

รายงานการวิจัยเรื่อง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลูและความคงตัวของไลโปโซม

FACTORS AFFECTING CLOVE OIL-LIPOSOME PREPARATION AND ITS STABILITY

รศ. ดร. สมลักษณ์ คงเมือง

SOMLAK KONGMUANG

ผศ. รตอ(ญ). ดร. มาลัย สติรพันธุ์

MALAI SATIRAPHAN

รศ. ดร. อุทัย โสธนะพันธุ์

UTHAI SOTANAPHUN

คณะเภสัชศาสตร์

ปี พ.ศ. 2550

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

คำนำ

ปัจจุบันการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้กันมาก และพบว่า บางชนิดของน้ำมันหอมระเหยไม่มีความคงตัว ดังนั้นการประยุกต์ใช้ โลโปโซม ในการป้องกันการสลายตัว นับเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนารูปแบบการเก็บรักษา น้ำมันหอมระเหยให้มีคุณภาพที่มีความคงตัวที่เหมาะสมในการใช้งานต่างๆ

ผู้ดำเนินการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ "ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีงบประมาณ 2549

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเตรียมไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลู แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกสกัดสารปนเปื้อนออกจากฟอสฟาติลโคลีน (PC) โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี โดย PC ที่ได้มีการควบคุมคุณภาพโดยใช้ วิธีวิเคราะห์ตาม Bartlett's assay ขั้นที่สองเตรียมไลโปโซมจาก PC 3 แหล่ง คือ PC ที่สกัดจาก PC ความบริสุทธิ์ต่ำ (PPC) PC ความบริสุทธิ์ต่ำซึ่งซื้อมาจากบริษัทก่อนการสกัด (CPC) และ PC ความบริสุทธิ์สูง (HPC) ในการเตรียมไลโปโซมใช้ 2 เทคนิค คือ reverse phase evaporation และ thin film method เปรียบเทียบอัตราส่วนโดยโมลของฟอสฟาติลโคลีนต่อคอเลสเตอรอลที่ 1:0 1:1 7:3 และ 9:1 ขั้นตอนที่สามคือการวัดขนาดและควบคุมขนาดไลโปโซมที่เตรียมได้จากทั้ง 2 วิธี ขั้นตอนที่สุดท้ายไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลูที่เตรียมได้มีการศึกษาทางกายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและการวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟีในการหาปริมาณสารยูจินอลซึ่งเป็นสารสำคัญในน้ำมันกานพลู

ผลการศึกษาพบว่า PPC CPC และ HPC มีปริมาณฟอสฟอรัสเท่ากับ ร้อยละ $68.67 \pm 3.90\%$ $39.00 \pm 4.38\%$ และ $70.00 \pm 4.25\%$ ตามลำดับ วิธีการเตรียมไลโปโซมแบบ thin film ที่อัตราส่วน 1:1 ให้ไลโปโซมชนิดผนังหลายชั้น โดยขนาดอนุภาคของไลโปโซม คือ 204.32 ± 259.82 , 246.99 ± 125.16 และ 243.45 ± 165.76 นาโนเมตร ตามลำดับ และพบว่าไลโปโซมที่เตรียมจาก PPC และ CPC มีลักษณะของผนังหลายชั้นเหมือนกับ HPC แต่ลักษณะของไลโปโซมที่เตรียมจาก CPC มีลักษณะของผนังที่ไม่ค่อยสมบูรณ์และมีค่าการกระจายขนาดสูงกว่าไลโปโซมที่เตรียมจาก PPC และ HPC เมื่อทำการควบคุมขนาดของไลโปโซมโดยนำอนุภาคผ่าน liposome extruder พบว่าทำให้การกระจายตัวแคบลง โดยดูจากค่า poly dispersion index (PI) ที่ลดลงโดยมีขนาดของไลโปโซมของ extruded HPC extruded CPC และ extruded HPC 200.76 ± 0.58 , 200.23 ± 0.19 และ 200.35 ± 0.43 นาโนเมตร ตามลำดับ การศึกษาทางเคมีพบว่าไลโปโซมที่เตรียมได้จาก PPC สามารถบรรจุ Eugenol ได้ใกล้เคียงกับไลโปโซมที่เตรียมจาก HPC หลังศึกษาความคงตัวโดยเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 เดือน พบว่ารูปร่างของไลโปโซมที่เตรียมจากทุกแหล่งของ PC ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น PPC สามารถนำมาใช้เตรียมไลโปโซมที่มีความสามารถบรรจุน้ำมันกานพลูเท่ากับไลโปโซมที่เตรียมได้จาก HPC

Abstract

This research particularly focuses on preparation of liposomes which can efficiently maintain stability and quality of clove oil. The research method used in this study can be divided into four main steps. First, phosphatidylcholine (PC) was purified by using techniques called column chromatography and thin layer chromatography. Each source of PC was chemically evaluated using Bartlett's assay. Second, liposomes from three different sources of PC (i.e., purified PC from commercial PC (PPC), commercial PC (CPC) and commercial high-purified PC (HPC)) were prepared by using two different methods: thin film method and reverse evaporation. Four different molar ratios of PC to cholesterol: 1:0, 9:1, 7:3 and 1:1 were investigated. Third, size and size distribution control were analyzed by extruding liposomes obtained from the two techniques through syringe extruders. Finally, a physical study of liposome containing clove oil was performed using transmission electron microscopy (TEM), a chemical study of eugenol was performed using gas chromatography (GC) and a stability study was performed at a temperature of 4 degree Celsius for 3 months.,

The research results showed that PPC, CPC and HPC contained 68.67 ± 3.90 %, 39.00 ± 4.38 % and 70.00 ± 4.25 % of PC respectively (the amounts were calculated by weight using inorganic phosphorus). Thin film method and 1:1 molar ratio of PC to cholesterol showed multilamellar structure in the liposome from every source with size of 204.32 ± 259.82 , 246.99 ± 125.16 and 243.45 ± 165.76 nm. PPC, CPC and HPC respectively. The multilamellar structure of liposome analyzed by using TEM showed that liposome from PPC and CPC were similar to that from HPC while liposome prepared by CPC showed incomplete multilamellar structure and high polydispersion index (PI) with size of 200.76 ± 0.58 , 200.23 ± 0.19 and 200.35 ± 0.43 nm with extruded PPC, extruded CPC and extruded HPC respectively. The results showed that liposome extruded through a syringe extruder had low PI since size of liposome was controlled by membrane. In addition, results of the chemical study showed that the amount of eugenol contained in the liposome from PPC was nearly equivalent to that contained in the HPC. After storage, in 4°C for 3 month the morphology of liposome from each type of PC did not change significantly. Liposome prepared by HPC or PPC could maintain eugenol after stability. Thus, PPC could be a good source for liposome as comparing to HPC in term of quality of containing substance and stability.

สารบัญ เรื่อง (Table of Content)	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ง
บทนำ	
ความสำคัญที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตการวิจัย	2
ทฤษฎี และ แนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย (Material and Method)	4
วิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการทดลอง (Result)	8
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง (Conclusion and Discussion)	27
ข้อเสนอแนะ (Recommendation)	28
บรรณานุกรม (Bibliography)	29
ภาคผนวกที่ 1	30
ภาคผนวกที่ 2	30
ภาคผนวกที่ 3	30
ภาคผนวกที่ 4	30
ภาคผนวกที่ 5	30
ภาคผนวกที่ 6	30

สารบัญตาราง (List of Tables)	หน้า
1 แสดงถึงปริมาณของ ฟอสฟอรัส ในเลซิดินต่างชนิด	10
2 ตารางแสดงผลลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมโดยวิธี thin film จาก PCP	12
3 ตารางแสดงผลลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมโดยวิธี thin film จาก HCP	13
4 ตารางแสดงผลลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมโดยวิธี thin film จาก CPC	14
5 ตารางแสดงผล ลักษณะทางกายภาพของไลโปโซม ที่เตรียมโดยวิธี reverse phase evaporation เตรียมจาก PCP	16
6 ตารางแสดงผล ลักษณะทางกายภาพของไลโปโซม ที่เตรียมโดยวิธี reverse phase evaporation เตรียมจาก HCP	17
7 ตารางแสดงผล ลักษณะทางกายภาพของไลโปโซม ที่เตรียมโดยวิธี reverse phase evaporation เตรียมจาก CPC	18
8 แสดงสัณฐานของไลโปโซมที่ได้จากเลซิดินทั้ง 3 ชนิด	19
9 แสดงขนาดของอนุภาคของไลโปโซมที่เตรียมได้ จากอัตราส่วน 1:1 จากเลซิดิน 3 แหล่ง	20
10 แสดงปริมาณของน้ำมันกานพลูที่สามารถบรรจุในไลโปโซม	21
11 แสดงปริมาณของ eugenol ในไลโปโซมที่เตรียมได้จาก 3 ชนิด	24
12 แสดงถึงปริมาณของ eugenol ในไลโปโซม เป็นระยะเวลา 3 เดือน	25
13 แสดงลักษณะทางกายภาพ ก่อนและหลังการศึกษาความคงตัว ศึกษาภายใต้กล้อง TEM	26

สารบัญภาพ (List of Illustrations)	หน้า
1 แสดง IR spectrogram ของเลขิตินที่ได้จากทั้ง 3 แหล่ง	9
2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ ฟอสฟอรัส	9
3 แสดง GC chromatogram ของ eugenol	21
4 แสดง peak ของสารมาตรฐานสำหรับระบบ GC MS	22
5 แสดง calibration curve ของ ปริมาณน้ำมันกานพลู	23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (List of Abbreviations)

CC	=	column chromatography
CHOL	=	cholesterol
CPC	=	commercial phosphatidylcholine
DRV	=	dehydration rehydration vesicle
Et al	=	and other
EU	=	eugenol
FRV	=	freeze dried rehydration vesicle
GC	=	gas chromatography
GC-MS	=	gas chromatography couple with Mass spectroscopy
HPC	=	commercial high purified phosphatidylcholine
IR	=	infrared spectroscopy
IUV	=	intermediated size unilamellar vesicle
LUV	=	large unilamellar vesicles
LUVET	=	large unilamellar vesicle by extrusion technology
mg	=	Milligram
ml	=	milliliter
MLV	=	multilamellar vesicle
MVL	=	multivesicular liposomes
MWCO	=	molecular weight cut off
nm	=	nanometer
PBS	=	phosphate buffer saline
PC	=	phosphatidylcholine
PCS	=	photon correlation spectroscopy
PI	=	polydispersion index
PPC	=	purified phosphatidylcholine from commercial phosphatidylcholine
REV	=	reverse phase evaporation

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญที่มาของปัญหา

ปัจจุบันการใช้ยาชาในการลดความเจ็บปวดทั้งหมดเป็นยาแผนปัจจุบันที่มีผลในการรักษาและความปลอดภัยที่ได้ผ่านการทดสอบทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาแล้ว⁽¹⁾ นอกจากนี้จากการศึกษาทางเคมีพบว่ามีการสกัดสารจากธรรมชาติหลายชนิดที่มีผลทำให้เกิดอาการชาได้ เช่น น้ำมันกานพลู⁽²⁾ ซึ่งเป็นน้ำมันที่สกัดมาจาก *Syzygium aromaticum* (Linn.) มีสารสำคัญ คือ eugenol มีปริมาณร้อยละ 75 ถึง 88 นอกจากนี้ยังมีสาร carryophyllene ปริมาณร้อยละ 5 ถึง 8 และ acetyleugenol ปริมาณร้อยละ 4 ถึง 15 มีคุณสมบัติเป็นน้ำมันหอมระเหยสีเหลืองอ่อน ใส มีกลิ่นและรสที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะของน้ำมันกานพลู มีสีเข้มขึ้นเมื่อสัมผัสกับอากาศ สี สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ได้ในอัตราส่วนระหว่างน้ำมันกานพลูกับแอลกอฮอล์ 1:2 เนื่องจากสามารถเปลี่ยนสีได้เมื่อสัมผัสอากาศจึงควรเก็บในภาชนะป้องกันแสงและเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ยังไม่มีข้อมูลเรื่องของระยะเวลาในการเกิดเปลี่ยนแปลงของ ซึ่งน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ลดอาการปวดศีรษะ ไมเกรน รักษาอาการเวียนศีรษะ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ขับลมและช่วยย่อยอาหาร เป็นต้น และยังมีฤทธิ์ที่สำคัญ คือ ทำให้เกิดอาการชาได้ โดยมักใช้เป็นยาชาลดความเจ็บปวดจากอาการปวดฟันหรือจากการทำฟัน เนื่องจากสามารถทำให้เกิดอาการชาเฉพาะที่ได้จากการยับยั้งการสร้างสารสร้างความเจ็บปวด prostaglandin ที่เป็นผลมาจาก eugenol ดังนั้นปริมาณการได้รับ eugenol เข้าสู่ร่างกายในแต่ละวันไม่ควรเกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในปัจจุบันยังไม่มีการพัฒนา น้ำมันกานพลูให้เป็นรูปแบบที่มีความคงตัวและสามารถกักเก็บสารหอมระเหยเอาไว้ได้ ในการใช้ในการลดอาการปวดฟันมักใช้ร่วมกับ zinc oxide วิธีการใช้โดยใช้ตำลึงมีส่วนผสมของน้ำมันกานพลูและ zinc oxide แล้วทาหรืออุดบริเวณที่ปวด⁽³⁾ จากการใช้ในแบบดั้งเดิมนี้ทำให้น้ำมันกานพลูมีโอกาสสัมผัสอากาศได้มากทำให้เกิดความไม่คงตัวและไม่สามารถรักษาคุณภาพของสารหอมระเหยเอาไว้ได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาน้ำมันกานพลูให้อยู่ในรูปที่มีความคงตัวโดยการเก็บกักไว้ในไลโปโซม

ไลโปโซม เป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็กซึ่งมีผนังเป็นสารไขมันประเภท ฟอสโฟไลปิด ซึ่งอาจมีผนังชั้นเดียว (unilamellar vesicle) หรือหลายชั้น (multilamellar vesicle) ภายในอนุภาคไลโปโซมจะมีวัฏภาคน้ำ (aqueous phase) และวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) ซึ่งทั้งสองวัฏภาคสามารถบรรจุยาหรือสารที่ต้องการได้ และในปัจจุบันมีการวิจัยเกี่ยวกับการนำไลโปโซม มาใช้เป็นตัวพาหยาหรือสารต่างๆเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเป็นการใช้ทั้งทางยาและเครื่องสำอาง⁽⁴⁾ ในการใช้ทางยา เช่น ไลโปโซมที่บรรจุยาต้านเชื้อรา เช่น แอมโฟเทอริซินบี⁽⁵⁾ ยาต้านมะเร็ง เช่น ดอกชอรูปิซิน⁽⁶⁾ ยาต้านไวรัส เช่น ฟอสคาร์เน็ต⁽⁷⁾ และยาต้านแบคทีเรีย เช่น เพนิซิลลิน⁽⁸⁾ เป็นต้น ส่วนในการใช้ทางเครื่องสำอางนั้น มีการใช้ไลโปโซมบรรจุวิตามินเอ เช่น เททโทนิอิน⁽⁹⁾ เป็นต้น วิธีในการเตรียมไลโปโซมมีหลายวิธี เช่น ether injection, double emulsion technique, freeze drying, polyol dilution method แต่ในการศึกษานี้เลือกวิธี thin film method และ reverse phase evaporation ซึ่งทั้งสองวิธีสามารถทำให้เกิดไลโปโซมที่สามารถบรรจุยาหรือสารที่มี

