

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ผิวหนัง

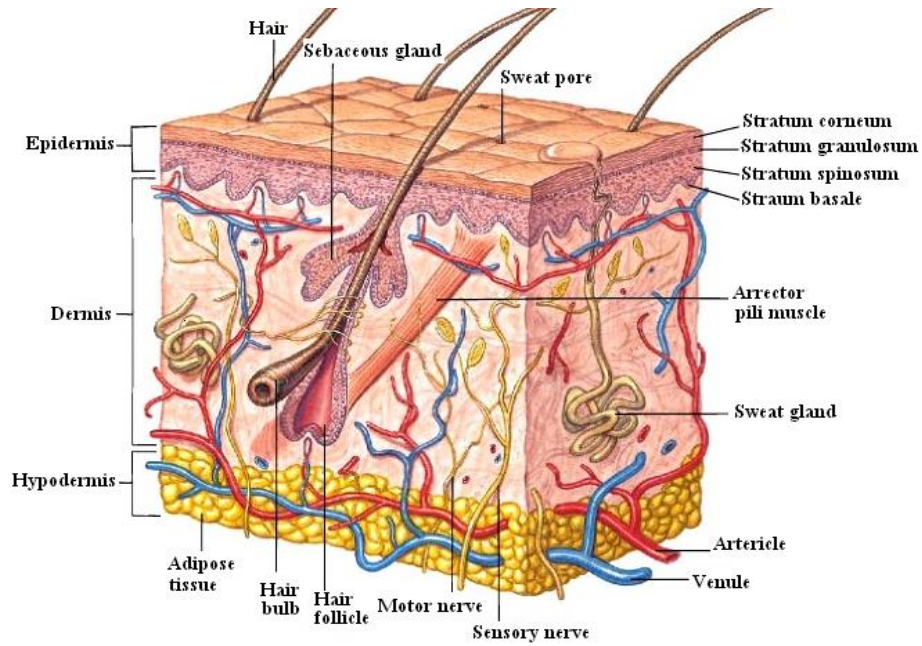
ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุด มีพื้นที่ผิวมากที่สุดและอยู่ส่วนนอกสุดของร่างกาย ทำหน้าที่รับความรู้สึก ปกคลุม ป้องกันอวัยวะต่างๆไม่ให้ถูกทำลายจากอันตรายภายนอกในร่างกาย ป้องกันสารแปลกปลอมจากสิ่งแวดล้อมไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย ควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย และรักษาน้ำในร่างกายไม่ให้สูญเสียมากเกินไป ในแต่ละแห่งของร่างกายผิวหนังจะหนาบางไม่เท่ากัน ส่วนที่บางที่สุดคือเปลือกตา หนา 0.2-0.6 mm ส่วนหนาที่สุดคือฝ่ามือและฝ่าเท้า หนา 2-4 mm [4, 17-19]

##### 2.1.1 โครงสร้างของผิวหนัง

ผิวหนังประกอบด้วยสตราตัมคอร์เนียม (หนา 10-20  $\mu\text{m}$ ) ชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต (หนาประมาณ 100  $\mu\text{m}$ ) ชั้นหนังแท้ (0.1-0.5 cm) และเนื้อเยื่อไขมันซึ่งอยู่ติดกับชั้นของกล้ามเนื้อ ผิวหนังแบ่งเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นรองรับผิวหนัง (hypodermis) [4, 17] ดังแสดงในภาพที่ 2.1

##### 1) ชั้นหนังกำพร้า (epidermis)

เป็นผิวหนังชั้นนอกสุด แบ่งเป็น 5 ชั้นย่อย ได้แก่ สตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) สตราตัมลูซิเดียม (stratum lucidum) สตราตัมแกรนูโลซัม (stratum granulosum) สตราตัมสไปโนซัม (stratum spinosum) และสตราตัมเบซาล (stratum basale) ซึ่งในแต่ละชั้นมีลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ต่างกัน ดังนี้ [4, 17]



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างผิวหนัง [20]

### 1.1) ชั้นสตราตัมคอร์เนียม

เป็นเซลล์ผิวหนังชั้นนอกที่ไม่มีชีวิต ไม่มีนิวเคลียสจึงไม่มีกระบวนการเมทาบอลิซึม ทำหน้าที่สำคัญในการเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารต่างๆ เรียกเซลล์ในชั้นผิวหนังว่า “เซลล์คอร์นีโอไซต์” (corneocytes) มีลักษณะแบนและหกเหลี่ยม เรียงซ้อนกัน 15-35 เซลล์ แต่ละเซลล์เรียงต่อกันโดยมีไขมันพसानระหว่างเซลล์ให้ยึดติดกันคล้ายโครงสร้างอิฐและปูน (brick and mortar model) แต่ละเซลล์ประกอบด้วยมัดของคีราตินร้อยละ 70 และไขมันร้อยละ 20 ห่อหุ้มผนังเซลล์ ระหว่างเซลล์เป็นไขมันและเดสโมโซม (desmosomes) ซึ่งทำให้เซลล์ยึดติดกัน ส่วนของไขมันระหว่างเซลล์ประกอบด้วยคอเลสเตอรอล (cholesterol) ร้อยละ 27 เซราไมด์ (ceramides) ร้อยละ 4 กรดไขมันอิสระร้อยละ 9 คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) ร้อยละ 10 และคอเรสเตอรอลซัลเฟต (cholesterol sulfate) ร้อยละ 2 ซึ่งสัดส่วนของสารประกอบเหล่านี้มีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับตำแหน่งบนร่างกาย [4, 17-19]

## 1.2) ชั้นสตราตัมลูซิเดียม

ชั้นผิวหนังประกอบด้วยหยดน้ำมันอิเลิดิน (eleidin) ชั้นนี้มีความหนาเมื่ออยู่ที่ฝ่ามือ ฝ่าเท้า และหนังที่หนา ด้าน นอกจากนี้ตำแหน่งล่างสุดของชั้นนี้มีเยื่อคิราตินบางๆ เรียกว่า “Rein’s barrier” ทำหน้าที่แบ่งกันประจุบวกและลบ จึงแบ่งกันความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของผิวทำให้ชั้นผิวข้างบนมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 5 และชั้นผิวที่อยู่ลึกลงมามีความเป็นด่างมากขึ้น และนอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวกั้นการซึมผ่านเข้าออกของน้ำ และอิเล็กโทรไลต์ [4]

## 1.3) ชั้นสตราตัมเกรนูโลซัม

ชั้นผิวหนังนี้มีเซลล์ที่มี keratohyalin ในไซโตพลาสซึม ทำหน้าที่ช่วยสะท้อนแสงทำให้ผิวดูขาวผุดผ่องหรือทึบแสง เซลล์ในชั้นนี้อาจเรียงตัวเป็นชั้นเดียวหรือ 4 ชั้น ขึ้นอยู่กับแต่ละบริเวณของร่างกาย เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์ผิวหนังชั้นนี้จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ผิวหนังชั้นบนเรื่อยๆ โดยภายในเซลล์ประกอบด้วยสเตียรอยด์ไขมัน และเอนไซม์ ได้แก่ lipase glycosidase และ acid phosphatase จึงทำให้ไขมันในเซลล์เปลี่ยนจากไขมันมีขี้ หรือ glycoceramides ไปเป็นไขมันที่ไม่มีขี้ หรือ ceramides และเมื่อไขมันไม่มีขี้เกิดการตกผลึกเป็นชั้นๆ ที่เรียกว่า “lipid lamella” อยู่ระหว่างเซลล์คอรันไอไซต์ ส่งผลให้เกิดชั้นที่มีคุณสมบัติกั้นน้ำ (waterproof barriers) [4]

## 1.4) ชั้นสตราตัมสไปโนซัม

เซลล์ผิวหนังชั้นนี้มีขนาด 100-300 nm เรียงเป็นชั้นสูงต่ำไม่เท่ากัน มีลักษณะหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสที่ชัดเจนทุกเซลล์ ในเซลล์มีเม็ดสีผิวที่เพิ่งสร้างเสร็จ ซึ่งเคลื่อนย้ายมาจากเซลล์เมลาโนไซต์ที่อยู่ในชั้นสตราตัมเบซาล [4]

## 1.5) ชั้นสตราตัมเบซาล

เซลล์ผิวหนังชั้นนี้มีลักษณะรูปทรงกระบอก เรียงกันเป็นแถวเดียว มีเซลล์คิราตินโนไซต์ (keratinocytes) ที่เมื่อเกิดการแบ่งตัวมาสู่ผิวชั้นบนแล้วทำให้เกิดการผลัดเซลล์ผิว (keratinization) โดยโปรตีนในเซลล์นี้จะค่อยเปลี่ยนสภาพเป็นคิราติน จนตัวเซลล์สูญเสียนิวเคลียสจึงแบนลงเรื่อยๆ และเมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัวขึ้นไปยังผิวชั้นบนเรื่อยๆ จะถูกเรียกว่า “คอรันไอไซต์” จนหลุดลอก

ออกเป็นจีไคล นอกจากนั้นในชั้นผิวหนังนี้ยังประกอบด้วยเซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhan's cells) ทำหน้าที่คล้าย macrophage ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง เซลล์เมอเคลิล (merkel cells) ทำหน้าที่เป็นเซลล์ประสาทในหนังกำพร้า และเซลล์เมลานโนไซต์ มีหน้าที่ผลิตเมลานิน (melanin) หรือเม็ดสีผิว โดยใช้ไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารตั้งต้น เมลาโนไซต์มีปริมาณที่แตกต่างกันตามตำแหน่งของร่างกาย โดยตำแหน่งผิวหนังร่างกายที่มีโอกาสสัมผัสแสงแดดมากจะถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มจำนวนมากขึ้น และในคนผิวเข้มก็อาจมีเมลานโนไซต์ในจำนวนเท่าเทียมกับคนผิวสีอ่อนได้ เพียงแต่เมลานโนไซต์ในคนผิวเข้มอาจมีประสิทธิภาพและทำหน้าที่สร้างเมลานินได้ดีกว่า [4, 17]

## 2) ชั้นหนังแท้ (dermis)

มีความหนาประมาณ 0.1-0.5 cm มีตำแหน่งอยู่ระหว่างชั้นหนังกำพร้าและชั้นรองรับผิวหนัง ประกอบด้วยชั้นร่างแหของคอลลาเจน เซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่ประกอบด้วย คอลลาเจน (collagen) ลามินิน (laminin) ไฟโบริน (fibronin) และไวโทรเนกติน (vitronectin) หนังแท้เป็นแหล่งสารอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบค้ำจุนชั้นหนังกำพร้า รวมทั้งเกี่ยวข้องในการควบคุมอุณหภูมิ ความดัน และความเจ็บปวด ชั้นหนังแท้ติดต่อกับเส้นเลือดแดง ต่อมเหงื่อ ปลายประสาท ต่อมไขมัน และต่อมเหงื่อ ร่างแหของเส้นเลือดจำนวนมากทำหน้าที่ในการเป็นแหล่งสารอาหาร ออกซิเจน ซ่อมแซม และการตอบสนองภูมิคุ้มกันให้กับผิวหนัง [17-19]

## 3) ชั้นรองรับผิวหนัง (hypodermis)

เป็นผิวหนังชั้นลึกสุดประกอบด้วยเซลล์ไขมัน ไฟโบรบลาสต์ และแมคโครฟาจ ซึ่งทำหน้าที่เป็นฉนวนร่างกายและปกป้องผิวหนังจากแรงกระแทกภายนอก [17]

### 2.1.2 เส้นทางการซึมผ่านผิวหนัง

การซึมผ่าน (permeation) ในการนำส่งสารทางผิวหนัง เป็นปรากฏการณ์ที่โมเลกุลของสารสำคัญเคลื่อนที่เข้าสู่ผิวหนัง โมเลกุลของสารนี้ต้องละลายอยู่ในกระสายยาที่เป็นของเหลว หรืออาจเป็น โมเลกุลของสารที่สามารถเกิดการไหลได้ด้วยตัวเอง การถ่ายโอนของมวลสารเป็น

ตามกฎการแพร่ของฟิคส์ (Fick's diffusion law) โดยสิ่งที่ต้องการเพื่อให้เกิดการแพร่นั้นคือ ความแตกต่างของความเข้มข้น (concentration gradient) [17]

เมื่อสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำ และ/หรือละลายไขมันสัมผัสบนผิวหนัง สารดังกล่าวจะเกิดการซึมผ่านผิวโดยการแพร่ไปยังชั้นผิวที่ลึกลงไป ทั้งนี้ความสามารถของสารในการซึมผ่านผิวชั้นสตราตัมคอร์เนียขึ้นอยู่กับความมีขั้วของสาร และขนาดโมเลกุล แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่พบว่า สารที่มีความเป็นขั้วสูงมากสามารถซึมผ่านผิวชั้นสตราตัมคอร์เนียได้ทั้งบริเวณที่มีขั้วของคortiไอโซต์และไขมันระหว่างเซลล์ ซึ่งเส้นทางการซึมผ่านของสารสามารถแบ่งออกเป็น 2 เส้นทางหลัก ได้แก่ การซึมผ่านของสารทางเซลล์สตราตัม คอร์เนีย และ การซึมผ่านของสารทางท่อหรือรูเปิดทางผิวหนัง [17, 21-22]

### 1) การซึมผ่านของสารทางเซลล์สตราตัมคอร์เนีย (transepidermal route)

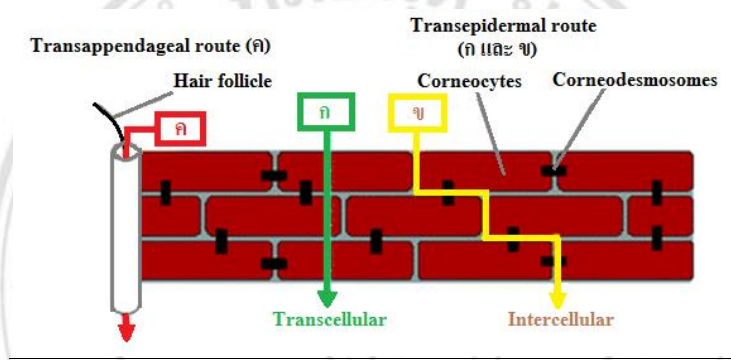
เนื่องจากชั้นสตราตัมคอร์เนียมีโครงสร้างที่เกิดจากการเรียงตัวของเซลล์คล้ายอิฐและปูนดังที่กล่าวข้างต้น จึงทำให้โมเลกุลของสารสามารถซึมผ่านได้ 2 รูปแบบ ได้แก่ แทรกผ่านทางระหว่างเซลล์คortiไอโซต์ (intercellular route) และ แพร่ผ่านทางคortiไอโซต์ (transcellular route) [17, 21-22] ดังแสดงในภาพที่ 2.2

### 2) การซึมผ่านของสารทางช่องเปิดหรือท่อนผิวหนัง (transappendageal route)

ช่องเปิดหรือท่อนทางผิวหนังประกอบด้วย รูขุมขน (hair follicles) ติดอยู่กับต่อมไขมัน (sebaceous gland) ต่อมเหงื่อขับออก (eccrine sweat gland) ต่อมเหงื่อไร้ออก (apocrine sweat gland) และเล็บ สารสามารถซึมสู่ผิวทางช่องเปิดหรือท่อนทางผิวหนังดังกล่าวได้ โดยพื้นที่เหล่านี้คิดเป็นร้อยละ 0.1 ของผิวหนังทั้งหมดที่เอื้อต่อการขนส่งสาร ดังนั้น เส้นทางนี้จึงส่งผลกระทบต่อสารที่แพร่ผ่านของสารในสภาวะคงที่ แต่เส้นทางนี้เป็นเส้นทางสำคัญของการซึมผ่านผิวของสารประเภทไอออนและโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีขั้ว ซึ่งไม่สามารถซึมผ่านผิวชั้นสตราตัมคอร์เนียได้ นอกจากนั้นพอลิเมอร์และอนุภาคคอลลอยด์สามารถนำส่งสู่เป้าหมายทางช่องรูเปิดเหล่านี้ได้ [17, 21-22] ดังแสดงในภาพที่ 2.2

