

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากมะขามป้อมมีฤทธิ์คล้าย juvenile hormone สามารถรักษาได้เช่น ยับยั้งความเป็นพิษต่อตับ ยับยั้งความเป็นพิษต่อไต ยับยั้งหัวใจโต ยับยั้งภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ยับยั้งหลอดเลือดอุดตัน ยับยั้งระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูง ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ยับยั้งระดับน้ำตาลในเลือดสูง ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดไขมันในเลือด เป็นพิษต่อปลา หม่าหอย หม่าไส้เดือน ลดความดันโลหิต ยับยั้งพิษ ลดการอักเสบ แก้กษัย แก้ไข้ แก้หวัด กระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน เพิ่มน้ำหนักตัว ด้านฮีสตามีน ขับเสมหะ ยับยั้งหดเกร็งของลำไส้ ลดกรดในกระเพาะอาหาร รักษาแผลในกระเพาะอาหาร ยับยั้งการเกาะของตัวอ่อนที่ผนังมดลูก ยับยั้ง complement alternative pathway และ complement classical pathway ยับยั้งการเกิด N-nitrosomorpholine และ N-nitrosoproline ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ ยับยั้งความผิดปกติของโครโมโซม ยับยั้ง sister chromatid exchange ทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ต้านมะเร็ง เพิ่ม natural killer cell ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ leukocyte กระตุ้นการเรียนรู้ ปรับปรุงความทรงจำ และยับยั้งเอนไซม์ polygalacturonase ที่ทำให้เกิดการชัก

ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม Khopde และคณะ(2001) ได้รายงานว่าสารสกัดในชั้นน้ำของผลมะขามป้อมสด สามารถยับยั้ง lipid peroxidation (LPO) ใน microsomes และเอนไซม์ superoxide dismutase ใน mitochondria ของตับหนู ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสีแกมมาได้ ในการศึกษาภายนอกพบว่ามี hydrolysable tannins ในมะขามป้อม คือ emblicanin A และ B สามารถยับยั้งการเกิด peripheral blood erythrocyte haemolysis ในหนูที่ถูกกระตุ้นโดยอนุมูลอิสระ oxygen (Ghosal *et al.*, 1996). ในปี ค.ศ. 1990 Bhattacharya และคณะ รายงานว่าเมื่อนิ้ดสารสกัดมะขามป้อมเข้าในช่องท้องของหนู เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase ในสมองมีปริมาณมากขึ้น สารสกัดมะขามป้อมใน 75% methanol สามารถยับยั้ง lipid peroxidation ที่ถูกกระตุ้นโดย Fe^{2+} /ascorbate (EC_{50} 74.0 ± 5.8 $\mu g/ml$) และสามารถทำลายอนุมูลอิสระ hydroxyl (EC_{50} 155.0 ± 8.1 $\mu g/ml$) and อนุมูลอิสระ superoxide (EC_{50} 6.5 ± 1.5 $\mu g/ml$) (Sabu and Kuttan, 2002). สารสกัดในชั้น ethyl acetate extract และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 5 ชนิด คือ gallic acid, methyl gallate, corilagin, furosin และ geraniin มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $NO^{\cdot}$ ได้ดีในการศึกษาภายนอก ซึ่งจะมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดในชั้นน้ำ และ hexane (Kumaran and Karunakaran, 2006). Bandyopadhyay และคณะ (2000) พบว่า butanolic extract ของมะขามป้อม มีฤทธิ์ cytoprotective ต่อ รอยแผลบริเวณผนังกระเพาะอาหารของหนูที่ถูกกระตุ้นโดยยาอินโดเมทาซิน โดยไปเพิ่มการผลิต hexosamine and gastric mucus นอกจากนี้ยังไปทำให้ระดับของ malonaldehyde ลดลง Emblicanin-A และ emblicanin-B ในน้ำมะขามป้อมสด มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน fresh emblica juice ต่อ ischemia-reperfusion injury (IRI) ในหัวใจหนูที่ถูกกระตุ้นสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

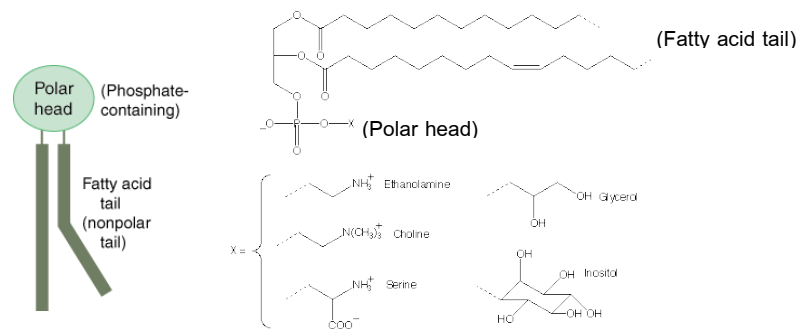
(Bhattacharya *et al.*, 2002). นอกจากนี้ยังพบว่า ascorbic acid ที่มีในสารสกัดจากผลของมะขามป้อม มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบโดยการทดสอบด้วย DPPH and ABTS (Scartezzini *et al.*, 2006) Kumar *et al.*, (2006) ยังได้รายงานฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารฟีนอลิก ในสารสกัดจากผลของมะขามป้อม ทั้งในรูปอิสระและรูปที่รวมตัวกับสารอื่น เมื่อทดสอบโดยวิธี DPPH

ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากมะขามป้อม มีรายงานว่าไม่พบความเป็นพิษของสารสกัดผลด้วย 50% เอทานอลและไม่พบพิษถึงเฉียบพลันของสารสกัดใบด้วยน้ำ (Mokkhasmit *et al.*, 1971; Itthipanichpong *et al.*, 1987) จะเห็นได้ว่ามะขามป้อมเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงที่อาจนำมาพัฒนาเป็นเครื่องสำอางได้โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เพื่อชะลอความแก่

2.2 ลิโปโซมในทางเครื่องสำอาง (Liposomes in Cosmetics)

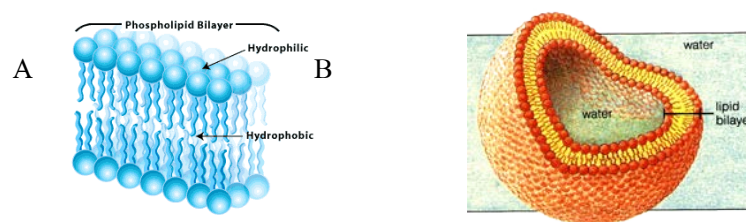
ลิโปโซม (liposome) เป็นเทคโนโลยีที่ได้ถูกค้นพบมานานกว่า 40 แล้ว แต่ปัจจุบันก็ยังได้รับความสนใจและถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในทางเวชสำอาง ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นตัวนำส่งสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนัง เนื่องจากลิโปโซมมีข้อดีหลายประการ กล่าวคือสามารถเก็บกักสารต่างๆ ไว้ได้ทั้งชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ สามารถควบคุมการปล่อยปล่อยสารที่เก็บกักไว้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และที่สำคัญคือสามารถเข้ากับร่างกายได้ดี และไม่มีพิษ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบลิโปโซมกำลังได้รับความสนใจมากในปัจจุบันโดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงการเครื่องสำอาง โดยจะเห็นได้จากจำนวนผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเวชสำอางในรูปแบบลิโปโซมที่มีออกมาจำหน่ายในตลาดจำนวนมาก ต่างกับกรณีของผลิตภัณฑ์ยาซึ่งยังมีผลิตภัณฑ์ในรูปแบบลิโปโซมไม่มากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางนั้นสามารถทำได้ง่ายรวดเร็ว อีกทั้งมีกฎเกณฑ์และข้อควรระวังต่างๆ น้อยกว่าในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยา นอกจากนี้การนำเทคโนโลยีลิโปโซมมาใช้ยังสามารถใช้เป็นจุดขายและเพิ่มมูลค่าให้กับตัวผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้เป็นอย่างดี

โดยคำจำกัดความ ลิโปโซม (liposome or lipid vesicle) หมายถึง อนุภาค หรือ ถุงทรงกลม (vesicles) ขนาดเล็กของสารไขมันที่กระจายตัวอยู่ในน้ำ มีคุณสมบัติเป็นสารละลายคอลลอยด์ (colloids) สารไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของลิโปโซมจะเป็นสารไขมันประเภทฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ซึ่งเป็นสารไขมันที่มีขั้ว (polar lipid) ดังแสดงใน รูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 โครงสร้างโมเลกุลของสารฟอสโฟลิปิด
(ที่มา: <http://www.sparknote.com>)

โมเลกุลของสารฟอสโฟลิปิด ประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งเป็นสายไฮโดรคาร์บอน 2 สายที่ได้จากกรดไขมัน เช่น palmitic acid และ กลุ่มที่มีขั้ว (x) ชนิดต่างๆ เช่น choline หรือ serine เป็นต้น ซึ่งเชื่อมต่อกับ phosphate group ทำให้โมเลกุลของสารฟอสโฟลิปิดมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในโมเลกุลเดียวกัน เรียกสารลักษณะนี้โดยทั่วไปว่า amphiphile ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสารลดแรงตึงผิวโดยทั่วไป เมื่อสารฟอสโฟลิปิดมีการกระจายตัวในน้ำ โมเลกุลของมันจะมีการจัดเรียงตัวเป็นแถวซ้อนกัน 2 ชั้น เรียกว่า ชั้นโมเลกุลคู่ (bilayer) โดยจะหันเอาส่วนของสายไฮโดรคาร์บอนซึ่งไม่มีขั้วเก็บไว้ข้างในและหันเอาส่วนที่มีขั้วออกสู่ภายนอก ดังแสดงในรูปที่ 1.3 (A)



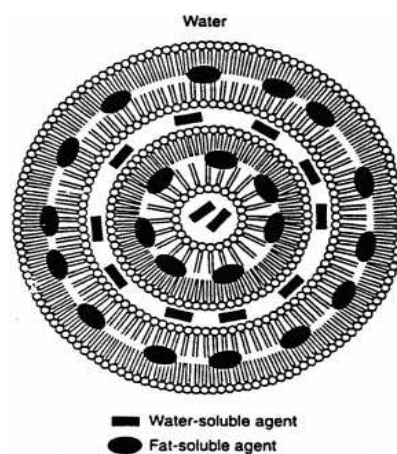
รูปที่ 1.3 ลักษณะของ Lipid bilayer (A) และลิโปโซม (B)

(ที่มา: <http://www.biotech.ubc.ca> และ <http://www.academic.brooklyn.cuny.edu>)

แผ่นของชั้นโมเลกุลที่เกิดขึ้นจะเกิดการม้วนตัวและผสานกันเป็นทรงกลม ห่อหุ้มส่วนของวัฏภาคน้ำไว้ภายในเพื่อลดพื้นที่ให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโมเลกุลฟอสโฟลิปิดสัมผัสกับวัฏภาคน้ำน้อยที่สุด

เกิดเป็นลิโปโซมขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1.3 (B) ลิโปโซมอาจมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรจนถึงระดับไมครอน ขึ้นกับชนิดของลิโปโซม

ลิโปโซมสามารถเก็บกักด้วยยาหรือสารสำคัญไว้ภายในได้หลายชนิดทั้งชนิดที่ละลายน้ำและละลายในไขมัน การเก็บกักสารจะเกิดขึ้นในกระบวนการก่อรูปเป็นลิโปโซม ดังนั้นอาจเติมด้วยยาหรือสารสำคัญจึงลงไปในวัตถุน้ำหรือสารละลายอินทรีย์ได้ในขั้นตอนการเตรียมลิโปโซม สารที่มีขั้วหรือมีประจุซึ่งละลายอยู่ในวัตถุน้ำจะถูกห่อหุ้มไว้ภายในลิโปโซม ซึ่งนอกจากสารจะถูกกักไว้ในภายในลิโปโซมแล้วยังอาจถูกกักไว้ในชั้นน้ำที่แทรกอยู่ระหว่างผนังของลิโปโซมแต่ละชั้นด้วย ส่วนสารที่ไม่ละลายน้ำก็สามารถถูกเก็บไว้ในลิโปโซมได้เช่นกัน โดยจะถูกกักไว้ในผนังของลิโปโซม ในบริเวณของส่วนที่ไม่มีขั้วของชั้นโมเลกุลคู่ ดังแสดงในรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 ตำแหน่งการเก็บกักสารไว้ในลิโปโซม

นอกจากนี้กรณีด้วยยาหรือสารมีคุณสมบัติที่ชอบทั้งน้ำและไขมัน ก็อาจถูกเก็บในลิโปโซมได้โดยแทรกตัวอยู่ในระหว่างโมเลกุลของสารไขมันในชั้นโมเลกุลคู่

ส่วนประกอบ ของลิโปโซม

ลิโปโซมโดยทั่วไปมีส่วนประกอบหลัก 2 ส่วน ได้แก่ สารไขมันประเภทฟอสโฟลิปิด และโคเลสเตอรอล (cholesterol) นอกจากนี้อาจเติมสารอื่นๆ ในตำรับ เช่น สารเพิ่มประจุที่ผิว (surface charge) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บสารของลิโปโซม สารต้านออกซิเดชัน และสารกันเสีย เป็นต้น

ฟอสโฟลิปิด จัดเป็นโครงสร้างหลัก หรือไขมันโครงสร้าง (structural lipid) ของลิโปโซม ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น ตัวอย่างเช่น phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, และ sphingomyelin เป็นต้น โดยอาจได้จากทั้งธรรมชาติและสังเคราะห์ ฟอสโฟลิปิดจากธรรมชาติได้จากไข่แดงและถั่วเหลือง ซึ่งสารที่ได้จากธรรมชาตินี้มักจะมีส่วนประกอบที่เป็นไขมัน

ไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) สูง จึงมักไม่คงตัว ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยทำให้สารไขมันเหล่านี้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น รวมทั้งมีการสารสังเคราะห์ตัวใหม่ๆ มาใช้ในการเตรียมลิโปโซม โดยเฉพาะในทางเครื่องสำอางมากขึ้น นอกจากนี้ ลิโปโซมอาจเตรียมได้จาก สาร amphiphile สังเคราะห์ที่ไม่มีประจุ เช่น polyoxyethylene alkylether ที่มีสายไฮโดรคาร์บอนสายเดี่ยว หรือ saccharose diester ที่มีสายไฮโดรคาร์บอน 2 สาย ลิโปโซมประเภทนี้ จะเรียกชื่อใหม่ว่า niosome

โคเลสเตอรอล เป็นไขมันชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ผสมร่วมกับฟอสโฟลิปิดในการเตรียมลิโปโซม เพื่อให้ลิโปโซมที่ได้มีความคงตัวมากขึ้น โดยจะไปทำให้ลิโปโซมมีความแข็งแรงขึ้น และมีสภาพการเป็นของเหลวลดลง สามารถเก็บกักสารไว้ในลิโปโซมได้นานขึ้นและมีการซึมผ่านของสารจากลิโปโซมหรือการรั่วของสารน้อยลง แต่จะทำให้ลิโปโซมจะมีความยืดหยุ่นลดลง นอกจากโคเลสเตอรอลแล้วอาจใช้อนุพันธ์ของฟอสโฟลิปิดอื่นๆ ลิโปโซมที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิปิดร่วมกับโคเลสเตอรอล จะไม่มีประจุ และเป็นกลางทางไฟฟ้า

สารเพิ่มประจุที่ผิว ได้แก่สาร amphiphile ที่มีประจุในโมเลกุล เช่น stearylamine (ประจุบวก), dicetyl phosphate (ประจุลบ) และ phosphatidic acid (ประจุลบ) สารเหล่านี้เดิมในสูตรตำรับลิโปโซมเพื่อให้ผนังลิโปโซมเกิดประจุขึ้นตามชนิดของสารที่ใช้ การใช้สารเพิ่มประจุที่ผิวจะทำให้ประสิทธิภาพการเก็บกักสารของลิโปโซมสูงขึ้น กล่าวคือ แรงผลักระหว่างประจุจะทำให้ผนังของชั้นโมเลกุลคู่มิระยะห่างระหว่างกันมากขึ้น นั่นคือมีวฏภาคน้ำมาแทรกอยู่ระหว่างชั้นของผนังลิโปโซมมากขึ้น ทำให้ลิโปโซมสามารถเก็บกักด้วยาหรือสารที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการเก็บกักสารไว้ภายในลิโปโซมจะเพิ่มขึ้นได้ ถ้าทำให้ลิโปโซมมีประจุตรงข้ามกับสารที่ต้องการเก็บกักไว้ภายใน

