., 2012) ประกอบด้วยโครงสร้างเปลือก (wall) ซึ่งสร้างขึ้นจากสารกลุ่มพอลิเมอร์ (polymers) ทำหน้าที่ห่อหุ้มยาหรือสารออกฤทธิ์ไว้ภายใน โดยบริเวณผิวของเปลือกหุ้มพอลิเมอร์นั้นจะถูกล้อมรอบด้วยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่ช่วยเพิ่มความมั่นคงให้แก่โครงสร้าง ดังนั้นอนุภาคของนาโนแคปซูลจะมีโครงสร้างที่ค่อนข้างคงรูป (rigid) ทำให้สามารถคงทนอยู่ได้เมื่อนำมาเตรียมเป็นตำรับ และยังสามารถเป็นเสมือนแอ่งกักเก็บ (reservoir) สารออกฤทธิ์เพื่อควบคุมการปลดปล่อยได้อีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นระบบที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้บริเวณผิวหนัง (Poletto et al., 2011)

2.8.1 ประโยชน์ของนาโนแคปซูล

นาโนแคปซูลเริ่มมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางมากขึ้นเนื่องจากตำรับสามารถเพิ่มความคงตัวของสารเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา ลดการเกิดการสลายตัวเนื่องจากแสง เพิ่มชีวประสิทธิผลของยาได้ สามารถบรรจุสารลงไปนาโนแคปซูลได้มาก พัฒนาให้ตำรับสามารถไปออกฤทธิ์ได้ที่บริเวณที่ต้องการ ควบคุมการปลดปล่อยของสารเพื่อมีระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการได้

2.8.2 การเพิ่มความคงตัวของตำรับ

จากการศึกษาของ Brum et al. (2017) ได้มีการศึกษาความคงตัวของตำรับ lutein nanocapsules ซึ่งสาร lutein เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์แรง แต่มีความไม่เสถียรของโมเลกุลมากและมีค่าชีวประสิทธิผลต่ำ (bioavailability) และละลายน้ำยาก ทำให้มีปัญหาเมื่อจะนำไปใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ยาและอาหาร จึงมีการพัฒนาตำรับโดยสนใจปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิแสงความชื้น เป็นต้น การเตรียม lutein nanocapsules ทำด้วยวิธี interfacial deposition of the preformed polymer (nanoprecipitation) ในวัฏภาคสารละลายอินทรีย์ ประกอบด้วย polycaprolactone (PCL), sorbitanmonostearate, medium chain triglycerides และ lutein 92% ละลายอยู่ใน acetone และ ethanol ส่วนวัฏภาคน้ำประกอบด้วยน้ำและ polysorbate 80 นำไปทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้เห็นถึงความแตกต่าง ($p > 0.05$) และมีการเปรียบเทียบความคงตัวของตำรับ lutein nanocapsules และสารละลาย lutein เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและ 25 องศาเซลเซียส พบว่าตำรับ lutein nanocapsules ภายหลังจากผ่านไป 90 วัน ที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียสเหลือปริมาณ lutein อยู่

ที่ 21% และ 33.71% ตามลำดับ แต่สารละลาย lutein พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส กลับลดลงอย่างมากภายใน 10-40 วัน

2.8.3 การเพิ่มความคงตัวต่อแสง

จากงานวิจัยของ Ourique et al. (2008) ได้มาการศึกษาพัฒนาตำรับ tretinoin-loaded nanocapsules เพื่อเพิ่มความคงตัวต่อแสงเนื่องจาก tretinoin (all-trans-retinoic acid) ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ของวิตามินเอ มีค่าการละลายน้ำที่ต่ำมีการระคายเคืองต่อผิวหนังไม่คงตัวต่อแสงและสารเคมี การเตรียมตำรับทำด้วยวิธี interfacial deposition of preformed polymer (nanoprecipitation) วัสดุสารละลายอินทรีย์ประกอบด้วย tretinoin วัสดุไขมัน capric/caprylic triglyceride mixture (CCM) หรือน้ำมันเมล็ดทานตะวัน (sun flower oil, SFO), sorbitan monooleate polymer (PLC) และ acetone ส่วนวัสดุค้ำน้ำประกอบด้วยน้ำ และ polysorbate 80 การศึกษาความไวต่อแสงใช้หลอดไฟ UV (Phillips TUV lamp-UVC long life, 30 W) แบ่งกลุ่มทดลองเป็น 3 กลุ่มคือ สารละลายเมทานอลที่มี tretinoin (MS) นาโนแคปซูล (NC) นาโนอิมัลชัน (NE) โดยนำตำรับไปให้แสงนาน 1 ชั่วโมงพบว่า MS มีค่าครึ่งชีวิตอยู่ที่ 40 นาที แต่ค่าครึ่งชีวิตของ NC มีมากกว่าเป็น 2 เท่าของ MS ($p < 0.05$) หรือในช่วง 85-100 นาที ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า NE ($p < 0.05$) ที่ค่าอยู่ที่ 69-82 นาที

จากงานวิจัยของ Savian et al. (2015) ได้มาการศึกษาพัฒนาตำรับ dithranol-loaded lipid-core nanocapsules เพื่อเพิ่มความคงตัวต่อแสงและลดการระคายเคือง เนื่องจาก dithranol (DIT) เมื่อนำมาใช้เป็นยาทาภายนอกสำหรับรักษาสะเก็ดเงินจะทำให้เกิดการระคายเคืองมากเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วจากแสงอากาศค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่สูง และตัวยามีคุณสมบัติละลายน้ำต่ำดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังยาก การเตรียมตำรับทำด้วยวิธี interfacial deposition of preformed polymer (nanoprecipitation) วัสดุสารละลายอินทรีย์ประกอบด้วย polymer (PCL) caprylic/capric triglyceride mixture (CCM) sorbitan monostearate DIT และ acetone ส่วนวัสดุค้ำน้ำประกอบด้วยน้ำชนิดนี้เป็นน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูงสุด (ultrapure water) และ polysorbate 80 นอกจากนี้ยังมีการเติม ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ ascorbic acid (AA) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาแบ่งกลุ่มทดลองเพื่อเปรียบเทียบความคงตัวของตำรับพบว่าการศึกษาตำรับ lipid-core nanocapsules ที่มี EDTA (DIT-LCNCEDTA) เปรียบเทียบกับสารละลาย dithranol ที่มี EDTA (DIT-SEDTA) พบว่าเมื่อผ่านไป 5 ชั่วโมง lipid-core nanocapsules ที่มี EDTA เหลืออยู่ 40% แต่สารละลาย dithranol เมื่อผ่านไป 1.5 ชั่วโมงพบว่าเหลือสารอยู่ 30% และการศึกษา lipid-core nanocapsules ที่มี AA (DIT-LCNCAA) เปรียบเทียบกับสารละลาย dithranol ที่มี AA (DIT-SAA) พบว่าในช่วงเวลาที่เหลือสาร 40% เท่ากันสารละลาย dithranol ที่มี AA จะใช้เวลา 9 ชั่วโมง แต่ในขณะที่ lipid-core nanocapsules ที่มี AA ใช้เวลา 20 ชั่วโมง

2.8.4 การควบคุมการปลดปล่อย

จากงานวิจัยของ Hoffmeister et al. (2012) ได้มาการศึกษาพัฒนาการนำส่งผ่านผิวหนังโดยใช้ระบบนาโนแคปซูลเพื่อควบคุมการปลดปล่อยของเมลาโทนินเพื่อใช้ควบคุมอารมณ์และวงจรการนอนหลับโดยเมลาโทนินมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ที่สั้นมากมีค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ที่ต่ำและยังมี

คุณสมบัติการละลายน้ำที่ต่ำ จึงมีการพัฒนาเป็นตำรับ melatonin-loaded polymeric nanocapsules suspension (NC) โดยการเตรียมด้วยวิธี interfacial deposition of the preformed polymer (nanoprecipitation) วัสดุสารละลายอินทรีย์ประกอบด้วย melatonin caprylic/capric triglyceride mixture Eudragit S100 Span 80 และ acetone ส่วนวัฏภาคน้ำประกอบด้วยน้ำและ polysorbate 80 และมีการเตรียม hydrophilic gels โดยใช้ carbopol 940 diazolinidyl urea และ triethanolamine เตรียมลงไปใน nanocapsule suspension (G-NC) และเตรียมลงไปในสารละลายเมลาโทนินที่มี polysorbate ร้อยละ 80 0.77 เพื่อเตรียมเป็น preformed hydrogels (G-M) นำไปทดลองการปลดปล่อยโดยใช้ cellulose dialysis bag พบว่า เมลาโทนินนาโนแคปซูล (NC) เปรียบเทียบกับสารละลายเมลาโทนิน และ G-M เปรียบเทียบ G-NC ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่การเปรียบเทียบการดูดซึมผ่านผิวหนังโดยใช้เครื่อง Franz-type diffusion cell และหนังหมูบริเวณท้องที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพบว่า G-NC มีการซึมผ่านผิวหนังน้อยกว่า G-M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการควบคุมอัตราการปลดปล่อยเกิดจากการชะลอการซึมผ่านผิวหนัง

2.8.5 การออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งที่ต้องการ

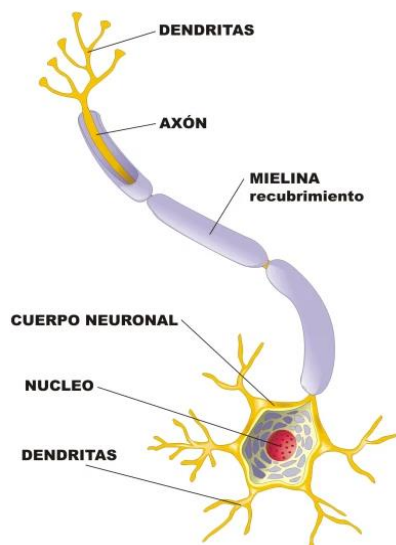
จากงานวิจัยของ Molloy et al. (2017) ได้มีการศึกษาพัฒนาการนำส่งยาเพื่อไปถึงเป้าหมายคือบริเวณที่เกิดลิ่มเลือดอุดตัน การเกิดลิ่มเลือดจะเกิดในบริเวณที่มีช่องว่างขนาดเล็กและมีอัตราเฉือน (shear rate) มากโดยการศึกษาใช้ phosphatidylcholine (PC)-based nanocapsules สำหรับ eptifibatide ในการต้านเกล็ดเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยลดการเกิดอาการข้างเคียงคือภาวะเลือดออก การเตรียมนาโนแคปซูลทำด้วยวิธี thin film hydration ทำการทดลองในหนูทดลองโดยทำให้หนูเกิดลิ่มเลือดที่ carotid artery ผลการทดสอบพบว่า eptifibatide nanocapsules (E-NC) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดลิ่มเลือดที่ตำแหน่ง stenotic (8000 วินาที) และไม่มีผลต่อลิ่มเลือดในบริเวณที่มีอัตราเฉือน 1000 วินาทีและมีการศึกษาภาวะเลือดด้วยวิธี Tail bleeding time พบว่า E-NC มีค่า Tail bleeding time อยู่ที่ 200 วินาทีซึ่งน้อยกว่า eptifibatide ซึ่งมีค่า tail bleeding time อยู่ที่ 800 วินาที ($p<0.001$)

2.8.6 การบรรจุสารได้ปริมาณมาก

จากงานวิจัยของ Ouyang et al. (2011) ได้มีการศึกษาพัฒนา polyurethane nanocapsules เพื่อบรรจุ triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) เพื่อใช้เป็นสารยึดเกาะฟัน เตรียมนาโนอิมัลชันด้วยวิธี interfacial polycondensation หลังจากนั้นเตรียมตำรับเป็น 5 กลุ่มโดยใส่ Prime & Bond NT (Dentsply De Trey, Germany) ลงไปในตำรับ TEGDMA nanocapsules ซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 0 (A) ร้อยละ 3 (B) ร้อยละ 6 (C) ร้อยละ 9 (D) และร้อยละ 12 (E) โดยพบว่า NT ที่ร้อยละ 9 TEGDMA nanocapsules แสดงถึงความสามารถในการบรรจุสารได้มาก มี micro-tensile bond strength (mTBS) มากกว่าตำรับอื่น ($p<0.001$)

2.9 โครงข่ายประสาทเทียม

โครงข่ายประสาทเทียม(artificial neural network)เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อจำลองการทำงานของโครงข่ายประสาทในสมองมนุษย์ โดยที่โครงข่ายประสาทของมนุษย์ประกอบด้วย เซลล์ประสาทที่เรียกว่า นิวรอน (neuron) และไซแนปส์ (synapses) ซึ่งเป็นจุดประสานประสาท การเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ประสาทหลายพันล้านเซลล์ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของการส่งสัญญาณ เซลล์ประสาทแต่ละเซลล์ประกอบด้วยแขนงรับสัญญาณประสาทซึ่งเป็นเสมือนหน่วยรับข้อมูลป้อนเข้าที่เรียกว่า “เดนไดรต์”(dendrites) และส่วนปลายของเซลล์ประสาทในการส่งสัญญาณประสาทซึ่งเป็นเสมือนหน่วยส่งข้อมูลออกของเซลล์ เรียกว่า “แอกซอน”(axon)



ภาพที่ 2.2 ภาพโครงสร้างระบบประสาทสำหรับสร้างเป็นโครงข่ายประสาทเทียม
ที่มา: <http://proyectoeducere.wordpress.com>

โครงข่ายประสาทเทียมมีคุณลักษณะคล้ายกับการส่งผ่านสัญญาณประสาทในสมองมนุษย์โดย มีความสามารถในการรวบรวมความรู้ (Knowledge) โดยผ่านกระบวนการเรียนรู้ (learning process) และความรู้จะถูกจัดเก็บอยู่ในรูปแบบค่าน้ำหนัก(weight) ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนค่าได้เมื่อมีการเรียนรู้สิ่งใหม่ ๆ เข้าไป ค่าน้ำหนักทำหน้าที่เปรียบเสมือนความรู้ที่รวบรวมไว้เพื่อใช้ในการแก้ปัญหาเฉพาะอย่างของมนุษย์ โครงข่ายประสาทเทียมประกอบด้วย 5 องค์ประกอบดังนี้

(1) ข้อมูลป้อนเข้า (input) เป็นข้อมูลที่ป้อนเข้าเป็นตัวเลข หากเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ ต้องแปลงให้อยู่ในรูปแบบเชิงปริมาณที่โครงข่ายประสาทเทียมยอมรับได้

(2) ข้อมูลส่งออก (output) เป็นข้อมูลที่เกิดขึ้นจริง (actual output) จากกระบวนการเรียนรู้ของโครงข่ายประสาทเทียม

(3) ค่าน้ำหนัก (weights) คือสิ่งที่ได้จากการเรียนรู้ของโครงข่ายประสาทเทียม หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ค่าความรู้ (knowledge) ค่านี้จะถูกเก็บเป็นทักษะเพื่อใช้ในการจดจำข้อมูลอื่นๆที่อยู่ในรูปแบบเดียวกัน

(4) ฟังก์ชันผลรวม (summation function, s) เป็นผลรวมของข้อมูลป้อนเข้า (a_i) และค่าน้ำหนัก (w_i)

$$s = \sum_{i=1}^n a_i w_i \quad (2.2)$$

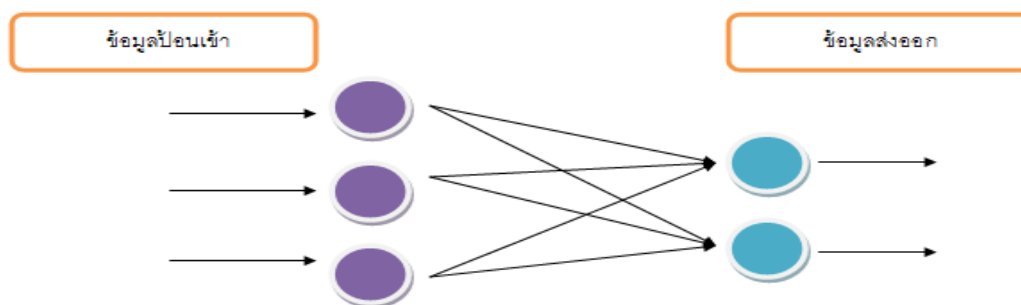
(5) ฟังก์ชันการแปลง (transfer function) เป็นการคำนวณการจำลองของโครงข่ายประสาทเทียม เช่น ซิกมอยด์ฟังก์ชัน (sigmoid function) ฟังก์ชันไฮเพอร์โบลิคแทนเจนต์ (hyperbolic tangent function)

2.9.1 ลักษณะของโครงข่ายประสาทเทียม

โครงข่ายประสาทเทียมประกอบด้วยเซลล์ประสาทเทียม หรือโหนด (node) จำนวนมากเชื่อมต่อกัน ซึ่งการเชื่อมต่อแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย เรียกว่า ชั้น (layer) ชั้นแรกเป็นชั้นนำข้อมูลเข้าเรียกว่า ชั้นรับข้อมูลป้อนเข้า (input layer) ชั้นสุดท้ายเรียกว่าชั้นส่งข้อมูลออก (output layer) และชั้นที่อยู่ระหว่างชั้นรับข้อมูลป้อนเข้าและชั้นส่งข้อมูลออกเรียกว่า ชั้นแอบแฝง (hidden layer) ซึ่งโดยทั่วไปชั้นแอบแฝงอาจมีมากกว่า 1 ชั้นก็ได้ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งประเภทของโครงข่ายประสาทเทียมได้ 2 แบบ ดังนี้

2.9.2 โครงข่ายแบบชั้นเดียว

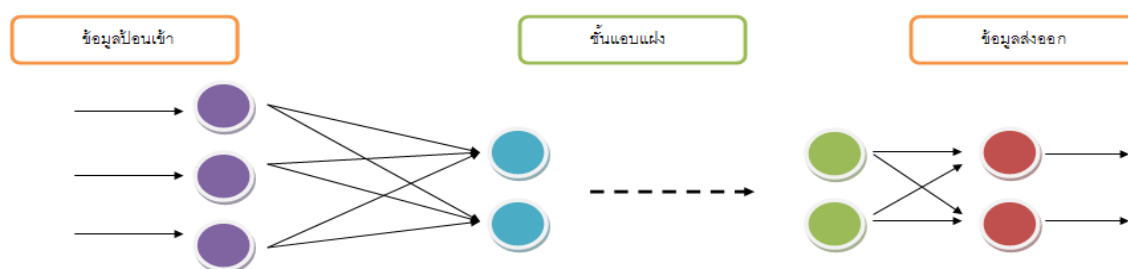
เป็นโครงข่ายประสาทเทียมอย่างง่ายที่มีเพียงชั้นรับข้อมูลป้อนเข้าและชั้นส่งข้อมูลออกเท่านั้น



ภาพที่ 2.3 โครงข่ายประสาทแบบชั้นเดียว (single layer)

2.9.3 โครงข่ายแบบหลายชั้น

โครงข่ายแบบหลายชั้นเป็นโครงข่ายที่มีชั้นแอบแฝงตั้งแต่ 1 ชั้นขึ้นไป โครงข่ายแบบหลายชั้นจะใช้ในกรณีที่ปัญหามีความซับซ้อน ซึ่งโครงข่ายชั้นเดียวไม่สามารถแก้ปัญหาได้ จึงเพิ่มจำนวนโหนดที่มีการคำนวณ หรือชั้นแอบแฝงให้กับโครงข่ายตัวอย่างของโครงข่ายหลายชั้น เช่น การแพร่ย้อนกลับ (back Propagation) เซลล์พอร์แกไนซิงแมปส์ (self organizing maps) และเคาน์เตอร์พรอพเกชัน (counter propagation)



ภาพที่ 2.4 โครงข่ายประสาทแบบหลายชั้น (multi layer)

หลักการทดสอบ

โครงข่ายประสาทเทียมมีการเรียนรู้ได้ด้วยการรับข้อมูลตัวอย่างเข้ามาจำนวนหนึ่งแล้วค่อยๆทำการปรับน้ำหนักจนกว่าจะได้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกับค่าผลลัพธ์ที่ต้องการ ความสามารถของโครงข่ายประสาทเทียม สามารถเรียนรู้ได้จากตัวอย่างข้อมูลที่มีอยู่เป็นจำนวนมากได้เป็นอย่างดีและมีความเที่ยงตรงสูง ถึงแม้จะมีกระบวนการหรือมีรูปแบบในการปฏิบัติงานที่ซับซ้อนและมีความยุ่งยากในการประมวลผลก็ตาม ซึ่งสามารถที่จะตอบปัญหาที่ยุ่งยากและค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลหรือสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ซับซ้อนได้ดี จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาทำนายหรือพยากรณ์ (สะอาด, 2552) จากความสามารถของโครงข่ายประสาทเทียม ที่มีความเหมาะสมกับกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนและให้ความแม่นยำในการทำนายผลต่างๆ (Assidjo, Yao, Kisselmina, & Amane, 2008) จึงได้มีการนำตัวแปรที่ต้องการศึกษาจากสูตรตำรับสเปรย์เพิ่มความสดชื่นที่มีส่วนผสมของ menthol บรรจุนาโนแคปซูล ได้แก่ (Menthol) X1 (Poly (ϵ -caprolactone) X2 (Poloxamer188) X3 (Particle size) Y1 (Zeta potential) Y2 (Entrapment efficiency (%)) Y3 มาใช้ในการออกแบบการทดลอง(experimental design) โดยใช้เทคนิคทางสถิติขั้นสูงเพื่อปรับค่าสภาวะของกระบวนการให้ได้ค่าที่เหมาะสมที่สุดและผลตอบสนองเป็นไปตามที่เราต้องการ และสามารถหาความสัมพันธ์ของตัวแปรนั้นๆได้

2.10 การทดสอบการระเคื่องของสารต่อเยื่อไขฟัก

การระคายเคืองของสารต่อหลอดเลือด (vascular irritation) เป็นวิธีทดสอบที่กำลังระหว่าง *in vivo* และ *ex vivo* test system เรียกว่า *In ovo* ใช้เป็นวิธีทางเลือกของการทดสอบในสัตว์ทดลอง (alternative animal model) เพื่อประเมินความเป็นพิษหรือความเข้ากันของสารต่อ capillary plexus ของ granulation tissue และ tissue damage เรียก การทดสอบนี้ว่า hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM test) โมเดลทดสอบ HET-CAM จะวัดปฏิกิริยา 3 อย่าง คือ ภาวะเลือดออก (vascular hemorrhage) การแตกของหลอดเลือด (vascular lysis) และการเกาะกลุ่มกันของ chorioallantoic membrane บนเนื้อเยื่อไข่ไก่ฟัก (fertilized chicken egg) ณ วันที่ 9 ของอายุไข่ ซึ่งเป็นระยะที่เนื้อเยื่อเส้นประสาท (nerve tissue) และตัวรับความเจ็บปวดของเอมบริโอ (pain perception) ยังไม่พัฒนา และไม่จัดเป็นสัตว์ทดลองตาม พ.ร.บ. สัตว์ทดลอง มีหลายการศึกษาที่ใช้โมเดลนี้เพื่อศึกษาคุณสมบัติการระคายเคืองของสารและแยกความแตกต่างระหว่างสารที่ระคายเคืองและไม่ระคายเคืองได้ โดยสามารถใช้ได้กับสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบของตำรับหรือตำรับผลิตภัณฑ์ การประเมินว่า สารหรือผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อการใช้ (safe for application) เมื่อพบว่าสารที่ทดสอบให้ผลแบบ medium irritation และ mild irritation ต่อ HET-CAM จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัย ขณะที่สารที่ให้ผลแบบ severe irritation ควรหลีกเลี่ยงการใช้ (ICCVAM, 2010)

2.11 สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้อง

2.11.1 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องคือ EP 988852 ได้ยื่นจดเกี่ยวกับส่วน ประกอบของเครื่องสำอางที่ให้ความรู้สึกเย็นต่อผิวหนังประกอบด้วย menthol, isopulegol, 3-(menthoxy)propane-1,2-diol menthane-3,8-diol และ vanillyl butyl ester ซึ่งให้ความรู้สึกเย็นได้นานถึง 90 นาที

2.11.2 สิทธิบัตร WO 03/007909 ได้บรรยายเกี่ยวกับผลให้ความเย็นของ methyl palmitate ที่ออกฤทธิ์นานตลอดช่วยที่ใช้

2.11.3 สิทธิบัตร U.S. Pat. No. 6,267,974 ได้เปิดเผยเกี่ยวกับส่วนผสมของสารที่ให้ความเย็นและออกฤทธิ์นาน ได้แก่ menthyl lactate, isopulegol และ menthoxypropane

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองเพื่อผลิตเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล และพัฒนารับสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลกักเก็บในนาโนแคปซูลเพื่อเพิ่มความสดชื่น ทดสอบประสิทธิภาพการซึมผ่านเข้าไปในชั้นผิวหนังของระบบนำส่งและสารออกฤทธิ์ และทดสอบการระคายเคืองในเยื่อไขไก่ฟัก เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้สำหรับวางแผนการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิผลและความพึงพอใจในอาสาสมัครสุขภาพดีต่อไป โดยมีระเบียบวิธีวิจัยดังต่อไปนี้

3.1 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัยกลางชั้น 4 คณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ตำบลเมืองศรีไค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

3.2 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1.1 เครื่องวัดขนาดอนุภาค ค่าการกระจายอนุภาค และศักย์ซีตาร์ (Nano ZS Zetasizer Malvern Instruments Worcestershire UK) และโปรแกรมประมวลผล Zetasizer version 7.02

3.2.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge, Eppendorf Company, Germany)

3.2.1.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Field Emission Scanning Electron Microscope, JEOL JSM-5800, Tokyo, Japan)

3.2.1.4 กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope, AFM XE-100, Park Systems Corp., Suwon, Korea)

3.2.1.5 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (JEOL JEM 1010, Tokyo, Japan)

3.2.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH 21, Mettler Toledo, Switzerland)

3.2.1.7 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)

3.2.1.8 หลอดปั่นเหวี่ยง (Ultracel, 10K regenerated cellulose membrane, Milliore, Germany)

3.2.1.9 เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูงต่อเชื่อมกับเครื่องตรวจวัดปริมาณสารด้วยหลักการวัดดัชนีการหักเหแสง (High Performance Liquid Chromatography-refractive Index Detector) (Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Thermo Fisher Scientific Company, USA) เชื่อมต่อกับโปรแกรมวิเคราะห์และประมวลผล Chromeleon Chromatographic Data system Software (version 7.2) (Thermo Fisher Scientific Company, USA)

3.2.1.10 เครื่องHPLC (binary pump, auto-sampler)-RI detector (Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Thermo Fisher Scientific Company, USA)เชื่อมต่อกับ C₁₈ Luna reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size) (Phenomenex, Torrance, USA) ประมวลผลการวิเคราะห์ทำโดยใช้โปรแกรม Chromeleon Chromatographic Data System (version 7.2)

3.2.1.11 เครื่องวิเคราะห์การดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (FTIR spectrometer, Nicolet 6700, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)

3.2.1.12 เครื่อง thermalgravimetric analyzer และประมวลผลการทดสอบด้วยโปรแกรม STAR SW 9.01 (TGA/SDTA851, Mettler-Toledo Corporation, Switzerland)

3.2.1.13 เครื่องวัดคุณสมบัติการไหลrheometer (MARSIII, Haake, Germany)

- 3.2.1.14 เครื่องทดสอบการซึมผ่านผิวหนังนอกร่างกาย (Franz diffusion cells, Crown Glass Company, NJ, USA)
- 3.2.1.15 เครื่อง platinum sputter (JEOL Jee 4B SVG IN, Tokyo, Japan)
- 3.2.1.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (PowerWave XS2 microplate reader, BioTeck, Winooski, VT, USA)
- 3.2.1.17 เครื่องฟกไขไก่อัตโนมัติ (Nanchang Alex Electric Factory, Jiangxi, China)
- 3.2.1.18 โปรแกรมสำเร็จรูป JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)
- 3.2.1.19 ไฟฉาย
- 3.2.1.20 Syringe gauge 27G
- 3.2.1.21 Micropipette (1-10, 10-200, 100-1000, และ 1000-10,000 μ L)

3.2.2 สารเคมี

- 3.2.2.1 Menthol [1*R*,2*S*,5*R*]-(-)-menthol] (refractive index 1.46) (melting point 41-43°C) (Fisher Chemical Company, Leicestershire, USA)
- 3.2.2.2 Nile red (9-diethylamino-5-benzo [α] phenoxazinone (molecular weight 318.4 Da) (Log P 3.8)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.2.2.3 Poloxamer 188 (Kolliphor P188) (molecular weight 7680-9510 Da)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.2.2.4 Poly (ϵ -caprolactone) (semicrystalline polymer) (molecular weight 80,000 g/mol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.2.2.5 Polysorbate 80 (Tween80) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.2.2.6 Sorbitan monooleate(Span 80) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3.2.2.7 Caprylic triglyceride (LexolGT-865) (INOLEX Company, Bangkok, Thailand) Fresh and cool, ozone, ocean fragrance (บริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีนจำกัด)
- 3.2.2.8 น้ำกลั่นและน้ำปราศจากไอออน ห้องปฏิบัติการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การออกแบบสูตรตำรับเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล

การผลิตเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลในการศึกษานี้ใช้เทคนิคการตกตะกอนนาโน (nanoprecipitation) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ferreira et al. (Ferreira et al., 2018) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังแสดงในภาพที่ 6 ดังนี้ แยกเตรียมวัตถุดิบน้ำมันและวัตถุดิบน้ำ โดยวัตถุดิบน้ำมันประกอบด้วย menthol poly(ϵ -caprolactone) sorbitan monooleate และ caprylic/capric triglycerides ละลาย

ใน acetone ปริมาตร 20 mL ส่วนวัตถุดิบประกอบด้วย polyxamer 188 polysorbate 60 และ น้ำกลั่น จากนั้นเติมวัตถุดิบน้ำมันลงในกระบอกฉีดที่ทำด้วยแก้วต่อกับเข็มขนาด 27 G และฉีดลงในวัตถุดิบในสภาวะการผลิตเป็นดังนี้ อัตราเร็วการฉีดสารเท่ากับ 4 มิลลิลิตร/นาที่ อัตราเร็วการปั่นผสมสารเท่ากับ 1000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เวลาการผสม 10 นาที จากนั้นนำไประเหย acetone ออกโดยวิธีลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35°C จนได้ปริมาณของเมนทอลนาโนแคปซูลเท่ากับ 35 มิลลิลิตร สำหรับการผลิตตำรับที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์จะทำได้เช่นเดียวกันโดยเพิ่มเฉพาะสาร Nile Red ลงไปที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 mg/mL



ภาพที่ 3.1 การผลิตเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลด้วยเทคนิคการตกตะกอนนาโน

การออกแบบการทดลอง (design of experiments, DOE) ใช้วิธีการทางสถิติในศึกษาสภาวะของกระบวนการเพื่อให้ได้ค่าสัดส่วนของปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด และได้มาซึ่งผลตอบสนองที่ต้องการ โดยเป็นการปรับปัจจัยทุกปัจจัยไปพร้อมกันด้วยแผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นกัน (Box-Behnken Design, BBD) กำหนดปัจจัยตัวแปรต้นที่ต้องการในการพัฒนาตำรับนาโนแคปซูล 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณ menthol (X_1 : 50 – 150 mg) ปริมาณ poly (ϵ -caprolactone) (X_2 : 80 – 125 mg) และปริมาณ poloxamer 188 (X_3 : 125 – 375 mg) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตัวแปรตามที่ต้องการศึกษาคือคุณสมบัติของตำรับที่ได้จากการเตรียม ได้แก่ ขนาดอนุภาคนาโนแคปซูล (Y_1) ค่าศักย์ซีตาร์ (Y_2) และร้อยละการกักเก็บเมนทอลในนาโนแคปซูล (encapsulation efficiency; %EE) (Y_3) (ทั้งนี้ค่าดัชนีการกระจายอนุภาคไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ เพราะการเปรียบเทียบแต่ละสูตรตำรับโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยในการทดลองจะทำแบบสุ่มเพื่อลดปัจจัยกวนที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการผลิต แผนการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับแต่ละชุดข้อมูล

ตารางที่ 3.1 ปริมาณส่วนประกอบของสารที่ใช้ผลิตเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลที่จะนำไปออกแบบ

การทดลองด้วยแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกิน

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	ระดับการทดลอง			หน้าที่ในตำรับ
		-1	0	+1	
วัตถุดิบน้ำมัน					
menthol (mg)	X_1	50	100	150	สารเพิ่มความรู้สึกรื่นเย็น
poly(ϵ -caprolactone) (mg)	X_2	80	102.5	125	พอลิเมอร์ห่อหุ้ม
caprylic/capric triglycerides(mg)			300		น้ำมัน
sorbitan monooleate (mg)			80		สารลดแรงตึงผิว
acetone (mL)			25		ตัวทำละลาย
วัตถุดิบน้ำ					
poloxamer 188 (mg)	X_3	125	250	375	สารลดแรงตึงผิว
polysorbate 80 (mg)			80		สารลดแรงตึงผิว
distilled water (g)			50		น้ำกระสาย
ตัวแปรตาม		เป้าหมายที่ต้องการ			
ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนแคปซูล (nm)	Y_1	ต่ำสุด			
ศักย์ซีตาร์ด (mV)	Y_2	สูงสุด (ค่าลบ)			
ร้อยละการบรรจุ menthol (%)	Y_3	สูงสุด			

ตารางที่ 3.2 สภาวะของการทดลองด้วยแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกินสำหรับผลิตเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล

ลำดับที่	ค่าจริง (ค่ารหัสระดับการทดลอง)		
	menthol (X_1 , mg)	poly(ϵ -caprolactone) (X_2 , mg)	poloxamer 188 (X_3 , mg)
1	50.00 (-1)	80.00 (0)	250.00 (0)
2	100.00 (0)	125.00 (+1)	125.00 (-1)
3	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)
4	150.00 (+1)	125.00 (+1)	250.00 (0)
5	100.00 (0)	80.00 (-1)	125.00 (-1)

6	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)
7	50.00 (-1)	102.50 (0)	375.00 (+1)
8	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)
9	150.00 (+1)	80.00 (-1)	250.00 (0)
10	150.00 (+1)	102.50 (0)	375.00 (+1)
11	100.00 (0)	80.00 (-1)	375.00 (+)
12	50.00 (-1)	102.50 (0)	125.00 (0)
13	100.00 (0)	125.00 (+1)	375.00 (+1)
14	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)
15	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)
16	50.00 (-1)	125.00 (+1)	250.00 (0)
17	150.00 (+1)	102.50 (0)	125.00 (-1)

หมายเหตุ : ค่าที่อยู่ในวงเล็บ -1 0 และ +1 หมายถึง ระดับการทดลอง

3.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตนาโนแคปซูลด้วยวิธีโครงข่ายประสาทเทียม