คุณสมบัติชอบน้ำมัน (lipophilic) ได้เนื่องจากอาจสามารถทำให้เกิดไลโปโซมชนิด multilamellar liposome ซึ่งทำให้มีจำนวน bilayer หลายชั้นสำหรับการกักเก็บสารที่มีคุณสมบัติ lipophilic ได้ในปริมาณสูง

การนำไลโปโซมเก็บกักน้ำมันกานพลูมีคุณสมบัติเป็นสารหอมระเหยนำมาใช้ทางทันตกรรม นอกจากอาจสามารถเพิ่มความคงตัวของน้ำมันกานพลูได้เนื่องจากไลโปโซมจะช่วยป้องกันการสลายตัวและการระเหยของน้ำมันกานพลูที่กักเก็บไว้ในไลโปโซมแล้ว ไลโปโซมที่เตรียมขึ้นยังมีผนังภายนอกที่เป็นส่วนประกอบไขมันที่สามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ของฟันชั้นอีนาเมล (enamel) ซึ่งทำให้ไลโปโซมอาจจับกับฟันได้แน่นและนาน สารหรือยาที่กักเก็บไว้ในไลโปโซมสามารถออกฤทธิ์ตามที่ต้องการได้ พบว่าการกินอาหาร คั้นน้ำ หรือกลืนน้ำลายไม่ทำให้ไลโปโซมหลุดออกจากฟัน⁽⁵⁾

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาไลโปโซมที่เตรียมได้จากเลซิทินที่มาจาก soy bean
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ ไลโปโซมที่ได้จากวิธีการเตรียมไลโปโซมระหว่างวิธี thin film method และ reverse phase evaporation
3. เพื่อศึกษาหาอัตราส่วนประกอบไขมันและคอเลสเตอรอลที่มีผลทำให้คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไลโปโซม
4. เพื่อศึกษาหาปริมาณน้ำมันกานพลูที่สามารถกักเก็บในไลโปโซมได้อย่างเหมาะสม
5. เพื่อศึกษาหาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของไลโปโซมที่บรรจุ น้ำมันกานพลู

ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึง ไลโปโซมในการบรรจุสารหอมระเหย ทั้งนี้จะมุ่งเน้นด้านการปรับปรุงสูตรการเตรียม และวิธีการเตรียมไลโปโซมเพื่อให้สามารถเก็บกักสารหอมระเหยให้มีประสิทธิภาพดี ทั้งนี้จะเริ่มจากการสกัดเลซิทินจากเลซิทินจากถั่วเหลืองที่ความบริสุทธิ์ต่ำ จนเกิดเป็นไลโปโซม ที่บรรจุน้ำมันกานพลู

ทฤษฎี และ แนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

การเตรียมสารหอมระเหยโดยการบรรจุใส่ในไลโปโซม นับเป็นการพัฒนาให้สารประเภทนี้สามารถมีความคงตัวที่ดี อีกทั้งเป็นการนำเอานวัตกรรม ระบบนำส่งยามาประยุกต์ใช้กับงานด้านสมุนไพร ซึ่งรูปแบบของการเก็บกักนี้คาดว่าจะนำมาพัฒนาเพื่อเป็นการผลิตในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับสารหอมระเหย ในประเทศต่อไปได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงผลของเลซิทินที่มาจาก soy bean ในการเตรียมไลโปโซม
2. ทราบถึงการเปรียบเทียบผลของการเตรียมไลโปโซมจากวิธีการเตรียมไลโปโซมต่างวิธีในการเตรียมระหว่าง thin film method และ reverse phase evaporation
3. ทราบถึงอัตราส่วนประกอบไขมันต่อคอเลสเตอรอลที่ทำให้ไลโปโซมมีคุณสมบัติที่ดี
4. ทราบถึงปริมาณน้ำมันกานพลูที่สามารถกักเก็บได้
5. ทราบถึงความคงตัวทางกายภาพและเคมีของไลโปโซม
6. สามารถนำมาเป็นแนวทางในการพัฒนาไลโปโซมที่สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรมต่อไป

สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย (Material and Method)

สารเคมี :

40%Phosphatidylcholine (from soy bean, Fluka, Swizerland Lot 1105011 62604010) หรือ CPC
96%Phosphatidylcholine (from soy bean, Calbiochem, B64883) หรือ HPC
Cholesterol (Sigma, USA Lot 111H8488)
Chloroform,AR grade (Lab-Scan, Ireland 04101010)
Methanol,AR grade(Fisher Scientific, 060054)
Sodium hydroxide (BDH Laboratory Supplies, England 191294D036)
Sodium chloride (Farmitalia Carlo Erba,Italy Cod 479687)
Sodium dihydrogen phosphate (Merck,Germany Lot A768946 407)
Disodium hydrogen phosphate (Merck,Germany Lot F997086 532)
Potassium dihydrogen phosphate (Merck,Germany Lot A768946 507)
Sulfuric acid (Merck,Germany Lot K23612831 651)
Ammonium molybdate (Fluka,Swizerland Lot 232685)
Fisk-Subbarow reducer (Sigma,USA Lot 084H78212)
Hydrogen peroxide (Merck,Germany Lot B768946 615)

เครื่องมือ และอุปกรณ์ :

Analytical balance
Rotary Evaporator
Ultrasonic bath
Vortex mixer
Gas Chromatographer
Ultraviolet Spectrophotometer
pH meter
Refrigerated centrifuge
Inverted microscope
Transmission Electron Microscope(Model JEM-200CX,JOEL[®],Japan)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การวิเคราะห์เลขิตินเชิงคุณภาพและการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในสารสกัดเลขิติน

1.1 การสกัดสารเลขิตินที่ได้โดยการใช้ column chromatography ร่วมกับ thin layer chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็น stationary phase ทั้งนี้มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ mobile phase การบรรจุสารเลขิตินจะเริ่มจากการละลายเลขิตินปริมาณ 1.5 กรัม ใน chloroform 10 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บสารที่สกัดจำนวน 30 มิลลิลิตรต่อหลอด เพื่อนำไปศึกษาหาปริมาณเลขิตินต่อไป ทั้งนี้ทำการวิเคราะห์สารเลขิตินที่บริสุทธิ์โดยใช้ TLC aluminium sheet โดยมี mobile phase เป็น chloroform:methanol 1:2 เมื่อ mobile phase ถึงระดับที่กำหนดจะนำ TLC ไปทำแห้งแล้ว spray ด้วย vanillin เพื่อศึกษาหาค่า Rf value ต่อไป ทั้งนี้สารที่ได้จากการสกัดคือ PPC

1.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณของเลขิตินที่เตรียมได้

การวิเคราะห์คุณภาพของเลขิตินที่เตรียมได้นั้น โดยศึกษาเชิงคุณภาพของ lecithin ที่เตรียมได้ ด้วยวิธี FTIR spectrophotometer การใช้ Thin layer chromatography และ ศึกษาหาปริมาณ phosphorus content วิธี Bartlett's assay⁽¹⁰⁻²³⁾ เริ่มจากนำ anhydrous potassium dihydrogen phosphate มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศา นาน 4 ชั่วโมงในตู้อบแบบ hot air oven เตรียม stock solution ของสาร โดยชั่ง 43.55 มิลลิกรัม ละลายในน้ำที่มีการกลั่น 2 ครั้ง ทั้งนี้จะมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส เท่ากับ 3 microole/ml จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานของ phosphorus ในปริมาณ 0.064 0.096 0.128 0.192 0.224 0.256 micromol/ml การเตรียม reagent สำหรับทำให้เกิดสีได้แก่ การผสม กรดซัลฟูริก 5 โมลลาร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในน้ำปริมาณ 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม ammonium molybdate 0.44 กรัม ลงในสารละลาย ผสมจนละลายหมดแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำ จากนั้นเตรียมสารละลาย Friske Subbarow โดยชั่งสารจำนวน 0.8 กรัม ละลายน้ำ 5 มิลลิลิตร การเตรียมสารนี้จะต้องทำใหม่ทุกวันที่มีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ ทำโดยการนำสาร phospholipid มา 1 มิลลิกรัม ละลายใน chloroform 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มา 50 ไมโครลิตร เพื่อทำให้แห้ง จากนั้นมากระจายตัวในน้ำจำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก 0.4 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 180 องศา นาน 1 ชั่วโมง หลังจากเย็นแล้วนำมาเติมด้วย hydrogen peroxide จำนวน 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 180 องศา นาน 30 นาที เมื่อตั้งไว้ให้เย็นแล้ว เติมสารละลาย acid molybdate ที่เตรียมไว้จากข้างต้น ปริมาณ 4.6 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาให้เกิดสีกับสาร Fiske & Subbarow reducing agent และสารละลาย acid molybdate นำมาอุ่นในอ่างน้ำร้อน นาน 7 นาที นำสารละลายทั้งหมดที่เตรียมได้ มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 800 นาโนเมตร นำข้อมูลต่างๆ เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานของ phosphorus และนำข้อมูลของเลขิตินที่เตรียมได้ แล้วนำผลที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่า phosphorus ด้วยสมการ

Phosphorus content = concentration x dilution factor x molecular weight of Phosphorus

2. การเตรียมไลโปโซม

การเตรียมไลโปโซมสำหรับการศึกษาครั้งนี้จะเตรียมได้ 2 วิธี คือ thin film method และ reverse phase evaporation ดังมีขั้นตอนดังนี้

2.1 Thin film method มีขั้นตอนในการเตรียม คือ นำส่วนผสมของสารไขมันและคอเลสเตอรอลในอัตราส่วนโมลต่างๆ (1:0 1:1 7:3 และ 9:1) มาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาทำให้แห้งจนตัวทำละลายระเหยหมดในภาวะที่กำหนดความดันที่ 400 mm ของปรอท และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายน้ำที่อาจมีหรือไม่มีสารหรือยาลงในแผ่นฟิล์มแล้วจึงเขย่าผสมให้เข้ากัน โดยให้มีการพองตัวของเลชิตินอย่างสมบูรณ์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แผ่นฟิล์มจะหลุดออกได้สารละลายคอลลอยด์ของไลโปโซม จากนั้นจะมีการเขย่าโดยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้เกิดเป็นไลโปโซม ส่วนของขนาดอนุภาคที่ได้ จะมีการใช้อุปกรณ์ syringe ช่วยในการปรับขนาดให้ได้ระดับที่ต้องการและมีการกระจายตัวแคบ ซึ่งจะมีการเปรียบเทียบระหว่างขนาดของไลโปโซมที่ผ่าน และไม่ผ่านอุปกรณ์ลดขนาด

2.2 Reverse phase evaporation มีขั้นตอนในการเตรียม คือ นำส่วนผสมของสารไขมันและคอเลสเตอรอลในอัตราส่วนโมลต่างๆ (1:0 9:1 7:3 และ 1:1) มาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายไขมันนี้มาผสมกับสารละลายน้ำที่มีหรือไม่มีสารหรือยา จากนั้นนำของผสมนี้มาผสมให้เข้ากันในอ่างกำเนิดคลื่นความถี่สูง (sonicator bath) จนเกิดอิมัลชันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำอิมัลชันที่ได้มาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในภาวะที่กำหนดความดันที่ 400 mm ของปรอท และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยหมดจะได้สารละลายแขวนตะกอนของไลโปโซม ส่วนขนาดที่ศึกษาจะเหมือนกับการทดลองที่ผ่านมา

3. การประเมินคุณภาพของไลโปโซมในด้านต่างๆ

การศึกษาลักษณะของไลโปโซมที่เตรียมได้ทางด้านกายภาพได้แก่ การวัดขนาด การวัดการกระจายของขนาดอนุภาค การตรวจดูชนิดของไลโปโซมว่าเป็นชนิด multilamellar liposome หรือ unilamellar liposome ซึ่งใช้ เครื่องวัดขนาดชนิด submicron particle size analyzer โดยการหยดสารกระจายตัวของไลโปโซม ที่ผสมกับ 10 mM ของ สารละลาย sodium chloride ลงในเครื่อง Zetasizer Nano S90 จากนั้นจะนำข้อมูลมาวิเคราะห์

4. การบรรจุน้ำมันกานพลูลงในไลโปโซม

การเตรียมน้ำมันกานพลูในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการบรรจุในโลโปโซมได้มากที่สุด ทั้งนี้จะไม่ใส่น้ำมันกานพลูมากเกินไปเกินความสามารถในการบรรจุลงในโลโปโซมได้ โดยกำหนดเป็นปริมาณต่างๆของ clove oil ที่เติมลงไป จากนั้นมีการประเมินโดยการใช้อุปกรณ์ centrifuge ในสถานะ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ว่ามีการแยกชั้นออกมาหรือไม่ โดยผลการศึกษาคือจะพิจารณาจากระดับที่ไม่มีการแยกชั้น

5. การศึกษาความคงตัวของโลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลู

การศึกษาคือศึกษาทั้งวิธีทางกายภาพและทางเคมี โดยโลโปโซมที่นำมาทดสอบความคงตัวเป็นโลโปโซมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

5.1 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพใช้วิธีการและเครื่องมือเดียวกับการประเมินคุณภาพของโลโปโซม จะมีการเพิ่มอุปกรณ์ศึกษาขนาดโดยใช้กล้อง Transmission Microscope

5.2 การทดสอบความคงตัวทางเคมีเป็นการหาปริมาณน้ำมันกานพลูที่เหลือในโลโปโซม โดย gas chromatography ร่วมกับ mass spectrometer สารที่ตรวจสอบในกานพลูที่ใช้คือ eugenol ซึ่งในเครื่องมือนี้ใช้ aquawax colume โดยมี detector เป็นแบบ FID flow rate ของก๊าซ Heliumที่ใช้เท่ากับ 1.5 ml/min อุณหภูมิที่ใช้คือ 60 องศาเซลเซียสในช่วง 8 นาทีแรก จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ 3 องศา จนครบ 180 องศาภายในเวลา 5 นาที อุณหภูมิที่ injector port เท่ากับ 240 องศา ทั้งนี้ทำการศึกษาค่าที่ได้ 3 ตัวอย่าง (triplicate) ทั้งนี้ได้เตรียม standard eugenol (จำนวนที่ใช้เท่ากับ 0.5 1.25 2. 2.5 3.0 3.75 และ 4.5 ไมโครลิตร) เพื่อคำนวณ eugenol ใน clove oil ทั้งนี้จะใช้ menthol เป็น internal standard ตัวอย่างที่ใช้จะฉีดเข้า GC MS ในปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร

ผลการทดลอง (Result)

1. การวิเคราะห์เลซิดินและการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในสารสกัดเลซิดิน

จากการศึกษาโดยการปรับค่าความมีขี้ของ mobile phase สำหรับการแยก เลซิดิน พบว่า อัตราส่วนระหว่าง chloroform:methanol ที่สามารถแยกเลซิดินให้บริสุทธิ์ได้ ที่อัตราส่วน 4:1 และ 9:1 ซึ่งเมื่อเทียบกับสารเลซิดินมาตรฐาน พบว่า มีค่า Rf value เท่ากับ 0.5 ซึ่งในการทดลองนี้พบว่า ในอัตราส่วน 4:1 สามารถแยก เลซิดินให้มีความบริสุทธิ์ได้ในช่วงที่เก็บหลอดที่ 31-40 ส่วนอัตราส่วน 9:1 ได้ในช่วงหลอดที่ 80-100 เมื่อลองนำเอาเลซิดินที่เตรียมได้จากทั้ง 2 มาศึกษาแบบ preliminary study ในการเตรียม ไลโปโซม พบว่า สารที่ได้จากอัตราส่วน 9:1 ไม่สามารถเตรียมไลโปโซมออกมาเป็นรูปร่างได้ ดังนั้นจึงเตรียมสารสกัดโดยใช้ mobile phase อัตราส่วน 4:1 (chloroform:methanol) ข้อมูลดังแสดงใน appendix ที่ 1

1.2 Quality control of lecithin

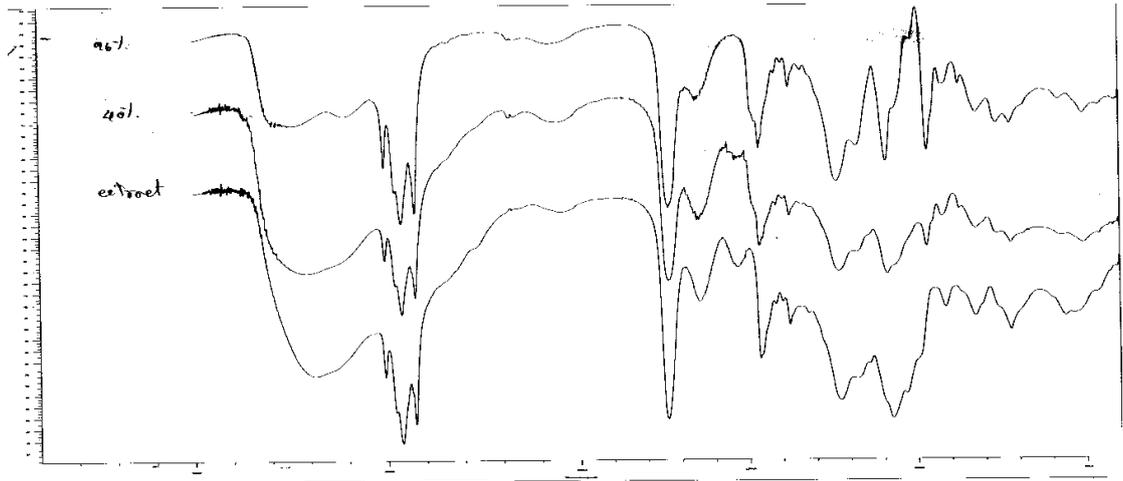
งานวิจัยนี้มีการควบคุมคุณภาพของเลซิดินที่สกัดได้ 2 วิธีด้วยกัน คือ Thin layer chromatography IR spectrophotometer และ Bartlett' assay

1.2.1 Thin layer chromatography

จากผลการศึกษา ที่เป็นการศึกษาร่วมระหว่าง TLC และการสกัด phosphatidyle choline จาก เลซิดินที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ พบว่าค่า Rf ที่ได้ของ CPC และ PPC เท่ากับ 0.5 ซึ่งเท่ากับสารเลซิดิน มาตรฐาน ทั้งนี้พบว่าใน CPC จะมีจุดใน TLC มากกว่าหนึ่งจุดทำให้ทราบถึงมีสารอื่นผสม ในขณะที่ PPC พบว่ามีจุดเพียงจุดเดียวเหมือนสารมาตรฐาน ดังนั้นเลซิดินที่ได้จากสามแหล่งมีส่วนประกอบด้วย phosphatidyl choline แต่ความบริสุทธิ์ต่างกัน

1.2.2 การศึกษาของ IR spectrogram

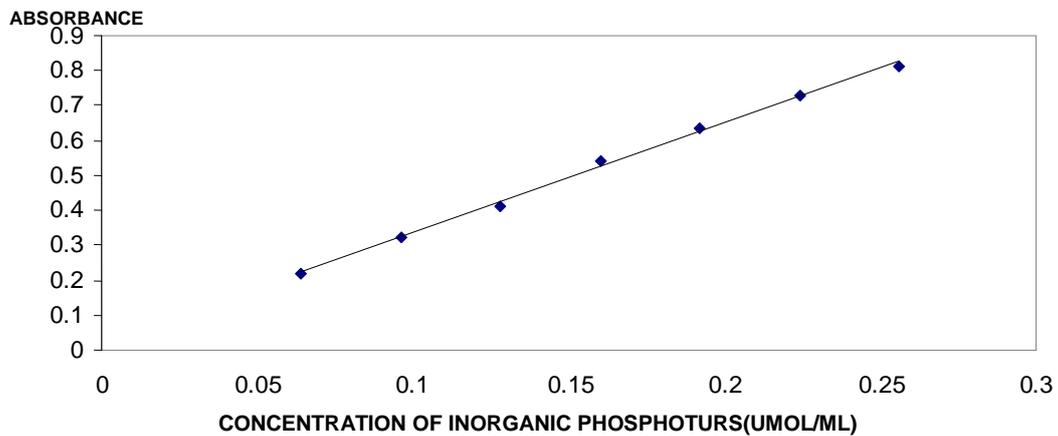
เพื่อเป็นการยืนยันลักษณะ โครงสร้างทางเคมีที่เหมือนกัน จึงนำสารเลซิดินจาก 3 แหล่งมา วิเคราะห์โดยใช้ เครื่อง IR spectrometer ได้ spectrogram ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าสารทั้ง 3 spectrogram หลัก ที่ไม่แตกต่างกันในช่วงของความยาวคลื่น ตั้งแต่ 1800 ซึ่งบ่งบอกถึงส่วนประกอบทางเคมีที่คล้ายกัน



รูปที่ 1 แสดง IR spectrogram ของเลซีดินที่ได้จากทั้ง 3 แหล่ง (96% HPC, 40% CPC, extract PPC)

1.2.2 Bartlett's assay

การหาปริมาณฟอสฟอรัส โดยการนำวิธี Bartlett's assay มาใช้ ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ inorganic phosphorus และ ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 800 nm ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ ฟอสฟอรัส

และสามารถคำนวณหาค่าความสัมพันธ์ดังกล่าว โดยแสดงเป็นสมการ เส้นตรง คือ

$$Y = 3.144 X + 0.0201 \quad (R^2 = 0.9968)$$

โดย ค่า Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 800 nm

X คือความเข้มข้นของ phosphorus (micromole/ml)

เมื่อกำหนดหาปริมาณค่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในเลขิตินที่ได้จาก 3 แหล่ง มีค่าแสดงตามตารางที่ 1 โดยได้ปริมาณฟอสฟอรัสจาก HPC CPC และ PPC เท่ากับ 70.00 39.00 และ 68.67% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PPC มีปริมาณฟอสฟอรัสใกล้เคียงกับ HPC ทั้งนี้เป็นการยืนยันถึงการสกัด CPC ที่ทำให้เลขิตินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จึงมีปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณใกล้เคียงกับ HPC ดังนั้นขั้นตอนในการสกัดนี้สามารถทำให้ได้เลขิตินที่มีคุณภาพสูงขึ้น (ภาคผนวกที่ 3)

ตารางที่ 1 แสดงถึงปริมาณของ ฟอสฟอรัส ในเลขิตินต่างชนิด

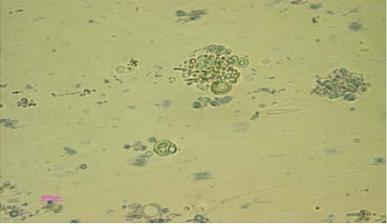
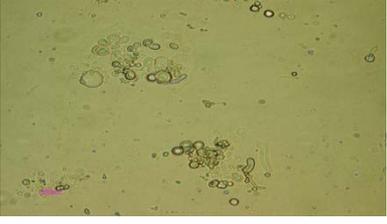
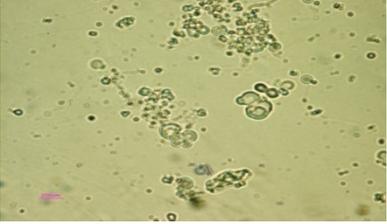
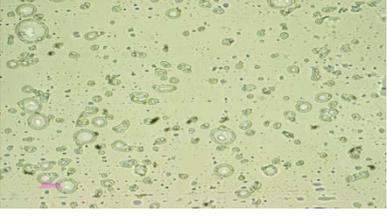
ชนิดของเลขิติน	ปริมาณ ของ inorganic phosphorus จำนวน โดยวิธี Bartlett's assay
PPC	68.67 ± 3.90 %
CPC	39.00 ± 4.38 %
HPC	70.00 ± 4.25 %

2. การเตรียม ไลโปโซม

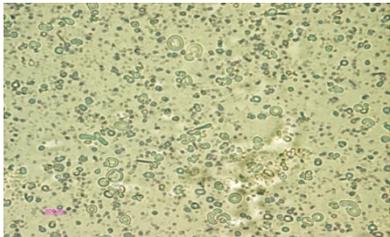
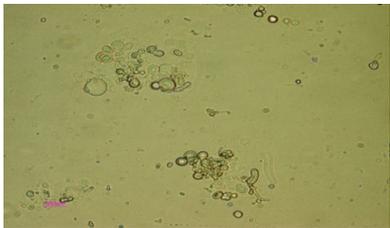
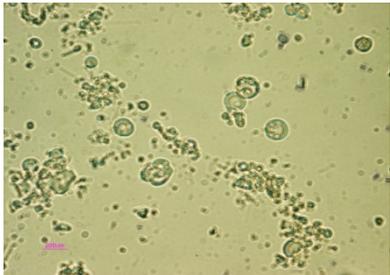
2.1 การเตรียมโดย วิธี Thin film method

การเตรียมไลโปโซมโดยวิธี thin film method จากเลซิติน ทั้ง 3 ชนิด โดยมีการปรับอัตราส่วน โดยโมลระหว่าง เลซิตินต่อคลอเลสเทอรอลเป็น 1:0 9:1 7:3 และ 1:1 พบว่าการใช้เลซิตินทั้ง 3 ชนิด ในอัตราส่วน 1:0 7:3 และ 1:1 ทำให้เกิดไลโปโซมชนิด Multilamellar vesicles ในขณะที่อัตราส่วน 9:1 จะเกิด Unilamellar vesicles ศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในตารางที่ 2 – 4 จากผลการทดลองนี้ได้ตั้งสมมติฐานว่าหากต้องการเก็บกักสารในปริมาณที่มาก จะสามารถเลือกใช้ไลโปโซมที่มีผนังหลายชั้น เท่านั้น (ภาคผนวกที่ 2 เป็นตัวอย่างค่าที่ได้จากการวัดขนาดของไลโปโซมโดยใช้เครื่อง Zeta Sizer)

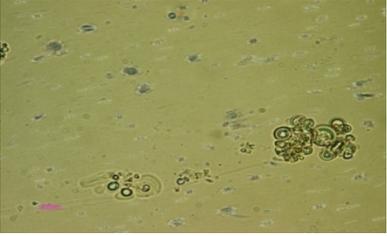
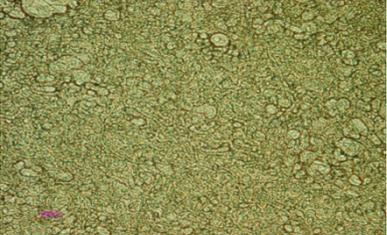
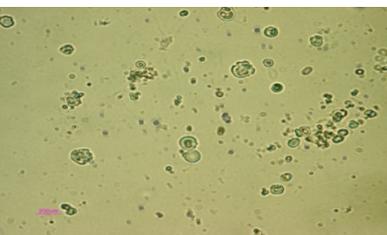
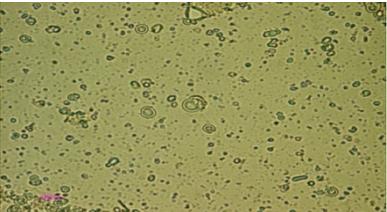
ตารางที่ 2 ตารางแสดงผลลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมโดยวิธี thin film จาก PCP

ประเภทเลชิติน	อัตราส่วน เลชิติน:กลอเลสเตอรอล	ลักษณะทางกายภาพ (x1000)	ขนาดอนุภาค (nm)
PCP	1:0		230.56±162.47
	1:1		204.32±259.82
	7:3		219.48±121.23
	9:1		178.98±103.56

ตารางที่ 3 ตารางแสดงผลลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมโดยวิธี thin film จาก HCP

ประเภทเลชิติน	อัตราส่วน เลชิติน:กลอเลสเตอรอล	ลักษณะทางกายภาพ (x1000)	ขนาดอนุภาค (nm)
HPC	1:0		225.26±148.29
	1:1		246.125±125.16
	7:3		204.43±122.75
	9:1		189.34±96.56

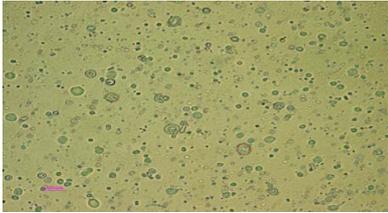
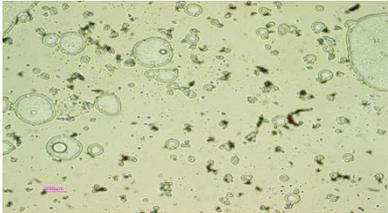
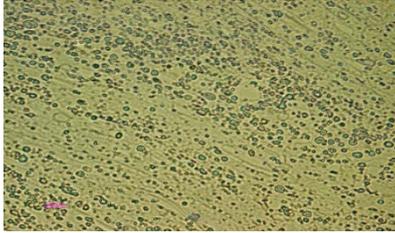
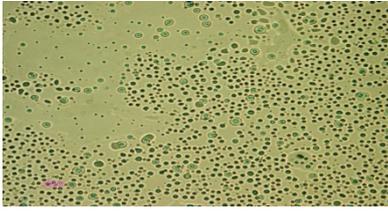
ตารางที่ 4 ตารางแสดงผลลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมโดยวิธี thin film จาก CPC

