

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

1. Absolute ethanol (Analytical grade, Merck, Germany)
2. Acetone (Analytical grade, RCI Labscan Ltd., Thailand)
3. Acetonitrile (HPLC grade, RCI Labscan Ltd., Thailand)
4. Aluminum chloride (Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd., Thailand)
5. Beta arbutin (Sigma-Aldrich Inc., USA)
6. Butylated hydroxytoluene (Sigma-Aldrich Inc., USA)
7. Cetareth-25 (Sigma-Aldrich Inc., USA)
8. 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) (Sigma-Aldrich Inc., USA)
9. Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (Analytical grade, Sigma-Aldrich Inc., USA)
10. Ethyl acetate (Analytical grade, RCI Labscan Ltd., Thailand)
11. Hexane (Analytical grade, RCI Labscan Ltd., Thailand)
12. Hydrochloric acid (Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd., Thailand)
13. Hydrogenated palm glycerides (Gattefosse, France)
14. Isopropyl myristate (Sigma-Aldrich Inc., USA)
15. Kojic acid (Sigma-Aldrich Inc., USA)
16. Methanol (HPLC grade, RCI Labscan Ltd., Thailand)
17. Methyl paraben (Sigma-Aldrich Inc., USA)
18. Mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich Inc., USA)
19. Olive oil (Cesar, Spain)
20. Patulatin (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ประเทศไทย)

21. Phosphotungstic acid (Electron Microscopy Sciences, USA)
22. Polyethylene glycol 400 (Srichand United dispensary Co., Ltd, Thailand)
23. Pomegranate (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ประเทศไทย)
24. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich Inc., USA)
25. Propyl paraben (Sigma-Aldrich Inc., USA)
26. Quercetagenin (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ประเทศไทย)
27. Quercetin (Sigma-Aldrich Inc., USA)
28. Rutin (Sigma-Aldrich Inc., USA)
29. Silica gel high-purity grade (7734 grade, Merck, Germany)
30. Sodium hydroxide (Analytical grade, RCI Labscan Ltd., Thailand)
31. Sodium nitrate (Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd., Thailand)
32. Sorbitan oleate (Sigma-Aldrich Inc., USA)
33. Stearyl alcohol (Sigma-Aldrich Inc., USA)
34. Vitamin C (Sigma-Aldrich Inc., USA)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Analytical balance (Sartorius[®] BP610, Germany)
2. Brick and mortar (IKEA[®], Thailand)
3. Carbon-coated copper grid (Electron Microscopy Sciences, USA)
4. Cellulose membrane (Sigma-Aldrich Inc., USA)
5. Cuvette uv (synthetic quartz glass, Hellma[®], Germany)
6. Cylinder (Witeg, DIFFICO, Germany)
7. Deep freezer (Sanyo, Japan)
8. Filter paper No.1 (Whatman[™], China)
9. Franz diffusion cell (Crown Glass Co. Inc., USA)
10. Franz diffusion Instrument (HAAKE Goerzallee 249, Germany)
11. Glass bottle 500 ml, 1000 ml (Schott Duran[®], Germany)
12. High performance liquid chromatography (Agilent[®] hp1100, USA)
13. High Pressure homogenizer (AVESTIN C3, Canada)
14. Homogenizer (Yellow line DI 25 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Germany)

