ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

JARST Journal of Applied Research on Science and Technology
Rajamangala University of Technology Thanyaburi

การเตรียมนีโอโซมสารสกัดจากเม่าสำหรับผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

Preparation of Mao (*Antidesma thwaitesianum* Muell.Arg) Extract Niosomes for Skin Care Product

สุภกาญจน์ พรหมขันธ์* ชนิษฎา วงศ์บาสก์ และ ศุกฤชชญา เหมะธุลิน

Supakarn Promkhan* Chanidda Wongbasg and Sukrichaya Hemathulin

สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ.พังโคน จ.สกลนคร 47160

Department of Food Science and Technology, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan, Sakon Nakhon 47160, THAILAND

*Corresponding author e-mail: s_promkhan@hotmail.com

ARTICLE INFO

Article history:
Received: 10 November, 2021
Revised: 29 April, 2022
Accepted: 21 June, 2022
Available online: 24 June, 2022
DOI: 10.14456/jarst.2022.11

Keywords: Mao extract, niosome, skin care product

ABSTRACT

The objective of this research was to utilize the residual black Mao pulp and seeds from the production process of Mao products. In the niosome form of Mao extract and applied in skin lotion product. The extracting the residual black Mao pulp with 50% concentration of ethanol solution, it was found that 100 ml of the extract contained all phenolic compound, total anthocyanin and antioxidant capacity compared to ascorbic acid at the highest of 3,725.27 mg gallic acid, 28.57 mg cyanidin-3-glucoside and 3,570.33 mg ascorbic acid, respectively. The Mao extract was developed into niosomes by Chloroform film method and the particle sizes were reduced by Ultrasonic probe and Microfluidizer. The ratio of Tween 60 and cholesterol at 30:70 was used. The particle size of Mao extract niosome was 252.19 nm and polydispersity index (PDI) was 0.26. Niosomes colloid of 2% Mao extract had antioxidant activity at 84.11 mg ascorbic acid/ 100ml, total phenolic acid at 78.10 mg gallic acid/100ml, total anthocyanin at 3.78 mg cyanidin-3-glucoside/100ml and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) at 7,775.71 μmol

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

TE/100ml. From the application of Mao extract niosomes in skin care product (10%), it was showed that the product had antioxidant activity at 9.12 mg ascorbic acid/100ml, total phenolic acid at 41.86 mg gallic acid/100ml, ORAC at 678.04 µmol TE/100ml, total anthocyanin at 0.27 mg cyanidin-3-glucoside/100ml and anti-tyrosinase efficient (IC_{50}) less than 1,000 mg/ml.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้ประโยชน์กากและเมล็ดเม่าดำเศษเหลือจากกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากเม่า ในรูปแบบนีโอโซมของสารสกัดจากเม่าและประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว โดยการสกัดกากเม่าดำด้วยสารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50 พบว่าสารสกัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แอนโธไซยานินทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับวิตามินซีสูงสุด 3,725.27 mg gallic acid, 28.57 mg cyanidin-3-glucoside และ 3,570.33 mg ascorbic acid ตามลำดับ ทำการกักเก็บสารสกัดจากเม่าที่ได้ในรูปแบบนีโอโซมด้วยวิธี Chloroform film method ลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Ultrasonic probe และ Microfluidizer อัตราส่วนระหว่าง Tween 60 ต่อคอเลสเตอรอล ที่เหมาะสม คือ 30:70 ให้นีโอโซมของสารสกัดจากเม่าที่มีขนาดอนุภาค 252.19 nm มีค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) 0.26 โดยคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดเม่าความเข้มข้นร้อยละ 2 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 84.11 mg ascorbic acid/100ml ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 78.10 mg gallic acid/100ml ปริมาณแอนโธไซยานิน 3.78 mg cyanidin-3-glucoside/100ml และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (ORAC) 7,775.71 µmol TE/100ml จากการประยุกต์ใช้นีโอโซมสารสกัดจากเม่าในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว (ร้อยละ 10) พบว่า ผลิตภัณฑ์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 9.12 mg ascorbic acid/100ml ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 41.86 mg gallic acid/100ml มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (ORAC) 678.04 µmol TE/100ml ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด 0.27 mg cyanidin-3-glucoside/100ml และมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเล็กน้อยโดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 1,000 mg/ml

