

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัดสารสำคัญจากดอกดาวเรือง

ผงดอกดาวเรืองแห้งถูกสกัดแบบต่อเนื่องด้วยชุดเครื่องมือชอกเลต โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล 95% สกัดไล่ชั้นของตัวทำละลายที่ขั้วต่ำไปสูงตามลำดับ จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า สารสกัดหยาบเอทานอล (AE) ให้ร้อยละผลผลิต (% yield) ที่คิดเทียบผงดอกดาวเรืองแห้งสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (EE) และ สารสกัดหยาบ เฮกเซน (HE) โดยมี % yield เป็น 23.83 ± 1.76 , 10.26 ± 1.03 และ 4.45 ± 0.16 ตามลำดับ และจากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่า สารสกัดดอกดาวเรืองโดยส่วนใหญ่มีสารประกอบที่มีความเป็นขั้วสูงปริมาณมาก รองลงมาคือสารประกอบขั้วกลาง และสารประกอบขั้วต่ำ ซึ่งมีปริมาณน้อยที่สุด

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากผงดอกดาวเรืองแห้ง 250 กรัมต่อครั้ง และ % Yield ของสารสกัดหยาบ ซึ่งคิดเทียบจากผงดอกดาวเรืองแห้ง

ครั้งที่สกัด	สารสกัดหยาบ HE		สารสกัดหยาบ EE		สารสกัดหยาบ AE	
	กรัม (g)	% Yield	กรัม (g)	% Yield	กรัม (g)	% Yield
1	11.48	4.59	31.04	12.42	49.21	19.68
2	11.53	4.61	23.25	9.30	60.98	24.39
3	11.23	4.49	22.55	9.02	60.39	24.16
4	10.50	4.20	24.80	9.92	58.83	23.53
5	10.62	4.25	26.76	10.70	61.26	24.50
6	11.44	4.58	25.80	10.32	63.82	25.53
7	11.25	4.50	25.45	10.18	61.08	24.43
8	10.95	4.38	25.57	10.23	61.06	24.42
ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	11.13 $\pm$ 0.40	4.45 $\pm$ 0.16	25.65 $\pm$ 2.58	10.26 $\pm$ 1.03	59.58 $\pm$ 4.41	23.83 $\pm$ 1.76

4.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบ

4.2.1) การตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดด้วยวิธี Shinoda test

Shinoda test ใช้ตรวจสอบฟลาโวนอยด์ที่มี benzo-γ-pyrone อยู่ในโมเลกุล ดังนั้น สารสกัดที่มีฟลาโวนอยด์ เป็นองค์ประกอบจะให้ผลการทดสอบที่เป็นบวก โดย ฟลาโวน จะให้สีส้มแดง ฟลาโวนอลให้สีแดงเข้ม และฟลาวาโนน ให้สีแดงอมม่วง [63] และจากการนำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด ที่สกัดได้ไปทดสอบ Shinoda test พบว่า สารสกัดหยาบชนิด **EE** และ **AE** ให้ผลการทดสอบที่เป็นบวก ยกเว้นสารสกัดหยาบ **HE** ให้ผลการทดสอบที่เป็นลบ จึงสามารถคาดเดาได้ว่า ในสารสกัดหยาบ **EE** และ **AE** มีสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.2.2) การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content) ในสารสกัด

จากการนำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด ที่สกัดได้ดังกล่าวไปวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบพบว่า สารสกัดหยาบ **EE** และ **AE** สามารถตรวจวัดหาปริมาณฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดได้ โดยสารสกัดหยาบ **EE** มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ซึ่งสามารถคิดเทียบเท่าสารมาตรฐานรูตินได้เป็น 287.93 ± 0.19 มิลลิกรัมของน้ำนํักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (หรือ 287.93 ± 0.19 mg RE/g of dry extract) ส่วนสารสกัดหยาบ **AE** ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่น้อยกว่าสารสกัดหยาบ **EE** โดยมีปริมาณฟลาโวนอยด์เป็น 79.50 ± 0.14 mg RE/g of dry extract ทั้งนี้ สารสกัดหยาบ **HE** ไม่สามารถตรวจวัดหาปริมาณฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัด

สารสกัดหยาบ	องค์ประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัด	
	Shinoda test	TFC (mg RE/g of dry extracts $\pm$ SD)
HE	-	ND
EE	+	287.93 ± 0.19
AE	+	79.50 ± 0.14

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจวัดได้ หรือ Not determined และ

TFC หมายถึง total flavonoid content

จากผลการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดที่สกัดได้ พบว่า สารสกัดหยาบที่มีขั้ว ดังเช่น สารสกัดหยาบ **EE** และ **AE** พบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ โดยพบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบ **EE** มีปริมาณสูงที่สุด จากผลการทดลองนี้ประกอบกับข้อมูลการศึกษาที่รายงานเกี่ยวกับสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ [2-3] ซึ่งไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตเมลานินหรือเม็ดสีผิว [3-5] ทำให้ผู้ศึกษาสนใจนำสารสกัดหยาบ **EE** ที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดไปทำการแยกสารด้วยเทคนิค VCC เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานของผู้ศึกษาที่ว่า หากแยกสารสกัดที่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (แยกสารประกอบกลุ่มอื่นออกไปได้มากขึ้น) อาจส่งผลให้ได้สารสกัด fraction ที่มีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ **EE**

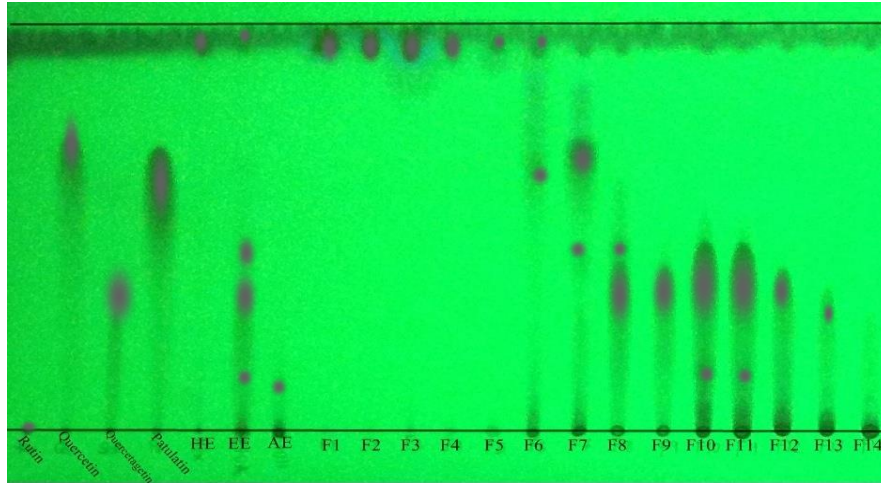
4.3 การแยกสารสกัดหยาบ **EE** ด้วยเทคนิค Vacuum Column Chromatography (VCC)

การแยกสารสกัดหยาบ **EE** ด้วยเทคนิค VCC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไล่ขั้วต่ำไปสูง (gradient elution) คือจากตัวทำละลายอินทรีย์ 100% เฮกเซน ถึง 30% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท สามารถรวม fraction ของสารสกัดที่มีรูปแบบ TLC โครมาโทแกรมที่เหมือนกันไว้ด้วยกัน รวมมีทั้งหมด 14 fractions ดังแสดง TLC โครมาโทแกรมในภาพที่ 4.1 (ก-ข) และแสดง % yield ของสารสกัดแต่ละ fraction ที่แยกได้ในตารางที่ 4.3

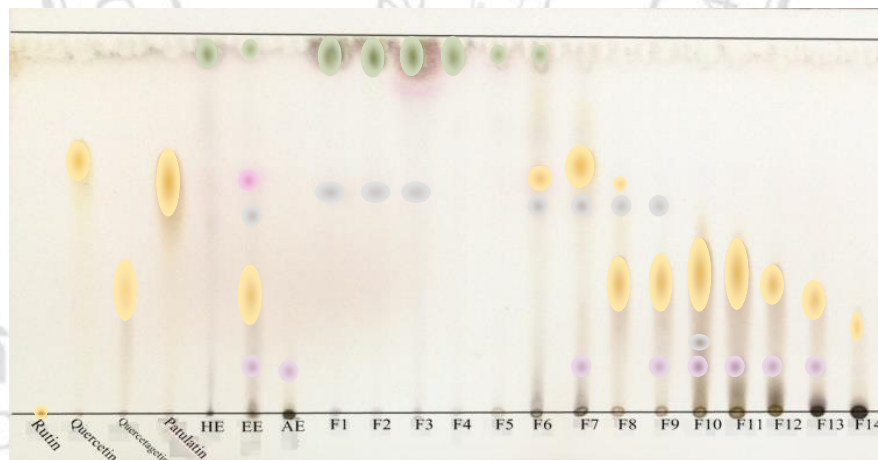
TLC โครมาโทแกรมแสดงในภาพที่ 4.1 (ก-ข) มีการใช้สารมาตรฐานกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งได้แก่ rutin, quercetin, quercetagenin และ patuletin เปรียบเทียบกับ สารสกัดหยาบ **HE**, **EE**, **AE** และ สารสกัด **F13-F14** ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ **EE** เมื่อชะสารดังกล่าวด้วยระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็น เฮกเซน: เอทิลอะซิเตท: อะซิโตน ในอัตราส่วน 2:2:1 พบว่า สารมาตรฐาน quercetagenin มีค่า $R_f = 0.36$ พบได้ใน สารสกัดหยาบ **EE** และสารสกัด **F8-F13** โดยแสดงอย่างชัดเจนทั้งบน TLC โครมาโทแกรมที่ตรวจสอบภายใต้ยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm และบน TLC โครมาโทแกรมที่พ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde sulphuric acid ส่วนสารมาตรฐาน patuletin มีค่า $R_f = 0.60$ พบได้ในสารสกัดหยาบ **EE** และสารสกัด **F6-F8** อย่างชัดเจนบน TLC โครมาโทแกรมที่พ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde sulphuric acid

ดังนั้นจะพบว่า สารสกัดดอกดาวเรืองที่แยกได้นั้นมี quercetagenin เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ และจากตารางที่ 4.3 พบว่า **F8** มีองค์ประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสูงที่สุด และมีฤทธิ์ยับยั้งการ

ทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส สูงที่สุดเช่นกัน ผู้วิจัยจึงเลือก **F8** นี้มาพัฒนาตัวพออนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารสกัดดอกดาวเรือง โดยใช้ quercetagenin เป็นสารบ่งชี้ในการประเมินประสิทธิภาพ และความคงตัวของตำรับที่พัฒนาขึ้น



ก) TLC โครมาโทแกรมที่ดูภายใต้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
เมื่อ HE= สารสกัดหยาบเฮกเซน, EE= สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท, AE= สารสกัดหยาบเอทานอล
และ F1-F14= สารสกัด fraction 1 ถึง 14 จาก EE



ข) TLC โครมาโทแกรมที่พ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde sulphuric acid
เมื่อ HE= สารสกัดหยาบเฮกเซน, EE= สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท, AE= สารสกัดหยาบเอทานอล
และ F1-F14= สารสกัด fraction 1 ถึง 14 จาก EE

ภาพที่ 4.1 แสดง TLC โครมาโทแกรมของสารสกัด (fraction) ที่แยกได้จาก **EE** ด้วยเทคนิค VCC, สารสกัดหยาบ และสารเปรียบเทียบกับเฟสเคลื่อนที่ เฮกเซน:เอทิลอะซิเตท:อะซิโตน ในอัตราส่วน 2:2:1

