

การพัฒนานาโนอิมัลชันบรรจุน้ำมันยางนาสำหรับผิวหนัง

ธนวัฒน์ โปธา¹, ภาณุมาศ ภูมาศ², ดวงกมล คักดีเลิศสกุล^{3*}

¹นักศึกษาระดับปริญญาตรี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

²อาจารย์, กลุ่มวิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

³รองศาสตราจารย์, สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** รศ.ดร.ดวงกมล คักดีเลิศสกุล สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทร. 081-6003272 อีเมล: sduangk@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การพัฒนานาโนอิมัลชันบรรจุน้ำมันยางนาสำหรับผิวหนัง

ธนวัฒน์ โปธา¹, ภาณุมาศ ภูมาศ², ดวงกมล คักดีเลิศสกุล^{3*}

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2565; 18(2) : 63-75

รับบทความ: 20 กันยายน 2564

แก้ไขบทความ: 12 เมษายน 2564

ตอบรับ: 2 มิถุนายน 2565

นาโนอิมัลชันเป็นระบบการนำส่งที่ถูกนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการแทรกผ่านผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม และป้องกันการสลายตัวของสารสำคัญ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตั้งตำรับ และศึกษาลักษณะของตำรับนาโนอิมัลชันที่เตรียมได้ของน้ำมันยางนา ด้วยวิธีใช้พลังงานสูง และประเมินความคงสภาพทางกายภาพของตำรับ วิธีการดำเนินการวิจัย: ชนิดของส่วนประกอบและสัดส่วนที่ใช้ในการตั้งตำรับถูกนำมาสร้างแผนภาพภูมิภาคไตรภาคเพื่อหาบริเวณที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชัน นำตำรับที่ได้มาบรรจุน้ำมันยางนาร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก จากนั้นวัดขนาด การกระจายตัว รูปร่างของอนุภาคนาโนอิมัลชัน และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคในตำรับ รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของน้ำมันยางนา และตำรับนาโนอิมัลชัน **ผลการศึกษา:** ตำรับนาโนอิมัลชันที่เหมาะสมประกอบด้วยไอโซโพรพริล ไมริสเททเป็นวัฏภาคน้ำมัน tween® 60 เป็นสารลดแรงตึงผิว เอทานอลเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม (ในสัดส่วน 2:1) และวัฏภาคน้ำ เมื่อเติมน้ำมันยางนาลงในตำรับนาโนอิมัลชันพบว่าตำรับที่ได้มีลักษณะใส อนุภาคเป็นทรงกลมและมีการกระจายขนาดของอนุภาคใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 29-162 นาโนเมตร ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของตำรับเท่ากับ -9 ถึง -24 มิลลิโวลต์ ตำรับนาโนอิมัลชันมีค่าพีเอชใกล้เคียงกับผิวหนัง นอกจากนี้น้ำมันยางนามีค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ร้อยละ 50 เท่ากับ 16.14 ± 0.97 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.034 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่บรรจุอยู่ในอนุภาคร้อยละ 77.57-90.26 และเมื่อนำไปทดสอบความคงสภาพด้วยวิธีอุณหภูมิร้อน-สลับเย็น 6 รอบ พบว่าตำรับมีความคงสภาพดี มีลักษณะใส ไม่เกิดการแยกชั้น **สรุปผลการศึกษา** นาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนามีความคงสภาพที่เหมาะสม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี วิธีการที่นำรูปแบบการนำส่งสารสำคัญด้วยนาโนอิมัลชันและน้ำมันยางนามารวมกันที่แสดงให้เห็นในการศึกษานี้ สามารถนำมาพัฒนาเป็นตำรับนาโนอิมัลชันเพื่อใช้ในการผลิตเป็นเครื่องสำอางในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ: ยางนา, น้ำมันยางนา, นาโนอิมัลชัน



Development of Nanoemulsion Containing Yang-Na Oleoresin for Topical Delivery

Thanawat Pota¹, Panumart Phumart², Duangkamon Sakloetsakun^{3*}

¹Undergraduate student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University Khon Kaen 40002, Thailand

²Ph.D., Lecturer, Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

³Ph.D., Associate Professor, Division of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*Corresponding author: Duangkamon Sakloetsakun, Division of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand Tel. +66 81-6003272 E-mail: sduangk@kku.ac.th

Abstract

Development of Nanoemulsion Containing Yang-Na Oleoresin for Topical Delivery

Thanawat Pota¹, Panumart Phumart², Duangkamon Sakloetsakun^{3*}

IJPS, 2022; 18(2) : 63-75

Received: 20 September 2021

Revised: 12 April 2022

Accepted: 2 June 2022

Nanoemulsions are one of drug delivery systems, which can enhance transdermal permeation, especially via stratum corneum, and improve the stability of active compounds. This study aimed to formulate and characterize nanoemulsions containing Yang-na oleoresin using high energy method, as well as evaluate physical stability of the formulations. **Materials and methods:** Pseudo-ternary phase diagrams were constructed to identify the nanoemulsion regions. 2% (w/w) of Yang-na oleoresin was incorporated to obtained formulations. The size, size distribution, morphology of droplets, and zeta potential of the nanoemulsions were determined. In addition, antioxidant activity and total phenolic compounds of oleoresin and the formulations were investigated. **Results:** The optimized nanoemulsions consists of isopropyl myristate as oil phase, tween® 60 as surfactant, ethanol as co-surfactant (in a mixing ratio of 2: 1) and water. In the presence of Yang-na oleoresin in the formulations, it was found that obtained nanoemulsions were clear with a spherical in shape and narrow distribution. The size ranged between 29-162 nm and zeta potential were -9 to -24 mV. The pH values of the formulations were relatively to the physiological pH of skin. Moreover, results showed that the 50% inhibitory concentration of Yang-na oleoresin was 16.14±0.97 mg/ml from DPPH assay, and total phenolic compounds was 0.034 mg GAE/ml. Encapsulation efficiency (%) of the nanoemulsions was 77.57% - 90.26%. In addition, after 6 cycles of heating-cooling cycle stability testing, the nanoemulsions were clear and no phase separation was observed. **Conclusions:** Nanoemulsions containing Yang-na oleoresin revealed suitable stability and potential antioxidant properties. A strategy to combine nanoemulsions and Yang-na oleoresin described in the study would therefore be a valuable approach to develop a topical skin cosmetic in an industrial scale.

