บทที่ 2
การทดลอง

1. สารเคมี และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1.1 สารเคมี

- Standard ellagic acid (95% HPLC from tree bark, Sigma, USA)
- Compritol® 888 AOT (glyceryl behenate, Gattefossé, France)
- Gelucire 44/14 (Gattefossé, France)
- Olive oil (TCFF, Thailand)
- Lexol (Medium chain triglyceride, Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Isopropyl palmitate (Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Isopropyl myristate (Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Pluronic F-68 (poloxamer 188, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)
- Stearic acid (Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Glyceryl Monosterate (Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Cetyl alcohol (Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Medium chain triglyeride (Lexol(, Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Proply paraben (Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Methyl paraben (Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA, Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Tween 80 (S. Tong chemical, Thailand)
- Span 80 (Namsiang trading co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Vaniline (98%, HPLC grade, Fluka, France)
- Lipoid (s75 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)
- Methanol (HPLC grade, Labscan Asia Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
- Ethanol (Excise Department, Chachoengsao, Thailand)
- Mannitol (analytical grade, Univar, Ajax Finechem, Australia)
- Poloxamer 188 (Polyoxyethylene – polyoxypropylene copolymer, BASF, Germany)
- Glacial acetic acid (analytical grade, Labscan Asia Co., Ltd., Bangkok, Thailand)

1.2 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- High pressure liquid chromatography (LD10A, Shimasu, Kyoto, Japan)
- Homogenizer (T50 basic, IKA®, Staufen, Germany)
- Zeta potential analyzer (ZetaPAL®, Brookhaven instruments corporation, New York, USA)

- pH meter & pH electrode (S20-k, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)
- Freeze dryer, Lyophilyzer (Lyolab 3000, Heto, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)
- Franz diffusion cell (PermeGear, PA, USA)
- Programmable Rheometer (Model DV-III, Brookfield, MA, USA)
- Ultrafiltration cell (Model 8400, Amicon Grace Company, MA, USA)
- Scanning Electron Microscope (1455VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK)
- Analytical balance (TB-214, Denvor instrument, Germany)
- Microscope (BX51, Olympus,Tokyo, Japan)
- Ultracentrifuge (Mikro 120, Hettich, Tuttlingen, Germany)

2. การทดลอง

2.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมแห้ง

นำเปลือกผลทับทิมแห้งมาสกัดด้วยวิธีการต้ม (Reflux) ด้วย 95% Ethanol ที่อุณหภูมิประมาณ 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. (x2) นำมากรอง แล้วระเหย ethanol ออกด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาละลายใน acetic acid นำไป partition ด้วย ethyl acetate แล้วระเหย ethyl acetate ออกด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดเปลือกผลทับทิมแห้งจากการ reflux/partition

2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่

1. ทดสอบฤทธิ์ Anti-tyrosinase ด้วยวิธี mushroom tyrosinase inhibitor assay ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือ สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม, standard ellagic acid และใช้ kojic acid เป็น positive control โดยสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม, standard ellagic acid เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.001 – 5 mg/ml kojic acid เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.001 – 0.5 mg/ml โดย pipette ตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น 20 µl ลงใน 96 well plate เติม 50 mM phosphate buffer 145 µl และเอนไซน์ tyrosinase 10 µl นำไป incubate ที่ 37°c นาน 10 นาที จากนั้นเติม 4 mM L-tyrosinase 25 µl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader นำผลที่ได้มาคำนวณหา % tyrosinase inhibition แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log concentration และ% tyrosinase inhibition ของตัวอย่างเพื่อหาค่า EC_{50}