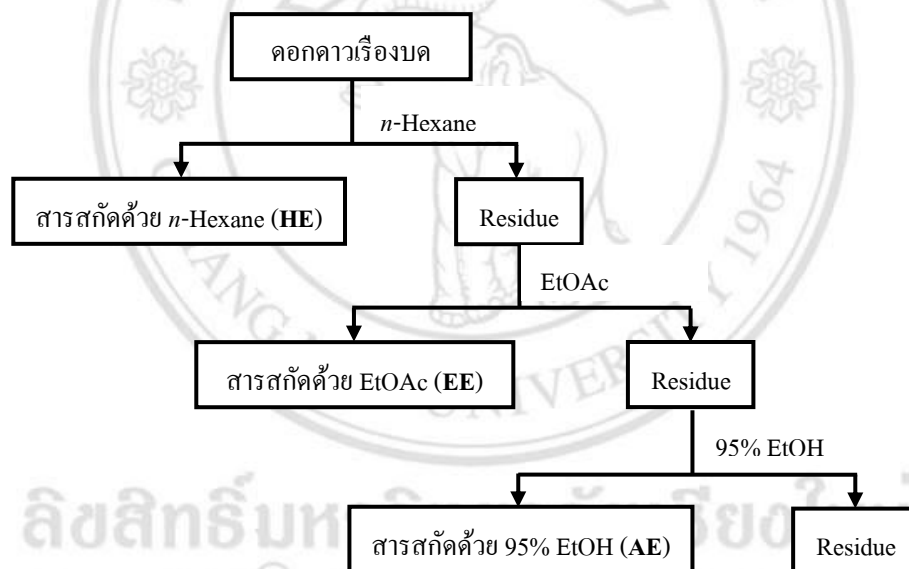
15. Hot air oven (Mettler/UM500, Germany)
16. HPLC analytical column (Mightysil[®] C-18, Japan)
17. Micro-centrifuge tube 1.5 ml (Hycon Plastics Inc., USA)
18. Micropipettes 1-200 µl, 1-1000 µl (Pipetman[®], Gilson Co. Ltd., France)
19. Microplate reader (DTX-880 multimode detector) (Beckman Coulter Inc., USA)
20. Nylon membrane filter 47 mm, 0.45 µm (Filtrex[®], Union Science Co., Ltd, Thailand)
21. Particle size analyzer (Zetasizer ZS, Malvern Instrument Ltd., Germany)
22. pH meter (EX-20, Horiba Ltd., Japan)
23. Refrigerated micro centrifuge (Avanti30, Beckman, USA)
24. Rotary evaporator (Rotavapor R-210, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)
25. Sephadex G50 (Sigma-Aldrich Inc., USA)
26. Scintillation vial 20 ml (Kimble[®], USA)
27. Sonicator (S 30 H Elmasonic, Elma[®], Germany)
28. Suction apparatus (pump VCP 8101, Sparmax[®], Taiwan)
29. TLC alumina sheet (Silica gel 60 GF₂₅₄, Merck, Germany)
30. TLC developing tank (general glassblowing co. Inc., USA)
31. Transmission electron microscope (JEM-2010 electron microscope, Jeol Ltd., Japan)
32. UV cabinet (Camag, Switzerland)
33. UV spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu, Japan)
34. Vacuum flask 500 ml (Pyrex[®], USA)
35. Vortex (Vortex-Genie 2, Scientific[®], USA)
36. Water bath incubator (WNB 14, Mettler GmbH & Co. KG, Germany)
37. 96-well microplate (Nunc[®]) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
38. Zeta cell (DTSIO 60, Malvern Instrument Ltd., Germany)

3.3 วัตถุดิบสมุนไพร

ดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* Linn.) ที่ผู้วิจัยนำมาศึกษาในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางนาโนจากสารสกัดดอกดาวเรืองไทย ได้ผ่านการตรวจสอบเอกลักษณ์พืชสมุนไพร การจัดทำตัวอย่างพืชแห้ง (Herbarium specimen) และเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.4 การสกัดสารสำคัญจากดอกดาวเรือง

นำดอกดาวเรืองที่ทำความสะอาดแล้วมาอบแห้งด้วยตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50°C แล้วนำไปบดเพื่อลดขนาด นำผงดอกดาวเรืองแห้งที่ทราบน้ำหนักแน่นอนมาสกัดแบบต่อเนื่องโดยชุดเครื่องมือซอกเลต (Soxhlet's apparatus) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ ดังแผนภาพที่ 3.1 ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) 3 ชนิด คือ สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน (hexane extract หรือ HE) สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate extract หรือ EE) และสารสกัดหยาบด้วยเอทานอล (ethanol extract หรือ AE) นำสารสกัดหยาบที่ได้นี้ไปทดสอบหาปริมาณ ฟลาโวนอยด์ และนำสารสกัดหยาบที่มีฟลาโวนอยด์สูงที่สุดไปแยกต่อด้วยเทคนิค Vacuum Column Chromatography (VCC) ด้วยวิธีชะตัวทำละลายไล่ชั้น (gradient elution) ของตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) จากขั้วต่ำไปสูง[13]



แผนภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากดอกดาวเรืองด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

3.5 การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบ

3.5.1) การตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดด้วยวิธี Shinoda test

นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้ 0.2 mg/ml ใส่แมกนีเซียมลงไป 2-3 ชิ้นเล็กแล้วหยดสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2-3 หยด เมื่อเวลาผ่านไป สารสกัดที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบจะให้สารละลายเปลี่ยนสีไปจากเดิม โดยสารละลายที่มีสารประกอบ

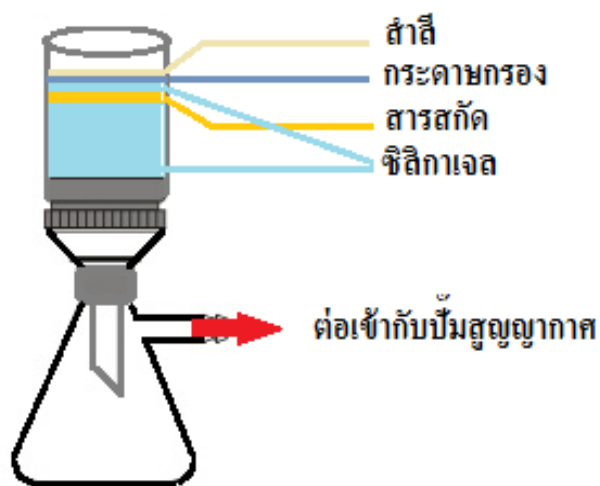
ฟลาโวน ให้สีส้มถึงแดง ฟลาโวนอลให้สีแดงถึงแดงเข้ม ฟลาวาโนนให้สีแดงเข้มถึงแดงม่วง และบางครั้งอาจให้สีเขียวหรือน้ำเงิน [62-63]

3.5.2) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content) ในสารสกัด

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content) ที่ใช้ศึกษานี้ได้ปรับปรุงมาจาก Rohman A [64] เป็นการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค spectrophotometric method โดยนำสารละลายของสารสกัดที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนและให้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.2-0.8 ปริมาตร 1 ml และ รุทีน (rutin) ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน ปริมาตร 1 ml ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/ml ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 ml เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 4 ml เติม 5% NaNO_3 300 μl ทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนที่จะเติม 10% AlCl_3 300 μl และ NaOH 1 M 300 μl ที่นาทีที่ 6 ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำสารละลายสีชมพูที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 nm นำผลการทดลองที่ได้มาสร้างความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) เพื่อหาสมการเส้นตรงพร้อมคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดและแปรผลในหน่วย เทียบเท่ารุทีนเป็นมิลลิกรัมต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (mg rutin equivalent (RE)/ g dry material of extracts)

3.6 การแยกสารสกัดหยาบ EE ด้วยเทคนิค Vacuum Column Chromatography (VCC)

นำสกัดหยาบ EE ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด ปริมาณ 10 g มาแยกผ่านซิลิกาเจล (silica gel 60) จำนวน 190 g ที่บรรจุในคอลัมน์ (Sintered glass column) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm โดยบดผสมสารสกัดหยาบ EE กับซิลิกาเจลแล้วโปรยบน Sintered glass column ให้ชั้นนี้มีความสูงไม่เกิน 0.5 cm โปรยซิลิกาเจลเปล่าทับบนผงสารสกัดอีกชั้นหนึ่งให้มีความสูงไม่เกิน 0.5 cm วางทับด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เจาะรู สูดทำยปิดทับด้วยสำลี ดังภาพที่ 3.1 จากนั้น จะคอลัมน์สุญญากาศ (vacuum column) ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) แบบไล่ขั้ว (gradient elution) จากขั้วต่ำไปสูง คือ จากตัวทำละลายอินทรีย์ 100% เฮกเซน ถึง 30% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท โดยจะระบบด้วยปริมาตร 200 ml ต่อครั้ง แล้วเก็บ fraction ที่ได้ ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก และรวม fraction ที่มีรูปแบบโครมาโทแกรมบน TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำ fraction ที่ได้ไปวิเคราะห์หาฟลาโวนอยด์ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.5 [13]



ภาพที่ 3.1 แสดงลำดับการบรรจุคอลัมน์เพื่อแยกสารด้วยเทคนิค VCC

3.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี mushroom tyrosinase inhibitory assay

