การพัฒนาอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บลิกแนนจากน้ำมันงา เพื่อการนำส่งทางผิวหนัง

วลัยพร เตียประสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาศาสตร์แห่งเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

DEVELOPMENT OF LIPID NANOPARTICLES CONTAINING LIGNANS EXTRACT FROM SESAME OIL FOR SKIN DELIVERY

WALAIPORN TIAPRASIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN COSMETIC SCIENCES AND HEALTH PRODUCTS
FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2018
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาศาสตร์แห่งเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บลิกแนนจากน้ำมันงาเพื่อการนำส่งทางผิวหนัง

ผู้วิจัย นางสาววลัยพร เตียประสิทธิ์

คณะกรรมการสอบ

รองศาสตราจารย์ ดร.วริษฎา ศิลาอ่อน	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัญชา ยิ่งงาม	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา	กรรมการ
ดร.รับขวัญ เชื้อลี	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

.... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัญชา ยิ่งงาม)

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา)

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2561

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์รองศาสตราจารย์ ดร .วันดี รังสีวิจิตรประภา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร .บัญชา ยิ่งงาม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งได้ให้คำแนะนำ ตรวจแก้ไข ข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ รวมทั้งการเป็นแบบอย่างที่ดีแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ และขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วริษฎา ศิลาอ่อน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชาและ ดรรับขวัญ เชื้อลี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ ศูนย์การเรียนรู้และพัฒนางาเชิงเกษตรอุตสาหกรรมครัวเรือนแบบยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันงาดำบริสุทธิ์ที่สกัดโดยวิธีการบีบแบบอัดเย็น เพื่อใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณโครงการยกระดับสมรรถนะนักวิจัยไทยเพื่อสร้างขีดความสามารถในการแข่งขัน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ประสิทธิ์ประสาทวิชาอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ นักศึกษาที่คอยให้กำลังใจ และขอขอบพระคุณสถาบันการศึกษาแห่งนี้ ที่ได้ให้ความรู้ และประสบการณ์อันมีค่าในการศึกษา

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณอนวัช และเด็กชายองศา สุขไพเราะ ที่ให้กำลังใจ เข้าใจ สละเวลา ส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการศึกษาที่ดี คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากการศึกษาครั้งนี้ ขอมอบแด่ผู้ที่อยู่เบื้องหลังในการส่งเสริมความสำเร็จ ทั้งที่ได้กล่าวนามถึงและมิได้กล่าวนามถึงทุกท่าน และขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

วลัยพร เตียประสิทธิ์
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : การพัฒนาอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บลิกแนนจากน้ำมันงาเพื่อการนำส่งทางผิวหนัง
ผู้วิจัย : วลัยพร เตียประสิทธิ์
ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา : ศาสตร์แห่งเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา
คำสำคัญ : สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน, น้ำมันงา, อนุภาคไขมันขนาดนาโน, การนำส่งทางผิวหนัง การซึมผ่านทางรูขุมขน

สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน จากน้ำมันงา มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ เซซามิน เซซาโมลิน และเซซามอล ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ในการ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส มีรายงานว่า เซซามิน และเซซามอลยังมีฤทธิ์ใน การยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส อีลาสเตส และไฮยาลูนิเดส ซึ่ง เป็นสาเหตุของริ้วรอยบนผิวหนัง อย่างไรก็ตามค่าการละลายในสารละลายที่ต่ำของสารลิกแนนจึงเป็นอุปสรรคของการนำส่งสารทางผิวหนัง ดังนั้น การกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในอนุภาคไขมันขนาดนาโนอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังให้ดียิ่งขึ้น การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงา และพัฒนาอนุภาคไขมันขนาด นาโนซึ่งกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน จากน้ำมันงาเพื่อการนำส่งทางผิวหนัง เตรียมอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรด้วยวิธีการเตรียมอิมัลชัน แบบใช้ความร้อน และลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์และเครื่องโซนิเคทแบบโพรบ ศึกษา ปัจจัยของกระบวนการและส่วนประกอบในตำรับของการเตรียม อนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร (Solid lipid nanoparticles, SLN) นาโนสตรัคเจอร์ลิปิดแคริเออร์ (Nanostructure lipid carrieres, NLC) และนาโนอิมัลชัน (Nanoemulsion, NE) วัดขนาดอนุภาคและค่าการกระจายอนุภาค (PDI) ด้วยอาศัยหลักการกระเจิงของแสงเลเซอร์ ผลการศึกษาพบว่า สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดีกว่าน้ำมันงา ในขณะที่ ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและอีลาสเตสที่ความเข้มข้นที่มากกว่า 400 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร อนุภาคไขมันขนาดนาโนในทุกรูปแบบมีขนาดอยู่ในช่วง 175.13-215.40 นาโนเมตร และมีร้อยละในการกักเก็บสารเซซามินและเซซาโมลินในช่วง 93.00-98.37 และ 95.94-98.92 ตามลำดับ การศึกษาการปลดปล่อยสารเซซามิน และเซซาโมลินด้วยเทคนิคไดอะไลซิสพบว่า ตำรับ SLN, NLC และ NE สามารถปลดปล่อยสารได้มากกว่าสารละลายลิกแนนในน้ำมันงา อนุภาค SLN ปลดปล่อยสารได้เร็วกว่า NLC

และ NE ในขณะที่อนุภาค NLC และ NE มีรูปแบบการปลดปล่อยสารที่ใกล้เคียงกัน การศึกษาการซึมผ่านชั้นผิวหนังของสารเซซามิน และเซซาโมลินด้วยเทคนิค Franz diffusion cell พบว่าอัตราการแพร่ผ่าน (steady state flux) ของสารเซซามิน จากสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ในน้ำมันงา อนุภาค SLN, NLC และ NE คือ 0.23, 0.26. 0.35 และ 0.31 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับในขณะที่ อัตราการแพร่ผ่าน สารเซซาโมลิน ของสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ในน้ำมันงา ตำรับอนุภาค SLN, NLC และ NE คือ 0.12, 0.27, 0.33 และ 0.31 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรต่อชั่วโมง คุณลักษณะทางกายภาพของ SLN, NLC และ NE ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเก็บ ภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน ดังนั้นอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่ กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน จากน้ำมันงาช่วยเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขน และมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหนังต่อไป

ABSTRACT

TITLE : DEVELOPMENT OF LIPID NANOPARTICLES CONTAININGG LIGNANS EXTRACT FROM SESAME OIL FOR SKIN DELIVERY
AUTHOR : WALAIPORN TIAPRASIT
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : COSMETIC SCIENCE AND HEALTH PRODUCTS
ADVISOR : ASSOC. PROF. WANDEE RUNGSEEVIJITPRAPA, Dr.rer.nat.
KEYWORDS : LIGNANS, SESAME OIL, NANOSTRUCTURE LIPID CARRIERS, SKIN DELIVERY, SKIN PERMEATION

Lignans extract from sesame oil mainly comprise of sesamin, sesamolin and sesamol which have strong bioactivities such as antioxidant, anti-inflamation and tyrosinase inhibition. Sesamin and sesamol also have been reported to inhibit collagenase, elastase and hyarulonidase enzyme activities that cause skin wrinkle. However, the low aqueous solubility of lignans is the obstacle for skin delivery. Thus, encapsulation of lignans into lipid nanoparticles may enhance skin delivery. The purpose of this experimental research was to determine the bioactivities of lignans– and develop lipid nanoparticles containing lignans for skin delivery. Lipid nanoparticles were prepared by hot emulsification method and the particle size was reduced by homogenizer and followed by probe sonicator. Process and formulations parameters for the preparation of solid lipid nanoparticles, (SLN), nanostructure lipid carriers, (NLC) and nanoemulsion (NE) were investigated. Particle size and polydispersity index (PDI) were measured by laser light scattering. Lignans showed better antioxidant activity than sesame oil by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) and 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) antioxidant assay while lignans found gellatinase and elastase inhibition at concentration more than 400 µg/mL. All lipid nanoparticle systems exhibit average volume diameter in the rage of 175.13-215.40 nm with 93.00-98.37 and 95.94-98.92 sesamin and sesamolin encapsulation efficiency respectively. *In vitro* release study showed that sesamin and sesamolin can be released from SLN, NLC and NE faster than lignans solution

Moreover, SLN presents the rapid release than NLC and NE, which providing the similar release patterns. *In vitro* skin permeation by franz diffusion cell found the steady state flux of sesamin from lignans solution, SLN, NLC and NE were 0.23, 0.26. 0.35 and 0.31 µg/cm^2/h, respectively, while the steady state flux of sesamolin from lignans solution, SLN, NLC and NE were 0.12, 0.27, 0.33 and0.31 µg/cm^2/h, respectively. Physical stability of SLN, NLC and NE remained unchanged when stored at 4°C and 75% relative humidity for 3 months. In conclusion, lipid nanoparticles containing lignans extract from sesame oil could enhanced skin delivery and have potential to be further developed as skin care products.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ **ก**
บทคัดย่อภาษาไทย **ข**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ **ง**
สารบัญ **ฉ**
สารบัญตาราง **ซ**
สารบัญภาพ **ฌ**
บทที่1 บทนำ
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 3
1.3 สมมติฐานการวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
1.5 ขอบเขตการศึกษา 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 งา 4
2.2 ชั้นผิวหนัง 6
2.3 อนุมูลอิสระ 10
2.4 รังสียูวีกับผิวหนังแก่ก่อนวัย 13
2.5 เอนไซม์ 14
2.6 ช่องทางการซึมผ่านผิวหนัง 16
2.7 วิธีการเพิ่มการดูดซึมผ่านผิวหนัง 18
2.8 ระบบนำส่งโดยใช้ไขมัน 19
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 25
3.2 วิธีการทดลอง 26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล
4.1 ผลการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงา 35
4.2 ผลการวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนด้วยวิธีโครโมโตกราฟีเหลวความดันสูง 37
4.3 วิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน 40
4.4 การพัฒนาตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน 42
4.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อนของอนุภาคไขมันขนาดนาโนด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC-Thermogram) 47
4.6 ศึกษาระนาบของผลึกอนุภาคไขมันขนาดนาโนด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction, XRD) 49
4.7 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของอนุภาคไขมันขนาดนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscopy) 51
4.8 ทดสอบการปลดปล่อยสาร และการซึมผ่านทางผิวหนังของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน 52
4.9 ทดสอบความคงตัวของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในรูปแบบ SLN, NLC และ NE 57
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผล และข้อเสนอแนะ
5.1 อภิปรายผลการวิจัย 62
5.2 สรุปผลการวิจัย 72
5.3 ข้อเสนอแนะ 72
เอกสารอ้างอิง 73
ประวัติผู้วิจัย 80

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1	กรดไขมันชนิดต่างๆพบได้ในเมล็ดงา	5
2.2	ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันชนิดต่าง ๆ	5
2.3	เปรียบเทียบโครงสร้างและองค์ประกอบของคอลลาเจนและอีลาสติน	9
4.1	ร้อยละผลผลิตสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันในแต่ละครั้งการผลิต	35
4.2	ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์เจลลาติเนส และอิลาสเตส (IC_{50}) ของ สารต่าง ๆ ได้ร้อยละ 50	40
4.3	ค่าความเข้มข้นที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH	41
4.4	ค่าความเข้มข้นที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ด้วยวิธี ABTS	41
4.5	ผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค ในวันที่ 7 (n=3), (โอลิแว็กซ์ ร้อยละ 4, น้ำมันงา ร้อยละ 3)	43
4.6	ผลของปริมาณไขมันรวมที่มีต่อขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค (n=3)	44
4.7	ผลของปริมาณน้ำมันงาของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่มีการกักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.10 ที่มีต่อขนาดอนุภาค ค่าการกระจายอนุภาคและ ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (n=3)	45
4.8	ค่าร้อยละการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในอนุภาคไขมันขนาดนาโน ที่มีปริมาณน้ำมันงาในสัดส่วนต่าง ๆ กันของปริมาณไขมันรวม (n=3)	45
4.9	ค่าร้อยละการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.50 ใน อนุภาคไขมันขนาดนาโนแบบ SLN, NLC และ NE (n=5)	47
4.10	ค่าขีดการละลายของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในตัวทำละลายต่าง ๆ (pH 7.4, 32 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที, n=3)	53
4.11	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย การกระจายขนาดของอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้า ที่ผิวอนุภาคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน	59

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างทางเคมีของเซซามิน (sesamin) และเซซาโมลิน (sesamolin) 4
2.2 โครงสร้างของชั้นผิวหนัง 6
2.3 การซึมผ่านหนังกำพร้า (transepidermal route) 16
2.4 เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร (ก) และตัวพาไขมันขนาดนาโนเมตร (ข) 20
4.1 ผลึกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่แยกได้จากน้ำมันงา 36
4.2 ผลึกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนส่องโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและฟลูออเรสเซนต์ 36
4.3 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเซซามิน เซซาโมลิน (A) และสาร กึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่แยกจากน้ำมันงาดำสกัดเย็น (B) 38
4.4 กราฟของสารมาตรฐานเซซามิน (A) และสารมาตรฐานเซซาโมลิน (B) ในช่วงความเข้มข้น 1.5625-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (n=3) 39
4.5 ผลของสัดส่วนของน้ำมันงาในตำรับต่อขนาดอนุภาคและค่าการกระจายอนุภาค หลังจากเตรียมเสร็จเป็นเวลา 7 วัน โดยมีปริมาณไขมันรวม และสารลดแรงตึงผิวที่ร้อยละ 7.5 และ 2.5 ตามลำดับ 42
4.6 ค่าร้อยละการกักเก็บสารของอนุภาคไขมันขนาดนาโนรูปแบบ NLC ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 (n = 3) 46
4.7 กราฟ DSC สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (a) และ โอลิแว็กซ์ (b) 48
4.8 กราฟ DSC ของNLC ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 (a), NE ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (b) และSLN ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (c) 48
4.9 กราฟ XRD ของ โอลิแว็กซ์ (a), สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (b), poloxamer 188 (c), SLN ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (d), NLC ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (e) และ NE ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (f) 49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.10	กราฟ XRD ของNE ที่ไม่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (a), NE ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (b), NLC ที่ไม่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (c), NLC ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (d), SLN ที่ไม่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (e) และSLN ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (f)	50
4.11	ภาพสามมิติจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมของอนุภาคไขมันในรูปแบบ SLN (A) และNLC (B)	51
4.12	การปลดปล่อยสารเซซามิน (A) และสารเซซาโมลิน (B) จากตำรับ SLN, NLC และ NE ด้วยเทคนิคไดอะไลซิส (ช่วงมวลโมเลกุล 12,000-14,000, สารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) (1:1), 32 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที, n=3)	54
4.13	ปริมาณสารเซซามิน (A) และเซซาโมลิน (B) ที่ซึมผ่านผิวหนังสุกรตายแรกเกิดของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ละลายในน้ำมันงา และตำรับที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรแบบ SLN, NLC และ NE สารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) (1:1), 32 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที, n=3)	55
4.14	ค่าเฉลี่ย steady state flux ของสารเซซามิน และสารเซซาโมลินที่ซึมผ่านหนังสุกรตายแรกเกิดของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ละลายในน้ำมันงา และตำรับที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 ในอนุภาคไขมันขนาดนาโนแบบ SLN, NLC และ NE (n=3)	56
4.15	ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 ในรูปแบบ SLN, NLC และ NE ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน	57
4.16	กราฟแสดงร้อยละของปริมาณสารเซซามินที่คงเหลือในตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนในรูปแบบ SLN, NLC และ NE เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.17 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณสารเซซาโมลินที่คงเหลือในตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนในรูปแบบ SLN, NLC และ NE เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C 75% RH, 25°C 75% RH และ 40°C 75% RH เป็นเวลา 1 เดือน และ 3 เดือน (n=3) 61

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

จากข้อมูลเอกสารประมวลสถิติด้านสังคม ปี พ.ศ. 2558 เรื่องประชากรไทยปัจจุบันและอนาคต ได้กล่าวถึงสถานการณ์แนวโน้มของประชากรไทยว่า กำลังมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่การเป็นสังคมผู้สูงวัยโดยประเทศไทยกลุ่มสังคมสูงวัย มีจำนวนสูงเป็น อันดับที่ 2 ในกลุ่มประเทศอาเซียน รองจากสิงคโปร์ จากปี 2548 ประเทศไทยมีประชากรผู้สูงอายุประมาณ ร้อยละ 10 ของประชากรทั้งหมด และคาดว่าในปี พ .ศ. 2578 ผู้สูงอายุจะเพิ่มขึ้ นถึงร้อยละ 25 ของประชากรทั้งหมด หรือมีจำนวน 16 ล้านคน (สำนักงานปลัดกระทรวงพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์, 2557)

ดังนั้นปัญหาต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับผู้สูงอายุจึงได้รับความสนใจในการศึกษา ได้แก่ ปัญหาทางด้านผิวหนังของผู้สูงอายุ โดยผิวหนังมีการเปลี่ยนแปลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น เกิดการเสื่อมเนื่องจากมีการสะสมของเสียภายในเซลล์ (วลัยอร ปรัชญพฤทธิ์ , 2557) การทำลายเซลล์ผิวหนังเนื่องจากอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดการทำลายคอลลาเจน คอลลาเจนจึงมีปริมาณน้อยลง ผิวหนัง ขาดความยืดหยุ่นรวมทั้งทำให้ องค์ประกอบต่าง ๆ เช่น อีลาสติน โปรติโอไกลแคน และ ไกลโคอะมิโนไกลแคน มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ผิวหนังจึงหย่อนยานเป็นริ้วรอยลึก สีผิวเข้มในบางจุด (จารุภา วิโยชน์ , 2560) ในปัจจุบันมีหลักฐานจำนวนมากที่บ่ งชี้ว่าปัจจัยที่ก่อให้เกิดภาวะอนุมูลอิสระและสารออกซิแดนท์บนผิวหนังมากเกินสมดุล (oxidative stress) ที่สำคัญที่สุดมาจาก UV ในแสงแดด ผลจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตที่ผิวหนังจะเกิด lipid peroxidation, lipid radical, melanin radical และการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติในร่างกาย ทั้งชนิดเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ (วิชิต, 2547) นอกจากนี้รังสียูวีเอและยูวีบีกระตุ้นให้ไฟโบรบลาสต์ผลิตอีลาสเตส (elastase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยอีลาสติน ส่งผลให้ผิวหนังสูญเสียความยืดหยุ่นและเกิดริ้วรอย และยังเพิ่มปริมาณเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรติเอส (metrix metalloproteinases, MMPs) ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเมทริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งประกอบไ ปด้วยคอลลาเจน อีลาสติน และไกลโคอะ มิโนไกลแคน (จารุภา วิโยชน์, 2560) ดังนั้นควรมีกลไกที่ช่วยในการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะสมดุลไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย

จากรายงาน พบว่าน้ำมันงา และสาร ลิกแนนจากน้ำมันงามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลาก หลาย เช่น การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในรงควัตถุสีน้ำตาลที่สกัดมาจากเมล็ดงาดำ พบว่ามีฤทธิ์ที่สูงกว่าโทรล็อกซ์ (Trolox) และวิตามินอี (alpha-tocopherol) และมีฤทธิ์เทียบเท่า Beta Hydroxy

Acid (BHA) (Xu J., Chen S., and Hu Q., 2005) หรือในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันงาที่ได้จากงาขาวและงาน้ำตาล โดยงาน้ำตาลจะมีสารสเตอรอลและวิตามินอี สูงกว่างาขาว แต่มีปริมาณเซซามินและเซซาโมลินต่ำกว่างาขาว และการคั่วงาจะช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่างาที่ไม่ได้คั่ว (Mohamed H.M.A. and Awatif I.I., 1998) มีงานวิจัยที่บ่งชี้ว่าสารเซซามอลช่วยยับยั้งการทำงานของลิโพโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) จึงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Uehara J. et al, 2010) และเซซามอลยังช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการผลิตเมลานิน (Mahendra Kumar C., et al, 2011) การวิจัยใน albino rats พบว่าเซซามอลช่วยในกระบวนการรักษาบาดแผลได้ โดยพบว่าค่า tensile strength ของบาดแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำ คัญ เมื่อให้ เซซามอล ทาง ช่องท้อง ที่ปริมาณ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เทียบกับ กลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้รับยาใด ๆ และที่ให้การรักษาด้วย ตัวยา dexamethasone ทาง กล้ามเนื้อ ที่ 0.17 มิลลิกรัม/กิโลกรัม นอกจากนี้ยัง พบการเพิ่ม ปริมาณของ hydroxyproline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Shenoy R.R. et al., 2011) แล้วยังมีงานวิจัยที่กล่าว พบว่า น้ำมันงาและองค์ประกอบในน้ำมันงา คือ เซซามิน และเซซามอล มีฤทธิ์ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรไลติ ก ได้แก่ เอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อิลาสเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเดส (Yadav N.V. et al., 2011)

จากประโยชน์อันหลากหลายของน้ำมันงา จึงมีผู้สนใจบริโภคและใช้ประโยชน์กับน้ำมันงาเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามการนำน้ำมันงามาใช้ ประโยชน์ โดย การทาน้ำมันงาไปที่ผิวโดยตรง อาจทำให้น้ำมันงาไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมได้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว การซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนังมีอยู่ 3 เส้นทาง คือ ผ่านทางผิวหนัง การข้ามผ่านสตราตัมคอร์เนียมที่อยู่ระหว่างท่อบนผิวหนัง และผ่านทางรูขุมขนที่ติดอยู่กับต่อมไขมัน การแทรกผ่านของโมเลกุลเข้าสู่สตราตัมคอร์เนียม มีอยู่ 2 แนวทาง คือ การทำลาย หรือก่อกวนตัวกั้นของสต ราตัมคอร์เนียม หรือ การใช้ระบบอนุภาคร่วมกับเครื่องมือทางกล และไฟฟ้า หรืออีกแนวทางหนึ่ง คือ การใช้อนุภาคพิเศษที่ซึมผ่านผิวหนังได้ โดยไม่ทำลายตัวกั้นสตราตัมคอร์เนียม ดังนั้นการพัฒนาระบบตัวพานาโนไขมัน จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสา รเข้าสู่ผิวหนังให้ดียิ่ง ขึ้น เช่น นาโนอิมัลชัน ขนาดอนุภาค 20-200 นาโนเมตร , นาโนพาร์ติเคิลไขมัน ขนาดอนุภาค 100-500 นาโนเมตร หรือ ลิโพโซม ขนาดอนุภาค 20-1000 นาโนเมตร ล้วนเป็ นตัวพาไขมันที่ช่วยในการนำส่งสาร และควบคุมการปล่อยสารเข้าสู่ชั้นผิวหนังที่ลึกลงไป ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (วราภรณ์, 2555) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาอนุภาคนาโนที่เก็บกักสารสกัดลิกแนนในน้ำมันงา ในรูปแบบนาโนสตรักเจอร์ลิปิดแคริเออร์ (Nanostructured lipid carriers, NLC) ในการ นำส่งสารลิกแนน จากน้ำมันงา เข้าไปสู่ชั้นผิวหนัง เพื่อมีโอกาสพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางสำหรับการฟื้นฟูผิวหนังในผู้สูงวัยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารลิกแนนจากน้ำมันงา

1.2.2 เพื่อพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนซึ่งกักเก็บสารสกัดลิกแนนจากน้ำมันงา เพื่อการนำส่งทางผิวหนัง

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 สารลิกแนนจากน้ำมันงามีฤทธิ์ในการฟื้นฟูสภาพผิว

1.3.2 อนุภาคไขมันขนาดนาโนสามารถนำส่งสารลิกแน นจากน้ำมันงาเข้าสู่ชั้นผิวหนัง ได้ดีมากขึ้น

1.3.3 ส่วนประกอบในสูตรตำรับมีผลต่อคุณลักษณะของอนุภาคไขมันขนาดนาโน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรตำรับ อนุภาคไขมันขนาดนาโน เพื่อกักเก็บสารลิกแนนจากน้ำมันงาเหมาะสมในการนำส่งเข้าสู่ชั้นผิวหนัง เพื่อให้สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.5 ขอบเขตการศึกษา

1.5.1 การสกัดสารลิกแนนจากน้ำมันงา

1.5.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดลิกแนน

1.5.3 การพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนโดยยังไม่บรรจุสารลิกแนนจากน้ำมันงา

1.5.4 การพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่บรรจุสารลิกแนนจากน้ำมันงา

1.5.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ (x-ray diffraction) และกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscopy, AFM) ของอนุภาคไขมันขนาดนาโน

1.5.6 การศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดลิกแนนในหลอดทดลอง (*In vivo* release)

1.5.7 ทดสอบการซึมผ่านผิวหนังหมูด้วยวิธี Franz diffusion cell

1.5.8 ทดสอบความคงสภาพของตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 งา

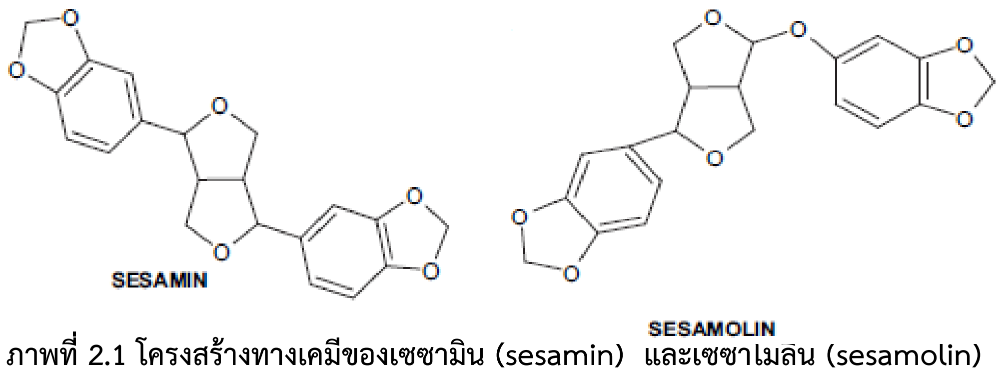
งา เป็นพืชน้ำมันที่อยู่ในวงศ์ (Family) Pedaliaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sesamum indicum* L. มีชื่อเรียกที่หลากหลาย เช่น Sesame, benni seed, bambara และ sesamier เป็นต้น

การจำแนกชนิดและพันธุ์งา โดย International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) และ National Bureau of Plant Genetic Resources (NBPGR) มีการจำแนกชนิดงาออกตามสีของเมล็ด โดยแบ่งได้ทั้งหมด 12 สี และทางศูนย์วิจัยพืชอุบลราชธานี จำแนกพันธุ์งาที่มีการเพาะปลูกในประเทศไทยตามสีของเมล็ด ได้ 3 สี คือ สีดำ สีขาว และสีดำ-แดง (อริยาภรณ์, 2556)

2.1.1 องค์ประกอบในเมล็ดงา

เมล็ดงาประกอบไปด้วยโปรตีนร้อยละ 18.3-25.4 น้ำมันร้อยละ 43.3-44.3 ซึ่งมีกรดไขมันชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบแสดงดังตารางที่ 2.1 และปริมาณกรดไขมันที่พบได้ในน้ำมันงาจะมีความแตกต่างจากกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืช และไขมันสัตว์ชนิดอื่น ๆ แสดงดังตารางที่ 2.2

องค์ประกอบสำคัญที่อยู่ในงา คือ สารลิกแนน (Lignans) ซึ่งมีปริมาณไม่สูงมาก โดยสารลิกแนนในงา แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เซซามิน (sesamin) และเซซาโมลิน (sesamolin) (โครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพที่ 2.1) ซึ่งเป็นสารลิกแนนที่ละลายในน้ำมัน ส่วนสารลิกแนนที่ละลายได้ในน้ำ ได้แก่ sesaminol glucosides มีรายงานว่าสามารถพบสาร เซซามินได้ในพืชชนิดอื่น ๆ แต่สารเซซาโมลิน พบในงาเท่านั้น



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของเซซามิน (sesamin) และเซซาโมลิน (sesamolin)
ที่มา: Mahendra K. et al. (2011)

ตารางที่ 2.1 กรดไขมันชนิดต่าง ๆ ที่พบได้ในเมล็ดงา

กรดไขมัน	ร้อยละ
กรดโอเลอิก (Oleic acid; 18:1)	41.4
กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid; 18:2)	39.4
กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid; 16:0)	11.7
กรดสเตียริก (Stearic acid; 18:0)	5.2
กรดบีเฮนิก (behenic acid; 20:0)	0.6
กรดไลโนเลนิก (Linolenic acid; 18:3)	0.4
กรดอะแรคิดิก (Arachidic acid; 20:0)	0.4

ที่มา: ดัดแปลงจาก อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ (2556)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันชนิดต่าง ๆ