2. ทดสอบฤทธิ์ anti-oxidation ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือ สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม, standard ellagic acid และใช้ trolox เป็น positive control โดยสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม, standard ellagic acid เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.001 – 5 mg/ml trolox เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.001 – 0.5 mg/ml โดย pipette ตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น 30 µl ลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml เติม brain homogenate 210 µl ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่ 37°c นาน 30 นาที จากนั้นเติม 4 mM ferrous sulfate และ 2 mM ascorbic acid อย่างละ 30 µl ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่ 37°c นาน 60 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม TBARs reagent 300 µl (40% TCA : 1.4% TBA : 8% HCl อัตราส่วน 1 : 2 : 1) ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่ 90°c นาน 60 นาที แล้วทิ้งไว้จนเย็นจึงนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm 5 นาที ดูดส่วน supernatant ปริมาณ 200 µl ใส่ 96 well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader นำผลที่

ได้มาคำนวณหา % lipid peroxidation inhibition แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log concentration และ % lipid peroxidation inhibition ของตัวอย่างเพื่อหาค่า EC_{50}

2.3 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ ellagic acid

โดยเตรียม standard curve ของ standard ellagic acid โดยนำ standard ellagic acid มาละลายใน methanol จากนั้นเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 10, 25 และ 50 µg/ml ด้วย mobile phase นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ellagic acid โดยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) แล้วนำผลที่ได้มาสร้าง standard curve ระหว่างค่าเฉลี่ยของ peak area กับความเข้มข้นของ ellagic acid โดยสภาวะที่ใช้วิเคราะห์มีดังนี้คือ column: phenomenex luna 5µm PFP (2) 100 Å 150x4.60 mm, detector: 254 nm mobile phase: methanol: 0.2% phosphoric acid aqueous solution (60:40), flow rate: 1 ml/min

2.4 การตั้งตำรับสารสกัดเปลือกผลทับทิมในรูปแบบ อนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโน

2.4.1 การเตรียมอนุภาคไขมันแข็งรูปแบบครีม (pomegranate peel extract loaded NLCs)

เตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมในรูปแบบ อนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโน โดยวิธี Hot melt microemulsion โดยมีวิธีเตรียมดังนี้

1. ชั่งส่วนประกอบของวัตภาคน้ำใส่บีกเกอร์ขนาด 25 ml ให้ความร้อนบน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 75°c
2. ชั่งส่วนประกอบของวัตภาคน้ำมันใส่บีกเกอร์ขนาด 25 ml นำมาให้ความร้อนบน water bath ที่อุณหภูมิ ประมาณ 70 °c
3. เทวัตภาคน้ำลงในวัตภาคน้ำมันเป็นสายช้าๆ บน water bath คนตลอดเวลาจนเกิดเป็น hot microemulsion
4. เท hot microemulsion ที่เตรียมได้ จากข้อ 3 ลง 0.1% stabilizing agent 200 ml (4°c) ที่ปั่นรอไว้ด้วย High speed homogenizer ด้วยความเร็ว 9500 rpm/min เป็นเวลา 30 นาที
5. ลดปริมาตรน้ำด้วย ultrafiltration และล้างด้วย DI water 2 ครั้ง ๆ ละประมาณ10-20 ml จนกระทั่งปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 50 ml
6. เติม Manitol 3 %w/v ลงในสารละลายที่ลดปริมาตรแล้ว
7. นำไป Freeze-dry ที่ ความดัน $1x10^{-4}$ Torr และอุณหภูมิ -55 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
8. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ในขั้นตอนนี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการผลิตดังนี้ คือ

- ชนิดของไขมันเหลว; lexol, oleic acid, olive oil, IPP, IPM
- ปริมาณของไขมันแข็งร้อยละโดยน้ำหนัก (glyceryl monosterate, glyceryl behenate, gelucire 44/14); 10, 15, 20, 25, 30
- ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวร้อยละโดยน้ำหนัก (lipoid s75); 3, 5, 7
- ปริมาณของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมร้อยละโดยน้ำหนัก; 0.5, 0.6, 0.7

ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรตำรับของ pomegranate peel extract loaded NLCs

Ingredients	Function
Oil phase	
Glyceryl monosterate	Solid lipid
Glyceryl behenate	Solid lipid
Gelucire 44/14	Solid lipid
Oil (lexol, oleic acid, olive oil, IPP, IPM)	Liquid lipid
Lipoid S75	Surfactant
Ethanol	Co-surfactant
Pomegranate peel extract	Active agent
Water phase	
Poloxamer 188	Surfactant
AOT	Co-surfactant
Water	Solvent