ประเภทเลชิติน	อัตราส่วน เลชิติน:กลอเลสเตอรอล	ลักษณะทางกายภาพ (x1000)	ขนาดอนุภาค (nm)
CPC	1:0		225.26±148.59
	1:1		246.99±125.16
	7:3		204.43±122.75
	9:1		192.87±99.34

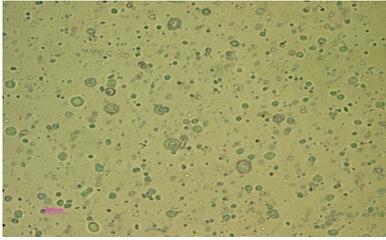
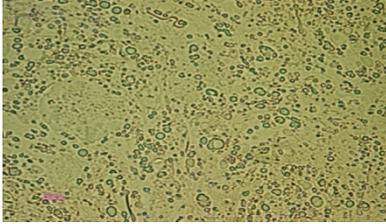
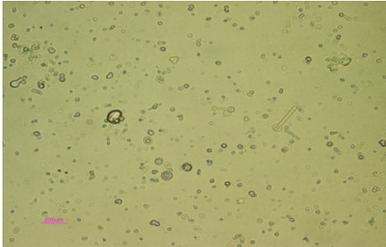
2.2 Reverse phase evaporation

การเตรียมไลโปโซมโดยวิธี reverse phase evaporation จากเลซิติน ทั้ง 3 ชนิด โดยมีการปรับอัตราส่วนโดยโมลระหว่าง เลซิตินต่อคลอเลสเทอรอลเป็น 1:0 9:1 7:3 และ 1:1 พบว่าทุกอัตราส่วนทำให้เกิดไลโปโซมชนิด Unilamellar vesicles ดังแสดงในตารางที่ 5 – 7 จากการเตรียมโดยวิธีนี้พบว่าไลโปโซมที่ได้มีลักษณะเป็นแบบเดี่ยว ซึ่งทำให้ไม่สามารถเก็บกักสารที่เป็น hydrophobic ได้ในปริมาณที่มาก เมื่อเทียบกับแบบ multilamellar vesicles (ภาคผนวกที่ 2 เป็นตัวอย่างค่าที่ได้จากการวัดขนาดของไลโปโซมโดยใช้เครื่อง Zeta Sizer)

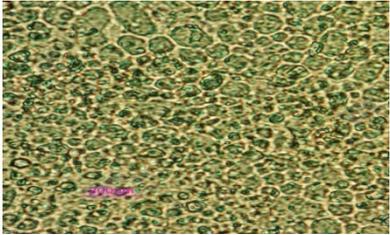
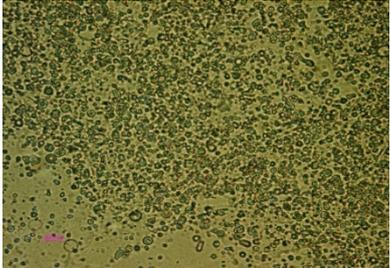
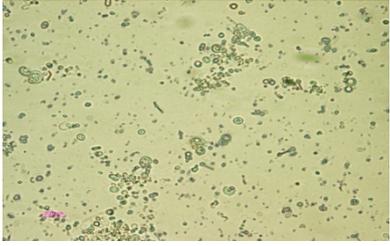
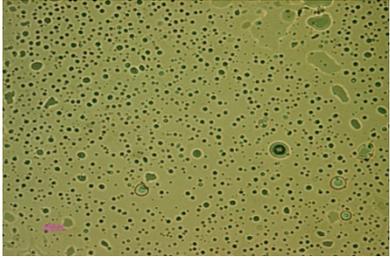
ตารางที่ 5 ตารางแสดงผล ลักษณะทางกายภาพของไลโปโซม ที่เตรียมโดยวิธี reverse phase evaporation เตรียมจาก PCP

ระบบของไลโปโซม	อัตราส่วน เลชิติน:คลอเลสเตอรอล	ลักษณะทางกายภาพ (x1000)	ขนาดอนุภาค (nm)
PCP	1:0		215.79±87.45
	1:1		212.46±176.78
	7:3		215.48±109.78
	9:1		178.98±103.56

ตารางที่ 6 ตารางแสดงผล ลักษณะทางกายภาพของไลโปโซม ที่เตรียมโดยวิธี reverse phase evaporation เตรียมจาก HPC

ระบบของไลโปโซม	อัตราส่วน เลชิติน:คลอเลสเตอรอล	ลักษณะทางกายภาพ (x1000)	ขนาดอนุภาค (nm)
HPC	1:0		224.32±132.47
	1:1		240.23±159.84
	7:3		218.74±112.93
	9:1		195.76±57.98

ตารางที่ 7 ตารางแสดงผล ลักษณะทางกายภาพของไลโปโซม ที่เตรียมโดยวิธี reverse phase evaporation เตรียมจาก CPC

ระบบของไลโปโซม	อัตราส่วน เลซิติน:คลอเลสเตอรอล	ลักษณะทางกายภาพ (x1000)	ขนาดอนุภาค (nm)
CPC	1:0		219.78±134.74
	1:1		240.58±132.67
	7:3		217.56±134.98
	9:1		192.87±99.34

โดยลักษณะทางสัณฐานแล้วพบว่า ไลโปโซมที่ได้จาก เลซิตินทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะเป็นดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงสัมพัทธ์ของไลโปโซมที่ได้จากเลขิตินทั้ง 3 ชนิด

RATIO	THIN FILM METHOD	REVERSE PHASE EVAPORATION
1:0	MULTILAMELLAR	UNILAMELLAR
9:1	UNILAMELLAR	UNILAMELLAR
7:3	MULTILAMELLAR	UNILAMELLAR
1:1	MULTILAMELLAR	UNILAMELLAR

3. Evaluation of liposome

การประเมินไลโปโซมที่เตรียมจากเลขิตินความบริสุทธิ์สูง โดยดูลักษณะทางกายภาพ และขนาดอนุภาคไลโปโซมที่เตรียมได้ การประเมินผลทางกายภาพโดยนำไลโปโซมที่เตรียมได้ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง (Morphology) ของไลโปโซมโดยใช้การย้อมสีที่ละลายในน้ำมัน (Dye) ผสมลงขณะทำการตรวจสอบ เพื่อให้เห็นจำนวนชั้นได้ชัดเจน และการประเมินผลขนาดอนุภาคของไลโปโซม โดยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร (Particle size analyzer) ด้วยเทคนิค Photon correlation spectroscopy ได้ผลการศึกษาดังนี้

การหาขนาดอนุภาคไลโปโซมโดยใช้เครื่อง Particle size analyzer (Zetasizer™) ซึ่งเป็นเทคนิค Photon correlation spectroscopy พบว่าขนาดของไลโปโซมที่ได้มีขนาดไม่แตกต่างกันตามชนิดของเลขิติน เนื่องจากมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่สูงมาก และ วิธีการเตรียมดังแสดงตามตารางที่ 2 ถึง 7 ที่ ผ่านมาแล้ว

โดยลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่ต้องการของการศึกษานี้ คือ ไลโปโซมชนิด Multilamellar vesicle ตามสมมุติฐานที่เมื่อเกิดไลโปโซมชนิด Multilamellar vesicle แล้วจะสามารถบรรจุน้ำมันกานพลูได้มากขึ้น ตามจำนวนชั้น (Lamellar) ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากตามทฤษฎีชั้น (Lamellar) เป็นชั้นของฟอสโฟไลปิดที่หันด้านไม่มีขั้ว (Nonpolar) เข้าหากันจึงน่าจะสามารถกักเก็บสารที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้วไว้ได้ ซึ่งน้ำมันกานพลูก็เป็นสารที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้วจึงน่าจะถูกกักเก็บไว้ตามชั้นที่เกิดในอนุภาคไลโปโซม ดังนั้นหากมีชั้นเกิดขึ้นมากน่าจะทำให้สามารถกักเก็บน้ำมันกานพลูได้มากขึ้นด้วย จากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้อัตราส่วนของ 1:1 และ 7:3 เพื่อศึกษาถึงความคงตัวต่อไป นอกจากนี้เพื่อให้ขนาดอนุภาคที่มีการกระจายตัวน้อยจึงต้องมีขั้นตอนการปรับขนาดด้วยอุปกรณ์การปรับขนาดของไลโปโซม ซึ่งพบว่า ขนาดอนุภาคที่ได้มีการกระจายที่แคบอย่างมีนัยสำคัญ ตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงขนาดของอนุภาคของไลโปโซมที่เตรียมได้ จากอัตราส่วน 1:1 จากเลซิดิน 3 แหล่ง

ชนิดของเลซิดิน	ขนาดของไลโปโซม (nm)
PPC	204.32 ± 259.82
CPC	246.99 ± 125.16
HPC	243.45 ± 165.76
extruded PPC	200.76 ± 0.58
extruded CPC	200.23 ± 0.19
extruded HPC	200.35 ± 0.43

4. Incorporation of clove oil in liposome

การเตรียมไลโปโซมจากเลซิดินความบริสุทธิ์สูงโดยวิธี thin film method ที่ทำให้เกิดไลโปโซมชนิด multilamellar vesicle ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเลซิดินต่อคอเลสเตอรอล 1:0 7:3 และ 1:1 นำผลการศึกษาที่ได้มาเตรียมไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลู โดยการผสมน้ำมันกานพลูลงในส่วนที่เป็นเลซิดิน คอเลสเตอรอลและคลอโรฟอร์ม โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำมันกานพลูที่ใส่ 10 20 30 40 50 และ 60 ไมโครลิตร ตามลำดับ และทำการแยกไลโปโซมกับน้ำมันกานพลูส่วนเกินออกโดยใช้การหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง(Ultracentrifugation) ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งจากการทดลองพบว่าที่สภาวะดังกล่าวสามารถแยกสารแขวนลอยไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลู ออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นล่างสุด(ไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลู) ชั้นกลาง(น้ำมันกานพลูส่วนที่เหลือ) และชั้นบนสุดเป็นส่วนน้ำ(ที่ใช้เตรียมไลโปโซม) ซึ่งปริมาณของน้ำมันกานพลูที่บรรจุในไลโปโซมน้อยจนสามารถบรรจุลงในไลโปโซมได้หมดจะพบเพียงชั้นของไลโปโซมกับชั้นน้ำ หากปริมาณของน้ำมันกานพลูที่บรรจุในไลโปโซมมากเกินไปจะพบส่วนของชั้นที่เป็นน้ำมันกานพลูส่วนที่เหลือและจะทำให้ไลโปโซมที่ได้เสียสภาพเป็นไลโปโซมที่จับตัวกันเป็นก้อนเมื่อตั้งทิ้งไว้จะหลอมรวมเป็นก้อนไขมัน ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าที่อัตราส่วน 1:0 และ 7:3 สามารถบรรจุน้ำมันกานพลู ได้ 10 ไมโครลิตร ในขณะที่อัตราส่วน 1:1 สามารถบรรจุน้ำมันกานพลูได้ถึง 20 ไมโครลิตร ดังนั้นการศึกษาต่อของไลโปโซมจึงเลือก อัตราส่วนเพียง 1:1 ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณของน้ำมันกานพลูที่สามารถบรรจุในไลโปโซม

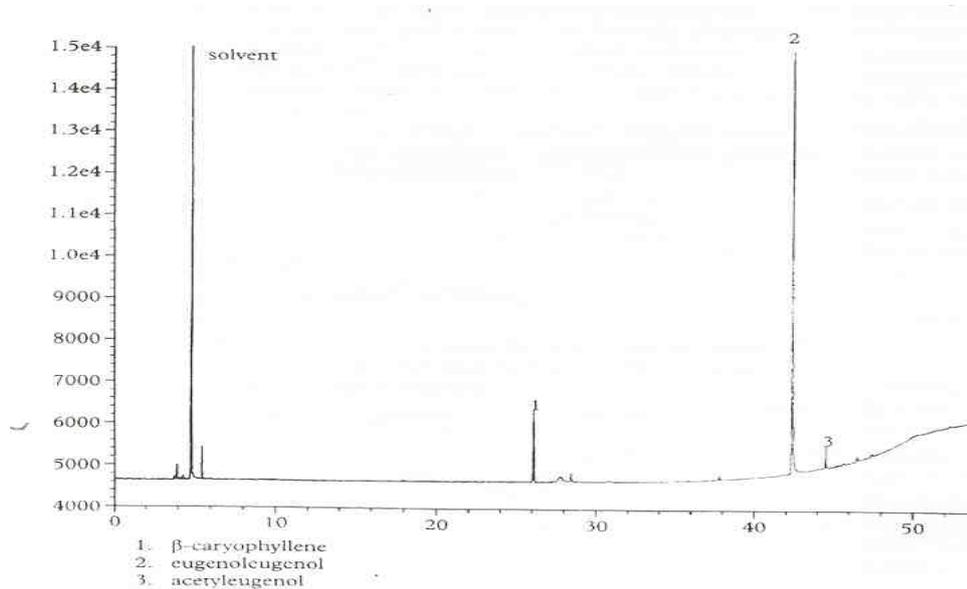
อัตราส่วน	ปริมาณมากที่สุดของ น้ำมันกานพลูใน HPC ไลโปโซม	ปริมาณมากที่สุดของ น้ำมันกานพลูใน PPC ไลโปโซม	ปริมาณมากที่สุดของ น้ำมันกานพลูใน CPC ไลโปโซม
1:0	10	10	10
7:3	10	10	10
1:1	20	10	10