คำสำคัญ: สารสกัดเม่า นีโอโซม ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

บทนำ

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากขึ้น (1) รายงานว่า มีการใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการลดริ้วรอย เช่น นำสารสกัดจากผล Indian Barberry (*Berberis aristata* DC.) ซึ่งเป็นผลไม้ตระกูลเบอรี่ที่เป็นพืชท้องถิ่นของประเทศอินเดียและพบได้ทั่วไปในพื้นที่แถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ผสมกับน้ำผึ้งสามารถลดริ้วรอยจากแผลเป็น (2) ป้องกันการเกิดสิว (3) นอกจากนั้น (4) พบว่า สาร Berberine ที่สกัดได้จากผล *B. aristata* สามารถยับยั้งการอักเสบของผิวเนื่องจากรังสียูวี และกระบวนการเสื่อมสภาพของโปรตีนที่ผิวหนังและริ้วรอยที่เกิดจากวัย โดยเฉพาะเม่าที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้พบว่า สารสกัดจากเมล็ดและกากเม่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 97.32-130.02

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

mg gallic acid/g และพบว่าสารสกัดจากเมล็ดและกากเม่ามีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (Radical scavenging activity) โดยมีค่า IC_{50} (50% inhibition concentration) 0.85-1.21 µg/ml (5) สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์บำรุงผิวต้องคำนึงถึงคุณสมบัติที่มีผลต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ความคงตัว และการดูดซึมของสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ เป็นต้น (6) ดังนั้นการพัฒนาคุณสมบัติด้านความสามารถในการดูดซึมของสารต้านอนุมูลอิสระและรูปแบบของผลิตภัณฑ์จึงมีความสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์จากกากและเมล็ดเม่าดำในรูปแบบสารสกัด พัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพระบบการนำส่งและการกักเก็บสารในรูปแบบนีโอโซมของผลิตภัณฑ์บำรุงผิวผสมสารสกัดจากเม่า เพื่อให้สารต้านอนุมูลอิสระมีความคงตัวและสามารถซึมผ่านผิวหนังเข้าสู่ตำแหน่งการออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น

วิธีการดำเนินการวิจัย

เตรียมตัวอย่างกากและเมล็ดเม่า โดยนำกากเม่าและเมล็ดเม่าดำที่เหลือจากกระบวนการผลิตเครื่องดื่มมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 เมช บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ เก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การสกัดสารสกัดจากเม่า

ศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดจากกากและเมล็ดเม่า โดยศึกษาตัวแปร 2 ปัจจัย ได้แก่ ส่วนของเม่า 2 ชนิด (กากเม่าและเมล็ดเม่า) และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 3 ชนิด (น้ำ Deionized water (DI), เอทานอล ความเข้มข้น ร้อยละ 50 และร้อยละ 100) วางแผนการทดลองแบบ 2x3 Factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สกัดด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่อัตราเร็วคงที่ 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เหวี่ยงแยกส่วนใสด้วยเครื่องเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 (7) จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์คุณภาพของสารสกัดเม่า ได้แก่ ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีการต้านการเปลี่ยนแปลงของสาร DPPH (2, 2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) (8) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compound) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Reagent (9) และวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโธไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential (10)

การกักเก็บสารสกัดจากเม่าในรูปแบบนีโอโซม

ศึกษาการกักเก็บสารสกัดจากเม่าร้อยละ 2 ในรูปแบบ นีโอโซม โดยศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) กับคอเลสเตอรอล ในอัตราส่วน 30:70, 40:60, และ 50:50 เตรียมนีโอโซมด้วยวิธี Chloroform film method ดัดแปลงจาก (11) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ลดขนาดอนุภาคด้วย Ultrasonic probe ที่คลื่นความถี่ 40 amplitude เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกโลหะหนักที่อาจปะปนอยู่ในสารสกัดด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปลดขนาดอนุภาคอีกครั้งด้วยเครื่องลดขนาดอนุภาค (Microfluidize) ที่ความดัน 15,000 psi 4 รอบ เก็บรักษาในขวด สีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์คุณภาพนีโอโซมสารสกัดเม่า ได้แก่ ขนาดอนุภาคและความคงตัวของนีโอโซมด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (Zetasizer) ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการต้านการเปลี่ยนแปลงของสาร DPPH ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