สารต้านออกซิเดชัน สารเหล่านี้จะมีความจำเป็นในป้องกันการสลายตัวของสารไขมัน จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยเฉพาะสารไขมันที่มีปริมาณไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น ไขมันที่ได้จากธรรมชาติ สารต้านออกซิเดชันที่นิยมใช้ได้แก่ วิตามิน E, butyl hydroxy anisole (BHA) และ butyl hydroxyl toluene เป็นต้น

สารกันเสีย มีความจำเป็นโดยเฉพาะลิโปโซมที่จะใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทั้งนี้เนื่องจากสารไขมันที่ได้จากธรรมชาติอาจมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย อีกทั้งสารที่นำมาเก็บกักในลิโปโซมอาจเป็นสารสกัดจากธรรมชาติซึ่งบูดเสียได้

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1 การเตรียมสารสกัดมะขามป้อม

เตรียมสารสกัดมะขามป้อม โดยการนำผลของมะขามป้อมมาแกะเอาส่วนเนื้อนำไปอบแห้งที่ 50°C และบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปแช่ใน 95% ethanol โดยใช้ 3 เท่าของปริมาณเนื้อแห้ง แช่ไว้เป็นเวลา 3 วัน กรองแยกสารสกัดออกมา นำส่วนกากที่เหลือมาแช่ใน ethanol อีกครั้งเป็นเวลา 3 วัน รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมด นำมาระเหยให้แห้งด้วย evaporator จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) จากชั้น ethanol

2 การศึกษาก่อนการตั้งตำรับ (preformulation studies)

2.1 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม โดยวิธี DPPH radical scavenging assay ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Kumar *et al.* (2006)

ก) การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

- สารละลาย DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) ใน ethanol เตรียมทันที ก่อนนำมาใช้ ความเข้มข้น 6×10^{-5} M จำนวน 50 ml โดยชั่ง DPPH 1.2 mg มาละลายและปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท ป้องกันแสง

- สารละลายมาตรฐาน ascorbic acid โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 และ 4.0 $\mu\text{g/ml}$ และใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย (ความเข้มข้นสุดท้าย หลังการเติมสารละลาย DPPH จะเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 $\mu\text{g/ml}$)

- สารละลายตัวอย่าง โดยเตรียม stock solution ของสารละลายมะขามป้อมให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 และ 4.0 $\mu\text{g/ml}$ โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย (ความเข้มข้นสุดท้าย หลังการเติมสารละลาย DPPH จะเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 $\mu\text{g/ml}$)

ข) วิธีการทดสอบ ผสมสารละลายตัวอย่าง 500 μl กับสารละลาย DPPH 500 μl ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm แต่ละความเข้มข้นจะทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (blank ประกอบด้วยสารสกัดมะขามป้อมแต่ละความเข้มข้น 500 μl ผสมกับ absolute ethanol 500 μl) ส่วน control จะประกอบด้วย absolute ethanol 500 μl ผสมกับสารละลาย DPPH 500 μl (ใช้ absolute ethanol เป็น blank ของ control) คำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \left\{ \frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

จากนั้นสร้างกราฟระหว่างค่า % Inhibition กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อคำนวณหาค่า EC_{50} ซึ่งเป็น ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50%

2.2 การ วิเคราะห์ปริมาณของ total phenolic contents ในสารสกัดมะขามป้อม โดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Miliauskas *et al.*, 2004)

ปีเปตสารละลายตัวอย่างมะขาม ป้อมใน ethanol (100 µg/ml) มา 100 µl เติม 2.0 M Folin-Ciocalteu's phenol reagent (เจือจาง 10 เท่า) 500 µl และ sodium carbonate (75g/l) 400 µl ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้ absolute ethanol เป็น blank ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณปริมาณ total phenolic contents โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (gallic acid equivalent; GAE) ตามสมการ

$$C = c \times (V/W)$$

โดยที่ C คือ ปริมาณของ total phenolic contents คิดเป็น GAE (mg/g)
 c คือ ความเข้มข้นของ gallic acid เทียบจาก standard curve ของ gallic acid (µg/ml)
 V คือ ปริมาตรของสารสกัด (ml)
 W คือ น้ำหนักของสารสกัด (mg)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ ascorbic acid และ gallic acid ในสารสกัดมะขามป้อม

วิเคราะห์ปริมาณ ascorbic acid และ gallic acid ในสารสกัดมะขามป้อม โดยใช้เทคนิค HPLC โดยดัดแปลงตามวิธีของ Kumaran and Karunakaran (2006) ใช้ HPLC conditions ดังนี้

Column	:	reverse phase C_{18} column (250x4.6 mm, 5 µm)
Mobile phase	:	0.05% H_3PO_4 : acetonitrile (gradient system)
Flow rate	:	1.0 ml/min
Injection volume	:	10 µl
UV detector	:	220 nm

ปริมาณวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อมนั้น จะคำนวณได้จากกราฟ Calibration curve ของวิตามินซี ซึ่งเตรียมในความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1 และ 0.2 mg/ml

2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total phenolic contents และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม

เตรียมสารละลายมะขามป้อมในความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ คือ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2 $\mu\text{g/ml}$ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic contents ในสารละลายแต่ละความเข้มข้น พร้อมทั้งหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay นำค่าทั้งสองไป plot กราฟเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear correlation)

2.5 การศึกษาความคงตัวของสารสกัดมะขามป้อม (ผลของอุณหภูมิ)

เก็บสารสกัดในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ และ 45°C กำหนดความชื้นสัมพัทธ์ที่ 75 % ทำการประเมินความคงตัวของสารสกัดที่เวลา 0, 7, 15, 21, 28, 35, 69, 90, 120 และ 240 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic contents และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

2.6 ผลของ pH ต่อความคงตัวของสารสกัดมะขามป้อม

เตรียมสารละลายของสารสกัดมะขามป้อม (100 $\mu\text{g/ml}$) ใน buffer pH 5.5 และ 7.0 โดยเก็บสารละลายดังกล่าวไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°C ประเมินความคงตัวของสารสกัดที่เวลา 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 69, 90, 120, 161 และ 240 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic contents และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

3 การเตรียมโปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อม

ศึกษาการเตรียมโปรลิโปโซมสารสกัดมะขามป้อม คัดแปลงตามวิธีของ Ning *et al.* (2005) โดยนำส่วนประกอบของผนังลิโปโซมและสารสกัดมะขามป้อมมาละลายกับ ethanol และใช้ผง sorbitol หรือ mannitol เป็นตัวกลางในการดูดซับสารไขมันและสารสกัด โดยระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้ผงแห้ง หลังจากนั้นนำผงโปรลิโปโซมที่ได้เก็บใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ในการทดลองจะทำการเปลี่ยนแปลงชนิดและส่วนประกอบของผนังลิโปโซมในอัตราส่วนต่างๆ กัน เช่น ชนิดของ phosphatidylcholine ทั้งจาก dried egg yolk (EPC) และ soybean (SPC), cholesterol, non-ionic surfactant และ surface charge agents เป็นต้น รวมทั้งปริมาณไขมัน ความเข้มข้นของสารสกัดมะขามป้อม และปริมาณของ sorbitol ที่ใช้เป็น core material เพื่อให้ได้โปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมที่เหมาะสม กล่าวคือเมื่อละลายเป็นลิโปโซมแล้วจะได้ลิโปโซมที่มีขนาดที่เหมาะสม (100-400 nm) และยังสามารถเก็บกักสารสกัดมะขามป้อมได้ในปริมาณสูงสุด

การเตรียม reconstituted liposome ของสารสกัดมะขามป้อม ทำได้โดยการนำผงโพรลิโปโซม 200 มิลลิกรัมมากระจายตัวในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เกิดเป็น reconstituted liposome นำไปประเมินขั้นต่อไป

4. การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของโพรลิโปโซม

4.1 ลักษณะของผงโพรลิโปโซมภายใต้ SEM (scanning electron micro scopy)

4.2 ขนาดและการกระจายขนาดของ reconstituted liposome โดย particle size analysis

4.3 ประสิทธิภาพการกักเก็บสาร (entrapment efficiency) ประเมินโดยวิธี dialysis technique โดยเปิด reconstituted liposome จำนวน 1 ml ใส่ใน dialysis membrane (molecular weight cut-off 3500 dalton) ซึ่งแช่ในน้ำกลั่นไว้ก่อนแล้ว อย่างน้อย 30 นาที ใช้ medicutหนีบด้านบนและด้านล่างของถุง dialysis ให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ในบีกเกอร์ ที่มีน้ำกลั่น 500 ml หมุนด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่มีอัตราการหมุน 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บสาร ละลายจากภายนอกถุง dialysis ไปวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic contents จากนั้นคำนวณ หา entrapment efficiency (EE) จาก

$$EE (\%) = 100 \times [1 - (\text{free} / \text{total})]$$

โดย free และ total คือ ปริมาณ total phenolic contents ของสารสกัดมะขามป้อมในรูปอิสระ ซึ่งไม่ได้ถูกกักเก็บไว้ในลิโปโซม และ total phenolic contents ทั้งหมดของสารสกัด (ทั้งในรูปอิสระและที่ถูกกักไว้ในลิโปโซม) ตามลำดับ

5. การศึกษาความคงตัวของโพรลิโปโซม

นำผงโพรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อม มาเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C, 45°C และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 2 เดือน โดยทำการประเมินลักษณะทางกายภาพ ขนาดอนุภาค ประสิทธิภาพการกักเก็บสาร รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ reconstituted liposome

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ reconstituted liposome โดยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay ทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย reconstituted liposome suspension 50 µl ผสมกับ Triton x 10% 950 µl เพื่อทำให้ลิโปโซมแตก ผสมสารละลายตัวอย่าง 500 µl กับ สารละลาย DPPH 500 µl ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (blank ประกอบด้วยสารละลายตัวอย่าง 500 µl ผสมกับ absolute ethanol 500 µl) ส่วน control จะเตรียมเช่นเดียวกันแต่จะใช้ blank liposome แทน reconstituted liposome คำนวณหา % inhibition เช่นเดียวกับข้อ 2.1

6. การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังสัตว์ทดลอง (*in vitro*)

ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังนอกกายของ reconstituted liposome จากสารสกัดมะขามป้อม โดย Modified Franz Diffusion Cell ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

6.1 เตรียมหนังหมูจากลูกหมูอายุไม่เกิน 3 วันที่ตายตามธรรมชาติ โดยนำลูกหมูที่ตายแล้วแช่ในน้ำแข็งจนกว่าจะนำมาเตรียมการทดลอง ทำความสะอาดเช็ดตัวลูกหมูให้แห้ง และกำจัดขนด้วย clipper ตัดผิวหนังบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านของลูกหมู และเอาชิ้นส่วนไขมันที่ติดบริเวณผิวหนังออกให้หมดจนได้ผิวหนังแผ่นบาง ๆ

6.2 นำผิวหนังที่เตรียมได้มาตัดให้มีขนาดพอดีกับพื้นที่หน้าตัดของ receptor part โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร เพื่อให้ผิวหนังด้านบนที่ได้รับการโกนขนสัมผัสกับส่วน donor part ในส่วนของ receptor part บรรจุสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร และ donor part บรรจุ reconstituted liposome 1 มิลลิลิตร ประกอบส่วนของ donor part ลงบนผิวหนังสัตว์ทดลองให้ส่วนของสารตัวอย่างสัมผัสกับผิวหนัง และด้านบนของ donor part ปิดทับด้วย paraffin paper และยึดสองส่วนติดกันด้วย clamp การบรรจุสารละลาย phosphate buffer ต้องระมัดระวังไม่ให้มีฟองอากาศบนผิวหนังของสารละลายที่สัมผัสกับผิวหนัง ควบคุมอุณหภูมิในการทดลอง 37°C และรอบของการหมุน 410 รอบต่อนาที ทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 10 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับในปริมาตร 2 มิลลิลิตร และแทนที่ด้วย phosphate buffer pH 7.4 ในปริมาตรที่เท่ากัน นำมาหาค่า antioxidant activity (โดย DPPH assay) ณ ที่เวลาต่างๆ

7. การทดสอบความระคายเคืองในสัตว์ทดลอง

ทดสอบการระคายเคืองของลิโปโซมที่ได้จากโปรลิโปโซมมะขามป้อม (equivalent to 1% extract) ในกระต่าย เพื่อดูอาการระคายเคืองต่อผิวหนัง ผลการทดสอบต้องมีการระคายเคืองต่ำหรือไม่เกิดการระคายเคืองเลย โดยทดสอบตาม Test Guideline (TG) No. 404 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemical (2001) ดังนี้

นำกระต่ายขาว (New Zealand) มาโกนขนบริเวณหลังให้มีขนาดพื้นที่ 10 cm x 10 cm ทาตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.5 ml ลงบน gauze patch ขนาด 2.5 cm x 2.5 cm นำไปแปะบนผิวหนังบริเวณที่โกนขนแล้ว และปิดทับด้วย transpore adhesive tape เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยใช้ น้ำกลั่น 0.5 ml เป็น control ห่อลำตัวของกระต่ายไว้ด้วยผ้าพลาสติกเพื่อป้องกันไม่ให้แผ่นแปะเคลื่อนที่ออกจากบริเวณผิวที่ทดสอบ เมื่อครบเวลาจะนำแผ่นแปะออกและเช็ดผิวด้วยสำลีชุบน้ำเบาๆ จากนั้นจึงสังเกตระดับการเกิดผื่นแดง (erythema) หรือการบวม (oedema) ของผิว ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนำแผ่นแปะออก หรืออาจใช้เวลานานขึ้นหากยังเห็นอาการระคาย

เครื่องอยู่ แต่ไม่ควรเกิน 14 วันนับจากวันที่ทำการทดลอง การให้ระดับคะแนนของการระคายเคือง จะใช้ผู้ทดลอง 2 คน ซึ่งเป็นอิสระต่อกัน และมีระดับการกำหนดคะแนนดังนี้

Erythema and eschar formation:

No erythema	0
Very-slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4

Oedema formation:

No oedema	0
Very slight oedema (barely perceptible)	1
Slight oedema (edges of area well-defined by definite raising)	2
Moderated oedema (raised approximately 1 mm.)	3
Severe oedema (raised more than 1 mm. and extending beyond the area of exposure)	4

หมายเหตุ: วิธีการทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังนี้ ได้ผ่านการพิจารณาตาม จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของคณะกรรมการรับพิศชอบและจัดการเรื่องการใช้สัตว์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR-ACUC) โครงการ 17/2550 วันที่ 6 ก.พ. 2550

8. การพัฒนาตำรับเครื่องสำอางผสมโปรลิโปโซม

นำโปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมที่เตรียมได้และผ่านการทดสอบแล้ว มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในรูปแบบครีมผิว โดยเลือกใช้ยาพื้นและสารปรุงแต่งที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะน่าใช้

9. การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์

9.1 เลือกตำรับที่เหมาะสมมาทดสอบความคงตัวทางกายภาพ โดยนำมาผ่าน Freeze thaw cycles (เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C และ 45°C สลับกันอุณหภูมิละ 24 ชั่วโมง) ประมาณ 10 รอบ ประเมินผลของตำรับเทียบกับตำรับที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ สี ความหนืด กลิ่น pH และลักษณะทางกายภาพอื่นๆ เช่น creaming และ cracking เป็นต้น

9.2 นำตำรับที่ผ่านการทดสอบทางกายภาพมาประเมินความคงตัวทางเคมีโดยวิเคราะห์ปริมาณ gallic acid โดย HPLC

9.3 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ ทำได้โดย

1. ชั่งครีมลิโปโซมมะขามป้อมจำนวน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด
2. เติม absolute ethanol จำนวน 10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายเพื่อสกัดสารสกัดมะขามป้อมจากตำรับนำไป sonicate 10 นาที
3. นำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. แยกสารละลายใสด้านบน จำนวน 50 µl ผสม 950 µl Triton X-100 (10%) จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ตามวิธีในข้อ 2.1
5. ใช้สารละลายที่ได้จากการสกัดครีมเบสเป็น control

9.4 เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45 °C และ 75 %RH เป็นเวลา 4 เดือน ทำการทดสอบที่ 1, 2, 3, 4 เดือน ทำการประเมินผลผลิตภัณฑ์เทียบกับตำรับที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ

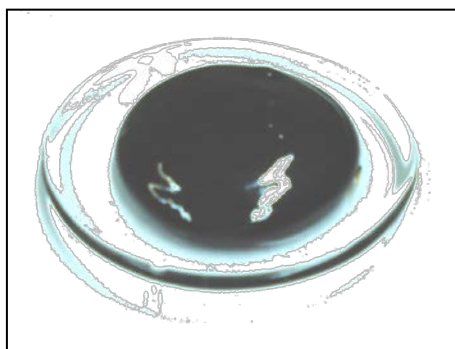
10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในกรณีที่มีการเปรียบเทียบกลุ่มข้อมูลตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปจะใช้ F test และ ANOVA สำหรับ 2 กลุ่มข้อมูลใช้ t-test ซึ่งจะเป็น independent หรือ paired t-test ขึ้นกับธรรมชาติของข้อมูลที่ได้

4. ผลการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

จากการเตรียมสารสกัดของมะขามป้อมโดยใช้ 95% ethanol พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะข้นเหนียว กึ่งแข็ง สีน้ำตาลเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 1.5 มี %yield เมื่อเทียบจากน้ำหนักผงแห้งของเนื้อมะขามป้อมเท่ากับ 38.39% ในการศึกษานี้จะเก็บสารสกัดหยาบที่เตรียมได้ไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทในช่อง freeze ของตู้เย็นจนกระทั่งนำมาใช้

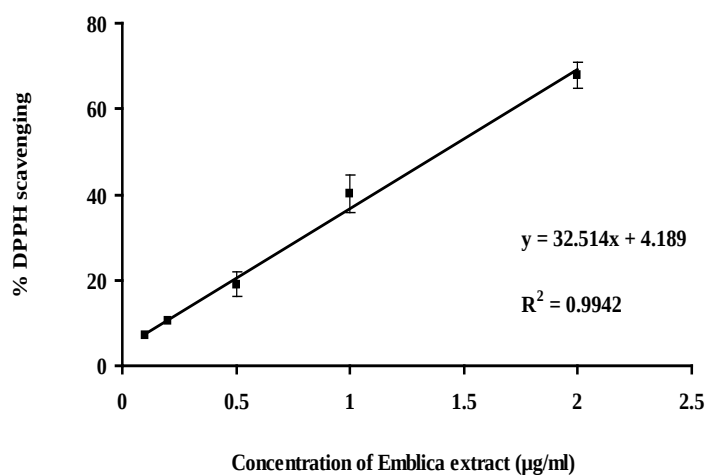


รูปที่ 1.5 สารสกัดของมะขามป้อม

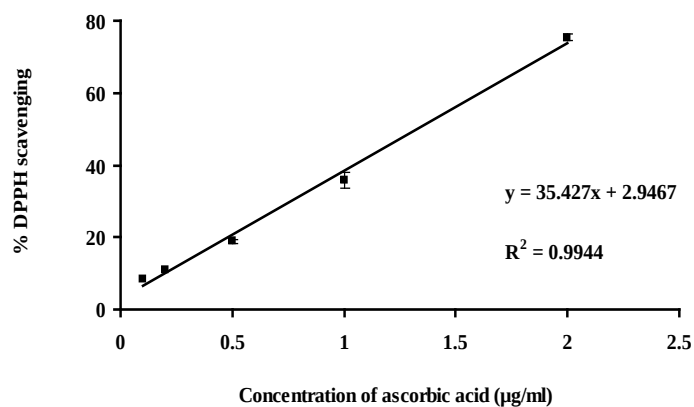
2 การศึกษาก่อนการตั้งตำรับ (preformulation studies)

2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อมวิเคราะห์โดยวิธี DPPH radical scavenging assay จะใช้ ascorbic acid เป็น positive control ค่า EC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดมะขามป้อม ที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50% จะหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %DPPH radical scavenging และความเข้มข้นของสารสกัด ดังแสดงในรูปที่ 1.6 ในทำนองเดียวกัน ค่า EC_{50} ของ ascorbic acid ก็จะหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %DPPH radical scavenging และความเข้มข้นของ ascorbic acid ดังแสดงในรูปที่ 1.7 ค่า EC_{50} ของสารสกัดมะขามป้อมและ ascorbic acid แสดงในตาราง 1.3



รูปที่ 1.6 %DPPH radical scavenging ของสารสกัดมะขามป้อม (n=3)



รูปที่ 1.7 %DPPH radical scavenging ของ ascorbic acid (n=3)

ตารางที่ 1.3 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม และ ascorbic

Sample	EC ₅₀ (µg/ml)
Emblica extract	1.41 ± 0.08
Ascorbic acid	1.33 ± 0.07

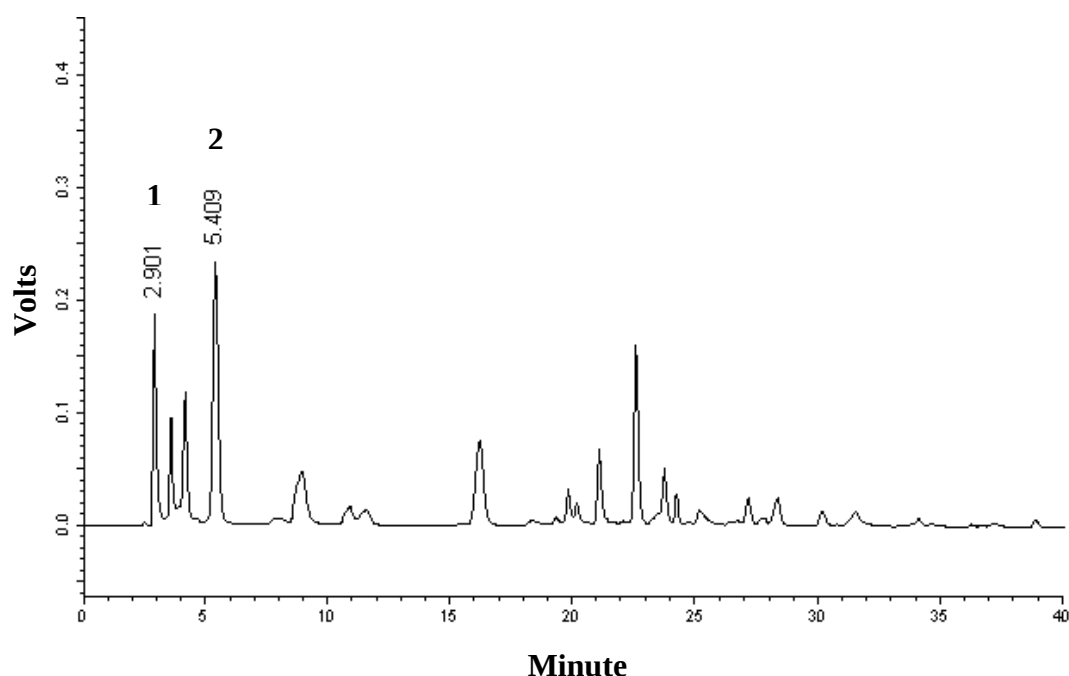
(n = 3)

2.2 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ของสารสกัดมะขามป้อม

จากการวิเคราะห์หา total phenolics ในสารสกัดจากมะขามป้อมโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และประเมินเป็นค่า gallic acid equivalents (GAE) mg/g สารสกัด พบว่า total phenolics ของสารสกัดมะขามป้อม มีค่าเท่ากับ 358.92 ± 2.09 mg GAE/g สารสกัด ($n = 3$)

2.3 ปริมาณของ ascorbic acid และ gallic acid ของสารสกัดมะขามป้อม

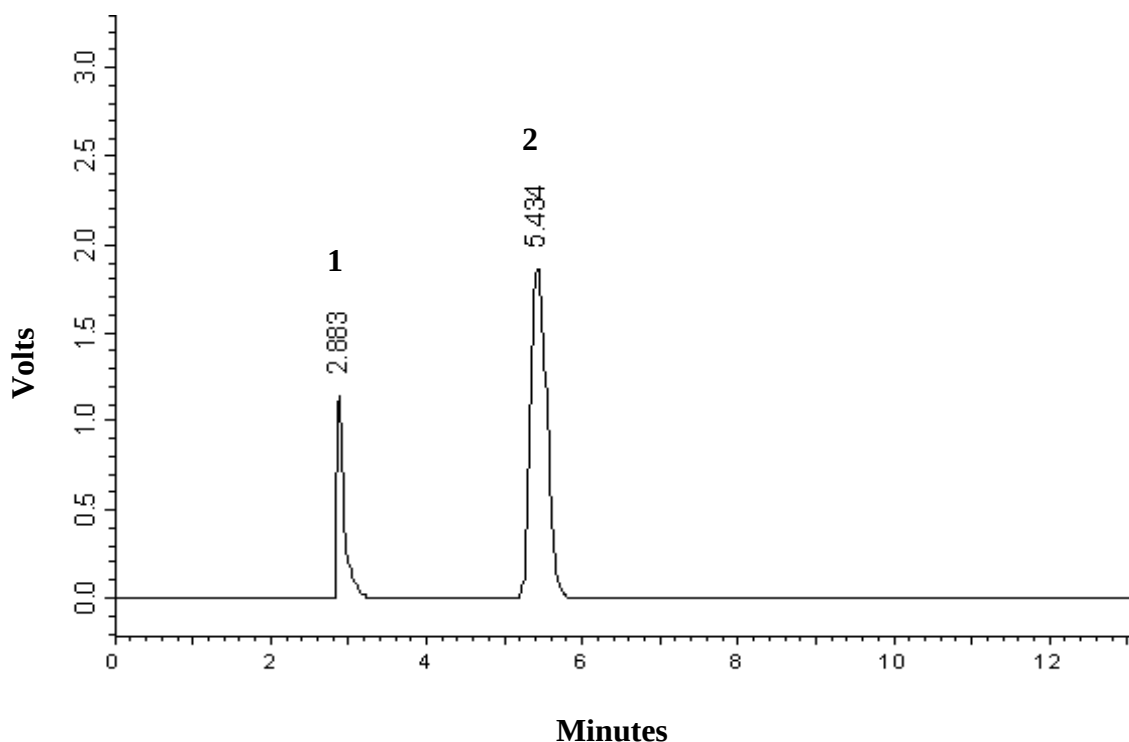
โดยใช้เทคนิค HPLC ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Kumaran and Karunakaran (2006) จะได้ fingerprint หรือ chromatogram ของสารสกัดมะขามป้อม ดังแสดงในรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 A typical chromatogram of emblica extract for ascorbic acid and gallic acid assay: ascorbic acid (1) and gallic acid (2)

เมื่อเปรียบเทียบ chromatogram ของสารสกัดมะขามป้อม กับ chromatogram ของสารมาตรฐาน ascorbic acid และ gallic acid (แสดงในรูปที่ 1.9) ที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC conditions เดียวกัน จาก retention time พบว่า peak 1 ซึ่งมี retention time ประมาณ 2.9 นาที จะเป็น peak ของ ascorbic acid และ peak 2 ซึ่งมี retention time ประมาณ 5.4 นาที เป็น peak ของ gallic acid ส่วน peak อื่นๆ ที่อยู่ระหว่างสอง peak นี้ อาจจะเป็น peak ของ hydrolysable tannins ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสภาพขั้วสูง (Ghosal *et al.*, 1996; Mayachiew and Devahastin, 2008)

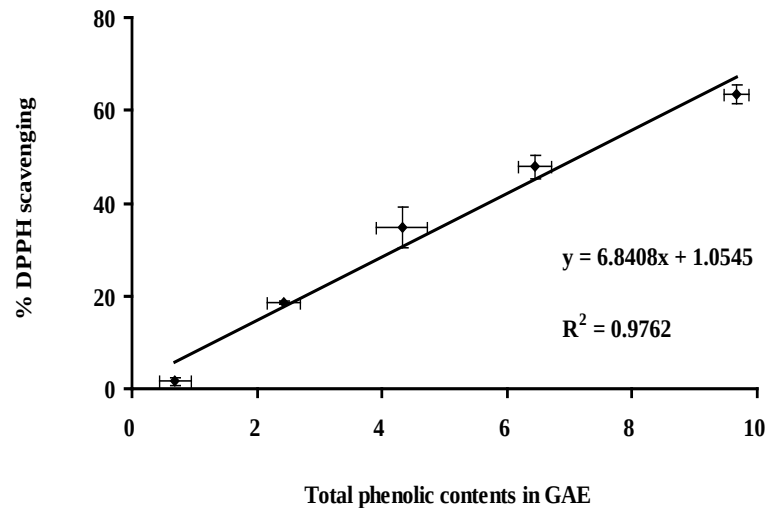
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid และ gallic acid พบว่าในสารสกัดมะขามป้อม มีปริมาณ ascorbic acid $19.78 \pm 4.11\%$ (w/w) และ gallic acid $3.14 \pm 0.51\%$ (w/w)



รูปที่ 1.9 A typical chromatogram of the authentic standards of ascorbic acid (1) and gallic acid (2)

2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total phenolic contents และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณ total phenolics ของสารสกัดมะขามป้อม พบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics นั้นมีความสัมพันธ์กันในลักษณะเชิงเส้น ($r^2 = 0.9762$) ดังแสดงรูปที่ 1.10 แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม ขึ้นอยู่กับปริมาณของ total phenolics ที่มีอยู่ในสารสกัด

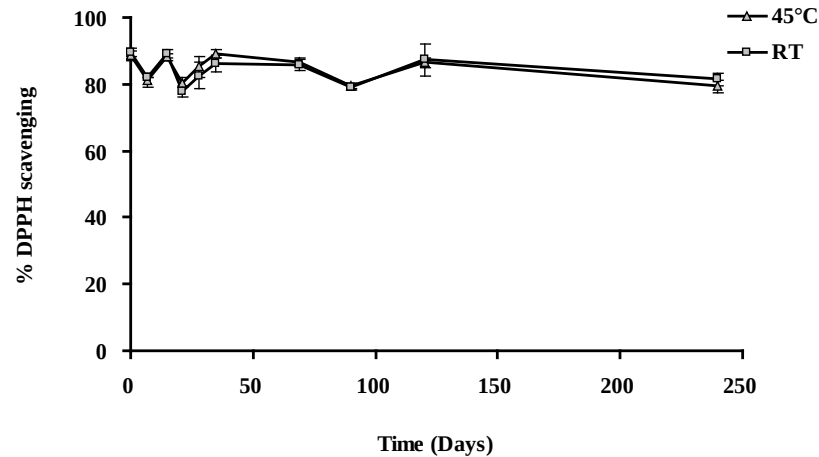


รูปที่ 1.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง total phenolics (mg GAE/g สารสกัด) และฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดมะขามป้อม ($n = 3$)

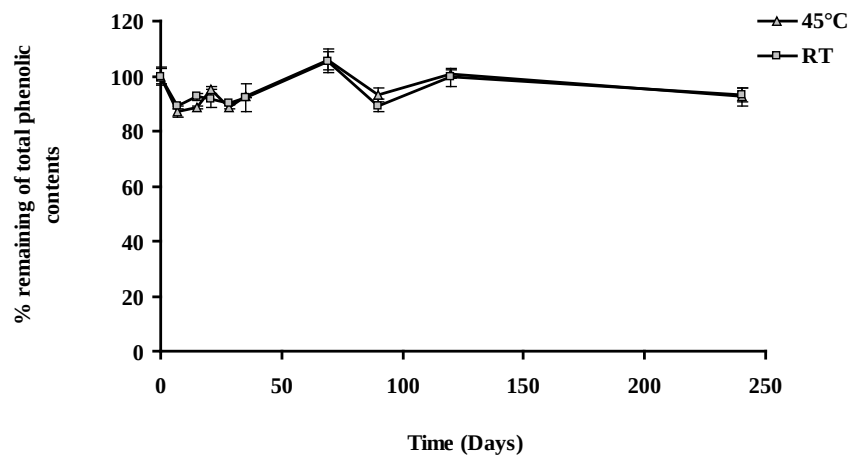
2.4 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารสกัดมะขามป้อม

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารสกัดมะขามป้อม โดยประเมินจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics เมื่อเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 45°C และอุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) โดยควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ที่ 75 % เป็นเวลา 8 เดือน พบว่า ไม่มีความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญที่ $p > 0.05$ ทั้งในแง่ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics ดังแสดงในรูปที่ 1.11 (a) และ (b) ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดมะขามป้อมจึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ได้ เนื่องจากมีความคงตัวที่ดีแม้อยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิและความชื้นสูง

(a)