5. การควบคุมคุณภาพของน้ำมันกานพลู

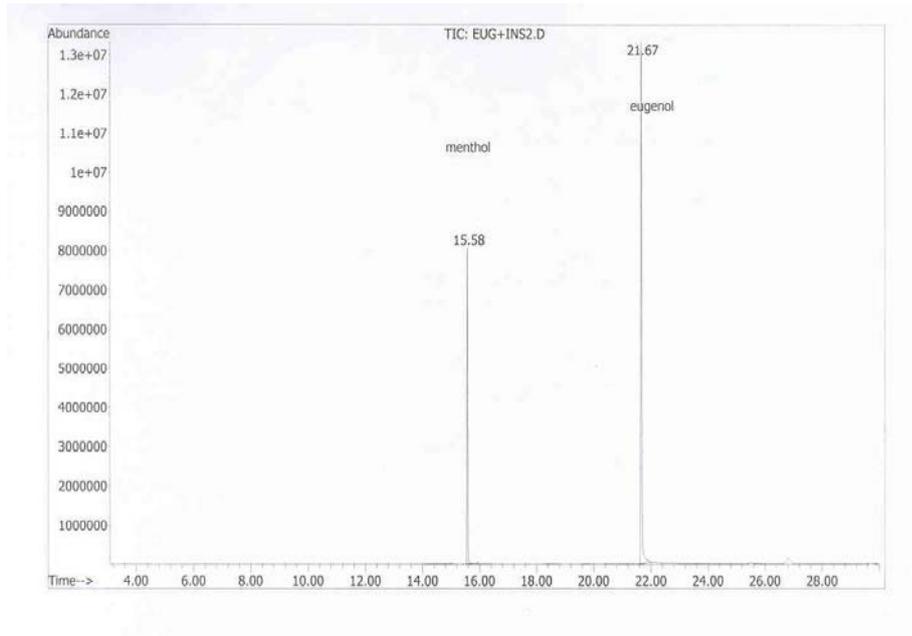
การศึกษาการควบคุมคุณภาพและปริมาณของน้ำมันกานพลูจะศึกษาจากสารสำคัญในน้ำมันได้แก่ eugenol ด้วยวิธี GC และ GC MS

5.1 การศึกษาเอกลักษณ์ของ eugenol ในน้ำมันกานพลูด้วย GC-MS

จากการหาค่า retention time ของ peak ที่ได้จาก GC chromatogram พบว่ามีค่าเท่ากับ 21.67 นาที เมื่อเทียบกับค่ามาตรฐาน โดยมี menthol เป็น internal standard พบว่ามีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 3 และ รูปที่ 4



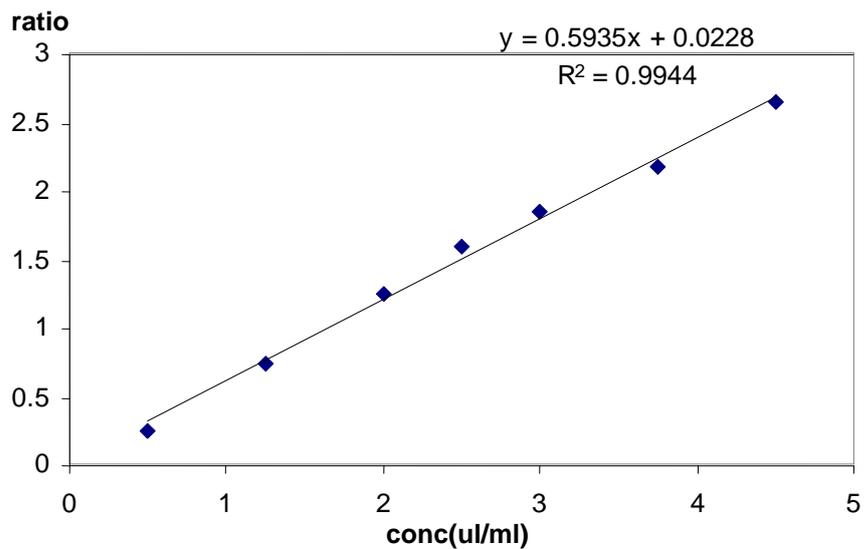
รูปที่ 3 แสดง GC chromatogram ของ eugenol



รูปที่ 4 แสดง peak ของสารมาตรฐานสำหรับระบบ GC MS

5.2 การศึกษาเชิงปริมาณ eugenol ในน้ำมันกานพลู

จากการศึกษาหา area under the curve ของ GC chromatogram เทียบกับปริมาณ eugenol มาตรฐาน สามารถสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณของ eugenol ได้ ดังแสดงในรูป 5 ทั้งนี้การใช้ area under the curve เนื่องจากมีความกว้างของ peak อยู่ในส่วนของน้ำมันกานพลู



รูปที่ 5 แสดง calibration curve ของ ปริมาณน้ำมันกานพลู

จากกราฟ สามารถสร้างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ eugenol และ ได้ค่า อัตราส่วนพื้นที่ของ eugenol ต่อ พื้นที่ของ menthol

$$Y = 0.5935x + 0.0228 \quad (r^2 = 0.9944)$$

โดย y คือ ค่า อัตราส่วนพื้นที่ของ eugenol ต่อ พื้นที่ของ menthol

x คือ ความเข้มข้นของ eugenol (ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร)

จากการศึกษาพบว่า eugenol ในน้ำมันกานพลู คิดเป็น 24.12 ± 0.01 % ซึ่งทำให้ทราบว่า น้ำมันกานพลูที่จำหน่ายในท้องตลาดมาตรฐาน และเมื่อนำมาผสมลงใน โลโปโซม ที่เตรียมจากเลซิดิน ทั้ง 3 ชนิด ที่เตรียมจากอัตราส่วนอัตราส่วน (1:1) พบว่าปริมาณที่ใส่ลงใน โลโปโซม ทั้ง 3 แบบมี eugenol ดังแสดงในตาราง 11

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณของ eugenol ใน โลโปโซมที่เตรียมได้จาก 3 ชนิด

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	AVERAGE %EUGENOL	SD	%RSD
PPC	24.47	24.46	24.45	24.45	24.40	24.39	24.46	24.41	24.38	24.43	0.034	0.139
CPC	23.76	23.78	23.88	23.73	23.95	23.85	23.74	23.71	23.84	23.80	0.082	0.344
HPC	24.32	24.48	24.46	24.42	24.25	24.17	24.15	24.11	24.37	24.30	0.138	0.570

พบว่าปริมาณของ eugenol เมื่อบรรจุลงใน โลโปโซมแล้วมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับปริมาณของน้ำมันกานพลูที่ใส่ลงใน โลโปโซม

6. การศึกษาถึงความคงตัวของ โลโปโซมที่มีการบรรจุ น้ำมันกานพลู

6.1 การศึกษาความคงตัวทางเคมี

ในการศึกษานี้จะใช้ระยะเวลา 3 เดือน ในการศึกษาสภาพของ โลโปโซมที่มีน้ำมันกานพลู บรรจุอยู่ ปริมาณคงเหลือของน้ำมันกานพลูจะใช้เครื่อง Gas Chromatography เป็นเครื่องตรวจวัด ซึ่งได้ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะของการวิเคราะห์ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ระยะเวลาของการเห็น peak ของสารจะใช้เวลา 30 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงถึงปริมาณของ Eugenol ในไลโปโซม เป็นระยะเวลา 3 เดือนที่ 4 องศาเซลเซียส

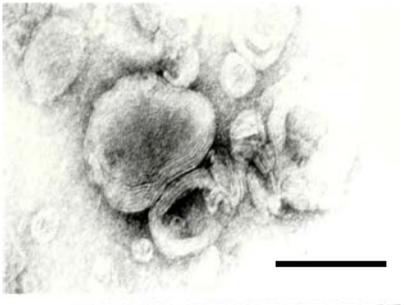
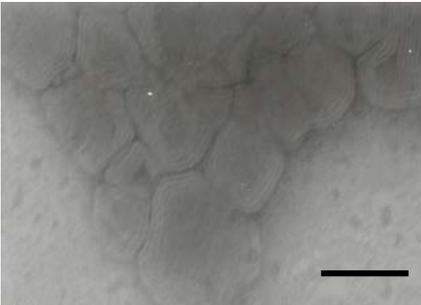
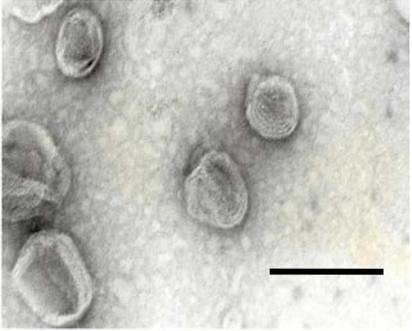
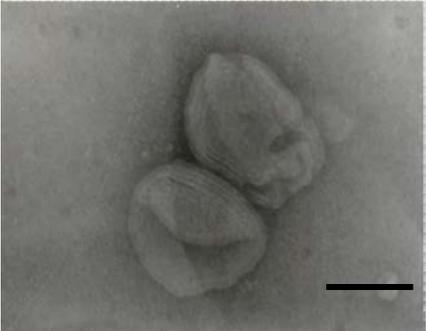
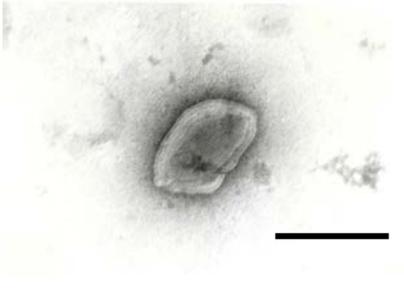
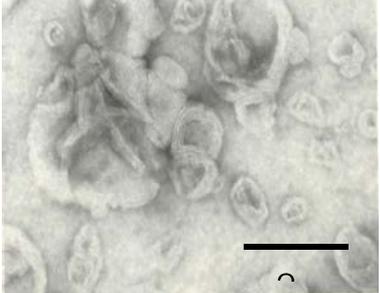
SOURCE OF LIPOSOME	ORIGIN(0 MONTH)		STABILITY(3 MONTH)	
	%EUGENOL	%ENTRAPMENT	%EUGENOL	%ENTRAPMENT
PPC	24.43±0.034	99.78±0.138	24.45±0.017	99.93±0.068
CPC	23.80±0.082	97.33±0.334	23.81±0.087	97.28±0.357
HPC	24.44±0.027	99.93±0.561	24.39±0.102	99.68±0.418

จากการศึกษาพบว่าปริมาณ eugenol ในน้ำมันกานพลู เมื่อคำนวณจากความเข้มข้นแล้วมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการบรรจุน้ำมันกานพลูในไลโปโซมจึงสามารถรักษาคุณภาพของน้ำมันกานพลูไว้ได้ภายในระยะเวลา 3 เดือนในสภาวะ ที่เก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส

6.2 ความคงตัวของกายภาพ

จากการศึกษาด้วยกล้อง TEM พบว่า ลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมก่อนและหลัง การศึกษาความคงตัวของรักษารูปแบบไว้ได้ ด้วยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสใน สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.5 ดังแสดงในตารางที่ 13 ทั้งนี้เมื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าลักษณะ ของไลโปโซมเสื่อมคุณภาพไป

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะทางกายภาพ ก่อนและหลังการศึกษาความคงตัว ศึกษาภายใต้กล้อง TEM

ระบบไลโปโซม	ลักษณะทางกายภาพก่อนการศึกษา	ลักษณะทางกายภาพหลังการศึกษา
CPC	 <p>TEM image showing CPC liposomes before study. The liposomes appear as irregular, somewhat spherical structures with a textured surface. A black scale bar is present in the bottom right corner.</p>	 <p>TEM image showing CPC liposomes after study. The liposomes appear as more uniform, rounded structures with a smoother surface. A black scale bar is present in the bottom right corner.</p>
HPC	 <p>TEM image showing HPC liposomes before study. The liposomes are mostly oval-shaped with a distinct outer layer. A black scale bar is present in the bottom right corner.</p>	 <p>TEM image showing HPC liposomes after study. The liposomes are larger and more irregular in shape, suggesting aggregation or fusion. A black scale bar is present in the bottom right corner.</p>
PPC	 <p>TEM image showing PPC liposomes before study. A single, large liposome is visible, showing a clear bilayer structure. A black scale bar is present in the bottom right corner.</p>	 <p>TEM image showing PPC liposomes after study. Multiple liposomes are visible, some appearing to be fused or aggregated. A black scale bar is present in the bottom right corner.</p>

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

1. ในการเตรียมเลซิดิน

จากการศึกษาค้นคว้าวิธีการสกัด โดยประยุกต์วิธีของ Yechezkel และ Shimon²⁴ พบว่าอัตราส่วนของ mobile phase ที่ใช้คือ chloroform:methanol:water 65:25:4 ทั้งนี้การไม่เพิ่มกรดลงใน mobile phase เนื่องมาจากการลดการเกิด acid hydrolysis ที่อาจเกิดขึ้นกับ เลซิดิน แต่เมื่อทำการทดลองพบว่า mobile phase ที่เหมาะสมในการเตรียมการสกัด ได้แก่ Chloroform: methanol 4:1 จะให้ผลในการแยกเลซิดินได้รวดเร็วและมีปริมาณที่ได้ของเลซิดินมากกว่าอัตราส่วน 9:1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปรับขั้วของ mobile phase และเลซิดิน

เมื่อทำการศึกษาดังปริมาณเลซิดินที่ได้จากการสกัดพบว่าจะได้เลซิดินที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เทียบเท่ากับสารบริสุทธิ์ ที่ซื้อจากบริษัท ทั้งนี้ปริมาณที่คำนวณจากวิธี Barrette นั้นยังมีค่าที่น้อยกว่า ปริมาณที่ระบุไว้ที่ฉลากของเลซิดินอาจเนื่องมาจากวิธีนี้จะป็นวิธีที่บอกปริมาณรวมของฟอสฟอรัสที่อยู่ สารทั้งหมด

ในการศึกษานี้พบว่าการสกัดเลซิดินที่เป็นชนิดที่มีขายตามท้องตลาด นั้นจะใช้เวลาในการสกัด และ ยังขึ้นกับความมีประสิทธิภาพของผู้วิจัย อย่างไรก็ตามการสกัดก็สามารถนำ mobile phase ที่ใช้แล้วมาใช้ อีกหลายครั้งได้ เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าการสกัดด้วยวิธีนี้อาจเป็นวิธีทางเลือกเพื่อประหยัดงบประมาณได้

2. การเตรียมไลโปโซม

ในการเตรียมไลโปโซมสามารถเตรียมทั้งได้ทั้งวิธี thin film และ phase evaporation จากเลซิดินทั้ง สามชนิด ด้วยอัตราส่วนที่ผสมกับ cholesterol 1:0 9:1 7:3 และ 1:1 ทั้งนี้การเติม cholesterol ลงในสูตร เพื่อเพิ่ม rigidity ของไลโปโซม ทำให้ไม่แตกง่าย

การเตรียมโดยวิธี thin film จะได้ไลโปโซมที่มีลักษณะเป็น multilamellar ทุกอัตราส่วนยกเว้น 9:1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในอัตราส่วนนี้ทำให้เกิดการม้วนตัวของ Cholesterol และเลซิดินหมุนเป็นลักษณะ เป็นชั้นเดียวจึงทำให้ได้เป็นแบบ unilamellar สิ่งที่เกิดขึ้นพบว่า การกระจายของอนุภาคมีการกระจายตัวสูง มา แต่เมื่อนำมาผ่านเครื่องเพื่อปรับขนาดลงแล้วพบว่าอนุภาคที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอ และมีค่าการกระจาย ตัวน้อยลงมาก ดังนั้นหากต้องการการกระจายขนาดที่แคบจำเป็นต้องใช้เครื่องควบคุมขนาดประกอบ