ตารางที่ 4.3 แสดง % yield ของสารสกัดหยาบ และ fraction ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ EE ด้วยเทคนิค VCC โดยคิดเทียบเท่าผงดอกดาวเรืองแห้ง ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารสกัด	ลักษณะทางกายภาพ	เฟสเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	% Yield	องค์ประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัด		Tyrosinase Inhibition (TI) [(IC ₅₀ (μg/ml)]
					Shinoda test	TFC (mg RE/g of dry ext.±SD)	
HE	เหลือง-น้ำตาลเข้ม	Hex.	11.13±0.40	4.45±0.16	-	ND	ND
EE	เหลือง-น้ำตาลเข้ม	EtOAc	25.65±2.58	10.26±1.03	+	287.93±0.19	261.20±1.03
AE	เหลือง-น้ำตาลเข้ม	95% EtOH	59.58±4.41	23.83±1.76	+	79.50±0.14	3668.85±3.32
Fractions (F)							TI (IC ₅₀ (μg/ml)
F1	เหลือง-ส้มเข้ม	100% Hex.	0.1076	0.0551	-	ND	ND
F2	เหลือง-ส้มเข้ม	1% EtOAc/ Hex.	0.0540	0.0277	-	ND	ND
F3	เหลือง-น้ำตาล	3,5,10% EtOAc/ Hex.	0.2310	0.1184	-	ND	ND
F4	เขียวขี้ม้า-น้ำตาล	20% EtOAc/ Hex.	0.1138	0.0583	-	ND	ND
F5	เขียวขี้ม้า-น้ำตาล	70,80% EtOAc/ Hex.	0.1052	0.0539	-	ND	ND
F6	เขียวขี้ม้า-น้ำตาล	50% EtOAc/ Hex.	0.2322	0.1190	+	95.36±0.33	174.31±1.78
F7	เขียวขี้ม้า-น้ำตาล	50% EtOAc/ Hex.	0.2248	0.1152	+	278.31±0.33	57.06±1.23
F8	เขียวขี้ม้า-น้ำตาล	30% EtOAc/ Hex.	1.0196	0.5225	+	475.56±0.38	50.73±0.56
F9	เหลือง-น้ำตาล	30% EtOAc/ Hex.	2.5531	1.3085	+	441.91±0.00	95.51±0.42
F10	น้ำตาลเข้ม	100% EtOAc	1.9044	0.9760	+	308.66±0.23	126.40±1.12
F11	น้ำตาลเข้ม	100% EtOAc	0.6098	0.3125	+	214.26±0.00	151.60±1.44
F12	น้ำตาลเข้ม	1,3% MeOH/EtOAc	0.8842	0.4532	+	193.14±0.00	166.51±1.02
F13	น้ำตาลเข้ม	5,10% MeOH/EtOAc	5.8327	2.9893	+	93.75±0.19	1177.17±1.93
F14	น้ำตาลเข้ม	20,30% MeOH/EtOAc	4.9608	2.5424	+	78.05±0.00	3625.94±4.83
สารเปรียบเทียบ							TI (IC ₅₀ (μg/ml)
สารบริสุทธิ์มาตรฐาน		Kojic acid					7.70±0.08
		Quercetin					33.08±1.31
		Vitamin C					84.14±0.29
		Beta-arbutin					536.70±3.22
สารสกัดในท้องตลาด		Mulberry					43.55±1.73
		Lakoocha					12.37±1.41
		Pomegranate					164.83±3.30
สารองค์ประกอบในดอกดาวเรือง		Quercetagenin					70.89±0.42
		Patulatin					94.99±1.40

หมายเหตุ ND = ไม่สามารถตรวจวัดได้ หรือ Not determined, Hex. = ตัวทำละลายอินทรีย์ *n*-Hexane, TFC = total flavonoid content,

HE = สารสกัดหยาบเฮกเซน, EE = สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต, AE = สารสกัดหยาบเอทานอล และ F1 ถึง F14 = สารสกัด

fraction 1-14 จาก EE

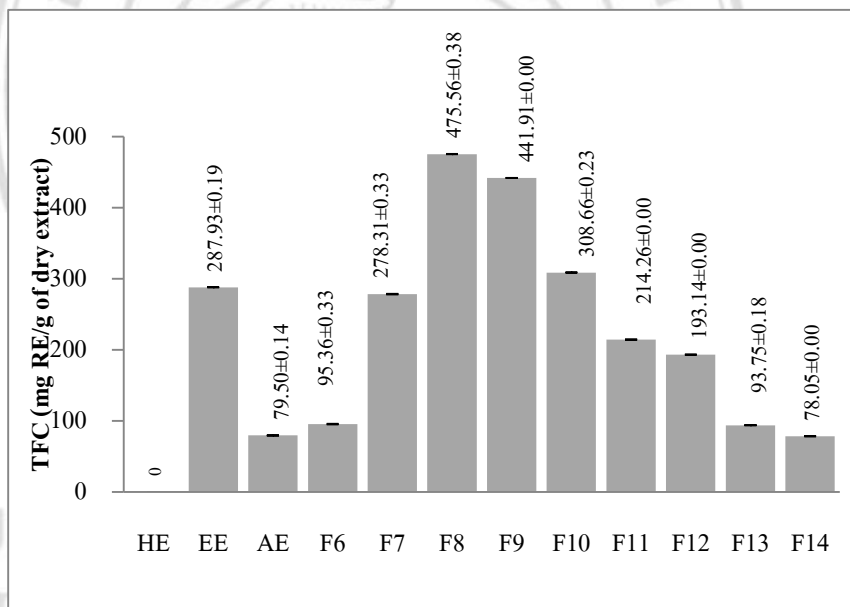
4.4 การหาสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัด F1-F14

4.4.1) การตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัด (F1-F14) ด้วยวิธี Shinoda test

จากผลการทดสอบเชิงคุณภาพทางเคมีเบื้องต้น เพื่อหาสารสกัด fraction ที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี Shinoda test ดังปรากฏในตารางที่ 4.3 พบว่า สารสกัด fraction ที่ให้ผลเชิงบวกกับปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ **F6-F14** ส่วนสารสกัด **F1-F5** ให้ผลลบ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าในสารสกัด **F6-F14** มีสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบในสารสกัด

4.4.2) การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content) ในสารสกัด (F1-F14)

กราฟที่ 4.1 แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบและ fraction



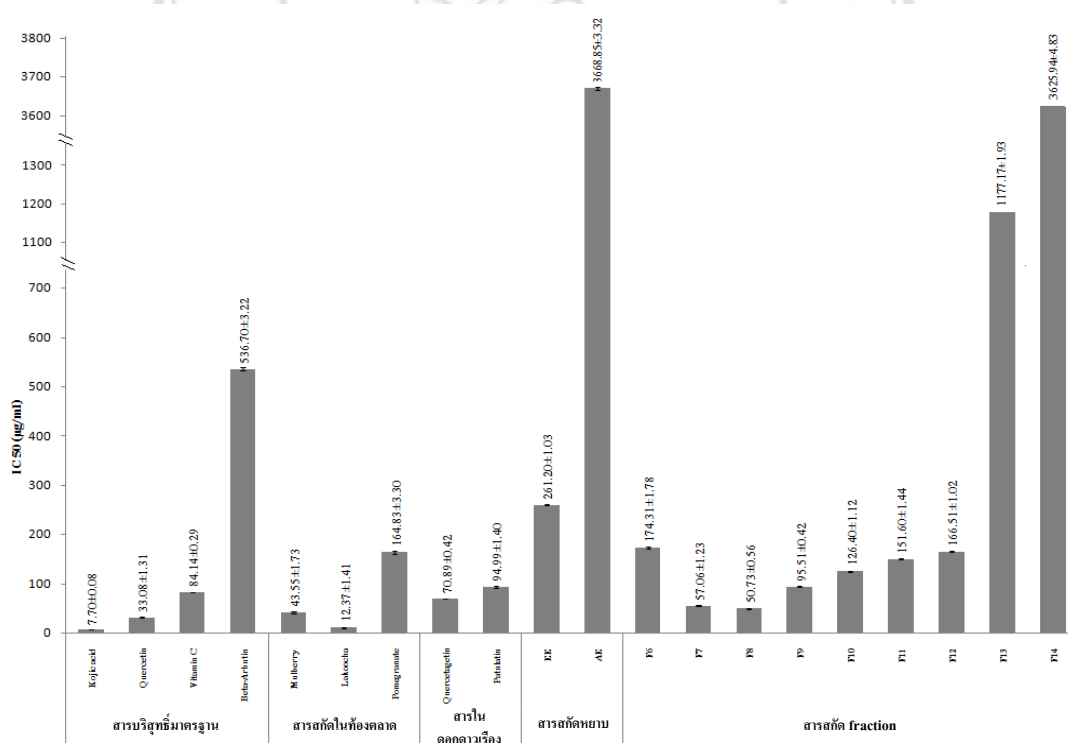
หมายเหตุ TFC หมายถึง total flavonoid content

จากการนำสารสกัดแต่ละ fraction ที่แยกได้จาก **EE** ดังกล่าวไปวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์และเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดหยาบ พบว่า สารสกัด **F6-F14** สามารถตรวจวัดหาปริมาณฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดได้ โดยสารสกัดที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบมากที่สุด คือ สารสกัด **F8** ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์สามารถคิดเทียบเท่าสารมาตรฐานรูตินได้เป็น 475.56 ± 0.38 มิลลิกรัมของน้ำหนักรวบรวมสารสกัดแห้ง 1 กรัม (หรือ 475.56 ± 0.38 mg RE/g of dry extract) นอกจากนี้พบว่า สารสกัด **F8** มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดหยาบ **EE** ถึง 1.65

เท่า เนื่องมาจากการแยกสารสกัดด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี (VCC) ช่วยทำให้ได้ fraction ที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบมีสัดส่วนมากขึ้น สามารถแยกออกจากสารกลุ่มอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบในดอกดาวเรืองได้ ทั้งนี้ สารสกัด **F1-F5** ไม่สามารถตรวจวัดหาปริมาณฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลทดสอบฟลาโวนอยด์เชิงคุณภาพ (ในหัวข้อ 4.4.1 ข้อ 1) จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัด **F1-F5** ไม่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงในตารางที่ 4.3 และกราฟที่ 4.1

4.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี mushroom tyrosinase inhibitory assay

กราฟที่ 4.2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารเปรียบเทียบต่างๆ สารในดอกดาวเรือง และสารสกัดดอกดาวเรือง



หมายเหตุ HE= สารสกัดหยาบเฮกเซน, EE= สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต, AE= สารสกัดหยาบเอทานอล และ F1 ถึง F14= สารสกัด fraction 1- fraction 14 ที่แยกได้จาก EE

ในการหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดของการทดลองนี้ เป็นการศึกษาความสามารถของสารสกัดดอกดาวเรืองในการยับยั้งไทโรซิเนสที่ทำหน้าที่ในขั้นตอนที่ 2 ของ

กระบวนการผลิตเมลานินในเซลล์เมลานोไซต์ของผิวหนัง หรือกระบวนการออกซิเดชันของ L-DOPA เป็น dopachrome ก่อนที่จะเกิดกระบวนการ polymerization ให้ผลผลิตเป็นเมลานิน [3] โดยการศึกษาเลือกใช้ kojic acid, beta-arbutin, quercetin และ vitamin C เป็นสารมาตรฐานที่เป็นตัวแทนของสารบริสุทธิ์ที่นิยมผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาวที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป และสารเหล่านี้มักถูกใช้เป็นสารมาตรฐานในงานวิจัยทั่วไปอีกด้วย สารสกัด mulberry, lakoocha และ pomegranate เป็นตัวแทนของสารสกัดในท้องตลาดที่นิยมใช้ในภาคอุตสาหกรรมเครื่องสำอางที่นิยมผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาวที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไปเช่นกัน ส่วน quercetagenin และ patulatin ใช้เป็นสารมาตรฐานที่เป็นตัวแทนของสารองค์ประกอบที่แยกได้จากดอกดาวเรือง [13] ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงนำมาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดดาวเรือง ซึ่งได้แก่ สารสกัดหยาบจากดอกดาวเรืองที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ (EE และ AE) และสารสกัดแต่ละ fraction ที่แยกได้ซึ่งมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ (F6-F14)