ชนิดของน้ำมัน	ปริมาณกรดไขมัน (ร้อยละ)			
	ชนิดอิ่มตัว	ชนิดไม่อิ่มตัว		
		ชนิดพันธะคู่ 1 พันธะ	ชนิดพันธะคู่หลายพันธะ	รวม
น้ำมันมะพร้าว	86	6	2	8
น้ำมันปาล์ม	48	38	9	47
น้ำมันหมู	38	53	9	62
น้ำมันฝ้าย	26	29	51	80
น้ำมันถั่วลิสง	19	46	30	76
น้ำมันรำข้าว	19	38	37	75
น้ำมันงา	15	40	40	80
น้ำมันถั่วเหลือง	15	23	58	81
น้ำมันมะกอก	14	72	9	81
น้ำมันข้าวโพด	13	25	58	83
น้ำมันดอกทานตะวัน	10	21	64	85
น้ำมันดอกคำฝอย	9	12	74	86

ที่มา: ดัดแปลงจาก อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ (2556)

2.1.2 วิธีการสกัดน้ำมันงา แบ่งออกเป็น 3 วิธี ดังนี้ (วาสนา วงษ์ใหญ่, 2550)

2.1.2.1 Hydrolic press หรือการใช้แรงอัดไฮโดรลิก เป็นวิธีที่ใช้กันมานาน และได้น้ำมันงาที่มีคุณภาพดีที่สุด การสกัด หรือการหีบน้ำมันแบบนี้จะไม่มีการใช้ความร้อน น้ำมันที่ได้จะมีสี กลิ่น รสชาติ และคุณค่าทางโภชนาการที่ใกล้เคียงกับในเมล็ดธรรมชาติมากที่สุด

2.1.2.2 Expeller method เป็นการสกัดน้ำมันโดยการใช้เกลียวหมุนบีบอัดอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิระหว่างทำงานจะค่อนข้างสูง คุณภาพของน้ำมันที่ได้จะไม่ดีเท่าวิธีการใช้แรงอัดไฮโดรลิก

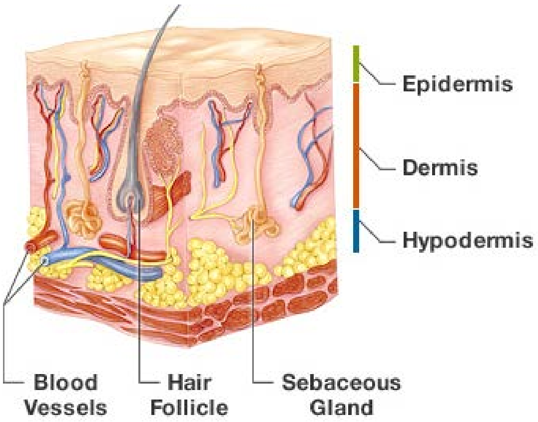
2.1.2.3 การสกัดโดยการใช้สารเคมี เช่นการใช้ออกเทน เฮกเซน เพนเทน เฮปเทน โดยวิธีการ คือ เมล็ดงาจะถูกบด ก่อนที่จะนำไปนึ่งด้วยไอร้อน จากนั้นจึง ใช้สารเคมีที่เป็นตัวทำละล าย เพื่อช่วยในการละลายน้ำมันออกมา เหลือกากแห้งของงาไว้ แล้วจึงแยกตัวทำละลายออก

2.1.3 คุณสมบัติของน้ำมันงาที่ดี

มีสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น มีความนุ่มนวลในรสชาติ ค่ากรด (Acid Value; AV) ที่ 0.1 กรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid, FFA) ที่ 0.05 ค่าเปอร์ออกไซด์ (PV) ที่ 2.0 ค่าไอโอดีน (Iodine value; IV) ที่ 103-116 และค่าสปอนนิฟิเคชั่น (Sponification; SP) ที่ 186-199 อย่างไรก็ตามน้ำมันงามีกลิ่นเฉพาะตัว สำหรับงาคั่วจะมีสีเหลืองเข้ม สารเซซาโมลินในน้ำมันงาช่วยให้น้ำมันงามีกลิ่นหอม การเก็บน้ำมันงาควรเก็บในขวดแก้วสีชาเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น

2.2 ชั้นผิวหนัง (บังอร ฉางทรัพย์, 2548)

ผิวหนังมนุษย์ประกอบด้วย 3 ชั้นหลัก คือ Epidermis, Dermis และ Subcutaneous fat (ภาพที่ 2.2) โดยมีลักษณะที่เฉพาะและหน้าที่แตกต่างกันในแต่ละชั้น



ภา

ที่มา: WebMD (2017)

2.2.1 ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) (บังอร ฉางทรัพย์, 2548)

เซลล์ keratinocyte (corneocyte) เป็นส่วนประกอบหลักของผิวหนังชั้นนี้ โดยเริ่ม จากบริเวณชั้นล่างสุด เรียกชั้นนี้ว่า basal layer เมื่อมีการแบ่งตัวจะเกิดเซลล์ใหม่ ๆ เรียกว่า daughter cell ซึ่งจะเคลื่อนที่ขึ้นสู่ด้านบนช้า ๆ จนถึงชั้นบนสุด ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า keratinication ในชั้น epidermis จะแบ่งเป็นชั้นย่อยต่าง ๆ ตามลักษณะของเซลล์ที่อยู่

2.2.1.1 basal layer คือ ชั้นล่างสุด ในชั้นนี้มีเซลล์รูปร่างสี่เหลี่ยมลูกเต๋า (cuboidal shape)

2.2.1.2 spinous layer ในชั้นนี้ประกอบไปด้วย keratin 1,10 ซึ่งเป็น keratin ที่มีความแข็งแรงมาก ทำให้ทนต่อแรงเสียดทานได้ดี Desmosome ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นมุมแหลมจะเห็นได้ชัดเจนมากในชั้นนี้ มีการผลิตโปรตีนและสารประกอบต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ชั้นนี้

2.2.1.3 granular layer เซลล์ในชั้นนี้จะพบ granule ที่เรียกว่า keratohyaline granules ซึ่งประกอบด้วย profilaggrin ซึ่งเป็น precursor ของ filaggrin ส่วน granular cells มีหน้าที่สำคัญในการสร้าง filaggrin, form cell envelope, สร้าง high-molecular-weight keratins และมีการทำลาย nucleus และ organelles ของ cells

2.2.1.4 horny layer เป็นชั้นที่อยู่บนสุดของ epidermis เรียกว่า stratum corneum ในชั้นนี้ไม่มี organelles อีกแล้ว และมีการเรียงตัวกันเหมือนกำแพงอิฐ ตัวที่เป็นเหมือนอิฐก็คือ keratinocytes ส่วนปูนที่เคลือบฉาบอิฐให้ติดกันนั้น คือ สารที่หลั่งออกมาจาก lamellar granules โดยส่วนประกอบหลักเป็น โปรตีนกับไขมัน โดยเซลล์ในชั้นนี้ไม่มีการทำงานใด ๆ หน้าที่หลักของผิวหนังชั้นบนสุดนี้ คือ protective barrier เช่น ป้องกันการระเหยของน้ำจากชั้นผิว (transepidermal water loss= TEWL) สารที่ได้จากการสลายตัวของ filaggrin ก็กลายไปเป็น natural moisturizing factor = NMF โดยทั้งหมดล้วนเป็นส่วนสำคัญในการให้คว ามชุ่มชื้น นุ่มนวล และยืดหยุ่นของผิว

2.2.2 ชั้นหนังแท้ (dermis) (บังอร ฉางทรัพย์, 2548)

ผิวหนังชั้น dermis อยู่ระหว่าง epidermis กับ subcutaneous fat เป็นชั้นที่กำหนดความหนาของผิวหนังบริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย เมื่อแก่ตัวลง ผิวหนังชั้น dermis นี้ก็จะบางลงด้วย ส่วนประกอบหลักของผิวหนังชั้น dermis คือ คอลลาเจน (collagen) โดยพบว่าในระหว่างเส้นใยคอลลาเจนนั้นจะถูกแทรกซึมไปด้วยเส้นประสาท เส้นเลือดและต่อมเหงื่อ แทรกตัวอยู่ด้านบนสุดของชั้น dermis ที่ติดกับ epidermis นั้นเราเรียกว่า papillary dermis ส่วนด้านล่างลงมาเรียกว่า reticular dermis ในชั้น papillary dermis นั้น พบเส้นใยคอลลาเจนที่มีขนาดเล็กกว่า มีจำนวนมากกว่าและพบเส้นเลือดอยู่หนาแน่นกว่า เมื่อเทียบกับชั้น reticular dermis เซลล์ที่เป็นส่วนประกอบหลักของผิวหนังชั้น dermis คือ ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ซึ่งมีหน้าที่สร้างคอลลาเจน

อีลาสติน (elastin) เมทริกซ์โปรตีน (matrix proteins) และเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น คอลลาจีเนส (collagenase) และ สโตรไมลีซิน (stromelysin)

นอกจากนี้ยังพบ immune cells เช่น mast cells, PMNs, lymphocytes, macrophages ในผิวหนังชั้นนี้อีกด้วย

2.2.2.1 คอลลาเจน

คอลลาเจน เป็นโปรตีน ที่มีความแข็งแรงมากที่สุด โดยก่อให้เกิดความแข็งแรง และยืดหยุ่นอย่างมาก ต่อผิวหนัง คอลลาเจน นั้นเป็นเป้าหมายหลักของตลาดเครื่องสำอางในปัจจุบัน รวมทั้งการพัฒนาด้านความงามและการชะลอความแก่ (antiaging medicine

คอลลาเจน ประกอบไปด้วย โปรตีน 18 ชนิด โดยเราจะพบ คอลลาเจน ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วในผิวหนังชั้นบน ตรงกันข้ามกับ อีลาสตินซึ่งจะพบ อีลาสตินที่เป็น immature fibers ในผิวชั้นบน ส่วน mature elastin กลับพบมากที่ด้านล่างของผิวหนังชั้น dermis

คอลลาเจนถูกสร้างขึ้นในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็น procollagen ก่อน แล้วจึงเปลี่ยนเป็นคอลลาเจนโดยผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งใช้วิตามินซี และ Fe^{++} เป็นส่วนสำคัญ ดังนั้นในคนไข้ที่ขาดวิตามินซีจะมีการสร้างคอลลาเจนลดลงอย่างมาก เรียกชื่อโรคนี้ว่า scurvy

ชนิดของคอลลาเจนที่พบในผิวหนังชั้น dermis มีดังนี้

(1) คอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นส่วนประกอบ ร้อยละ 80-85 ของ dermis จึงเป็นตัวหลักที่บ่งชี้ถึงความแข็งแรงของผิวหนังชั้น dermis ในคนอายุมากและในผิวที่ถูกแสงแดดมานาน พบว่าจำนวนของคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีจำนวนลดลงอย่างชัดเจน จึงเป็นที่เชื่อได้ว่า คอลลาเจนชนิดที่ 1 นั้นเป็นตัวบ่งชี้ถึง skin aging ที่สำคัญ

(2) คอลลาเจนชนิดที่ 3 เป็นตัวที่พบรองลงมา โดยพบอยู่ร้อยละ 10-15 มีขนาดเส้นใยที่เล็กกว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า fetal collagen พบคอลลาเจนชนิดที่ 3 มากในระยะ embryo และจะพบมากรอบ ๆ เส้นเลือดและบริเวณใต้ชั้น epidermis

(3) คอลลาเจนชนิดที่ 4 พบบริเวณ basement membrane zone

(4) คอลลาเจนชนิดที่ 5 พบทั่วไปในชั้น dermis ประมาณร้อยละ 4-5

(5) คอลลาเจนชนิดที่ 7 พบบริเวณ Demalepidermal Junction (DEJ) โดยเป็น anchoring fibrils

(6) คอลลาเจนชนิดที่ 17 พบบริเวณ hemidesmosome

2.2.1.2 อีลาสติน (elastin) (จารุภา, 2560)

อีลาสตินเป็นเส้นใยโปรตีนที่มีความยืดหยุ่น ช่วยให้เนื้ อเยื่อคืนรูปร่างหลังจากถูกยืด หรือทำให้หดตัว อีลาสตินเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ที่มีต้นกำเนิดมาจากโทรโปอีลาสติน (tropoelastin) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นขดอย่างไม่มีแบบแผน ส่วนใหญ่พบกรดอะมิโนที่มี

ขนาดเล็ก ซึ่งไม่มีขั้ว เช่น ไกลซีน และอะลานีน นอกจากนี้ยังพบโปรลีนและไลซีน ส่วนไฮดรอกซีโปรลีน และไฮดรอกซีไลซีนนั้น พบในปริมาณเล็กน้อย โทรโปอีลาสตินผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ แล้วถูกขับออกมานอกเซลล์ โทรโปอีลาสตินที่เป็นอิสระ จะเข้าสู่กระบวนการสร้างเส้นใยอีลาสตินที่มีความสมบูรณ์ เพื่อให้มีการเชื่อมต่อกันระหว่างสายด้วยพันธะเคมีและได้เป็นเส้นใยอีลาสติน พันธะเคมีที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากเอนไซม์ไลซิ ลออกซิเดสร่วมกับมีไอออนคอปเปอร์ เป็นปัจจัยร่วม การเชื่อมโยงส่งผลให้เกิดเส้นใยอีลาสตินที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ และมีความยืดหยุ่นสูง

ในชั้นหนังแท้ จะพบเส้นใยอีลาสตินใน 3 รูปแบบ ได้แก่ ออกซีทาแ ลน (oxytalan) อีลายูนิน (elaunin) และอีลาสติน (elastin fiber) เส้นใยอีลาสตินทั้ง 3 รูปแบบ มีโครงสร้างที่แตกต่างกันตามลำดับของกระบวนการเกิดอีลาสติน

เส้นใยคอลลาเจน และอีลาสตินมี โครงสร้างและ องค์ประกอบแตกต่างกันดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบโครงสร้างและองค์ประกอบของคอลลาเจน และอีลาสติน

คอลลาเจน	อีลาสติน
โครงสร้างประกอบด้วยเพปไทด์ 3 สายบิดเกลียว (triple helix)	โครงสร้างเป็นขดอย่างไม่มีแบบแผน (random coil conformation)
ลำดับกรดอะมิโนจัดเรียงตัวซ้ำ ๆ	ไม่มีการจัดเรียงตัวซ้ำ ๆ
กรดอะมิโนที่พบมากในโครงสร้าง คือ ไกลซีน โปรลีน และไฮดรอกซีโปรลีน	กรดอะมิโนที่พบมากในโครงสร้าง คือ ไกลซีน โปรลีน อะลานีน และไลซีน
มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง	ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง
เกิดการเชื่อมโยงกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ผ่านหมู่อัลดีไฮด์ของกรดอะมิโน โดยอาศัยไลซิลออกซิเดสเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีของไลซีนและของไฮดรอกซีไลซีนไปเป็นหมู่อัลดีไฮด์	เกิดการเชื่อมโยงกันด้วยโครงสร้างทางเคมีที่เรียกว่าเดสโมซีน หรือไอโซเดสโมซีน โดยอาศัยไลซิลออกซิเดสเปลี่ยนไลซีนให้เป็นอัลไลซีน

ที่มา: จารุภา วิโยชน์ (2560)

2.2.1.3 Glycoprotein

Glycoprotein มีหน้าที่เกี่ยวกับ cell migration, cell adhesion, และ cell orientation Glycoprotein ที่พบมากที่สุดใน dermis คือ fibronectin และ tenascin fibronectin เป็น filamentous Glycoprotein ที่มีส่วนสำคัญในการยึดเกาะของเกร็ดเลือดกับ collagen และมีบทบาทสำคัญในขบวนการเกิด granulation tissue และ re-epithelialization Tenascin พบเฉพาะบริเวณ papillary dermis เท่านั้น ดังนั้นความสำคัญของ Glycoprotein ก็คือ tissue remodeling และ wound healing นั่นเอง

2.2.1.4 Glycosaminoglycans (GAGs)

GAGs เป็น polysaccharide chains ซึ่งยึดเกาะอยู่กับ core proteins มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับ salt and water balance GAGs ที่พบมากที่สุดใน dermis คือ hyaluronic acid และ dermatan sulfate hyaluronic acid นั้นมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับ cell growth, cell membrane receptor, cell adhesion พบ hyaluronic acid อยู่ทั่ว ๆ ไปในชั้น dermis โดยเฉพาะในบริเวณที่ cell ไม่หนาแน่น โดย hyaluronic acid จะฉาบอยู่รอบ ๆ คอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติน และช่องว่างระหว่างเซลล์ต่าง ๆ โดยพบว่าในคนแก่ จะมี hyaluronic acid ลดลงอย่างมากในชั้น dermis ดังนั้นจึงเป็นที่มาของผลิตภัณฑ์เสริมความงามต่าง ๆ ที่ช่วยเพิ่ม hyaluronic acid ให้กับผิว โดยจะฟื้นความชุ่มชื่นให้กับผิวในวัยชราได้ รวมทั้งใช้ hyaluronic acid เป็นสารเติมเต็มโดยฉีดเข้าสู่ผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอยชนิด

2.2.3 Hypodermis (Subcutaneous tissue) (บังอร ฉางทรัพย์, 2548)

อยู่ใต้ชั้น dermis ลงไป ประกอบไปด้วย fat cells เป็นหลัก โดยเป็นแหล่งสำคัญของพลังงานสะสมของร่างกาย เมื่ออายุมากขึ้นไขมันในชั้น subcutaneous จะลดลง โดยอาจจะหายไปหรือมีการสะสมบริเวณหน้าท้องหรือต้นขา จึงเป็นที่มาของการดูดไขมันออกจากบริเวณหน้าท้องและต้นขา แล้วนำไปเติมเต็มในส่วนของแก้มและคาง

2.3 อนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์, 2550)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือ สารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว อยู่ในออร์บิทัลนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูงสุด รวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและอิออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอิสระที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไว สูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระบางชนิดมีความเสถียร ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา และสามารถคงสภาพอนุมูลได้นาน ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) อนุมูลไฮดรอกซี (${}^{\bullet}OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\bullet}$) และอนุมูลไฮโดรเปอร์ออกซิล ($HOO_2^{\bullet}$) อนุมูล

อิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก ขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรือ อนุมูลไนตริกออกไซด์ (˙NO) อนุมูลวิตามินอีและอนุมูลวิตามินซี เป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงรองลงมา

อนุมูลอิสระ และสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลที่มีบทบาททางชีววิทยา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดจัดอยู่ใน 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนเตรท

2.3.1 การเกิดอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจน อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) และอนุมูลไฮดรอกซี (˙OH) เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่า อนุมูลอื่น ๆ ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเปอร์ออกซีไนเตรท ($ONOO^-$) แม้ว่าโครงสร้างไม่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ แต่เป็นสารที่ได้จากปฏิกิริยาต่อเนื่องที่มีอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ สารที่ไม่ได้อยู่ในรูปอนุมูลอิสระเหล่านี้มีบทบาทในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมาก และมีความเป็นพิษสูง เรียกสารที่ว่านี้ว่าสารไวสูง (reactive species, RS)

2.3.2 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค

อนุมูลอิสระมีความสำคัญในกระบวนการเกิดโรค ทั้งเป็นต้นเ หตุ และเป็นปัจจัยที่ทำให้โรคพัฒนาอย่างรวดเร็ว และมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อม และความบกพร่องของเซลล์ประสาท และระบบสื่อสารในสมอง นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เป้าหมายแรกที่อนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหายและเป็นสาเหตุของการเกิดโรค คือ ขีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์ ได้แก่ ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเ อนไซม์ รีเซปเตอร์ สารสื่อประสาทและดีเอ็นเอ ทั้งนี้เนื่องจาก ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ เป็นสารชีวโมเลกุล ที่มีอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนที่หลุดออกได้ง่าย ทำให้อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยจับคู่เข้ากับอิเล็กตรอนของสารชีวโมเลกุล หรือดึงอิเล็กตรอน หรืออะตอมไฮโดรเจนของสารชีวโมเลกุลนั้น ๆ สารชีวโมเลกุลเหล่านี้ถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ ทำให้คุณสมบัติ และการทำง านของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป เกิดความบกพร่อง หรือถูกทำลาย อันเป็นต้นเหตุของการเกิดโรค

2.3.3 การป้องกันอันตรายและความเสียหายจากอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ ที่เกิดขึ้นในเซลล์ร่างกายมีหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษ อนุมูลอิสระบางชนิดทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่ อเซลล์ และบางชนิดมีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย แต่หากเกิดภาวะผิดปกติทำให้กลไกป้องกันบกพร่องไม่สามารถควบคุมสภาวะสมดุลได้ จะทำให้เกิดภาวะ

อนุมูลอิสระและสารออกซิแดนท์มากเกินสมดุล (oxidative stress) กลไกที่ช่วยในการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระได้แก่

2.3.3.1 เอนไซม์ในระดับเซลล์ เอนไซม์เป็นกลไกแรกที่ช่วยควบคุมให้อนุมูลอิสระอยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Superoxide dismutase, SOD) เอนไซม์คาตาเลส (Catalase, CAT) เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx) และเอนไซม์ไทโอรีด็อกซินรีดักเตส (Thioredoxin reductase TR)

2.3.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ สารขจัดหรือกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenger) สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือ หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารกำจัดอนุมูลอิสระที่มีตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริค บิลิรูบิน ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุ ดปฏิกิริยาลูกโซ่การเกิดอนุมูล โดยสารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ มีส่วนสำคัญในการทำให้ปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิ เดชันสิ้นสุดลง

2.3.3.3 สารคีเลทโลหะ (metal chelator) สารคีเลทโลหะช่วยในการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เนื่องจากโลหะทรานซิชัน เช่น ธาตุเหล็ก และทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ

2.3.4 ผลของอนุมูลอิสระต่อผิวหนัง (วิชิต, 2547)

มนุษย์อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เต็มไปด้วยออกซิเจน และขบวนการชีวเคมีของเซลล์ในร่างกายจะผลิต ROS ออกมาตลอดเวลา ถ้าไม่มีการควบคุม ก็จะเกิดการทำลายเซลล์ สำหรับผิวหนังซึ่งเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุด และอยู่ภายนอกทำให้ต้องสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม เช่น แสงแดด ความร้อน ความเย็น หรือสารเคมี แ ละปัจจุบันมีหลักฐานจำนวนมากที่บ่ งชี้ว่า oxidative stress ที่สำคัญที่สุดของผิวหนังมาจาก UV ในแสงแดด ผลจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเ ลตที่ผิวหนังจะเกิด lipid peroxidation, lipid radical, melanin radical และการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติในร่างกาย ทั้งชนิดเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาที่เกิดจาก oxygen dependent photosensitization ที่รู้จักกันดีจาก endogenous sensitizers ได้แก่ porphyrins, flavins, melanins และ tryptophan metabolites ล้วนผ่าน ROS ทั้งสิ้น

การเปลี่ยนแปลงทางคลินิกที่ผิวหนัง 3 ชนิดที่เป็นผลของแสงแดด โดยผ่านอนุมูลอิสระได้แก่ photocarcinogenesis, photoaging และ photodermatosis บางประเภท สำหรับผิวหนังชราจากแสงแดด มีการศึกษาว่า อนุมูลอิ สระทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคอลลาเจน และพบว่าบริเวณผิวหนังที่มี photoaged จะมีเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก ซึ่งเม็ดเลือดขาวเหล่านี้สามารถปล่อย ROS ออกมาทำลายคอลลาเจนได้

2.4 รังสียูวีกับผิวหนังแก่ก่อนวัย (จารุภา วิโยชน์, 2560)

2.4.1 คอลลาเจนถูกทำลาย

ผิวหนังที่เสื่อมสภาพเนื่องจากรังสียูวี มักมีลักษณะหย่อนยานเป็นริ้วรอยลึก สีผิวเข้มในบางจุด โดยพบว่าปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ คอลลาเจนมีปริมาณน้อยลง ขาดความยืดหยุ่น และองค์ประกอบต่าง ๆ เช่น อีลาสติน โปรติโอไกลแคน และกลูโคสะมิโนไกลแคน มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้พบจำนวนเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น มาสท์เซลล์ (mast cell) และนิวโทรฟิล (neutrophils) ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะพบได้น้อยในเซลล์ผิวหนังของผู้สูงอายุ ทำให้การต้านทานต่อสิ่งแปลกปลอมลดลง

2.4.2 รังสียูวีกับการทำลายดีเอ็นเอและผลิต ROS

โมเลกุลที่อยู่ในชั้นผิวหนัง เช่น พอไฟริน (porphyrins), เธอริน (pterins), บิลิรูบิน (bilirubin) และกรดทรานสยูโรคานิค (trans urocanic acid) เป็นต้น ถูกกระตุ้นหลังจากได้รับรังสียูวีเอและทำปฏิกิริยากับออกซิ เจนได้ผลเ ป็น singlet oxygen ซึ่งเป็นอนุมู ลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นส่วนประกอบ หรือ ROS ซึ่ง ROS สามารถทำลายโครงสร้าง DNA โปรตีน ไขมัน และแซ็กคาไรด์ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ และรังสียูวีเอสามารถทำลาย DNA ได้โดยตรง และเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์มะเร็ง นอกจากนั้นรังสียูวีเอยังส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ผลิต Matrix metalloproteinases (MMPs) มากขึ้น

รังสียูวีเอแล ะยูวีบียังก่อให้เกิดการผลิตซุปเป อร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, O_2^-) ซึ่งซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนที่เกิดขึ้นจำนวนหนึ่งจะ ถูกเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเป อร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเป อร์ออกไซด์นี้สามารถทำปฏิกิริยากับเฟอรัส เรียกว่าปฏิกิริยาเฟนตัน (fenton reaction) ได้ผลผลิตเป็นไฮดรอกซิลแรดิเคิล (hydroxyl radical, ^-OH) ที่มีความเป็นพิษสูง ทำให้การสังเคราะห์ DNA และโปรตีน รวมทั้งการแบ่งเซลล์บกพร่อง นอกจากนี้ไฮดรอกซิลแรดิเคิลยังทำให้ไขมันที่ไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นองค์ประกอบข องผนังเซลล์ เกิดปฏิกิริยาลิพิดเป อร์ออกซิเดชัน ส่งผลให้ผนังเซลล์สูญเสียความแข็งแรง

นอกจาก ROS แล้ว อนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ หรือ RNS เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ก็มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นไฟโบรบลาสต์ผลิต MMPs เช่นกัน

2.4.3 รังสียูวีกับการกระตุ้นไซโตไคน์ (cytokines) และโกรธแฟคเตอร์ (growth factors)

การทำงานของไฟโบรบลาสต์ถูกควบคุมด้วยไซโตไคน์และโกรธแฟคเตอร์ รวมทั้งการผลิตเอนไซม์และองค์ประกอบของเมทริกซ์นอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์นั้น ยังขึ้นอยู่กับการทำงานของรีเซปเตอร์และไซโตไคน์ และโกรธแฟคเตอร์ที่มีอยู่ในเซลล์

MMPs นั้นถูกผลิตจากการที่รั งสียูวีกร ะตุ้นรีเซปเตอร์ ที่มีตำแหน่งอยู่บริเวณที่ผิวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ การกระตุ้นการทำงานของรีเซปเตอร์ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดี แต่เป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการที่รังสียูวีไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) นอกจากกระตุ้นรีเซปเตอร์แล้วรังสียูวียังสามารถกระตุ้นการทำงานของนิวเคลียร์แฟคเตอร์- แคปปาบี หรือเอ็นเอฟ- แคปปาบี (nuclear factor-KB, NF-KB) ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่ผลิตไซโตไคน์ต่าง ๆ รวมทั้งโกรธแฟคเตอร์และเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน

รังสียูวีเอและยูวีบีกระตุ้นให้ไฟโบรบลาสต์ผลิตอีลาสเตส (elastase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยอีลาสติน ส่งผลให้ผิวหนังสูญเสียความยืดหยุ่นและเกิดริ้วรอย ทั้งนี้การกระตุ้นการผลิตอีลาสเตสโดยรังสียูวีนั้น ส่วนหนึ่งเกิดจากการกระตุ้นให้คีราติโนไซต์ และ /หรือไฟโบรบลาสต์ปลดปล่อยไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ นอกจากนั้นรังสียูวียังกระตุ้ นให้ไฟโบรบลาสต์ผลิตเนปริลีซีน (neprilysin) ซึ่งเชื่อว่าเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับอีลาสเตสทำหน้าที่ย่อยนิวโรเพปไตด์ (neuropeptides) หลายชนิด ส่งผลให้นิวโรเพปไตด์ที่ผิวหนังลดลง นำไปสู่การเสื่อมสภาพของผิวหนัง

2.4.4 รังสียูวีกับการลดการสร้างโปรคอลลาเจน (procollagen)

นอกจากการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ MMPs แล้ว รังสียูวียังส่งผลให้โปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 ลดลง รวมทั้งทำให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลง

2.5 เอนไซม์

เอนไซม์ เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีน และมหชีวโมเลกุลอื่น ๆ คือ มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารที่ทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า สารตั้งต้น (substrate) และสามารถทำงานโดยเอนไซม์จะไม่เปลี่ยนรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เอนไซม์สามารถเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา และลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาได้

2.5.1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรติเน ส (metrix metalloproteinases, MMPs) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเมทริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ โดยมีแคลเซียมและสังกะสีเป็น co-factor เอนไซม์นี้ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเมทริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วยคอลลาเจน อีลาสติน และไกลโคสมิโนไกลแคน MMPs แต่ละชนิดจะมีความจำเพราะกับสับสเตรทต่างกัน ในช่วงแรก จึงเรียกตามชื่อสับเสตรทที่จำเพราะ เช่น คอลลาจีเนส (collagenase), เจลาติเนส (gelatinase) และเมทัลโลอีลาสเตส (metalloelastase) เป็นต้น แต่ในปัจจุบัน MMPs แต่ละชนิดสามารถจำเพาะกับสับเสตรท

ได้หลายชนิด บางสับเสตรทก็จำเพาะกับ MMPs มากกว่า 1 ชนิด จึงปรับการเรียกชื่อเป็นลำดับแทน เช่น collagenase เปลี่ยนเป็น MMP-1 และ gelatinase A เปลี่ยนเป็น MMP-2 เป็นต้น (สหพัฒน์, 2550) เอนไซม์ คอลลาจีเนสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มโปรติเอสที่สามารถย่อยสลาย native collagen ได้ โดยทั่วไปเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ย่อยคอลลาเจนจะต้องมี Zn2+ เป็นโคแฟคเตอร์บริเวณเร่ง ซึ่งจัดเป็นเมทัลโลโปรติเนส บางชนิดจัดเป็นซีรีนโปรติเนสและโปรติเอสอื่นๆรองลงมา เอนไซม์คอลลาจีเนสชนิดเมทัลโลโปรติเนสย่อยสลายสายคอลลาเจนตรงพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนชนิดอื่นๆกับไกลซีน-โพรลีน (Watanabe, 2004)

MMPs จำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ขึ้นอยู่กับประเภทของชีวโมเลกุลที่เอนไซม์นี้จะเข้าไปย่อย ได้แก่

2.5.1.1 กลุ่มคอลลาจีเนส เช่น MMP-1 ทำหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจนที่ขดกันเป็นเกลียว (triple-helical structure) ให้แยกออกจากกัน เพื่อให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดอื่นรวมทั้ง MMPs เข้าไปย่อยสลายต่อ

2.5.1.2 กลุ่มคอลลาจีเนส ชนิดที่ 4 ที่มีขนาด 72 และ 92 กิโลดาลตัน (72 and 92 kd IV collagenase) หรือมีชื่อเรียกว่า เจลาติเนส เช่น MMP-9 สามารถย่อยคอลลาเจนที่อยู่บริเวณเยื่อฐาน (basement membrane) ตรงรอยต่อระหว่างชั้นหนังแท้และหนังกำพร้า รวมทั้งสามารถย่อยเจลาติน และคอลลาเจนที่ถูกแปรสภาพโดยคอลลาจีเนสมาก่อน

2.5.1.3 กลุ่มสโตรมีไลซิน (stromelysins) เช่น MMP-3 สามารถย่อยสารได้หลายชนิด เช่น เจลาติน, ไฟโบรเนคติน, โปรติโอไกลแคน และลามินิน (laminin) รวมทั้งกระตุ้น proMMP-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในรูปแบบที่ไม่สามารถทำงนได้ ไปเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้

การทำงานของ MMPs ถูกยับยั้งได้โดยทิชชูอินฮิบิเตอร์ออฟเมทริกซ์เมตัลโลโปรติเนสหรือทิมป์ (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) และการทำงานของทิมป์จะ ถูกยับยั้งโดย ROS ส่งผลให้เมทริกซ์นอกเซลล์ในผิ วหนังที่ได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง มีปริมาณลดลงจากการทำลายโดย MMPs เนื่องจากสมดุลของ MMPsและทิมป์เปลี่ยนแปลงไปในแนวทางที่ส่งผลให้กิจกรรมของ MMPs เพิ่มขึ้น (จารุภา วิโยชน์, 2560)

2.6 ช่องทางการซึมผ่านผิวหนัง (route of penetration) (ปราณีต โอปณโสภิต, 2557)

ช่องทางการซึมผ่านผิวหนังมี 2 ทางคือ

(1) ผ่านทางรูเปิด หรือ ท่อบนผิวหนัง

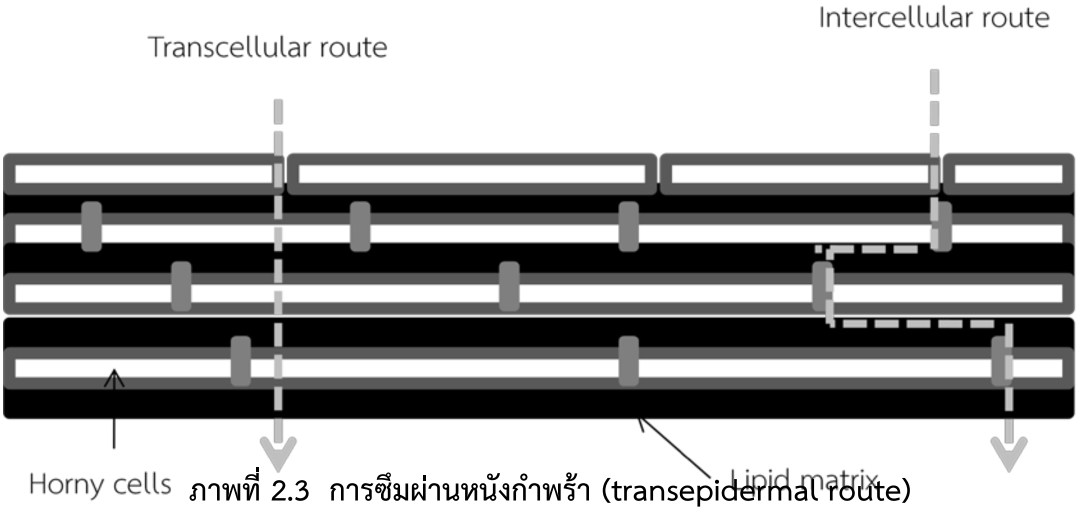
(2) ผ่านทางหนังกำพร้า ซึ่งแบ่งเป็น 2 ช่องทางคือ ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular route) และผ่านทางเซลล์ของผิวหนัง (transcellular route)

2.6.1 การซึมผ่านทางรูเปิดบนผิวหนัง (transappendageal route)

ได้แก่ รูขุมขน ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน ซึ่งยอมให้สารที่เป็นโพลาร์ และโมเลกุลใหญ่ซึมผ่านได้ แต่พื้นที่เหล่านี้มีเพียง 0.1% ของพื้นที่ผิวหนัง จึงไม่ช่วยในการซึมผ่านมากนัก นอกจากนี้ยังจะต้องสวนทางกับการหลั่งของเหงื่อ หรือไขมันอีกด้วย

2.6.2 การซึมผ่านทางหนังกำพร้า (transepidermal route)

ชั้นที่มีความสำคัญต่อการซึมผ่าน คือ ชั้นสตราตัมคอร์เนียม การซึมผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular route) และการซึมผ่านทางเซลล์ของผิวหนัง (transcellular route) แสดงดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 การซึมผ่านหนังกำพร้า (transepidermal route)

ที่มา: ดัดแปลงจาก ปราณีต โอปณโสภิต (2557)

2.6.2.1 การซึมผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ ระหว่างเซลล์ในชั้น สตาร์ตัมคอร์เนียม ประกอบด้วยของเหลวที่เป็นไขมันหลายชนิด เช่น phospholipids, fatty acid, chloresterol, triglycerides และ ceramides ดังนั้นสารที่จะซึมผ่านชั้นนี้ ควรที่จะละลายได้บ้างในไขมัน แต่ก็ไม่ควรที่จะละลายดีเกินไป ไม่เช่นนั้นตัวยาจะถูกจับไว้ที่ชั้นนี้จนหมด ไม่สามารถซึมผ่านสู่ผิวหนังชั้นอื่นได้ ยาควรมีสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคใกล้เคียงกับ 1

2.6.2.2 การซึมผ่านเซลล์ เซลล์ของสตาร์ตัมคอร์เนียม เป็นเซลล์ที่ตายแล้วไม่มีนิวเคลียส ส่วนประกอบหลักเป็นโปรตีน และเคราติน เซลล์มีการเรียงตัวกันอย่างหน าแน่น โครงสร้างคล้ายเส้นใย ค่อนข้างแห้งและกึ่งแข็ง ต่างจากเซลล์ชั้นใน และหนังแท้ที่ชุ่มชื้น ดังนั้นสารต่าง ๆ ที่จะผ่านเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม ควรเป็นสารที่ละลายน้ำดี

2.6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซึมผ่านทางผิวหนัง (ปราณีต โอปณโสภิต, 2557)

2.6.3.1 ปัจจัยทางชีวภาพ

1) อายุผิวหนัง อายุของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์ในการซึมของตัวยาเข้าสู่ผิวหนัง โดยผิวหนังของทารก มีการซึมผ่านของตัวยาได้ดีกว่าวัยหนุ่มสาว

2) สภาพผิวหนัง เมื่อผิวหนังอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ มันจะทำหน้าที่ต้านการซึมผ่านของสารต่าง ๆ แต่เมื่อมีสิ่งใดมาทำลายชั้นผิวหนังไป การซึมผ่านของสารก็จะมากยิ่งขึ้น

3) ตำแหน่งของผิวหนัง เนื่องจากชั้นสตราตัมคอร์เนียมมีความหนาของผิวหนังที่แตกต่างกันตามบริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาจึงแปรเปลี่ยนไปตาม ความหนา โครงสร้างของชั้นสตราตั มคอร์เนียม ความหนาแน่นของรูขุมขน ต่อมเหงื่อ และต่อมไขมัน และอัตราการดูดซึมสารชนิดเดียวกันของแต่ละคนก็แตกต่างกันด้วย

4) เมตาบอลิสมในผิวหนัง ในชั้นผิวหนัง viable epidermis และชั้นหนังแท้ มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและทำลายสาร การนำส่งยาทางผิวหนังควรที่จะคำนึงถึงปัจจัยนี้ เพราะหากยาถูกเมตาบอลิสมที่ผิวหนัง อาจทำให้ยาไม่ออกฤทธิ์ หรือมีอาการข้างเคียงได้

5) การหมุนเวียนของโลหิต การหมุนเวียนของโลหิตมีผลต่อการซึมผ่านของยาทางผิวหนัง การซึมผ่านจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการหมุนเวียนของโลหิตมากยิ่งขึ้น

6) ความแตกต่างของสัตว์แต่ละชนิด สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีลักษณะผิวแตกต่างกัน โดยสัตว์จะมีรูขุมขนมากกว่าคน และไม่มีต่อมเหงื่อ จึงมีผลต่อช่องทางหลักที่ตัวยาจะซึมผ่านเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นในการศึกษาการซึมผ่านของตัวยาของสัตว์ทดลองที่มีขนที่ผิวหนัง มาก จึงต้องมีการโกนขนออก

2.6.3.2 ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม

1) ความชื้น (skin hydration) เมื่อผิวหนังมีความชุ่มชื้น ชั้นสตราตัมคอร์เนียมของผิวหนังจะเกิดการพองตัว ส่งผลให้การซึมผ่านขอ งตัวยาผ่านชั้นผิวหนังมีอัตราเพิ่ มขึ้นอย่างรวดเร็ว

2) อุณหภูมิ อุณหภูมิมีผล 2 ทางคือ เพิ่มพลังงานจลน์ให้กับสารสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น และมีผลต่อสรีรวิทยาของผิวหนัง โดยทุก ๆ 10 องศาที่เปลี่ยนไป การซึมผ่านผิวจะเปลี่ยนไปประมาณ 2 เท่า และอุณหภูมิที่สูงขึ้น มีผลทำให้ระบบหมุนเวียนโลหิตเพิ่มมากขึ้น

2.6.3.3 ปัจจัยจากระบบนำส่งยา

1) สมบัติทางเคมีกายภาพของตัวยา ยาที่มีโมเลกุลใหญ่ จะมีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งค่าสัมประสทธิ์การแพร่เป็นสัดส่วนกลับกับรากที่สองของน้ำหนักโมเลกุล ยาที่มีคุณสมบัติการแพร่ผ่านผิวหนังดี ควรมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 600 Da นอกจากนี้ควรมีสมบัติทางเคมีกายภาพอื่น ๆ ที่เหมาะสม เช่น ค่า Log P (partition coefficient) ประมาณ 1 ค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าความเข้มข้นของยา การจับกันของยากับผิวหนัง

2) สมบัติทางเคมีกายภาพของระบบนำส่งยา

2.1) ผลของกระสายยาต่อความชุ่มชื้นของผิวหนัง ในชั้นผิวหนังมีสารที่มีความจำเป็นในการควบคุมปริมาณน้ำของสตราตัมคอร์เนียม ไม่ให้ต่ำกว่า 20% เพื่อให้ผิวหนังมีความอ่อนนุ่ม เมื่อต้องการให้มีการซึมผ่านของยามากขึ้น ต้องทำให้ผิวหนังเกิดการ hydration มากขึ้น โดยการใช้สารที่ช่วยให้เกิดแผ่นฟิล์มปกคลุมผิวหนัง เพื่อลดการสูญเสียน้ำ เพิ่มความชุ่มชื้น และช่วยเพิ่มอัตราการซึมผ่านของตัวยา

2.2) ผลของกระสายยาต่อการปลดปล่อยยา ความชอบของกระสายยากับโมเลกุลยา มีผลต่อการปลดปล่อยโดยทั่วไป ถ้ายาปลดปล่อยจากระบบนำส่งง่าย จะมีอัตราการซึมผ่านที่สูงขึ้น กลไกการปลดปล่อยยาขึ้นกับโมเลกุลของยาละลาย หรือแขวนลอยในระบบนำส่งยา และค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของยาจากระบบนำส่งยาไปยังผิวหนัง

2.3) ส่วนประกอบของระบบนำส่งยา ส่วนประกอบของระบบนำส่งยา มีอิทธิพลต่อค่าการดูดซึมผ่านผิว หนังของยา ไม่เพียงแต่มีผลต่ออัตราการปลดปล่อยยา แต่มีอิทธิพลต่อการซึมผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม ตัวอย่างของสารที่มีอิทธิพลต่อการซึมผ่านยา เช่น methyl salicylate จะมีการซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่า salicylic acid เนื่องจากมีความชอบไขมัน (lipophilic) มากกว่า

2.7 วิธีการเพิ่มการดูดซึมผ่านผิวหนัง (ปราณีต โอปณโสภิต, 2557)

2.7.1 Drug or vehicle interactions

2.7.1.1 Drug หรือ Prodrug โดยการเลือกยาที่มีคุณสมบัติในการซึมผ่านผิวหนังได้ดี เช่น มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 600 Da มีค่า LogP 1-3 มีการละลายในน้ำมันได้ดี จุดหลอมเหลวต่ำ หรือปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีให้เป็น บรรพเภสัช (prodrug) ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเพิ่มการแพร่ของโมเลกุลเข้าสู่ผิวหนัง

2.7.1.2 วิธีการทางเคมี โดยการเตรียมยาให้มีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น ซึ่งยาที่มีการละลายเพิ่มขึ้น จะมีการซึมผ่านที่สูงขึ้นกว่าปกติ

2.7.1.3 ion pair หรือ complex coacervation การเพิ่มการซึมผ่านตัวยา โดยการปรับปรุงยาให้มีประจุ

2.7.1.4 Eutectic system เป็นการผสมสาร 2 ชนิด เพื่อให้มีจุดหลอมเหลวที่ลดลง ช่วยในการซึมผ่านผิวหนังได้

2.7.2 การดัดแปลงชั้นสตราตัมคอร์เนียม เช่นการทำให้ผิวหนังมีความชุ่มชื้นมากยิ่งขึ้น หรือการใช้สารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง เพื่อให้มีผลช่วยในการเปลี่ยนแปลงสภาพผิวหนังให้มีความเหมาะสมหรือส่งเสริมการซึมผ่านของตัวยา สารเร่งการซึมผ่านจะไปจับกับโปรตีน หรือไขมันในชั้นสตราตัมคอร์เนียม ทำให้ผิวหนังจัดเรียงตัวกันหลวมขึ้น ตัวยาจึงแพร่ผ่านได้ง่ายขึ้น

2.7.3 การลอก หรือข้ามผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม เช่นการใช้สารเคมี เลเซอร์ หรือเทป ลอกชั้นสตราตัมคอร์เนียมออก การใช้วิธี micro needle array มาจัดเรียงกันในปริมาณที่มากพอ เพื่อช่วยนำส่งตัวยาไปยังชั้น viable epidermis หรือ dermis และการนำส่งข้ามชั้นสตราตัมคอร์เนียมอีกวิธี คือ การส่งทางรูขุมขน

2.7.4 การใช้เครื่องมือช่วยในการนำส่ง เช่น วิธีโฟโนโฟเรซิส เป็นการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง วิธีไอออนโตโฟเรซิส โดยการใช้กระแสไฟฟ้าความแรงต่ำ วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน วิธีช่วยในการซึมผ่านยาโดยการลดความต้านทานของผิวหนัง

2.7.5 ระบบนำส่งในรูปแบบคอลลอยด์ หรืออนุภาค การใช้ระบบนำส่งที่มีขนาดนาโนในการนำส่งสารผ่านผิวหนัง เช่น การใช้ลิโพโซม solid lipid nanoparticles (SLN) และ nano structured lipid carriers (NLC)

2.8 ระบบนำส่งโดยใช้ไขมัน

2.8.1 อนุภาคไขมันแข็งระดับนาโนเมตร (solid lipid nanoparticles)

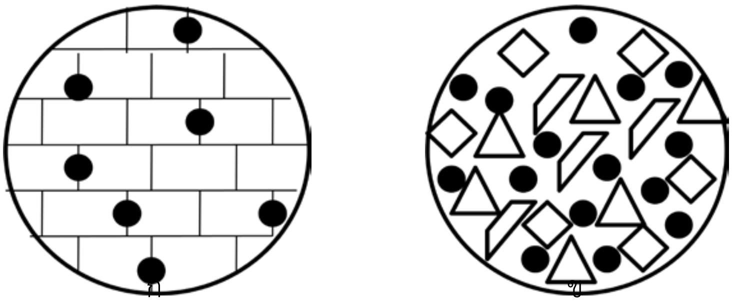
(วันดี รังสีวิจิตรประภา, 2554)

อนุภาคไขมันแข็งระดับนาโนเมตร เตรียมได้โดยการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยใช้สารห่อหุ้มประเภทไขมัน เมื่อเย็น ลงที่อุหภูมิห้อง สารห่อหุ้มจะเปลี่ยนอนุภาคเป็นของแข็งและจะห่อหุ้มสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ไว้ โดยส่วนประกอบที่สำคัญของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเมตรประกอบไปด้วย ไขมันแข็ง (ร้อยละ 0.1-30) สารก่ออิมัลชั่น (ร้อยละ 0.5-5) สารสำคัญ (ร้อยละ 1-5) และน้ำ (ร้อยละ 70-99)

2.8.2 ตัวพาไขมันระดับนาโมเมตร (nanostructured lipid carrier, NLC)

ตัวพาไขมันระดับนาโนเมตร ถือเป็นการพัฒนารุ่นที่ 2 ของระบบนำส่งอนุภาคไขมันแข็งระดับนาโนเมตร เพื่อใช้กักเก็บยา หรือสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดี ระบบนี้มีข้อดีที่เหนือกว่าอนุภาคไขมันแข็งระดับนาโน คือ สามารถช่วยชะลอการสลายตัวของสารที่กักเก็บไว้ และ

ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของชีวประสิทธิผล แล้วยังช่วย ในการบริหารยาเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง ส่วนประกอบของตัวพาไขมันแข็ง ขนาด นาโน เมตร คือ ไขมันแข็ง ไขมันเหลว สารก่ออิมัลชั่น สารสำคัญ และน้ำ โดยมีส่วนผสมระหว่างไขมันแข็งและไขมันเหลว เป็นสัดส่วนระหว่างร้อยละ 0.1-30 ของไขมันทั้งหมด ทำให้จุดหลอมเหลวของไขมันในระบบลดลง โดยที่ระบบยังคงคุณสมบัติการเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิร่างกาย เมื่อเตรียมเสร็จแล้ว จะมีโครงสร้างของผลึกหลากหลายชนิด มีช่องว่างระหว่างผลึกที่ไม่สมบูรณ์ แล้วยังมีส่วนของไขมันเหลวที่ช่วยกักเก็บสารออกฤทธิ์ ดังนั้นระบบตัวพาไขมันขนาดนาโนเมตร จึงสามา รถกักเก็บสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าอนุภาคไขมันแข็งระดับนาโนเมตร (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร (ก) และตัวพาไขมันขนาดนาโนเมตร (ข)
ที่มา: ดัดแปลงจาก วันดี รังสีวิจิตรประภา (2554)

2.8.3 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณลักษณะของตัวพาไขมัน

2.8.3.1 วิธีการผลิต กรรมวิธีการผลิตมีผลต่อการปลดปล่อยตัวยาหรือสารออกฤทธิ์ออกจากระบบนำส่ง

2.8.3.2 ปริมาณไขมันเหลว ความเข้มข้นของไขมันมีผลต่อร้อยละการกักเก็บสารในระบบนำส่ง และการปลดปล่อยตัวยา

2.8.3.3 ความเข้มข้นของยาหรือสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นของยามีผลให้ระ บบที่ผลิตมีความแตกต่างกัน เช่น ขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น หรือค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาค

2.8.3.4 สารพอลี อธิลีน ไกลคอล สารนี้ช่วยหลีกเลี่ย งในการจับกินของเซลล์ macrophage โดยเพิ่มความชอบน้ำที่ผิวของอนุภาค และยังมีผลรบกวนบริเวณผิวอนุภาค ทำให้ประจุไฟฟ้าที่ผิวลดลง และยังช่วยให้เกิดการปลดปล่อยยาที่กักเก็บในระบบตัวพาไขมันได้เร็วขึ้น

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.9.1 ฤทธิ์ในการสมานบาดแผล (Wound healing activity)

จากการวิจัยใน albino rats พบว่าเซซามอล (sesamol) ช่วยในกระบวนการรักษาบาดแผลได้ โดยพบว่าค่า tensile strength ของบาดแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อให้ sesamol i.p. 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ให้อะไรเลย และตัวอย่างที่ให้การรักษาด้วย dexamethasone i.m. 0.17 มิลลิกรัม /กิโลกรัม และพบว่าปริมาณของ ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของคอลลาเจนก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Shenoy R.R et al., 2011)

2.9.2 ฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ประสาท (Neuroprotective)

จากการวิจัย ในหลอดทดลอง โดยใช้เซลล์ gerbil brain ทดสอบส่วนของ cerebral ischemia โดยดูปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์ การทดสอบแบ่งหนูเป็น 3 กลุ่ม และมีการให้อาหาร (op) และสารเสริมแตกต่างกัน ในปริมาณ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน คือ กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ให้อาหารปกติกับน้ำเกลือ กลุ่มที่ 2 อาหารปกติกับเซซามินบริสุทธิ์ และกลุ่มที่ 3 อาหารปกติกับสารสกัดหยาบของน้ำมันงา ที่ประกอบไปด้วย เซซามิน ร้อยละ 90 และ เซซาโมลิน ร้อยละ 10 และผลการทดลองพบว่า ถ้ามีการดูแลโดยให้เซซามิน หรือ สารสกัดหยาบของน้ำมันงา แก่กลุ่มตัวอย่างก่อน จะสามารถลดปริมาณการตายของ gerbil brain ใน cerebral ischemia ได้ถึงร้อยละ 56 และร้อยละ 49 ตามลำดับ (Cheng F.-C. et al., 2006)

ในการทดสอบกับ Wistar adult rat เพศผู้ โดยการฉีดสารสกัดน้ำมันงาดำ (*S. indicum* extracts) เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง แล้วจึงผ่าสมองดูรอยแผล leukocytes infiltration และ apoptosis clues โดยพบว่าสารสกัดน้ำมันงาช่วยลด leukocytes infiltration และ พบว่าช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ (anti-apototic) และ การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ซึ่งเป็นผลมาจากกการยับยั้งการทำงานของ lipid peroxidation และ MAPK และ COX2 (Botelho J.R.S. et al., 2014)

จากการวิจัยโดยการบรรจุ เซซามอลในรูปแบบอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร (Solid lipid nanoparticles, SLN) โดยมีส่วนประกอบของ SLN เป็น Polysorbate 80 ร้อยละ 45.45 soy lecithin ร้อยละ 0.58 Compritol 888 ATO ร้อยละ 7.27 และน้ำ โดยการฉีดตำรับที่มีการบรรจุเซซามอลในรูปแบบ SLN เข้าสู่สมอง (Intracerebroventricular: ICV) ปริมาณเซซามอลที่ให้แก่กลุ่มตัวอย่างคือ 8 และ 16 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพื่อช่วยในการป้องกันการเกิดอัลไซเมอร์ โดยอาศัยฤทธิ์ของเซซามอลใน การยับยั้งการผลิต cytokine หรือฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิ สระ (Sachdeva A.K. et al., 2015)

2.9.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน

การทดสอบ ในสัตว์ทดลอง พบว่าเซซามอล สามารถยับยั้งเอนไซม์ diphenolase และ monophenolase เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 1.9 ไมโครโมลาร์ และ 3.2 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ จึงสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เมลาโนมาของหนู เมื่อทดสอบกับเซลล์ B16F10 โดยพบว่าเมื่อใช้เซซามอลที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเซลล์ได้ร้อยละ 60 และจากการวัดด้วยวิธี MTT พบว่าการใช้เซซามินที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลง ร้อยละ 30 และจากการดูผลของ สารลิกแนนจากน้ำมันงา ต่อกระบวนการตายของเซลล์ (apoptotic) พบว่าเซซามินไม่ทำให้เซลล์ตาย แต่เซซามอลแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไป และมีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ โดยพบว่าเซลล์เกิด apoptotic cells เกือบร้อยละ 40 (Mahendra Kumar C. et al., 2011)

2.9.4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidation)

งานวิจัยหาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันงาที่สกัดจากงาขาว และงาน้ำตาล พบว่าน้ำมันงาที่ได้จากงาน้ำตาลมีปริมาณสเตอรอล (total sterol) และวิตามินอี (tocopherol) สูง แต่มีปริมาณเซซามิน เซซาโมลิน และสารไฮโดรคาร์บอนอื่น ๆ น้อยกว่าน้ำมันงที่ได้จากงาขาว การคั่วงาจะ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในงา รวมถึงเพิ่มปริมาณร้อยละสัมพันธ์ของสารเซซามอล เอทธิลิดีนสเตอรอล (ethylidene sterols) รวมถึงวิตามินอี ซึ่งสารเหล่านี้แสดงออกถึงการต้ านอนุมูลอิสระ และการเพิ่มงาขาวที่ ผ่านการคั่วในปริมาณ ร้อยละ 0.1 จะเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงขึ้นมาก (Mohamed H.M.A. and I.I. Awatif, 1998)

จากการ สกัดสารออกจากกากงาดำที่ไม่ได้คั่ว ได้สารออกมา 4 ส่วน พบว่าสารที่ได้จากส่วนที่ 2 และ 3 แสดงถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate) เมื่อทำการวิเคราะห์ โดยการทำให้สารในทั้ง 2 ส่วนนี้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative HPLC พบสาร lignan glycosides และสารสีน้ำตาลที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้อีก 1 ชนิด ซึ่งสารชนิดนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ low density lipoprotein (LDL) (Shyu Y.-S. and L.S. Hwang, 2002)

ในการทดลองสกัดสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากกากงา และจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าสารนั้นคือสารลิกแนน และในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β-carotene bleaching, linoleic acid peroxidation และ DPPH พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีความสามา ถในการต้านอนุมูลอิสระ ตั้งแต่ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ได้เทียบเท่ากับสาร butylated hydroxy toluene (BHT) ที่ความเข้มข้น 200 ppm และสารสกัดหยาบที่ทำให้บริสุทธิ์จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดียิ่งขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้น 5 10 50 100 และ 200 ppm (Suja, K.P., A. Jayalekshmy, and C. Arumughan, 2005)

เซซามอลเป็นสารที่พบได้ในงา และในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารเซซามอล โดยทดสอบในหลอดทดลอง ด้วยวิธี hydroxyl, superoxide anion, nitric oxide, ABTS, DPPH ได้ค่า IC50 ของสารเซซามอล ที่ 31.29, 40.72, 36.36, 3.65 และ 3.23 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเซซามอลแสดงถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kanimozhi, P. and N.R. Prasad, 2009)

