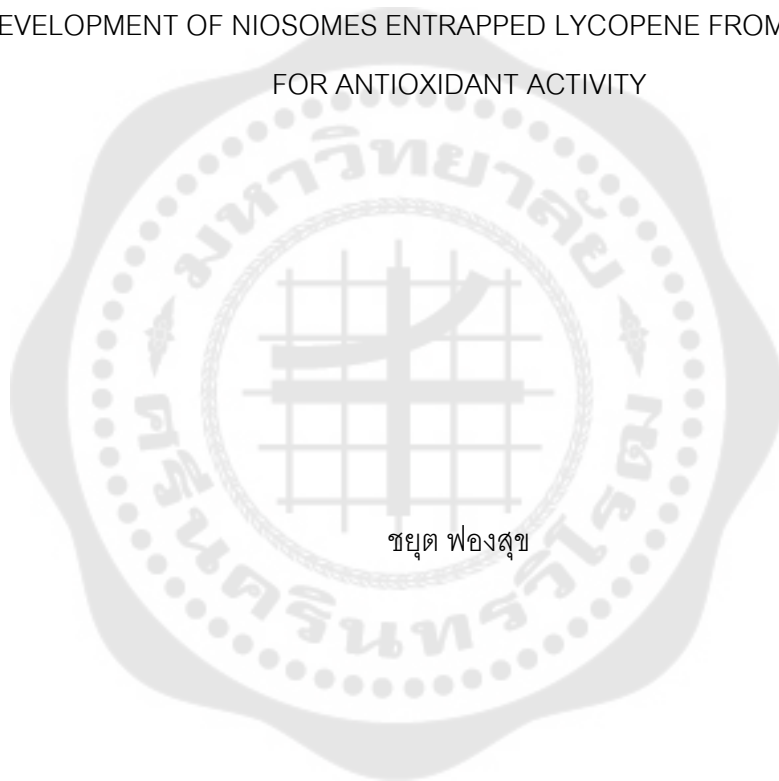




การพัฒนานิโสมกักเก็บไลโคปีนจากฟักข้าวเพื่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ  
DEVELOPMENT OF NIOSOMES ENTRAPPED LYCOPENE FROM GAC FRUIT  
FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY



ชยุต ฟองสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การพัฒนานิโไซมกักเก็บไโคป็นจากฟักข้าวเพื่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF NIOSOMES ENTRAPPED LYCOPENE FROM GAC FRUIT  
FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY



CHAYUT FONGSUK

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Pharmaceutical Product Development)  
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนานาโนไอโซมกักเก็บไลโคปีนจากฟักข้าวเพื่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ของ

ชยุต ฟองสุข

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรพวรรณ สิริธิดาวร)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราพร เลื่อนผลเจริญชัย)
..... ที่ปรึกษาร่วม	..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนี หงส์รัตนาวรกีจ)	(อาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล)
..... ที่ปรึกษาร่วม	
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลลนา คงคาเนรมิตร)	

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาไนโอโซมกักเก็บไลโคปีนจากผักข่าเพื่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ผู้วิจัย	ชยุต พองสุข
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ สิทธิถาวร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาพนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลลนา คงคาเนรมิตร

ผักข่า (*Momordica cochinchinensis* Spreng, Family Cucurbitaceae) เป็นแหล่งของไลโคปีนซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิว แต่ไลโคปีนมีความคงตัวต่ำ ส่งผลให้ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ลดลงในเวลาสั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไนโอโซมสำหรับกักเก็บไลโคปีนในสารสกัดผักข่าเพื่อช่วยเพิ่มความคงสภาพ ทำการสกัดสารจากผงแห้งของเปลือก เนื้อ และรกหุ้มเมล็ดผักข่า วิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนจากสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) เติร์ยมินิโอสโมเปลาและนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัด แล้วศึกษาคุณลักษณะ ปริมาณไลโคปีนที่กักเก็บได้ในนิโอโซม พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้มีความถูกต้อง โดยมีความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำและความเที่ยงตามมาตรฐาน AOAC2012 รกหุ้มเมล็ดมีปริมาณไลโคปีนมากที่สุด (9.45 ± 0.27 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (ค่า FRAP = 3,997.55 ไมโครโมลต่อกรัมเฟอร์ริซซัลเฟตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตำรับนิโอโซมที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดทวิน 60 และคอเลสเทอรอล (1:1 โดยโมล) มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 170 นาโนเมตร และมีขนาดสม่ำเสมอ การกักเก็บสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการกักเก็บมากที่สุด (ร้อยละ 64.59) เมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 เดือน สารสกัดมีปริมาณไลโคปีนเหลืออยู่เท่ากับ 22.72 ± 4.05 % ในขณะที่นิโอโซมที่กักเก็บสารสกัดมีไลโคปีนเหลืออยู่เท่ากับ 52.05 ± 0.88 % ดังนั้นการกักเก็บสารสกัดผักข่าในนิโอโซมสามารถช่วยเพิ่มความคงสภาพของไลโคปีนในสารสกัดได้

คำสำคัญ : ผักข่า, ไลโคปีน, นิโอโซม, ความคงสภาพ

Title	DEVELOPMENT OF NIOSOMES ENTRAPPED LYCOPENE FROM GAC FRUIT FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY
Author	CHAYUT FONGSUK
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Worapan Sitthithaworn
Co Advisor	Associate Professor Dr. Tapanee Hongratanaworakit
Co Advisor	Assistant Professor Dr. Lalana Kongkaneromit

*Gac (Momordica cochinchinensis Spreng., Family Cucurbitaceae)* is rich in lycopene and possesses a high antioxidant activity. It has a high potential for use in skin care products, but lycopene is easily decomposed thus reduces product efficiency. This research aimed to develop niosomes entrapped lycopene from gac fruit in order to enhance lycopene stability. A dried powder of peel, pulp and aril was separately extracted. Lycopene content was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). The ferric reducing antioxidant power (FRAP) method was used to test for antioxidant activity. Niosomes and niosomes entrapped with the extract were prepared and characterized. Lycopene content in niosomes were also investigated. The analysis method was proved to be specific, accurate and precise, as indicate by AOAC guideline in 2012. The highest lycopene content ( $9.45 \pm 0.27$  mg/g dry weight) and the highest antioxidant activity ( $3,997.55 \mu\text{ mol FeSO}_4 / \text{g}$  dry weight) were found in aril. Niosome formulated with the combination of Tween 60 and cholesterol (1:1 by mole) exhibited the size less than 170 nm with narrow size distribution. The highest percentage of entrapment (64.59%) was observed in niosome containing 0.5 mg/ml extract. A stability study at 4°C for one month revealed that the percentage of lycopene remaining in the extract and in the niosome containing 0.5 mg/ml extract were  $22.72 \pm 4.05$  % and  $52.05 \pm 0.88$  %, respectively. Thus, entrapment of the extract in niosomes could prolong the stability of lycopene.

Keyword : gac, lycopene, niosome, stability

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือของ รองศาสตราจารย์ ดร. เกษักรหญิงวรรณ สิทธิถาวร, รองศาสตราจารย์ ดร. เกษักรหญิงฐาปนี หงส์รัตนาวรกิจ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกษักรหญิงลลนา คงคาเนรมิตร อาจารย์ที่ปรึกษาทุกท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานอีกด้วย นอกจากนี้ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และขอขอบคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้คำแนะนำ ให้ความรู้ และคำปรึกษา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ชยุต พองสุข

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ .....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์งานวิจัย .....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
สมมติฐานงานวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย .....	3
กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	3
คำสำคัญ.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	6
ฟักข้าว.....	6
1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของฟักข้าว.....	6
2. พฤษเคมีของฟักข้าว.....	10
3. การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดฟักข้าว .....	10
ไลโคปีน .....	12
Non-ionic surfactant based vesicles (Niosomes).....	14
1. องค์ประกอบของนิโอโซม .....	16



2. การเตรียมนิโโซม.....	20
3. กระบวนการหลังการเตรียมนิโโซม.....	24
4. การแสดงคุณลักษณะของนิโโซม (Characterization of noisome) .....	26
5. ความสามารถในการกักเก็บ (Entrapment efficiency, EE).....	28
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย .....	29
อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....	29
สารเคมี.....	30
การศึกษาและการเก็บรวบรวมข้อมูล.....	30
1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดฟ้าขาว.....	30
1.1 การเตรียมวัตถุดิบ.....	30
1.2 การสกัด.....	30
2. การวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนจากสารสกัด.....	31
2.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงสารละลายไลโคปีน.....	31
2.2 การเตรียมสารละลายไลโคปีนจากสารมาตรฐานทุติยภูมิ.....	31
2.3 การพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์.....	31
2.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation).....	32
2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนจากสารสกัด.....	34
3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	35
3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power. ....	35
3.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	36
4. การเตรียมนิโโซมเปล่าและนิโโซมที่กักเก็บสารสกัด.....	37
4.1 สูตรตำรับนิโโซมเปล่า.....	37
4.2 การเตรียมนิโโซมที่กักเก็บสารสกัด.....	38

5. การศึกษาคุณลักษณะของสารละลายที่มีนิโอโซม .....	38
5.1 การสังเกตลักษณะปรากฏ .....	38
5.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง .....	38
5.3 รูปร่างอนุภาค .....	38
5.4 การวัดขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ซีต้า .....	38
6. การกักเก็บไลโคปีน .....	39
6.1 การเตรียมตัวอย่างนิโอโซมเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีน .....	39
6.2 การหาปริมาณปริมาณไลโคปีนทั้งหมดในตำรับ .....	39
6.3 การหาปริมาณไลโคปีนที่กักเก็บในนิโอโซม .....	39
7. การศึกษาความคงสภาพแบบเร่งและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ .....	40
7.1 การทดสอบความคงสภาพแบบเร่งในสารสกัด นิโอโซมเปล่า และนิโอโซมกักเก็บ สารสกัด .....	40
7.2 การศึกษาคุณลักษณะของสารสกัดและนิโอโซม .....	40
7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณที่เหลืออยู่ของไลโคปีนในส่วนตะกอน .....	40
บทที่ 4 .....	41
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	41
1. คุณลักษณะของสารสกัดผักขาว .....	41
2. ปริมาณไลโคปีนในสารสกัดผักขาว .....	43
2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน .....	43
2.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ .....	45
2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ .....	49
2.4 ปริมาณไลโคปีนในสารสกัด .....	52
3. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ .....	56

3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH .....	56
3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP .....	59
4. การเตรียมนิโอโซมเปล่าและนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัดนิโอโซม .....	61
4.1 ผลของชนิดของสารลดแรงตึงผิว .....	61
4.2 ผลของปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการบรรจุนิโอโซม .....	63
4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนในนิโอโซมและร้อยละของการกักเก็บ .....	65
5. การศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง .....	67
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	70
สรุปผลการวิจัย .....	70
อภิปรายผลการวิจัย .....	72
ข้อเสนอแนะ .....	74
บรรณานุกรม .....	75
ภาคผนวก .....	76
ประวัติผู้เขียน .....	100

## สารบัญตาราง

หน้า	
ตาราง 1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลพริกขี้หนู.....	11
ตาราง 2 การศึกษาและประยุกต์ใช้นิโอสิม.....	15
ตาราง 3 ตัวอย่างเจลชนิดต่าง ๆ.....	25
ตาราง 4 ค่าหรือคุณสมบัติในการบ่งบอกคุณลักษณะของนิโอสิม และเทคนิคที่ใช้.....	26
ตาราง 5 ตำรับและส่วนประกอบในการเตรียมนิโอสิม.....	37
ตาราง 6 ผลการสกัดผงจากส่วนต่าง ๆ ของผลพริกขี้หนู.....	42
ตาราง 7 ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุดของสารมาตรฐานไลโคปีนในตัวทำละลายต่าง ๆ.....	44
ตาราง 8 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ไลโคปีนโดยใช้ระบบที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างกัน.....	47
ตาราง 9 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไลโคปีนใน dichloromethane ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น acetonitrile: dichloromethane (75:25, v/v) ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง.....	48
ตาราง 10 ผลการศึกษากราฟมาตรฐานไลโคปีนเป็นเวลา 3 วัน (n = 3).....	50
ตาราง 11 ค่าความถูกต้องและแม่นยำของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไลโคปีน เวลา 3 วัน.....	51
ตาราง 12 เปรียบเทียบปริมาณไลโคปีนจากสารสกัดรกของพริกขี้หนูในงานวิจัยที่เคยมีผู้ศึกษาก่อนหน้า.....	55
ตาราง 13 ค่า FRAP ที่ได้จากสารสกัดแต่ละส่วนของผลพริกขี้หนู (n=3).....	60
ตาราง 14 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) และค่า Zeta potential ของแต่ละตำรับ (n = 3).....	62
ตาราง 15 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (PDI) และค่า Zeta potential ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด.....	64
ตาราง 16 ร้อยละการกักเก็บไลโคปีนในนิโอสิมสารสกัดจากผลพริกขี้หนูที่ความเข้มข้นต่างกัน ...	66

ตาราง 17 ปริมาณไลโคปีนที่คงอยู่ในสารสกัดเทียบกับเวลา.....68



## สารบัญรูปภาพ

หน้า	
ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบผักขำ	7
ภาพประกอบ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกผักขำ	8
ภาพประกอบ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลผักขำ	9
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างไลโคปีน	12
ภาพประกอบ 5 แบบจำลองโครงสร้างของนิโอโซมที่เตรียมจาก sorbitan monostearate (Span-60)	14
ภาพประกอบ 6 ค่า CPP และทำนายชนิดของอนุภาคคล้ายถุง (type of vesicle)	17
ภาพประกอบ 7 สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้เตรียมนิโอโซม	18
ภาพประกอบ 8 ตำแหน่งของคอเลสเตอรอล และพันธะไฮโดรเจนที่เกิดกับ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีขั้ว (เช่น Span-60)	19
ภาพประกอบ 9 ขั้นตอนการเตรียมนิโอโซมด้วยวิธี Thin-film hydration method (TFH)	21
ภาพประกอบ 10 ขั้นตอนการเตรียมนิโอโซมด้วยการฉีดด้วยอีเทอร์ (Ether injection)	22
ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการเตรียมนิโอโซมด้วยการกลั่นวัฏภาค (Reverse Phase Evaporation, REV)	23
ภาพประกอบ 12 ลักษณะของผงของส่วนต่าง ๆ ของผักขำและสารสกัดผักขำ	41
ภาพประกอบ 13 ร้อยละน้ำหนักสารสกัด (%yield) จากส่วนต่าง ๆ ของผักขำ	42
ภาพประกอบ 14 สเปคตรัมของสารมาตรฐานไลโคปีนในตัวทำละลายต่าง ๆ	43
ภาพประกอบ 15 โคโรมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานไลโคปีนใน dichloromethane ในระบบที่เฟสเคลื่อนที่ต่างกันโดยเฟสเคลื่อนที่	46
ภาพประกอบ 16 โคโรมาโตแกรมของสารมาตรฐานไลโคปีนเปรียบเทียบกับ สารสกัดผักขำ	49

ภาพประกอบ 17 กราฟมาตรฐานของสารละลายไลโคปีนในไดคลอโรมีเทนที่ ช่วงความเข้มข้น 11.54 – 69.22 $\mu\text{g/mL}$ (n=3).....	50
ภาพประกอบ 18 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไลโคปีนเปรียบเทียบกับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลพริกขี้หนู.....	53
ภาพประกอบ 19 ปริมาณไลโคปีนในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลพริกขี้หนู .....	54
ภาพประกอบ 20 สเปกตรัมของอนุมูลอิสระ DPPH ในเอทานอล และสารละลายสารสกัดพริกขี้หนู .....	56
ภาพประกอบ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระ DPPH (DPPH <sup>•</sup> scavenging activity) (n=3).....	57
ภาพประกอบ 22 กระบวนการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีและวิตามินอี .....	58
ภาพประกอบ 23 ลักษณะของนิโอโซมแต่ละตำรับที่ละลายในน้ำ .....	61
ภาพประกอบ 24 ลักษณะของนิโอโซมที่บรรจุสารสกัดพริกขี้หนู และสัณฐานของนิโอโซมจากกล้อง TEM.....	63
ภาพประกอบ 25 โครมาโตแกรมนิโอโซมเปล่าและนิโอโซมบรรจุสารสกัดพริกขี้หนู.....	65
ภาพประกอบ 26 ปริมาณไลโคปีนที่คงอยู่ในสารสกัด (%remaining) เทียบกับเวลา.....	67
ภาพประกอบ 27 ปริมาณไลโคปีนที่คงอยู่ในนิโอโซมเทียบกับเวลา .....	69

## บทที่ 1

### บทนำ

ในปัจจุบันความสวยงาม และการดูแลตนเองได้รับความสนใจจากผู้บริโภคมากขึ้น จึงส่งผลให้ธุรกิจที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ดูแลผิวต่าง ๆ เติบโตอย่างต่อเนื่องโดยในปี พ.ศ. 2557 ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวในประเทศมีมูลค่ารวมถึง 58,553 ล้านบาท มีอัตราการเพิ่มขึ้นร้อยละ 7 ต่อปี และคาดการณ์ว่าในปี 2562 ตลาดผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจะมีมูลค่าถึง 67,412 ล้านบาท<sup>(1)</sup> ปัจจัยหนึ่งซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนัง คือ อนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งร่างกายของเราสามารถรับอนุมูลอิสระทั้งจากภายในร่างกาย และนอกร่างกาย โดยไม่เพียงแต่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนัง ยังส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือด<sup>(2)</sup> ได้อีกด้วย แม้ปัจจุบันจะยังไม่มียาที่ฟื้นฟูผิวหนังที่เสื่อมสภาพแล้วให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ แต่ก็สามารถป้องกันและชะลอไม่ให้ผิวเสื่อมก่อนวัยอันควรได้

ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวส่วนมากมีส่วนประกอบที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้บริโภคได้ หลายปีที่ผ่านมามีผู้บริโภคหันมาให้ความสนใจผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาติที่มีสรรพคุณช่วยในการชะลอวัย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ดังนั้นพืชที่มีสารพฤกษเคมี (phytochemical) สูง เช่น พืชข้าว พืชพื้นบ้านที่มีศักยภาพสูง เนื่องจากมีปริมาณสารเบตาแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) และไลโคปีน (lycopene) สูงกว่าผักและผลไม้ชนิดอื่น ๆ<sup>(3)</sup> ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ปัญหาหลักของผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดนี้ คือ ความคงตัวที่ต่ำ และประสิทธิภาพลดลงรวดเร็วในเวลาอันสั้น จากการศึกษากระบวนการนำส่งสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระให้ยาวนานขึ้น โดยการนำส่งด้วยอนุภาคลักษณะคล้ายถุง (vesicles) ที่เตรียมได้จากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ หรือ นีโอโซม (niosomes) ซึ่งนีโอโซมแสดงพฤติกรรมคล้ายลิโปโซม (liposomes) แต่ลิโปโซมนั้นมีองค์ประกอบเป็นฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ซึ่งมีราคาสูง เสื่อมสลายได้ง่ายกว่า วัตถุประสงค์การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ<sup>(4)</sup>

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการพัฒนาตำรับนีโอโซมบรรจุสารสกัดจากพืชที่มีไลโคปีนเป็นสารสำคัญ เพื่อเพิ่มความคงสภาพของสารสำคัญ จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความคงสภาพของตำรับนีโอโซม



### วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. วิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนในส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าว
2. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลฟักข้าว
3. พัฒนาสูตรตำรับและศึกษาคุณลักษณะของนิโอโซมที่กักเก็บสกัดผลฟักข้าว
4. ศึกษาความคงสภาพของนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัดผลฟักข้าว

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นิโอโซมบรรจุสารสกัดที่ได้สามารถที่จะนำไปไปผสมในผลิตภัณฑ์รูปแบบต่าง ๆ เช่น ครีม เจล
2. เพื่อเป็นประโยชน์แก่นักวิชาการ และผู้สนใจใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาตำรับ

### สมมติฐานงานวิจัย

1. สามารถใช้นิโอโซมกักเก็บสารสกัดฟักข้าวได้
2. การกักเก็บสารสกัดฟักข้าวในนิโอโซมสามารถเพิ่มความคงสภาพของไลโคปีนในสารสกัดได้

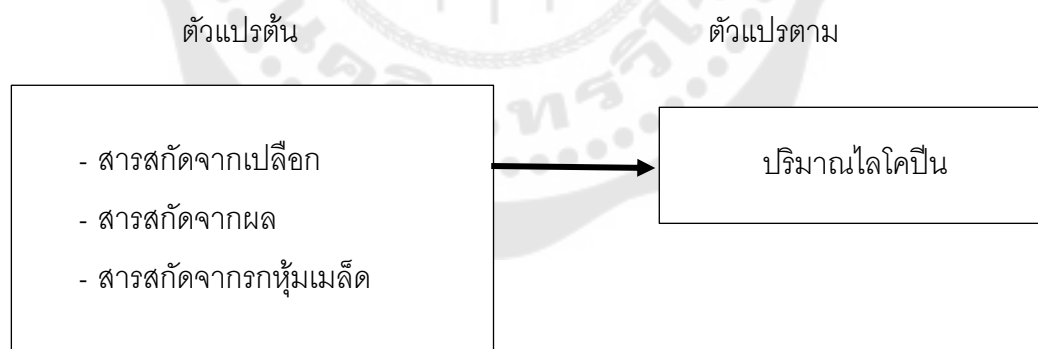
### ขอบเขตการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนด้วยเทคนิค HPLC จากการสกัดผลพักข้าวแล้วทำการเปรียบเทียบปริมาณในแต่ละส่วนของผล ได้แก่ เปลือก เนื้อ และรอกหุ้มเมล็ด ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด เตรียมตำรับนิโอโซมเปล่าที่มีสารลดแรงตึงผิว คอลเลสเตรอล ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ศึกษาคุณลักษณะของนิโอโซม ได้แก่ ขนาด การกระจายตัว และค่าความต่างศักย์ซีต้า แล้วคัดเลือกสูตรตำรับที่เหมาะสมนำมาเตรียมเป็นตำรับนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัด ศึกษาคุณลักษณะของนิโอโซม และประสิทธิภาพการกักเก็บไลโคปีน จากนั้นทำการศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง ระยะเวลา 1 เดือน โดยประเมินจากคุณลักษณะและปริมาณไลโคปีนที่เหลืออยู่หรือยังคงอยู่ในนิโอโซม

### กรอบแนวคิดงานวิจัย

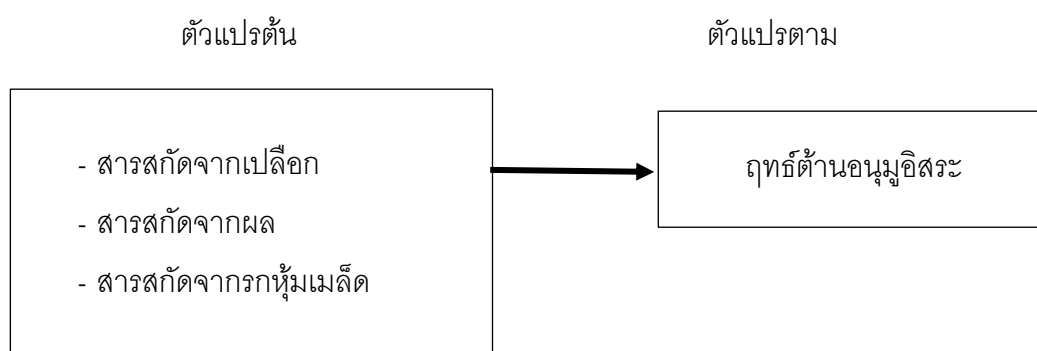
ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาและพัฒนาสิ่งต่าง ๆ ดังนี้

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลพักข้าว ได้แก่ เปลือก เนื้อ และรอกหุ้มเมล็ด โดยพัฒนาระบบเทคนิค HPLC และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นและตัวแปรตามได้ ดังนี้



ตัวแปรควบคุม ได้แก่ วิธีสกัดและวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ

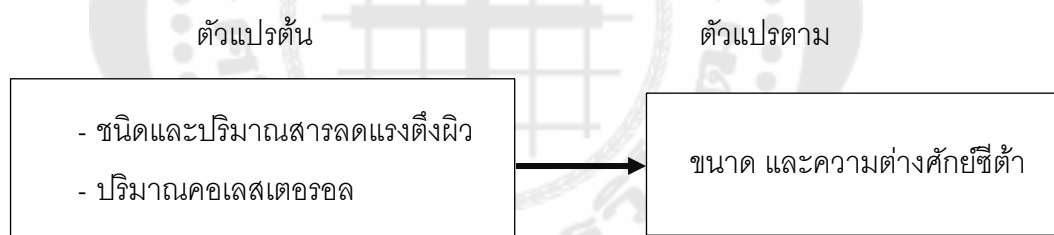
## 2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ตัวแปรควบคุม ได้แก่ วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