จากผลการทดลองดังแสดงในกราฟที่ 4.2 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบและแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารต่างๆ ที่นำมาทดสอบ โดยแสดงผลการทดสอบในค่า IC_{50} พบว่า สารสกัดหยาบ EE ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบด้วยกัน (จากการทดลองที่ 4.2.3) นั้น ให้ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดด้วยเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} เป็น $261.20 \pm 1.03 \mu\text{g/ml}$ และเมื่อนำสารสกัดหยาบ EE ไปแยกด้วยเทคนิค VCC พบว่า สารสกัด fraction 8 (F8) ที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดในสารสกัดที่แยกได้ทั้งหมด และยังให้ฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดหยาบ EE ถึง 5.15 เท่า โดย F8 มีค่า IC_{50} เป็น $50.73 \pm 0.56 \mu\text{g/ml}$ ส่วนสารสกัด fraction อื่นๆที่แยกได้ และ มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบนั้น พบว่า F6-F7 และ F9-F12 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มากกว่า สารสกัดหยาบ EE แต่น้อยกว่า F8 อาจเป็นเพราะในสารสกัด F8 มีสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นองค์ประกอบอยู่มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด fraction อื่นๆที่แยกได้ ดังนั้น จะเห็นว่าสารสกัดที่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์อยู่ในสัดส่วนที่มากขึ้น ก็มีแนวโน้มในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นเช่นกัน (ตารางที่ 4.3)

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด F8 กับสารบริสุทธิ์มาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัยทั่วไป พบว่า สารสกัด F8 มีฤทธิ์ที่ดีกว่า beta-arbutin ($IC_{50} = 536.70 \pm 1.73 \mu\text{g/ml}$) ประมาณ 10.57 เท่า และ vitamin C ($IC_{50} = 84.14 \pm 2.85 \mu\text{g/ml}$) ประมาณ 1.66 เท่า แต่มีฤทธิ์น้อยกว่า kojic acid และ quercetin เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ดังกล่าวของ F8 กับสารสกัดในท้องตลาดที่นิยมในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางทั่วไป พบว่า F8 ให้ฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกับสารสกัด

mulberry ($IC_{50}=43.55\pm1.41$ $\mu\text{g/ml}$) และให้ฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดทับทิม หรือ pomegranate ($IC_{50}=164.83\pm3.30$ $\mu\text{g/ml}$) ประมาณ 3.25 เท่า แต่ฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดมะหาด (lakoocha) ซึ่งมี oxyresveratrol เป็นองค์ประกอบ แต่อย่างไรก็ตามสารที่เป็นองค์ประกอบในดอกดาวเรืองและใน F8 ซึ่งได้แก่ patulatin และ quercetagenin ให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วย IC_{50} เป็น 94.99 ± 1.31 $\mu\text{g/ml}$ และ 70.89 ± 1.40 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ F8 แล้ว พบว่า ทั้ง patulatin และ quercetagenin มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่น้อยกว่า F8 ประมาณ 1.87 เท่า และ 1.40 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า การที่ F8 มีฤทธิ์ที่ดีกว่าเป็นผลมาจากฤทธิ์เสริมของสารที่เป็นองค์ประกอบอื่นๆนอกเหนือจากการมี quercetagenin และ patulatin เป็นองค์ประกอบ

4.6 การพัฒนาตำรับตัวพาทานูภาคนาโนไขมันชนิด NLC เปล่า

4.6.1 วิธีการเตรียมตำรับ NLC เปล่า

ขั้นตอนที่ 1: ตำรับ NLC เปล่าได้พัฒนาขึ้นจากการคัดเลือกสารที่จะนำมาตั้งตำรับ ซึ่งประกอบด้วย สาร stearyl alcohol, cetyl alcohol และ hydrogenated palm glyceride ที่เป็นไขมันแข็งในตำรับ สาร olive oil และ isopropyl myristate เป็นไขมันเหลวในตำรับ สาร span 80 และ cetareth-25 ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ สาร BHT ทำหน้าที่เป็นสารกันหืนในตำรับ และใช้ methyl paraben และ propyl paraben เป็นสารกันเสียในตำรับ

ขั้นตอนที่ 2: ในแต่ละตำรับ NLC เปล่าที่พัฒนาขึ้นจะมีการคำนวณค่า HLB จากค่า required HLB ของไขมันและน้ำมันที่ใช้ในตำรับนั้นๆ เพื่อนำมาหาปริมาณ และอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในตำรับได้อย่างเหมาะสม เพื่อให้ตำรับเกิดความคงตัวที่ดี ซึ่งค่า HLB ของตำรับ NLC เปล่าที่เตรียมได้มีค่าโดยประมาณอยู่ที่ 9-10 ซึ่งเหมาะแก่การเกิดอิมัลชันชนิด o/w ได้ [70]

ขั้นตอนที่ 3: เตรียมตำรับ NLC แต่ละตำรับจะถูกเตรียมโดยหลอมไขมันที่อุณหภูมิสูง 75°C และผสมเข้ากับสารละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิวที่อุณหภูมิเดียวกัน ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมเป็นเนื้อเดียว (homogenizer) ด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm จนเกิดเป็นอิมัลชันเริ่มต้น (pre-emulsion) ชนิด o/w emulsion ที่ร้อน แล้วนำไปผ่านเครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่ความดันสูง ที่อุณหภูมิ 75°C โดยทั่วไปใช้ความดัน 1000 บาร์ จำนวน 5 รอบ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องให้ตกผลึก หรือเกิดเป็น emulsion droplets crystallize เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงได้ NLC

ขั้นตอนที่ 4: ปรับสูตรตำรับโดยคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อลักษณะ NLC ที่ควรจะมีคุณสมบัติแขวนลอย (suspension) ในลักษณะอนุภาคไขมันของแข็งแขวนลอยในของเหลวได้อย่างคงตัวซึ่งปัจจัยที่ต้องการพัฒนาจากตำรับดั้งเดิม ได้แก่

1. อัตราส่วนไขมันแข็งต่อไขมันเหลวในตำรับ จากการศึกษาพบว่า ช่วงอัตราส่วนที่เหมาะสมสามารถใช้ในตำรับนี้คือ ช่วงอัตราส่วนไขมันแข็งต่อไขมันเหลว ตั้งแต่ 1:1 ถึง 1:4 ซึ่งอัตราส่วนช่วงนี้ทำให้ไขมันผสมกันแล้วยังคงเป็นของแข็งได้เมื่อดึงทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง
2. ไขมันและน้ำมันทั้งหมดในตำรับ จากการศึกษาพบว่า ไขมันและน้ำมันทั้งหมดในตำรับควรมีไม่เกิน 10% ซึ่งใน 10% นี้ควรเป็นส่วนของไขมันแข็งไม่เกิน 2-2.5% เพราะหากมากกว่านี้ตำรับจะเริ่มหนืดจากการมีไขมันแข็งได้ และควรเป็นส่วนไขมันเหลวไม่เกิน 7.5-8% เพราะตำรับจะเกิดการแยกชั้นจากการมีไขมันเหลวที่มากเกินไป
3. สารลดแรงตึงผิวในตำรับสามารถใช้ได้สูงที่สุดไม่เกิน 10% ที่ทำให้ตำรับที่ได้มีความคงตัวที่ดี และหากใช้ในปริมาณที่สูงขึ้นจะส่งผลทำให้ตำรับข้นหนืดขึ้น

ทั้งนี้ แนวทางการพัฒนาสูตรของตำรับ NLC เปล่า คือการปรับที่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อตำรับดังกล่าวในข้างต้น ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ NLC เปล่าที่พัฒนาได้มีส่วนประกอบในตำรับ และค่าความคงตัวทางกายภาพ ซึ่งได้แก่ ขนาดอนุภาค, ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (PdI), ค่าศักย์ซีต้าของอนุภาค และค่าความเป็นกรด – ด่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 แนวทางการพัฒนาสูตรตำรับ NLC เปล่า

ปัจจัยที่มีผลต่อตำรับ	ตำรับดั้งเดิม	ตำรับพัฒนา								
1. ไขมันแข็งต่อไขมันเหลว	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
2. ไขมันในตำรับ	5%	5%	5%	5%	5%	6%	8%	10%	12	10
3. สารลดแรงตึงผิว	6%	6%	6%	6%	6%	6%	8%	10%	10	12
ลักษณะกายภาพของตำรับที่ได้	ไม่แยกชั้น เหลว				ไม่แยกชั้น แต่ข้นหนืด		ไม่แยกชั้น เหลว		ไม่แยกชั้น แต่ข้นหนืด	

4.6.2 การทดสอบลักษณะทางกายภาพและการทดสอบความคงตัวของตำรับ NLC เปล่า ด้วยสถานะเร่งจากอุณหภูมิ

เมื่อตำรับ NLC เปล่า ที่พัฒนาได้ ทั้งหมด 5 ตำรับ (ดังตารางที่ 4.5) ผ่านการทดสอบความคงตัวทางกายภาพด้วย Heating-Cooling 6 วงจร พบว่า ตำรับ NLC เปล่า ทุกตำรับมีขนาดอนุภาคที่ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน และน้อยกว่า 200 nm ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีเหมาะสมกับ

ระบบนำส่งสู่ผิวหนัง มีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (PDI) โดยประมาณ 0.2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ดี [59] ยกเว้นตัวรับ E ที่มีค่าโดยประมาณอยู่ที่ 0.3 ซึ่งสูงกว่าตัวรับอื่นๆ ทุกตัวรับมีค่าศักย์ไฟฟ้าไม่ต่างจากเดิม ซึ่งมีค่าศักย์ไฟฟ้าโดยประมาณ ± 25 mV หากแปรผลตามทฤษฎีจัดอยู่ในกำหนดช่วง ± 10 ถึง ± 30 ซึ่งหมายถึง อนุภาคมีความคงตัวพอใช้ [59] แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาตัวรับนี้ได้ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) จึงอาจส่งผลให้มีค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณผิวอนุภาคมีค่าที่ต่ำได้ เพราะเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุไม่ได้ทำให้เกิดความคงตัวของอนุภาค โดยการทำให้อนุภาคผลัดกันตามความเหมือนของขั้วประจุที่อยู่ใกล้กันแล้วผลัดกันดังเช่นสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุ แต่สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุจะทำให้เกิดความคงตัวของขนาดอนุภาคโดยการเกิด steric effect ของโครงสร้างตัวมันเองที่มีโครงสร้างใหญ่เตอะเตะ และมีสายโซ่ที่ยาว [71] ในทุกสถานะการทดสอบของทุกตัวรับมีค่า pH ที่ไม่แตกต่างจากเดิมและมีความใกล้เคียงกัน ที่ค่าเฉลี่ย 6.2 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะเนื้อตัวรับ พบว่าทุกตัวรับไม่มีการแยกชั้นเกิดขึ้นแต่อย่างไรเพราะทุกตัวรับจะมีค่า HLB อยู่ในช่วง 9-10 ซึ่งสามารถเกิดเป็นอิมัลชันชนิด o/w ได้ [70] แต่ตัวรับ A และ B ยังคงมีลักษณะเนื้อของตัวรับเป็นเนื้อเดียวกันที่ดีกว่าตัวรับ C และ D ซึ่งพบว่าเนื้อตัวรับเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะเนื้อเป็นเม็ดๆ วาวๆ ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะลักษณะทางเคมีกายภาพของไขมัน stearyl alcohol และ cetyl alcohol ที่น่าจะส่งผลต่อลักษณะเนื้อตัวรับ ในขณะที่เมื่อนำไขมันแข็ง stearyl alcohol และ cetyl alcohol ผสมกับไขมันแข็ง hydrogenated palm glycerides แล้วจะส่งผลให้มีเนื้อตัวรับที่ดีกว่า ดังเช่น ตัวรับ A, B และ E

ส่วนตัวรับ E ถึงแม้ว่าจะผ่านการทดสอบความคงตัวทางกายภาพด้วยสถานะเร่งจากอุณหภูมิแบบวงจรร้อนสลับเย็น โดยที่ตัวรับไม่ได้เกิดการแยกชั้นแต่อย่างใดและยังคงความเป็นเนื้อเดียวกันที่ดี แต่ทั้งนี้ก็มีขนาดอนุภาค NLC ที่ขนาดใหญ่ ซึ่งอาจเป็นเพราะการผสมไขมันแข็งหลายชนิดเข้าด้วยกัน ส่งผลให้โครงสร้างเกิดการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบมากขึ้น ขนาดอนุภาคจึงใหญ่ขึ้นและนอกจากนี้ ตัวรับ E ยังให้ความแตกต่างของขนาดอนุภาคที่สูงกว่าตัวรับอื่นๆ มีค่า PDI = 0.3 โดยประมาณ ซึ่งการมีความแตกต่างของขนาดอนุภาคที่สูงจะส่งผลให้ตัวรับเกิดความไม่คงตัวของตัวรับขึ้นในภายหลังด้วยอาจเกิดปรากฏการณ์ Ostwald ripening [72]