งานวิจัยนี้ใช้วิธีโครงข่ายประสาทเทียม (artificial neural network, ANN) และ K-fold cross-validation โดยใช้โปรแกรม JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) กำหนดให้ช่วงของชั้นซ่อน(hidden layer) มีจำนวนหน่วยย่อย (node) ในชั้นซ่อนอยู่ระหว่าง 5-10 หน่วยย่อย (node) และกำหนดฟังก์ชันถ่ายโอน (transfer function) ของโครงข่ายประสาทเทียมในชั้นซ่อน (hidden layer) และชั้นส่งออก (output layer) เป็นแบบ exponential logistic TanH และ identity เพื่อคัดเลือกฟังก์ชันถ่ายโอนที่เหมาะสมต่อไปตัวแปรข้อมูลนำเข้าที่ใช้กับโครงข่ายประสาทเทียมต้องมีการแปลงค่าข้อมูล (data transformation) เพื่อเป็นการปรับขอบเขตของข้อมูลให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ฝึกสอนให้โครงข่ายประสาทเทียม ข้อมูลนำเข้า (input layer) และข้อมูลส่งออก (output) ของโครงข่ายประสาทเทียมประกอบด้วย

3.3.2.1 ข้อมูลนำเข้า (input layer) คือ สัดส่วนของ menthol (X_1) Poly(ϵ -caprolactone) (X_2) และ poloxamer 188 (X_3)

3.3.2.2 ข้อมูลส่งออก (output layer) คือขนาดอนุภาคเฉลี่ยของนาโนแคปซูล (Y_1) ศักย์ซีตาร์ (Y_2) และค่าร้อยละการกักเก็บเมนทอลในระบบนำส่งนาโนแคปซูล (Y_3)

การประเมินประสิทธิภาพการทำนายค่าของแบบจำลองที่สร้างขึ้นมาว่ามีความเหมาะสมหรือไม่นั้นในการศึกษานี้ใช้สถิติ 3 ค่า ได้แก่ determination coefficient (R^2) mean absolute deviation (MAD) และ root mean squared error (RMSE) จากนั้นจะคำนวณหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิต

เมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลโดยใช้ฟังก์ชันความพึงพอใจ(Yingngam et al., 2019; Yingngam et al., 2018)

3.3.3 การตรวจสอบคุณสมบัติของเมนทอลกักเก็บในนาโนแคปซูล

3.3.3.1 การวัดขนาดอนุภาค ดัชนีการกระจายอนุภาค และศักย์ซีตาร์ของนาโนแคปซูล การวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ย ค่าดัชนีการกระจายอนุภาค และศักย์ซีตาร์ของนาโนแคปซูลวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือNano ZS Zetasizer และประมวลผลด้วยโปรแกรมZetasizer version 7.02 มีขั้นตอนดังนี้ นำตัวอย่างที่ทดสอบมาเจือจางด้วย ultrapure water ในอัตราส่วน 1:300 (v/v) เพื่อให้เกิดการกระเจิงลำแสงเลเซอร์ได้อย่างอิสระและเหมาะสมในการวัด จากนั้นคำนวณค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายอนุภาค และค่าศักย์ซีตาร์ การวิเคราะห์ทำที่อุณหภูมิ 25°C และวัดตัวอย่างทดสอบอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.3.3.2 การวิเคราะห์ค่าร้อยละการกักเก็บmentholในนาโนแคปซูล การวัดปริมาณของเมนทอลที่กักเก็บไว้ในนาโนแคปซูลใช้วิธีวิเคราะห์ทางอ้อม (indirect method) จากการคำนวณหาปริมาณของเมนทอลอิสระหรืออยู่ในส่วนของเหลวใส(supernatant) ที่ได้ภายหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง การวิเคราะห์ใช้วิธี high performance liquid chromatography-refractive index detector (HPLC-RI detector) เพราะเมนทอลเป็นสารที่ไม่ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตและแสงปกติที่ตามนุษย์มองเห็นได้ (ultraviolet-visible light) ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 800 nm จึงไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-UV/Visdetector หรือ HPLC-Fluorescent detector ได้ (Shaikh & Patil, 2010) อีกทั้งการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography ทำได้ยากและมีขั้นตอนที่ซับซ้อนเพราะองค์ประกอบของสารในตำรับมีผลต่อ capillary column จึงไม่สามารถฉีดเข้าไปในคอลัมน์ได้โดยตรง การคำนวณหาปริมาณร้อยละการกักเก็บmentholในนาโนแคปซูล (encapsulation efficiency, %EE) คำนวณโดยใช้สมการที่ 3.1 ดังนี้

$$\%EE = \frac{\text{ปริมาณเมนทอลทั้งหมด} - \text{ปริมาณเมนทอลอิสระ}}{\text{ปริมาณเมนทอลทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.1)$$

การแยกเมนทอลอิสระจากเมนทอลที่กักเก็บในนาโนแคปซูลจะไม่สามารถแยกได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงภายใต้สภาวะยิ่งยวด (ultracentrifugation) ได้เพราะระบบนำส่งที่พัฒนาขึ้นมานั้นเป็นชนิด lipid-core nanocapsulesซึ่งอนุภาคนาโนแคปซูลที่มีน้ำมันเป็นส่วนประกอบจะลอยอยู่ด้านบนของหลอดปั่นเหวี่ยงดังนั้นจำเป็นต้องใช้เทคนิคการปั่นแยกผ่านเยื่อกั้น เรียกว่า เทคนิค centrifugation/filtration มีวิธีทำดังนี้

1) การสกัดเมนทอลทั้งหมดจากตำรับ ใช้ปิเปตดูดตำรับเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลมา 0.2 mL จากนั้นเติมเมนทอล 9.8 mL ลงไปและนำไปสกัดด้วยคลีนเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,800 รอบต่อนาที นาน 20 นาที และเก็บส่วนใส (supernatant) ไปกรองด้วยชุดกรองขนาด 0.22 ไมครอน สำหรับนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-RI detector

2) การสกัดเมมทอลอิสระจากตำรับ ใช้ปิเปตดูดตำรับเมมทอลบรรจุนาโนแคปซูล มา 0.5 mL จากนั้นเติมลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (Ultracel, 10K regenerated cellulose membrane) อุปกรณ์ชนิดนี้จะคัดขนาดอนุภาคที่สูงกว่า 10 นาโนเมตรไม่ให้ผ่านลงไปที่ด้านล่าง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,800 รอบต่อนาที ที่ 25°C นาน 20 นาที และเก็บส่วนใส (supernatant) เทคนิคนี้ได้ตรวจสอบเบื้องต้นโดยผู้วิจัยแล้วพบว่าไม่มีผลดูดซับสารที่ต้องการวิเคราะห์ไว้ที่แผ่นกรอง และสามารถนำสารส่วนใสด้านล่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-RI detector ได้

3) การวิเคราะห์เมมทอลด้วยเทคนิค HPLC-RI การวิเคราะห์เมมทอลด้วยเทคนิค HPLC-RI (Shaikh & Patil, 2010) มีสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ เครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้คือ HPLC (binary pump, auto-sampler) - RI detector (Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Thermo Fisher Scientific) วัสดุภาคเคลื่อนที่คือ สารผสมระหว่าง methanol:water อัตราส่วน 70:30 โดยปริมาตร กำหนดอัตราเร็วการไหลเท่ากับ 1 mL/min จากนั้นฉีดตัวอย่างปริมาตร 80 μ L ผ่านเข้าไปใน guard column (4 mm $\times$ 2 mm) ที่เชื่อมต่อกับ C₁₈ Luna reverse-phase column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m particle size) การประมวลผลการวิเคราะห์ทำโดยใช้โปรแกรม Chromeleon Chromatographic Data System (version 7.2)

3.3.4 การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของเมมทอลบรรจุนาโนแคปซูล

3.3.4.1 สัณฐานวิทยาของระบบนำส่ง ลักษณะนาโนแคปซูลของระบบนำส่งที่ผลิตขึ้น ตรวจสอบด้วยเทคนิค (transmission electron microscopy, TEM) ดังนี้ นำตัวอย่างไปย้อมในสารละลาย 1% sodium phosphotungstic acid จากนั้นหยดลงบน copper grid และนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (JEOL JEM 1010, Tokyo, Japan)

3.3.4.2 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงพันธะเคมี การทดสอบการเปลี่ยนแปลงพันธะเคมีของสารที่นำมาเตรียมเป็นนาโนแคปซูลได้ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) (FTIR spectrometer) วิเคราะห์การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่นระหว่าง 4,000 ถึง 400 cm^{-1} โดยกำหนดขนาดการสแกนเท่ากับ 32 และความละเอียดของการสแกนเท่ากับ 4 cm^{-1} จากนั้นประมวลผลการทดสอบด้วยโปรแกรม OMNIC

3.3.4.3 คุณสมบัติเชิงอุณหภูมิจากการทดสอบคุณสมบัติของนาโนแคปซูลในการป้องกันการระเหยของ methol ออกจากระบบนำส่งเมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิได้ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค thermalgravimetric analysis (TGA) มีวิธีทำดังนี้ นำสารตัวอย่างหนักน้ำที่ชั่งอย่างแม่นยำ 15 mg มาวางลงใน crucible จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง thermalgravimetric analyzer และประมวลผลการทดสอบด้วยโปรแกรม STAR SW 9.01 (TGA/SDTA851, Mettler-Toledo Corporation, Switzerland) กำหนดสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ ช่วงอุณหภูมิวิเคราะห์ระหว่าง 25°C ถึง 600°C และอัตรา

การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเท่ากับ 10°C/min การวิเคราะห์ทำภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน และแสดงผลในรูปร้อยละมวลที่หายไป

3.3.4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH value) ความเป็นกรด-ด่างของระบบนำส่ง menthol บรรจุในนาโนแคปซูลวัดด้วยเทคนิค potentiometry ดังนี้ นำตัวอย่างมาวัดด้วยเครื่องวัด potentiometer (model pH 21, Mettler Toledo, Switzerland) โดยจุ่มหัววัดลงไปในตัวอย่างที่เป็นของเหลวโดยตรง การวัดทำที่อุณหภูมิ 25°C ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลาย 1N NaOH หรือ 0.1%v/v HCl

3.3.4.5 คุณสมบัติการไหล วัดความหนืดของตัวอย่างมาวัดความหนืดด้วยเครื่อง rheometer (MARSIII) และควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C และบันทึกผลที่วัดได้

3.3.5 การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล

3.3.5.1 การวิเคราะห์วิถี (pathway) การนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังของนาโนแคปซูล การวิเคราะห์วิถีการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังของระบบนำส่งนาโนแคปซูลทดสอบโดยการติดฉลากสาร Nile red ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลูออเรสเซนต์ที่ละลายในไขมันลงไปบนนาโนแคปซูล โดยกำหนดให้ Nile red มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 mg/mL และกำหนดให้ Nile red ที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็นกลุ่มควบคุมโดยละลายใน caprylic/capric triglycerides มีวิธีทำดังนี้ นำผิวหนังส่วนหูของสุกรที่ได้รับจากโรงฆ่าสัตว์มาล้างทำความสะอาด จากนั้นตัดให้มีความหนาเท่ากับ 1.0 ± 0.1 mm และนำไปซึ่งลงบนเครื่องทดสอบการซึมผ่านผิวหนังนอกร่างกาย (Franz diffusion cells, Crown Glass Company, NJ, USA) ที่มีพื้นที่การซึมผ่านผิวหนังเท่ากับ 1.72 cm² สารละลายตัวกลางสำหรับรับสารที่ซึมผ่านผิวลงมาเป็น phosphate buffer saline solution pH 7.4 กำหนดอุณหภูมิของสารละลายตัวกลางด้านล่างเท่ากับ 37°C ซึ่งจะมีผลทำให้ผิวหนังด้านบนมีอุณหภูมิเท่ากับ 32°C และอัตราเร็วในการขนส่งสารละลายด้านล่างเท่ากับ 600 รอบต่อนาที เมื่อเตรียมผิวหนังก่อนเริ่มการทดสอบแล้วประมาณ 30 นาที จึงนำสารตัวอย่างมา 0.25 mL เติมลงไปในช่องรับสารส่วนบน จากนั้นปั๊มเป็นเวลา 0 5 15 และ 30 นาที โดยผิวหนังที่ปั๊มเสร็จจะนำมาล้างสารตัวอย่างออกแล้วตัดผิวหนังทันทีด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ และนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์

3.3.5.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของนาโนแคปซูลและการซึมผ่านลงผิวหนังของเมนทอล การตรวจสอบลักษณะการกระจายตัวของนาโนแคปซูลบรรจุเมนทอลบนผิวหนังสุกรใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (field emission-scanning electron microscopy, FE-SEM) (JEOL JSM-5800, Tokyo, Japan) มีวิธีทำดังนี้ นำผิวหนังสุกรซึ่งบนเครื่องทดสอบการซึมผ่านผิวหนังนอกร่างกาย (Franz diffusion cell) โดยให้ผิวหนังส่วนล่างสัมผัสกับสารละลาย phosphate buffer saline ส่วนผิวหนังด้านบนสัมผัสกับสารตัวอย่าง (0.5 mL) กำหนดอุณหภูมิของสารละลายตัวกลางด้านล่างเท่ากับ 37°C ซึ่งจะมีผลทำให้ผิวหนังด้านบนมีอุณหภูมิเท่ากับ 32°C และอัตราเร็วในการขนส่งสารละลายด้านล่างเท่ากับ 600 รอบต่อนาที จากนั้นปั๊มเป็นเวลา 30 นาที จึงนำผิวหนังด้านบนออก ซับสารตัวอย่างออกจากผิวหนังและตรึงเนื้อเยื่อด้วยน้ำยา 10%v/v phosphate

buffered formalin ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำตัวอย่างผิวหนังสุกรไปทำให้แห้ง จากนั้นนำผิวหนังไปวางลงบน carbon adhesive tape และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเคลือบด้วยทองคำขาว (platinum) ด้วยเครื่อง platinum sputter (JEOL Jee 4B SVG) โดยกำหนด accelerating voltage เท่ากับ 1 kV และวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ส่วนปริมาณของเมนทอลที่ซึมลงไปในพื้นที่ผิวหนังทดสอบวิเคราะห์ปริมาณเมนทอลภายหลังการบ่มสารตัวอย่างบนผิวหนัง ณ เวลา 0 5 15 และ 30 นาที เมื่อครบกำหนดแต่ละช่วงเวลาตามที่กำหนดไว้จะนำผิวหนังมาล้างสารตัวอย่างออก จากนั้นใช้เทปแยกชั้นผิวหนังชั้น stratum corneum ออกโดยทำซ้ำ 20 ครั้ง เทปที่ดึงครั้งที่ 1 ให้ทิ้งไป ส่วนเทปที่ได้จากการดึงครั้งที่ 2 ถึง 20 นั้นจะนำมารวมกันแล้วนำไปสกัดด้วยเมนทอลเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-RI ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น เทคนิคนี้จะสามารถแยกผิวหนังชั้น stratum corneum ได้ประมาณร้อยละ 70 ส่วนปริมาณเมนทอลที่ดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้จะวิเคราะห์รวมกันโดยตัดลดขนาดผิวหนังให้ละเอียดจากนั้นจึงนำไปสกัดด้วยเมทานอลและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-RI

3.3.6 การทดสอบความเป็นพิษของระบบนำส่งนาโนแคปซูลต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของเมนทอลบรรจุในระบบนำส่งนาโนแคปซูลและระบบนำส่งเปล่าประเมินโดยทดสอบในเซลล์ normal human dermal fibroblasts (NHDF cells) โดยส่งตัวอย่างทดสอบที่ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิตมีวิธีทำดังนี้ เลี้ยงเซลล์ให้เจริญเติบโตและพร้อมสำหรับทดสอบ จากนั้นกำหนดปริมาณเซลล์ต่อหลุมทดสอบชนิด 96-well plate เท่ากับ 5,000 cells/well และบ่มเป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เซลล์เกาะผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำตัวอย่างทดสอบเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 5,000 µg/mL และบ่มเป็นเวลา 24 ชม. เมื่อครบกำหนดจะวิเคราะห์ค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการทดสอบใช้วิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เพื่อทำให้เอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิตเปลี่ยนสารละลาย MTT ที่มีสีเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีม่วง จากนั้นจึงละลายผลิตภัณฑ์สีม่วงที่ได้ด้วย dimethyl sulfoxide (100 µL) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 570 nm (PowerWave XS2 microplate reader, BioTeck, Winooski, VT, USA) สำหรับกลุ่มควบคุมผลบวกทดสอบด้วย 0.5 mM H₂O₂

3.3.7 การเตรียมผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับทดสอบศักยภาพระคายเคือง

สเปรย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้น มีส่วนประกอบสำคัญ ได้แก่ สารออกฤทธิ์เพิ่มความรู้สึกเย็นเมนทอล ความเข้มข้นร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก ตัวทำละลายร่วม สารกันเสีย สารหล่อลื่นผิว น้ำหอม และน้ำกลั่น กรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์สเปรย์พื้นจะแทนที่ปริมาณของเมนทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูลด้วยน้ำกลั่น ซึ่งระบบนำส่งเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลเตรียมด้วยวิธีการตกตะกอนนาโน (nanoprecipitation) (Ferreira et al., 2018) และคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยเทคนิคโครงข่ายประสาทเทียมร่วมกับการประยุกต์ใช้ฟังก์ชันความพึงพอใจประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้ menthol

poly (ϵ -caprolactone)caprylic /capric triglycerides sorbitan monooleate poloxamer 188 polysorbate 80 และน้ำกลั่น (ทางผู้วิจัยขออนุญาตไม่เปิดเผยข้อมูลสัดส่วนของสารที่ใช้ในตำรับผลิตภัณฑ์สเปรย์โดยละเอียดได้เนื่องจากการศึกษาเป็นโครงการวิจัยที่ทำร่วมกับผู้ประกอบการภาคเอกชน ซึ่งได้ผ่านการอนุญาตใช้สิทธิ์โดยมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และถ่ายทอดสูตรตำรับและกรรมวิธีการผลิตสู่เชิงพาณิชย์แล้ว)

3.3.8 การทดสอบศักยภาพระคายเคืองต่อเยื่อไขุไข่ฟัก

ศักยภาพการระคายเคืองของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้นประเมนโดยการทดสอบการระคายเคืองต่อเยื่อไขุไข่ฟัก(hen's egg test-chlorioallantoic membrane, HET-CAM)ตามแนวทางของ NICEATM-ICCVAM (Casey & Lowit, 2019)ดังนี้ นำไข่ไก่ฟัก สายพันธุ์โรดไอร์แลนด์ น้ำหนักระหว่าง 50 ถึง 60 กรัม มาบ่มในเครื่องฟักไข่ไก่อัตโนมัติ (Nanchang Alex Electric Factory) สภาวะการบ่มไข่ฟักกำหนดดังนี้ อุณหภูมิภายในเครื่องฟักไข่เท่ากับ $37.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 58.0 ± 2.0 อัตราการกลับไข่ทุก 2 ชั่วโมง เป็นนานครั้งละ 15 วินาที เมื่อไข่ฟักอายุครบ 9 วัน เปิดเปลือกไข่ด้วยเครื่องเจาะเปลือกไข่ ลอกเยื่อด้านนอกออก จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบ ปริมาตร 300 μL เติมลงบนผิวเยื่อไขุไข่ฟัก แต่ละกลุ่มประกอบด้วยไข่ฟัก 6 ฟอง การศึกษานี้กำหนดให้ความเข้มข้นของเมนทอลที่อยู่ในสูตรตำรับและสารละลายเมนทอลอิสระมีปริมาณเท่ากัน กลุ่มที่ทดสอบด้วยสารละลายโซดาไฟละลายในน้ำปราศจากไอออนความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมผลบวกและสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9%w/v ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมผลลบ จากนั้น บันทึกเวลาครั้งแรกที่ตรวจพบ การแตกของเม็ดเลือดแดง การฉีกขาดของหลอดเลือดและการเกาะกลุ่มของโปรตีน เป็นระยะเวลา 300 วินาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Nikon ZMZ 745T, Nikon Instruments Inc. , Melville, NY, USA) ควบคู่กับกล้องบันทึกภาพ Canon DSLR แปลผลโดยใช้โปรแกรม Image Frame Work และประเมินศักยภาพการระคายเคืองโดยวิธีการให้คะแนนแบบกึ่งปริมาณซึ่งคำนวณโดยใช้สมการที่ 2 ดังนี้

$$\text{Irritation score} = \frac{5 \times (301-h)}{300} + \frac{7 \times (301-l)}{300} + \frac{9 \times (301-c)}{300} \quad (3.2)$$

เมื่อ h, l และ c แสดงถึง ระยะเวลาการแตกของเม็ดเลือดแดง การฉีกขาดของหลอดเลือด และการเกาะกลุ่มของโปรตีน การประเมินผลคะแนนที่คำนวณได้ กำหนดดังนี้ คะแนน .0-0.09 หมายถึง ไม่ระคายเคืองคะแนน 9.4-0.1หมายถึงระคายเคืองเล็กน้อยคะแนน 9.8-0.5 หมายถึง ระคายเคืองปานกลาง และคะแนน 0.21-0.9หมายถึง ระคายเคืองรุนแรงสำหรับไข่ที่ผ่านการทดสอบแล้วจะนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ 20°C ข้ามคืนเพื่อทำลายเอ็มบริโอไข่ (chicken embryo)

3.3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การออกแบบการทดลองด้วยแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกันและการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายสภาวะที่เหมาะสมด้วยอัลกอริทึมใช้

โปรแกรมสำเร็จรูป JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ Tukey's test โดยกำหนดค่าระดับความเชื่อมั่นที่ ($p < 0.05$) ถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่นำมาเปรียบเทียบ

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การศึกษานี้มุ่งเน้นผลิตและทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์เพิ่มความสดชื่นที่มีส่วนผสมของเมนทอล บรรจุนาโนแคปซูล โดยการศึกษาจะทำเฉพาะการทดสอบในหลอดทดลองเท่านั้น เพื่อให้ได้ระบบนำส่งที่มีคุณสมบัติตามต้องการ มีเสถียรภาพทางเคมีกายภาพ และมีประสิทธิภาพในการนำส่งเมนทอลลงไปยังชั้นผิวหนังที่มีตัวรับ TRPM8 ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลเพียงพอสำหรับนำไปใช้วางแผนการศึกษาวิจัยในอาสาสมัครสุขภาพดีในอนาคต โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1 การออกแบบสูตรตำรับเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล

การศึกษานี้ได้เลือกปัจจัยสูตรตำรับมาศึกษาจำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณ menthol (50 100 และ 150 mg) poly(ϵ -caprolactone) (80 102.5 และ 125 mg) และ poloxamer 188 (125 250 และ 375 mg) ดังแสดงในตารางที่ 3 กำหนดให้เมนทอลเป็นสารออกฤทธิ์กระตุ้นตัวรับ TRPM8 poly(ϵ -caprolactone) ทำหน้าที่เป็นพอลิเมอร์ห่อหุ้มระบบนำส่งนาโนแคปซูล และ poloxamer 188 ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุเพื่อรักษาเสถียรภาพทางกายภาพให้แก่ระบบนำส่ง เหตุผลที่เลือกปัจจัยดังกล่าวมาศึกษา เพราะข้อมูลผลทดสอบโดยผู้วิจัยพบว่ามีอิทธิพลต่อคุณสมบัตินาโนแคปซูลอีกทั้งต้องการให้เมนทอลอยู่ในรูปสารละลายจึงเติม caprylic/capric triglycerides ลงไป ซึ่งเมนทอลเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำและจะเข้าไปละลายอยู่ใน caprylic/capric triglycerides และจะได้ระบบนำส่งนาโนแคปซูลที่มีไขมันเป็นแกนกลาง เรียกว่า lipid-core nanocapsules

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของนาโนแคปซูลแสดงไว้ในตารางที่ 4 พบว่าตำรับที่ผลิตได้มีสีขาวขุ่นและเกิดการกระเจิงแสงได้เนื่องจากเกิดปรากฏการณ์ tyndall ระหว่างอนุภาคคอลลอยด์ที่แขวนลอยในน้ำ (colloidal suspension) ที่สัมผัสแสงจะกระเจิงแสงออกมา (ภาพที่ 7) (P. S. Kumar, Jeyalatha, Malathi, & Ignacimuthu, 2018) เมื่อนำตำรับที่ได้ไปวัดขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงเลเซอร์พบว่า มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 122 nm ถึง 354 nm จะเห็นได้ว่าอนุภาคของสูตรตำรับที่ศึกษามีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 500 nm ซึ่งเป็นช่วงขนาดอนุภาคนาโนแคปซูลที่ต้องการสำหรับการนำส่งสารเข้าสู่ชั้นผิวหนัง เพราะหากมีขนาดอนุภาคสูงกว่า 500 nm ระบบนำส่งที่พัฒนาขึ้นมาจะกระจายอยู่บนชั้นผิวหนังและมีโอกาสดูดซึมลงไปในชั้นผิวหนังได้น้อย หรือไม่ถูกดูดซึมเข้าไปถึงชั้นที่ลึกลงไป (Yingngam et al., 2019)

สูตรตำรับเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลทุกสูตรมีค่าดัชนีการกระจายอนุภาคเท่ากับ 0.148 ถึง 0.284 ซึ่งบ่งบอกว่าอนุภาคที่ผลิตได้ค่อนข้างสม่ำเสมอเนื่องจากค่าดังกล่าวต่ำกว่า 0.3 ซึ่งโดยปกติแล้วค่าดัชนีการกระจายอนุภาคจะมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ค่าที่ต่ำกว่า 0.3 บ่งชี้ว่าอนุภาคคอลลอยด์มีความสม่ำเสมอใกล้เคียงกัน (Vasconcelos et al., 2020) เมื่อนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) พบว่า ค่า

ดัชนีการกระจายอนุภาคไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าระบบนำส่งนาโนแคปซูลที่ศึกษามีการใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับที่เพียงพอสำหรับรักษาเสถียรภาพของอนุภาคนาโนแคปซูลที่เกิดขึ้นให้คงตัวอยู่ได้

สำหรับค่าศักย์ซีตาร์ (zeta potential) นั้นพบว่ามีความเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง -22.47 ถึง -30.86 mV ค่านี้จะเป็นการวัดประจุที่ชั้น Stern ของนาโนแคปซูลที่อยู่ในรูปสารคอลลอยด์และใช้ทำนายเสถียรภาพทางกายภาพของนาโนแคปซูล โดยทฤษฎีแล้วระบบนำส่งที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงนาโนเมตรและมีเสถียรภาพทางกายภาพควรมีค่าศักย์ซีตาร์สูงกว่า ± 25 mV (ค่า 0 mV ถึง ± 5 mV หมายถึง อนุภาคมีแนวโน้มจะจับตัวเป็นกลุ่มก้อน (flocculation) หรือเกาะกลุ่มตกตะกอน (coagulation) ค่า ± 10 mV ถึง ± 30 mV หมายถึง มีแนวโน้มเกิดความไม่เสถียรค่า ± 30 mV ถึง ± 40 mV หมายถึง มีเสถียรภาพทางกายภาพปานกลาง ค่า ± 40 mV ถึง ± 60 mV หมายถึง มีเสถียรภาพทางกายภาพที่ดี และค่าที่สูงกว่า ± 60 mV หมายถึง มีเสถียรภาพทางกายภาพที่ดีเยี่ยม) (A. Kumar & Dixit, 2017) ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากหลักเกณฑ์ข้างต้น ระบบนำส่งที่พัฒนาขึ้นมาจึงคาดว่าจะมีเสถียรภาพทางกายภาพ

ส่วนการกักเก็บเมนทอลในระบบนำส่งนาโนแคปซูล พบว่ามีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 93.44 ถึง 98.99 บ่งชี้ว่าเมนทอลสามารถกักเก็บเข้าไปอยู่ในระบบนำส่งได้สูงมาก ที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเกิดจากคุณสมบัติการละลายในน้ำต่ำ ซึ่ง menthol มีค่าขีดการละลายน้ำที่อุณหภูมิ 25°C เท่ากับ 0.4 mg/L (Phunpee et al., 2016) จึงทำให้สารชนิดนี้เข้าไปละลายอยู่ใน caprylic/capric triglycerides และถูกกักเก็บไว้ภายในอนุภาคนาโนแคปซูลแทนการไปละลายอยู่ในวัตถุภายนอกที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก

ตารางที่ 4.1 ปริมาณส่วนประกอบของสารที่ใช้ผลิตเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลที่จะนำไปออกแบบ
การทดลองด้วยแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกิน

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	ระดับการทดลอง			หน้าที่ในตำรับ
		-1	0	+1	
วัตถุดิบน้ำมัน					
Menthol (mg)	X_1	50	100	150	สารเพิ่มความรู้สึกรื่นเย็น
Poly (ϵ -caprolactone) (mg)	X_2	80	102.5	125	พอลิเมอร์ห่อหุ้ม
Caprylic/capric triglycerides(mg)			300		น้ำมัน
Sorbitan monooleate (mg)			80		สารลดแรงตึงผิว
Acetone (mL)			25		ตัวทำละลาย
วัตถุดิบน้ำ					
Poloxamer 188 (mg)	X_3	125	250	375	สารลดแรงตึงผิว
Polysorbate 80 (mg)			80		สารลดแรงตึงผิว
Distilled water (g)			50		น้ำกระสาย
ตัวแปรตาม		เป้าหมายที่ต้องการ			
ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนแคปซูล (nm)	Y_1	ต่ำสุด			
ศักย์ซีตาร์ (mV)	Y_2	สูงสุด (ค่าลบ)			
ร้อยละการบรรจุ menthol (%)	Y_3	สูงสุด			

ตารางที่ 4.2 การออกแบบการทดลองด้วยแบบแผน Box-Behnken สำหรับผลิต menthol บรรจุนาโนแคปซูล และคุณสมบัติของตำรับที่เตรียมได้

ลำดับที่	ค่าจริง (ค่ารหัส)			ค่าการตอบสนอง		
	Menthol (X ₁ , mg)	Poly(ε-caprolactone) (X ₂ , mg)	Poloxamer 188 (X ₃ , mg)	ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาค (Y ₁ , nm)	ศักย์ซีตาร์ (Y ₂ , mV)	ร้อยละการกักเก็บ menthol (Y ₃ , %)
1	50.00 (-1)	80.00 (0)	250.00 (0)	259.27±4.24	-30.86±1.44	95.76±3.50
2	100.00 (0)	125.00 (+1)	125.00 (-1)	269.70±8.57	-27.17±1.21	97.67±1.01
3 ^c	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	200.83±0.12	-23.40±1.08	96.24±1.50
4	150.00 (+1)	125.00 (+1)	250.00 (0)	354.77±2.96	-30.07±2.51	97.67±2.57
5	100.00 (0)	80.00 (-1)	125.00 (-1)	220.57±0.81	-23.8 ±0.76	98.92±1.08
6 ^c	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	215.90±2.59	-22.47±0.50	96.39±0.75
7	50.00 (-1)	102.50 (0)	375.00 (+1)	122.00±1.50	-26.03±0.70	93.43±0.84
8 ^c	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	199.53±0.42	-23.09±0.06	96.53±1.75
9	150.00 (+1)	80.00 (-1)	250.00 (0)	265.87±1.53	-26.03±0.81	97.86±0.68
10	150.00 (+1)	102.50 (0)	375.00 (+1)	271.83±6.31	-25.30±0.10	97.53±0.89
11	100.00 (0)	80.00 (-1)	375.00 (+1)	195.07±1.02	-25.00±0.35	94.57±0.78
12	50.00 (-1)	102.50 (0)	125.00 (0)	201.30±0.53	-24.23±0.83	95.45±1.05
13	100.00 (0)	125.00 (+1)	375.00 (+1)	205.10±1.67	-24.40±0.56	98.99±1.29
14 ^c	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	205.60±1.04	-23.53±0.38	97.36±1.35
15 ^c	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	203.43±1.68	-23.77±0.75	96.83±0.40
16	50.00 (-1)	125.00 (+1)	250.00 (0)	199.07±1.42	-27.70±0.87	98.87±1.80
17	150.00 (+1)	102.50 (0)	125.00 (-1)	211.87±1.53	-27.87±2.15	97.37±1.86

^cระดับกลางข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3)



ภาพที่ 4.1 การเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของน้ำกลั่น (ภาพซ้าย) และคาร์บอนเมทอลกักเก็บในระบบนำส่งนาโนแคปซูล (ภาพขวา)

4.2 การสร้างแบบจำลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของนาโนแคปซูลด้วยโครงข่ายประสาทเทียม

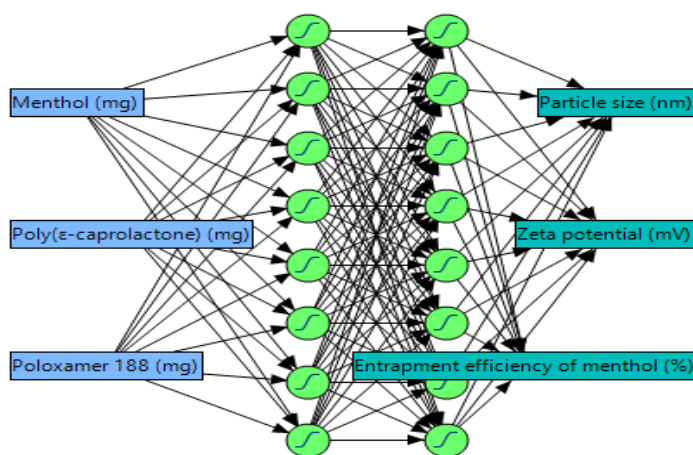
การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายคุณสมบัติของนาโนแคปซูลในการวิจัยนี้ทำโดยใช้อัลกอริทึมโครงข่ายประสาทเทียมโดยนำข้อมูลการทดลองทั้ง 17 ชุดข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ข้างต้นมาวิเคราะห์เหตุผลที่เลือกใช้อัลกอริทึมนี้เนื่องจากโครงข่ายประสาทเทียมเป็นแบบแผนที่สามารถสร้างแบบจำลองไม่เป็นเชิงเส้นตรงระหว่างตัวแปรต้นและตัวแปรตามได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ได้เทียบกับระเบียบวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology) (Faisal, Nassir, Naji, Naushad, & Ahamad, 2020)

เทคนิคที่นำมาใช้วิเคราะห์คือ K-fold cross-validation ซึ่งจัดเป็นเทคนิคมาตรฐาน หรือเรียกว่า gold standard สำหรับใช้ในการสร้างและทดสอบการเรียนรู้ของโครงข่ายประสาทเทียม เพราะใช้เทคนิคที่เรียกว่า การสุ่มซ้ำ (resampling technique) ซึ่งจะทำให้แต่ละชุดของข้อมูลกระจายใกล้เคียงกันและช่วยลดอคติ อีกทั้งยังช่วยป้องกันการเกิดการทำนายที่มากเกินไป (overfitting) ของแบบจำลองได้โดยค่า K ที่นิยมทดสอบคือ K = 5 และ K = 10 (Faisal et al., 2020) ในการศึกษาได้ใช้เทคนิคการลองผิดลองถูก (trial and error) เพื่อสร้างแบบจำลองโดยกำหนดค่า K อยู่ระหว่าง 3 ถึง 20 พบว่าค่า K ที่เหมาะสมคือ K = 5 นั่นคือ เมื่อแบ่งข้อมูลเสร็จแล้วจะมีการทดสอบโมเดลจำนวน 5 รอบด้วยชุดข้อมูลที่นำมาฝึก (training fold) และทดสอบโมเดลทั้ง 5 รอบด้วยการตรวจสอบความถูกต้อง (validation fold) ทั้งนี้ในแต่ละรอบ (iteration) จะบันทึกค่าความคลาดเคลื่อนของการตรวจสอบ (validation error) เพื่อนำมาสรุปภายหลังสิ้นสุดกระบวนการ cross-validation ส่วนเทคนิค cross-validation ทางเลือกประเภทอื่น ๆ เช่น jackknife test (leave-one-out) bootstrapping Monte Carlo test, three-way split test และ disjoint set test ไม่ได้นำมาใช้ในการศึกษา