การศึกษานี้ใช้วิธี mushroom tyrosinase inhibitory assay ที่ปรับปรุงมาจาก Likhitwitayawuid และคณะ [65] ทำการทดลองโดยใช้เทคนิค spectrophotometric method ดังนี้ นำสารละลายของสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ที่ปริมาตร 40 μl มาผสมกับ mushroom tyrosinase (240 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 40 μl ซึ่งละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8 ความเข้มข้น 0.02 M) ใน 96-well plate จากนั้น เติม L-DOPA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมาสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น (แกน x) และค่า % inhibition (แกน y) ซึ่งหาได้จากสมการ % tyrosinase inhibition เพื่อหาสมการเส้นตรงพร้อมทั้งคำนวณหาค่า IC_{50} และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับสารมาตรฐานซึ่งได้แก่ kojic acid, β -arbutin, vitamin C, quercetin, quercetagenin และ patulatin [3, 5, 65]

$$\text{หมายเหตุ \% tyrosinase inhibition} = \frac{[(A-B)-(C-D)]}{(A-B)} \times 100$$

- โดยที่
- A = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารละลายตัวอย่าง แต่มีเอนไซม์
 - B = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารละลายตัวอย่างและเอนไซม์
 - C = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารละลายตัวอย่างและเอนไซม์
 - D = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารละลายตัวอย่าง แต่ไม่มีเอนไซม์

3.8 การพัฒนาตำรับตัวพาทอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLC เปล่า

3.8.1 การเตรียมตำรับ NLC เปล่า

การพัฒนาตำรับตัวพาทอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLC ด้วยเทคนิคการปั่นผสมโดยใช้ความดันสูง (high pressure homogenization) แบบบ ใช้อุณหภูมิสูง (hot homogenization technique) มีวิธีการดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: การคัดเลือกสารที่จะนำมาตั้งตำรับ NLC เปล่าซึ่งจะต้องประกอบด้วย สารที่เป็นไขมันแข็ง ไขมันเหลว สารลดแรงตึงผิว และน้ำ

ขั้นตอนที่ 2: ในแต่ละตำรับ NLC ที่พัฒนาขึ้นจะมีการคำนวณค่า Hydrophilic - Lipophilic Balance (HLB) จากค่า required HLB ของไขมันและน้ำมันที่ใช้ในตำรับนั้นๆ เพื่อนำมาทำนายหาปริมาณ และอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในตำรับได้อย่างเหมาะสม และทำให้ตำรับเกิดความคงตัวที่ดี

ขั้นตอนที่ 3: จากนั้นเตรียมสูตรตำรับตั้งต้น โดยเริ่มจากการผสมไขมันแข็ง ไขมันเหลว และสารลดแรงตึงผิวที่อุณหภูมิเทียบเท่าจุดหลอมไขมันแข็ง (75 °C) ด้วยเครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียว (homogenizer) ด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm จากนั้นนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่ความดันสูง แบบบ ใช้อุณหภูมิสูง 75 °C โดยทั่วไปใช้ความดัน 1000 บาร์ จำนวน 5 รอบเมื่อเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4: ตำรับ NLC เปล่าที่ได้ถูกนำมาพิจารณาเพื่อปรับสูตรตำรับ จากปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อลักษณะตำรับที่ต้องการและความคงตัวของตำรับ ซึ่งโดยปกติแล้วตำรับ NLC ที่ถูกพัฒนาขึ้นควรมีลักษณะเนื้อตำรับเป็นของเหลว ไม่หนืด และมีคุณสมบัติแขวนลอย (suspension) ในลักษณะอนุภาคไขมันของแข็งแขวนลอยในของเหลวได้อย่างคงตัว ซึ่งปัจจัยที่ต้องการพัฒนาจากตำรับตั้งต้น ได้แก่

1. การปรับและเปลี่ยนสารลดแรงตึงผิว ด้วยการเพิ่ม/ลด ทีละ 2% เพื่อให้ใช้ในตำรับน้อยที่สุดและทำให้เกิดความคงตัวแก่ตำรับได้
2. การปรับอัตราส่วนไขมันแข็งต่อไขมันเหลว ด้วยการเพิ่ม/ลดทีละ 0.5% เพื่อปรับเนื้อของตำรับให้เหลว หรือไม่หนืดจนเป็นครีม และอนุภาคไขมันที่แขวนลอยต้องเป็นของแข็ง
3. เปลี่ยนชนิดไขมันแข็ง เพื่อปรับเนื้อของตำรับให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และไม่ทำให้ตำรับเกิดความหนืด