ดังนั้นตัวรับ A และ B ที่พัฒนาได้จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบความคงตัวโดยการนำตัวรับไปไว้ที่ 4 สถานะ ซึ่งได้แก่ 4 °C, 45 °C, อุณหภูมิห้องที่มีแสง (Light Room Temperature หรือ LRT) และอุณหภูมิห้องไม่มีแสง (Dark Room Temperature หรือ DRT) เป็นเวลา 3 เดือน และวัดความคงตัวทางเคมีกายภาพเมื่อครบกำหนดวันที่ 30, 60 และ 90 เปรียบเทียบผลการ

ทดสอบของวันที่ 0 จากการทดสอบความคงตัวทางกายภาพ พบว่า ทั้ง 2 คำรับ มีความคงตัวที่ดี เนื้อคำรับเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน มีสีขาวขุ่น มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงไม่เกิน 200 nm มีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคคงเดิมและอยู่ในเกณฑ์ที่ดีประมาณ 0.2 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใกล้เคียงเดิมโดยประมาณ ± 25 mV ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.6-4.7 ทั้งนี้ คำรับ NLC เปล่า A และ B ที่พัฒนาขึ้นจะใช้ชื่อย่อเป็น A_Base และ B_Base ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 แสดงสัดส่วนสารประกอบในคำรับ NLC เปล่าที่พัฒนาได้ ผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพ และการทดสอบความคงตัวของคำรับ NLC เปล่าที่สภาวะ

Heating – Cooling Cycle 6 รอบ

สูตรคำรับ		A	B	C	D	E
Stearyl alcohol		1	1	1	0.5	0.5
Cetyl alcohol		-	-	-	0.5	0.5
HPG		1	1	-	-	0.5
ค่า HLB ของสูตร		9.749	9.55	10.5	10.5	10.09
%สารลดแรงตึงผิว		10	10	10	10	10
%ไขมันแข็ง		2	2	1	1	1.5
%ไขมันเหลว		4	8	4	4	4
ไขมันแข็ง: ไขมันเหลว		1: 2	1: 4	1: 4	1: 4	3: 8
วันที่ 0	pH	6.10 $\pm$ 0.10	6.22 $\pm$ 0.01	6.23 $\pm$ 0.01	6.21 $\pm$ 0.01	6.21 $\pm$ 0.10
	ลักษณะกายภาพ	เนื้อขาว มีความเป็นเนื้อเดียวกัน	เนื้อขาว มีความเป็นเนื้อเดียวกัน	เนื้อขาว มีความเป็นเนื้อเดียวกัน	เนื้อขาว มีความเป็นเนื้อเดียวกัน	เนื้อขาว มีความเป็นเนื้อเดียวกัน
HC	pH	6.23 $\pm$ 0.02	6.18 $\pm$ 0.01	6.20 $\pm$ 0.10	6.14 $\pm$ 0.05	6.14 $\pm$ 0.10
	ลักษณะกายภาพ	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน	ขาวขุ่น เนื้อเป็นเม็ดๆ แต่ไม่แยกชั้น	ขาวขุ่น เนื้อเป็นเม็ดๆ แต่ไม่แยกชั้น	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน

หมายเหตุ HC = สภาวะ Heating –Cooling Cycle และ HPG = Hydrogenated Palm Glycerides

ตารางที่ 4.6 แสดงความคงตัวทางกายภาพของตำรับ NLC เปล่า ตำรับ A (A_base) และ B (B_base) ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ

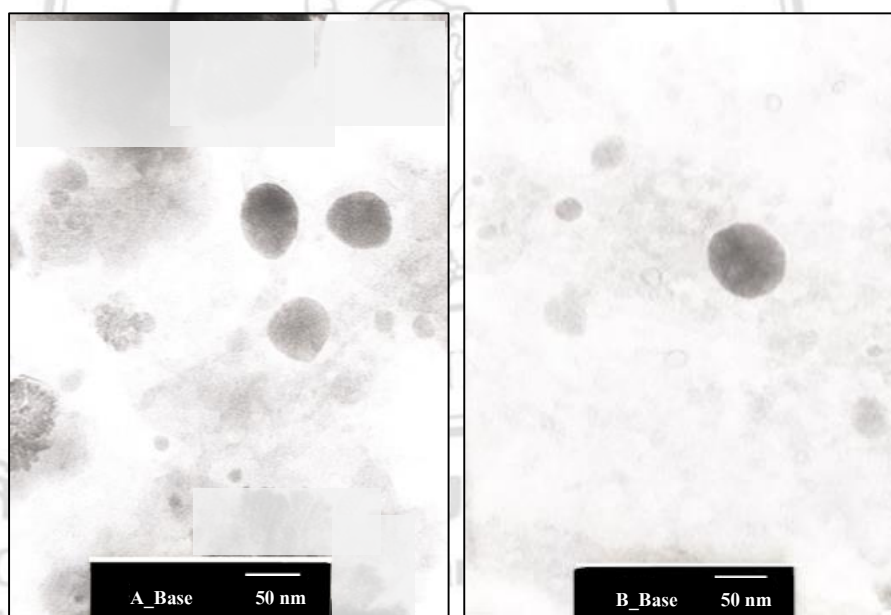
สูตร ตำรับ	สภาวะ/ วันที่ทดสอบ	ขนาดอนุภาค (nm)	PdI	ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	pH	ลักษณะทางกายภาพ
A_base	วันที่ 0	119.13±5.00	0.22±0.01	-26.30±0.82	6.10±0.10	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	HC	120.20±8.3	0.21±0.01	-25.33±0.21	6.23±0.02	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	LRT	วันที่ 30	0.19±0.02	-20.93±0.40	6.37±0.20	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 60	0.18±0.02	-22.35±0.21	6.29±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 90	0.21±0.01	-23.60±0.65	6.33±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	DRT	วันที่ 30	0.19±0.00	-28.33±0.85	6.32±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 60	0.18±0.01	-24.80±0.44	6.41±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 90	0.19±0.01	-28.80±0.44	6.33±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	4°C	วันที่ 30	0.19±0.00	-20.33±0.32	6.08±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 60	0.22±0.01	-28.65±1.34	6.35±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 90	0.22±0.00	-20.50±0.03	6.10±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	45°C	วันที่ 30	0.19±0.02	-18.17±0.70	5.78±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 60	0.18±0.02	-27.85±1.91	6.02±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 90	0.17±0.01	-26.50±0.18	6.23±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
B_base	วันที่ 0	112.67±5.82	0.25±0.01	-24.03±1.09	6.22±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	HC	122.10±4.93	0.18±0.01	-25.57±1.02	6.18±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	LRT	วันที่ 30	0.23±0.01	-23.03±0.49	6.34±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 60	0.24±0.01	-24.85±0.21	6.90±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 90	0.26±0.00	-26.00±0.52	6.40±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	DRT	วันที่ 30	0.25±0.08	-25.63±0.67	6.39±0.02	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 60	0.24±0.44	-23.77±1.93	6.39±0.02	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 90	0.21±0.01	-27.78±0.30	6.42±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	4°C	วันที่ 30	0.25±0.01	-23.27±1.82	6.25±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 60	0.24±0.00	-24.85±1.34	6.44±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 90	0.25±0.01	-22.60±1.19	6.22±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
	45°C	วันที่ 30	0.23±0.02	-21.60±1.06	5.88±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 60	0.18±0.01	-31.50±0.85	6.06±0.00	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน
		วันที่ 90	0.22±0.01	-22.10±0.30	6.18±0.01	ขาวขุ่น เหลว เนื้อเดียวกัน

หมายเหตุ HC = สภาวะ Heating –Cooling Cycle, LRT = สภาวะอุณหภูมิห้องที่มีแสง และ DRT = สภาวะอุณหภูมิห้องที่ไม่มีแสง

ตารางที่ 4.7 ลักษณะกายภาพของตำรับ NLC เปล่า (A_Base และ B_Base) ที่ผ่านการทดสอบ
สภาวะเร่งจากอุณหภูมิ

สภาวะทดสอบ ตำรับ NLC เปล่า	วันที่ 0	HC	วันที่ 90			
			LRT	DRT	4°C	45°C
A_Base						
B_Base						

4.6.3 การวิเคราะห์รูปร่างพื้นฐานของอนุภาค NLC เปล่า ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องผ่าน



ก. A_Base

ข. B_Base

ภาพที่ 4.2 รูปร่างพื้นฐานของตัวพาอนุภาคไขมันแข็งชนิด NLC เปล่า

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านใช้วิเคราะห์ขนาดและรูปร่างพื้นฐานของอนุภาคตัวพา NLC เปล่า ที่พัฒนาได้ ซึ่งได้แก่ A_Base และ B_Base ผลการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 4.2 (ก และ ข) ทั้ง 2 ตำรับมีลักษณะอนุภาคค่อนข้างกลมและมีขนาดอนุภาคโดยคร่าวไม่เกิน 200 nm และไม่พบการเกิดความไม่คงตัวของตำรับจาก Ostwald ripening แต่อย่างใด ซึ่ง

ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการวัดขนาดอนุภาคและค่า PDI ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง Zetasizer® ดังปรากฏในตารางที่ 4.6

4.7 การพัฒนาตัวรับตัวพาสานนาโนไขมันชนิด NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

4.7.1 วิธีการเตรียมตัวรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดจากดอกดาวเรือง

ตัวรับ A_Base และ B_Base ที่พัฒนาได้ถูกนำมาบรรจุสารสกัดดอกดาวเรืองที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเลือกสารสกัดหยาบ EE ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดในสารสกัดหยาบทั้งหมด และเลือกสารสกัด F8 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดในสารสกัด fraction ที่แยกได้ทั้งหมด ซึ่งปริมาณสารสกัดที่ใช้ในตัวรับคือปริมาณที่มากที่สุดที่สารสกัดสามารถบรรจุในตัวรับ A_Base และ/หรือ B_Base ได้โดยตัวรับยังคงมีความคงตัวที่ดีเมื่อผ่านการทดสอบความคงตัวที่สภาวะเร่งจากอุณหภูมิ โดยพบว่า ทั้งตัวรับ A_Base และ B_Base สามารถบรรจุสารสกัดหยาบ EE ได้มากที่สุด 1.0 % w/w ของตัวรับ ส่วนสารสกัด F8 สามารถบรรจุในตัวรับได้มากที่สุด 0.2 % w/w ของตัวรับ

ทั้งนี้ ผู้ศึกษาได้ตั้งชื่อตัวรับที่กักเก็บสารสกัดที่พัฒนาขึ้นเป็น ลำดับรหัส คือ “ชนิดสารสกัด_% สารสกัดในตัวรับ_ตัวรับ NLC” เช่น EE_1.0%_A เป็นต้น

4.7.2 การทดสอบลักษณะทางกายภาพและการทดสอบความคงตัวของตัวรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองด้วยสภาวะเร่งจากอุณหภูมิต่างๆ

จากการทดสอบความคงตัวทางกายภาพ พบว่า ทั้ง 4 ตัวรับ ซึ่งได้แก่ F8_0.2%_A, F8_0.2%_B, EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงไม่เกิน 200 nm มีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคไม่ต่างจากเดิมและอยู่ในเกณฑ์ที่ดีประมาณ 0.2 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใกล้เคียงเดิมโดยมีค่าช่วง ± 15 ถึง ± 30 mV เนื้อตัวรับเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน โดยตัวรับ F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B ให้เนื้อสีเหลืองอ่อน เนื่องจากสีของสารสกัด ส่วนตัวรับ EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ให้เนื้อสีเหลืองที่เข้ม เนื่องจากสีของสารสกัดเช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้ ในการทดสอบสภาวะวอร์มสลับเย็น และสภาวะอุณหภูมิที่ 45 °C มีการเปลี่ยนแปลงของทั้ง 4 ตัวรับโดย มีสีเหลืองที่เข้มขึ้นอย่างชัดเจนและต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป โดยเปรียบเทียบกับตัวรับเดียวกันของวันที่ 0 และสารละลายสารสกัดที่สภาวะเดียวกัน นอกจากนี้