เมื่อสารแพร่กระจายผ่านช่องทางต่างๆ ไปยังชั้นผิวที่อยู่ลึกลงไปก็จะเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดโดยผ่านทางเส้นเลือดฝอย ซึ่งสารที่เข้าสู่เส้นเลือดฝอยได้ต้องมีขนาดเล็กกว่าภาพตัดขวางของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นเลือดฝอยที่เล็กที่สุด ซึ่งมีค่าประมาณ 200 nm จาก

เส้นทางการขนส่งสารดังกล่าว ทำให้ระบบนำส่งยาที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในระดับ นาโน สามารถแทรกผ่านผิวหนังและท่อบนผิวหนังได้ เนื่องจากรูพรุนที่อยู่บนพื้นผิวและ เมมเบรนส่วนใหญ่มีช่องเปิด หรือทางเข้าในระดับเซลล์ หรือระดับเล็กกว่าเซลล์ในขนาดนาโน เช่นกัน [16] ดังนั้น อนุภาคขนาดนาโนที่มีขนาดมากกว่า 200 nm ขึ้นไปอาจไม่สามารถขนส่ง สารสำคัญที่กักเก็บไว้ไปถึงเส้นเลือดฝอยได้ แต่อาจมีความสามารถในการนำส่งสารที่กักเก็บ ไว้ไปถึงผิวชั้นหนังกำพร้าได้ จากข้อมูลดังกล่าวทำให้การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ระบบนำส่ง ยาที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโน เพื่อการนำส่งสารสกัดดาวเรืองไปยังเซลล์เมลาโนไซต์ ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ที่หนังกำพร้าชั้นสตราตัมเบซาล และเป็นเซลล์เป้าหมายของการศึกษาครั้งนี้

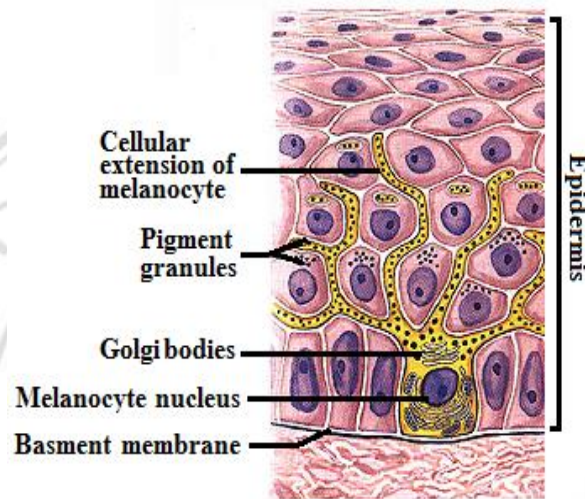


ภาพที่ 2.2 เส้นทางการซึมผ่านของสารที่ผิวหนัง [23]

2.1.3 สีผิวและเมลานิน

สีผิวเป็นลักษณะของผิวหนังที่ปรากฏให้เห็นภายนอกอย่างหนึ่ง แต่ละคนมีสีผิวที่ ต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่มีสีในผิวหนังและปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบ องค์ประกอบที่ มีสีในผิวหนัง ได้แก่ oxyhemoglobin (สีแดง) reduced hemoglobin (สีน้ำเงินแดง) เมลาโนิน (มีสี น้ำตาล แดง) melanoid (สีน้ำตาลอ่อน) keratohyalin (สีขาวทึบแสง) corneal layer (สีเหลืองอม เทา) และ carotene (สีเหลือง) เป็นต้น ซึ่งองค์ประกอบที่มีสีเหล่านี้จะผสมผสานกันให้เกิดโทน สีผิวขึ้นมา โดยความมากน้อยของสารแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในร่างกาย และภายนอก ร่างกายที่มากกระตุ้น ปัจจัยภายในร่างกาย เช่น เชื้อชาติ กรรมพันธุ์ ฮอร์โมน เป็นต้น ส่วนปัจจัย ภายนอกร่างกาย เช่น รังสียูวีจากแสงแดด ทั้งนี้ เมลาโนินถูกจัดเป็นเม็ดสีผิวที่มีบทบาทสำคัญต่อ การเปลี่ยนแปลงสีผิวที่เด่นชัด เนื่องจากมีหน้าที่ป้องกันผิวหนังจากสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัย ภายนอก นั่นคือ รังสียูวีจากแสงแดดที่สัมผัสผิวมากเกินไปนั้นเป็นตัวการสำคัญที่ก่ออันตราย ต่อผิวหนังและทำให้สีผิวหมองคล้ำ โดยเมลานินจะดูดซับรังสียูวีเอาไว้ไม่ให้ป็นอันตรายต่อ ผิว [3-5, 24]

เมลานิน (melanin) เป็นเม็ดสีที่สร้างขึ้นและเก็บไว้ใน melanosome ที่อยู่ใน melanocyte ซึ่งเป็นเซลล์ในผิวหนังชั้น stratum basale และถูกส่งมาเก็บไว้ที่เซลล์ keratinocyte ในชั้นผิวที่ ให้สีผิวหนัง ผม และตา เป็นต้น (ดังภาพที่ 2.3) เมลานินแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ eumelanin มีสีดำหรือน้ำตาล และ pheomelanin มีสีเหลืองแดง ทั้งนี้ eumelanin มีประสิทธิภาพในการปกป้องผิวจากรังสียูวีได้ดีกว่า pheomelanin [3-5, 24]



ภาพที่ 2.3 แสดงเซลล์สร้างสี และการกระจายของเม็ดสีในเซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า [25]

## 1) ทฤษฎีการเกิดเมลานิน

### 1.1) การกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนส

การผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการที่ผิวหนังถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวี เพื่อสังเคราะห์เมลานินที่เมลานโอไซต์ของผิวหนัง สามารถแบ่งออกเป็น 3 เส้นทางหลัก (ดังแผนภาพที่ 2.1) ได้แก่ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) - dependent signal pathway, Wnt ( $\beta$ -catenin) signal pathway และ extracellular signal - regulated kinase (ERK) signaling pathway ซึ่งทุกเส้นทาง การสังเคราะห์เมลานิน ของผิวหนังเกี่ยวข้องกับ microphthalmia associated transcription factor (MITF) เนื่องจากเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังนั้น หากเซลล์เมลานโอไซต์มีปริมาณ MITF มาก ส่งผลให้

มีเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ผลิตมากขึ้นตามกลไกการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสังเขปมีดังนี้ [26]

#### 1.1.1) cAMP-dependent signal pathway

Alpha-melanocyte stimulation hormone ( $\alpha$ -MSH) ซึ่งอยู่นอกเซลล์เมลาโนไซต์จะไปกระตุ้นทำให้เกิดการสร้าง MITF ปริมาณมากในเซลล์เมลาโนไซต์ จึงทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มากขึ้น [26]

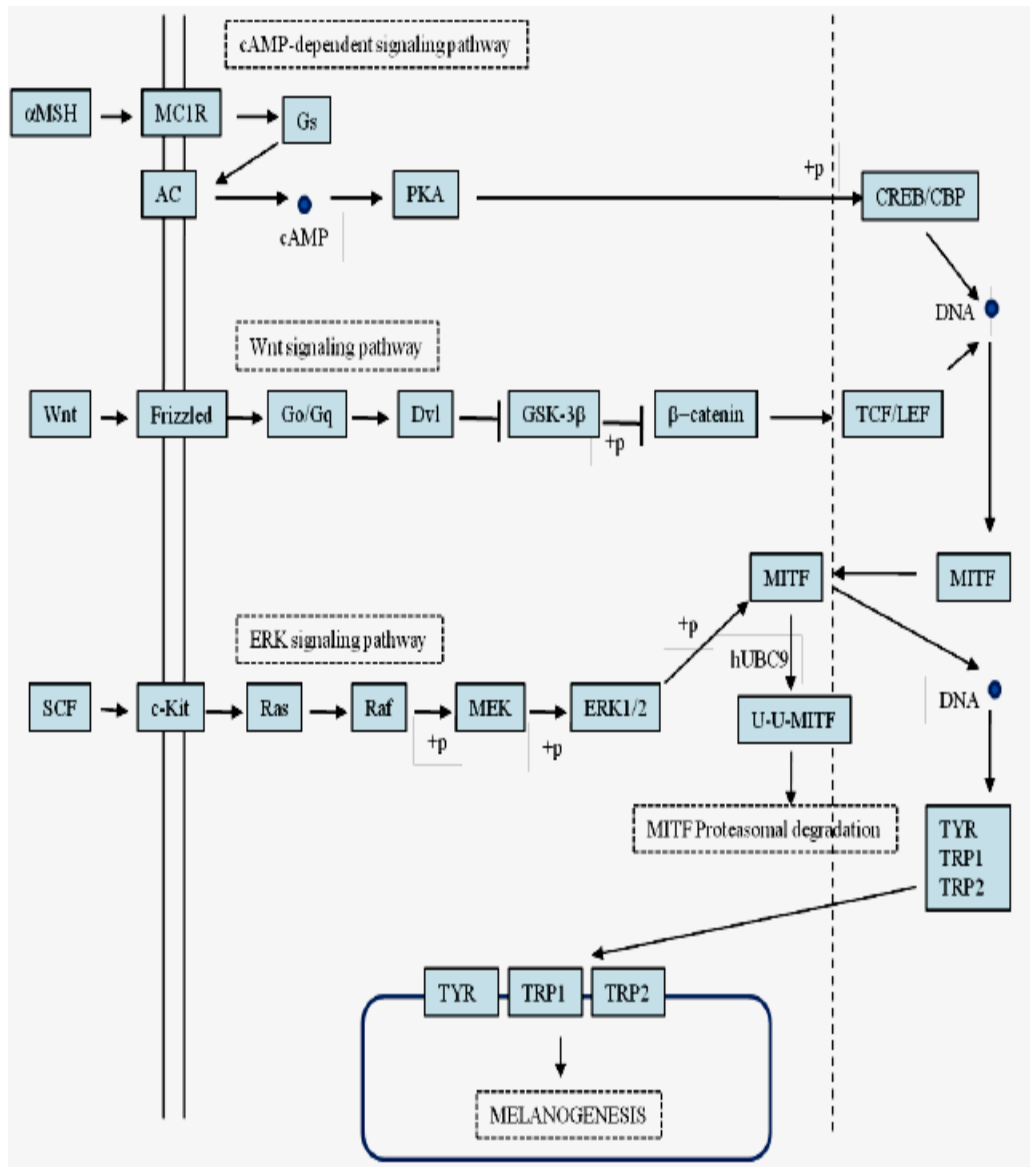
#### 1.1.2) Wnt signal pathway

การสังเคราะห์  $\beta$ -catenin ปริมาณมากในเซลล์เมลาโนไซต์จะไปกระตุ้นให้เกิดการสร้าง MITF มากขึ้น ทำให้มีการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนสปริมาณมากตาม [26]

#### 1.1.3) ERK signaling pathway

extracellular signal-regulated kinase (ERK) ซึ่งอยู่นอกเซลล์เมลาโนไซต์ โดยปกติแล้ว ERK ถ้ามีปริมาณมากจะทำลาย MITF ที่อยู่ในเซลล์เมลาโนไซต์ ดังนั้น หาก ERK มีปริมาณน้อยลง ส่งผลให้การสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนสปริมาณมากขึ้น [26]





แผนภาพที่ 2.1 เส้นทางการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการที่ผิวหนัง

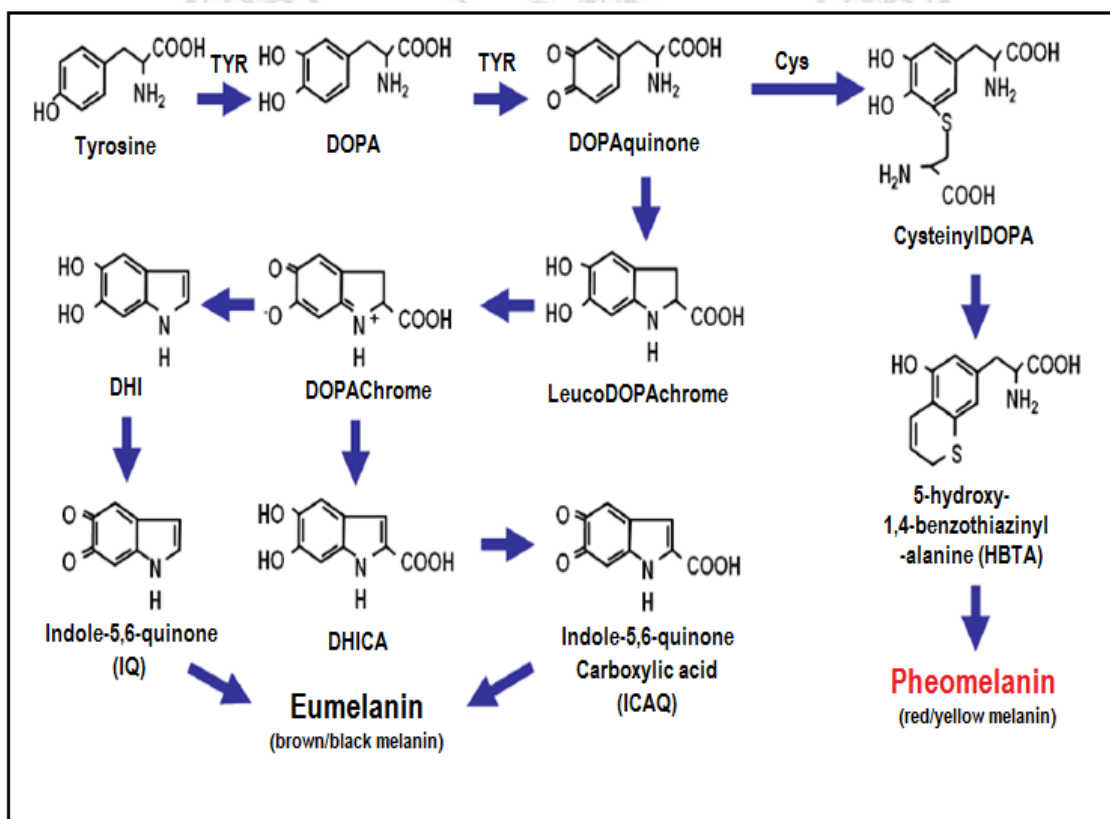
ถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวี [26]

### 1.2) การสังเคราะห์เมลานิน

กระบวนการสร้างเมลานินดังแสดงในแผนภาพที่ 2.2 แบ่งออกเป็น 2 ระยะ ในระยะแรก tyrosine หรือ dihydroxyphenylalanine (DOPA) ถูกเปลี่ยนไปเป็น dopaquinone โดยปฏิกิริยา oxidation ซึ่งมีเอนไซม์ tyrosinase (TYR) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา dopaquinone ที่สร้างขึ้นนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็น dopachrome ได้ด้วยปฏิกิริยา cyclization โดยหมู่ NH<sub>2</sub> จะทำหน้าที่เป็น nucleophile ได้เป็น leucodopachrome ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ (oxidized) ต่อไปให้ dopachrome ส่วนในระยะที่สอง dopachrome ที่เกิดขึ้นสูญเสีย CO<sub>2</sub>

แล้วถูกเปลี่ยนเป็น 5,6-dihydroxyindole (DHI) และต่อไปเป็น 5,6-indolequinone (IQ) ในอีกทางหนึ่ง dopachrome อาจเกิดปฏิกิริยา tautomerization ได้เป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone (ICAQ) โครงสร้าง IQ และ ICAQ จัดเป็นหน่วยย่อย ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยา polymerization ต่อไปได้เป็น eumelanin ที่มีสีดำหรือน้ำตาล [3-5]

ในกระบวนการสร้าง pheomelanin นั้น หลังจาก tyrosine หรือ DOPA ถูกเปลี่ยนเป็น dopaquinone แล้วจะเกิดปฏิกิริยากับหมู่ SH ของ cystein (Cys) หรือ glutathione ได้เป็น cysteinylDOPA จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา cyclization และ decarboxylation ได้เป็น 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine (HBTA) ซึ่งต่อมาเกิดปฏิกิริยา polymerization ได้เป็น pheomelanin ซึ่งมีสีเหลืองแดง กระบวนการสร้างเม็ดสีทั้งหมดนี้เกิดในส่วน melanosome และเม็ดสีที่ถูกผลิตขึ้นนี้จะถูกส่ง หรือขนย้ายไปยัง เซลล์ keratinocyte ด้วย melanosome dendrites [3-5, 27]



แผนภาพที่ 2.2 ชีวสังเคราะห์ของเมลานิน [24]

## 2) กลไกการขจัดเมลานิน

สีผิวที่ปรากฏให้เห็นนั้นเป็นองค์ประกอบรวมของสารต่างๆในผิว โดยเฉพาะจากสีของเมลานิน ดังนั้น การขจัดสีผิว (depigmentation) จึงมุ่งเน้นที่กระบวนการสร้างเมลานิน ซึ่งสามารถทำได้หลายขั้นตอน ดังนี้

1. การทำลายเซลล์สร้างเม็ดสีผิว (melanocytes)
2. การรบกวนชีวสังเคราะห์ของเมลานินและสารเริ่มต้นของเมลานิน
3. การยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส
4. การรบกวนการส่งผ่าน melanosome ไปยัง malpighian cell โดยระงับ phagocytosis ของ melanocytic dendrite หรือโดยทำให้เกิด intercellular edema
5. การเปลี่ยนแปลงเมลานินที่สร้างแล้วใน melanosome จาก oxidized form ที่มีสีเข้ม ไปเป็น reduced form ที่มีสีจางลง

จากวิธีการดังกล่าว วิธียับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดเพราะช่วยขจัดสีผิวได้ผลดีในเวลาที่ยาวนาน ทำให้ในปัจจุบันมีการวิจัยมากมายเพื่อค้นหาสารที่ใช้รบกวนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส หรือสารที่เรียกว่า “depigmenting agent” หรือ “สารต่อต้านกลไกการสร้างสีผิว” [4]

### 2.2 เอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ตั้งแต่แบคทีเรีย รา พืชชั้นสูง รวมทั้งสัตว์ ในพืช เอนไซม์ไทโรซิเนส ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างสารสีน้ำตาลดำ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกรมองคล้ำของสีผิวและผักผลไม้ ในสัตว์พวกแมลงบางชนิดเอนไซม์นี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัย เอนไซม์ไทโรซิเนสในมนุษย์ สังเคราะห์จากไรโบโซม (ribosome) พบที่ rough endoplasmic reticulum และถูกขนส่งด้วย golgi ไปยัง เมลาโนโซม เพื่อมีหน้าที่สังเคราะห์เมลานิน ดังนั้น จึงเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสีสำหรับสีน้ำตาลของผิวหนังหรือเส้นผม โดยเอนไซม์นี้มีการทำงานใน 2 ลักษณะ โดยใช้ออกซิเจนในรูปโมเลกุล (molecular oxygen) [5, 27] ดังนี้

1. Monophenolase activity เป็นการเร่งปฏิกิริยา *ortho*-hydroxylation ของ substrate ที่มีโครงสร้างเป็น monophenol ให้เป็น *ortho*-dihydroxyphenol

## 2. Diphenolase activity เป็นการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ *ortho*-dihydroxyphenol ให้เป็น *ortho*-quinone

เอนไซม์ไทโรซิเนสที่พบในสิ่งมีชีวิตต่างกันจะมีลักษณะต่างกัน เอนไซม์นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) ตั้งแต่ 276-706 โมเลกุล มีโครงสร้างเป็นหน่วยเดี่ยว (monomer) แต่ปรากฏอยู่ได้หลายรูป (isoform) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสที่พบในพืชและมนุษย์แม้จะแตกต่างกันแต่ก็มีลักษณะโครงสร้างเป็นหน่วยเดี่ยวและมีหลายรูปเช่นเดียวกัน โดยในมนุษย์นั้นพบว่าเอนไซม์นี้เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งเกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) [5]

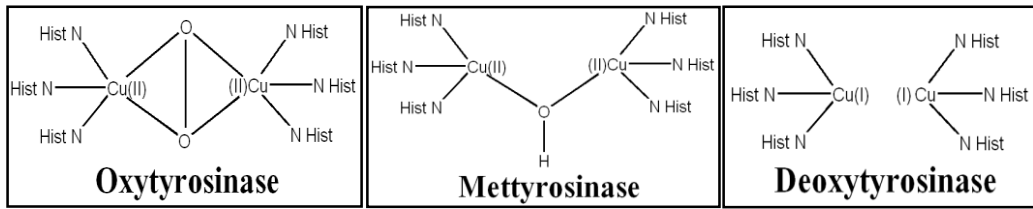
### 2.2.1 ตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตำแหน่งออกฤทธิ์ (active site) ของเอนไซม์ประกอบด้วย Cu จำนวน 2 อะตอม ลักษณะการวางตัวและอิเล็กตรอนของ Cu ทั้งสองอะตอมมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำให้เอนไซม์ปรากฏอยู่ในรูปต่างๆ (isoform) จำนวน 3 รูป ซึ่งมีชื่อเรียกดังนี้ oxytyrosinase, deoxytyrosinase และ mettyrosinase [5]

Oxytyrosinase เอนไซม์รูปนี้ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์มีโครงสร้างซึ่งประกอบไปด้วย  $Cu^{2+}$  จำนวน 2 อะตอมเกาะกับอะตอมของออกซิเจนจำนวน 2 อะตอม โดยแต่ละอะตอมอยู่ที่มุมของรูปสี่เหลี่ยม (tetragonal) ดังภาพที่ 2.4 ทั้งนี้  $Cu^{2+}$  แต่ละอะตอมจะถูกยึดเกาะด้วยอะตอมไนโตรเจนใน histidine ของเอนไซม์ ออกซิเจนที่อยู่ในตำแหน่งออกฤทธิ์ อยู่ในรูปของเปอร์ออกไซด์ (peroxide) เอนไซม์ในรูป oxytyrosinase สามารถเร่งปฏิกิริยาของ substrate ทั้งที่เป็น monophenol และ *ortho*-diphenol [5]

Mettyrosinase มีตำแหน่งออกฤทธิ์ ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วย 2 อะตอมของ  $Cu^{2+}$  โดยเชื่อมกับอะตอมออกซิเจนเพียงอะตอมเดียวในรูปของ OH ดังภาพที่ 2.4 เอนไซม์ในรูปนี้ช่วยเร่งปฏิกิริยาได้เฉพาะปฏิกิริยา oxidation ของ *ortho*-diphenol ให้เป็น *ortho*-quinone เท่านั้น แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ monophenol ได้ [5]

Deoxytyrosinase มีตำแหน่งออกฤทธิ์ (active site) ซึ่งประกอบไปด้วยอะตอมของ Cu ในสถานะ  $Cu^+$  และไม่มีอะตอมของออกซิเจนดังภาพที่ 2.4 เอนไซม์ในรูปนี้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาใดๆ ได้ แต่สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็น oxytyrosinase ได้โดยปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจน [5]



ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Oxytyrosinase, Mettyrosinase และ Deoxytyrosinase

### 2.3 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร (mechanism of tyrosinase enzyme inhibitor)

กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร สามารถแบ่งได้หลายแบบ ดังนี้

#### 2.3.1) แบ่งตามลักษณะของสารประกอบ

ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสแบ่งตามลักษณะของสารประกอบได้ 2 ชนิด [3] ได้แก่

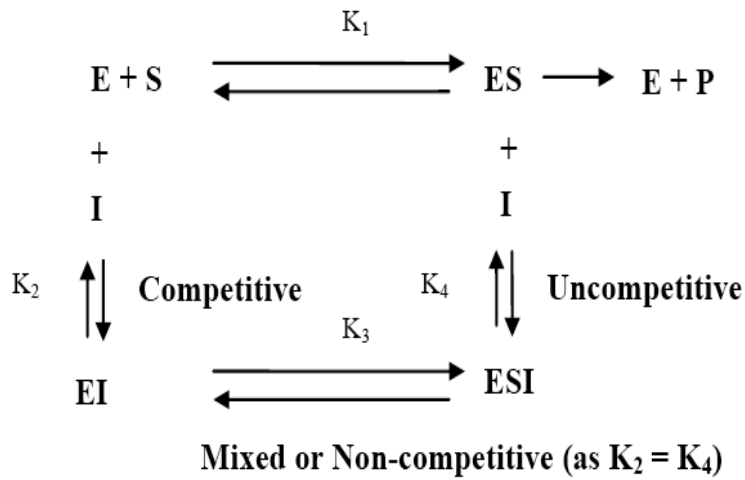
1. specific tyrosinase inactivators หรือเรียกว่า suicide substrates สารนี้สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสเสียสภาพและไม่สามารถกลับไปทำงานได้
2. specific tyrosinase inhibitor ได้แก่ สารประกอบที่สามารถจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบผันกลับได้ และลดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

#### 2.3.2) แบ่งตามกลไกการยับยั้งเอนไซม์

หากแบ่งสารที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสตามกลไกการยับยั้งเอนไซม์ สามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ competitive inhibitors, uncompetitive inhibitors, mixed type (competitive/ uncompetitive) inhibitors และ non-competitive inhibitors [3] ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.3

1. competitive inhibitor คือ สารที่ไปจับกับเอนไซม์เพื่อไม่ให้สารตั้งต้นไปจับกับเอนไซม์ที่ active site ที่เดียวกัน inhibitor ชนิดนี้เป็น copper chelator, non-metabolizable analogs หรืออนุพันธ์ของสารตั้งต้นนั้นๆ
2. uncompetitive inhibitor คือ สารที่ไปจับกับ enzyme-substrate complex
3. mixed type inhibitor คือ สารที่จับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ และสามารถจับกับ enzyme-substrate complex ได้ โดยมี equilibrium binding constants ในการจับต่างกัน

4. non-competitive inhibitor คือ สารที่จับกับเอนไซม์อิสระและสามารถจับกับ enzyme-substrate complex ได้ โดยมี equilibrium binding constants ในการจับเหมือนกัน



แผนภาพที่ 2.3 กลไกการยับยั้งของ inhibitor [3]

หมายเหตุ E, S, I และ P คือ Enzyme, Substrate, Inhibitor และ Product ตามลำดับ โดย ES คือ Enzyme-Substrate complex, EI คือ Enzyme-Inhibitor complex และ ESI คือ Enzyme-Substrate-Inhibitor complex

## 2.4 กลุ่มสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ในปัจจุบัน ภาคอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้นำสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ช่วยเพิ่มความกระจ่างใสให้ผิว ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่นิยมในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เช่น กรดโคจิก อาร์บูติน และ กรดอะเซลลาติก เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มากขึ้น โดยสามารถแบ่งประเภทสารดังกล่าวตามแหล่งที่มาได้ 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สารจากธรรมชาติ และสารสังเคราะห์ [3, 27-28]

### 2.4.1 สารจากธรรมชาติ

#### 1) สารกลุ่มฟีนอลิก

##### 1.1) อาร์บูติน และอนุพันธ์

อาร์บูติน (arbutin หรือ hydroquinone-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.1 เป็น hydroquinone glycoside พบได้ในผลสดของ California buckeye (*Aesculus californica*) ใบของ *Bergenia crassifolia* และ

bearberry plant (*Arctostaphylos uvaursi*) อาร์บูตินให้ฤทธิ์ยับยั้งออกซิเดชันของ L-DOPA ที่เกิดจากการถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไทโรซิเนสและเนื่องจากอาร์บูตินมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับไฮโดรควิโนนจึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จึงมีประสิทธิภาพในการรักษาผิวหนังที่มีการผลิตเม็ดสีผิวที่มากเกินไปได้ โดยทั่วไปแล้ว อาร์บูตินเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูก hydrolyze ก่อนทำให้ได้โครงสร้าง aglycone หรือ ส่วนไฮโดรควิโนนที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเข้าจับกับ  $\text{Cu}^{2+}$  หรือตำแหน่งทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส แบบ competitive inhibition อาร์บูตินมีหลายรูปแบบ เช่น  $\beta$ -arbutin (4-hydroxyphenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) และ  $\alpha$ -arbutin (4-hydroxyphenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) ชนิด  $\beta$ -arbutin พบได้ในธรรมชาติ เช่น ในแบร์เบอรี่ (bearberry) ส่วนชนิด  $\alpha$ -arbutin ได้มาจากการสังเคราะห์ ซึ่งให้ประสิทธิภาพยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า  $\beta$ -arbutin ถึง 20 เท่า เนื่องมาจากการมีโครงสร้างที่ถูก hydrolyze ด้วยเซลล์ ได้ง่ายกว่า นอกจากนี้มีการสังเคราะห์ deoxyarbutin ขึ้นเพื่อขจัดหมู่ OH ออกจากโครงสร้าง จึงช่วยทำให้มีความสามารถซึมสู่ผิวได้ดี และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่คล้าย [27-28]

## 1.2) โคลจิก และอนุพันธ์

โคลจิก (kojic หรือ 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one) มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.1 พบในราหลายชนิด เช่น สกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยทำหน้าที่เป็น chelating agent ไปจับกับ  $\text{Cu}^{2+}$  บริเวณตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ และดักจับอนุมูลอิสระ (scavenging free radicals) อย่างไรก็ตาม โคลจิกมีรายงานทำให้เกิดการแพ้ในผู้บริโภค และให้ผลดีในระดับปานกลางเมื่อทดสอบทางคลินิก ทั้งนี้ ได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์โคลจิกขึ้นเพื่อช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังให้ดีขึ้น ยกตัวอย่าง เช่น kojyl-APPA (5-(3-aminopropyl)-phosphino-oxy-2-(hydroxymethyl)-4H-1-pyran-4-one) ที่สังเคราะห์จากการนำ pyran ring มาเชื่อมกัน 2 วงด้วย ethylene linkage [27]

### 1.3) เจนติซิก และอนุพันธ์

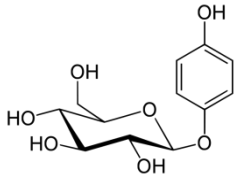
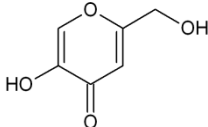
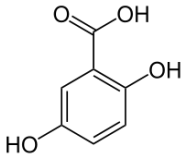
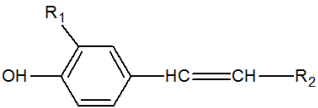
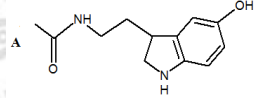
เจนติซิก (gentisic acid หรือ 2,5-dihydrobenzoic acid) มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.1 พบในรากของพืชจำพวกคีมังกร (gentian) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี อนุพันธ์พวก alkyl ester เช่น methyl gentisate ที่พัฒนาขึ้นภายหลังมีประสิทธิภาพที่มากกว่าเจนติซิกและเทียบเท่ากับโคจิก และอาร์บูติน มีความเป็นพิษต่อเซลล์และก่อให้เกิดกลายพันธุ์ที่ต่ำกว่า hydroquinone [27]

### 1.4) อนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีซินนามิก

อนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีซินนามิก (มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.1) ให้ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตเมลานิน ยกตัวอย่างเช่น *p*-coumaric acid พบในใบโสม ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งในการทำงานของ monophenolase และ diphenolase สารเฟอร์ริก (ferulic acid) ให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนสจากเห็ดในขั้นตอนการเกิดออกซิเดชันของ L-DOPA แบบ non-competitive inhibition สาร *N*-feruloyserotonin และ *N*-(*p*-coumaryl) serotonin พบในเมล็ดดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius* L.) ให้ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตเมลานินที่ดีมาก นอกจากนี้ยังมีอนุพันธ์กรดซินนามิกที่สังเคราะห์โดยการเติมหมู่ methyl หรือ OH ในโครงสร้างที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเช่นเดียวกัน [27]



ตารางที่ 2.1 แสดงโครงสร้างสารกลุ่มฟีนอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส [27]

 <p>1. Arbutin</p>	 <p>2. Kojic acid</p>	 <p>3. Gentisic acid</p>															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>4. Hydroxycinnamic acid derivatives</th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>p</i>-Coumaric acid</td> <td>H</td> <td>COOH</td> </tr> <tr> <td>Ferulic acid</td> <td>OMe</td> <td>COOH</td> </tr> <tr> <td><i>N</i>-feruloylserotonin</td> <td>OMe</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td><i>N</i>-(<i>p</i>-coumaroyl)serotonin</td> <td>H</td> <td>A</td> </tr> </tbody> </table>	4. Hydroxycinnamic acid derivatives	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	<i>p</i> -Coumaric acid	H	COOH	Ferulic acid	OMe	COOH	<i>N</i> -feruloylserotonin	OMe	A	<i>N</i> -( <i>p</i> -coumaroyl)serotonin	H	A	
4. Hydroxycinnamic acid derivatives	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>															
<i>p</i> -Coumaric acid	H	COOH															
Ferulic acid	OMe	COOH															
<i>N</i> -feruloylserotonin	OMe	A															
<i>N</i> -( <i>p</i> -coumaroyl)serotonin	H	A															

## 2) สารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols)

จัดเป็นกลุ่มสารที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใหญ่ที่สุด มักพบในดอกไม้ มีสี ประกอบด้วยสารกลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่ม flavonols เช่น quercetin, myricetin, kaempferol, galangin และ morin กลุ่ม flavones เช่น nobiletin, neohesperidin และ norartocarpetin กลุ่ม flavanones เช่น naringin, streppogenin, dihydromorin, artocarpetin, kurarinone และ kurarinol กลุ่ม flavanols เช่น taxifolin, glabridine, glabrene และ glyasperin C กลุ่ม isoflavonoids เช่น hagininn A, dalbergioidin และ calycosin กลุ่ม chalcones และอนุพันธ์ของ chalcones เช่น licuraside, isoliquiritin, licochalcone A, kuraridin และ kuraridinol กลุ่ม stilbenes เช่น oxyresveratrol, resveratrol, และ dihydrognetol และกลุ่ม coumarins เช่น aloesin และ cleomiscosin A [3, 27] โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มนี้บางตัวแสดงในตารางที่ 2.2

### 2.1) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (2-phenylbenzo- $\gamma$ -pyrone) ซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง (วง A และ B) เชื่อมต่อกันด้วยวง heterocyclic pyran (วง C) เนื่องจากฟลาโวนอยด์มีหมู่ methoxy hydroxyl และ glycoside มาเกาะตามตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่แตกต่างกัน จึงสามารถแบ่ง

ฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ ฟลาโวน (flavones) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาวานอล (flavanols) ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) ฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยขึ้นอยู่กับความสามารถในการเป็นตัวจับ (chelating agent) กับ  $\text{Cu}^{2+}$  แบบ competitive inhibitors ที่บริเวณทำปฏิกิริยา (active site) ตำแหน่งโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์คือ ตำแหน่งวง A และ B ยกตัวอย่างเช่น quercetin (3, 3', 4', 5, 7 - pentahydroxyflavone) พบในหอมใหญ่ และดอกไม้ quercetin ให้ฤทธิ์ดังกล่าวได้ดีกว่า kaempferol และ morin ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน kaempferol พบได้ในหญ้าฝรั่น (*Crocus sativus*) morin ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส นอกจากนี้ mulberroside F (moracine M-6) พบได้ในใบหม่อน (*Morus alba*) มีความสามารถลดการผลิตเมลานินในเมลานินไซต์ได้ ฟลาโวนอยด์อื่นๆที่มีรายงานการให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น galangin, luteolin, chrysin และ baicalein เป็นต้น [27, 29]

## 2.2) อโลซิน (aloesin)

aloesin (2-acetyl-8-D-glucopyranosyl-7-hydroxy-5-methylchromone) มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.2 พบได้ในว่านหางจระเข้ มีโครงสร้างเคมีที่คล้ายคลึงกับ flavone ให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบ competitive inhibition ในระดับปานกลาง แต่เมื่อนำ aloesin มาผสมกับ arbutin พบว่ามีการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีการยับยั้งแบบทั้ง non-competitive และ competitive inhibition [27]

## 2.3) กรดแกลลิก (gallic acid) และอนุพันธ์

กรดแกลลิก (มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.2) หลายตัวเป็นอนุพันธ์ของ hydroxyflavanols พบได้ในชาเขียว ยกตัวอย่างเช่น ECG [(-) epigallocatechin-3-O-gallate] GCG [(-)gallocatechin-3-O-gallate] EGCG [(-) epigallocatechin-3-O-gallate] (มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.2) EGC [(-) epigallocatechin] [26]

อนุพันธ์ของกรดแกลลิกบางตัวมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีมาก กรดแกลลิกและอนุพันธ์ที่มีสายโซ่คาร์บอนเอสเทอร์ขนาดสั้น (<C10) เมื่อถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนสจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลือง ส่วนกรดแกลลิกและอนุพันธ์ที่มีสายโซ่คาร์บอนเอสเทอร์ที่ยาว (>C10) เมื่อถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนสจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีคล้ายเม็ดสีผิว จึงบ่งชี้ได้ว่าความยาวของสายโซ่คาร์บอนมีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส [27]

#### 2.4) โพรไซยานิดิน (procyanidins)

โพรไซยานิดินพบได้ในชา แอปเปิ้ล องุ่น ให้ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานิน โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ไปเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนเมลานินไซต์ [27]

#### 2.5) อนุพันธ์ไฮดรอกซีสตีลบิน (hydroxystilbene derivatives)

อนุพันธ์ไฮดรอกซีสตีลบิน เช่น resveratrol และ oxyresveratrol (มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.2) มีประสิทธิภาพในการเป็นสารที่ทำให้ผิวขาว (whitening agent) เพราะมีความสามารถจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูง โดย oxyresveratrol มีฤทธิ์ที่ดีกว่า resveratrol นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 2-oxyresveratrol พบในสารสกัดจากกิ่งอ่อนของหม่อน (*Morus alba*) มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตเมลานิน [27]

#### 2.6) กรดเอลลาจิก (ellagic acid)

กรดเอลลาจิก (มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.2) เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล พบใน ผลไม้กลุ่มเบอร์รี่ ชาเขียว และทับทิม เป็นต้น ให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีมาก เพราะสามารถคีเลต  $\text{Cu}^{2+}$  ที่บริเวณเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ และยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินไซต์ด้วย [27]

### 3) สารกลุ่มเบนซาลดีไฮด์ (benzaldehydes) และอนุพันธ์เบนโซเอท (benzoate derivatives)

ยกตัวอย่างเช่น benzoic acid, benzaldehyde, anisic acid, anisaldehyde, fluorebenzaldehydes, salicylic acid, hydroxybenzaldehydes, 4-β-D-glucopyranosyloxybenzoate, protocatechualdehyde, prtocatechuic aldehyde และ protocatechuic acid [3]

### 4) สารกลุ่มไขมันที่มีโซ่ยาวและ สเตียรอยด์

ยกตัวอย่างเช่น triacylglycerol (trilinolein และ tritriacontenoate), glycosphingolipid (soyaacerebroside I และ cerebroside B), steroids (stigmast-5-ene-3-β-2,6-diol) และ long-chain ester (2-β- (2S)-hydroxyl-7(E)-tritriacontenoate) [3]

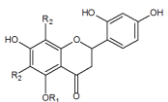
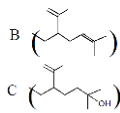
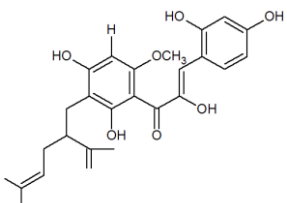
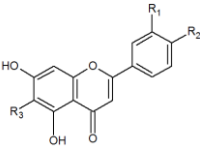
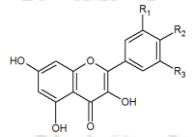
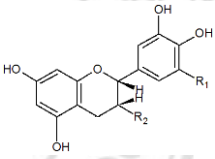
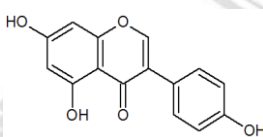
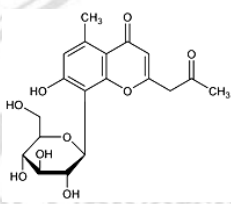
### 5) สารกลุ่มอื่นๆ

ยกตัวอย่างเช่น isoimperatorin และ imperatorin (มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.2) พบได้ในโศรสอ (*Angelica dahurica*) มีรายงานถึงการมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูง [27]

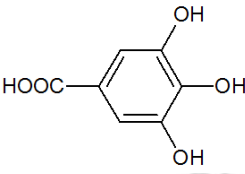
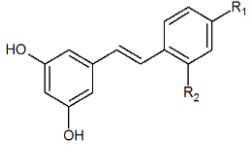
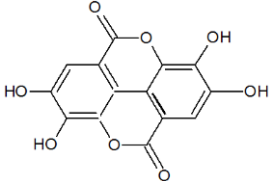
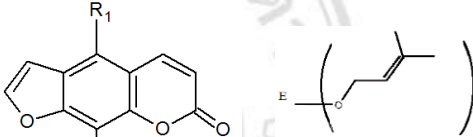
#### 2.4.2 สารสังเคราะห์

ตัวอย่างเช่น *N*-phenylthiourea, *N*-(phenylalkyl) cinnamides, *N*-substituted-*N*-nitrosohydroxylamines, sildenafil, oxadiazole, oxazolones, tetraketones, 4,4'-dihydroxybiphenyl, *S*-phenyl *N*-phenylthiocarbamate และ 4-(2',4'-dihydroxyphenyl)-(E)-3-buten-2-one นอกจากนี้ ยังมีสารสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างถาวร (irreversible inactivators) เช่น captopril, cetylpyridinium chloride, 3,5-dihydroxyphenyl decaoate และ *p*-hydroxybenzyl alcohol [3]

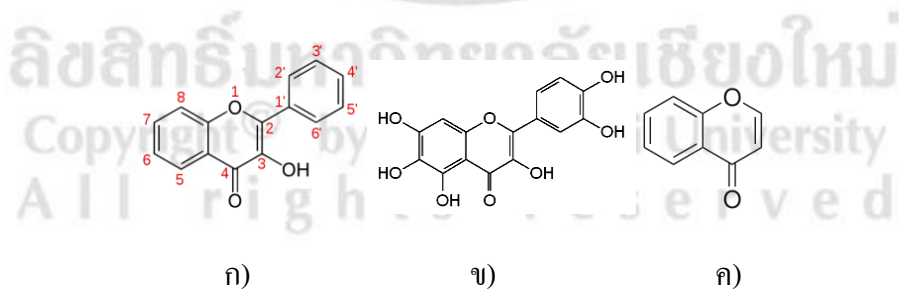
ตารางที่ 2.2 แสดงโครงสร้างสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  
ไทโรซิเนส [27]

 <table border="1" data-bbox="630 358 957 504"> <thead> <tr> <th>1. Flavonones</th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Kurarinol</td> <td>Me</td> <td>H</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>Kurarinone</td> <td>Me</td> <td>H</td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>Kushnol F</td> <td>H</td> <td>B</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Sophoraflavanone G</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>B</td> </tr> </tbody> </table>	1. Flavonones	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Kurarinol	Me	H	C	Kurarinone	Me	H	B	Kushnol F	H	B	H	Sophoraflavanone G	H	H	B													
1. Flavonones	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>																														
Kurarinol	Me	H	C																														
Kurarinone	Me	H	B																														
Kushnol F	H	B	H																														
Sophoraflavanone G	H	H	B																														
 <p data-bbox="470 817 630 851"><b>2. Kuraridin</b></p>	 <table border="1" data-bbox="1005 716 1284 817"> <thead> <tr> <th>3. Flavones</th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chrysin</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Luteolin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Baicalein</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table>	3. Flavones	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Chrysin	H	H	H	Luteolin	OH	OH	H	Baicalein	H	H	OH																
3. Flavones	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>																														
Chrysin	H	H	H																														
Luteolin	OH	OH	H																														
Baicalein	H	H	OH																														
 <table border="1" data-bbox="351 1064 710 1232"> <thead> <tr> <th>4. Flavonols</th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Galangin</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Quercetin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Kaempferol</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Myricetin</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table>	4. Flavonols	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Galangin	H	H	H	Quercetin	OH	OH	H	Kaempferol	H	OH	H	Myricetin	OH	OH	OH	 <table border="1" data-bbox="973 1086 1316 1220"> <thead> <tr> <th>5. Flavanols</th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Catechin</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Epicatechin</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>EGCG</td> <td>OH</td> <td>Gallate</td> </tr> </tbody> </table>	5. Flavanols	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Catechin	H	OH	Epicatechin	H	OH	EGCG	OH	Gallate
4. Flavonols	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>																														
Galangin	H	H	H																														
Quercetin	OH	OH	H																														
Kaempferol	H	OH	H																														
Myricetin	OH	OH	OH																														
5. Flavanols	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>																															
Catechin	H	OH																															
Epicatechin	H	OH																															
EGCG	OH	Gallate																															
 <p data-bbox="486 1467 622 1500"><b>6. Isoflavone</b></p> <p data-bbox="502 1512 606 1545">Genistein</p>	 <p data-bbox="1061 1500 1173 1534"><b>7. Aloesin</b></p>																																

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงโครงสร้างสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส [27]

 <p><b>8. Gallic acid</b></p>	 <table border="1" data-bbox="941 604 1308 728"> <thead> <tr> <th><b>9. Hydroxystilbenes</b></th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Resveratrol</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Oxyresveratrol</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table>	<b>9. Hydroxystilbenes</b>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Resveratrol	OH	H	Oxyresveratrol	OH	OH
<b>9. Hydroxystilbenes</b>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>								
Resveratrol	OH	H								
Oxyresveratrol	OH	OH								
 <p><b>10. Ellagic acid</b></p>	 <table border="1" data-bbox="957 1052 1244 1164"> <thead> <tr> <th><b>11. Others</b></th> <th>R<sub>1</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Imperatorin</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Isoimperatorin</td> <td>E</td> </tr> </tbody> </table>	<b>11. Others</b>	R <sub>1</sub>	Imperatorin	H	Isoimperatorin	E			
<b>11. Others</b>	R <sub>1</sub>									
Imperatorin	H									
Isoimperatorin	E									

2.5 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอลและการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส



ภาพที่ 2.5 แสดง ก) โครงสร้างพื้นฐานของ flavonol [29]

ข) quercetagenin [30] และ ค) benzo-  $\gamma$ -pyrone [31]

quercetagenin (ภาพที่ 2.5 ข) เป็นสารประกอบหลักของสารสกัดดอกดาวเรืองที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอล ซึ่งโดยทั่วไปแล้วฟลาโวนอลมี

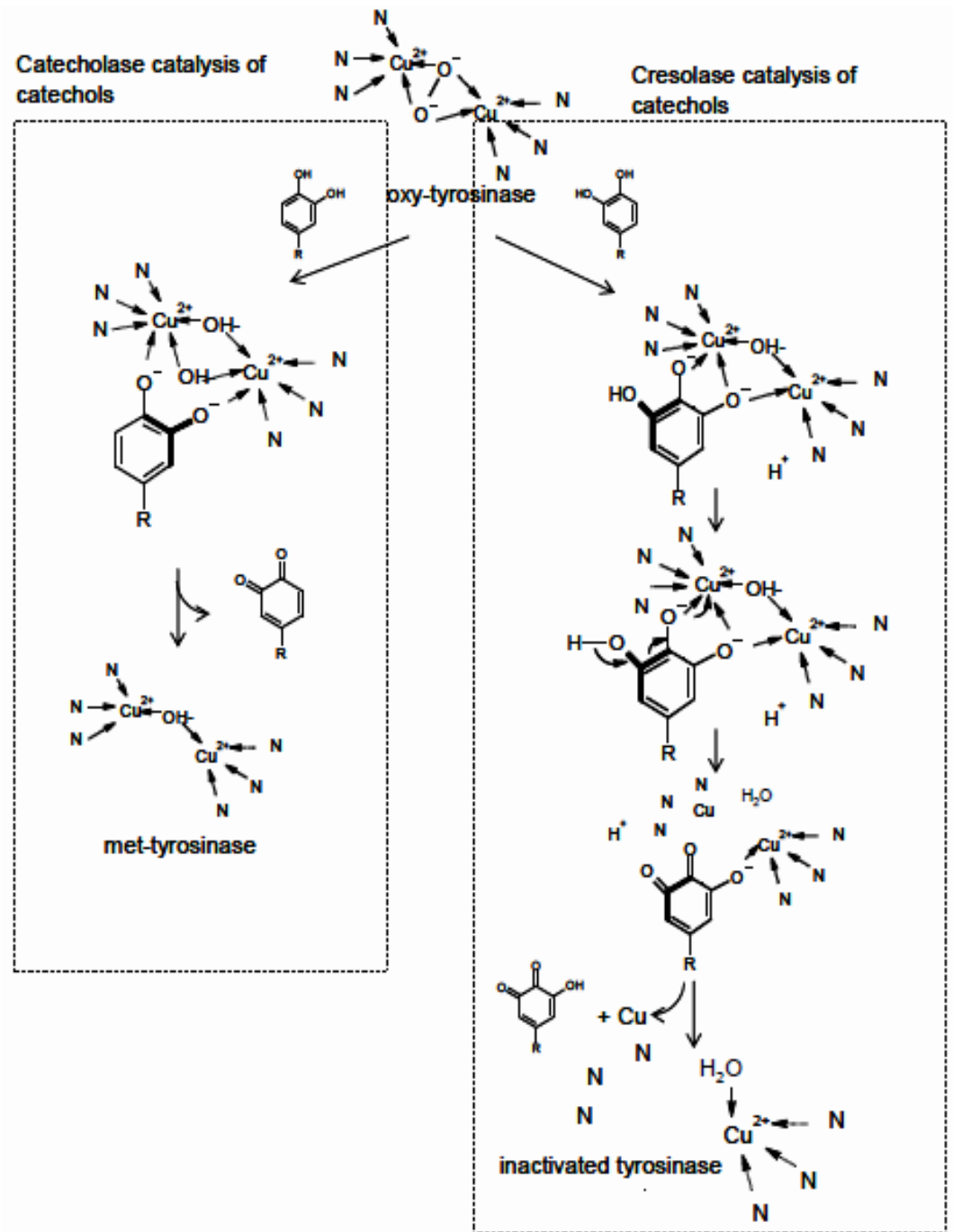
ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบ competitive inhibitor ในขั้นตอนที่ 2 ของการเกิดปฏิกิริยาในระยะแรกของการสร้างเมลานิน (หรือขั้นตอนการเกิด oxidation ของ L-DOPA ด้วยไทโรซิเนส) โดยส่วนของโครงสร้าง flavonol ที่ทำหน้าที่เป็น copper chelation หรือไปจับกับ Cu คือโครงสร้างส่วน 3-hydroxy-4-keto moiety ของ benzo- $\gamma$ -pyrone (ภาพที่ 2.5 ค) [3]

นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Chang ถึงความสามารถของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีของสารกลุ่ม flavonol สามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ quercetin > myricetin > kaempferol > galangin >> morin และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสส่วน aglycones ของ flavonol กับ flavonol glycoside พบว่า flavonol glycoside ให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่อ่อนกว่าส่วน aglycones [3]

## 2.6 กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของ *o*-diphenol [3]

กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการเกิดออกซิเดชันของ monophenols ด้วยเอนไซม์ cresolase และ จากการเกิดออกซิเดชันของ diphenols ด้วยเอนไซม์ catecholase เมื่อ monophenols และ/หรือ diphenols เกิดการออกซิเดชัน อะตอมออกซิเจนในโมเลกุลจะให้อิเล็กตรอนแก่  $\text{Cu}^{2+}$  จนทำให้  $\text{Cu}^{2+}$  มีเลขออกซิเดชันเป็น 0 (zero-valency copper) และทำให้ Cu ไม่สามารถจับกับ N อะตอมของกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine) ได้ ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.4 [3]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved



แผนภาพที่ 2.4 กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการเกิดออกซิเดชันของสารตั้งต้น *o*-diphenol ด้วยการดำเนินงานของเอนไซม์ cresolase และ catecholase [3]



## 2.7 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส แบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่คือ วิธีทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro test*) และในสัตว์ทดลอง (*In vivo test*) ตัวอย่างการทดสอบทาง *In vitro* เช่น mushroom tyrosinase inhibitory assay [5,32] และ cellular tyrosinase inhibitory assay [33] ส่วนการทดสอบทาง *In vivo* เป็นการทดสอบ depigmenting activity ในสิ่งมีชีวิต ยกตัวอย่างเช่น mouse model system [34-35] zebrafish model system [34] และ human skin [36-37] เป็นต้น

วิธีที่เลือกใช้ในการศึกษาคั้งนี้คือวิธี mushroom tyrosinase inhibitory assay ซึ่งวัดประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการยับยั้งการเกิด dopachrome ด้วยเทคนิค spectrophotometry ที่เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในหลายๆงานวิจัย โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้ทดลองสกัดมาจากเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ในมนุษย์มากกว่าเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรีย (*Streptomyces glaucescens*) และรา (*Neurospora crassa*) อีกทั้งเอนไซม์จากเห็ดนี้มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป หาซื้อได้ง่าย และเป็นที่ยอมรับนำมาใช้ศึกษาวิจัยทั่วไป [3] นอกจากนี้ วิธีการศึกษานี้เป็นวิธีการที่ใช้สารสกัดในการทดสอบน้อย มีขั้นตอนการทดลองที่ไม่ซับซ้อน เกิดปฏิกิริยาที่มีความต่อเนื่อง และสามารถแปรผลได้รวดเร็ว อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้มีข้อจำกัด ได้แก่ ไม่สามารถวัดผลสารที่มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้อย่างรวดเร็ว ไม่สามารถวัดผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวต่ำได้ และบางครั้งอาจมีการรบกวนระบบจากสารตัวกลาง (intermediate) ที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งจะทำได้ผลการทดลองที่คลาดเคลื่อน [33]

## 2.8 ดาวเรือง



ภาพที่ 2.6 ดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) [38]

## 2.8.1 อนุกรมวิธานของดาวเรือง (*Tagetes erecta* Linn.) [39-41]

อาณาจักร (kingdom): Plantae

ต้วชั้น (division): Magnoliophyta

ชั้น (class): Magnoliopsida

อันดับ (order): Asterales

วงศ์ (family): Asteraceae

สกุล (genus): *Tagetes*

ชนิด (species): *Tagetes erecta* (*T. erecta*)

## 2.8.2 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์และทางเคมี

1) ชื่อวิทยาศาสตร์: *Tagetes erecta* Linn.

2) ชื่ออื่นๆ: คำปู้หลวง คำปู้ คำพู่ชู (ภาคเหนือ), ดาวเรืองใหญ่ (ภาคกลาง), พอทุ (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน), บ่วงลิ้วเก็ก; ฉะพู่ย้ง; กิมเก็ก (ภาษาจีน), African marigold, Marigold [39]

3) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ไม้ล้มลุก มีกลิ่นเฉพาะ สูง 15-60 cm ลำต้นเป็นร่อง สีเขียว แตกกิ่งก้านมากที่โคนต้น ใบประกอบแบบขนนก ปลายใบคี่ ออกเรียงตรงข้ามกัน ใบย่อยมี 11-17 ใบ ใบย่อยรูปรี กว้าง 0.5-1.5 cm ปลายใบแหลม โคนใบสอบ เนื้อใบนิ่ม ขอบใบหยักฟันเลื่อย ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง ดอกย่อยสีเหลืองเข้ม มี 2 ลักษณะ คือ ดอกไม่สมบูรณ์เพศอยู่รอบนอกจำนวนมากสีเหลืองหรือเหลืองส้ม ลักษณะคล้ายลิ้นบานแผ่ออกปลายม้วนลง ซ้อนกันหลายชั้น ดอกสมบูรณ์เพศมีลักษณะเป็นหลอดเล็กๆจำนวนมาก รวมกลุ่มอยู่บริเวณกลางช่อดอก กลีบเลี้ยงสีเขียวเชื่อมติดกันหุ้มโคนช่อดอก ก้านชูช่อดอกยาว ผลเป็นผลแห้งสีดำ ไม่แตก ดอกจะแห้งติดกับผล (ดังภาพที่ 2.6) [39, 42]

4) องค์ประกอบทางเคมี

ได้แก่ phenolic compounds (syringic acid, gallic acid), thiophene derivatives ( $\alpha$ -terthienyl), terpenoids ( $\beta$ -amyrin, erythrodiol, oplodiol), steroids ( $\beta$ -sistosterol,  $\beta$ -

daucosterol, stigmasterol), alkaloids (6-ethoxy-2,4-dimethylquinoline), flavonoids (quercetagenin, kaempferol, kaempferitrin, quercetin), carotenoids (lutein,  $\beta$ -carotene, zeaxanthin), อื่นๆ ได้แก่ monolinoleoyl glycerol, uracil, mannitol, vitamin E, palmitin [10]

Rui-hua และคณะ มีการศึกษาน้ำมันหอมระเหยในส่วนต่างๆของดาวเรือง (*T. erecta*) ได้แก่ ส่วน ดอก ใบ และลำต้นของดาวเรือง แต่ละส่วนถูกสกัดด้วยวิธี Simultaneous distillation extraction (SDE) จากนั้นใช้ Gas Chromatography (GC) แยกส่วนประกอบแล้ววิเคราะห์สารด้วย Mass Spectrometer (MS) พบว่าส่วนดอกมี น้ำมันหอมระเหยมากที่สุดถึงร้อยละ 3.7 รองลงมาคือส่วนใบร้อยละ 3.5 และส่วนลำต้นร้อยละ 2.9 น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีสารประกอบที่หลากหลาย ซึ่งสารหลักคือ limonene [43]

Rosa และคณะ ศึกษาสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากส่วนดอกซึ่งสกัดด้วย light petroleum ด้วยวิธี soxhlet extraction แล้วนำมาวิเคราะห์สารประกอบด้วย Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารประกอบหลักได้หลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น beta-caryophyllene, limonene, methyleugenol, (*E*)-ocimene piperitone, piperitone และ terpinolene เป็นต้น [44]

จากการศึกษาของ Kaisoon และคณะ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของดาวเรือง (*T. erecta*) มีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าดาวกระจาย (*Conos sulphureus*) พวงชมพู (*Antigonon leptopus*) และเฟื่องฟ้า (*Bougainvillea glabra*) จากการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC พบสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ gallic acid, chlorogenic acid, vanilic acid, caffeic acid, ferulic acid และ sinapic acid สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบ ได้แก่ rutin, myricetin, quercetin, apigenin และ kaempferol โดยที่ kaempferol มีปริมาณสูงสุด [45]

### 2.8.3) สรรพคุณทางยา ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และพิษวิทยา

#### 1) สรรพคุณทางยา

ทั้งต้น ใช้ขับลมในลำไส้ แก้ปวดท้อง และแก้จุกเสียด ใบ ใช้แก้ฟื่นอง รักษาอาการบวมไม่รู้สาเหตุ ฝีหัวขาด โรคเกี่ยวกับเลือดลม ริดสีดวงทวารโรคไต อาการปวดกล้ามเนื้อ บาดแผลต่างๆ น้ำคั้นใบ แก้หูเจ็บ และ ดอก แก่ริดสีดวงทวาร เป็นยาฟอก

เลือด แก้วไกรณ แก้วปวดฟัน แก้วตาเจ็บ บำรุงตับ ขับร้อน ขับลม ละลายเสมหะ แก้วเวียนหัว แก้วตาแดง ตาเจ็บ เนื่องจากลมและไฟ แก้วไอหวัด ต่อมน์้านมอักเสบ แก้วแผลมีหนอง ขับของเสีย ไล่วุง นอกจากนี้ยังใช้ดอกแห้งบดเป็นผงผสมอาหารไก่เพื่อช่วยให้ไข่แดงมีสีเข้มขึ้น [39, 42]

## 2) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา:

### 2.1) ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

Rhama และ Mahavan ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากดอกดาวเรือง (*T. erecta*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายหลายชนิด ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่สารสกัดจากดอกดาวเรืองสามารถต้านได้ ได้แก่ *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus mutans* และ *S. pyogenes* โดยเฉพาะสารสกัดที่มีกลุ่มสาร flavonoid สามารถต้านแบคทีเรียได้ทุกชนิดที่ทดสอบ โดยเฉพาะแบคทีเรียชนิด *K. pneumonia* ที่สามารถต้านได้มากที่สุด มีค่า inhibition zone กว้างถึง 29.50 mm และสาร patulitrin เป็นสารกลุ่ม flavonoid ตัวหนึ่งที่มีศักยภาพในการต้านแบคทีเรียได้ดี [46-47]

Ruddock และคณะ ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิด *Neisseria gonorrhoeae* ของพืชทั้งหมด 19 ชนิด ด้วยวิธี disc susceptibility assay พบว่าดอกดาวเรือง (*T. erecta*) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในจำนวนพืชทั้งหมดที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้สูงสุด [46-47]

### 2.2) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Chivde และคณะ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดด้วยเอทานอลของดอกดาวเรือง (*T. erecta*) โดยวิธี DPPH reducing power และ superoxide radical scavenging activity ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า สารสกัดนี้ให้ฤทธิ์ reducing power มากกว่าสารมาตรฐาน (เช่น ascorbic acid) ส่วนฤทธิ์ superoxide anion และ ฤทธิ์ DPPH scavenging activity มีน้อยกว่าสารมาตรฐาน อย่างไรก็ตาม สรุปได้ว่าสารสกัดเอทานอลของดอกดาวเรืองให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ [47, 49]

Li และคณะ นำเอาสารสกัดจากดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มาหาปริมาณฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-ciocalteu พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด และสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อศึกษาด้วยวิธี DPPH [50]

Phrutivorapongkul และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในดอกดาวเรือง (*T. erecta*) โดยวิธี DPPH reducing power เปรียบเทียบกับปริมาณฟีนอลิก (total phenolic content) และพบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทและสารสกัดแยกส่วนลำดับที่ 8 และ 9 ซึ่งแยกได้จากการนำสารสกัดเอทิลอะซิเตทไปแยกด้วยเทคนิค Vacuum Column Chromatography (VCC) มีปริมาณปริมาณฟีนอลิกสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่สูงเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ และสารสกัดแยกส่วนตามลำดับ โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณฟีนอลิกเป็น  $318.05 \pm 3.18$  mg gallic acid/ g extract มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ค่า  $IC_{50} = 15.71 \pm 0.24$   $\mu\text{g/ml}$  ส่วนสารสกัดแยกส่วนลำดับที่ 8 และ 9 มีปริมาณฟีนอลิกเป็น  $518.50 \pm 6.45$  และ  $461.70 \pm 5.12$  mg gallic acid/g extract ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ค่า  $IC_{50} = 7.80 \pm 0.49$  และ  $7.64 \pm 0.10$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ [13]

### 2.3) ฤทธิ์ฆ่าแมลง

Nikkon และคณะ ได้นำดอกดาวเรือง (*T. erecta*) มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เพื่อศึกษาฤทธิ์การฆ่ามอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่สำคัญ โดยเฉพาะในผลผลิตทางการเกษตร และจากการศึกษาพบว่า สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้ฤทธิ์ฆ่ามอดแป้งชนิดนี้ได้ทั้งในระยะตัวอ่อนและโตเต็มวัยได้ดีที่สุด รองลงมาเป็น สารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเอทานอลตามลำดับ ซึ่งค่า  $LC_{50}$  ของตัวอ่อนในระยะที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มีค่าเป็น 11.64, 14.23, 19.26, 29.02, 36.66 และ 59.51  $\mu\text{g/cm}^2$  ตามลำดับ (ในระยะเวลาทำการทดลอง 72 ชั่วโมง) และในตัวโตเต็มวัย มีค่าเป็น 65.93  $\mu\text{g/cm}^2$  (ในระยะเวลาทำการทดลอง 72 ชั่วโมง) โดยที่กลุ่มควบคุมของการทดลองไม่มีตัวใดตายเลย สรุปได้ว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองเป็นยาฆ่ามอดแป้งชนิด *T. castaneum* ได้ [47, 51]

Nikkon และคณะ ศึกษาฤทธิ์การฆ่าของสารสกัดด้วยเอทานอล คลอโรฟอร์ม และ ปิโตรเลียมอีเทอร์จากดอกดาวเรือง (*T. erecta*) ในตัวอ่อนยุง ชนิด *Culex quinquefasciatus* แต่ละระยะของตัวอ่อน ได้แก่ ระยะ 1, 2, 3 และ 4 พบว่าสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้ค่าความเป็นพิษต่อตัวอ่อนสูงสุด มีค่า  $LC_{50}$  เป็น 14.14, 17.06, 36.88 และ 75.48  $\mu\text{g/ml}$  ตัวอ่อนที่อายุมากขึ้นมีความทนต่อ สารสกัดได้ดี สรุปได้ว่าสารสกัดดาวเรืองมีฤทธิ์ฆ่ายุงได้ดี [47-48]

#### 2.4) ฤทธิ์รักษาแผล

Kiranmai และคณะ ศึกษาฤทธิ์การรักษาแผลของ carbopol gel ที่ผสมสาร สกัดน้ำของ *Gymnema sylvestre* และ ดาวเรือง (*T. erecta*) ทดสอบในหนูเหือก ด้วยวิธี excision wound model และ burn wound model พบว่าในทั้ง 2 การ ทดสอบนี้แผลที่ได้รับการรักษาโดยทาเจลที่ผสมสารสกัดดังกล่าวทั้ง 2 ชนิด รวมกัน ให้ฤทธิ์รักษาแผลที่ดีที่สุดอาจเป็นเพราะการมีฤทธิ์เสริมกันของสารสกัด ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งการทำให้แผลประสานกัน อาจเป็นเพราะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีในพืชทั้งสองชนิดนี้ หรือฤทธิ์เสริมการ รักษาแผล [47, 52]

#### 2.5) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Vallisuta และคณะ นำสารสกัดดอกดาวเรือง (*T. erecta*) ที่สกัดด้วย เอทานอลและเอทิลอะซิเตทมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี dopachrome method พบว่าสารสกัดเอทานอลและเอทิลอะซิเตทมีค่า  $IC_{50}$  เป็น 1,078  $\mu\text{g/ml}$  และ 1,467  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ [53]

Phrutivorapongkul และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสในดอก ดาวเรือง (*T. erecta*) และพบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทและสารสกัดแยก ส่วน ซึ่งแยกได้จากการนำสารสกัดเอทิลอะซิเตทไปแยกด้วยเทคนิค Vacuum Column Chromatography (VCC) มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสที่ดี ทั้งในขั้นตอนที่ 1 และ 2 ของกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว โดยสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ ยับยั้งไทโรซิเนส เมื่อใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็น สารตั้งต้น ที่  $IC_{50}=186.39\pm 6.95\mu\text{g/ml}$  และ  $IC_{50}=140.31\pm 7.99\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ส่วนสารสกัด แยกส่วนลำดับที่ 7, 8, 9, 10 และ 11 มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส เมื่อใช้ L-tyrosine

เป็น สาร ตั้ง ต้น ที่ ค่า  $IC_{50}$  เป็น  $164.49 \pm 3.88$ ,  $186.39 \pm 6.95$ ,  $291.83 \pm 21.76$ ,  $460.93 \pm 19.12$  และ  $390.76 \pm 14.19$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และเมื่อใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น สารสกัดแยกส่วนลำดับที่ 7, 8, 9, 10 และ 11 มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสที่ค่า  $IC_{50}$  เป็น  $352.22 \pm 32.40$ ,  $140.36 \pm 7.99$ ,  $193.17 \pm 27.35$ ,  $488.85 \pm 23.70$  และ  $470.47 \pm 29.79$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ [13]

### 3) พิษวิทยา:

Nikkon และคณะ ศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษเฉียบพลัน (subacute toxicity) จากสารสกัดคลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็น fraction ที่ได้จาก solvent-solvent partitioning method ของสารสกัดเอทานอลจากดอกดาวเรือง โดยหนู Long Evan's rat ถูกฉีดสารสกัดดังกล่าวเข้าไปในร่างกายที่ความเข้มข้น 200 และ 400 mg/kg ผลการทดลองพบว่าขนาดความเข้มข้นที่ให้ดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญใดๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา และชีววิทยาในหนู แม้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้วก็ตาม และการทดสอบนี้ยังแสดงถึงการไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในตับ ไต หัวใจ และปอด ของหนูที่ได้รับสารสกัดนี้ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มไม่มีความเป็นพิษต่อหนูที่นำมาทดสอบ [47, 54]

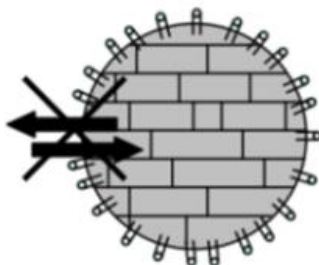
Vallisa และคณะ ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดดอกดาวเรืองที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตตต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด H460 lung cancer cell line และชนิด Caco-2 cell line ผลการทดลองพบว่า สารสกัดทั้งสองชนิดไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าว [53]

Phrutivorapongkul และคณะ ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดดอกดาวเรืองต่อเซลล์ fibroblasts ด้วย Sulphorodamine B (SRB) assay โดยใช้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และสาร quercetagenin ซึ่งเป็นองค์ประกอบในดอกดาวเรืองทดสอบ ผลการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงที่สุด 1 mg/ml สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และสาร quercetagenin มี % การมีชีวิตรอดของเซลล์ fibroblasts ที่  $109.89 \pm 31.56$  และ  $85.22 \pm 21.16$  ตามลำดับ ดังนั้น สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และสาร quercetagenin ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ fibroblasts [13]

นอกจากนี้มีการใช้สารสกัดดอกดาวเรืองเป็นเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอก และยังไม่มียางานความเป็นพิษในคน โดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้ดอกดาวเรือง

ในอุตสาหกรรมสัตว์ เช่น ช่วยเพิ่มสีของไข่แดงในไข่ไก่ ซึ่งยังไม่มีรายงานความเป็นพิษ เช่นกัน [55]

## 2.9 ตัวพาอนุภาคไขมันระดับนาโน หรือ Nanostructured lipid carriers (NLC)



ภาพที่ 2.7 ลักษณะ wall material ของ NLC และการแลกเปลี่ยนสาร ที่กักเก็บภายในกับสิ่งแวดล้อม [17, 56]

NLC ย่อมาจาก Nanostructured Lipid Carrier หรือ อนุภาคไขมันระดับนาโนที่มีขนาด 100-500 nm ได้จากการผสมกันระหว่างไขมันแข็ง ไขมันเหลว และสารลดแรงตึงผิว โดย NLC มีสถานะเป็นของแข็งที่กระจายอยู่ในสารละลายน้ำ และทำให้ง่ายต่อการนำสารลดแรงตึงผิวสร้างเป็นฟิล์มรอบอนุภาคไขมัน NLC ถูกคิดค้นขึ้นในปีคริสต์ศักราช 1999-2000 โดยนักวิจัยชื่อ Muller เป็นชาวเยอรมัน และ Gasco ชาวอิตาลี ซึ่งพัฒนา NLC มาจากข้อจำกัดของ Solid Lipid Nanoparticle (SLN) ที่ใช้ไขมันเหลวเพียงอย่างเดียวจึงกักเก็บสารได้น้อย ทำให้ NLC ถูกเรียกว่า “the second generation of nanoparticles” NLC สามารถช่วยให้สารที่กักเก็บอยู่ภายในมีความคงตัวทางเคมีที่ดีขึ้นได้ เนื่องจาก wall material มีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิต่ำ จึงช่วยป้องกันไม่ให้สารสำคัญที่กักเก็บข้างในสัมผัสหรือแลกเปลี่ยนกับสิ่งแวดล้อมภายนอก (ดังภาพที่ 2.7) ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Riangianapatee และ Okonoki ได้นำสาร lycopene มากักเก็บใน NLC จากผลการทดสอบความคงตัวพบว่า สาร lycopene ที่กักเก็บใน NLC มีความคงตัวที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารละลาย lycopene [57]

นอกจากนี้ ยังมีข้อได้เปรียบอื่นๆ ได้แก่ สามารถขนส่งสารผ่านผิวหนังชั้นหนังกำพร้าได้ จึงน่าจะขนส่งสารสำคัญที่กักเก็บสู่เมลาโนไซต์ที่มีตำแหน่งอยู่ในชั้นสตราตัมเบซาลและเป็นเซลล์เป้าหมายได้ช่วยควบคุมความชุ่มชื้นของผิวโดยการเกิด occlusion effect และเพิ่มการซึมผ่านของสารสำคัญสู่ผิวได้ ช่วยควบคุมหรือยกระดับการออกฤทธิ์ของสารให้นานขึ้น และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำจึงถูกเรียกว่า “a nanosave carrier” เนื่องจาก NLC นิยมใช้ fatty acid และ glycerol ซึ่งเป็นประกอบชนิดไขมันที่มีในร่างกายจึงสามารถย่อยสลายในร่างกายได้ ทั้งนี้ระยะเวลาของการย่อยสลายขึ้นอยู่กับธรรมชาติหรือชนิดของไขมันและ stabilizer ที่เลือกใช้ [17, 56]



## 2.9.1 เทคนิคการเตรียม NLC

การเตรียม NLC สามารถทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีก็มีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

### 1) การปั่นผสมโดยใช้ความดันสูง (High pressure homogenization)

วิธีนี้มีหลักการลดขนาดอนุภาคโดยการกระทำให้ผ่านช่องแคบ (cavitation) และการปั่นป่วน (turbulences) สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีย่อย ได้แก่ เทคนิคการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิสูง (hot homogenization techniques) และเทคนิคการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิต่ำ (cold homogenization techniques) [17, 58]

**ข้อดี:** ขยายขนาดการผลิตได้ง่าย ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ให้ความสม่ำเสมอในการผลิต ผลิตได้ในปริมาณที่มากและใช้เวลาผลิตน้อย สามารถใช้ความร้อนหรือไม่ใช้ความร้อนก็ได้ ใช้แรงเฉือนสูง และการกระจายแรงที่เหมาะสมที่จะแตกอนุภาคให้มีขนาดเล็กที่น้อยกว่า 500 nm อนุภาคที่ได้มีการกระจายตัวของขนาดที่แคบ (ค่า polydispersion index (PdI) < 0.2) เหมาะสมกับตัวยาที่เสื่อมสลายง่าย โดยการใช้อุณหภูมิต่ำ ดังนั้น เทคนิคนี้จึงนิยมใช้ในภาคอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง [17, 58]

**ข้อเสีย:** ห่อหุ้มต่อตัวยาที่ชอบน้ำต่ำและมีการใช้อุณหภูมิระหว่างการผสมให้เป็นเนื้อเดียวอาจทำให้สารสำคัญสลายตัวจากความร้อนได้ [17, 58]

#### 1.1) เทคนิคการปั่นผสมที่อุณหภูมิสูง

เทคนิคการปั่นผสมที่อุณหภูมิสูงนั้นทำได้โดยการหลอมตัวยากับไขมันที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมัน 5 °C และผสมเข้ากับสารละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิวที่อุณหภูมิเดียวกัน บดผสมด้วยความเร็วสูงจนเกิดเป็นอิมัลชันเริ่มต้น (pre-emulsion) ชนิด o/w emulsion ที่ร้อน แล้วนำไปผ่านเครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันความเร็วสูงที่อุณหภูมิต่ำ โดยทั่วไปใช้ความดัน 500 บาร์ จำนวน 3 รอบ หรือ 800 บาร์ จำนวน 2 รอบ จนกลับมามีผลระหว่างการทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดเป็น emulsion droplets crystallize จึงได้ NLC [17, 58]

โดยทั่วไปมักใช้ไขมันสำหรับการเตรียม NLC ด้วยวิธีนี้สูงถึงร้อยละ 5-10 และบางกรณีสูงถึงร้อยละ 40 มีอัตราส่วนของไขมันชนิดแข็ง: ไขมันชนิดเหลว เป็นไปได้ตั้งแต่ 70:30 ถึง 99.9:0.1 ขึ้นอยู่กับของผสมที่ได้นั้นจะต้องเป็นของแข็ง

ที่อุณหภูมิร่างกาย แม้ว่าอาจมีจุดหลอมเหลวที่ลดลงเมื่อเทียบกับไขมันชนิดแข็ง เทคนิคการเตรียมวิธีนี้มีปัจจัยที่ส่งผลต่อการกระจายขนาดอนุภาคได้แก่ ประเภทเครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ความดัน จำนวนรอบการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และอุณหภูมิ [17, 58]

## 1.2) เทคนิคการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิต่ำ

วิธีนี้เหมาะกับตัวยาที่ละลายตัวได้ง่ายและชอบน้ำ วิธีการเตรียม NLC ด้วยเทคนิคการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิต่ำเริ่มจากนำไขมันและตัวยาหลอมรวมกันในไนโตรเจนเหลวเพื่อเกิดเป็นไมโครพาร์ทิเคิลไขมันแข็ง (solid lipid microparticles) นำไปปั่นด้วยความเร็วสูงในสารละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิวที่เย็นจนได้เป็นอิมัลชันเริ่มต้น (pre-emulsion) จากนั้นนำไปผ่านเครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่สภาวะความดันสูงและอุณหภูมิเท่ากับหรือต่ำกว่าอุณหภูมิห้องโดยใช้ความดัน 1500 บาร์จำนวน 5-10 รอบ จนได้ NLC [17, 58]

## 2) เทคนิคไมโครอิมัลชัน (Microemulsion technique)

เตรียมไมโครอิมัลชันร้อนด้วยการคนผสมไขมันหลอมร้อยละ 10 ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวร้อยละ 15 และสารลดแรงตึงผิวร่วม (cosurfactant) ร้อยละ 10 จากนั้นทำการกระจายไมโครอิมัลชันร้อนที่เตรียมได้ในน้ำเย็น (อัตราส่วนไมโครอิมัลชัน:น้ำเย็น เป็น 1:50) พร้อมการผสมตลอดเวลา แล้วจึงกำจัดน้ำออกด้วยวิธี ultrafiltration หรือโดยการทำให้ lyophilization เพื่อให้สารละลายมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น [17, 58]

**ข้อดี:** สามารถผลิตในปริมาณที่มาก ไม่ใช้พลังงาน ห่อหุ้มได้ทั้งยาชอบน้ำและไขมัน ใช้เครื่องมือธรรมดาทั่วไปในการผลิต [17, 58]

**ข้อเสีย:** ต้องใช้สารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่สูง อาจทำให้ได้ปริมาณไมโครอิมัลชันจำนวนน้อยต่อครั้งการผลิต เนื่องจากต้องทำการเจือจางระหว่างการผลิต [17, 58]

### 3) การทำให้เกิดอิมัลชันด้วยตัวทำละลายและการระเหย (Solvent emulsification and evaporation)

วิธีนี้ใช้หลักการตกตะกอนในสารละลายที่เหมาะสม โดยการทำให้ไขมันในสารละลายอินทรีย์ที่ไม่เข้ากับน้ำ เช่น โทลูอีน และคลอโรฟอร์ม เติมน้ำในสารละลายน้ำจนเกิดเป็นอิมัลชัน แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะการลดความดันระหว่างที่ทำการระเหยตัวทำละลาย ไขมันจะตกตะกอนออกมาจนได้เป็น NLC [17]

**ข้อดี:** ได้อนุภาคขนาดเล็ก และหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิสูงจึงเหมาะกับการใช้กับเก็บตัวยาที่สลายตัวได้ง่าย [17]

**ข้อเสีย:** อาจมีการตกค้างของตัวทำละลายอินทรีย์ และมีข้อจำกัดเรื่องขนาดการผลิต [17]

### 4) วิธีอิมัลชันซ้อนชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ (w/o/w Double emulsion method)

วิธีการนี้ใช้หลักการตกตะกอนในสารละลายที่เหมาะสม โดยการทำให้ไขมันในสารละลายอินทรีย์ที่ไม่เข้ากับน้ำ (เช่น โทลูอีน และคลอโรฟอร์ม) เติมน้ำในสารละลายน้ำจนเกิดเป็นอิมัลชัน แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะการลดความดันระหว่างที่ทำการระเหยตัวทำละลายไขมันจะตกตะกอนออกมาจนได้ NLC [17]

**ข้อดี:** ไม่ใช้ความร้อนระหว่างการเตรียม [17]

**ข้อเสีย:** มีการตกค้างของตัวทำละลาย [17]

## 2.9.2 รูปแบบของ NLC

NLC ที่พัฒนาได้จาก SLN มีรูปแบบที่มีช่องว่างสำหรับบรรจุยาและป้องกันยาถูกขับออกจากอนุภาค ทั้งหมด 3 รูปแบบ (ดังภาพที่ 2.8) ได้แก่ รูปแบบผลึกไม่สมบูรณ์ (imperfect crystal type) รูปแบบอสัณฐาน (amorphous type) และรูปแบบซ้อน (multiple type) [17]

### 1) รูปแบบผลึกไม่สมบูรณ์

ได้จากการผสมไขมันต่างชนิดที่มีโครงสร้างผลึกต่างกันเข้าด้วยกัน เช่น การผสมไขมันชนิด กลีเซอรอลที่มี หนึ่ง สอง และสาม สายโซ่ จากความแตกต่างของสายโซ่ไขมันในส่วนผสมนี้ทำให้เกิดการเรียงตัวของผลึกไม่สมบูรณ์จึงเกิดเป็นช่องว่างที่รองรับให้ตัวยายู่ในเมทริกซ์ได้ ดังแสดงในภาพที่ 2.8 (ก) [17]

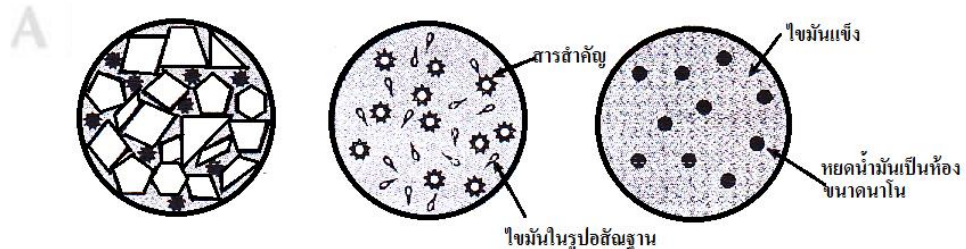
## 2) รูปแบบอสัณฐาน

ได้จากการขัดขวางกระบวนการตกผลึก (crystallization) โดยการเติมไขมันพิเศษบางชนิดลงไปทำให้ไขมันอยู่ในรูปอสัณฐาน เช่น การผสม Hydroxyoctacosanyl-hydroxylstearate ร่วมกับ isopropylmyristate ซึ่งการไม่สามารถเกิดเป็นผลึกและการลดการขับไล่ตัวยาออกจากเมทริกซ์นั้นเนื่องมาจากเมทริกซ์ไขมันคงสภาพอยู่ในรูปอสัณฐานชนิดแอลฟา (ทรงกลม) ดังแสดงในภาพที่ 2.8 (ข) [17]

## 3) รูปแบบซ้อน

มีลักษณะเป็นสารกระจายของน้ำในไขมันแข็งในน้ำ (water-in-solid-lipid-in-water) โดยมีหยดน้ำมันขนาดจิ๋วเป็นห้องนาโน (nanocompartment) อยู่ในเมทริกซ์ของไขมันแข็ง รูปแบบนี้ช่วยเพิ่มการบรรจุยาได้เพราะยาส่วนใหญ่ละลายในน้ำมันหรือไขมันเหลวได้ดีกว่าไขมันแข็ง [17]

การผลิต NLC ในรูปแบบซ้อนทำได้โดยการผสมไขมันแข็งเข้ากับน้ำมันในปริมาณที่มากพอ ถ้าหากใช้น้ำมันในปริมาณน้อยเกินไป น้ำมันจะละลายหรือกระจายเป็นโมเลกุลเล็กๆ ในเมทริกซ์ไขมันแข็งโดยไม่เกิดเป็นห้องขนาดนาโนของน้ำมัน ซึ่งจะเกิดขึ้นในระหว่างการทำให้เย็นหลังการผลิตด้วยการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความร้อน แสดงให้เห็นว่าการผสมน้ำมันเข้ากับไขมันแข็งช่วยลดการตกผลึกของไขมันแข็งโดยที่เมื่อเพิ่มสัดส่วนปริมาณน้ำมันที่ผสมในทำให้ดัชนีการตกผลึก (crystallization index) มีค่าลดลง ตัวอย่างเช่น การใช้ไตรกลีเซอไรด์สายโซ่ขนาดกลาง (Myglyol<sup>®</sup> 821) ร้อยละ 0, 5, 10, 30 และ 50 ใน cetyl palmitate มีดัชนีการตกผลึกเป็นร้อยละ 100, 79.48, 61.94, 37.85 และ 22.23 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2.8 (ค) [17]



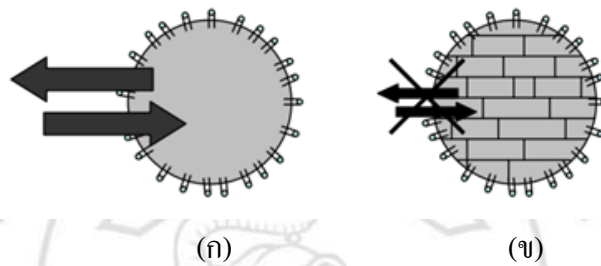
ก) รูปแบบผลึกไม่สมบูรณ์ ข) รูปแบบอสัณฐาน ค) รูปแบบซ้อน

ภาพที่ 2.8 รูปแบบของ NLC [17]

### 2.9.3 ข้อดีและประโยชน์ของ NLC ทางยาและเครื่องสำอาง

#### 1) ช่วยเพิ่มความคงตัวของตัวทางเคมีของสารสำคัญ

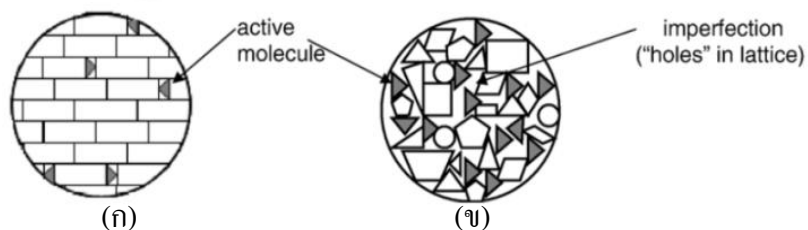
เนื่องจากตัวพาสุนัขไขมันระดับนาโน ชนิด NLC มี wall material ที่มีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิต่ำ จึงทำให้สารสำคัญที่จู่อยู่ข้างใน wall material ไม่สามารถสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ หรืออาจเกิดการแลกเปลี่ยนกับสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ช้าลง ดังภาพที่ 2.9 [56]



ภาพที่ 2.9 เปรียบเทียบการแลกเปลี่ยนระหว่างสิ่งแวดล้อมข้างนอกอนุภาคกับสารสำคัญที่ถูกกักเก็บไว้ในอนุภาคชนิด emulsion o/w (ก) และ NLC (ข) [56]

#### 2) NLC มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญได้ในปริมาณมากกว่า SLN

เนื่องจาก SLN ประกอบด้วยไขมันชนิดแข็งเพียงอย่างเดียวจึงทำให้มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลเรียงกันได้ดี (crystalline structure) ดังภาพที่ 2.10 (ก) ส่วน NLC เป็นการผสมกันของไขมันชนิดแข็งและเหลวเข้าด้วยกัน จึงทำให้มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลเกิดเป็นช่องหรือร่องขึ้นคล้ายลักษณะตาข่าย (crystal lattice) หรือมีการเรียงตัวของโมเลกุลไขมันไม่สมบูรณ์ดังภาพที่ 2.10 (ข) จึงช่วยเพิ่มพื้นที่การจุสารสำคัญได้มากกว่า [56, 58]



ภาพที่ 2.10 การจัดเรียงตัวของโมเลกุลไขมันแบบ crystalline structure (ก) และแบบ crystal lattice (ข) [56, 58]

### 3) ช่วยควบคุมความชุ่มชื้นของผิวโดยการเกิด occlusion effect และเพิ่มการซึมผ่านของสารสำคัญสู่ผิวได้

เนื่องจาก NLC มีอนุภาคขนาดนาโน หรือขนาดเล็ก ทำให้มีช่องว่างระหว่างอนุภาคที่น้อยจึงทำให้มีการเกาะติดผิวได้ดี และด้วยความที่มีคุณสมบัติเป็นไขมันจึงทำให้เกิด occlusion effect บนผิวจึงช่วยลดการสูญเสียน้ำของผิวหนัง ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นอยู่เสมอ และด้วยความที่ผิวมีความชุ่มชื้นอยู่สูงจึงทำให้การเรียงตัวของเซลล์ผิวหนัง (corneocyte) หลวมขึ้นและเพิ่มช่องว่างระหว่างเซลล์ สารสำคัญแทรกซึมผ่านผิวหนังชั้นลึกได้ดียิ่งขึ้น [17, 56]

### 4) ช่วยทำให้มีการซึมผ่านสารสำคัญไปยังผิวได้มากขึ้นและตรงเป้าหมายมากขึ้น

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารสำคัญที่อยู่ในตำรับเครื่องสำอาง ที่มีเป้าหมายการออกฤทธิ์อยู่ที่ผิวหนัง [17, 56]

### 5) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ต่ำจึงถูกเรียกว่า “a nanosave carrier”

เนื่องจาก NLC ประกอบด้วยไขมันชนิดที่เป็นองค์ประกอบในร่างกายจึงสามารถย่อยสลายในร่างกายได้ (biodegradable lipid) ซึ่งระยะเวลาของการย่อยสลายขึ้นอยู่กับธรรมชาติหรือชนิดของไขมันและ stabilizer ที่เลือกใช้ สำหรับ fatty acid และ glycerol พบได้ในร่างกายจึงมักถูกเลือกใช้ทำ NLC [17]

### 6) ช่วยควบคุมหรือยกระดับการออกฤทธิ์ของสารให้ยาวนานขึ้น

NLC มีลักษณะเฉพาะที่สามารถให้การปลดปล่อยแบบออกฤทธิ์เนิ่น (sustained release) ได้ จึงนิยมนำมาใช้กับน้ำหอม ยาไล่แมลง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระยะเวลาการออกฤทธิ์ได้นานขึ้น [17, 59]

## 2.9.4 ข้อเสียของ NLC ทางยาและเครื่องสำอาง [17]

- 1) วิธีที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการผลิต อาจทำให้มีการตกค้างของตัวทำละลายดังกล่าว
- 2) NLC อาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้จากการที่อนุภาคไปเกาะติดที่ผนังเซลล์ จากนั้นสลายตัวแล้วปลดปล่อย cytotoxic degradation products ออกมา หรืออาจเกิด

จากอนุภาคที่เข้าไปอยู่ข้างในเซลล์ ซึ่งเข้าไปแล้วสลายตัวให้สารพิษ ข้างในเซลล์ โดยตรง

3) เทคนิคการเตรียม NLC บางเทคนิคมีความยากในการขยายขนาดการผลิต

## 2.9.5 การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโน

วิธีที่นิยมใช้สำหรับการตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนเมตร ได้แก่ การวัดขนาดอนุภาค การศึกษาสัณฐานวิทยาและโครงสร้างภายในของอนุภาค การวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิว การศึกษาความเป็นผลึกและ โครงร่างผลึก และการศึกษาอันตรกิริยาของสารออกฤทธิ์กับอนุภาคไขมัน [59]

### 1) การวัดขนาดอนุภาค

ขนาดอนุภาคเป็นปัจจัยสำคัญต่อประสิทธิภาพระบบนำส่ง โดยขนาดอนุภาคที่เหมาะสมต่อการนำส่งทางผิวหนังควรมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100-200 นาโนเมตร เพื่อให้ระบบสามารถดูดซึมเข้าทางช่องว่างระหว่างเซลล์ผิวหนังได้ นอกจากนี้ขนาดอนุภาคยังส่งผลโดยตรงต่อความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญ และความสามารถในการควบคุมอัตราเร็วในการปลดปล่อยสาร นั่นคือ อนุภาคขนาดเล็กจะกักเก็บตัวยาไว้ภายในได้น้อยกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ แต่อย่างไรก็ตาม อนุภาคขนาดเล็กให้พื้นที่ผิวสัมผัสที่มากกว่าส่งผลให้มีอัตราเร็วปลดปล่อยยาที่มากกว่า ทั้งนี้ ขนาดอนุภาคสามารถใช้ทำนายความคงตัวทางกายภาพของระบบได้ [59]

การวัดขนาดอนุภาคสามารถแบ่งออกเป็น วิธีตรง และวิธีอ้อม การวัดขนาดอนุภาควิธีตรง คือการใช้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนการวัดขนาดอนุภาควิธีอ้อมนั้นมีหลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น การวัดโดยอาศัยหลักการของแสง การวัดโดยใช้วิธีการแยกอนุภาคแบบไหลภายใต้สนาม และการวัดด้วยวิธีทางไฟฟ้า เป็นต้น [59]

ในที่นี้จะยกตัวอย่างการวัดขนาดอนุภาคโดยอาศัยหลักการของแสง ด้วยวิธีโฟตอนคอร์เรเลชันสเปกโทรสโกปี (Photon correlation spectroscopy, PCS) เพราะวิธีนี้เป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งหลักการอย่างง่ายของเครื่องมือนี้คือการกระเจิงแสง โดยมีแหล่งกำเนิดแสง ได้แก่ ฮีเลียม-นีออน หรือ อาร์กอนไอออน ซึ่งจะให้ลำแสงเลเซอร์ เมื่อลำแสงนี้ตกกระทบกับอนุภาคแขวนลอย ซึ่งเคลื่อนที่แบบไร้ทิศทาง (brownian movement) ในสารตัวกลางอยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดการกระเจิงแสงขึ้น โดย

อนุภาคขนาดเล็กจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความผันผวนของความเข้มแสงที่วัดได้เร็วกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ซึ่งสุดท้ายนี้เครื่องมือจะรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยอนุภาค หรือค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค (z-average diameter) [59]

นอกจากหลักการนี้จะใช้วัดขนาดอนุภาคได้แล้วยังสามารถวัดค่าความกว้างในการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Polydispersity index หรือ PDI) ได้อีกด้วย ซึ่งค่าการกระจายอนุภาคจะสามารถอยู่ในช่วง 0-1 โดยค่าที่เข้าใกล้ 0 บ่งบอกถึงการมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่สม่ำเสมอ และในทางกลับกัน ค่าที่เข้าใกล้ 1 แสดงถึงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคแตกต่างกัน ทั้งนี้ค่า PDI ที่ดีควรน้อยกว่า 0.4 และค่า PDI ที่ดีมากควรมีค่าน้อยกว่า 0.2 จึงจะถือว่ามีการกระจายขนาดอนุภาคอยู่ในเกณฑ์ที่ดี [59]

อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของผลการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค และการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่ได้ อาจมีปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวข้อง เช่น วิธีและเครื่องมือที่ใช้ การสุ่มตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างและระยะเวลาที่ใช้ในการวัด เป็นต้น [59]

## 2) การศึกษาสัณฐานวิทยาและโครงสร้างภายในของอนุภาค

สามารถศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscope หรือ TEM) และกล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (Atomic force microscope หรือ AFM) [59]

ยกตัวอย่างเช่น กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ซึ่งมีกำลังขยาย และประสิทธิภาพสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ภาพที่ได้มีลักษณะ 2 มิติของรูปร่าง ขนาด และโครงสร้างของสารตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างนั้นจะต้องใช้ กริดคาร์บอนที่เคลือบด้วยทองแดง โดยหยดตัวอย่างที่เจือจางลงบนกริดแล้วทิ้งให้แห้ง จากนั้นย้อมตัวอย่างด้วย 1% phosphotungstic acid หรือ อาจใช้ uranyl acetate [59]

## 3) การวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (Zeta potential)

โดยปกติแล้วตำรับระบบแขวนลอยต่างๆ จะมีประจุไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาค ซึ่งเกิดจากการดูดซับประจุ หรือเกิดการแตกตัวของประจุที่พื้นผิวจากสภาพแวดล้อมของระบบ



นั้น ซึ่งประจุที่ผิวนี้ส่งผลให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าขึ้นรอบๆอนุภาค และมีค่าน้อยลงเมื่อมีระยะห่างจากผิวของอนุภาคมากขึ้น [59]

ค่าความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคกับประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบอนุภาค คือ ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค ซึ่งค่านี้สามารถใช้ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของระบบที่เป็นอนุภาคแขวนลอย โดยอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าจะเกิดแรงผลักระหว่างกันทำให้ระบบมีเสถียรภาพ จึงไม่เกิดการรวมตัวของอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV) ช่วง 0 ถึง  $\pm 5$  แสดงถึง อนุภาคไม่มีความคงตัว ช่วง  $\pm 10$  ถึง  $\pm 30$  แสดงถึง อนุภาคมีความคงตัวพอใช้ ช่วง  $\pm 30$  ถึง  $\pm 40$  แสดงถึง อนุภาคมีความคงตัวปานกลาง ช่วง  $\pm 40$  ถึง  $\pm 60$  แสดงถึง อนุภาคมีความคงตัวดี และ ค่ามากกว่า  $\pm 61$  แสดงถึง อนุภาคมีความคงตัวดีมาก [59]

#### 4) การกระจายตัวของสารสำคัญใน NLC

การกระจายตัวของสารสำคัญใน NLC มีรูปแบบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยซึ่งได้แก่ คุณสมบัติทางเคมีของสารสำคัญและไขมัน ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในไขมันหลอม ชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว วิธีการผลิต และ อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียม ซึ่งแต่ละแบบมีผลต่อการปลดปล่อยสารสำคัญจาก NLC แต่อย่างไรก็ตาม การปลดปล่อยสารสำคัญจาก NLC ยังคงได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาพของเมทริกซ์ไขมัน เป็นต้น [17, 58-59]

การกระจายตัวของสารสำคัญใน NLC สามารถการกระจายตัวของสารสำคัญใน NLC ได้ 3 แบบ (ดังแสดงในภาพที่ 2.11) คือ แบบเมทริกซ์เนื้อเดียวกัน (homogeneous matrix) แบบตัวยาเข้มข้นที่เปลือก (active – free lipid core) และแบบตัวยาเข้มข้นที่แกนกลาง (active-enriched core with active-free lipid shell) [17, 58-59]

##### 4.1) แบบเมทริกซ์เนื้อเดียวกัน

รูปแบบเมทริกซ์เนื้อเดียวกัน (ดังภาพที่ 2.11 (ก)) นี้มักได้จากสารละลายของแข็งระหว่างไขมันและสารสำคัญที่ได้จากการผลิตโดยวิธีการปั่นผสมโดยใช้ความดันสูงและอุณหภูมิต่ำ สารสำคัญละลายหรือกระจายระดับโมเลกุลในไขมันได้เป็นของผสมที่เมื่อทำให้แข็งและบดในสภาวะของแข็งจะช่วยหลีกเลี่ยงหรือ

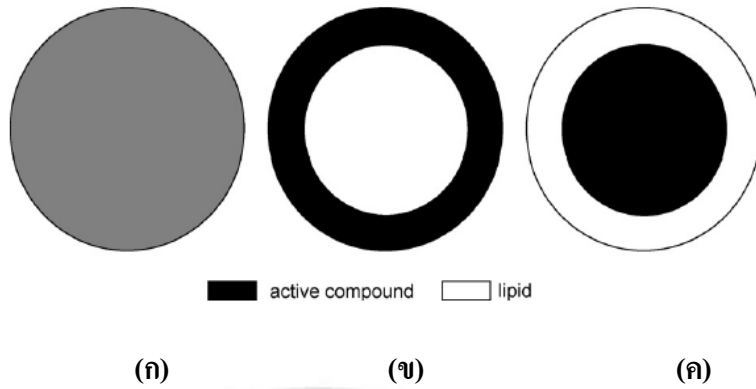
ลดการเกิดการสะสมของตัวสารสำคัญในส่วนใดส่วนหนึ่งของอนุภาค [17, 56,58]

#### 4.2) แบบตัวยาค้ำชั้นที่เปลือก

รูปแบบตัวยาค้ำชั้นที่เปลือก (ดังภาพที่ 2.11 (ข)) นี้ได้จากการผลิตโดยวิธีการปั่นผสมโดยใช้ความดันสูงและอุณหภูมิสูง และมีความเข้มข้นของสารสำคัญที่ต่ำกว่าขีดการละลายในไขมันหลอมอย่างมาก โดยระหว่างการวางตัวรับให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง (หลังจากผ่านกระบวนการปั่นผสมโดยใช้ความดันสูงและอุณหภูมิสูง) ไขมันจะเกิดการตกตะกอนก่อนจากการแยกวัฏภาคของไขมัน ในขณะที่เดียวกันเกิดการเพิ่มความเข้มข้นของสารสำคัญในไขมันหลอมขึ้นเรื่อยๆ เมื่อการละลายของสารสำคัญในไขมันหลอมเข้าสู่จุดอิ่มตัว จะเกิดการตกตะกอนพร้อมไขมันส่วนเปลือกและเคลือบอยู่บนแกนกลางไขมันที่ไม่มีสารสำคัญซึ่งตกตะกอนก่อนหน้านี้ ส่งผลให้ NLC รูปแบบนี้มีการปลดปล่อยจับพัตัน (burst release) นอกจากนี้หากมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยการผลิตอาจทำให้มีปริมาณการสะสมสารสำคัญที่เปลือกด้านนอกเปลี่ยนไปได้ อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยจับพัตัน ได้แก่ อนุภาคขนาดเล็ก หรืออนุภาคมีพื้นที่ผิวมาก ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient) ที่สูง จากการมีโมเลกุลขนาดเล็กของสารสำคัญ การที่เมทริกซ์มีความหนืดต่ำและมีระยะการแพร่ของสารสำคัญจากเมทริกซ์ที่สั้น [17, 58-59]

#### 4.3) แบบตัวยาค้ำชั้นที่แกนกลาง

รูปแบบตัวยาค้ำชั้นที่แกนกลาง (ดังภาพที่ 2.11 (ค)) นี้เกิดจากการเตรียมที่ใช้ความเข้มข้นของสารสำคัญในไขมันหลอมในปริมาณที่สูงระดับที่เทียบเคียงหรือเทียบเท่ากับค่าการละลายอิ่มตัวของสารสำคัญในไขมัน เมื่อไขมันที่ถูกหลอมเย็นตัวลงทำให้การละลายของสารสำคัญลดลงจนเกิดขีดค่าการละลายอิ่มตัว ทำให้เกิดการตกตะกอนของสารสำคัญขึ้นก่อน แล้วสร้างเป็น NLC ชนิดตัวยาค้ำชั้นที่แกนกลาง รูปแบบนี้ให้การปลดปล่อยเป็นแบบทยอย (sustained release) เนื่องจากมีระยะทางแพร่ผ่านของสารสำคัญสูง และการกั้นขวางของไขมันที่เปลือก [17, 58-59]



(ก)

(ข)

(ค)

ก) เมทริกซ์เนื้อเดียวกัน

ข) สารสำคัญเข้มข้นที่เปลือก

ค) สารสำคัญเข้มข้นที่แกนกลาง

ภาพที่ 2.11 การกระจายตัวของสารสำคัญใน NLC [17, 58]

## 5. การศึกษาอัตราเร็วในการปลดปล่อย

การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากตัวพออนุภาคไขมันระดับนาโนมี 3 วิธี ได้แก่ การใช้ถุงไตอะไลซิส (dialysis tubing) การศึกษาด้วยการแพร่ผ่านฟรานส์เซลล์ (Franz diffusion cell) การศึกษาโดยวิธีไม่ใช่เยื่อ (Membrane-free model) [59]

ยกตัวอย่างเช่น วิธีการแพร่ผ่านฟรานส์เซลล์ (Franz diffusion cell) ซึ่งวิธีนี้ใช้เยื่อที่ทำจากวัสดุต่างๆ ได้แก่ เซลโลโลฟอน เซลลูโลสอะซิเตท เซลลูโลสไนเตท และ เทฟลอน (PTFE) เป็นต้น ทั้งนี้สามารถใช้หนังส่วนท้องของสุกรเกิดใหม่ เนื่องจากมีลักษณะการยอมให้สารผ่านใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์มากที่สุด [59]

### 2.10 การพัฒนาตำรับและการทดสอบความคงตัว

การพัฒนาตำรับเวชสำอางที่ดีจำเป็นต้องมีการทดสอบความคงตัวของตำรับเพื่อเป็นการสร้างความมั่นใจใน คุณภาพ (quality) ความปลอดภัย (safety) และประสิทธิภาพ (efficacy) ตลอดจนอายุการเก็บรักษา (shelf life) ของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้ และอย่างน้อยถือเป็นสิ่งจำเป็นต่อการยอมรับและการอนุมัติผลิตภัณฑ์ทางเวชสำอางตามที่องค์การอนามัยโลก (World Health Organization-WHO) หรือ International Conference on Harmonization (ICH) กำหนด [60-61]

ความคงตัวของผลิตภัณฑ์เวชสำอาง คือ ความสามารถโดยเฉพาะของตำรับในลักษณะที่เฉพาะเจาะจงและหรือในระบบปิดที่มีการควบคุม เพื่อคงสภาพทางกายภาพ เคมี จุลชีววิทยา พิษวิทยา การป้องกัน และข้อมูลเฉพาะ หรืออาจหมายถึง ขอบเขตที่ผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพตามที่

กำหนดไว้ ตลอดจนระยะเวลาการเก็บรักษา และการใช้งานของผลิตภัณฑ์ที่จะยังคงคุณสมบัติและลักษณะเมื่ออยู่ในบรรจุภัณฑ์ [60-61]

### 2.10.1 วิธีการทดสอบความคงตัว

การทดสอบความคงตัวสามารถแบ่งตามวัตถุประสงค์ได้เป็น 4 แบบ ได้แก่ การทดสอบความคงตัวตามเวลาจริง (Real-time stability testing) การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง (Accelerated stability testing) การทดสอบความคงตัวสะสม (Retained sample stability testing) และการทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิแบบวงจร (Cyclic temperature stress testing) [60-61]

#### 1) การทดสอบความคงตัวตามเวลาจริง

เป็นการทดสอบความคงตัวที่สภาวะอุณหภูมิห้อง ช่วงเวลายาวนานจนสามารถดูการเสถียรภาพ (degradation) ของผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะที่กำหนด ดังนั้นระยะเวลาการทดสอบควรมีระยะเวลานานพอที่จะแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเกิดการเสถียรภาพขึ้นหรือไม่สามารถวัดได้ ทั้งนี้ ข้อมูลความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดสอบนี้ใช้เป็นข้อมูลเสริมกับการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งที่ใช้ทำนายความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดในเบื้องต้น [60-61]

#### 2) การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง

การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งจะเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในที่สภาวะเร่ง หรือสภาวะอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง การทดสอบสภาวะนี้มักจะทำภายใต้อุณหภูมิ 37 °C 40 °C หรือ 45 °C เป็นเวลา 3 เดือน ทั้งนี้ อุณหภูมิที่ใช้และระยะเวลาการทดสอบอาจขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ นอกจากอุณหภูมิที่ใช้เป็นสภาวะเร่งแล้วยังมีความชื้น แสง การกวน (agitation) แรงโน้มถ่วง (gravity) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น วิธีนี้เปรียบเสมือนการจำลองสภาวะเร้าต่างๆ ให้แก่ผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้ทำนายความคงทนของผลิตภัณฑ์ต่อสภาวะเร้าเหล่านั้น ยกตัวอย่างเช่น สภาวะมีแสง มักใช้ทดสอบความคงตัวต่อแสงของผลิตภัณฑ์ที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์โปร่งใส [60-61]

#### 3) การทดสอบความคงตัวสะสม

วิธีการนี้ใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ออกจำหน่ายสู่ท้องตลาดไปแล้ว โดยมีการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อย่างน้อย 1 ครั้งการผลิต (batch) ไว้เป็นเวลา 1 ปี แต่หากมีการผลิต 50 ครั้ง

ออกสู่ตลาด จะต้องเก็บตัวอย่างอย่างน้อย 2 ครั้งการผลิต เพื่อจัดทำข้อมูลความคงตัวในระหว่างการจำหน่าย โดยตัวอย่างที่เก็บไว้จะถูกนำมาทดสอบความคงตัวตามช่วงเวลาที่กำหนด ยกตัวอย่างเช่น หากผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษา 5 ปี จะมีการทดสอบความคงตัวเมื่อครบกำหนดเดือนที่ 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 และ 60 หากตัวอย่างดังกล่าวมีความคงตัวลดลงเกินกว่าช่วง 2-5% ถือว่าเสียหาย หรือไม่มีความคงตัว [60-61]

#### 4) การทดสอบสภาวะเร่งจากอุณหภูมิแบบวงจร

วิธีการทดสอบนี้เป็นการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในสภาวะที่แตกต่างกันของอุณหภูมิอย่างสุดขั้ว โดยจะทดสอบเป็นวงจร สามารถแบ่งออกเป็น 2 วงจรได้แก่ freeze-thaw testing และ heating-cooling testing [60-61]

freeze-thaw cycles และ heating-cooling testing เป็นการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในสภาวะอุณหภูมิ 45°C สลับกับ -20°C และอุณหภูมิ 45°C สลับกับ 5°C โดยมีช่วงเวลาของวงจร (cycle) ที่ทดสอบนาน 48 ชั่วโมงต่อวงจร และยาวนาน 6 วงจร [60-61]

วิธีการทดสอบนี้เน้นดูความคงตัวทางกายภาพ เช่น การตกตะกอน การเกิดการแยกชั้นของตำรับครีม อิมัลชัน รวมไปถึงการหด ขยาย หรือการเสียหายของบรรจุภัณฑ์ที่อาจเกิดขึ้น [60-61]

#### 2.10.2 ตัวแปรที่ใช้ทดสอบความคงตัว

การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยทั่วไป มักทดสอบปัจจัยต่างๆซึ่งได้แก่ สี กลิ่น ลักษณะภายนอก หรือลักษณะทางกายภาพ ความคงตัวของสารสำคัญในตำรับ การเปลี่ยนแปลงของบรรจุภัณฑ์ กรด-เบส (pH) ความหนืด น้ำหนัก จุลินทรีย์ และข้อมูลเฉพาะของแต่ละผลิตภัณฑ์ เช่น หากเป็นผลิตภัณฑ์อิมัลชัน ควรทดสอบ การแยกชั้น ความหนืด ขนาดของอนุภาค และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค เป็นต้น [60-61]