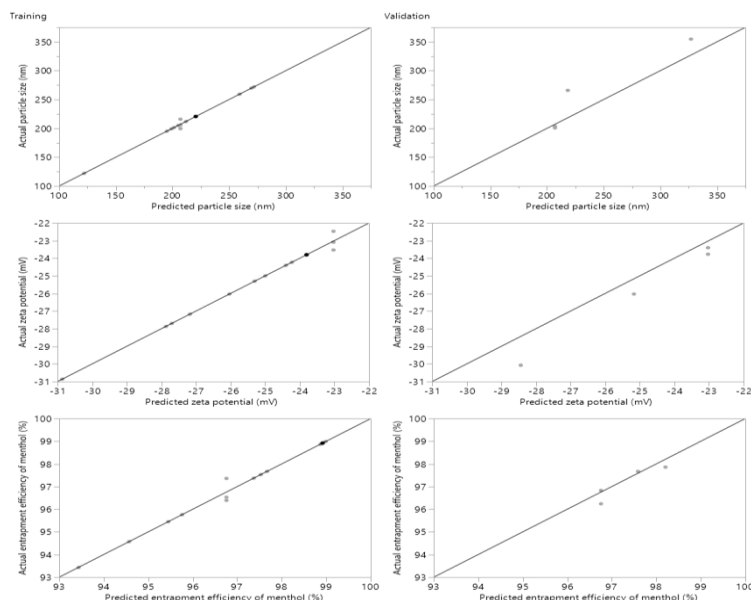
การทดสอบแบบ K-fold cross-validation ($K = 5$) นี้จะแบ่งข้อมูลออกเป็น 2 ชุดข้อมูลคือ ข้อมูลสำหรับการฝึกย่อยละ 80 (training and validation dataset) และข้อมูลสำหรับทดสอบย่อยละ 20 (testing dataset) จากนั้นเลือกใช้ฟังก์ชัน TanH สำหรับสร้างโครงร่างของโครงข่ายประสาทเทียมขึ้นมา ซึ่งฟังก์ชันนี้มีข้อดีคือ การแสดงของข้อมูลนำออก (output) จะมีค่าอยู่ระหว่าง -1 และ 1 จึงเป็นฟังก์ชันที่ทำให้ข้อมูลมีความสมดุลเพราะมีค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 0 ทำให้สามารถหาสถานะที่เหมาะสมได้ง่าย ไม่ซับซ้อนเกินไป และการแปลผลให้เข้าใจทำได้ง่าย

ระเบียบวิธีสร้างแบบจำลองด้วยอัลกอริทึมนี้ จำนวนของชั้นซ่อน (hidden layer) และจำนวนโครงข่าย (neuron) เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการทำนายค่าของแบบจำลองที่สร้างขึ้น การสร้างโครงข่ายที่มีจำนวนชั้นซ่อนและจำนวนโครงข่ายที่มีจำนวนน้อยเกินไป อาจส่งผลทำให้แบบจำลองมีประสิทธิภาพในการทำนายค่าได้ไม่ดี ในทางตรงกันข้ามหากจำนวนชั้นซ่อนและจำนวนโครงข่ายมีค่ามากเกินไปจะส่งผลทำให้แบบจำลองที่สร้างขึ้นมานั้นมีความซับซ้อนและทำได้ยาก ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาสถานะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิคการลองผิดลองถูก

ผลการศึกษาพบว่า โครงร่างที่เหมาะสมสำหรับชั้นนำเข้า (input layer) ชั้นซ่อน (hidden layer) ที่ 1 ชั้นซ่อน (hidden layer) ที่ 2 และชั้นผลลัพธ์ (output layer) คือ 3-8-8-3 ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ซึ่งเป็นโครงข่ายที่ให้ประสิทธิภาพการทำนายเหมาะสมที่สุดและมีค่าความคลาดเคลื่อนต่ำ โดยมีค่า R^2 สูงกว่า 0.75 (ภาพที่ 4.2) อีกทั้งยังมีค่า MAD และ RMSE ต่ำ สำหรับทุกชุดข้อมูลที่นำมาฝึก (training dataset) และข้อมูลสำหรับทดสอบ (testing dataset) (ตารางที่ 4.3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองที่พัฒนาขึ้นช่วยลดปัญหาการเกิดการทำนายที่ดีเกินไปได้ (overfitting) สามารถเขียนเป็นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรในชั้นนำเข้า (input layer) และชั้นซ่อน (hidden layer) ได้ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4.2 ผังโครงสร้างของโครงข่ายประสาทเทียมที่เหมาะสม (3-8-8-3) สำหรับสร้างแบบจำลองทำนายคุณสมบัติของเมนทอลบรรจุโนแคปซูล



ภาพที่ 4.3 ค่า R^2 ของชุดข้อมูลที่น่ามาฝึกและข้อมูลสำหรับตรวจสอบความถูกต้องสำหรับสร้างแบบจำลองทำนายคุณสมบัติของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล

ฟังก์ชัน TanH แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นและชั้นซ่อนที่ 1 แสดงในสมการที่ (4.1) – (4.8) ดังนี้

$$H_1 = \text{TanH}(0.5(0.0103068115066717X_1 - 0.042956743046402X_2 - 0.00163853525414455X_3 + 3.23390746597682) \quad (4.1)$$

$$H_2 = \text{TanH}(0.5(0.00587243581774941X_1 - 0.0324208590876487X_2 - 0.00565676681432105X_3 + 4.12924037901135) \quad (4.2)$$

$$H_3 = \text{TanH}(0.5(-0.0332219660404928X_1 - 0.0130271605242845X_2 + 0.00538247024922714X_3 + 2.65194499903653) \quad (4.3)$$

$$H_4 = \text{TanH}(0.5(0.0380100557754298X_1 + 0.0465476920020161X_2 - 0.0051367202249681X_3 - 8.02022321088381) \quad (4.4)$$

$$H_5 = \text{TanH}(0.5(-0.00147374953243669X_1 - 0.011624292675493X_2 + 0.0140268689654147X_3 - 2.30389506455566) \quad (4.5)$$

$$H_6 = \text{TanH}(0.5(0.021286859199495X_1 - 0.00163277787463914X_2 - 0.00755985816747422X_3 + 0.948873006478389) \quad (4.6)$$

$$H_7 = \text{TanH}(0.5(0.0131904108364851X_1 + 0.0737199786452804X_2 + 0.00473029947402788X_3 - 8.85157365138812) \quad (4.7)$$

$$H_8 = \text{TanH}(0.5(-0.0129459174415221X_1 - 0.101134048251944X_2 - 0.00672854220799969X_3 + 13.9835668207438) \quad (4.8)$$

ฟังก์ชัน TanH แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชั้นซ่อนที่ 1 และชั้นซ่อนที่ 2 แสดงในสมการที่ – (4.16) เป็นดังนี้ (4.9)

$$\begin{aligned} HH_1 = & \text{TanH}(0.5(0.0824387629673298H_1 + 0.423785866579208H_2 - 0.446968675771875H_3 \\ & + 0.184485573842866H_4 - 0.717422525178891H_5 + 0.970162734536538H_6 \\ & - 0.259422819156442H_7 + 0.0435846868963398H_8 + 1.14651176924334) \end{aligned} \quad (4.9)$$

$$\begin{aligned} HH_2 = & \text{TanH}(0.5(-0.315503179766834H_1 - 0.201630437660092H_2 - 0.638246258774863H_3 + \\ & 0.12003877732995H_4 + 0.307622835999698H_5 + 0.266203799821021H_6 + 0.556784443382964H_7 - \\ & 0.631279398220077H_8 + 0.511625429836302) \end{aligned} \quad (4.10)$$

$$\begin{aligned} HH_3 = & \text{TanH}(0.5(-0.168915392759593H_1 - 0.0803085278868904H_2 - 0.250586668891787H_3 \\ & - 0.0371048320203291H_4 + 0.743014536501128H_5 - 0.0148551436247029H_6 \\ & - 0.00743114722456239H_7 - 0.452019167536003H_8 + 0.671400818519061) \end{aligned} \quad (4.11)$$

$$\begin{aligned} HH_4 = & \text{TanH}(0.5(0.727594707140409H_1 + 0.405146595630959H_2 - 0.278863440074121H_3 \\ & + 1.26647624477123H_4 - 0.305489015216205H_5 - 0.0136785932839413H_6 \\ & + 0.0926404004599945H_7 + 0.244636557480673H_8 - 0.48398076823738) \end{aligned} \quad (4.12)$$

$$\begin{aligned} HH_5 = & \text{TanH}(0.5(0.181897315171208H_1 + 0.69168238775912H_2 + 0.694963617819721H_3 \\ & + 0.256435503301775H_4 - 0.12093652887442H_5 - 0.456566922380782H_6 \\ & - 0.329818579866086H_7 - 0.333523999283395H_8 + 0.952870415340341) \end{aligned} \quad (4.13)$$

$$\begin{aligned} HH_6 = & \text{TanH}(0.5(0.809411919535502H_1+0.469338991792833H_2-0.916267837685723 \\ & H_3+-0.190356228345599H_4-0.881809627177955H_5+0.153213523718917 \\ & H_6-0.148019420305889H_7+0.722395303746602H_8-1.43385274397934 \end{aligned} \quad (4.14)$$

$$\begin{aligned} HH_7 = & \text{TanH}(0.5(0.33662560946677H_1-0.0140268932402472H_2 -0.194887914660192 \\ & H_3+0.147725240611948H_4+0.0813295776846605H_5+0.535875639575287 \\ & H_6-1.2698552368338H_7-0.772185411870193H_8+0.258504869085479 \end{aligned} \quad (4.15)$$

$$\begin{aligned} HH_8 = & \text{TanH}(0.5(0.0446404466529525H_1+0.125622318421367H_2+0.120481327035935 \\ & H_3+0.0283995998747116H_4-0.1225141003485H_5-0.114216500118345 \\ & H_6-0.0566764748325492H_7+0.234392072272717H_8+0.0716902813687533 \end{aligned} \quad (4.16)$$

เมื่อนำความสัมพันธ์ของชั้นซ่อนที่ 2 ข้างต้นมาแสดงความสัมพันธ์กับตัวแปรตามจะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ (19) - (21) ดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned} \text{ขนาดอนุภาคของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล (Y}_1\text{) (nm) = } & 148.426394863557HH_1 + \\ & 2.24421990371873HH_2 + 63.509040664959HH_3 + 33.9993076728498HH_4 + 179.010818705517HH_5 \\ & - 126.799042684808HH_6 + 145.379838173161HH_7 + 4.24013685619427HH_8 + 71.0757234225039 \end{aligned} \quad (4.17)$$

$$\begin{aligned} \text{ศักย์ซีตาร์ของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล (Y}_2\text{) (mV) = } & -9.88101693540562HH_1- 4.71812012401674HH_2- \\ & 14.0509096528718HH_3- 6.28165556946776HH_4 - 42.2846041329898HH_5 + 2.47805069194714HH_6 \\ & + 4.2000301104528HH_7-2.90332020446707HH_8 - 8.63100573973574 \end{aligned} \quad (4.18)$$

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละการกักเก็บเมนทอลในระบบนำส่งนาโนแคปซูล = } & 10.9946972242681HH_1 + 11.6508308309627HH_2 \\ & + 17.2247902135992HH_3 - 7.73773265405683HH_4 + 29.0282984967683HH_5 + \\ & 10.6528820959258HH_6 - 0.586605031968911HH_7 + 0.932426993865547HH_8 + 79.3873885467459 \end{aligned} \quad (4.19)$$

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการทดลองและค่าทำนายแสดงไว้ในภาพที่ 4.3 นั้น พบว่าผลการวิเคราะห์ พบว่า ค่าการทดลองของการตอบสนองของตัวแปรที่ทดลองและทำนายได้มีความสอดคล้องกันโดยทุกจุดจัดเรียงตามเรียงกันเป็นเชิงเส้นและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (determination coefficient, $R^2 > 0.75$) (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าค่าส่วนเหลือ (residuals) มีการกระจายตัวซึ่งบ่งชี้ว่าค่าความคลาดเคลื่อนมีผลกระทบเพียง

เล็กน้อย ดังนั้น ผลการสร้างแบบจำลองดังกล่าวจึงสามารถนำมาใช้เพื่อทำนายค่าของตัวแปรตามของนาโนแคปซูลได้

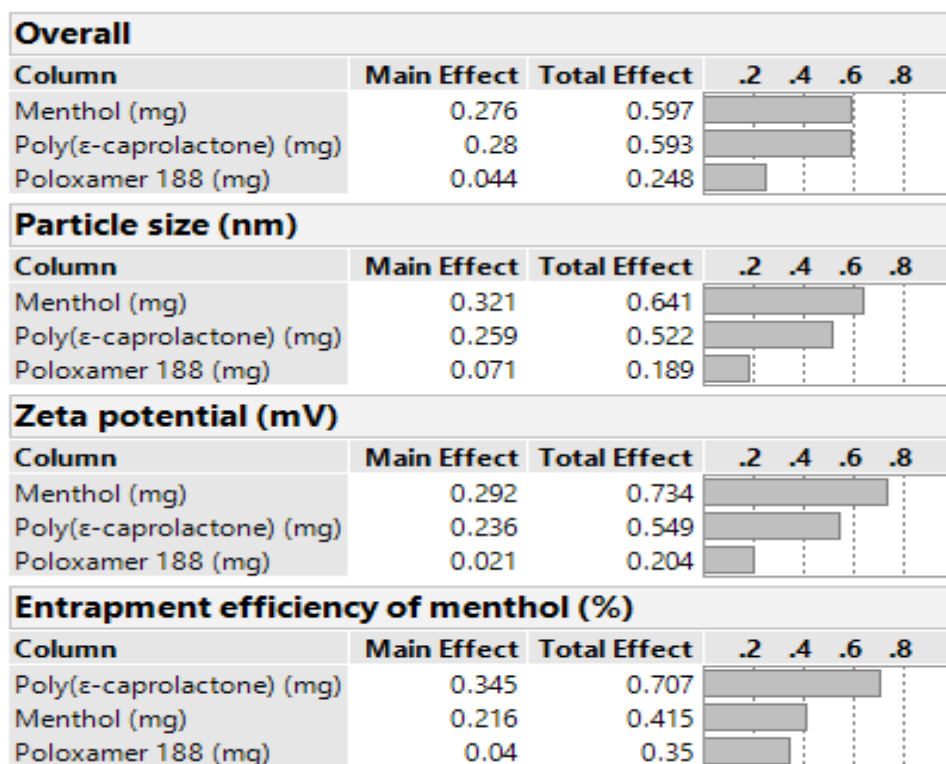
ตารางที่ 4.3 ค่าสถิติสำหรับการประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองโครงข่ายประสาทเทียม

พารามิเตอร์ทางสถิติ	ชุดข้อมูลการฝึก (training dataset)	ชุดข้อมูลตรวจสอบความถูกต้อง (validation dataset)
ขนาดอนุภาคของ menthol บรรจุนาโนแคปซูล		
R^2	0.9924	0.8032
RMSE	3.2462	27.7560
MAD	1.3978	21.2506
-LogLikelihood	33.7537	18.9696
SSE	136.7537	3081.5733
ศักยภาพการกักเก็บ menthol บรรจุนาโนแคปซูล		
R^2	0.9915	0.8544
RMSE	0.2089	1.0126
MAD	0.0884	0.9028
-LogLikelihood	0.5673	4.1015
SSE	0.5673	4.1015
ร้อยละการกักเก็บ menthol ในนาโนแคปซูล		
R^2	0.9843	0.7657
RMSE	0.2057	0.3160
MAD	0.0935	0.2545
-LogLikelihood	-2.1133	1.0680
SSE	0.5499	0.3995
ภาพรวมของพารามิเตอร์ทางสถิติ		
Generalized R^2	1.0000	0.9933
-LogLikelihood	29.7300	25.734

4.3 การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรต้นต่อคุณสมบัติของนาโนแคปซูล

การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรต้นที่ศึกษาทั้ง 3 ชนิด คือ ปริมาณ menthol ปริมาณ poly(ϵ -caprolactone) และปริมาณ poloxamer 188 จะแสดงโดยใช้ค่าสัมพัทธ์ร้อยละความสำคัญของตัวแปร j (relative percentage of important j (j)) โดยการใช้ค่าดังกล่าวนี้มีหลักการคือ ค่า j จะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 100 หากค่าที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 0 หมายถึงตัวแปรต้นไม่มีผลต่อตัวแปรตาม และหากค่าที่คำนวณได้เท่ากับ 100

หมายถึง ตัวแปรต้นดังกล่าวมีอิทธิพลต่อตัวแปรตามมากที่สุด(Faisal et al., 2020) ผลการคำนวณค่า f_j แสดงในภาพที่ 4.4 ดังนี้ เมื่อพิจารณาอิทธิพลของตัวแปรต้นตามคุณสมบัติของนาโนแคปซูลในภาพรวม พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อเม้นทอลบรรจุในนาโนแคปซูลมากที่สุดคือ ปริมาณ menthol รองลงมาคือ ปริมาณ poly(ϵ -caprolactone) และ ปริมาณ poloxamer 188 โดยมีค่า f_j เท่ากับร้อยละ 59.7 59.3 และ 24.8 ตามลำดับ เมื่อพิจารณารายละเอียดของตัวแปรต้นที่มีผลต่อตัวแปรตามย่อย พบว่า ตัวแปรต้นที่ศึกษามีผลต่อคุณสมบัติของนาโนแคปซูลแตกต่างกัน ดังนี้ ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อดัชนีการกักเก็บของนาโนแคปซูลมากที่สุดคือ ปริมาณ menthol (ร้อยละ 64.1) รองลงมาคือ ปริมาณ poly(ϵ -caprolactone) (ร้อยละ 52.2) และ ปริมาณ poloxamer 188 (ร้อยละ 18.9) ผลกระทบดังกล่าวมีแนวโน้มคล้ายคลึงกับผลต่อค่าศักย์ซีตาร์ ซึ่งแตกต่างจากผลที่มีต่อค่าร้อยละการกักเก็บเม้นทอลในนาโนแคปซูลซึ่งพบว่าปัจจัยที่มีผลมากที่สุดคือปริมาณ poly(ϵ -caprolactone) (ร้อยละ 70.7) ปริมาณ menthol (ร้อยละ 41.5) และปริมาณ poloxamer 188 (ร้อยละ 35.0) และเพื่อให้เข้าใจรายละเอียดมากขึ้น ผู้วิจัยจึงได้นำความสัมพันธ์ของตัวแปรต้นในขั้นนำเข้า ชั้นซ่อน และชั้นแสดงผล มาคำนวณและสร้างเป็นกราฟสามมิติโดยรายละเอียดดังหัวข้อย่อยด้านล่าง ดังนี้

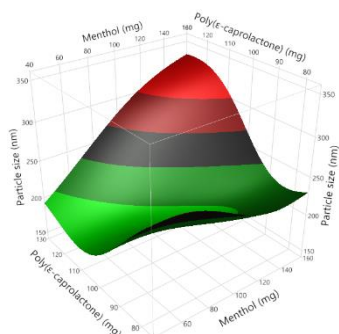


ภาพที่ 4.4 ค่าสัมพัทธ์ร้อยละความสำคัญของตัวแปร (f_j) ของตัวแปรต้นต่อคุณสมบัติของเม้นทอลบรรจุในนาโนแคปซูล

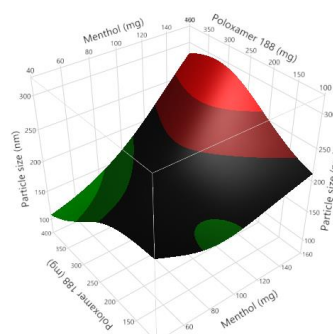
4.3.1 ผลต่อขนาดอนุภาคนาโนแคปซูล

ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคนาโนแคปซูลเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการดูดซึมของนาโนแคปซูลที่บรรจุเมนทอลโดยอนุภาคนาโนแคปซูลขนาดเล็กแทรกซึมลึกลงไปในชั้นผิวได้มากกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ (Wolf et al., 2018) ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่าการเพิ่มสัดส่วนของ menthol มากขึ้นจากเริ่มต้นคือ 50 mg ส่งผลทำให้ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของนาโนแคปซูลเพิ่มขึ้นและขนาดอนุภาคจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง 100 mg ถึง 150 mg (ภาพที่ 4.5a และ b) โดยมีแนวโน้มที่คล้ายกันกับการเพิ่มสัดส่วนของ poly(ϵ -caprolactone) (ภาพที่ 11a และ c) ในทางตรงกันข้าม poloxamer 188 มีความสัมพันธ์เชิงลบ โดยมีผลต่อขนาดอนุภาคเช่นเดียวกัน ที่สัดส่วนของ poloxamer 188 ต่ำระหว่าง 100 ถึง 250 mg และในขณะที่ช่วงความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลทำให้ขนาดอนุภาคลดลง ลักษณะเช่นนี้สามารถอธิบายได้จากปริมาณที่สูงขึ้นของเมนทอลในนาโนแคปซูลทำให้สารเข้ากักเก็บไว้ภายในอนุภากระบบนำส่งจึงทำให้เพิ่มขนาดอนุภาค ผลของการศึกษานี้สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้อ้างไว้ก่อนหน้านี้โดย Alkholief สำหรับอนุภาคนาโนพาร์ติเคิลที่บรรจุ doxorubicin และ piperine ที่พบว่าการเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ลงไปจะส่งผลให้อนุภาคของระบบนำส่งมีขนาดใหญ่ขึ้น (Alkholief, 2019)

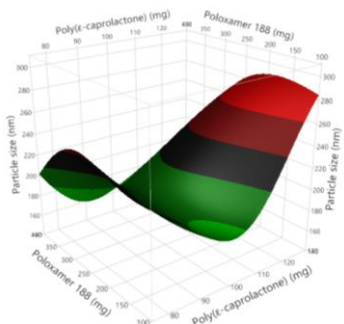
(a)



(b)



(c)

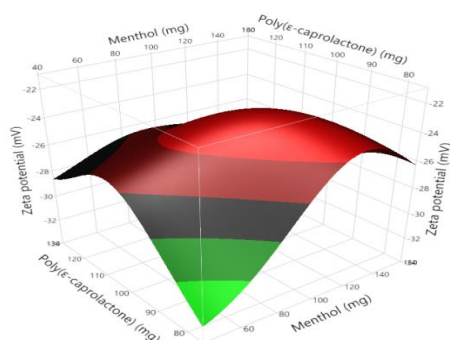


ภาพที่ 4.5 ภาพสามมิติแสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล เมื่อ (a) คือ ผลของปริมาณ menthol และ poly(ϵ -caprolactone) (b) คือ ผลของปริมาณ menthol และ poloxamer 188 และ (c) คือ ผลของ poly(ϵ -caprolactone) และ poloxamer 188

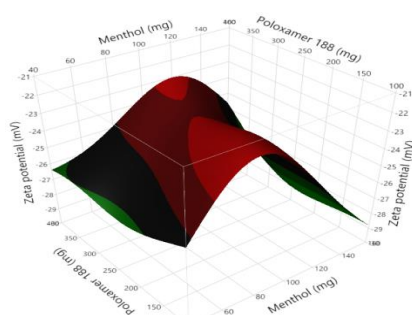
4.3.2 ผลต่อศักย์ซีตาร์

ผลของตัวแปรต้นต่อศักย์ซีตาร์ของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลแสดงในภาพที่ 4.6 พบว่าค่าศักย์ซีตาร์ของนาโนแคปซูลที่บรรจุเมนทอลมีค่าอยู่ระหว่าง -22.47 ถึง -30.86 mV ตัวแปรอิสระที่มีผลกระทบคือ สัดส่วนปริมาณของ menthol โดยการเพิ่ม menthol มากขึ้นทำให้ศักย์ซีตาร์ลดลง ในทางตรงกันข้ามการเพิ่มปริมาณ poly(ϵ -caprolactone) ลงไปทำให้ศักย์ซีตาร์เพิ่มขึ้นไปอย่างมากซึ่งคาดว่าหมู่ carboxyl ของพอลิเมอร์ชนิดนี้มีผลทำให้เพิ่มสัดส่วนของ carboxyl ion (COO^-) ในชั้น Stern ของนาโนแคปซูล ทั้งนี้ช่วงของค่าศักย์ซีตาร์ของระบบนำส่งที่ศึกษาสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ใกล้เคียงกันซึ่งรายงานไว้โดยนักวิจัยกลุ่มอื่นก่อนหน้านี้ (Badri et al., 2018)

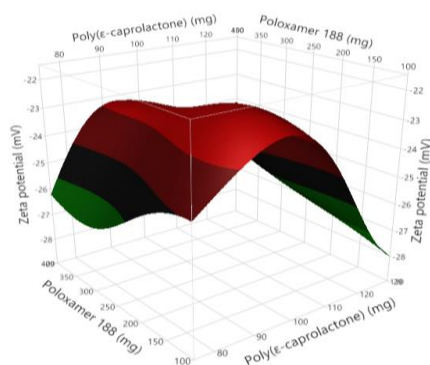
(a)



(b)



(c)

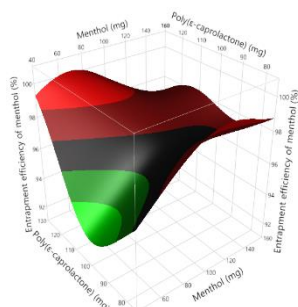


ภาพที่ 4.6 ภาพสามมิติแสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อค่าศักย์ซีตาร์ของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล เมื่อ คือ ผลของปริมาณ menthol และ poly (ϵ -caprolactone) (b) คือ ผลของปริมาณ menthol และ poloxamer 188 และ (c) คือ ผลของ poly (ϵ -caprolactone) และ poloxamer 188

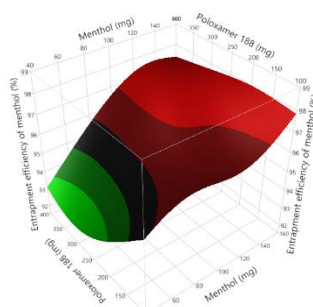
4.3.3 ผลต่อร้อยละการกักเก็บเมนทอลในนาโนแคปซูล

ผลของตัวแปรต้นต่อค่าร้อยละการกักเก็บเมนทอลในนาโนแคปซูลแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่า สัดส่วนน้ำหนักของ menthol และ poly(ϵ -caprolactone) มีผลต่อค่าร้อยละการกักเก็บ menthol เมื่อเพิ่มสัดส่วนของ menthol ให้สูงขึ้นมากกว่าตั้งแต่ 80 mg จนถึง 150 mg ส่งผลให้ร้อยละการกักเก็บสารสูงขึ้น ในทางตรงกันข้าม สัดส่วนของปริมาณ poloxamer 188 ค่อนข้างมีอิทธิพลน้อยมากต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร ทั้งนี้เนื่องจาก menthol เป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ จึงคาดว่าจะกระจายตัวไปยังวัฏภาคน้ำมันของนาโนแคปซูล ผลลัพธ์ที่ได้คือ menthol จะถูกกักเก็บในส่วนแกนกลางที่มี caprylic/capric triglycerides ทำให้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสูงขึ้น(Phunpee et al., 2016) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการกักเก็บสารที่มีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมันชนิดอื่น ๆ เมื่อนำมาเก็บไว้ในระบบนำส่งประเภทนาโนพาร์ทิเคิลจะมีความชอบในการเข้าไปกักเก็บไว้ในวัฏภาคภายในมากกว่าการละลายอยู่ในวัฏภาคภายนอกที่เป็นน้ำ(Wolf et al., 2018)

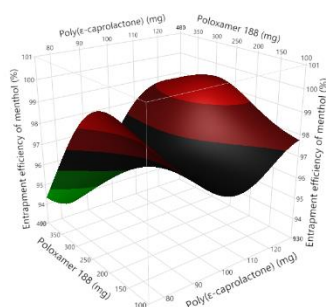
(a)



(b)



(c)

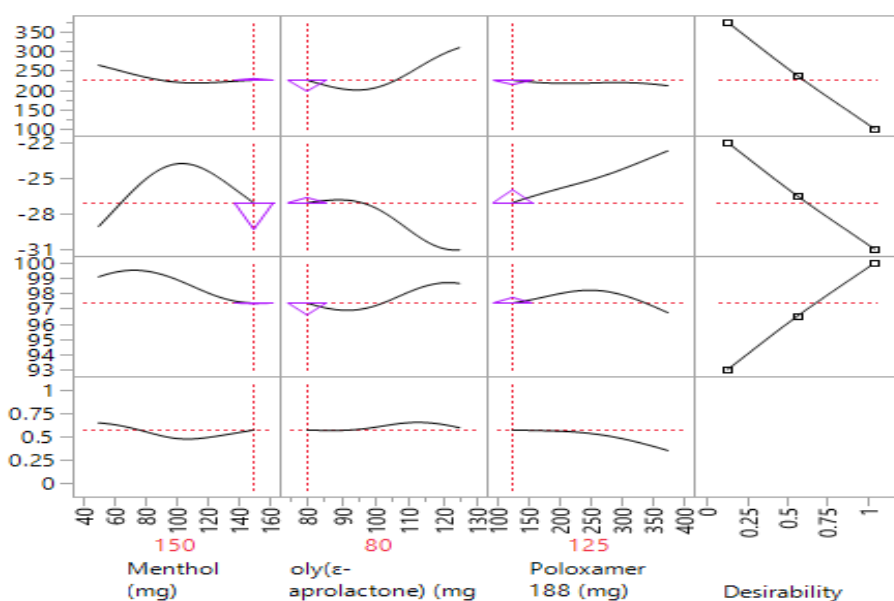


ภาพที่ 4.7 กราฟสามมิติแสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นต่อค่าร้อยละการกักเก็บเมนทอลในนาโนแคปซูล เมื่อ (a) คือ ผลของปริมาณ menthol และ poly(ϵ -caprolactone) (b) คือ ผลของปริมาณ menthol และ poloxamer 188 และ (c) คือ ผลของ poly (ϵ -caprolactone) และ poloxamer 188

4.4 การหาสถานะที่เหมาะสมของการเตรียมเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล

การวิจัยนี้ได้เลือกใช้ฟังก์ชันความพึงพอใจ (desirability function) เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมของการผลิตเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล โดยกำหนดสถานะที่เหมาะสมคือ ระบบนำส่งที่ได้ควรมีขนาดอนุภาคเล็ก มีค่าศักย์ซีตาร์สูง (ค่าติดลบ) และมีค่าร้อยละการกักเก็บสารในระบบนำส่งสูง และกำหนดค่าฟังก์ชันความพึงพอใจระหว่าง 0 ถึง 1 หากค่าที่คำนวณได้เท่ากับ 0 หมายถึง จะได้คุณสมบัติของนาโนแคปซูลที่ไม่ต้องการ ในทางตรงกันข้าม หากค่าที่คำนวณได้เท่ากับ 1 หมายถึง สถานะดังกล่าวเป็นสถานะที่ต้องการมากที่สุด (Yingngam et al., 2018)

ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.8 พบว่า ค่าฟังก์ชันความพึงพอใจเท่ากับ 0.87 ซึ่งสูงกว่า 0.70 แสดงว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ โดยมีสัดส่วนของ menthol เท่ากับ 150 mg ปริมาณ poly(ϵ -caprolactone) เท่ากับ 84 mg และ poloxamer 188 เท่ากับ 125 mg ซึ่งจะได้ค่าทำนายของค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคนาโนแคปซูลเท่ากับ 216 nm ศักย์ซีตาร์เท่ากับ -27.08 mV และ ร้อยละการกักเก็บ menthol เท่ากับ 97.37 เพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของสถานะที่คำนวณได้จึงได้ทดลองผลิตสูตรตำรับดังกล่าวเพิ่มเป็นจำนวน 3 ขั้ว พบว่าระบบนำส่งที่ผลิตได้มีค่าเฉลี่ยของอนุภาคเท่ากับ 205.11 ± 12.73 nm ศักย์ซีตาร์ เท่ากับ -26.61 ± 2.32 mV และร้อยละการกักเก็บ menthol เท่ากับ 98.18 ± 0.15 ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าที่ทำนายไว้ ($p > 0.05$) แสดงว่าสถานะที่ทำนายไว้มีความเหมาะสมและสามารถใช้กำหนดสถานะในการผลิตตำรับได้

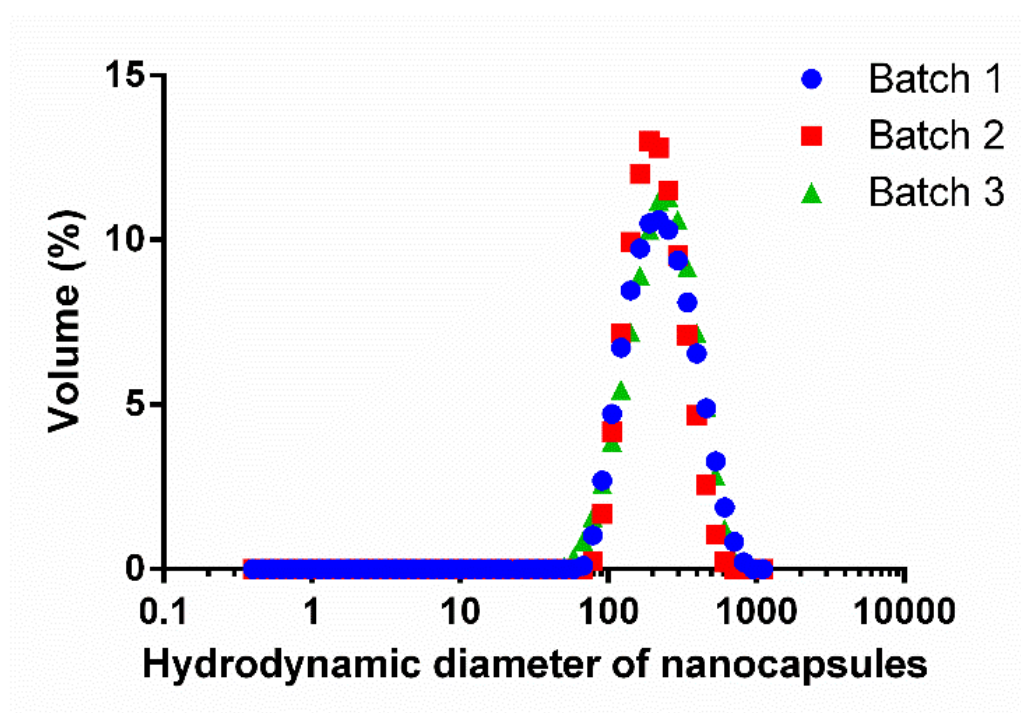


ภาพที่ 4.8 การคำนวณค่าฟังก์ชันความพึงพอใจเพื่อหาสภาวะการผลิตระบบนำส่งนาโนแคปซูลบรรจุ menthol