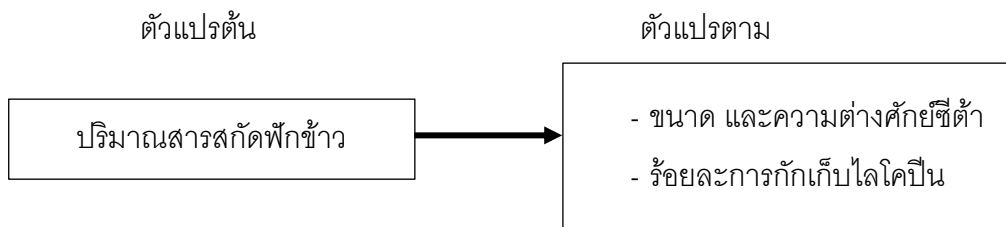
3. การพัฒนาตำรับการเตรียมนิโอโซม โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นและตัวแปรตามได้ ดังนี้

### 3.1 การเตรียมตำรับนิโอโซมเปล่า



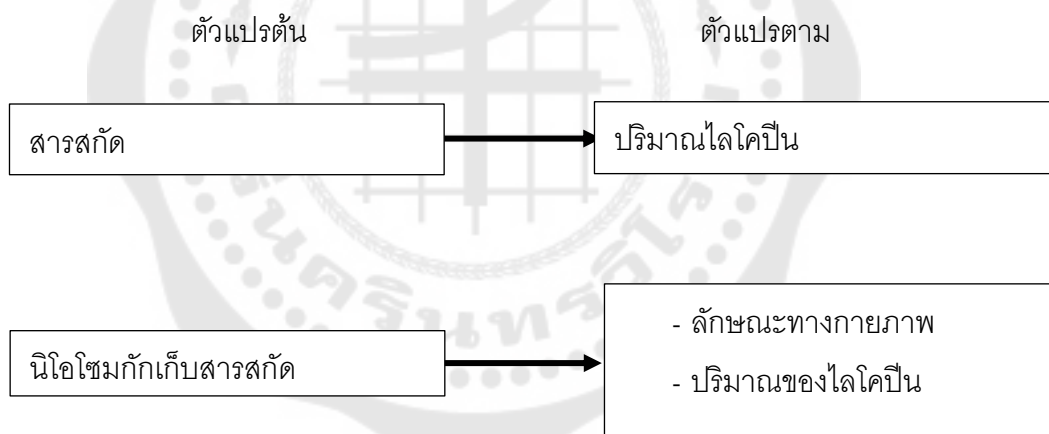
ตัวแปรควบคุม ได้แก่ วิธีการเตรียม

### 3.2 การเตรียมตัวรับนิโอโซมบรรจุสารสกัด



ตัวแปรควบคุม ได้แก่ วิธีการเตรียม ชนิดของสารลดแรงตึงผิว และอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวกับคอเลสเตรอรอล

4. ศึกษาความคงสภาพ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้น และตัวแปรตามได้ดังนี้



ตัวแปรควบคุม ได้แก่ สภาวะที่ใช้ในการทดสอบและวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์

#### คำสำคัญ

ไลโคปีน, ผักข้าว, นิโอโซม, ความคงสภาพ

## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรม

#### ผักข่า

ผักข่าเป็นพืชในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Momordica cochinchiensis* (Lour.) Spreng ชื่อสามัญ Gac fruit, Baby Jack fruit, Cochinchin Gourd, Spiny Bitter Gourd, Sweet Gourd นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่น ๆ ในแต่ละท้องถิ่น เช่น ชาวปัตตานีเรียกว่า ขี้กาเครือ ชาวตากเรียกว่า ผักข่า ชาวแพร่เรียกว่า มะข่า ชาวโยธวาทิตเรียกว่า ผักใส่ใหญ่ และชาวกาฬสินธุ์เรียกว่า ผักสะไห้ใหญ่ (กาฬสินธุ์) ผักข่ามีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน พม่า ไทย ลาว บังกลาเทศ มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และเป็นพืชที่ชาวเวียดนามนิยมกันมากเรียกว่า แก๊ก (Gac) ส่วนใหญ่นิยมนำผลอ่อนของผักข่า (ผลอ่อนมีสีเขียว) มาใช้ในการปรุงอาหาร เช่น ลวก ต้ม หรือ นึ่ง ให้สุกใช้จิ้มกินกับน้ำพริก หรืออาจปรุงเป็นแกง เช่น แกงเลียง แกงอ่อม และแกงส้ม เป็นต้น

#### 1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของผักข่า

##### ราก ลำต้น

ผักข่าเป็นไม้เลื้อยล้มลุก มีอายุหลายปี ในธรรมชาติชอบขึ้นคลุมไม้ยืนต้น ลำต้นเป็นเถาเลื้อย เถาลักษณะเป็นเหลี่ยมยาวได้มากกว่า 20 เมตร ตามซอกใบมีมือเกาะเป็นเส้นเดี่ยว ไม่แตกแขนง เพื่อใช้สำหรับเกาะพันยึดกับต้นไม้อื่น เถาแก่มีเหง้าใต้ดิน<sup>(5)</sup>

## ใบ

ใบเป็นลักษณะใบเดี่ยว เรียงแบบสลับกันตามกิ่ง และลำต้น ก้านใบยาว 5 – 8 เซนติเมตร ลักษณะใบรูปร่างแตกต่างกันตามพันธุ์ เช่น ขอบใบมีทั้งเรียบ และหยัก จำนวนแฉกมีตั้งแต่ไม่มีแฉกจนถึง 5 แฉก เป็นต้น ขนาดใบที่โตเต็มที่ที่มีความยาวประมาณ 10 – 20 เซนติเมตร มีต่อมตามก้านใบและโคนใบ<sup>(5)</sup>



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบฟักข้าว

ที่มา: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pic=253>, 18/7/2019

## ดอก

ดอกของฟักข้าวจะออกบริเวณข้อต่อระหว่างใบหรือตามซอกใบ โดยพบข้อละหนึ่งดอก ลักษณะของดอกคล้ายดอกตำลึง กลีบดอกสีขาวอมเหลือง หรือขาวแกมเหลือง มีกลีบดอก 5 กลีบ สามกลีบใน (ก้านเกสรและกลีบละอองเกสรจะมีสีม่วงแกมดำหรือสีม่วงแกมน้ำตาล) ใบเลี้ยงประดับลักษณะคล้ายไตหรือเกือบกลม กว้าง 2.5 – 5 เซนติเมตร ยาว 2.8 – 3.2 เซนติเมตร ผิวด้านในมีขน กลีบเลี้ยงรูปไข่ กว้าง 4 – 6 มิลลิเมตร ยาว 1 – 1.5 เซนติเมตร หนาค่ายแผ่นหนังเกลี้ยง หรือมีขนสากประปราย ดอกฟักข้าวนั้นเป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ แยกเป็นดอกเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งจะอยู่ต่างต้นกัน ดอกเพศเมียมีขนาดเล็ก ปลายใบมน ดอกเพศผู้ปลายใบแหลม



A. ดอกตูม

ที่มา: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pic=253,19/2018>

B. ดอกเพศผู้<sup>(5)</sup>C. ดอกเพศเมีย<sup>(5)</sup>

ภาพประกอบ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกพืชข้าว

### ผล

มีความแตกต่างกันตามพันธุ์ แต่โดยทั่วไปมี 2 ลักษณะ คือ ผลทรงกลมมีขนาดยาว 4 – 6 เซนติเมตร และผลทรงกลมรีคล้ายไข่ขนาด 8 – 15 เซนติเมตร เปลือกมีหนามเล็ก ๆ อยู่นอกผล ผลอ่อนจะมีสีเขียวอมเหลือง เมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส้ม แดงหรือสีส้มอมแดงตามลำดับ ภายในผล ผลสุกเนื้อจะเป็นสีเหลือง มีเยื่อกลางหุ้มเมล็ดเป็นสีแดง เมล็ดจัดเรียงเป็นแถว 6 แถว จำนวนเมล็ดต่อผลประมาณ 50 – 60 เมล็ด



ภาพประกอบ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลฟักข้าว

ที่มา: <https://gacfruit.weebly.com/gac-fruit-composition.html>



## 2. พฤษเคมีของผักข่า

ผักข่าเป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะในเยื่อหุ้มเมล็ด (aril) มีสารพฤษเคมีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะสารในกลุ่มไลโคปีนและเบตาแคโรทีน<sup>(6, 7)</sup> และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น เช่น  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) สารกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารต่าง ๆ เหล่านี้ที่อยู่ในผักข่ามีคุณสมบัติต่อสุขภาพ เช่น เป็นสารเริ่มต้นของวิตามินเอ (provitamin A) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activities)<sup>(8)</sup>

ภายในรอกของผักข่าพบสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในความเข้มข้นสูง เบตาแคโรทีนเป็นสารที่มีรายงานการตรวจพบมากกว่าที่พบในแครอท 5 เท่า และไลโคปีน (lycopene) มีการตรวจพบมากกว่าในมะเขือเทศ 8 เท่า<sup>(9, 10)</sup> ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่พบมีความผันผวนตามความแตกต่างของวัตถุดิบที่ใช้ ความแก่อ่อนของผล สภาวะการเจริญเติบโตและสภาวะที่เก็บหลังการเก็บเกี่ยว

## 3. การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักข่า

สารสกัดที่ได้จากรกหุ้มเมล็ดของผลผักข่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงเนื่องจากมีปริมาณสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สูงมาก ไลโคปีนเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่งซึ่งมีการรายงานการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอย่างแพร่หลาย ดังตาราง 1 ยกตัวอย่างเช่น Kubola & sriamornpun ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric – reducing antioxidant power (FRAP) โดยทดสอบกับส่วนต่าง ๆ ของผลผักข่าที่ระยะอายุผลแตกต่างกัน ผลที่ได้พบว่า รกหุ้มเมล็ดของผลผักข่าที่สุกอย่างเต็มที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด ในขณะที่เมล็ดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำที่สุด<sup>(7)</sup>

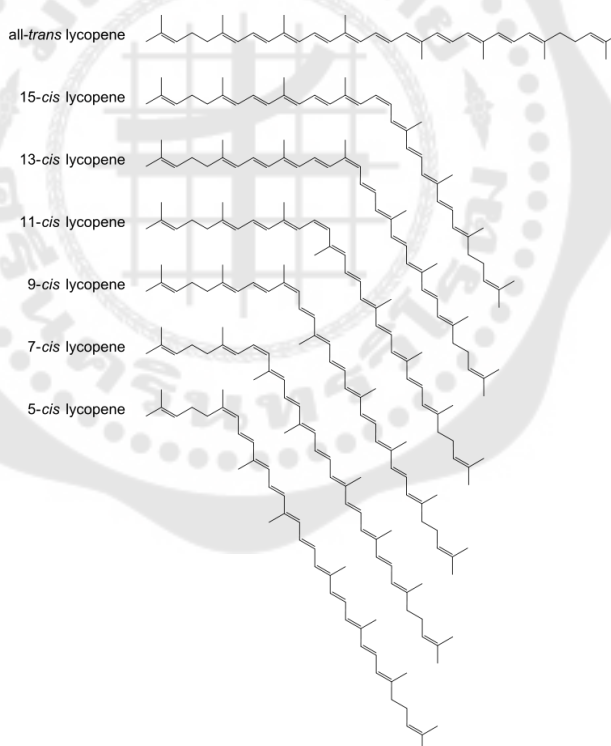
ตาราง 1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลพริกขี้หนู

วัตถุดิบที่ใช้	วิธีการ		ผลการทดสอบ	อ้างอิง
สารสกัดด้วยเอทานอล	DPPH	รกหุ้ม	IC <sub>50</sub> = 3.66 mg/g	(7)
	& FRAP	เมล็ด	FRAP 531 μmol/g FeSO <sub>4</sub>	
		เนื้อผล	IC <sub>50</sub> = 2.53 mg/g FRAP 466 μmol/g FeSO <sub>4</sub>	
		เปลือก	IC <sub>50</sub> = 2.56 mg/g FRAP 472 μmol/g FeSO <sub>4</sub>	
สารสกัดด้วยเมทานอล	DPPH	DPPH	45.1 mgAAE/100g	(11)
	& FRAP	FRAP	5.9 mgAAE/100g	
ผงพริกขี้หนู (spray – dry)	ABTS	ABTS	1.4 mM TE/g	(12)
ผงพริกขี้หนู (air – dry)	ABTS &	ABTS	0.37 mM TE/g	(13)
	DPPH	DPPH	0.33 mM TE/g	
ผงพริกขี้หนู (vacuum – dry)	ABTS &	ABTS	162 mM TE/gDW	(14)
	DPPH	DPPH	124 mM TE/gDW	

\* AAE = ascorbic acid equivalent, TE = Trolox equivalent, gDW = gram of dry weight

## ไลโคปีน

ไลโคปีน เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว ไม่มีวงแหวนอยู่ในโมเลกุล จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ โครงสร้างหลักประกอบด้วยไอโซพรีนซึ่งเป็นไดอีน (diene)  $[\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}_2]$  มาเรียงกัน 8 หน่วย มีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุล 40 อะตอม สูตรโครงสร้างโมเลกุลเป็น  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$  และน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 536.9 ลักษณะโครงสร้างมีพันธะคู่ของคาร์บอนคอนจูเกต 11 พันธะและไม่คอนจูเกตพันธะคู่ 2 พันธะ ดังแสดงในภาพประกอบ 4<sup>(15)</sup> ทำให้เกิดการเลื่อนไหลของอิเล็กตรอน (Electron delocalization) ภายในโครงสร้างได้ง่าย ทำให้ง่ายต่อการเชื่อมด้วยแสง ความร้อน โดยผ่านปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน (Polymerization) และการเชื่อมด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation degradation) ไลโคปีนนั้นสามารถละลายได้ในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วบางชนิด เช่น เบนซีน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน แต่ไม่ละลายในน้ำ<sup>(16)</sup>



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างไลโคปีน

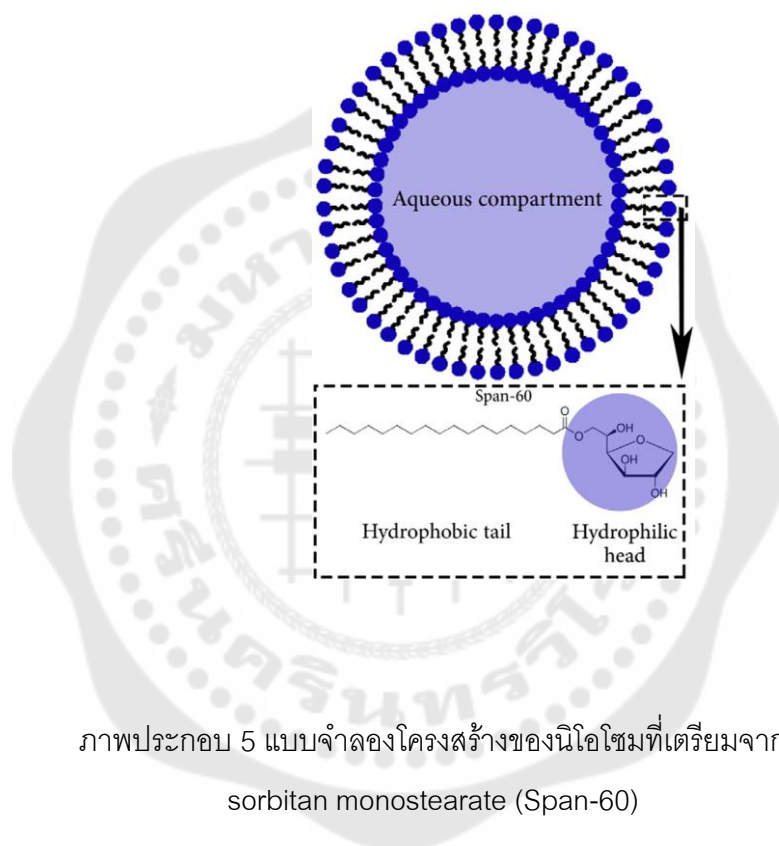
ไลโคปีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์รุนแรงเมื่อเทียบกับสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น จากรายงานการศึกษาเปรียบเทียบพบว่าผลการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของไลโคปีนมีฤทธิ์ที่แรงกว่าเบตาแคโรทีน และแอลฟาโทโคเฟอรอลถึง 2 และ 10 เท่าตามลำดับ<sup>(17)</sup>

โครงสร้างทางเคมีของไลโคปีนสามารถแบ่งได้ 2 แบบ คือ *trans* และ *cis* – isomer ดังแสดงในภาพประกอบ 4 โดยปกติไลโคปีนมีลักษณะทรานส์ทุกพันธะคู่ (all-trans isomer) ที่พบได้ในธรรมชาติ แต่เมื่อสัมผัสกับความร้อนหรือแสงสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแบบ *cis* – isomer ได้ ซึ่งโครงสร้างที่พบในเนื้อเยื่อและซีรัมในร่างกายของมนุษย์ มีทั้งแบบ *all-trans* และแบบ 9-, 13- หรือ 15-*cis* isomer<sup>(18)</sup>

ไลโคปีนเป็นรงควัตถุที่มีสีแดงสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่แตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและตัวทำละลาย เช่น เมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ไลโคปีนสามารถดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 443, 472 และ 502 นาโนเมตร เมื่อใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย ไลโคปีนสามารถดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 446, 475 และ 506 นาโนเมตร<sup>(19)</sup> และเมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ไลโคปีนสามารถดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 445, 472 และ 503 นาโนเมตร<sup>(20)</sup>

### Non-ionic surfactant based vesicles (Niosomes)

นิโอโซม (niosome) มีลักษณะเป็นถุงทรงกลมคล้ายกระเปาะสำหรับเก็บสารต่าง ๆ เกิดจากการจัดเรียงตัวเอง (self-assembly) ของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นโมเลกุลมีขั้วและไม่มีขั้วในโมเลกุลเดียวกัน (amphiphilic molecule) การจัดเรียงตัวของโมเลกุลนำส่วนที่มีคุณสมบัติเหมือนกันหันเข้าหากันและซ้อนเรียงตัวเป็นผนัง สามารถเรียงซ้อนกันเป็นผนังชั้นเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชั้นก็ได้ ดังภาพประกอบ 4 <sup>(21)</sup>



นิโอโซมแสดงพฤติกรรมคล้ายลิโปโซม แต่ลิโปโซมนั้นมีองค์ประกอบเป็นฟอสโฟลิปิดซึ่งสลายตัวได้ง่าย ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ และฟอสโฟลิปิดมีราคาสูง <sup>(4)</sup> ทำให้มีการศึกษาและประยุกต์ใช้ตำรับนิโอโซมขึ้นมา ดังแสดงใน ตาราง 2

ตาราง 2 การศึกษาและประยุกต์ใช้นาโนโซม

Drug	Application	Components	Method	References
5-Fluorouracil (5-FU)	Drug delivery carrier	$\alpha,\omega$ -Hexadecyl-bis-(1-aza)18-crown-6(bola), span80, cholesterol	Thin layer evaporation technique	(22)
Acyclovir	Increase bioavailability	Span60, dicetylphosphate(DCP), cholesterol	Film hydration method	(23)
Ibuprofen	Transdermal drug delivery	Tween, Span, cholesteryl hemisuccinate (CHEM), cholesterol	Film hydration method	(24)
Oxcarbazepine	Increase elimination half life	Span/cholesterol	Thin layer evaporation technique	(25)
Celecoxib	Slow drug release	Span 60/Chol/DCP: proniosomes	Spray drying method	(26)

## 1. องค์ประกอบของนิโอโซม

นิโอโซมประกอบด้วยส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้

### 1.1 สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Non-ionic surfactants)

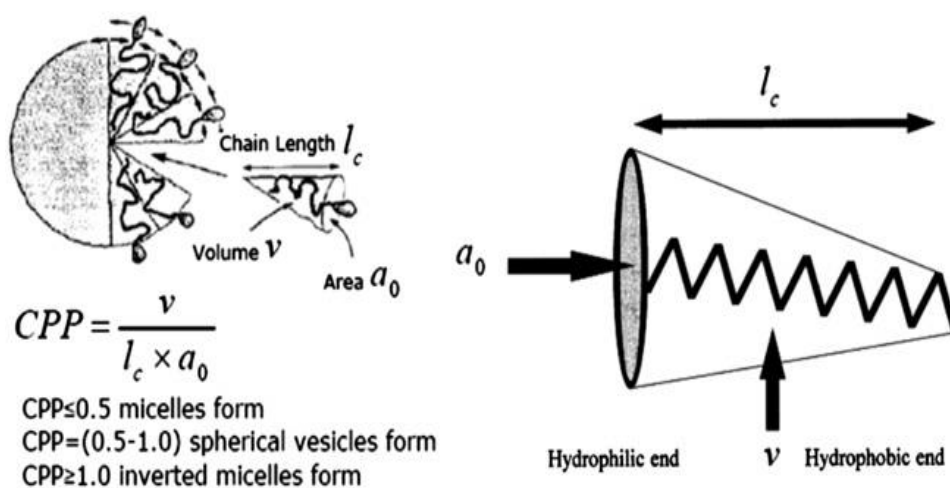
สารลดแรงตึงผิว (surfactants) เป็นสารที่มีส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (lipophilic หรือ hydrophobic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (amphiphilic molecules) สามารถแบ่งสารลดแรงตึงผิวออกเป็น 4 ชนิด ตามส่วนที่ชอบน้ำหรือมีขั้ว (hydrophilic head group) คือ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic), ประจุบวก (cationic), มีทั้งสองประจุ (amphoteric) และไม่มีประจุ (non-ionic)

สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุเป็นสารที่นิยมใช้ในการเตรียมอนุภาคลักษณะคล้ายถุง (vesicles) เนื่องจากข้อดีของสารเหล่านี้ในการคงสภาพ (stability) ความเข้ากันได้ (compatibility) และความเป็นพิษ (toxicity) รวมถึงความเป็นพิษต่ำ การเกิดเม็ดเลือดแดงแตกตัว (hemolytic) น้อย ระคายเคืองต่อเซลล์น้อย และมีแนวโน้มในการรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างให้ใกล้เคียงกับสภาวะแวดล้อม<sup>(27)</sup> เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic) มีทั้งสองประจุ (amphoteric) และประจุบวก (cationic)

สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนของโมเลกุลมีขั้วและไม่ขั้ว การจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้จึงมีลักษณะคล้ายถุงที่มีสองชั้น (bilayer vesicles) แทนที่จะเป็นไมเซลล์ (micelles) เป็นผลมาจากสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำ (มีขั้ว) กับส่วนที่ชอบน้ำมัน (ไม่มีขั้ว) (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) และค่า critical packing parameter (CPP)

ค่า HLB เป็นค่าที่มีความสำคัญในการกักเก็บตัวยา (entrapment efficiency) ค่า HLB มีค่าตั้งแต่ 0 – 20 สำหรับสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ค่า HLB ต่ำ (<9) หมายถึง มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด lipophilic (oil soluble) และ ค่า HLB สูง (>11) หมายถึง มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด hydrophilic (water soluble) ส่วนสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ระหว่าง 3 – 8 สามารถเตรียมผนังสองชั้น (bilayer surface) และเตรียมโดยอิมัลชัน น้ำในน้ำมัน (water-in-oil, W/O emulsifier) เช่นเดียวกันหากค่า HLB ระหว่าง 3 – 18 สามารถเตรียมโดยอิมัลชัน น้ำมันในน้ำ (oil-in-water, O/W emulsifier)<sup>(21)</sup>

ค่า CPP สามารถทำนายชนิดของอนุภาคลักษณะคล้ายถุง (type of vesicles) ได้ โดยการคำนวณจากปริมาตรของส่วนที่ไม่มีขั้ว (volume of hydrophobic group,  $V$ ) พื้นที่ของส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic head group,  $a_0$ ) และ ความยาวของสายโซ่แอลคิลในส่วนที่ไม่มีขั้ว (lipophilic alkyl chain,  $l_c$ ) ของสารลดแรงตึงผิว ดังแสดงในภาพประกอบ 6 <sup>(27)</sup>

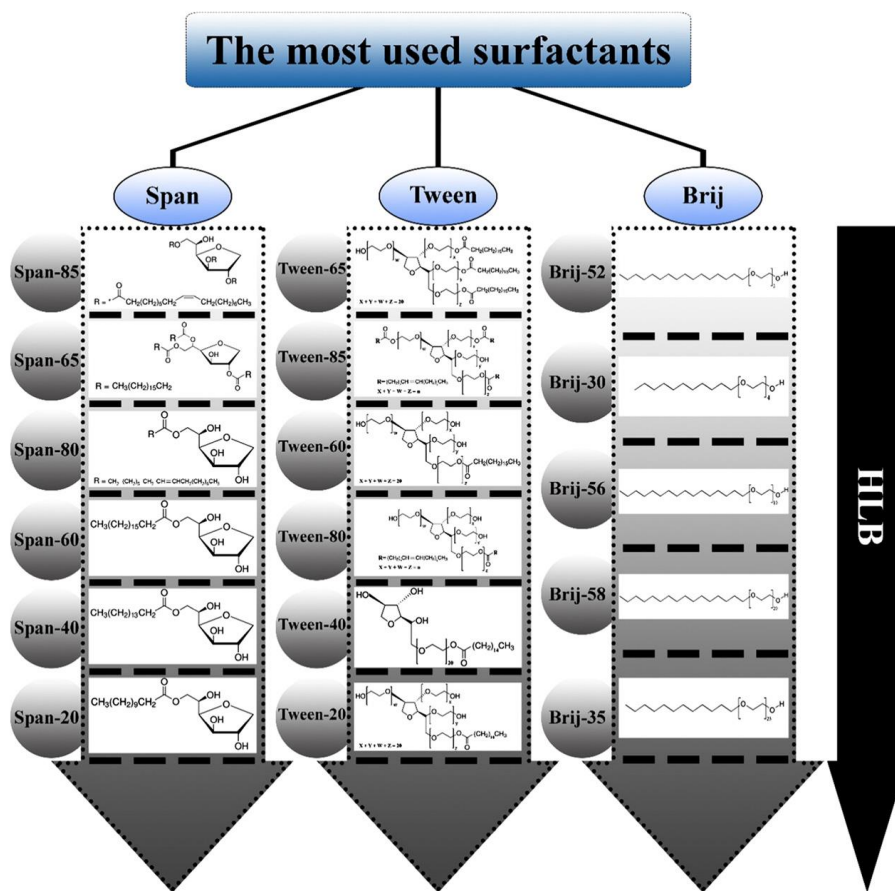


ภาพประกอบ 6 ค่า CPP และทำนายชนิดของอนุภาคคล้ายถุง (type of vesicle)