Folin-Ciocalteu (9) และปริมาณสารแอนโธไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential (10)

การประยุกต์ใช้นีโอโซมสารสกัดเม่าในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

นำสารสกัดจากเม่าที่ผ่านการกักเก็บในรูปแบบนีโอโซมมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิวที่ผ่านการพัฒนาสูตร โดยมีส่วนผสมของคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดเม่าในปริมาณ ร้อยละ 10 ไม่ผ่านการแต่งสีและกลิ่น วิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่ ค่าสี L*, C* และ h° ด้วยเครื่องวัดสี (ColorFlex รุ่น CX 1498) ค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield (หัววัดเบอร์ 64S ความเร็วรอบ 10 rpm) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วย pH meter รุ่น pH 320 ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีการต้านการเปลี่ยนแปลงของสาร DPPH (8) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Reagent (9) ปริมาณสารแอนโธ ไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential (10) วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) โดยดัดแปลงจากวิธีของ (12) และวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachome โดยดัดแปลงจากวิธีของ (13) และค่าคุณภาพทางจุลินทรีย์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม 478-2555 (14)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

คุณภาพสารสกัดจากเม่า

จากการวิเคราะห์คุณภาพปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเม่า พบว่าส่วนประกอบของเม่าและตัวทำละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อค่าคุณภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดและกากเม่าดำ

ตัวอย่าง	สารละลายที่ใช้สกัด	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (mg Ascorbic acid/100ml)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg Gallic acid/100ml)	ปริมาณสารแอนโธไซยานิน (mg Cyanidin-3-glucoside/100ml)
เมล็ดเม่าดำ	น้ำ	932.11 ± 2.45^{d}	1,628.14 ± 0.61^{e}	4.57 ± 0.37^{c}
	เอทานอลร้อยละ 50	1,894.33 ± 8.53^{b}	2,888.94 ± 3.39^{b}	9.16 ± 0.94^{b}
	เอทานอลร้อยละ 100	971.67 ± 2.82^{d}	1,717.77 ± 1.17^{d}	2.23 ± 0.43^{d}
กากเม่าดำ	น้ำ	1,613.78 ± 2.58^{c}	2,412.98 ± 3.28^{c}	11.15 ± 0.11^{b}
	เอทานอลร้อยละ 50	3,570.33 ± 1.10^{a}	3,725.27 ± 1.54^{a}	28.57 ± 1.07^{a}
	เอทานอลร้อยละ 100	554.11 ± 0.94^{e}	605.74 ± 1.31^{f}	4.69 ± 0.06^{c}

หมายเหตุ $^{a-f}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลแต่ละชุดในแนวตั้งที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตัวเลขหลังเครื่องหมาย ± หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) ของข้อมูล

เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเม่า พบว่า สารสกัดจากกากเม่าดำที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คิดเป็น 3,570.33 mg ascorbic acid/100 ml ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดเม่าดำ แต่เมื่อสกัดด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 100 พบว่าสารสกัดจากเมล็ดเม่าดำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากกากเม่าดำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในเมล็ดเม่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้วสูงกว่าในกากเม่า (15) กล่าวว่าเมื่อระดับความเข้มข้น

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

ของตัวทำละลายมีความเป็นขั้วที่เหมาะสมกับตัวถูกละลายจะทำให้สามารถสกัดสารได้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากกากและเมล็ดเม่าดำ พบว่าสารสกัดจากกากเม่าดำที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอล ร้อยละ 50 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 3,725.27 mg gallic acid/100 ml โดยเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลที่เท่ากัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากกากและเมล็ดเม่ามีทิศทางเช่นเดียวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดีทั้งในระบบอาหารและร่างกาย (16) โดยสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงขึ้นด้วย (17) นอกจากนั้นสารประกอบ ฟีนอลิกยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และยังช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานดีขึ้น ซึ่งจะมีผลยับยั้งความเสื่อมสภาพของผิวหนังและยับยั้งการเกิดมะเร็งผิวหนังได้เช่นกัน (6)