4.5 การตรวจสอบคุณสมบัติของเมมทอลบรรจุในนาโนแคปซูล

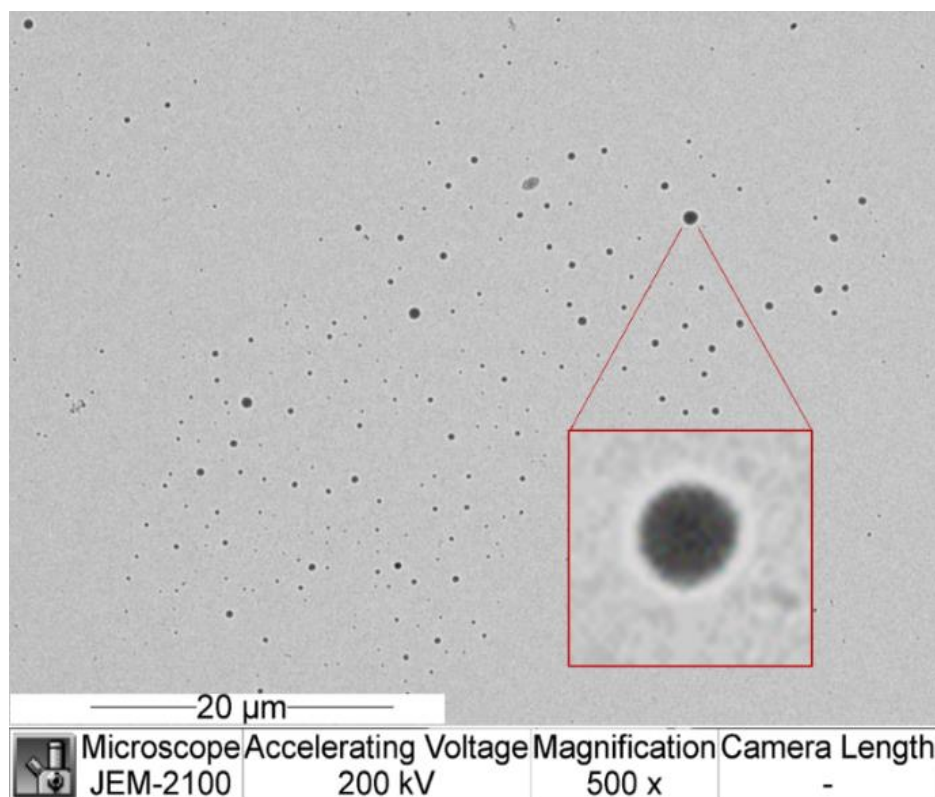
4.5.1 สัณฐานวิทยาของเมมทอลบรรจุในนาโนแคปซูล

สูตรที่ได้ปรับให้เหมาะสมจากการออกแบบการทดลองด้วยแบบแผนบอกซ์-เบห์นกิน(Box-Behnken)ร่วมกับโครงข่ายประสาทเทียมนั้นพบว่า เป็นสภาวะที่สามารถทำการผลิตซ้ำได้ดี (reproducibility) เมื่อผลิตซ้ำ 3 รุ่นการผลิตพบว่ามีความสอดคล้องของนาโนแคปซูลที่บรรจุเมมทอล เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ที่ 205.11 ± 16.71 nm มีค่าดัชนีการกระจายอนุภาค < 0.3 ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ในขณะที่ขนาดอนุภาคของนาโนแคปซูลเปล่ามีขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย (182.37 ± 7.29 นาโนเมตร, $p < 0.05$)



ภาพที่ 4.9 การกระจายอนุภาคของเมมทอลบรรจุนาโนแคปซูล 3 รุ่นการผลิต เมื่อวัดด้วยเทคนิคการกระเจิงลำแสงเลเซอร์

เมื่อนำนานาโนแคปซูลที่พัฒนาแล้วไปศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) พบว่านาโนแคปซูลที่บรรจุเมมทอล มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมมีขนาดเฉลี่ยของนาโนแคปซูลใกล้เคียงกับการวัดโดยใช้เทคนิคการกระเจิงแสงเลเซอร์และมีลักษณะเป็นแคปซูลที่ห่อหุ้มด้วยพอลิเมอร์ที่ใช้คือ poly(ϵ -caprolactone) ดังแสดงในภาพที่ 4.10 ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นชัดเจนว่าการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตระบบนำส่งชนิดนาโนแคปซูล



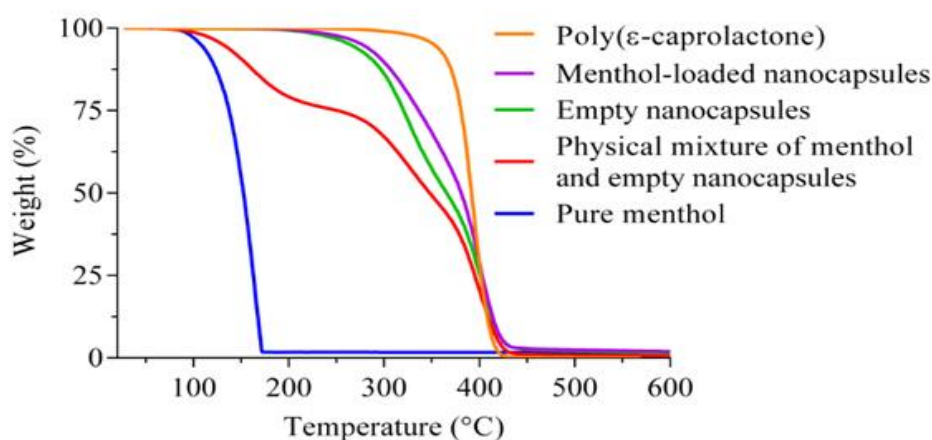
ภาพที่ 4.10 การตรวจสอบโครงสร้างระดับนาโนเมตรของ menthol บรรจุนาโนแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

4.5.2 คุณสมบัติเชิงอุณหภูมิ

การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงอุณหภูมิของระบบนำส่งในการศึกษาที่ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค thermal gravimetric analysis (TGA) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของระบบนำส่ง และประเมินศักยภาพของระบบนำส่งในการป้องกันการระเหยของ menthol ออกสู่บรรยากาศภายนอกโดยวัดการสูญเสียมวลสารเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น การศึกษาจำเป็นต้องทดสอบในช่วงอุณหภูมิสูงในช่วง 25°C ถึง 600°C เพราะหากทดสอบในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 100°C จะพบการเปลี่ยนแปลงได้ไม่ชัดเจน

ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.11 พบว่า เมนทอลระเหยที่อุณหภูมิเริ่มจาก 76°C ขึ้นไป และระเหยอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 81°C ถึง 171°C โดยมีการสูญเสียมวลมากถึงร้อยละ 99 สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเกิดเนื่องจากการได้รับความร้อนส่งผลทำให้เมนทอลระเหยออกไป และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะเกิดการสลายตัว ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการรายงานโดยนักวิจัยก่อนหน้านี้ (Yildiz, Celebioglu, Kilic, Durgun, & Uyar, 2018) เมื่อพิจารณาคุณสมบัติเชิงอุณหภูมิของพอลิเมอร์ poly(ϵ -caprolactone) ที่ใช้เป็นสารห่อหุ้มนาโนแคปซูลนั้น พบว่ามีการสูญเสียมวลอย่างมีนัยสำคัญระหว่างอุณหภูมิ 303°C ถึง 455°C ซึ่งสอดคล้องกับการสลายตัวของพอลิเมอร์ด้วยความร้อนจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สำหรับสารผสมระหว่างเมนทอลและนาโนแคปซูลเปล่าจะพบ

การสูญเสียมวลเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 98°C และสิ้นสุดที่ 230°C ซึ่งคาดว่า เป็นผลมาจากการสลายตัวของ menthol และการแตกออกของเปลือกนาโนแคปซูลเปล่าและสิ้นสุดที่อุณหภูมิ 38°C ส่วนระบบนำส่งนาโนแคปซูลเปล่า และนาโนแคปซูลที่บรรจุเมนทอลจะแสดงการสูญเสียมวลแบ่งเป็น 3 ระยะ โดยที่เส้นกราฟของนาโนแคปซูลที่บรรจุเมนทอลเลื่อนขึ้นไปเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นแสดงว่านาโนแคปซูลช่วยเพิ่มความสามารถในการป้องกันการสูญเสียของเมนทอลได้ ดังนั้น ผลการศึกษานี้ได้พิสูจน์ให้เห็นถึงข้อดีของการห่อหุ้มเมนทอลไว้ในนาโนแคปซูลซึ่งช่วยรักษาเสถียรภาพทางเคมีของสารต่ออุณหภูมิได้



ภาพที่ 4.11 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงอุณหภูมิของระบบนำส่งโดยใช้เทคนิค thermal gravimetric analysis ในช่วงอุณหภูมิ 25°C ถึง 600°C

4.5.3 Fourier transform infrared spectroscopy

จากข้อมูลคุณสมบัติทางกายภาพของนาโนแคปซูลข้างต้นจะพบว่า ศักย์ซีตาร์ของระบบนำส่งที่พัฒนาขึ้นมีค่าเท่ากับ -26.61 ± 2.32 mV ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการเตรียมระบบนำส่งนาโนแคปซูลเป็นสารกลุ่มไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) 2 ชนิด คือ poloxamer 188 และ polysorbate 80 ดังนั้นระบบนำส่งที่เกิดขึ้นควรมีค่าศักย์ซีตาร์เข้าใกล้เลข 0 หรือไม่มีประจุเกิดขึ้น ดังนั้น เพื่อพิสูจน์ว่าประจุที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากสารชนิดใดผู้วิจัยจึงได้นำระบบนำส่งที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วด้วยเทคนิคการระเหิดแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) มาทดสอบด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.12 โดยแสดงสเปกตรัมเหลื่อมกันในแนวแกน Y เพื่อให้เห็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงแต่ละช่วงเลขคลื่นพบว่า menthol บริสุทธิ์มีการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่เลขคลื่น 3240 cm^{-1} (เนื่องจากการสั่นแบบยืดของ O-H) และ $2869\text{--}2954\text{ cm}^{-1}$ (การสั่นของการยืด C-H) $1025\text{--}104\text{ cm}^{-1}$ (การสั่นแบบยืดของ C-O) และ 1364 cm^{-1} (กลุ่มไอโซโพรพิล) และที่เลขคลื่น 986, 920, 878, 843 และ 669 cm^{-1} (การสั่นสะเทือนของโครงสร้างแกนวงแหวน)

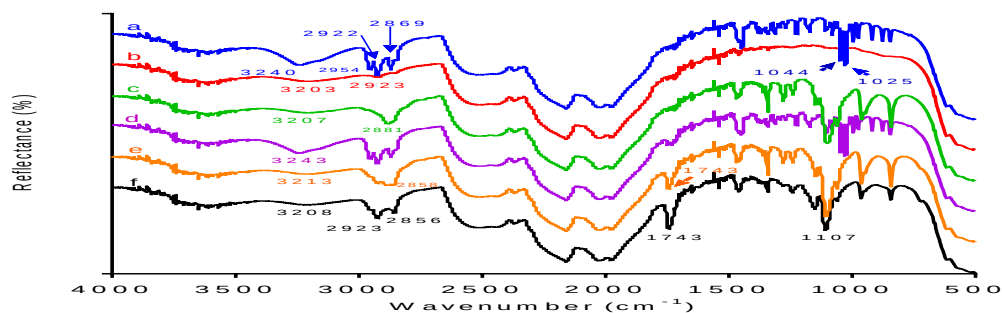
สำหรับพอลิเมอร์ poly (ϵ -caprolactone) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม aliphatic polyesters พบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่เลขคลื่น 2947 cm^{-1} (sp³ การยืด C-H แบบไม่สมมาตร) ที่เลขคลื่น 2866 cm^{-1} (sp³ การยืด C-H

แบบสมมาตร) 1731 cm^{-1} (C = O การสั่นของหมู่ carbonyl) 1468 cm^{-1} (CH_2 การดัด) 1365 cm^{-1} (CH_3 การดัด) 1294 cm^{-1} (COและการยืด C-C) 1240 cm^{-1} (การยืดแบบไม่สมมาตรของ C-O-C) 1170 cm^{-1} (การยืดแบบสมมาตร C-O-C) และ 730 cm^{-1} (การโยกโครงสร้างแกนของ C-C)

สเปกตรัมการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของ poloxamer 188 แสดงแถบการดูดกลืนรังสีที่เลขคลื่น $3600\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ (O-H stretching) 2890 cm^{-1} (C-H sp^3 stretching) และ 1080 cm^{-1} (C-O stretching)

สเปกตรัม FTIR ของนาโนแคปซูลที่บรรจุเมนทอลแสดงให้เห็นว่ามีสารที่ใช้ในการเตรียมระบบนำส่งเป็นส่วนประกอบ และการหายไปของค่าดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่เลขคลื่น 2955 2922 2870 987 920 878 843 และ 669 cm^{-1} เป็นไปได้ว่า menthol ถูกห่อหุ้มไว้โดยการกระจายตัวอยู่ภายในโพรงของนาโนแคปซูลซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ร้อยละการกักเก็บสารในระบบนำส่งที่พบว่ามีค่าใกล้เคียงร้อยละ 100

สิ่งที่น่าสนใจระบบนำส่งนาโนแคปซูลเปล่าและนาโนแคปซูลที่บรรจุเมนทอล ในการศึกษาครั้งนี้คือ พบแถบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเกิดขึ้นที่เลขคลื่น 1743 cm^{-1} ซึ่งเป็นผลมาจากการสั่นสะเทือนของการยืดของหมู่ C = O จาก poly(ϵ -caprolactone) ทำให้สามารถพิสูจน์ได้ว่าประจุลบที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจาก COO^- ของพอลิเมอร์ที่ใช้ ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มสัดส่วนของ poly(ϵ -caprolactone) ลงไปในสูตรตำรับส่งผลทำให้ระบบนำส่งที่ผลิตได้มีค่าศักย์ซีตาร์เป็นลบเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4.12 การตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนรังสี infrared ของระบบนำส่งเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและส่วนประกอบของตำรับ เมื่อ (a) คือ menthol (b) คือ poly (ϵ -caprolactone) (c) คือ poloxamer 188 (d) คือ สารผสมทางกายภาพระหว่างเมนทอลและระบบนำส่งเปล่า (e) คือ ระบบนำส่งเปล่าและ (f) คือ เมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล

4.6 การทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง

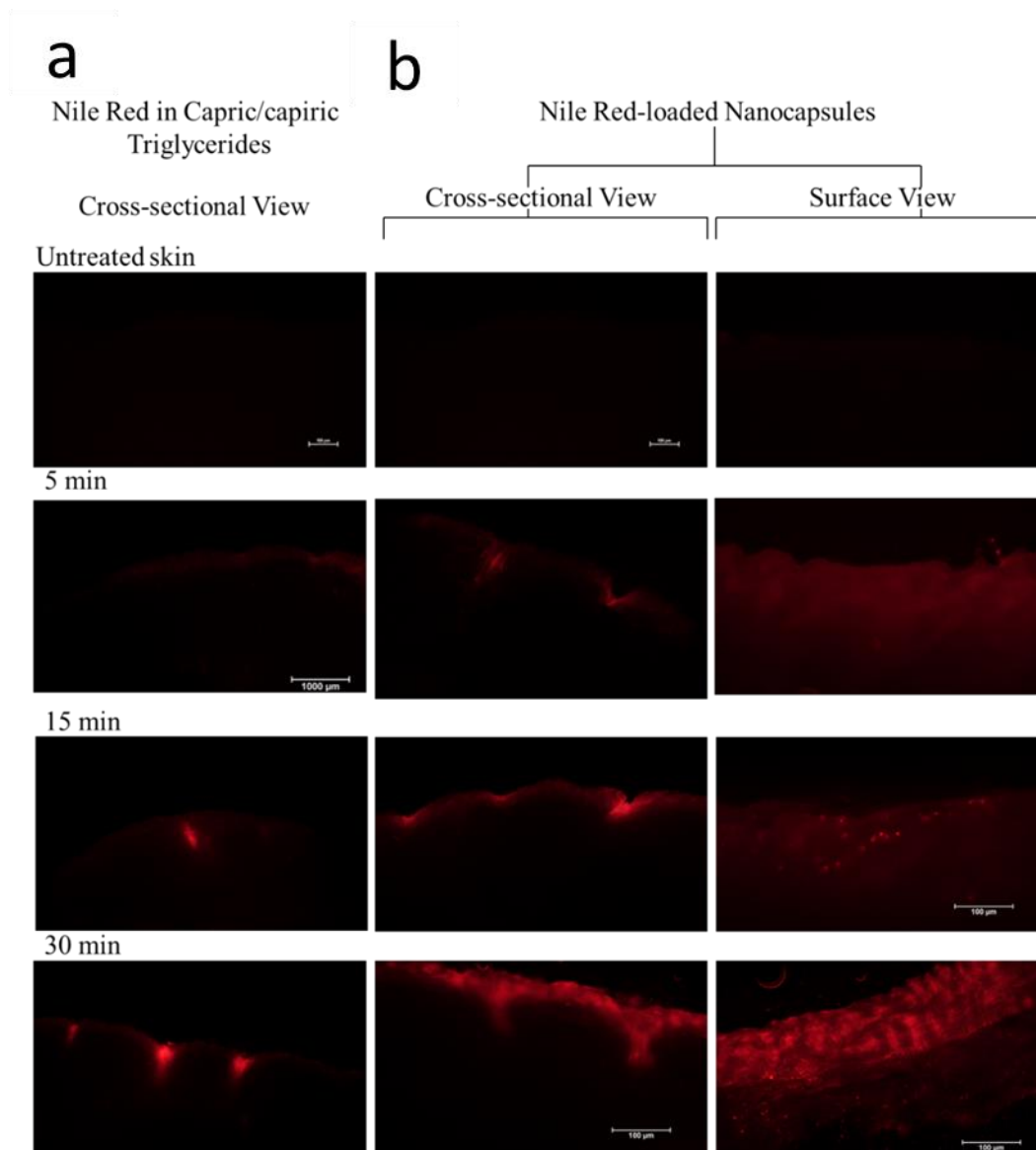
การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลในการศึกษานี้เป็นการศึกษานอกร่างกาย (ex vivo study) โดยใช้ผิวหนังส่วนหู (ส่วนหลังของใบหู) ของสุกรที่ได้รับจากโรงฆ่าสัตว์ (ไม่จัดเป็นสัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์) เหตุผลที่เลือกใช้ผิวหนังหูของสุกรเพราะว่ามีโครงสร้างทางกายภาพที่คล้ายคลึงกับผิวหนังมนุษย์ โดยผิวหนังชั้น stratum corneum มีความหนาประมาณ $17\text{--}28\text{ }\mu\text{m}$ ชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต (viable epidermis) หนาประมาณ $60\text{--}85\text{ }\mu\text{m}$ และผิวหนังที่เหลือ (ชั้นผิวหนังแท้และชั้นไขมันใต้ผิวหนัง) หนาประมาณ $1.44\text{--}2.21\text{ mm}$

มีเส้นขนประมาณ 11-25 เส้น/cm²นอกจากนี้แล้วผิวหนังส่วนหูของสุกรยังประกอบด้วยเส้นขนที่ยาวลงไปใผิวหนังชั้นหนังแท้ที่ความลึก 0.96-1.38 mm และมีช่องเปิดของรูขุมขนกว้างประมาณ 200 μ m (Jacobi et al., 2007)

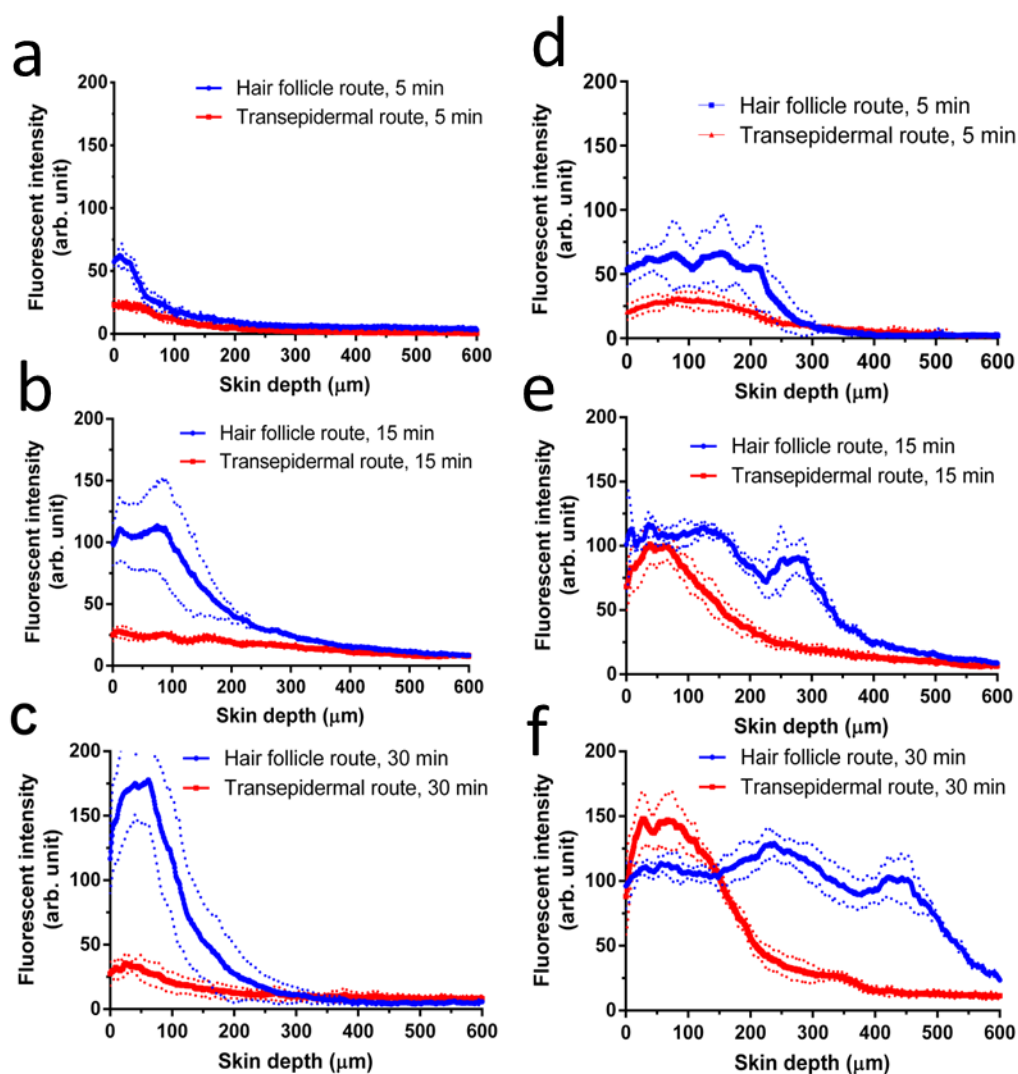
ภาพที่ 4.13 แสดงให้เห็นถึงการซึมผ่านผิวหนังที่มีความหนา 1,000 μ m ของ nile red ซึ่งเป็นสารฟลูออเรสเซนต์ที่ละลายในไขมัน และใช้เป็นสารที่กักเก็บลงไปในนาโนแคปซูล หรือละลายใน caprylic/capric triglycerides เพื่อประเมินการซึมผ่านของสารกรณีที่อยู่ในรูขุมขนและการกักเก็บในระบบนำส่งนาโนแคปซูล และเหตุผลที่เลือกใช้ nile red อีกประการคือ menthol เป็นสารที่ไม่มีคุณสมบัติไวแสง ในการศึกษานี้ได้เลือกสภาวะการทดสอบระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 30 นาที เพื่อประเมินการซึมผ่านของสารอย่างรวดเร็วลงไปยังตำแหน่งเป้าหมายคือ ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเส้นประสาทรับสัมผัส TRPM8 มาสิ้นสุดผลการศึกษาพบว่าผิวหนังของสุกรแทบจะไม่พบการเกิด autofluorescence โดยลักษณะการซึมผ่านผิวหนังของ nile red ที่ละลายอยู่ใน caprylic/capric triglycerides พบกระจายเฉพาะอยู่บนผิวหนัง แต่ไม่พบการซึมผ่านผิวหนังด้วยกลไก trans-epidermal route (transcellular & intercellular route) ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 30 นาที โดยการซึมผ่านของ nile red ในรูขุมขนนี้พบผ่านช่องรูขุมขนภายหลังการบ่มเป็นเวลา 15 นาที และความเข้มของการวาวแสงฟลูออเรสเซนต์เพิ่มขึ้น ณ เวลา 30 นาที ดังนั้น สารละลายในรูขุมขนจึงมีกลไกการซึมผ่านช่องทางรูขุมขนเป็นเส้นทางหลัก

ในทางตรงข้ามเมื่อเปรียบเทียบกับ nile red ที่บรรจุไว้ในนาโนแคปซูลจะพบการวาวแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เข้มกว่าในรูขุมขน ณ เวลา 5 15 และ 30 นาที ภายหลังการบ่มไว้บนผิวหนัง ผลการศึกษานี้เป็นไปได้ว่านาโนแคปซูลสามารถหลอมรวมกันกับองค์ประกอบไขมันบนผิวหนังชั้น stratum corneum หรือทั้ง nile red และนาโนแคปซูลซึมผ่านเข้าไปในผิวหนังชั้นที่อยู่ลึกลงไปได้ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาโดยนักวิจัยกลุ่มอื่นที่ได้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนเมตร (nanoparticles) ที่มีขนาดเล็กสามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารลงไปชั้นผิวหนังได้ดี (Liu et al., 2018)

เมื่อวัดระยะการซึมผ่านลงไปใผิวหนังที่ความลึก 600 μ m (ภาพที่ 4.14) พบว่า การกักเก็บสาร nile red ลงในนาโนแคปซูลจะทำให้การซึมผ่านผิวหนังนั้นเกิดผ่านเส้นทางรูขุมขน (trans-follicular pathway) เกิดขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยโดย Kurtz และ Lawson (Kurtz & Lawson, 2018) ที่พบว่าการซึมผ่านของ nile red ซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมันจะซึมผ่านผิวหนังผ่านรูขุมขน (transductal route) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าที่เวลา 30 นาทีของการบ่ม nile red กักเก็บในนาโนแคปซูลพบการวาวแสงฟลูออเรสเซนต์ทั่วทั้งบริเวณผิวหนังชั้น stratum corneum และช่องว่างระหว่างเซลล์ corneocyte (intercorneocyte) ซึ่งเป็นไปได้ว่าการนำส่งผ่านผิวหนังนั้นยังสามารถเกิดผ่านวิธีผ่านเซลล์ (transepidermal pathway) ได้เช่นกัน



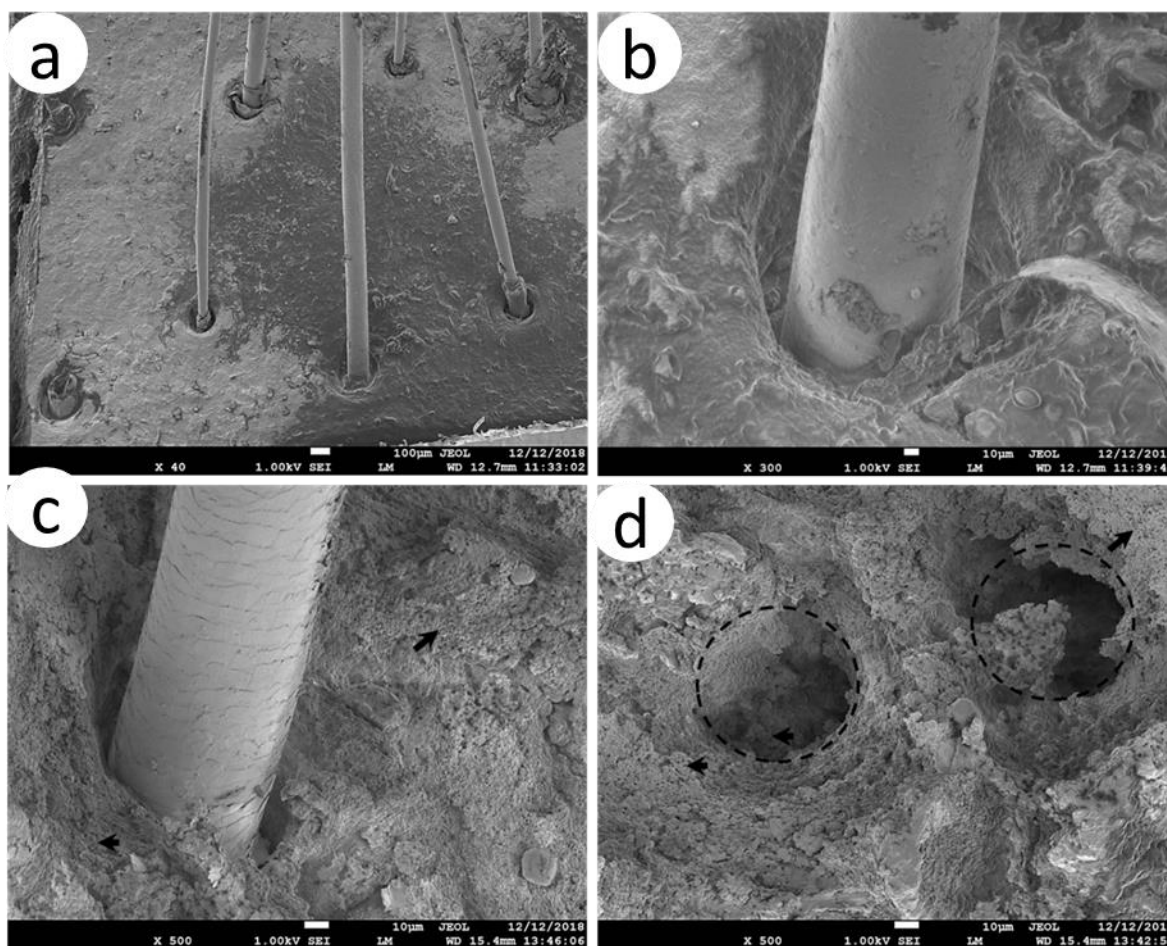
ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังหุสุกรของ nile red ที่อยู่ในรูปสารละลายอิสระใน caprylic/capric triglycerides และกักเก็บในนาโนแคปซูล ณ เวลาต่างกัน



ภาพที่ 4.14 เปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังสู่รูลงไปในผิวหนังที่ระดับความลึกต่างกันของ Nile red ที่อยู่ในรูปสารละลายอิสระใน caprylic/capric triglycerides และในนาโนแคปซูล ณ เวลาต่างกัน

นอกจากนี้แล้วงานวิจัยนี้ยังได้ตรวจสอบลักษณะของนาโนแคปซูลที่พบผิวหนังสู่รูโดยการบ่มเป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะตรึงตัวอย่างด้วยน้ำยาตรึงตัวอย่างแล้วนำไปทำให้แห้งและนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.15 ซึ่งพบว่าอนุภาคนาโนแคปซูลส่วนมากกระจายอยู่บนผิวหนังด้านบนและมีส่วนสามารถพบได้ในรูขุมขน สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เป็นไปได้ว่าช่องรูขุมขนนั้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100-200 μm ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของนาโน

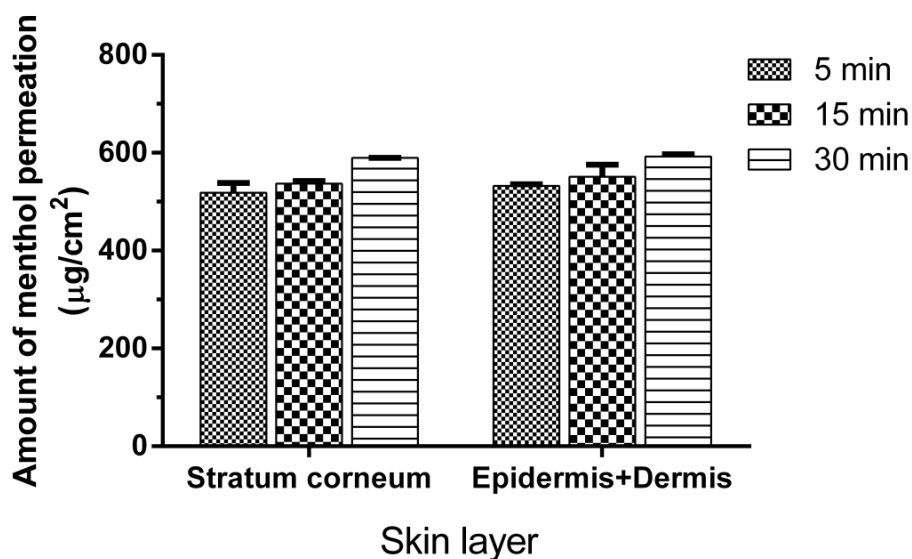
แคปซูล (205.11 ± 6.71 nm) ประมาณ 500 ถึง 1,000 เท่า ดังนั้น จึงคาดว่าลักษณะดังกล่าวส่งผลทำให้สารที่บรรจุไว้ในระบบนำส่งสามารถซึมเข้าไปยังชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิตและชั้นหนังแท้ และส่งผลทำให้เม้นทอลเข้าไปจับกับตัวรับ TRPM8 ในผิวหนังได้



ภาพที่ 4.15 เปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังหุสกรลงไปในผิวหนังที่ระดับความลึกต่างกันของ เม้นทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูล และผิวหนังปกติ ณ เวลา 30 นาทีภายหลังการบ่ม เมื่อภาพ a และ b คือ ผิวหนังปกติ ส่วนภาพ c และ d คือ ผิวหนังที่บ่มด้วยเม้นทอลบรรจุในนาโนแคปซูล

เพื่อพิสูจน์ให้เห็นชัดเจนว่าเม้นทอลสามารถซึมลงไปในชั้นผิวหนังได้จึงได้ทดสอบเพิ่มเติมโดยบ่ม เม้นทอลที่บรรจุไว้ในนาโนแคปซูลเป็นเวลา 5 15 และ 30 นาที จากนั้นใช้เทคนิคการแยกชั้นผิวหนังด้วยเทป (tape stripping) จำนวน 20 ครั้ง (การแยกด้วยเทปครั้งที่ 1 ทิ้งไปและนำเฉพาะเทปที่แยกครั้งที่ 2 – 20 มารวมกัน) ซึ่งจะครอบคลุมชั้น stratum corneum ประมาณร้อยละ 70 ขณะที่ผิวหนังส่วนที่เหลือจะ