การเตรียมไลโปโซมด้วยวิธี REV จะได้ลักษณะที่เป็น unilamellar ที่มากกว่า multilamellar ซึ่ง สอดคล้องกับการศึกษาที่ได้ศึกษาแล้วของ Susan (1992)²⁵ และ Omar (2005)²⁶ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะไม่ ถูknนำมาใช้เนื่องจากสมมติฐานของปริมาณชั้นของไลโปโซมกับการกักเก็บน้ำมันกานพลู

เพื่อสามารถบรรจุน้ำมันกานพลูให้มีปริมาณสูง จึงเลือกไลโปโซมชนิดที่เป็น multilamellar ซึ่ง สามารถเตรียมได้ด้วยวิธี TF พบว่าปริมาณน้ำมันกานพลูที่สามารถบรรจุได้ในไลโปโซม หาได้จากวิธี centrifugation สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lucia (1996)²⁷ ปั่นแยก retinoic acid บรรจุในไลโปโซม

3. การวิเคราะห์ปริมาณของ น้ำมันกานพลู

การวิเคราะห์น้ำมันกานพลูที่ได้จะศึกษาส่วนประกอบสำคัญคือ eugenol ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้ด้วยเครื่อง DC MS spectrometer พบว่าคุณภาพของน้ำมันกานพลูที่ได้มาศึกษาครั้งนี้ไม่เข้ามาตรฐานตาม BP ซึ่งกำหนดไว้ 75 - 88 % แต่ที่ได้จากการศึกษาเท่ากับ 24.5 % จึงทำให้เห็นชัดว่าน้ำมันกานพลูที่มาจำหน่ายในท้องตลาดมีค่าน้อยกว่ามาตรฐาน อาจเกิดเนื่องจากการเก็บรักษา ดังนั้นหากมีการเก็บกักที่ดีอาจจะช่วยเรื่องของความคงตัวได้

4. ความคงตัวของน้ำมันกานพลูในไลโปโซม

จากการศึกษาความคงตัวทั้งกายภาพและทางเคมีของไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลู เป็นระยะเวลา 3 เดือนโดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH เท่ากับ 5.5 จะพบว่าไลโปโซมสามารถรักษาคุณภาพของน้ำมันกานพลูให้มีปริมาณที่ไม่เปลี่ยนแปลงในเชิงคุณภาพของ eugenol ที่วิเคราะห์ แต่เชิงกายภาพพบว่าการเหี่ยวของไลโปโซมเกิดขึ้นแน่นอนจะเก็บไว้ในสภาพ isotonic ก็ตาม ทั้งนี้ลักษณะที่เป็นชั้นประเภท multilamellar ยังพบได้ ในขณะที่เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไลโปโซมมีการเสียดสภาพไป

5. ไลโปโซมที่เตรียมได้จากการสกัดเลคิติน สามารถเก็บกักน้ำมันกานพลูได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ทั้งนี้หากต้องการขยายการศึกษาถึงระดับขั้นตรวจสอบการรักษาควรจะต้องมีการวิจัยที่ตอบรับต่อไป เพื่อคำนวณหาขนาดยาที่ใช้ให้เหมาะสมและมีความปลอดภัยที่ดี

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นการลดมูลค่าต้นทุนในการผลิตไลโปโซม โดยมุ่งเน้นเรื่องของสารเลคิติน ซึ่งการสกัดควรเตรียมโดยบุคลากรที่ได้รับการฝึกฝนเป็นอย่างดี
2. เมื่อพัฒนาไลโปโซมประเภทนี้ได้ก็สามารถประยุกต์ใช้กับสารที่ต้องการรักษาคุณภาพชนิดอื่นๆ ได้

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Bauman J et al.: Lidocain (FDA label use). In: Klasco RK (Ed): DRUGDEX® System. Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado (Edition expires [12/2004]).
2. <http://www.mahidol.ac.th/mahidol/py/mpcenter/html/syzygium.html>
3. James E Reynolds, ,Pharmaceutical Society of Great Britain and prepared in the Society's Publications Department., Martindal The Extra Pharmacopoeia, 531th ed.,(1996) :1692-167
4. อรัญญาและจิรเดช มโนสร้อย, ไลโปโซมทางยาและเครื่องสำอาง, 2545, หน้า135-148, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.
5. A. Manosroi, L. Kongkaneramt and J. Manosroi.,” Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations,” Int J Pharm, 270 (2004): 279-286.
6. Anatoly N. Lukyanov, Tamer A. Elbayoumi, Ananthsrinivas R. Chakilam and Vladimir P. Torchilin.,” Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody,” Journal of Controlled Release, 100 (2004) :135-144.
7. Joep J. Bergers, Ulrich R. Hengge, Susan V. Snijders and Irma A. J. M. Bakker-Woudenb.,” Inhibition of cytomegalovirus late antigen expression and cytomegalovirus replication in human fibroblasts and differentiated monocytic cells by liposome-encapsulated foscarnet,” Journal of Controlled Release, 47 (1997): 163-171.
8. K. H. Sekeri-Pataryas, C. Vakirtzi-Lemonias, H. A. Pataryas and J. N. Legakis.,” Liposomes as carriers of ¹⁴C-labelled penicillin and ¹²⁵I-labelled albumin through the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*,” International Journal of Biological Macromolecules, 7 (1985) : 379-381.
9. M. Brisaert, M. Gabriëls, V. Matthijs and J. Plaizier-Vercammen.,” Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation,” Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 26 (2001) : 909-917.
10. Chiara , Sinico et al. "Liposomal Incorporation of Artemisia Arborescens L. Essential Oil and in Vitro Antiviral Activity." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 59 (2005): 161-68.
11. Chow, Mc et al. "Chemical Composition of Oil Droplets from Palm Oil Mill Sludge." Journal of Oil Palm Research 14 (2002): 25-34.
12. E. ,Chaieb et al. "Inhibition of the Corrosion of Steel in 1 M Hcl by Eugenol Derivatives." Applied Surface Science 246 (2005): 199-206.
13. Edgar, Vazquez-Contreras, Marietta Tuena de Gomez-Puyou, and Georges Dreyfus. "A Column Centrifugation Method for the Reconstitution in Liposomes of the Mitochondrial F0f1Atp Synthase/Atpase." Protein Expression and Purification 7 (1996): 155-59.
14. Fatima, Paiva-Martins, Michael H. Gordon, and Paula Gameiro. "Activity and Location of Olive Oil Phenolic Antioxidants in Liposomes." Chemistry and Physics of Lipids 124 (2003): 23-36.

15. Federico, Momo, Sabrina Fabris, and Roberto Stevanato. "Interaction of Fluoxetine with Phosphatidylcholine Liposomes." Biophysical Chemistry 118 (2005): 15-21.
16. Fre'zard, F. "Liposomes: From Biophysics to the Design of Peptide Vaccines." Brazilian Journal of Medical and Biological Research 32 (1999): 181-89.
17. G. Della Porta et al. "Isolation of Clove Bud and Star Anise Essential Oil by Supercritical Co₂ Extraction." Lebensm.-Wiss. u.-Technol 31 (1998): 454-60.
18. Gabriele, Betz et al. "In Vivo Comparison of Various Liposome Formulations for Cosmetic Application." International Journal of Pharmaceutics 296 (2005): 44-54.
19. Granick, Liangfang Zhang, and Steve Michael. "How to Stabilize Phospholipid Liposomes (Using Nanoparticles)." Nano Letters (2006): A-E.
20. Gregory Gregoriadis.: Liposome Preparation And Related Techniques. Liposome Technology Second Edition Volume I CRC Press Inc.(1992) 77-102 .
21. Gregory Gregoriadis.: Liposome Preparation And Related Techniques Inform Healthcare." Liposome Technology Third Edition Volume I USA ,Inc., 2007 :109-121.
22. Guddarangavvanahally K. Jayaprakasha, Lingamallu Jaganmohan Rao and Sakaria Kunnumpurath K. "Chemical Composition of Volatile Oil from Cinnamomum Zeylanicum Buds." Z. Naturforsch. 57c (2002): 990-93.
23. Holger ,Grohganz et al. "Quantification of Various Phosphatidylcholines in Liposomes by Enzymatic Assay." AAPS Pharm Sci Tech 4 (2003)
24. Yechezkel, Barenholz and Shimon Amsdem, " QC Assays in the Development and Clinical Use of Lipo-based Formulation" Liposome Technology (1992):527-616
25. Susan Gould-Fogerite and Raphale J Mannimo "Preparation of Large Unilamellar Liposome with high entrapment yield by Rotary Dialysis or Agarose Diffusion" Liposome Technology (1992): 67-121
26. Omar Mertin et.al. "Production of Soybean Phosphatidylecholine chitosan nanovesicle by reverse phase evaporation: a step by step study" Chemistry and Physics of Lipids, (2005):19-37
27. Lucia M., Anna M. P. and Francesco B. "Quantitative Determination of Hydrophilic compound entrapment in dipalmitoylphosphatidylcholine liposome by DSC" Int. J. Pharm (1996) 138:191-197

ภาคผนวก (Appendix) ที่ 1

การสกัดสารเลชิตินเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์

การสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่มีส่วนผสมต่าง ๆ กันระหว่าง chloroform และ methanol

Fraction	chloroform	methanol	Rf
1-9	100	0	1=0,5=0
10-15	100	1	10=0,15=0
16-23	100	5	20=0
24-28	100	10	25=0
29-32	80	20	30=0
33-45	75	25	35=0.7,38=0.7
46-58	70	30	45=0.7,50=0.7,0.5 55=0.7,0.5
59-82	65	35	60=0.7,0.5 65=0.7,0.5 70=0.5,75=0.5 80=0.5
83-88	60	40	86=0.5
89-92	55	45	90=0.5
93-105	50	50	100=0,105=0
106-116	45	55	110=0
117-123	40	60	120=0

ปริมาณสารที่ได้จากแต่ละช่วงของตัวทำละลายผสม

Fraction	weight(g)	%
1-79	0.53	35.33
80-100	0.85	56.67
101-123	0.12	8.00

Table study of extraction lecithin from 9:1(chloroform:methanol) as mobile phase

Fraction	Rf
1-20	15=0
21-40	25=0
41-50	40=0.7
61-80	50=0.7
81-100	90=0.5,100=0.5
101-120	110=0,115=0
121-125	120=0,125=0

Table %yield of lecithin from 9:1 as mobile phase

Fraction	weight(g)	%
1-80	1.0400	69.33
81-100	0.0551	3.673
101-125	0.4049	26.99

Table study of extraction lecithin from 4:1(chloroform:methanol) as mobile phase

Fraction	Rf
1-10	5=0
11-20	15=0.7
21-30	25=0.7
31-40	35=0.5
41-50	45=0

Table %yield of lecithin from 4:1 as mobile phase

Fraction	weight(g)	%
1-30	0.9210	61.40
31-40	0.5150	34.33
41-50	0.0640	4.27

ตัวอย่างข้อมูลจากเครื่อง zeta sizer ในการวัดขนาดอนุภาค

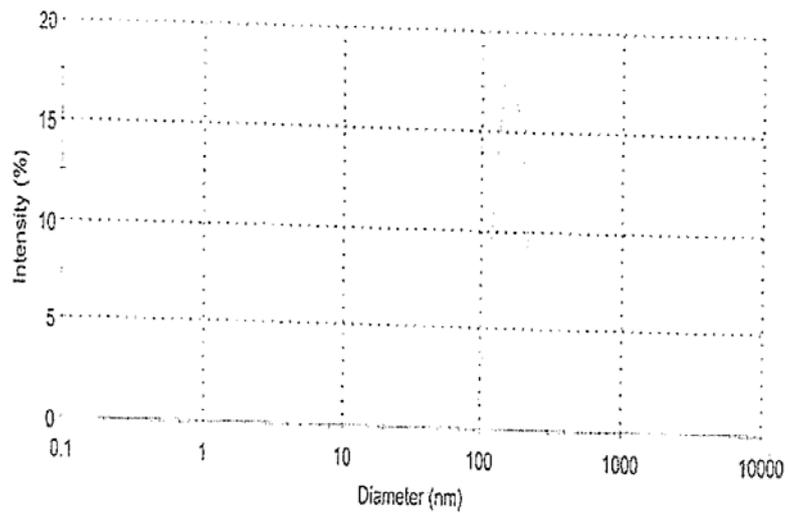
System

Temperature (°C): 25.0 Duration Used (s): 10
 Count Rate (kcps): 147 Measurement Position (mm): 4.65
 Cell Description: Disposable sizing cuvette Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (nm): 204.7	Peak 1: 162	77.59	35.92
PDI: 0.403	Peak 2: 3510	22.41	1202
Intercept: 0.9658	Peak 3: 0	0	0

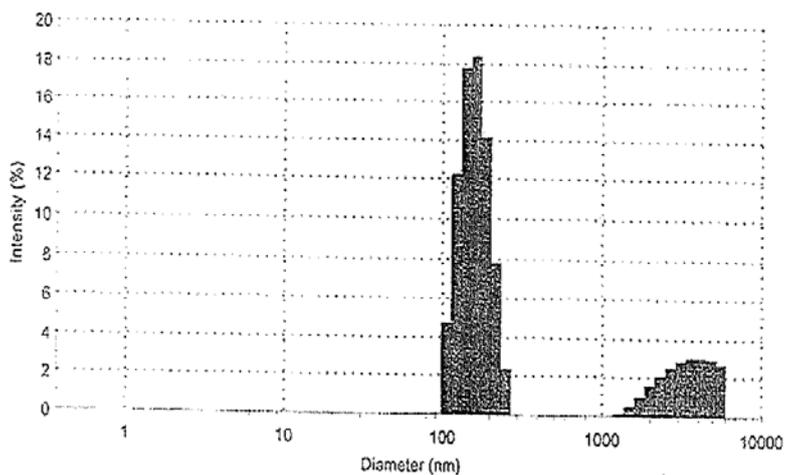
Size Distribution by Intensity



Z-Average (nm): 204.7442 Derived Count Rate (kcps): 146.576248168...
 Standard Deviation: 0 Standard Deviation: 0
 %Std Deviation: 0 %Std Deviation: 0
 Variance: 0 Variance: 0

| Size | Mean | Std Dev |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % Intensity |
0.4	0		5.615	0		78.82	0		1105	0	
0.5365	0		6.500	0		91.28	0		1281	0.1419	
0.6213	0		7.531	0		105.7	4.73		1424	0.5906	
0.7195	0		8.721	0		122.4	12.31		1718	1.013	
0.8332	0		10.1	0		141.8	17.63		1990	1.573	
0.9649	0		11.7	0		164.2	19.36		2305	2.102	
1.117	0		13.54	0		190.1	14.15		2699	2.542	
1.294	0		15.69	0		220.2	7.788		3091	2.849	
1.493	0		18.17	0		255	2.41		3580	3.02	
1.735	0		21.04	0		295.3	0		4145	3.05	
2.01	0		24.36	0		342	5		4801	2.936	
2.328	0		28.21	0		396.1	0		5550	2.673	
2.686	0		32.67	0		459.7	0		6439	0	
3.122	0		37.84	0		531.2	0		7456	0	
3.645	0		43.82	0		615.1	0		8535	0	
4.187	0		50.75	0		712.4	0		1e+004	0	
4.849	0		58.77	0		825	0				
			68.06	0		955.4	0				