ส่วนปริมาณสารแอนโธไซยานินทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี pH differential โดยสารสกัดจากเม่าดำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 523 นาโนเมตร แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่มี pH 1.0 และ 4.5 ที่ความยาวคลื่น 523 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด ซึ่งแสดงในรูปของ cyanidin-3-glucoside พบว่า สารสกัดจากกากเม่าดำที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารแอนโธไซยานินทั้งหมดสูงที่สุดคิดเป็น 28.57 mg cyanidin-3-glucoside/100 ml และเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลที่เท่ากัน พบว่า สารสกัดจากกากเม่าดำมีปริมาณสารแอนโธไซยานินสูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดเม่าดำในทุกตัวทำละลาย

จากการพิจารณาค่าคุณภาพของสารสกัดจากกากและเมล็ดเม่าดำด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่าสารสกัดจากกากเม่าดำที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 50 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 3,570.33 mg ascorbic acid/100ml ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 3,725.27 mg gallic acid/100ml และปริมาณสารแอนโธไซยานินทั้งหมด 28.57 mg cyanidin-3-glucoside/100ml สูงที่สุด ซึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทในการป้องกันเซลล์ผิวหนังจากการถูกทำลาย จึงใช้ป้องกันหรือชะลอความเหี่ยวย่นของผิวหนังได้ (18) อนุมูลอิสระที่มีผลต่อโครงสร้างของผิวหนังที่พบเป็นส่วนใหญ่คือ Reactive Oxygen Species (ROS) โดย พบว่า ร้อยละ 80 ของอนุมูลอิสระชนิดนี้เกิดจากรังสี UV ทั้งรังสี UVA คิดเป็นร้อยละ 95-98 และรังสี UVB ร้อยละ 2-5 (19) ROS จะส่งผลต่อความกระชับตึง และความยืดหยุ่นของผิว ซึ่งเป็นสาเหตุของผิวแห้งเสียและการเกิดริ้วรอย (20) สารแอนโธไซยานินที่ได้จากผลไม้ตระกูลเบอร์รี่มีความสามารถในการป้องกันรังสี และป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ (21) โดยมีการนำสารสกัดจากผลไม้ตระกูลเบอรรี่ผสมในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวทั้งในครีมกลางวันและกลางคืน (6) รายงานว่าสารในกลุ่มแอนโธไซยานิน มีผลทำให้สุขภาพผิวดีขึ้นและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งผิวหนังอีกด้วย ดังนั้นการใช้สารสกัดจากกากเม่าในผลิตภัณฑ์โลชันบำรุงผิวอาจช่วยเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระให้แก่ผลิตภัณฑ์ได้ เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเม่า จึงเลือกสารสกัดจากกากเม่าดำที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 50 ไปกักเก็บสารในรูปแบบนีโอโซมในขั้นตอนต่อไป

การกักเก็บสารสกัดจากเม่าในรูปแบบนีโอโซม

การกักเก็บสารสกัดในรูปแบบนีโอโซมและลดขนาดของอนุภาคด้วยคลื่นความถี่สูงร่วมกับแรงดันสูง ทำให้สารเกิดการแตกตัวแล้วกลับมาเรียงตัวใหม่ โดยมีขนาดเล็กลงและมีอนุภาคที่สม่ำเสมอมากขึ้น โดยอนุภาค