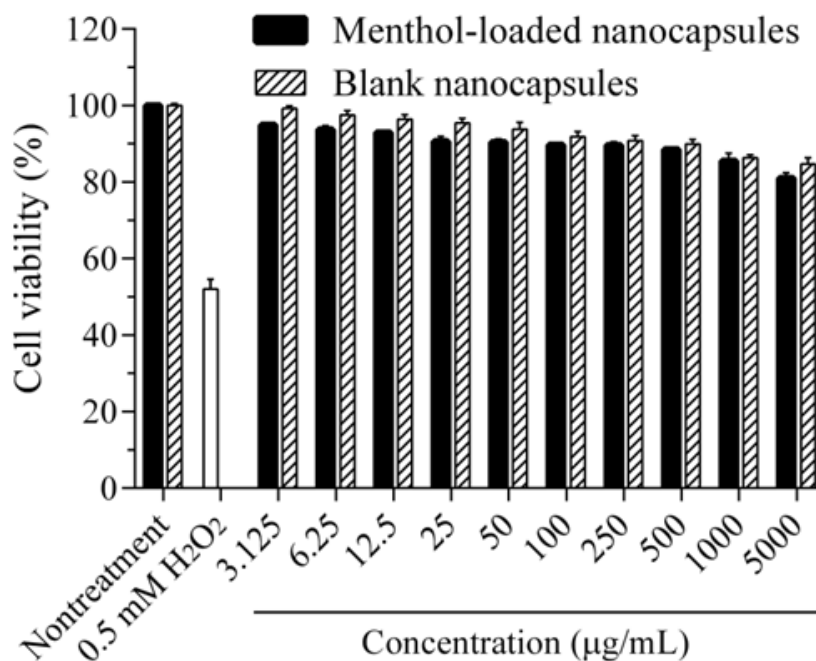
ประกอบด้วยชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้ (epidermis & dermis) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเมนทอลด้วยเทคนิค HPLC-RI ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.16 พบว่าเมนทอลสามารถตรวจพบในผิวหนังทั้ง 2 ชั้น ณ เวลา 5 15 และ 30 นาที อยู่ในช่วง 500 – 600 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ซึ่งการศึกษานี้สามารถพิสูจน์ให้เห็นว่า menthol ที่บรรจุอยู่ในอนุภาคนาโนแคปซูลที่มีขนาดเล็กกว่า 500 nm สามารถลงไปในผิวหนังชั้นที่ต้องการให้ออกฤทธิ์ได้อย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังสุกรของเมนทอลที่บรรจุไว้ในนาโนแคปซูลที่ชั้น stratum corneum และชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้ ณ เวลา 5 15 และ 30 นาที ภายหลังการบ่ม

4.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ความปลอดภัยมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ การศึกษานี้จึงได้ทดสอบความเป็นพิษของระบบนำส่งต่อเซลล์โดยวิเคราะห์ในเซลล์ normal human dermal fibroblasts โดยบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและวิเคราะห์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.17 พบว่า ระบบนำส่งเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและนาโนแคปซูลเปล่า มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ใกล้เคียงกัน โดย ณ ความเข้มข้น 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ให้ค่าการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 85 ซึ่งหากต่ำกว่าร้อยละ 70 จะมีพิษต่อเซลล์ [ISO 10993-5: 2009 (Biological evaluation of medical devices - part 5 : tests for vitro cytotoxicity)] และการวิเคราะห์ลักษณะสัญญาณวิทยาของเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพบว่าเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณวิทยา ณ ความเข้มข้นที่ตรวจสอบ ขณะที่กลุ่มควบคุมผลบวกคือ เซลล์ที่ทดสอบด้วย 0.5 mM H_2O_2 มีค่าการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 52.01 ± 2.61 ดังนั้น ตำรับที่พัฒนาขึ้นจึงเข้ากันได้กับเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.17 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ normal human dermal fibroblasts ของระบบนำส่งเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและนาโนแคปซูลเปล่า ณ เวลา 24 ชั่วโมง

4.8 การผลิตสเปรย์เพื่อเพิ่มความสดชื่นและทดสอบการระคายเคืองของสเปรย์เพิ่มความสดชื่น

สเปรย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้น มีส่วนประกอบสำคัญ ได้แก่ สารออกฤทธิ์เพิ่มความสดชื่นที่มีเมนทอลความเข้มข้นร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก ตัวทำละลายร่วม สารกันเสีย สารหล่อลื่นผิว น้ำหอม และน้ำกลั่น กรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์สเปรย์พื้นจะแทนที่ปริมาณของเมนทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูลด้วยน้ำกลั่น ซึ่งระบบนำส่งเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลเตรียมด้วยวิธีการตกตะกอนนาโน (nanoprecipitation) ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้ mentholpoly(ϵ -caprolactone) caprylic/capric triglyceride sorbitan monooleate poloxamer 188 polysorbate 80 และน้ำกลั่น (ทางผู้วิจัยขออนุญาตไม่เปิดเผยข้อมูลสัดส่วนของสารที่ใช้ในตำรับผลิตภัณฑ์สเปรย์โดยละเอียดได้เนื่องจากการศึกษานี้เป็นโครงการวิจัยที่ทำร่วมกับผู้ประกอบการภาคเอกชน)

เมนทอลมีคุณสมบัติเพิ่มความสดชื่นให้แก่ผิวหนังผ่านกลไกกระตุ้นตัวรับศักย์ไอออนชั่วคราวของช่องทาง metastatin ชนิดย่อยที่ 8 (transient receptor potential ion channel metastatin subtyp 8) ที่ปลายประสาทรับสัมผัสบริเวณผิวหนังชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต (Yildiz et al., 2018) การใช้เมนทอลเป็นสารออกฤทธิ์ให้ความเย็นแก่ผิวหนังมีข้อจำกัดสำคัญคือ เมนทอลมีค่าขีดการละลายน้ำต่ำ ปัญหาดังกล่าวทำให้เกิดแนวคิดเกี่ยวกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ช่วยสร้างความสดชื่นที่ผิวหนังที่ช่วยทำให้เมนทอลละลายน้ำและลดอัตราการระเหยลงได้โดยกักเก็บสารออกฤทธิ์ในนาโนแคปซูล จากนั้นจึงนำนาโนแคปซูลที่ได้มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสเปรย์

เพื่อเพิ่มความสะดวกในการใช้งานคือสามารถใช้งานง่ายเพียงฉีดยาที่บริเวณใบหน้าหรือส่วนอื่นของร่างกาย พบว่าสะดวกขณะเดินทางและไม่ระคายเคืองต่อผิวหนัง ต้นแบบผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้พัฒนาเสร็จสิ้นแล้วโดยกลุ่มคณะผู้วิจัย

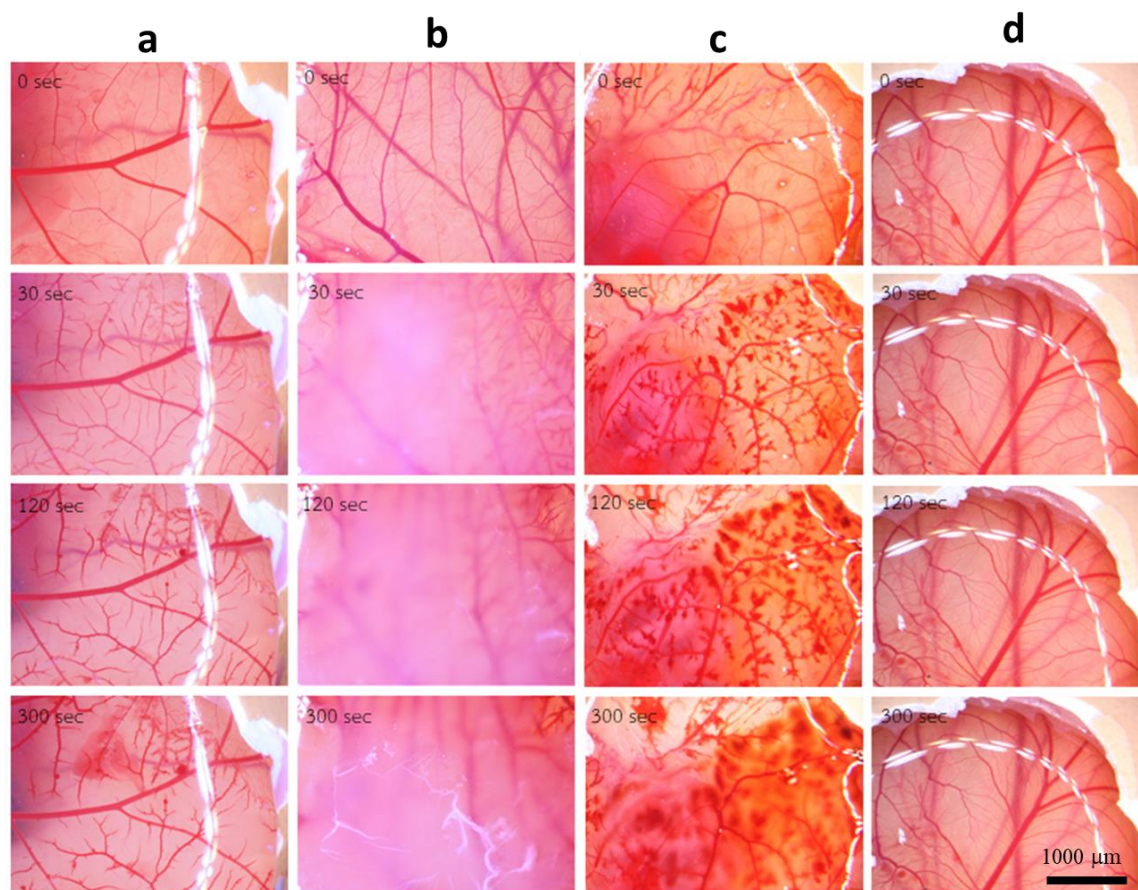
อย่างไรก็ตามการนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปใช้จำเป็นต้องทราบข้อมูลด้านการระคายเคือง ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพระคายเคืองของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลโดยทดสอบในเยื่อหูไขฟก กำหนดให้เยื่อหูไขฟกที่ทดสอบด้วยสารละลายโซดาไฟความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 N และสารละลายน้ำเกลือปกติ(normal saline solution)เป็นกลุ่มควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ ปฏิบัติการระคายเคืองที่ประเมินประกอบด้วยภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดง การฉีกขาดของหลอดเลือดและการตกตะกอนของโปรตีน จากนั้นคำนวณค่าศักยภาพระคายเคืองผลที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการขออนุมัติจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์เกี่ยวกับประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อกระตุ้นให้เกิดความรู้สึกรู้สึกในอาสาสมัครสุขภาพดีต่อไป

ผลการศึกษาพบว่าคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของระบบนำส่งเมนทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูล มีค่าร้อยละการกักเก็บสารออกฤทธิ์สูงเท่ากับ 98.18 ± 1.05 เมื่อนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สเปรย์และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 25°C พบว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลมีค่าเท่ากับ 5.32 ± 0.84 ขณะที่สเปรย์พื้นมีค่าเท่ากับ 5.34 ± 0.97 ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์สองชนิดดังกล่าวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และอยู่ในช่วงระหว่าง 4.5 – 6.5 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใกล้เคียงกับผิวหนังของมนุษย์

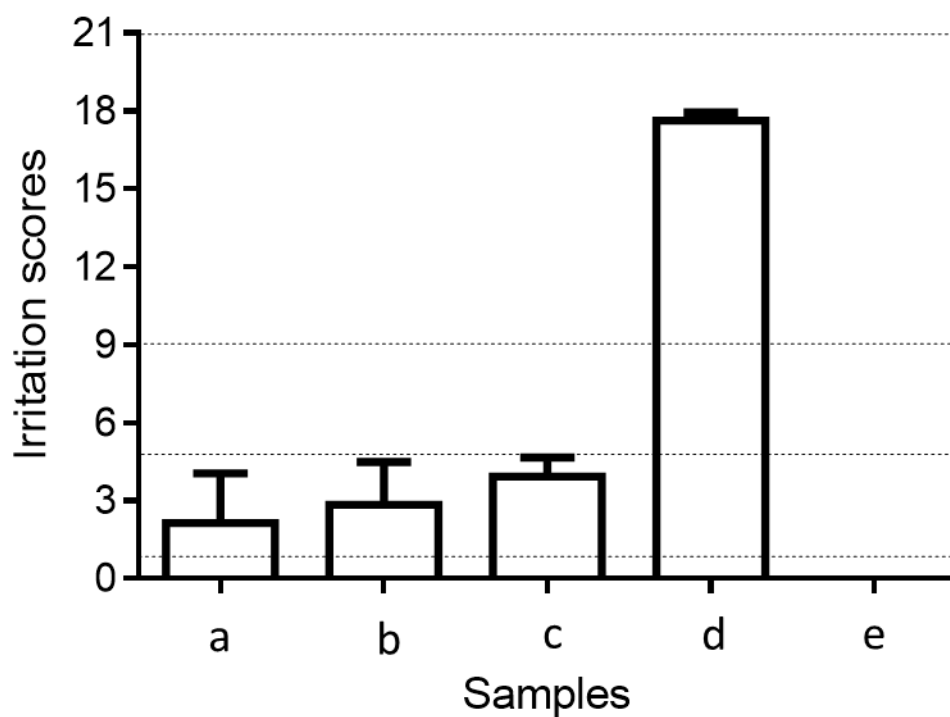
การประเมินศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ต่อเยื่อหูไขฟกแสดงในภาพที่ 24 ผลการศึกษา พบว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลมีภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เวลา 51.6 ± 6.2 วินาที ขณะที่สเปรย์พื้นพบที่เวลา 55.5 ± 3.5 วินาที ผลิตภัณฑ์ที่นำมาทดสอบทั้งสองชนิดข้างต้นไม่มีผลทำให้เกิดการฉีกขาดของหลอดเลือดและไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพเมื่อตรวจสอบในช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 300 วินาทีตามแนวทางของ NICEATM-ICCVAM (Casey & Lowit, 2019) สำหรับกลุ่มควบคุมผลบวกพบว่าสารละลายโซดาไฟความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เวลา 12.8 ± 3.3 วินาที การฉีกขาดของหลอดเลือดที่เวลา 71.2 ± 8.2 วินาที และโปรตีนเกาะกลุ่มกันที่เวลา 52.6 ± 7.5 วินาที ไม่พบการระคายเคืองเกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมผลลบที่ทดสอบด้วยสารละลายเกลือแกงปกติ โดยมีค่าคะแนนการระคายเคืองเท่ากับ 0.00 ± 0.00 จากนั้นเมื่อนำค่าระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและโปรตีนเยื่อหูไขฟกมาคำนวณเป็นคะแนนระคายเคือง สามารถสรุปผลได้ดังแสดงในภาพที่ 24 พบว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้นมีคะแนนการระคายเคืองเท่ากับ 2.15 ± 1.91 และ 2.84 ± 1.65 ตามลำดับ ($p > 0.05$) คะแนนการระคายเคืองที่สูงขึ้น (3.92 ± 0.75) พบในสารละลายเมนทอลอิสระ ขณะที่กลุ่มผลบวกควบคุมและผลลบควบคุมมีค่าเท่ากับ 17.63 ± 0.31 และ 0.00 ± 0.00 ตามลำดับ ($p < 0.001$) (ภาพที่ 4.18)

การทดสอบศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ต่อเยื่อหูไขฟกจัดเป็นวิธีทดสอบทางเลือกที่ไม่ใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ การศึกษานี้ได้นำวิธีการดังกล่าวเพื่อตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล การศึกษานี้เลือกใช้ไขฟกอายุ 9 วัน เป็นเยื่อหูสำหรับทดสอบเพราะมีเนื้อเยื่อที่

สมบูรณ์ประกอบด้วยหลอดเลือดแดงหลอดเลือดดำและหลอดเลือดฝอย แต่เอมบริโอของไก่ยังเจริญเติบโตไม่ถึงร้อยละ 50 ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ตรวจสอบการระคายเคืองหรือบาดเจ็บที่เกิดจากสารเคมีตามแนวทางของ NICEATM-ICCVAM (2015)(Casey & Lowit, 2019)โดยผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีนี้เพราะสามารถทำได้รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายไม่สูง และจัดเป็นทางเลือกที่ได้รับการยอมรับสำหรับการทดลองในสัตว์หรือมนุษย์ ผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ชัดเจนว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้นมีคะแนนการระคายเคืองจัดอยู่ในเกณฑ์ระคายเคืองเล็กน้อย (คะแนนอยู่ในช่วง 1.0-4.9) ซึ่งต่ำกว่า 9 ซึ่งให้เห็นว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสำหรับการใช้เฉพาะที่ได้ (Pandey et al., 2019) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยงชนิด normal human dermal fibroblasts (NHDF cells) ด้วยวิธี MTT ซึ่งผู้วิจัยพบว่าระบบนำส่งเมนทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูลและระบบนำส่งนาโนแคปซูลเปล่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 3 ถึง 5000 $\mu\text{g/mL}$ ดังนั้น การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและสามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์ภายนอกที่มีความปลอดภัยได้



ภาพที่ 4.18 ภาพถ่ายหลอดเลือดของเยื่อไขไก่ฟักอายุ 9 วัน เมื่อทดสอบ ณ เวลา 0 30 120 และ 300 วินาที ตามลำดับ เมื่อ (a)คือ สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล (b) คือ สเปรย์พื้น (c) คือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และ (d) คือ สารละลายน้ำเกลือ (n = 6)



ภาพที่ 4.19 คะแนนศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุ
นาโนแคปซูลและสเปรย์พื้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผลบวกและผลลบ ตามลำดับ
เมื่อ a คือ สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล b คือ สเปรย์พื้น
c คือ สารละลาย เมนทอลอิสระ d คือสารละลายโซดาไฟความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
และ e คือ สารละลายเกลือแกงปกติ (n = 6)

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ได้พัฒนาระบบนำส่งนาโนแคปซูลเพื่อบรรจุเมนทอลสำหรับใช้ผลิตเป็นสเปรย์เพิ่มความสดชื่น การพัฒนาตำรับใช้วิธีการออกแบบตามแบบแผนบ็อกซ์-เบห์นกัน (Box-Behnken) ร่วมกับอัลกอริทึมโครงข่ายประสาทเทียม พบว่า สามารถกำหนดคุณสมบัติของตำรับที่ต้องการได้ เมื่อนำตำรับเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลมาผลิตในรูปแบบสเปรย์ได้คุณสมบัติของสเปรย์ที่ดี การทดสอบศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ต่อเยื่อ مخاطจัดเป็นวิธีทดสอบทางเลือกที่ไม่ใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ การศึกษานี้ได้นำวิธีการดังกล่าวเพื่อตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูล การศึกษานี้เลือกใช้ไข่ไก่ฟักอายุ 9 วัน เป็นเยื่อสำหรับทดสอบ เพราะมีเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ประกอบด้วยหลอดเลือดแดง หลอดเลือดดำ และหลอดเลือดฝอย แต่เอมบริโอของไก่ยังเจริญเติบโตไม่ถึงร้อยละ 50 ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ตรวจสอบการระคายเคืองหรือบาดเจ็บที่เกิดจากสารเคมี ผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีนี้เพราะสามารถทำได้รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายไม่สูง และจัดเป็นทางเลือกที่ได้รับการยอมรับสำหรับการทดลองในสัตว์หรือมนุษย์ ผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ชัดเจนว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้นมีคะแนนการระคายเคืองจัดอยู่ในเกณฑ์ระคายเคืองเล็กน้อย (คะแนนอยู่ในช่วง 1.0-4.9) ซึ่งต่ำกว่า 9 ซึ่งให้เห็นว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสำหรับการใช้เฉพาะที่ได้ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง normal human dermal fibroblasts (NHDF cells) ด้วยวิธี 3-(4,5-diethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งผู้วิจัยพบว่าระบบนำส่งเมนทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูลและระบบนำส่งนาโนแคปซูลเปล่าไม่เป็นที่พิษต่อเซลล์ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 3 ถึง 5,000 $\mu\text{g/mL}$ ดังนั้น การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและสามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์ภายนอกที่มีความปลอดภัยได้ ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการขออนุมัติจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์เกี่ยวกับประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อกระตุ้นให้เกิดความรู้สึกระหว่างในอาสาสมัครสุขภาพดีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- Alkholief, M. “Optimization of Lecithin-Chitosan nanoparticles for simultaneous encapsulation of doxorubicin and piperine”, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 52: 204-214; August, 2019.
- Badri, W and et al. “Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and Nigella Sativa L. essential oil for the topical treatment of inflammation”, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 46: 234-242; August, 2018.
- Etzold, B., Jess, A., & Nobis, M. “Epimerisation of menthol stereoisomers: Kinetic studies of the heterogeneously catalysed menthol production”, **Catalysis Today**. 140(1): 30-36; February, 2009.
- Faisal, A. A. H. and et al. “A sustainable approach to utilize olive pips for the sorption of lead ions: Numerical modeling with aid of artificial neural network”, **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. 15: 100220: March, 2020.
- Ferreira, L. M. and et al. “Diphenyl diselenide loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation”, **Materials Science and Engineering**. 91: 1-9; October, 2018.
- Jacobi, U. and et al. “Porcine ear skin: an in vitro model for human skin”, **Research & Technology**. 13(1): 19-24; February, 2007. Skin
- Journigan, V. B., & Zaveri, N. T. “TRPM8 ion channel ligands for new therapeutic applications and as probes to study menthol pharmacology”, **Life Sciences**. 92(8): 425-437; Mar, 2013. Life Sciences.
- Kumar, P. S., Jeyalatha, M. V., Malathi, J. and Ignacimuthu, S. “Anticancer effects of one-pot synthesized biogenic gold nanoparticles (Mc-AuNps) against laryngeal carcinoma”, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 44: 118-128; December 2017.
- Kurtz, S. L., & Lawson, L. B. “Determination of permeation pathways of hydrophilic or hydrophobic dyes through the mammary papilla”, **International Journal of Pharmaceutics**. 545(1): 10-18; April, 2018.
- Liu, X. and et al. “Nanoparticle-loaded gels for topical delivery of nitrofurazone: Effect of particle size on skin permeation and retention”, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 45: 367-372; June, 2018.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Patel, T., Ishiujji, Y., & Yosipovitch, G. “Menthol: A refreshing look at this ancient compound” , **Journal of the American Academy of Dermatology**. 57(5): 873- 878; November, 2007.
- Phunpee, S. and et al. “A comparison of eugenol and menthol on encapsulation characteristics with water-soluble quaternized β -cyclodextrin grafted chitosan” , **International Journal of Biological Macromolecules**. 84: 472-480; March, 2016.
- Shaikh, K. and Patil, S. D. “Sensitive and selective method for the analysis of menthol from pharmaceutical products by RP- HPLC with refractive index detector” , **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. 2(4): 360-364; Oct-Dec, 2010.
- Vasconcelos, A.G. and et al. “Cytotoxic activity of poly- ϵ -caprolactone lipid-core nanocapsules loaded with lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava*L.) on breast cancer cells” , **Food Research International**. 136: 109548; October, 2020.
- Wolf, M. and et al. “Monoacyl-phosphatidylcholine based drug delivery systems for lipophilic drugs: Nanostructured lipid carriers vs. nano- sized emulsions” , **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 46: 490-497; August, 2018
- Yildiz, Z. I. and et al. “Menthol/cyclodextrin inclusion complex nanofibers: Enhanced water-solubility and high-temperature stability of menthol” , **Journal of Food Engineering**. 224: 27-36; May, 2018.
- Yin, Y. and Lee, S.-Y. “Current View of Ligand and Lipid Recognition by the Menthol Receptor TRPM8” , **Trends in Biochemical Sciences**. 45(9): 806-819; September, 2020.
- Yingngam, B. “Optimization of menthol-loaded nanocapsules for skin application using the response surface methodology” , **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 53: 101138; October, 2019.
- Yingngam, B. and et al. “Modeling and stability study of the anthocyanin-rich maoberry fruit extract in the fast-dissolving spray-dried microparticles” , **Powder Technology**. 325: 261-270; February, 2018.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยเผยแพร่ระดับนานาชาติ

Yingngam B, Chiangsom A, Pharikarn P, Vonganakasame K, **Kanoknitthiran V**, Rungseevijitprapa W, Prasitpuriprecha C. Optimization of menthol-loaded nanocapsules for skin application using the response surface methodology. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2019; 53: 101138. (Q2; 2018 Impact Factor = 2.606)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Optimization of menthol-loaded nanocapsules for skin application using the response surface methodology



Bancha Yingngam^{a,*}, Abhiruj Chiangsom^b, Paranda Pharikarn^a, Kantaphong Vonganakasame^a, Virawan Kanoknitthiran^a, Wandee Rungseevijitprapa^a, Chutinun Prasitpuriprecha^c

^a Department of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

^b Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Rangsit University, Pathum Thani, 12000, Thailand

^c Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Cosmetotextile
Menthol
Nanocapsule
Response surface methodology
Safety

ABSTRACT

Menthol is used as a natural coolant in numerous consumer healthcare products. However, low aqueous solubility and high volatility limit its applications. This study aimed to encapsulate menthol in lipid-core nanocapsules by using a nanoprecipitation method and to explore its skin application. Experiments were performed using a Box-Behnken design to investigate the influence of relevant causal parameters (weight proportions of menthol, poly(ϵ -caprolactone) and poloxamer 188) on responses, including the hydrodynamic diameter, zeta potential and entrapment efficiency, of menthol in the nanocapsules. The optimized nanocapsules with good physicochemical features consisted of 150 mg menthol, 84 mg poly(ϵ -caprolactone) and 125 mg poloxamer 188. The menthol-loaded nanocapsules were subsequently characterized in terms of physicochemical properties, skin localization and permeation, irritation potential and cytotoxicity. Nile Red-labelled nanocapsules supported rapid *ex vivo* skin penetration. Hair follicle and *trans*-epidermal routes played an important role in the rapid percutaneous absorption of menthol. Hen's egg chorioallantoic membrane results and cytotoxicity analysis in HaCaT and human dermal fibroblast cells suggested the safety of topically applied nanocapsules. The developed nanocapsules not only have the potential to enhance the aqueous solubility of menthol and improve the thermal stability but also are an alternative option for cosmetotextiles with fast dermal absorption properties.

1. Introduction

Menthol, which is one of the most valuable coolants with a peppermint-like odour, is used worldwide in cosmetic, perfumery, pharmaceutical and food products [1]. The most specific feature of this substance is that it generates a cooling sensation when it contacts human skin and mucosal surfaces [1–3]. Menthol can also relieve sunburn by its anti-inflammatory and anti-pruritic properties [1,4,5]. Numerous benefits have led to the interest of many researchers in applying menthol as an active ingredient in cosmetotextile products. Ideally, menthol impregnated within cosmetotextiles is transferred to the skin surface, followed by penetration through the stratum corneum to interact with the transient receptor potential ion channel melastatin subtype 8 (TRPM8) at nerve endings in the viable epidermis [1]. This results in a slower freshening and revitalization of the human body. Unfortunately, direct application hinders the usefulness of menthol in

cosmetotextiles because of its very low solubility in water (0.40 mg/L) and volatility [6].

To overcome these disadvantages, many encapsulation technologies, such as cyclodextrin complexes [3] and nanoparticles [7], have attracted great interest for improving water solubility, entrapping menthol, preventing loss and improving the shelf-life of the active ingredients to broaden their applications. Among nanostructured devices, lipid-core nanocapsules are effective systems and have been extensively used in numerous encapsulation studies [8]. The nanocapsules have been shown to enhance the solubility and penetration of several active substances for dermal applications [9]. A mixture of fatty acid ester oil and sorbitan monooleate (or other sorbitan derivatives) in the core compartment of this type of carrier is surrounded by poly(ϵ -caprolactone) (a wall material) and is stabilized by micelles consisting of a hydrophilic non-ionic surfactant mixture (polysorbate 80 and poloxamer 188) on their surface. Thus, the hydrophobic active substance in

* Corresponding author.

E-mail addresses: bancha.y@ubu.ac.th (B. Yingngam), abhiruj.c@rsu.ac.th (A. Chiangsom), paranda.ph.57@ubu.ac.th (P. Pharikarn), kantaphong.vo.57@ubu.ac.th (K. Vonganakasame), v.virawan@gmail.com (V. Kanoknitthiran), wandee.r@ubu.ac.th (W. Rungseevijitprapa), chutinun.p@ubu.ac.th (C. Prasitpuriprecha).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101138>

Received 8 May 2019; Received in revised form 25 June 2019; Accepted 30 June 2019
Available online 02 July 2019

1773-2247/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

both liquid and solid forms can be easily confined to an internal reservoir of the delivery system [8]. Additionally, other properties that have promoted the use of poly(ϵ -caprolactone) include its biocompatibility with slow degradation when used as a drug delivery polymer [9].

Nanocapsules can be prepared by several techniques, including nanoprecipitation, double emulsification, emulsion-coacervation, polymer coating, layer-by-layer deposition and emulsion-diffusion [10]. Nanoprecipitation is a promising technique that is a practical strategy for industrial-scale production because of its ease, high encapsulation efficiency, high reproducibility and ability to produce nanocapsules with uniform sizes [9]. This method consists of a two-step process that includes emulsification of the organic and aqueous phases, followed by the removal of organic solvents to form nanocapsule dispersions. Acetone, which is a pharmaceutically suitable organic solvent, is mostly used to solubilize synthetic polymers for the preparation of nanocapsules and can be eliminated from the final products by evaporation under reduced pressure.

The aforementioned benefits of nanocapsules led our group to hypothesize that some major obstacles that limit the use of menthol can be overcome and that the dermal bioavailability of menthol can be improved. However, a review of previously published studies revealed that there is no current report on the application of nanocapsules for the encapsulation of menthol by nanoprecipitation combined with the response surface methodology. Therefore, this study aimed to encapsulate menthol in nanocapsules as a cooling agent and to explore its skin application. The menthol-loaded nanocapsules were characterized in terms of particle size, zeta potential and entrapment efficiency. The Box-Behnken design was applied to the relevant independent variables. This experimental design reduces the number of required experiments, improves the accuracy of the optimum conditions and enables interactions between independent and dependent variables. Subsequently, the physicochemical properties of the resultant nanocapsules were characterized. The ability of the nanocapsules to improve the dermal delivery of menthol, nanocapsule cytotoxicity, and irritation potential of the nanocapsules on hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) were investigated. Finally, the optimized menthol nanocapsules were impregnated within nonwoven fabric for application as a wet wipe.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Natural menthol ((1R,2S,5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol) (purity 99.5%) was purchased from the Fisher Chemical Company (Leicestershire, UK). Nile Red, poloxamer 188 (Kolliphor® P188), poly(ϵ -caprolactone) (molecular weight 80,000 g/mol), polysorbate 80 (Tween® 80), and sorbitan monooleate (Span® 80) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Caprylic/capric triglycerides (Lexol® GT-865) were acquired from the INOLEX Company (Bangkok, Thailand). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), foetal bovine serum (FBS), 200 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin were purchased from Gibco Invitrogen Corporation (Grand Island, NY, USA). All reagents used were of analytical grade.

2.2. Preparation of nanocapsules

Menthol-loaded nanocapsule suspensions were prepared by a nanoprecipitation approach [9] with some modifications. An organic phase containing poly(ϵ -caprolactone), menthol, sorbitan monooleate and caprylic/capric triglycerides in acetone (20 mL) was added to an aqueous solution of polysorbate 80, poloxamer 188 and deionized water using a glass syringe at a flow rate of 4 mL/min under stirring at 1000 rpm and a temperature of 25 ± 2 °C. Then, acetone was removed from the resulting mixture under vacuum using a rotary evaporator (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) at 35 °C at a final volume of 35 mL. The resulting nanocapsules were placed under gentle N₂

Table 1

Three-factor Box-Behnken design and desirability constraints used for the optimization of the menthol-loaded nanocapsule dispersions.

Independent variable	Symbol	Level			Function
		−1	0	+1	
Oil phase					
Menthol (mg)	X_1	50	100	150	Coolant
Poly(ϵ -caprolactone) (mg)	X_2	80	102.5	125	Coating polymer
Caprylic/capric triglycerides (mg)			300		Oil
Sorbitan monooleate (mg)			80		Stabilizer
Acetone (mL)			20		Organic solvent
Aqueous phase					
Poloxamer 188 (mg)	X_3	125	250	375	Stabilizer
Polysorbate 80 (mg)			80		Stabilizer
Distilled water (g)			50		Vehicle
Dependent variable		Desirability constraints			
Particle size (nm)	Y_1	Minimized			
Zeta potential (mV)	Y_2	Minimized			
Entrapment efficiency (%)	Y_3	Maximized			

flow for 30 min to ensure the complete evaporation of acetone, which was confirmed by headspace gas chromatography-mass spectrometry analysis. Nile Red-loaded nanocapsules were also prepared by replacing the menthol with 0.4 mg/mL Nile Red with the same preparation procedure as the method mentioned above.

2.3. Experimental design

A 3-factor and 3-level BBD was used to investigate the influence of the relevant independent variables on the physicochemical properties of the menthol-loaded nanocapsules and to identify the optimal production conditions. The three selected independent parameters included the weight proportions of menthol (X_1 , 50–150 mg), poly(ϵ -caprolactone) (X_2 , 80–125 mg) and poloxamer 188 (X_3 , 125–375 mg). The ranges of each relevant variable that have been shown to affect the physicochemical properties of the nanocapsules were chosen based on preliminary screening experiments by our group and previously published reports [11]. Other components used in the formulations were held constant (Table 1). The 3 levels of the investigated factors were coded as −1, 0 and +1 to generate seventeen randomized experiments with five replicates at a central point. The responses included the particle size (Y_1), zeta potential (Y_2) and entrapment efficiency of menthol in the nanocapsules (Y_3). A multiple regression through the least squares method was applied to analyse the experimental data. Additionally, principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were applied to differentiate between the initial dataset of the responses of the formed nanocapsules.

2.4. Desirability function

A desirability function was utilized to select the optimal formulation. The criteria for the optimal formulation included the following characteristics: the smallest particle size, optimal zeta potential, and maximum entrapment efficiency of the resultant menthol-loaded nanocapsules (Table 1). The desirability value was calculated by Eq. (1) as follows:

$$d_i = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i \leq y_{i \min} \\ \left[\frac{\hat{y}_i - y_{i \min}}{y_{i \max} - y_{i \min}} \right] & y_{i \min} < \hat{y}_i < y_{i \max}, \text{ for } i = 1, 2, \dots, k, \\ 1 & \hat{y}_i \geq y_{i \max} \end{cases} \quad (1)$$

where d_i is the desirability value of each response, $y_{i \min}$ is the minimum acceptable value of $\hat{y}_i$, and $y_{i \max}$ is the maximum acceptable value of $\hat{y}_i$. The obtained individual desirability was combined by applying the

geometric mean to calculate the overall desirability (D) as follows:

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3)^{1/4} \quad (2)$$

The selected conditions were further validated with three independent replicates, and the obtained values were compared to the predicted values. The significance of the results was determined by t -test.