ค่า pH ของทั้ง 4 ดำรับมีค่าใกล้เคียงกัน โดยดำรับ **F8_0.2%_A** และ **F8_0.2%_B** มีค่า pH ช่วง 4-5 ยกเว้นที่สภาวะอุณหภูมิที่ 45 °C มีช่วง pH ต่ำในระดับ 3.5 ซึ่งมีแนวโน้มที่เป็นไปในการทำงานเดียวกันกับดำรับ **EE_1.0%_A** และ **EE_1.0%_B** ที่มีค่า pH ช่วง 3.5-4 แต่ที่สภาวะอุณหภูมิที่ 45 °C มีช่วง pH ที่ลดลง (ต่ำกว่า 3.5) ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.8-4.11

ดังนั้น จะพบว่า ที่อุณหภูมิสูง (45 °C) ทำให้ดำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส มีสีของเนื้อดำรับที่เปลี่ยนไปโดยมีสีเข้มขึ้น และมีค่า pH ที่ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับดำรับเดียวกันที่สภาวะอื่นๆ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.8 แสดงความคงตัวทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัด EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ

สูตร ตำรับ	สภาวะ/ วันที่ทดสอบ	ขนาดอนุภาค (nm)	PdI	ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	pH	ลักษณะทางกายภาพ
EE_1.0%_A	วันที่ 0	134.90±1.40	0.19±0.01	-14.77±1.62	3.64±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
	HC	145.70±2.01	0.23±0.01	-16.70±1.22	3.80±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
	LRT	วันที่ 30	0.20±0.01	-12.53±0.32	3.75±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 60	0.19±0.01	-17.40±0.47	3.61±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
		วันที่ 90	0.18±0.01	-19.60±1.31	3.70±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
	DRT	วันที่ 30	0.20±0.00	-17.87±1.50	3.75±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 60	0.24±0.02	-22.80±1.67	3.55±0.04	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 90	0.26±0.01	-22.50±0.73	3.63±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
	4°C	วันที่ 30	0.16±0.01	-13.77±0.85	4.17±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 60	0.19±0.02	-20.60±.81	3.63±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 90	0.19±0.02	-17.10±1.34	4.00±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
	45°C	วันที่ 30	0.16±0.01	-13.67±0.32	3.36±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
		วันที่ 60	0.19±0.03	-19.20±2.05	3.21±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
		วันที่ 90	0.17±0.02	-21.40±1.80	3.10±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
EE_1.0%_B	วันที่ 0	140.20±0.19	0.25±0.04	-19.96±0.28	3.60±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
	HC	145.90±0.57	0.20±0.03	-21.93±0.35	3.60±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
	LRT	วันที่ 30	0.19±0.01	-17.90±2.09	3.51±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 60	0.23±0.01	-18.60±0.52	3.64±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
		วันที่ 90	0.21±0.00	-15.30±0.00	3.51±0.02	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
	DRT	วันที่ 30	0.24±0.02	-20.70±1.41	3.60±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 60	0.26±0.01	-22.50±0.73	3.66±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 90	0.25±0.01	-19.90±0.01	3.60±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
	4°C	วันที่ 30	0.19±0.02	-18.30±0.44	3.61±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 60	0.19±0.02	-19.30±1.38	3.97±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 90	0.19±0.02	-20.30±0.26	3.70±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
	45°C	วันที่ 30	0.19±0.03	-20.60±0.95	3.33±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
		วันที่ 60	0.24±0.01	-19.20±2.05	3.17±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)
		วันที่ 90	0.23±0.05	-21.40±1.80	3.29±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++++)

หมายเหตุ HC = สภาวะ Heating – Cooling Cycle, LRT = สภาวะอุณหภูมิห้องที่มีแสง และ DRT = สภาวะอุณหภูมิห้องไม่มีแสง

ตารางที่ 4.9 แสดงความคงตัวทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัด F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ

สูตร ตำรับ	สภาวะ/ วันที่ทดสอบ	ขนาดอนุภาค (nm)	PdI	ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	pH	ลักษณะทางกายภาพ
F8_0.2%_A	วันที่ 0	119.97±0.76	0.17±0.01	-23.43±0.40	5.25±0.03	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
	HC	130.43±1.26	0.19±0.01	-22.30±0.75	4.49±0.02	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+++)
	LRT	วันที่ 30	0.19±0.01	-23.87±0.95	5.12±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 60	0.15±0.02	-20.40±1.33	5.12±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 90	0.24±0.01	-32.30±1.71	4.91±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
	DRT	วันที่ 30	0.19±0.00	-27.47±0.15	4.88±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 60	0.23±0.00	-25.80±0.71	4.89±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 90	0.18±0.02	-29.70±0.02	4.57±0.02	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
	4°C	วันที่ 30	0.20±0.00	-20.50±0.85	5.06±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 60	0.21±0.01	-18.60±0.00	4.90±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 90	0.20±0.01	-24.40±1.49	4.71±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
	45°C	วันที่ 30	0.14±0.01	-29.27±1.33	3.54±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+++)
		วันที่ 60	0.16±0.03	-12.90±0.42	3.40±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+++)
		วันที่ 90	0.15±0.02	-24.70±1.99	3.38±0.02	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+++)
F8_0.2%_B	วันที่ 0	150.53±3.75	0.25±0.03	-24.03±0.68	5.23±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
	HC	148.73±3.48	0.21±0.02	-22.20±0.36	4.48±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+++)
	LRT	วันที่ 30	0.22±0.01	-25.13±0.85	4.91±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 60	0.22±0.00	-17.20±1.41	4.91±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
		วันที่ 90	0.24±0.01	-23.10±1.32	4.76±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (++)
	DRT	วันที่ 30	0.21±0.00	-26.07±0.42	4.90±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 60	0.24±0.01	-20.25±1.20	4.90±0.02	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 90	0.26±0.02	-25.90±1.27	4.76±0.02	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
	4°C	วันที่ 30	0.25±0.00	-26.65±0.21	5.10±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 60	0.23±0.01	-20.55±1.40	4.91±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
		วันที่ 90	0.22±0.01	-24.80±0.27	4.71±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+)
	45°C	วันที่ 30	0.26±0.02	-26.33±1.43	3.38±0.00	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+++)
		วันที่ 60	0.17±0.00	-20.25±1.20	4.76±0.01	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+++)
		วันที่ 90	0.19±0.00	-23.40±1.04	4.76±0.02	เหลว เนื้อเดียวกัน เหลืองขุ่น (+++)

หมายเหตุ HC = สภาวะ Heating –Cooling Cycle, LRT = สภาวะอุณหภูมิห้องที่มีแสง และ DRT = สภาวะอุณหภูมิห้องไม่มีแสง

ตารางที่ 4.10 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัด EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ เปรียบเทียบ

สารละลายสารสกัด (EE_1.0%_PEG)

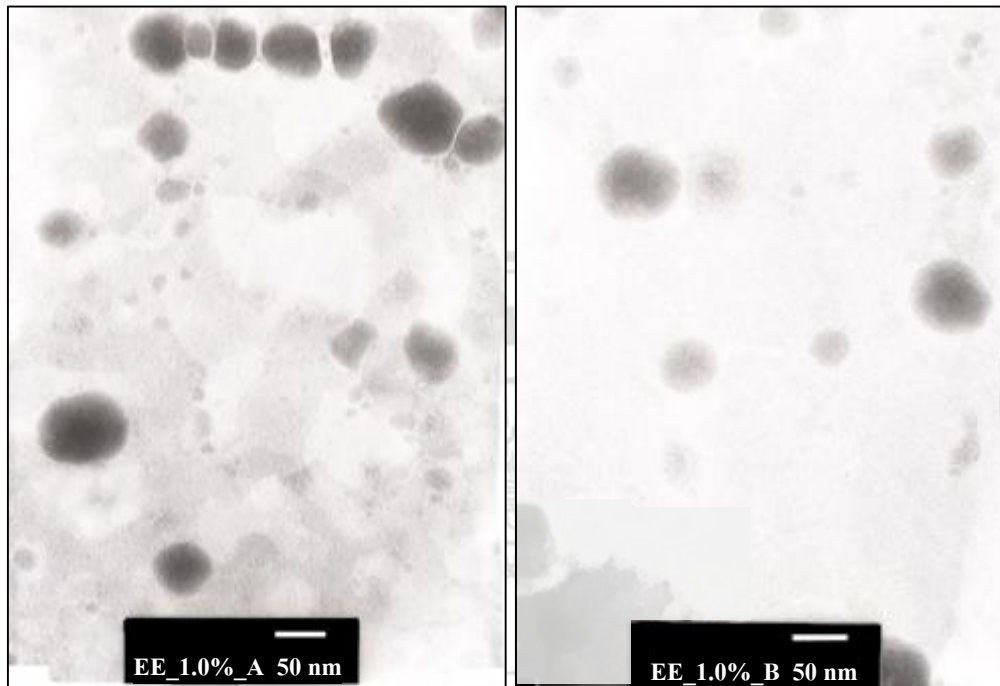
สภาวะทดสอบ ตำรับ NLC/ สารละลายสารสกัด	วันที่ 0	HC	วันที่ 90			
			LRT	DRT	4°C	45°C
EE_1.0%_PEG400						
EE_1.0%_A						
EE_1.0%_B						

ตารางที่ 4.11 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัด F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B ที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิ เปรียบเทียบ

สารละลายสารสกัด (F8_0.2%_PEG)

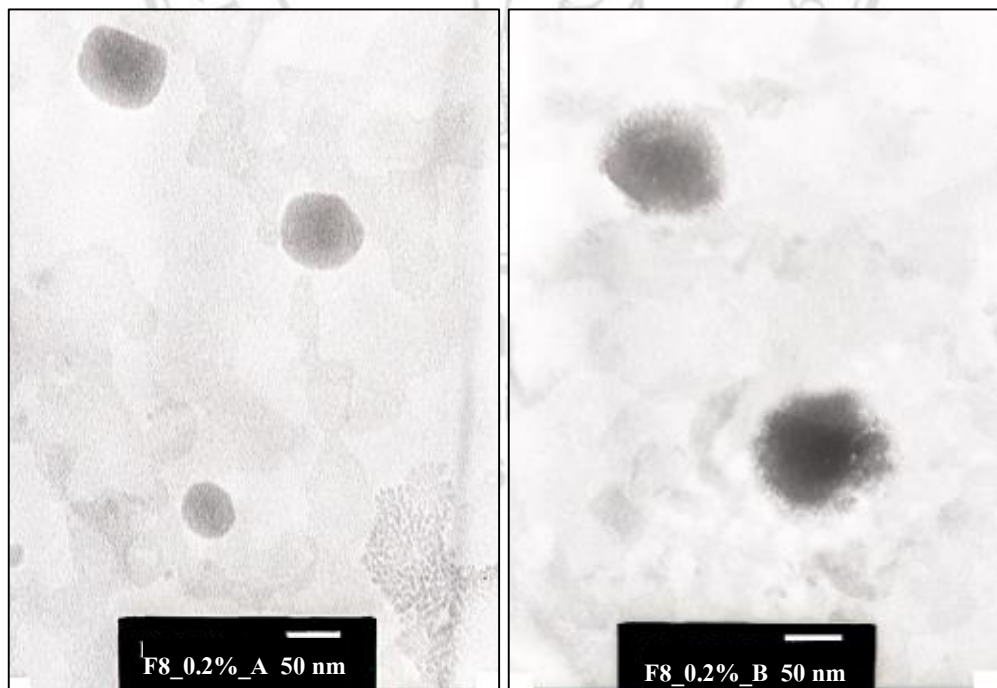
สภาวะทดสอบ ตำรับ NLC/ สารละลายสารสกัด	วันที่ 0	HC	วันที่ 90			
			LRT	DRT	4°C	45°C
F8_0.2%_PEG400						
F8_0.2%_A						
F8_0.2%_B						

4.7.3 การวิเคราะห์รูปร่างสัณฐานของอนุภาค NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรือง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



ก) EE_1.0%_A

ข) EE_1.0%_B



ค) F8_0.2%_A

ง) F8_0.2%_B

ภาพที่ 4.3 รูปร่างสัณฐานของตัวพาอนุภาคไขมันแข็งชนิด NLC_A และ B ที่กักเก็บสารสกัดหยาบ EE_1.0% และสารสกัด F8_0.2%