Keywords: Yang-na, Oleoresin, Nanoemulsions

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนแปลงโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ สร้างความเสียหายให้แก่สารเคลือบเซลล์ (extracellular matrix) ได้แก่ การลดลงของการสร้างคอลลาเจน การเพิ่มการแตกหักของคอลลาเจน และเป็นสาเหตุของกระบวนการชราภาพ (aging process) (Kammeyer and Luiten, 2015) สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน (อนุพันธ์ของวิตามินเอ) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระทั้งที่เกิดขึ้นในร่างกาย และที่ได้รับจากภายนอก ช่วยลดการเสื่อมสภาพของผิวและการเกิดริ้วรอยได้ (Sutin, 2016) โดยการศึกษาของ Chen และคณะ (2012) พบว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบทา (topical antioxidant) สามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระที่เกิดจากการได้รับรังสียูวีเอ (UVA) และเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในชั้นผิวหนังได้ (Chen et al., 2012) ปัจจุบันได้มีการนำสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรมาทำการศึกษาและพัฒนามากขึ้น เพราะนอกจากพืชสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีฤทธิ์ด้านอื่นๆ อีกเช่น ด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย หรือด้านการอักเสบ เป็นต้น

ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don) เป็นพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์หลากหลาย เช่น เรซิน คูมาริน (coumarin) และยางไม้ (dammar) นอกจากนี้ในยางนายังมีเรสเวอราทรอล (resveratrol) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อไวรัสเอดส์ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระได้ (Muhammad et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบสารสำคัญอื่นๆ เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และเซสควิเทอร์พีน (sesquiterpene) ในส่วนต่างๆ ของต้นยางนา ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวเหมาะสำหรับการนำมาพัฒนาใช้ประโยชน์ด้านเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการนำสารสกัดของยางนามาใช้ คือ ความไม่คงสภาพ และมีกลิ่นที่มีลักษณะเฉพาะตัว จึงจำเป็นต้องหาวิธีการแก้ปัญหาดังกล่าว รวมทั้งการพัฒนาสูตรตำรับเพื่อนำส่งสารสำคัญไปยังอวัยวะเป้าหมายที่ต้องการได้

การนำเทคโนโลยีต่างๆ มาใช้เพื่อพัฒนาสูตรตำรับมีหลายวิธี โดยประสิทธิภาพของสารสำคัญที่ใส่ลงในผลิตภัณฑ์ทาผิวนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในรูปแบบการนำส่งที่ประสิทธิภาพ และความสามารถในการแทรก

ผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม เป็นต้น รูปแบบนำส่งที่ได้รับความนิยม ได้แก่ นาโนอิมัลชัน (nanoemulsions) นาโนอิมัลชันเป็นการใช้สารก่ออิมัลชันหรืออิมัลเซอร์สำคัญไว้ เพื่อเพิ่มความคงสภาพของสูตรตำรับ กลบรสชาติหรือกลิ่นของสารสำคัญที่ได้จะมีความโปร่งใสหรือโปร่งแสง เนื่องจากขนาดอนุภาคภายในมีขนาดเล็กมาก อยู่ในช่วงระหว่าง 20-200 นาโนเมตร กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในระบบ (isotropic dispersed system) และทำให้มีคุณสมบัติคงตัวทางจลนศาสตร์ (kinetically stable) จึงมีความคงตัวสูงกว่าอิมัลชัน (emulsions) ทั่วไป (Fanun, 2010; Escobar-Chávez et al., 2012; Chime et al., 2014; Tadros, 2014) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้นาโนอิมัลชันสามารถแทรกผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียมเข้าไปถึงผิวหนังชั้นอื่นๆ ได้ และดูดซึมเข้าทางผิวหนังได้อย่างรวดเร็ว (Mostafa et al., 2015) เกาะติดกับผิวได้ดี รวมทั้งกระจายบนผิวหนังได้ทั่วและสม่ำเสมอ (Tadros, 2014) จากการศึกษาของ Clares และคณะ (2014) เปรียบเทียบการนำส่งวิตามินเอ (vitamin A) ด้วยนาโนอิมัลชันกับการนำส่งในรูปแบบอื่น พบว่านาโนอิมัลชันให้ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าทำให้สามารถแทรกผ่านชั้นผิวหนังของมนุษย์ได้มากกว่าการนำส่งในรูปแบบอื่น (Clares et al., 2014) นอกจากนี้การศึกษาของ Donsi และคณะ (2011) พบว่านาโนอิมัลชันมีความสามารถในการปกป้องสารเรสเวอราทรอล (resveratrol) ซึ่งเป็นสารสำคัญให้มีความคงตัวมากขึ้นเมื่อเทียบกับการเตรียมในรูปแบบอื่น (Donsi et al., 2011) โดยทั่วไปแล้วระบบของนาโนอิมัลชัน จะประกอบไปด้วย 3 ส่วนคือ น้ำมัน (oil) น้ำ (water) และสารลดแรงตึงผิว (surfactants) แต่อาจมีการเติมสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) ลงไปในบางตำรับ โดยน้ำมันและน้ำจะอยู่ในรูปของวัฏภาคในตำรับอาจเป็นในรูปแบบ o/w nanoemulsion หรือ w/o nanoemulsion สารลดแรงตึงผิว ทำหน้าที่ช่วยให้ระบบมีความคงตัว โดยสารลดแรงตึงผิวอาจเป็นชนิด ไม่มีประจุ (non-ionic) ไอออนซึ่งมีประจุบวกและลบ (zwitterion ion) ประจุบวก (cationic) หรือ ประจุลบ (anionic) เลือกใช้ตามความเหมาะสม (Fanun, 2010) ซึ่งการเตรียมตำรับนาโนอิมัลชัน มีวิธีการผลิต 2 แบบ คือวิธีใช้พลังงานสูงและพลังงานต่ำ วิธีการใช้พลังงานสูง ได้แก่ การใช้เครื่องสร้างคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic homogenization) (Fanun, 2010; Chime et al., 2014) ซึ่งวิธีนี้ได้รับความนิยมสูง เพราะผลิตได้ง่าย ประหยัดเวลา ตำรับที่ได้มีการกระจายตัว และขนาดอนุภาคสม่ำเสมอ สามารถนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ ส่วนการ

เตรียมโดยใช้พลังงานต่ำ (low energy emulsion technique) เช่น การเตรียมโดยวิธีกลับวัฏภาค (phase inversion method) (Tadros, 2014)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับนาโนอิมัลชันในการนำส่งน้ำมันยางนาไปยังผิวหนัง เพื่อช่วยชะลอริ้วรอยที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระ เริ่มจากการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนา และการทดสอบลักษณะของตำรับ เช่น ความโปร่งใสหรือโปร่งแสง คุณสมบัติทางกายภาพของตำรับ ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพและชนิดของตำรับ ขนาดอนุภาคและการกระจายตัว รูปทรงของอนุภาค ศักย์ไฟฟ้าซีต้า พีเอชของตำรับ และความคงสภาพของสูตรตำรับด้วยวิธีร้อนสลับเย็น (heating-cooling cycle) เพื่อให้เป็นข้อมูลพื้นฐานไปพัฒนาต่อยอดด้านการผลิตเครื่องสำอางจากยางนาได้

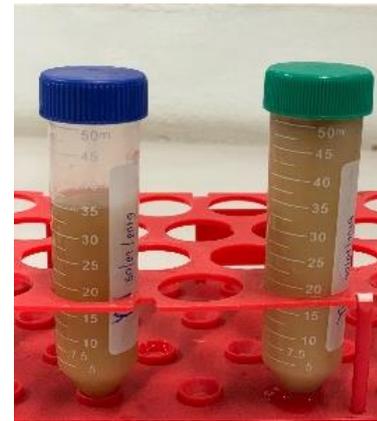
วิธีการวิจัย

1. วัสดุ และสารเคมี

น้ำมันจากต้นยางนา ได้รับมาจาก ดร.สมพร เกษแก้ว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อวันที่ 30 เดือน มกราคม 2562, Trolox (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), 3,2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), Gallic acid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), Sodium carbonate anhydrous AR (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, India), Folin & Ciocalteu' reagent (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, India), Polysorbate 80 (Tween® 80) (Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, India), Polysorbate 60 (Tween® 60), Polysorbate20 (Tween® 20) (Namsiang Group, Bangkok, Thailand), PEG- 40 Hydro castor oil (Cremophor® RH 40) และ Isopropyl myristate (IPM) (S. Tong Chemicals Co. Ltd., Nonthaburi, Thailand) Ethanol (Excise Department, Ministry of Finance, Thailand)

2. วิธีการดำเนินการศึกษา

2.1 การเตรียมน้ำมันยางนา (oleoresin) ของต้นยางนา การเตรียมน้ำมันยางนาได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lathsamee และคณะ (2018) กล่าวคือนำน้ำมันดิบของต้นยางนามากรองด้วยผ้าขาวบาง 2 รอบ และเก็บส่วนใสด้านล่างที่เรียกว่า โอเลโอเรซิน (oleoresin) และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Lathsamee *et al.*, 2018) เพื่อไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 น้ำมันยางนา (oleoresin) ของต้นยางนา

2.2 การสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (Pseudoternary phase diagram)

ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของระบบในการเกิดนาโนอิมัลชันที่มีส่วนประกอบของน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวผสม (สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม) และน้ำ โดยสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม สารผสมแต่ละหลอดทดลองเตรียมโดยกำหนดจากสัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวผสมไว้ที่ช่วง 1:9 ถึง 9:1 จากนั้นทำการผสมด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer (S0100-220, Labnet, NJ, USA)) เป็นเวลา 3 นาที คัดเลือกสัดส่วนที่นำมาทำการทดสอบต่อไป โดยค่อยๆ หยดน้ำกลั่นลงไปในห้องทดลองที่ผ่านการคัดเลือกและคนด้วยเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer (ZMS-20A, Daihan labtech Co.Ltd., Gyeonggi-do, Korea)) ตลอดเวลาจนกว่าสารผสมจะมีลักษณะขุ่นถือเป็นจุดสิ้นสุดการทดสอบ นำสัดส่วนที่ได้ไปเขียนกราฟในแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมโดยใช้โปรแกรม SigmaPlot ternary plot software (Trial version) สัดส่วนที่ให้ระบบที่ใสจะถูกเลือกไปใช้ในการเตรียมนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาของต้นยางนา

2.3 การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาของต้นยางนา

เตรียมตำรับจากสัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำ น้ำมัน น้ำมันยางนา และสารลดแรงตึงผิวผสม ดังแสดงในตารางที่ 1 นำไปผสมด้วยเครื่องกวนสารนาน 10 นาที แล้วนำไปสั่นโดยใช้อ่างคลื่นความถี่สูง (ultrasonic bath (Power sonic LUC405, Daihan labtech Co.Ltd., Gyeonggi-do, Korea)) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 5-7 โดยใช้ 0.1 N HCl หรือ 0.1 N NaOH เทใส่ภาชนะปิดแน่นสนิท ตั้งทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ระบบเข้าสู่สมดุล

ตารางที่ 1 สูตรตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนา ในปริมาณน้ำมันยางนาร้อยละ 2

ตำรับ	น้ำมัน		Smix (tween60/EtOH)		น้ำ (%)	รวม (%)
	ยางนา (%)	IPM (%)	Smix (%)	สัดส่วน		
F1	2	3.50	38.90	2:1	55.6	100
F2	2	5.14	42.86	2:1	50.0	100
F3	2	4.25	43.75	2:1	50.0	100
F4	2	3.56	44.44	2:1	50.0	100

2.4 การทดสอบลักษณะของตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนา

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับนาโนอิมัลชัน (Determination of antioxidant properties of nanoemulsions)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH free radical scavenging activity assay) โดยนำตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนา ทั้ง 4 ตำรับ ตัวอย่างละปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ในเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.006 โดยปริมาตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเวลเพลททิ้งไว้นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grödigg, Austria)) คำนวณ % inhibition ของแต่ละความเข้มข้นและทำกราฟมาตรฐานระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของตัวอย่างแต่ละตัว และหาค่ามิลลิโมลาร์สมมูลของโทรลอกซ์ (mM Trolox equivalent, mM TE) จากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ความเข้มข้น 0.5-1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาของต้นยางนาแต่ละตำรับกับสารละลายน้ำมันยางนาของต้นยางนาในเอทานอลที่มีความเข้มข้นที่เท่ากัน โดยสูตรคำนวณ คือ % inhibition = $[(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$ โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม คือ สารละลาย DPPH และ A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH และสารตัวอย่าง

2. การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตำรับนาโนอิมัลชัน (Determination of total phenolic compound in nanoemulsions)

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตำรับนาโนอิมัลชันทำโดยนำตำรับนาโนอิมัลชันผสมกับเอทานอล

ปริมาณในอัตราส่วน 1:1 ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติมโพลิน-ซีโอแคลทรีเอเจนต์ (Folin Ciocalteu reagent) (เจือจางด้วยน้ำ 1 : 9 โดยปริมาตร) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 745 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวีวิสเปกโทรโฟโตเมเตอร์ เมตริก (UV-Visible spectrophotometer (UV1201, Shimadzu Corporation, Kyoto Japan)) เปรียบเทียบกับตำรับนาโนอิมัลชันที่ไม่ได้บรรจุน้ำมันยางนา ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะถูกแสดงในรูปแบบ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร (mg GAE/ml) ซึ่งได้จากกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 0.200-0.0125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3. การประเมินลักษณะทางกายภาพ (Determination of physical appearance and nanoemulsion type)

ตำรับนาโนอิมัลชันที่เตรียมได้ถูกประเมินลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความโปร่งแสง/โปร่งใส สี และกลิ่น ด้วยการสังเกต

4. การศึกษาขนาดของอนุภาคและการกระจายตัวของอนุภาค (Determination of particle size & polydispersity index; PDI) ทดสอบค่าดัชนีการกระจายตัวและขนาดของอนุภาคนาโนอิมัลชันในแต่ละสูตรตำรับ โดยทดสอบด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร (Zetasizer® (NanoSeries ZEN2600, Malvern Instrument Ltd., Worcester-shire, UK))

5. การศึกษารูปร่างของอนุภาค (Determination of droplet morphology) หยดตัวอย่างตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุ น้ำมันยางนาลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปเคลือบทองคำ จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Scanning electron microscopy; SEM (LEO/1450, CarlZeiss Co. Ltd, Berlin, Germany))

**6. การวัดค่าพีเอช และ ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของ
ตำรับ (Determination of pH and zeta potential value)**
ทดสอบค่าความเป็นกรดต่างของตำรับนาโนอิมัลชันที่เตรียม
ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter (PL-600, M.R.Co. Ltd, Holon,
Israel)) และใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรวัดค่า
ศักย์ไฟฟ้าซีต้าของนาโนอิมัลชันแต่ละสูตรตำรับ

**7. การทดสอบความคงสภาพ (Determination of
stability of nanoemulsions)** ทดสอบด้วยอุณหภูมิร้อน-สลับ
เย็น (Heating-Cooling Cycle) โดยเริ่มจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 45
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้นับเป็น 1 รอบการ
ทดสอบ ทำซ้ำวิธีการเดิม 6 รอบ หลังจากทดสอบความคงสภาพ
แล้ว ศึกษาลักษณะของตำรับที่ได้ โดยสังเกตความเข้ากันได้ของ
ตำรับ

**8. การวิเคราะห์หรร้อยละการกักเก็บน้ำมันยางนา
ในนาโนอิมัลชัน (Determination of entrapment efficiency,
% EE)**

การวิเคราะห์หรร้อยละการกักเก็บน้ำมันยางนาในนาโน
อิมัลชันใช้วิธีการทดสอบแบบตรง (direct method) ดัดแปลง
จากการศึกษาของ Ramrit และคณะ (2014) การวิเคราะห์
ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนของน้ำมันยางนาที่ถูกกักเก็บใน
นาโนอิมัลชัน โดยคำนวณจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
ทั้งหมด (ตามวิธีในข้อ 2) และส่วนที่ 2 คือ การหาปริมาณ
ของน้ำมันยางนาที่ใช้ นำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
ทั้งหมด โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก คำนวณหา
ร้อยละการกักเก็บน้ำมันยางนาในนาโนอิมัลชัน (Ramrit,
Yingngam, Rungseevijitprapa, 2014)

$$\%EE = \left(\frac{GAE \text{ ของน้ำมันยางนาที่บรรจุในนาโนอิมัลชัน}}{GAE \text{ ของน้ำมันยางนาทั้งหมดที่ใช้}} \right) \times 100$$

สมการที่ 1

3. สถิติที่ใช้ในการวิจัย (Statistical analysis)

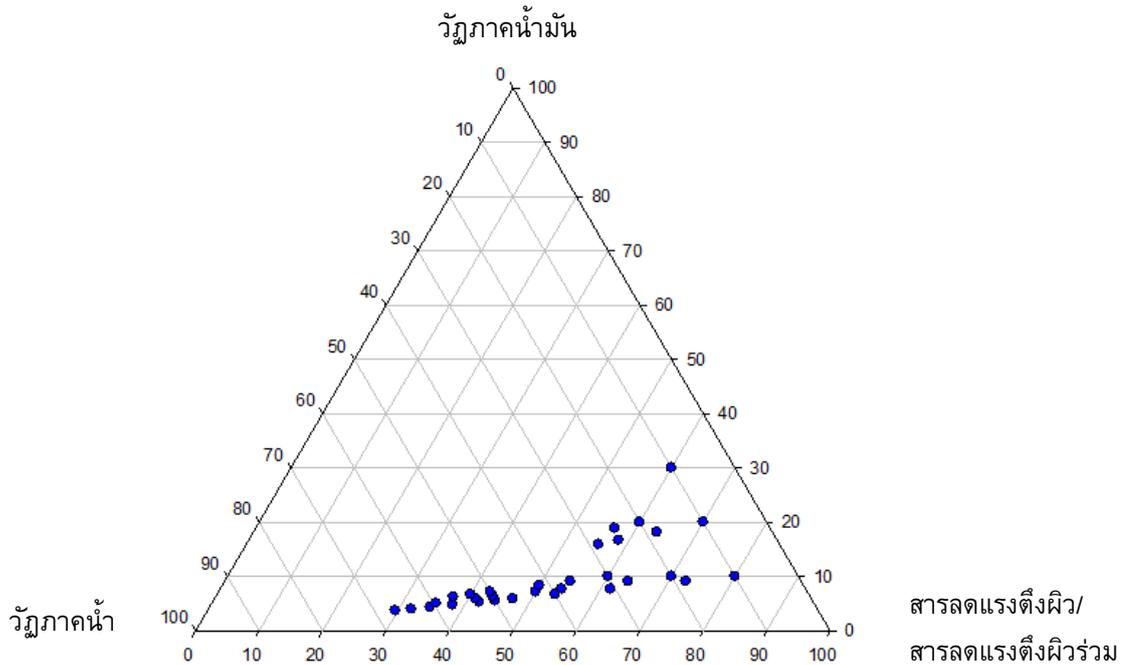
ทุกการทดสอบมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และผล
การศึกษากฎวิเคราะห์โดยหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบน
มาตรฐาน (standard deviation; S.D.) และวิเคราะห์ความ
แตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบความแปรปรวนทางเดียว (One-way
ANOVA) เมื่อพบว่าแตกต่างกันจึงทดสอบความแตกต่างระหว่าง
ค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่โดยวิธีทดสอบ Scheffe ด้วยโปรแกรมทาง
สถิติ SPSS version 19.0 (IBM SPSS Statistics for Windows.,
Armonk, NY: IBM Corp; 2010) และกำหนดให้ค่าเฉลี่ยแตกต่าง
กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p\text{-value} < 0.05$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การสร้างแผนภาพวิภูภาคไตรภาคเทียม (Pseudoternary phase diagram)

นาโนอิมัลชัน คือ อิมัลชันที่มีลักษณะใสหรือโปร่งใส
(clear/transparent) และเป็นของเหลวที่ไหลง่าย ดังนั้น จึงใช้
เกณฑ์ดังกล่าวในการคัดเลือกสัดส่วนที่ใช้ในการตั้งตำรับ
แผนภาพวิภูภาคไตรภาคเทียมรูปที่ 2 พบว่านาโนอิมัลชัน
สามารถเกิดขึ้นได้โดยใช้สัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวและสารลด

แรงตึงผิวร่วม (Smix) ร้อยละ 30-70 วิภูภาคน้ำมันร้อยละ 10-30
และวิภูภาคน้ำร้อยละ 10-70 ความเข้มข้นของ tween® 60 ที่ใช้
เป็นสารลดแรงตึงผิวคิดเป็นร้อยละ 20-45 ของตำรับ จาก
การศึกษาก่อนการตั้งตำรับพบว่าเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวมีผล
ต่อความสามารถในการเกิดนาโนอิมัลชันและความคงสภาพของ
ตำรับ การเลือกชนิดและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม
จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการตั้งตำรับ โดยการทดลองนี้ใช้ Tween®
60 (HLB 14.9) เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ซึ่งความ
เข้มข้นที่นำมาใช้ทำให้เกิดไมเซลล์น้อยกว่าสารลดแรงตึงผิว
ชนิดมีประจุ และเป็นที่ยอมรับใช้มากกว่า เพราะมีความเป็นพิษ
และระคายเคืองน้อย มีความคงสภาพสูง และนิยมใช้ควบคู่กับ
สารลดแรงตึงผิวร่วม ในที่นี้คือ เอทานอล เมื่อได้สัดส่วนที่ทำให้
เกิดนาโนอิมัลชันแล้ว จึงได้มีการบรรจุน้ำมันยางนาร้อยละ 2 ลง
ไป ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสัดส่วนของนาโนอิมัลชัน
ประกอบด้วยวิภูภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึง
ผิวร่วม ในอัตราส่วน 2:1 และวิภูภาคน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 2 ภูมิภาคไตรภาคเทียบระหว่างน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำ
• บริเวณที่เกิดนาโนอิมัลชันได้

2. ลักษณะของตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางของต้นยางนา

2.1 ลักษณะทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชัน

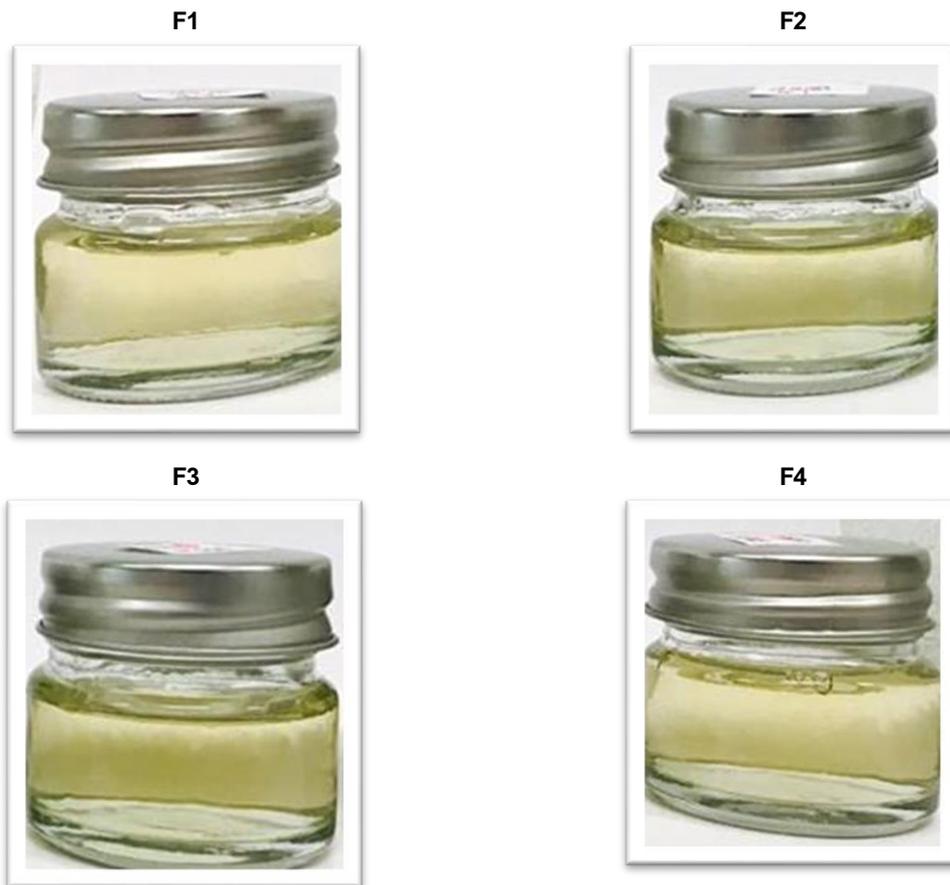
จากแผนภาพภูมิภาคไตรภาคเทียบรูปที่ 2 พบว่ามีสัดส่วนระหว่างน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวผสมและน้ำหลายสัดส่วนที่สามารถเกิดนาโนอิมัลชันได้ ในการทดลองจึงใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวและภูมิภาคน้ำมัน เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสัดส่วนที่จะนำมาใช้ในการตั้งตำรับ โดยคัดเลือกเฉพาะสัดส่วนที่มี tween@60 ไม่เกินร้อยละ 30 เนื่องจากการใช้สารลดแรงตึงผิวปริมาณมากจะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ และคัดเลือกสัดส่วนที่มีน้ำมันมากกว่าร้อยละ 5 มาตั้งตำรับ จากเกณฑ์การคัดเลือกข้างต้นจะได้สัดส่วนที่เหมาะสมทั้งสิ้น 4 ตำรับ ซึ่งสามารถบรรจุน้ำมันของต้นยางนาได้ในปริมาณร้อยละ 2 ของตำรับ มีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 ตำรับที่เตรียมได้ทุกตำรับมีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลว สีเหลืองใส ไหลง่าย (รูปที่ 3) มีความเข้ากันเป็นเนื้อเดียว ซึมง่าย มีความหนืดต่ำ โปร่งใส กระจายเคลือบบนผิวหนัง

2.2 ขนาดและดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค

การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันของต้นยางนาเป็นนาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งมีขนาดของภูมิภาค

ภายในหรือภูมิภาคน้ำมันที่บรรจุน้ำมันยางนาควรอยู่ในช่วง 20-200 นาโนเมตรและควรมีดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคน้อยกว่า 0.5 (polydispersity index; PDI<0.5) ซึ่งสะท้อนถึงความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคในตำรับ

จากผลการทดลองตามตารางที่ 2 พบว่าตำรับที่บรรจุน้ำมันยางร้อยละ 2 ของตำรับเมื่อเรียงตามขนาดอนุภาคเฉลี่ยจากเล็กไปใหญ่ ได้แก่ F4, F2, F3 และ F1 โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 29.52 ± 2.87 , 56.95 ± 12.07 , 101.93 ± 2.49 และ 161.80 ± 20.87 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับนาโนอิมัลชัน โดยตำรับ F4 มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุด ซึ่งแตกต่างจากตำรับ F1, F2 และ F3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.01) เนื่องจากมีสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวร่วมมากที่สุด (ร้อยละ 44.44) เมื่อเทียบกับตำรับอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตำรับที่มีการเติมน้ำมันยางนาร้อยละ 2 ลงไปในตำรับพบว่าตำรับ F1 มีอนุภาคขนาดใหญ่ มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคมากกว่า 0.5 แสดงว่าตำรับ F1 มีการกระจายขนาดอนุภาคที่กว้าง อาจเป็นผลมาจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ในตำรับ F1 มีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับตำรับอื่น



รูปที่ 3 ตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาของต้นยางนา

3. ลักษณะรูปร่างของอนุภาคของนาโนอิมัลชัน

จากรูปที่ 4 พบว่าตำรับนาโนอิมัลชันที่มีน้ำมันยางนามีอนุภาครูปทรงไม่แน่นอน ส่วนใหญ่เป็นทรงกลม ลักษณะพื้นผิวขรุขระ และบางส่วนของอนุภาคแตก อาจเนื่องมาจากการทำให้แห้งจากการเป่าลมร้อนเป็นเวลานาน เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของอนุภาคพบว่าการกระจายตัวค่อนข้างสม่ำเสมอในทุกตำรับ ขนาดอนุภาคที่ได้จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีขนาดอนุภาคของตำรับ F1, F2, F3 และ F4 เป็น 34.06, 35.12, 30.12 และ 39.27 ไมโครเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้ขนาดของอนุภาคที่วัดได้จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีขนาดใหญ่กว่าค่าที่ได้จากเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร เนื่องจากหลักการวัดขนาดด้วยเครื่องมือทั้งสองชนิดแตกต่างกัน กล่าวคือ เทคนิคการวัดขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดจะวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจากพื้นผิวภายนอกของอนุภาคของตำรับ ในขณะที่แห้ง (Petcharoen, Sirivat, 2012) ขณะที่เครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรจะเป็นการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคแบบไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic

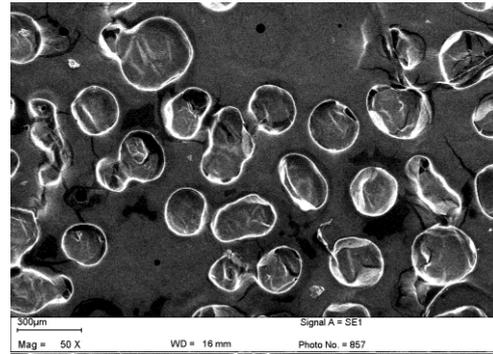
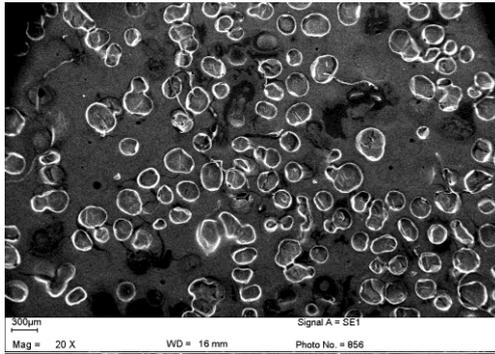
diameter) ในขณะที่อนุภาคกระจายตัวอยู่ในตัวกลาง และมีการเคลื่อนที่แบบบราวน์ (Brownian movement) โดยการที่อนุภาคกระจายตัวอยู่ในตัวกลางอาจมีการแพร่ผ่านของตัวกลางเข้าและออกไปยังบริเวณเมมเบรนของอนุภาคทำให้เกิดการพองเป็นเจล (permeable gel membrane) ในขณะที่การวัดขนาดด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะไม่เกิดปรากฏการณ์นี้ ขนาดที่ได้จะเป็นขนาดอนุภาคที่มีการพองตัวเต็มที่และทำแห้งแล้ว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tuoriniemi *et al.* (2014) ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคของ colloidal silica nanoparticles ด้วยวิธีต่างๆ เช่น การวัดการกระจายขนาดด้วย 1. กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด 2. กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน วิธี electrospray-scanning mobility particle size (ES-SMPS) 3. การวัดขนาดด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร เป็นต้น ผลการศึกษาพบว่าขนาดอนุภาคที่ได้จากเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรมีขนาดเล็กกว่ากล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด และ electrospray-scanning mobility particle size (Tuoriniemi *et al.*, 2014)

ตำรับ

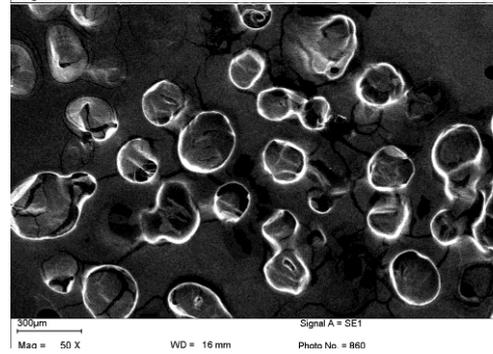
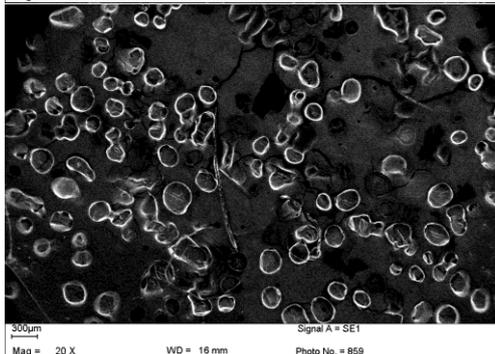
กำลังขยาย 20x

กำลังขยาย 50x

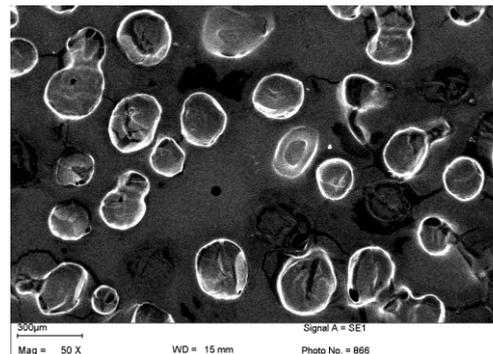
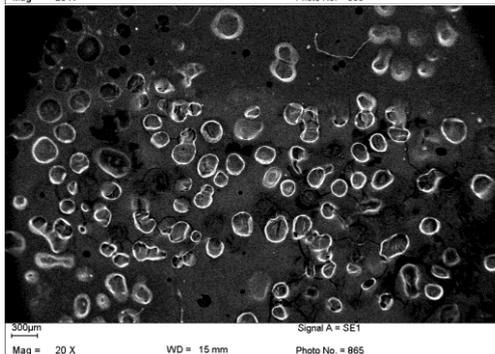
F1



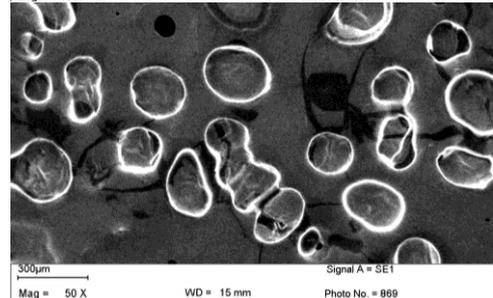
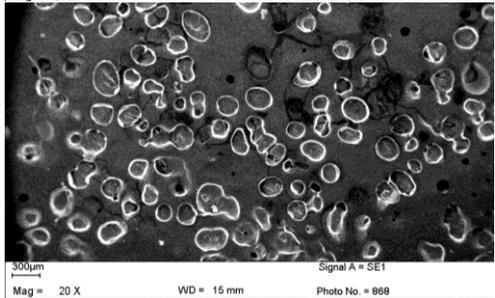
F2



F3



F4



รูปที่ 4 ภาพถ่ายลักษณะของอนุภาคจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 20, และ 50 เท่าตามลำดับ

4. ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และพีเอชของตำรับ

ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของตำรับสามารถใช้ในการทำนายความคงสภาพในระยะยาวของนาโนอิมัลชัน (Ostolska, WiŚniewska, 2014) โดยความคงสภาพของตำรับเกิดขึ้นจากแรงผลักระหว่างอนุภาคภายใน หากค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้ามีค่าสูงจะแสดงให้เห็นถึงความคงสภาพของตำรับได้ดี ตำรับที่มีค่าศักย์ไฟฟ้าต่ำ (± 5 มิลลิโวลต์) มีแนวโน้มที่จะเสถียรภาพได้

เนื่องจากวัฏภาคภายในเกิดการเกาะกลุ่มกันแล้วรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดการแยกชั้นในที่สุด อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าไม่มีเกณฑ์ที่ชัดเจนที่ใช้ในการแบ่งความคงสภาพของตำรับจากค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า แต่สามารถคาดการณ์ได้ว่าหากตำรับมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า อยู่ระหว่าง 31 - 40 มิลลิโวลต์จะมีความคงสภาพที่ดี (Salopek, KrasiĆ FilipowiĆ, 1992) อย่างไรก็ตามในการศึกษารุ่นนี้ได้เลือกใช้สาร

ลดแรงตึงผิวไม่มีประจุเป็นสารก่ออิมัลชันในระบบ หากระบบมีความคงสภาพดีประจุที่เกิดขึ้นจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จากผลการทดลองค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของแต่ละตำรับอยู่ระหว่าง ± 9 ถึง ± 24 มิลลิโวลต์ ซึ่งแสดงถึงตำรับนาโนอิมัลชันมีแนวโน้มที่คงสภาพดี และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของทั้ง 4 ตำรับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value > 0.05)

สำหรับค่าพีเอชของแต่ละตำรับอยู่ระหว่าง 6.04-6.19 (p -value > 0.05) ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ที่ใช้เฉพาะที่บนผิวหนังที่ควรอยู่ระหว่าง 4.5-7 (Mostafa *et al.*, 2015) เพื่อให้เหมาะสมกับลักษณะทางกายภาพของผิวหนังที่มีความเป็นกรดอ่อน ซึ่งจะช่วยปกป้องผิวไม่ให้สูญเสียความชุ่มชื้น ปกป้องผิวจากแบคทีเรียและมลภาวะต่างๆ

ตารางที่ 2 ลักษณะของตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาของต้นยางนา

ตำรับ	พีเอช	ขนาดอนุภาค	ดัชนีการกระจายตัว	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า
		(nm \pm SD)	(mean \pm SD)	(mV \pm SD)
F1	6.15	161.80 \pm 20.87	0.510 \pm 0.001	-14.27 \pm 6.22
F2	6.04	56.95 \pm 12.07	0.435 \pm 0.013	-11.05 \pm 1.00
F3	6.19	101.93 \pm 2.49	0.390 \pm 0.008	-9.79 \pm 1.45
F4	6.07	29.52 \pm 2.87	0.129 \pm 0.001	-24.10 \pm 0.18

5. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่บรรจุอยู่ในอนุภาค

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันยางนาและในตำรับนาโนอิมัลชัน ใช้วิธี Folin-ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ($Y=12.13x+0.0084$, $R^2 = 0.9975$) และแสดงผลในรูปแบบไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าน้ำมันยางนาร้อยละ 1 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.034 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร (mg GAE/ml) โดยตำรับ F1 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 30.67 \pm 3.98 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร (μ g GAE/ml) และตำรับ F3 มีปริมาณน้อยที่สุดคือ 26.38 \pm 0.34 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร (μ g GAE/ml) (รูปที่ 5) ซึ่งทั้ง 4 ตำรับมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value > 0.05) สำหรับการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่บรรจุอยู่ในอนุภาคของนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาของต้นยางนาทั้ง 4 ตำรับ (รูปที่ 6) พบว่าตำรับที่มีร้อยละการกักเก็บเรียงจากมากไปน้อยคือ F1 > F4 > F2 > F3 เท่ากับร้อยละ 90.26 \pm 11.64 > 86.28 \pm 1.82 > 82.67 \pm 7.23 > 77.57 \pm 1.01 ตามลำดับ ทั้งนี้ตำรับ F1 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และร้อยละการกักเก็บสูงกว่าตำรับอื่นๆ อาจเนื่องมาจากการที่ตำรับ F1 มีขนาดอนุภาคใหญ่ที่สุด ทำให้มีโอกาสที่น้ำมันยางนาจะถูกบรรจุอยู่ภายในมากกว่า แต่เมื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่า

ร้อยละการกักเก็บของแต่ละตำรับด้วยสถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างตำรับทั้ง 4 ตำรับ (p -value >0.05)

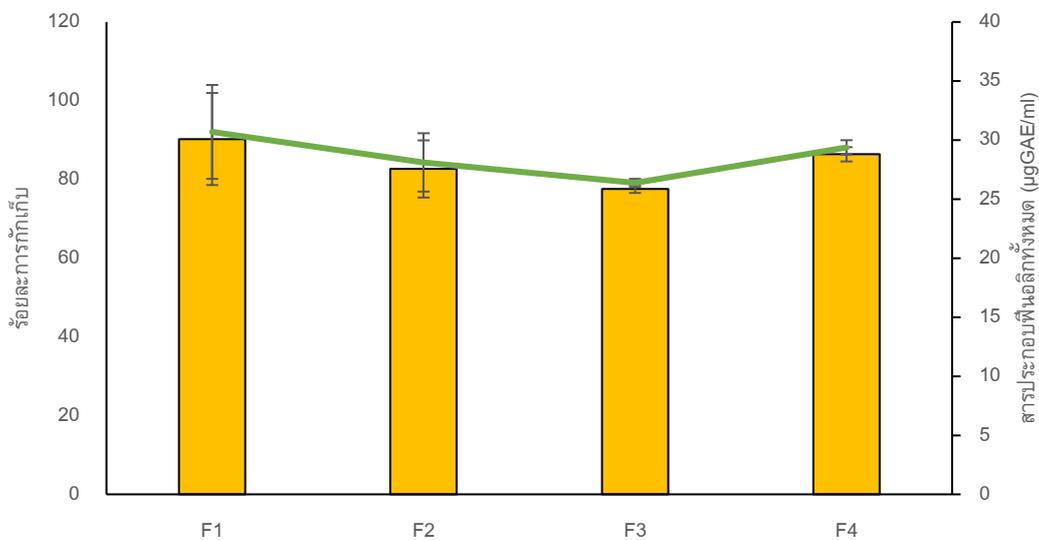
6. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการทำ assay อนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH free radical scavenging activity assay) ของน้ำมันยางนาที่ไม่ได้เตรียมในรูปแบบนาโนอิมัลชัน และตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาที่ถูกเลือกมาเตรียมทั้ง 4 ตำรับ จะแสดงเป็นค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ร้อยละ 50 (50% Inhibitory concentration; IC₅₀) โดยน้ำมันยางนามีค่า IC₅₀ เท่ากับ 16.14 \pm 0.97 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า Trolox ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.016 \pm 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.01)

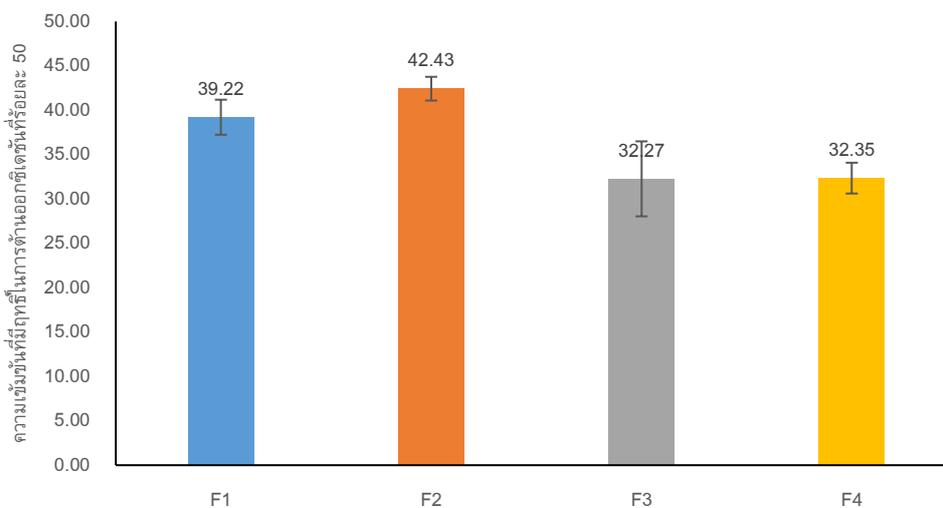
เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันยางนาร้อยละ 2 ที่ถูกบรรจุลงในตำรับนาโนอิมัลชันพบว่าตำรับ F3 มีค่า IC₅₀ ใกล้เคียงกับตำรับ F4 ซึ่งเท่ากับ 32.27 \pm 4.23 และ 32.35 \pm 1.73 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (p -value = 0.92) ขณะที่ตำรับ F1 และ F2 ค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.22 \pm 1.97 และ 42.43 \pm 1.34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าตำรับ F3 และ F4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยตำรับ F4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกับ F2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.005) อาจเกิดจากการที่ตำรับ F4 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าตำรับอื่นๆ โดยสารประกอบฟีนอลิก

จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง ดังนั้นการที่ตำรับมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง อาจส่งผลให้ตำรับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Maleelai (2019) ที่ได้ทำการศึกษาค่าสหสัมพันธ์ Pearson Correlation ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์ระดับสูงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีความสัมพันธ์ไปในทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.01$) (Maleelai, 2019)

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเป็นเครื่องบ่งชี้ อย่างไรก็ตามตำรับ F1 มีร้อยละการกักเก็บที่สูงแต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่ได้สูงเท่ากับ F4 อาจเป็นได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจไม่ได้มาจากสารประกอบฟีนอลิกเพียงอย่างเดียว อาจเป็นผลมาจากสารอื่นๆ ที่อยู่ในน้ำมันยางนาด้วย เช่น ฟลาโวนอยด์ เรสเวอราทรอล เป็นต้น ดังนั้นการที่ F1 มีขนาดใหญ่และมีร้อยละการกักเก็บมากที่สุดทำให้มีโอกาที่จะมีสารอื่นๆ บรรจุเพิ่มเติมเข้ามามากกว่าตำรับอื่นด้วย



รูปที่ 5 ร้อยละการกักเก็บ (กราฟแท่ง) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (กราฟเส้น) ที่บรรจุอยู่ในตำรับนาโนอิมัลชันทั้ง 4 ตำรับ



รูปที่ 6 ฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ของตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาทั้ง 4 ตำรับ

7. ทดสอบความคงสภาพ

ผลการทดสอบความคงสภาพด้วยวิธีการใช้อุณหภูมิร้อน-สลับเย็น (heating-cooling cycle) จำนวน 6 รอบ พบว่าทุกตำรับมีความคงสภาพที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่บ่งบอกถึงความคงสภาพของทั้ง 4 ตำรับ

สรุปผลการวิจัย

การเตรียมน้ำมันยางนาที่ให้อยู่ในรูปแบบตำรับนาโนอิมัลชันด้วยวิธีการใช้พลังงานสูง (การใช้เครื่องสร้างคลื่นความถี่สูง) และมีการศึกษาหาสัดส่วนที่เหมาะสมในการเกิดนาโนอิมัลชัน เช่น ชนิดของน้ำมัน สัดส่วนระหว่างน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม ตำรับนาโนอิมัลชันที่ได้ประกอบไปด้วยวัฏภาคน้ำมันคือ น้ำมันยางนาและไอโซโพรพิล ไมริสเทท สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม (tween60/ethanol) ในสัดส่วน 2:1 และวัฏภาคน้ำ สมบัติทางกายภาพ และเคมีฟิสิกส์ เช่น พีเอช ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาค ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า แสดงให้เห็นว่าตำรับนาโนอิมัลชันที่เตรียมได้มีลักษณะที่เหมาะสม โดยเฉพาะตำรับ F4 (วัฏภาคน้ำมันร้อยละ 5.56 สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมร้อยละ 44.44 และปรับปริมาตรน้ำให้ครบร้อยละ 100) รวมทั้งมีปริมาณการกักเก็บสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สูงกว่าตำรับอื่นๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และมีความคงสภาพในสภาวะเร่ง ดังนั้นตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนาสามารถใช้ในการนำส่งสารสำคัญในทางยา และเครื่องสำอางได้ สามารถนำไปศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้การพัฒนาตำรับนาโนอิมัลชันที่บรรจุน้ำมันยางนา โดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันยางนาที่มากขึ้นอาจจะส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่เกี่ยวข้อง และคณะ เกษศาตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการดำเนินงานวิจัย งานวิจัยฉบับนี้จึงสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

References

Aslam MS, Ahmad MS, Mamat AS. A Phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological review of genus *Dipterocarpus*. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015; 7(4), 27-38.

- Balasundram N, Sundram L, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006; 99(1), 191-203.
- Chen L, Hu J, Wang S. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67, 1013-1024.
- Chime SA, Kenechukwu FC, Attama AA. Nanoemulsions: advances in formulation, characterization, and applications in drug delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* 2014, Retrieved March 2, 2021. from <https://dx.doi.org/10.5772/15371>
- Clares B, Calpena AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Fanguero JF, et al. EB. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *Int J Pharm* 2014 473(1), 591–598.
- Donsi F, Sessa M, Mediouni H, Mgaidi A, Ferrar G. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery systems. *Procedia Food Sci* 2001; 1: 1666–1671.
- Escobar-Chávez J, Díaz R, Rodriguez-Cruz IM, Dominguez-Delgado, Sampere-Morales, Angeles-Anugiano, et al. Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Res Rep Transdermal Drug Deliv* 2012; 1, 3–17.
- Fanun M. *Colloid in drug delivery*, Surfactant Science Series Vol., 2010, Boca Raton, FL: Taylor & Francis/CRC Press.
- Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev* 2015; 21, 16-29.
- Lathsamee T, Khunkitti W, Sakloetsakun D. Preparation and characterization of polymeric nanoparticles loaded with Yang-na oleoresin (*Dipterocarpus alatus* Roxb. Ex G. Don) [master's thesis]. Graduate school: Khon Kaen University, 2018.
- Maleelai W. Study of physical properties and development of skin lightening product from *Raphanus sativus* extract [master's thesis]. Graduate school: Khon Kaen University; 2019.

- Mostafa DM, Kassem AA, Asfour MH, Okbi SYA, Mohamed DA, Hamed TES. Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: *In-vitro* and *in-vivo* evaluation. *J Mol Liq* 2015; 212, 6-15
- Nipaporn N, Somporn K, Nattida, W. The study of antioxidant capacity of ethanolic extracts from Yang-na tree (*Dipterocarpus alatus* Roxb. Ex G. Don). Proceeding of the 2nd NEU National and International Research Conference 2014 May 24; Khon Kean, Thailand.
- Ostolska I, WiŚniewska M. Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr₂O₃ stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acid. *Colloid Polym Sci* 2014; 292(10): 2453-2464.
- Petcharoen K., Sirivat A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. *Mat Sci Eng B* 2012, 177: 421-427.
- Ramrit T, Yingngam B, Rungseevijitprapa W. Development of Triphala niosomes. *IJPS* 2014; 9(Supplement), 22-26.
- Salopek B, Kradić D, Filipović S. Measurement and application of zeta-potential. *Rudarsko-Geolosko-Naftni Zbornik* 1992; 4:147–151.
- Sutin S. Vitamins and free Radicals [Master thesis]. Division of Physical Science, Faculty of Science and Technology: Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn; 2016.
- Silva HD, Miguel A, Cerqueira, Souza BWS, Ribeiro C, Maria C, *et al.* Nanoemulsions of β-carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique. *J Food Eng* 2011; 102(2), 130-135.
- Tadros TF. *Formulation of Dispense Systems: Science and Technology* 2014. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Tuoriniemi J, Johnson A-C J, Holmberg JP, Gustafsson S, Gallego-Urrea JA, Olsson E, *et al.* Intermethod comparison of the particle size distributions of colloidal silica nanoparticles. *Sci Technol Adv Mater* 2014; 15(3), 1-11.
- Ud-Daula AS, Demirci F, Salim KA, Demirci B, Lim LB, Baser KHC, *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Elingera fimbriobracteata* (K. Schum). *RM SM. Ind Crops and Prod* 2016; 84, 189-198.