2.5. Analysis of the dependent variables

2.5.1. Particle size and zeta potential

The particle size of each sample was measured by dynamic light scattering using a Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The samples were diluted in ultrapure water at 1:300 (v/v) to achieve a suitable optical density before the measurements. The width of the particle size distribution, which is known as the polydispersity index (PDI), was also determined. Additionally, electrophoretic mobility was applied to determine the surface charge of the menthol-loaded nanocapsules by using the same instrument. The data were analysed using Zetasizer version 7.02 software, and the measurements were performed at 25 °C.

2.5.2. Entrapment efficiency

The efficiency of menthol entrapment in the nanocapsules was analysed by high-performance liquid chromatography coupled with the refractive index detection (HPLC-RI). The total menthol content in the nanocapsule suspension was quantified by mixing the sample (0.2 mL) with methanol (9.8 mL). The resulting mixture was sonicated for 30 min, followed by centrifugation at 3800 rpm for 20 min, and the supernatant was collected. In parallel experiments, free menthol was separated from the menthol-loaded nanocapsules by centrifuging the sample at 3800 rpm and 25 °C for 20 min in an ultrafiltration centrifuge tube (Ultracel, 10 K regenerated cellulose membrane, Millipore, Germany). The technique proved that no menthol adsorbed on the ultrafilter membrane before the experiments, showing a recovery of nearly 100%. The ultrafilter membrane does not allow the transport of nanocapsules with particle sizes greater than 10 nm to the lower part of the tube. The obtained supernatants were collected for further analysis. The HPLC-RI [12] system consisted of a binary pump, auto-sampler, column compartment (Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Thermo Fisher Scientific Company, USA) and refractive index detector. A mixture of methanol and water (70:30 v/v) was used as a mobile phase with a flow rate of 1 mL/min. The sample (80 µL) was injected into a guard column (4.0 mm × 2.0 mm) connected to a C₁₈ Luna reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size) (Phenomenex, Torrance, USA). Data acquisition was performed by Chromeleon™ Chromatographic Data System Software (version 7.2). The entrapment efficiency was calculated using Eq. (3) as follows:

$$\text{entrapment efficiency (\%)} = \frac{(\text{Total menthol} - \text{Free menthol})}{\text{Total menthol}} \times 100 \quad (3)$$

2.6. Characterization of the optimized menthol-loaded nanocapsules

2.6.1. Morphological analysis

The external morphology of the menthol-loaded nanocapsules was examined by field emission-scanning electron microscopy (FE-SEM) (JEOL JSM-5800, Tokyo, Japan). A drop of the sample was placed on carbon adhesive tape and allowed to dry in air at 25 °C before a platinum coating was applied using a sputter coater (JEOL Jee 4B SVG IN). Microscopic images were acquired using an accelerating voltage of 1 kV. Topographic images of the nanocapsules were observed in non-contact mode by atomic force microscopy (AFM) (model AFM XE-100, Park Systems Corp., Suwon, Korea). The scans were performed in different areas at a scan rate of 0.3–0.5 Hz. The surface scanning data of

the samples that were acquired by a laser beam were converted to topographic images by using XEP and XEI software (Park Systems Corp., Suwon, Korea). Additionally, the microstructure of the nanocapsules was observed using transmission electron microscopy (TEM) (JEM-1010 JEOL, Tokyo, Japan). A drop of menthol-loaded nanocapsule suspension was placed on a copper grid prior to the TEM measurements.

2.6.2. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

FTIR was used to evaluate changes in the molecular chemical structure of the samples. Infrared spectra of the samples were determined by using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer equipped with an attenuated total reflectance (ATR) accessory (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). The measurement was performed using 32 scans with a scanning resolution of 4 cm⁻¹ in the range of 4000 to 400 cm⁻¹. Data were analysed using OMNIC 7.0 software.

2.6.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

The thermal properties of the menthol-loaded nanocapsules were investigated by using a differential scanning calorimeter (Mettler Toledo DSC823°/400, Mettler-Toledo Corporation, Switzerland). Freeze-dried menthol-loaded nanocapsules and their individual excipients (approximately 5 mg) were separately placed in aluminium pans and hermetically sealed. Then, the pans were heated from 25 to 300 °C at a rate of 5 °C/min under nitrogen. An empty pan was used as a reference.

2.6.4. Thermogravimetric analysis (TGA)

The samples (freeze-dried menthol-loaded nanocapsules, blank nanocapsules, a physical mixture of menthol and blank nanocapsules and pure menthol) were additionally subjected to an investigation of the thermal stability using a thermogravimetric analyser with STAR® SW 9.01 software (TGA/SDTA851°, Mettler-Toledo Corporation, Switzerland). Each sample (approximately 15 mg) was placed on a microbalance. The experiment was conducted from 25 to 600 °C, and the heating rate was set to 10 °C/min under nitrogen. The results were calculated as weight loss percentages, and the obtained data were converted to derivative thermogravimetric (DTG) curves.

2.6.5. Evaluation of skin permeation

Percutaneous absorption of menthol-loaded nanocapsules was investigated using the full thickness of porcine ear skin. The skin was freshly obtained from a local slaughterhouse before the scalding procedure. The underlying cartilage and debris were carefully removed from the outer part of the ears using a surgical scalpel (skin thickness of 1.0 ± 0.1 mm). The skin was wrapped in aluminium foil and stored at -20 °C up to a maximum of 4 weeks before use. The excised skin was then mounted on Franz vertical cells with a diffusional area of 1.72 cm² (Crown Glass Company, Inc., NJ, USA) and allowed to equilibrate at 37 °C for 30 min. The receptor fluid was filled with 10 mL of phosphate-buffered saline solution (pH 7.4). The investigated samples (250 µL), including 0.4 mg/mL Nile Red-loaded nanocapsules, Nile Red dissolved in caprylic/capric triglycerides, menthol-loaded nanocapsules and menthol dissolved in caprylic/capric triglycerides, were applied to the skin. At the end of preselected time intervals (5, 15 and 30 min), the upper skin surface was washed with water to remove unabsorbed compounds. Cross sections of the skin were obtained using a Cryotome® Electronic (Thermo Fisher Scientific, Ltd., Loughborough, UK) cryostat to investigate the progressive diffusion of Nile Red. The stratum corneum was carefully separated from viable epidermis with 20 pieces of adhesive tape (Scotch Transparent Tape® 600 (3M Co., Ltd., Bangkok, Thailand). The remaining skin was cut into small pieces and extracted with methanol before HPLC-RI analysis. Additionally, skin localization of the menthol-loaded nanocapsules was performed by incubating the samples for 30 min using Franz diffusion cells. The obtained skin was fixed in a formaldehyde-acetic acid-ethanol (FAA) solution, dehydrated

and coated with platinum before FE-SEM analysis.

2.6.6. Cytotoxicity assay

The in vitro cytotoxicity of the optimized menthol-loaded nanocapsules and blank formulation was evaluated on immortalized human skin keratinocytes (HaCaT cells) and normal human dermal fibroblasts (NHDF cells). The cells were provided by the National Nanotechnology Centre, National Science and Technology Development Agency, Thailand. Cell viability was determined by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [13]. The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 2.5 mM L-glutamine, 1% antibiotics (100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. The cells (100 µL) were separately seeded in 96-well culture plates at a density of 1×10^4 cells/well ($n = 5$). After 24 h, freshly prepared samples with different concentrations ranging from 3.125 to 5000 µg/mL were added for the next 24 h. Cell culture medium without the samples served as a negative control, and 0.5 mM H₂O₂ was used as a positive control. Cell viability was evaluated by adding 25 µL MTT reagent (5 mg/mL) to each well with 100 µL of culture medium, and the cells were incubated for 4 h. The culture medium was discarded, and the optical density of formazan crystals solubilized in 100 µL dimethyl sulfoxide was measured at a wavelength of 570 nm by using a PowerWave XS2 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). The % cell viability was determined by comparing the optical density values of the treated cells with those of the untreated cells [14]. All experiments were conducted in triplicate.

2.6.7. HET-CAM assay

The irritation potential of the menthol-loaded nanocapsules was evaluated by a HET-CAM assay according to the NICEATM-ICCVAM protocol [15]. Nine-day-old fertilized Rhode Ireland Red chicken eggs weighing between 50 and 60 g were incubated in an automatic hen egg incubator (Nanchang Alex Electric Factory, Jiangxi, China) at 37.8 ± 0.3 °C and 58.0 ± 2.0 % relative humidity. The investigated samples (300 µL) included the menthol-loaded nanocapsules, blank nanocapsules and free menthol solution (dissolved in ethanol), and 6 eggs were used per sample. A solution consisting of 0.1 N NaOH in deionized water served as a positive control, and 0.9% NaCl in deionized water served as a negative control. The onset of haemorrhage, vessel lysis and coagulation of the CAM treated with the samples were monitored over a period of 300 s under a stereo microscope (Nikon ZMZ 745T, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) coupled with a Canon

DSLR camera and Image Frame Work software. The irritation potential was evaluated by using semi-quantitative scoring, which was calculated using Eq. (4) as follows:

$$\text{irritation score} = \frac{5 \times (301 - h)}{300} + \frac{7 \times (301 - l)}{300} + \frac{9 \times (301 - c)}{300}, \quad (4)$$

where h , l and c represent haemorrhage, vessel lysis time and coagulation times required for each endpoint as follows: (0–0.9); slight (1.0–4.9); moderate (5.0–8.9) and severe (9.0–21.0) irritants [15].

2.7. Impregnation of the menthol-loaded nanocapsules within nonwoven fabric

The developed nanocapsules were impregnated within nonwoven fabric for further use as a wet wipe. The nonwoven fabric (6×6 cm²) was dipped in a menthol nanocapsule suspension (Kimberly-Clark Asia Pacific Pte, Ltd., Tuas South Avenue, Singapore) three times, and fabric immersed in distilled water was prepared as a control. The samples were deposited onto carbon tape prior to being coated with platinum in a sputter coated with a 30 mA current intensity for 80 s. Microscopic images were obtained using FE-SEM at an accelerating voltage of 1 kV.

2.8. Statistical analysis

The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (S.D.). Experimental design and algorithms for PCA were performed using Statistica 10.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Two-dimensional hierarchical cluster analysis was performed using the ArrayTrack™ HCA-PCA Standalone Package software [16]. A probability level of $p < 0.05$ was considered significantly different.

3. Results and discussion

3.1. Multivariate statistical analysis

All nanocapsule formulations were white and opalescent and had a bluish reflection because of the Tyndall effect caused by light scattered by the particles in a colloidal suspension [14]. The particle size of the prepared nanocapsules varied from 122 to 354 nm with a PDI of 0.148–0.284. The PDI, which indicates the homogeneity of the particles, was not significantly different between the formulations

Table 2
The Box-Behnken matrix used to prepare the menthol-loaded nanocapsule suspensions.

No.	Run order	Actual value (coded value)			Response		
		Menthol (X_1 , mg)	Poly(ϵ -caprolactone) (X_2 , mg)	Poloxamer 188 (X_3 , mg)	Particle size (Y_1 , nm)	Zeta potential (Y_2 , mV)	Entrapment efficiency (Y_3 , %)
1	1	50.00 (−1)	80.00 (0)	250.00 (0)	259.27 $\pm$ 4.24	−30.86 $\pm$ 1.44	95.76 $\pm$ 3.50
2	6	100.00 (0)	125.00 (+1)	125.00 (−1)	269.70 $\pm$ 8.57	−27.17 $\pm$ 1.21	97.67 $\pm$ 1.01
3 ^c	13	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	200.83 $\pm$ 0.12	−23.40 $\pm$ 1.08	96.24 $\pm$ 1.50
4	4	150.00 (+1)	125.00 (+1)	250.00 (0)	354.77 $\pm$ 2.96	−30.07 $\pm$ 2.51	97.67 $\pm$ 2.57
5	5	100.00 (0)	80.00 (−1)	125.00 (−1)	220.57 $\pm$ 0.81	−23.8 $\pm$ 0.76	98.92 $\pm$ 1.08
6 ^c	17	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	215.90 $\pm$ 2.59	−22.47 $\pm$ 0.50	96.39 $\pm$ 0.75
7	11	50.00 (−1)	102.50 (0)	375.00 (+1)	122.00 $\pm$ 1.50	−26.03 $\pm$ 0.70	93.43 $\pm$ 0.84
8 ^c	15	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	199.53 $\pm$ 0.42	−23.09 $\pm$ 0.06	96.53 $\pm$ 1.75
9	3	150.00 (+1)	80.00 (−1)	250.00 (0)	265.87 $\pm$ 1.53	−26.03 $\pm$ 0.81	97.86 $\pm$ 0.68
10	12	150.00 (+1)	102.50 (0)	375.00 (+1)	271.83 $\pm$ 6.31	−25.30 $\pm$ 0.10	97.53 $\pm$ 0.89
11	7	100.00 (0)	80.00 (−1)	375.00 (+)	195.07 $\pm$ 1.02	−25.00 $\pm$ 0.35	94.57 $\pm$ 0.78
12	9	50.00 (−1)	102.50 (0)	125.00 (0)	201.30 $\pm$ 0.53	−24.23 $\pm$ 0.83	95.45 $\pm$ 1.05
13	8	100.00 (0)	125.00 (+1)	375.00 (+1)	205.10 $\pm$ 1.67	−24.40 $\pm$ 0.56	98.99 $\pm$ 1.29
14 ^c	14	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	205.60 $\pm$ 1.04	−23.53 $\pm$ 0.38	97.36 $\pm$ 1.35
15 ^c	16	100.00 (0)	102.50 (0)	250.00 (0)	203.43 $\pm$ 1.68	−23.77 $\pm$ 0.75	96.83 $\pm$ 0.40
16	2	50.00 (−1)	125.00 (+1)	250.00 (0)	199.07 $\pm$ 1.42	−27.70 $\pm$ 0.87	98.87 $\pm$ 1.80
17	10	150.00 (+1)	102.50 (0)	125.00 (−1)	211.87 $\pm$ 1.53	−27.87 $\pm$ 2.15	97.37 $\pm$ 1.86

The data are presented as the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

^c Centre point.

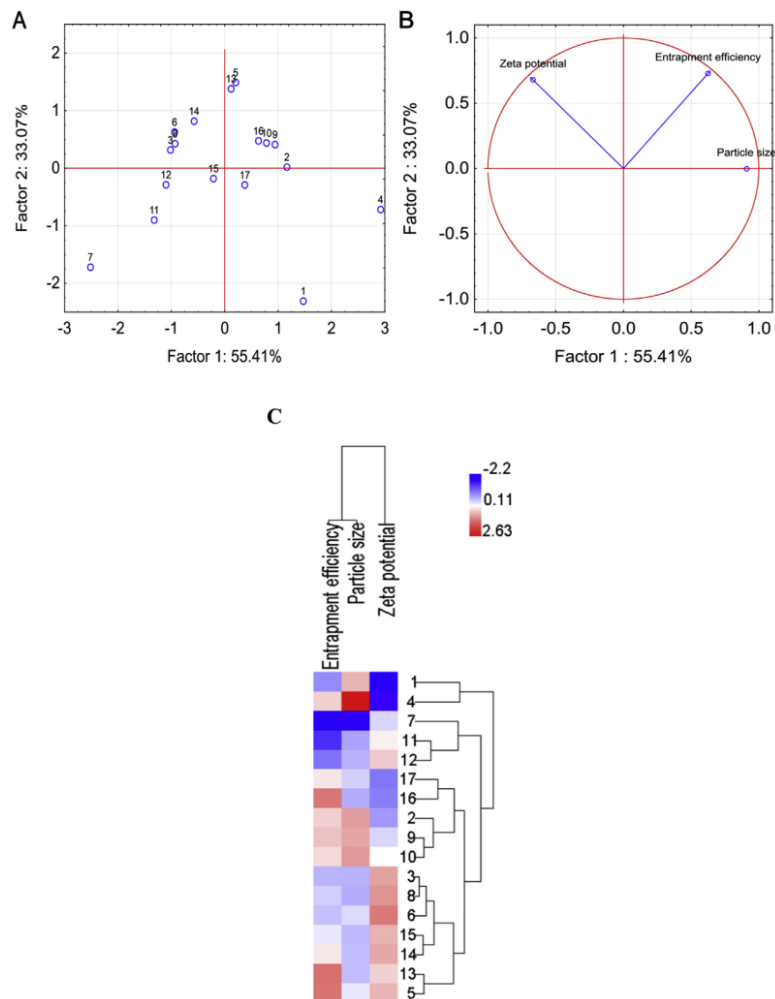


Fig. 1. Multivariate statistical analysis of the responses, including the particle size, zeta potential and entrapment efficiency, of the menthol-loaded nanocapsules according to 17 experiments. (A) PCA plot, (B) factor loading for PCA and (C) two-dimensional HCA combined with a heat map. The numbers in the graph indicate the experimental numbers shown in Table 2.

($p > 0.05$). The zeta potential values were between -22.47 and -30.86 mV, and the entrapment efficiency of menthol in the nanocapsules was between 93.44 and 98.99% (Table 2).

To make the complex analysis feasible and to understand the relationship between the variables in the dataset, PCA and HCA algorithms were applied to the initial responses of the dependent variables. PCA enables the minimization of data dimensionality and provides most of the variance in the investigated responses. The score plot, which is presented in four quadrants according to PCA, is shown in Fig. 1A. This algorithm grouped the correlated variables with a similar characteristic of the nanocapsule properties to a few components. The relationship between the multiple responses of all 17 experimental runs that were obtained by using auto-scaled data explained 88.80% of the total variability. The first and second PCA components explained 57.41 and 31.66% of the data variance, respectively. Additionally, factor loading for PCA was performed, and the results are shown in Fig. 1B. These results demonstrated that the crucial variables had high correlation and

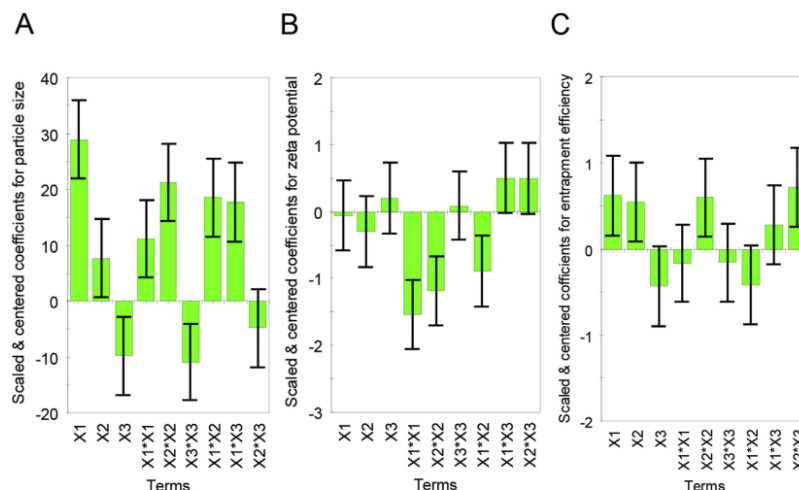
covariance. The entrapment efficiency of menthol in the nanocapsules was positively correlated with the principal component 2 axis, whereas the zeta potential value was negatively correlated with that axis.

The dataset of the menthol-loaded nanocapsules that had similar properties to the responses were emphatically grouped by using HCA combined with a heat map. This technique provided a dendrogram for the in-depth evaluation of the clustering tendency and for tracing the similarities of the initial dataset that was sorted according to Ward's linkage method. As shown in Fig. 1C, the results of the 17 experiments were distinguished into four main clusters. The first cluster was composed of experiments 1 and 4, which showed low values of the responses, and the second cluster was composed of experiments 7, 11 and 12. The third cluster included experiments 2, 9, 10, 16 and 17. The remaining experiments were grouped in the fourth cluster according to the relatively high values of the responses. Therefore, the values of the responses depended on the influence of the investigated factors.

Table 3

ANOVA statistics showing the effect of the formulation parameters on the particle size, zeta potential and entrapment efficiency of the menthol-loaded nanocapsules.

Source	Particle size		Zeta potential		Entrapment efficiency	
	Sum of squares	P-value probability	Sum of squares	P-value probability	Sum of squares	P-value probability
β	38293.1900	< 0.0001 ^c	90.3800	0.0012 ^b	32.7200	0.0137 ^a
Linear term						
X_1	946.1200	0.0331 ^a	1.6400	0.1785 ^{ns}	4.6500	0.0276 ^a
X_2	13041.1200	< 0.0001 ^c	0.0250	0.8578 ^{ns}	5.9800	0.0163 ^a
X_3	1512.5000	0.0123 ^a	0.7000	0.3602 ^{ns}	2.9700	0.0622 ^{ns}
Interaction term						
X_1X_2	5476.0000	0.0004 ^c	12.9600	0.0040 ^b	2.7200	0.0716 ^{ns}
X_1X_3	380.2500	0.1372 ^{ns}	3.8800	0.0549 ^{ns}	8.0600	0.0082 ^b
X_2X_3	4830.2500	0.0006 ^c	4.7700	0.0380 ^a	1.1900	0.2042 ^{ns}
Quadratic term						
X_1^2	7731.0400	0.0006 ^c	22.8100	0.0008 ^c	6.3700	0.0142 ^a
X_2^2	2010.2000	0.0001 ^c	40.0800	0.0001 ^c	0.5500	0.3717 ^{ns}
X_3^2	2610.5700	0.0062 ^b	0.9700	0.2879 ^{ns}	0.5500	0.3719 ^{ns}
Residual	945.0500		5.1300		4.2400	
Lack-of-fit	768.2500	0.0614 ^{ns}	4.1200	0.0671 ^{ns}	3.4500	0.0604 ^{ns}
Pure error	176.8000		1.0100		0.7900	
Corrected total	39238.2400		95.5000		36.9600	
R^2	0.9759		0.9463		0.8854	
Adj- R^2	0.9449		0.8773		0.7380	

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ and ^{ns} nonsignificant.**Fig. 2.** Studentized effect plots showing the impact of the investigated factors on the responses. (A) The particle size and (B) zeta potential of the menthol-loaded nanocapsules, and (C) the entrapment efficiency of menthol within the nanocapsules. The data are presented as the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

3.2. Fitting the model

The experimental data shown in Table 2 were analysed by analysis of variance (ANOVA), and several terms, including the sequential model sum of squares, lack-of-fit tests and model summary statistics, were considered for fitting the models [17]. Quadratic polynomial models provided an adequate representation of the dataset. Table 3 shows the coefficients of the optimized models. The responses, including the particle size, zeta potential and entrapment efficiency of the menthol-loaded nanocapsules, showed model F -values of 31.52, 4.30 and 6.01, respectively. All of the selected models were statistically significant, and the values of the “ p -value probability $> F$ -value” were < 0.0001 , 0.0338 and 0.0137, respectively. Moreover, the lack-of-fit F -value that was utilized to indicate the failure of the model to represent data was not significant ($p > 0.05$). The lack-of-fit F -values for the particle size, zeta potential and entrapment efficiency were 5.79 ($p = 0.0614$), 1.23 ($p = 0.4083$) and 5.85 ($p = 0.0604$), respectively.

These results indicated that the proposed models were suitable for predicting the responses at a 95% confidence level [17,18].

Normal probability plots of the studentized residuals were performed to analyse the normality of the residuals. The plot is based on the fact that if all the estimated effects are noise, they have a normal distribution, and when plotted on a normal cumulative plot, they are plotted as a straight line, and the noise is plotted outside the normal line [19]. According to a cumulative normal probability scale (Fig. S1), the residuals of all experiments were plotted as a straight line, indicating the normal distribution of the residuals [20].

The R^2 value is an additional important term that was used for fitting the models [20], and the results are shown in Fig. S2. A high correlation between the predicted and experimental data was obtained, the R^2 values of the particle size, zeta potential and entrapment efficiency were 0.9759 (Fig. S2A), 0.9463 (Fig. S2B) and 0.8854 (Fig. S2C), respectively. The adjusted R^2 values for the particle size, zeta potential and entrapment efficiency were 0.9449, 0.6498 and 0.7380,

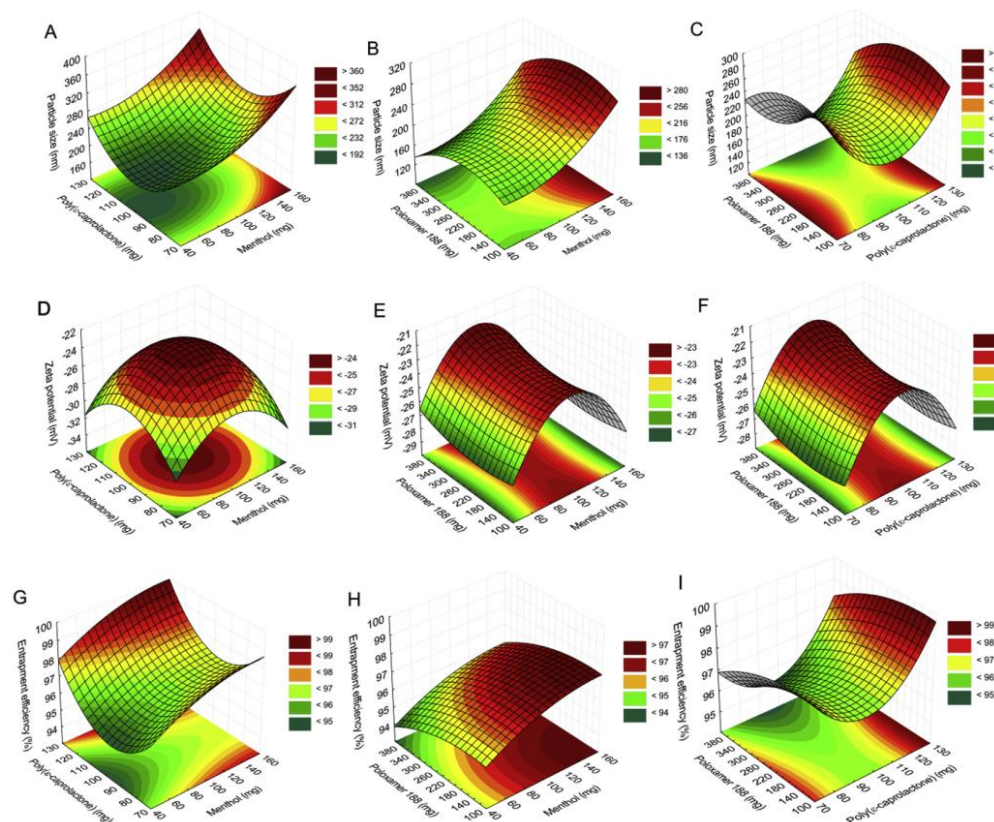


Figure 3. 3D-plots showing the relationship between the independent variables and the corresponding responses. (A–C) The particle size and (D–F) zeta potential of the menthol-loaded nanocapsules, and (G–I) the entrapment efficiency of menthol within the nanocapsules.

Table 4

Physical appearances of the menthol-loaded nanocapsules obtained from the optimized conditions determined immediately after preparation (initial) and at 90 days after preparation.

Physicochemical property	Menthol-loaded nanocapsule suspension	
	Initial	90 days
Appearance	White colour, opaque and bluish	White colour, opaque and bluish
Particle size (nm)	205.11 ± 12.73	207.65 ± 4.16 ^{ns}
Polydispersity index	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.06 ^{ns}
Zeta potential (mV)	−26.61 ± 2.32	−25.61 ± 3.32 ^{ns}
Entrapment efficiency (%)	98.18 ± 1.05	97.21 ± 1.43 ^{ns}
Menthol amount (mg/mL)	4.32 ± 0.34	4.28 ± 0.11 ^{ns}
Odour	Moderate minty odour	Moderate minty odour

The formulations were stored at 25 ± 2 °C and 70 ± 3% relative humidity (saturated sodium chloride in water). The data are presented the mean ± S.D. (n = 3). ^{ns} Nonsignificant difference from the initial value (p > 0.05).

respectively, which were similar to the calculated R^2 values. Moreover, the precision of all proposed models that measured the signal to noise ratio was adequate because the ratios were greater than 4 [17–20]. Overall, these results indicated an adequate fit of the proposed models that were used to navigate the design space. In terms of the coded

factors for the optimal responses, the final equations can be summarized by Eqs. (5)–(7) as follows:

$$\text{particle size (nm)}(Y_1) = 205.99 + 17.30X_1 + 7.12X_2 - 10.93X_3 + 37.00X_1X_2 + 15.64X_1X_3 - 21.67X_2X_3 + 4.42X_1^2 + 211.60X_2^2 - 24.90X_3^2 \quad (5)$$

$$\text{zeta potential (mV)}(Y_2) = -23.25 - 0.45X_1 - 0.06X_2 + 0.30X_3 - 1.80X_1X_2 + 0.99X_1X_3 + 1.09X_2X_3 - 2.33X_1^2 - 3.09X_2^2 + 0.48X_3^2 \quad (6)$$

and

$$\text{entrapment efficiency (\%)}(Y_3) = 99.65 + 0.41X_1 + 1.00X_2 - 0.74X_3 - 0.82X_1X_2 + 0.25X_1X_3 + 3.15X_2X_3 - 0.073X_1^2 + 6.07X_2^2 - 0.36X_3^2 \quad (7)$$

3.3. Response surface analysis

The overview plots show the normalized coefficient values for the investigated responses as side-by-side bar graphs. As shown in Fig. 2A, the contents of menthol ($p < 0.05$) and poly(ϵ -caprolactone) ($p < 0.001$) positively affected the size of the nanocapsules, whereas the weight proportion of poloxamer 188 showed a negative effect ($p < 0.05$). The quadratic terms X_1^2 , X_2^2 and X_3^2 and the interaction

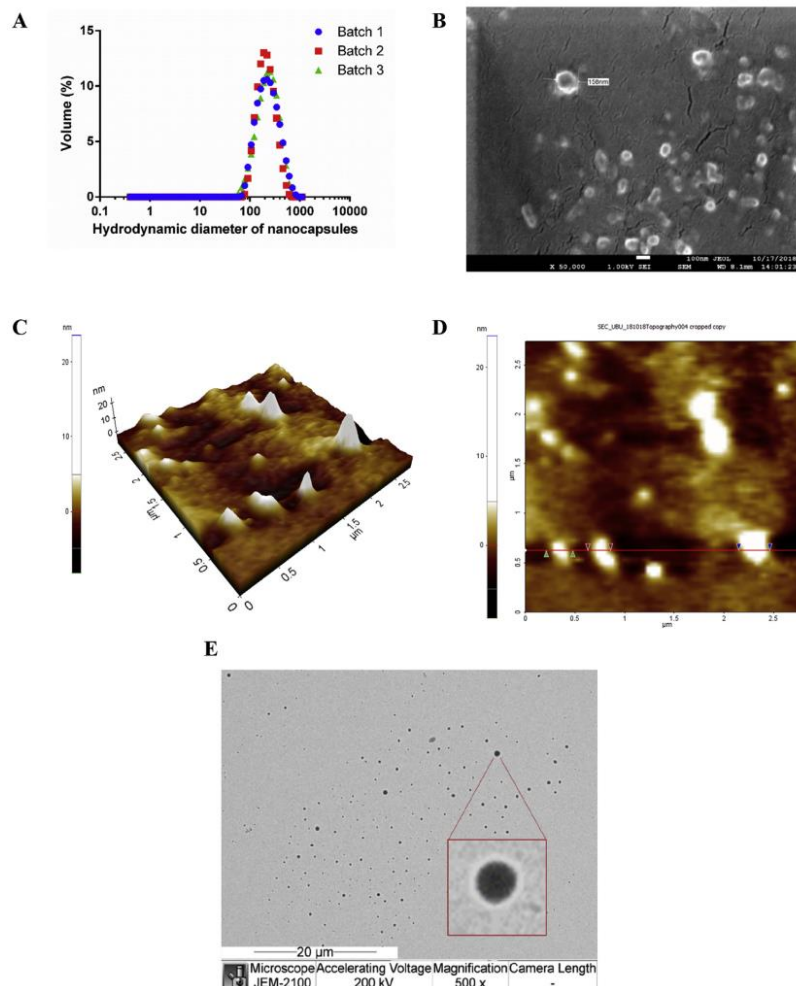


Fig. 4. The physical properties of the menthol-loaded nanocapsules prepared under optimal conditions. (A) Size distribution of the nanocapsules obtained from three different batches. (B) An FE-SEM image, (C-D) AFM images and (E) a TEM image.

terms X_1X_2 and X_1X_3 of the hydrodynamic diameter of the nanocapsules were observed. No interaction of X_2X_3 was found in the present study. Fig. 2B shows the influence of the investigated variables on the zeta potential of the nanocapsules. The quadratic terms X_1^2 and X_2^2 had a negative effect on the zeta potential, and the interaction term was found for X_1X_2 . Regarding the entrapment efficiency (Fig. 2C), the linear terms X_1 and X_2 and the quadratic terms X_2^2 and X_2X_3 showed positive correlations. The other remaining terms for each response were non-significant ($p > 0.05$). Three-dimensional (3D) plots were constructed to analyse the influence of the investigated factors on the responses, and the results are described in the following sections.

3.3.1. Particle size

The particle size was shown to strongly affect the percutaneous absorption of the menthol-loaded nanocapsules. Small nanoparticles penetrate deeper into the skin layer than large nanoparticles [21]. By applying Eq. (5), the effect of the investigated factors on the hydrodynamic diameter of the prepared nanocapsules is shown in 3D plots

(Fig. 3A–C). A greater effect of menthol on the particle size of nanocapsules was clearly observed when its quantity increased above 50 mg. A similar trend was observed for poly(ϵ -caprolactone) quantities between 100 and 125 mg. In contrast, poloxamer 188 showed a positive correlation with the particle size at low concentrations between 100 and 260 mg, while beyond this concentration range, the particle size decreased. This can be explained by the higher amount of menthol in the nanocapsules increasing the particle size. Similar results have been reported by Alkholief [22] for doxorubicin- and piperine-loaded nanoparticles. Additionally, the PDI, which describes the distribution of the particle size (a value between 0 and 1), showed values less than 0.30. This indicated the uniformity of the prepared nanocapsules in suspension.