ค่าความยาวของสายโซ่ (chain length) และขนาดของส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic head group) มีผลกับประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวสาร (entrapment efficiency) สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีขั้วที่มีสายโซ่ยาว เช่น stearyl (C18) ที่มีสายโซ่ยาวกว่า lauryl (C12) แสดงประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาได้ดีกว่าด้วย นอกจากนี้คุณหมุมในการเปลี่ยนวัฏภาค (phase transition temperature,  $T_c$ ) ของสารลดแรงตึงผิวมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารตัวอย่างเช่น Span60 เป็นสารที่มีค่า  $T_c$  สูง ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสูงตามไปด้วย <sup>(28)</sup>

สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการเตรียมไมโซมมักเป็น Alkyl esters, Alkyl amides, Alkyl ethers และ esters ของกรดไขมัน <sup>(21)</sup> ดังแสดงในภาพประกอบ 7



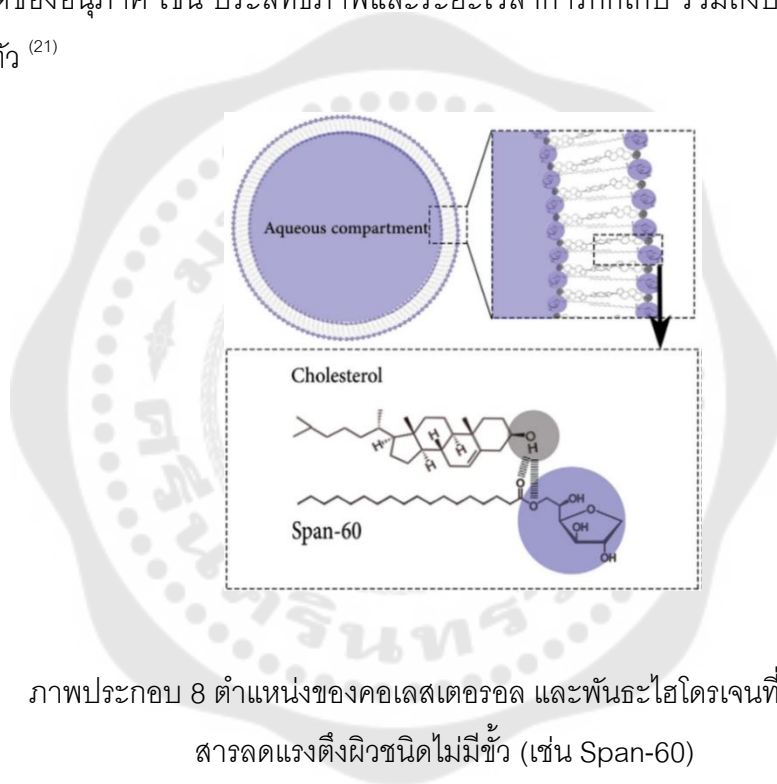


ภาพประกอบ 7 สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้เตรียมไมโซม

## 1.2 สารเติมแต่ง (additive agent)

### คอเลสเตอรอล (cholesterol)

คอเลสเตอรอลมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างของนิโอโซมเนื่องจากคอเลสเตอรอลมีปฏิสัมพันธ์ (interaction) กับสารลดแรงตึงชนิดไม่มีประจุ คอเลสเตอรอลแทรกตัวอยู่ใน ผนังสองชั้นของอนุภาคลักษณะคล้ายถุง (bilayer of vesicle) และสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) กับส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic head group) ดังภาพประกอบ 8 การเพิ่มคอเลสเตอรอลเข้าไปในกระบวนการสร้างนิโอโซมมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของอนุภาค เช่น ประสิทธิภาพและระยะเวลาการกักเก็บ รวมถึงปลดปล่อยสาร และความคงตัว<sup>(21)</sup>



ภาพประกอบ 8 ตำแหน่งของคอเลสเตอรอล และพันธะไฮโดรเจนที่เกิดกับ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีขั้ว (เช่น Span-60)

สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB > 6 จำเป็นต้องเพิ่มคอเลสเตอรอลเพื่อช่วยในการจัดเรียงตัวให้มีลักษณะโครงสร้างของผนังสองชั้นของอนุภาคลักษณะคล้ายถุง และเพื่อเป็นการลดค่า HLB ลง นอกจากนี้คอเลสเตอรอลยังช่วยเพิ่มความคงตัว (stability) อีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากคอเลสเตอรอลช่วยเพิ่มอุณหภูมิการเปลี่ยนสภาพ (gel liquid transition, TC) ของอนุภาค ซึ่งการใช้คอเลสเตอรอลในปริมาณเท่าใดขึ้นอยู่กับค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิว<sup>(29)</sup>

### 1.3 สารเพิ่มความคงตัว

วิธีการหนึ่งซึ่งจะช่วยให้ไนโอโซมมีความคงตัวโดยอาศัยการเติมโมเลกุลมีขั้วเข้าไป เพื่อให้เกิดมีแรงผลักทางประจุไฟฟ้าเพื่อเพิ่มความคงตัวแก่อนุภาคหรือเพื่อป้องกันการตกตะกอน (aggregation) ตัวอย่างเช่น dicetyl phosphate กับ phosphotidic acid ที่มีประจุลบ และ stearylamine กับ stearyl pyridinium chloride ที่มีประจุบวก เป็นต้น <sup>(4)</sup> โดยส่วนใหญ่ใช้ปริมาณความเข้มข้น 2.5 – 5 % (w/w) หากใส่ใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้โมเลกุลมีขั้วจะยับยั้งการเกิดไนโอโซม <sup>(30)</sup>

## 2. การเตรียมไนโอโซม

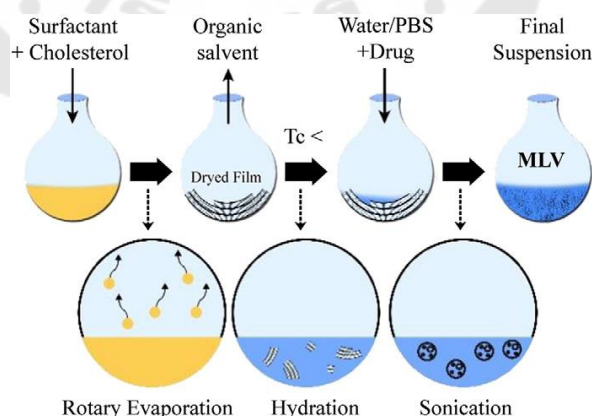
ไนโอโซมมีวิธีการเตรียมหลายวิธี แต่ละวิธีมีผลต่อลักษณะอนุภาค ขนาด จำนวนชั้นของอนุภาค และมีผลต่อการกระจายตัว รวมถึงประสิทธิภาพในการกักเก็บ และความสามารถในการซึมผ่านด้วย วิธีการเตรียมมักเกี่ยวข้องกับพลังงาน เช่น ความร้อน พลังงานกล เป็นต้น วิธีการเตรียมไนโอโซมมีหลากหลายวิธี <sup>(21)</sup> เช่น

- Thin film hydration method (TFH)
  - Hand shanking method (HSM)
  - Bubble method
  - Ether injector (EIM)
  - Reverse phase evaporation
  - Microfluidization method
  - Heating method (HM)
  - Freeze and thaw method (FAT)
  - Dehydration rehydration method (DRM)
  - Pro-niosome technology (PT)
- (REV)
- Sonication method

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้จะนำเสนอเฉพาะวิธีการเตรียมไมโอโซม ด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่สามารถได้ ดังนี้

### การทำให้เกิดฟิล์ม (Thin-film hydration method (TFH)) และการเขย่าด้วยมือ (hand – shaking method)

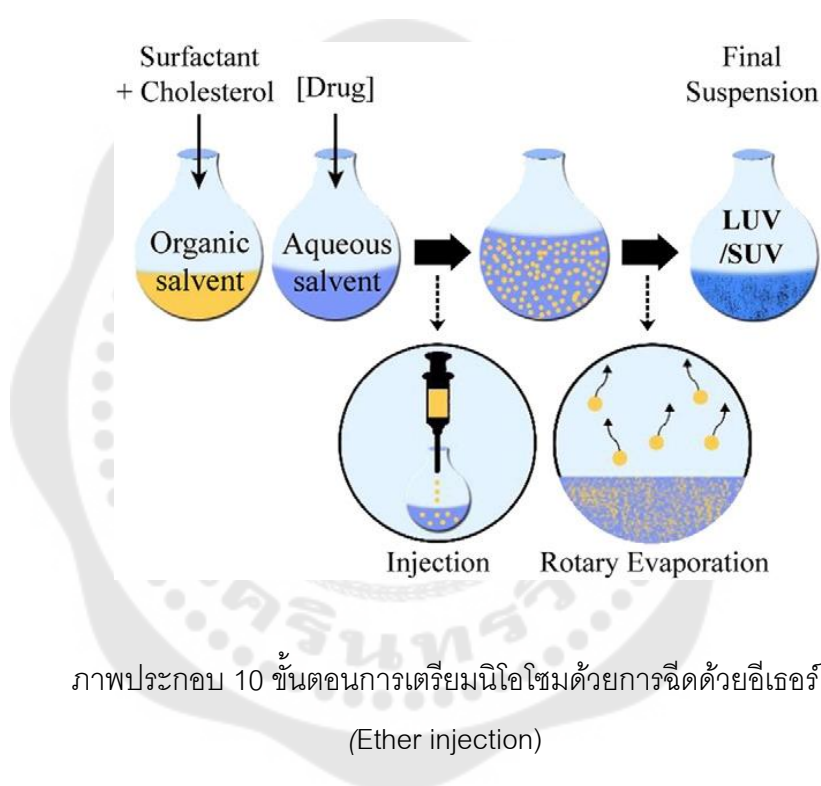
เป็นวิธีที่ง่ายและใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับการเตรียมด้วยวิธีนี้ สารลดแรงตึงผิวและสารเพิ่มเติมต่าง ๆ เช่น คอเลสเตอรอล นำมาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในภาชนะก้นกลม เมื่อทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ฟิล์มที่เกิดเคลือบอยู่ที่ผิวภายในภาชนะก้นกลม เติมน้ำหรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline) เพื่อให้เกิดการพองตัวที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะ (phase transition temperature,  $T_c$ ) ของสารลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอล หลังจากเติมตัวทำละลายแล้ว ให้เขย่าในระหว่างที่แผ่นฟิล์มพองตัวเข้ากับบัฟเฟอร์ จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นอนุภาคไมโอโซมหลายชั้น (MLV) ดังภาพประกอบ 9 การเติมยาขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของยา ถ้าตัวยาละลายน้ำได้ดีให้ผสมในน้ำหรือบัฟเฟอร์ และถูกกักเก็บภายในไมโอโซม แต่ถ้าตัวยาละลายน้ำได้น้อย ให้ผสมตัวทำละลายอินทรีย์ และถูกกักเก็บในชั้นที่ไม่ชอบน้ำของไมโอโซม ภายหลังจากที่เขย่าจะเห็นลักษณะเป็นของสารละลายขาวขุ่นคล้ายนม



ภาพประกอบ 9 ขั้นตอนการเตรียมไมโอโซมด้วยวิธี  
Thin-film hydration method (TFH)

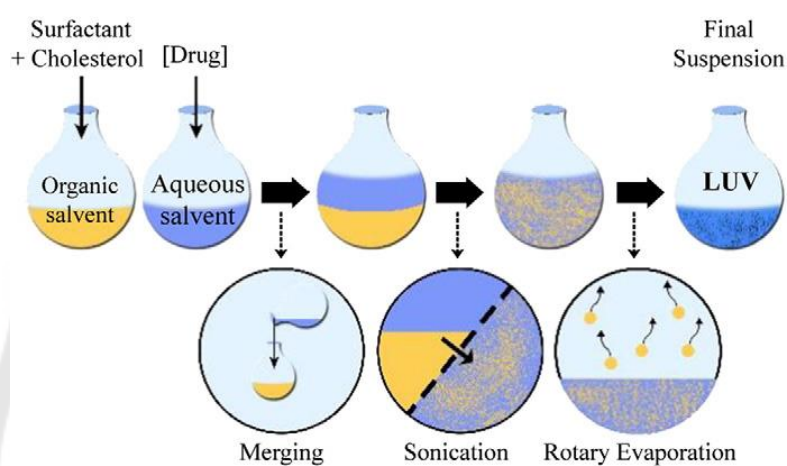
### การฉีดด้วยอีเธอร์ (Ether injection)

ละลายสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีขั้ว พร้อมกับสารเพิ่มเติม หรือคอเลสเตอรอลในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น diethyl ether และฉีดอย่างช้าลงไปใต้น้ำหรือบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิคงที่ (ประมาณ 60 °C) ระเหยแห้งด้วย เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ในระหว่างที่อีเทอร์ระเหยออกไปเกิดการเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวจนได้อนุภาคชั้นเดียว (SUV หรือ LUV) ขนาดประมาณ 500 - 1000 nm ดังภาพประกอบ 10 แต่ข้อเสียของระบบนี้ คือ กำจัดอีเธอร์ออกจากระบบยาก <sup>(31)</sup>



### การกลับวัฏภาค (Reverse Phase Evaporation, REV)

ละลายสารลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอลในตัวทำละลายอินทรีย์ เติมน้ำหรือบัฟเฟอร์ที่มียาลงไป ใช้คลื่นเสียงจนได้เจลที่มีลักษณะใสแล้วจึงเติมบัฟเฟอร์ลงไปพร้อมกับเขย่า ระบายตัวทำละลายอินทรีย์ออกช้า ๆ โดยใช้เครื่องระเหยแห้ง ที่อุณหภูมิ 40 – 60 °C นิโโซมที่ได้มีการจัดเรียงตัวชั้นเดียว ขนาดอนุภาค 500 nm ดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการเตรียมนิโโซมด้วยการกลับวัฏภาค  
(Reverse Phase Evaporation, REV)

### 3. กระบวนการหลังการเตรียมนิโอโซม

เมื่อเตรียมนิโอโซมได้แล้ว ภายหลังการเตรียมนิโอโซมที่มียาหรือสารสำคัญบรรจุ การบรรจุยาหรือสารสำคัญอาจไม่ได้เกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการแยกส่วนที่ไม่ถูกบรรจุออกไป ซึ่งกระบวนการแยกสามารถทำได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ดังนี้

#### การแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis)

เทคนิคนี้มีพื้นฐานมาจากการแพร่ (diffusion) และออสโมซิส (osmosis) ของตัวถูกละลายและสารละลายผ่านเยื่อเลือกผ่าน ทำให้สามารถแยก vesicle ที่กระจายอยู่ในสารละลายออกจากยาหรือสารที่ไม่ได้บรรจุใน vesicle ได้ ทำได้โดยการนำนิโอโซมที่เตรียมได้เติมเข้าไปในถุงเยื่อเลือกผ่าน (dialysis bag) ตัวยาที่ไม่ได้บรรจุในนิโอโซมจะแพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่านออกไป

#### การแยกโดยใช้เจล (gel filtration)

เป็นเทคนิคโครมาโทกราฟีอีกหลักการหนึ่ง ซึ่งแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันตามขนาดโมเลกุล เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์บรรจุเจล วิธีการนี้เรียกว่า size exclusion chromatography หรือ molecular sieve chromatography ซึ่งเจลที่ใช้ผลิตจากโพลีเมอร์ที่เป็นเดกซ์แทรน (dextran) หรืออะกาโลส (agarose) หรือโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ซึ่งมีชื่อการค้าต่างกัน ดังตาราง 3

สำหรับเทคนิคการแยกด้วยเจลินี้เป็นวิธีที่ง่ายและเป็นที่ยอมรับในการใช้แยกนิโอโซมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตาราง 3 ตัวอย่างเจลชนิดต่าง ๆ

ชื่อการค้า	ชนิดโพลิเมอร์	ขนาดโมเลกุลที่แยกได้ (Da)
Sephadex G-10		0 – 700
Sephadex G-25		1,000 – 5,000
Sephadex G-50	Dextran	1,500 – 30,000
Sephadex G-100		4,000 – 150,000
Sephadex G-250		5,000 – 600,000
Bio-gel P-2		100 – 1,800
Bio-gel P-5		1,000 – 6,000
Bio-gel P-10		1,500 – 20,000
Bio-gel P-30	Polyacrylamide	2,500 – 40,000
Bio-gel P-100		5,000 – 100,000
Bio-gel P-300		6,000 – 400,000
Sepharose 6 B	Agarose	10,000 – 4,000,000
Sepharose 4 B		60,000 – 20,000,000
Sepharose 2 B		70,000 – 40,000,000

#### การแยกด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrifugation/ultra-centrifugation)

เป็นเทคนิคที่อาศัยแรงหนีศูนย์กลางซึ่งอาศัยหลักความแตกต่างระหว่างความหนาแน่นของสาร จึงนิยมใช้สำหรับปั่นแยกตะกอนทั้งหมดออกจากของเหลว แต่สามารถประยุกต์ใช้ในการแยกสารแต่ละชนิดออกจากกันโดยการกำหนดความแรงในการปั่น และระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ (อนุภาคขนาดใหญ่) ออกก่อน

เทคนิคการแยกโดยการปั่นเหวี่ยงสามารถนำมาใช้ร่วมกับการแยกโดยใช้เจลได้ ซึ่งผลที่ได้ออกมาพบว่ามีประสิทธิภาพในการแยกนิโอโซมกับสารที่ไม่ได้บรรจุในช่วง 92 – 100%



#### 4. การแสดงคุณลักษณะของนีโอโซม (Characterization of niosome)

เมื่อตั้งตำรับนีโอโซมและเตรียมออกมาได้แล้ว ต้องมีการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ซึ่งจำเป็นต่อการพัฒนาและประยุกต์ใช้ต่อไป ค่าสำหรับการประเมิน ดังแสดงในตาราง 4 <sup>(29)</sup>

ตาราง 4 ค่าหรือคุณสมบัติในการบ่งบอกคุณลักษณะของนีโอโซม และเทคนิคที่ใช้

Niosome parameter/property	Applied technique
Size	- (ของแข็ง); Dynamic Light Scattering (DLS/PCS); Scanning Electron Microscope (SEM) - (ของเหลว); Transmission Electron Microscope (TEM); Atomic Force Microscope (AFM)
Zeta-potential	Electorphoretic mobility
Bilayer characterization	Fluorescence polarization Fluorescence anisotropy
Stability	DLS; Turbiscan; microscopy techniques Release studies
Entrapment efficiency	UV/VIS; HPLC; fluorescence
pH-sensitivity assessment	Fluorescence spectroscopy; Small-angle X-ray scattering (SAXS)

ในที่นี้จะกล่าวถึงรายละเอียดเพียง 4 หัวข้อ ดังนี้

### **ขนาดโดยเฉลี่ย สัณฐาน และการกระจายตัวของอนุภาค**

(Average size, morphology and size distribution)

เมื่อถือว่าไอโซมมีรูปร่างลักษณะทรงกลมและขนาดของอนุภาคสามารถวัดได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น กล้องจุลทรรศน์ หรือ coulter counter, Scanning electron microscopy (SEM), Transmission electron microscopy (TEM), Freeze fracture replication-electron microscopy (FF-TEM), light scattering techniques (spectrometer — dynamic light scattering (DLS) instrument), zetasizer and mastersizer ค่าที่อ่านได้จะเป็นขนาดของอนุภาคและการกระจายตัวอยู่ในรูป polydispersity index (PDI) <sup>(29)</sup>

### **Zeta - potential และคุณสมบัติพื้นผิว**

zeta - potential มีความสำคัญอย่างมากต่อความคงตัวของอนุภาค โดยทั่วไปไอโซมที่มีประจุมีความเสถียรมากกว่าที่ไม่มีประจุ เนื่องจากความมีประจุนี้จะไปต้านการตกตะกอนและรวมกันของอนุภาค ค่า zeta - potential ที่มีค่าติดลบ ที่มีค่าตั้งแต่ -41.7 ถึง -58.4 mV มากพอสำหรับการรักษาเสถียรภาพไฟฟ้า ซึ่งประเภทของสารลดแรงตึงผิวหรือประสิทธิภาพในการกักเก็บส่งผลต่อค่า zeta - potential วัดได้โดยใช้ zetasizer, mastersizer, microelectrophoresis, pH-sensitive fluorophores และ DLS <sup>(21)</sup>

### 5. ความสามารถในการกักเก็บ (Entrapment efficiency, EE)

ภายหลังจากที่เตรียมไนโอโซมได้แล้ว ยาหรือสารสำคัญที่ไม่ได้ถูกบรรจุในไนโอโซมต้องถูกแยกออกโดยใช้เทคนิคดังกล่าวไว้ในหัวข้อก่อนหน้า หลังจากแยกไนโอโซมที่มีสารบรรจุอยู่แล้ว สามารถหาความเข้มข้นของสารที่ไม่ได้บรรจุได้ แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสาร ก่อนนำมาหาความสามารถในการกักเก็บ<sup>(21)</sup> ซึ่งสามารถหาได้จากสมการ

$$EE = \frac{(W_T - W_F)}{W_T} \times 100\%$$

โดย  $W_T$  คือ ปริมาณของยาหรือสารที่ใช้ในการเตรียมไนโอโซม

$W_F$  คือ ปริมาณยาหรือสารที่ไม่ได้บรรจุไปในไนโอโซม

นอกจากนี้แล้ว สามารถหาได้จากวิธีการทำให้นีโอโซมที่มียาหรือสารบรรจุอยู่แตกออกด้วย 50% propane หรือ 0.1% TritonX-100 แล้วคำนวณหาปริมาณสารที่บรรจุอยู่ในไนโอโซมโดยตรง ความสามารถในการกักเก็บจึงหาได้จากสมการ

$$EE = \frac{W_L}{W_T} \times 100\%$$

โดย  $W_T$  คือ ปริมาณของยาหรือสารที่ใช้ในการเตรียมไนโอโซม

$W_L$  คือ ปริมาณยาหรือสารที่บรรจุไปในไนโอโซม

### บทที่ 3

## ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

รูปแบบการวิจัย: งานวิจัยเชิงทดลอง

อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องระเหยสารแบบหมุน R-210, Büchi, Switzerland
2. เครื่อง HPLC M20A, Shimadzu, Japan
3. HPLC column (C<sub>18</sub>, 150 x 4.6 mm, 5µm) Inertsil®, GL sciences, Japan
4. ชุดกรองสารละลาย
5. เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง MS2050U, Mettler Toledo, USA
6. Nylon membrane filter (0.45µm) Whatman Limited Maidstone, England
7. เครื่องกวนผสมแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) MS7-H550-Pro, DLAB scientific, China
8. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) BD400, Binder, Germany
9. ตู้อบควบคุมแรงดัน (vacuum oven) VD 23, Binder, Germany
10. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (climate chamber) KBF 115, Binder, Germany
11. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) UV-1800, Shimadzu, Japan
12. เครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโน Zetasizer Nano ZS90, Malvern, UK
13. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน  
(Transmission Electron Microscope; TEM) JEM-2100Plus, JEOL, USA
14. เครื่องผสม (vortex mixture) MS-X, DLAB, China

## สารเคมี

1. สารมาตรฐานทุติยภูมิไลโคปีน (Secondary standard, 11.4% lycopene in inert material) Sigma-Aldrich, Germany
2. Dichloromethane (HPLC grade) RCI Labscan, Thailand
3. Acetonitrile (HPLC grade) RCI Labscan, Thailand
4. Methanol (HPLC grade) Merck, Germany
5. Acetone RCI Labscan, Thailand
6. Methanol RCI Labscan, Thailand
7. Ferric chloride hexahydrate Ajax Finechem, Australia
8. Ferrous sulfate heptahydrate Ajax Finechem, Australia
9. Sodium acetate trihydrate KEMAUS, Australia
10. (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine; TPTZ) Alfa, USA

## การศึกษาและการเก็บรวบรวมข้อมูล

### 1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดผักข่า

#### 1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำผลผักข่าที่สุกแล้วจากตลาดไท ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี สังกัดจากสีของผลจะมีสีส้มแดงนำมาล้างให้สะอาด ผ่า แยกชิ้นส่วนโดยแยก เปลือก เนื้อ และรกหุ้มเมล็ด (gac aril) ออกจากกันก่อนนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เมื่อชิ้นส่วนแต่ละส่วนแห้งแล้ว นำไปบดเป็นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด นำผงที่ได้เก็บในที่แห้ง ป้องกันความชื้นและแสง