Statistics Graph (1 measurements)

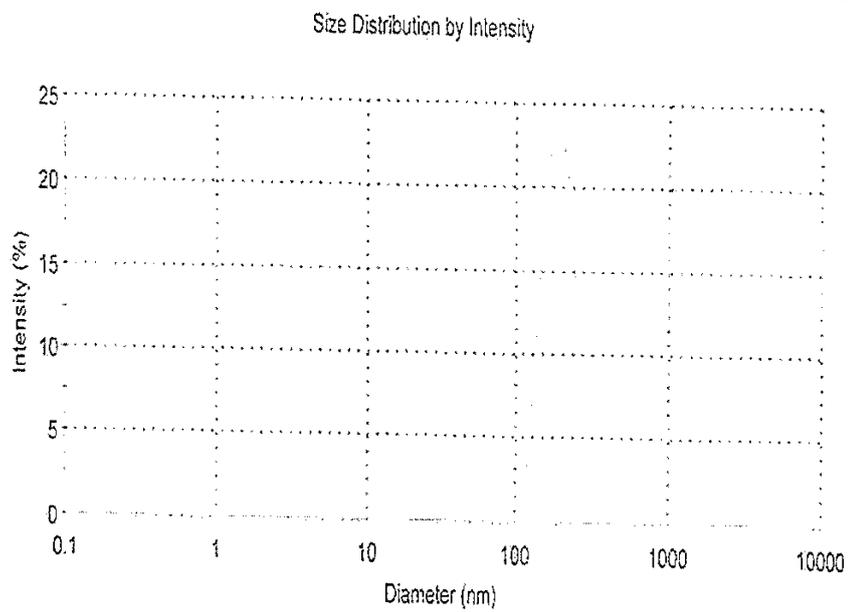


System

Temperature (°C): 25.0 Duration Used (s): 10
Count Rate (kcps): 187 Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette Attenuator: 10

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (nm): 183.9	Peak 1: 189	100	41.06
PDI: 0.044	Peak 2: 0	0	0
Intercept: 0.9735	Peak 3: 0	0	0

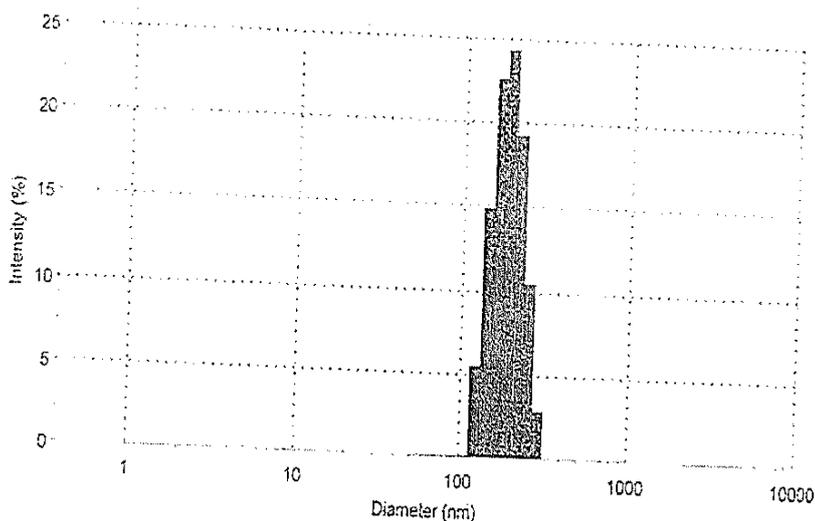


Z-Average (nm): 183.912
 Standard Deviation: 0
 %Std Deviation: 0
 Variance: 0

Derived Count Rate (kcps): 673.793610955...
 Standard Deviation: 0
 %Std Deviation: 0
 Variance: 0

Size	Mean	Std Dev	Size	Mean	Std Dev	Size	Mean	Std Dev	Size	Mean	Std Dev
				% Intensity	% Intensity		% Intensity	% Intensity		% Intensity	% Intensity
0.4	0		5.015	0		78.82	0		1106	0	
0.4532	0		5.563	0		91.28	0		1281	0	
0.5365	0		7.531	0		109.7	0		1494	0	
0.6213	0		8.721	0		122.4	5.46		1718	0	
0.7155	0		10.1	0		141.8	14.59		1900	0	
0.8322	0		11.7	0		164.2	22.52		2305	0	
0.9849	0		13.54	0		190.1	24.33		2869	0	
1.117	0		15.69	0		220.2	19.29		3091	0	
1.284	0		18.17	0		255	10.51		3580	0	
1.489	0		21.04	0		295.3	2.895		4145	0	
1.736	0		24.36	0		342	0		4801	0	
2.01	0		28.21	0		396.1	0		5528	0	
2.328	0		32.67	0		457.7	0		6409	0	
2.696	0		37.84	0		521.2	0		7456	0	
3.122	0		43.82	0		615.1	0		8635	0	
3.615	0		50.75	0		712.4	0		10000	0	
4.187	0		58.77	0		825	0				
4.849	0		69.05	0		955.4	0				

Statistics Graph (1 measurements)



ภาคผนวก (Appendix) ที่ 3

ข้อมูลการหาฟอสฟอรัสโดยวิธี Barrett's

Quality control of lecithin

Bartlett assay data

$$Y = 3.144 X + 0.0201 \quad (R^2 = 0.9968)$$

Y is absorbance at wavelength 800 nm

X is concentration of inorganic phosphorus (μ mol/ml)

	Abs1	Abs2	Abs3	Av	sd	Av(abs)- Av(blank)
Blank	0.024	0.031	0.026	0.027	0.004	
Standard 0.064	0.249	0.238	0.242	0.243	0.006	0.216
0.096	0.325	0.338	0.381	0.348	0.029	0.321
0.128	0.432	0.462	0.421	0.438	0.021	0.411
0.160	0.584	0.564	0.562	0.57	0.012	0.543
0.192	0.643	0.654	0.684	0.660	0.021	0.633
0.224	0.754	0.746	0.768	0.756	0.011	0.729
0.256	0.843	0.835	0.831	0.836	0.006	0.809

	Sample 1							Sample 2						
	Abs	Abs-Blank	Conc ($\mu\text{mol/n.l}$)	Conc (mol/ml)	g	mg	% w/w (mg/mg)	Abs	Abs-Blank	Conc ($\mu\text{mol/ml}$)	Conc (mol/ml)	g	mg	% w/w (mg/mg)
Blank	0.027													
HPC	0.335	0.308	0.091571247	9.15712E-08	0.00065	0.65	65.0	0.342	0.342	0.102385491	1.02385E-07	0.00073	0.73	73.0
CPC	0.196	0.169	0.047360151	4.73601E-08	0.00034	0.34	34.0	0.204	0.204	0.058492361	5.84924E-08	0.00042	0.42	42.0
PPC	0.334	0.307	0.091253181	9.12532E-08	0.00065	0.65	65.0	0.338	0.338	0.10111323	1.01113E-07	0.00072	0.72	72.0

Sample 3										sd
	Abs	Abs-Blank	Conc ($\mu\text{mol/r.l}$)	Conc (mol/ml)	g	mg	% w/w (mg/mg)	Av % w/w (mg/mg)		
Blank										
HPC	0.320	0.320	0.095388341	9.53880E-08	0.00068	0.68	68.0	68.67	3.90	
CPC	0.201	0.201	0.057538168	5.75382E-08	0.00041	0.41	41.0	39.00	4.38	
PPC	0.341	0.341	0.102067430	1.02067E-07	0.00073	0.73	73.0	70.00	4.25	

ภาคผนวก (Appendix) ที่ 4

ข้อมูลการหาปริมาณ eugenol ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน และในไลโปโซม

Clove 5 $\mu\text{l/ml}$. = clove 10 μl + stock menthol 1 ml + hexane 990 μl Clove 10 $\mu\text{l/ml}$ = clove 20 μl + stock menthol 1 ml + hexane 980 μl

$$Y = 0.5935 X + 0.0228 \quad (R^2 = 0.9944)$$

Y is area ratio between eugenol are menthol , X is concentration of eugenol ($\mu\text{l/ml}$)

	clove 5 $\mu\text{l/ml}$					clove 10 $\mu\text{l/ml}$				
	area of menthol	area of eugenol	area ratio	eugenol ($\mu\text{l/ml}$)	% eugenol ($\mu\text{l}/100\text{ml}$)	area of menthol	area of eugenol	area ratio	eugenol ($\mu\text{l/ml}$)	% eugenol ($\mu\text{l}/100\text{ml}$)
area 1	16626	12276	0.73836	1.20566	24.11	16410	24233	1.47672	2.44974	24.50
area 2	16627	12277	0.73838	1.20569	24.11	16404	24236	1.47745	2.45096	24.51
area 3	16632	12280	0.73834	1.20562	24.11	16409	24229	1.47657	2.44948	24.49
area 4	16633	12286	0.73865	1.20615	24.12	16411	24228	1.47633	2.44908	24.49
area 5	16629	12284	0.73871	1.20625	24.13	16409	24234	1.47687	2.45000	24.50
area 6	16628	12280	0.73851	1.20592	24.12	16412	24230	1.47636	2.44913	24.50
area 7	16630	12284	0.73867	1.20618	24.12	16405	24228	1.47687	2.45000	24.50
area 8	16626	12278	0.73848	1.20587	24.12	16407	24228	1.47669	2.44968	24.50
area 9	16627	12278	0.73844	1.20579	24.12	16414	24240	1.47679	2.44985	24.50
Av %eu	24.12					24.50				
sd	0.005					0.006				
%rsd	0.020					0.023				

PPC																			
	Sample						Blank						Control						
	area of menthol	area of eugenol	area ratio	eugenol (µl/ml)	% eugenol (µl/100ml)	% content	area of menthol	area of eugenol	area ratio	eugenol (µl/ml)	area of menthol	area of eugenol	area ratio	eugenol (µl/ml)	area of menthol	area of eugenol	area ratio	eugenol (µl/ml)	% eugenol (µl/100ml)
area 1	16381	24167	1.47531	2.44685	24.47	99.41	15749	0	0	0	16377	24169	1.47579	2.44767					
area 2	16376	24147	1.47454	2.44555	24.46	99.89	15739	0	0	0	16357	24164	1.47729	2.45019					
area 3	16380	24150	1.47436	2.44526	24.45	99.88	15733	0	0	0	16431	24242	1.47538	2.44698					
area 4	16388	24158	1.47413	2.44487	24.45	99.86													
area 5	16419	24152	1.47098	2.43956	24.40	99.64													
area 6	16424	24156	1.47077	2.43922	24.39	99.63													
area 7	16386	24163	1.47461	2.44568	24.46	99.89													
area 8	16413	24158	1.47188	2.44108	24.41	99.71													
area 9	16434	24159	1.47006	2.43802	24.38	99.58													
Av	2.442898			2.44290	24.43	99.78					2.448278			2.44828					24.48
sd	0.003386			0.003	0.03	0.14					0.001691			0.002					
% rsd	0.138597			0.14	0.14	0.14					0.069081			0.07					

ภาคผนวก (Appendix) ที่ 5

ข้อมูลการวาดกราฟมาตรฐานของ eugenol

Quality control of clove oil

Stock standard menthol solution = 2.5 mg/ml

Stock standard eugenol solution = 100 μ l/ml

Stock standard eugenol (μ l)	Stock standard menthol (ml)	Hexane (μ l)	Final conc. of eugenol and menthol (μ l/ml + mg/ml)
10	1	990	0.5+1.25
25	1	975	1.25+1.25
40	1	960	2.0+1.25
50	1	950	2.5+1.25
60	1	940	3.0+1.25
75	1	925	3.75+1.25
90	1	910	4.5+1.25

conc. ($\mu\text{l/ml}$)	area 1			area 2			area 3			area 4		
	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio
0.5	15736	3979	0.25286	15735	3980	0.25294	15730	3984	0.25327	15737	3980	0.25291
1.25	16121	12055	0.74778	16125	12056	0.74766	16131	12060	0.74763	16119	12047	0.74738
2	15809	19671	1.24429	15823	20011	1.2646	15811	19665	1.24375	15825	20013	1.26464
2.5	15865	25092	1.58160	15861	25654	1.61743	15861	25086	1.58162	15871	25656	1.61653
3	15854	29672	1.87158	15838	29222	1.84506	15855	29670	1.87133	15843	29232	1.84511
3.75	16113	35342	2.19338	16071	35051	2.18101	16120	35347	2.19274	16082	35061	2.18014
4.5	16201	43013	2.65496	16276	43053	2.64518	16204	43022	2.65502	16265	43011	2.64685

Conc. (μ l/ml)	area 5			area 6			area 7			area 8		
	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio
0.5	15736	3979	0.25286	15735	3984	0.25319	15730	3977	0.25283	15745	3983	0.25297
1.25	16127	12065	0.74812	16133	12060	0.74754	16142	12054	0.74675	16127	12062	0.74794
2	15814	19667	1.24364	15827	20015	1.26461	15832	19654	1.24141	15815	20013	1.26544
2.5	15869	25076	1.58019	15864	25073	1.58050	15872	25096	1.58115	15876	25665	1.61659
3	15851	29673	1.87200	15835	29633	1.87136	15857	29673	1.87129	15854	29241	1.84439
3.75	16118	35344	2.19283	16079	35066	2.18086	16115	35354	2.19386	16065	35054	2.18201
4.5	16207	43011	2.65385	16274	43013	2.64305	16211	43017	2.65357	16269	43049	2.64608

conc. ($\mu\text{l/ml}$)	area 9			Av	sd	% RSD
	area of menthol	area of eugenol	area ratio			
0.5	15737	3973	0.25246	0.25292	0.18	0.09
1.25	16126	12055	0.74755	0.74759	0.53	0.05
2	15823	19656	1.24224	1.25275	0.88	0.92
2.5	15865	25074	1.58046	1.59289	1.11	1.13
3	15853	29683	1.87239	1.86272	1.31	0.72
3.75	16115	35347	2.19342	2.18781	1.54	0.30
4.5	16211	43023	2.65394	2.65028	1.87	0.18

ข้อมูล ค่า accuracy และ precision ในการศึกษา

Eugenol in 5 $\mu\text{l/ml}$ clove oil was 24.12% ($\mu\text{l/ml}$)

Eugenol in 10 $\mu\text{l/ml}$ clove oil was 24.50% ($\mu\text{l/ml}$)