3.3.2. Zeta potential

Fig. 3D–F shows the response surface of the independent variables on the zeta potential values of the menthol-loaded nanocapsules. The zeta potential values were between -22.47 and -30.86 mV. Among all

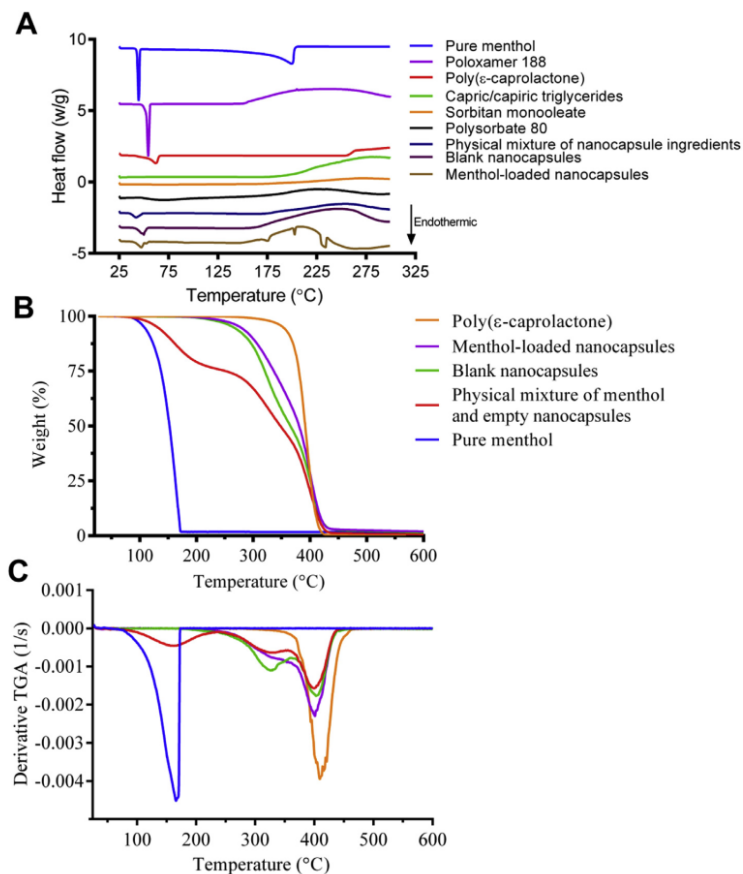


Fig. 5. The thermal properties of the freeze-dried menthol-loaded nanocapsules and their excipients that were used in the formulations. (A) DSC thermograms, (B) TGA thermograms and (C) DTA thermograms.

of the investigated independent variables, only the quadratic terms X_1^2 ($p = 0.0217$) and X_2^2 ($p = 0.0056$) and the interaction term X_1X_2 ($p = 0.0238$) had a significantly negative effect on the zeta potential of the nanocapsules. The range of the zeta potential values of the prepared formulations was consistent with previously reported ranges [23].

3.3.3. Entrapment efficiency

As shown in Fig. 3G–I, the entrapment efficiency of menthol in the nanocapsules depended on the weight proportions of menthol and poly (ϵ -caprolactone). No difference was observed for poloxamer 188 ($p > 0.05$). Notably, a very high entrapment efficiency was observed for all formulations. This is because menthol is a relatively hydrophobic substance [6], facilitating its dispersion into the oily core of the nanocapsules. The obtained results were closely related to previously reported results showing that active compounds with lipophilic characteristics favour a high entrapment efficiency [21].

3.4. Formulation optimization and model verification

A global desirability function was applied to simultaneously obtain the desired features of the nanocapsules. A D value of zero indicates a completely undesirable feature, whereas a D value of 1 indicates a completely desirable feature [17,20]. In this study, the D value was

0.87 with the following most favourable attributes: 150 mg menthol, 84 mg poly(ϵ -caprolactone) and 125 mg poloxamer 188. Under the selected conditions, the experimental values of the particle size, zeta potential and entrapment efficiency of menthol in the nanocapsules were 205.11 ± 12.73 nm, -26.61 ± 2.32 mV and $98.18 \pm 0.15\%$, respectively. The particle size of the developed nanocapsules was in accordance with the suitable size range for topical drug delivery (between 50 and 500 nm) according to previously described methods [7,24]. Overall, the values of the desired nanocapsule properties were consistent with the predicted values calculated from the proposed optimization conditions ($p > 0.05$), leading to satisfactory results obtained with acceptable accuracy.

Generally, a colloidal dispersion should have a zeta potential value that is less than -20 mV or greater than $+20$ mV to provide electrostatic repulsion between the particles [25]. In our study, the developed nanocapsules had a zeta potential value of -26.61 ± 2.32 mV. This negative value was attributed to the $-\text{COOH}$ end group in the poly(ϵ -caprolactone) polymer backbone [26]. The developed nanocapsules were kinetically stable because they exhibited delayed aggregation, and the particle size remained constant at approximately 200 nm for at least 90 days after the nanocapsules were stored at 25 ± 2 °C with $70 \pm 3\%$ relative humidity (Table 4). Thus, the stabilization mechanism of the developed nanocapsules was likely a steric hindrance effect and

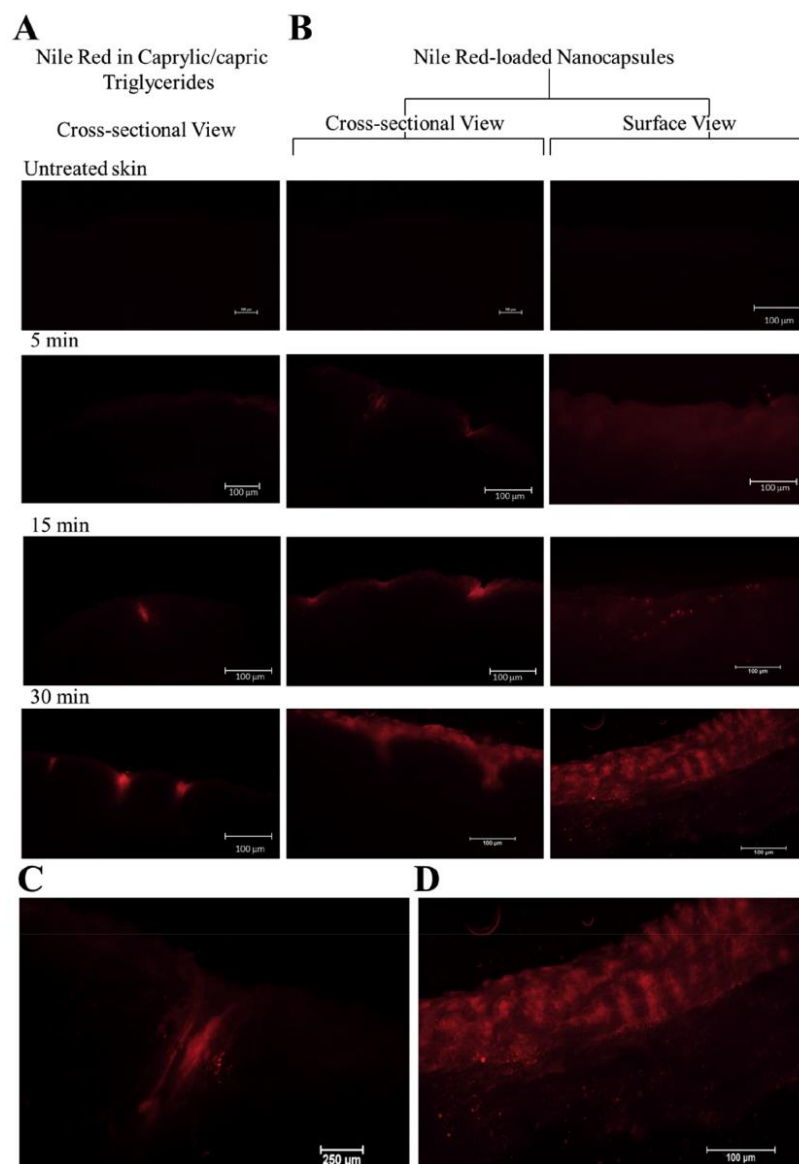


Fig. 6. Fluorescence microscopy images showing the penetration of the developed formulations into porcine ear skin *ex vivo* before and after being subjected to the penetration study. (A) Skin treated with Nile Red solution, (B) skin treated with the Nile Red-loaded nanocapsules, (C) a cross-sectional view of the skin treated with the Nile Red-loaded nanocapsules at 5 min, and (D) a surface view of the skin treated with the Nile Red-loaded nanocapsules at 30 min. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

repulsion between the particles [23,27] combined with a steric hindrance effect of the micelles derived from polysorbate 80 and poloxamer 188. Our results were supported by Heurtault et al. [28], who reported that lipid nanocapsules prepared with other compositions were stable for up to 18 months.

3.5. Physicochemical properties of the menthol-loaded nanocapsules fabricated under the optimized conditions

3.5.1. Nanocapsule morphology

The optimized formulations provided good batch-to-batch reproducibility and yielded milky nanosized particles (Fig. 4A). The menthol-loaded nanocapsules had a mean diameter of 205.11 ± 6.71 nm with a monomodal size distribution ($PDI < 0.3$), whereas the particle size of the blank nanocapsules was slightly smaller

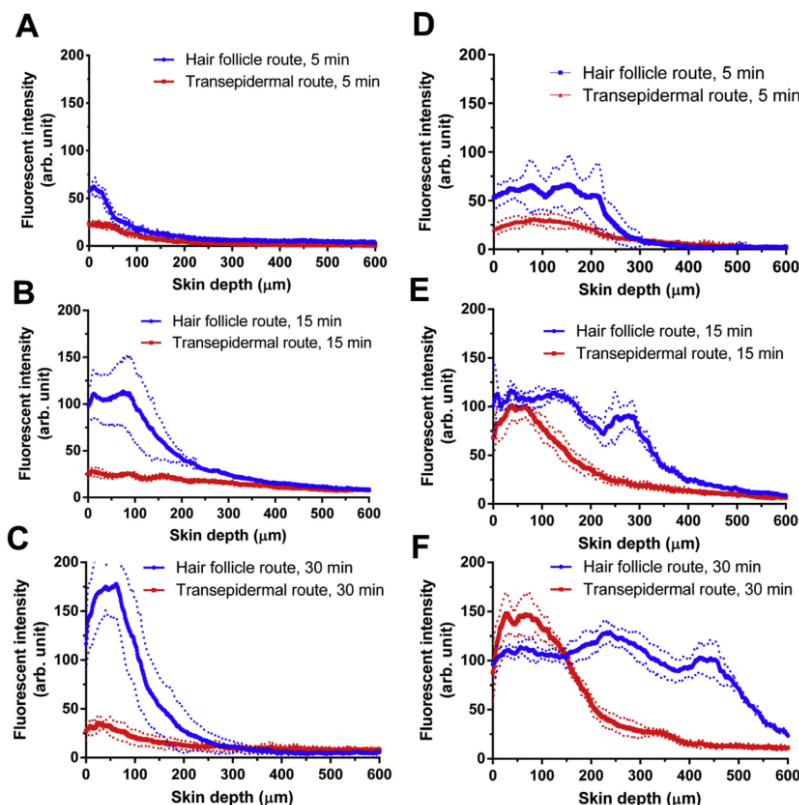


Fig. 7. Fluorescence intensity profiles as a function of the skin depth obtained from the penetration experiments using porcine ear skin at 5, 15 and 30 min. (A–C) Nile Red solubilized in caprylic/capric triglycerides and (D–F) the Nile Red-loaded nanocapsules. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(182.37 ± 7.29 nm, $p < 0.05$). The morphology of the developed nanocapsules was further investigated using advanced imaging techniques (FE-SEM, AFM and TEM). FE-SEM analysis showed that the menthol-loaded nanocapsules were nanoscale particles with spherical shapes (Fig. 4B). Topographic images of the nanocapsules were examined by using AFM to confirm the spherical shape of the particles (Fig. 4C–D). The average size of the developed nanocapsules that was determined by AFM was not different than that determined by the dynamic light scattering method. The nanocapsules had spherical shapes and smooth surfaces. Furthermore, free menthol crystals on the particle surface were observed. This could be explained by the menthol deposited in the core region of the nanocapsules. This core compartment was also surrounded by a flexible membrane consisting of poly(ϵ -caprolactone) and polysorbate 80. Moreover, a TEM image of the menthol-loaded nanocapsules (Fig. 4E) confirmed the reservoir structure of the delivery system by showing a lighter corona of the wall compartment with a darker core region. This was attributed to poly(ϵ -caprolactone) forming a polymer coating around the oily mixture (caprylic/capric triglycerides, sorbitan monooleate and menthol). Therefore, the techniques mentioned above confirmed successful nanocapsule formation.

3.5.2. DSC analysis

The thermal properties of freeze-dried menthol-loaded nanocapsules and their excipients were analysed by DSC, and the results are

shown in Fig. 5A. Pure menthol exhibited a sharp endothermic event at a melting temperature (T_m) of 43.97°C and a boiling temperature (T_b) of 199.47°C , and the thermal transition enthalpy (ΔH) was 81.65 and 390.53 J/g , respectively. Poly(ϵ -caprolactone) exhibited an endothermic peak at a T_m of 61.12°C , whereas poloxamer 188 exhibited a T_m of 53.66°C , a small exothermic peak was observed at $T_b = 205.26^\circ\text{C}$, and the boiling temperature exceeded 300°C . The freeze-dried blank nanocapsules and menthol-loaded nanocapsules showed three endothermic peaks at 47.18, 91.26 and 175.87°C . For the blank nanocapsules, an endothermic peak was observed at 49.76°C . The first endothermic peak that was observed in the menthol-loaded nanocapsules suggested the presence of menthol, poly(ϵ -caprolactone) and poloxamer 188. A physical mixture of menthol and the nanocapsule excipients was prepared for comparison. Two endothermic peaks related to the surfactant and coating polymer were observed at approximately 51.15 and 58.19°C . The fact that the blank nanocapsules had a higher melting temperature than menthol suggested that the encapsulated compound had a better thermal stability than the unencapsulated compound. In contrast, a menthol endothermic peak was not observed for the menthol-loaded nanocapsules. These results suggest that menthol was either dissolved in caprylic/capric triglycerides in the core compartment of the nanocapsules or transformed from a crystalline state to a molecular state in system. A slight decrease in the melting temperature of the menthol-loaded nanocapsules by shifting to a lower temperature was attributed to the nanoscale size of the lipid

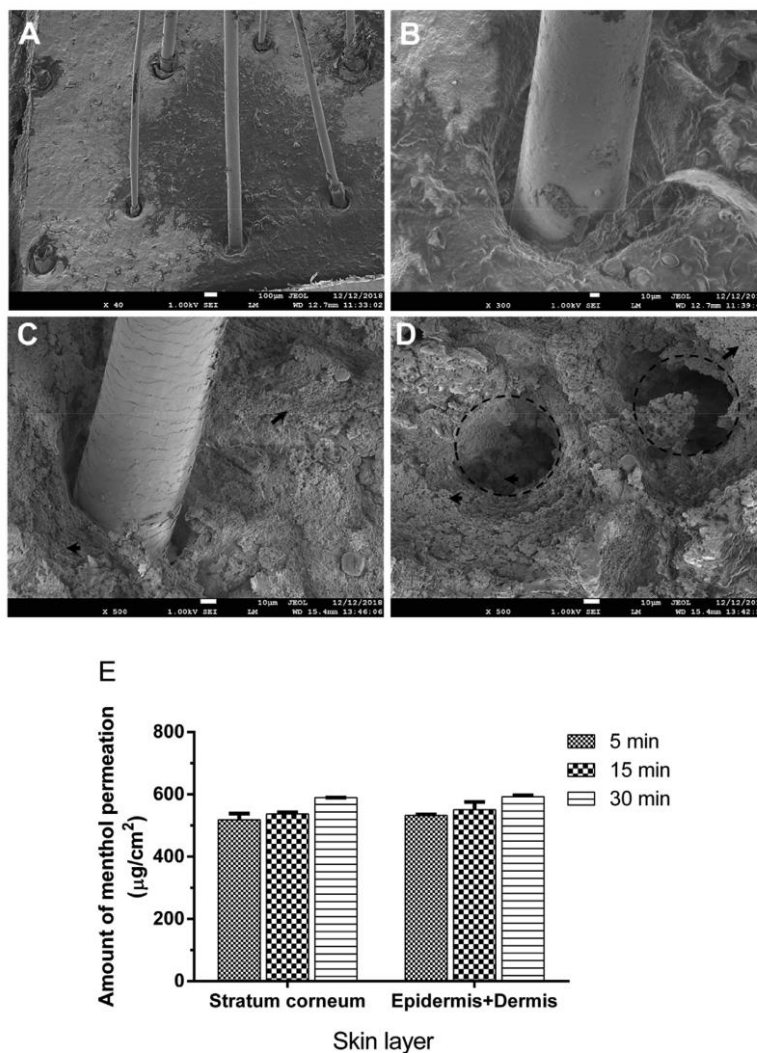


Fig. 8. FE-SEM images showing the localization of the menthol-loaded nanocapsules after 30 min of incubation on porcine ear skin using Franz diffusion cells. (A) Untreated skin (40 $\times$ magnification), (B) untreated skin (300 $\times$ magnification), and (C and D) skin treated with the menthol-loaded nanocapsules (500 $\times$ magnification). The black arrows indicate the nanocapsules, and the black circles indicate open hair follicles. (E) The effect of the nanocapsules on the skin permeation of menthol into porcine ear skin determined at 5, 15 and 30 min.

nanocapsules.

3.5.3. TGA analysis

The thermal stability and temperature variation of the freeze-dried menthol-loaded nanocapsules were characterized by TGA. This technique provides information on the gradual weight loss of the samples related to volatilization and/or thermal oxidation degradation. As shown in Fig. 5B, pure menthol exhibited rapid weight loss beginning at 76 $^{\circ}\text{C}$ that continued to rapidly accelerate from 81 to 171 $^{\circ}\text{C}$, with drastic mass loss of over 99% because of its highly volatile characteristic and/or degradation. These results were consistent with a previous report showing the same thermogram pattern of menthol with a susceptibility to volatility [3]. Poly(ϵ -caprolactone) showed significant

mass loss between 303 and 455 $^{\circ}\text{C}$, corresponding to thermo-oxidative degradation [29]. Mass loss of the physical mixture of menthol and the blank nanocapsules began at 98 $^{\circ}\text{C}$ and ended at 230 $^{\circ}\text{C}$, which was attributed to the loss of menthol. The breakdown of the blank nanocapsule shell in the solid mixture was observed at 238 $^{\circ}\text{C}$. The TGA thermograms of the blank and menthol-loaded nanocapsules exhibited a three-step weight loss. The TGA curve of the menthol-loaded nanocapsules was obviously shifted to a higher temperature, indicating that the nanocapsules improve the thermostability of menthol. Decomposition of the nanocapsule shell was observed at nearly 315 $^{\circ}\text{C}$, whereas the additional weight loss in the range of 315–353 $^{\circ}\text{C}$ was associated with the rapid loss of menthol. The shift in the temperature proved the encapsulation of menthol inside the core compartment of the

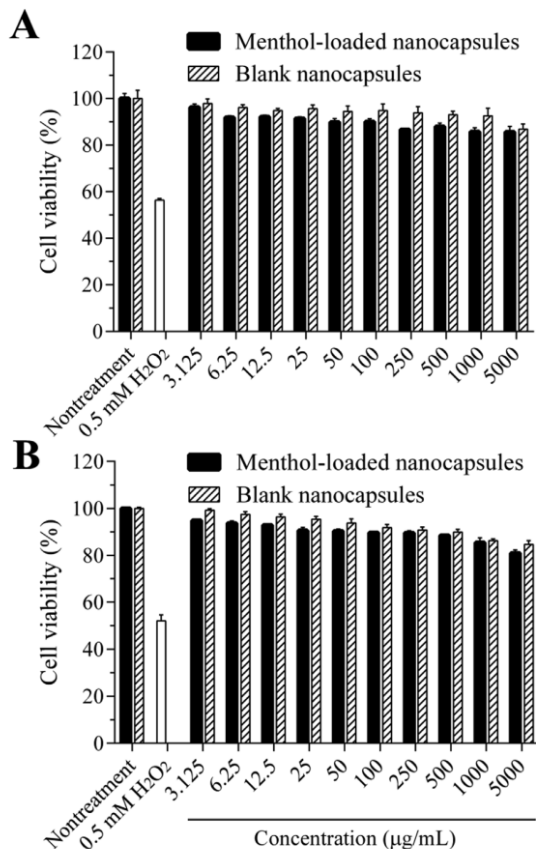


Fig. 9. The cytotoxicity of the menthol-loaded nanocapsules and blank nanocapsules in two types of human skin cells: (A) HaCaT cells and (B) NHDF cells.

nanocapsules.

DTG curves were constructed to distinguish between the stages of mass loss of the corresponding samples (Fig. 5C). Mass loss of pure menthol and the physical mixture of menthol and the blank nanocapsules occurred in the 50–200 °C temperature range. Poly(ϵ -caprolactone) showed degradation temperatures (T_d) at 150 and 400 °C. The degradation of this polymer has been previously reported by another research group through unzipping depolymerization to produce ϵ -caprolactone and an elimination reaction to produce carbon dioxide, carbon monoxide and 5-hexenoic acid [30]. An additional weight loss in the range from 280 to 400 °C was attributed to the T_d of the encapsulated menthol. Similar observations have been reported by Pinto et al. [29], who showed that poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules have a significant protective effect against *Lippia sidoides* essential oil volatilization. Thus, these results clearly confirmed that compared with free menthol, menthol with the developed nanocapsules had improved thermal stability.

3.5.4. FTIR analysis

The negative zeta potential values of the developed nanocapsules prompted us to examine their chemical bond composition. The chemical bonds of the freeze-dried menthol-loaded nanocapsules were analysed by using ATR-FTIR (Fig. S3). To distinguish between the samples, the spectra were shifted on the y-axis. Pure menthol showed

characteristic absorption bands at 3240 cm^{-1} (O–H stretching vibration), 2869–2954 cm^{-1} (C–H stretching vibration), 1025–1044 cm^{-1} (C–O stretching vibration) and 1364 cm^{-1} (isopropyl group) and at 986, 920, 878, 843 and 669 cm^{-1} (ring skeleton vibration) [3]. Poly(ϵ -caprolactone), which is an aliphatic polyester polymer, exhibited absorption bands at 2947 cm^{-1} (sp^3 asymmetric C–H stretching), 2866 cm^{-1} (sp^3 symmetric C–H stretching), 1731 cm^{-1} (C=O stretching vibration of the carbonyl group), 1468 cm^{-1} (CH_2 bending vibration), 1365 cm^{-1} (CH_3 bending vibration), 1294 cm^{-1} (C–O and C–C stretching in the crystalline phase), 1240 cm^{-1} (C–O–C asymmetric stretching), 1170 cm^{-1} (C–O–C symmetric stretching) and 730 cm^{-1} (C–C backbone rocking) (Fig. S3) [23,31]. The spectrum of poloxamer 188 showed typical absorption bands at 3600–3400 cm^{-1} (O–H stretching vibration), 2890 cm^{-1} (C–H sp^3 stretching) and 1080 cm^{-1} (C–O stretching vibration). The FTIR spectra of the menthol-loaded nanocapsules showed the presence of those excipients. The bands of the menthol-loaded nanocapsules at 2955, 2922, 2870, 987, 920, 878, 843 and 669 cm^{-1} disappeared, suggesting that menthol was encapsulated as a molecular dispersion inside the cavity of the nanocapsules. Therefore, it was concluded that there was no significant change in the functional groups of menthol and the polymer in the formulation. Interestingly, a new absorption band at 1743 cm^{-1} , which was attributed to the stretching vibration of the C=O group from poly(ϵ -caprolactone), was observed. This could be the reason why both blank and menthol-loaded nanocapsules prepared from non-ionic surfactants exhibited negative charges.

3.5.5. Skin penetration profile

The fast skin absorption property of the developed nanocapsules and their transport pathway was analysed using porcine ear skin. We used this skin because it is histologically similar to human skin. According to previous reports, the full thickness of porcine ear skin is 17–28 μm for the stratum corneum, 60–85 μm for the viable epidermis (151–176 μm including the rete ridges) and 1.44–2.21 mm for the residual skin, including the dermis, hypodermis and perichondrium. Additionally, 11–25 hairs/ cm^2 skin area were observed with orifices of the porcine infundibula that were approximately 200 μm . The hair extended into the dermis at a depth of 0.96–1.38 mm in the skin [32].

Fig. 6A–D qualitatively shows the progressive penetration of Nile Red prepared with different formulations through the skin (a thickness of approximately 1000 μm). Very weak autofluorescence was observed in the untreated skin, suggesting a lack of fluorescent signal overlap. The *trans*-epidermal route, including transcellular and intercellular mechanisms, was not observed after the application of the non-encapsulated formulation (Fig. 6A). Free Nile Red solution was observed in only the superficial skin layer at 30 min after treatment. A higher fluorescence intensity was observed in the vital epidermis, and the dermis was observed in the hair infundibulum at 30 min compared with 15 min. Thus, hair follicles may act as the major route for the penetration of free Nile Red solution. In contrast, compared with the non-encapsulated compounds, the Nile Red-loaded nanocapsules showed a higher fluorescence intensity. Deeper penetration to the lower skin layers was observed at 30 min (Fig. 6B). This can be explained by either the nanocapsules fusing with the lipid compartment of the stratum corneum or only Nile Red diffusing into the deeper skin layer, while the nanocapsules retain their structure. Thus, the findings of the present study prove the superiority of the nanocapsules in transporting menthol to the viable epidermis via *trans*-epidermal and transductal (hair follicle) routes. The results of this study were consistent with a previous study [33] showing that nanoparticles with smaller sizes favour active ingredient permeation into the skin.

The relative fluorescence intensity of Nile Red permeated through the whole porcine ear skin (600 μm width) was quantified. As expected, the Nile Red intensity in the hair follicles and the *trans*-epidermal route was negligible (Fig. 7A–C). In contrast, Nile Red-loaded nanocapsules showed a higher relative fluorescence intensity (Fig. 7D–F). The Nile

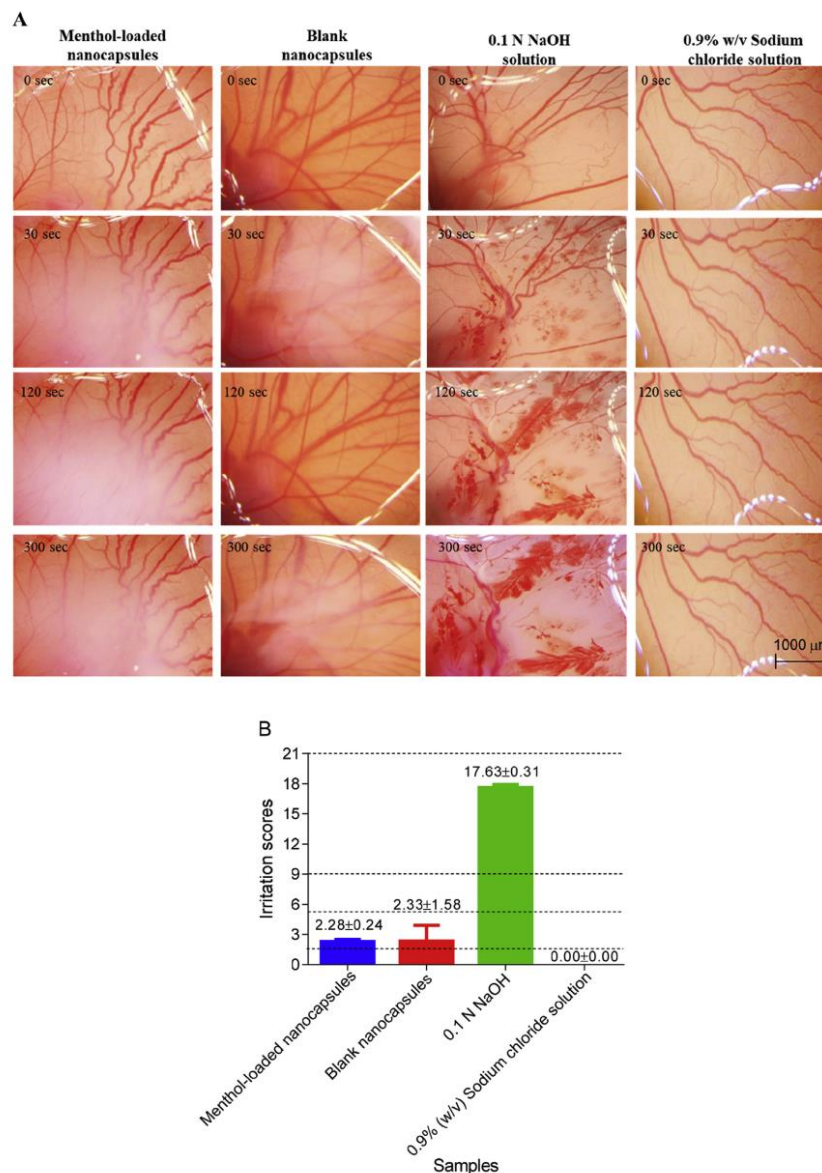


Fig. 10. The irritation potential of the menthol-loaded nanocapsules. (A) Microscopic images obtained by stereomicroscopy showing changes in the signs of irritation in a chorioallantoic membrane over a period of 300 s and (B) the irritation scores. The data are presented as the mean $\pm$ S.D. (n = 6).

Red-loaded nanocapsules mainly diffused via the *trans*-follicular pathway. Similarly, Kurtz and Lawson [34] have reported that lipophilic Nile Red predominately penetrates the skin via the transductal route. The fluorescence intensity was time-dependent, and the fluorescence intensity increased as the time increased. After 30 min of penetration, the fluorescent dye in the skin was predominantly observed throughout the lipid domain of the stratum corneum intercorneocyte, suggesting that the transport pathway of the active ingredient manipulated by the nanocapsules also involves the *trans*-epidermal pathway.

3.5.6. Localization of the menthol-loaded nanocapsules on the porcine ear skin surface

FE-SEM was carried out to demonstrate the detailed localization of the developed nanocapsules on the skin. The fixed skin was treated with the nanocapsules for 30 min and observed by FE-SEM. Untreated skin was used as a control. The results shown in Fig. 8A–B demonstrate the normal integrity of the untreated skin. The nanocapsules were observed on the skin surface, and some particles accumulated in the infundibulum of the hair follicles (Fig. 8C). The nanocapsules also invaded open hair follicle ducts (Fig. 8D). Because the large diameter of

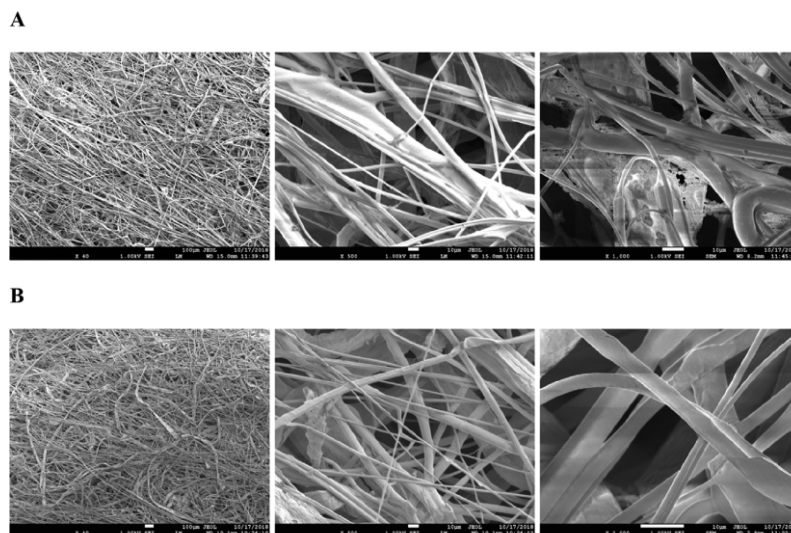


Fig. 11. FE-SEM images with different magnifications showing the adhesion of the menthol-loaded nanocapsules onto nonwoven fabrics. (A) Fabrics impregnated with the developed nanocapsules and (B) untreated fabrics.

hair orifices (approximately 100–200 μm) was between 500- and 1000-fold larger than the particle size of the developed formulation ($205.11 \pm 6.71 \text{ nm}$), this phenomenon facilitated the substantial penetration of the encapsulated substance into the viable epidermis and dermis. Therefore, the encapsulation of menthol in the nanocapsules promotes the efficient delivery of menthol for the interaction with TRPM8 in the lower skin layers [1,2,4,5].

To confirm successful skin delivery, a tape stripping technique with 20 sequential pieces of tape was conducted to separate the menthol in the stratum corneum from the remaining skin (the viable epidermis and dermis). As shown in Fig. 8E, menthol penetrated the deeper skin layers, and the penetration of menthol increased as time increased. This could be attributed to the fact that some of the nanocapsules are confined within hair follicles, contributing to the diffusion of the active ingredient into the surrounding skin tissue. Thus, hair follicles may play an important role in the permeation of the nanocapsules to the target site in the skin. The nanocapsules may facilitate the entry of menthol across the stratum corneum, and menthol may then diffuse to the underlying viable epidermal layer. The results of this study supported the findings demonstrated by several researchers, who showed that nanoparticles smaller than 500 nm exhibit a propensity to cross the stratum corneum [35].

3.5.7. Cytotoxicity study

Safety plays an important role in the development of new products [13,36]. Dose-dependent cytotoxicity of the developed menthol-loaded nanocapsules and blank nanocapsules was analysed in HaCaT and NHDF cells. Fig. 9 shows the cell viability after 24 h of exposure to different concentrations of the investigated formulations. The cell viability results were similar between HaCaT and NHDF cells. Both types of nanocapsules resulted in a dose-dependent reduction in cell viability. Compared to untreated cell viability, cell viability was greater than 85% across a wide range of investigated concentrations (3.125–5000 $\mu\text{g/mL}$). These results were also above the 70% cut-off for cytotoxicity [ISO 10993-5: 2009 (Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity)]. Inverted microscopy analysis did not indicate cell aggregation or changes in the cellular morphology at the investigated concentrations. Cells in the positive

control group were treated with 0.5 mM H_2O_2 and the viability of HaCaT and NHDF cells in this group was 56.39 ± 0.70 and $52.01 \pm 2.61\%$, respectively. These results indicated that the prepared nanocapsules are less toxic than H_2O_2 and can be used for skin delivery. Similarly, in a previous study, we observed that the nanocapsules are biocompatible with HepG2 cells [36].

3.5.8. Irritation potential study

HET-CAM, which is a non-animal model, was used to investigate the biocompatibility of the nanocapsules. HET-CAM was used because the chorioallantoic membrane of the 9-day-old fertilized eggs has complete tissues (arteries, veins and capillaries) for investigating injuries induced by chemicals. Furthermore, this method was used because it is a rapid, sensitive and inexpensive alternative to experiments in animals or humans [15,37]. As shown in Fig. 10A and B, the blank and menthol-loaded nanocapsules had irritation scores of 2.28 ± 0.24 and 2.33 ± 1.58 , respectively. No irritation was observed when treating the CAM with sodium chloride solution (the irritation score was zero). In contrast, an irritation score of 17.61 ± 0.31 and 3.92 ± 0.75 was observed in the group treated with 0.1 N NaOH solution and free menthol, respectively. Clearly, a menthol-loaded nanocapsule suspension with an irritation score less than 9 suggests that it is well-tolerated and safe for topical use [15,37].

3.6. Fabric containing the menthol-loaded nanocapsules

Surface functionalization of a nonwoven fabric with the menthol-loaded nanocapsules was analysed by FE-SEM. The developed wet wipe product had a white colour, mild minty odour and a rapid cooling effect when in contact with the skin. Fig. 11 shows the adhesion of the nanocapsules on the fibres. Evidently, the distribution of the impregnated nanocapsules was observed with good adhesion to the surface of the fabric. These results confirmed that the developed nanocapsules can be successfully impregnated within the nonwoven fabric for further use as a fast cooling wet wipe.