2.9.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflamation)

เซซามิน และเซซาโมลินซึ่งเป็นสารลิกแนนหลักที่ได้จากน้ำมันงา แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการควบคุมการผลิตไนตริกออกไซด์ ในการทดลองกับเซลล์ไมโครเกลีย (microglia) และ BV-2 cell line ในงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเซซามินมีผลต่อสาร cytokine ที่สร้างมาจาก LPS โดยสามารถยับ ยั้ง LPS-stimulated IL-6 mRNA และโปรตีน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเซซามินยับยั้ง LPS ให้มีการสร้าง IL-6 1 โดยแสดงออกที่วิถีของ p38 MAPK และการกระตุ้น NF kB (Jeng, K.-C.G., et al., 2005)

เซซามินมีส่วนช่วยในการป้องกันกระดูกเสื่อม โดยช่วยในการลดการแสดงออกของ MMP-1, MMP-3 และ MMP-13 ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของ PGs และคอลลาเจน ชนิดที่ 2 นอกจากนั้นในการทดลองกับ human articular chondrocytes (HACs) แสดงให้เห็นว่า IL-1β นั้นถูกยับยั้งด้วยเซซามิน และในการรักษาด้วยเซซามินพบว่าลักษณะของ Osteoarthristis cartilage มีการเปลี่ยนแปลง เช่น ลดการเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบของเซลล์กระดูกอ่อน เพิ่มความแข็งแรงของเซลล์กระดูกอ่อน ช่วยลดการสูญเสียคอลลาเจน ชนิดที่ 2 และ PGs ด้วยเซซามินยังช่วยเพิ่มการจัดเรียงตัวของคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ PGs ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของหนูกลุ่มควบคุม ดังนั้นเซซามินมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคข้อกระดูกเสื่อม และมีความเป็นไปได้ในการใช้เซซามินเป็นสารที่ช่วยบรรเทาการเกิดโรคนี้ (Phitak, T., et al., 2012)

2.9.6 ฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไฮโดรไลติก

การทดสอบในหนู โดยการให้น้ำมันงาเป็นอาหารเสริมทางสายยาง โดยน้ำมันงาที่ให้มี 2 ชนิดคือ น้ำมันงาโดยทั่วไป และน้ำมันงาที่มีการแยกเอาสารเซซามิน และเซซามอลออก ให้น้ำมันงากับหนู Wistar rat เพศผู้ ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร/หนู/วัน เป็นเวลา 15 วัน ก่อน และ 15 วันหลังจากที่มีการเหนี่ยวนำให้หนูเกิดอาการข้ออักเสบ ทำการวัดปริมาณเอนไซม์ไฮโดรไลติก อันได้แก่ เอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส พบว่าหนูที่ให้อาหารเสริมน้ำมันงาทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณเอนไซม์ที่ลดลงเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยาใด ๆ และหนูกลุ่มที่ให้น้ำมันงาที่มีการแยกสารเซซามิน และเซซามอลออก มีปริมาณเอนไซม์ที่ลดลงน้อยกว่ากลุ่มที่ให้น้ำมันงาปกติ ดังนั้นสารสำคัญ ในน้ำมันงาอันได้แก่เซซามิน และเซซามอล มีส่วนช่วยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรไลติก (Yadav, N.V., et al., 2016)

2.9.7 การทดสอบการเป็นพิษของเซซามอล

การทดสอบความเป็นพิษของเซซามอล ต่อ C57BL/6 mice เพศเมีย ตามวิธีการ OECD 423 พบว่า acute toxicological มีผลข้างเคียง (adverse effect) ที่ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และพบว่าที่ 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลต่อลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาขั้นรุนแรงต่ออวัยวะทุกชนิด และมีผลต่อ DNA และในการทดลองให้ single dose ที่ 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลทำให้หนู 2 ใน 3 ตัวตาย ภายใน 2 ชั่วโมง ดังนั้นเซซามอลจึงถูกจัดอยู่ใน GHS category 4 (>300 - 2000) โดยมีค่า LD_{50} ที่ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Khan, S., et al., 2016)

2.9.8 เอนไซม์ในกระบวนการเมตาบลิซึมสารบริเวณชั้นผิวหนัง

พบการแสดงออกของเอนไซม์ที่บริเวณผิวหนัง เช่น เอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 หลายชนิดเช่น เอนไซม์ CYP1A, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C เป็นต้น เอนไซม์ในกลุ่ม Oxidizing enzyme เช่น ฟลาวินโมโนออกซิเจเนส (flavin monooxygenase) นอกจากนั้นยังพบ Conjugated enzyme เช่น Glutathione S-transferases, sulfotransferase ที่พบในชั้นคีราติโนไซต์ และ *N*-acetyltransferases ที่พบในเซลล์คีราติโนไซต์และไฟโบรบลาสต์ นอกจากนี้ยังพบเอนไ ซม์ชนิดอื่นๆ เช่น carboxyesterase ที่มีคว่มสำคัญในปฏิกิริยาเอสเทอร์ไฮโดรไลซิส (ester hydrolysis) (Svensson C.K., 2008)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบน้ำมันงา

น้ำมันงาดำบริสุทธิ์ (virgin sesame oil) ที่สกัดโดยวิธีการบีบแบบอัดเย็นจากศูนย์การเรียนรู้และพัฒนา งาเชิงเกษตรอุตสาหกรรมครัวเรือนแบบยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3.1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง

สารเซซามิน (Sesamin) เซซาโมลิน (Sesamolin) และ เซซามอล (Sesamol) บริษัท Sigma-Aldrich, USA

3.1.3 ส่วนประกอบของอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตร

3.1.3.1 น้ำมันงา

3.1.3.2 โอลิแวกซ์ (Oliwax®) บริษัท Hallstar, Italy

3.1.3.3 สารลดแรงตึงผิวโพลอกซ์ซาเมอร์ 188 (Kolliphor® P188) บริษัท Sigma-Aldrich, USA

3.1.4 ตัวทำละลาย

3.1.4.1 อะซิโตน (commercial grade)

3.1.4.2 ไอโซออกเทน (Fisher scientific, UK)

3.1.4.3 เมทานอล (HPLC grade,)

3.1.4.4 เอทานอล (commercial grade)

3.1.4.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Fisher scientific, UK)

3.1.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์เจลลาติเนส

ชุดทดสอบเอนไซม์เจลาติเนสและคอลลาจีเนส (EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit, Molecular Probes, USA) ซึ่งประกอบไปด้วย

3.1.5.1 DQ gelatin จากหนังหมู

3.1.5.2 10X Reaction Buffer

3.1.5.3 1,10-Phenanthroline, monohydrate

3.1.5.4 เอนไซม์คอลลาจีเนส ชนิดที่ 4 จาก *Clostridium histolyticum*

3.1.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์อิลาสเตส

ชุดทดสอบเอนไซม์อิลาสเตส (EnzChek® Elastase Assay Kit, Molecular Probes, USA) ซึ่งประกอบไปด้วย

3.1.6.1 DQ elastin จาก bovine neck ligament, BODIPY FL

3.1.6.2 10X Reaction Buffer

3.1.6.3 Elastase จาก ตับอ่อนของหมู

3.1.6.4 N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone

3.1.7 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.7.1 Freezer (-86°C ultralow frezzer, Nuaire, USA)

3.1.7.2 Light /Fluorescent microscope (Nikon, Eclipse Ni, USA)

3.1.7.3 High speed homogenizer (Ultra taurrax, IKA, Germany)

3.1.7.4 Dialysis tubing (cellu Sep T4® MW cut off 12,000-14,000 Membrane Filtration Product, Inc., USA)

3.1.7.5 Incubator shaker (Kuhner/ISF-I-W, Switzerland)

3.1.7.6 Centrifuge (Biofuge Fresco, Heraeus, Germany)

3.1.7.7 High pressure liquid chromatography (Ultimate 3000, ThermoFisher Scientific, USA)

3.1.7.8 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK)

3.1.7.9 Franz diffusion cell (VTC-300, Logan instruments corp, USA)

3.1.7.10 DSC (DSC822, Mettler Toledo, Switzerland)

3.1.7.11 Microplate reader (BMG Clariostar, Germany)

3.1.7.12 Atomic Force Microscope (XE 100 Park system, Korea)

3.1.7.13 X-ray diffraction spectrophotometer (X'Pert MPD Philips, Japan)

3.1.7.14 ผิวหนังสุกรตายแรกเกิด (จ. นครปฐม)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 วิธีการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงา

วิธีการแยก สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนน จากน้ำมันงา โดยดัดแปลงวิธีการจาก Dar และคณะ (2015) ละลายน้ำมันงา 500 กรัม/อะซิโตน ในอัตราส่วน 1:8 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และบ่มข้าม คืนที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแยกไตรกลีเซอไรด์ออก โดยกรองด้วยกระดาษกรอง

ไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน ทำการแยกน้ำมันสีเหลืองจากสารที่กรองด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ผสมสารที่เหลือกับไอโซออกเทน ในอัตราส่วน 1:8 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) แล้วทำการบ่มต่ออีก 4-5 วันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกของ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน จากนั้นทำการกรองเอาผลึกสารกึ่งบริสุทธิ์ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 การวิเคราะห์สารสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครโมโตกราฟีเหลวความดันสูง

3.2.2.1 การเตรียม ตัวอย่าง เพื่อการวิเคราะห์โครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง โดยดัดแปลงวิธีการจาก Dar et al. (2015)

ละลายผลึก สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนใน เมทานอล (HPLC grade) เพื่อทำเป็นสารละลายความเข้มข้น 1 มก./มล. กรองสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนด้วยกระดาษกรองไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์

3.2.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐานเซซามิน หรือเซซาโมลิน 1 มิลลิกรัมในเมทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.2.2.3 การวิเคราะห์สารสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง

วิเคราะห์สาร สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนที่แยกได้ด้วยการวิเคราะห์โครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผันกลั บ (reversed phase chromatography) คอลัมน์ขนาด 250 มม. x 4.6 มม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมครอน ตัวตรวจหาแบบอุลตร้าไวโอเลต (UV) ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ เมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 70:30 อัตราการไหล 1.0 มล./นาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ปริมาณสารที่ฉีดอยู่ที่ 20 ไมโครลิตร โดยใช้สารเซซามิน และเซซาโมลิน เป็นสารเครื่องหมายมาตรฐาน (standard marker)

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงา

3.2.3.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เจลลาติเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์เจลลาติเนส ตามคู่มือแนะนำการใช้งานของ EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit, (Molecular Probes, USA) ในหัวข้อวิธีการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์เจลาติเนส /คอลลาจีเนส เจือจางสารตัวอย่างในความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.4 เติมสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 80 ไมโครลิตร DQ gelatin ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ชนิดที่ 4 จาก *Clostridium histolyticum* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน 96-well plate บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันจากแสงเป็นเวลา 90 นาที วัดค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง fluorescence microplate

reader ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น และดูดกลืนแสงที่ 495 ± 15 นาโนเมตร และ 538 ± 20 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยมีตัวอย่างมาตรฐาน คือ EGCG ตัวควบคุมแบบบวก ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานขอ งเอนไซม์ คือ 1,10-phenanthroline, monohydrate ตัวควบคุมแบบลบ คือ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

3.2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อิลาสเตส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์อิลาสเตส ตามคู่มือแนะนำการใช้งานของ EnzChek® Elastase Assay Kit, (Molecular Probes, USA) ในหัวข้อวิธีการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ เอนไซม์อิลาสเตส เจือจางสารตัวอย่างในความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8 เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเอนไซม์อีลาสเตส ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน 96 well plate บ่มที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันจากแสงเป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย DQ Elastin ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันจากแสง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น และดูดกลืนแสงที่ 495 ± 15 นาโนเมตร และ 538 ± 20 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยมีตัวอย่างมาตรฐาน คือ EGCG ตัวควบคุมแบบบวกที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone ตัวควบคุมแบบลบ คือ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

3.2.3.3 การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryhydrazil (DPPH)

การเตรียมสารละลาย Trolox วิตามินซี และสารสกัด

ละลาย Trolox 1 มิลลิกรัมด้วยเมทานอล 1 มิลลิตร แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 และ 20.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายวิตามินซี 1 มิลลิกรัมด้วยเมทานอล 1 มิลลิตร แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายสารตัวอย่างด้วย DMSO แล้วเจือจางในความเข้มข้นต่าง ๆ ในเมทานอล

การเตรียมสารละลาย DPPH

ชั่ง DPPH 3.91 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 10 มลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้สารละลาย DPPH 0.004 โมลาร์ เก็บให้พ้นแสง

วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนด้วยวิธี DPPH

ปิเปต สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาตร 50 ไมโครลิตรใน 96-well plate แล้วเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.004 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา 25 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้ Trolox และวิตามินซีเป็นตัวควบคุมแบบบวก ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระวัดจากความสามารถในการฟอกจางสี

ของสารทดสอบ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง โดยเทียบกับกลุ่ม ควบคุม คือ DMSO และสารละลาย DPPH ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) กับความเข้มข้นของ Trolox แปลผลร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้สมการที่ 3.1

$$\% \text{ inhibition} = [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100 \quad (3.1)$$

โดย $Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทดสอบ

3.2.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ชั่งสาร ABTS 95.98 มิลลิกรัม ละลายใน DI ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ละลาย potassium persulfate 6.4 มิลลิกรัมใน DI ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้ง 2 ในอัตราส่วน 1:1 แล้วบ่มสารผสมไว้ที่อุณหภูมิห้อง ป้องกันแสง เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นเจือจางด้วยเมทานอล เพื่อให้ได้สารละลาย ABTS ที่มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ 405 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.70-0.90 ใช้สารละลาย ABTS นี้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากนั้นเตรียมตัวอย่างโดยละลายสารตัวอย่างด้วย DMSO แล้วเจือจางในความเข้มข้นต่าง ๆ ในเมทานอล ปิเปตสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาตร 20 ไมโครลิตรใน 96-well plate แล้วเติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ป้องกันแสง เป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้ Trolox และ วิตามินซี เป็นตัวควบคุมแบบบวก คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) จากสมการที่ 3.2

$$\% \text{ inhibition} = [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100 \quad (3.2)$$

โดย $Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทดสอบ

3.2.4 การพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน

3.2.4.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนา ตำรับอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโน ในเบื้องต้นทำการศึกษาที่ละตัวแปร ได้แก่ สัดส่วนของปริมาณไขมันเหลว สารลดแรงตึงผิว ปริมาณไขมันรวม และปริมาณสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ซึ่งมีผลต่อขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค ปริมาณร้อยละการกักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน เพื่อหาสภาวะ ที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเพื่อเก็บกักสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน

3.2.4.2 การเตรียมตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน

เตรียมตำรับ อนุภาคไขมันขนาดนาโน โดยมี โอลิแว๊กซ์ สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนน และน้ำมันงา เป็นวัฏภาคน้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ และน้ำ ปราศจากประจุ และวัฏภาคน้ำ หลอมสารวัฏภาคน้ำมันที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งให้ความร้อนกับสารวัฏภาคน้ำที่อุณหภูมิสูงกว่าวัฏภาคน้ำมันเล็กน้อย ปั่นผสมทั้งสองวัฏภาคด้วยเครื่อง high speed homogenizer (Ultra Turrax T10 basic, IKA, Germany) ที่ความเร็วรอบประมาณ 12,500 rpm จากนั้นทำการลดขนาดอนุภาคด้วยคลื่นเสียง ความถี่สูง (Ultrasonication) ด้วยเครื่อง Probe sonicator (Vibra cells, U.S.A.)

3.2.5 การประเมินคุณสมบัติของอนุภาคไขมันขนาดนาโน

3.2.5.1 การวัดขนาดอนุภาค และการกระจายตัวขนาดอนุภาคไขมันขนาดนาโน

เจือจางอนุภาคไขมันขนาดนาโนด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 400 เท่า (v/v) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัด ขนาดอนุภาค และการกระจายตัวขนาดอนุภาค ด้วยเครื่อง Zetasizer® Nano-ZS (Mavern instrument, UK) โดยวัดทั้งหมด 3 ซ้ำ เครื่องทำการวัดโดยการที่ลำแสงตกกระทบไปที่อนุภาคของตัวอย่าง และเกิดการกระเจิงของแสง โดยที่อนุภาคขนาดเล็กจะเคลื่อนที่เร็วกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ทำให้เกิดความผันผวนและความเข้มของแสงที่เครื่องวัดได้อย่างรวดเร็ว แล้วจึงมีการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของอนุภาค แล ะสามารถนำมาคำนวณขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคได้จากสมการของ สโตกและไอน์สไตน์ (Stokes-Einstein) (Washington, 1992), (Finsey, 1994), (Allen, 1997) ดังสมการที่ 3.3

$$d = \frac{kT}{3\pi\rho D} \tag{3.3}$$

เมื่อ d คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคทรงกลม

D คือ สัมประสิทธิ์การแพร่

ρ คือ ค่าความหนืดของสารตัวกลางที่อนุภาคแขวนลอยอยู่

k คือ ค่าคงที่ของโบลทซ์มาน (Boltzmann's cinstant)
T คือ ค่าองศาสัมบูรณ์

3.2.5.2 การวัดค่าไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค

เจือจางอนุภาคไขมันขนาดนาโนด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 400 เท่า (v/v) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัด ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค ด้วยเครื่อง Zetasizer® Nano-ZS (Mavern instrument, UK) โดยวัดทั้งหมด 3 ซ้ำ การหาค่าประจุสามารถวัดได้จากความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคในสนามไฟฟ้าด้วยวิธีเลเซอร์ดอปเปอร์อะนีโมเมทรี (laser doppler anemometry, LDA) (Rungseevijitprapa, 2011) ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคของระบบนำส่งสามารถวัดได้โดยใช้สมการของ Helmholtz-Smoluchowski (Washington, 1992) ดังสมการที่ 3.4

$$\xi = \frac{V}{n\varepsilon E} \tag{3.4}$$

เมื่อ ξ คือ ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค
n *คือ ความหนืดของตัวกลาง*
ε คือ ค่าคงที่ไดอิเล็คตริก (dielectric constant)

3.2.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณการเก็บกัก สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในอนุภาคไขมันขนาดนาโน

การวิเคราะห์หาปริมาณการเก็กกัก สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในอนุภาคไขมันขนาดนาโน โดยการนำอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยอัตราเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ในสภาวะเดียวกัน 3 รอบ เก็บเฉพาะส่วนอนุภาค รวมอนุภาคของทั้ง 3 รอบ ละลายในเมทานอลจนได้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้อนุภาคแตกตัวด้วยเครื่อง Ultrasonication นาน 10 นาที วิเคราะห์หาปริมาณ สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง แล้วคำนวณหาค่าร้อยละในการกักเก็บดังสมการที่ 3.5

$$\text{ค่าร้อยละการกักเก็บ} = \frac{\text{ปริมาณสารตัวอย่างในอนุภาค} \times 100}{\text{ปริมาณสารตัวอย่างทั้งหมด}} \tag{3.5}$$

3.2.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อนของอนุภาค ไขมันขนาดนาโน ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC-Thermogram)

เปรียบเทียบ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อน ของอนุภาค ไขมันขนาดนาโน กับสารต่าง ๆ ที่มีในตำรับ ได้แก่ไขมันแข็ง (Oliwax) ไขมันเหลว (น้ำมันงา) และสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน โดยทำการชั่งสาร น้ำหนักไม่เกิน 20 มิลลิกรัมลงใน DSC pan ปิดฝาภาชนะ เจาะรู แล้ววางภาชนะสำหรับใส่ตัวอย่าง และภาชนะที่ไม่มีตัวอย่าง ลงที่ตำแหน่งวางตัวอย่างในเครื่อง DSC (Mettler-Tolerdo, Switzerland) ตั้งการทำงานให้มีการเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 10 องศาเซลเซียส จนถึง 90 องศาเซลเซียส คำนวณค่าพลังงานเอน โทรปี และค่าดัชนีความเป็นผลึก (crystalline index, CI) ในการเปลี่ยนสถานะของสารแต่ละชนิดจากสมการที่ 3.6 (Freitas and Muller, 1999)

$$CI = \frac{\text{Enthalpy}_{\text{NLC dispersion}}\,[J/g^{-1}] \times 100}{\text{Enthalpy}_{\text{ไขมันวัตถุดิบ}}[J/g^{-1}]_{x}\ \text{ความเข้มข้น}_{\text{วัฏภาคไขมัน}}\ [\%]} \qquad (3.6)$$

3.2.7 การศึกษา ระนาบของ ผลึกอนุภาคไขมันขนาดนาโน ด้วยเทคนิค การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction, XRD)

ทำตัวอย่างให้แห้งโดยการเทบนจานแก้วปล่อยทิ้งให้แห้งในโถแก้วดูดความชื้น (glass dessicator) นำตัวอย่างที่บดละเอียดใส่ในแท่นบรรจุตัวอย่าง แล้วใช้แท่นโลหะกดตัวอย่างให้แน่นกับแท่นบรรจุ ผิวหน้าตัวอย่างเรียบ เกลี่ยตัวอย่างส่วนเกินออก จากนั้นวางแท่นบรรจุตัวอย่างลงบนแท่นวางตัวอย่างของเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) รุ่น X'Pert MPD ยี่ห้อ Philips โดยใช้ Cu K_{α} เป็นแหล่งกำเนิดรังสี (λ = 1.5406 A°) ซึ่งใช้ร่วมกับโปรแกรมวิเคราะห์ X' Pert line 1.3b เพื่อวิเคราะห์ระนาบของผลึกในตัวอย่าง โดยตั้งค่าการหมุนโกนิโอมิเตอร์ที่ 2θ ตั้งแต่ 5-80° ด้วยอัตราเร็ว 0.45° ต่อ 0.5 วินาที ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 20 mA ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 30 kV

3.2.8 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscopy)

ทำตัวอย่างให้แห้งโดยการหยดตัวอย่างลงบนกระจกปิดสไลด์แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องภายในโถแก้วดูดความชื้น จากนั้นวางตัวอย่างที่แท่นวางตัวอย่าง และวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม Atomic Force Microscope (XE 100 Park system, Korea) โดยใช้รูปแบบการวัดแบบ non-contact AFM วัดตัวอย่างในขนาด 20x20 ไมครอน แล้ววัดขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย และแสดงภาพเป็นแบบ 3 มิติ

3.2.9 การทดสอบการละลายของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน

เติม สาร กึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนในปริมาณที่มากเกินพอลงในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ในอัตราส่วนต่าง ๆ คือ 0:10, 1:9, 3:7, 1:1, 10:0 และสารละลาย DMSO ร้อยละ 1 จากนั้นเขย่าที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จนเข้าสู่สภาวะสมดุล เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณเซซามิน และเซซาโมลิน ด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง ตามวิธีในข้อ 3.2.2.3 ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

3.2.10 การศึกษาการปลดปล่อยสาร (*In vitro* release study)

3.2.10.1 เติมตำรับ อนุภาคไขมันขนาดนาโน ที่มีการเก็บกัก สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนจากน้ำมันงา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในถุงไดอะไลซิส แล้วมัดปลายของทั้ง 2 ข้างให้แน่น

3.2.10.2 ใส่ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 32 องศาเซลเซียส

3.2.10.3 สุ่มตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0.5, 1, 3, 6, 12 และ 24 ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร และใส่ PBS กลับคืนในปริมาณเท่ากัน ในทุกครั้งที่สุ่มตัวอย่างออกมาเช่นกัน

3.2.10.4 วัดปริมาณของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในรูปแบบของสารเซซามินและเซซาโมลินที่ถูกปลดปล่อยออกมา ตามวิธีในข้อ 3.2.2.3 โดยเปรียบเทียบระหว่างตำรับที่เป็น โซลิดลิปิดนาโนพาร์ติเคิล นาโนสตรักเจอร์ลิปิดแคริเออร์ นาโนอิมัลชั่น และสารละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา

3.2.11 การศึกษาการซึมผ่านเซลล์ผิวหนังของ สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนที่เก็บกักใน อนุภาคไขมันขนาดนาโนโดยวิธี Franz diffusion cell

เพื่อศึกษาการนำส่ง สาร กึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนที่เก็ บกักใน โซลิดลิปิดนาโนพาร์ติเคิล นาโนสตรักเจอร์ลิปิดแคริเออร์ นาโนอิมัลชัน และสารละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงาไปยังชั้น Dermis และวิเคราะห์หาปริมาณสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง

3.2.11.1 เตรียมผิวหนังลูกหมูแรกเกิด โดยการลอกเอาชั้นไขมันออกจนห มด โกนขนให้หมด ทำการเก็บรักษาในตู้เย็น - 20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ ให้ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน

3.2.11.2 ศึกษาการซึมผ่านเซลล์ผิวของ สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนที่เก็บกักใน อนุภาคโซลิดลิปิดนาโนพาร์ติเคิล นาโนสตรักเจอร์ลิปิดแคริเออร์ นาโนอิมัลชั่น และสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา โดยการขึงผิวหนังบน Franz diffusion cell โดยให้ผิวหนังด้าน Dermis สัมผัสกับ

ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งเป็นสารละลายตัวกลาง

3.2.11.3 เติมสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงไปบนผิวหนังทางช่อง donor ทำการเปิดเครื่อง เพื่อให้มีการหมุนเวียนของสารละลายตัวกลาง โดยตั้งความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 32 ± 2 องศาเซลเซียส ดูดสารที่อยู่ใน receiver ครั้งละ 300 ไมโครลิตร ที่เวลา 30 นาที 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน และมีการเติมสารละลายตัวกลางกลับคืนในปริมาณเท่ากับที่นำออกไปทุกครั้ง

3.2.11.4 วิเคราะห์ปริมาณสารเซซามินและเซซาโมลิน ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ตามวิธีในข้อ 3.2.2.3

3.2.12 การทดสอบความคงตัวของตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน

3.2.12.1 ทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

เก็บตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตร ภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน เก็บตัวอย่างของทุกตำรับในวันเริ่มต้น เดือนที่ 1 และเดือนที่ 3 เพื่อประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การเปลี่ยนสีของตำรับ การแยกชั้น แล้ววัดขนาดอนุภาค การกระจายอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค ด้วยเครื่อง Zetasizer nanoseries (Malvern Instruments, UK)

3.2.12.2 ทดสอบความคงตัวทางเคมี

เก็บตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตร ภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน เก็บตัวอย่างของทุกตำรับในวันเริ่มต้น เดือนที่ 1 และเดือนที่ 3 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารเซซามิน และเซซาโมลินที่คงเหลือด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง ตามวิธีในข้อ 3.2.2.3

3.2.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ

แสดงผลโดยใช้ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ และในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงวิเคราะห์ one way ANOVA และทดสอบความแตกต่าง โดยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญที่แสดงความแตกต่าง ที่ $p < 0.05$ ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) โดยข้อมูลแต่ละชุดมีการแจกแจงแบบปกติ และความแปรปรวนเท่ากัน

บทที่ 4
ผลการทดลอง

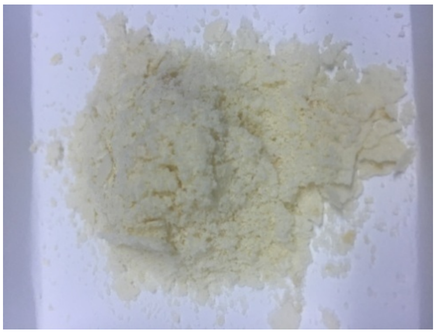
4.1 ผลการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงา

การแยกผลึก สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนน จากน้ำมันงา จากศูนย์การเรียนรู้และพัฒนางาเชิงเกษตรอุตสาหกรรมครัวเรือนแบบยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี แล้วนำมาแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน โดยทำการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงา ได้ผลึกที่มีสีขาวครีม (ภาพที่ 4.1) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1

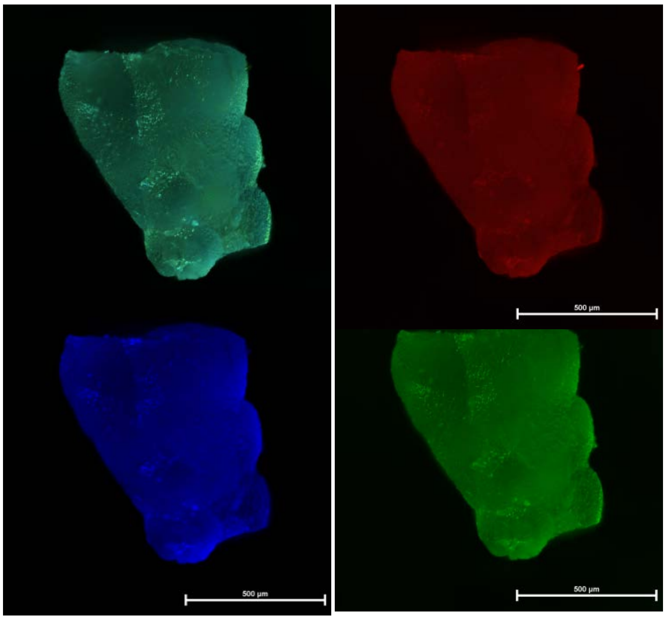
ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลผลิตสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันในแต่ละครั้งการผลิต

ครั้งที่	ครั้งการผลิตน้ำมันงา	น้ำหนักน้ำมันงาที่ใช้ (กรัม)	น้ำหนักผลึกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ได้ (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (% w/w)
1	1	500.58	0.90	0.18
2	2	1000.58	4.77	0.48
3	3	450.00	2.93	0.65
	เฉลี่ย			0.44 ± 0.24

เมื่อส่องผลึกด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและฟลูออเรสเซนต์ พบว่าผลึกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนมีลักษณะใส และสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ ดังภาพที่ 4.2



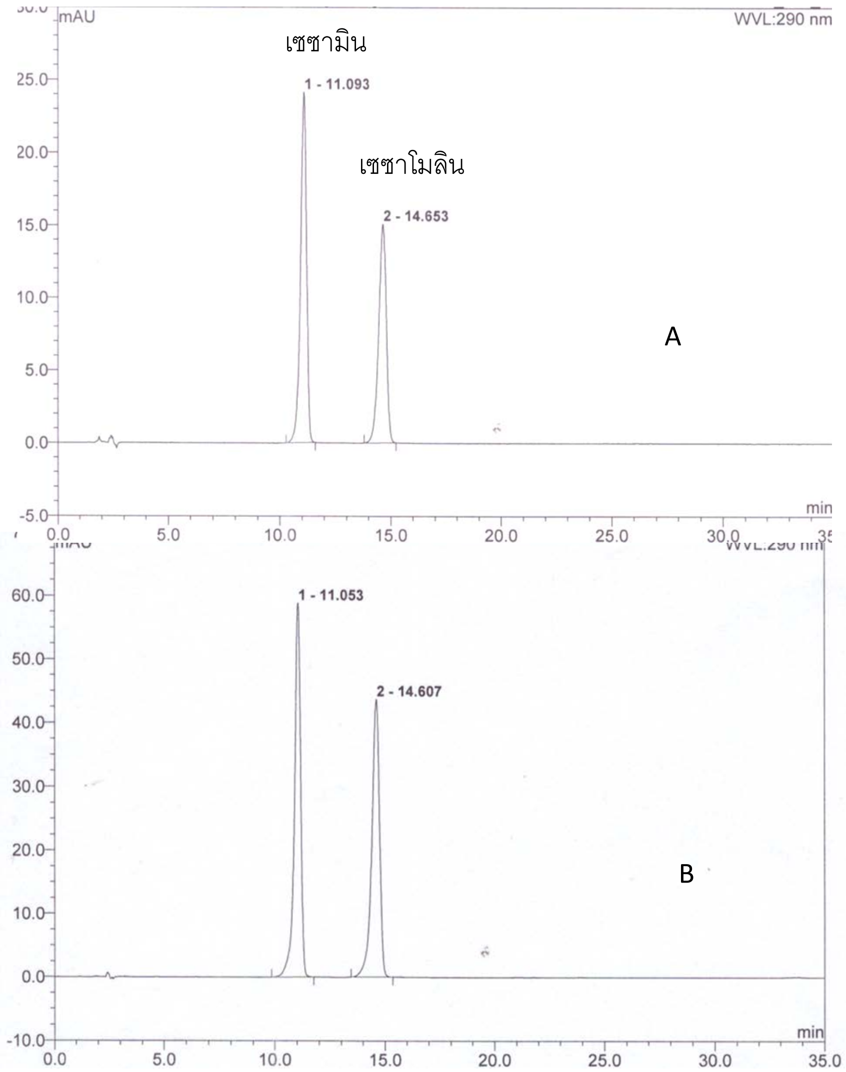
ภาพที่ 4.1 ผลึกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่แยกได้จากน้ำมันงา



ภาพที่ 4.2 ผลึกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนส่องโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและฟลูออเรสเซนต์

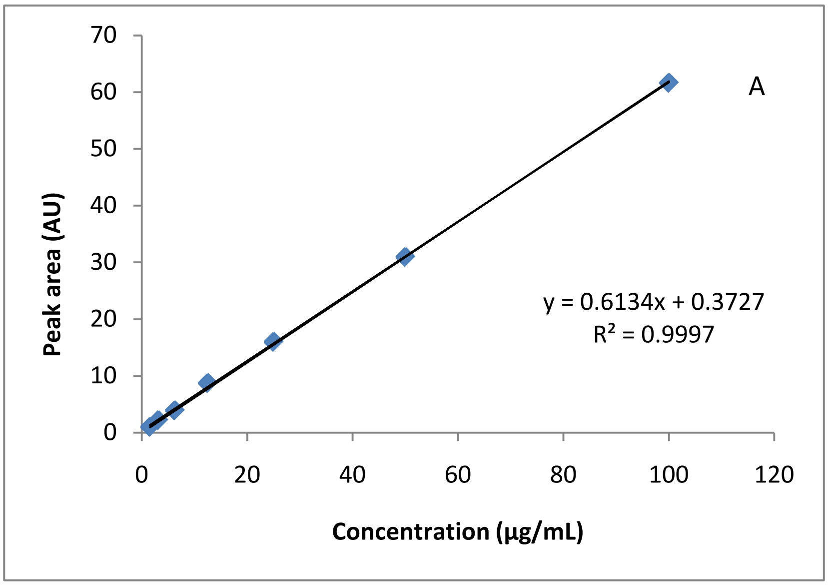
4.2 ผลการวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนด้วยวิธีโครโมโตกราฟีเหลวความดันสูง

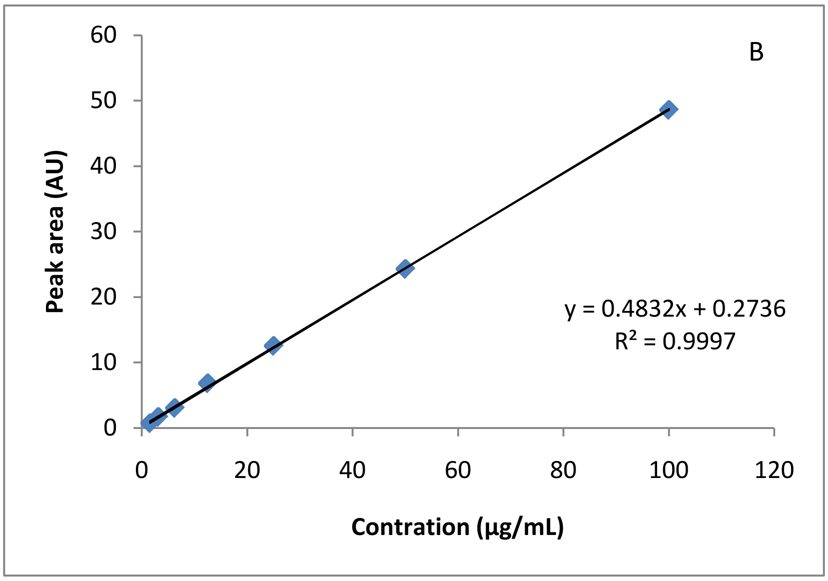
การวิเคราะห์ผลึกลิกแนนที่ สกัดจากน้ำมันงาดำหีบเย็นด้ วยวิธีโครมาโตกราฟี เหลวความดันสูงแบบผันกลับ (reversed phase chromatography) โดยดัดแปลงวิธีการการวิเคราะห์จาก Dar et al. (2015) ซึ่งเป็นวิธีที่มีการทดสอบความน่าเชื่อถือ โดยการใช้ คอลัมน์ขนาด 250 มิลลิเมตร . x 4.6 มิลลิเมตร. เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมครอน ตรวจ วัดแบบอุลตร้าไวโอเลต (UV-detector) ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบ ด้วย เมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 70:30 อัตราการไหล 1.00 มิลลิลิตร ./นาที ปริมาตรที่ฉีดสาร ตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร โดยแยกสารแบบไอโซเครติก (isocratic) โดยใช้เซซามินและเซซาโมลินเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งมีค่า retention time ที่ 10.83 นาทีและ14.22 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่.4.3 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเซซามิน เซซาโมลิน (A) และสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่แยกจากน้ำมันงาดำสกัดเย็น (B)

จากการวิเคราะห์ปริมาณเซซามิน และเซซาโมลินในน้ำมันงาและ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ที่สกัดได้ เมื่อเทียบกับกราฟสารมารตรฐาน เซซามิน และเซซาโมลินในช่วงความเข้มข้น 1.56-100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.4) พบว่า ในน้ำมันงามีสารเซซามินและเซซาโมลิน 3.81 ± 0.18 และ 3.79 ± 0.18 มิลลิกรัมต่อน้ำมันงา 1 กรัม (n=3) ตามลำดับ ในขณะที่ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน มีสารเซซามิน และเซซาโมลิน 353.42 ± 25.57 และ 345.29 ± 16.81 มิลลิกรัมต่อ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน 1 กรัม (n=6) ตามลำดับ





ภาพที่ 4.4 กราฟของสารมาตรฐานเซซามิน (A) และสารมาตรฐานเซซาโมลิน (B) ในช่วงความเข้มข้น 1.56-100.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (n=3)

4.3 วิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน

4.3.1 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เจลลาติเนสและอีลาสเตส

คอลลาเจนที่มีการย่อยให้มีโมเลกุลที่เล็กลง จะเปลี่ยนเป็นเจลลาตินซึ่งเป็น ไฮโดรคอลลอยด์ประเภทโปรตีนที่พบบริเวณผิวหนัง กระดูก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยเอนไซม์เจลลาติเนส ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเจลลาติน และส่งผลให้มีการทำลายคอลลาเจนที่ผิวหนัง ในขณะที่ เอนไซม์อีลาสเตส ทำลายอิลาสตินที่ผิวหนังทำให้ผิวหนังสูญเสียความยืดหยุ่น ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เจลลาติเนส และอีลาสเตสของ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน โดยการใช้ชุดทดสอบเอนไซม์เจ ลลาติเนสและอีลาสเตส [EnzChek® Gelatinase Assay Kit, EnzChek® Elastase Assay Kit (Molecular Probes, USA)] โดยทำการทดสอบกับสาร กึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ความเข้มข้นสูงสุด 400 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถละลายได้ ในสารละลาย 1% DMSO และทำการทดสอบกับสารมาตรฐานเซซามิน, เซซาโมลิน และเซซามอล ซึ่งค่าความเข้มข้นในการยับยั้ งการทำงานเอนไซม์เจลลาติเนส และอีลาสเตส ของสารต่าง ๆ ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์เจลลาติเนส และอีลาสเตส (IC_{50}) ของสารต่าง ๆ ได้ร้อยละ 50

สารที่ทดสอบ	ค่า IC_{50} (µg/mL)	
	เอนไซม์เจลลาติเนส	เอนไซม์อีลาสเตส
EGCG	16.67 ± 2.08	80.82 ± 11.93
สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน	> 400	> 400
เซซามิน (สารมาตรฐาน)	> 100	> 100
เซซาโมลิน (สารมาตรฐาน)	> 100	> 100
เซซามอล (สารมาตรฐาน)	> 600	> 600

EGCG คือ Epigallocatechin gallate เป็นสารควบคุมปฏิกิริยาผลบวก

4.3.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

4.3.2.1 ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-l-1-picryhydrazil (DPPH$^{\bullet}$)

จากการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ ของ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน, น้ำมันงา และสารมาตรฐานเซซา มอล เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน คือ Trolox และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารควบคุมปฏิกิริยาผลบวก แสดงผลเป็นค่าความเข้มข้นที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$

สารที่ทดสอบ	ค่า IC_{50} (mg/mL)
Trolox	0.005 ± 0.000
วิตามินซี	0.004 ± 0.000
สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน	8.297 ± 0.197
น้ำมันงา	18.300 ± 0.945
สารมาตรฐานเซซามอล	0.003 ± 0.000

4.3.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

จากการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ ของ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน, น้ำมันงา และสารมาตรฐานเซซามอล เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน คือ Trolox และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารควบคุมปฏิกิริยาผลบวก แสดงผลเป็นค่าความเข้มข้นที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ดังตารางที่ 4.4

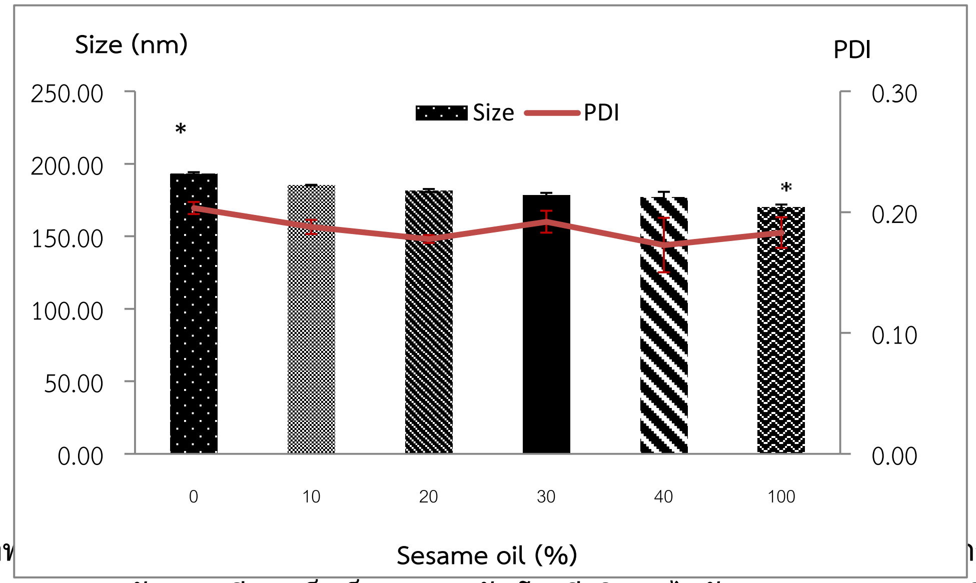
ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ด้วยวิธี ABTS

สารที่ทดสอบ	ค่า IC_{50} (mg/mL)
Trolox	0.006 ± 0.000
วิตามินซี	0.005 ± 0.000
สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน	8.534 ± 0.731
น้ำมันงา	15.233 ± 0.418
สารมาตรฐานเซซามอล	0.002 ± 0.000

4.4 การพัฒนาตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน

4.4.1 ผลของสัดส่วนน้ำมันงาต่อขนาดอนุภาค

กระบวนการพัฒนาระบบอนุภาคไขมันขนาดนาโน ปัจจัยด้านสัดส่วนของปริมาณของสารต่าง ๆ ในตำรับ จะส่งผลต่อคุณลักษณะของอนุภาคที่เตรียมได้ โดยในการวิจัยนี้ได้ศึกษาทดลองปรับเปลี่ยนสัดส่วนของปริมาณน้ำมันงาในตำรับอนุภาคไขมันที่ร้อยละ 0, 10, 20, 30, 40 และ 100 ของปริมาณไขมันรวม โดยมีปริมาณไขมันรวมและสาร ลดแรงตึงผิวคงที่ ร้อยละ 7.50 และ 2.50 ตามลำดับ และวัดขนาดอนุภาค (particle size) และการกระจายอนุภาค (Polydispersity index, PDI) ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 จากการทดลองพบว่าขนาดของอนุภาคของตำรับที่ ไม่มีส่วนประกอบของน้ำมันงา ซึ่งเป็นระบบโซลิดลิปิดนาโนพาร์ติเคิล (SLN) มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 212-220 นาโนเมตร และ ตำรับที่มีสัดส่วนน้ำมันงาที่ร้อยละ 100 เป็นส่วนประกอบซึ่งเป็นระบบนาโนอิมัลชัน (NE) มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 195-199 นาโนเมตร แปรผกผันกับสัดส่วนของน้ำมันงาในตำรับ เมื่อเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของทั้ง 6 ตำรับนี้ด้วยวิธีทางสถิติพบว่า ขนาดอนุภาคของตำรับที่มีสัดส่วนน้ำมันงาที่ร้อยละ 100 และที่ไม่มีน้ำมันงาเป็นส่วนประกอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% กับขนาดอนุภาคของตำรับอื่น ๆ และขนาดอนุภาคของตำรับที่มีสัดส่วนของน้ำมันงาที่ร้อยละ 10-40 ของปริมาณไขมันรวมนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 4.5)



ภาพ ... าค หลังจากเตรียมเสร็จเป็นเวลา 7 วัน โดยมีปริมาณไขมันรวม และสารลดแรงตึงผิวที่ร้อยละ 7.50 และ 2.50 ตามลำดับ

หมายเหตุ: * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นที่ $p < 0.05$

4.4.2 ผลของปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับต่อขนาดของอนุภาค

สารลดแรงตึงผิว ที่ใช้ในการเตรียมตำรับอนุภาคไขมันจะมีผลต่อขนาดอนุภาคและความคงตัวของตำรับ ในการทดลองนี้ ได้มีการเลือกใช้ Kolliphor® P188 ซึ่งคือ poloxamer 188 เป็นพอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นสาร ลดแรงตึงผิว ชนิดไม่มีประจุ เพื่อใช้ในการเตรียมตำรั บ ซึ่ง poloxamer 188 เป็นสารที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US-FDA) อนุญาตให้ใช้ในตำรับ เนื่องจาก มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิว จากการศึกษาเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร ลดแรงตึงผิว ที่ร้อยละ 2.50, 5.00 และ 7.50 ในตำรับ โดยมีสัดส่วนของน้ำมันงาที่ร้อยละ 40 ของปริมาณไขมันรวม และมีปริมาณไขมันรวมคงที่ ที่ร้อยละ 7.50 ของตำรับ เมื่อปริมาณสาร ลดแรงตึงผิว เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.50 เป็น 5.00 พบว่าอนุภาคที่ได้มีขนาดที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเพิ่มสาร ลดแรงตึงผิว เป็นร้อยละ 7.50 ขนาดอนุภาคกลับมีขนาดใหญ่ขึ้น (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค ในวันที่ 7 (n=3), (โอลิแว็กซ์ ร้อยละ 4, น้ำมันงา ร้อยละ 3)

ตำรับที่	Kolliphor® (%)	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าการกระจายอนุภาค	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)
1	2.50	202.30. ± 3.40[a]	0.19 ± 0.03	-27.47 ± 0.49
2	5.00	176.37 ± 0.21	0.17 ± 0.01	-21.90 ± 1.05
3	7.50	196.80 ± 3.60[a]	0.20 ± 0.02	-25.67 ± 1.10

หมายเหตุ: [a] แสดงถึงความแตกต่างกับตำรับที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Duncan

4.4.3 ผลของปริมาณไขมันรวมต่อขนาดอนุภาค

จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณ ไขมันรวม ที่ร้อยละ 5.00, 7.50 และ 10.00 ที่ประกอบไปด้วยโอลิแว็กซ์ (ไขมันแข็ง) และน้ำมันงา (ไขมันเหลว) โดยมีสัดส่วนน้ำมันงาที่ร้อยละ 40 ของปริมาณไขมันรวม ปริมาณสารลดแรงตึงผิวคงที่ ที่ร้อยละ 5.00 ของตำรับ ทำการวัดขนาดอนุภาค และค่า PDI ในวันที่ 7 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณไขมันรวมจากร้อยละ 5.00 เป็นร้อยละ 7.50 อนุภาคมีขนาดเล็กลง แต่เมื่อปริมาณไขมันรวมในตำรับเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 10.00 อนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น (ตารางที่ 4.6) โดยขนาดอนุภาคของทั้ง 3 ตำรับมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.6 ผลของปริมาณไขมันรวมที่มีต่อขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค (n=3)

ตำรับที่	โอลิแว็กซ์ (%)	น้ำมันงา (%)	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าการกระจายอนุภาค	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)
4	3.00	2.00	188.30 ± 0.95[a]	0.26 ± 0.01[a]	-19.43 ± 0.70
5	4.50	3.00	176.37 ± 0.21[b]	0.17 ± 0.01[b]	-21.90 ± 1.05
6	6.00	4.00	186.07 ± 1.04[c]	0.19 ± 0.00[c]	-26.83 ± 0.75

หมายเหตุ: [a] แสดงถึงความแตกต่างกับตำรับที่ 5 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Duncan

[b] แสดงถึงความแตกต่างกับตำรับที่ 4 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Duncan

[c] แสดงถึงความแตกต่างกับตำรับที่ 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Duncan

ดังนั้นสูตรตำรับของอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรที่เหมาะสม ควรประกอบไปด้วยสารลดแรงตึงผิวร้อยละ 5.00 และมีปริมาณไขมันรวมที่ร้อยละ 7.50

4.4.4 ผลของสัดส่วนน้ำมันงาต่อค่าร้อยละการกักเก็บสาร

สูตรตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน เมื่อเพิ่มสัดส่วนของน้ำมันงาจากร้อยละ 10, 20 และ 30 ของปริมาณไขมันรวม พบว่าขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้อยู่ในช่วง 184.60-200.90 นาโนเมตร และค่าร้อยละในการกักเก็บสารเซซามิน และเซซาโมลิน อยู่ในช่วง ร้อยละ 91.90-92.30 และ 90.51-94.52 ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของน้ำงาเป็นร้อยละ 40 พบว่าร้อยละในการกักเก็บสารเซซามินและเซซาโมลินลดลงมาอยู่ที่ร้อยละ 80.06 และ 80.20 แสดงผลดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลของปริมาณน้ำมันงาของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.10 ที่มีต่อขนาดอนุภาค ค่าการกระจายอนุภาคและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (n=3)

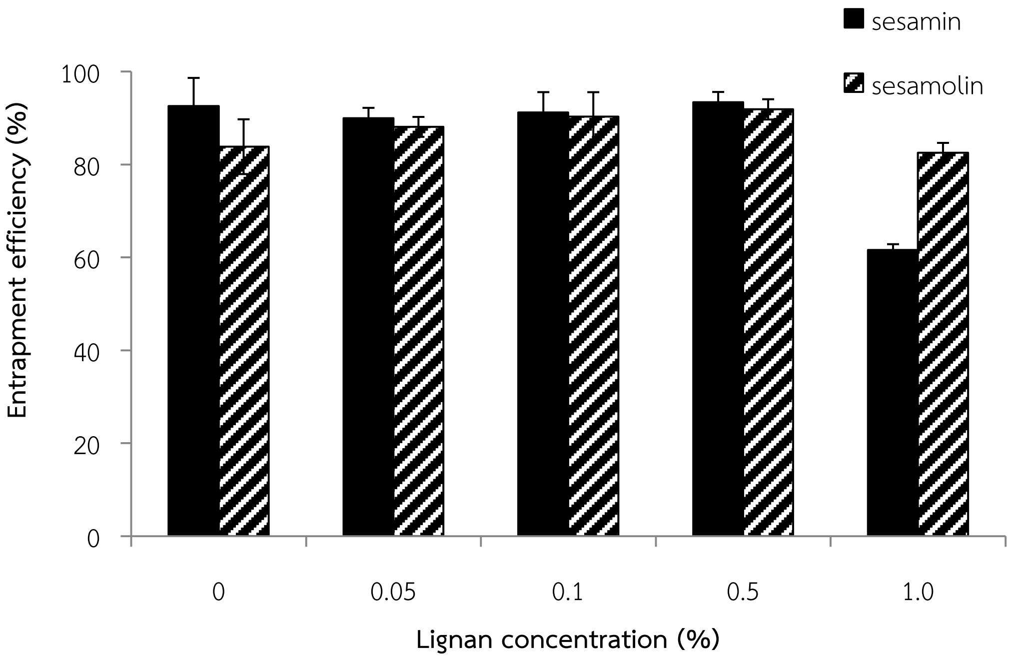
สัดส่วนของน้ำมันงาต่อปริมาณไขมันรวม (%)	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าการกระจายอนุภาค	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)
10	200.90 ± 1.01	0.21 ± 0.00	-21.57 ± 0.47
20	198.80 ± 3.82	0.21 ± 0.01	-22.83 ± 0.15
30	184.60 ± 1.11	0.20 ± 0.02	-26.63 ± 0.67
40	187.40 ± 0.10	0.20 ± 0.01	-24.97 ± 0.57

ตารางที่ 4.8 ค่าร้อยละการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่มีปริมาณน้ำมันงาในสัดส่วนต่าง ๆ กันของปริมาณไขมันรวม (n=3)

สัดส่วนน้ำมันงาต่อปริมาณไขมันรวม (%)	ร้อยละการกักเก็บ (%)	
	เซซามิน	เซซาโมลิน
10	92.27 ± 0.43	94.52 ± 2.98
20	91.90 ± 0.72	90.51 ± 0.58
30	92.30 ± 3.81	93.14 ± 0.63
40	80.06 ± 0.64	80.20 ± 0.72

4.4.3 ผลของปริมาณสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนต่อค่าร้อยละการกักเก็บสาร

ศึกษาสูตรตำรับที่เหมาะสมของอนุภาคไขมันขนาดนาโน ซึ่งประกอบด้วยปริมาณไขมันรวมร้อยละ 7.50 สารลดแรงตึงผิว ร้อยละ 5.00 ปริมาณน้ำมันงาร้อย 30 ของปริมาณไขมันรวม เพื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละการกักเก็บสาร โดยทำการแปรผันปริมาณ สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนเพื่อบรรจุลงในอนุภาคนาโนสตรักเจอร์ลิปิดแคริเออร์ ที่ร้อยละ 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 พบว่าค่าร้อยละการกักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.50 อยู่ในช่วง 89.94-93.40 88 .09 และ 88.09-91.86 สำหรับสารเซซามิน และเซซาโมลิน ตามลำดับ และเมื่อเพิ่ม สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.00 พบว่าค่าร้อยละการเก็บสาร สารเซซามินลดลงมาที่ร้อยละ 61.56 ± 1.28 และเซซาโมลิน ลดลงมาที่ร้อยละ 82.50 แสดงดังภาพที่ 4.6.



ภาพที่ 4.6 ค่าร้อยละการกักเก็บสารของอนุภาคไขมันขนาดนาโนในรูปแบบ NLC ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 (n = 3)

ดังนั้นอนุภาคไขมันขนาดนาโน ซึ่งประกอบด้วยปริมาณไขมันรวมร้อยละ 7.50 สารลดแรงตึงผิวร้อยละ 5.00 ปริมาณน้ำมันงาร้อย 30 ของปริมาณไขมันรวม สามารถบรรจุ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนได้เหมาะสมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

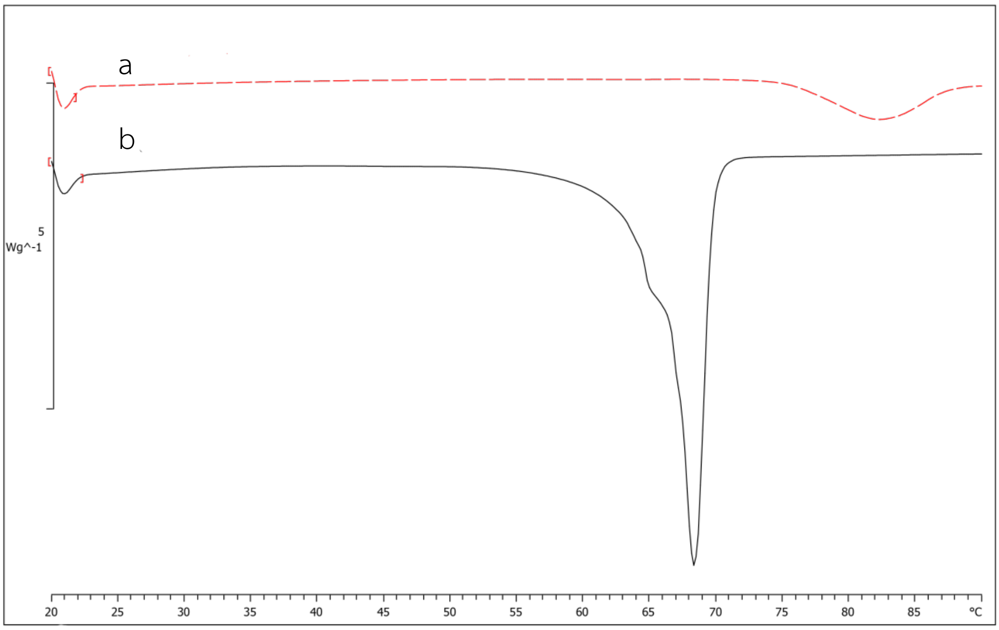
เมื่อบรรจุสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.50 ภายในอนุภาคโซลิดลิปิดนาโนพาร์ติเคิล (SLN, ตำรับที่ 7), นาโนสตรักเจอร์ลิปิดแคริเออร์ (NLC, ตำรับที่ 8) และนาโนอิมัลชัน (NE, ตำรับที่ 9) พบว่าสามารถกักเก็บสารเซซามิน และเซซาโมลินในอนุภาคขนาดนาโนเมตรได้ในช่วงร้อยละ 93.00-98.37 และ 95.94-98.92 ตามลำดับ โดยตำรับที่ 8 ซึ่งเป็นรูปแบบ NLC มีความสามารถในการกักเก็บสารเซซามิน และเซซาโมลินได้มากที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ค่าร้อยละการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.50 ในอนุภาคไขมันขนาดนาโนในรูปแบบ SLN, NLC และ NE (n=5)

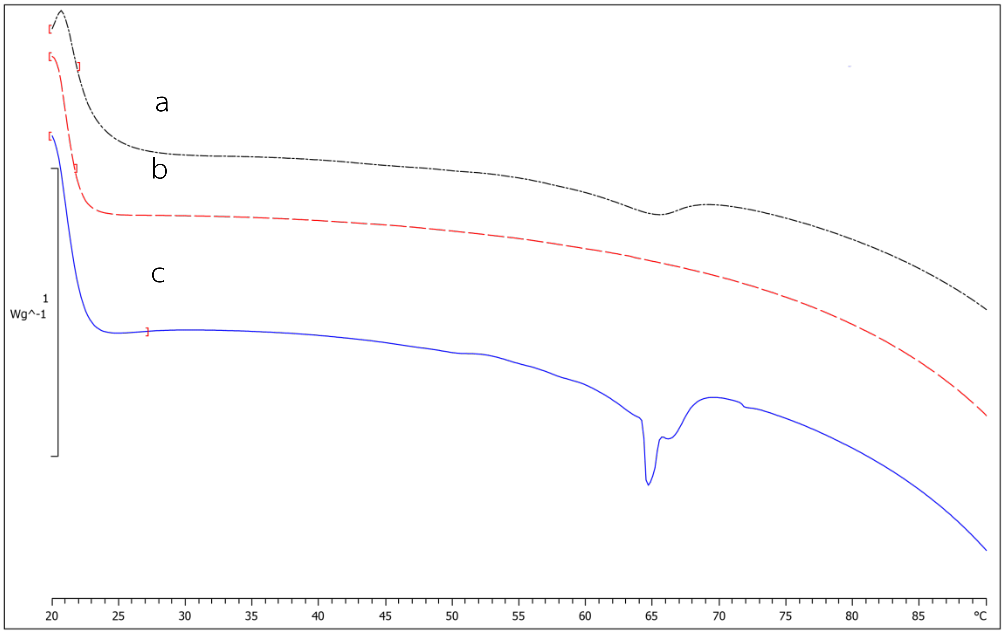
ตำรับที่	โอลิแว็กซ์	น้ำมันงา	Kolliphor®	ค่าร้อยละการกักเก็บสาร (%)	
				เซซามิน	เซซาโมลิน
7	7.50	0.00	5.00	93.00 ± 4.31	96.46 ± 4.99
8	5.25	2.25	5.00	98.37 ± 2.30	98.92 ± 2.36
9	0.00	7.50	5.00	95.06 ±2.91	95.94 ± 3.03

4.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อนของอนุภาคไขมันขนาดนาโนด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC-Thermogram)

จากการทดสอบการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อนของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ใน 3 รูปแบบ คือ SLN, NLC และ NE และส่วนประกอบของอนุภาคไขมัน พบว่าจุดหลอมเหลวของโอลิแว็กซ์ และสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน คือ 67.93 และ 82.08 °C และเอนทาลปีการหลอมเหลว คือ 131.47 $J.g^{-1}$ และ 24.01 $J.g^{-1}$ ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.7 ในอนุภาคไขมันแบบ SLN ที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 มีค่าเอนทาลปี และค่าร้อยละของดัชนีความเป็นผลึก (Crystallinity index, CI) ที่ 6.18 $J.g^{-1}$ และ 62.68% ส่วนอนุภาคไขมันแบบ NLC ที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 มีค่าเอนทาลปี และค่าร้อยละของดัชนีความเป็นผลึกที่ 2.04 $J.g^{-1}$ และ 20.69% แสดงดังภาพที่ 4.8

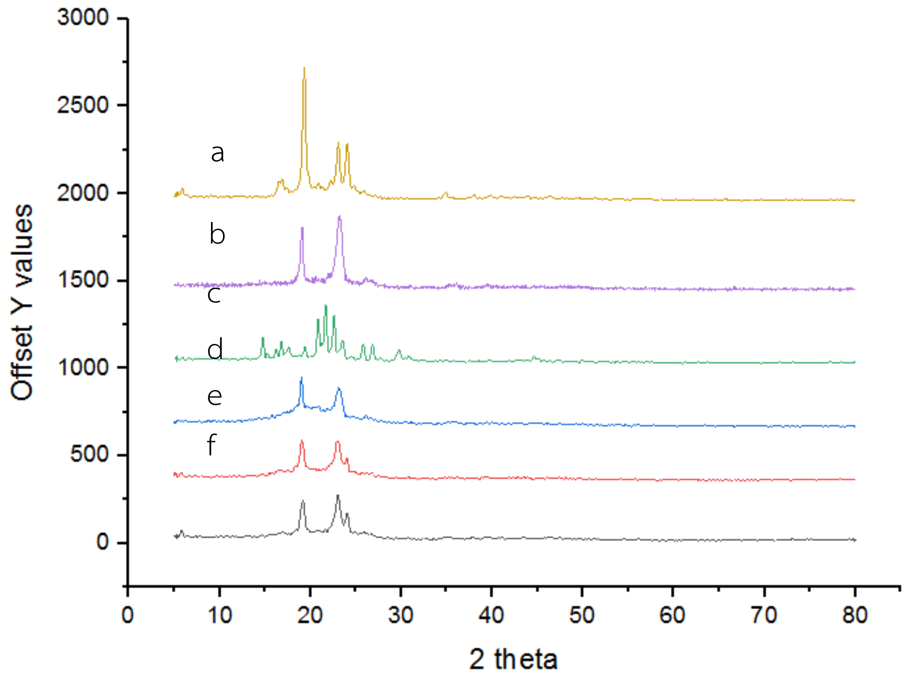


ภาพที่ 4.7 กราฟ DSC สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (a) และ โอลิแว็กซ์ (b)

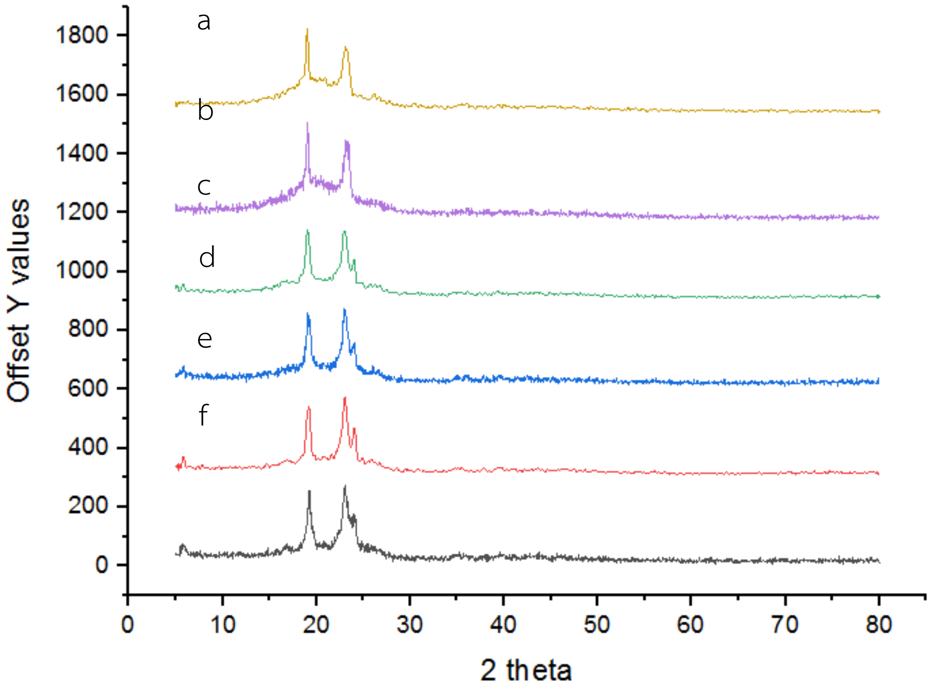


ภาพที่ 4.8 กราฟ DSC ของNLC ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 (a), NE ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (b) และSLN ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (c)

4.6 ศึกษาระนาบของผลึกอนุภาคไขมันขนาดนาโนด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction, XRD)



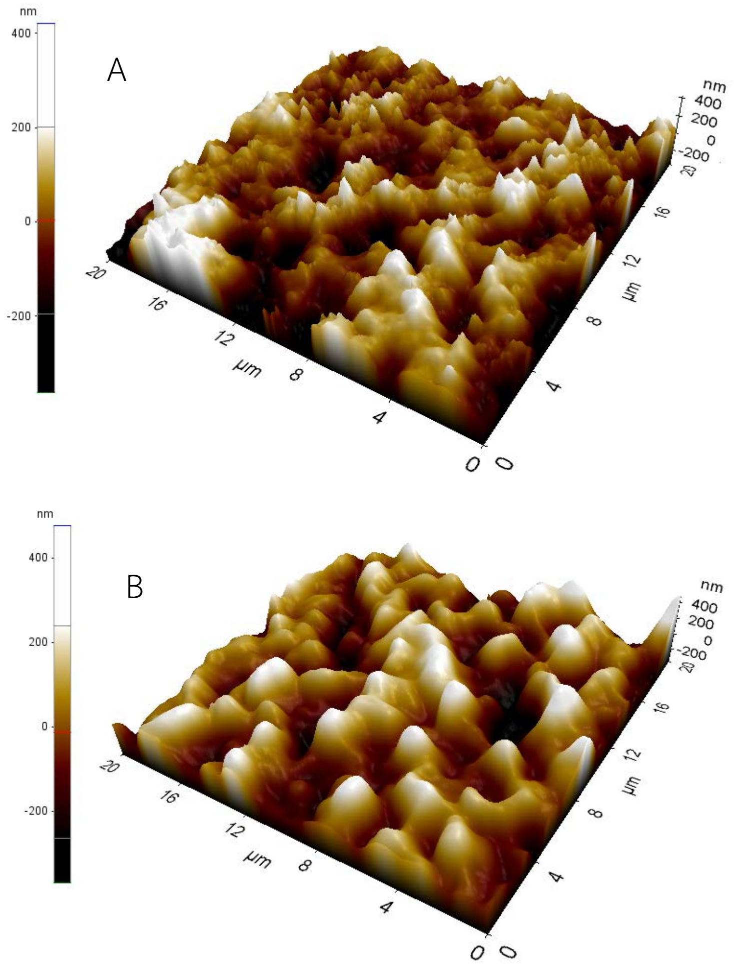
ภาพที่ 4.9 กราฟ XRD ของ โอลิแว็กซ์ (a), สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (b), poloxamer 188 (c), SLN ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (d), NLC ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (e) และ NE ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (f)



ภาพที่ 4.10 กราฟ XRD ของNE ที่ไม่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (a), NE ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนร้อยละ 0.50 (b), NLC ที่ไม่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (c), NLC ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (d), SLN ที่ไม่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน (e) และSLN ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 (f)

4.7 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของอนุภาคไขมันขนาดนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscopy)

จากการวิเคราะห์อนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตร ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.5 ในรูปแบบ SLN และ NLC ด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม พบว่าอนุภาค SLN และ NLC มีรูปร่างเป็นทรงกลม โดยอนุภาครูปแบบ SLN มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 200-300 นาโนเมตร ในขณะที่อนุภาครูปแบบ NLC มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 800-1000 นาโมเมตร ภาพ 3 มิติของอนุภาคทั้ง 2 ชนิด แสดงดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 ภาพสามมิติจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมของอนุภาคไขมันในรูปแบบ SLN (A) และNLC (B)

4.8 ทดสอบการปลดปล่อยสาร และการซึมผ่านทางผิวหนังของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน

4.8.1 ทดสอบการละลายของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน

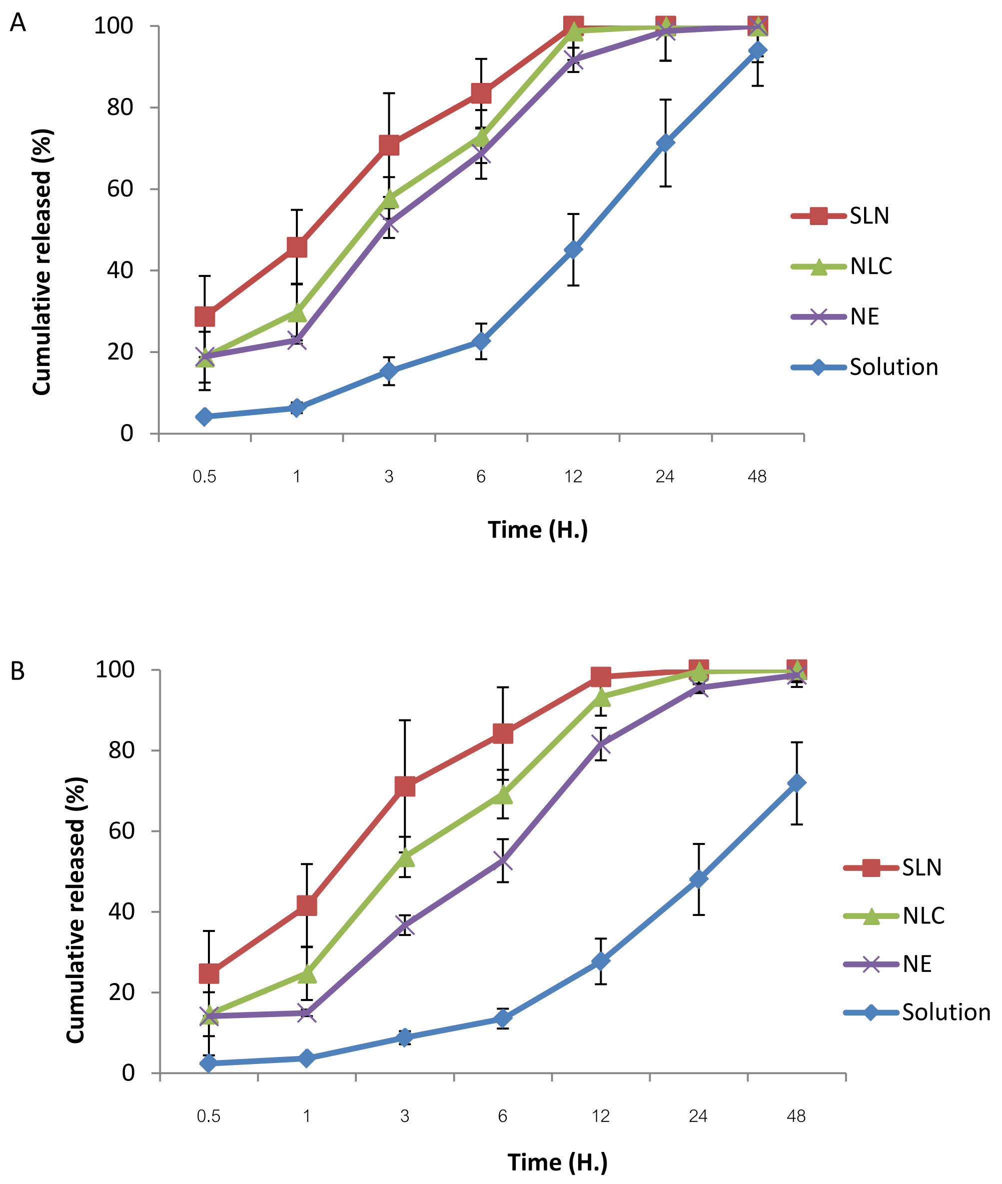
สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน เป็นสารที่มี ค่าการละลายน้ำต่ำ ในการศึกษาการปลดปล่อยสารและการซึมผ่านผิวหนังจำเป็นต้องหาตัวทำละลายที่มีเหมาะสมเพื่อ ให้อยู่ภายใต้สภาวะ การปลดปล่อยอิสระ (sink condition) ส่งผลให้การปลดปล่อยสารเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำการทดลองละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนในตัวทำละลาย 3 กลุ่ม คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว คือ สารผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์ กับสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ในอัตราส่วนต่าง ๆ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารผสมระหว่าง สารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) กับ DMSO ร้อยละ 1 และกลุ่มสุดท้ายคือ สารลดแรงตึงผิว ได้แก่ Tween 20 และ Tween 80 ที่อุณหภูมิ 32 ± 2 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่บริเวณผิวหนัง จากผลการทดลองพบว่าเซซามินและเซซาโมลิน มีค่าการละลา ยในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ที่ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การเพิ่มสัดส่วนเอทิลแอลกอฮอล์เป็นร้อยละ 10 และ 30 สามารถเพิ่มการละลายได้เล็กน้อย กลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น DMSO และเอทิลแอลกอฮอล์ สามารถเพิ่มการละลายได้มากกว่ากลุ่มสารลดแรงตึงผิว โดยค่าการละลายของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในตัวทำละลายต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 4.10

4.8.2 ทดสอบการปลดปล่อยสารด้วยเทคนิคไดอะไลซิส

การทดสอบการปลดปล่อยสารเพื่อให้ทราบอัตราเร็วในการปลดปล่อยสารจากอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตร และการละลายของสารในสารละลายตัวกลาง จากการทด ลองการปลดปล่อยสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 ที่กักเก็บในอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรแบบ SLN, NLC และ NE เทียบกับการปลดปล่อย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ในรูปแบบสารละลายในน้ำมันงา โดยใช้สารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นสารละลายตัวกลาง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 32 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ผลการทดลองดังภาพที่ 4.12

ตารางที่ 4.10 ค่าขีดการละลายของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในตัวทำละลายต่าง ๆ (pH 7.4, 32 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที, n=3)

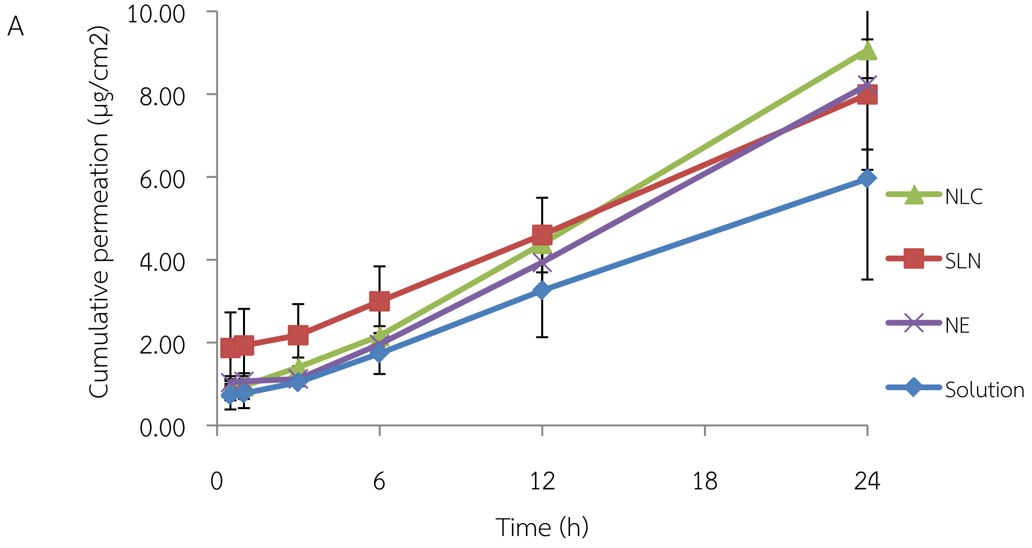
ตัวทำละลาย	ค่าขีดการละลาย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
	เซซามิน	เซซาโมลิน
PBS pH 7.4	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000
10%EtOH:PBS	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000
30%EtOH:PBS	0.018 ± 0.002	0.017 ± 0.002
50%EtOH:PBS	0.218 ± 0.011	0.258 ± 0.013
70%EtOH:DI	1.006 ± 0.120	1.366 ± 0.164
100% EtOH	2.567 ± 0.093	3.408 ± 0.205
100% DMSO	> 1000	> 1000
1% DMSO	0.001 ± 0.000	0.005 ± 0.004
5% Tween 20	0.150 ± 0.002	0.300 ± 0.003
10% Tween 20	0.149 ± 0.004	0.366 ± 0.009
20% Tween 20	0.228 ± 0.003	0.666 ± 0.007
5% Tween 80	0.123 ± 0.003	0.302 ± 0.008
10% Tween 80	0.200 ± 0.002	0.504 ± 0.004
20% Tween 80	0.233 ± 0.001	0.566 ± 0.001

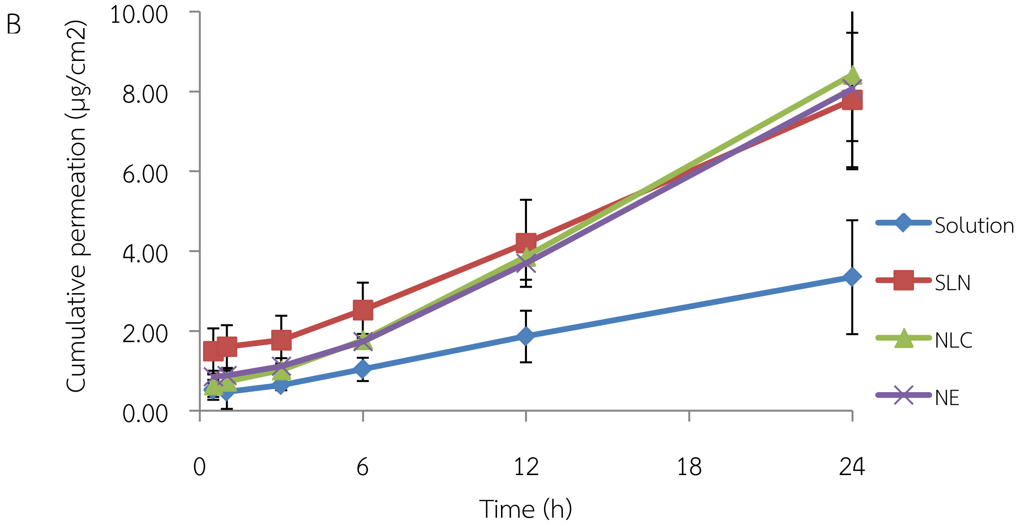


ภาพที่ 4.12 การปลดปล่อยสารเซซามิน (A) และสารเซซาโมลิน (B) จากตำรับ SLN, NLC และ NE ด้วยเทคนิคไดอะไลซิส (ช่วงมวลโมเลกุล 12,000-14,000, สารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) (1:1), 32 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที, n=3)

4.8.3 ทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังด้วยเทคนิค Franz diffusion cell

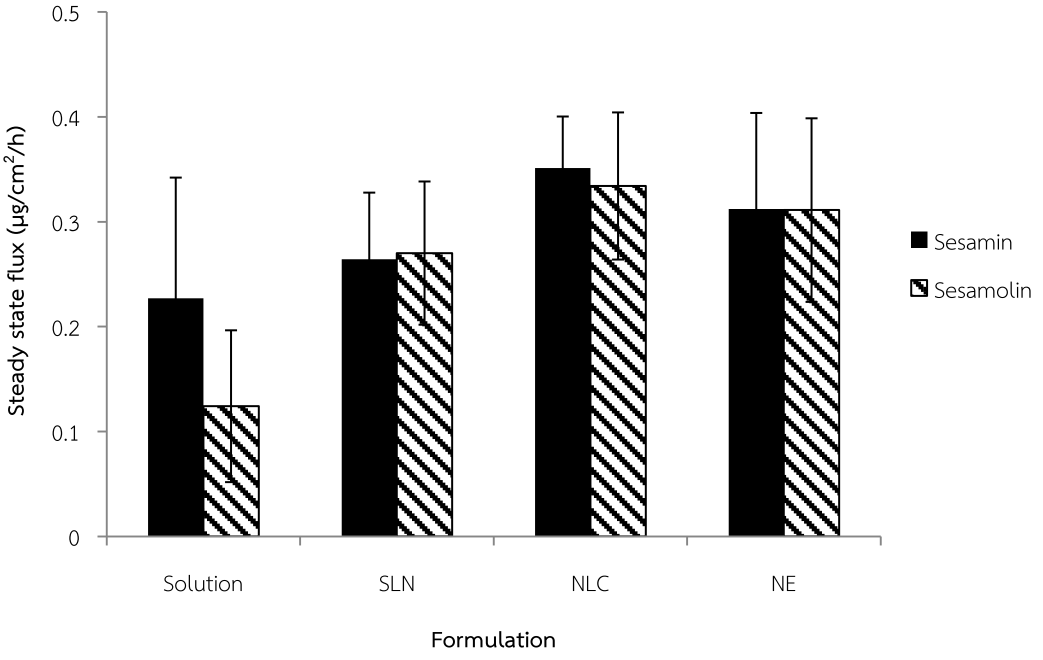
การประเมินการซึมผ่านผิวหนังของลูกสุกรตายแรกเกิดของตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรแบบ SLN, NLC และ NE ที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ที่พัฒนาขึ้น เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Franz diffusion cell ที่อุณหภูมิ 32 ± 2 °C และสุ่มเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 0.5, 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.13





ภาพที่ 4.13 **ปริมาณสารเซซามิน (A) และเซซาโมลิน (B) ที่ซึมผ่านผิวหนังสุกรตายแรกเกิดของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ละลายในน้ำมันงา และตำรับที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรแบบ SLN, NLC และ NE สารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) (1:1), 32 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที, n=3)**

จากการทดลองพบว่า สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ในอนุภาคขนาดนาโนสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ดีกว่ารูปแบบของสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา และในชั่วโมงที่ 24 ตำรับที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ในอนุภาคขนาดนาโนเมตร พบปริมาณสารเซซามิน และเซซาโมลิน ในสารละลายตัวกลางมากกว่า 7 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร แต่สารละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา พบสารเซามิน และเซ ซาโมลินเพียง 5.96 ± 2.43 และ 3.35 ± 1.43 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนั้นค่า steady state flux หรือ อัตราการแพร่ผ่านผิวหนังสุ กรตายแรกเกิด จากความชันของกราฟ อนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรที่กักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ในรูปแบบ SLN, NLC และ NE มีค่า steady state flux ที่มากกว่าสารละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา แสดงดังภาพที่ 4.14 โดยค่า steady state flux ของสารเซซามิน ของสารละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา ตำรับอนุภาค SLN, NLC และ NE คือ 0.23, 0.26. 0.35 และ 0.31 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่สารเซซาโมลินของสารละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา, SLN, NLC และ NE คือ 0.12, 0.27, 0.33 และ 0.31 ไมโครกรัม/ตารางเซนติเมตร/ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 4.14 ค่าเฉลีย steady state flux ของสารเซซามิน และสารเซซาโมลินทีซึมผ่านหนังสุกรตายแรกเกิดของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ละลายในน้ำมันงา และตำรับที่กักเก็บสารสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 ในอนุภาคไขมันขนาดนาโนแบบ SLN, NLC และ NE (n=3)

4.9 ทดสอบความคงตัวของอนุภาคไขมันขนาดนาโนเตรที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในรูปแบบ SLN, NLC และ NE

4.9.1 ทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 ในรูปแบบ SLN, NLC และ NE เมื่อเก็บภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อประเมินลักษณะทางกายภาพของ อนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรทั้ง 3 รูปแบบ แสดงผลดังภาพที่ 4.15

A

B

C

ภาพที่ 4.15 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 ในรูปแบบ SLN, NLC และ NE ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน

จากศึกษาความคงตัวทางกายภาพของตำรับ ทั้ง 3 ตำรับในทุกอุณหภูมิ พบว่า ตำรับไม่มีการแยกชั้น หรือเป็นเจลข้นสีขาว ตลอดระยะเวลาการเก็บตำรับเป็นเวลา 3 เดือน

เมื่อวัดขนาด อนุภาค การกระจายอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิว อนุภาคของตำรับทั้งหมด พบว่าขนาดอนุภาคของตำรับ SLN, NLC และ NE ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเดือนที่ 0 เมื่อเก็บภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน แต่อนุภาคทั้ง 3 รูปแบบมีขนาดที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเดือนเริ่มต้นเมื่อเก็บไว้ที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 แสดงผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ขนาดอนุภาคเฉลี่ย การกระจายขนาดของอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน

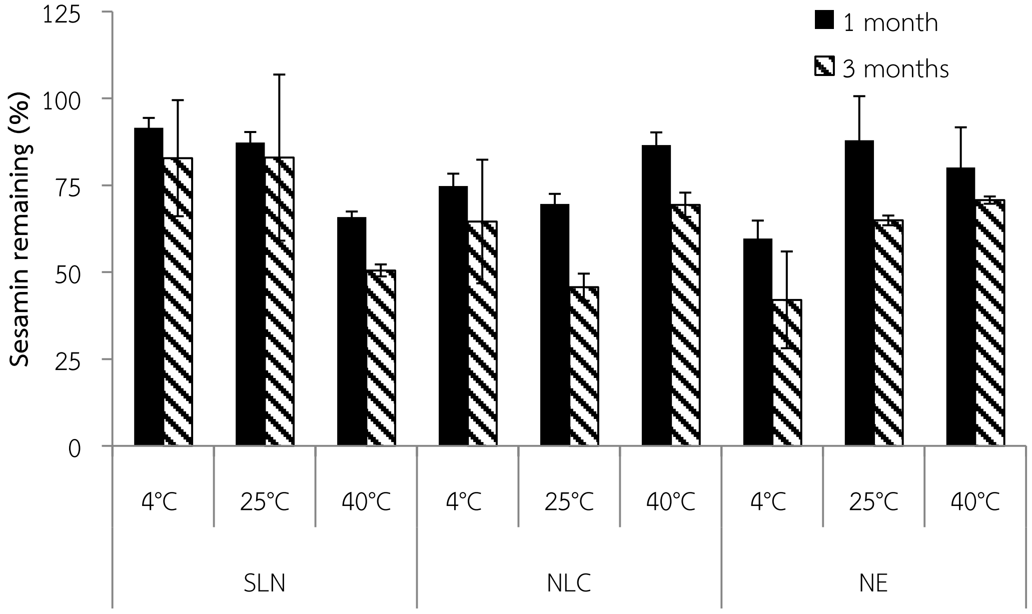
Month	Parameter	Storage condition								
		4°C 75% RH			25°C 75% RH			40°C 75% RH		
		SLN	NLC	NE	SLN	NLC	NE	SLN	NLC	NE
0	Size (nm)	215.40±1.80	186.50±2.40	175.13±2.92	215.4±1.80	186.50±2.40	175.13±2.92	215.40±1.80	186.50±2.40	175.13±2.92
	PDI	0.29±0.02	0.23±0.02	0.22±0.01	0.29±0.02	0.23±0.02	0.22±0.01	0.29±0.02	0.23±0.02	0.22±0.01
	ZP (mV)	-18.63±0.42	-20.73±0.47	-27.43±3.02	-18.63±0.42	-20.73±0.47	-27.43±3.02	-18.63±0.42	-20.73±0.47	-27.43±3.02
1	Size (nm)	205.83±0.40	176.27±1.24*	169.87±2.22	223.07±1.16*	189.97±3.65	172.17±2.29	200.37±0.83*	183.83±0.31	176.70±0.26
	PDI	0.23±0.01	0.19±0.02	0.18±0.00	0.29±0.02	0.24±0.01	0.20±0.01	0.22±0.01	0.19±0.02	0.21±0.02
	ZP (mV)	-25.87±0.85	-24.40±0.96	-28.03±3.80	-23.50±0.20	-25.83±0.67	-24.87±2.54	-28.10±0.20	-22.37±1.96	-26.83±0.35
3	Size (nm)	221.47±6.51	190.20±4.34	184.73±4.37	216.90±5.35	179.60±2.09*	172.47±2.45	199.77±2.61*	179.70±3.50*	170.87±1.22*
	PDI	0.26±0.01	0.25±0.02	0.25±0.01	0.26±0.01	0.19±0.02	0.19±0.01	0.22±0.03	0.20±0.01	0.19±0.01
	ZP (mV)	-26.70±0.35	-29.33±0.45	-31.20±0.46	-25.97±0.06	-33.50±0.90	-31.97±1.46	-28.23±0.25	-27.47±0.47	-28.33±0.60

หมายเหตุ: แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3)

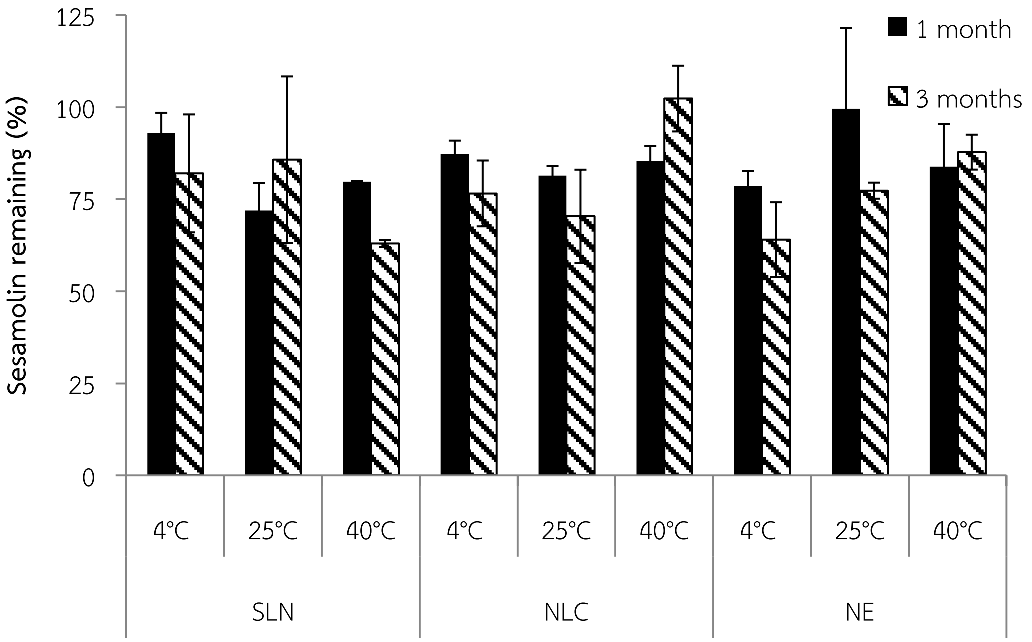
* ขนาดอนุภาคมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเทียบกับเดือนที่ 0

4.9.2 วิเคราะห์ปริมาณสารเซซามินและเซซาโมลินที่คงเหลือในอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรในรูปแบบ SLN, NLC และ NE

การวิเคราะห์สารเซซามินและสารเซซาโมลินที่คงเหลือในตำรับ เมื่อเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อประเมินถึงการเปลี่ยนแปลงของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50 ที่กักเก็บไว้ในตำรับ SLN, NLC, และ NE พบว่าปริมาณสารเซซามิน และเซซาโมลินคงเหลือน้อยที่สุด เมื่อเก็บตำรับ SLN, NLC, และ NE ที่ 40องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75และ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน ตามลำดับ แสดงผลดังภาพที่ 4.16 และภาพที่ 4.17



ภาพที่ 4.16 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณสารเซซามินที่คงเหลือในตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนในรูปแบบ SLN, NLC และ NE เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 4.17 กราฟแสดงร้อยละของปริมาณสารเซซาโมลินที่คงเหลือในตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนในรูปแบบ SLN, NLC และ NE เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

5.1.1 การแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงาและวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนด้วยวิธีโครโมโตกราฟีเหลวความดันสูง

งานวิจัยนี้ได้สกัด สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน จาก น้ำมันงาดำบริสุทธิ์ (virgin sesame oil) ที่สกัดโดยวิธีการบีบแบบอัดเย็นจากศูนย์การเรียนรู้และพัฒนางาเชิงเกษตรอุตสาหกรรมครัวเรือนแบบยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พบว่าสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่แยกได้จากน้ำมันงาดำสกัดเย็น มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวครีม จากการวิเคราะห์ปริมาณ สำคัญของ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงาที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ด้วยวิธี โครโมโตกราฟีเหลวความดันสูง โดยใช้เซซามิน และเซซาโมลินเป็นสารมาตรฐาน (Standard) พบว่ามีปริมาณเซซามินและเซซาโมลิน 3.81 ± 0.18 และ 3.79 ± 0.18 มิลลิกรัมต่อน้ำมันงาหนึ่งกรัม ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยจากก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการศึกษาหาปริมาณสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนของผลิตภัณฑ์น้ำมันงาในท้องตลาดไทยพบว่า มีปริมาณเซซามินและเซซาโมลิ นอยู่ในช่วง 0.93 – 2.89 มิลลิกรัมต่อน้ำมันงาหนึ่งกรัม และ 0.30 – 0.74 มิลลิกรัมต่อน้ำมันงาหนึ่งกรัม ตามลำดับ (Rungkadilok et al., 2010) แสดงว่า น้ำมันงาจากศูนย์การเรียนรู้และพัฒนางาเชิงเกษตรอุตสาหกรรมครัวเรือนแบบยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี มีปริมาณสารในกลุ่มลิกแนนมากกว่าจากแหล่งอื่น ๆ และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารเซซามินและเซซาโมลินใน สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน พบปริมาณเซซามิน และเซซาโมลิน ที่ 353.42 ± 25.57 และ 345.29 ± 16.81 มิลลิกรัมต่อ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน 1 กรัม หรือประมาณ 1.69 และ 1.65 กรัมต่อน้ำมันงา 1 กิโลกรัม ซึ่งปริมาณสารเซซามินและเซซาโมลิน ในเมล็ดงามีความหลากหลายขึ้นกับสายพันธุ์ บริเวณเพาะปลูก สภาวะในการเจริญเติบโต เช่น ชนิดของดิน ปุ๋ย และสภาพอากาศ รวมไปถึงขนาดของเมล็ดงา ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว ล้วนมีผลต่ออ งค์ประกอบในเมล็ดงา และน้ำมันงาที่ได้ (Rungkadilok et al., 2010) รวมถึงงานวิจัยของ Hemalatha S. และ Ghafoorunissa (2004) ที่ทำการสกัดน้ำมันจากงา ขาว และงาดำ 21 ตัวอย่างที่มาจาก หลายสายพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ เซซามิน และ เซซาโมลิน พบว่าตัวอย่างที่มีปริมาณเซซามิน และเซซาโมลินมากที่สุดแตกต่างจากตัวอย่างที่มีปริมาณ เซซามิน และเซซาโมลินน้อยที่สุดอยู่ 5-6 เท่า จากการศึกษาพบว่า สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่แยกจากน้ำมันงามีสารเป็นองค์ประกอบถึง 16 ชนิด โดยสารส่วนใหญ่เป็นสารอะไกลโคน (aglycones) ประเภทที่ละลายได้ในไขมัน เมื่อทำการสกัดสาร

กลุ่มนี้จึงถูกชะล้างออกมาในส่วนของน้ำมัน สารประกอบหลักของสารอะไกลโคนในน้ำมันงา คือ เซซามินและเซซาโมลิน ในขณะที่เซซามอล, เซซามินอล (sesaminol), เซซาโมลินอล (sesamolinol) เป็นสารประกอบย่อยของสารอะไกลโคนในน้ำมันงา (Dar A. and Arumugam N., 2013) สารเซซามินและเซซาโมลินเป็นสารที่พบมากที่สุดในสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากน้ำมันงาโดยมีปริมาณตั้งแต่ 0.70-8.85 และ 0.20-4.80 กรัมต่อน้ำมันงา 1 กิโลกรัมตามลำดับ ส่วนสารเซซามอลมีปริมาณเพียงเล็กน้อยโดยอยู่ในช่วง 50-100 มิลลิกรัมต่อน้ำมันงา 1 กิโลกรัม โดยปริมาณของสารนั้นแตกต่างไปตามแหล่งเพาะปลูก (Wan Y. et al., 2014) ซึ่งเมื่อคิดเป็นร้อยละปริมาณสารเซซามิน , เซซาโมลินและเซซามอล ในน้ำมันงามีสัดส่วนที่ร้อยละ 0.07-0.89, 0.02-0.48 และ 0.005-0.01 ตามลำดับ

5.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน

5.1.2.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์เจลลาติเนสและอีลาสเตส

ริ้วรอยของผิวหนัง และผิวหนังแก่ก่อนวัย เกิดจากการที่คอลลาเจนในชั้นผิวหนังแท้ถูกทำลาย ซึ่งคอลลาเจนสลายโดยเอนไซม์คอลลาจีเนส และเกิดเป็นเจลาตินซึ่งเ ป็นโปรตีนโมเลกุลที่เล็กลงที่สามารถถูกทำลายด้วยเอนไซม์เจลลาติเนส นอกจากนี้การสูญเสียความเต่งตึง หรือความยืดหยุ่นของผิวหนัง ก็เนื่องมาจากเส้นใยอีลาสตินนั้นถูกทำลายด้วยเอนไซม์อีลาสเตส การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์เจลาติเนสและอีลาสเตส เพื่อหาฤทธิ์ของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ชุดทดสอบ EnzChek® Gelatinase Assay Kit และ EnzChek® Elastase Assay Kit, (Molecular Probes, USA) ซึ่งมีสารตั้งต้นเป็น DQ™ Gelatin (Elastin ในกรณีของชุดทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส) ที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ สามารถตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วงแสงฟลูออเรสเซนต์ ที่เปลี่ยนแปลงได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เจลาติเนส และอีลาสเตสที่เพิ่มขึ้น ในการทดสอบแบบ *in vitro* เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน สารมาตรฐานเซซามิน , เซซาโมลิน และเซซามอลได้ พบว่าไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด เนื่องจากสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน รวมถึงสารมาตรฐานเซซามิน เซซาโมลิน และ เซซามอลเป็นสารที่ละลายน้ำได้ยาก ทำให้เกิดข้อจำกัดในการทำให้สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นด้วยข้อจำกัดในการละลายของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน รวมถึงสารมาตรฐานเซซามิน เซซาโมลิน จึงอาจเป็นเหตุให้การทดลองแบบ *in vitro* จึงไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์เจลลาติเนส และอีลาสเตสที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส อีลาสเตส และไฮยาลูโรนิเดสของสารเซซามิน และเซซามอล โดยการให้อาหารทางสายยางแก่หนูเพศผู้เป็นเวลา 15 วัน ก่อนจะมีการเหนี่ยวนำให้เป็นโรคข้ออักเสบอีก 15 วัน โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการให้น้ำมันงาที่มีสารเซซามอล และเซซามินที่มีความเข้มข้น 0.24 และ 3.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมันงา ตามลำดับ กับ

น้ำมันงาที่มีการสกัดสารเซซามอล และเซซามินออก แล้ววิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์คอลลาจีเนส อีลาสเตส และไฮยาลูโรนิเดสในเนื้อเยื่อของไขข้อ โดยพบว่าหนูที่ได้รับน้ำมันงาที่มีสารเซซามอล และเซซามิน มีปริมาณของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนั้นลดลง และมีผลทำให้หนูมีอาการไขข้ออักเสบที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yadav et. al., 2016) และในการทดสอบฤทธิ์แบบ *in vivo* เมื่อเซซามิน และเซซาโมลิน เข้าสู่เซลล์ร่างกายของสิ่งมีชีวิต สาร ทั้ง 2 ชนิดจะถูกเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ ต่าง ๆ เช่น เซซามอล เซซาโมลินอล โมโนคาเตชอล หรือไดคาเตชอล ด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrom P450 ซึ่งมักพบในตับ ซึ่งอนุพันธ์เหล่านี้ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก (Wan Y. et al., 2014) ดังนั้นการใช้สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนเพื่อช่วยฟื้นฟูสภาพผิว อาจจะผ่านกลไกด้านอื่น เช่น งานวิจัยที่ พบว่าเซซามอล ช่วยในกระบวนการรักษาบาดแผล และเพิ่มปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของคอลลาเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Shenoy R.R et al., 2011)

5.2.2.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีจับอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$

อนุมูลอิสระมีผลทำให้เกิดการทำลายเซลล์ผิว มีการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจน นอกจากนั้นแสงแดดยังเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระมากขึ้น ส่งผลให้เกิด ผิวหนังเหี่ยวย่นจากแสงแดด หรือมีการเกิดเป็นมะเร็งผิวหนังได้ (วิชิต ลีนุตพงษ์, 2547) ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่าสาร มาตรฐาน เซซามอลมีฤทธิ์ในก ารต้านอนุมูลอิสระได้ดี และมีฤทธิ์ ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ที่ดีกว่าตัวควบคุมเชิงบวก คือ วิตามินซี ในขณะที่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนน จะน้อยกว่าสารมาตรฐานเซซามอล แต่ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำมันงา ถึ ง 3 เท่า จากการวิเคราะห์ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน พบว่ามีสารเซซามินและเซซาโมลินเป็นส่วนประกอบหลัก และพบสารเซซามอลเป็นส่วนประกอบเพียงเล็กน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยที่กล่าวว่า เซซามินและเซซาโมลินเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำมันงา ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันตามแหล่งที่เพาะป ลูก โดยในไทยมีปริมาณเซซามินและเซซาโมลิน อยู่ที่ประมาณ 0.3-0.74 กรัม ต่อ น้ำมันงา 1 กิโลกรัม สามารถพบปริมาณ เซซามอล ที่ประมาณ 50-100 มิลลิกรัม ต่อ น้ำมันงา 1 กิโลกรัม (Wan Y., 2014) โดยสารเซซามอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี กว่าวิตามินซี 1.5, 6 และ 2.5 เท่า เมื่อทดสอบด้วยวิธีด้วยวิธี DPPH, กำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{\bullet-}$) และอนุมูลไนตริกออกไซด์ ($^{\bullet}NO$) ตามลำดับ และมีฤทธิ์ที่เทียบเท่าวิตามินซี เมื่อกำจัดอนุมูลไฮดรอกซี ($^{\bullet}OH$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Greetha T., Rohit B and Pal KI, 2009) ในขณะที่เซซามิน และเซซาโมลินที่เป็นส่วนประกอบหลักของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน นั้น มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่อ่อน ในปี 2003 Nakai และคณะ ไม่พบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$, กำจัด อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน และอนุมูลไฮดรอกซี ของสารเซซามินเมื่อทดสอบแบบ *in vitro* ในขณะที่ Dai และคณะแย้งว่าสาร เซซามินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$, กำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน และอนุมูลไฮดรอกซี ที่ 7.5, 29.5, 26 กรัม/ลิตร แต่

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าสารเซซามินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่อ่อนเมื่อทดสอบแบบ *in vitro* แต่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการทดสอบแบบ *in vivo* เช่นงานวิจัยที่ให้สารเซซามินแก่กลุ่มตัวอย่างนักศึกษาเพศชาย ที่ไม่สูบบุหรี่ 2 ชั่วโมงก่อนที่จะออกกำลังกายด้วยการปั่นจักรยาน พบว่านักศึกษากลุ่มที่ได้รับเซซามินมีระดับของลิปิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxide) ที่ต่ำกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ได้รับยาแบบหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kiso Y. and Moritani T., 2003) ดังนั้นสารเซซามินจึงถูกจัดให้เ ป็นสารกลุ่ม pro-antioxidant โดยในร่างกายมนุษย์ หรือ หนู เมื่อมีการย่อยสารเซซามินแล้ว พบว่าหมู่เมทิลีนไดออกซีฟีนิล (methylenedioxyphenyl) ของสารเซซามินได้แยกตัวออกและเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารโมโนคาเทชอล (monocatechol) หรือไดคาเทชอล (dicatechol) (Nakai M. et al., 2003) (Yasuda K et al.., 2010) (Penalvo JL et. at., 2005) ในงานทดลองสารเซซามินแบบ *in vitro* แสดงให้เห็นว่าสารเมตาบอไลท์ของเซซามินที่อยู่ในรูปของ คาเทชอล มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species, ROS) และยับยั้งปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าสารกลุ่มเซซามิน (Nakai et al., 2003)

ในส่วนของสารเซซาโมลินก็มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่อ่อนเช่นกันเมื่อทดสอบแบบ *in vitro* ในปี 1988 Kang และคณะ รายงานว่าไม่พบการยับยั้งปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันเมื่อทำการทดสอบแบบ *in vitro* กับไมโครโซมของเซลล์ตับหนูที่มีการเหนี่ยวนำด้วย ADP-Fe^{3+}/NADPH แต่พบการยับยั้งปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในตับและไตของหนูที่ได้รับอาหารเสริมที่มีเซซาโมลินเป็นส่วนประกอบ

ดังนั้นการพบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่อ่อนของเซซามิน และเซซาโมลินในการทดสอบแบบ *in vitro* เนื่องจากโครงสร้างเคมีของสารทั้ง 2 ชนิดไม่มีหมู่ไฮดรอกซีลฟีนอล (phenolic hydroxyl group) จึงเสียความสามารถในการเป็นผู้ให้ อิเล็กตรอนที่ดีแก่อนุมูลอิสระ แต่การที่พบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ในการทดสอบแบบ *in vivo* เนื่องจากสารมีการเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารเมตาบอไลท์ที่มีหมู่ไฮดรอกซีฟีนอลในโครงสร้าง จึง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี

อย่างไรก็ดีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเซซามินและเซซาโมลินนอกจาก โดย กระบวนการเมตาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิตแล้ว ยังมีกระบวนการอื่น ๆ เช่น การเปลี่ยนเซซาโมลินไปเป็นเซซามอลโดยใช้ความร้อน หรือ การเปลี่ยนเซซามินไปเป็นพิโนเรซินอล (pinoresinol) โดยใช้ปฏิกิริยา การย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) (Wan Y. et al, 2014) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีบางกลไกที่ช่วยเปลี่ยนโครงสร้างของสารเซซามินให้เป็นเซซาโมลินซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเซซามอลได้อีกด้วย (Dar AA. and Arumugam N., 2013)

สารเซซาโมลินซึ่งเป็นสารในกลุ่มไกลโคไซน์ ที่ไม่เสถียรเมื่อสัมผัสความร้อนจะเกิดปฏิกิยาไฮโดรไลซิส หรือเมตาบอไลท์ภายในร่างกาย ด้วยเอนไซม์ Cytochrome P450 (Wan Y. et al, 2014) จะให้สารเซซามอล ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี

5.1.3 การพัฒนาตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนเพื่อกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน

การพัฒนาอนุภาคไขมันขนาดนาโนในรูปแบบ SLN, NLC และ NE โดยรูปแบบ SLN และ NLC เป็นระบบ ที่มีการพัฒนาขึ้นมาจากอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยการแทนที่ไขมันที่เป็นของเหลวด้วยไขมันชนิดที่เป็นของแข็งให้เกิดเป็นเมทริกซ์แข็งที่ห้อมล้อมโมเลกุลของสารสำคัญเพื่อนำส่งสารในรูปแบบอนุภาคของแข็ง ซึ่งมีข้อดีที่แตกต่างจากระบบ NE คือ สามารถป้องกันการเสื่อมสลายของตัวยาได้ดีกว่า รูปแบบ SLN และ NLC มีข้อดีหลายประการ เช่น ช่วยเพิ่มการยึดติดผิวหนังเมื่อทาบนผิว คุณสมบัติดังกล่าวทำให้เกิดการปกคลุมผิว (occlusion) ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้น เพิ่มกา รดูดซึม เสริมการซึมผ่านของสารสำคัญ และ การปลดปล่อยสารแบบควบคุม (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ , 2555) ในการเตรียมตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน จะเตรียมด้วยวิธีการปั่นด้วยความเร็วสูง และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ซึ่งเป็นวิธีผลิตที่ทำได้ง่าย มีสภาวะผลิตซ้ำได้ และสามารถขยายการผลิตเป็นจำนวนมากได้ง่าย

การพัฒนาตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนในทั้ง 3 รูปแบบ เพื่อ กักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน จากน้ำมันงาเพื่อช่วยในการ ซึมผ่านทาง ผิวหนัง จะพิจารณา จาก ขนาดของอนุภาค ที่ควรอยู่ในช่วงไม่เกิน 300 นาโนเมตร เพราะเป็นขนาดที่ซึมผ่านทางรูขุมขนได้ (Tarl et al., 2011) และสามารถเข้าถึงบริเวณเป้าหมายที่ความลึก 600-1200 ไมครอน (Wing et al., 2011) โดยทั่วไปแล้วส่วนของชั้นหนังกำพร้าจะหนา 75-150 ไมครอน ชั้นของพา พิลารี (papillary layer) และชั้นเรติคิวลาร์ (reticular layer) ของชั้นหนังแท้อยู่ลึกลงมาจากผิวด้านบน 300 และ 700 ไมครอน ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ชั้นนี้ จะมีเซลล์ไฟโบรบลาส ต์ที่สร้างเส้นใย คอลลาเจน และมีเส้นใยอิลาสติน (Sorrell JM. and Caplan AI., 2004) และเป็นชั้นผิวหนังที่เป็นเป้าหมายในการนำส่ง สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนเพื่อช่วยในการฟื้นฟูผิว

ในการพัฒนาตำรับอนุภาคไขมัน ขนาดนาโน ได้ศึกษาปัจจัยที่เน้น ส่วนประกอบหลักของตำรับ ได้แก่ สัดส่วนของไขมันเหลว ซึ่งในขั้นแรกนั้นพบว่าสัดส่วนของไขมันเหลวไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yuan et al. (2017) ที่พบว่าการเพิ่มสัดส่วนของปริมาณกรดโอเลอิกซึ่งเป็นไขมันเหลวในตำรับไม่มีผลต่อขนาดอนุภาค แต่จะมีผลต่อปริมาณการกักเก็บสารภายในอนุภาค และความสามารถในการปลดปล่อยตัวยาสำคัญออกจากตำรับ ชนิดและปริมาณของไขมันเหลวมีผลต่อความคงตัวของตำรับ โดยไขมันเหลวมีส่วนที่ทำให้เกิดการเรียงตัวโครงสร้างของผลึกที่ไม่เป็นระเบียบ ไขมันเหลวที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ ช่วยให้ตำรับมีความคงตัวมากยิ่งขึ้น Yang et al. (2014) ได้เปรียบเทียบการใช้น้ำมันมะกอก และน้ำมันปาล์มเป็นไขมันเหลวใน

ตำรับ พบว่าตำรับที่ใช้น้ำมันมะกอกมีความคงตัวมากกว่าตำรับที่ใช้น้ำ มันปาล์ม เนื่องจา กน้ำมันมะกอกมีจุดหลอมเหลวที่ - 6 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำมันปาล์มมีจุดหลอมเหลวที่ 35องศาเซลเซียส ดังนั้นที่อุณหภูมิห้องน้ำมันปาล์มจะเป็นไข น้ำมันมะกอกที่มีความหนืดน้อยกว่า จะช่วยให้เคลื่อนที่ปกคลุมโดยรอบอนุภาคได้ง่ายกว่า จึงช่วยให้ตำรับที่ได้ มีความคงตัวที่ดี ซึ่งคุณลักษณะของน้ำมันมะกอกมีความคล้ายคลึงกับน้ำมันงา โดยมีจุดหลอมเหลวต่ำ คือ ที่ - 6 องศาเซลเซียส และค่าความหนืดของน้ำมันงา และน้ำมันมะกอก ที่ 40 องศาเซลเซียส อยู่ที่ประมาณ 0.03 Pa.s (Lemuel and Tianying, 2014) และน้ำมันทั้ง 2 ชนิดยังมีชนิดของกรดไขมันอิ่มตัวที่ใกล้เคียงกัน จากการทดลองเก็บอนุภาคไขมันที่มีน้ำมันงาเป็นส่วนประกอบในสัดส่วน ต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารลดแรงตึงผิว มีผลต่อขนาดของอนุภาค พบว่า เมื่อปริมาณ สารลดแรงตึงผิว เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.50 เป็น 5.00 อนุภาคมีขนาดลดลง อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเพิ่ม สารลดแรงตึงผิว เป็นร้อยละ 7.50 ขนาดอนุภาคกลับใหญ่ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยว่า สารลดแรงตึงผิว ที่ช่วยในการลดแรงตึงผิวระหว่างหยดไขมันและน้ำช่วยทำให้อนุภาคเคลื่อนที่ได้ง่ายในระหว่างขั้นตอนการปั่นผสม ทำให้อนุภาคของไขมันขนาดนาโนนั้นมีขนาดเล็ก และมีผิวสัมผัสที่มากขึ้น ดังนั้นเมื่อเพิ่ม สารลดแรงตึงผิว จึงทำให้อนุภาคมีขนาดที่เล็กลง (วันดี รังสีวิจิตรประภา, 2554) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ สารลดแรงตึงผิว มากยิ่งขึ้น จะทำให้อนุภาคใหญ่ขึ้น เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินจะห่อหุ้มอนุภาคทำให้ขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น (Suksiriworapong, 2014) และจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณไขมันรวม พบว่าอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณไขมันรวมจากร้อยละ 7.50 เป็น ร้อยละ 10.00 ซึ่งอนุภาค ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากปริมาณไขมันส่งผลต่อความหนืดของระบบ การใช้เวลาและแรงที่เท่าเดิมในการเตรียมตำรับ ทำให้ประสิทธิภาพในการลดขนาดของอนุภาคนั้นลดลง (Jinarat et al., 2017) และมีรายงานว่าปริมาณไขมันแข็งที่เพิ่มขึ้นทำให้ความคงตัวของตำรับลดลง (Yingngam et al., 2007) นอกจากนั้นความเข้มข้นของไขมันทั้งหมดในระบบ ต้องสอดคล้องกับปริมาณสารลดแรงตึงผิว กล่าวคือ ปริมาณสารลดแรงตึงผิว จะต้องมีปริมาณมากพอที่จะปกคลุมผิวของอนุภาคไขมันได้ จึงจะทำให้ระบบมีความคงตัว ป้องกันการกลับมารวมกันของอนุภาคไขมัน (Zirak and Pezeshki, 2015) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณไขมันรวม แต่ความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิว ที่เท่าเดิม จะมีผลทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อนำตำรับที่เหมาะสมมากักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน โดยมีการแปรผันสัดส่วนของไขมันเหลว พบว่าเมื่อสัดส่วนไขมันเหลวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 40 ค่าร้อยละในการกักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน กลับลดลงจากร้อยละ 90 เหลือเพียงร้อยละ 80 ซึ่งการเพิ่มปริมาณไขมันเหลวภายในระบบ ทำให้เกิดโครงสร้างที่ไร้ระเบียบภายในเมทริกซ์ไขมัน อนุภาคจึงห่อหุ้มสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ที่มีความเป็นผลึกได้ลดลง สอดคล้องกับ รายงานวิจัยของ Teeranachaideekul et al. (2008) ที่ทำการเปรียบเทียบอนุภาค NLC ที่กักเก็บน้ำมันร้อยละ 5.00 กับร้อยละ 50 โดยใช้เทคนิกสเปกตรัมโปรตอน NMR พบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำมันที่บรรจุใน