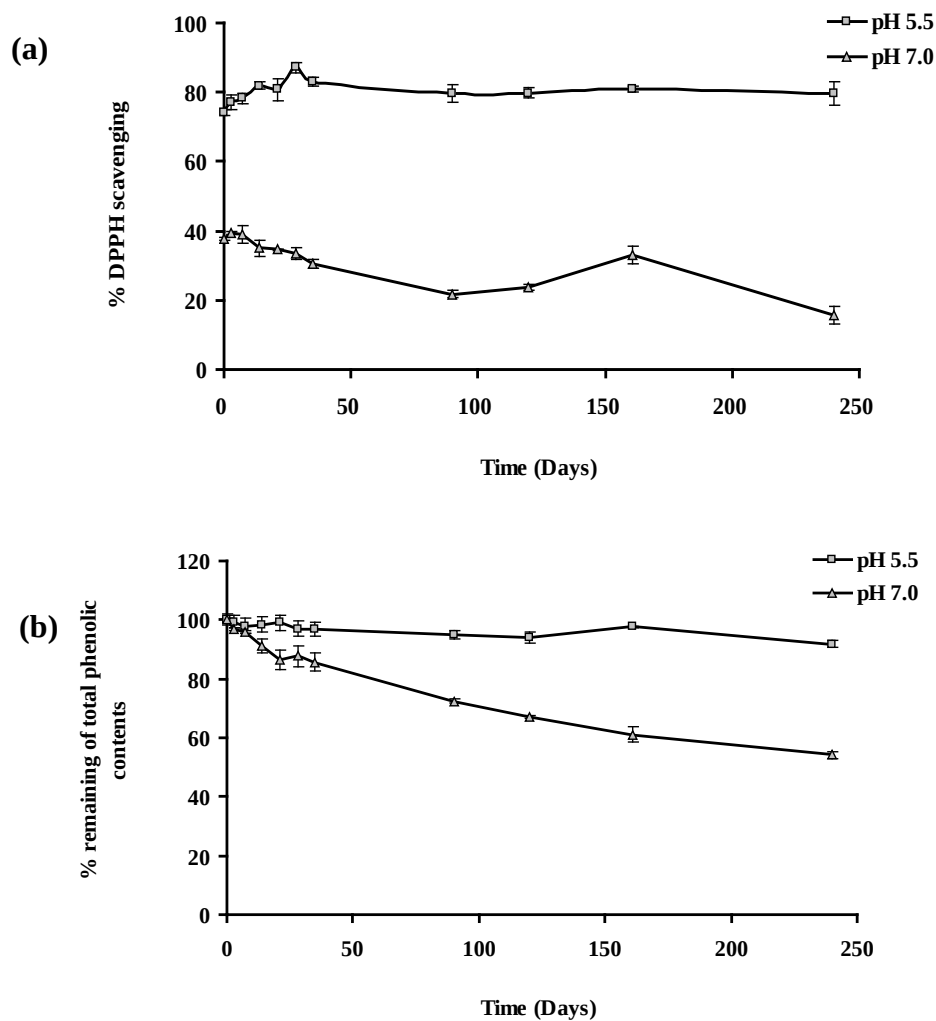
(b)



รูปที่ 1.11 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (a) และปริมาณ total phenolics (b) ของสารสกัดมะขามป้อม เมื่อเก็บไว้ที่ 45 °C และอุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) โดยควบคุมความชื้นที่ 75% RH ($n = 3$)

2.5 ผลของ pH ต่อความคงตัวของสารสกัดมะขามป้อม ในสารละลายน้ำ

เมื่อทำการศึกษาปัจจัยของ pH ต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics ของสารสกัดมะขามป้อมในสารละลายน้ำ โดยศึกษาเปรียบเทียบที่ pH 5.5 (skin pH; Melero *et al.*, 2008)) และ pH ที่เป็นกลาง (pH 7.0) ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1.12 (a) และ (b) ตามลำดับ



รูปที่ 1.12 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (a) และปริมาณ total phenolics (b) ของสารสกัดมะขามป้อม ในสารละลายที่ pH 5.5 และ 7.0 โดยเก็บไว้ในตู้เย็น (4°C) ($n = 3$)

จากรูปที่ 1.12 (a) จะเห็นว่าในสารละลายที่ pH 5.5 สารสกัดมะขามป้อมจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า ที่ pH 7.0 นอกจากนี้ ในตลอดระยะเวลาที่ศึกษา (240 วัน) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ของทั้งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics ของสารสกัดมะขามป้อม ในสารละลายที่ pH 5.5 แต่ในสารละลายที่ pH 7.0 นั้น จะพบว่ามีแนวโน้มของการลดลงของทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics อย่างมีนัยสำคัญ

3 การเตรียมโปรตีนโพลิโฆมของสารสกัดมะขามป้อม

3.1 การพัฒนาสูตรลิโฆมของสารสกัดมะขามป้อม

ในการพัฒนาเพื่อหาสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับลิโฆมของสารสกัดมะขามป้อม ได้ทำการทดลองเตรียมลิโฆมโดย vary ชนิดและปริมาณของสารที่เป็นส่วนประกอบของผนังลิโฆม เช่น phosphatidylcholines จาก dried egg yolk (EPC) และจาก soybean (SPC), cholesterol (CHOL), non-ionic surfactant เช่น Tween 80 และ surface charge agents ได้แก่ deoxycholic acid (DA) และ stearylamine (SA) เป็นต้น รวมทั้งเปลี่ยนแปลงปริมาณไขมันในตำรับ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมะขามป้อมในตำรับ 1% ทำการทดลองเตรียมลิโฆมด้วยวิธี modified ethanol injection เพื่อให้ได้ลิโฆมที่มีลักษณะทางกายภาพ ขนาดอนุภาค และประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร ที่เหมาะสม

พบว่าในสูตรลิโฆมที่องค์ประกอบต่างกัน จะได้ลิโฆมที่แตกต่างกันทั้งในแง่ของขนาดอนุภาค และประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร สูตรตำรับที่มี CHOL เป็นส่วนประกอบจะให้ลิโฆมที่มีลักษณะที่ไม่สวยงาม ขนาดอนุภาคใหญ่ และมีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารน้อยเมื่อเทียบกับสูตรตำรับที่มี Tween80 เป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะให้ลิโฆมที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ที่ดีกว่า นอกจากนี้การใช้สารเพิ่มประจุลบ Deoxycholic acid (DA) ทำให้ได้ลิโฆมที่มีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณ total lipid ในตำรับจะทำให้ entrapment efficiency และขนาดของลิโฆมเพิ่มขึ้นด้วย ดังตัวอย่างสูตรตำรับที่แสดงในตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 ขนาดอนุภาคและ entrapment efficiency ของลิโฆมมะขามป้อม

Compositions	Total lipid ($\mu\text{mol/ml}$)	Ratio	Particle size (nm) (n=3)	% entrapment efficiency (n=3)
SPC:CHOL	100	7:3	1489.2 ± 378.7	58.96 ± 5.11
SPC:TWEEN 80	100	84:16:2.5	323.40 ± 45.20	56.91 ± 12.0
SPC:TWEEN 80:SA	100	84:16:2.5	658.30 ± 182.0	67.68 ± 3.20
SPC:TWEEN 80:DA	100	84:16:2.5	235.80 ± 21.50	70.67 ± 2.66
SPC:TWEEN 80:DA	200	84:16:2.5	271.63 ± 15.01	84.27 ± 1.02

ตารางที่ 1.4 ขนาดอนุภาคและ entrapment efficiency ของลิโปโซมมะขามป้อม (ต่อ)

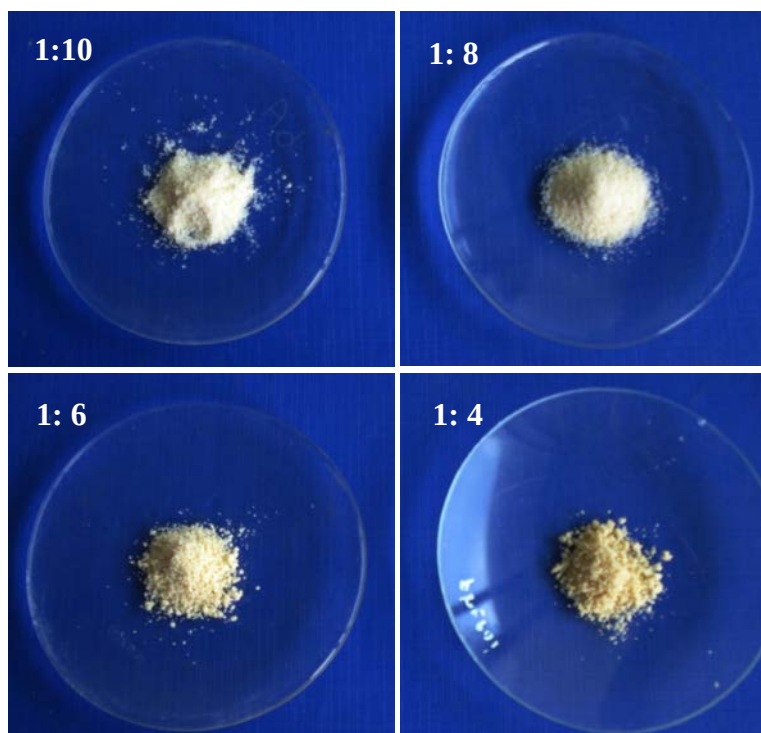
Compositions	Total lipid ($\mu\text{mol/ml}$)	Ratio	Particle size (nm) (n=3)	% entrapment efficiency (n=3)
EPC:CHOL	100	7:3	1521.0 ± 578.2	50.11 ± 4.81
EPC:TWEEN 80	100	84:16:2.5	304.90 ± 27.70	56.39 ± 2.98
EPC:TWEEN 80:SA	100	84:16:2.5	251.10 ± 14.20	33.60 ± 3.20
EPC:TWEEN 80:DA	100	84:16:2.5	315.40 ± 32.60	67.76 ± 2.50
EPC:TWEEN 80:DA	200	84:16:2.5	329.13 ± 11.10	82.07 ± 10.05
SPC:TWEEN 80	100	40:5	311.73 ± 14.79	65.52 ± 7.58
SPC:TWEEN 80:DA	100	40:5:1	341.53 ± 58.38	98.29 ± 0.11

สารสกัดมะขามป้อม 1% w/v

จากการพัฒนาลิโปโซมมะขามป้อม พบว่าสูตรตำรับที่มีลักษณะดีที่สุด คือ ลิโปโซมที่มีส่วนประกอบของ SPC:Tween80: DA (40:5:1 และ Total Lipid 100 $\mu\text{mole/ml}$) ซึ่งจะให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 341.53 ± 58.38 nm และสารสามารถเก็บกักสารสกัดมะขามป้อมได้สูงถึง $98.29 \pm 0.11\%$ จึงได้นำมาเตรียมให้อยู่ในรูปของโปรลิโปโซมต่อไป

3.1 การเตรียมโปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อม

การเตรียมโปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อม ใช้วิธี Film deposition on carriers ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Ning และคณะ (2005) โดยใช้สูตรที่ดีที่สุดของลิโปโซมที่ได้พัฒนาขึ้นในข้อ 3.1 และใช้ sorbitol เป็นตัวกลางในการดูดซับสารไขมันและสารสกัด ซึ่งในการทดลองได้ทำการศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของ sorbitol ที่ใช้ในสูตรตำรับ โดยการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของปริมาณของ total lipid และ sorbitol ในอัตราส่วน 1:4 ถึง 1:10 จากนั้นประเมินลักษณะทางกายภาพ และความสามารถในการไหลของผงโปรลิโปโซมที่เตรียมได้ ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 1.13



รูปที่ 1.13 ลักษณะของผงโพลีฟอสโฟลิพิดที่เตรียมจากสัดส่วนของ total lipid และ sorbitol ที่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่าโพลีฟอสโฟลิพิดที่เตรียมจากปริมาณ total lipid และ sorbitol ในอัตราส่วน 1:4 และ 1:6 นั้นผงที่ได้จะมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อนทั้งนี้ก็เป็นเพราะว่ามีปริมาณของไขมันมากเกินไป ส่วนในอัตราส่วน 1:8 และ 1:10 นั้นผงโพลีฟอสโฟลิพิดที่เตรียมได้จะมีการไหลที่ดีและไม่จับตัวกันเป็นก้อน จึงได้ทำการเลือกสัดส่วน 1:8 เพราะใช้ปริมาณของ sorbitol ที่น้อยกว่าเพื่อพัฒนาโพลีฟอสโฟลิพิดต่อไป

เมื่อเตรียมโพลีฟอสโฟลิพิดของสารสกัดมะขามป้อมโดยใช้สูตร SPC:Tween80:DA (40:5:1 และ Total Lipid 100 $\mu\text{mole/ml}$) และใช้ sorbitol (ขนาดอนุภาค 180-250 μm) เป็น microporous carrier ใช้สัดส่วนของ total lipid และ sorbitol เท่ากับ 1:8 และมีปริมาณของสารสกัดมะขามป้อม 1 % by weigh จะได้ลักษณะของผงโพลีฟอสโฟลิพิด ดังรูปที่ 1.14 โดยผงโพลีฟอสโฟลิพิดมะขามป้อมที่ได้จะมีสีขาวครีม มีการไหลที่ดี และไม่จับตัวกันเป็นก้อน เกิดเป็นลิโปโซมได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับน้ำ

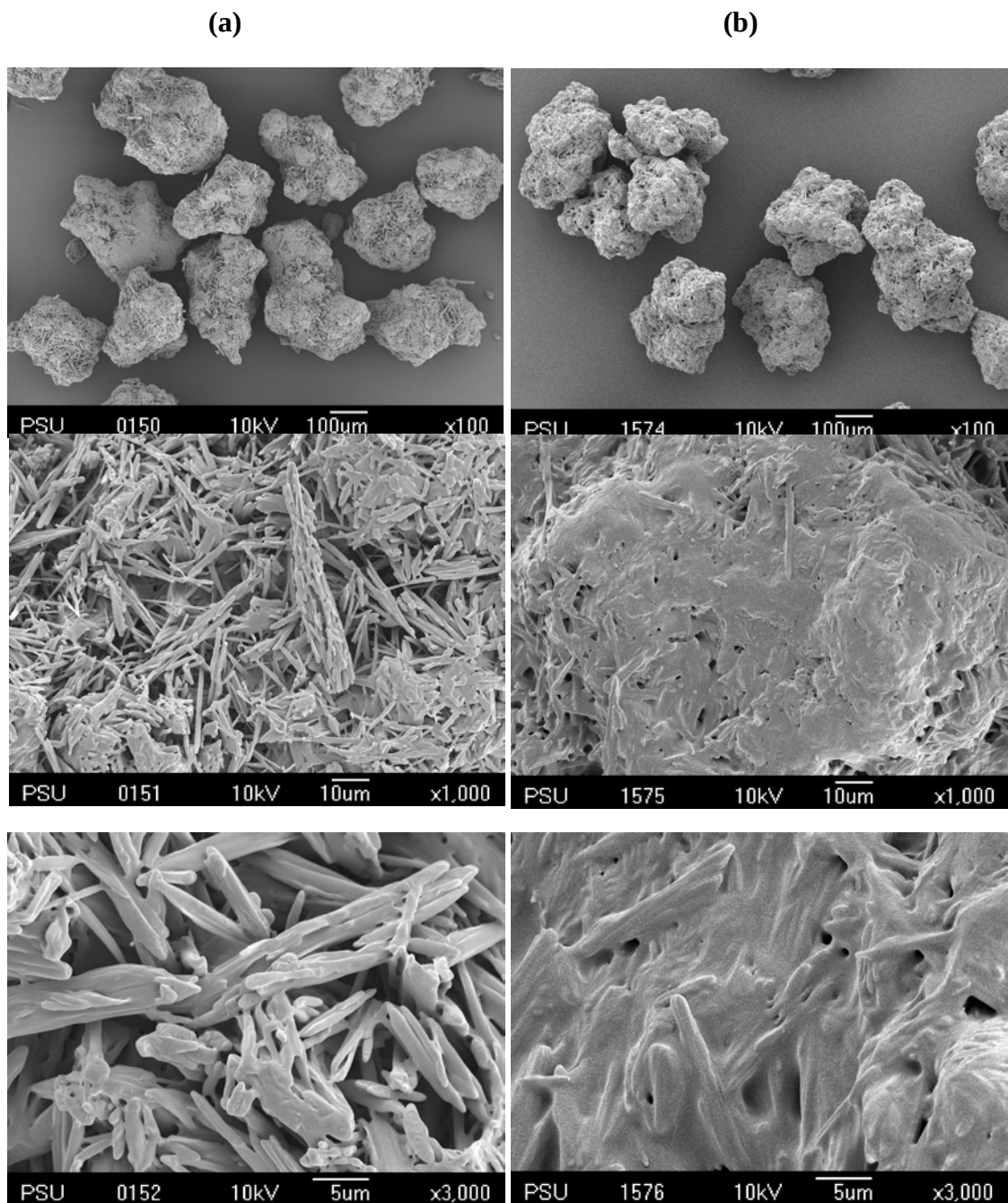


รูปที่ 1.14 ผงโพลิโพรไซมของสารสกัดมะขามป้อม

4 การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของโพลิโพรไซม

4.1 ลักษณะพื้นผิวของโพลิโพรไซม

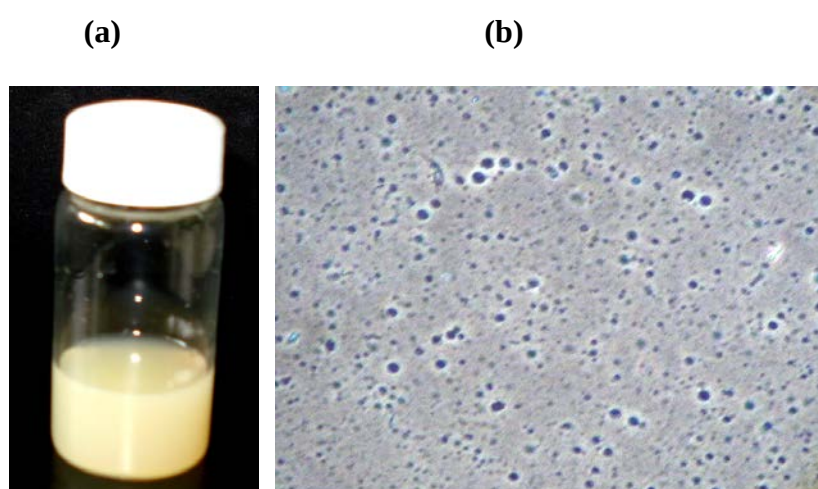
รูปที่ 1.15 แสดงลักษณะพื้นผิวของผงโพลิโพรไซมมะขามป้อม ภายใต้ scanning electron microscope (SEM) เปรียบเทียบกับ untreated sorbitol จะเห็นว่าที่กำลังขยาย 100X ผงโพลิโพรไซมมีลักษณะ irregular shape (รูปที่ 1.15b) และจะไม่แตกต่างจาก untreated sorbitol (รูปที่ 1.15a) ทั้งขนาดและลักษณะภายนอก แสดงให้เห็นว่าสารที่เป็นส่วนประกอบในโพลิโพรไซมจะสามารถถูกบรรจุไว้ในรูพรุนของอนุภาค sorbitol ได้อย่างเหมาะสม และเมื่อสังเกตภายใต้กำลังขยายที่เพิ่มขึ้น คือ 1,000X และ 3,000X จะเห็นว่าผงโพลิโพรไซมจะมีไขมันเคลือบอยู่ที่บริเวณผิวของ sorbitol แต่ยังคงเห็นลักษณะที่เป็นรูพรุนของ sorbitol อยู่ จึงทำให้ผงโพลิโพรไซมยังคงมีคุณสมบัติการไหลที่ดีได้