4. Conclusions

This study demonstrated the feasibility of preparing stable menthol-loaded lipid-core nanocapsules with satisfactory properties. The resultant formulation with a small particle size (205.11 ± 6.71 nm) and high entrapment efficiency ($98.18 \pm 1.05\%$) was successfully formulated by a nanoprecipitation method combined with a Box-Behnken design. The optimal formulation consisted of 150 mg menthol, 84 mg poly(ϵ -caprolactone) and 125 mg poloxamer 188. Menthol can be converted from a crystalline to colloidal suspension. These nanocapsules also facilitate the rapid penetration of the loaded substance into the viable epidermal layer by the hair follicle and *trans*-epidermal routes. The developed menthol-loaded nanocapsules are non-irritating according to the HET-CAM study and less toxic to HaCaT and NHDF cells. These results indicate that the material is biocompatible. Therefore, the formulations obtained by a combination of experimental parameters improve the use of menthol as a coolant by impregnating the resultant nanocapsules within a nonwoven fabric for further cosmetic textile applications.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgement

This study was supported by a grant from Ubon Ratchathani University, Thailand (project 05000008/050000080001) and the National Research Council of Thailand (project 16340).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101138>.

References

- [1] M. Naziroğlu, W. Blum, K. Józsvay, B. Çiğ, T. Henzi, Z. Oláh, C. Vizler, B. Schwaller, L. Pecze, Menthol evokes Ca^{2+} signals and induces oxidative stress independently of the presence of TRPM8 (menthol) receptor in cancer cells, *Redox Biol.* 14 (2018) 439–449.
- [2] J.A. Farco, O. Grundmann, Menthol-pharmacology of an important naturally medicinal “cool”, *Mini Rev. Med. Chem.* 13 (2013) 124–131.
- [3] Z.I. Yıldız, A. Celebioğlu, M.E. Kilic, E. Durgun, T. Uyar, Menthol/cyclodextrin inclusion complex nanofibers: enhanced water-solubility and high-temperature stability of menthol, *J. Food Eng.* 224 (2018) 27–36.
- [4] G.P. Kamatou, I. Vermaak, A.M. Viljoen, B.M. Lawrence, Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties, *Phytochemistry* 96 (2013) 15–25.
- [5] T. Patel, Y. Ishiiji, G. Yosipovitch, Menthol: a refreshing look at this ancient compound, *J. Am. Acad. Dermatol.* 57 (2007) 873–878.
- [6] S. Phunpee, S. Saesoo, I. Sramala, S. Jarussophon, W. Sajomsang, S. Puttipitakhajorn, A. Soottitantawat, U.R. Ruktanonchai, A comparison of eugenol and menthol on encapsulation characteristics with water-soluble quaternized β -cyclodextrin grafted chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 84 (2016) 472–480.
- [7] A. Júlio, S.A. Costa Lima, S. Reis, Tã Santos de Almeida, P. Fonte, Development of ionic liquid-polymer nanoparticle hybrid systems for delivery of poorly soluble drugs, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.030>.
- [8] M.D. Bianchin, S.M. Borowicz, G.D.R.M. Machado, B. Pippi, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, A.M. Fuentefria, I.C. Küllamp-Guerreiro, Lipid core nanoparticles as a broad strategy to reverse fluconazole resistance in multiple *Candida* species, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 175 (2019) 523–529.
- [9] L.M. Ferreira, V.F. Cervi, M.H.M. Sari, A.V. Barbieri, A.P. Ramos, P.M. Copetti, G.F. de Brum, K. Nascimento, J.M. Nadal, P.V. Farago, M.R. Sagrillo, C.W. Nogueira, L. Cruz, Diphenyl diselenide loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: development and cytotoxic evaluation, *Mat. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 91 (2018) 1–9.
- [10] C.E. Mora-Huertas, O. Garrigues, H. Fessi, A. Elaissari, Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: comparative study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80 (2012) 235–239.
- [11] G. Granata, S. Stracquadanio, M. Leonardi, E. Napoli, G.M.L. Consoli, V. Cafiso, S. Stefani, C. Geraci, Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation, *Food Chem.* 269 (2018) 286–292.
- [12] K.A. Shaikh, S.D. Patil, Sensitive and selective method for the analysis of menthol from pharmaceutical products by RP-HPLC with refractive index detector, *J. Pharm. BioAllied Sci.* 2 (2010) 360–364.
- [13] N. Boonmak, J. Niyompanich, P. Chuysinuan, P. Niamlang, P. Ekabutr, P. Supaphol, Preparation of mangosteen extract-loaded poly (vinyl acetate) for use as an antibacterial spray-on dressing, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 46 (2018) 322–329.
- [14] P.S. Kumar, M.V. Jeyalatha, J. Malathi, S. Ignacimuthu, Anticancer effects of one-pot synthesized biogenic gold nanoparticles (Mc-AuNps) against laryngeal carcinoma, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 44 (2018) 118–128.
- [15] NICEATM-ICCVAM, In vitro test methods for detecting ocular corrosives and severe irritants, <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/ocular/in-vitro/index.html>, (2015), Accessed date: 1 October 2018.
- [16] J. Xu, R. Kelly, H. Fang, W. Tong, ArrayTrack: a free FDA bioinformatics tool to support emerging biomedical research-an update, *Hum. Genom.* 4 (2010) 428.
- [17] B. Yinggam, K. Tantrakarnroj, T. Tawetaw, W. Rungsevivijitpapa, N. Supaka, A.H. Brantner, Modeling and stability study of the anthocyanin-rich maoberry fruit extract in the fast-dissolving spray-dried microparticles, *Powder Technol.* 325 (2018) 261–270.
- [18] S. Pimentel-Moral, M.C. Teixeira, A.R. Fernandes, I. Borrás-Linares, D. Arráez-Román, A. Martínez-Férez, A. Segura-Carretero, E.B. Souto, Polyphenols-enriched Hibiscus sabdariffa extract-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): optimization by multi-response surface methodology, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 49 (2019) 660–667.
- [19] B. Yinggam, A.H. Brantner, Factorial design of essential oil extraction from *Fragaria fragrans* Roxb. flowers and evaluation of its biological activities for perfumery and cosmetic applications, *Int. J. Cosmet. Sci.* 37 (2015) 272–281.
- [20] B. Yinggam, A. Brantner, Boosting the essential oil yield from the rhizomes of cassumunar ginger by an eco-friendly solvent-free microwave extraction combined with central composite design, *J. Essent. Oil Res.* 30 (2018) 409–420.
- [21] M. Wolf, F. Reiter, T. Heuser, H. Kotisch, V. Klang, C. Valenta, Monoacyl-phosphatidylcholine based drug delivery systems for lipophilic drugs: nanostructured lipid carriers vs. nano-sized emulsions, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 46 (2018) 490–497.
- [22] M. Alkhollef, Optimization of lecithin-chitosan nanoparticles for simultaneous encapsulation of doxorubicin and piperine, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 52 (2019) 204–214.
- [23] W. Badri, A. El Asbahani, K. Miladi, A. Baraket, G. Agusti, Q.A. Nazari, A. Errachid, H. Fessi, A. Elaissari, Co-delivery poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella sativa* L. essential oil: inflammation topical enhanced treatment, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 46 (2018) 234–242.
- [24] P. Carter, B. Narasimhan, Q. Wang, Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases, *Int. J. Pharm.* 555 (2019) 49–62.
- [25] F. Ghiasi, M. Hadi Eskandari, M.T. Golmakani, S. Mohammad Hashem Hosseini, Development of highly stablecolloidal dispersions of gelled oil nanoparticles loaded with cuminaldehyde, *J. Colloid Interface Sci.* 541 (2019) 65–74.
- [26] M.L. Zambrano-Zaragoza, E. Mercado-Silva, E. Gutiérrez-Cortez, E. Castaño-Tostado, D. Quintanar-Guerrero, Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications, *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)* 44 (2011) 1362–1368.
- [27] P.D. Menezes, L.A. Frank, B.D. Lima, Y.M. de Carvalho, M.R. Serafini, L.J. Quintans-Júnior, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, A.A. Araújo, Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery, *Int. J. Nanomed.* 12 (2017) 2069–2079.
- [28] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, J.P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm. Res. (N. Y.)* 19 (2002) 875–880.
- [29] N. de O.F. Pinto, T.H.S. Rodrigues, R. de C.A. Pereira, L.M.A. e Silva, C.A. Cáceres, H.M.C. de Azeredo, C.R. Muniz, E.S. de Brito, K.M. Canuto, Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham, *Ind. Crops Prod.* 86 (2016) 279–288.
- [30] O. Persenaire, M. Alexandre, P. Degee, P.H. Dubois, Mechanisms and kinetics of thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone), *Biomacromolecules* 2 (2001) 288–294.
- [31] V.D. Dev, T. Hemamalini, Porous electrospun starch rich polycaprolactone blend nanofibers for severe hemorrhage, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 1276–1283.
- [32] U. Jacobi, M. Kaiser, R. Toll, S. Mangelsdorf, H. Audring, N. Otberg, W. Sterry, J. Lademann, Porcine ear skin: an in vitro model for human skin, *Skin Res. Technol.* 13 (2007) 19–24.
- [33] X. Liu, B. Shen, C. Shen, R. Zhong, X. Wang, H. Yuan, Nanoparticle-loaded gels for topical delivery of nitrofurazone: effect of particle size on skin permeation and retention, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 45 (2018) 367–372.
- [34] S.L. Kurtz, L.B. Lawson, Determination of permeation pathways of hydrophilic or hydrophobic dyes through the mammary papilla, *Int. J. Pharm.* 545 (2018) 10–18.
- [35] Z. Chen, Y. Lv, J. Qi, Q. Zhu, Y. Lu, W. Wu, Overcoming or circumventing the stratum corneum barrier for efficient transcutaneous immunization, *Drug Discov. Today* 23 (2018) 181–186.
- [36] P. Stupar, V. Pavlović, J. Nunić, S. Cundrić, M. Filipić, M. Stevanović, Development of lyophilized spherical particles of poly(epsilon-caprolactone) and examination of their morphology, cytocompatibility and influence on the formation of reactive oxygen species, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 24 (2014) 191–197.
- [37] D. Pandey, S. Angure, D. Jain, G. Pandey, S. Jain, P. Kesharwani, Entrapment of drug-sorbate complex in submicron emulsion: a potential approach to improve antimicrobial activity in bacterial corneal infection, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 49 (2019) 455–462.

รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ

Kanoknitthiran V, Prasitpuriprecha C, Wandee Rungseevijitprapa W, **Yingngam B**. Evaluation of irritation potential of spray containing menthol-loaded nanocapsules using the hen's egg test chorioallantoic membrane assay. In: Thinvongpituk C editor. The 13th National Conference of Ubon Ratchathani University: Research and Innovations to Strengthen the New Economy; 2019 Jul 11-12; Ubon Ratchathani, Thailand. Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani University Press; 2019. p.150-155.

ประมวลบทความ (Proceedings)
ในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 13
ผลงานนำเสนอแบบโปสเตอร์

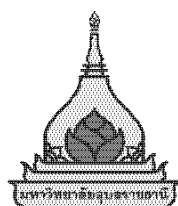
RESEARCH and INNOVATIONS

TO STRENGTHEN THE NEW ECONOMY

การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อสร้างความเข้มแข็งของเศรษฐกิจกระแสใหม่

11-12 กรกฎาคม 2562
ณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี





ประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 13
การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อสร้างความเข้มแข็งของเศรษฐกิจกระแสใหม่
(Research and Innovations to Strengthen the New Economy)

วันที่ 11-12 กรกฎาคม 2562
ณ อาคารเทพรัตนสิริปภา มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

การประเมินศักยภาพระคายเคืองของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล โดยใช้วิธีทดสอบในเยื่อไขไก่ฟ้า

วิรวานันท์ กนกนิตฺธิรัตน์¹ ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปริชา² วันดี รังสิวิจิตรประภา³ และ บัญชา ยิ่งงาม^{3*}

¹นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสาธารณสุขศาสตร์แห่งเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ²กลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

³กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

*E-mail : bancha.y@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

เมนทอลมีคุณสมบัติเพิ่มความรู้สึกเย็นให้แก่ผิวหนังผ่านกลไกกระตุ้นตัวรับศักย์ไอออนชั่วคราวของช่องทาง metastatin ชนิดย่อยที่ 8 (transient receptor potential ion channel metastatin subtype 8) ที่ปลายประสาทรับสัมผัสบริเวณผิวหนัง กำพำรที่มีชีวิต ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลที่ความเข้มข้นสูงหากสัมผัสกับผิวหนังโดยตรงอาจทำให้เกิดการระคายเคืองได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพระคายเคืองของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลโดยทดสอบในเยื่อไขไก่ฟ้า กำหนดให้เยื่อไขไก่ฟ้าที่ทดสอบด้วยสารละลายโซดาไฟความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 นอร์มอล และสารละลายน้ำเกลือปกติ เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกและเชิงลบตามลำดับ ปฏิกริยาการระคายเคืองที่ประเมินประกอบด้วย ภาวะเลือดออก การแตกของหลอดเลือดและการเกาะกลุ่มของโปรตีน ตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอร่วมกับโปรแกรมประมวลผล จากนั้นคำนวณค่าศักยภาพระคายเคืองแบบกึ่งปริมาณ ผลการศึกษาพบว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้นมีคะแนนการระคายเคืองเท่ากับ 2.15 ± 1.91 และ 2.84 ± 1.65 ตามลำดับ ($p > 0.05$) ในขณะที่คะแนนการระคายเคืองที่สูงขึ้น (3.92 ± 0.75) พบในสารละลายเมนทอลอิสระ การศึกษานี้บ่งชี้ว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและสามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์ภายนอกได้อย่างปลอดภัย

คำสำคัญ : การระคายเคือง เมนทอล นาโนแคปซูล เยื่อไขไก่ฟ้า สเปรย์

Evaluation of Irritation Potential of Spray containing Menthol-Loaded Nanocapsules using the Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane Assay

Virawanant Kanoknitthiran¹ Chutinun Prasitpuriprecha², Wandee Rungseewijitprapa³ and Bancha Yingngam^{3*}

¹Master Degree Student Program in Cosmetic Sciences and Health Products,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University

²Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University

³Department of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University

*E-mail : bancha.y@ubu.ac.th

Abstract

Menthol can enhance skin cooling sensation through the interaction with the transient receptor potential ion channel metastatin subtype 8 at nerve endings in the viable epidermis. Direct dermal exposure to the products containing a high content of menthol may result in irritation. The purpose of this study was to evaluate the irritation potential of spray containing menthol-loaded nanocapsules Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM). The CAM treated with 0.1 N NaOH and normal saline solution was served as a positive and negative control, respectively. The irritation reactions, including hemorrhage, vascular lysis and coagulation, were observed using a stereomicroscope coupled with Image Flam Work software. Then, a semi-quantitative scoring method was calculated. Results showed that spray containing menthol-loaded nanocapsules and base spray showed the irritation score of 2.15 ± 1.91 and 2.84 ± 1.65 respectively, whereas a higher irritation score (3.92 ± 0.75) was observed in free menthol solution. These results indicate that encapsulation of menthol in nanocapsules was well tolerated with reduced irritation potential and could be safe for topical uses.

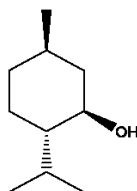
Keywords : Irritation, Menthol, Nanocapsule, Hen's Egg Chorioallantoic Membrane, Spray

บทนำ

เมนทอล (menthol) เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญชนิดหนึ่งที่มีราคาไม่แพง มีมูลค่าทางการตลาดสูงและได้รับความนิยมใช้อย่างมาก สารชนิดนี้เป็นที่ต้องการทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม น้ำหอม เครื่องสำอาง และการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชศาสตร์ เนื่องจากคุณสมบัติที่กระตุ้นให้รู้สึกเย็นและทำให้ผู้ใช้รู้สึกสดชื่นช่วงขณะซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ ทำให้อุปสงค์ของเมนทอลเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ แต่เนื่องด้วยเมนทอลมีข้อจำกัดเรื่องค่าขีดการละลายน้ำที่ต่ำมากและเมื่อสัมผัสผิวหนังจะเกิดการระคายเคืองอย่างรวดเร็ว

เมนทอล (รูปที่ 1) มีคุณสมบัติเพิ่มความรู้สึกเย็นให้แก่ผิวหนังผ่านกลไกกระตุ้นตัวรับศักย์ไอออนชั่วคราวของช่องทาง metastatin ชนิดย่อยที่ 8 (transient receptor potential ion channel metastatin subtype 8) ที่ปลายประสาทรับสัมผัสบริเวณผิวหนังชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต (Farco and Gundmann, 2013; Naziroğlu et al., 2018; Yildiz et al., 2018) การใช้เมนทอลเป็นสารออกฤทธิ์ให้ความเย็นแก่ผิวหนังมีข้อจำกัดสำคัญคือ เมนทอลมีค่าขีดการละลายน้ำต่ำ เท่ากับ 0.4 mg/mL ณ อุณหภูมิ 25 °C ขณะเดียวกันสารชนิดนี้ระเหิดได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้อง (Punpee et al., 2016) ปัญหาดังกล่าวทำให้เกิดแนวคิดเกี่ยวกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ช่วยสร้างความรู้สึกเย็นที่ผิวหนังที่ช่วยทำให้เมนทอลละลายน้ำและลดอัตราการระเหิดลงได้โดยกักเก็บสารออกฤทธิ์ในนาโนแคปซูล จากนั้นจึงนำนาโนแคปซูลที่ได้มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสเปรย์เพื่อเพิ่มความสะดวกในการใช้งานคือ สามารถใช้งานง่ายเพียงฉีดพ่นที่บริเวณใบหน้าหรือส่วนอื่นของร่างกาย พกพาสะดวกขณะเดินทางและไม่ระคายเคืองต่อผิวหนัง ต้นแบบผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้พัฒนาเสร็จสิ้นแล้วโดยกลุ่มคณะผู้วิจัย

อย่างไรก็ตามการนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปใช้จำเป็นต้องทราบข้อมูลด้านการระคายเคือง ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพระคายเคืองของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลโดยทดสอบในเยื่อบุไข่ฟัก กำหนดให้เยื่อบุไข่ฟักที่ทดสอบด้วยสารละลายโซดาไฟความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 นอร์มอล และสารละลายน้ำเกลือปกติ (normal saline solution) เป็นกลุ่มควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ ปฏิบัติการระคายเคืองที่ประเมินประกอบด้วย ภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดง การฉีกขาดของหลอดเลือดและการตกตะกอนของโปรตีน จากนั้นคำนวณค่าศักยภาพระคายเคือง



รูปที่ 1 โครงสร้างเคมีของเมนทอลชนิด (1R, 2S, 5R) -2-isopropyl-5-methylcyclohexanol หรือ (-)-menthol ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ (Naziroğlu et al., 2018)

วิธีการวิจัย

วัสดุ สารเคมี และอุปกรณ์

เมนทอล ((1R, 2S, 5R) -2-isopropyl-5-methylcyclohexanol) (บริษัท Fisher Chemical, Leicestershire ประเทศสหราชอาณาจักร) poloxamer 188 (Kolliphor® P188) poly(ε-caprolactone) (น้ำหนักโมเลกุล 80,000 กรัมต่อโมล) polysorbate 80 (Tween® 80) sorbitan monooleate (Span® 80) (บริษัท Sigma Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA) caprylic/capric triglyceride (Lexol® GT-865) (บริษัท INOLEX (ประเทศไทย) จำกัด, กรุงเทพฯประเทศไทย) สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดเป็นเกรดสำหรับใช้วิเคราะห์ ไซท์ฟักสายพันธุ์ไวท์ไอร์แลนด์ (ฟาร์มเลี้ยงไก่ท้องถิ่น อ.สุวรรณภูมิ จ.ร้อยเอ็ด) เครื่องฟักไข่ไก้อัตโนมัติ (Nanchang Alex Electric Factory, Jiangxi ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน)

ผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับทดสอบศักยภาพระคายเคือง

สเปรย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุในนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้น มีส่วนประกอบสำคัญ ได้แก่ สารออกฤทธิ์เพิ่มความรู้สึกเย็นเมนทอลความเข้มข้นร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก ตัวทำละลายร่วม สารกันเสีย สารหล่อลื่นผิว น้ำหอม และน้ำกลั่น กรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์สเปรย์พื้นจะแทนที่ปริมาณของเมนทอลที่บรรจุ

ในนาโนแคปซูลด้วยน้ำกลั่น ซึ่งระบบนำส่งเมมทอลบรรจุนาโนแคปซูลเตรียมด้วยวิธีการตกตะกอนนาโน (nanoprecipitation) (Ferreira et al., 2018) และคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยเทคนิคการตอบสนองพื้นผิว (response surface methodology) ร่วมกับการประยุกต์ใช้ฟังก์ชันความพึงพอใจ ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้ เมมทอล poly(ϵ -caprolactone) caprylic/capric triglyceride sorbitan monooleate poloxamer 188 polysorbate 80 และน้ำกลั่น (ทางคณะผู้วิจัยไม่สามารถเปิดเผยข้อมูลสัดส่วนของสารที่ใช้ในตำรับผลิตภัณฑ์สเปรย์โดยละเอียดได้เนื่องจากการศึกษาเป็นโครงการวิจัยที่ทำร่วมกับผู้ประกอบการภาคเอกชน)

การทดสอบศักยภาพระคายเคืองต่อเยื่อไขพุท

ศักยภาพระคายเคืองของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมมทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้นประเมนโดยการทดสอบ HET-CAM ตามแนวทางของ NICEATM-ICCVAM (2018) ดังนี้ นำไขพุท สายพันธุ์ไทร์แลนด์ น้ำหนักระหว่าง 50 ถึง 60 กรัม มาบ่มในเครื่องพุทไขพุทอัตโนมัติ (Nanchang Alex Electric Factory, Jiangxi ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน) สภาวะการบ่ม ไขพุทกำหนดตั้งนี้ อุณหภูมิภายในเครื่องพุทไขพุทเท่ากับ 37.8 ± 0.3 °C ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 58.0 ± 2.0 อัตราการกลับไขพุททุก 2 ชั่วโมง นานครั้งละ 15 วินาที เมื่อไขพุทอายุครบ 9 วัน เปิดเปลี่ยนไขพุทด้วยเครื่องเจาะเปลี่ยนไขพุท ลอกเยื่อไขพุทด้านนอกออก จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติมน้ำมันผิวเยื่อไขพุท แต่ละกลุ่มประกอบด้วยไขพุท 6 ฟอง การศึกษาที่กำหนดให้ความเข้มข้นของเมมทอลที่อยู่ในสูตรตำรับและสารละลายเมมทอลอิสระมีปริมาณเท่ากัน กลุ่มที่ทดสอบด้วยสารละลายโซดาไฟละลายในน้ำปราศจากไอออนความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมผลบวกและสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9%w/v ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมผลลบ จากนั้น บันทึกเวลาครั้งแรกที่ตรวจพบ การแตกของเม็ดเลือดแดง การฉีกขาดของหลอดเลือดและการเกาะกลุ่มของโปรตีน เป็นระยะเวลา 300 วินาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Nikon ZMZ 745T, Nikon Instruments Inc. , Melville, NY, USA) ควบคุมกล้องบันทึกภาพ Canon DSLR แปลผลโดยใช้โปรแกรม Image Frame Work และประเมินศักยภาพการระคายเคืองโดยวิธีการให้คะแนนแบบกึ่งปริมาณซึ่งคำนวณโดยใช้สมการที่ 1 ดังนี้

$$\text{irritation score} = \frac{5 \times (301-h)}{300} + \frac{7 \times (301-l)}{300} + \frac{9 \times (301-c)}{300} \quad (1)$$

เมื่อ h, l และ c แสดงถึง ระยะเวลาการแตกของเม็ดเลือดแดง การฉีกขาดของหลอดเลือด และการเกาะกลุ่มของโปรตีน การประเมินผลคะแนนที่คำนวณได้ กำหนดดังนี้

- คะแนน 0.0-0.9 ไม่ระคายเคือง
- คะแนน 1.0-4.9 ระคายเคืองเล็กน้อย
- คะแนน 5.0-8.9 ระคายเคืองปานกลาง
- คะแนน 9.0-21.0 ระคายเคืองรุนแรง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

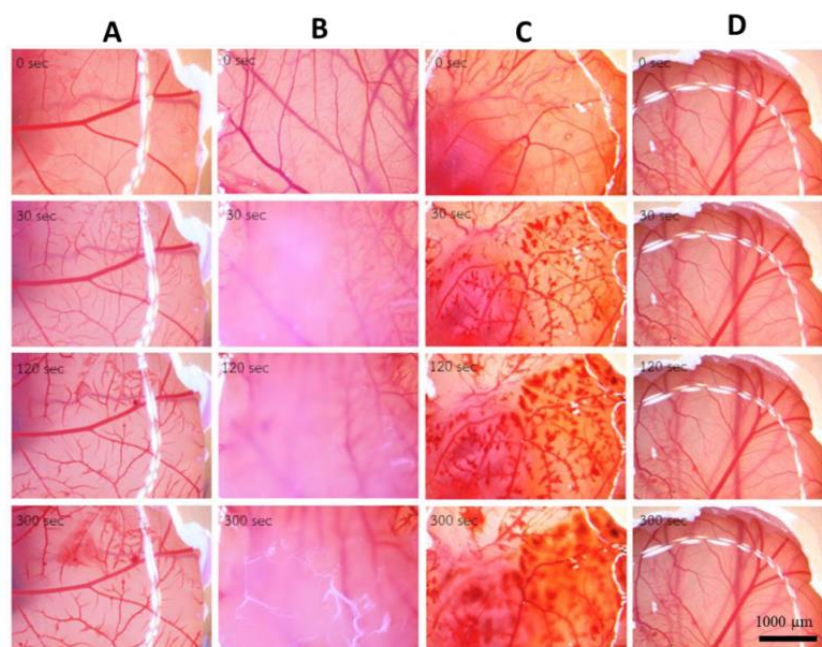
ข้อมูลผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน กำหนดค่าระดับความน่าจะเป็นที่ $p < 0.05$ ถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Company, San Diego, CA, USA)

ผลการวิจัย

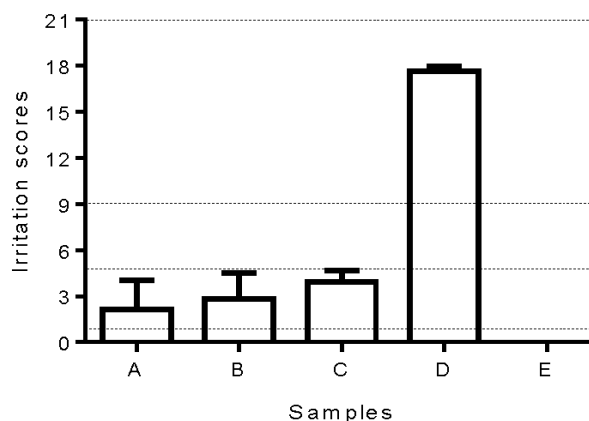
คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของระบบนำส่งเมมทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูล มีค่าร้อยละการกักเก็บสารออกฤทธิ์สูงเท่ากับ 98.18 ± 1.05 เมื่อนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สเปรย์และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมมทอลบรรจุนาโนแคปซูลมีค่าเท่ากับ 5.32 ± 0.84 ขณะที่สเปรย์พื้นมีค่าเท่ากับ 5.34 ± 0.97 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์สองชนิดดังกล่าวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และอยู่ในช่วงระหว่าง 4.5 – 6.5 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ใกล้เคียงกับผิวหนังของมนุษย์

การประเมินศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ต่อเยื่อไขพุทแสดงในรูปที่ 2 ผลการศึกษาพบว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมมทอลบรรจุนาโนแคปซูลมีภาวะการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เวลา 51.6 ± 6.2 วินาที ขณะที่สเปรย์พื้นพบที่เวลา 55.5 ± 3.5

วินาที ผลัดกันที่นำมาทดสอบทั้งสองชนิดข้างต้นไม่มีผลทำให้เกิดการฉีกขาดของหลอดเลือดและไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เมื่อตรวจสอบในช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 300 วินาทีตามแนวทางของ NICEATM-ICCVAM (2018) สำหรับกลุ่มควบคุมผลบวก พบว่า สารละลายโซดาไฟความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เวลา 12.8 ± 3.3 วินาที การฉีกขาดของหลอดเลือดที่เวลา 71.2 ± 8.2 วินาที และโปรตีนเกาะกลุ่มกันที่เวลา 52.6 ± 7.5 วินาที ไม่พบการระคายเคืองเกิดขึ้นในกลุ่มควบคุม ผลลบที่ทดสอบด้วยสารละลายเกลือแกงปกติ โดยมีค่าคะแนนการระคายเคืองเท่ากับ 0.00 ± 0.00 จากนั้นเมื่อนำค่าระยะเวลา การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและโปรตีนเยื่อไขฟักมาคำนวณเป็นคะแนนระคายเคือง สามารถสรุปผลได้ดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้นมีคะแนนการระคายเคืองเท่ากับ 2.15 ± 1.91 และ 2.84 ± 1.65 ตามลำดับ ($p > 0.05$) คะแนนการระคายเคืองที่สูงขึ้น (3.92 ± 0.75) พบในสารละลายเมนทอลอิสระ ขณะที่กลุ่มผลบวก ควบคุมและผลลบควบคุมมีค่าเท่ากับ 17.63 ± 0.31 และ 0.00 ± 0.00 ตามลำดับ ($p < 0.001$)



รูปที่ 2 ภาพถ่ายหลอดเลือดของเยื่อไขฟักอายุ 9 วัน เมื่อทดสอบ ณ เวลา 0 30 120 และ 300 วินาที ตามลำดับ เมื่อ A คือ สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล B คือ สเปรย์พื้น C คือ สารละลายโซดาไฟความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และ D คือ สารละลายเกลือแกงปกติ ($n = 6$)



รูปที่ 3 คะแนนศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผลบวกและผลลบ ตามลำดับ เมื่อ A คือ สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล B คือ สเปรย์พื้น C คือ สารละลายเมนทอลอิสระ D คือ สารละลายโซดาไฟความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และ E คือ สารละลายเกลือแกงปกติ ($n = 6$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การทดสอบศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ต่อเยื่อบุไ้ไก่ฟักจัดเป็นวิธีทดสอบทางเลือกที่ไม่ใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ การศึกษานี้ได้นำวิธีการดังกล่าวเพื่อตรวจสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูล การศึกษานี้เลือกใช้ไก่ฟักอายุ 9 วัน เป็นเยื่อบุสำหรับทดสอบ เพราะมีเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ประกอบด้วยหลอดเลือดแดง หลอดเลือดดำ และหลอดเลือดฝอย แต่เยื่อบุมีของไก่ยังเจริญเติบโตไม่ถึงร้อยละ 50 ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ตรวจสอบการระคายเคืองหรือบาดเจ็บที่เกิดจากสารเคมี (NICEATM-ICCVAM, 2015) คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีนี้เพราะสามารถทำได้รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายไม่สูง และจัดเป็นทางเลือกที่ได้รับการยอมรับสำหรับการทดลองในสัตว์หรือมนุษย์ ผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ชัดเจนว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลและสเปรย์พื้นมีคะแนนการระคายเคืองจัดอยู่ในเกณฑ์ระคายเคืองเล็กน้อย (คะแนนอยู่ในช่วง 1.0-4.9) ซึ่งต่ำกว่า 9 ซึ่งให้ถือว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสำหรับการใช้เฉพาะที่ได้ (Pandey et al., 2019) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ immortalized human skin keratinocytes (HaCaT cells) และ normal human dermal fibroblasts (NHDF cells) ด้วยวิธี 3-(4,5-diethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าระบบนำส่งเมนทอลที่บรรจุในนาโนแคปซูลและระบบนำส่งนาโนแคปซูลเปล่าไม่เป็นที่พิษต่อเซลล์ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 3 ถึง 5000 $\mu\text{g/mL}$ ดังนั้น การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าสเปรย์ที่มีส่วนผสมของเมนทอลบรรจุนาโนแคปซูลไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและสามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์ภายนอกที่มีความปลอดภัยได้ ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการขออนุมัติจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์เกี่ยวกับประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อกระตุ้นให้เกิดความรู้สึกรื่นเ็นในอาสาสมัครสุขภาพดีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการศึกษาวิจัยสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ภายใต้โครงการยกระดับสมรรถนะนักวิจัยไทย เพื่อสร้างขีดความสามารถในการแข่งขัน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 (รหัสโครงการ 05000008/050000080001) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวพรรณดา ภาริการ และนายกันตพงศ์ วงศ์เนกเกษม ที่ช่วยเหลือในการทดสอบศักยภาพระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ในเยื่อบุไ้ไก่ฟัก

เอกสารอ้างอิง

Farco, J., & Grundmann, O. (2013). Menthol-pharmacology of an important naturally medicinal “cool”. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13, 124-131.

- Ferreira, L. M., Cervi, V. F., Sari, M. H. M., Barbieri, A. V., Ramos, A. P., Copetti, P. M., de Brum, G. F., Nascimento, K., Nadal, J.M., Farago, P.V., Sagrillo, M. R., Nogueira, C.W., Cruz, L. (2018). Diphenyl diselenide loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 91, 1-9.
- Nazıroğlu, M., Blum, W., Jósvay, K., Çiğ, B., Henzi, T., Oláh, Z., Vizler, C., Schwaller, B., Pecze, L. (2018). Menthol evokes Ca^{2+} signals and induces oxidative stress independently of the presence of TRPM8 (menthol) receptor in cancer cells. *Redox Biology*, 14, 439-449.
- NICEATM-ICCVAM, In Vitro Test Methods for Detecting Ocular Corrosives and Severe Irritants, 2015. Accessed 1 October 2018, <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/ocular/in-vitro/index.html>.
- Pandey, D., Kesharwani, P., & Jain, D. (2019). Entrapment of drug-sorbate complex in submicron emulsion: A potential approach to improve antimicrobial activity in bacterial corneal infection. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49, 455-462.
- Phunpee, S., Saesoo, S., Sramala, I., Jarussophon, S., Sajomsang, W., Puttipipatkhajorn, S., Sootitawatt, U.R., Ruktanonchai, U. R. (2016). A comparison of eugenol and menthol on encapsulation characteristics with water-soluble quaternized β -cyclodextrin grafted chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 472-480.
- Yildiz, Z. I., Celebioglu, A., Kilic, M. E., Durgun, E., & Uyar, T. (2018). Menthol/cyclodextrin inclusion complex nanofibers: Enhanced water-solubility and high-temperature stability of menthol. *Journal of Food Engineering*, 224, 27-36.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาววิรารัตน์ กนกนิษฐ์หิรัญ
ประวัติการศึกษา	เภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยรังสิต
ประวัติการทำงาน	2553 เภสัชกรบางเวลา ร้านขายยาห้างแม็คโคร สาขาเมืองเอก รังสิต 2554-2563 เภสัชกร ฝ่ายเภสัชกรรมโรงพยาบาลนายแพทย์หาญ จังหวัดยโสธร
ตำแหน่งงาน	หัวหน้าฝ่ายเภสัชกรรมและผู้จัดการฝ่ายเทคนิคบริการ โรงพยาบาลนายแพทย์หาญ จังหวัดยโสธร
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงพยาบาลนายแพทย์หาญจังหวัดยโสธร