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านใช้วิเคราะห์ขนาดและรูปร่างพื้นฐานของตัวพาอนุภาคไขมันแข็งชนิด NLC ที่กักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองที่พัฒนาได้ ซึ่งได้แก่ EE_1.0%_A EE_1.0%B, F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B รวมทั้งหมด 4 ตำรับ ผลการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 4.3 (ก-ง) ทุกตำรับมีลักษณะอนุภาคค่อนข้างกลมและมีขนาดอนุภาคไม่เกิน 200 nm และไม่พบการเกิดความไม่คงตัวของตำรับจาก Ostwald ripening แต่อย่างใด ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการวัดขนาดอนุภาคและค่า PDI ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง Zetasizer® ดังปรากฏในตารางที่ 4.7 และ 4.8

4.7.4 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC

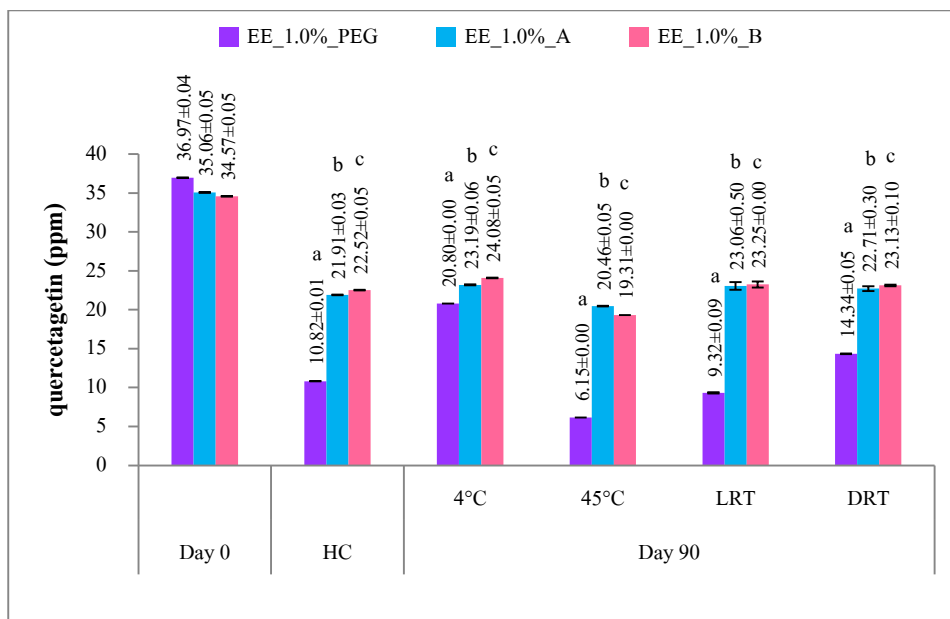
1) การวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC ด้วย UV spectrophotometer

ตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิจะถูกสกัดสารสกัดออกมาเพื่อนำไปวิเคราะห์ความคงตัวทางเคมีด้วย UV spectrophotometer โดยใช้ quercetagenin เป็นสารเป้าหมาย และมีสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็นตัวแปรควบคุม และใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ quercetagenin ($y=0.062x-0.001$, $r^2=0.999$) วิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC ด้วย UV spectrophotometer ดังแสดงในกราฟที่ 4.3 - 4.4 ความสูงของกราฟ คือปริมาณ quercetagenin (ppm) ที่วัดได้ในตำรับนั้นที่สภาวะต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กราฟที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ quercetagenin (ppm) ใน EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ที่เก็บในแต่ละสภาวะ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย UV spectrophotometer



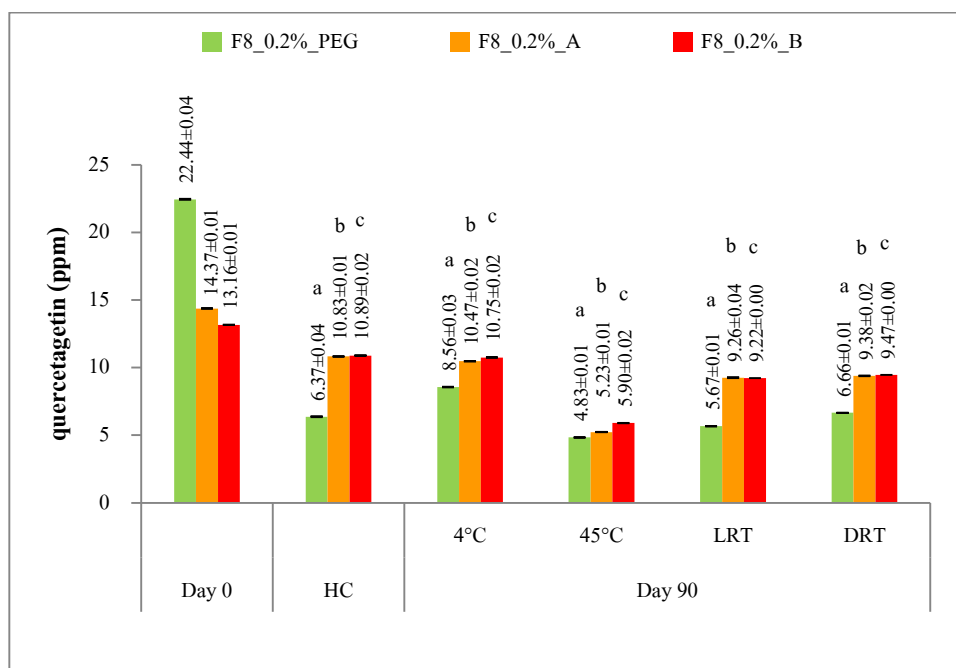
หมายเหตุ a, b และ c คือ การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มในเชิงสถิติ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากกราฟที่ 4.3 ปริมาณ quercetagenin (ppm) ใน ตำรับ EE_1.0%_A, EE_1.0%_B และในสารละลายของสารสกัดใน PEG (EE_1.0%_PEG) เมื่อผ่านการทดสอบที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน พบว่า ทุกสภาวะของการทดสอบสาร quercetagenin มีปริมาณที่ลดลงในทุกตำรับ เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (Day 0) แต่ทั้งนี้ สาร quercetagenin ใน EE_1.0%_PEG มีปริมาณ การลดลงที่มากกว่า EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างชัดเจนที่ $p < 0.05$ ในขณะที่ปริมาณ quercetagenin ที่ลดลงใน EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 ตำรับดังกล่าว ไม่ได้มีการลดลงของสาร quercetagenin อย่างแตกต่างกันมากไปกว่าการลดลงของปริมาณสารสาร quercetagenin ในสารละลายสารสกัดใน PEG ดังนั้น ทั้งตำรับ EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B สามารถเพิ่มความคงตัวของปริมาณ quercetagenin ในสารสกัดหยาบ EE ที่ถูกกักเก็บได้ด้วยประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบแยกแต่ละสภาวะ พบว่า ทั้งตำรับ EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ที่ผ่านการทดสอบในแต่ละสภาวะให้ปริมาณการลดลงของสาร quercetagenin เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (Day 0) ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่

$P < 0.05$ อย่างไรก็ตามที่สภาวะ 45°C พบว่า ปริมาณสาร quercetagenin ลดลงมากที่สุด และทั้ง 3 คำรับ มีแนวโน้มคงตัวดีที่อุณหภูมิ 4°C โดยสามารถเรียงลำดับสภาวะที่มีผลต่อการลดลงของปริมาณสารดังกล่าวจากมากไปน้อย คือ $45^{\circ}\text{C} > \text{HC} > \text{LRT}, \text{DRT} > 4^{\circ}\text{C}$

กราฟที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ quercetagenin (ppm) ใน F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B ที่เก็บในแต่ละสภาวะ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย UV spectrophotometer



หมายเหตุ a, b และ c คือ การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มในเชิงสถิติ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากกราฟที่ 4.4 ปริมาณ quercetagenin (ppm) ในคำรับ F8_0.2%_A, F8_0.2%_B และในสารละลายสารสกัดใน PEG (F8_0.2%_PEG) เมื่อผ่านการทดสอบที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน พบว่า ทุกสภาวะของการทดสอบสาร quercetagenin มีปริมาณที่ลดลงในทุกคำรับ เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (Day 0) แต่ทั้งนี้ สาร quercetagenin ใน F8_0.2%_PEG มีปริมาณการลดลงที่มากกว่า F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างชัดเจนที่ $p < 0.05$ ในขณะที่ปริมาณ quercetagenin ที่ลดลงใน F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 คำรับดังกล่าว ไม่ได้มีการลดลงของปริมาณสาร quercetagenin อย่างแตกต่างกันมากไปกว่าการลดลงของปริมาณสาร quercetagenin ในสารละลายสารสกัดใน PEG ดังนั้น ทั้งคำรับ F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B สามารถ

ยกระดับความคงตัวทางเคมีของ quercetagenin ในสารสกัด F8 ที่ถูกกักเก็บได้ด้วยประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบแยกแต่ละสภาวะ พบว่า ทั้งตำรับ F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B ที่ผ่านสภาวะการทดสอบในแต่ละสภาวะให้ปริมาณการลดลงของสาร quercetagenin เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (Day 0) ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ อย่างไรก็ดีตามทีสภาวะ 45°C พบว่า ปริมาณสาร quercetagenin ลดลงมากที่สุด และทั้ง 3 ตำรับ มีแนวโน้มคงตัวดีที่อุณหภูมิ 4°C โดยสามารถเรียงลำดับสภาวะที่มีผลต่อการลดลงของปริมาณสารดังกล่าวจากมากไปน้อย คือ 45°C > HC > LRT, DRT > 4°C

ดังนั้น ตำรับ NLC ที่พัฒนาขึ้นได้ทั้งตำรับ A และ B สามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของ quercetagenin ในสารสกัดที่กักเก็บในตำรับ (ซึ่งได้แก่ EE 1.0% และ F8 0.2%) ได้ในทุกสภาวะการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัดใน PEG แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งตำรับ A และ B ยังคงสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสกัดที่กักเก็บในตำรับได้น้อยที่สุดในสภาวะ 45°C ในช่วง 90 วัน

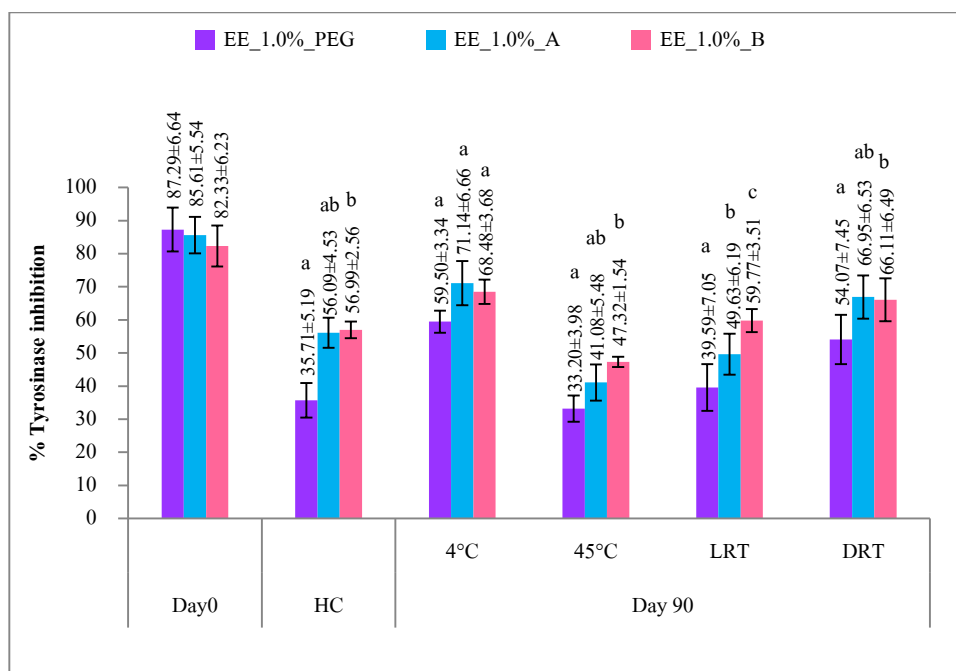
2) การวิเคราะห์ความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC

ตำรับ NLC ที่กักเก็บสารสกัดที่ผ่านการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิจะถูกสกัดสารสกัดออกมา เพื่อนำไปวิเคราะห์ความคงตัวของสารสกัดจากการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ในรูปแบบค่า % การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% tyrosinase inhibition) โดยมีสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นเดียวกับตำรับ NLC ที่พัฒนาได้เป็นตัวแปรควบคุม

จากผลการทดลองการวิเคราะห์ความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกดาวเรืองที่กักเก็บในตำรับ NLC ดังแสดงในกราฟที่ 4.5-4.6 ความสูงของกราฟ คือ % tyrosinase inhibition ที่วัดได้ในตำรับนั้นที่สภาวะต่างๆ

กราฟที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของ

EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ที่เก็บในแต่ละสภาวะ

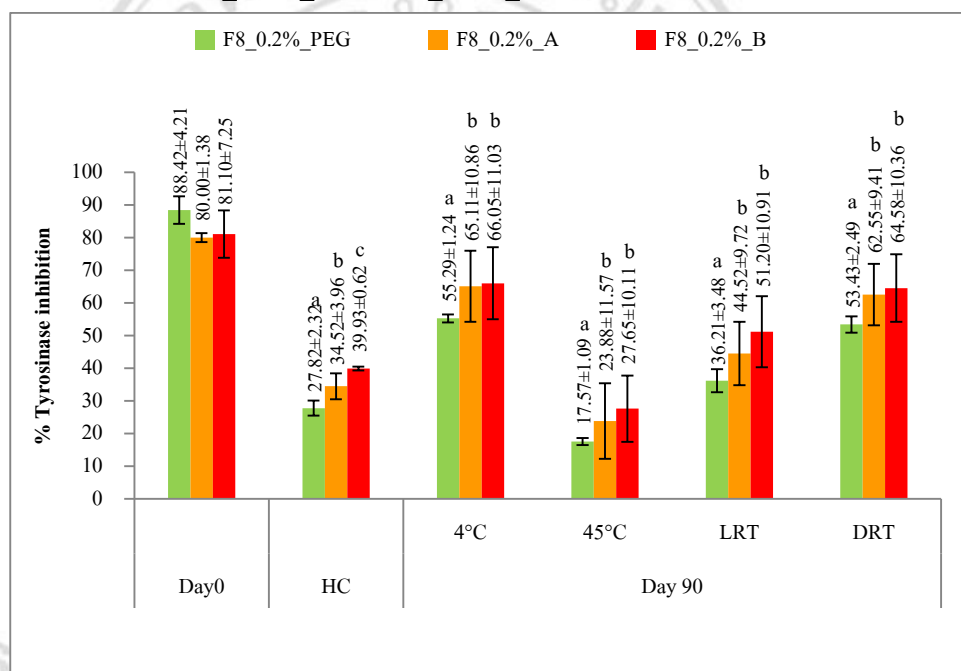


หมายเหตุ a, b และ c คือ การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มในเชิงสถิติ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

จากกราฟที่ 4.5 ค่า % tyrosinase inhibition ของสารสกัดในตำรับ EE_1.0%_A, EE_1.0%_B และในสารละลายสารสกัด (EE_1.0%_PEG) เมื่อผ่านการทดสอบที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน พบว่า ทุกสภาวะของการทดสอบมีค่า % tyrosinase inhibition ที่ลดลงในทุกตำรับ เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (Day 0) แต่ทั้งนี้ค่า % tyrosinase inhibition ใน EE_1.0%_PEG มีค่า % tyrosinase inhibition ลดลงที่มากกว่า EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างชัดเจนที่ $p < 0.05$ ในขณะที่ค่า % tyrosinase inhibition ที่ลดลงใน EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ยกเว้น ที่สภาวะ LRT ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 ตำรับดังกล่าวไม่ได้มีการลดลงของค่า % tyrosinase inhibition อย่างแตกต่างกันมากไปกว่าการลดลงของค่า % tyrosinase inhibition ในสารละลายสารสกัดใน PEG ดังนั้น ทั้งตำรับ EE_1.0%_A และ EE_1.0%_B สามารถเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบ EE ที่ถูกกักเก็บได้ด้วยประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบแยกแต่ละสภาวะ พบว่า ทั้งตำรับ **EE_1.0%_A** และ **EE_1.0%_B** ที่ผ่านการทดสอบในแต่ละสภาวะให้ค่า % tyrosinase inhibition ที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (Day 0) ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ อย่างไรก็ตามที่สภาวะ 45°C พบว่า มีค่า % tyrosinase inhibition ลดลงมากที่สุด และทั้ง 3 ตำรับ มีแนวโน้มคงตัวดีที่อุณหภูมิ 4°C โดยสามารถเรียงลำดับสภาวะที่มีผลต่อการสลายตัวของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากมากไปน้อย คือ 45°C>HC>LRT>DRT>4°C

กราฟที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของ **F8_0.2%_A** และ **F8_0.2%_B** ที่เก็บในแต่ละสภาวะ



หมายเหตุ a, b และ c คือ การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มในเชิงสถิติ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p<0.05$

จากกราฟที่ 4.6 ค่า % tyrosinase inhibition ของสารสกัดในตำรับ **F8_0.2%_A**, **F8_0.2%_B** และในสารละลายสารสกัด (**F8_0.2%_PEG**) เมื่อผ่านการทดสอบที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน พบว่า ทุกสภาวะของการทดสอบมีค่า % tyrosinase inhibition ที่ลดลงในทุกตำรับ เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (Day 0) แต่ทั้งนี้ค่า % tyrosinase inhibition ใน **F8_0.2%_PEG** มีค่า % tyrosinase inhibition ลดลงที่มากกว่า **F8_0.2%_A** และ **F8_0.2%_B** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างชัดเจนที่ $p<0.05$ ในขณะที่ค่า % tyrosinase inhibition ที่ลดลงใน **F8_0.2%_A** และ **F8_0.2%_B**

ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ยกเว้น ที่สภาวะ HC ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 ดำรับดังกล่าวไม่ได้มีการลดลงของค่า % tyrosinase inhibition อย่างแตกต่างกันมากไปกว่าการลดลงของค่า % tyrosinase inhibition ในสารละลายสารสกัดใน PEG ดังนั้น ทั้งดำรับ F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B สามารถเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบ F8 ที่ถูกกักเก็บได้ด้วยประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบแยกแต่ละสภาวะ พบว่า ทั้งดำรับ F8_0.2%_A และ F8_0.2%_B ที่ผ่านการทดสอบในแต่ละสภาวะให้ค่า % tyrosinase inhibition ที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น (Day 0) ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ อย่างไรก็ตาม ที่สภาวะ 45°C พบว่า มีค่า % tyrosinase inhibition ลดลงมากที่สุด และทั้ง 3 ดำรับมีแนวโน้มคงตัวดีที่อุณหภูมิ 4°C โดยสามารถเรียงลำดับสภาวะที่มีผลต่อการสลายตัวของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากมากไปน้อย คือ 45°C > HC > LRT > DRT > 4°C

ดังนั้น ดำรับ NLC ที่พัฒนาขึ้นได้ทั้งดำรับ A และ B สามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่กักเก็บในดำรับ (ซึ่งได้แก่ EE 1.0% และ F8 0.2%) ได้ในทุกสภาวะการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัด แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งดำรับ A และ B ยังคงสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่กักเก็บในดำรับได้น้อยที่สุดในสภาวะ 45°C

ดำรับตัวพานูกานาโนไขมันแข็งชนิด NLC ทั้งดำรับ A และ B ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 2 ดำรับสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสกัด EE 1.0% และ F8 0.2% ที่ถูกกักเก็บไว้ได้ในทุกสภาวะทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัดดังกล่าวใน PEG ซึ่งจากการทดสอบความคงตัวของสารสกัดโดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetagenin ซึ่งเป็นสารเป้าหมายและการวิเคราะห์ค่า % tyrosinase inhibition ของสารสกัดในดำรับ พบว่า ปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัด (EE 1.0% และ F8 0.2%) ที่ถูกกักเก็บในแต่ละดำรับอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิด NLC (A และ B) ในสภาวะต่างๆมีการสลายตัว และ/หรือคงตัวที่สัมพันธ์กันกับค่า % tyrosinase inhibition ที่ลดลง และ/หรือคงเดิมของสภาวะนั้นๆ โดยมีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกัน เนื่องจาก quercetagenin เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดดังกล่าว ทั้งนี้ในการทดลองนี้ มีความคาดหวังที่จะพัฒนาให้ได้ตัวพา

NLC ที่สามารถให้ความคงตัวแก่สารสกัดที่กักเก็บได้มากกว่านี้ แต่การทดสอบความคงตัวของสารสกัดที่กักเก็บ ทั้งการทดสอบวิเคราะห์ปริมาณ quercetagenin และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ขาดการควบคุมปัจจัยการรบกวนของตำรับ NLC เปล่า ที่อาจรบกวนระบบวิธีการทดสอบความคงตัวของสารสกัดนี้ และทำให้การวิเคราะห์ผลคลาดเคลื่อน

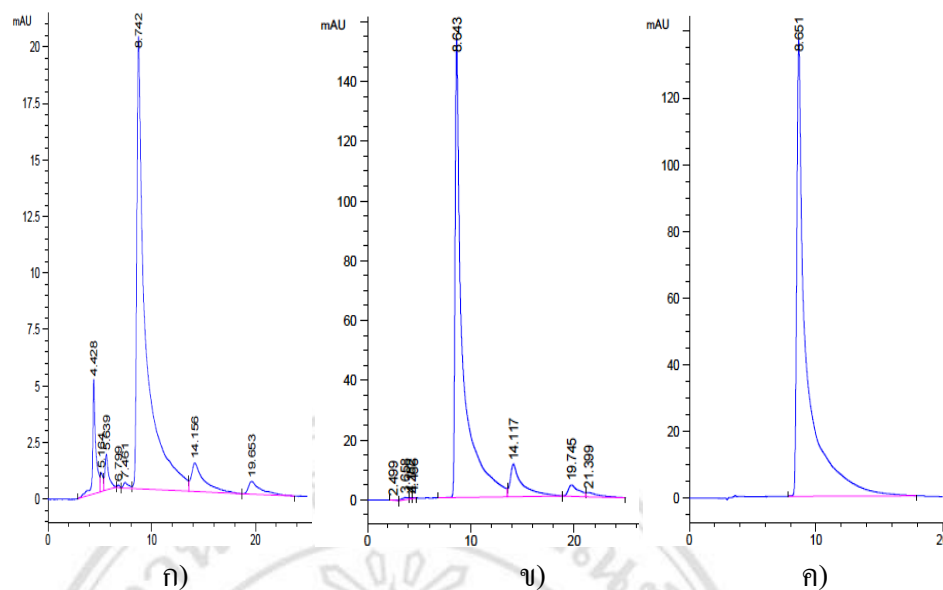
4.7.5 การทดสอบประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดดอกดาวเรืองในตำรับ NLC

การหาล้อยละการกักเก็บของสารสกัดในตำรับตัวพาอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิด NLC โดยการใช้ Sephadex column ซึ่งมีหลักการแยกสารแบ่งตามขนาดอนุภาค (size exclusion chromatography) ขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่า (ในที่นี้คือสารสกัดที่กักเก็บในตัวพา NLC) จะถูกแยกออกมาก่อนขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า (สารสกัดที่ไม่ได้ถูกกักเก็บในตัวพา NLC) เพราะใน Sephadex column จะมีรูพรุนอยู่ คอยดักสารอนุภาคขนาดเล็กกว่าไว้ ทั้งนี้ สารทั้งหมดจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก สารสกัด 2 fraction ที่เก็บได้ (ได้แก่ สารสกัดที่กักเก็บในตัวพา NLC และ สารสกัดที่ไม่ได้กักเก็บในตัวพา NLC) จะถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารเป้าหมายหรือสาร quercetagenin โดยเครื่องมือ HPLC