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

คอลลอยด์นีโอโซมที่ได้มีขนาด 145.18 - 252.19 นาโนเมตร มีสีม่วงเข้มและไม่ตกตะกอน และเมื่อวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพของคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำ พบว่า อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Tween 60) ต่อคอเลสเตอรอล ที่แตกต่างกันมีผลต่อขนาดของอนุภาคและค่าการกระจายตัว (PDI) ของคอลลอยด์นีโอโซม แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังตารางที่ 2 พบว่า คอลลอยด์ นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 145.18-252.19 นาโนเมตร โดยนีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าที่ใช้อัตราส่วนระหว่าง Tween 60 ต่อ คอเลสเตอรอล ในอัตราส่วน 30:70 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยใหญ่ที่สุด คือ 252.19 นาโนเมตร และอัตราส่วน 50:50 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กที่สุด คือ 145.18 นาโนเมตร ทั้งนี้เนื่องจากคอเลสเตอรอลมีผลในการเพิ่มขนาดและประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร (22) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (23) ที่ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 61) กับคอเลสเตอรอล ต่อคุณสมบัติของนีโอโซมโปรตีนไหม พบว่า อนุภาคของนีโอโซมโปรตีนไหมที่ใช้อัตราส่วน 30:70 มีขนาดอนุภาคใหญ่ที่สุด คือ 92.42 นาโนเมตร รองลงมาคืออัตราส่วน 40:60 และ 50:50 โดยมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 64.82 และ 60.60 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของอนุภาค (Polydispersity Index; PDI) ที่เป็นการวัดค่าทางกายภาพที่นิยมใช้เปรียบเทียบคุณสมบัติของอนุภาคนีโอโซม เป็นตัวชี้วัดความสม่ำเสมอของน้ำหนักและขนาดโมเลกุลในคอลลอยด์ ซึ่งถ้าอนุภาคนีโอโซมมีค่าการกระจายตัวของอนุภาคต่ำ แสดงว่าอนุภาคของนีโอโซมที่ได้มีความสม่ำเสมอ ขนาดใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่ และมีความคงตัวของคอลลอยด์นีโอโซมสูง จากผลการทดลอง พบว่า ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ของคอลลอยด์นีโอโซมที่เตรียมได้ค่อนข้างต่ำ อยู่ในช่วง 0.26-0.63 โดยนีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำที่ใช้อัตราส่วนระหว่าง Tween 60 ต่อ คอเลสเตอรอล เท่ากับ 30:70 มีค่าการกระจายตัวต่ำที่สุด คือ 0.26 แสดงว่าอนุภาคในระบบคอลลอยด์มีความสม่ำเสมอทำให้ระบบคอลลอยด์มีความคงตัวมากที่สุด รองลงมาคืออัตราส่วน 40:60 และ 50:50 ที่มีค่าการกระจายตัวของอนุภาค เท่ากับ 0.44 และ 0.63 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (23) ที่พบว่า คอลลอยด์นีโอโซมโปรตีนไหมที่มีอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 61) กับ คอเลสเตอรอล 30:70 มีค่าการกระจายตัวต่ำที่สุด คือ 0.22 ต่ำกว่าที่อัตราส่วน 40:60 และ 50:50 ที่มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 0.33 และ 0.47 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่าคุณภาพทางกายภาพของคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ใช้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) : คอเลสเตอรอล ที่ระดับต่าง ๆ

อัตราส่วน Tween 60 : คอเลสเตอรอล	ขนาดอนุภาค (nm)	การกระจายตัวของอนุภาค (PDI)
30:70	252.19 ± 4.83^{c}	0.26 ± 0.02^{a}
40:60	204.28 ± 5.97^{b}	0.44 ± 0.20^{b}
50:50	145.18 ± 6.23^{a}	0.63 ± 0.10^{c}

หมายเหตุ $^{a-c}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลแต่ละชุดในแนวตั้งที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตัวเลขหลังเครื่องหมาย ± คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของข้อมูล

และจากการวิเคราะห์ค่าคุณภาพทางเคมีของคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่า อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) ต่อ คอเลสเตอรอลที่แตกต่าง

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

กัน มีผลต่อค่าคุณภาพทางเคมี ได้แก่ ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารแอนโธไซยานิน ที่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังตารางที่ 3 พบว่า ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำอยู่ในช่วง 73.69-84.11 mg ascorbic acid/100ml โดยนีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำที่อัตราส่วนระหว่าง Tween 60 ต่อ คอเลสเตอรอล เท่ากับ 30:70 มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 84.11 mg ascorbic acid/100ml และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด 78.10 mg gallic acid/100ml ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากกากเม่าที่ไม่ผ่านการกักเก็บในรูปแบบนีโอโซม (Control) ส่วนปริมาณสารแอนโธไซยานิน พบว่า นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำที่อัตราส่วนระหว่าง Tween 60 ต่อคอเลสเตอรอล เท่ากับ 30:70 และ 40:60 มีปริมาณสารแอนโธไซยานินสูงที่สุด 3.78 และ 3.75 mg cyanidin-3-glucoside/100ml ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการกักเก็บในรูปแบบนีโอโซมเช่นกัน โดยสารสกัดจากเม่าที่ผ่านการกักเก็บในรูปแบบนีโอโซม ที่ใช้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) ต่อ คอเลสเตอรอล เท่ากับ 30:70 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารแอนโธไซยานินสูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากคอเลสเตอรอลมีคุณสมบัติในการเพิ่มความคงตัวและป้องกันการรั่วไหลของสารที่กักเก็บในอนุภาคนีโอโซม โดยประสิทธิภาพในการกักเก็บสารของอนุภาคนีโอโซมจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของคอเลสเตอรอลที่เพิ่มขึ้น (24) นอกจากนั้นคอเลสเตอรอลยังมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บยา เนื่องจากช่วยเพิ่มความแข็งแรงของผนังอนุภาคนีโอโซม และลดอัตราการปลดปล่อยตัวยาลง โดย (22) และ (23) ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 61) กับ คอเลสเตอรอลต่อคุณสมบัติของนีโอโซมโปรตีนไหม พบว่า ผงนีโอโซมโปรตีนไหมที่เตรียมได้จากอัตราส่วนระหว่าง Tween 61 ต่อคอเลสเตอรอล 30:70 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า SC_{50} เท่ากับ 75.02 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร เมื่อเทียบกับในอัตราส่วน 40:60 และ 50:50 ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (SC_{50}) เท่ากับ 84.22 และ 111.57 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าที่อัตราส่วน 30:70 มีปริมาณร้อยละของโปรตีนสูงสุด คือ ร้อยละ 2.52 ในขณะที่อัตราส่วน 40:60 และ 50:50 มีโปรตีนร้อยละ 2.37 และ 2.06 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำความเข้มข้น ร้อยละ 2 ที่ใช้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) : คอเลสเตอรอล ที่ระดับต่างๆ เทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการกักเก็บในรูปแบบนีโอโซม

อัตราส่วน Tween 60 : คอเลสเตอรอล	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (mg Ascorbic acid/100ml)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg Gallic acid/100ml)	ปริมาณสารแอนโธไซยานิน (mg Cyanidin-3-glucoside/100ml)
Control	80.82± 3.47^{b}	74.13± 0.94^{b}	3.49± 0.01^{b}
30:70	84.11± 1.46^{a}	78.10± 0.39^{a}	3.78± 0.02^{a}
40:60	80.53± 2.03^{b}	74.27± 0.14^{b}	3.75± 0.02^{a}
50:50	73.69± 1.57^{c}	66.85± 0.63^{c}	3.46± 0.02^{b}

หมายเหตุ $^{a-c}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลแต่ละชุดในแนวตั้งที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตัวเลขหลังเครื่องหมาย ± คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของข้อมูล

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

เมื่อพิจารณาค่าปัจจัยทางคุณภาพของคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำ ได้แก่ ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารแอนโธไซยานิน พบว่า อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) ต่อคอเลสเตอรอลที่เหมาะสมในการเตรียมนีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำสำหรับการศึกษาครั้งนี้ คือ 30:70 เนื่องจากคอลลอยด์นีโอโซมที่ได้ มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคต่ำที่สุด แสดงถึงขนาดของอนุภาคที่สม่ำเสมอ ทำให้ระบบคอลลอยด์มีความคงตัว นอกจากนั้นยังพบว่า คอลลอยด์นีโอโซมที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิก และปริมาณสารแอนโธไซยานินสูงที่สุด และจากการตรวจวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ORAC ซึ่งเป็นการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่อาศัยหลักการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอม โดยสารต้านออกซิเดชันจะกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล ทำให้ Fluorescent probe คงตัวมากขึ้น การเรืองแสงฟลูออเรสเซนท์คงตัวอยู่ได้นานขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่มีสารต้านออกซิเดชัน (25) พบว่า คอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดจากกากเม่าดำที่ใช้อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) ต่อคอเลสเตอรอลเท่ากับ 30:70 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน 7,775.71 µmol TE/100ml

การประยุกต์ใช้นีโอโซมสารสกัดจากเม่าในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

นำคอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดเม่าที่สกัดด้วยสารละลาย เอทานอลร้อยละ 50 และมีอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) ต่อคอเลสเตอรอลเท่ากับ 30:70 ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว พบว่า ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวมีสีชมพูอมน้ำตาลซึ่งเป็นสีธรรมชาติของนีโอโซมสารสกัดจากเม่า มีค่าความหนืด 13,964 cP ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5.12 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 9.12 mg ascorbic acid/100ml ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 41.86 mg gallic acid/100ml ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (ORAC) 678.04 µmol TE/100ml ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด 0.27 mg cyanidin-3-glucoside/100ml และความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเล็กน้อยโดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 1,000 mg/ml ส่วนคุณภาพทางจุลินทรีย์ พบว่า ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวผสมสารสกัดจากเม่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม โดยไม่พบเชื้อจุลินทรีย์สำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus areus*, *Candida albicans* และ *Clostridium* spp. ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 478-2555 (14)

สรุปผล

สารสกัดที่เหมาะสำหรับนำมากักเก็บในรูปแบบนีโอโซมและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิวผสมสารสกัดจากเม่า คือ สารสกัดจากกากเม่าดำที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 3,570.33 mg ascorbic acid/100 ml ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 3,725.27 mg gallic acid/100ml ปริมาณสารแอนโธไซยานินทั้งหมด 28.57 mg cyanidin-3-glucoside/100ml และเมื่อกักเก็บสารสกัดจากกากเม่าดำความเข้มข้นร้อยละ 2 ในรูปแบบนีโอโซมด้วยวิธี Chloroform film method โดยมีอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุผิว (Tween 60) ต่อ คอเลสเตอรอลที่เหมาะสม คือ 30:70 คอลลอยด์นีโอโซมสารสกัดเม่ามีขนาดอนุภาค 252.19 นาโนเมตร ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ค่อนข้างต่ำ คือ 0.26 และมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดจากเม่าที่ไม่ผ่านการกักเก็บในรูปแบบ นีโอโซม โดยมีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (ORAC) 7,775.71 µmol TE/100ml ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 84.11 mg ascorbic acid/100ml ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

78.10 mg gallic acid/100ml ปริมาณสารแอนโธไซยานิน 3.78 mg cyanidin-3-glucoside/100ml และเมื่อประยุกต์ใช้นีโอโซมสารสกัดจากเม่าในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว (ร้อยละ 10) พบว่าผลิตภัณฑ์มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (ORAC) 678.04 µmol TE/100ml ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 9.12 mg ascorbic acid/100ml ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 41.86 mg gallic acid/100ml ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด 0.27 mg cyanidin-3-glucoside/100ml และมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเล็กน้อยโดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 1,000 mg/ml และไม่พบเชื้อจุลินทรีย์สำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus areus*, *Candida albicans* และ *Clostridium* spp.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ ขอขอบคุณ รศ.ดร.วัชรี คุณกิตติ และ ผศ.ดร.สุพัตรา ปรศุพัฒนา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางการทำวิจัยจนแล้วเสร็จ

เอกสารอ้างอิง

1. Mukherjee PK, Niladr Mi, Neelesh KN, Birendra KS. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. J Phytomedicine. 2011;19 (1):64-73.
2. Nadkarni AK. Indian Materia Medical (Revised and Enlarged). vol.II. 3rd ed. Popular Book Depot: Bombay; 1976.
3. Mamgain RK. Acne Vulgaris and its Treatment by Indigenous Drugs SK34 (Purim) and SK-235 (Clarina). the Antiseptic. 2000;97(3):76-8.
4. Kim S, Chung JH. Berberine prevents UV-induced MMP-1 and reduction of type I procollagen expression in human dermal fibroblasts. Phytomedicine J. 2008;15(9): 749–53.
5. Puangpronpitag D, Areejitranusorn P, Boonsiri P, Suttajit M Yongvanit P. Antioxidant activities of polyphenolic compounds isolated from *Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg. seeds and marcs. J Food Sci. 2008;73(9):C648-53.
6. Panich A. Antioxidants and the inhibition of skin aging. In: Angwanith V, editor. Free radicals and antioxidant. Health Innovation Publishing; 2012. Thai.
7. Promkhan S, Wongbasg C, kumpita A. [Utilization of black Mao pomace extract in hand cleansing gel product]. JARST. 2018;17(1):23-32. Thai.
8. Karakaya S, El SN, TAS AA. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. International J Food Sciences and Nutrition. 2001;52(6):501–8.
9. Daduang J, Vichitphan S, Daduang S, Hongsprabhas P, Boonsiri P. High phenolics and antioxidant of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activities. AFR J Pharm Pharmaco. 2011;5(5): 608-15.
10. Giusti MM, Wrolstad RE. Charcterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectrocscopy. In: Wrolstad RE, editor. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New

York: John Wiley & Sons Inc.; 2001. p. F1.2.1-F1.2.13.

11. Manosroi A, Wongtrakul V, Manosroi J, Sakai H, Sugawara F, Yuasa M, et al. Characterization of vesicles prepares with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. J Colloids Surfaces. 2003;30:129-38.
12. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Haward L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity ($ORAC_{FL}$)) of plasma and other biological and food samples. J Agr Food Chem. 2003;51:3273-9.
13. Long ZP, Park HR, Park YK, Lee SK, Park JH, Park MK. Mushroom tyrosinase inhibition activity of some chromones. J Chem Pharm Bull. 2002;50(3):309-11.
14. Thai Industrial Standards Institute. Standards industry of skin products. TIS. 478-2555. 2555. Thai.
15. Loiphiman P, Phasakul T, Mongkoithai R. Comparison of antioxidant active and total phenolic compounds of fruit peels. Agr Sci J. 2011;42(2):385-8.
16. Robards, K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruit. J Food Chem. 1999:66(4):401-36.
17. Roungjacpetch A. Effect of Indian Gooseberry Browning and Spanish Plum Maturity on Total Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activities. [Master of Science Thesis]. Bangkok: kasetsart University; 2007. Thai.
18. Leelapornphisit P. Cosmetics for the skin. 2nd ed. Odeon store Publishing house; 2008. P.264 Thai.
19. Flober-Muller H, Champ S, Kandzia C, Jung K, Seifert M, Herrling T. Strategy for Efficient Prevention from photo-ageing. SOFW J. 2008:134(8):23-32.
20. Mishra AK, Mishra A, Chattopadhyay P. Herbal cosmeceuticals for photoprotection from Ultraviolet B radiation. Trop J Pharm Res. 2011:10(3):351-60.
21. Kusumawati I, Indrayanto G. Natural Antioxidants in Cosmetic. In: Atta-ur-Rahman, editor. Studies in Natural Products. Oxford United Kingdom: Elsevier press; 2013. p. 485-505.
22. Yoshida H, Lehr CM, Kok W, Junginger HE, Verhoef JC, Bouwistra JA. Niosomes for oral delivery of peptide drugs. J Controlled Release. 1992;21:145-54.
23. Pongphisut S. Developments of anti-aging cream product with silk protein niosomes. [Master of Science Thesis]. Bangkok: kasetsart University; 2011. Thai.
24. Agarwal R, Katare OP, Vyas SP. Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol. Int J Pharmaceut. 2001;228:43–52.
25. Porasupatthana S. Measurement technique of Oxidative Stress. In: Angwanith V, editor. Free radicals and antioxidant. Health Innovation Publishing; 2012. p.129-92. Thai.