3.8.2 การทดสอบลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC เปล่า

1) การวัดขนาดอนุภาค วัดการกระจายตัวของขนาดอนุภาคและวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาค NLC เปล่า

การวัดขนาดอนุภาค คำนวณการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Polydispersity Index-PdI) และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาค (Zetapotential-ZP) ด้วยการใช้เครื่อง Photon Correlation Spectrophotometer (Zetasizer[®]) โดยนำ NLC ที่เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน โดยมีอัตราส่วน NLC ต่อน้ำปราศจากไอออนเป็น 1:1,000 (v:v) บรรจุใน Zeta cell แบบโปร่งใสให้เต็ม และวัดภายใต้อุณหภูมิควบคุมที่ 25 °C

2) การวิเคราะห์รูปร่างพื้นฐานของอนุภาค NLC เปล่า ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy หรือ TEM) สามารถวิเคราะห์รูปร่างพื้นฐานของอนุภาค NLC ได้ และนอกจากนี้ยังสามารถบอกขนาดอนุภาคได้โดยคร่าวๆ โดยตัวอย่างจะถูกเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีอัตราส่วน NLC ต่อน้ำปราศจากไอออนเป็น 1:10 (v:v) จากนั้น นำไปหยดลงบน carbon-coated copper grid ที่วางอยู่บนกระดานกรอง 3 ครั้ง เสร็จแล้ววางทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้แห้งสนิท แล้วจึงนำไปย้อมด้วย 2 % phosphotungstic acid ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดสนิท จากนั้นนำออกมาเก็บไว้ในภาชนะที่มืดแห้งสนิท สำหรับรอการวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์ที่กัลลิ้งไฟฟ้า 80 kV และที่กัลลิ้งขยาย 100,000 เท่า

3.8.3 การทดสอบความคงตัวของตำรับ NLC เปล่า ด้วยสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ

เก็บตำรับ NLC ที่บรรจุในภาชนะแก้วโปร่งแสงระบบปิด ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C อุณหภูมิห้อง (มีแสง และไม่มีแสง) และ 45 °C เป็นเวลา 3 เดือน นอกจากนี้นำตำรับไปทดสอบความคงตัวแบบวงจรร้อนสลับเย็น (Heating-cooling cycle) โดยเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับกับ 45 °C 48 ชั่วโมง (คือ 1 วงจร) ทำสลับกันทั้งหมด 6 วงจร เมื่อครบกำหนด นำตำรับที่ผ่านการทดสอบความคงตัวดังกล่าวมาวิเคราะห์ความคงตัวทางกายภาพ จากการสังเกต สี กลิ่น และการแยกชั้น และจากการวัดขนาดอนุภาค คำนวณการกระจายตัวของขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาค (ดังกล่าวในหัวข้อ 3.8.2 ข้อ 1) และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับ

NLC หลังเตรียมเสร็จ เพื่อคัดเลือก NLC ที่คงตัวดี มีลักษณะภายนอกที่ดี ดำรับไม่เกิดการแยกชั้น มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย ในระดับนาโนเมตร มีค่า PDI ที่ต่ำและมีศักย์ไฟฟ้าไม่ต่ำกว่า ± 30 mV เพื่อนำไปกักเก็บสารสกัดดาวเรืองต่อไป

3.9 การพัฒนาตำรับตัวพอลิเมอร์นาโนไขมันชนิด NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.9.1 การเตรียมตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดจากดอกดาวเรือง

การเตรียมตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองนั้น มีขั้นตอนการเตรียมคล้ายกับการเตรียมตำรับ NLC เปล่า (ในหัวข้อ 3.8.1) เพียงแต่ผสมสารละลายสารสกัดดอกดาวเรือง ซึ่งได้แก่ สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (EE) ปริมาณ 1%w/w ในตำรับ และสารสกัด F8 ที่ได้จากการแยก EE ด้วยเทคนิค VCC ปริมาณ 0.2%w/w ในตำรับ ในไขมันหลอม สุดท้าย NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองดังกล่าวที่พัฒนาได้จะถูกนำไปทดสอบความคงตัวทางเคมีกายภาพของสารสกัดในตำรับ