รูปที่ 1.15 Scanning electron micrograph ของ uncoated sorbitol (a) และ โพรลีโอโซม(b)

4.2 การเกิดเป็นลิโปโซม เมื่อทำการ reconstitute โพรลิโปโซมในน้ำ

จากคุณสมบัติที่สำคัญของโพรลิโปโซม คือ สามารถเปลี่ยนเป็นลิโปโซมได้ เมื่อสัมผัสกับน้ำ จึงได้ทำการศึกษาคุณลักษณะที่เกิดขึ้นหลังจากกระจายตัวผงโพรลิโปโซมในน้ำ รูปที่ 1.16 (a) แสดงลักษณะของลิโปโซมที่เกิดขึ้นหลังจากสัมผัสกับน้ำโดยมีความเข้มข้นของผงโพรลิโปโซม 2% พบว่าลิโปโซมจะเกิดขึ้นภายในเวลาประมาณ 30 วินาที และมีลักษณะเป็นสารละลายคอลลอยด์ และเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็น อนุภาคของ lipid vesicle ที่เกิดขึ้น โดยมีขนาดที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 1.16 (b)



รูปที่ 1.16 Digital image of liposomes obtained from reconstituted emblica proliposome powders (a) and its optical micrograph at 20X magnification (b)

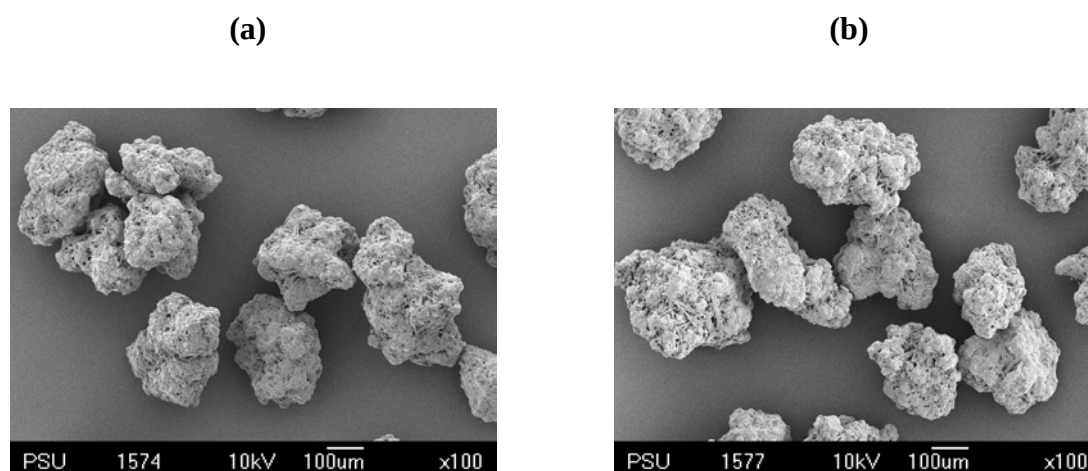
4.3 ขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพการเก็บกักของ reconstituted liposomes

ขนาดอนุภาคของลิโปโซม ที่ได้จากการ reconstitute โพรลิโปโซมมะขามป้อม วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Photon Correlation Spectroscopy พบว่า มีการกระจายของอนุภาคอยู่ในช่วงที่กว้าง ตั้งแต่ระดับนาโนเมตร จนถึง จาก 10 ไมโครเมตร โดยขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 530.3 ± 90.1 nm ($n = 3$) อย่างไรก็ตามพบว่าขนาดอนุภาคจะสามารถลดลงได้ โดยการ sonication พบว่าเมื่อนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จะได้ลิโปโซมที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 312 ± 25.17 nm ($n = 3$)

ลิโปโซมที่ได้จากการ reconstitute โพรลิโปโซมมะขามป้อม (0.2% w/v) มีประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร $83.34 \pm 10.16\%$ ($n = 3$)

5 การศึกษาความคงตัวของโพลีโพรพิลีน

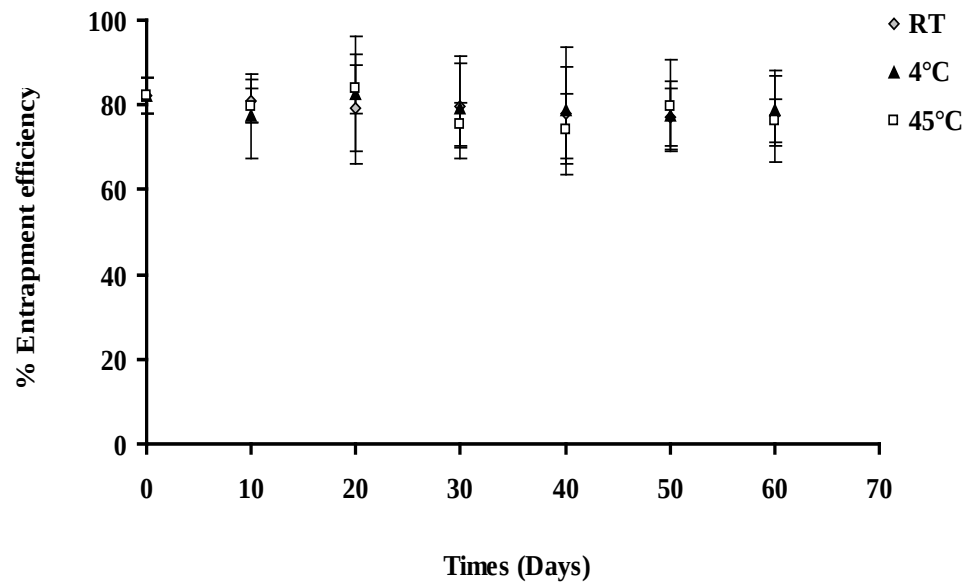
จากการนำผงโพลีโพรพิลีนไปเก็บไว้ในตู้เย็น (4°C) อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$), และ ที่อุณหภูมิ 45°C โดยควบคุมความชื้นที่ 75%RH เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อประเมินความคงตัวพบว่าผงโพลีโพรพิลีนที่เก็บในตู้เย็นและสภาวะปกติยังคงมีลักษณะร่วนซุยและไหลได้ดี สามารถเกิดเป็นโพลีโพรพิลีนได้ทันทีเมื่อสัมผัสกับน้ำ และเมื่อนำผงโพลีโพรพิลีนที่เก็บไว้ในสภาวะปกติไปส่องดูลักษณะพื้นผิวภายใต้ SEM (100X) พบว่ามีลักษณะที่ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับเริ่มต้น ทั้งในด้านของขนาด รูปร่างและลักษณะภายนอก ดังแสดงในรูปที่ 1.17



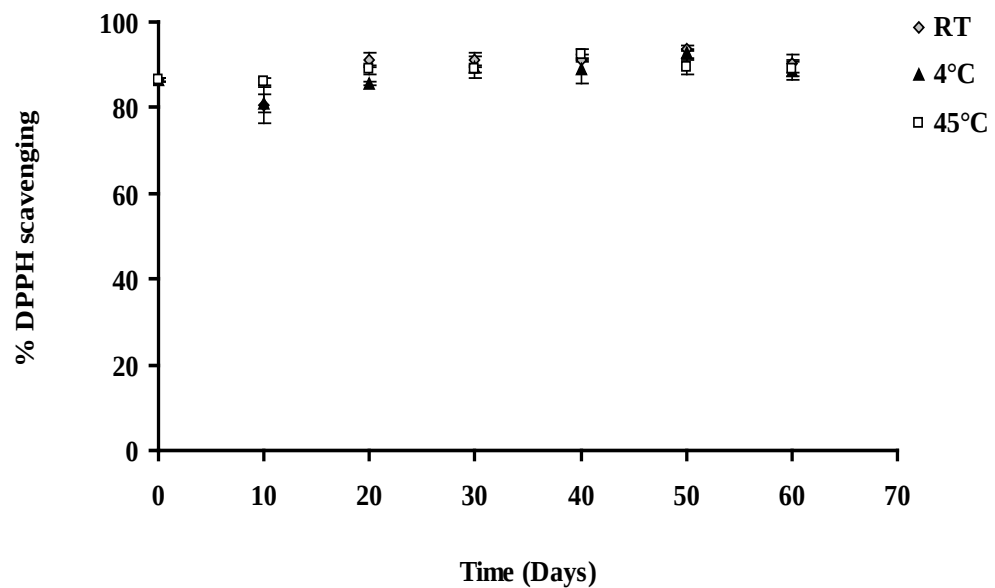
รูปที่ 1.17 Scanning electron micrograph (กำลังขยาย 100 X) ผงโพลีโพรพิลีนที่เก็บไว้ในสภาวะปกติ เมื่อเวลาเริ่มต้น (a) และหลังการเก็บไว้เป็นเวลา 2 เดือน (b)

ส่วนผงโพลีโพรพิลีนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45°C (75%RH) จะเริ่มเกิดการเยิ้มเหลวในประมาณวันที่ 50 และพบว่าเกิดการเยิ้มเหลวจะเกิดขึ้นได้เร็วขึ้นเมื่อความชื้นเพิ่มขึ้น (80%RH) ทั้งนี้เนื่องจาก sorbitol สามารถดูดความชื้นได้ดี และเกิดการเยิ้มเหลวได้ง่าย ดังนั้นในการเก็บรักษาจำเป็นต้องใส่ในภาชนะปิดสนิท และใส่สารกันชื้น (silica gel) ในภาชนะด้วย ซึ่งพบว่าจะสามารถรักษาสภาพของโพลีโพรพิลีน ให้มีความคงตัวทางกายภาพได้ดี

จากการประเมินประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโพลีโพรพิลีนที่เกิดขึ้นจากผงโพลีโพรพิลีนที่เก็บไว้ในสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าไม่มีความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพลีโพรพิลีน ดังแสดงในรูปที่ 1.18 และ 1.19 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงโพลีโพรพิลีนที่มีความคงตัวดี



รูปที่ 1.18 ประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร ของลิโปโซมจากผงโปรตีนมะขามป้อม ที่เก็บไว้เป็นเวลา 2 เดือน ในตู้เย็น (4°C), สภาวะปกติ ($27 \pm 2^\circ\text{C}$; 75% RH) และในสภาวะเร่ง (45°C; 75% RH) ($n = 3$)



รูปที่ 1.19 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของลิโปโซมจากผงโปรตีนมะขามป้อม ที่เก็บไว้เป็นเวลา 2 เดือน ในตู้เย็น (4°C), สภาวะปกติ ($27 \pm 2^\circ\text{C}$; 75% RH) และในสภาวะเร่ง (45°C; 75% RH) ($n = 3$)

และจากการศึกษา long term stability ในการเก็บรักษาผงโปรลิโปโซมมะขามป้อม โดยบรรจุในซองปิดสนิท กันความชื้น และเก็บใน desicator ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่าสามารถรักษาสภาพของผงโปรลิโปโซม ให้มีความคงตัวทางกายภาพได้ดี และมีผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในข้อมูล

เดือน	% inhibition (DPPH Assay)
0	83.34 ±10.16%
12	81.13 ± 11.49

(n = 3)

6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของลิโปโซมมะขามป้อมหลังศึกษาการซึมผ่านผิวหนังสัตว์ทดลอง

(*in vitro*)

เพื่อแสดงให้เห็นว่าลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมที่ได้จากโปรลิโปโซมสามารถที่จะนำส่งสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารสกัดมะขามป้อมผ่านชั้นไขมันของผิวหนัง และแทรกซึมเข้าสู่ชั้นผิวหนังที่ลึกลงไปได้ จึงได้ทำการทดลองวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นหลังการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังนอกร่างกายของ ลิโปโซม โดย Modified Franz Diffusion Cell

รูปที่ 1.20 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม เปรียบเทียบระหว่างการให้สารสกัดในรูปแบบลิโปโซมและรูปแบบสารสกัดอิสระเมื่อมีการซึมผ่านผิวหนังไปยัง receptor part จะเห็นได้ว่า ภายในเวลา 12 ชั่วโมง สารสกัดที่นำส่งในรูปแบบลิโปโซมจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสารสกัดอิสระ แสดงให้เห็นว่า ลิโปโซมสามารถนำส่งสารต้านอนุมูลอิสระพวก hydrophilic ของมะขามป้อมผ่านผิวหนังได้ดี เมื่อเทียบกับสารสกัดอิสระ ทั้งในแง่ของปริมาณ และอัตราในการนำส่ง

8. การเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางผสมโพลิโพรไทมมะขามป้อม

ในการเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปของครีมทาผิว โดยได้พัฒนาตำรับยาพื้นของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1.6 และได้ผ่านการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง โดยทำ Freeze - thaw จำนวน 10 cycles ก่อนที่จะนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 1.6 สารต่างๆ ที่ใช้ใน สูตรตำรับยาพื้นของผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์	องค์ประกอบในยาพื้น
ครีม	Cremophore A6, Cremophore A25, Cetyl alcohol, Aracel 165, White Beewax, Glyceryl monostearate (SE), Petrolatum, Mineral oil, Isopropyl myristate, Dimethicone 350, Lanol 1688, Cetomacrogol 1000, Propylene glycol, Glycerin, Sepigel 305, Disodium EDTA, Uniphen P-23, น้ำหอม

เมื่อนำโพลิโพรไทมมะขามป้อมมาผสมกับยาพื้นครีม โดยให้ความเข้มข้น 2, 5 และ 10% ตามลำดับ โดยใช้วิธี levigation ซึ่งแสดงดังรูปที่ 1.21 พบว่าสามารถผสมผงโพลิโพรไทมมะขามป้อมเข้ากับยาพื้นได้ง่ายทั้งสามความเข้มข้นได้ผลิตภัณฑ์ครีมสีเหลืองอ่อนทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของโพลิโพรไทมที่ผสมลงไป



รูปที่ 1.21 แสดงการผสมยาพื้นครีมกับโพลิโพรไทมมะขามป้อมโดยวิธี levigation

พบว่าเมื่อผสมโปรตีนโปไลโปไซมในยาพื้นครีมจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเนื้อครีมเรียบเนียนสีเหลืองอ่อน ความเป็นมันของผลิตภัณฑ์จะขึ้นกับปริมาณของโปรตีนโปไลโปไซมในตำรับ โดยความเป็นมันจะลดลงเมื่อปริมาณของโปรตีนโปไลโปไซมเพิ่มขึ้น จากการเตรียมตำรับครีมผสมโปรตีนโปไลโปไซมที่ความเข้มข้น 10% จะมีความมันน้อยกว่าเมื่อเทียบกับตำรับที่มีความเข้มข้น 5% ดังแสดงในรูปที่ 1.22