2.5 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ pomegranate extract loaded NLC

2.5.1 ศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและประจุบนผิวอนุภาคด้วยเครื่อง Dynamic light scattering (Zeta Pals, Meditop Co.,Ltd., Bangkok, Thailand)

2.5.2 ศึกษารูปร่างและลักษณะของอนุภาคด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM, 1455VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK)

2.6 การทดสอบการปกคลุมผิวของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโน

ในการทดสอบการปกคลุมผิวของอนุภาคไขมันแข็งขนาดนาโนนี้ได้ใช้ Franze diffusion cell โดยพัฒนาวิธีการทดลองมาจาก de Vringer และ de Ronde (1995) โดยการเติมน้ำลงใน receptor chamber และปิดด้วยผิวหนังหมู จากนั้นทา NLC dispersions ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหนังหมู ตัวควบคุมคือระบบที่ทาน้ำกลั่นบนผิวหนังหมู แล้วชั่งน้ำหนักเริ่มต้นและน้ำหนักที่คงเหลืออยู่ ที่เวลา 4 และ 8 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 32°c ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70-75% RH จากนั้นคำนวณหาค่าการปกคลุมจากสมการต่อไปนี้

$$F = 100*((A-B)/A) \qquad (1)$$

โดยที่ A เป็นปริมาณน้ำที่สูญหายไปของตัวควบคุม และ B เป็นปริมาณน้ำที่สูญหายไปของสารทดสอบ จากสมการนี้ถ้า F มีค่าเป็นศูนย์คือไม่มีผลการปกคลุมเมื่อเทียบกับตัวควบคุม และ F เป็น 100 คือมีผลการปกคลุมที่มากที่สุด

โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ ปริมาณของไขมันแข็งทั้งหมดในตำรับ 10%, 15%, 20% และ 30% w/w

2.7 การศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา

ชั่งตัวอย่าง NLCs dispersions ที่ลดปริมาตรแล้ว 1 ml ลงใน ultracentrifuge tube นำไป Centrifuge ที่ 80,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ปิเปตส่วนใสออก 0.5 ml เติมน้ำลงไปอีก 0.5 ml, Centrifuge ที่ 80,000 rpm 30 นาที (ล้างครั้งที่ 1) ล้างทั้งหมด 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายปิเปตส่วนใสทิ้งทั้งหมด ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml ด้วย ethanol จากนั้นนำไป vortex และ sonicate อย่างละ 1 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ ellagic acid ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 254 nm แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ ellagic acid โดยคำนวณจาก standard curve ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1-50 µg/ml ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาจากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ ellagic acid incorporation} = \frac{\text{Conc. of determination}}{\text{Conc. of initial}} \times 100 \qquad 2)$$

2.8 การเตรียม cream containing pomegranate peel extract loaded NLCs

แยกชั่งส่วนประกอบของวัตภาคน้ำมัน (Part A) และวัตภาคน้ำ (Part B) (ตารางที่ 2.2) จากนั้นให้ความร้อนบน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 70-75 $^{\circ}C$ เมื่อได้อุณหภูมิตามต้องการ เทวัตภาคน้ำลงในวัตภาคน้ำมันให้เป็นสาย คนตลอดเวลาจนเกิดเป็นอิมัลชัน คนต่อจนเมื่ออุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จึงเติม pomegranate peel extract loaded NLCs ลงไป คนจนอิมัลชันเป็นเนื้อเดียวกัน โดยให้มี pomegranate peels extract 0.05% w/w

เพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยตัวยา จึงเตรียมตำรับครีมสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่ไม่ได้บรรจุอยู่ในอนุภาคไขมันแข็งเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยเตรียมด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น เมื่อได้อิมัลชันที่เย็นแล้วจึงเติมสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่ละลายใน ethanol คนจนอิมัลชันเป็นเนื้อเดียวกัน โดยให้มีสกัดเปลือกผลทับทิม 0.05% w/w