#### 1.2 การสกัด

วิธีการสกัดผักข่าดัดแปลงจากงานวิจัยของ Barba และคณะ<sup>(32)</sup> โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำผงผักข่าแต่ละส่วนมาชั่ง 2 กรัม ลงในขวดที่ป้องกันแสง เติมตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane: acetone: ethanol อัตราส่วน 50:25:50 โดยปริมาตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กวนโดยใช้เครื่องกวนผสมแม่เหล็กไฟฟ้า เมื่อครบ 3 ชั่วโมง เติมน้ำ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วแยกชั้นด้วย separatory funnel โดยเก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ นำไปให้เข้มข้นขึ้นด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง vacuum oven ที่ 40 องศาเซลเซียส บันทึกลักษณะ และสี นำไปเก็บในขวดแก้วกันแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2. การวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนจากสารสกัด

### 2.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงสารละลายไลโคปีน

ชั่งไลโคปีนซึ่งเป็นสารมาตรฐานทุติยภูมิ 3 มิลลิกรัม (มีไลโคปีน 11.4 %) ละลายด้วย dichloromethane 8 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที กรองตะกอนที่ละลายไม่หมดออก ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้สารละลายไลโคปีนความเข้มข้นเท่ากับ 34.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 300 - 600 นาโนเมตร

### 2.2 การเตรียมสารละลายไลโคปีนจากสารมาตรฐานทุติยภูมิ

ชั่งไลโคปีนซึ่งเป็นสารมาตรฐานทุติยภูมิ 10 มิลลิกรัม (มีไลโคปีน 11.4%) ด้วยเครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง ละลายด้วย dichloromethane 8 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที กรองตะกอนที่ละลายไม่หมดออก ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้สต็อกสารละลายมาตรฐาน (stock standard solution) [สารละลายไลโคปีนความเข้มข้นเท่ากับ 114 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร]

เตรียมสารละลายมาตรฐานไลโคปีนที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 11.4, 22.8, 34.2, 57.0 และ 68.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการปิเปตสต็อกสารละลายมาตรฐานมา 100, 200, 300, 500 และ 600 ไมโครลิตร มาปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ไมโครลิตร ด้วย dichloromethane แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

### 2.3 การพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

#### 2.3.1 การทดสอบสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

- สถานะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- คอลัมน์ : Inertsil® (C18, 150 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร)
- อุณหภูมิ Oven : 25 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ Auto sampler : 4 องศาเซลเซียส
- อัตราการไหล : 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
- ปริมาตรที่ใช้ในการฉีด : 10 ไมโครลิตร
- Detector : photodiode array (PDA; 475 นาโนเมตร)

- ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เฟสเคลื่อนที่ A Acetonitrile: Methanol (90:10, v/v)
- เฟสเคลื่อนที่ B Acetonitrile: Methanol (60:40, v/v)
- เฟสเคลื่อนที่ C Acetonitrile: Methanol: Dichloromethane

(71: 22: 7, v/v)

- เฟสเคลื่อนที่ D Acetonitrile: Dichloromethane (75:25, v/v)

### 2.3.2 การศึกษาความเหมาะสมของระบบ (System suitability)

จากสภาวะที่ใช้ในการศึกษาในหัวข้อ 2.3.1 มีเฟสเคลื่อนที่แตกต่างกัน 4 ระบบ การเลือกระบบเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมพิจารณาจาก Retention time ไม่เกิน 10 นาที และมีพีคที่มีลักษณะสมมาตร ในการศึกษาความเหมาะสมของระบบเฟสเคลื่อนที่ทำการฉีดสารมาตรฐานไลโคปีนซ้ำ 6 ครั้ง เพื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น Retention time, Tailing factor, Theoretical plate ตามเกณฑ์ของ Center for Drug Evaluation and Research (CDER)<sup>(33)</sup> พิจารณาค่าพารามิเตอร์ Retention time, Tailing factor ไม่มากกว่า 2 และ Theoretical plate (N) มากกว่า 2000

### 2.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

นำวิธีวิเคราะห์ที่ได้เลือกมาทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามข้อกำหนด AOAC 2012 guideline<sup>(34)</sup> และเกณฑ์การยอมรับดังนี้

- ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

วิเคราะห์ dichloromethane (blank), สารละลายมาตรฐานไลโคปีน ความเข้มข้น 34.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารสกัด 1 มิลลิกรัม ละลายใน 1 มิลลิลิตร dichloromethane และสารละลายผสมของสารมาตรฐานไลโคปีนกับสารสกัด (ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง จะพิจารณาจาก retention time ของพีคโดย blank ต้องไม่พบพีคที่เวลาเดียวกับพีคของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน

- การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ทำการเตรียมสารละลายไลโคปีนจากสารมาตรฐานทุติยภูมิจนได้สกัดออก สารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นเท่ากับ 114 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาเตรียมให้ได้ สารละลายมาตรฐานไลโคปีนที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คือ 11.4, 22.8, 34.2, 57.0 และ 68.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีในข้อ 2.2 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไลโคปีนที่ระดับต่าง ๆ กับพื้นที่ใต้พีค (peak area) คำนวณหาสมการเส้นตรง และค่า Coefficient of determination ( $R^2$ ) ทำการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน

- การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy)

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานไลโคปีน 3 ความเข้มข้น โดยปิเปตต์จากสต็อกสารละลายมาตรฐาน (114 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มา 150, 250 และ 400 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ไมโครลิตร ด้วย dichloromethane จะได้สารละลายมาตรฐานไลโคปีน ความเข้มข้น 17.1, 28.5 และ 45.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) จากสมการ หาค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (%mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation, %RSD) โดยที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับจะต้องอยู่ในช่วง 85 – 115%

$$\%Recovery = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นของไลโคปีนที่วัดได้}}{\text{ค่าความเข้มข้นของไลโคปีนที่แท้จริง}} \times 100$$



### - การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

ความทำซ้ำได้ (Repeatability) ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานไลโคปีน 3 ความเข้มข้น คือ 17.1, 28.5 และ 45.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบความแม่นยำ นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย และ %RSD ภายในวันเดียวกัน

Intermediate Precision วิเคราะห์ปริมาณสารละลายมาตรฐานไลโคปีน เช่นเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์วันละครั้งเป็นเวลา 3 วัน แต่ละวันทำซ้ำ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และ %RSD

### - ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)

การหาค่า LOD และ LOQ หาได้จากวิธีการคำนวณโดยใช้ค่าเฉลี่ยความชันของกราฟมาตรฐาน (slope of calibration curve) (S) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สามารถหาค่า LOD และ LOQ ได้จาก  $3.3(SD)/S$  และ  $10(SD)/S$  ตามลำดับ

## 2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนจากสารสกัด

ซึ่งสารสกัดที่ได้จากการสกัดผักขาวแต่ละส่วน (เปลือก เนื้อ และรอกหุ้มเมล็ด) ด้วยเครื่องซัง 5 ตำแหน่งอย่างแม่นยำปริมาณ 1.00 มิลลิกรัม นำไปละลายด้วย dichloromethane และปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร ทำการกรองผ่าน nylon membrane filter (0.45 $\mu$ m) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC และทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบปริมาณไลโคปีนจากส่วนต่างๆ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Scheffe's Test

### 3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ทำตามวิธีของ Iris F.F. Benzie และ Malegaddi Devaki<sup>(35)</sup> โดยเตรียมสารละลายและมีวิธีการดังนี้

##### 3.1.1 การเตรียมสารละลาย Ferric reducing antioxidant power (FRAP) reagent

- Acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยการชั่ง sodium acetate trihydrate จำนวน 3.1 กรัม ละลายในน้ำ ultrapure 800 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid 16 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรและปรับค่า pH ให้เท่ากับ 3.6 เก็บที่อุณหภูมิห้องใช้ภายใน 1 เดือนหลังการเตรียม

- สารละลาย Ferric chloride ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยการชั่ง Ferric chloride hexahydrate 270.0 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ ultrapure 50 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้ควรมีสีเหลือง เก็บในขวดพลาสติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถใช้ได้ภายใน 2 สัปดาห์หลังการเตรียม

- สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยการชั่ง 2, 4, 6 tripyridyl-S-triazine (TPTZ) 156 มิลลิกรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้ต้องมีลักษณะใส ไม่ขุ่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถใช้ได้ภายใน 2 สัปดาห์หลังการเตรียม

- ผสมสารละลายเพื่อเตรียม FRAP reagent โดยใช้ acetate buffer: Ferric chloride solution: TPTZ solution อัตราส่วน 10:1:1 โดยปริมาตร สารละลายที่ได้ต้องไม่มีสีน้ำเงิน และสามารถใช้ได้ภายใน 3 ชั่วโมงหลังการเตรียม ก่อนการใช้งานชุน FRAP reagent ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10 - 15 นาที

##### 3.1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน Ferrous sulfate

ชั่งสาร Ferrous sulfate hexahydrate ปริมาณ 2.76 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ เจือจาง 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 100, 200, 400, 600 และ 800 ไมโครโมลาร์

ปิเปตต์สารละลาย Ferrous sulfate แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent จำนวน 2 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ Ferrous sulfate เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณ Relative antioxidant activity (FRAP value)

### 3.1.3 การทดสอบฤทธิ์ในสารสกัด

ซึ่งสารสกัด 5 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO 1 มิลลิลิตร บีเบตต์สารสกัด 300 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent จำนวน 2.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที นำไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

## 3.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ปรับจากวิธีของ Liu และคณะ<sup>(36)</sup> และวิธีของ Tan และคณะ<sup>(37)</sup>

### 3.2.1 การเตรียมสารละลาย DPPH ในเอทานอล

ซึ่ง DPPH 7.9 มิลลิกรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม ethanol 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร [จะได้ DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์]

### 3.2.2 การเตรียมสารสกัด

ซึ่งสารสกัด 100 มิลลิกรัม ละลายสารสกัดใน dichloromethane 8 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร

### 3.2.3 การทดสอบฤทธิ์สารสกัด

บีเบตต์สารสกัด 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 40 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

#### 4. การเตรียมนิโอโซมเปล่าและนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัด

##### 4.1 สูตรตำรับนิโอโซมเปล่า

ละลายสารลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอลในคลอโรฟอร์มปริมาณ 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดก้นกลม (round bottom flask) โดยมีอัตราส่วนดังตาราง 5 นำสารละลายที่ได้มา ระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำ โดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้แน่ใจว่าตัวทำละลายถูกระเหยออกหมด นำขวดก้นกลมมาทำการอบภายใต้แรงดันด้วยเครื่อง vacuum oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงเติมน้ำลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าและให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตั้งขวดก้นกลมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นิโอโซมที่ได้จะกระจายตัวอยู่ในสารละลาย

ตาราง 5 ตำรับและส่วนประกอบในการเตรียมนิโอโซม

ส่วนประกอบ	Molecular weight	Weight (mg)				
		F1	F2	F3	F4	F5
Tween 20	1227.54	61.4	-	-	-	-
Tween 40	1283.65	-	64.2	-	-	-
Tween 60	1311.70	-	-	65.5	32.8	131.0
Cholesterol	386.654	19.3	19.3	19.3	38.6	9.6

\* ตำรับ F1 – F3 อัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอล 1:1 โดยโมล

\*\* ตำรับ F4 และ F5 อัตราส่วนลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอล 1:2 และ 2:1 โดยโมล ตามลำดับ ความเข้มข้นโดยรวมเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์

## 4.2 การเตรียมนิโอสิมที่กักเก็บสารสกัด

จากตำรับนิโอสิมที่ได้จากข้อ 4.1 ทำการบรรจุสารสกัดให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.25, 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสารสกัด ละลายในคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้เทลงในขวดก้นกลมที่มีสารลดแรงตึงผิวและคอเลสเทอรอล เขย่าให้เข้ากัน นำขวดก้นกลมมาทำการอบภายใต้แรงดันด้วยเครื่อง vacuum oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงเติมน้ำลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าและให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตั้งขวดก้นกลมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นิโอสิมที่ได้จะกระจายตัวอยู่ในสารละลาย

## 5. การศึกษาคุณลักษณะของสารละลายที่มีนิโอสิม

### 5.1 การสังเกตลักษณะปรากฏ

เมื่อเตรียมนิโอสิมได้แล้ว ทำการสังเกตลักษณะของสารที่เตรียมได้ โดยสังเกตลักษณะภายนอก เช่น สีของทั้งนิโอสิมเปล่า และนิโอสิมที่กักเก็บสารสกัด

### 5.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาวัดความเป็นกรด - ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter บันทึกและเปรียบเทียบผลการทดลอง

### 5.3 รูปร่างอนุภาค

หยดนิโอสิมที่เตรียมได้บนแผ่นทองแดงที่ฉาบด้วยคาร์บอน (carbon coated copper grid) ปล่อยให้ให้นิโอสิมยึดติดกับผิวเป็นเวลา 1 - 2 นาที ซับส่วนที่เกินออกมาด้วยกระดาษกรอง พักทิ้งไว้ให้ตัวอย่างแห้งในตู้ดูดความชื้นก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

### 5.4 การวัดขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ซีต้า

นำตัวอย่างที่เตรียมได้ 0.1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำ 1.9 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้เติมลงเข้าไปใน Disposable folded capillary cell สำหรับเครื่อง zeta sizer การวัดทุกครั้งทำที่อุณหภูมิ  $25 \pm 0.5$  องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 3 ครั้ง

## 6. การกักเก็บไลโคปีน

### 6.1 การเตรียมตัวอย่างนิโอโซมเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีน

นำตัวอย่างมาสกัดสารก่อนนำไปวิเคราะห์ตามวิธีของ Tan และคณะ<sup>(38)</sup> โดยนิโอโซมที่มีสารสกัด แบ่งตัวอย่างที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม เมื่อผสมเสร็จแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็วรอบ 125,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดส่วนใส (supernatant) ออกด้วย Pasteur pipette และเก็บลงในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นเติมน้ำ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเดิม ผสมด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) 1 นาที เพื่อเป็นการกระจายตะกอน (re-suspension)

### 6.2 การหาปริมาณปริมาณไลโคปีนทั้งหมดในตำรับ

นำตำรับนิโอโซมที่เขย่าให้กระจายตัวเข้ากันดี ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำผสม acetonitrile: dichloromethane (75:25 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นาน 3 นาที กรองผ่าน PTFE syringe filter แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อหาปริมาณไลโคปีนทั้งหมดในตำรับ

### 6.3 การหาปริมาณไลโคปีนที่กักเก็บในนิโอโซม

ตะกอนในข้อ 6.1 ที่กระจายในน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำผสม acetonitrile: dichloromethane (75:25 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นาน 3 นาที กรองผ่าน PTFE syringe filter แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อหาปริมาณไลโคปีนทั้งหมดในตำรับ

ความสามารถในการกักเก็บไลโคปีน (encapsulation efficiency, %EE) สามารถหาได้จากสมการ

$$\%EE = \frac{\text{ปริมาณไลโคปีนที่วิเคราะห์จากส่วนตะกอน}}{\text{ปริมาณไลโคปีนทั้งหมดในตำรับ}} \times 100$$

## 7. การศึกษาความคงสภาพแบบเร่งและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

### 7.1 การทดสอบความคงสภาพแบบเร่งในสารสกัด นิโอโซมเปลา และนิโอโซมกักเก็บสารสกัด

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบนี้ ใช้ 3 สภาวะ คือ

- ที่อุณหภูมิ 4 – 8 °C (ในตู้เย็น)
- ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °C)
- ที่อุณหภูมิ  $40 \pm 2$  °C ความชื้น  $75 \pm 2$  % RH

โดยแต่ละสภาวะทำการเก็บไว้ในขวดแก้วกันแสงขนาด 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน เก็บผลที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

สารสกัดพักข้าวปริมาณ 5.0 มิลลิกรัม สำหรับนิโอโซมบรรจุสารสกัด ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นสารสกัดในการเตรียมเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บรรจุในขวดกันแสงขวดละ 3 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างช่วงเวลาละ 1 ขวด

### 7.2 การศึกษาคุณลักษณะของสารสกัดและนิโอโซม

เมื่อครบกำหนดช่วงเวลาในการเก็บผล ทำการสังเกตลักษณะภายนอก สี และความขุ่น วัดขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ซีต้า ปริมาณไลโคปีนหรือร้อยละการกักเก็บไลโคปีน ขั้นตอนเช่นเดียวกับการศึกษาคุณลักษณะของสารสกัดหรือนิโอโซมหลังการเตรียม

### 7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณที่เหลืออยู่ของไลโคปีนในส่วนตะกอน

เมื่อเก็บตัวอย่างของสารสกัด และนิโอโซมบรรจุสารสกัด ในแต่ละช่วงเวลา แล้ว นำสารสกัดทำการกรองผ่าน nylon membrane filter ( $0.45\mu\text{m}$ ) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC สำหรับนิโอโซมบรรจุสารสกัดนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เช่นเดียวกันกับการหาปริมาณการกักเก็บไลโคปีนในข้อ 6.3



## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. คุณลักษณะของสารสกัดพริกขี้หนู

ผงของเปลือก เนื้อ และรกของพริกขี้หนูที่ได้จะมีสีที่แตกต่างกัน ดังภาพประกอบ 12A โดยสีของรก (aril) จะมีสีแดงเข้มมากกว่าส่วนเนื้อ (pulp) และ เปลือก (peel) หลังจากนั้นนำส่วนต่าง ๆ ของพริกขี้หนูไปสกัด ลักษณะของสารสกัดที่ได้ของทุกส่วนมีลักษณะคล้ายกัน คือ ลักษณะเป็นของเหลวสีส้ม ไม่ละลายน้ำ ดังภาพประกอบ 12



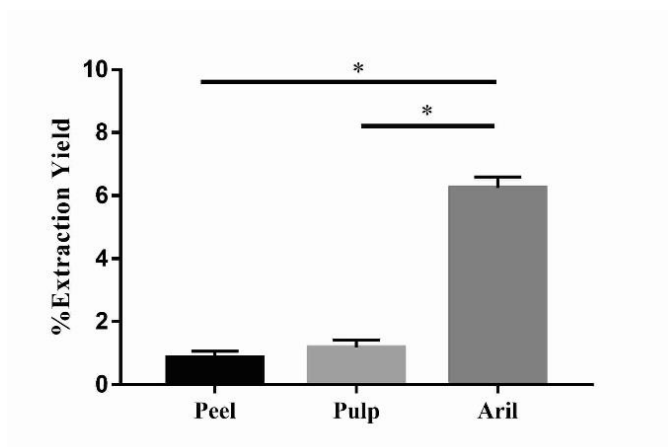
ผงของเปลือก เนื้อ และรกของพริกขี้หนู



สารสกัดพริกขี้หนู

ภาพประกอบ 12 ลักษณะของผงของส่วนต่าง ๆ ของพริกขี้หนูและสารสกัดพริกขี้หนู





ภาพประกอบ 13 ร้อยละน้ำหนักสารสกัด (%yield) จากส่วนต่าง ๆ ของฟักข้าว

จากการสกัดด้วยวิธีการของ Barba และคณะ<sup>(32)</sup> พบว่าร้อยละน้ำหนักของสารสกัด (%yield) เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงจากส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าว พบว่าสารสกัดจากรกมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ เนื้อและ เปลือก ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพประกอบ 13 รกมีปริมาณของสารสกัดมากที่สุด หากพิจารณาจากปริมาณสารสกัด รกจึงเป็นส่วนที่น่าสนใจในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบ

ตาราง 6 ผลการสกัดผงจากส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าว

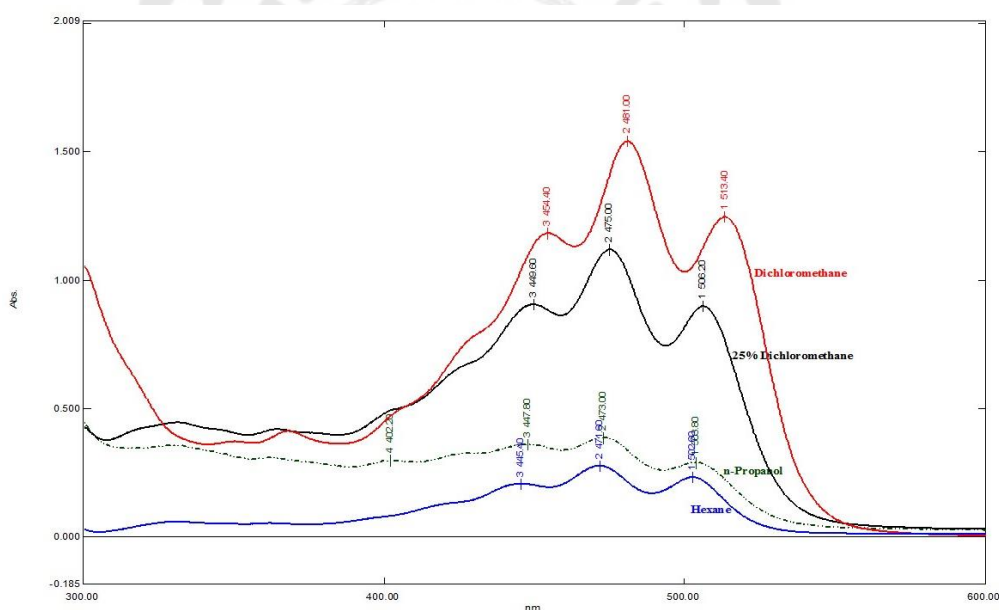
ผงจากส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าว	น้ำหนักผงเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)	% yield
เปลือก (peel)	2.01 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.87 ± 1.05 <sup>c</sup>
เนื้อ (pulp)	2.05 ± 0.01	0.02 ± 0.00	1.18 ± 0.19 <sup>b</sup>
รก (aril)	2.03 ± 0.01	0.13 ± 0.01	6.24 ± 0.29 <sup>a</sup>

\* ค่าที่แสดงเป็น mean ± SD (n=3) ตัวอักษรด้วยกใช้สำหรับเปรียบเทียบ %yield ที่แตกต่างกันของผงจากส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าว ตัวอักษรยกที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$

## 2. ปริมาณไลโคปีนในสารสกัดผักขำ

### 2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไลโคปีน

ไลโคปีนเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ประกอบไปด้วยการเรียงสลับระหว่างพันธะคู่กับพันธะเดี่ยว (conjugated double bond) จำนวน 11 ตำแหน่ง โดยลักษณะการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์จะแสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น ( $\lambda_{max}$ ) ที่แตกต่างกันชัดเจน 3 ตำแหน่ง ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคอนจูเกตในโครงสร้าง และชนิดของตัวทำละลาย ในการวิเคราะห์สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์มักจะใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เตรียม สารละลายมาตรฐานไลโคปีนในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ hexane, propanol และ dichloromethane นำมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 600 ถึง 300 นาโนเมตร พบว่าสเปกตรัมของสารมาตรฐานไลโคปีนใน hexane มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 445, 471 และ 502 นาโนเมตร ดังภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 สเปกตรัมของสารมาตรฐานไลโคปีนในตัวทำละลายต่าง ๆ

(เส้นสีน้ำเงิน: hexane, เส้นสีเขียว: n-propanol,

เส้นสีดำ: dichloromethane/acetonitrile (75:25 v/v) ละเส้นสีแดง: dichloromethane)

เมื่อทำการเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น n-propanol, dichloromethane และ acetonitrile: dichloromethane (75:25 v/v) พบว่าเกิดบาโทโครมิกชิฟต์ (bathochromic shift) หรือเรดชิฟต์ (red shift) ดังภาพประกอบ 14 และตารางที่ 7 ซึ่งสเปกตรัมที่มีความยาวคลื่นเปลี่ยนไปมากที่สุด คือ ตัวทำละลาย dichloromethane การเกิด bathochromic shift นี้สอดคล้องกับในรายงานที่เคยมีผู้ศึกษาก่อนหน้านี้<sup>(39)</sup> ซึ่งเป็นผลมาจาก polarizability ของสารละลาย เมื่อตัวทำละลายมีค่า polarizability มากขึ้นทำให้เกิด bathochromic shift ไปในทิศทางที่ทำให้ความยาวคลื่นเพิ่มมากขึ้น

ตาราง 7 ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุดของสารมาตรฐานไลโคปีนในตัวทำละลายต่าง ๆ

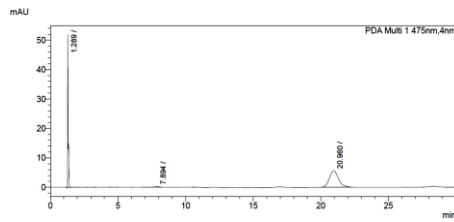
ตัวทำละลาย	ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุด ( $\lambda$ )		
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$
Hexane	445.4	471.8	502.6
n-Propanol	447.8	473.0	503.8
Dichloromethane	454.4	481.0	513.4
Acetonitrile:			
Dichloromethane (75:25 v/v)	449.6	475.0	506.2

## 2.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

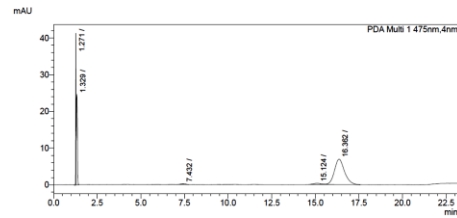
### 2.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสาร

ในการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนด้วยเครื่อง HPLC จำเป็นต้องเลือกเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสม เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถพาสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์เพื่อให้เกิดการแยกได้ สำหรับไลโคปีนเป็นสารที่มีขั้วน้อย ดังนั้นชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่นำมาศึกษา คือ เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ methanol, acetonitrile และ dichloromethane ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งสารแต่ละชนิดมีความมีขั้ว (Polarity index) ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ คือ acetonitrile (5.8), methanol (5.1) และ dichloromethane (3.8) ซึ่งในการทดลองนี้ เฟสเคลื่อนที่ชนิด (C) และ (D) ได้ใช้เฟสเคลื่อนที่เช่นเดียวกับงานของ Xu และคณะ<sup>(40)</sup>

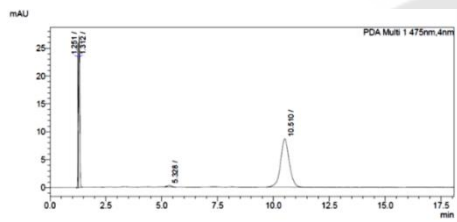
เฟสเคลื่อนที่ (A) สามารถชะสารมาตรฐานไลโคปีนออกมาที่เวลา 20.9 นาที (ภาพประกอบ 15A) เมื่อเพิ่มปริมาณ acetonitrile จาก 10% เป็น 60% ในเฟสเคลื่อนที่ (B) ทำให้ไลโคปีนสามารถถูกชะออกมาได้เร็วขึ้นที่เวลา 16.3 นาที (ภาพประกอบ 15B) เมื่อเพิ่มตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ dichloromethane ลงไปในเฟสเคลื่อนที่ (C) พบว่า สามารถชะไลโคปีนออกมาได้เร็วขึ้นที่เวลา 10.5 นาที (ภาพประกอบ 15C) และเมื่อเพิ่มปริมาณ dichloromethane จาก 7% เป็น 25% ในเฟสเคลื่อนที่ (D) ทำให้สามารถชะไลโคปีนออกมาได้เร็วที่สุดที่เวลา 4.1 นาที (ภาพประกอบ 15D)



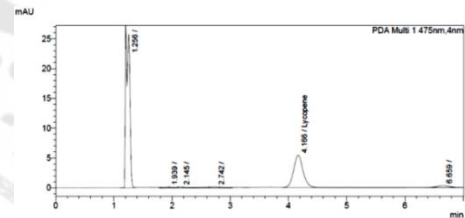
(A) acetonitrile: methanol  
(10:90, v/v)



(B) acetonitrile: methanol  
(60:40, v/v)



(C) acetonitrile: methanol :  
dichloromethane (71:22:7 v/v)<sup>(40)</sup>



(D) acetonitrile: dichloromethane  
(75:25, v/v)<sup>(40)</sup>

ภาพประกอบ 15 โคโรมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานไลโคปีนใน dichloromethane  
ในระบบที่เฟสเคลื่อนที่ต่างกันโดยเฟสเคลื่อนที่

แนวทางในการเลือกความเหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่สำหรับการแยกสารพารามิเตอร์ที่ใช้ในการพิจารณาตามเกณฑ์การยอมรับของ Center for Drug Evaluation and Research (CDER) <sup>(41)</sup> ได้แก่การพิจารณาค่า Retention time, Tailing factor  $\leq 2$ , Theoretical plate (N)  $> 2000$ , Column capacity  $> 2$  และเวลาในการวิเคราะห์ที่น้อย

จากค่าที่สรุปไว้ในตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ (A) และ (B) ที่มีเฉพาะ acetonitrile และ methanol สามารถชะไลโคป็นออกมาที่เวลา 20.9 และ 16.3 นาทีตามลำดับ แต่เมื่อมีการเพิ่ม dichloromethane ตามงานของ Xu และคณะ <sup>(40)</sup> ส่งผลให้ไลโคป็นถูกชะออกมาได้เร็วกว่า สำหรับเวลาที่ไลโคป็นถูกชะออกมา สอดคล้องกับงานก่อนหน้าที่สามารถชะออกมาได้ในเวลา 3.9 นาที ซึ่งแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยกับในการศึกษาครั้งนี้ที่สามารถชะออกมาได้ในเวลา 4.1 นาที สำหรับพารามิเตอร์อื่น เช่น Column capacity และ Theoretical plate ให้ค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณ dichloromethane ซึ่งแปรผกผันกับเวลาที่ใช้ในการชะไลโคป็น

ตาราง 8 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ไลโคป็นโดยใช้ระบบที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างกัน

Mobile phase	Parameter			
	RT (นาที)	k'	N	Tailing Factor
A	20.96	15.259	4890	1.192
B	16.362	11.871	3983	1.173
C	10.545	7.399	3691	1.007
D	4.166	2.316	3100	1.114

\* RT = retention time, k' = Column capacity, และ N = Theoretical plate

ดังนั้นเฟสเคลื่อนที่ D [acetonitrile : dichloromethane, 75:25 (v/v) ] ที่สามารถชะไลโคป็นออกมาได้โดยใช้เวลาน้อยกว่าการใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดอื่น ๆ จึงเป็นตัวเลือกเลือกที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการฉีดวิเคราะห์ไลโคป็นต่อไป และเมื่อทำการฉีดสารละลายมาตรฐานไลโคป็น (30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซ้ำ 6 ครั้ง ผลดังตารางที่ 9 พบว่าพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในข้อกำหนดที่ยอมรับได้ของ CDER จึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่นี้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

ตาราง 9 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไลโคป็นใน dichloromethane ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น acetonitrile: dichloromethane (75:25, v/v) ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง

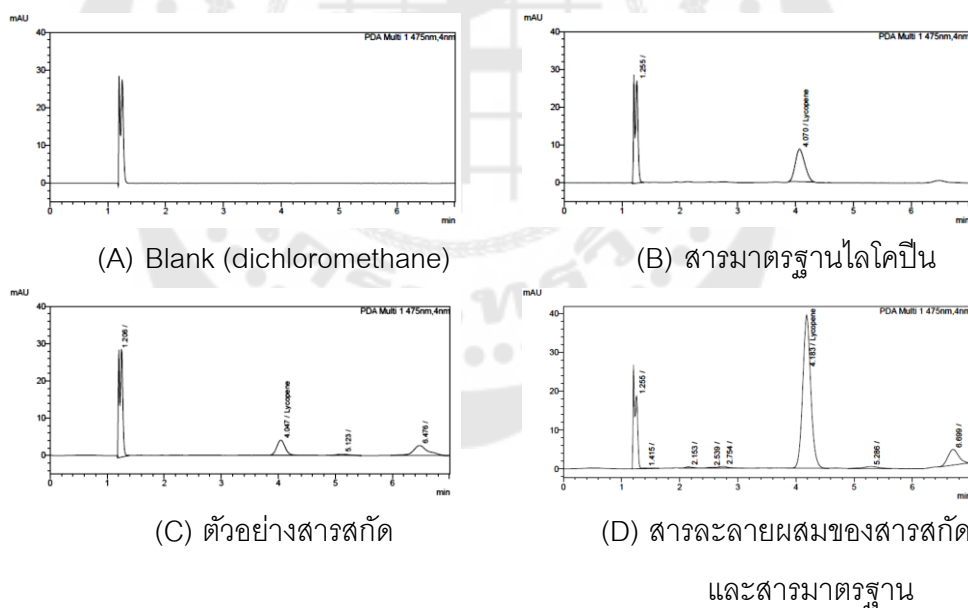
หัวข้อทดสอบ	เกณฑ์การยอมรับ (CDER 1994)	สารมาตรฐานไลโคป็น
Tailing Factor (R)	$\leq 2$	1.18 ± 0.01
Number of theoretical plates (N)	> 2000	2,208 ± 30.80
Capacity factor (k')	> 2	2.18 ± 0.01
Retention time	-	4.83 0.01

### 2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เมื่อกระบวนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แล้วเสร็จ ก่อนนำวิธีวิเคราะห์ไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง จำเป็นต้องผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง แม่นยำ เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนานั้นให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เหมาะสม สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ได้ ซึ่งกระบวนการยืนยันความใช้ได้ของวิธีนั้นใช้ตาม Association of Official Analytical Chemists (AOAC2012) guideline <sup>(42)</sup> ซึ่งควรให้มีการทดสอบในพารามิเตอร์ที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

#### 2.3.1 ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรมในภาพประกอบ 16 พบว่าค่า retention time ของสารมาตรฐานไลโคปีน มีค่าประมาณ 4.1 นาที โดยไม่ถูกรบกวนจากพีคใด ๆ ในตัวทำละลาย (Blank) เมื่อทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดพบพีคที่เวลาเดียวกันกับสารมาตรฐานไลโคปีน และเมื่อผสมสารสกัดและสารมาตรฐานเข้าด้วยกัน พบพีคของไลโคปีนของสารสกัดและสารมาตรฐานที่เวลาเดียวกันดังภาพประกอบ 16D

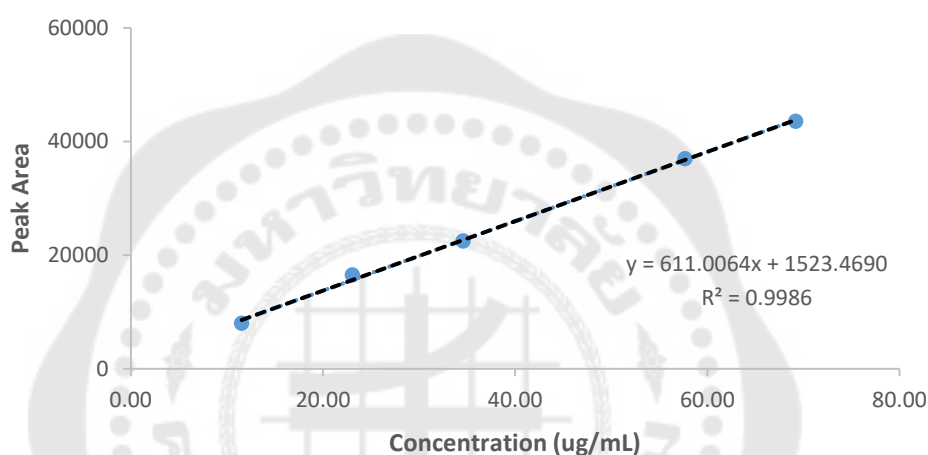


ภาพประกอบ 16 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไลโคปีนเปรียบเทียบกับสารสกัดผักขำ



### 2.3.2 ความเป็นเส้นตรงและช่วง (Linearity and range)

ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ external standard โดยความเป็นเส้นตรงจะแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง Peak area กับความเข้มข้นของไลโคปีน ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงโดยค่าถดถอยเชิงเส้น ( $R^2$ ) และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงตามสมการ  $Y = mX + c$  ที่หาได้จากกราฟมาตรฐาน



ภาพประกอบ 17 กราฟมาตรฐานของสารละลายไลโคปีนในไดคลอโรมีเทนที่ช่วงความเข้มข้น 11.54 – 69.22  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=3$ )

ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 11.54 – 69.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีสมการเชิงเส้น คือ  $y = 611.0064x + 1,523.4690$  และมีค่าถดถอยเชิงเส้น ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9986 คิดเป็น  $R = 0.9993$  ซึ่งผ่านตามเกณฑ์ AOAC2012 ที่กำหนดว่าค่า  $R$  ต้องมีค่ามากกว่า 0.990 ดังแสดงได้ในภาพประกอบ 17 และจากตารางที่ 10

ตาราง 10 ผลการศึกษากราฟมาตรฐานไลโคปีนเป็นเวลา 3 วัน ( $n = 3$ )

Day	Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Linearity	$R^2$
1	11.54 – 69.22	$y = 611.0064x + 1523.4690$	0.9986
2	13.17– 79.00	$y = 1012.3150x - 3502.6473$	0.9930
3	11.86 – 71.14	$y = 1725.1663x - 12344.1105$	0.9956

### 2.3.3 ความถูกต้องและความแม่นยำ (Accuracy and Precision)

สามารถหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ของไลโคปีน จากสมการเส้นตรง  $y = 611.0064x + 1,523.4690$  ที่ความเข้มข้น 17.5, 28.5 และ 45.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า %recovery ของแต่ละความเข้มข้นในช่วง 85.30 – 107.14 %, 96.55 – 112.52 % และ 93.73 – 112.12 % ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 11 ซึ่งผลที่ได้ผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC 2012 โดยเกณฑ์กำหนดว่าค่า %Recovery ต้องอยู่ในช่วง 85 – 115%

ตาราง 11 ค่าความถูกต้องและแม่นยำของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไลโคปีน เวลา 3 วัน

Day	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	%Recovery	%RSD
1	17.31	85.30 $\pm$ 1.79	2.10
	28.84	101.55 $\pm$ 2.73	2.69
	46.15	111.51 $\pm$ 2.20	1.97
2	19.75	91.75 $\pm$ 0.81	0.88
	32.92	96.55 $\pm$ 0.60	0.62
	52.67	93.73 $\pm$ 1.41	1.50
3	17.78	107.14 $\pm$ 1.26	1.18
	29.64	112.52 $\pm$ 0.38	0.33
	47.42	112.12 $\pm$ 0.08	0.07

\*แต่ละความเข้มข้นทดลองจำนวนครั้ง  $n = 3$

ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารมาตรฐานไลโคปีนพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (relative standard deviation, RSD) พบว่า %RSD ของสารมาตรฐานไลโคปีนสำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intraday precision) เป็นจำนวน 3 ซ้ำ และผลการวิเคราะห์ระหว่างวัน (Between day precision) มีค่า %RSD ของแต่ละความเข้มข้นในช่วง 0.88 – 2.10 %, 0.33 – 2.69 และ 0.07 – 1.97 % ตามลำดับ ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC2012 (กำหนด %RSD ต้องไม่เกิน 6 และ 11% สำหรับ Intraday precision และ Intermediate precision ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 11

### 2.3.3 ความถูกต้องและความแม่นยำ (Accuracy and Precision)

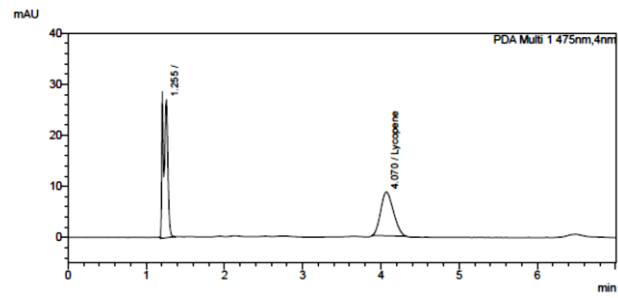
การหาค่า LOD และ LOQ ของไลโคปีนได้จากการคำนวณจากสมการเส้นตรง โดยใช้ค่าเฉลี่ยความชันของกราฟมาตรฐาน (slope of calibration curve) (S) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ค่า S และ SD ของสารมาตรฐานไลโคปีน เท่ากับ 1,110.13 และ 5,560.75 ตามลำดับ ทำให้ได้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 14.06 และ 42.61 และ  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ

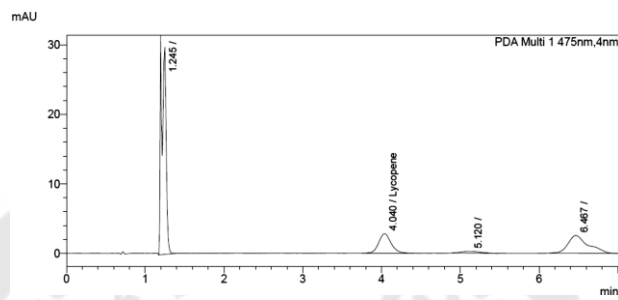
สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจง มีความเป็นเส้นตรงและใช้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม และมีความถูกต้องและแม่นยำต่อการวิเคราะห์ที่ไลโคปีน

## 2.4 ปริมาณไลโคปีนในสารสกัด

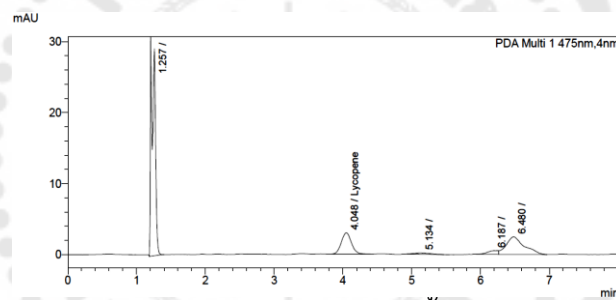
สารสกัดจากผลพริกขี้หนู 3 ส่วน คือ เปลือก เนื้อ และรกหุ้ม เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ HPLC ผลดังภาพประกอบ 18 พบว่าสารสกัดจากทั้งสามส่วนของผลพริกขี้หนูมีไลโคปีนเป็นส่วนประกอบในสารสกัด สังเกตได้จากมีพีคปรากฏที่เวลาใกล้เคียง 4.1 นาทีของพีคของไลโคปีน ในภาพประกอบ 18(A) อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นพีคที่มีความสูงใกล้เคียงกับไลโคปีนที่เวลา 6.5 นาที ในภาพประกอบ 18(C-E) คาดว่าน่าจะเป็นเบตาแคโรทีน ซึ่งมีการแสดงรายงานของ Xu และคณะ<sup>(40)</sup> เมื่อทำการฉีดสารมาตรฐานเบตาแคโรทีนวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สภาวะเดียวกันกับการวิเคราะห์สารสกัด พบว่าในสภาวะการวิเคราะห์นี้ไลโคปีนยังปรากฏพีคที่เวลาเดิม และเบตาแคโรทีนปรากฏพีคที่เวลา 6.5 นาที ซึ่งสารสกัดทั้งสามส่วนมีพีคที่เวลานี้ปรากฏเช่นกัน ดังนั้นสารสกัดเหล่านี้นอกจากจะมีสารไลโคปีนแล้วยังพบเบตาแคโรทีนเป็นส่วนประกอบด้วย อย่างไรก็ตาม สังเกตพีคที่เวลา 6.5 นาทีของสารสกัดไม่มีความสมมาตร อาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์เบตาแคโรทีน หรืออาจมีสารอื่นที่รวมอยู่กับเบตาแคโรทีนซึ่งต้องใช้สภาวะอื่นในการแยกพีค สารนี้อาจเป็นแคโรทีนอื่นๆ ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับเบตาแคโรทีนมาก



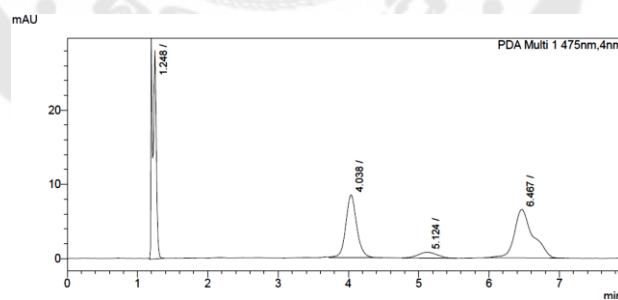
(A) สารมาตรฐานไลโคปีน



(B) สารสกัดจากเปลือก



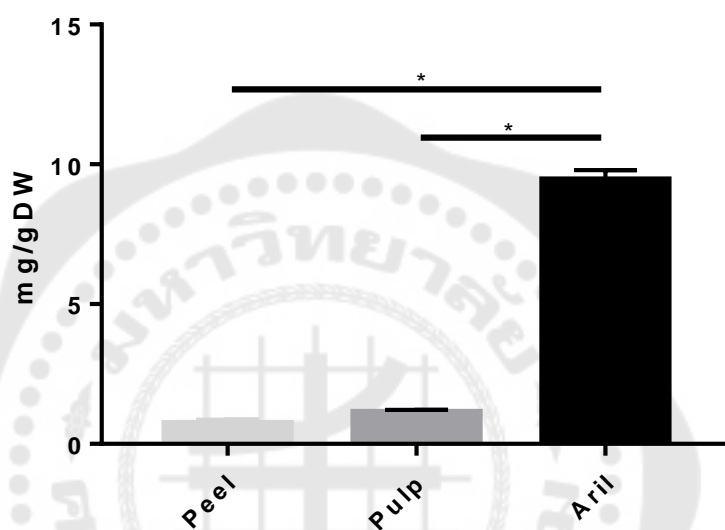
(C) สารสกัดจากเนื้อ



(D) สารสกัดจากรก

ภาพประกอบ 18 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไลโคปีนเปรียบเทียบกับสารสกัดจาก  
ส่วนต่าง ๆ ของผลฟักข้าว

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารไลโคปีนในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผล พักข้าว ดังแสดงในภาพประกอบ 19 พบว่ามีปริมาณสารไลโคปีนเฉลี่ย  $0.74 \pm 0.07$  ,  $1.15 \pm 0.06$  และ  $9.45 \pm 0.27$  มิลลิกรัมต่อกรัมของผงแห้งจากเปลือก เนื้อและรอกหุ้มเมล็ด ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดที่ได้จากรอกหุ้มเมล็ดมีปริมาณไลโคปีนที่มากกว่าในเปลือกและเนื้ออย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



ภาพประกอบ 19 ปริมาณไลโคปีนในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลพักข้าว

ในการศึกษาปริมาณไลโคปีนในผลผักขาวในงานวิจัยนี้ มีความสอดคล้องกับ รายงานที่ได้เคยมีการศึกษาก่อนหน้าโดย Kubola & Siriamornpun ที่ตรวจพบไลโคปีน 7.02 มิลลิกรัมต่อกรัมรอกหุ้มเมล็ดแห้ง ดังตารางที่ 12 แต่ปริมาณไลโคปีนที่พบมากกว่าของอีกหลาย งาน เป็นผลมาจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น วิธีการสกัด วิธีการวิเคราะห์ ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ในการ วิเคราะห์ HPLC รวมถึงลักษณะของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งบางงานวิจัยใช้ตัวอย่างที่แช่ แข็ง หรือใช้ตัวอย่างสด ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำแห้งหรือไล่น้ำ เป็นต้น งานวิจัยนี้ใช้วิธีสกัดคล้าย กับวิธีของ Kubola & Siriamornpun ทั้งชนิดและสัดส่วนของตัวทำละลาย แต่ในงานวิจัยครั้งนี้ ตรวจพบว่ามีปริมาณไลโคปีนสูงกว่าเนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดที่เป็นผงและผ่านการทำแห้ง มาแล้ว แต่ตามวิธีของ Kubola & Siriamornpun นั้นใช้ตัวอย่างสด

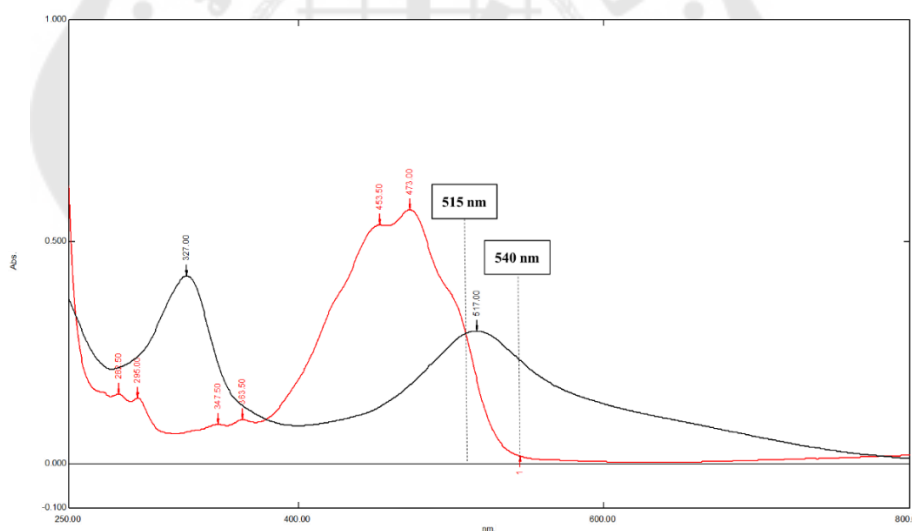
ตาราง 12 เปรียบเทียบปริมาณไลโคปีนจากสารสกัดรอกของผักขาวในงานวิจัยที่เคยมีผู้ศึกษาก่อน หน้า

Reference	ปริมาณไลโคปีน
Vuong et al. <sup>(8)</sup>	0.408 µg/g น้ำหนักสด
Aoki et al. <sup>(10)</sup>	0.380 µg/g น้ำหนักสด
Ishida et al. <sup>(6)</sup>	1.903 ( <i>trans</i> ) µg/g น้ำหนักสด
	0.128 ( <i>cis</i> ) µg/g น้ำหนักสด
Kubola & Siriamornpun <sup>(7)</sup>	7.02 mg/g น้ำหนักแห้ง

### 3. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

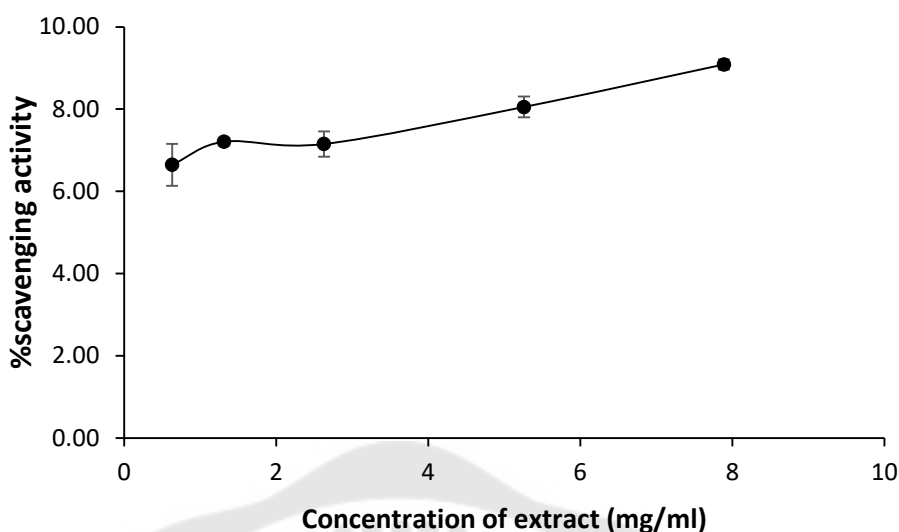
เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ในช่วงความยาวคลื่น 800 ถึง 300 โดยใช้เอทานอลเป็น blank พบว่าอนุมูลอิสระ DPPH ที่ละลายในเอทานอลมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ละลายใน dichloromethane พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 453 และ 473 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพประกอบ 20 ซึ่งที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ความยาวคลื่นดังกล่าว ค่าการดูดกลืนแสงจะไปรบกวนการวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเกิดปฏิกิริยากันของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดและอนุมูลอิสระ DPPH ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนความยาวคลื่นในการวัดจาก 515 นาโนเมตร เป็น 540 นาโนเมตร เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Liu และคณะในปี 2008 <sup>(43)</sup>



ภาพประกอบ 20 สเปกตรัมของอนุมูลอิสระ DPPH ในเอทานอล  
และสารละลายสารสกัดฟ้าทะลายโจร

(เส้นสีดำ: สเปกตรัมของอนุมูลอิสระ DPPH ในเอทานอล

และเส้นสีแดง: สเปกตรัมของสารละลายสารสกัดฟ้าทะลายโจรใน dichloromethane)

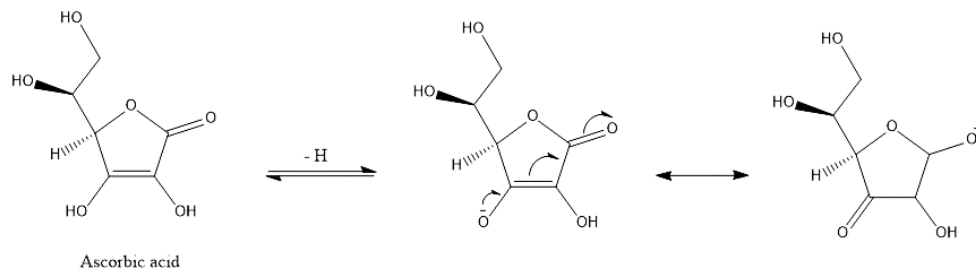


ภาพประกอบ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH<sup>•</sup> scavenging activity) (n=3)

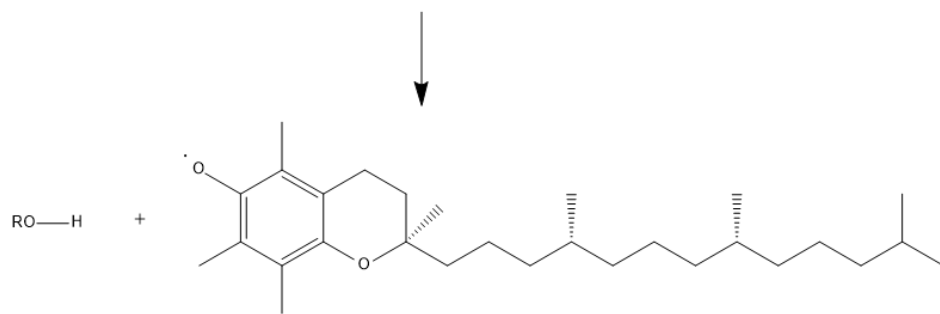
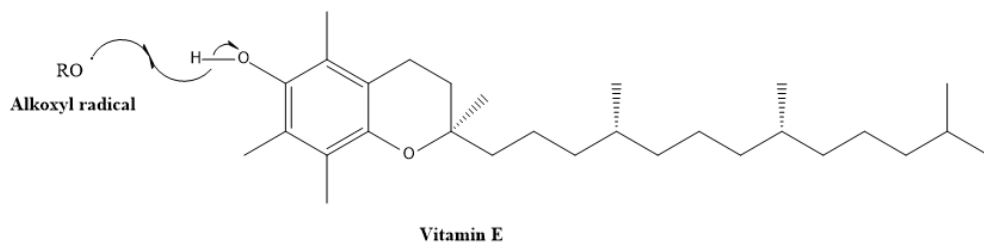
หลังจากทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาระหว่างสารอนุมูลอิสระ DPPH กับสารสกัดจากผลพริกขี้หนูแล้วนำไปคำนวณหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH<sup>•</sup> scavenging activity) ได้ผลดังภาพประกอบ 21 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกันระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับ %scavenging activity ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ 7.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %scavenging activity เท่ากับ 9.08 %

จากการศึกษาพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ให้ผลเช่นเดียวกับในงานวิจัยของ Liu และคณะในปี 2008<sup>(43)</sup> เมื่อทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH<sup>•</sup> scavenging activity) ของไลโคปีนพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชิงปริมาณกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH<sup>•</sup> scavenging activity) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Tsuchiya และคณะในปี 1992<sup>(44)</sup> พบว่าแคโรทีนอยด์ไม่มีส่วนใดภายในโครงสร้างที่แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการให้โปรตอน (H-donating) ซึ่งแตกต่างกับในวิตามิน C และวิตามิน E ซึ่งสามารถแตกตัว ให้โปรตอนกับอนุมูลอิสระได้ดังแสดงในภาพประกอบ 22





(A) วิตามินซี



(B) วิตามินอี

ภาพประกอบ 22 กระบวนการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีและวิตามินอี

### 3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

สารสกัดจากผลพริกขี้หนูตรวจสอบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า มีสารในในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้โดยเฉพาะไลโคปีนให้ผลที่มีประสิทธิภาพกับการทดสอบกับโดย FRAP ทั้งนี้เนื่องมาจากอิทธิพลของจำนวนของพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยว (conjugated double bond) สำหรับไลโคปีนจำนวนถึง 11 พันธะ ซึ่งการซ้อนทับของออร์บิทัล (orbital overlapping) ในโครงสร้างที่เป็นโครโมฟอร์ (chromophore) นั้นเพียงพอที่จะสร้างอนุมูลอิสระแคโรทีนอยด์ที่เสถียร (stable carotenoid radical) <sup>(45)</sup> หลังทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ และสามารถตรวจสอบได้โดยปฏิกิริยา FRAP นอกจากนี้ไลโคปีนแล้วในสารสกัดยังพบเบตาแคโรทีนซึ่งเบตาแคโรทีนเองมีโครงสร้างที่มีพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยว (conjugated double bond) 11 พันธะเช่นกัน นอกจากนี้ในโครงสร้างของเบตาแคโรทีนนั้นมีวงเบตาไอโอโนน ( $\beta$ -ionone ring) ทั้งสองฝั่งของโครงสร้างซึ่งวงเบตาไอโอโนน ( $\beta$ -ionone ring) จะไปขัดขวางการทำปฏิกิริยากับ ferric *d*-TPTZ <sup>(46)</sup>

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ซึ่งอาศัยการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระให้กับสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$  ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  ที่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4$ )

จากการทดสอบกับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลพริกขี้หนูดำตารางที่ 13 สารสกัดจากรกของพริกขี้หนูให้ค่า FRAP มากที่สุดเท่ากับ 3,997.55  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$  น้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าที่สารสกัดที่ได้จากเปลือกและเนื้อผลที่ให้ค่า FRAP 359.96 และ 471.31  $\mu\text{mol/g}$  น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งค่า FRAP ที่ได้จากรกของผลพริกขี้หนูที่แก่จัดให้ค่ามากที่สุดเช่นเดียวกับงานของ Kubola & Siriamornpun <sup>(7)</sup> แต่ค่า FRAP ของผู้วิจัยก่อนหน้าให้ค่าน้อยกว่า อาจเป็นผลจากการใช้ตัวอย่างที่ไม่เหมือนกัน โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างแห้ง ซึ่งถ้าใช้น้ำหนักเท่ากันจะทำให้ได้ปริมาณสารสกัดที่มากกว่า ทำให้เกิดความแตกต่างของค่าที่ได้

ตาราง 13 ค่า FRAP ที่ได้จากรกแต่ละส่วนของผลพริกขี้หนู (n=3)

ส่วนที่ใช้สกัดของผลพริกขี้หนู	ค่า FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ น้ำหนักแห้ง)
เปลือก	359.96 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>
เนื้อผล	471.31 $\pm$ 8.94 <sup>b</sup>
รกหุ้มเมล็ด	3,997.55 $\pm$ 16.80 <sup>c</sup>

ค่าที่แสดงเป็น mean  $\pm$  SD (n=3) ตัวอักษรด้วยกใช้สำหรับเปรียบเทียบค่า FRAP ที่แตกต่างกันของส่วนที่ใช้สกัดของผลพริกขี้หนูโดย a, b และ c หมายถึงส่วนของเปลือก เนื้อผล และรกหุ้มเมล็ด ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$

#### 4. การเตรียมนิโโซมเปล่าและนิโโซมที่กักเก็บสารสกัดนิโโซม

##### 4.1 ผลของชนิดของสารลดแรงตึงผิว

จากการศึกษาการเตรียมนิโโซมด้วยวิธี thin film hydration โดยการใช้สารลดแรงตึงผิวที่แตกต่างกัน (Tween20, 40 และ 60) ด้วยใช้วิธีของ Palozza และคณะ<sup>(47)</sup> โดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับคอเลสเตอรอลเท่ากับ 1:1 โดยโมล เมื่อตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง พบว่านิโโซมที่ได้กระจายอยู่ในน้ำ สารละลายที่ได้มีลักษณะสีขาวขุ่นโปร่งแสง ดังแสดงในภาพประกอบ 20 เมื่อนำไปทำการวัดขนาด การกระจายตัวของอนุภาค และค่า zeta potential ของแต่ละตำรับได้ผลตามตารางที่ 13 สูตรตำรับที่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น Tween60 มีขนาดเล็กกว่าตำรับที่ใช้ Tween40 และ Tween 20 โดยมีขนาด  $164.87 \pm 0.49$ ,  $284.43 \pm 3.31$  และ  $328.83 \pm 7.76 \mu\text{m}$  ตามลำดับ รวมถึงมีค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ที่น้อยกว่าตำรับที่ใช้ Tween 20 และ Tween 40

จากการศึกษาพบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกับผลการวิจัยของ Palozza และคณะ<sup>(47)</sup> ในการเตรียมนิโโซมเบตาแคโรทีนด้วยวิธี โดยที่ใช้สารลดแรงตึงผิว (Tween 20, 40, 60 และ Span 40, 60, 80) พบว่าการเตรียมนิโโซมโดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่แตกต่างกันสามารถที่จะกักเก็บเบตาแคโรทีนได้ โดยการใช้ Tween60 ให้ค่าร้อยละการกักเก็บเบตาแคโรทีนมากกว่าอีกสองชนิด ดังนั้นในการศึกษาการเตรียมนิโโซมพริกขี้หนูซึ่งมีสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์เช่นเดียวกัน จึงได้ใช้วิธีการเตรียม และชนิดของสารลดแรงตึงผิวเช่นเดียวกันในการทดลองเตรียมนิโโซม



(A) F1

(B) F2

(C) F3

(D) F4

(E) F5

ภาพประกอบ 23 ลักษณะของนิโโซมแต่ละตำรับที่ละลายในน้ำ

เมื่อพิจารณาสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวกับคอเลสเตรอลที่มีอัตราส่วนเป็น 1:1 (F3), 1:2 (F4) และ 2:1 (F5) โดยโมล หลังจากทำการเตรียมตำรับนิโอโซม พบว่านิโอโซมที่ได้กระจายอยู่ในน้ำ ได้สารละลายที่มีลักษณะสีขาวขุ่นโปร่งแสงเช่นเดียวกันทั้งสามตำรับ ดังแสดงในภาพประกอบ 13 หลังจากนำไปวัดขนาด การกระจายตัวของอนุภาค และค่า zeta potential ของแต่ละตำรับได้ผลตามตารางที่ 13

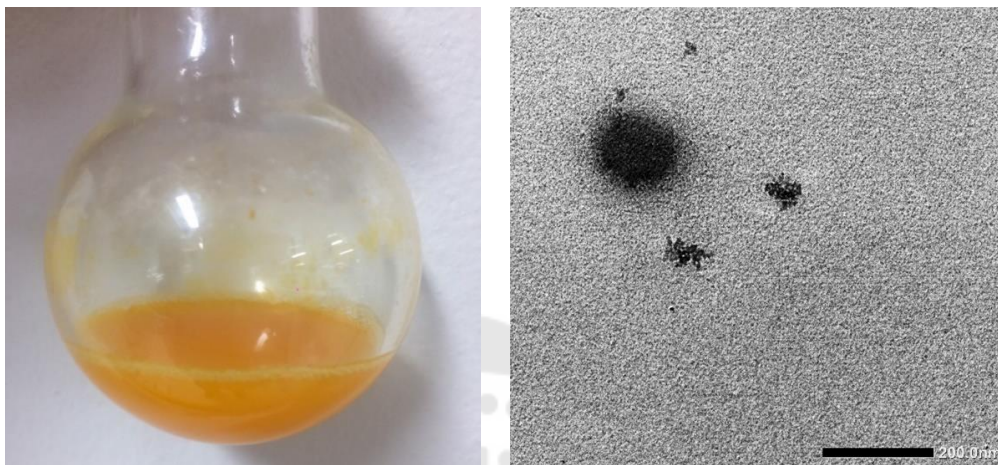
ตาราง 14 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) และค่า Zeta potential ของแต่ละตำรับ (n = 3)

ตำรับ	ขนาดอนุภาค ( $\mu\text{m}$ )	PDI	Zeta potential	pH
F1	$328.83 \pm 7.76$	$0.36 \pm 0.00$	$-35.70 \pm 0.22$	$5.43 \pm 0.02$
F2	$284.43 \pm 3.31$	$0.38 \pm 0.01$	$-34.47 \pm 0.54$	$4.88 \pm 0.02$
F3	$164.87 \pm 0.49$	$0.29 \pm 0.02$	$-30.00 \pm 0.78$	$4.63 \pm 0.04$
F4	$170.33 \pm 2.05$	$0.34 \pm 0.03$	$-29.70 \pm 0.16$	$5.03 \pm 0.06$
F5	$187.60 \pm 2.41$	$0.35 \pm 0.03$	$-31.87 \pm 0.41$	$4.81 \pm 0.03$

จากการเตรียมนิโอโซมทั้ง 5 ตำรับ และทำการวัดขนาด การกระจายตัวของอนุภาค และค่า zeta potential ทำให้พบว่าตำรับ F3 ที่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น Tween60 โดยมีอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับคอเลสเตรอลเท่ากับ 1:1 ให้ขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุด และการกระจายตัว (ค่า PDI) ที่น้อย และค่า zeta potential ไม่อยู่ระหว่างช่วง -30 ถึง 30 ทำให้มีโอกาสตกตะกอนน้อย

ด้วยเหตุผลดังกล่าว ทำให้เลือกใช้ตำรับ F3 โดยใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น Tween60 กับคอเลสเตรอล อัตราส่วน 1:1 ในการผลิตนิโอโซมบรรจุสารสกัดต่อไป

## 4.2 ผลของปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการบรรจุนิโอโซม



(A) นิโอโซมบรรจุสารสกัดผักขำ

(B) ภาพจากกล้อง TEM (20,000 เท่า)

ภาพประกอบ 24 ลักษณะของนิโอโซมที่บรรจุสารสกัดผักขำ  
และสัณฐานของนิโอโซมจากกล้อง TEM

จากการเตรียมตำรับนิโอโซมด้วยการใช้ตำรับที่มีสารลดแรงตึงผิวเป็น Tween60 โดยมีอัตราส่วนกับคอเลสเตอรอลเป็น 1:1 เมื่อนำมาทำการบรรจุสารสกัดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.25, 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่านิโอโซมที่ได้กระจายตัวอยู่ในน้ำ ได้สารละลายที่มีสีส้ม ดังภาพประกอบ 24A เมื่อนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า พบว่านิโอโซมที่บรรจุสารสกัดผักขำที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีรูปร่างค่อนข้างกลม ดังแสดงในภาพประกอบ 24B

ตาราง 15 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (PDI) และค่า Zeta potential ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด

ความเข้มข้น สารสกัด (mg/mL)	ขนาดอนุภาค ( $\mu\text{m}$ )	PDI	Zeta potential (mV)
0.25	122.87 $\pm$ 0.69	0.199 $\pm$ 0.01	-17.03 $\pm$ 0.39
0.50	132.73 $\pm$ 1.18	0.246 $\pm$ 0.01	-38.60 $\pm$ 1.39
1.00	138.17 $\pm$ 1.45	0.214 $\pm$ 0.01	-18.50 $\pm$ 1.50

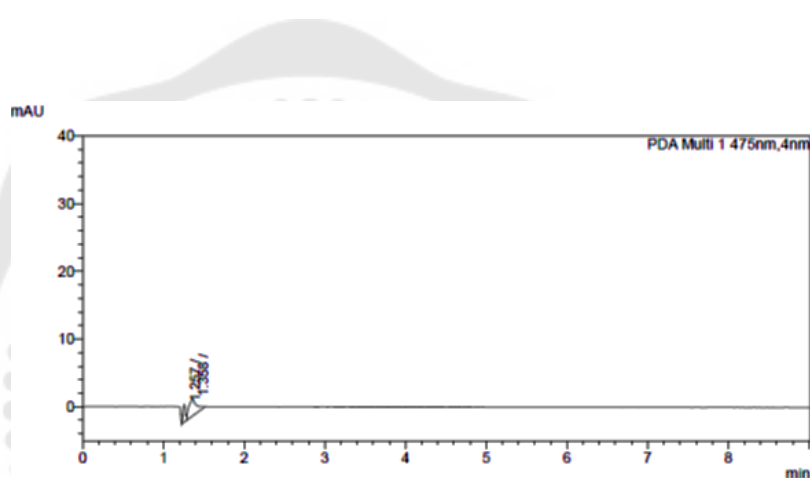
หลังจากนำไปวัดขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และค่า zeta potential แต่ละความเข้มข้นตามตารางที่ 14 พบว่าขนาดอนุภาคมีขนาดเล็กลง (นิโอสิมเปล่า ต่ำรับ 3 ขนาด 164.87  $\pm$  0.49 ไมโครเมตร เมื่อบรรจุสารสกัดขนาด 132.73  $\pm$  1.18 ไมโครเมตร) การกระจายตัวของอนุภาคใกล้เคียงกัน

ค่า zeta-potential ภายหลังจากบรรจุสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.25 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเพิ่มขึ้นจาก -30.00  $\pm$  0.78 มิลลิโวลต์ เป็น -17.03  $\pm$  0.39 และ -18.50  $\pm$  1.50 มิลลิโวลต์ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้นสารสกัด 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า zeta-potential มีค่าลดลงเป็น -38.60  $\pm$  1.39 มิลลิโวลต์

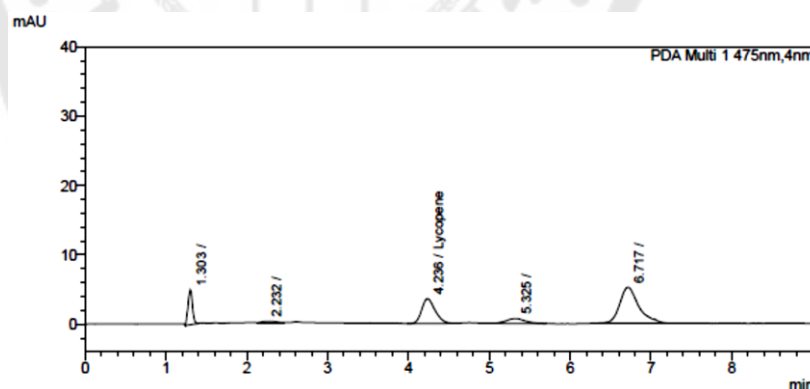
จากตารางที่ 15 เห็นได้ว่าการลดหรือเพิ่มของค่า zeta-potential ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับความเข้มข้น แต่จากค่า zeta-potential ที่ได้พบว่าเมื่อบรรจุสารสกัด ทำให้ค่า zeta-potential มีค่าลดลง แต่ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า zeta-potential อยู่ในช่วง  $\pm$ 30 mV ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคจึงเหมาะสมที่จะใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการบรรจุในนิโอสิม

### 4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไลโคปีนในนิโอโซมและร้อยละของการกักเก็บ

จากการเตรียมนิโอโซมบรรจุสารสกัดผักขำ เมื่อนำทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนแล้วนำส่วนตะกอนมาทำการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนด้วยเทคนิค HPLC พบว่านิโอโซมซึ่งบรรจุสารสกัดผักขำ มีไลโคปีนเป็นส่วนประกอบในสารสกัด สังเกตได้จากปรากฏพีคที่เวลาใกล้เคียง 4.1 นาที ดังแสดงในภาพประกอบ 25B ซึ่งพีคดังกล่าวตรงกับสารมาตรฐานไลโคปีน และไม่พบพีคที่เวลาเดียวกันกับสารมาตรฐานไลโคปีนในนิโอโซมเปล่า



(A) นิโอโซมเปล่า



(B) นิโอโซมบรรจุสารสกัดผักขำ

ภาพประกอบ 25 โครมาโตแกรมนิโอโซมเปล่าและนิโอโซมบรรจุสารสกัดผักขำ



จากตารางที่ 16 แสดงค่าร้อยละการกักเก็บไลโคปีนในไนโอโซมบรรจุสารสกัดผักขาว เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการกักเก็บไลโคปีนมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 64.59 เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัด 0.25 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ร้อยละการกักเก็บ 56.17 และ 41.15 ตามลำดับ)

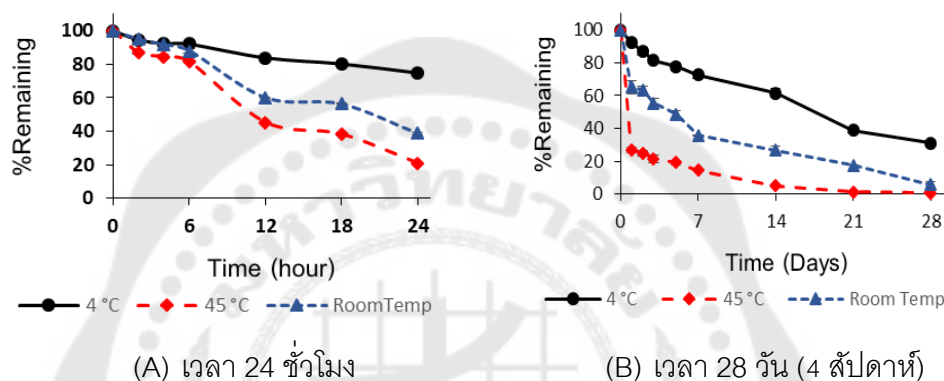
เมื่อนำไปพิจารณาร่วมกับตารางที่ 15 พบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากวัดค่า zeta-potential แล้ว มีไม่อยู่ในช่วง  $\pm 30$  มิลลิโวลต์ แต่ที่ 0.25 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ในช่วง  $\pm 30$  มิลลิโวลต์ ซึ่งค่า zeta-potential เป็นพารามิเตอร์ที่อนุมานถึงประจุที่พื้นผิวของอนุภาค โดยสามารถบอกถึงเสถียรภาพของอนุภาคได้ ค่าที่เหมาะสมคือ มากกว่าหรือเท่ากับ  $\pm 30$  มิลลิโวลต์ เพื่อป้องกันการเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค ซึ่งจากค่าที่ได้จากตารางที่ 15 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ความเข้มข้น 0.25 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อาจทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค และไม่สามารถกักเก็บสารสกัดได้ดีเท่ากับที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 16 ร้อยละการกักเก็บไลโคปีนในไนโอโซมบรรจุสารสกัดจากผลผักขาวที่ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นสารสกัด (mg/mL)	Loading capacity (%)	ร้อยละการกักเก็บ (%)
0.25	1.47	56.17 $\pm$ 2.31
0.50	3.81	64.59 $\pm$ 0.58
1.00	4.93	41.15 $\pm$ 0.59

## 5. การศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง

การศึกษาความคงสภาพแบบเร่งในที่นี้เป็นการศึกษาโดยการเพิ่มอุณหภูมิที่ 45 °C จาก การเก็บที่อุณหภูมิปกติ คือ อุณหภูมิห้อง และไนต์ยูเอ็น (4 – 8 °C) จากการทดสอบความคงสภาพ ทางกายภาพ โดยสังเกตสี พบมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่สภาวะเร่ง คือ สีของสารสกัดและ นิโอโซมมีการจางลง โดยสารสกัดและนิโอโซม เริ่มจางลงหลังจากชั่วโมง 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพประกอบ 26 ปริมาณไลโคปีนที่คงอยู่ในสารสกัด (%remaining) เทียบกับเวลา

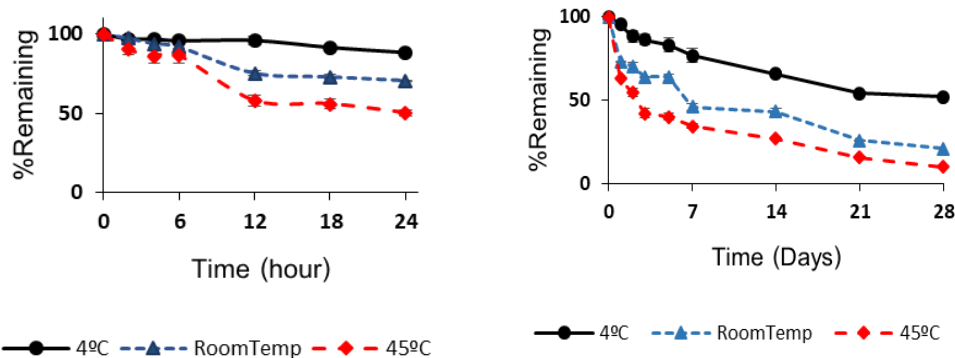
ภาพประกอบ 26(A) แสดงให้เห็นว่าภายใน 24 ชั่วโมง สารสกัดที่เก็บไว้ในตู้เย็น (4 – 8 °C) มีปริมาณไลโคปีนเหลืออยู่  $74.84 \pm 1.39$  % ซึ่งมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่ 45 องศาเซลเซียส โดยที่ ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการสลายตัวมากที่สุด

ภาพประกอบ 26(B) แสดงให้เห็นว่าที่เวลา 28 วัน สารสกัดที่เก็บไว้ในตู้เย็นมี ปริมาณไลโคปีนเหลืออยู่  $22.72 \pm 4.05$  % ซึ่งมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่ 45 องศาเซลเซียส โดยที่ ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการสลายตัวมากที่สุด

ตาราง 17 ปริมาณไลโคปีนที่คงอยู่ในสารสกัดเทียบกับเวลา

เวลา (สัปดาห์)	ปริมาณไลโคปีนที่คงอยู่ในสารสกัด (%remaining)					
	ตู้เย็น (4 – 8 °C)		อุณหภูมิห้อง		อุณหภูมิ 45 °C	
	สารสกัด	นิโอโซมสารสกัด	สารสกัด	นิโอโซมสารสกัด	สารสกัด	นิโอโซมสารสกัด
1	66.56 ± 2.14 <sup>c,d</sup>	76.97 ± 4.05 <sup>a</sup>	35.83 ± 0.24 <sup>a</sup>	46.18 ± 2.09 <sup>c,d</sup>	14.39 ± 0.09 <sup>a</sup>	34.51 ± 1.47 <sup>a</sup>
2	61.39 ± 2.69 <sup>c,d</sup>	65.71 ± 1.20 <sup>a</sup>	26.62 ± 2.37 <sup>a</sup>	43.38 ± 1.62 <sup>c,d</sup>	5.18 ± 0.25 <sup>a</sup>	26.85 ± 0.21 <sup>a</sup>
3	45.08 ± 1.36 <sup>a,b,d</sup>	53.08 ± 1.03 <sup>a</sup>	17.73 ± 0.26 <sup>a</sup>	25.93 ± 0.44 <sup>a,b,d</sup>	1.51 ± 0.01 <sup>a</sup>	15.78 ± 0.17 <sup>a</sup>
4	22.72 ± 4.05 <sup>a,b,c</sup>	52.05 ± 0.88 <sup>a</sup>	5.84 ± 2.42 <sup>a</sup>	21.04 ± 0.14 <sup>a,b,c</sup>	0.68 ± 0.02 <sup>a</sup>	10.04 ± 0.48 <sup>a</sup>

\*ทดสอบจำนวนครั้ง n = 3; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างโดยใช้อักษรตัวยก



(A) เวลา 24 ชั่วโมง

(B) เวลา 28 วัน (4 สัปดาห์)

ภาพประกอบ 27 ปริมาณไลโคปินที่คงอยู่ในนิโอซามเทียบกับเวลา

ภาพประกอบ 27(A) แสดงให้เห็นว่าภายใน 24 ชั่วโมง นิโอซามบรรจุสารสกัดที่เก็บไว้ในตู้เย็น (4 – 8 °C) มีปริมาณไลโคปินเหลืออยู่  $88.38 \pm 0.39$  % ซึ่งมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่ 45 องศาเซลเซียส โดยที่ ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการสลายตัวมากที่สุด

ภาพประกอบ 27(B) แสดงให้เห็นว่าที่เวลา 28 วัน นิโอซามบรรจุสารสกัดที่เก็บไว้ในตู้เย็นมีปริมาณไลโคปินเหลืออยู่  $52.05 \pm 0.89$  % ซึ่งมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่ 45 องศาเซลเซียส โดยที่ ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการสลายตัวมากที่สุด

การเก็บสารสกัดและนิโอซามก็เก็บสารสกัด ควรเก็บไว้ในตู้เย็น (4 – 8 °C) เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเร่งการสลายตัวของไลโคปินได้ พบว่าการกักเก็บสารสกัดไว้ในนิโอซามทำให้มีปริมาณไลโคปินที่เหลืออยู่มากกว่าสารสกัดที่ไม่ได้กักเก็บ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยหลังจาก 28 วัน ไลโคปินที่เหลืออยู่ในนิโอซามกักเก็บสารสกัดเท่ากับ  $52.05 \pm 0.88$  % ในขณะที่ในสารสกัดที่ไม่ได้กักเก็บมีปริมาณไลโคปินเหลืออยู่เท่ากับ  $22.72 \pm 4.05$  % ดังแสดงในตารางที่ 17 ดังนั้นนิโอซามจึงมีความสามารถในการปกป้องไลโคปิน

## สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในครั้งนี้ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สำหรับตรวจสอบปริมาณของไลโคปีนในสารสกัดผักขาวด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน 4 ระบบ พบว่า เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย acetonitrile กับ dichloromethane ในอัตราส่วนร้อยละ 75:25 โดยปริมาตร สามารถชะไลโคปีนออกมาได้เร็วที่สุดที่เวลา 4.1 นาที เมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าผลการตรวจสอบความแม่นยำและเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ โดยศึกษาไลโคปีนที่ 5 ระดับความเข้มข้น ในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 11.54 – 69.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีสมการเชิงเส้น คือ  $y = 611.0064x + 1,523.4690$  และมีค่าถดถอยเชิงเส้น ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9986 คิดเป็น  $R = 0.9993$  ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงตลอดช่วง มีค่าถดถอยเชิงเส้น ( $R^2$ ) มากกว่า 0.99 ทุกเส้น

การทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ (precision) ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้นใช้ความเข้มข้น 17.5, 28.5 และ 45.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบเปลี่ยนวันวิเคราะห์ ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ซ้ำ ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ให้ผลการทดสอบที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ( $\% RSD \leq 2.0$ ) แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา มีความสามารถทำซ้ำได้

การทดสอบความถูกต้อง (accuracy) มีการทดสอบหาร้อยละการคืนกลับ ( $\% recovery$ ) ของไลโคปีนในทำการทดสอบใช้ความเข้มข้น 3 ระดับเช่นเดียวกับการทดสอบความแม่นยำ (precision) พบ  $\% recovery$  ของทุกความเข้มข้น อยู่ในช่วง 85.30 – 112.12  $\%$  และมี  $\% RSD$  ของทุกการทดสอบมีค่าไม่มากกว่า 2.0 ซึ่งผ่านช่วงที่ยอมรับได้ที่ 85.0 – 115.0  $\%$

เมื่อนำวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนจากส่วนต่าง ๆ ของผลผักขาว คือ เปลือก เนื้อ และรกหุ้มเมล็ด พบว่าในรกหุ้มเมล็ดมีปริมาณไลโคปีนมากที่สุดเท่ากับ  $9.45 \pm 0.27$  มิลลิกรัมต่อกรัมของรกหุ้มเมล็ดแห้ง

สำหรับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลผักขาวด้วยวิธี DPPH และ FRAP พบว่าในสารสกัดที่ประกอบไปด้วยสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น ไลโคปีน หลังจากทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH เกิดการรบกวนของสารสกัดกับช่วงการเปลี่ยนสีของ DPPH ทำให้ไม่สามารถวัดว่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรได้ ต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 540 นาโนเมตร อย่างไรก็ตาม เมื่อนำผลที่ได้ไปคำนวณหาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH scavenging activity) แสดงให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกันระหว่างความเข้มข้น

ของสารสกัดกับ %scavenging activity ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะใช้วิธีนี้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จึงได้ทำการใช้วิธี FRAP ในการทดสอบ ผลที่ได้พบว่าสารสกัดจากรกของฟักข้าวให้ค่า FRAP มากที่สุดเท่ากับ 3,997.55  $\mu\text{mol/g}$  น้ำหนักผงรกแห้ง

จากการทำการศึกษากการเตรียมตำรับนิโอโซมพบว่าการเตรียมนิโอโซมด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิด Tween60 ต่อคอเลสเตอรอลด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยโมล ทำให้ได้นิโอโซมที่มีขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุด และการกระจายตัว (ค่า PDI) ที่น้อย และค่า zeta potential ไม่อยู่ระหว่างช่วง -30 ถึง 30 ทำให้มีโอกาสตกตะกอนน้อย รวมทั้งมีผลในการเพิ่มความสามารถในการจับกับสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้ดีกว่าตำรับอื่น ทำให้เหมาะสมที่จะนำมาใช้เตรียมนิโอโซมบรรจุสารสกัดจากฟักข้าวซึ่งมีสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยใช้ปริมาณสารสกัด 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการบรรจุจะให้นิโอโซมที่มีขนาด การกระจายตัว ค่า zeta potential และร้อยละการกักเก็บที่ดีกว่าตำรับอื่น

การเก็บสารสกัดและนิโอโซมกักเก็บสารสกัดไว้ในตู้เย็น (4 – 8 °C) พบว่าการกักเก็บสารสกัดไว้ในนิโอโซมทำให้มีปริมาณไลโคปีนที่เหลืออยู่มากกว่าสารสกัดที่ไม่ได้กักเก็บโดยหลังจากผ่านไป 28 วัน ไลโคปีนที่เหลืออยู่ในนิโอโซมกักเก็บสารสกัดเท่ากับ  $52.05 \pm 0.88 \%$  ในขณะที่ในสารสกัดที่ไม่ได้กักเก็บมีปริมาณไลโคปีนเหลืออยู่เท่ากับ  $22.72 \pm 4.05 \%$

ดังนั้นการบรรจุสารสกัดในนิโอโซมสามารถชะลอการสลายตัวของไลโคปีนในสารสกัดได้ และการบรรจุสารสกัดในนิโอโซม โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถชะลอการสลายตัวของไลโคปีนในสารสกัดได้ดีขึ้นกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่ 45 องศาเซลเซียส

## อภิปรายผลการวิจัย

ไลโคปีนเป็นสารที่มีสภาพความเป็นขั้วต่ำ การวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนด้วยเทคนิค HPLC จำเป็นต้องเลือกเฟสเคลื่อนที่ซึ่งมีขั้วต่ำเช่นเดียวกัน เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถพาสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์เพื่อทำให้เกิดการแยกได้ จากการศึกษาจากงานวิจัยก่อนหน้าของ Xu และคณะ<sup>(40)</sup> ได้ทำการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีน โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 โดยสารที่ใช้สำหรับเตรียมเฟสเคลื่อนที่ คือ methanol, acetonitrile และ dichloromethane ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ซึ่งในงานวิจัยดังกล่าวได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard) แต่วิธีการนี้ค่อนข้างยุ่งยากและมีข้อจำกัดในเรื่องของสารมาตรฐานภายในที่ต้องเติมเข้าไป ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้ได้ใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยการใช้วิธีสารมาตรฐานภายนอก (external standard) ซึ่งเป็นที่นิยมและง่ายต่อการวิเคราะห์ โดยใช้สารชนิดเดียวกันในการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ คือ methanol, acetonitrile และ dichloromethane ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งสารแต่ละชนิดมีความมีขั้ว (Polarity index) ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ คือ acetonitrile (5.8), methanol (5.1) และ dichloromethane (3.8) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกันกับงานวิจัยก่อนหน้า โดยเมื่อเพิ่มปริมาณ dichloromethane จาก 7% (เฟสเคลื่อนที่ C) เป็น 25% ในเฟสเคลื่อนที่ (D) ทำให้เวลาในการใช้ไลโคปีนออกจากคอลัมน์เร็วขึ้น (จากใช้เวลา 10.5 นาทีเป็น 4.1 นาที) และระบบดังกล่าวเมื่อทำทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) แล้วสามารถนำไปใช้การวิเคราะห์ได้

เมื่อนำวิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาทำการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนจากส่วนต่าง ๆ ของผลพริกขี้หนู คือ เปลือก เนื้อ และรกหุ้มเมล็ด พบว่าในรกหุ้มเมล็ดมีปริมาณไลโคปีนมากที่สุดเท่ากับ  $9.45 \pm 0.27$  มิลลิกรัมต่อกรัมของรกหุ้มเมล็ดแห้ง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกันกับรายงานที่ได้เคยมีการศึกษาก่อนหน้าโดย Kubola & Siriamornpun<sup>(7)</sup> ตรวจพบไลโคปีน 7.02 มิลลิกรัมต่อกรัมรกหุ้มเมล็ด ซึ่งงานวิจัยของ Kubola & Siriamornpun ตรวจพบปริมาณไลโคปีนในรกของพริกขี้หนูใกล้เคียงกันเป็นผลมาจากแหล่งวัตถุดิบจากประเทศเดียวกัน และมีวิธีการสกัดที่คล้ายกัน แต่ปริมาณไลโคปีนที่ได้จากการศึกษานี้มีปริมาณมากกว่าเนื่องจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างซึ่งในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างที่เป็นผงแห้งจากการอบ แต่การเตรียมตัวอย่างของ Kubola & Siriamornpun ได้จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) และวิธีการวิเคราะห์แม้จะใช้คอลัมน์ชนิด C18 เช่นเดียวกันแต่แตกต่างกันที่ระบบการวิเคราะห์และการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ นอกจากงานเปรียบเทียบกับงานวิจัยดังกล่าวแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบกับอีกหลายงานวิจัยดังตารางที่ 12



การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากผลของผักขาวซึ่งในสารสกัดเหล่านี้ประกอบไปด้วยสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น ไลโคปีน ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีวิเคราะห์ 2 วิธี คือ วิธี DPPH และ FRAP หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH แล้วพบว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากแคโรทีนอยด์ไม่มีส่วนใดภายในโครงสร้างที่แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในโดยการให้โปรตอน (H-donating) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกันกับงานวิจัยของ Tsuchiya และคณะ<sup>(44)</sup> และ Liu และคณะในปี 2008<sup>(43)</sup> ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชิงปริมาณกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH<sup>•</sup> scavenging activity)

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้วิธี FRAP พบว่ามีความเหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่า เนื่องจากอิทธิพลของจำนวนพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยว (conjugated double bond) ของไลโคปีนที่มีจำนวนถึง 11 พันธะ ทำให้การซ้อนทับของออร์บิทัล (orbital overlapping) ในโครงสร้างที่เป็นโครโมฟอร์ (chromophore) นั้นเพียงพอที่จะสร้างอนุมูลอิสระแคโรทีนอยด์ที่เสถียร (stable carotenoid radical)<sup>(45)</sup> ทำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ดี ซึ่งเมื่อทำการหาค่า FRAP สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลผักขาวพบว่ารกของผักขาวให้ค่า FRAP มากที่สุดเท่ากับ 3,997.55  $\mu\text{mol FeSO}_4$  ต่อกรัมผงรกรู่มเมล็ด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกันกับงานวิจัยของ Kubola & Siriamornpun<sup>(7)</sup> แต่ค่า FRAP ที่ได้จากงานวิจัยดังกล่าวได้เท่ากับ  $531.17 \pm 1.89 \mu\text{mol FeSO}_4$  ต่อกรัมผงรกรู่มเมล็ด ค่าที่แตกต่างกันนี้เนื่องจากปริมาณของไลโคปีนที่ตรวจพบในงานวิจัยของ Kubola & Siriamornpun มีปริมาณน้อยกว่าในการศึกษาในครั้งนี้

เนื่องด้วยสารสำคัญในสารสกัดมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และมีความคงตัวต่ำจึงทำการศึกษาการเตรียมตำรับนิโอโซม ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นสารลดแรงตึงผิว สำหรับชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่จะก่อตัวเป็นอนุภาคนิโอโซมได้ควรมีค่าความชอบน้ำต่อไขมัน (Hydrophilic-Lipophilic Balance: HLB) ที่เหมาะสม ถ้าสารที่ต้องการกักเก็บมีความชอบไขมัน ควรเลือกสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ที่มีค่า HLB ในช่วง 14 – 17 เช่น Tween20, Tween40 หรือ Tween60 ในการเตรียมนิโอโซม ในขณะที่สารที่ต้องการจะกักเก็บมีขั้วสูง ควรเลือกสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ในช่วง 4 – 8 เช่น Span60<sup>(48)</sup>

จากงานวิจัยของ Palozza และคณะ<sup>(47)</sup> ในการเตรียมนิโอโซมบรรจุเบตาแคโรทีน โดยใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น Span40, Span60, Span80, Tween20, Tween40 และ Tween60 ที่มีการเติมคอเลสเตอรอลอัตราส่วน 1:1 โดยโมล พบว่าสารลดแรงตึงผิวในกลุ่ม Sorbitan esters (Span) ก่อตัวให้อนุภาคนิโอโซมที่มีขนาดในช่วง  $338.4 \pm 25.6$  ถึง  $428.1 \pm 28.3$  นาโนเมตร แต่มี



ความสามารถในการกักเก็บ (Entrapment efficiency) 10 – 35 % แตกต่างจากการใช้สารลดแรงตึงผิวในกลุ่ม Polyethoxylated monosester (Tween) ที่สามารถกักอนุภาคนิโอสโสมขนาดเล็กกว่า อยู่ในช่วง  $350.2 \pm 25.8$  ถึง  $440.3 \pm 32.3$  นาโนเมตร และมีความสามารถในการกักเก็บ 30 – 55 %

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกใช้สารลดแรงตึงผิว 3 ชนิด คือ Tween20, 40 และ 60 ในการเตรียมตำรับนิโอสโสม พบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิว Tween60 กับคอเลสเทอรอลในอัตราส่วน 1:1 โดยโมล สามารถกักอนุภาคนิโอสโสมที่มีขนาด  $164.87 \pm 0.49$  นาโนเมตรและความสามารถกักเก็บ  $64.59 \pm 0.98$  % เมื่อบรรจุสารสกัด 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของงานวิจัยของ Palozza และคณะ<sup>(47)</sup> ที่มีการเตรียมนิโอสโสมบรรจุเบตาแคโรทีน ซึ่งการเติมคอเลสเทอรอลอัตราส่วนเท่ากัน (เช่น 1:1) กับ Tween60 โดยโมลสามารถก่อตัวเป็นนิโอสโสมที่มีความคงตัวได้ เนื่องจากปฏิสัมพันธ์ (interaction) ที่เกิดขึ้นระหว่างส่วนหัวที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic head group) ของสารลดแรงตึงผิวกับตำแหน่ง 3-OH ของคอเลสเทอรอล<sup>(49)</sup>

จากการศึกษาความคงสภาพของสารสกัดผักขาวในนิโอสโสม ซึ่งใช้การวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนที่คงอยู่เป็นตัวชี้วัดพบว่าการเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถยืดเวลาการสลายตัวของไลโคปีนลงได้ในช่วงเวลา 3 สัปดาห์ แต่เมื่อนำมาบรรจุนิโอสโสมสามารถยืดเวลาในการสลายตัวของไลโคปีนได้เกิน 1 เดือน ปริมาณไลโคปีนคงอยู่มากกว่า 50%) ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tan และคณะ<sup>(50)</sup> ที่ได้ทำการเตรียมลิโปโซมบรรจุไลโคปีนที่ความเข้มข้น 0.5 % โดยมวล โดยสภาวะที่ศึกษาความคงสภาพ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้แก๊สไนโตรเจน สามารถยืดเวลาการสลายตัวของไลโคปีนได้เป็นอย่างดี และจากงานวิจัยของ Okonogi และ Riangjanapatee<sup>(51)</sup> ใช้ตัวพาไขมันขนาดนาโนเมตร (Nanostructured lipid carriers; NLC) โดยบรรจุไลโคปีน 50 % มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถยืดเวลาการสลายตัวของไลโคปีนได้นานกว่า 60 วัน

### ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาข้างต้นพบว่าการเตรียมตำรับนิโอสโสมบรรจุสารสกัดผักขาวสามารถกักเก็บและยืดเวลาการสลายตัวของไลโคปีนซึ่งเป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งในสารสกัด เมื่อทำการเตรียมตำรับนิโอสโสมบรรจุสารสกัดได้แล้ว ควรศึกษาเพิ่มในการทำให้อยู่ในรูปแบบแห้งหรือเก็บภายใต้สภาวะไนโตรเจน หรือเตรียมในรูปแบบโปรนิโอสโสมเพื่อช่วยลดการสลายของไลโคปีนและเพื่อความสะดวกในการเตรียมรูปแบบผลิตภัณฑ์ เช่น ซีรัม หรือครีม ในอนาคต

## บรรณานุกรม

1. (สสว.) ส. ยุทธศาสตร์และแผนปฏิบัติการส่งเสริมวิสาหกิจขนาดกลางและย่อมกลุ่มอุตสาหกรรมฐานชีวภาพ (Bio-Based Industry) : อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ ปัณณธร มีเดีย; 2559. 85 p.
2. Florence TM. The role of free radicals in disease. Aust N Z J Ophthalmol. 1995;23(1):3-7.
3. Chuyen HV, Nguyen MH, Roach PD, Golding JB, Parks SE. Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng.): a rich source of bioactive compounds and its potential health benefits. Int J Food Sci Tech. 2015;50(3):567-77.
4. Uchegbu FI, Vyas, S.P. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. int J Pharm. 1998;172:33-70.
5. สงศรี พ. พักข้าว พืชพื้นบ้านคุณค่าสูงเพื่อสุขภาพ. แก่นเกษตร. 2012;40:1-6.
6. Ishida BK, Turner C, Chapman MH, McKeon TA. Fatty acid and carotenoid composition of gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruit. J Agric Food Chem. 2004;52(2):274-9.
7. Kubola J, Siriamornpun S. Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). Food Chem. 2011;127(3):1138-45.
8. Vuong LT, King JC. A method of preserving and testing the acceptability of gac fruit oil, a good source of beta-carotene and essential fatty acids. Food Nutr Bull. 2003;24(2):224-30.
9. Singh G, Kawatra A, Sehgal S. Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. Plant Foods Hum Nutr. 2001;56(4):359-64.
10. Aoki H, Kieu NT, Kuze N, Tomisaka K, Van Chuyen N. Carotenoid pigments in GAC fruit (*Momordica cochinchinensis* SPRENG). Biosci Biotechnol Biochem. 2002;66(11):2479-82.
11. Bharathi LK, Singh HS, Shivashankar S, Ganeshamurthy AN, Sureshkumar P. Assay of Nutritional Composition and Antioxidant Activity of Three Dioecious *Momordica* Species

of South East Asia. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. 2014;84(1):31-6.

12. Kha TC, Nguyen MH, Roach PD. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. J Food Eng. 2010;98(3):385-92.

13. Kha TC, Nguyen MH, Roach PD. Effects of Pre-Treatments and Air Drying Temperatures on Colour and Antioxidant Properties of Gac Fruit Powder. Int J Food Eng. 2011;7(3).

14. Mai HC, Truong V, Debaste F. Carotenoids concentration of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) fruit oil using cross-flow filtration technology. J Food Sci. 2014;79(11):E2222-31.

15. Kong KW, Khoo HE, Prasad KN, Ismail A, Tan CP, Rajab NF. Revealing the Power of the Natural Red Pigment Lycopene. Molecules. 2010;15(2):959-87.

16. Holzapfel NP, Holzapfel BM, Champ S, Feldthusen J, Clements J, Hutmacher DW. The potential role of lycopene for the prevention and therapy of prostate cancer: from molecular mechanisms to clinical evidence. Int J Mol Sci. 2013;14(7):14620-46.

17. Stahl W, Sies H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? Arch Biochem Biophys. 1996;336(1):1-9.

18. Clinton SK, Emenhiser C, Schwartz SJ, Bostwick DG, Williams AW, Moore BJ, et al. cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996;5(10):823-33.