รูปที่ 1.22 ลักษณะครีมโปรตีนโปไลโปไซมมะขามป้อมที่เตรียมจากโปรตีนโปไลโปไซมความเข้มข้น 5% (A) และ 10% (B)

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ครีมทั้งสาม โดยประเมินใน ผลิตภัณฑ์ครีม 1 กรัม ซึ่งนำมาสกัดและเจือจางในอัตราส่วนที่เท่ากันและเหมาะสมเพื่อให้สามารถวัดได้โดยวิธี DPPH พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับจะขึ้นกับปริมาณโปรตีนโปไลโปไซมที่เติมลงในตำรับ ดังแสดงในตารางที่ 1.7

ตารางที่ 1.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ของผลิตภัณฑ์ครีมผสมโปรตีนโปไลโปไซมมะขามป้อม

สูตรตำรับครีม	% Inhibition (n=3)
2%	20.98 ± 3.58
5%	70.80 ± 2.49
10%	91.80 ± 4.29

อย่างไรก็ตามเมื่อประเมินจากคุณลักษณะและความน่าใช้ พบว่า คาร์บครีม 5% จะมีความน่าใช้โดยสามารถกระจายตัวบนผิวเมือทาได้ดีกว่าคาร์บครีม 10% ดังนั้นจึงได้เลือกคัดเลือกเฉพาะผลิตภัณฑ์ครีมผสมโพลิโปโซม 5% ไปประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์ต่อไป

9. การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์

จากการประเมินผลความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์โดยนำมาผ่าน Freeze-thaw cycles (เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C และ 45°C สลับกันอุณหภูมิละ 24 ชั่วโมง) 10 รอบ เมื่อเทียบกับคาร์บที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ พบว่า ผลิตภัณฑ์ครีมลิโปโซมมะขามป้อมที่เตรียมจากโพลิโปโซม ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความหนืด pH ดังแสดงในตารางที่ 1.8 และไม่เกิด creaming และ cracking ของคาร์บ

ตารางที่ 1.8 pH และความหนืด ของครีมผสมโพลิโปโซมมะขามป้อม ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง (Freeze -Thaw 10 cycles)

ผลิตภัณฑ์ครีม	pH		ความหนืด ($\times 10^3$ cP)	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
5%	5.57	5.52	252	228

ในการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ครีมลิโปโซมมะขามป้อมที่เตรียมจากโพลิโปโซม ที่ความเข้มข้น 5% โดยนำไปผ่าน freeze - thaw จำนวน 10 cycles เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ gallic acid และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของคาร์บ พบว่าก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว คาร์บมีปริมาณ gallic acid และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของคาร์บไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 1.9

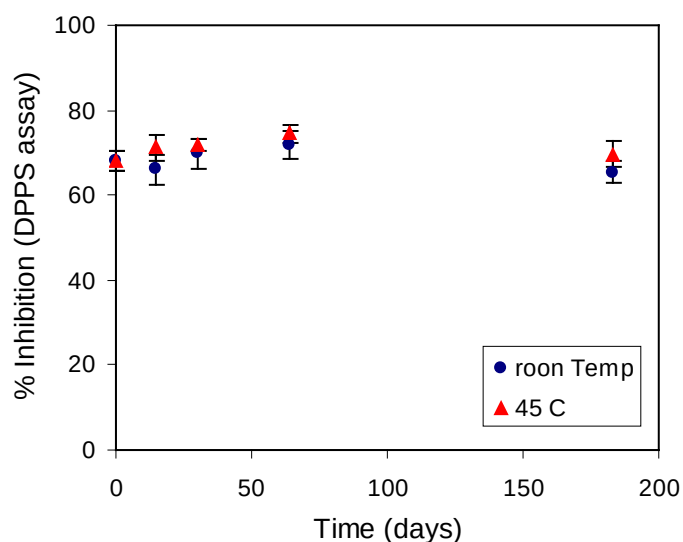
ตารางที่ 1.9 ผลประเมินประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณ gallic acid ในผลิตภัณฑ์ครีมโปรลิโปโซมมะขามป้อม 5% ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว

ผลิตภัณฑ์ครีม	% antioxidant activity (DPPH assay),		Gallic acid (mg/g of cream)	
	before ^a	after ^b	before ^a	After ^b
5%	70.80 ± 2.49	72.54 ± 3.96	0.98 ± 0.04	0.89 ± 0.54

^a ก่อนเข้า freeze - thaw test, ^b หลังผ่าน freeze - thaw จำนวน 10 cycles

n=3

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของครีมผสมโปรลิโปโซม 5% โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ดังแสดงใน รูปที่ 1.23



รูปที่ 1.23 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ของครีมผสมโปรลิโปโซมมะขามป้อม (5%) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 6 เดือน

5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

จากการทำการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อมด้วยวิธี DPPH radical scavenging โดยมีหลักการคือ DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร และมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร หลังจากอนุมูล DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป reduced form (DPPH-H) ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นเหลืองอ่อน เนื่องจากหมู่ picryl ในโมเลกุล การเกิดการเปลี่ยนสีนี้ของ DPPH จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้จะขึ้นกับจำนวนของโมเลกุล DPPH-H ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระนั่นเอง จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดมะขามป้อมมีค่า EC_{50} ($1.41 \mu\text{g/ml}$) ใกล้เคียงกับค่า EC_{50} ของ ascorbic acid ($1.33 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$) ที่นิยมใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับรายงานซึ่งเคยมีมาแล้วนั้น พบว่าค่า EC_{50} ที่ได้จากการศึกษานี้ สูงกว่าของ Liu และคณะในปี 2008 ซึ่งได้ทำการศึกษาศารสกัดเมทานอลของผลมะขามป้อมจาก 6 เขตในประเทศจีน และพบว่าค่า EC_{50} อยู่ในช่วง $11-45 \mu\text{g/ml}$ ทั้งนี้อาจเนื่องจากใช้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดแตกต่างกัน รวมทั้งแหล่งที่มาของพืชต่างกัน จึงมีผลทำให้องค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดต่างกันด้วย อรุณพร และคณะ (2007, unpublished data) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย DPPH assay ของสารสกัดจากผลมะขามป้อมทั้งจากชั้นน้ำและ ethanol พบว่าจะมี EC_{50} $4.92 \mu\text{g/ml}$ และ $2.85 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารสกัดมะขามป้อมจากชั้น ethanol จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าในชั้นน้ำ นอกจากนี้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดย lipid peroxidation of liposome assay พบว่าสารสกัดมะขามป้อมจากชั้น ethanol (EC_{50} $54.69 \mu\text{g/ml}$) จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าในชั้นน้ำเช่นกัน (EC_{50} $125.41 \mu\text{g/ml}$)

เมื่อทำการวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดมะขามป้อม โดยวิเคราะห์ในรูปของปริมาณ total phenolics โดยวิธี Folin-Ciocalteu และประเมินเป็นค่า gallic acid equivalents (GAE) mg/g สารสกัด พบว่า total phenolics ของสารสกัดมะขามป้อม มีค่าเท่ากับ $358.92 \pm 2.09 \text{ mg GAE/g}$ สารสกัด ($n = 3$) ซึ่งจากปริมาณที่ได้ เมื่อเทียบกับรายงานซึ่งเคยมีมาแล้ว พบว่ามีค่าสูงกว่าจากรายงานของ Mayachiew และ Devahastin ปี 2008 ที่ได้ทำการศึกษา total phenolics ของสารสกัดจากเอทานอลในมะขามป้อมในประเทศไทย และพบว่าค่าเท่ากับ $290.4 \pm 0.7 \text{ mg GAE/g}$ สารสกัด อย่างไรก็ตามค่าที่ได้จากการศึกษานี้จะอยู่ในช่วงเดียวกับในรายงานของ Kumaran และ Karunakaran ในปี 2007 ซึ่งได้ศึกษาหา total phenolics ของสารสกัดเมทานอลจากพืชสกุล *Phyllanthus* sp. 5 ชนิดในประเทศอินเดีย พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในพืชสกุลนี้ มีค่าระหว่าง $171-380 \text{ mg GAE/g}$ สารสกัด เมื่อศึกษาจาก chromatogram fingerprint ของสารสกัด พบว่ามีองค์ประกอบหลัก คือ ascorbic acid ($19.78 \pm 4.11\% \text{ w/w}$) และ gallic acid ($3.14 \pm 0.51\%$)

w/w) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kumar และคณะ ในปี 2006 ซึ่งรายงานว่า gallic acid และ tannic acid เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดมะขามป้อมที่ได้จากการสกัดด้วย เอทานอล (70%) นอกจากนี้ ในปี 2006 Kumaran และ Karunakaran ได้รายงานว่า gallic acid เป็นองค์ประกอบหลักในของสารสกัดมะขามป้อมชั้น ethyl acetate ดังนั้น อาจจะสรุปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อมนั้นเป็นสารในกลุ่ม phenolic compounds และ ascorbic acid

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม ขึ้นอยู่กับปริมาณของ total phenolics ที่มีอยู่ในสารสกัด ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Kumar และคณะ ในปี 2006 โดยพบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อมที่เพิ่มขึ้นนั้นจะเป็นผลจากสารประกอบ phenolics ที่มีในสารสกัด ($r^2 = 0.74$) นอกจากนี้ความสัมพันธ์นี้ยังพบใน *P. debilis* ซึ่งเป็น *Phyllanthus* specie อื่น (Kumaran and Karunakaran, 2007)

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดมะขามป้อม อย่างไรก็ตาม อรุณพร และคณะ (2007) ได้เคยทำการทดสอบ cytotoxic activity ของสารสกัดมะขามป้อม โดยใช้ sulphorhodamine B (SRB) assay และทดสอบในเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ breast cancer cell line, cervical cancer cell line และ prostate cancer cell พบว่ามีเปอร์เซ็นต์โดยเฉลี่ยของการรอดชีวิตของเซลล์ 87.67, 70.60 และ 5.88% ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดมะขามป้อมจะมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด >50 , 30.13 และ 34.61 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ปกติ (MRC5) พบว่าสารสกัดมะขามป้อมมีค่า $IC_{50} >50 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งถือว่าไม่เป็พิษต่อเซลล์ปกติ

ในการศึกษาก่อนการตั้งตำรับ พบว่าสารสกัดมะขามป้อมมีความคงตัวดีต่ออุณหภูมิและความชื้น (45°C , 75%RH) โดยไม่พบว่าความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics ในสารสกัดในระยะเวลา 8-10 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมะขามป้อมมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากมีความคงตัวที่ดีแม้อยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิและความชื้นสูง นอกจากนี้ สารสกัดมะขามป้อมจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในสารละลายที่มี pH 5.5 สูงกว่า สารละลาย pH 7.0 ทั้งนี้เนื่องจากที่ pH 5.5 ซึ่งมีสภาวะเป็นกรดนั้น สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ ascorbic acid และ organic acids ในกลุ่ม phenolic compounds จะอยู่ในรูป unionized form เป็นส่วนใหญ่ จึงมี H อะตอมที่สามารถไปจับกับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าที่ pH 7.0 และ ในตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา (240 วัน) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ของทั้งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics ของสารสกัดมะขามป้อม ในสารละลายที่ pH 5.5 แต่ในสารละลายที่ pH 7.0 นั้น จะพบว่ามีแนวโน้มของการลดลงของทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolics อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ เนื่องจาก โดยทั่วไปสารกลุ่ม organic acids ซึ่งเป็นสารสำคัญ

ในมะขามป้อมส่วนใหญ่จะไม่มีค่าความคงตัวใน pH ที่เป็นกลางและด่าง ดังนั้นในพัฒนาผลิตภัณฑ์ของสารสกัดมะขามป้อมจำเป็นต้องมีการควบคุม pH ของตำรับให้เหมาะสม

การเตรียมลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมโดยใช้วิธี modified ethanol injection เพื่อเตรียมให้ได้ลิโปโซมที่มีลักษณะทางกายภาพ ขนาดอนุภาค และประสิทธิภาพในการเก็บกักสารที่เหมาะสมนั้น พบว่าส่วนประกอบในสูตรตำรับที่ต่างกัน จะมีผลให้ได้ลิโปโซมที่แตกต่างกัน ทั้งในแง่ของขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร สูตรตำรับที่มี CHOL เป็นส่วนประกอบจะมีลักษณะที่ไม่สวยงาม ขนาดอนุภาคใหญ่ และมีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารน้อย เมื่อเทียบกับสูตรตำรับที่มี Tween 80 เป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะให้ได้ลิโปโซมที่มีลักษณะที่ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดมะขามป้อมมีความเป็นขี้สูง จึงสามารถเข้ากับ Tween 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว ได้ดีกว่า และส่งผลให้ได้ตำรับที่มีลักษณะที่ดีกว่า เมื่อเทียบกับ CHOL ซึ่งเป็นสารไขมัน การใช้สารเพิ่มประจุลบ Deoxycholic acid (DA) จะทำให้ได้ลิโปโซมที่มีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณ total lipid จะทำให้ประสิทธิภาพในการเก็บ และขนาดของลิโปโซมเพิ่มขึ้นด้วยซึ่งอาจเป็นผลจากการที่อนุภาคของลิโปโซมมีขนาดใหญ่ขึ้น การอธิบายในเชิงทฤษฎีของผลจากปัจจัยต่างๆ ของส่วนประกอบในตำรับ ที่ทำให้ได้ลิโปโซมมีคุณลักษณะแตกต่างออกไป จะทำได้ยากทั้งนี้เนื่องสารสกัดมะขามป้อมที่ใช้เป็น crude extract ไม่ใช่สารบริสุทธิ์ จึงอาจมีปัจจัยอันเกิดจากองค์ประกอบอื่นที่มีจำนวนมากในสารสกัดร่วมด้วยซึ่งทำให้มีความยุ่งยากซับซ้อนและไม่สามารถอธิบายได้ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่าสูตรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมที่มีลักษณะดีที่สุด จะประกอบด้วย SPC:Tween80: DA ในอัตราส่วน 40:5:1 (โดยน้ำหนัก) และปริมาณไขมันทั้งหมด 100 $\mu\text{mole/ml}$ ซึ่งจะมีขนาดอนุภาค $341.53 \pm 58.38 \text{ nm}$ และมีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารสกัดมะขามป้อม $98.29 \pm 0.11\%$ จึงได้นำไปเตรียมเป็นโปรลิโปโซมต่อไป

เหตุผลที่ต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของโปรลิโปโซม เนื่องจากข้อจำกัดของลิโปโซมซึ่งเป็นรูปแบบคอลลอยด์หรือสารแขวนลอยของอนุภาคไขมันขนาดเล็ก จึงมักเกิดปัญหาด้านความไม่คงตัวทางกายภาพ เช่น การรวมตัว และการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค รวมทั้งปัญหาด้านความไม่คงตัวทางด้านเคมีของสารฟอสโฟลิปิดที่ไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และออกซิเดชัน ทำให้ไม่สามารถเก็บลิโปโซมไว้ได้นาน ซึ่งปัญหาเหล่านี้จะสามารถป้องกันและแก้ไขได้โดยการเตรียมให้อยู่ในรูปโปรลิโปโซมที่มีลักษณะผงแห้ง จึงคงตัวกว่า แต่เมื่อสัมผัสกับน้ำ เหนือ หรือของเหลวในร่างกาย จะสามารถเกิดเป็นลิโปโซมที่พร้อมใช้ได้ทันที การเตรียมโปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมทำได้โดยวิธี Film deposition on carriers โดยนำสูตรลิโปโซมมะขามป้อมที่ดีที่สุดมาเตรียม และทดลองใช้ sorbitol เป็นตัวกลางในการดูดซับสารไขมันต่างๆ และสารสกัด โดยได้ทำการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ sorbitol ที่สามารถดูดซับปริมาณไขมันทั้งหมด ซึ่งพบว่าจากสูตร