3.9.2 การทดสอบลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรือง

- 1). การวัดขนาด วัดการกระจายตัว และวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาค NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรือง

ใช้วิธีการทดสอบดังการทดลองที่ 3.8.2 หัวข้อที่ 1

- 2). การวิเคราะห์รูปร่างสัณฐานของอนุภาค NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ใช้วิธีการทดสอบดังการทดลองที่ 3.8.2 หัวข้อที่ 2

3.9.3 การทดสอบความคงตัวของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองด้วยสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ

ใช้วิธีการทดสอบดังการทดลองที่ 3.8.3

3.9.4 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC

1) การวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC

จากรายงานการศึกษาของ Phrutivorapongkul และคณะ สามารถแยกสาร quercetagenin ซึ่งเป็นสารสำคัญกลุ่ม flavonol จากสารสกัดดอกดาวเรืองได้[13] ดังนั้น จึงใช้ quercetagenin เป็น marker ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดดอกดาวเรืองและเป็นตัวชี้วัดในการหาปริมาณกักเก็บและการปลดปล่อยสารสำคัญของสารสกัดดอกดาวเรืองในตัวพออนุภาคนาโนไขมัน (NLC) ที่พัฒนาได้โดยใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ รวมถึงการศึกษาความคงตัวของสารสกัด โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญดังกล่าว โดยเปรียบเทียบกับสารละลายของสารสกัด EE และสารสกัด F8 ใน Polyethylene glycol 400 (PEG 400)

1.1) จัดทำกราฟมาตรฐานของ quercetagenin ด้วย UV spectrophotometer

เตรียมสารมาตรฐาน quercetagenin ที่ความเข้มข้น 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ppm จากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360 nm นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความเข้มข้นที่ได้มาสร้างความสัมพันธ์กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) เพื่อนำสมการเส้นตรงที่ได้ไปหาความเข้มข้นของสารเป้าหมายในตัวอย่างและแปรผลความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่ได้เป็นปริมาณสาร

1.2) การทดสอบความคงตัวของ quercetagenin ในสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC

ละลายตำรับ NLC ในตัวทำละลายเอทานอล ในอัตราส่วนโดยปริมาตรของตำรับต่อเอทานอล เป็น 1:5 ในหลอดปั่นเหวี่ยง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 1 นาที ต่อด้วย sonicate 30 นาที เป็นจำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้อนุภาค NLC แยกตัว แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ได้ไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง UV spectrophotometer โดยเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงช่วง 0.2 - 0.8 และใช้สภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับการจัดทำกราฟมาตรฐาน ซึ่งมี quercetagenin เป็นสารสำคัญสำหรับเปรียบเทียบ

ความคงตัวของสารสกัดดอกดาวเรือง (EE และ F8) ที่กักเก็บในตำรับ NLC ซึ่งแสดงในรูปแบบความเข้มข้น (ppm)

2) การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC

ละลายตำรับ NLC ในตัวทำละลายเอทานอล ในอัตราส่วนโดยปริมาตรของตำรับต่อเอทานอล เป็น 3:5 ในหลอดปั่นเหวี่ยง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 1 นาที ต่อด้วย sonicate 30 นาที เป็นจำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้อนุภาค NLC แยกตัว แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ได้ไปใช้วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังการทดลองที่ 3.7 และแปลผลการทดลองเป็นร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.9.5 การทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองในตำรับ NLC

1.1) จัดทำกราฟมาตรฐานของ quercetagenin ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เตรียมสารมาตรฐาน หรือ quercetagenin ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200, 300 และ 400 ppm จากนั้นนำไปกรองผ่านในล่อนเมมเบรน (nylon membrane) ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 μm แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่มีสภาวะดังต่อไปนี้

- 1) เครื่อง High performance liquid chromatography (Agilent[®] hp1100, USA)
- 2) คอลัมน์ คอลัมน์ C₁₈ ($\varnothing$ 4.6 mm $\times$ 250 mm)
- 3) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) อะซิโตนในไตร: เมทานอล: น้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วน 1:1:3 (v/v/v)
- 4) ระบบชะตัวทำละลาย ระบบเดียว (isocratic elution)
- 5) ระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (run time) 15 นาที
- 6) ปริมาตรที่ทำการวิเคราะห์ (injection volume) 10 μl
- 7) อัตราการไหล (flow rate) 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
- 8) เครื่องตรวจวัด (detector) ยูวี ที่ความยาวคลื่น 360 nm