19. Goodwin TW. Chemistry and biochemistry of plant pigment. London: Academic Press Inc. 1967.

20. Sharma SKM, M.L. Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. Food Research International. 1996;29:306-75.

21. Moghassemi S, Hadjizadeh A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. J Control Release. 2014;185:22-36.

22. Paolino D, Cosco D, Muzzalupo R, Trapasso E, Picci N, Fresta M. Innovative bola-surfactant niosomes as topical delivery systems of 5-fluorouracil for the treatment of skin cancer. *Int J Pharm*. 2008;353(1-2):233-42.
23. Attia IA, El-Gizawy SA, Fouda MA, Donia AM. Influence of a niosomal formulation on the oral bioavailability of acyclovir in rabbits. *AAPS PharmSciTech*. 2007;8(4):E106.
24. Carafa M, Marianecchi C, Rinaldi F, Santucci E, Tampucci S, Monti D. Span and Tween neutral and pH-sensitive vesicles: characterization and in vitro skin permeation. *J Liposome Res*. 2009;19(4):332-40.
25. Sakthivel M KK, Manavalan R, Senthamarai R. Formulation and in vivo evaluation of niosomes containing oxcarbazepine. *J Pharm Sci Res* 2013;5(1):8-11.
26. Nasr M. In vitro and in vivo evaluation of proniosomes containing celecoxib for oral administration. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(1):85-9.
27. Kumar GP, Rajeshwarrao P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery-an overview. *Acta Pharm Sin B*. 2011;1(4):208-19.
28. Biswal S, Murthy PN, Sahu J, Sahoo P, Amir F. Vesicles of Non-ionic Surfactants (Niosomes) and Drug Delivery Potential. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2008;1(1):1-8.
29. Marianecchi C, Di Marzio L, Rinaldi F, Celia C, Paolino D, Alhaique F, et al. Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;205:187-206.
30. Junyaprasert VB, Teeranachaideekul V, Supaperm T. Effect of Charged and Non-ionic Membrane Additives on Physicochemical Properties and Stability of Niosomes. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(3):851.
31. Bhaskaran S LP. Comparative evaluation of niosome formulations prepared by different techniques. *Acta Pharm Sci*. 2009;51:27-32.
32. Barba AIO, Hurtado MC, Mata MCS, Ruiz VF, de Tejada MLS. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and beta-carotene in vegetables. *Food Chem*. 2006;95(2):328-36.
33. Center for Drug Evaluation and Research USFaDA. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods.

34. International A. Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Part 1 AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2013.
35. Iris F.F. Benzie MD. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. In: Resat Apak EC, and Fereidoon Shahidi, editor. Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications, First Edition: John Wiley & Sons Ltd; 2017.
36. Liu D, Shi J, Colina Ibarra A, Kakuda Y, Jun Xue S. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. LWT - Food Science and Technology. 2008;41(7):1344-9.
37. Tan C, Xue J, Abbas S, Feng B, Zhang X, Xia S. Liposome as a delivery system for carotenoids: comparative antioxidant activity of carotenoids as measured by ferric reducing antioxidant power, DPPH assay and lipid peroxidation. J Agric Food Chem. 2014;62(28):6726-35.
38. Tan C, Xue J, Lou X, Abbas S, Guan Y, Feng B, et al. Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. Food Funct. 2014;5(6):1232-40.
39. Takehara M, Nishimura M, Kuwa T, Inoue Y, Kitamura C, Kumagai T, et al. Characterization and thermal isomerization of (all-E)-lycopene. J Agric Food Chem. 2014;62(1):264-9.
40. Xu F, Yuan QP, Dong HR. Determination of lycopene and beta-carotene by high-performance liquid chromatography using sudan I as internal standard. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006;838(1):44-9.
41. Center for Drug Evaluation and Research USFDA. Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Method. 1994.
42. Van Breemen R, Bzhelyansky A, Es-Safi NE, Jennens M, Johnson HE, Krepich S, et al. Standard Method Performance Requirements (SMPRs(R)) 2018.004: Determination of trans Resveratrol in Dietary Supplements and Dietary Ingredients. J AOAC Int. 2018;101(4):1254-5.

43. Liu DH, Shi J, Ibarra AC, Kakuda Y, Xue SJ. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and beta-carotene mixtures on the DPPH free radical. *Lwt-Food Sci Technol.* 2008;41(7):1344-9.
44. Tsuchiya M, Scita G, Freisleben HJ, Kagan VE, Packer L. Antioxidant Radical-Scavenging Activity of Carotenoids and Retinoids Compared to Alpha-Tocopherol. *Method Enzymol.* 1992;213:460-72.
45. Mortensen A, Skibsted LH. Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions. *J Agr Food Chem.* 1997;45(8):2970-7.
46. Muller L, Frohlich K, Bohm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (alpha TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry.* 2011;129(1):139-48.
47. Palozza P, Muzzalupo R, Trombino S, Valdannini A, Picci N. Solubilization and stabilization of  $\beta$ -carotene in niosomes: delivery to cultured cells. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2006;139(1):32-42.
48. Joshi S, White R, Sahu R, Dennis VA, Singh SR. Comprehensive Screening of Drug Encapsulation and Co-Encapsulation into Niosomes Produced Using a Microfluidic Device. *Processes.* 2020;8(5):535.
49. Seleci DA, Seleci M, Walter JG, Stahl F, Scheper T. Niosomes as Nanoparticulate Drug Carriers: Fundamentals and Recent Applications. *Journal of Nanomaterials.* 2016;2016.
50. Tan C, Xue J, Lou X, Abbas S, Guan Y, Feng B, et al. Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. *Food & Function.* 2014;5(6):1232-40.
51. Okonogi S, Riangjanapatee P. Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration. *International Journal of Pharmaceutics.* 2015;478(2):726-35.





การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์  
 ความเป็นเส้นตรงและช่วง (Linearity and range)  
 ทำการทดสอบ 3 วัน ซ้ำ 3 ครั้ง

ความเป็นเส้นตรงและช่วง

วัน	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	Peak area			เฉลี่ย
		1	2	3	
1	11.54	8262	8027	7638	7976
	23.07	16887	16628	15901	16472
	34.61	23102	22441	21843	22462
	57.68	37665	37055	36212	36977
	69.22	44028	43708	42957	43564
2	13.17	12657	12522	12204	12461
	26.33	22223	21861	21688	21924
	39.50	33262	33236	33198	33232
	65.84	64235	64737	64995	64656
	79.00	76154	78377	75898	76810
3	11.86	11555	11588	12020	11721
	23.71	26198	27025	27066	26612
	35.57	45908	45981	45368	45752
	59.28	88245	90215	89935	89465
	71.14	108137	112361	116823	112440



ความถูกต้องและความแม่นยำ (Accuracy and Precision)

วัน	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	Peak area			ค่าเฉลี่ย
		1	2	3	
1	17.31	12195	12276	12156	12209
	28.84	19979	20101	20079	20053
	46.15	30114	30212	30571	30299
2	19.75	17067	17056	17099	17074
	32.92	28759	28860	28396	28672
	52.67	47344	47554	47512	47470
3	17.784	20098	20020	20061	20060
	29.64	41461	41018	41104	41194
	47.424	70307	70406	70457	70390

### ปริมาณไลโคปีนในสารสกัด

น้ำหนักแห้ง

ส่วนของผล	น้ำหนักผง (g)		
	1	2	3
เปลือก	2.00	2.01	2.03
เนื้อ	2.06	2.05	2.03
รอกหุ้มเมล็ด	2.05	2.03	2.05

น้ำหนักสารสกัดที่ซึ่งสำหรับวิเคราะห์

ส่วนของผล	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
	1	2	3
เปลือก	1.17	1.19	1.15
เนื้อ	1.15	1.12	1.18
รอกหุ้มเมล็ด	1.11	1.1	1.11

พื้นที่ใต้กราฟในการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัด

ส่วนของผล	Peak area		
	1	2	3
เปลือก	2272	2348	2553
เนื้อ	4806	4553	4579
รอกหุ้มเมล็ด	16369	17018	17051

### การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ชั่งสารสกัดพืชข้าว 105.2 มิลลิกรัม ละลายด้วย dichloromethane 8 มิลลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิตร จะได้ความเข้มข้น 10.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร (S0) เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น และนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและความเข้มข้นของสารสกัด

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (หลังหักค่า blank)		
	1	2	3
0.6312	1.65	1.652	1.67
1.315	1.645	1.648	1.649
2.63	1.641	1.65	1.654
5.26	1.627	1.638	1.632
7.89	1.616	1.611	1.615

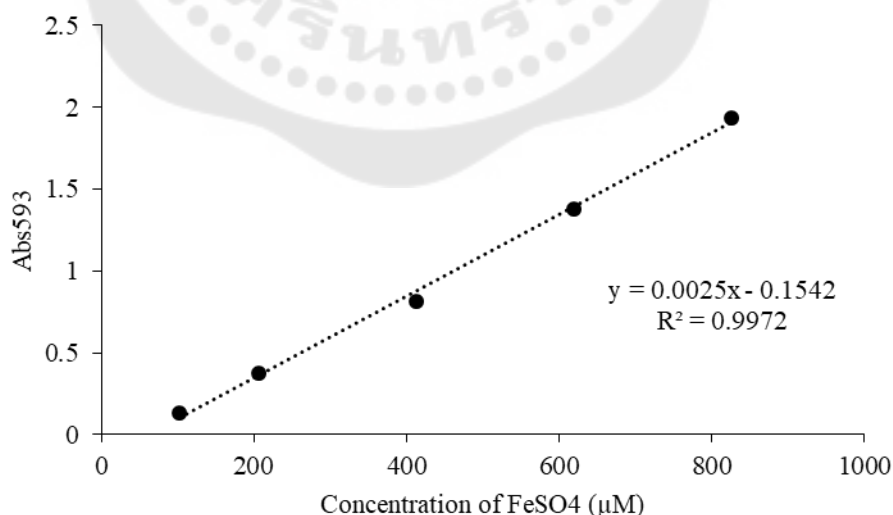
### การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ชั่ง  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  มา 2.87 กรัม มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1,032.37 ไมโครโมลาร์ เจือจาง 6 ความเข้มข้น ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ได้ค่าดังตาราง

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและความเข้มข้นของ  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

ความเข้มข้น ( $\mu\text{M}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (หลังหักค่า blank)		
	1	2	3
103.24	0.133	0.133	0.133
206.47	0.371	0.371	0.371
412.95	0.812	0.812	0.812
619.42	1.382	1.382	1.382
825.90	1.935	1.937	1.939

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร มาสร้างกราฟกับความเข้มข้น จะได้กราฟมาตรฐาน ดังนี้



กราฟมาตรฐาน Ferrous sulfate กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร

## ชั่งสารสกัด ดังตาราง

น้ำหนักสารสกัดจากแต่ละส่วนของผลพริกขี้หนูสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

	น้ำหนักสารสกัด (mg)		
	1	2	3
เปลือก	6.05	6.05	6.04
เนื้อ	6.07	6.05	6.07
รากหุ้มเมล็ด	6.21	6.24	6.18

ละลายสารสกัดใน DMSO 1 มิลลิลิตร นำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของสารละลายสารสกัด

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (หลังหักค่า blank)			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
เปลือก	0.480	0.479	0.485	0.481
เนื้อ	0.455	0.434	0.429	0.439
รากหุ้มเมล็ด	0.819	0.829	0.823	0.824

### การคำนวณหาปริมาณ Relative antioxidant activity (FRAP value)

เมื่อวัดค่าการดูดแสงของสารสกัดได้แล้วนำค่าที่ได้ไปแทนในสมการที่ได้จากกราฟ  
มาตรฐาน  $[Y = 0.0025X - 0.1542]$

โดยค่า X คือความเข้มข้นของ Ferrous sulfate ส่วนค่า

Y คือค่าการดูดกลืนแสง

### ตัวอย่างการคำนวณ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของรอกหุ้มเมล็ด 0.819 เมื่อนำมาแทนค่าในสมการ

$$Y = 0.0025X - 0.1542$$

แทนค่า  $Y = 0.819$

$$0.819 = 0.0025X - 0.1542$$

แก้สมการหาค่า X

$$X = \frac{(0.819 + 0.1542)}{0.0025} = 389.28 \mu\text{M}$$

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเทียบได้กับ Ferrous sulfate ความเข้มข้น  
389.28 ไมโครโมลาร์

สารสกัดรอกของพริกขี้หนูที่ชั่งมา 6.21 มิลลิกรัม เทียบได้กับ Ferrous sulfate ความ  
เข้มข้น 389.28 ไมโครโมลาร์ ถ้าสารสกัด 1 มิลลิกรัม เทียบได้กับ Ferrous sulfate ความเข้มข้น  
เท่ากับ  $389.28/6.21 = 62.63$  ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัมสารสกัด

สารสกัดที่ชั่งมา ได้จากสารสกัด 126.93 มิลลิกรัม ซึ่งมาจากผงรอกพริกขี้หนูแห้ง  
2.0 กรัม ดังนั้นเมื่อคำนวณหาค่า FRAP value โดยเทียบกับน้ำหนักผงแห้ง จะได้เท่ากับ

$$\frac{389.28 \mu\text{M} \times 126.93 \text{ mg}}{6.21 \text{ mg} \times 2.0 \text{ g}} = 3,978.37 \mu\text{M FeSO}_4/\text{gผงแห้ง}$$

จากการคำนวณ FRAP value ที่ได้จากการเปรียบเทียบสารสกัดจากผงรอกพริกขี้หนูแห้ง สามารถ  
เทียบได้กับ Ferrous sulfate ความเข้มข้น 3,978.37 ไมโครโมลาร์ต่อผงรอกพริกขี้หนูแห้ง 1 กรัม

### ตัวอย่างการคำนวณตำรับนิโอโซม

ตำรับ F1 อัตราส่วน Tween20 และคอเลสเตรอล 1:1 โดยโมล ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หรือเท่ากับ 100 ไมโครโมลในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ในตำรับประกอบด้วย Tween20 และคอเลสเตรอล 50 ไมโครโมล เมื่อคิดแยกแต่ละชนิดใช้ปริมาณ ดังนี้

Tween 20 มีน้ำหนักโมเลกุล 1,227.54 กรัมต่อโมล ในตำรับมี 50 ไมโครโมล ต้องใช้ Tween20 เท่ากับ

$$1,227.54 \frac{g}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1,000,000 \mu\text{mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 g} \times 50 \mu\text{mol} = 61.37 \text{ mg}$$

สำหรับ คอเลสเตรอล มีน้ำหนักโมเลกุล 386.654 กรัมต่อโมล ในตำรับมี 50 ไมโครโมล ต้องใช้ Tween20 เท่ากับ

$$386.654 \frac{g}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1,000,000 \mu\text{mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 g} \times 50 \mu\text{mol} = 19.33 \text{ mg}$$

จากการคำนวณต้องใช้ Tween20 และคอเลสเตรอลเท่ากับ 61.4 mg และ 19.3 mg ตามลำดับ

การเตรียมนิโอโซมเปล่าและนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัดนิโอโซม  
ผลของชนิดของสารลดแรงตึงผิว

ขนาดอนุภาค และค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI)ของแต่ละตำรับ

ตำรับ	ขนาดอนุภาค (nm)			ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI)		
	1	2	3	1	2	3
F1	318.5	330.8	337.2	0.358	0.358	0.351
F2	285.4	287.9	279.98	0.385	0.370	0.383
F3	165.5	164.3	164.8	0.302	0.292	0.285
F4	168.0	173.0	170.0	0.354	0.296	0.357
F5	190.5	184.6	187.7	0.309	0.371	0.364

ค่า Zeta potential และ ค่า pH

ตำรับ	Zeta potential (mV)			pH		
	1	2	3	1	2	3
F1	-35.5	-35.6	-36	5.41	5.42	5.45
F2	-34.3	-35.2	-33.9	4.88	4.9	4.85
F3	-29.9	-31	-29.1	4.61	4.6	4.68
F4	-29.7	-29.9	-29.5	5.1	5.04	4.95
F5	-32.4	-31.4	-31.8	4.85	4.8	4.79



การเตรียมนิโอโซมเปล่าและนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัดนิโอโซม  
ผลของปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการบรรจุนิโอโซม

ขนาดอนุภาค และค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI)ของแต่ละตำรับ

ความเข้มข้น (mg/mL)	ขนาดอนุภาค (nm)			ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI)		
	1	2	3	1	2	3
0.25	122	123.7	122.9	0.189	0.202	0.205
0.5	131.8	132	134.4	0.254	0.249	0.236
1.0	136.9	137.4	140.2	0.231	0.201	0.21

ค่า Zeta potential และ ค่า pH

ความเข้มข้น (mg/mL)	Zeta potential (mV)			pH		
	1	2	3	1	2	3
0.25	-17.4	-16.5	-17.2	4.89	4.89	4.88
0.5	-36.9	-40.3	-38.6	4.63	4.63	4.63
1.0	-20.6	-17.7	-17.2	4.57	4.57	4.56

### ร้อยละการกักเก็บ

ก่อนนำนิโอโซมบรรจุสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงแบ่งสารละลายมา 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนทั้งหมด (Total) หลังจากปั่นเหวี่ยงจะถูกแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนใส (supernatant) และตะกอน (pellet) นำแต่ละส่วนไปทำการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีน โดยใช้ความสัมพันธ์ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน สมการ  $y = 1,725.1663x - 1,2344.1105$  โดยค่า  $y$  แสดงถึงพื้นที่ใต้กราฟ และ  $x$  แทนความเข้มข้นของสารมาตรฐานไลโคปีน

พื้นที่ใต้กราฟนิโอโซมบรรจุสารสกัดความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

	Peak area			ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	1	2	3	1	2	3
Total	12664	14195	15090	14.50	15.38	15.90
Supernatant	990	679	919	7.73	7.55	7.69
Pellet	2404	2581	2280	8.55	8.65	8.48

พื้นที่ใต้กราฟนิโอโซมบรรจุสารสกัดความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

	Peak area			ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	1	2	3	1	2	3
Total	15079	15104	15281	15.90	15.91	16.01
Supernatant	6354	6584	6530	10.84	10.97	10.94
Pellet	5549	5410	5290	10.37	10.29	10.22

พื้นที่ใต้กราฟนิโอโซมบรจจุสารสกัดความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

	Peak area			ความเข้มข้น (µg/mL)		
	1	2	3	1	2	3
Total	26699	26925	26663	22.63	22.76	22.61
Supernatant	10052	10662	10234	12.98	13.34	13.09
Pellet	3958	3895	3398	9.45	9.41	9.12

คำนวณหาร้อยละการกักเก็บ จากสมการ

$$\%EE = \frac{\text{ปริมาณไลโคปีนที่วิเคราะห์จากส่วนตะกอน}}{\text{ปริมาณไลโคปีนทั้งหมดในตำรับ}} \times 100$$

ร้อยละการกักเก็บนิโอโซมบรจจุสารสกัดความเข้มข้นแตกต่างกัน

ความเข้มข้น (mg/mL)	ร้อยละการกักเก็บ (%EE)		
	1	2	3
0.25	58.97	56.24	53.31
0.50	65.25	64.68	63.83
1.00	41.75	41.35	40.36

### ตัวอย่างการคำนวณ loading capacity

เมื่อเตรียมโดยใช้ตำรับนิโอโซมตำรับ F3 โดยใช้ Tween60 และคอเลสเตรอล อัตราส่วน 1:1 โดยโมล ปริมาตร 10 mL ต้องซึ่ง Tween60 และ คอเลสเตรอลเท่ากับ 65.5 และ 19.3 มิลลิกรัม ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้นที่ใช้ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต้องซึ่งมาเท่ากับ 5.0 มิลลิกรัม ในสารสกัดที่ใช้ 5.0 mg จะถูกกักเก็บไป 64.59 % คิดเป็น 3.23 mg ดังนั้นเมื่อคำนวณหา loading capacity ได้ดังนี้

$$\frac{3.23 \text{ mg}}{(65.5 + 19.3) \text{ mg}} \times 100 = 3.81\%$$

จากการคำนวณจะได้ค่า loading capacity เท่ากับ 3.81%

### การศึกษาความคงสภาพแบบเร่ง

การศึกษาความคงสภาพ แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ ศึกษาความคงสภาพของสารสกัดและของนิโอโซมบรรจุสารสกัด

การศึกษาความคงตัวของสารสกัด เริ่มจากการซึ่งสารสกัด 5.0 มิลลิกรัม แล้วนำไปใส่ในภาชนะบรรจุ จากนั้นป้อนที่สภาวะต่าง ๆ เก็บผลทุก ๆ 1 สัปดาห์

เมื่อครบระยะเวลาเก็บผลแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณโดยละลายในไดคลอโรมีเทน 5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณได้โดยเทคนิค HPLC และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สมการ  $y = 1,453.1105x - 1,081.0853$  ในการหาความเข้มข้น

พื้นที่ใต้กราฟของสารสกัด

เวลา (สัปดาห์)	พื้นที่ใต้กราฟ								
	ตู้เย็น			อุณหภูมิห้อง			45 °C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	152561	158762	161072	152561	158762	161072	152561	158762	161072
1	104424	100615	108180	53618	56735	56846	21189	21739	22273
2	99016	94827	94629	43629	42597	36905	7377	7113	6876
3	71007	68766	71262	26143	26754	28205	1230	1335	1386
4	39822	37935	26713	12011	9058	3228	ND	ND0	ND

หมายเหตุ: ND = ไม่สามารถตรวจสอบได้

ปริมาณไลโคปีนของสารสกัด

เวลา (สัปดาห์)	ปริมาณไลโคปีน (µg/mL)								
	ตู้เย็น			อุณหภูมิห้อง			45 °C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	105.73	110.00	111.59	105.73	110.00	111.59	105.73	110.00	111.59
1	72.61	69.99	75.19	37.64	39.79	39.86	15.33	15.70	16.07
2	68.88	66.00	65.87	30.77	30.06	26.14	5.82	5.64	5.48
3	49.61	48.07	49.78	18.74	19.16	20.15	1.59	1.66	1.70
4	28.15	26.85	19.13	9.01	6.98	2.97	0.74	0.74	0.74

ร้อยละคงเหลือของไลโคปีนในสารสกัด

เวลา (สัปดาห์)	ตู้เย็น			อุณหภูมิห้อง			45 °C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	68.67	63.62	67.38	35.60	36.17	35.72	14.49	14.28	14.40
2	65.15	60.00	59.02	29.10	27.33	23.43	5.51	5.13	4.91
3	46.92	43.70	44.61	17.72	17.41	18.06	1.50	1.51	1.52
4	26.62	24.41	17.14	8.52	6.34	2.66	0.70	0.68	0.67

การศึกษาคงตัวของนิโอโซมบรรจุสารสกัด เริ่มจากการเตรียมนิโอโซมบรรจุสารสกัดความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำนิโอโซมที่เตรียมได้ไปใส่ในภาชนะบรรจุขวดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งที่สถานะต่าง ๆ เก็บผลทุก ๆ 1 สัปดาห์ โดยนำนิโอโซมที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนตะกอนมากระจายในน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำผสม acetone (75:25 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นาน 3 นาที

พื้นที่ได้กราฟ

เวลา (สัปดาห์)	ดูเย็น			พื้นที่ได้กราฟ		
	1	2	3	1	2	3
0	732780	748362	739640	732780	748362	739640
1	564424	609615	528180	353675	323671	330433
2	485382	475238	487412	325874	302850	315958
3	398510	388961	398510	185230	187410	179206
4	385472	379521	375209	146523	149520	145684



ทำการวิเคราะห์ปริมาณไลโคปีนในเนยโสมบรจุสารสกัดโดยใช้ความสัมพันธเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐานไลโคปีน แทนค่าในสมการ  $y = 1453.1105x - 1081.0853$  จะได้ค่าความเข้มข้นของไลโคปีนที่อยู่ในเนยโสมบรจุสารสกัด

ปริมาณไลโคปีนในเนยโสมบรจุสารสกัด

เวลา (สัปดาห์)	ตู้เย็น			อุณหภูมิห้อง			45 °C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	51.17	52.24	51.64	51.17	52.24	51.64	51.17	52.24	51.64
1	39.59	42.70	37.09	25.08	23.02	23.48	18.24	16.94	18.31
2	34.15	33.45	34.29	23.17	21.59	22.49	13.86	13.88	13.89
3	28.17	27.51	28.17	13.49	13.64	13.08	7.97	8.24	8.26
4	27.27	26.86	26.56	10.83	11.03	10.77	5.00	5.03	5.53

ร้อยละคงเหลือของไลโคปีนในสารสกัด

เวลา (สัปดาห์)	ดูเย็น			อุณหภูมิห้อง			45 °C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	77.36	81.72	71.82	49.02	44.06	45.47	35.64	32.43	35.45
2	66.73	64.02	66.39	45.28	41.32	43.54	27.08	26.56	26.89
3	55.05	52.66	54.54	26.36	26.11	25.32	15.57	15.78	15.99
4	53.29	51.42	51.44	21.16	21.12	20.85	9.78	9.63	10.71

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ชยุต ฟองสุข
วัน เดือน ปี เกิด	7 กันยายน 2530
สถานที่เกิด	อุตรดิตถ์
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ที่อยู่ปัจจุบัน	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ 99 หมู่ 18 ถนนพหลโยธิน อาคารเรียนและปฏิบัติการรวม ตำบล คลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
ผลงานตีพิมพ์	HPLC method optimization and validation for determination of lycopene and beta-carotene in gac fruit