NLC ทำให้เกิดการรบกวนโครงสร้างภายในของเมทริกซ์ไขมัน ทำให้เกิดความไร้ระเบียบของโครงสร้างภายในเมทริกซ์ จึงมีการเคลื่อนไหวของน้ำมันมากขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณน้ำมันทำให้เกิดการกระจายของน้ำมันที่ไม่สม่ำเสมอในโครงสร้าง ในระหว่างกระบวนการตกผลึก การละลายของน้ำมันในซิทิลปาล์มิเตทลดลง และไขมันเริ่มกลับมาเป็นผลึก ก่อน เนื่องจากมีจุดหลอมเหลวสูง แล้วตามด้วยการสะสมน้ำมันปริมาณมากบริเวณผิวของอนุภาค น้ำมันจึงมีการเคลื่อนที่สูง ดังนั้นการเพิ่มปริมาณไขมันเหลวในปริมาณมาก จึงทำให้ความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญลดลง

5.1.4 คุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไขมันขนาดนาโน

ในการเตรียมตำรับอนุภาคไขมันที่มีไขมันแข็งเป็นส่วนประกอบ สามารถเกิดผลึกในรูปพหุสัณฐาน (polymorph) ที่มีพลังงานสูงและเป็นโครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ แต่ภายหลังอาจเกิดความไม่คงตัวทางเทอร์โมไดนามิ ก มีแนวโน้มที่จะเกิดโครงสร้างพหุสัณฐานที่มีความคงตัวที่มีพลังงานต่ำกว่ า ได้โครงสร้างที่มีการเรียงตัวที่เป็นระเบียบมากขึ้น ดังนั้นจึงนิยมใช้วิธีการวัดแยกปริมาณความร้อนแบบส่องกราด (Differential Scanning Calorimetry, DSC) และการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ (x-ray diffraction) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายหลังการผลิต (วราภรณ์ จ รรยาประเสริฐ , 2555) การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อนของอนุภาคไขมันขนาดนาโนเมตรด้วยเครื่อง DSC เป็นการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสารระหว่างการทำให้ตัวอย่างร้อนขึ้นหรือเย็นลง ทำให้ทราบข้อมูลทั้งสมบัติทางกายภาพและพลังงานของสาร (Dubey A., Prabhu P. and Kamath J.V., 2012) เมื่อเปรียบเทียบกราฟ DSC ส่วนประกอบของอนุภาคไขมัน คือ โอลิแว็กซ์ และ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน กับอนุภาคไขมันทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าโอลิกแว็กซ์มีความเป็นผลึกมาก จุดหลอมเหลวต่ำกว่าสารสกัดลิกแนน แต่เมื่อเตรียมเป็นตำรับ SLN และ NLC ที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 แล้ว พบว่าค่าเอนทาลปีลดลง และค่าร้อยละของดัชนีความเป็นผลึก (CI) ของอนุภาคแบบ NLC มีค่าน้อยกว่า SLN แสดงว่าอนุภาค NLC มีความเป็นอสัณฐานมาก กว่า SLN และในตำรับที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนไม่พบพีคของสาร กึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน แสดงว่าสาร กึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนสามารถเข้ากันได้ดีกับตำรับ โดยเปลี่ยนจากรูปของผลึกไปอยู่ในส่วนของไขมันในตำรับ (Kesharwani R. et al., 2016) ความกว้างของพีคของอนุภาค NLC กว้างกว่าอนุภาค SLN เนื่องจากการเพิ่มปริมาณน้ำมันทำให้กราฟดูดกลืนความร้อนในช่วงหลอมเ หลวกว้างขึ้น การเติมไขมันเหลวเพิ่มขึ้นในตำรับทำให้การกลับมาเป็นผลึกในระหว่างการลดอุณหภูมิของขั้นตอนการผลิตช้าลง (Teeranachaideekul V. et al., 2008) ในขณะที่อนุภาค NE ไม่พบพีคของสารใดเลยเนื่องจากไม่มีส่วนประกอบของโอลิแว็กซ์รวมถึง สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน สามารถเข้ากับตำรับได้ดีเมื่อศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของส่วนประกอบ และอนุภาค ที่มีการกักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ในทั้ง 3 รูปแบบโดยใช้เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ พบว่าโอลิแว็กซ์และ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน มีความเป็นผลึกสูง และเมื่อเตรียมเป็นตำรับอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนร้อยละ 0.50

ลักษณะความเป็นผลึกของตำรับทั้ง 3 ชนิดนั้นลดลง และกราฟการเลี้ยวเบนของอนุภาคทั้ง 3 ชนิดมีโครงรูปที่คล้ายกับกราฟการเลี้ยวเบนของ poloxamer 188 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีในอนุภาคทั้ง 3 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกราฟการเลี้ยวเบนของอนุภาคทั้ง 3 ชนิดที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนกับอนุภาคที่ไม่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน พบว่าอนุภาคที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนของทั้ง 3 ตำรับกับอนุภาคที่ไม่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์มีกราฟการเลี้ยวเบนที่เหมือนกัน และมีโครงรูปที่แตกต่างจากสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน แสดงว่าอนุภาคไขมันขนาดนาโนทั้ง 3 ชนิดสามารถกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนภายในตำรับได้ดี การวัดขนาดอนุภาคของอนุภาคไขมันขนาดนาโน ที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ในทั้ง 3 รูปแบบ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer nanoseries มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 200 นาโมเมตร ซึ่งเป็นการวัดขนาดอนุภาคด้วยวิธี photon correlation spectroscopy (PCS) โดยเป็นการวัดความผันผวนของความเข้มแสงที่กระเจิงเนื่องจากการเคลื่อนที่ของอนุภาค ทั้งนี้วิธีนี้ไม่ใช่การวัดขนาดอนุภาคโดยตรง แต่เป็นการวัดผลของการกระเจิงแสง ซึ่งใช้เพื่อการคำนวณอนุภาคต่อไป ในขณะที่การวัดขนาดอนุภาคโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (atomic force microscopy, AFM) เป็นการวัดแรงอะตอมซึ่งเกิดขึ้นระหว่างพื้นผิวตัวอย่างและปลายแหลมของ AFM ซึ่งนอกจากใช้ในการตรวจสอบขนาดอนุภาคแล้ว ยังให้ข้อมูลสามมิติของอนุภาคด้วย ซึ่งอนุภาคไขมันขนาดนาโน ที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ในรูปแบบ SLN ที่วัดด้วยวิธี PCS มีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกับขนาดอนุภาคที่วัดด้วยวิธี AFM ในขณะที่อนุภาคไขมันขนาดนาโนที่มีการกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ในรูปแบบ NLC ที่วัดด้วยวิธี AFM มีขนาดอนุภาคที่แตกต่างจากวิธีการวัดแบบ PCS อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไขมันในระหว่างการเตรียมตัวอย่างโดยการทำให้แห้งเพื่อวัดขนาดด้วยวิธี AFM ซึ่งองค์ประกอบของอนุภาค NLC มีไขมันเหลวและน้ำเป็นส่วนประกอบมากกว่าอนุภาค SLN อนุภาค NLC จึงมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่มากกว่าอนุภาค SLN (Teeranachaideekul V. et al., 2008)

5.1.5 การทดสอบการปลดปล่อยสาร และการซึมผ่านทางผิวหนังของ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนจากอนุภาคไขมันขนาดนาโน

การทดสอบการปลดปล่อย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน จากอนุภาคไขมันขนาดนาโนทั้ง 3 รูปแบ บ และสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ ลิกแนนในน้ำมันงาจากเมมเบรนแยกสาร (dialysis membrane) โดยวิเคราะห์จากปริมาณเซซามินและเซซาโมลินในสารละลายตัวกลาง พบว่าการปลดปล่อยสารจากอนุภาคขนาดนาโนเมตรทั้ง 3 รูปแบบ มีการปลดปล่อยสารที่รวดเร็วในช่วงแรก และมีการปลดปล่อยสารได้เร็วกว่าสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา ซึ่งสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่มีความเข้มข้นของเซซามินและเซซาโมลินที่มากกว่า แต่กลับมีการปลดปล่อยสารที่ช้ากว่า เนื่องมาจากโมเลกุลของตัวยาจำนวนมากพยายามแพร่ออกมาทำให้เกิดการขวาง (hindering effect) การแพร่ (Wissing SA and Muller RH., 2002) ในกรณีของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่มีการ

กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 อนุภาค SLN ปลดปล่อยสารได้เร็วกว่า NLC และ NE ในขณะที่อนุภาค NLC และ NE มีรูปแบบการปลดปล่อยสารที่ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาถึงค่าร้อยละการกักเก็บสารในอนุภาค พบว่าอนุภาค SLN มีค่าร้อยละในการกักเก็บสารน้อยกว่าอนุภาค NLC และ NE จึงคาดว่าสารที่ถูกปลดปล่อยมาน่าจะสะสมอยู่ที่ผิวอนุภาค แทนที่จะถูกห่อหุ้มในเมทริกซ์ไขมัน (zur Muhlen A., Schwarz C. and Mehnert W., 2007) การปลดปล่อยสารออกมาอย่าง รวดเร็วในครึ่งชั่วโมงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 6 เรียกว่า initial burst release ซึ่งจะช่วยให้มีฤทธิ์ในการรักษาทันที จากนั้นปริมาณสารยังคงปลดปล่อยออกมาเรื่อย ๆ และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 12 และปลดปล่อยสารมาได้เกือบทั้งหมดในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นช่วงที่ความเข้มข้นของสารภายในถุงเมมเบรนกับสารละลายตัวกลางมีความเข้มข้นที่เท่ากัน เรียกว่า steady state การกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ในรูปแบบของอนุภาคไขมันจึงมีรูปแบบการปลดปล่อยแบบ เนิ่น (sustained release) เนื่องจากสารสำคัญภายในอนุภาคจะค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยออกสู่วัตภาคภายนอก

รูปแบบการปลดปล่อยสารจะ สอดคล้องกับการทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังสุกรแรกเกิด โดยสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ในอนุภาคขนาดนาโนสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ดีกว่ารูปแบบของสารละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา โดยค่า steady state flux ของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บสาร ลิกแนนร้อยละ 0.50 ในรูปแบบ SLN, NLC และ NE มีค่ามากกว่าของสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ในน้ำมันงา รูปแบบในการปลดปล่อยสารเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้การซึมผ่านผิวหนังของอนุภาคไขมันทั้ง 3 รูปแบบดีกว่า การปลดปล่อยสารข องสารละลาย สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนในน้ำมันงา นอกจากนั้นสารลดแรงตึงผิวที่เป็นส่วนประกอบในอนุภาคไขมันขน าดนาโน ส่งผลต่อการแทรกซึมของผิว ทำให้สารที่กักเก็บในรูปแบบอนุภาคสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่าในรูปแบบสารละลาย และค่าการกักเก็บตัวยาเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการซึมผ่านผิว (Chen H. et al., 2006) ขนาดอนุภาคเป็นหนึ่งปัจจัยที่ช่วยนำส่งสารเข้าสู่ชั้นผิวหนัง โด ยอนุภาค SLN มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ที่สุด คือ 200 นาโมเตร ในขณะที่อนุภาค NLC และ NE อยู่ในช่วง 170-180 นาโนเมตร อัตราการแพร่ผ่าน (steady state flux) ผิวหนังสุกรของอนุภาค SLN จึงน้อยกว่า NLC และ NE และอนุภาค NLC มีอัตราการแพร่ผ่าน ของสาร เซซามิน และเซซาโมลินที่มากกว่า อนุภาคในรูปแบบ NE ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Teeranachaideekul และคณะ (2008) ที่ทดสอบผลของการปรับสัดส่วนน้ำมันต่อการแทรกซึมของตัวยาจาก NLC พบว่า NLC ทำให้ปริมาณสีฟลูโอเรสเซนไนล์เรด (Nile red) กระจายเข้าไปในผิวหนังได้มากกว่านา โนอิมัลชัน โดย NLC ที่มีสัดส่วนของน้ำมันน้อยจะทำให้มีการสะสมของสีที่หนังกำพร้ามาก และเมื่อเพิ่มสัดส่วนน้ำมันใน NLC ทำให้ปริมาณสีซึมลึกสู่หนังแท้ การปลดปล่อยสีของบริเวณหนังแท้ที่สูงขึ้นเนื่องจากการปลดปล่อย สารที่สูงจาก NLC ที่มีปริมาณน้ำมันสูง ร่วมกับผลการปกคลุมทำให้สีสามารถซึมลึกสู่ผิวหนังชั้นลึกได้

5.1.6 ทดสอบ ความคงตัวของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ในรูปแบบ SLN, NLC และ NE

เมื่อทดสอบความคงตัวทางกายภาพ ของอนุภาคไขมัน ที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน ร้อยละ 0.50 ในรูปแบบ SLN, NLC และ NE ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, 25 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ทั้ง 3 ตำรับมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ สีขาว มีลักษณะทึบแสง ไม่มีการแ ยกชั้น และเป็น เจลข้น ดังนั้นอุณ หภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ไม่มีผลต่อความคงตัวทางกายภาพของทั้ง 3 ตำรับ เมื่อนำตำรับไปวัดขนาด และค่าการกระจายของอนุภาคด้วยเครื่อง Zetasizer nanoseries พบว่าที่อุณหภูมิ 40องศาเซลเซียส ทุกตำรับมีขนาดอนุภาคที่ลดลงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากขนาดในวันเริ่มต้ น แต่อย่างไรก็ตาม ขนาดอนุภาคของทุกตำรับอยู่ในช่วงที่ ใกล้เคียง 200 นาโนเมตร ซึ่งเป็นเป้าหมายในการพัฒนาตำรับเพื่อนำส่ง สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน เข้าสู่ชั้นผิวหนัง โดยทั่วไปอุณหภูมิมีผลต่อ ความ หนืดระดับจุลภาค (microviscosity) ของตัวอย่าง โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น เป็นเหตุให้ความหนืดระดับจุลภาพลดลง จึงทำให้ตัวอย่าง เกิดการสูญเสียความคงสภาพ (Freitas C. and Muller RH., 1998) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาตำรับ เพื่อรักษาความคงตัวทางกายภาพ ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของตำรับด้วย ตัวอย่างเช่น อุณหภูมิที่เหมาะในการเก็บรักษาตำรั บ SLN ที่มี Compritol เป็นส่วนประกอบ คือที่ 8 องศาเซลเซียส (Freitas C. and Muller RH., 1998) ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะในการเก็บรักษาตำรับ SLN ที่มี Trilaurine และ phospholipid เป็นส่วนประกอบ คือ ที่ 20 องศาเซลเซียส (Heiati H., Tawashi R. and Phillips NC., 1996)

เมื่อพิจารณา สารเซซามินและสารเซซาโมลินที่คงเหลือในตำรับ เมื่อเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75, 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าอนุภาค SLN เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดคงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 60 ในขณะ ที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณร้อยละของสารเซซามิน และเซซาโมลิน ที่คงเหลือของ อนุภาค NLC และ NE เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน พบ ว่ามีปริมาณเซซามินที่ลดลง แต่ปริมาณเซซาโมลินที่คงเหลือเพิ่มขึ้น โดยมีรายงานว่าสารเซซามินสามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็นเซซาโมลินได้ด้วย กลไกทางเคมี (Dar AA. and Arumugam N., 2013) ในกระบวนการสังเคราะห์เซซาโมลิน พบว่าการเติมหมู่ออกซิเจนไประหว่างหมู่ฟูแรนและวงแหวนอะโรม าติก โดยเอนไซม์ Cytochrom P450 CYP92B14 ที่ช่วยในปฏิกิริยา oxygenation ของการเปลี่ยนเซวามินไปเป็นเซวาโมลินและเซซามินอล (Maruta J., et al., 2017) ซึ่งในระหว่างการเก็บรักษา อาจมีกลไกที่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก สารเซซามินไปเป็นสารเซซาโมลิน

5.2 สรุปผลการวิจัย

พบสารเซซามิน และเซซาโมลินในสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่สกัดจากน้ำมันงาดำแบบสกัดเย็น และสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ได้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำมันงา ส่วนสารมาตรฐานเซซามอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินซี ไม่พบฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ เจลาติเนส และเอนไซม์อีลาสเตส เมื่อทดสอบแบบ *in vitro* เมื่อทดสอบในสารละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนที่ความเข้มข้นสูงสุดได้ ส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับอนุภาคไขมันขนาดนาโน คือ ปริมาณไขมันรวม ร้อยละ 7.50 สารลดแรงตึงผิว ร้อยละ 5.00 และสัดส่วนของน้ำมันงาที่ ร้อยละ 30 ของปริมาณไขมันรวม อนุภาคขนาดนาโนสามารถกักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนได้มากที่สุดที่ร้อยละ 0.50 นอกจากนี้รูปแบบอนุภาคไขมันขนาดนาโน ช่วยในการปลดปล่อย และการซึมผ่านของ สารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนได้เร็วกว่ารูปแบบสารละลาย สารกึ่งบริสุ ทธิ์ลิกแนน ในน้ำมันงา อุณหภูมิสูงมีผลต่อลักษณะทางเคมีของอนุภาคไขมันขนาดนาโนที่กักเก็บสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนน โดยเฉพาะรูปแบบ NLC และ NE

5.3 ข้อเสนอแนะ

เซซามิน และเซซาโมลิน อาจไม่พบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เจลลาติเนส และอีลาสเตส แต่อาจมีคุณสมบัติในการสร้างคอลลาเจน ดังนั้น ควรทดสอบฤทธิ์ในการ กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของสารกึ่งบริสุทธิ์ลิกแนนโดยการทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และควรศึกษาถึงกลไกในการเปลี่ยนโครงสร้างเซซามินและเซซาโมลินเมื่อใช้ทางผิวหนังต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

จารุภา วิโยชน์. **ตัวชี้วัดทางชีวภาพของเซลล์ผิวหนังจากความรู้สู่การนำไปประยุกต์ใช้เพื่อประเมินเวชสำอาง**. พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2560.

บังอร ฉางทรัพย์. **กายวิภาคศาสตร์ 1**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

ปราณีต โอปณโสภิต. **ระบบนำส่งยา**. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2557.

ปราณี อ่านเปรื่อง. **เอนไซม์ทางอาหาร**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2558.

วิชิต ลีนุตพงษ์ และคณะ. **แสงแดดและผิวหนัง**. กรุงเทพฯ: งานตำราวารสารและสิ่งพิมพ์ สถานเทคโนโลยีการศึกษาแพทยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, 2547.

วันดี รังสีวิจิตรประภา. **อนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเมตรเพื่อการนำส่งยาและเครื่องสำอาง**. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2554.

วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. **นาโนเทคโนโลยีในการนำส่งทางผิวหนัง**. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน, 2555.

วลัยอร ปรัชญพฤทธิ์. **การรักษาโรคผิวหนังที่พบบ่อยในผู้สูงอายุและการดูแลผิวพรรณสำหรับผู้สูงอายุ**. กรุงเทพ: สถาบันโรคผิวหนัง, 2557.

วาสนา วงษ์ใหญ่, **งา พฤกษศาสตร์ การปลูก ปรับปรุงพันธุ์ และการใช้ประโยชน์**. กรุงเทพฯ: เปเปอร์เมท, 2550.

สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์. "บทบาทของเอ็นไซม์เมทริกเมทัลโลโปรติเอสและการแสดงออกในมะเร็ง", **วารสารวิจัยวิทยาศาสต์การแพทย์**. 21(3): 239-249; กรกฎาคม-กันยายน, 2550.

สำนักงานปลัดกระทรวงพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์. "ประชากรสูงอายุไทย:ปัจจุบันและอนาคต", ใน **เอกสารประมวลสถิติด้านสังคม 1/2558**. กรุงเทพฯ: ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2557.

อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์. **งา การผลิต การปรับปรุงพันธุ์ และการแปรรูป**. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2556.

โอภา วัชระคุปต์ และคณะ. **สารต้านอนุมูลอิสระ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์, 2550.

Allen T. "Photon correlation spectroscopy", in **particle size measurment**. London: Champman & Hall, 1997.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Botelho, J.R.S., et al. "Black sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds extracts by CO*2* supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects", **The Journal of Supercritical Fluids**. 93: 49-5; September, 2014.

Chen H. et al. "Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting", **Journal of Controlled Release**. 110(2): 296-306; January, 2006.

Cheng, F.-C., et al. "Neuroprotective Effects of Sesamin and Sesamolin on Gerbil Brain in Cerebral Ischemia", **International Journal of Biomedical Science**. 2(3): 284-288; September, 2006.

Dar A.A. and Arumugam N. "Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis-A review", **Bioorganic Chemistry**. 50: 1-10; October, 2013.

Dar, A.A., N.K. Verma, and N. Arumugam. "An updated method for isolation, purification and characterization of clinically important antioxidant lignans – Sesamin and sesamolin, from sesame oil", **Industrial Crops and Products**. 64: 201-208; February, 2015.

Finsey R. "Particle sizing by quasi-elastic light scattering", **Advance in Colloid and Interface Science**. 52: 79-143; September, 1994.

Freitas C. and Muller RH. "Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid nanoparticle (SLN) dispersions", **International Journal of Pharmaceutics**. 168: 221-229; June, 1998.

Greetha T., Rohit B and Pal KI. "An efficient antioxidant with potential therapeutic benefits", **Journal of Medicinal Chemistry**. 5: 367-371; July, 2009.

Heiati H., Tawashi R. and Phillips NC. "Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization", **Journal of Microencapsulation**. 15(2): 173-184; November, 1996.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Hemalatha S. and Ghafoorunissa. "Lignans and tocopherols in Indian sesame cultivars", **Journal of the American Oil Chemists' Soceity**. 81(5): 467-470; May, 2004.

Jeng, K.-C.G., et al. "Sesamin inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production by suppression of p*38* mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-**K**B", **Immunology Letters**. 97(1): 101-106; February, 2005.

Jinarat D, Yingngam B, Rungseevijitprapa W. "Development and characterization of *Curcuma comosa* extract loaded nanostructured lipid carriers", **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 13 Suppl: 163-173; January-March, 2017.

Kanimozhi, P. and N.R. Prasad. "Antioxidant potential of sesamol and its role on radiation-induced DNA damage in whole-body irradiated Swiss albino mice", **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 28(2): 192-197; September, 2009.

Khan, S., et al. "Evaluation of sesamol-induced histopathological, biochemical, haematological and genomic alteration after acute oral toxicity in female C*57*BL/*6* mice", **Toxicology Reports**. 3: 880-894; March, 2016.

Kesharwani R. et al. "Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticle (SLN) based topical gel of etoricoxib", **Journal of Applied Pharmaceatical science**. 6(10): 124-131; October, 2016.

Kiso Y. and Moritani T., "Antioxidative effects of sesamin during high intensity exercise", **Medicine and Science in Sport and Exercise**. 35:S269; 2003.

Mahendra Kumar, C., et al. "Interaction of sesamol (3,4-methylenedioxyphenol) with tyrosinase and its effect on melanin synthesis", **Biochimie**. 93(3): 562-569; March, 2011.

Mohamed, H.M.A. and I.I. Awatif. "The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant", **Food Chemistry**. 62(3): 269-276; July, 1998.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Murata J, Ono E, Yoroizuka S, Toyonaga H, Shiraishi A, Mori S, et al. "Oxidative rearrangement of (+)-sesamin by CYP92B14 co-generates twin dietary lignans in sesame", **Nature Communications**. 8(1):2155; December 2017.

Nakai M. et al. "Novel antioxidantive metabolites in rat liver with digested sesamin", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 1666-1670; February, 2003.

Phitak, T., et al. "Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin", **Phytochemistry**. 80: 77-88; August, 2012.

Penealvo JL et at. "Dietary sesamin is converted to enterolactonein humans", **Journal of Nutrition**. 135: 1056-1062; May, 2005.

Rungkadilok N, Pholphana N, Mahidol C, et al. "Variation of sesamin, sesamolin and tocopherols in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds and oil products in Thailand", **Food Chemistry** 122(3): 724-730; October, 2010.

Sachdeva, A.K., et al. "Neuroprotective potential of sesamol and its loaded solid lipid nanoparticles in ICV-STZ-induced cognitive deficits: Behavioral and biochemical evidence", **European Journal of Pharmacology**. 747: 132-140; January, 2015.

Shenoy R.R., et al. "Normal and delayed wound healing is improved by sesamol, an active constituent of Sesamum indicum (L.) in albino rats", **Journal of Ethnopharmacology.** 133(2): 608-612; January, 2011.

Shyu, Y.-S. and L.S. Hwang. "Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal", **Food Research International**. 35(4): 357-365; 2002.

Sorrell JM and Caplan AI. "Fibroblast heterogeneity: more than skin deep", Journal **of Cell Science**. 117: 667-675; February, 2004.

Suja, K.P., A. Jayalekshmy, and C. Arumughan. "Antioxidant activity of sesame cake extract", **Food Chemistry.** 91(2): 213-219; June, 2005.

Svesson, C.K.. "Minireview biotransformation of drugs in human skin", **Drug Metabolosm and Disposition**. 34(2): 247-253; November, 2008.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Teeranachaideekul V. et al. "Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC", **Journal of Controlled Release**. 128(2): 134-141; June, 2008.

Teeranachaideekul V. et al. "Physiochemical characterization and in vitro release studied of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels)", **Journal of Microencapsulation**. 25(2): 111-120; March, 2008.

Uehara, J., et al. "Inhibitory effect of sesamol on LPS-mediated inflammatory response", **Toxicology Letters.** 196 Supplement: S24; July, 2010.

Wan Y. et. al. "The relationship of antioxidant components and antioxidant activity of sesame seed oil", **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 95: 2571-2578; October, 2014.

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

Watanabe, K. "Collagenolytic protease from bacteria", **Apply Microbial Biotechnology**. 63: 520-526; February, 2004.

WebMD. "An overview of the skin", https://www.webmd.com/beauty/cosmetic-procedures-overview-skin#1. October 30 2017.

Wissing SA. and Muller RH. "Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration", **Journal of Controlled Release**. 81(3): 225-233; June, 2002.

Xu, J., S. Chen, and Q. Hu. "Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (Sesamum indicum L.)", **Food Chemistry**. 91(1): 79-83; June, 2005.

Yadav, N.V., et al. "Sesame Oil and Rice Bran Oil Ameliorates Adjuvant-Induced Arthritis in Rats: Distinguishing the Role of Minor Components and Fatty Acids", **Lipid.** 51(12): 1385-1395; December, 2016.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Yasuda K. et al. "Metabolisk of sesamin by cytochrom P450 in human liver chromosomes", **Drug Metabolism and Disposition**. 38: 2117-2123; December, 2010.

Yingnngam B, Phimpanit Y, Wongkasemchai, Sila-on W et al. "Encapsulation of rice bran oil in solid lipid nanoparticles (SLN) for skin hydration and viscoelasticity", **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 3(2): 8-22; July-December, 2007.

zur Muhlen A., Schwarz C. and Mehnert W. "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - drug release and release mechanism", **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals.** 42(2): 149-155; March, 1998.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	วลัยพร เตียประสิทธิ์
ประวัติการศึกษา	
	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนนารีนุกูล จังหวัดอุบลราชธานี มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ จังหวัดนครปฐม วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