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของ cream containing pomegranate peel extract loaded NLCs

Ingredients	Function
Oil phase (Part A)	
Stearic acid	Stiffening agent
Glyceryl monostearate	Stiffening agent
Cetyl alcohol	Stiffening agent
PEG 1500	Emulsifier
Octyl palmitate	Emollient
Jojoba oil	Emollient
Silicone 350	Emollient
Propyl paraben	Preservative
Water phase (Part B)	
Carbopal 934	Thickening agent
TEA	pH adjuster
Propylene glycol	Humectants
EDTA	Chelating agent
Methyl paraben	Preservative
Water to	Solvent
Active (Part C)	
Pomegranate peel extract loaded NLCs/ Pomegranate peel extract in ethanol	Active agent

2.9 การศึกษารูปแบบการปลดปล่อยตัวยา

ศึกษาการปลดปล่อยตัวยาในหลอดทดลอง ด้วย vertical Franze diffusion cell พื้นที่ในการแพร่ผ่าน 1.77 ตารางเซนติเมตร receptor chamber มีความจุ 11 ml membrane ที่ใช้กั้นระหว่าง donor และ receptor คือ cellulose acetate membrane (pore size 0.22 µm) โดยแช่ membrane ในน้ำกลั่น ไว้ 12 ชั่วโมง ก่อนที่จะประกอบเข้ากับ vertical Franze diffusion cell โดย medium ที่ใช้ คือ ethanol กับ acetate buffer (pH 5.5) ในอัตราส่วน 50:50 เมื่อเตรียมเสร็จแล้วให้ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้เกิดความสมดุล จากนั้นชั่งตัวอย่าง cream containing pomegranate peel extract loaded NLCs 50 mg ทาลงบนผิวหน้า membrane สุ่มตัวอย่าง 0.5 ml ที่เวลา 15, 30, นาที 1, 3, 5, 7, 9 และ 12 ชั่วโมง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างจะเติม medium 0.5 ml กลับลงใน receptor chamber นำตัวอย่างที่สุ่มได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ ellagic acid ด้วย HPLC ที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตำรับ pomegranate peel extract unloaded NLCs ด้วยวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น

2.10 การศึกษาความคงตัวทางกายภาพ และเคมี

ศึกษาที่สภาวะเร่ง heat cool cycle โดยชั่งน้ำหนักแต่ละตำรับประมาณ 10 g ใส่ลงในขวด ปิดฝาให้สนิท และเก็บให้พ้นแสง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชม. แล้วย้ายนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชม. นับเป็น 1 รอบ ทำเช่นเดียวกันนี้ 6 รอบ แล้วทำการประเมินความคงตัวทางกายภาพและความคงตัวทางเคมีในหัวข้อต่อไปนี้

ประเมินความคงตัวทางกายภาพ

- การแยกชั้น โดยใช้ visual observe
- วัดความหนืด โดยใช้เครื่อง Rheometer (Model DV-III, Brookfield, MA, USA) ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม นำไปวัดความหนืดด้วย cone & plate โดยใช้ spindle CP51 shear rate 3.84 sec^{-1}

ประเมินความคงตัวทางเคมี

- วัด pH โดยใช้เครื่อง pH meter
- วัดปริมาณของ ellagic acid ด้วยวิธี HPLC โดยวิธีการวิเคราะห์มีดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างมา 100 mg ละลายใน MeOH (HPLC grade) 1 ml
2. นำไป sonicate 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 rpm นาน 10 นาที
3. ปิเปต Supernatant จากข้อ 2 มา 0.1ml ละลายใน mobile phase 0.9 ml
4. วิเคราะห์หาปริมาณ ellagic acid โดยคำนวณจาก Standard curve ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1- 50 µg/ml ทำการทดลอง ซ้ำ3 ครั้ง