Cloveoil ($\mu\text{l/ml}$)	Clove oil in water		Clove oil in liposome	
	% eugenol	%recovery	% eugenol	%recovery
2.5	23.91	-	23.92	-
5	23.93	99.26	24.10	98.50
10	24.47	99.87	24.45	99.83

ข้อมูล ค่า accuracy และ precision ในการศึกษา

Clove oil ($\mu\text{l/ml}$)	Clove oil in water		Clove oil in liposome	
	% eugenol	%recovery	% eugenol	%recovery
2.5	42.47	96.71	43.45	98.95
5	33.62	99.08	34.21	100.83
10	29.44	99.91	29.20	99.09

conc. ($\mu\text{l/ml}$)	area 3			area 4			area 5			area 6		
	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio
0.5	15729	3980	0.25304	15735	3977	0.25275	15734	3977.2	0.25278	15732	3981	0.25305
1.25	16133	12060	0.74754	16123	12049	0.74732	16123	12057	0.74781	16127	12055	0.74750
2	15810	19670	1.24415	15823	20009	1.26455	15808	19666	1.24405	15820	20010	1.26485
2.5	15865	25090	1.58147	15870	25653	1.61645	15862	25086	1.58151	15863	25077	1.58085
3	15858	29673	1.87117	15839	29230	1.84544	15856	29670	1.87122	15840	29630	1.87058
3.75	16118	35350	2.19320	16078	35059	2.18056	16115	35348	2.19348	16077	35056	2.18051
4.5	16210	43020	2.65392	16269	43053	2.64632	16206	43009	2.65389	16277	43019	2.64293

ภาคผนวก (Appendix) ที่ 6

ข้อมูลของ eugenol ในการศึกษาความคงตัว

conc. ($\mu\text{l/ml}$)	area 1			area 2		
	area of menthol	area of eugenol	area ratio	area of menthol	area of eugenol	area ratio
0.5	15734	3977.2	0.25278	15733	3978.7	0.25289
1.25	16123	12057	0.74781	16125	12053	0.74747
2	15808	19666	1.24405	15818	20003	1.26457
2.5	15862	25086	1.58152	15865	25651	1.61683
3	15856	29670	1.87121	15836	29226	1.84554
3.75	16115	35348	2.19348	16075	35053	2.18059
4.5	16206	43009	2.65389	16274	43051	2.64538

ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) สมลักษณ์ คงเมือง
(ภาษาอังกฤษ) SOMLAK KONGMUANG
2. สถานที่ทำงาน ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
จังหวัด นครปฐม รหัสไปรษณีย์ 73000
โทรศัพท์ (034) 255800 โทรสาร (034) 255801
E-mail somlak@su.ac.th
3. ประวัติการศึกษา
 - 3.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา เภสัชศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2531
 - 3.2 ปริญญาโท สาขาวิชา เภสัชอุตสาหกรรม สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2534
 - 3.3 ปริญญาเอก สาขาวิชา Pharmaceutics สถาบัน Purdue University, USA
ปีที่จบ พ.ศ. 2542
4. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ
Pharmaceutical technology , Cosmeticology , Nanotechnology
5. ผลงานทางวิชาการ

Research and review articles

1. Kongmuang, S. Hydrotropic Solubilization of Riboflavin by Urea, Nicotinamide and Nicotinamide Analogues in Aqueous and Non-aqueous systems. *Thai J. Pharm Sci.* vol 26 (1-2), 2002 , p. 68
2. Kongmuang, S. and Piyapolriungroj, Effect of Solubilizer for Riboflavin on Caco-2 Cell monolayer Morphology, *Thai J. Pharm. Sci.* vol 26 (supplement), 2002 ,p. 53
3. Kongmuang, S. Tumor and Some Aspects of Its Curatives, *Silpakorn University Journal*, Vol 21, 2001 ,p.186
4. Kongmuang, S. Mechanism of increasing dissolution by solid dispersion technique. *Thai. J. Pharm. Sci.* vol 16 ,1991 p.1

Abstracts and Conference Proceedings

1. Pombua R., Panyapotasarnkul S., Thongsadayu S., Chomto P., Kongmuang S. Factor Affecting Maillard Reaction on Partial Parenteral Nutrition and Compatibility with Hydrocortisone sodium

succinate, Proceeding in The Future of Nutrition Support and Cooperation Among the Asian Regions, Pattaya Oct 2004, p195

2. Thipvichai S. , Paechamad T and Kongmuang S. Physical Properties and Effectiveness of Chitosan in Mouth-Wash Preparation , Proceeding in National Science Meeting, Bangkok Oct, 2004
3. Toprasri P., Kongmuang S., Sotanaphun U., Phaechamud T. The Physical Properties and Release of Curcuminoids from Chitosan Facial Mask, Proceeding in 8th Pacific Polymer Conference, Bangkok Nov 2003, p.103

หนังสือ

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาตำรับยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ , เรื่อง หลักการเลือกใช้พอลิเมอร์ในการตั้งตำรับ เจลและไฮโดรเจล, พฤษจิกายน

ประวัติ

2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) อุทัย โสธนะพันธุ์

(ภาษาอังกฤษ) UTHAI SOTANAPHUN

2. สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

จังหวัด นครปฐม

รหัสไปรษณีย์ 73000

โทรศัพท์ (034) 255800

โทรสาร (034) 255801

E-mail uthai@kanate.su.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

3.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา เภสัชศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2531

3.2 ปริญญาโท สาขาวิชา เภสัชพฤกษศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2533

3.4 ปริญญาเอก สาขาวิชา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2540

4. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

เภสัชเวท เคมีของพืชสมุนไพร

6. ผลงานทางวิชาการ

Research and review articles

1. **Sotanaphun, U.**, Lipipun, V., Yaipakdee, P. and Bavovada, R. (2005) New acidic-rearranged compounds from tingenone derivatives and their biological activity. *Pharmaceutical Biology* 43, 1-8. (in press).
2. **Sotanaphun, U.**, Lipipun, V. and Bavovada, R. (2004). Constituents of the pericarp of *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Fitoterapia* 75, 606-608.
3. SripHong, L., **Sotanaphun, U.**, Limsirichaikul, S., Wetwitayaklung, P., Chaichantipyuth, C. and Pummangura, S. (2003). Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. *Planta Medica* 69, 1054-1056.
4. Poobrasert, O and **Sothanaphun, U.** (2002). Bioactive constituents from the stem of *Euphorbia heterophylla* Linn. *Silpakorn University International Journal* 2, 123-132.

5. **Sotanaphun, U., Suttisri, R., Lipipun, V. and Bavovada, R. (2000).** A new 3,4-*seco*-ursane triterpenoid from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Chem. Pharm. Bull.* 48(9), 1347-1349.
6. **Sotanaphun, U., Lipipun, V., Suttisri, R and Bavovada, R. (1999).** A new antiviral and antimicrobial sesquiterpene from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Planta Medica* 65(3), 257-258.
7. **Sotanaphun, U., Lipipun, V., Suttisri, R and Bavovada, R. (1999).** Antimicrobial activity and stability of tingenone derivatives. *Planta Medica* 65(5), 450-452.
8. **Sotanaphun, U., Suttisri, R., Lipipun, V. and Bavovada, R. (1998).** Quinone-methide triterpenoids from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Phytochemistry* 49 (6), 1749-1755.
9. **อุทัย โสธนะพันธ์ และ รพีพล ภโวภาว** Supercritical Fluids ตอนที่ 1 : หลักการเบื้องต้น *Journal of STREC* 3(1), 37-50, 1993.
10. **อุทัย โสธนะพันธ์ และ รพีพล ภโวภาว** Supercritical Fluids ตอนที่ 2 : Supercritical fluid extraction. *Journal of STREC* 3(1), 51-63, 1993

Abstracts and Conference Proceedings

1. ประพนอม เดชวิศิษฐ์สกุล ไพริน ทองคุ้ม และอุทัย โสธนะพันธ์ (3-4 พฤษภาคม 2547) เอกถำกษณ์ทางกล้ำองจุลทรรศน์ของขม้นอ้อยและ *Curcuma zedoria* (Berg.) Roscoe สาธารณสุขไทยในยุคเป็ดเสรีทางการค้า โรงแรมเดอะแอมบาสเตอร์ กรุงเทพฯ หน้า 71
2. **Sotanaphun, U.** (1-7 Mar 2004). Natural antioxidants. *The 3rd IPSF-Asia Pacific Pharmaceutical Symposium: Pharmacy: Tradition and innovation.* Silpakorn University, Thailand, p.14.
3. Sukwattanasinit, T. and **Sotanaphun, U.** (2-4 Dec. 2003). Effect of solvent on extractive yield, total anthocyanin content and antioxidation of the extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *The six JSPS-NRCT joint seminar : Recent advances in natural medicine research.* Bangkok, Thailand, p.226.
4. Kajtna, D., Brantner, A.H. and **Sotanaphun, U.** (2-4 Dec. 2003). Effect of ethanolic strength on the extraction of *Clinacanthus nutans* leaf. *The six JSPS-NRCT joint seminar : Recent advances in natural medicine research.* Bangkok, Thailand. p.225.
5. Toprasri, P., Kongmuang, S., **Sotanaphun, U.** and Phaechamud, T. The physical properties and release of curcuminoids from chitosan facial mask. (24-27 Nov. 2003). 8th *Pacific polymer conference (PPC8).* Bangkok, Thailand, p.103.

6. Poobrasert, O and **Sothanaphun, U.** (3-7 Feb. 2003). Phytochemical study of *Euphorbia heterophylla* Linn. The 3rd world congress on medicinal and aromatic plants for human welfare (WOCMAPIII). Chiang Mai, Thailand, p.346.
7. Ngamkham, J., Ondee, S., **Sotanaphun, U.**, Sittisombut, C. and Picha, P. (18-21 Nov. 2001). Cytotoxicity of leaf extracts of Plu, *Piper betle* on cultured mammalian neoplastic cells. 16th Asian-Pacific cancer congress 2001. Manila, Philippine, p.109.
8. **Sotanaphun, U.**, Lipipun, V. and Bavovada, R. (20-23 Oct. 2001). Phenolic-(9→8)-D:A-friedo-24-noroleananes : A new class of antiviral agents. *Pharma Indochina II*. Hanoi, Vietnam, pp.556-558.
9. Bavovada, R., Chavalittumrong, P., Pingsuthiwong, C., **Sotanaphun, U.**, Sukhakul, T., Thongphasuk, P. and Thanakijcharoenpath, W. (15-17 Nov. 2000). Chemical and ethnobotanical in vestigation of Thai *Strychnos* species. *NRCT-JSPS core university system on pharmaceutical sciences. The fifth joint seminar : Natural medicines*. Bangkok, Thailand, p.32-42.
10. Sripong, L., **Sotanaphun, U.**, Vajvittayaklung, P. and Limsirichaikul, S. (7-11 May 2000). The alkaloids from the flower of *Cassia spectabilis* D.C. and their cytotoxic activity. *The symposium of young scientists of the European Phytochemistry Society : Future trends in phytochemistry*. Rolduc, Natherlands.
11. **Sotanaphun, U.**, Suttisri, R., Lipipun, V. and Bavovada, R. (28-30 Oct. 1997). Triterpene from the stem bark of *Glyptopetalum sclerocarpum* Laws. *International symposium on natural medicines*. Kyoto, Japan, p.312.
12. **Sotanaphun, U.**, Lipipun, V., Suttisri, R and Bavovada, R. (27-29 Nov. 1996). A novel bioactive sesquiterpene from *Glyptopetalum sclerocarpum* Laws. *NRCT-JSPS core university system on pharmaceutical sciences. The third joint seminar : Current advances in natural product research*. Bangkok, Thailand.

หนังสือ

1. อูทัย โสธนะพันธุ์ สินธพ โคมยา วันดี ญาณไพศาล และนุชนาฏ กิจเจริญ เกสัชพฤกษ์
บพิตรการพิมพ์ กรุงเทพฯ 2544

ประวัติ

3. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) มาลัย สติรพันธุ์
(ภาษาอังกฤษ) MALAI SATIRAPHAN
2. สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
จังหวัด นครปฐม รหัสไปรษณีย์ 73000
โทรศัพท์ (034) 255800 โทรสาร (034) 255801
E-mail malai@email.pharm.su.ac.th
3. ประวัติการศึกษา
 - 3.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา เภสัชศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2530
 - 3.2 ปริญญาโท สาขาวิชา เภสัชเคมี สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2536
4. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ
เภสัชเคมี เคมีวิเคราะห์ของสารหอมระเหย และสารอินทรีย์
7. ผลงานทางวิชาการ
Research and review articles
 1. อรุมา ภูประเสริฐ และคณะ การวิเคราะห์หาสเตียรอยด์ในตัวอย่างยาแผนโบราณที่ส่งมารับบริการจากภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2542. **วารสารเภสัชนิพนธ์** ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 พฤษภาคม-สิงหาคม 2545 หน้า 7-15
 2. ร.ต.อ.หญิง มาลัย สติรพันธุ์ (2544) การเกิดออกซิเดชันของแอลดีแอลและพยาธิสภาพของโรคหลอดเลือดแข็ง **วารสารมหาวิทยาลัยศิลปากร** ปีที่ 21 ฉบับพิเศษ คณะเภสัชศาสตร์ พ.ศ.2544 หน้า 144/157
 3. ร.ต.อ.หญิง มาลัย สติรพันธุ์ (2542) อาหารเสริมสุขภาพ **เภสัชกรรมเพื่อสังคม** โครงการหนังสือเพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวเนื่องในโอกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 6 รอบ 5 ธันวาคม 2542 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร หน้า 121-131

4. ร.ต.อ. หญิง มาลัย สติรพันธุ์ ปวดหลังในโรคแองไคโลสซิงสปอนด์ไลทิส(Ankylosing spondylitis)
วารสารไภสัชนิพนธ์ คณะเภสัชศาสตร์ พ.ศ. 2546 (อยู่ในระหว่างการพิจารณา)

หนังสือ

1. ร.ต.อ.หญิง มาลัย สติรพันธุ์ (2543) การไทเทรตกรด-ด่างในตัวอย่างไตไม่ใช้น้ำ *การควบคุมคุณภาพมาตรฐานยา 1* ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร หน้า 297-316
2. ร.ต.อ.หญิง มาลัย สติรพันธุ์ (2543) การไทเทรตโดยอาศัยหลักการการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน *การควบคุมคุณภาพมาตรฐานยา 1* ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร หน้า 317-368
3. ร.ต.อ.หญิง มาลัย สติรพันธุ์ (2543) การไทเทรตโดยอาศัยหลักการการทำให้เกิดตะกอน *การควบคุมคุณภาพมาตรฐานยา 1* ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร หน้า 369-402 (รายละเอียดตามเอกสารดั่งแนบชุดที่ 8)