ลิโปโซม SPC:Tween80:DA สัดส่วน 40:5:1 (โดยน้ำหนัก) และปริมาณไขมันรวม 100 $\mu\text{mole/ml}$ และต้องใช้ sorbitol (180-250 μm) เป็น microporous carrier ในสัดส่วนของปริมาณไขมันรวมต่อ sorbitol เท่ากับ 1:8 โดยมีปริมาณของสารสกัดประมาณ 1.32% โดยน้ำหนัก ซึ่งผงโปรลิโปโซม ที่เตรียมได้ จะมี ลักษณะเป็นผงสีขาวครีม มีการไหลที่ดี และไม่จับตัวกันเป็นก้อน สามารถเกิดเป็น ลิโปโซมได้ง่ายเมื่อผสมกับน้ำ ขนาดอนุภาคของลิโปโซม ที่ได้จากการ reconstitute โปรลิโปโซม มะขามป้อม วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Photon Correlation Spectroscopy พบว่า มีการกระจายของอนุภาคอยู่ในช่วงที่กว้าง ตั้งแต่ระดับนาโนเมตร จนถึง จาก 10 ไมโครเมตร ทั้งนี้เป็นเพราะว่าลิโปโซมที่เกิดขึ้นจากจากโปรลิโปโซมนั้นเป็นการฟอร์มตัวขึ้นเองโดยธรรมชาติ และไม่มีแรงใดๆ เข้ามาช่วย จึงเป็นเหตุให้มีช่วงของขนาดที่กว้าง โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 530.3 ± 90.1 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามพบว่าขนาดอนุภาคจะสามารถลดลงได้ โดยการ sonication พบว่าเมื่อนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จะได้ลิโปโซมที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 312 ± 25.17 ($n = 3$) นอกจากนี้ การควบคุมขนาดของลิโปโซมอาจทำได้โดยการคัดหรือควบคุมขนาดอนุภาคของผงโปรลิโปโซม หรือผง sorbitol ที่ใช้ในการเตรียมโปรลิโปโซม

จากงานวิจัยที่เกี่ยวกับลิโปโซม เคยมีการรายงานว่าลิโปโซมที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 200 นาโนเมตรนั้น สามารถนำส่งสารที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เข้าสู่ผิวหนังได้ดี (Fresta and Puglisi, 1996; Schramlova *et al.*, 1997 and Sentjurc *et al.*, 1999) และ ยังมีรายงานอีกว่าลิโปโซมที่มีขนาดอนุภาคเล็กจะมีความคงตัวน้อยกว่าลิโปโซมที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ เนื่องจากลิโปโซมขนาดเล็กนั้น จะเกิดการแตกตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสผิวหนัง เกิดเป็นชั้นไขมันบนผิวหนัง ทำให้เกิดการขัดขวางการซึมผ่านของสารที่ชอบน้ำ หรือสารที่มีขั้วสูง เข้าสู่ผิวหนัง

ลิโปโซมที่ได้จากโปรลิโปโซมมะขามป้อม (0.2% w/v) มีประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร $83.34 \pm 10.16\%$ ($n = 3$) อย่างไรก็ตาม Hwang และคณะ (1997) ได้รายงานว่ามีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารของ reconstituted liposome ที่เกิดขึ้นนั้น จะขึ้นกับปริมาณน้ำที่ใช้ในการกระจายตัวของผงโปรลิโปโซมโดยหากใช้น้ำในปริมาณน้อยลงจะให้ประสิทธิภาพในการเก็บกักสารสูงขึ้น

จากการศึกษาความคงตัวของผงโปรลิโปโซมที่เก็บในตู้เย็น (4°C) อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$), และ 45°C โดยควบคุมความชื้นที่ 75%RH เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าผงโปรลิโปโซมที่เก็บในตู้เย็นและสภาวะปกติยังคงมีลักษณะร่วนซุยและไหลได้ดี โดยมีลักษณะพื้นผิวไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับเริ่มต้นเมื่อตรวจสอบภายใต้ SEM (100X) และสามารถเกิดเป็นลิโปโซมได้ทันทีเมื่อสัมผัสกับน้ำ อย่างไรก็ตามผงโปรลิโปโซมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง 45°C (75%RH) จะเริ่มเกิดการเยิ้มเหลวภายใน 50 วัน ซึ่งการเยิ้มเหลวนี้อาจเกิดได้เร็วขึ้นเมื่อสัมผัสกับความชื้นสูงขึ้น (80%RH) ทั้งนี้เนื่องจาก sorbitol สามารถดูดความชื้นได้ดี และเกิดการเยิ้มเหลวได้ง่าย อย่างไรก็ตามเมื่อประเมินประสิทธิภาพในการเก็บกักสารและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของลิโปโซมที่เกิดขึ้นจากผงโปรลิ

โปรไลโปโซมที่เก็บไว้ในสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าจะไม่มีความแตกต่างของทั้งประสิทธิภาพในการเก็บกักสาร และ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ในการเก็บรักษาโปรไลโปโซมจำเป็นต้องใส่ในภาชนะปิดสนิท เช่น ขวด aluminum ปิดสนิท และใส่สารกันชื้น (silica gel) ในภาชนะด้วย จะสามารถรักษาสภาพของโปรไลโปโซม ให้มีความคงตัวทางกายภาพได้ดี จากการศึกษา long term study เมื่อประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโปรไลโปโซมที่เกิดขึ้นจากผงโปรไลโปโซมที่เก็บไว้ในสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 12 เดือน พบว่าไม่มีความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งลักษณะทางกายภาพของผงโปรไลโปโซม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงโปรไลโปโซมที่มีความคงตัวดี

เนื่องจากว่าสารสกัดมะขามป้อมจะมีองค์ประกอบของสารฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น ascorbic acid, gallic acid และ polyphenolic compounds ต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นเพื่อแสดงให้เห็นว่าโปรไลโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมที่ได้จากโปรไลโปโซมสามารถที่จะนำส่งสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ผ่านชั้นไขมันของผิวหนังและแทรกซึมเข้าสู่ชั้นผิวหนังที่ลึกลงไปได้ ซึ่งจะเป็นการพิสูจน์ถึงประสิทธิภาพในการที่จะนำโปรไลโปโซมมะขามป้อมไปใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ซึ่งสารสำคัญควรสามารถแทรกซึมเข้าไปสู่ผิวหนังได้เพื่อทำให้สามารถออกฤทธิ์ในการปรับและฟื้นฟูสภาพผิวให้ดีขึ้นได้ เมื่อทำการทดลองศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังจากการปล่อยโปรไลโปโซมมะขามป้อมซึมผ่านผิวหนังนอกร่าง โดย Modified Franz Diffusion Cell พบว่าภายในเวลา 12 ชั่วโมง ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่นำส่งด้วย โปรไลโปโซม มีค่าสูงกว่าในสารละลายในน้ำ จึงเห็นได้ว่าโปรไลโปโซมสามารถที่จะนำส่งสารต้านอนุมูลอิสระ ของมะขามป้อมผ่านผิวหนังได้ดี เมื่อเทียบกับ control ทั้งในแง่ของปริมาณและอัตราในการนำส่ง ถึงแม้ว่าขนาดของโปรไลโปโซมในการศึกษานี้จะมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (> 300 nm) ก็ตาม ทั้งนี้อาจจะชี้ให้เห็นได้ว่าขนาดของโปรไลโปโซมอาจจะไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการนำส่งสารผ่านผิวหนังเสมอไป

Sentjurg และคณะในปี 1999 เคยรายงานไว้ว่า liposome ที่มีขนาดมากกว่า 200 นาโนเมตร จะมีประสิทธิภาพในการนำส่งสารพวก hydrophilic เข้าสู่ผิวหนังได้ดี ซึ่งก็สอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษานี้ นอกจากนี้เมื่อศึกษาการเกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังของกระด่า พบว่าโปรไลโปโซมที่เกิดจากโปรไลโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวของกระด่าเลย จากคุณสมบัติเหล่านี้ จะเห็นว่าโปรไลโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมนี้เหมาะสมที่จะประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ พบว่าครีมโปรไลโปโซมมะขามป้อมสามารถเตรียมได้ง่าย โดยการผสมผงโปรไลโปโซมกับยาพื้นครีม ลักษณะของเนื้อครีมที่ได้จะขึ้นกับชนิดของยาพื้นครีมที่ใช้ และปริมาณของโปรไลโปโซมที่ผสมในตำรับ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 5-10% ซึ่งจะได้ตำรับที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (70-90%) เมื่อนำตำรับที่มีความเข้มข้นของโปร

ลิโปโซมมะขามป้อม 5% มาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบเพื่อทำการประเมินความคงตัว โดยผ่านสภาวะเร่ง (Freeze-thaw cycles, 10 รอบ) พบว่าตำรับมีความคงตัวดีทั้งทางกายภาพและทางเคมี รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) และ 45°C เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าตำรับมีความคงตัวดีในแง่ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสรุปจะเห็นว่า โพร ลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมที่เตรียมขึ้นในการศึกษาวิจัยนี้ มีศักยภาพสูงในการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง และ/หรือ เครื่องสำอาง และอาจเป็นแนวทางในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชสมุนไพรได้

6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สารสกัดมะขามป้อมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยมีค่า EC_{50} $1.41 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งใกล้เคียงกับวิตามินซี ($1.33 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอาง สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดมะขามป้อมได้แก่ ascorbic acid ($19.78 \pm 4.11\%$ w/w), gallic acid ($3.14 \pm 0.51\%$ w/w) และ phenolic compounds อื่นๆ โดยพบว่าสารสกัดมะขามป้อม มีปริมาณ total phenolics ประมาณ 358.92 mg GAE/g สารสกัด พบว่า ปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัดนี้จะสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขามป้อม ($R^2 = 0.9762$) สารสกัดมะขามป้อมมีความคงตัวดีเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 45°C ในระยะเวลา 240 วัน ในรูปสารละลาย สารสกัดจะมีความคงตัวดี ที่ pH 5.5 (skin pH) ทั้งในแง่ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ total phenolic compounds ซึ่งแสดงให้เห็นศักยภาพในการนำสารสกัดไปพัฒนาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเวชสำอาง อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารสกัดมีสภาพความเป็นกรดค่อนข้างสูงจึงอาจมีผลต่อการระคายเคืองต่อผิวหนังและการดูดซึมเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้น้อย ในการวิจัยนี้จึงได้พัฒนาสารสกัดในรูปแบบโปรลิโปโซมที่มีความคงตัวสูงกว่าลิโปโซม และเมื่อผสมกับน้ำจะสามารถเกิดเป็นลิโปโซมได้ง่าย ซึ่งนอกจากจะสามารถเก็บกักสารไว้ภายในลิโปโซมแล้ว ยังสามารถช่วยในการดูดซึมของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเข้าสู่ผิวหนังและร่างกายได้ นอกจากนี้ลิโปโซมเองยังช่วยให้สภาพผิวหนังมีความชุ่มชื้นมากขึ้น ซึ่งเหมาะกับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเวชสำอาง

โปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อม สามารถเตรียมได้โดยวิธี Film deposition on carriers โดยสูตรตำรับจะประกอบด้วย สารสกัดมะขามป้อม 1%w/w; SPC:Tween80:DA สัดส่วน 40:5:1 (โดยน้ำหนัก) มีปริมาณไขมันรวม $100 \mu\text{mole/ml}$ และใช้ sorbitol ($180\text{--}250 \mu\text{m}$) เป็น microporous carrier ในสัดส่วนของปริมาณไขมันรวมต่อ sorbitol เท่ากับ 1:8 ซึ่งผงโปรลิโปโซม

ที่เตรียมได้ จะมีลักษณะเป็นผงสีขาวครีม มีการไหลที่ดี และไม่จับตัวกันเป็นก้อน สามารถเกิดเป็นลิโปโซมได้ง่ายเมื่อผสมกับน้ำ ซึ่งเป็นการฟอร์มตัวขึ้นเองโดยธรรมชาติ ทำให้มีการกระจายของขนาดลิโปโซมในช่วงที่กว้าง ตั้งแต่ระดับนาโนเมตร จนถึง จาก 10 ไมโครเมตร อย่างไรก็ตามพบว่าขนาดอนุภาคจะสามารถลดลงได้ โดย sonication หรือควบคุมขนาดของอนุภาค sorbitol ที่ใช้ในการเตรียม ลิโปโซมที่ได้ มีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารประมาณ 80% ข้อเสียของผงโปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อม คือ จะเกิดการเยิ้มเหลวได้เร็วเมื่อสัมผัสกับความชื้นสูงขึ้น (80%RH) ทั้งนี้เนื่องจาก sorbitol สามารถดูดความชื้นได้ดี จึงต้องเก็บในภาชนะปิดสนิท และควรใส่สารกันชื้น (silica gel) ภายในภาชนะด้วย จะสามารถรักษาสภาพความคงตัวของกายภาพได้

ลิโปโซมที่ได้จากการ reconstitute โปรลิโปโซมในน้ำ สามารถนำส่งสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ในสารสกัดมะขามป้อมผ่านผิวหนังได้ดี ทั้งในแง่ของปริมาณและอัตราการนำส่ง และไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวของกระต่ายเลย ซึ่งจากคุณสมบัติเหล่านี้ โปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมนี้มีความเหมาะสมที่จะประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ครีมลิโปโซมมะขามป้อมสามารถเตรียมได้ง่ายโดยการบดผสมผงโปรลิโปโซมกับยาพื้นครีม โดยลักษณะของเนื้อครีมที่ได้จะขึ้นกับชนิดของยาพื้นครีมที่ใช้ และปริมาณของโปรลิโปโซมที่ผสมในตำรับ โดยสรุปจะเห็นว่า โปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมที่เตรียมขึ้นในการศึกษาวิจัยนี้ มีศักยภาพสูงในการใช้เป็นวัตถุดิบหรือสารสำคัญเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง และ/หรือ เครื่องสำอาง และ เป็นแนวทางในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชสมุนไพรได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเชิงคลินิกในมนุษย์ต่อไปถึงประสิทธิภาพในการปรับปรุงและฟื้นฟูสภาพผิวของผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีโปรลิโปโซมของสารสกัดมะขามป้อมเป็นสารสำคัญ

7. เอกสารอ้างอิง

- สุพร นุชดำรง (2549) อนุมูลอิสระคุณและโทษต่อมนุษย์. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 34(2), 97-102.
- Ahmad, I., Mehmood, Z. and Mohammad, F. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 62: 183-193.
- Ahn, B.N., Kim, S.K., Shim, C.K. 1995. Proliposomes as an intranasal dosage form for the sustained delivery of propranolol. *Journal of Controlled Release*. 34: 203-210.
- Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2(4): 875-877.

- Anila, L. and Vijayalakshmi, N.R. 2002. Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. *Journal of Ethnopharmacology*. 79(1): 81-87.
- Arora, S., Kaur, K. and Kaur, S. 2003. Indian medicinal plants as a reservoir of protective phytochemicals. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis Supplement*. 1: 295-300.
- Asmawi, M.Z., Kankaanranta, H., Moilanen, E. and Vapaatalo, H. 1992. Anti-inflammatory activities of *Emblica officinalis* Gaertn. leaf extracts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 45(6): 581-584.
- Bandyopadhyay, S.K., Pakrashi, S.C. and Pakrashi, A. 2000. The role of antioxidant activity of *Phyllanthus emblica* fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*. 70:171-176.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C. 1965. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*. 13: 238-252.
- Banu, S.M., Selvendiran, K., Singh, J.P.V. and Sakthisekaran, D. 2004. Protective effect of *Emblica officinalis* ethanolic extract against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced genotoxicity in Swiss albino mice. *Human and Experimental Toxicology*. 23: 527-531.
- Basa, S.C. and Shrinivasulu, C. 1987. Constituents of leaves of *Phyllanthus emblica* Linn. *Journal of Natural Products*. 3: 13-14.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*. 78(2): 547-581.
- Benedetto, A.V. 1998. The environment and skin aging. *Clinics in Dermatology*. 16: 129-139.
- Betteridge, D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*. 49(2): 3-8.
- Bhattacharya, A., Chatterjee, A., Ghosal, S. and Bhattacharya, S.K. 1999. Antioxidant activity of active tannoid principles of *Emblica officinalis* (Amla). *Indian Journal of Experimental Biology*. 37(7): 676-680.
- Bhattacharya, S.K., Bhattacharya, A., Sairam, K. and Ghosal, S. 2002. Effect of bioactive tannoid. *Phytomedicine*. 9: 171-174.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.
- Bouwstra, J.A. and Honeywell-Nguyen, P.L. 2002. Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54 (1): 41-55.

- Chadha, K.L. 2003. *Handbook of horticulture*. New Delhi, India: ICAR Publications.
- Cevc, G., Blumeb, G., Schitzlein, A., Gebauer, D. and Paul, A. 1996. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 18: 349-378.
- Deamer, D. and Bangham, A.D. 1976. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta*. 443: 629-634.
- Desai, H.K., Gawad, D.H., Joshi, B.S., Parthasathy, P.C., Ravindranath, K.R., Saindane, M.T., Sidhave, A.R. and Viswanathan, N. 1977. Chemical investigation of Indian plants: Part X. *Indian Journal of Chemistry*. 15B 3: 291-293.
- El-Mekkawy, S., Meselhy, M.R., Kusumoto, I.T., Kadota, S., Hattori, M. and Namba, T. 1995. Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 43: 641-648.
- Fresta, M. and Puglisi, G. 1996. Application of liposomes as potential cutaneous drug delivery systems. *In vitro and in vivo investigation with radioactively labeled vesicles. Journal of drug targeting*. 4: 95-101.
- Ganter, S. and Volker, K.M. 1997. *Process for liposomes or proliposomes*. United States patent US 5,635,206.
- Ghosal, S., Tripathi, V.K. and Chauhan, S. 1996. Active constituents of *Emblica officinalis*: Part 1-The chemistry and antioxidative effects of two new hydrolysable tannins, emblicanin A and B. *Indian Journal of Chemistry*. 35B: 941-948.
- Harberson, J.F. and Spayd, S. 2006. Measuring Phenolics in the Winery. *Enology and Viticulture*. 57(3): 280-288.
- Harman, D. 1981. The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78(11): 7124-7128.
- Harman, D. 1998. Free radical theory of ageing: Applications. *Asia Pacific Heart*. 7(3): 169-177.
- Hui, B.W. and Sung, M.L. 1968. An examination of the Euphorbiaceae of Hong Kong. II.The occurence of epitaraxenol and other triterpenoids. *Australian Journal of Chemistry*. 21: 2137-2140.
- Hwang, B.Y., Jung, B.H., Chung, S.J., Lee, M.H. and Shim, C.K. 1997. *In vitro* skin permeation of nicotine from proliposomes. *Journal of Controlled Release*. 49: 177-184.

- Ihantola-Vormisto, A., Summanen, J., Kankaanranta, H., Vuorela, H., Asmawi, M.Z. and Moilanen, E. 1997. Anti-inflammatory activity of extracts from leaves of *Phyllanthus emblica*. *Planta Medica*. 63: 518-524.
- Itthipanichpong, C., Ousavaplangchai, L., Ramart, S., Thamaree, S. and Tankeyoon, M. 1987. Acute toxicity and subacute toxicity study of *Phyllanthus emblica*. *Chulalongkorn Medical Journal*. 31(5): 367-76.
- Jacob, A., Pandey, M., Kapoor, S. and Saroja, R. 1988. Effect of the Indian gooseberry (amla) on serum cholesterol levels in men aged 35-55 years. *Journal of Clinical Nutrition*. 42(11): 939-944.
- Jantan, I.B., Kang, Y.H., Suh, D.Y. and Han, B.H. 1996. Inhibitory effects of Malaysian medicinal plants on the platelet-activating factor (PAF) receptor binding. *Natural Product Sciences*. 2: 86-89.
- Jeena, K.J., Joy, K.L. and Kuttan, R. 1999. Effect of *Emblica officinalis*, *Phyllanthus amarus* and *Picrorrhiza kurroa* on *N*-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*. 136: 11-16.
- Jeena, K.J. and Kuttan, R. 2000. Hepatoprotective activity of *Emblica officinalis* and Chyavanaprash. *Journal of Ethnopharmacology*. 75: 65-69.
- Jenkins, G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. 123: 801-810.
- Kamidate, T., Kikuchi, N., Ishida, A. and Tani, H. 2005. Determination of peroxidase encapsulated in liposomes using homogentisic acid γ -lactone chemiluminescence. *Analytical sciences*. 21: 701-704.
- Karlsson, J. 1997. *Introduction to nutraology and radical formation*. In: Antioxidants and Exercise. Illinois: Human Kinetics Press. 1-143.
- Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K. and Yamane, Y. 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant product: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay and Folin-Ciocalteu Assay. *Agricultural and Food Chemistry*. 52(8): 2391-2396.
- Khan, M.T., Lampronti, I., Martello, D., Bianchi, N., Jabbar, S., Choudhuri, M.S., Datta, B.K. and Gambari, R. 2002. Identification of pyrogallol as an antiproliferative compound

- present in extracts from the medicinal plant *Emblica officinalis*: Effects on *in vitro* cell growth of human tumor cell lines. *Journal of Oncology*. 21: 187-192.
- Khanna, P. and Bansal, R. 1975. Phyllantidine and phyllantine from *Emblica officinalis* Gaertn. leaves, fruits, and *in vitro* tissue cultures. *Indian Journal of Experimental Biology*. 13: 82-83.
- Khopde, S.M., Priyadarsini, K.I., Mohan, H., Gawandi, V.B., Satav, J.G., Yakhmi, J.V., Banavaliker, M.M., Biyani, M.K. and Mittal, J.P. 2001. Characterizing the antioxidant activity of amla (*Phyllanthus emblica*) extract. *Current Science*. 81: 185-190.
- Kim, H.J., Yokojava, T., Kim, H.Y., Tohda, C., Rao, T.P. and Juneja, L.R. 2005. Influence of amla (*Emblica officinalis*) on hypercholesterolemia and lipid peroxidation in cholesterol fed rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 51: 413-418.
- Kozubek, A., Gubernator, J., Przeworska, E. and Stasiuk, M. 2002. Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes. *Acta Biochimica Polonica*. 47(3): 639-649.
- Kumar, G.S., Nayaka, H., Dharmesh, S.M. and Salimath, P.V. 2006. Free and bound phenolic antioxidants in amla (*Emblica officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 446-452.
- Kumaran, A. and Karunakaran, R.J. 2006. Nitric oxide radical scavenging active components from *Phyllanthus emblica*. *Plant Foods for Human Nutrition*. 61: 1-5.
- Kumaran, A. and Karunakaran, R.J. 2007. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*. 40: 344-352.
- Kusumoto, I.T., Nakabayashi, T., Kida, H., Miyashiro, H., Hattori, M., Namba, T. and Shimotohno, K. 1995. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. *Phytotherapy Research*. 9: 180-184.
- Laumas, K.R., and Seshadri, T.R. 1958. Chemical components of the bark of *Phyllanthus emblica*. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 17B: 167-168.
- Lin, M.T., Beal, M.F. 2003. The oxidative damage theory of aging. *Clinical Neuroscience Research*. 2: 305-315
- Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B. and Jiang, Y. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21: 219-228.

- Lee, K.Y., Weintraub, S.T. and Yu, B.P. 2000. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Society for Free Radical Biology and Medicine*. 28: 261-265.
- Machlin, L.J. and Bendich, A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*. 1: 441-445.
- Maitani, Y., Soeda, H., Wang, J. and Takayama, K. 2001. Modified ethanol injection method for liposomes containing β -sitosterol β -D-glucoside. *Journal of Liposome Research*. 11, 115-125.
- Mathur, R., Sharma, A., Dixit, V. and Varma, M. 1996. Hypolipidaemic effect of fruit juice of *Emblica officinalis* in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*. 50: 61-68.
- Mayachiew, P. and Devahastin, S. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT-Food Science and Technology* 41. 1153-1159
- Meisner, D., Mezei, M. 1995. Liposome ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 16: 75-93.
- Melero, A., Garrigues, T.M., Almudever, P., Martin Villodre, A., Lehr, C.M. and Schafer, U. 2008. Nortriptyline hydrochloride skin, absorption: Development of a transdermal patch. *Pharmaceutics and Biopharmaceutics (in press)*.
- Michel, C., Purmann, T., Mentrup, E., Seiller, E. and Kreuter, J. 1992. Effect of liposomes on percutaneous penetration of lipophilic materials. *International. Journal of Pharmaceutics*. 84: 93-105.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85: 231-237.
- Mokkhasmit, M., Swatdimongkol, K. and Satrawaha, P. 1971. Study on toxicity of Thai medicinal plants. *Bulletin of the department of medical sciences*. 12(2/4): 36-65.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2): 211-219.
- Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R. and Green, C.J. 2000. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent induce heme oxygenase-1 and protect endothelial cells against oxidative stress. *Society for Free Radical Biology and Medicine*. 28: 1303-1312.

- Nandi, P., Talukder, G. and Sharma, A. 1997. Dietary chemoprevention of clastogenic effects of 3,4-benzo (a) pyrene by *Emblica officinalis* Gaertn. fruit extract. *British Journal of Cancer*. 76: 1279-1283.
- New, R.R.C. 1990. *Liposomes: a practical approach*. New York, IRL Press. pp 1-132.
- Ning, M.Y., Guo, Y.Z., Pan, H.Z., Yu, H.M. and Gu, Z.W. 2005. Preparation and Evaluation of Proliposomes Containing Clotrimazole. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 53: 620-624.
- Nizzamuddin, M.D., Hoffman, J. and Larm, O. 1982. Fractionation and characterization of carbohydrates from *Emblica officinalis* Gaertn. fruit. *Swedish Journal of Agricultural Research*. 12: 3-7.
- Parmar, C. and Kaushal, M.K. 1982. *Emblica officinalis*. In: Wild Fruits. New Delhi, India: Kalyani Publishers. 26-30.
- Perianayagam, J.B., Sharma, S.K., Joseph, A. and Christina, A.J.M. 2004. Evaluation of antipyretic and analgesic activity of *Emblica officinalis* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*. 95(1): 83-85.
- Pillay, P.P. and Iyer, K.M. 1958. A chemical examination of *Emblica officinalis* Gaertn. *Current Science*. 3: 266-267.
- Pithayanukul, P. Chansri, N. Sugibayashi, K. 2002. The enhanceing effects of common pharmaceutical solvents on the in vitro skin permeation of estradiol. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 26(3-4):109-119.
- Pokharkar, S.M. 2005. Development and performance evaluation of aonla shredding machine. *Beverage and Food World*. 32(3): 52-53.
- Pramyothin, P., Samosorn, P., Pongshompoo, S. and Chaichantipyuth, C. 2006. The protective effects of *Phyllanthus emblica* Linn. extract on ethanol induced rat hepatic injury. *Journal of Ethnopharmacology*. 107(3): 361-364.
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290-4302.
- Raghu, V., Platel, K. and Srinivasan, K. 2007. Comparison of ascorbic acid content of *Emblica officinalis* fruits determined by different analytical methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20: 529-533.

- Ram, S. and Rao, T.R. 1976. Naturally occurring cytokinins in aonla (*Emblica officinalis*) fruit. *New Phytologist*. 76: 441-448.
- Ram, S. and Rao, T.R. 1978. Studies on naturally occurring gibberellins in aonla (*Emblica officinalis*) fruit. *New Phytologist*. 81: 513-519.
- Rieger, M.M. 1993. Oxidative reactions in and on skin: mechanism and prevention. *Cosmetics and Toiletries*. 108: 43-56.
- Roche Laboratories Inc. 2005. CellCep (Mycophenolate mofetil capsule and tablet). New Jersey. pp 1-35.
- Sabu, M.C. and Kuttan, R. 2002. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethnopharmacology*. 81: 155-160.
- Sairam, K., Rao, Ch.V., Babu, M.D., Kumar, K.V., Agrawal, V.K. and Goel, R.K. 2002. Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Emblica officinalis*: an experimental study. *Journal of Ethnopharmacology*. 82:1-9.
- Sankaranarayanan, J. and Jolly, C.I. 1993. Phytochemical, antibacterial and pharmacological investigations on *Momordica charantia* Linn., *Emblica officinalis* Gaertn. and *Curcuma longa* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*. 1: 6-13.
- Scartezzini, P., Antognoni, F., Raggi, M.A., Poli, F. and Sabbioni, C. 2006. Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation *Emblica officinalis* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*. 104: 113-118.
- Schramlova, J., Blazek, K., Bartackova, M., Mardesicova, L., Zizkovsky, V. and Hulinska, D. 1997. Electron microscopic demonstration of the penetration of liposomes through skin. *Folia Biologica*. 43: 165-169.
- Sentjurc, M., Vrhovnik, K. and Krisl, J. 1999. Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *Journal of Controlled Release*. 59: 87-97.
- Sharma, A. and Sharma, U. S. 1997. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 154: 123-140.
- Song, K.H., Chung, S.J. and Shim, C.K. 2002. Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin. *Journal of Controlled Release*. 84: 27-37.
- Subramanian, S.S., Nagarajan, S. and Sulochana, N. 1971. Euphorbiaceae. Flavonoids of some Euphorbiaceous plants. *Phytochemistry*. 10: 2548-2549.

- Summanen, J.O. 1999. A Chemical and Ethnopharmacological Study on *Phyllanthus emblica* (Euphorbiaceae) [dissertation]. Helsinki: University of Helsinki.
- Suresh, K. and Vasudevan, D.M. 1994. Augmentation of murine natural killer cell and antibody dependent cellular cytotoxicity activities of *Phyllanthus emblica*, a new immunomodulator. *Journal of Ethnopharmacology*. 44: 55-60.
- Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75(9): 4194-4198.
- Tasduq, S.A., Kaiser, P., Gupta, D.K., Kapahi, B.K., Jyotsna, S., Maheshwari, H.S. and Johri, R.K. 2005. Protective effect of a 50% hydroalcoholic fruit extract of *Emblia officinalis* against anti-tuberculosis drugs induced liver toxicity. *Phytotherapy Research*. 19(3): 193-197.
- Theresa, Y.M., Rajandurai, S., Sastry, K.N.S. and Nayudamma, Y. 1967. Studies on biosynthesis of tannins in indigenous plants XIII. Occurrence of a new gallotannin amlaic acid in amla leaves (*Phyllanthus emblica*). *Leather Science*. 14: 16-17.
- Theresa, Y.M., Sastry, K.N.S. and Nayudamma, Y. 1965. Studies on biosynthesis of tannins in indigenous plants XII. Occurrence of different polyphenolics in amla (*Phyllanthus emblica* Linn.). *Leather Science*. 12: 327-328.
- THP. 2007. *Thai Herbal Pharmacopoeia volume II*. Medical Sciences, Public Health, Nonthaburi, Thailand. 55-62.
- Venuganti, V.K., Perumal, P.O. 2008. Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendimer on skin permeation of 5-fluorouracil. *International Journal of Pharmaceutics*. 361: 230-238.
- Verumi, S. and Rhodes, C.T. 1995. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery system: a review. *Pharm. Acta. Helv*. 70: 95-111.
- Wang, C.J., Wang, J.M., Lin, W.L., Chu, C.Y., Chou, F.P. and Tseng, T.H. 2000. Protective effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 38: 411-416.
- Weder, H.G. and Zumbuehl, O. 1984. *The preparation of variably sized homogeneous liposomes for laboratory, clinical and industrial use by controlled detergent dialysis*. In: G. Gregoriadis (Ed.), *Liposome Technology*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL. 79-107.
- Wickens, A.P. 2001. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*. 128: 379-391.

- Wohlmuth, H. Triphala-a short review. 2007. *Information and research on botanical medicine*. 16: 1-8.
- Xiao, Y.Y., Song, Y.M., Chen, Z.P. and Ping, Q.N. 2006. Preparation of silymarin proliposome: A new way to increase oral bioavailability of silymarin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics*. 319: 162-168.
- Yadav, S.K. 1987. Protection against radiation induced chromosome damage by *Emblica officinalis* fruit extract. *Caryologia*. 40(3): 261-265.
- Yarosh, D.B. 2001. Liposomes in investigative dermatology. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*. 17: 203-212.
- Zhang, L.Z., Zhao, W.H., Guo, Y.J., Tu, G.Z., Lin, S. and Xin, L.G. 2003. Studies on chemical constituents in fruits of Tibetan medicine *Phyllanthus emblica*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 28(10): 940-943.
- Zhang, Y.J., Abe, T., Tanaka, T., Yang, C.R. and Kouno, I. 2001(a). Phyllanemblinins A-F, new ellagitannins from *Phyllanthus emblica*. *Journal of Natural Products*. 64:1527-1532.
- Zhang, Y.J., Nagao, T., Tanaka, T., Yang, C.R., Okabe, H. and Kouno, I. 2004. Antiproliferation activity of the mainconstituents from *Phyllanthus emblica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27(2): 251-255.
- Zhang, Y.J., Tanaka, T., Iwamoto, Y., Yang, C.R. and Kouno, I. 2000. Novel norsesquiterpenoids from the roots of *Phyllanthus emblica*. *Journal of Natural Products*. 63: 1507-1510.
- Zhang, Y.J., Tanaka, T., Iwamoto, Y., Yang, C.R. and Kouno, I. 2001(b). Novel sesquiterpenoids from the roots of *Phyllanthus emblica*. *Journal of Natural Products*. 64: 870-873.
- Zhang, Y.J., Tanaka, T., Yang, C.R. and Kouno, I. 2001. New phenolic constituents from the fruit juice of *Phyllanthus emblica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 49(5): 537-540.