1) การวิเคราะห์ปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัดดอกดาวเรืองด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การหาปริมาณสาร quercetagenin ในสารสกัด ด้วย HPLC โดยจะใช้ HPLC โครมาโทแกรม ดังแสดงในภาพที่ 4.4 (ก-ค) และสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน quercetagenin ($y=33.05x-651.4$, $R^2=0.994$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.4 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบ EE (ก)
สารสกัด F8 (ข) และ quercetagenin (ค)

2) % การกักเก็บของสารสกัดในตำรับตัวพาทอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิด NLC

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณการถูกกักเก็บของสารสกัดในตำรับตัวพาทอนุภาคนาโน
ไขมันแข็งชนิด NLC

ตำรับ	% การกักเก็บ
EE_1.0%_A	83.65±1.38
EE_1.0%_B	88.10±6.47
F8_0.2%_A	76.55±2.38
F8_0.2%_B	86.82±2.79

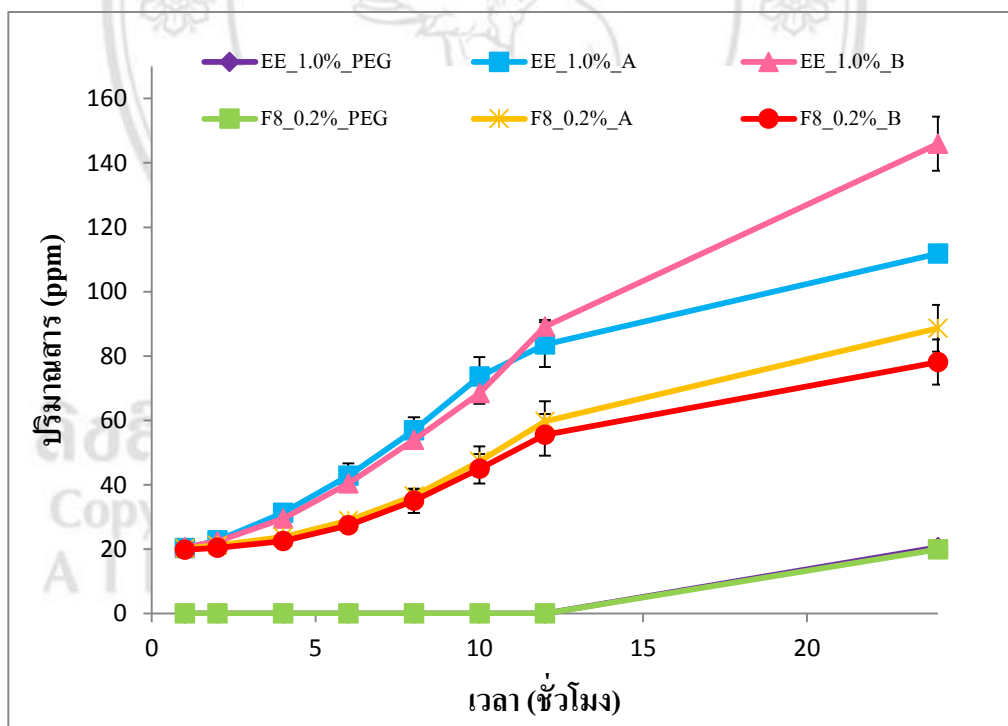
จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12 เมื่อเปรียบเทียบการกักเก็บสารสกัดหยาบ EE ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในตำรับตัวพาท NLC พบว่า ตำรับ B (EE_1.0%_B) ให้ค่าร้อยละการกักเก็บที่สูงกว่าตำรับ A (EE_1.0%_A) ต่างกันถึงร้อยละ 4.45 ดังนั้น ตำรับ B ให้การกักเก็บสารสกัดหยาบ EE ได้มากกว่าตำรับ A และเมื่อเปรียบเทียบการกักเก็บสารสกัด F8 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในตำรับตัวพาท NLC พบว่า ตำรับ B (F8_0.2%_B) ให้ค่าร้อยละการกักเก็บที่สูงกว่าตำรับ A (F8_0.2%_A) ต่างกันถึงร้อยละ 10.27 ดังนั้น จึงพบว่า ตำรับ B มีแนวโน้มที่สามารถกักเก็บสารสกัดทั้ง EE 1.0% และ F8 0.2% ที่มากกว่าตำรับ A อาจเนื่องมาจากการมี

ปริมาณไขมันในตำรับ **B** ที่มากกว่า 2% แต่อย่างไรก็ตาม การแปรผลในเชิงสถิติพบว่า ตำรับ **A** และ ตำรับ **B** ให้ % การกักเก็บสารสกัด **EE** 1.0% ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนตำรับ **A** และ **B** ให้ % การกักเก็บสารสกัด **F8** 0.2% ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

4.7.6 การทดสอบการปลดปล่อยสารสกัดดอกดาวเรืองในตำรับ NLC

การทดสอบการปลดปล่อยสารสกัดออกจากตัวพอนูภาคนาโนไขมันแข็งชนิด NLC ด้วยการใส่ Franz diffusion cells เปรียบเสมือนระบบผิวหนังและวิเคราะห์ผลการปลดปล่อยแบบสะสม (accumulative amount) ของสารเป้าหมายคือ quercetagenin โดยเครื่องมือ HPLC โดยใช้ HPLC โครมาโทแกรม ดังแสดงในภาพที่ 4.4 (ก-ค) และสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน quercetagenin ($y = 33.05x - 651.4$, $R^2 = 0.994$) ในการวิเคราะห์ผล

กราฟที่ 4.7 แสดงการปลดปล่อยสารสกัดหยาบ **EE** และ **F8** จากตัวพาน NLC ตำรับ **A** และ **B** เปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัด



ตารางที่ 4.13 แสดงค่าการปลดปล่อยสารสำคัญในสารสกัดหยาบ EE จากตัวพา NLC

ตำรับ A และ B เปรียบเทียบกับสารละลายสารสกัดเปล่า

Average $\pm$ SD	1hr.	2hr.	4hr.	6hr.	8hr.	10hr.	12hr.	24hr.
EE_1.0%_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20.58 $\pm$ 0.19
EE_1.0%_A	20.35 $\pm$ 0.10	22.73 $\pm$ 0.46	31.31 $\pm$ 0.97	42.81 $\pm$ 3.87	56.94 $\pm$ 4.01	73.63 $\pm$ 10.39	88.86 $\pm$ 6.99	111.77 $\pm$ 1.38
EE_1.0%_B	20.60 $\pm$ 0.57	22.45 $\pm$ 0.67	29.44 $\pm$ 2.27	40.39 $\pm$ 0.64	53.94 $\pm$ 2.81	73.63 $\pm$ 6.02	89.13 $\pm$ 2.05	145.93 $\pm$ 8.41
F8_0.2%_PEG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19.93 $\pm$ 0.11
F8_0.2%_A	20.25 $\pm$ 0.24	21.26 $\pm$ 0.47	23.76 $\pm$ 0.83	28.87 $\pm$ 1.19	36.49 $\pm$ 2.05	47.31 $\pm$ 4.63	59.75 $\pm$ 6.24	88.66 $\pm$ 7.29
F8_0.2%_B	19.85 $\pm$ 0.03	20.41 $\pm$ 0.13	22.56 $\pm$ 0.96	27.36 $\pm$ 2.19	35.07 $\pm$ 3.76	45.01 $\pm$ 4.57	55.51 $\pm$ 6.48	78.14 $\pm$ 7.05

หมายเหตุ ND หมายถึง Not determined

จากผลการทดลองดังแสดงในกราฟที่ 4.7 และตารางที่ 4.13 พบว่า ทั้งสารสกัดหยาบ EE และสารสกัด F8 ที่กักเก็บในตำรับ NLC มีการปลดปล่อยที่รวดเร็วกว่าสารละลายของสารสกัดหยาบ EE (EE_1.0%_PEG) และสารละลายของสารสกัด F8 ใน PEG 400 (F8_0.2%_PEG) ตามลำดับ โดยสารสกัดที่กักเก็บใน NLC มีการปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว หรือ ปล่อย (burst release) ในระยะแรก (ชั่วโมงที่ 1-12) และมีระยะเวลาการปลดปล่อยที่นาน หรือการปลดปล่อยแบบออกฤทธิ์เนิ่น (sustained release) ในระยะหลัง (ชั่วโมงที่ 12-24) ดังแสดงในกราฟที่ 4.7 ซึ่งการที่อนุภาค NLC มีการปลดปล่อย 2 แบบ อาจเป็นเพราะรูปแบบของอนุภาค NLC ที่พัฒนาได้เป็นรูปแบบเมทริกซ์ หรือรูปแบบผสมระหว่าง รูปแบบที่มีความเข้มข้นของตัวยาสะสมอยู่ที่เปลือก และรูปแบบที่มีความเข้มข้นของตัวยาสะสมอยู่ที่แกนกลาง เนื่องจากความสามารถในการละลายของสารสกัดที่นำมากักเก็บ โดยสารสกัดบางส่วนสามารถละลายได้ดีในไขมันและบางส่วนละลายในไขมันได้น้อย

ซึ่งการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในระยะแรกที่เกิดขึ้น เกิดจากสารสำคัญที่สะสมอยู่ที่เปลือก เนื่องจากมีสารสกัดบางส่วนมีความสามารถละลายในไขมันได้น้อย ประกอบกับการเตรียมตำรับด้วยเทคนิคการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่ความดันสูง แบบใช้อุณหภูมิสูง แล้ววางตำรับทิ้งไว้เพื่อให้ค่อยๆเย็นตัวที่อุณหภูมิห้อง ทำให้สารสำคัญเกิดการตกตะกอนที่หลังพร้อมไขมันหลอมที่เคลือบอยู่ที่เปลือก [59]

ปัจจัยที่สามารถส่งผลต่อการปลดปล่อยอย่างช้าๆนอกเหนือจากรูปแบบการสะสมของสารใน NLC ดังกล่าวแล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ได้แก่ การมีความแตกต่างของความเข้มข้นที่สูงระหว่างความเข้มข้นของสารใน donor chamber และ receptor chamber จึงส่งผลให้มีอัตราการแพร่ที่สูงเช่นกัน นอกจากนี้ อนุภาคนาโนขนาดเล็กของตัวพา NLC ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสต่อ cellulose membrane ที่สูงจึงส่งเสริมการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากอนุภาคได้เร็ว

การปลดปล่อยแบบออกฤทธิ์เนิ่น (sustained release) ในระยะหลังที่เกิดขึ้น จัดเป็นลักษณะเฉพาะของตัวพา NLC ที่มีการกักเก็บสารไว้วัด้านในของอนุภาค หรือ NLC รูปแบบตัวพาเข้มข้นที่แกนกลาง ซึ่งสารสำคัญจะใช้ระยะทางแพร่ผ่านจากการกั้นขวางของไขมันที่เปลือกอนุภาคที่มากจึงใช้ระยะเวลาที่นาน เนื่องจากสารสกัดอาจมีความสามารถละลายได้ดีในไขมันส่งผลให้ขั้นตอนการเปลี่ยนจากหยดนํ้ามันเป็นของแข็งทำให้สารสกัดสามารถถูกกักเก็บไว้วัด้านในอนุภาคได้ การปลดปล่อยลักษณะนี้จัดเป็นคุณสมบัติที่ดีต่อการนำมาใช้ในทางเครื่องสำอาง เนื่องจากช่วยลดการระคายเคืองของสารออกฤทธิ์จากภาวะที่ผิวหนังได้รับสารออกฤทธิ์สูงเกินไป อีกทั้งยังช่วยให้ผิวหนังได้รับสารออกฤทธิ์อย่างต่อเนื่อง [59]

ดังนั้น การพัฒนา NLC ที่ได้มีรูปแบบเป็นเมทริกซ์เนื้อเดียวกัน หรือมีการสะสมสารสำคัญในทุกๆส่วนของอนุภาค เนื่องจากสารสกัด EE และ F8 มีความสามารถทั้งละลายในไขมันได้ปานกลางถึงดีมาก

ทั้งนี้ สารละลายของสารสกัด EE และ F8 ใน PEG 400 ให้การปลดปล่อยที่ช้า อาจมาจากสารสกัดละลายใน PEG 400 ได้ดีกว่าระบบตัวพาละลายใน receptor chamber ซึ่งเป็นน้ำต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 1:4