จากนั้น นำ HPLC chromatogram ที่ได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) เพื่อนำสมการเส้นตรงที่

ได้ไปหาความเข้มข้นของสารเป้าหมายในตัวอย่างและแปรผลความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่ได้เป็นปริมาณสาร

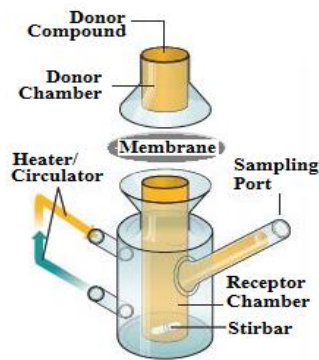
1.2) การแยกสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บใน NLC ออกจากรับ

วิธีการทดสอบนี้ปรับปรุงมาจาก Junyaprasert และคณะ [66] โดยนำมารับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรือง ซึ่งได้แก่ **EE** และ **F8** ไปทำการแยกสารสกัดที่ถูกกักเก็บใน NLC ออกจากสารสกัดที่ไม่ถูกกักเก็บใน NLC โดยใช้ Sephadex column ที่มีน้ำกลั่นและเอทานอลอัตราส่วน 1:4 (v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ เก็บ fraction ที่แยกได้ของสารสกัดที่ถูกกักเก็บใน NLC ซึ่งจะออกมาก่อน และสารสกัดที่ไม่ถูกกักเก็บใน NLC ที่ออกมาตามมาจากนั้น ขจัดตัวทำละลายออกจากแต่ละ fraction ที่เก็บได้ แล้วนำสารสกัดแห้งดังกล่าวที่เก็บได้ใส่หลอดปั่นเหวี่ยง แล้วเติมเมทานอลไปละลายที่ปริมาตร 5 ml เท่ากัน ทั้ง 2 fraction สำหรับสารสกัดที่ถูกกักเก็บใน NLC ที่ละลายในเมทานอลจะผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 1 นาที ต่อด้วย sonicate 30 นาที เป็นจำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้อนุภาค NLC แตกตัว แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ได้ไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดด้วยเครื่อง HPLC แล้วคำนวณหาปริมาณสาร และค่าร้อยละประสิทธิภาพการกักเก็บ ดังสมการข้างล่างนี้

$$\text{หมายเหตุ \% ประสิทธิภาพการกักเก็บ} = \frac{[\text{ปริมาณสารสกัดที่ถูกกักเก็บ}]}{[\text{ปริมาณสารสกัดที่ใส่เริ่มต้น}]} \times 100$$

3.9.6 การทดสอบการปลดปล่อยสารสกัดดอกดาวเรืองในมารับ NLC

ทดสอบหาปริมาณสารสกัดดอกดาวเรืองที่ถูกปลดปล่อยจาก NLC โดยใช้ Franz diffusion cells (ดังแสดงในภาพที่ 3.2) ใช้เยื่อสังเคราะห์ ชนิดเซลลูโลส (cellulose membrane) กั้นระหว่างมารับซึ่งอยู่ที่ donor site (ใส่สารสกัด 3 ml) และสารละลายเอทานอลผสมน้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วนน้ำต่อเอทานอล เป็น 1: 4 ที่อยู่ใน receptor medium เมื่อครบกำหนดเวลา ซึ่งได้แก่ 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง จึงดูดเอาสารละลายในส่วน receptor chamber ออกมาวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเครื่อง HPLC โดยมีการแทนที่ด้วยสารละลายใหม่ทุกครั้ง โดยผลการปลดปล่อยมีการเปรียบเทียบสารละลายของสารสกัดใน PEG 400 เพื่อเป็นตัวแปรควบคุม [67-68] ทั้งนี้ ในการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเครื่อง HPLC จะใช้สภาวะวิเคราะห์เดียวกับที่แสดงในหัวข้อ 3.9.5 ข้อ 1.1



ภาพที่ 3.2 แสดง Franz diffusion cells [69]



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved