



การกักเก็บสารไตรเทอปีนอยด์ไกลโคไซด์ที่ได้จากใบบัวบก
ในไลโปโซม

ENCAPSULATION OF TRITERPENOID GLYCOSIDES FROM *Centella Asiatica* Linn.
LEAVES IN LIPOSOME

ณัฐชนากานต์ วงศ์ธนะบุรณ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การกักเก็บสารไตรเทอปีนอยด์ไกลโคไซด์ที่ได้จากใบบัวบก
ในไลโปโซม

ENCAPSULATION OF TRITERPENOID GLYCOSIDES FROM *Centella asiatica* Linn.
LEAVES IN LIPOSOME

ณัฐชนากานต์ วงศ์ธนะบุรณ์

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติการค้นคว้าอิสระ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

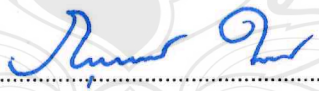
การค้นคว้าอิสระเรื่อง การกักเก็บสารไตรเทอพินอยด์ไกลโคไซด์ที่ได้จากใบบัวบกในไลโปโซม
Encapsulation of Triterpenoid Glycosides from *Centella asiatica*
Linn. Leaves in Liposome

ผู้ประพันธ์ ญัฐชนากานต์ วงศ์ชนะบุญ

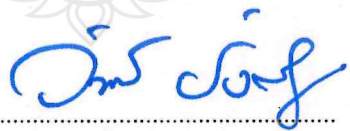
คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญวัฒน์ ปินดาทอง	ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรีตา สังข์ทอง	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวดี ฐิติปราโมทย์	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรา ศรีษะแย้ม	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา


.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ)

คณบดี


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสิวิจิตรประภา)

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ ที่ได้ให้คำแนะนำอย่างใกล้ชิดในการทำวิจัย ตลอดจนการทำรูปเล่มวิจัย/การค้นคว้าอิสระ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบการค้นคว้าอิสระ อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรีตา สังข์ทอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธราวุฒิ จิตติปราโมทย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรา ศรีชะแย้ม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของงานวิจัย จนทำให้รายงานการค้นคว้าอิสระฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่เป็นสถานที่ที่คอยให้ความรู้ และประสิทธิ์ประสาทวิชาจนทำให้ข้าพเจ้ามีความเชี่ยวชาญในสายอาชีพ ขอขอบคุณเหล่าคณาจารย์ ผู้มากด้วยประสบการณ์ ความรู้ และจิตวิญญาณแห่งความเป็นครูที่ได้ถ่ายทอดองค์ความรู้อันสำคัญยิ่งให้แก่ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หนึ่งฤทัย สุพรม อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ รวมถึงเครื่องมือในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ พ่อ แม่ ผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่คอยให้ความรัก ความอบอุ่น และยังเป็นกำลังใจที่สำคัญเสมอมา ขอขอบคุณเพื่อนเหล่ากัลยาณมิตรที่ดี ที่ได้ร่วมทุกข์ร่วมสุข และคอยให้กำลังใจจนผ่านทุกเรื่องราวมาได้เป็นอย่างดี สุดท้ายนี้ขอขอบคุณตัวเองที่ไม่ยอมละทิ้งความพยายามในการพัฒนาตนเองอยู่เสมอ และสัญญาว่าจะไม่หยุดพัฒนาตัวเอง เพื่ออนาคตอันสดใสต่อไป

ณัฐชนากานต์ วงศ์ธนะบุรณ์

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	การกักเก็บสารไตรเทอปีนอยด์ไกลโคไซด์ที่ได้จากใบบัวบกในไลโปโซม
ผู้ประพันธ์	ณัฐชนากานต์ วงศ์ชนะบุญ
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

บทคัดย่อ

ใบบัวบก (*Centella asiatica* Linn.) มีสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอปีนอยด์ไกลโคไซด์ เช่น อะเซียติโคไซด์ (asiaticoside) และมาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน และสมานแผล อย่างไรก็ตาม พบว่าสารกลุ่มนี้มีความคงตัวต่ำในผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญ และผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของไลโปโซมที่ใช้กักเก็บสารจากใบบัวบก ผลการทดลองพบว่า 70% เอทานอล ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ อยู่ที่ 239.91 ± 21.38 และ 102.92 ± 2.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมไลโปโซมมีผลต่อขนาดอนุภาค โดยเรียงลำดับขนาดจากมากไปน้อย ได้แก่ ไอโซโพรพานอล > เอทานอล > เมทานอล และมีขนาดอยู่ที่ $6,521.7 \pm 389.1$, $6,496.4 \pm 445.2$ และ $5,618. \pm 879.4$ นาโนเมตร ตามลำดับ สำหรับการศึกษาความคงตัว พบว่าอุณหภูมิส่งผลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสาร โดยที่อุณหภูมิ 4°C ให้ผลการกักเก็บสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์สูงสุด (47.23% และ 43.99% ตามลำดับ) รองลงมาคือ 25°C (51.30% และ 32.49%) และต่ำที่สุดที่ 45°C (27.77% และ 15.41%) หลังการเก็บรักษา 21 วัน การบรรจุสารสำคัญในไลโปโซมจึงเป็นเทคโนโลยีที่ช่วยเพิ่มความคงตัวของสาร และชะลอการเสื่อมสภาพยาได้อุณหภูมิที่สูง มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางในอนาคต

คำสำคัญ: ใบบัวบก, อะเซียติโคไซด์, มาเดคาสโซไซด์, ไลโปโซม

Independent Study Title Encapsulation of Triterpenoid Glycosides from *Centella asiatica* Linn. Leaves in Liposome

Author Natchanakan Wongtanaboon

Degree Master of Science (Cosmetic Science)

Advisor Assistant Professor Panupong Jaiwut, Ph. D.

ABSTRACT

Centella asiatica (Linn.) contains active compounds in the triterpenoid glycoside group, such as asiaticoside and madecassoside, which possess anti-inflammatory properties, stimulate collagen production, and promote wound healing. However, these compounds exhibit low stability in formulations. This study aimed to evaluate the efficiency of various solvents in extracting the active compounds and to investigate the effect of temperature on the stability of liposomes used for encapsulating *Centella asiatica* extracts. The results showed that 70% ethanol provided the highest extraction efficiency for asiaticoside and madecassoside, yielding 239.91 ± 21.38 and 102.92 ± 2.25 mg/L, respectively. The type of solvent used in liposome preparation significantly affected particle size, which decreased in the following order: isopropanol > ethanol > methanol, with particle sizes of $6,521.7 \pm 389.1$, $6,496.4 \pm 445.2$, and $5,618.0 \pm 879.4$ nm, respectively. In terms of stability, storage temperature had a considerable effect on the retention of active compounds. The highest retention of asiaticoside and madecassoside was observed at 4°C (47.23% and 43.99%, respectively), followed by 25°C (41.30% and 32.49%), and the lowest at 45°C (27.77% and 15.41%) after 21 days of storage. These findings indicate that liposomal encapsulation enhances the stability of active compounds and slows degradation under elevated temperatures. This technology shows promise for future applications in cosmeceutical products.

Keywords: *Centella asiatica* Linn. Leaf, Asiaticoside, Madecassoside, Liposome

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ความสำคัญของการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
2 การทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 บั๊บก	4
2.2 ไลโปโซม	7
2.3 กลไกการดูดซึมสารผ่านผิวหนัง	11
3 ระเบียบวิธีวิจัย	12
3.1 การเตรียมตัวอย่างไบ๊บก	12
3.2 การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากตัวอย่างไบ๊บกแห้ง	12
3.3 การวิเคราะห์สารอะเซียติโคไซด์ และมาเดกาสโซไซด์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	13
3.4 การสกัดสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดกาสโซไซด์จากไบ๊บกด้วยวิธีแช่ตัวอย่างในสารตัวทำละลาย	13
3.5 การเตรียมไลโปโซมเพื่อกักเก็บสารสกัดสารสกัดจากไบ๊บก	14
3.6 การวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไลโปโซม	15
3.7 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการกักเก็บและความคงตัวของไลโปโซม	15
4 ผลการศึกษาและการอภิปรายผล	16
4.1 ผลการเตรียมตัวอย่าง และการสกัดสารจากไบ๊บก	16
4.2 ผลการเตรียมไลโปโซมเพื่อกักเก็บสารสกัดสารสกัดจากไบ๊บก	22
4.3 ผลการศึกษาความคงตัวของไลโปโซมที่อุณหภูมิต่าง ๆ	27

สารบัญ

บทที่	หน้า
5 สรุปและข้อเสนอแนะ	43
5.1 สรุปผลการทดลอง	43
5.2 ข้อเสนอแนะ	44
รายการอ้างอิง	45



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
4.1 องค์ประกอบของสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากใบบัวบกแห้งที่สกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลายอย่างง่าย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตนไตรล์	18
4.2 องค์ประกอบหลักของสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากใบบัวบกแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล, เอทานอล, 70% เอทานอล, 50% เอทานอล และ 30% เอทานอล	20
4.3 เปรียบเทียบลักษณะฟิล์มบางที่ได้จากทำละลายต่างชนิดในการเตรียมไลโปโซม	24
4.4 ขนาดของอนุภาคไลโปที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด	24
4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง, ค่า PDI และค่าศักย์ zeta-potential ของอนุภาคไลโปโซมทำการทดสอบเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	28
4.6 ค่าร้อยละการกักเก็บ และปริมาณสารอะเซยติโคไซด์ และมาเดคาสติโคไซด์ในไลโปโซมจากสารสกัดใบบัวบก ที่เก็บรักษา ณ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	36

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 บัวบก (<i>Centella asiatica</i> Linn.)	4
2.2 เปรียบเทียบบัวบก (<i>Centella asiatica</i> Linn.) ซ้าย และผักแว่นแก้ว (<i>Hydrocotyle umbellata</i> Linn.) ขวา	5
2.3 โครงสร้างทางเคมีของ Asiaticoside (A), Asiatic Acid (B), Madecassoside (C) และ Madecassic Acid (D)	6
2.4 โครงสร้างของไลโปโซม	8
2.5 โครงสร้างของคอเลสเทอรอล และการจัดเรียงตัวของคอเลสเทอรอลในชั้นเมมเบรน	10
4.1 ลักษณะและสีของใบบัวบกหลังการอบให้แห้งจากตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดนครสวรรค์	16
4.2 Chromatogram ของสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากใบบัวบกแห้งด้วยตัวทำละลายอย่างง่าย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล (A), เอทานอล (B) และอะซิโตนไตรล์ (C) โดยที่ AS คือ อะเซียติโคไซด์ และ MS คือ มาเดคาสโซไซด์	17
4.3 Chromatogram ของสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ ได้แก่ อะเซียติโคไซด์ (AS) และมาเดคาสโซไซด์ (MS) จากใบบัวบกแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล (A), 100% เอทานอล (B), 70% เอทานอล (C), 50% เอทานอล (D) และ 30% เอทานอล (E)	19
4.4 फिल्मบางที่ได้จากการนำคอเลสเทอรอล และเลซิธินในอัตราส่วน 8 ต่อ 1 กรัม น้ำหนัก และใช้ตัวทำละลายไอโซโพรพานอล (A), เอทานอล (B) และเมทานอล (C)	23
4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงขนาด และรูปร่างของไลโปโซมที่ได้จากการเตรียมด้วยตัวทำละลายไอโซโพรพานอล (A), เอทานอล (B) และเมทานอล (C)	23

สารบัญภาพ

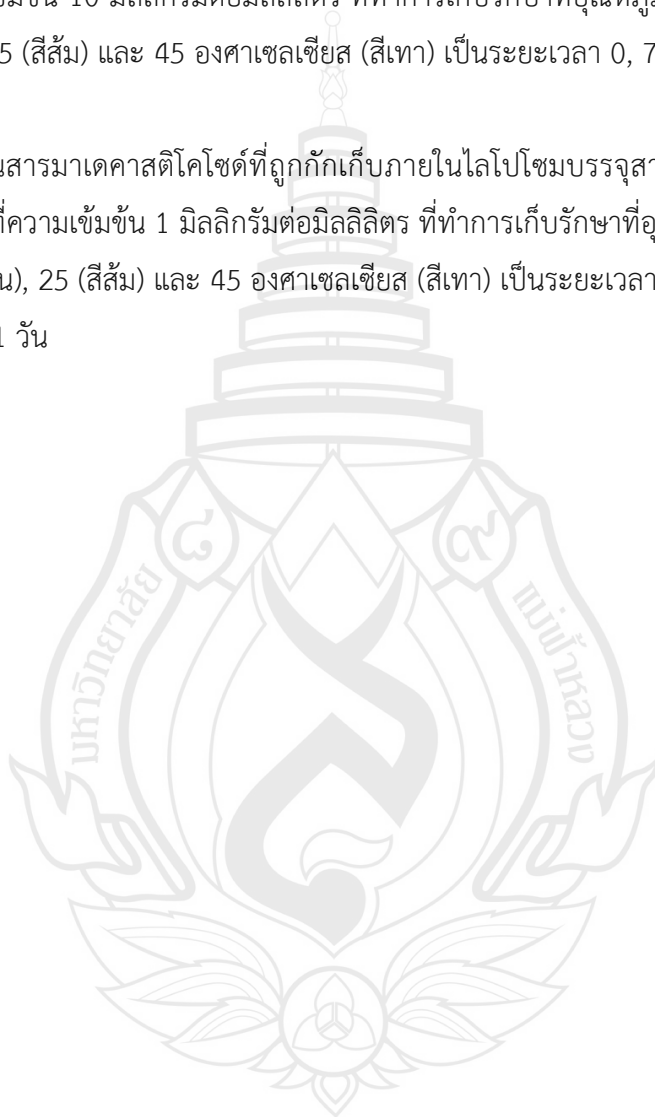
ภาพ	หน้า
4.6 สารละลายไลโปโซมที่มีสารสกัดใบบัวบกความเข้มข้น 0, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (A) และภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงขนาด และรูปร่างของไลโปโซมสารสกัดใบบัวบกที่ได้จากการเตรียมด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่มีสารสกัดใบบัวบกความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B), 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (C) และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (D) ตามลำดับ	27
4.7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	30
4.8 ค่าการกระจายตัวของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	31
4.9 ค่าศักย์ซีตาของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	31
4.10 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	32
4.11 ค่าการกระจายตัวของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	32
4.12 ค่าศักย์ซีตาของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	33

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
4.13 ค่าร้อยละการกักเก็บสารอะเซติลโคไซด์ของไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (ส่น้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	38
4.14 ปริมาณสารอะเซติลโคไซด์ที่ถูกกักเก็บภายในไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (ส่น้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	38
4.15 ค่าร้อยละการกักเก็บของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (ส่น้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	39
4.16 ปริมาณสารมาเดคาสโซไซด์ที่ถูกกักเก็บภายในอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (ส่น้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	39
4.17 ค่าร้อยละการกักเก็บสารมาเดคาสติโคไซด์ของไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (ส่น้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	40
4.18 ปริมาณสารมาเดคาสติโคไซด์ที่ถูกกักเก็บภายในไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (ส่น้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	40

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
4.19 ค่าร้อยละการกักเก็บสารมาเดคาสติโคไซด์ของไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สื่อน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	40
4.20 ปริมาณสารมาเดคาสติโคไซด์ที่ถูกกักเก็บภายในไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวบักที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สื่อน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน	41



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย

ใบบัวบกมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* Linn. เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลกทั้งในทวีปเอเชีย แอฟริกา อเมริกา รวมไปถึงทวีปออสเตรเลีย (Hussin et al., 2014) นอกจากนี้ยังได้มีการวิจัยถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือสรรพคุณทางยาต่าง ๆ ของใบบัวบกอย่างมากมายเช่น มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) (Monton et al., 2019), ฤทธิ์ต้านแผลเปื่อย (Anti-ulcer) (Abdulla et al., 2010), ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial) (Byakodi et al., 2019) รวมไปถึงมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความจำดีขึ้น (Memory-enhancing Properties) (Soumyanath et al., 2012) ข้อมูลทางด้านการตลาดของพืชใบบัวบกพบว่า มีการขายกันอย่างแพร่หลายมาอย่างยาวนานในตลาดท้องถิ่นของภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก และพบว่ามีกำลังเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ ในแถบประเทศอเมริกา และหลายพื้นที่ทางยุโรปในแง่ของการนำใบบัวบกมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ต่าง ๆ (Transparency Market Research, 2021) และมีการศึกษาวิจัยเพื่อประเมินถึงประสิทธิภาพของใบบัวบกในด้านการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งจากคุณสมบัติเหล่านี้จะนำไปสู่การพัฒนาใบบัวบกให้เป็น ผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้ในอนาคต

สารสำคัญที่พบได้มากที่สุดใบบัวบก คือ สารกลุ่มไตรเทอร์ปีน (Triterpene) ได้แก่ อะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside) มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) กรดมาเดคาสสิก (Madecassic Acid) และกรดอะเซียติก (Asiatic Acid) (Azwanida, 2013) สารกลุ่มไตรเทอร์ปีนมีรายงานการใช้ทางด้านเครื่องสำอางค์โดยมีคุณสมบัติในการสมานแผล (Wound-healing), ต่อด้านริ้วรอย (Anti-wrinkle), และช่วยลดเซลลูไลท์ (Anti-cellulite Effects) อีกทั้งยังมีฤทธิ์เพิ่มการสังเคราะห์ของคอลลาเจน และการผลิตโปรตีนไฟโบรเนคติน (Fibronectin) ในเซลล์ไฟโบบลาสต์ที่พบตามผิวหนัง (Human Skin Fibroblast) อีกด้วย (Monton et al., 2019) ด้วยคุณสมบัติดังที่กล่าวมาของสารสำคัญใบบัวบกจึงสามารถกล่าวได้ว่าบัวบกเป็นอีกหนึ่งในพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ และด้วยในปัจจุบันได้เริ่มมีการนำนวัตกรรมด้านระบบนำส่งยาในระดับนาโน (Drug Nano-carrier) ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารสกัด โดยมีหลายระบบ เช่น ไลโปโซม (Liposome), ไฟโทโซม (Phytosome), นาโนพาร์ทิเคิล (Nanoparticle),

นาโนอิมัลชัน (Nanoemulsion) เป็นต้น ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวมีข้อดี-ข้อเสียที่แตกต่างกัน และยังเป็นเพียงการวิจัยในระยะเริ่มต้นที่ต้องมีการปรับปรุงในส่วนของการผลิต และการนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดทางด้านการพัฒนาสารที่ใช้เป็นตัวพาระบบ จำเป็นจะต้องมีการศึกษาพัฒนาเพื่อลดความเป็นพิษของยา และเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษา ตลอดจนควบคุมคุณภาพของสารสำคัญในการออกฤทธิ์อีกด้วย (ภาสวรี จันทรสุก และคณะ, 2555)

การใช้ไลโปโซมเป็นระบบกักเก็บสารสกัดจากใบบัวบกมีความเหมาะสมอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถช่วยเพิ่มความเสถียรของสารสำคัญ ลดการสลายตัวจากแสง ความร้อน และออกซิเจน รวมถึงเพิ่มการดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังได้ดีกว่าการใช้สารสกัดเดี่ยว ๆ โดยเฉพาะสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ที่มีคุณสมบัติสมานแผล ต้านการอักเสบ และกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน แต่มีข้อจำกัดในการซึมผ่านผิวหนัง ไลโปโซมสามารถกักเก็บสารที่ละลายในน้ำและไขมันได้พร้อมกัน ช่วยให้ปลดปล่อยสารออกฤทธิ์อย่างช้า ๆ ลดการระคายเคือง และยืดระยะเวลาการออกฤทธิ์ นอกจากนี้ ยังสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นในการศึกษาการสกัดสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์พีนไกลโคไซด์ ได้แก่ อะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ จากใบบัวบกด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอลผสมกับน้ำในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุด และนำสารสกัดที่ได้มาพัฒนาเป็นระบบกักเก็บในรูปแบบไลโปโซม พร้อมทั้งศึกษาความคงตัวของไลโปโซมภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน (4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน โดยประเมินจากค่าขนาดอนุภาค, ค่าการกระจายตัวของอนุภาค, ค่าศักย์ซีตา และเปอร์เซ็นต์การกักเก็บของสารออกฤทธิ์ ทั้งนี้เพื่อประเมินศักยภาพของระบบไลโปโซมในการเพิ่มความเสถียรภาพของสารสกัด และยังสามารถพัฒนาเป็นระบบนำส่งสารสำคัญจากพืชสมุนไพรสำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางอย่างมีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายในการสกัดสารกลุ่มไตรเทอร์พีนไกลโคไซด์ ได้แก่ อะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์จากสารสกัดหยาบใบบัวบก

1.2.2 เพื่อเตรียม และศึกษาความคงตัวของไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดใบบัวบกที่มีสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาถึงวิธีการสกัดสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ทั้ง 2 ชนิด อะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ที่ได้จากใบบัวบก โดยจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน และศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด และไลโปโซมในการกักเก็บสาร โดยวิธีไลโปโซมเป็นวิธีที่ทำงานง่าย มีประสิทธิภาพสูงในการกักเก็บสารสำคัญ และสามารถทำการศึกษาได้ในระดับห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังจะศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของไลโปโซมในการกักเก็บสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ที่ได้จากใบบัวบก เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดทางด้านการพัฒนาระบบนำส่ง และกักเก็บสารสกัดให้มีความคงตัว และยังเป็นการใช้นวัตกรรมในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจชุมชนไพร่ให้เติบโตไปในอนาคตได้เป็นอย่างดี

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1.4.1 ศึกษาปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์คือ อะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ ที่สกัดจากใบบัวบกด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอลที่ผสมกับน้ำในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยใช้ตัวอย่างใบบัวบกที่ทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครสวรรค์ ในระหว่างเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ 2567

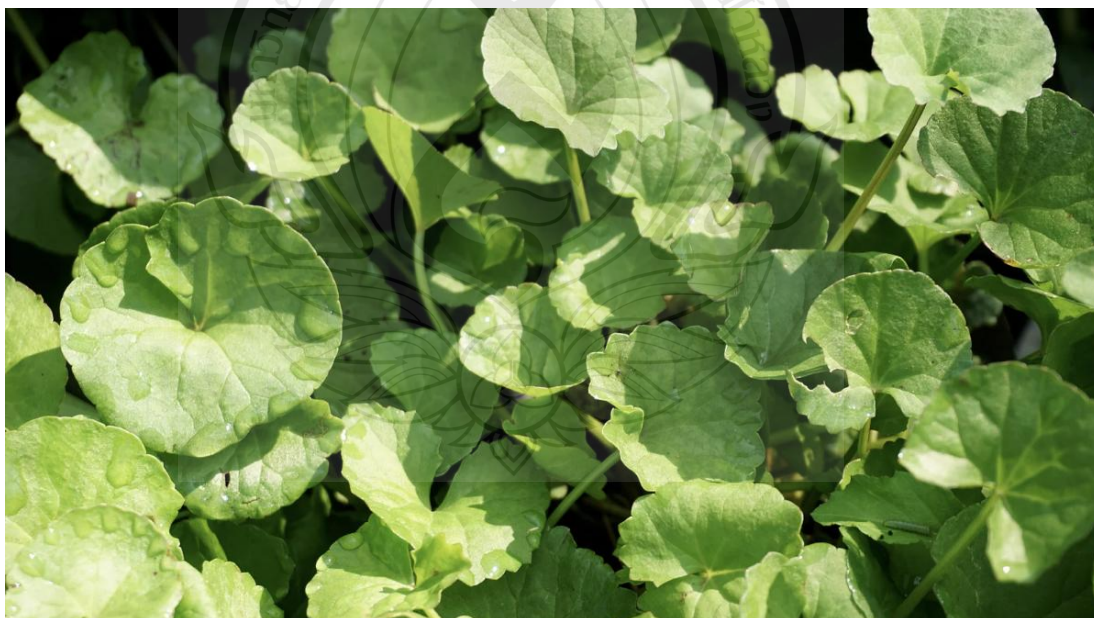
1.4.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ต่อความคงตัวของไลโปโซมในการกักเก็บสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ คือ อะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ ที่ได้จากสารสกัดใบบัวบกที่ผ่านการสกัดแยกส่วนแล้วด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยทำการตรวจวัด ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคไลโปโซม, ค่าการกระจายตัวอนุภาค, ค่าศักย์ซีตา และเปอร์เซ็นต์การกักเก็บสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ เป็นระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 บัวบก

บัวบกเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กอยู่ในวงศ์ Umbelliferae หรือที่รู้จักกันในชื่อวงศ์ผักชี บัวบกมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Centella asiatica* Linn. ชื่อสามัญ gotu kola ชื่อภาษาอังกฤษว่า Asiatic Pennywort และชื่อพื้นเมืองมีหลายชื่อ โดยภาคใต้เรียกผักแว่น ภาคเหนือเรียกว่าผักหนอก ในแถบกะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอนจะเรียกว่า บะหนะเอชาเต๊ะ บัวบกเป็นผักพื้นบ้าน และยังเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่มีอายุหลายปี คนไทยนิยมนำบัวบกมารับประทานสด หรือเป็นผักเครื่องเคียงกับอาหารประเภทต่าง ๆ บัวบกปลูกง่ายเลื้อยยาวไปตามพื้นดิน แตกกิ่งตามข้อใบ ใบเป็นรูปไต ขอบใบหยัก กว้าง 1.5-5 เซนติเมตรยาว 1-5 เซนติเมตร ก้านยาว 1-25 เซนติเมตร ลักษณะใบและก้านบัวบกแสดงดังภาพที่ 1 ดอกเป็นช่อ ออกตามซอกใบ ขนาดเล็ก 2-3 ดอก กลีบดอกสีม่วง ผลแบน (จันทร์พร ทองเอกแก้ว, 2556)



ภาพที่ 2.1 บัวบก (*Centella asiatica* Linn.)

บัวบกชอบขึ้นในพื้นที่ชื้นแต่ไม่แฉะมากหรือน้ำท่วมขัง โดยมากจะขึ้นตามไต้ต้นไม้ใหญ่ หรือท้องร่องในสวน และตามคันนา ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด หรือตัดแยกไหลที่มีดินอ่อน และ ราก นำไปปลูกในที่ที่มีแสงแดดพอควรก็จะเจริญเติบโตได้ดี พบมากในประเทศแถบยุโรปเรื่อยมาจนถึง แถบแอฟริกาใต้ อินเดีย ปากีสถาน และศรีลังกา (Kirtikar & Basu, 1987)

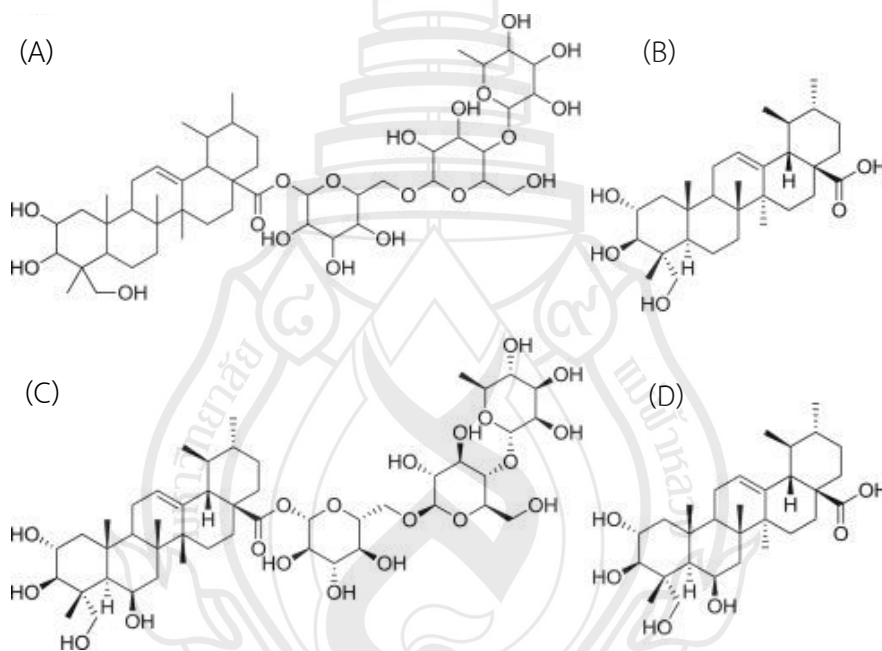
บัวบกมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับพืชอีกชนิดหนึ่งที่ชื่อว่า ผักแว่นแก้ว (*Hydrocotyle umbellata* L.) หากผู้ใดไม่ได้สังเกตอาจจะทำให้เกิดความสับสนในการจำแนกพืชทั้งสองชนิดนี้ได้ โดยลักษณะที่สำคัญในการแยกบัวบก และผักแว่นแก้วจะพิจารณาในส่วนของใบเป็นหลัก โดยใบของ บัวบกจะเป็นรูปไต หรือคล้ายกับรูปหัวใจ ส่วนปลายใบ และขอบใบจะพบแฉกเล็กน้อย และงุ้มม้วนลง ลักษณะพื้นผิวจะหยาบ ขรุขระ และเห็นเป็นร่างแหใบอย่างชัดเจน ในขณะที่ผักแว่นแก้วใบจะมี ลักษณะเป็นทรงกลม ขอบใบจะเรียบ ผิวใบมันลื่น และเรียบ ส่วนการติดของก้านใบกับใบ ผักแว่น แก้วก้านใบจะติดตรงกลางใบทำให้ใบมีลักษณะคล้ายโล่ ในขณะที่บัวบกจะไม่คล้ายโล่ดังภาพที่ 2 (สวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มศว, 2561)



ภาพที่ 2.2 เปรียบเทียบบัวบก (*Centella asiatica* Linn.) ซ้าย และผักแว่นแก้ว (*Hydrocotyle umbellata* Linn.) ขวา

บัวบกจัดเป็นพืชที่มีกลิ่นหอม (Aromatic Plant) และมีรสหวานเมื่อรับประทาน มีสารสำคัญ (Bioactive Compound) ที่พบในบัวบกได้แก่ สารประกอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids Compound) ซึ่งประกอบด้วยสาร 2 กลุ่มด้วยกัน ได้แก่ กลุ่มแรกคือ สารประกอบโมโนเทอร์พีน (Monoterpene) และเซสควิเทอร์พีน (Sesquiterpene) และกลุ่มต่อมาคือ สารประกอบไตรเทอร์พีน (Pentacyclic Triterpene Compound) ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบมากที่สุดใบบัวบก โดย

ประกอบด้วย 4 ชนิด ได้แก่ กรดอะเซียติก (Asiatic Acid) กรดมาเดคาสสิก (Madecassic Acid) อะเซียติโคไซด์ (Asiaticoside) มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) ดังภาพที่ 3 นอกจากนี้ยังพบสาร ไตรเทอร์ปีนชนิดอื่น ๆ อีกได้แก่ 6-เบต้า-ไฮดรอกซีอะเซียติก (6-beta-hydroxyacetic), กรดเทอร์มินอลิก (Terminolic Acid), กรดบรามิก (Brahmic Acid), บราโมไซด์ (Brahmocide) และเซ็นเทลโลไซด์ (Centelloside) (Schaneberg et al., 2003) นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic) อย่าง แคทีชิน (Catechin), นารังจีน (Naringin), เอพิจินิน (Apigenin), รุทีน (Rutin), คิวเคอร์ทีน (quercetin), และน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) อย่าง ฟาร์นิโซล (farnesol) และคาร์โยฟิลลีน (caryophyllene) (Zheng, 1989)



ที่มา Yousaf et al. (2020)

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ Asiaticoside (A), Asiatic Acid (B), Madecassoside (C) และ Madecassic Acid (D)

สารประกอบเทอร์ปีนอยด์มีรายงานการใช้ทางด้านการเครื่องสำอางอย่างมากมาย โดยมีคุณสมบัติในการสมานแผล (Wound-healing), ต่อด้านริ้วรอย (Anti-wrinkle), และช่วยลดเซลลูไลท์ (Anti-cellulite Effects) อีกทั้งยังมีฤทธิ์เพิ่มการสังเคราะห์ของคอลลาเจน และการผลิตโปรตีนไฟโบรเนคติน (Fibronectin) ในเซลล์ไฟโบบลาสต์ที่พบตามผิวหนัง (Human Skin Fibroblast) อีกด้วย

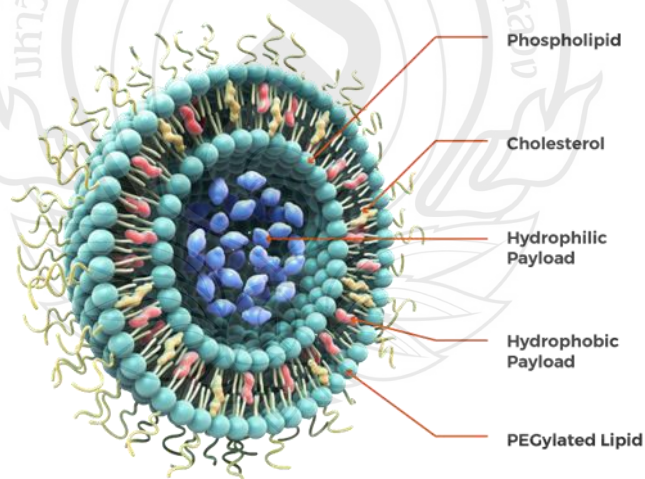
(Monton et al., 2019) อีกทั้งยังมีการศึกษาในระดับยีนด้วยวิธี gene microarrays ร่วมกับ real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่า สารประกอบเทอร์พีนอยด์ ทั้งสี่ชนิดจากใบบัวบกเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดใหม่ ยีนการสร้าง เมทริกซ์นอกเซลล์ขึ้นใหม่ รวมทั้งยีนของ growth factor อีกหลายชนิด (Coldren et al., 2003)

สารอะเซติโคไซด์ในบัวบกมีรายงานถึงคุณสมบัติมีการเพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-inflammation) โดยเพิ่มความสามารถในการ ผ่านของสารต่างๆ ในหลอดเลือด (Capillary Permeability) อีกทั้งยังเพิ่มระดับของสารไฮดรอกซี โพรลีน (Hydroxyproline) ซึ่งเป็นตัวช่วยสำคัญในกระบวนการสมานแผล มีการรายงานถึงผลการ กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน (Collagen Formation) โดยพบว่า สารอะเซติโคไซด์กระตุ้นการ สังเคราะห์คอลลาเจนไทป์ I และ III (Collagen Type I, III) (Lu et al., 2004) ในขณะที่สารมาเดคาส โซไซด์ก็มีรายงานในการกระตุ้นการสังเคราะห์คอลลาเจนไทป์ III ด้วยเช่นกัน (Monton., 2019)

การศึกษาเทคนิคการสกัดสารสำคัญจากใบบัวบกได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และจาก ข้อมูลพบว่า กำลังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี (Idris & Nadzir, 2021) โดยเทคนิคที่นำมาใช้ในการสกัด สารสำคัญจากใบบัวบกเช่น การแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย (Maceration), การสกัดโดยการต้ม (Distillation), การใช้คลื่นเสียงในการช่วยสกัด (Ultrasound Assisted Extraction), การใช้คลื่น แม่เหล็กไฟฟ้า (Microwave Assisted Extraction) เป็นต้น วิธีการแช่ในตัวทำละลายเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากมีขั้นตอนที่ง่าย และสามารถให้ปริมาณของสารสำคัญที่ต้องการใน ปริมาณที่พอเหมาะ (Albuquerque et al., 2017) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการสกัด สารสำคัญจากใบบัวบก ได้แก่ ตัวทำละลายแอลกอฮอล์ และน้ำ อันเนื่องมาจากความมีขั้วของสาร ไตรเทอปีนอยด์ไกลโคไซด์ โดยเฉพาะสารอะเซติโคที่มีโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส (Glucose) และ น้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) จึงสามารถละลายได้ดีในน้ำ และแอลกอฮอล์ (James & Dubery, 2009) การที่สารละลายในน้ำได้ดีทำให้เกิดข้อจำกัดในการผ่านเข้าสู่ผิวหนังชั้นสเตรตัมคอร์เนียม (Stratum Corneum) ส่งผลให้เกิดปัญหาในการดูดซึมสารสำคัญ (Bioavailability) ในร่างกาย (Bonificio et al., 2014) จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาเทคนิคเพิ่มเติมในการนำส่งสารสำคัญ

2.2 ไลโปโซม

ไลโปโซม (Liposome) มีที่มาจากภาษากรีก 2 คำ โดยคำว่า lipos ที่แปลว่าไขมัน และคำว่า soma ที่หมายถึงร่างกาย (Daraee et al., 2014) มีลักษณะเป็นทรงกลม (Spherical Shape) โดยไลโปโซมเป็นระบบนำส่งสารแบบนาโนเวสิเคิล (Nanovesicle) ที่มีขนาดอนุภาคขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน (Submicron) โดยมีขนาดประมาณ 15 -1,000 นาโนเมตร โครงสร้างหลัก (ดังภาพที่ 2.4) ของไลโปโซมประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญได้แก่ ส่วนฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ซึ่งมีทั้งชนิดที่เตรียมได้จากธรรมชาติ และชนิดที่สังเคราะห์ขึ้น ชนิดที่นิยมใช้คือ เลซิทีน (Lecithin) หรือฟอสฟาติดีลโคลีน (Phosphatidylcholine) และอาจใช้สารอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Amphipathic) แทนได้ และส่วนคอเลสเตอรอล (Cholesterol) เป็นองค์ประกอบที่แทรกตัวอยู่ในชั้นผนังของไลโปโซม ทำหน้าที่ในการรักษาความเสถียรภาพของไลโปโซม จากองค์ประกอบที่กล่าวมาจึงทำให้ไลโปโซมมีคุณสมบัติเป็นสารแอมฟิพาติก (amphipathic) คือมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในโมเลกุล โดยจะเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลซ้อนกันเป็นผนังสองชั้นหรือ lipid bilayer โดยตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบน้ำจะกักเก็บอยู่ในส่วนของชั้นที่มีขั้ว ส่วนตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะแทรกอยู่ในชั้น lipid bilayer



ที่มา Majumdar et al. (2024)

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของไลโปโซม

ขนาดของไลโปโซมนั้นพบได้แตกต่างกัน โดยไลโปโซมขนาดใหญ่อาจมีผนังสองชั้นหลายชุด (Large Multilamellar Vesicles, LMV) มีขนาดอนุภาค 0.05-10 ไมครอน (1 ไมครอน เท่ากับ 1,000 นาโนเมตร) เมื่อนำไลโปโซมนี้ไปผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง จะได้ไลโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นชุดเดียว (Small Unilamellar Vesicles, SUV) ซึ่งมีขนาดอนุภาค 0.025-0.05 ไมครอน ปัจจุบันมีการนำไลโปโซมมาใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัย เนื่องจากไลโปโซมสามารถเก็บกักยาได้ทั้งชนิดที่ชอบน้ำ (Hydrophilic Drugs) และไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Drugs) ในส่วนที่เป็นวัตถุน้ำภายในอนุภาค หรือส่วนที่อยู่ระหว่างผนังสองชั้นของไลโปโซมตามลำดับ

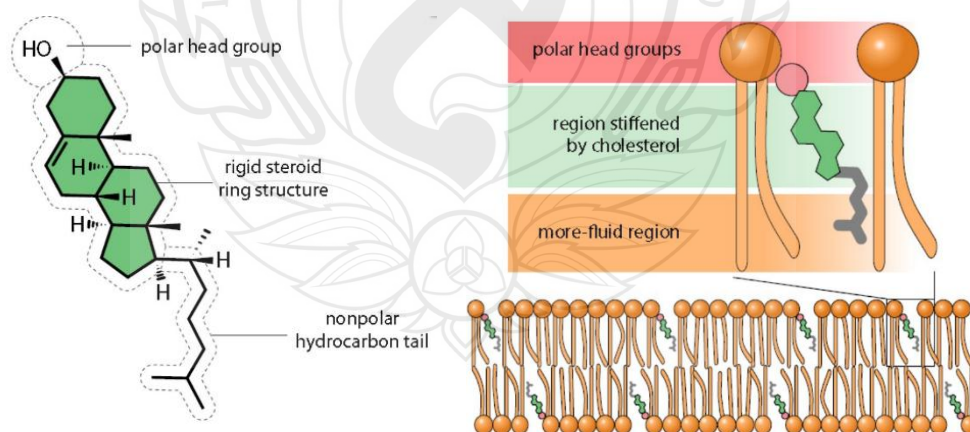
การเลือกวิธีในการเตรียมไลโปโซมขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะทางเคมี ความเข้มข้นของสารที่จะนำเข้าสู่ไลโปโซม ลักษณะทางเคมีของสารที่ใช้สร้างหรือผลิตไลโปโซม ความเหมาะสมของขนาดไลโปโซมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ และขนาดการผลิต ซึ่งจากการศึกษาพบว่าวิธี Thin-film hydration method เป็นวิธีที่แพร่หลาย มีกระบวนการไม่ซับซ้อน และเหมาะสมกับสารที่ใช้ในการเตรียมไลโปโซม สามารถเตรียมโดยละลายสารฟอสโฟลิปิดในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมแล้วทำให้เกิดฟิล์มของฟอสโฟลิปิดด้วยการระเหยเอาส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ออก จากนั้นเติมน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ ฟิล์มที่กลับมาเปียกจะสร้างเป็นไลโปโซมชนิด MLV ซึ่งการเติมตัวยา หรือสารสำคัญลงไปจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารนั้น ถ้าสารละลายในน้ำได้ไม่ดี จะเติมลงในสารละลายฟอสโฟลิปิดในช่วงการสร้างฟิล์ม แต่ถ้าตัวยาละลายน้ำได้ดีจะเติมลงในส่วนของสารละลายน้ำในช่วงที่ทำให้ฟิล์มเปียกแทน

การตรวจวัดคุณภาพของไลโปโซมสามารถทำได้ และจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติที่หลากหลายเพื่อประเมินประสิทธิภาพที่เหมาะสม เช่น การวัดขนาดอนุภาค (Particle Size) รูปร่าง (Morphology), การวัดการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Polydispersity Index: PDI) ซึ่งค่า PDI บ่งบอกถึงความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาค โดยค่าต่ำจะมีความสม่ำเสมอของอนุภาคสูงกว่าค่าสูง การวัดศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (Zeta-potential) บ่งบอกความเสถียรของสารแขวนลอย ความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญ (Encapsulation Efficiency) การปลดปล่อยสารสำคัญ (Active Ingredient Release) ด้วยเครื่อง franz diffusion cell เป็นต้น

การกักเก็บสารในรูปแบบไลโปโซมมีข้อดีหลายประการ โดยไลโปโซมสามารถเตรียมได้จากไขมันที่ไม่เป็นพิษ และเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทำให้เข้ากันได้กับร่างกาย และสามารถถูกทำลายได้ สามารถเพิ่มความคงตัวของสารที่ถูกกักเก็บ ช่วยลดความเป็นพิษของสาร สามารถดัดแปลงโครงสร้างได้ง่ายเช่น สามารถผลิตไลโปโซมให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ได้ด้วยการติดสารหรือลิแกนด์ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารที่ถูกกักเก็บภายใน และทำให้ยาออกฤทธิ์ได้นานขึ้น แต่อย่างไรก็ตามไลโปโซมยังมีข้อจำกัดในเรื่องความคงตัว เนื่องจากฟอสโฟลิปิดบางชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) และสามารถเกิดการย่อยสลาย

(Hydrolysis-like Reaction) ทำให้เกิดการรั่วของสารที่กักเก็บภายในได้ นอกจากนี้ตัวสารสำคัญที่ละลายได้ในไขมันเมื่อทำการกักเก็บด้วยวิธีไลโปโซมพบว่า จะอยู่บริเวณชั้นของฟอสโฟลิปิด และจะเกิดการแพร่ของสารไปยังบริเวณที่เป็นน้ำด้านนอก แล้วเกิดการสลายตัวขึ้น ปรากฏการณ์นี้ไม่สามารถป้องกันไม่ให้เกิดขึ้นได้ แต่สามารถชะลอให้เกิดช้าลงโดยการเพิ่มความหนืดของชั้นฟอสโฟลิปิด อย่างเช่น การเติมคอเลสเตอรอลลงไปก็จะสามารถช่วยลด หรือชะลอระยะเวลาการสูญเสียสารสำคัญนี้ไปได้

คอเลสเตอรอล (Cholesterol) ไม่สามารถที่จะเกิดการจัดเรียงตัวในลักษณะสองชั้นได้ด้วยตัวเอง แต่เกิดจากการรวมกันของชั้นเมมเบรนฟอสโฟลิปิด (Phospholipid Membrane) เข้าด้วยกัน คอเลสเตอรอลแขวนตัวอยู่ในชั้นของเมมเบรนฟอสโฟลิปิด ด้วยความที่มีหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล (Hydroxyl Group) ทำให้โมเลกุลของคอเลสเตอรอลสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ และกับสายไฮโดรคาร์บอนของฟอสโฟลิปิดได้ (Daraee et al., 2014) ได้มีการศึกษานำคอเลสเตอรอลมาใช้ในการผลิตไลโปโซม เนื่องจากคอเลสเตอรอลมีส่วนสำคัญในการเพิ่มความคงตัวและความเพิ่มความแข็ง (Rigidity) ของไลโปโซม ช่วยให้การเรียงตัวของผนังฟอสโฟลิปิดแบบสองชั้นของไลโปโซมเป็นระเบียบยิ่งขึ้น และลดการซึมผ่านออกของสารที่ถูกกักเก็บไว้ โดยพบว่า การเติมคอเลสเตอรอลลงไปเป็นส่วนผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ ทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารในชั้นน้ำของไลโปโซมสูงกว่าไลโปโซมที่ไม่มีการเติมคอเลสเตอรอล (เนื้อทอง วณานวัธ และ ศรัล วรณพันธุ์, 2545) นอกจากนี้การศึกษาถึงสัดส่วนของคอเลสเตอรอลต่อฟอสโฟลิปิดว่าสามารถใช้ตั้งแต่ 0.5:1 ไปจนถึง 1:1 (New, 1990)



ที่มา Wegner et al. (2022)

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของคอเลสเตอรอล และการจัดเรียงตัวของคอเลสเตอรอลในชั้นเมมเบรน

2.3 กลไกการดูดซึมสารผ่านผิวหนัง

ไลโปโซมเป็นตัวนำส่งสารระบบหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็น อนุภาคที่สามารถเพิ่มการนำส่งสารสำคัญผ่านผิวหนังได้ โดยกลไกในการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนัง ของไลโปโซมมีหลายกลไก ได้แก่ ไลโปโซมดูดซับบริเวณผิวส่วนนอกสุด แล้วเกิดการแตก และเพิ่มแรง ส่งให้สารเข้าสู่ผิวหนังได้ดีขึ้น หรือไลโปโซมซึมเข้าสู่ผิวหนังชั้นนอกสุด และหลอมรวมกับส่วนของ ไขมันในผิวหนังชั้นนี้ แล้วค่อย ๆ ปลดปล่อยสารที่กักเก็บไว้ ทำให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของยา หรือสารสำคัญยาวนานขึ้น ซึ่งผลเพิ่มการนำส่งสารทางผิวหนังอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติทางเคมี กายภาพของไลโปโซม เช่น ขนาดอนุภาค ประจุผิว (Surface Charge) จำนวนชั้นของผนังไลโปโซม (Lamellarity) เป็นต้น ไลโปโซมสามารถดูดซึมผ่านผิวหนังได้ 3 ช่องทาง คือ ผ่านเซลล์ของ ผิวหนัง (Transcellular Route) ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (Intracellular Route) และผ่านช่องหรือ ท่อเปิดบริเวณผิวหนัง (Appendageal Route) โดยเมื่อสารสัมผัสกับผิวหนัง สารจะถูกดูดซึมเข้าสู่ ผิวหนังโดยการแพร่ได้ 3 ทาง คือ

ช่องทางแรกผ่านเซลล์ของผิวหนัง (Transcellular, Trans-corneocytes หรือ Intracellular Route) โดยเซลล์ของผิวหนังชั้น stratum corneum มีส่วนประกอบที่เป็นเส้นใยโปรตีนเป็น องค์ประกอบหลัก จึงมีส่วนที่มีขั้ว และไม่มีขั้วเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นสารที่จะแพร่ผ่านในบริเวณนี้ได้ ดีควรจะละลายได้ทั้งในน้ำ และน้ำมัน

ช่องทางที่สองผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (Intercellular Route) ซึ่งในระหว่างเซลล์ใน ชั้น stratum corneum ประกอบด้วยส่วนที่เป็นของเหลวที่เป็นไขมัน ดังนั้นสารที่จะสามารถซึมผ่าน ได้ดีจะต้องมีคุณสมบัติที่สามารถละลายในไขมันได้บางส่วน แต่ต้องไม่ละลายในไขมันดีจนเกินไป เนื่องจากการละลายในไขมันได้ดีเกินไปมีผลให้ตัวยาหรือสารสำคัญอาจถูกจับไว้ในชั้นของผิวหนัง ส่งผลให้ไม่เกิดการปลดปล่อยยาหรือสารสำคัญให้ผ่านไปยังผิวหนังชั้นถัดไป สารที่ผ่านได้ดีควรมีค่า สัมประสิทธิ์การแบ่งภาค (Partition Coefficient) ใกล้เคียงหนึ่ง

ช่องทางที่สามผ่านทางรูเปิดหรือท่อบนผิวหนัง (Trans-appendageal) ได้แก่ บริเวณต่อม ไขมัน รูขุมขน และต่อมเหงื่อ ซึ่งบริเวณนี้จะยอมให้สารที่มีขั้ว และโมเลกุลใหญ่ซึมผ่านได้ดี แต่ อย่างไรก็ตามพื้นที่ผิวของรูเปิดนี้นับว่าน้อยมาก ประมาณ 0.1% จึงไม่ช่วยการดูดซึมมากนักในบริเวณ นี้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างใบบัวบก

นำใบบัวบกสดที่ทำการเก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ ใช้ช่วงเวลา 9.00 – 12.00 น. มาแยกเอาเฉพาะส่วนใบของบัวบกเท่านั้น เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าส่วนใบของบัวบกมีปริมาณสาร pentacyclic triterpene มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น (Puttarak & Panichayupakaranant, 2012) นำใบบัวบกที่ได้ล้างด้วยน้ำจนสะอาด ตากลมให้ใบสะเด็ดน้ำ จากนั้นนำมาอบในตู้อบลมร้อนที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำใบบัวบกแห้งที่อบแล้วมาทำการปั่นให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดอาหารแห้ง เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสกัดสารต่อไป จากนั้นนำผงใบบัวบกที่ได้มาเก็บไว้ในขวดสีชา และเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง

3.2 การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารกลุ่มไตรเทอร์พีนไกลโคไซด์ จากตัวอย่างใบบัวบกแห้ง

ทำการประเมินความมีขั้วที่เหมาะสมเบื้องต้นของตัวทำละลาย 3 ชนิดได้แก่ เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตนไตรัล เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดเอสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโไซด์ออกมามากที่สุด โดยการนำตัวอย่างใบบัวบกแห้งจำนวน 1 กรัม แช่ในตัวทำละลาย 3 ชนิด 10 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 10 น้ำหนักกรัมแห้งใบบัวบกต่อปริมาตรสารตัวทำละลายในหน่วยมิลลิลิตร) แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาเฉพาะสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารละลายสารสกัดใบบัวบกเก็บในภาชนะขวดสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทดสอบวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์พีนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เพื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการสกัดเอสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโไซด์จากใบบัวบก

3.3 การวิเคราะห์สารอะเซตีโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในกลุ่มไตรเทอร์ปีนจากใบบัวบกที่ได้จากข้อ 3.2 (ดัดแปลงวิธีจาก Monton et al. (2019) ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1260 infinity, Agilent, USA) โดยใช้คอลัมน์ ACE C18-PFP column วิเคราะห์หาปริมาณอะเซตีโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์จากสารสกัดหยาบใบบัวบก โดยใช้อะซิโตนไตรล์ (Acetonitrile) และ กรดซัลฟอริก (Phosphoric Acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร, % v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ด้วยอัตราการไหลคงที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที (mL/min) ทำการตรวจวัดปริมาณสารที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (nm) และใช้สารตัวอย่างมาตรฐานอะเซตีโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือส่วนต่อล้านส่วน (ppm) โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากใบบัวบกที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตนไตรล์ วัดปริมาณของสารสำคัญที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย และบันทึกผล

3.4 การสกัดสารอะเซตีโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์จากใบบัวบกด้วยวิธีแช่ตัวอย่าง ในสารตัวทำละลาย

ดัดแปลงวิธีจาก Monton et al. (2019) นำผงใบบัวบกที่ผ่านการอบแห้งจำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดสีชาขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ เมทานอล และเอทานอลที่ความเข้มข้น 100, 70, 50 และ 30% เป็นตัวทำละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 10 น้ำหนักกรัมแห้งใบบัวบกต่อ ปริมาตรสารตัวทำละลายในหน่วยมิลลิลิตร) มาเทใส่ลงในขวดสีชาแต่ละขวดที่บรรจุผงบัวบกแห้งที่ชั่งไว้ เขย่าให้สารผสมกัน และนำไปแช่ใน water bath shaker ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนํานำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง และแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง เพื่อเอาตะกอนของผงบัวบกออกจากสารสกัด ทำการสกัดซ้ำอีก รอบ รวบรวมสารละลายใบบัวบกที่ได้ในแต่ละสารตัวทำละลาย เก็บตัวทำละลายที่ได้ไปมาระเหยเอา ตัวทำละลายที่เหลือออกด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ บันทึกน้ำหนัก และคำนวณร้อยละของสารสกัดที่ได้ จากนั้น นำสารสกัดหยาบเก็บในภาชนะขวดสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทดสอบ

เช่นกันวิเคราะห์ปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดกาโซไซด์ป็นด้วยวิธี HPLC เพื่อศึกษาว่าตัวทำลายใดมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัด

3.5 การเตรียมไลโปโซมเพื่อกักเก็บสารสกัดสารสกัดจากใบบัวบก

3.5.1 การคัดเลือกตัวทำลายเพื่อใช้เตรียมไลโปโซม

ทำการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธีฟิล์มบาง (Thin-film Hydration Method) (Tripathy & Srivastav, 2023) โดยเตรียมส่วนของสารผสมไม่มีขั้ว โดยทำการผสมเลซิธินจากถั่วเหลือง (Soy Lecithin) ต่อกอเลสเตอรอล ในอัตราส่วน 8 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) โดยชั่งเลซิธินจากถั่วเหลือง 810 กรัม และคอเลสเตอรอล 90 กรัม แล้วนำไปเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการเตรียมด้วยตัวละลาย 3 ชนิดได้แก่ เมทานอล, เอทานอล และไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (คิดเป็นความเข้มข้นของเลซิธิน และคอเลสเตอรอลต่อสารละลาย 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูง (Sonicator) และนำไประเหยตัวทำลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ฟิล์มบางของฟอสโฟลิพิด สังเกตลักษณะของฟิล์มบางที่เกิดขึ้น

การเตรียมส่วนของสารละลายมีขั้วในชั้นน้ำ โดยการผสมสารสกัดจากใบบัวบกที่ผ่านการสกัดแยกชั้นด้วยตัวทำลายที่เหมาะสมในความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 0.01 โมลาร์ (Molar; M) ของสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (Phosphate Buffered saline; PBS) pH 7.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเทส่วนของสารละลายมีขั้วลงบนแผ่น ฟิล์ม และนำไปหมุนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้สภาวะสุญญากาศ ทำการหมุนจนกว่าฟิล์ม และสารละลายสารสกัดใบบัวบก ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูง (20 กิโลเฮิร์ตซ์) เป็นเวลา 5 นาที และเตรียมนำไปวัดคุณสมบัติทางกายภาพเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการเตรียมอนุภาคไลโปโซมต่อไป

3.5.2 การเตรียมไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดใบบัวบก

คัดเลือกตัวทำลายที่ทำให้เกิดไลโปโซมที่มีคุณสมบัติทางกายภาพดีที่สุด ใช้ในการเตรียมไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.5.2

3.6 การวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไลโปโซม

ก่อนทำการวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไลโปโซม ทำการเตรียมสารละลายที่ได้จากหัวข้อ 3.5.2 ปริมาตร 1 มิลลิตร นำมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 90 มิลลิตร (คิดเป็นการเจือจาง 100 เท่า) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไป วัดค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง, ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (PDI) และศักย์ซีตา (Zeta Potential) ของไลโปโซมที่เตรียมจากตัวทำละลายเมทานอล, เอทานอล และไอโซโพรพานอล โดยปริมาตรต่อปริมาตร ด้วยเครื่อง SZ-100 Nanoparticle Size & Zeta Potential Analyzer เปรียบเทียบประสิทธิภาพ และคัดเลือกจากวิธีที่ดีที่สุดเพื่อนำไปทดสอบต่อไป

3.7 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการกักเก็บและความคงตัวของไลโปโซม

นำไลโปโซมที่เตรียมได้จากข้อ 3.5 มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บสารโดยทำการเก็บรักษาไลโปโซมไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน ก่อนนำไลโปโซมมาตรวจวิเคราะห์ นำสารละลายไลโปโซมปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 9 มิลลิตร (คิดเป็นการเจือจาง 10 เท่า) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (ดัดแปลงจากวิธีของ Marsanasco et al., 2011) ดูดเอาเฉพาะส่วนสารละลายใสด้านบน 1 มิลลิตร นำมาวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนโดยใช้เทคนิค HPLC (รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในข้อ 3.3) (คิดเป็น W_1) จากนั้นนำไลโปโซมมาทำให้แตกโดยใช้สารละลาย triton X-100 (10% v/v) ปริมาตร 1 มิลลิตรผสมให้เข้ากัน เพื่อให้ไลโปโซมปลดปล่อยสารสกัดใบบวบที่ถูกกักเก็บไว้ออกมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำสารละลายส่วนใสด้านบน 1 มิลลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนโดยใช้เทคนิค HPLC อีกครั้ง (คิดเป็น W_2) แล้วคำนวณหาปริมาณกลุ่มไตรเทอร์ปีนแต่ละตัวที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพการกักเก็บสารดังสมการ และทำการวิเคราะห์วัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค, ศักย์ซีตา (Zeta Potential) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค บันทึกผลพร้อมประเมินประสิทธิภาพ

บทที่ 4

ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

4.1 ผลการเตรียมตัวอย่าง และการสกัดสารจากใบบัวบก

4.1.1 ผลการเตรียมตัวอย่างใบบัวบก

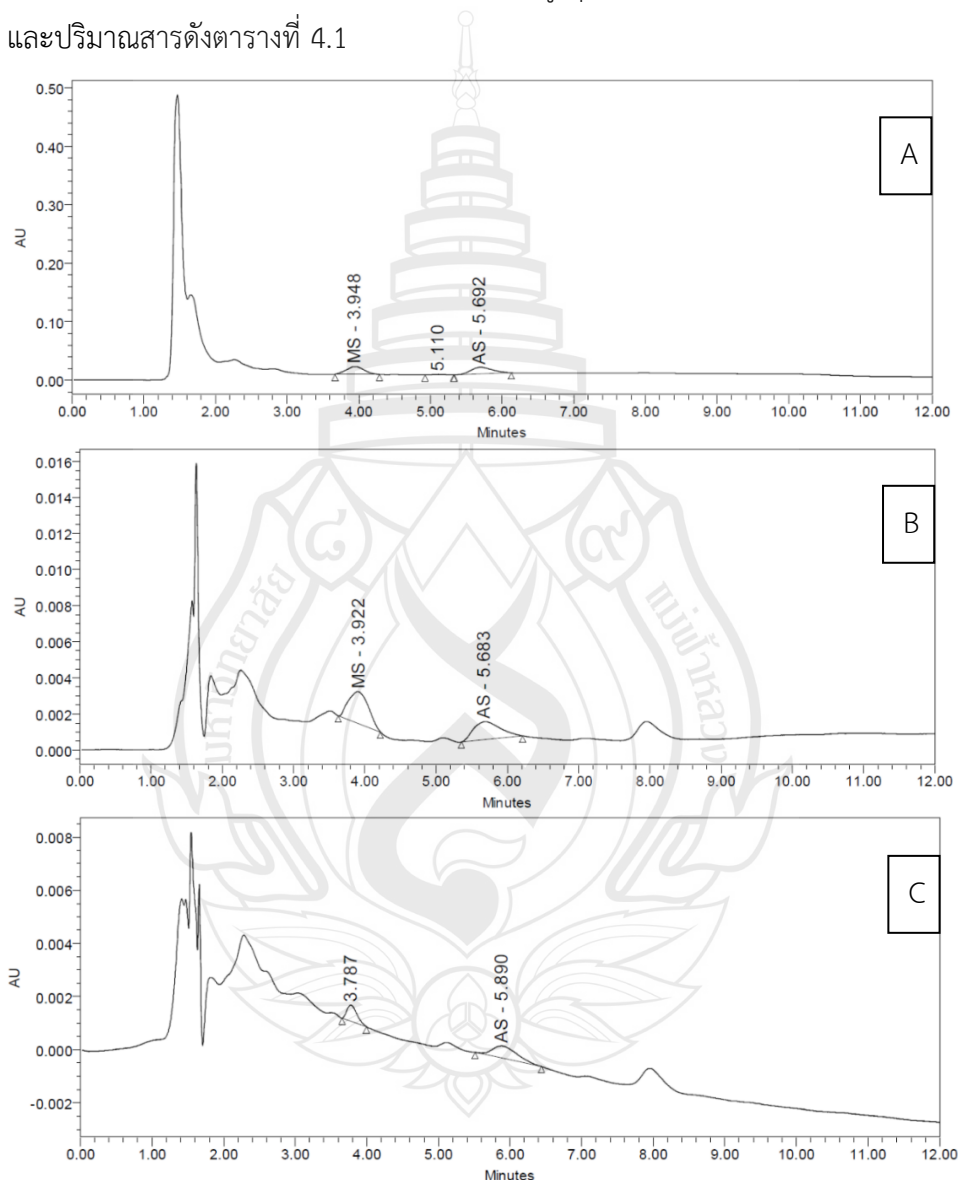
หลังจากทำการเก็บตัวอย่างใบบัวบกจาก สถานที่อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ และเมื่อผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ 3.3 เรียบร้อยแล้ว ลักษณะของผงใบบัวบกที่ได้ คือมีสีเขียวเข้ม ดังภาพที่ 4.1 น้ำหนักแห้งใบบัวบกที่ได้เท่ากับ 4.57 กรัม จากน้ำหนักสดใบบัวบก 100 กรัม คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งคือ 4.57



ภาพที่ 4.1 ลักษณะและสีของใบบัวบกหลังการอบให้แห้งจากตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดนครสวรรค์

4.1.2 ผลการประเมินความมีชี้นำของตัวทำละลายเบื้องต้นในการสกัดสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากตัวอย่างใบบัวบกแห้ง

สารสกัดใบบัวบกแห้งที่ถูกสกัดอย่างง่ายด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และอะซิโตนไตรล์ ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ด้วยวิธี HPLC พบว่าตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดเอาสารสำคัญออกมา ดังภาพที่ 4.2 และปริมาณสารดังตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.2 Chromatogram ของสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากใบบัวบกแห้งด้วยตัวทำละลายอย่างง่าย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล (A), เอทานอล (B) และอะซิโตนไตรล์ (C) โดยที่ AS คือ อะเซยีติโคไซด์ และ MS คือ มาเดคาสโซไซด์

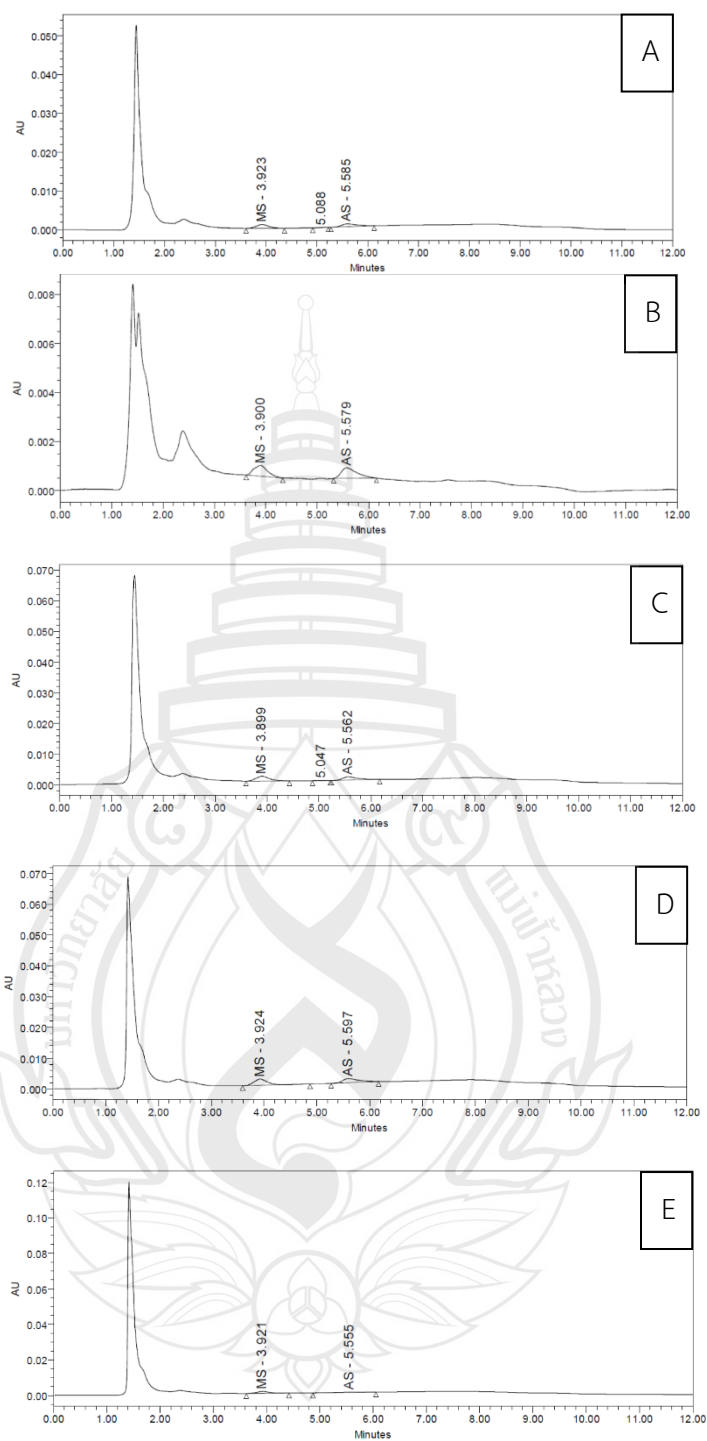
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากใบบัวบกแห้งที่สกัดแยก ส่วนด้วยตัวทำละลายอย่างง่าย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตนไตรล์

No.	ชนิดตัวทำละลาย	อะเซียติโคไซด์ (ppm)	มาเดคาสโซไซด์ (ppm)
1	เมทานอล	296.67±44.83	138.15±8.98
2	เอทานอล	239.91±21.38	102.92±2.25
3	อะซิโตนไตรล์	101.74±4.39	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

หมายเหตุ* ทำการจากแต่ละตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง (n = 3)

4.1.3 ผลการสกัดสารจากใบบัวบกด้วยการแช่ในตัวทำละลาย

ตัวอย่างใบบัวบกแห้ง ที่ถูกนำไปแช่กับตัวทำละลาย 100% เมทานอล, 100, 70, 50 และ 30% เอทานอล ในอัตราส่วนน้ำหนักแห้งของบัวบก 10 กรัม ต่อปริมาตรตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร ทำการแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไประเหยตัวทำละลายออก พร้อมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด โดยอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์จะพบที่ค่า retention time (RT) ที่ 3.913 ± 0.013 และ 5.576 ± 0.017 นาที ตามลำดับ และพบว่า ตัวทำละลาย 70% เอทานอล มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการสกัดเอาสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ออกมาได้ รองลงมาคือ 50% เอทานอล, เมทานอล, เอทานอล และน้อยสุดคือ 30% เอทานอล ดังภาพที่ 4.3 เมื่อทำการคำนวณร้อยละของการสกัดพบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลาย 30% เอทานอลให้ปริมาณสารสกัดหายามากที่สุด รองลงมาคือ 50% เอทานอล, 70% เอทานอล, เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถตรวจวัดปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ออกมาได้ ดังตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.3 Chromatogram ของสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ได้แก่ อะเซียติโคไซด์ (AS) และมาเดคาสโซไซด์ (MS) จากใบบัวบกแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล (A), 100% เอทานอล (B), 70% เอทานอล (C), 50% เอทานอล (D) และ 30% เอทานอล (E)

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบหลักของสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากใบบัวบกแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล, เอทานอล, 70% เอทานอล, 50% เอทานอล และ 30% เอทานอล

No.	ชนิดตัวทำละลาย	ร้อยละการสกัด (%)	อะเซียติโคไซด์ (ppm)	มาเดกาสโซไซด์ (ppm)
1	เมทานอล	3.25	168.03±1.87	77.61±1.44
2	100% เอทานอล	4.12	107.65±2.61	42.82±3.02
3	70% เอทานอล	5.85	302.41±3.09	149.46±0.83
4	50% เอทานอล	6.63	234.46±3.70	117.04±0.68
5	30% เอทานอล	8.74	65.51±1.92	82.19±0.48

หมายเหตุ* ทำการทดลองจากแต่ละตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง (n = 3)

จากผลการสกัดอย่างง่ายด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด (เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตน ไตรล์) พบว่า สารละลายเมทานอลมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดเอสารมาเดกาสโซไซด์ และอะเซียติโคไซด์จากใบบัวบก รองลงมาคือสารละลายเอทานอล และอะซิโตน ไตรล์ โดยที่การสกัดอย่างง่ายด้วยสารละลายอะซิโตน ไตรล์ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณที่สารอะเซียติโคไซด์ได้เลย และจากทุกชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพบว่า ใบบัวบกจากแหล่งที่ทำการเก็บมาศึกษาในครั้งนี้ ให้ปริมาณอะเซียติโคไซด์ที่มากกว่ามาเดกาสโซไซด์ จากการศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายต่อสารออกฤทธิ์จากใบบัวบก (Mohapatra et al., 2021) พบว่า ตัวทำละลายเมทานอล, เอทานอล และอะซิโตน ไตรล์มีประสิทธิภาพในการสกัดเอสารมาเดกาสโซไซด์ อยู่ที่ 0.54, 0.32 และ 0.19 ร้อยละน้ำหนักต่อ น้ำหนัก (% w/w) ตามลำดับ และอะเซียติโคไซด์เท่ากับ 1.78, 0.99 และ 0.42 % w/w ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ โดยที่สารละลายเมทานอล มีประสิทธิภาพสูงสุดเช่นเดียวกัน ในกรณีที่ตัวทำละลายและอะซิโตน ไตรล์ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณของสารมาเดกาสโซไซด์ได้ อันเนื่องมาจากเวลาที่ใช้ในการแช่ในตัวทำละลายที่สั้น อีกทั้งปริมาณสารที่มีน้อยอยู่แล้วจึงทำให้ตรวจไม่พบได้จากเทคนิค HPLC ในครั้งนี้

เมทานอล และเอทานอล มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดเอสารกลุ่มไตรเทอร์ปีน และสารประกอบฟีนอลิก จากใบบัวบก มีการศึกษาพบว่า การเพิ่มความเป็นขี้ให้กับสารละลายอย่างเหมาะสม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเอสารสำคัญออกมาจากพืชได้มากยิ่งขึ้น ในขณะที่น้ำที่มีความเป็นขี้สูง พบว่ามีประสิทธิภาพในการสกัดเอสารสำคัญจากใบบัวบกน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายในกลุ่มแอลกอฮอล์ เนื่องจากสามารถเกิดแรงผลักกับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีในพืชอย่างหมู่คาร์บอกซิล (-COO) หรือหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ได้มาก การลดความเป็นขี้ของตัวทำ

ละลายลงจะทำให้มีประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญกลุ่มนี้มากขึ้น (Rafinska et al., 2019) ซึ่งเป็นไปตามผลการทดลองที่เมื่อมีการผสมสัดส่วนของสารละลายน้ำมากขึ้นในการผสมกับเอทานอล (50 และ 30% เอทานอล) ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดเอสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนจากใบบัวบกลดลง ส่วนอะซีติโคไซด์ในไตรมีความเป็นขั้วต่ำที่สุดในกลุ่มสารละลายที่ใช้สกัดในครั้งนี้ จึงไม่มีความเหมาะสมในการดึงเอสารอะซีติโคไซด์ออกมาได้ ในขณะที่ตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอลจะมีความเป็นขั้วที่เหมาะสมมากกว่า เนื่องจากสารอะซีติโคไซด์ จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบไตรเทอร์ปีน มีลักษณะโครงสร้างเป็นสารที่เรียกว่า ซาโปนินไกลโคไซด์ (Saponin Glycoside) ที่มีการเติมโมเลกุลน้ำตาล 3 โมเลกุล บริเวณโครงสร้างของหน่วยไตรเทอร์ปีน โดยโมเลกุลของน้ำตาลนั้นประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส (Glucose) 2 โมเลกุล และน้ำตาลแรมนโนส (Rhamnose) 1 โมเลกุล ทำให้มีความสามารถในการละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว (Azis et al., 2017)

จากผลการทดลองการสกัดด้วยการแช่ใบบัวบกแห้งในตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด พบว่า ตัวทำละลาย 70% เอทานอลมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดเอสารมาเดคาสโซไซด์ และอะซีติโคไซด์ออกมาได้สูงสุดเมื่อเทียบกับสารละลายอื่น อันเนื่องมาจาก การใช้สารละลายเอทานอลมีประจุที่มีความใกล้เคียงกับสารในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จึงทำให้มีการสกัดเอสารสำคัญในกลุ่มนี้ออกมาได้มาก จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีต่างๆ ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากใบบัวบก (Idris et al., 2021) พบว่า ความแตกต่างของการมีขั้วในสารละลาย จะมีความจำเพาะต่อสารสำคัญ การใช้เอทานอลผสมกับน้ำในอัตราส่วนต่าง ๆ ให้ประสิทธิภาพในการสกัดเอสารสำคัญอย่าง มาเดคาสโซไซด์ และอะซีติโคไซด์ ออกมาได้มากกว่าการใช้สารละลายเอทานอล หรือน้ำเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง (Monton et al., 2019) ในขณะที่การใช้เมทานอลสามารถสกัดเอสารสำคัญในกลุ่ม ฟีนอล, ฟลาโวนอยด์ และสารในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ โดยเฉพาะมีการใช้ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (Pillai et al., 2024) แต่เนื่องจากความเป็นพิษของการใช้ตัวทำละลายเมทานอลจึงมักไม่เป็นที่นิยมในการนำมาสกัดสารสำคัญที่ใช้ในการอุปโภค บริโภค หรือใช้ทากับผิวหนัง

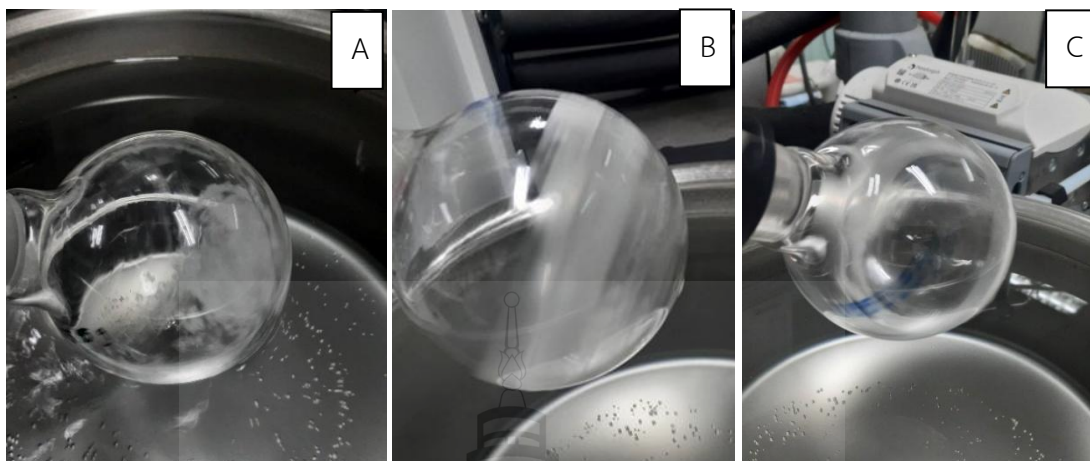
4.2 ผลการเตรียมไลโปโซมเพื่อกักเก็บสารสกัดสารสกัดจากใบบัวบก

4.2.1 ผลการเปรียบเทียบตัวทำละลายต่างชนิดในการเตรียมไลโปโซม

หลังการผสมคอเลสเทอรอล และเลซิทีนในอัตราส่วน 8 ต่อ 1 กรัม น้ำหนัก (คอเลสเทอรอล 810 กรัม และเลซิทีน 90 กรัม) โดยใช้ไฮโซโฟพานอลเป็นตัวทำละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจนได้สารละลายใส แล้วนำไปละลายเอาตัวทำละลายออก พบว่าสารละลายจับตัวกันเป็นก้อนส่วนใหญ่ และมีลักษณะเป็นฟิล์มส่วนน้อย ไม่สม่ำเสมอทั่วภาชนะที่บรรจุ ดังภาพที่ 4.4 (A) หลังจากกระเหยตัวทำละลายจนหมด นำส่วนสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร (ที่ยังไม่ได้มีเติมสารสกัดใบบัวบกเพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไลโปโซม) ผสมให้เข้ากัน สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นเนื้อขาวขุ่น มีตะกอนขาว นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า อนุภาคที่ได้มีขนาด และรูปร่างที่หลากหลาย เมื่อส่องที่กำลังขยาย 40 เท่า และคำนวณหาขนาด พบว่า มีขนาดเล็กประมาณ 6 ไมโครเมตร และมีปริมาณของไลโปโซมน้อย ดังภาพที่ 4.5 (A)

สำหรับการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจนได้สารละลายใส แล้วนำไปละลายเอาตัวทำละลายออกจนหมด พบว่าสารละลายสามารถสร้างเป็นฟิล์มบางใส และเคลือบตัวไปกับภาชนะที่บรรจุได้ดี ดังภาพที่ 4.4 (B) หลังจากกระเหยตัวทำละลายจนหมด นำส่วนสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นเนื้อขาวขุ่นเช่นกันดังภาพที่ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ขนาดอนุภาคที่ได้มีขนาด และรูปร่างที่หลากหลาย เมื่อส่องที่กำลังขยาย 100 เท่า และคำนวณหาขนาด พบว่า มีขนาดเล็กประมาณ 6 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 4.5 (B)

ตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจนได้สารละลายใส แล้วนำไปละลายเอาตัวทำละลายออกจนหมด พบว่าสารละลายเคลือบเป็นฟิล์มบางใสรอบภาชนะ และมีลักษณะเป็นฟิล์มที่สม่ำเสมอเช่นเดียวกับการใช้ตัวทำละลายเอทานอล ดังภาพที่ 4.4 (C) หลังจากกระเหยตัวทำละลายจนหมด นำส่วนสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นเนื้อขาวขุ่น นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ขนาดอนุภาคที่ได้มีขนาด และรูปร่างที่หลากหลาย เมื่อส่องที่กำลังขยาย 100 เท่า และคำนวณหาขนาด พบว่า มีขนาดเล็กประมาณ 6 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 4.5 (C) และทำการเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ต่อลักษณะของฟิล์มบางที่ได้ดังตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.4 พิล์มบางที่ได้จากการนำคอเลสเทอรอล และเลซิธินในอัตราส่วน 8 ต่อ 1 กรัม น้ำหนัก และใช้ตัวทำละลายไอโซโพรพานอล (A), เอทานอล (B) และเมทานอล (C)



ภาพที่ 4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงขนาด และรูปร่างของไลโปโซมที่ได้จากการเตรียมด้วยตัวทำละลายไอโซโพรพานอล (A), เอทานอล (B) และเมทานอล (C)

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบลักษณะฟิล์มบางที่ได้จากทำละลายต่างชนิดในการเตรียมไลโปโซม

ตัวทำละลาย	ลักษณะของแผ่นฟิล์มบางที่ได้
ไอโซโพรพานอล	สารละลายจับตัวกันเป็นก้อนส่วนใหญ่ และมีลักษณะเป็นฟิล์มส่วนน้อย ไม่สม่ำเสมอทั่ว
เอทานอล	สารละลายสามารถสร้างเป็นฟิล์มบางใส และเคลือบตัวไปกับภาชนะที่บรรจุได้ดี
เมทานอล	สารละลายเคลือบเป็นฟิล์มบางใสรอบภาชนะ และมีลักษณะเป็นฟิล์มที่สม่ำเสมอเช่นเดียวกับการใช้ตัวทำละลายเอทานอล

หลังจากการนำสารสกัดใบบัวบกที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มาเตรียมในไลโปโซมเสร็จแล้วจึงนำมาวัดขนาดของอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค โดยนำส่วนที่เป็นสารละลายใสด้านบนมาทำการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเจือจางลง 100 เท่า ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง, ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าฐานนิยมของอนุภาค ดังตารางที่ 4.4 โดยทั้งสามตัวทำละลายไม่ได้มีความแตกต่างกันในเรื่องของจำนวนอนุภาค โดยจะมีอนุภาคขนาดประมาณ 6 ไมโครเมตร เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเมื่อนำไปแช่ในเครื่องสั่นด้วยคลื่นความถี่สูง และตรวจวัดขนาดของอนุภาค มีขนาดที่เปลี่ยนแปลงไปในทั้งสามชนิดตัวทำละลายที่ใช้ โดยเมื่อเรียงลำดับขนาดอนุภาคไลโปโซมพบว่า การเตรียมไลโปโซมจากตัวทำละลายไอโซโพรพานอลจะมีขนาดอนุภาคใหญ่สุดรองลงมาคือเอทานอล และเมทานอลจะมีขนาดเล็กที่สุดในการทดลองครั้งนี้ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ขนาดของอนุภาคไลโปที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด

ชนิดตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ย (นาโนเมตร)
ไอโซโพรพานอล	$6,521.7 \pm 389.1$
เอทานอล	$6,496.4 \pm 445.2$
เมทานอล	$5,618.6 \pm 879.4$

หมายเหตุ* ทำการทดลองจากแต่ละตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง ($n = 3$)

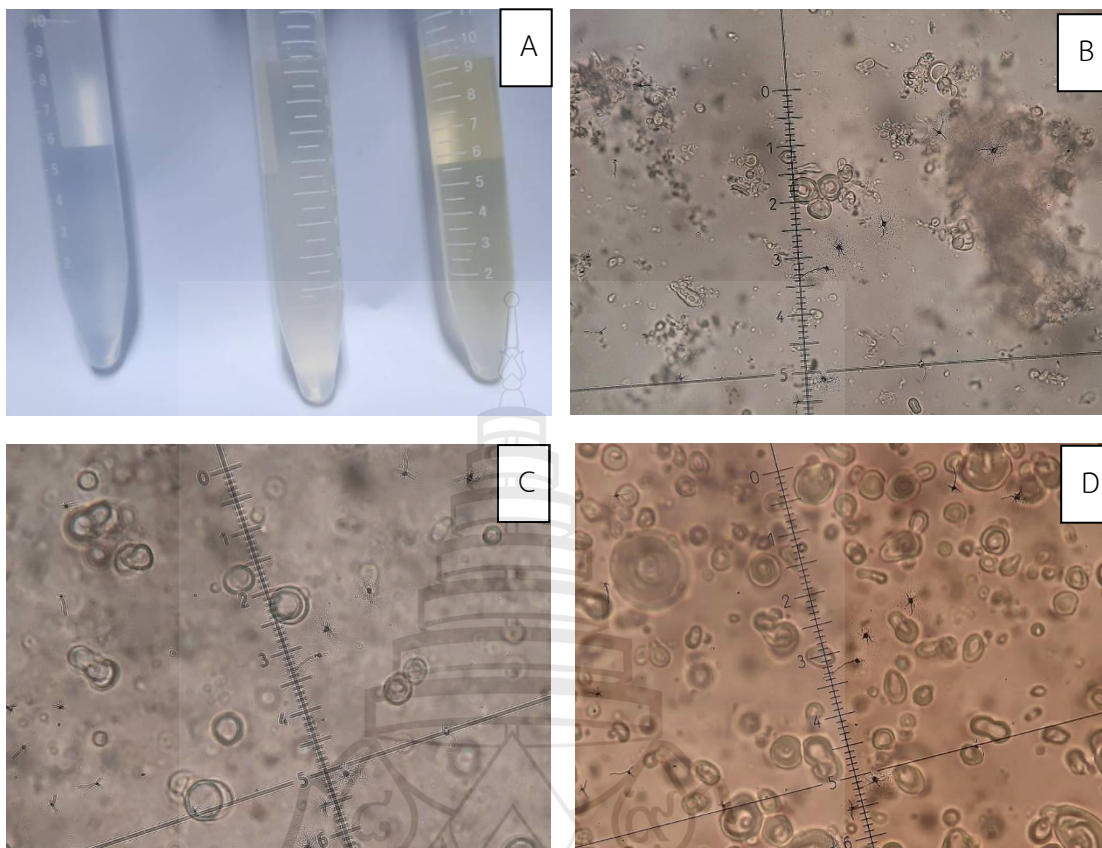
การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการผสมเข้ากับฟอสโฟลิปิด และคอเลสเตอรอล มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อคุณสมบัติของไลโปโซมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องการส่งผลต่อขนาดของอนุภาคไลโปโซม มีการศึกษาถึงคุณสมบัติความเป็นขั้วของตัวทำละลายพบว่า การลดความเป็นขั้วของตัวทำละลายจะส่งผลต่อขนาดของอนุภาคไลโปโซมให้มีขนาดมากยิ่งขึ้น (Webb et al., 2019) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายได้ทั้งองค์ประกอบที่เป็นไขมัน และละลายในน้ำได้อย่าง กลุ่มแอลกอฮอล์ คือ ไอโซโพรพานอล, เอทานอล และเมทานอล โดยทั้ง 3 ตัวทำละลายนี้มีความเป็นขั้วที่แตกต่างกัน เมื่อเรียงลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมากคือ ไอโซโพรพานอล < เอทานอล < เมทานอล เมื่อความยาวของสายโซ่คาร์บอนอะตอมที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ความเป็นขั้วของหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ลดลง ความสามารถในการละลายในน้ำของตัวทำละลาย แอลกอฮอล์ก็ลดลงไปด้วย ในกรณีของไอโซโพรพานอลที่ประกอบไปด้วยคาร์บอน 3 อะตอม จึงมีความเป็นขั้วต่ำกว่าเอทานอลที่มีคาร์บอน 2 อะตอม และเมทานอลที่มีคาร์บอน 1 อะตอม

หลักการสร้างโครงสร้างของไลโปโซมเกิดจากการที่ชั้นที่มีองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดผสมกับชั้นน้ำ การเพิ่มความมีขั้วจากตัวทำละลายน้ำทำให้ชั้นฟอสโฟลิปิดละลายในน้ำได้น้อยลงเรื่อย ๆ แล้วประกอบตัวเองเป็นลิพิดไบเลเยอร์ (Lipid Bilayers) และเกิดการสร้างเป็นไลโปโซมขึ้น (Zook & Vreeland, 2010) ในขณะหลังจากละลายตัวทำละลายแอลกอฮอล์ออกไปจนหมด ฟอสโฟลิปิดได้เคลือบตัวอย่างเป็นระเบียบในลักษณะเป็นแผ่นใหญ่ตามพื้นผิวของภาชนะ และเมื่อเติมน้ำลงไปซึ่งเป็นสารละลายที่มีความเป็นขั้วสูง เพื่อลดพื้นที่ผิวสัมผัสของชั้นฟอสโฟลิปิดที่เต็มไปด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic Forces) กับแรงไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic Force) จากน้ำ แผ่นฟอสโฟลิปิดไบเลเยอร์จะโค้งงอ และม้วนตัวเกิดเป็นโครงสร้างไลโปโซมขึ้น (Kastner et al., 2014) ปัจจัยในการส่งผลต่อขั้วของชั้นฟอสโฟลิปิดว่ามีมากหรือน้อย เกิดจากระดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายแอลกอฮอล์แต่ละชนิดที่ใช้เตรียม เนื่องตัวทำละลายแอลกอฮอล์แต่ละชนิดจะเป็นตัวทำให้ฟอสโฟลิปิดละลายได้มากน้อยแตกต่างกัน โดยแอลกอฮอล์ที่มีทำให้ขนาดอนุภาคไลโปโซมที่เตรียมจากไอโซโพรพานอลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด และเมทานอลให้ขนาดอนุภาคน้อยที่สุด แต่เมื่อพิจารณาในด้านความปลอดภัยของสารเคมี เมทานอลจัดอยู่ในคลาส 2 (Class 2) ในขณะที่ไอโซโพรพานอล และเอทานอลจัดอยู่ในคลาส 2 อ้างอิง จาก ICH Q3C ในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายหลัก อันเนื่องมาจาก ขนาดของอนุภาคไลโปโซมที่เล็ก และด้านความปลอดภัย อีกทั้งมีงานวิจัยมากมายที่นิยมใช้ตัวทำละลายเอทานอลในการเตรียมไลโปโซมในการกักเก็บสารสกัดจากพืช (Guo et al., 2020; Tripathy & Srivastav, 2023; Webb et al., 2019)

ดังนั้นทำละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมไลโปโซมเพื่อกักเก็บสารสกัดจากใบบัวบก คือเอทานอล เนื่องจากมีความสมดุลทั้งด้านประสิทธิภาพในการสร้างโครงสร้างของไลโปโซม และความปลอดภัยในการใช้งาน เมื่อเปรียบเทียบกับเมทานอลและไอโซโพรพานอล พบว่าเอทานอล สามารถสร้างฟิล์มบางที่สม่ำเสมอ เคลือบผิวภาชนะได้ดี และเมื่อนำไปเติมสารละลายบัฟเฟอร์ สามารถสร้างไลโปโซมที่มีลักษณะทางกายภาพดี อนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกัน มีความกระจายตัวต่ำ และอยู่ในขนาดที่เหมาะสมต่อการกักเก็บสารออกฤทธิ์ ในขณะที่เมทานอลแม้จะให้อนุภาคที่มีขนาดเล็กที่สุด แต่มีข้อเสียคือมีความเป็นพิษ และไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ต้องสัมผัสร่างกายหรือบริโภค ส่วนไอโซโพรพานอลให้ฟิล์มที่ไม่สม่ำเสมอ มีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน ทำให้ไม่สามารถสร้างโครงสร้างไลโปโซมที่มีคุณภาพได้อย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบขนาดอนุภาคที่ได้จากทั้งสามตัวทำละลาย เอทานอลยังให้ไลโปโซมที่มีขนาดเล็ก และเสถียรภาพดีในระดับที่ใกล้เคียงเมทานอล แต่มีความปลอดภัยมากกว่าอีกทั้งเอทานอลยังมีคุณสมบัติในการละลายได้ทั้งในน้ำ และไขมัน ทำให้ช่วยเสริมกระบวนการจัดเรียงตัวของฟอสโฟลิปิดร่วมกับคอเลสเตอรอลในกระบวนการสร้างไลโปโซม ส่งผลให้เกิดการสร้างไลโปโซมที่มีคุณภาพสูง มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอางได้ โดยไม่ต้องกังวลเรื่องสารตกค้างหรือพิษตกค้างจากตัวทำละลาย ดังนั้นเมื่อพิจารณาทั้งด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัยร่วมกันเอทานอล จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมไลโปโซมจากสารสกัดใบบัวบกในการศึกษาครั้งนี้

4.2.2 การเตรียมไลโปโซมจากตัวทำละลายเอทานอลในการกักเก็บสารสกัดใบบัวบก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพไลโปโซมที่ใช้ตัวทำละลายชนิดเอทานอล ในการกักเก็บสารสกัดใบบัวบก ได้ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวบกแบ่งออกเป็น 0, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังการเตรียมไลโปโซมเสร็จ สารละลายที่ได้จะมีลักษณะขุ่นขาว ในกรณีที่ไม่มีการใส่สารสกัดใบบัวบก และสารละลายไลโปโซมจะมีสีขาวขุ่นออกสีเหลืองอ่อน และเข้มมากขึ้นเมื่อการใส่สารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนสารละลายใสด้านบนไปวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบขนาดของไลโปโซมดังภาพที่ 4.6 (A-D)



ภาพที่ 4.6 สารละลายไลโปโซมที่มีสารสกัดใบบัวบกความเข้มข้น 0, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (A) และภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า แสดงขนาด และรูปร่างของไลโปโซมสารสกัดใบบัวบกที่ได้จากการเตรียมด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่มีสารสกัดใบบัวบกความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B), 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (C) และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (D) ตามลำดับ

4.3 ผลการศึกษาความคงตัวของไลโปโซมที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การเก็บไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดใบบัวบกที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารอะเซติลโคลีน และมาเดคาสโซไซด์จากสารสกัดบัวบก โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค, ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (Polydispersity index, PDI) และค่าศักย์ซีตา (zeta-potential) ผลของการเก็บตัวอย่างหลังทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง, ค่า PDI และค่าศักย์ zeta-potential ของอนุภาคไลโปโซม
ทำการทดสอบเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7,
14 และ 21 วัน

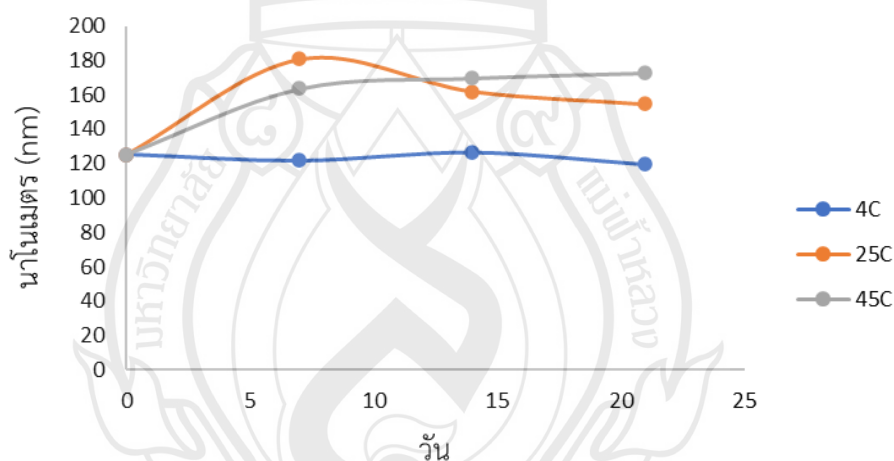
ความเข้มข้นสารสกัด ใบบัวบก (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาค (นาโนเมตร, nm)	ค่า PDI	ค่าศักย์ zeta-potential (มิลลิโวลต์, mV)
วันที่ 0 ของการทดสอบ			
0	538.5±17.6	0.50±0.14	-21.2±1.2
1	125.2±2.9	0.13±0.02	-24.4±3.0
10	419.2±24.4	0.44±0.04	-26.4±0.7
วันที่ 7 ของการทดสอบ			
การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส			
0	761.9±13.3	0.53±0.09	-25.2±3.0
1	121.7±0.5	0.02±0.02	-25.2±1.6
10	340.0±22.0	0.57±0.10	-13.4±2.2
การเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส			
0	282.8±6.1	0.56±0.05	-21.9±2.5
1	180.8±7.7	0.11±0.01	-23.6±3.4
10	313.8±6.2	0.54±0.09	-15.2±2.0
การเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส			
0	233.1±5.8	0.28±0.04	-17.9±2.1
1	163.5±4.7	0.15±0.07	-23.3±1.9
10	275.5±13.2	0.59±0.13	-15.7±1.3
วันที่ 14 ของการทดสอบ			
การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส			
0	636.4±16.5	0.47±0.08	-11.0±2.1
1	126.2±1.6	0.05±0.03	-17.8±0.4
10	365.4±2.3	0.37±0.05	-8.5±0.7

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

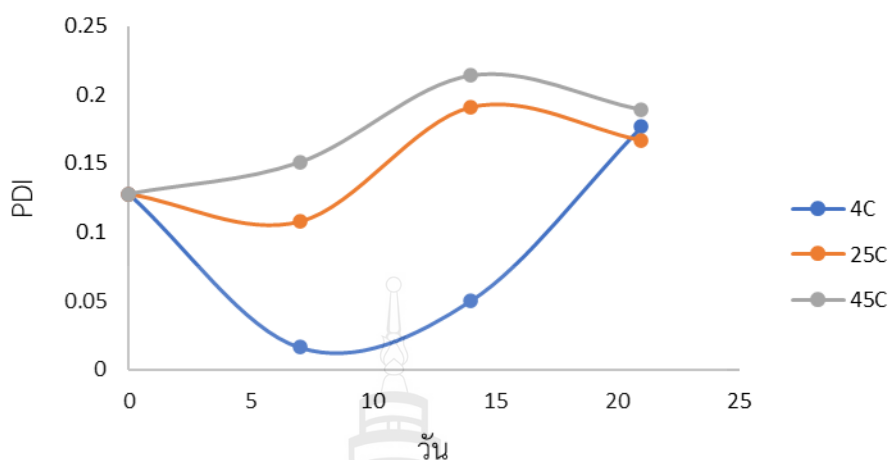
ความเข้มข้นสารสกัด ใบบัวบก (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาค (นาโนเมตร, nm)	ค่า PDI	ค่าศักย์ zeta-potential (มิลลิโวลต์, mV)
วันที่ 14 ของการทดสอบ			
การเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส			
0	354.7±21.6	0.66±0.12	-9.5±0.9
1	161.9±2.8	0.19±0.01	-16.6±1.0
10	332.1±17.5	0.55±0.03	-9.4±0.6
การเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส			
0	269.4±5.3	0.35±0.01	-9.9±1.9
1	169.7±1.1	0.21±0.02	-15.3±1.4
10	315.2±4.8	0.57±0.05	-7.4±2.1
วันที่ 21 ของการทดสอบ			
การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส			
0	331.6±33.7	0.60±0.10	-3.9±0.2 ^a
1	119.5±0.5	0.18±0.01	-11.6±0.8
10	134.1±8.1	0.35±0.04	-11.9±0.6
การเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส			
0	310.6±7.7	0.48±0.03	-5.9±0.3
1	145.5±3.4	0.18±0.04	-8.6±0.8
10	173.6±7.3	0.36±0.03	-5.2±1.3
การเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส			
0	254.7±1.6	0.30±0.02	-4.6±0.5
1	172.7±1.8	0.20±0.03	-5.1±0.9
10	269.4±33.7	0.57±0.03	-2.7±0.3

หมายเหตุ* ทำการวัดจากตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (n = 3)

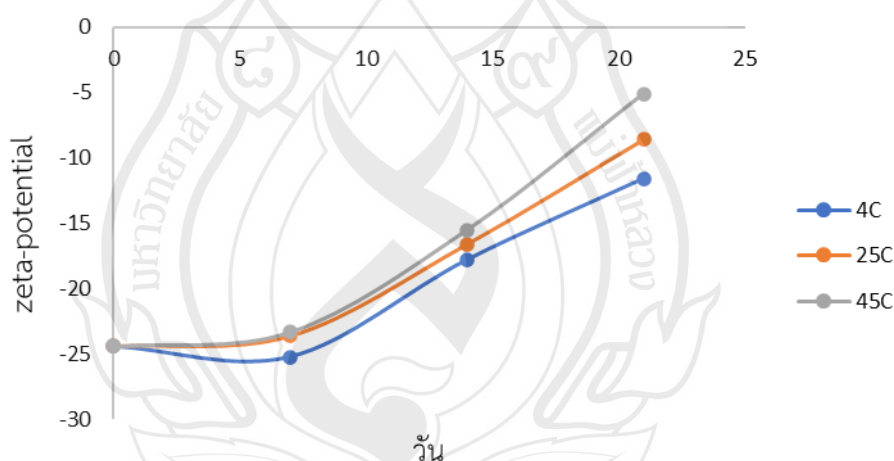
จากผลการวัดค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค, ค่าการกระจายตัวของอนุภาค และ ค่าศักย์ซีตาของอนุภาคไลโปโซมที่บรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 21 วัน ค่าเฉลี่ยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางไม่พบความแตกต่าง ณ ช่วง 3 อุณหภูมิ ดังภาพที่ 4.7 ในขณะที่ ค่า PDI และค่าศักย์ซีตามีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยค่า PDI ซึ่งเป็นค่า ตรวจวัดความสม่ำเสมอของอนุภาคของขนาดอนุภาคพบว่า แนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นตั้งแต่วันที่ 7 และ 14 และมีแนวโน้มลดลงในที่ 21 ของตัวอย่างที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 45 องศาเซลเซียส ในขณะที่ตัวอย่างที่ทำการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 4.8 ส่วนค่าศักย์ซีตาซึ่งบ่งบอกถึงความเสถียรภาพของสารแขวนลอย จากการเก็บรักษาทั้ง 3 อุณหภูมิ พบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้น ดังภาพที่ 4.14 ในขณะที่ค่าสัมบูรณ์ค่าศักย์ซีตามีแนวโน้มลดลงดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน



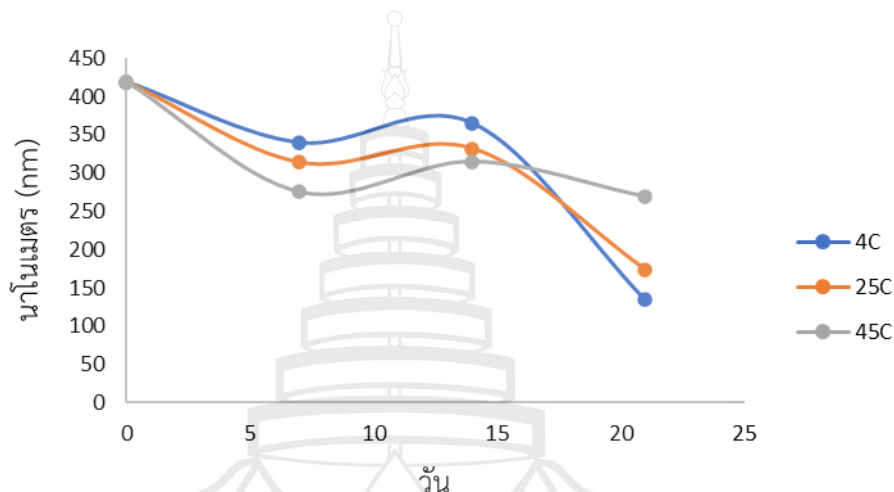
ภาพที่ 4.8 ค่าการกระจายตัวของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน



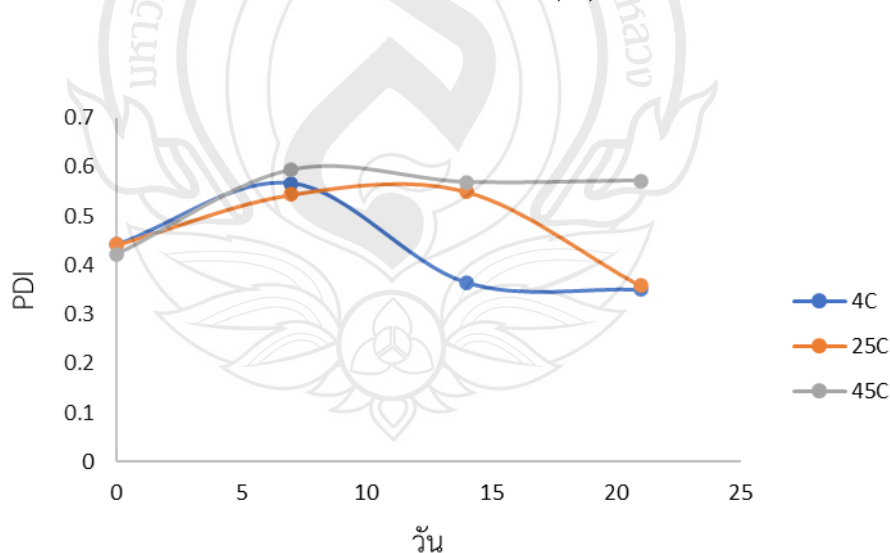
ภาพที่ 4.9 ค่าศักย์ซีตาของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน

ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค, ค่าการกระจายตัวของอนุภาค และค่าศักย์ซีตาของอนุภาคไลโปโซมที่บรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลที่แตกต่างกับชุดการทดลองสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเฉพาะค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค และค่าการกระจายตัวของอนุภาคพบว่า ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคที่ใช้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดใบบัวก็มีแนวโน้ม

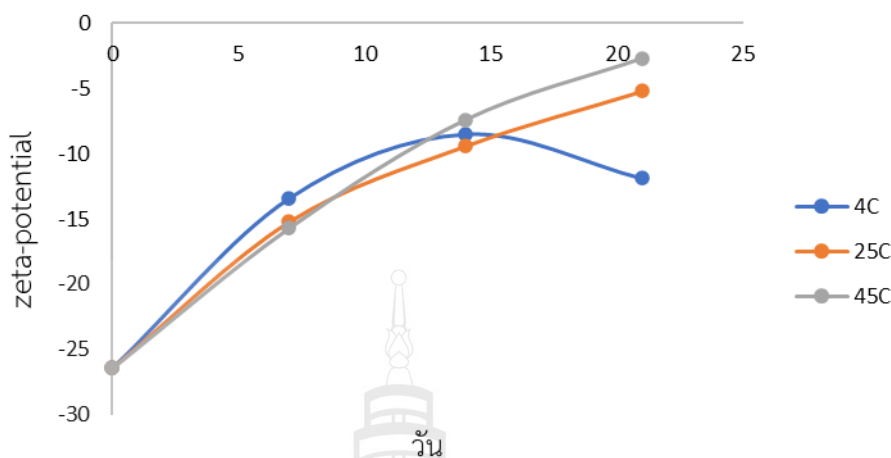
ลดลงทั้ง 3 อุณหภูมิดังภาพที่ 4.10 โดยต่ำสุดในวันที่ 21 ค่าเฉลี่ยของทั้ง 3 อุณหภูมิอยู่ที่ 192.37 ± 69.57 นาโนเมตร จากที่ขนาดเริ่มต้น 419.20 ± 24.40 นาโนเมตร ในขณะที่ค่าการกระจายตัวมีแนวโน้มคงที่สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่กลับลดลงที่อุณหภูมิ 25 และ 45 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 4.11 ส่วนค่าสัมบูรณ์ของค่าศักย์ซีตาทพบว่ามีแนวโน้มลดลงดังภาพที่ 4.12 และเป็นรูปแบบเดียวกับการทดสอบที่ใช้สารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน



ภาพที่ 4.11 ค่าการกระจายตัวของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน



ภาพที่ 4.12 ค่าศักย์ซีตาของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (เส้นสีน้ำเงิน), 25 (เส้นสีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เส้นสีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน

ในการทดลองนี้เลือกใช้อัตราส่วนน้ำหนักของฟอสโฟลิปิดต่อคอเลสเตอรอลอยู่ที่ 8 ต่อ 1 ความเข้มข้นของฟอสโฟลิปิดต่อตัวทำละลายแอลกอฮอล์อยู่ที่ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการดัดแปลงของงานวิจัยของ Tripathy and Srivastav (2023) ในส่วนของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคไลโปโซมที่ไม่มีการเติมสารสกัดมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 538.5 ± 17.6 นาโนเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองจากรายงานว่าอยู่ที่ 512.7 ± 13.7 นาโนเมตร ที่เป็นชุดควบคุมเช่นเดียวกัน แต่เมื่อทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าขนาดของอนุภาคไลโปโซมมีค่าเฉลี่ยที่ลดลงอยู่ที่ 125.2 ± 2.9 นาโนเมตร ซึ่งแตกต่างจากในงานวิจัยที่อ้างอิงถึง 6.3 เท่า (ในงานวิจัยระบุไว้ที่ 787.8 ± 09.5 นาโนเมตร) จากการศึกษาพบว่า ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ขนาดของอนุภาคไลโปโซมมีความแตกต่างนอกจากการเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการเตรียมชั้นฟอสโฟลิปิดแล้ว (Webb et al., 2019) คือชนิดของคอเลสเตอรอล มีการศึกษาการใช้สติกแมสเตอร์อล (Stigmasterol) ซึ่งเป็นคอเลสเตอรอลชนิดหนึ่งที่สกัดได้จากพืช โดยสังเคราะห์มาจากสารตั้งต้นคือเมวาโลเนต (Mevalonate) ซึ่งมีโครงสร้างที่แตกต่างจากคอเลสเตอรอลทั่วไปตรงของพันธะของหมู่ฟังก์ชันจะเป็นพันธะคู่ ในขณะที่คอเลสเตอรอลทั่วไปเป็นพันธะเดี่ยว และการใช้สติกแมสเตอร์อลสามารถเพิ่มขนาดอนุภาคไลโปโซมได้ อันเนื่องมาจากการเติมสติกแมสเตอร์อลจะช่วยเพิ่มพื้นที่ของฟอสโฟลิปิด (Tai et al., 2018) นอกจากนี้สภาวะความเป็นกรด-ด่างของสารสกัด หรือสภาวะแวดล้อมของไลโปโซมส่งผลต่อขนาดอนุภาค (Joguparthi, Feng & Anderson, 2008) จึงอาจเป็นอีกปัจจัยเนื่องจากกระบวนการสกัดเอาสารสำคัญ และสัดส่วน หรือปริมาณของสารสำคัญที่แตกต่าง

กันก็อาจทำให้ สารสกัดมีค่า pH ที่แตกต่างกัน อีกประเด็นที่น่าสนใจ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของ สารสกัดมากขึ้น ขนาดของอนุภาคก็เพิ่มมากขึ้น

ค่าศักย์ซีตาเป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความเสถียรภาพของไลโปโซม จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า ค่าศักย์ซีตาในทุกตัวอย่างมีค่าติดลบ อันเนื่องมาจากสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก และสารกลุ่ม ไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ในใบบัวบกมีประจุเป็นลบ และสารเหล่านี้ทำให้ที่พื้นผิวของอนุภาคไลโปโซม มีประจุเป็นลบตามไปด้วย (Soleimanifar et al., 2020) อนุภาคไลโปโซมที่มีความเสถียรค่าศักย์ซีตา จะอยู่ในช่วงมากกว่าค่าสัมบูรณ์ของ ± 30 mV ขึ้นไป เพื่อให้เกิดแรงผลักมากพอระหว่างอนุภาคไลโปโซมกันเอง และลดการเกาะรวมกันของไลโปโซม (Zhao et al., 2015) และจากผลการทดลองยัง พบว่า อุณหภูมิที่มากขึ้นส่งผลต่อการลดลงของค่าศักย์ซีตา มีการศึกษาพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความหนืดของสารในระบบจะลดลง ส่งผลให้อนุภาคเคลื่อนที่ได้ง่ายขึ้นจึงส่งผลต่อค่าศักย์ซีตาให้ต่ำลง นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิปิดไบเลเยอร์ ซึ่งส่งผลต่อค่าไฟฟ้าบนพื้นผิวไลโปโซม (Tripathy & Srivastav, 2023) ส่วนค่าการกระจายตัวของอนุภาค ในการทดลองนี้พบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการกระจายตัวของอนุภาคเพียงเล็กน้อย โดยอุณหภูมิส่งผลต่อการจัดเรียงของชั้นลิปิดส่งผลต่อค่าการกระจายตัวของอนุภาค แต่ปัจจัยหลักที่ส่งผลเกิดจากองค์ประกอบของลิปิด และกระบวนการผลิตมากกว่า (Roy et al., 2016)

ค่า PDI เป็นตัววัดความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคในระบบไลโปโซม ซึ่งค่า PDI ที่ต่ำกว่า 0.3 บ่งชี้ถึงระบบที่มีขนาดอนุภาคสม่ำเสมอ และมีเสถียรภาพดี จากการทดลองพบว่า ไลโปโซมที่บรรจุสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า PDI ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่มีสารสกัด และสูตรที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่า PDI สูงกว่า แสดงให้เห็นว่า การเติมสารสกัดในปริมาณที่เหมาะสมสามารถช่วยให้อนุภาคมีขนาดที่ใกล้เคียงกันมากขึ้นเมื่อทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบว่า ค่า PDI มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง ค่า PDI ที่เพิ่มขึ้นบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างไลโปโซม แนวโน้มของค่า PDI ที่สูงขึ้นในอุณหภูมิที่สูงสะท้อนให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอนุภาคไลโปโซม ซึ่งอาจเกิดจากการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มากขึ้น ทำให้เกิดการรวมตัว อีกทั้งอุณหภูมิสูงยังส่งผลต่อเสถียรภาพของชั้นลิปิดไบเลเยอร์ ทำให้เกิดการเรียงตัวที่ไม่ นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงค่า PDI ยังสัมพันธ์กับค่าศักย์ซีตาที่ลดลง โดยเฉพาะในอุณหภูมิสูง ซึ่งบ่งชี้ถึงความไม่เสถียรของระบบที่มากขึ้น อันเป็นปัจจัยร่วมที่อาจเร่งให้ไลโปโซมเสื่อมสภาพและลดประสิทธิภาพในการกักเก็บสารออกฤทธิ์ลงมิงงานวิจัยที่สนับสนุนผลดังกล่าว โดยระบุว่า PDI เป็นตัวบ่งชี้สำคัญด้านคุณภาพของไลโปโซม และสามารถได้รับผลกระทบจากทั้งองค์ประกอบลิปิด อุณหภูมิ และกระบวนการผลิต (Roy et al., 2016) ดังนั้นการควบคุมความเข้มข้นของสารสกัดและอุณหภูมิการเก็บรักษาเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษาความเสถียรของไลโปโซม การเลือกใช้สูตรที่เหมาะสมโดย

ควบคุมความเข้มข้นของสารสกัดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เช่น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ เช่น 4 องศาเซลเซียส จึงเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาไลโปโซมให้มีคุณภาพสูงและสามารถใช้งานในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือยาได้อย่างมีประสิทธิภาพในระยะยาว

4.3.4 ผลการทดสอบอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสารของไลโปโซม

ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์จากสารสกัดใบบัวบก ทำการตรวจวัดปริมาณการกักเก็บสารทั้ง 2 ชนิด ที่ละลายอยู่ในไลโปโซม และเป็นอิสระละลายในสารละลายภายนอกผิวไลโปโซมที่ไม่ถูกกักเก็บ และคำนวณออกมาแสดงผลในค่าที่เรียกว่า encapsulation efficiency (EE) ในรูปแบบร้อยละ (%) และปริมาณสารในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) ภายหลังการเตรียมไลโปโซมเสร็จโดยใช้สารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการตรวจวัดทันที แสดงค่าการกักเก็บ และปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ และจากการทดสอบประสิทธิภาพเมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน แสดงดังตารางที่ 4.6



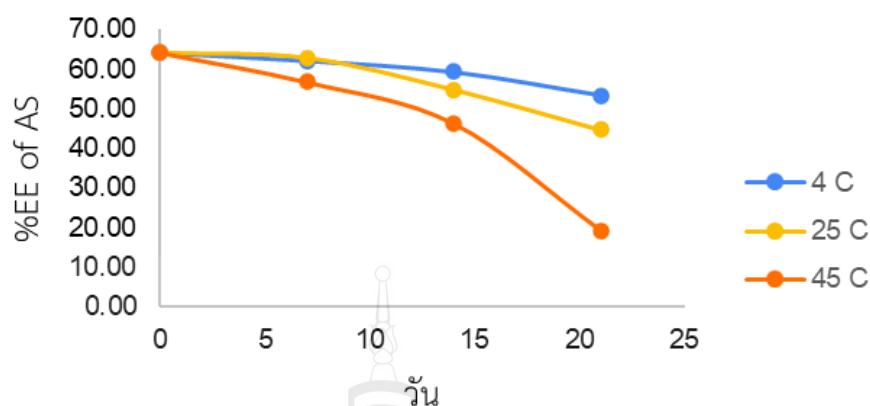
ตารางที่ 4.6 ค่าร้อยละการกักเก็บ และปริมาณสารอะเซติลโคไฮด์ และมาเดคาสติโคไซด์ในไลโปโซม จากสารสกัดใบบัวบก ที่เก็บรักษา ณ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน

ความเข้มข้น สารสกัดใบบัวบก (mg/ml)	การกักเก็บ อะเซติลโคไฮด์ (%)	ปริมาณ อะเซติลโคไฮด์ (mg/l)	การกักเก็บ มาเดคาสติโคไซด์ (%)	ปริมาณ มาเดคาสติโคไซด์ (mg/l)
วันที่ 0 ของการทดสอบ				
1	64.24	22.964	68.60	15.653
10	68.78	43.107	66.66	23.553
วันที่ 7 ของการทดสอบ				
การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส				
1	62.23	20.011	70.30	12.01
10	68.57	40.640	65.67	17.810
การเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส				
1	62.96	18.966	65.27	10.483
10	66.74	32.969	66.75	16.485
การเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส				
1	56.78	9.912	71.50	6.956
10	51.69	12.988	46.65	5.394
วันที่ 14 ของการทดสอบ				
การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส				
1	59.36	16.89	59.36	8.450
10	67.33	33.46	65.97	15.730
การเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส				
1	54.85	12.301	63.77	7.150
10	63.97	30.387	61.44	8.721
การเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส				
1	46.29	5.234	63.97	3.617
10	36.72	4.983	19.55	1.131

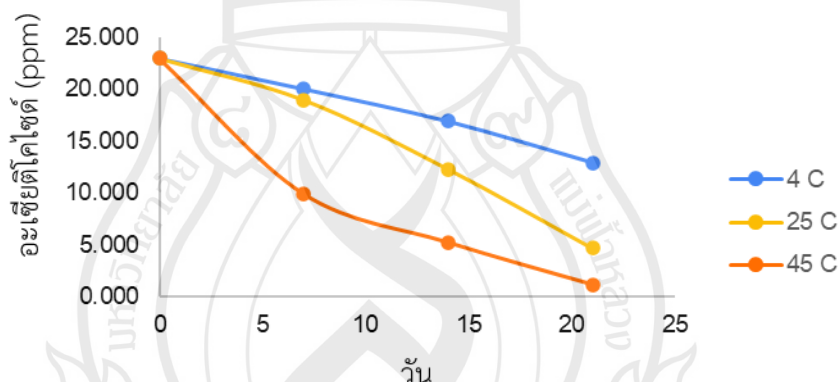
ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ความเข้มข้น สารสกัดใบบวบก (mg/ml)	การกักเก็บ อะเซตีโคไซด์ (%)	ปริมาณ อะเซตีโคไซด์ (mg/l)	การกักเก็บ มาเดคาสติโคไซด์ (%)	ปริมาณ มาเดคาสติโคไซด์ (mg/l)
วันที่ 21 ของการทดสอบ				
การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส				
1	53.45	12.912	57.01	7.456
10	47.23	17.380	43.99	7.654
การเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส				
1	44.68	4.671	45.42	2.374
10	51.30	8.591	32.49	2.396
การเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส				
1	19.20	1.180	28.72	0.600
10	27.77	1.856	15.41	0.362

สำหรับผลการวิเคราะห์สารอะเซตีโคไซด์ จากไลโปโซมที่เตรียมจากสารสกัดใบบวบกความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการกักเก็บที่แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าร้อยละการกักเก็บเริ่มต้นอยู่ที่ร้อยละ 62.23 สามารถคำนวณปริมาณความเข้มข้นสารอะเซตีโคไซด์อยู่ที่ 22.964 มิลลิกรัมต่อลิตร คือคิดเป็น 0.023 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เจือจางลง 43.48 เท่า จากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในช่วงวันที่ 7, 14 และ 21 ร้อยละของการกักเก็บลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังภาพ 4.13 และยิ่งลดลงมากขึ้นเมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ในวันที่ 21 พบว่า การเปลี่ยนแปลงร้อยละการกักเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกอยู่ที่ร้อยละ 10.79, 19.56 และ 45.04 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีอัตราการเปลี่ยนแปลงของการกักเก็บสูงสุด ซึ่งหมายถึงมีอัตราการสูญเสียของสารอะเซตีโคไซด์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส และเมื่อคำนวณให้อยู่ในรูปความเข้มข้นดังภาพ 4.14 ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับร้อยละการกักเก็บ



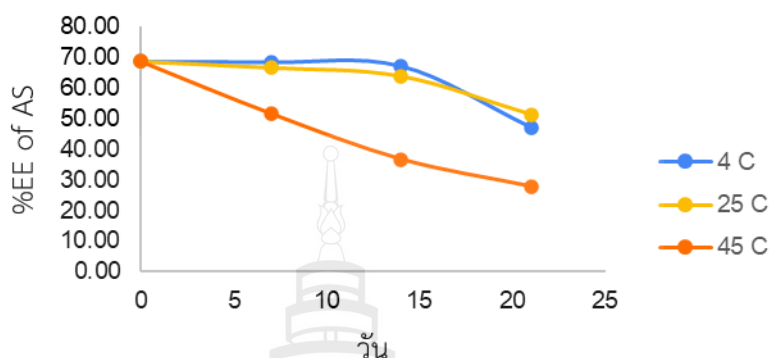
ภาพที่ 4.13 ค่าร้อยละการกักเก็บสารอะเซตีลโคไซด์ของไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สีน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน



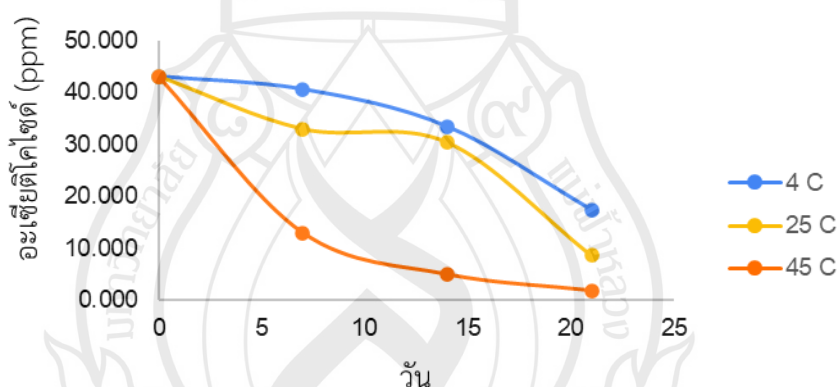
ภาพที่ 4.14 ปริมาณสารอะเซตีลโคไซด์ที่ถูกกักเก็บภายในไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สีน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน

ประสิทธิภาพการกักเก็บสารมาเดคาสโซไซด์ของอนุภาคไลโปโซมที่บรรจุสารสกัดใบบัวบกที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับการใช้สารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน โดยร้อยละการกักเก็บ และปริมาณสารอะเซตีลโคไซด์ค่อย ๆ ลดลง และสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่เก็บรักษา ดังภาพที่ 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการใช้ความเข้มข้นสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บ 21 วัน ร้อยละการ

กักเก็บ และปริมาณสารอะเซตีลโคไซด์ที่เหลืออยู่ในไลโปโซม ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ลดลงในทุกตัวอย่าง

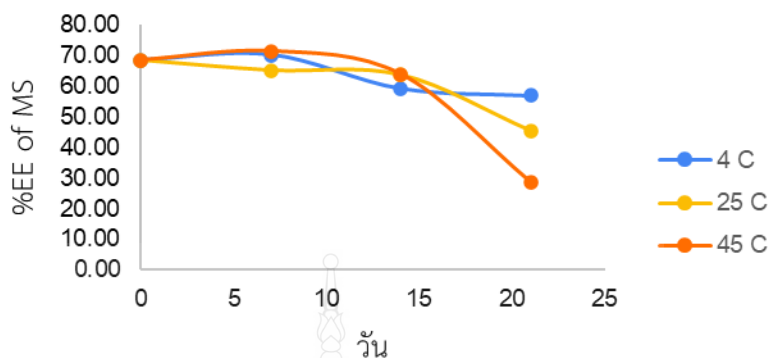


ภาพที่ 4.15 ค่าร้อยละการกักเก็บของอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สีน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน

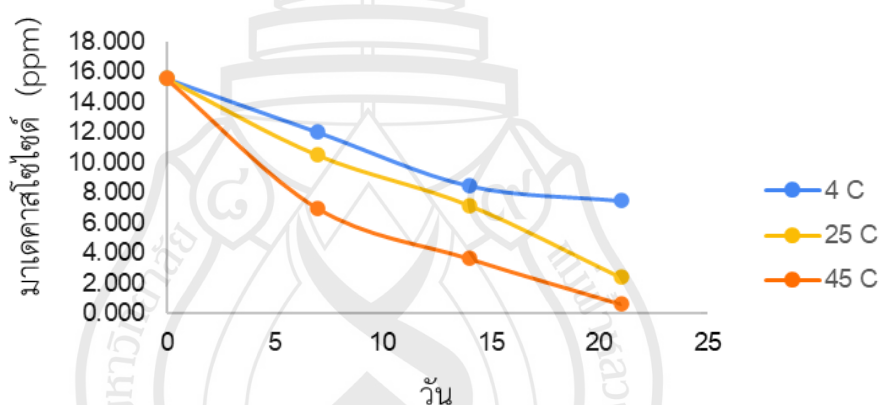


ภาพที่ 4.16 ปริมาณสารมาเดกาโซไซด์ที่ถูกกักเก็บภายในอนุภาคไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สีน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน

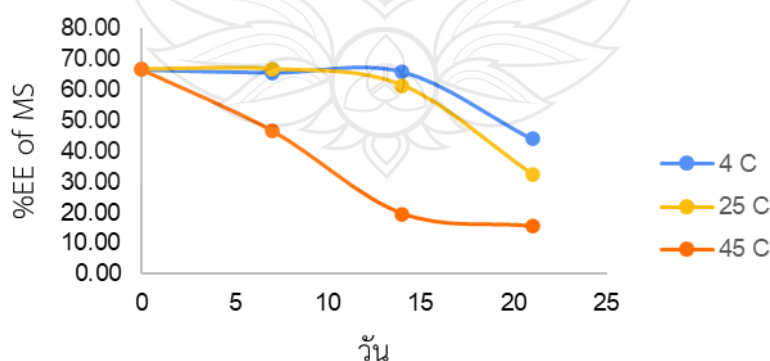
ผลการทดลองร้อยละการกักเก็บ และปริมาณของสารมาเดกาโซไซด์ที่บรรจุอยู่ภายในอนุภาคไลโปโซมทั้งการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวบักที่ 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับการสารอะเซตีลโคไซด์ ดังภาพที่ 4.17 – 4.20



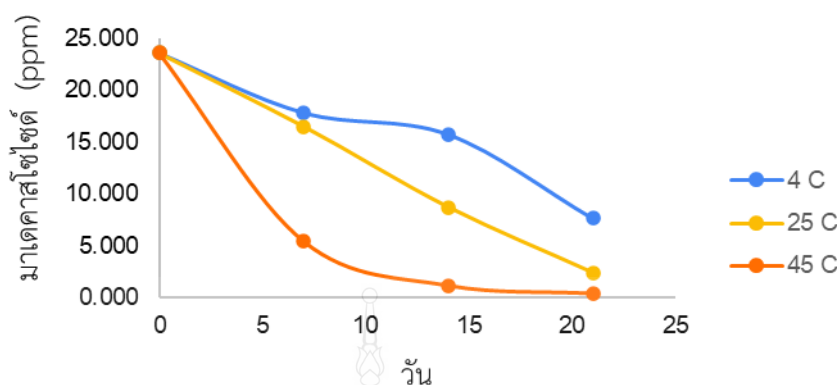
ภาพที่ 4.17 ค่าร้อยละการกักเก็บสารมาเดคาสติโคไซด์ของไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สีน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน



ภาพที่ 4.18 ปริมาณสารมาเดคาสติโคไซด์ที่ถูกกักเก็บภายในไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (น้ำเงิน), 25 (ส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (เทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน



ภาพที่ 4.19 ค่าร้อยละการกักเก็บสารมาเดคาสติโคไซด์ของไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สีน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน



ภาพที่ 4.20 ปริมาณสารมาเดคาสโตโคไซด์ที่ถูกกักเก็บภายในไลโปโซมบรรจุสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (สีน้ำเงิน), 25 (สีส้ม) และ 45 องศาเซลเซียส (สีเทา) เป็นระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน

ผลจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสารในกลุ่มไตรเทอร์ปีนโกโคไซด์จากสารสกัดใบบัวบกที่ถูกกักเก็บภายในอนุภาคไลโปโซม มีรายงานการศึกษามากมายในการวิเคราะห์ถึงกลไกต่อการลดประสิทธิภาพการกักเก็บเหล่านี้ หนึ่งในผลกระทบที่สำคัญคือ อุณหภูมิที่สูงทำให้อัตราการสลายตัวของสารออกฤทธิ์เร็วขึ้น โดยเฉพาะสารในกลุ่มโพลีฟีนอล รวมไปถึงสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่เสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่อเจอกับความร้อน ความร้อนเร่งให้เกิดกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน (Polymerization) ของสารประกอบไตรเทอร์ปีนกับสารออกฤทธิ์ตัวอื่นทำให้สูญเสียการทำงานของสารเดิมไป, เกิดกระบวนการออกซิเดชัน (Oxidation) รวมไปถึงกระบวนการย่อยสลาย (Hydrolysis) ให้เกิดไรไวซิน (Lago & Noreña, 2017) มีการศึกษาเปรียบเทียบความคงตัวของสารไตรเทอร์ปีนโกโคไซด์สารสกัดใบบัวบกที่ถูกกักเก็บในไลโปโซมโดยทดสอบในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 27 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ใช้ไลโปโซมในการกักเก็บพบว่า ทุกตัวอย่างที่ใช้ไลโปโซมสามารถวัดค่าครึ่งชีวิต (Half-life) ของสารออกฤทธิ์ได้ยาวนานกว่าอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ และการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาสารออกฤทธิ์ได้ประสิทธิภาพสูงสุด (Tripathy & Srivastav, 2023)

การศึกษาความคงตัวของสารอะเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์พบว่า สามารถเก็บรักษาได้ยาวนานกว่า 16 สัปดาห์ เมื่อทำการเก็บรักษาในรูปแบบผงแห้ง ภายใต้สภาวะปิดสนิท ปราศจากแสง และอุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาในรูปสารละลายสามารถทำได้ทั้งการใช้ตัวทำละลายแอลกอฮอล์และปรับค่า pH อยู่ที่ 5.8 และ 7.0 หรือใช้น้ำในการเก็บรักษาโดยมีการเติมกรดบางชนิดลงไป สารสกัดจากใบบัวบกสามารถการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับแสง และเปลี่ยนสีจากเขียวไปเป็นสีเหลือง นอกจากนี้การสัมผัสกับแสงทำให้อัตราการลดลงของสารสำคัญถึงร้อยละ 14 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่สัมผัสแสง ซึ่งลดลงเพียงร้อยละ 6 ในเวลา 2 สัปดาห์ ในกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่

สำคัญทั้ง 4 ชนิด ที่พบได้มากในบัวบก สารออกฤทธิ์ในรูปกรด (กรดอะเซติก และกรดมาเดคาสสิก) จะมีความคงตัวมากกว่าในรูปไกลโคไซด์ (อะเซติลโคไซด์ และมาเดคาส์โคไซด์) (Puttarak, Brantner & Panichayupakaranant, 2016)

ดังนั้นในการศึกษานี้พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมไลโปโซมสำหรับกักเก็บ สารสกัดจากใบบัวบก คือ การเลือกใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากให้อนุภาคไลโปโซมที่มีขนาดเล็กที่สุด มีความสม่ำเสมอของอนุภาคดี (ค่า PDI ต่ำ) และมีความเสถียรของระบบสูงกว่าอย่างชัดเจน โดยขนาดเฉลี่ยของอนุภาคไลโปโซมที่ได้จากการใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ที่ประมาณ 125.2 ± 2.9 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าการใช้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าเฉลี่ยสูงกว่า (419.2 ± 24.4 นาโนเมตร ณ วันที่ 0) แสดงถึงการรวมตัวของสารสกัดภายในที่มากเกินไปเมื่อใช้สารสกัดเข้มข้นสูง นอกจากนี้ ค่า PDI ที่ใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเริ่มต้นเพียง 0.13 ± 0.02 บ่งชี้ถึงระบบที่มีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคแคบ และมีแนวโน้มคงที่ตลอดช่วงเวลาการเก็บรักษา โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำ (ที่ 4°C) ขณะที่สูตร 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า PDI ที่สูงกว่า และแปรผันมากกว่าในหลายอุณหภูมิ ซึ่งชี้ถึงความไม่สม่ำเสมอ และอาจเกิดการรวมตัวของอนุภาคมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป อีกทั้งในแง่ของประสิทธิภาพการกักเก็บสาร (encapsulation efficiency) แม้ว่าสูตรเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีปริมาณสารที่กักเก็บได้สูงในช่วงเริ่มต้น แต่พบว่าอัตราการสูญเสียของสารสำคัญกลับสูงขึ้นอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะเมื่อเก็บในอุณหภูมิสูง (ที่ 45°C) ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพลดลงชัดเจนเมื่อเทียบกับสูตรความเข้มข้นต่ำกว่า ดังนั้นการเลือกใช้สารสกัดในระดับที่เหมาะสมที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจึงให้สมดุลที่ดีที่สุดระหว่างความสม่ำเสมอของอนุภาค ความเสถียร และความสามารถในการคงรักษาสารออกฤทธิ์ไว้อยู่ภายในไลโปโซมในระยะยาว โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาพร้อมกับปัจจัยด้านอุณหภูมิการเก็บรักษา และโครงสร้างอนุภาคที่ต้องการในผลิตภัณฑ์เพื่อใช้จริงในอุตสาหกรรมอาหาร ยา หรือเครื่องสำอาง

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ผลการสกัดสารสำคัญในกลุ่มกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์จากใบบัวบกแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล, 70, 50 และ 30% เอทานอล ในอัตราส่วนน้ำหนักแห้งของบัวบก 10 กรัม ต่อปริมาตรตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร พบว่า สารละลาย 70% เอทานอลให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดเอาสารมาเดคาสโซไซด์ และอะเซียติโคไซด์ได้ โดยมีร้อยละของการสกัดสารสกัดหยาบอยู่ร้อยละ 5.85 และมีปริมาณสารสารมาเดคาสโซไซด์ และอะเซียติโคไซด์ อยู่ที่ 299.243 และ 148.528 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายที่มีประสิทธิภาพรองลงมาคือ 50% เอทานอล, เมทานอล, เอทานอล และ 30% เอทานอล โดยทุกสารละลายที่ใช้สกัด (100% เมทานอล, 100, 70, 50 และ 30% เอทานอล) จะให้อัตราส่วนปริมาณสารอะเซียติโคไซด์ต่อมาเดคาสโซไซด์คือ 2.15, 2.60, 2.0, 1.99 และ 0.78 ตามลำดับ จึงเลือกใช้ตัวทำละลายจาก 70% เอทานอล เป็นตัวอย่างหลักในการวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญ

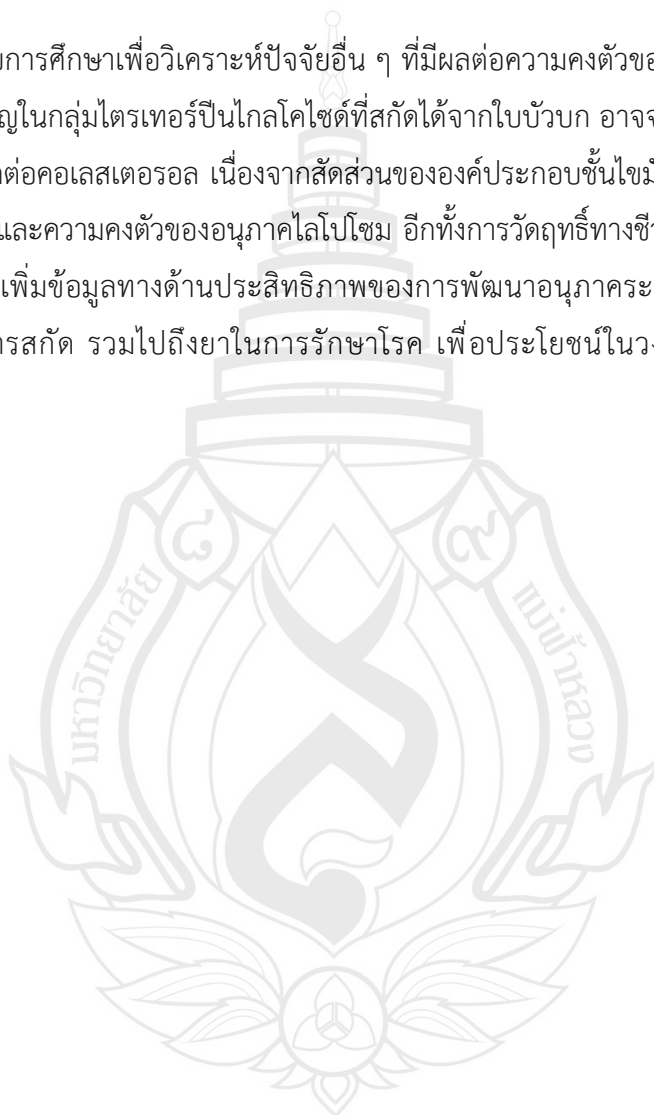
ผลการเตรียมไลโปโซมจากสารสกัดใบบัวบกด้วยตัวละลายไอโซโพรพานอล, เอทานอล และเมทานอล เมื่อทำการตรวจวัดลักษณะทางกายภาพไลโปโซมจากตัวอย่างที่ใช้สารละลายทั้ง 3 ชนิด พบว่าชนิดไลโปโซมที่เตรียมจากตัวทำละลายเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ที่ $6,496.4 \pm 445.2$ นาโนเมตร ในขณะที่ไลโปโซมชนิดที่เตรียมจากสารละลายไอโซโพรพานอล และเมทานอลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ที่ $6,521.7 \pm 389.1$ และ $5,618.6 \pm 879.4$ นาโนเมตรตามลำดับ

ผลการทดสอบอนุหุมีต่อคุณภาพทางกายภาพ และประสิทธิภาพการกักเก็บของไลโปโซม พบว่า ที่อนุหุมี 4, 25 และ 45 องศาเซลเซียส ตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน ไลโปโซมที่บรรจุความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวบก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคไลโปโซม ในขณะที่ไลโปโซมที่บรรจุความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวบก 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการลดลงของขนาดค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค และทั้ง 2 ความเข้มข้นมีการเปลี่ยนแปลงของค่าการกระจายตัว และค่าศักย์ซีตาของอนุภาคที่เพิ่มมากขึ้นแสดงให้เห็นถึงการลดลงของคุณสมบัติทางกายภาพที่ลดน้อยลง และมี

ความสัมพันธ์กับปริมาณการกักเก็บสารสำคัญอย่างอะเซียติโคไซด์ และมาเดกาสโซไซด์ที่ลดลง เช่นเดียวกัน และพบว่า ยิ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อร้อยละการกักเก็บที่ลดน้อยลง

5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อความคงตัวของอนุภาคไลโปโซมในการกักเก็บสารสำคัญในกลุ่มไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ที่สกัดได้จากใบบัวบก อาจจะทำการศึกษาถึงสัดส่วนของฟอสโฟลิปิดต่อคอเลสเตอรอล เนื่องจากสัดส่วนขององค์ประกอบชั้นไขมันเหล่านี้เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อขนาด และความคงตัวของอนุภาคไลโปโซม อีกทั้งการวัดฤทธิ์ทางชีวภาพภายหลังการกักเก็บ จะเป็นการช่วยเพิ่มข้อมูลทางด้านประสิทธิภาพของการพัฒนาอนุภาคนาโนในการเก็บรักษาคุณภาพของสารสกัด รวมไปถึงยาในการรักษาโรค เพื่อประโยชน์ในวงการเครื่องสำอาง และการแพทย์



รายการอ้างอิง

- ภาสวีย์ จันท์สุก วิทยาพร ศิริกุล และ ชุตินันท์ หมั่นแก้ว. (2555). รูปแบบนวัตกรรมของการนำส่งยาสมุนไพร. *วารสารก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์*, 12(1), 37-47.
- สมลักษณ์ คงเมืองมาลัย สติรพันธุ์ และอุทัย โสธนะพันธุ์. (2550). *ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลูและความคงตัวของไลโปโซม* (ปริญญานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- Abdulla, M. A., Al-Bayaty, F. H., Younis, L. T. & Abu Hassan, M. I. (2010). Anti-ulcer activity of *Centella asiatica* leaf extract against ethanolinduced gastric mucosal injury in rats. *J. Med. Plants Res*, 4(1), 1253–1259.
- Albuquerque, B. R., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Rodrigues, A. E., Curran, T. P., Barros, L. & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Ind. Crop. Prod*, 95(1), 404–415.
- Alfarra, H. Y. & Omar, M. N. (2013). *Centella asiatica*: From folk remedy to the medicinal biotechnology—A state revision. *Int. J. Biosci*, 3, 49–67.
- Azis, H. A., Taher, M., Ahmed, A. S., Sulaiman, W.M.A.W., Susanti, D., Chowdhury S.R. Zakaria Z.A. (2017). In vitro and in vivo wound healing studies of methanolic fraction of *Centella asiatica* extract. *South African Journal of Botany*, 108(1), 156-167
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods uses in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Aromat. Plants*, 4, 1–6.
- Bonifácio, B. V., da Silva, P. B., Ramos, M. A. dos S., Negri, K. M. S., Bauab, T. M., Chorilli, M. (2014). Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine*, 9, 1–15.
- Byakodi, M. K., Bagewadi, Z. K. & Muddapur, U. M. (2018). Phytoconstituents profiling and evaluation of antimicrobial and antioxidant attributes of methanolic extract of *Centella asiatica*. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, 9, 493–500.
- Bylka, W., Znajdek-awiżek, P., Studzińska-sroka, E., Brzezińska, M. (2013). *Centella asiatica* in cosmetology. *Postępy Dermatol. Alergol*, 63, 46–49.

- Coldren, C. D., Hashim, P., Ali, J. M., Oh, S. K., Sinsky, A. J. & Rha, C. (2003). Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoids. *Planta Med*, 69, 725-32.
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., & Akbarzadeh, A. (2014). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 381–391.
- Guo, D., Liu, J., Fan, Y., Cheng, J., Shi, Y., Zou, J., & Zhang, X. (2020). Optimization, characterization and evaluation of liposomes from *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. extracts. *Journal of liposome research*, 30(4), 366–376.
- Hussin, F., Eshkoor, S. A., Rahmat, A., Othman, F. & Akim, A. (2014). The *Centella asiatica* juice effects on DNA damage, apoptosis and gene expression in hepatocellular carcinoma (HCC). *BMC Complement. Altern. Med*, 32, 1–7.
- Idris, F. N., & Mohd Nadzir, M. (2021). Comparative Studies on Different Extraction Methods of *Centella asiatica* and Extracts Bioactive Compounds Effects on Antimicrobial Activities. *Antibiotics*, 10(4), 457.
- James, J. T., Dubery, I. A., 2009. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) urban. *Molecules*, 14, 3922–3941.
- Joguparthi, V., Feng, S., & Anderson, B. D. (2008). Determination of intraliposomal pH and its effect on membrane partitioning and passive loading of a hydrophobic camptothecin, DB-67. *International journal of pharmaceutics*, 352(1-2), 17–28.
- Kastner E., Kaur R., Lowry D., Moghaddam B., Wilkinson A., Perrie Y. (2014). High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization. *Int. J. Pharm*, 477, 361–368.
- Kritikar, K. R., & Basu, B. D. (1987). *Indian medicinal plants* (Vol. 2, pp. 1193–1195). International Book Distributors.
- Lu, L., Ying, K., Wei, S., Fang, Y., Liu, Y., Lin, H., . . . Mao, Y. (2004). Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. *Basic Sci. Rev*, 43, 801–807.

- Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. V. & Chiaramoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, 44(1), 3039-3046.
- Majumdar, S., Mahanti, B., Kar, A. K., Parya, H., Ghosh, A., & Kar, B. (2024). Nanoliposome: As a smart nanocarrier in transdermal drug delivery system. *Intelligent Pharmacy*, 2(4), 768-776.
- Mohapatra, P., Ray, A., Jena, S., Nayak, S. (2021). Influence of extraction methods and solvent system on the chemical composition and antioxidant activity of *Centella asiatica* L. leaves. *March Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33(1), 101971.
- Monton, C., Settharaksa, S., Luprasong, C., Songsak, T. An optimization approach of dynamic maceration of *Centella asiatica* to obtain the highest content of four centelloids by response surface methodology. *Braz. J. Pharmacogn*, 29(1), 254–261.
- New, R. R. S. (1990). *Liposomes a Practical Approach*. Oxford University Press.
- Pillai, A. R. S., Bhosale, Y. K., & Roy, S. (2024). Extraction of Bioactive Compounds From *Centella asiatica* and Enlightenment of Its Utilization into Food Packaging: A Review. *International journal of food science*, 2024(1), 1249553.
- Puttarak, P., Brantner, A. & Panichayupakaranant, P. (2016). Biological Activities and Stability of a Standardized Pentacyclic Triterpene Enriched *Centella asiatica* Extract. *Natural Product Sciences*, 22(1), 20-24.
- Rafinska, K., Pomastowski, P., Rudnicka, J., Krakowska, A., Maruska, A., Narkute, M., & Buszewski, B. (2019). Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. *Food chemistry*, 289, 16–25.
- Roy, B., Guha, P., Bhattarai, R., Nahak, P., Karmakar, G., Chettri, P., & Panda, A. K. (2016). Influence of Lipid Composition, pH, and Temperature on Physicochemical Properties of Liposomes with Curcumin as Model Drug. *Journal of oleo science*, 65(5), 399–411.

- Schaneberg, B., Mikell, J., Bedir, E., Khan, I., Nachname, V., 2003. An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. *Die PharmazieeAn International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 381e384.
- Soleimanifar, M., Jafari, S. M., & Assadpour, E. (2020). Encapsulation of olive leaf Phenolics within electrosprayed whey protein nanoparticles; production and characterization. *Food Hydrocolloids*, 101, Article105572.
- Soumyanath, A., Zhong, Y.P., Henson, E., Wadsworth, T., Bishop, J., Gold, B.G., Quinn, J.F. (2012). *Centella asiatica* extract improves behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease: Investigation of a possible mechanism of action. *Int. J. Alzheimer's Dis*, 381974.
- Tai, K., Liu, F., He, X., Ma, P., Mao, L., Gao, Y., & Yuan, F. (2018). The effect of sterol Derivatives on properties of soybean and egg yolk lecithin liposomes: Stability, structure and membrane characteristics. *Food Research International*, 109, 24–34.
- Transparency Market Research. (2020). *Centella asiatica Market—Global Industry Analysis, Size, Share, Trends, Growth, and Forecasts, 2020 to 2030*. <https://www.transparencymarketresearch.com/centella-asiatica-market.html>
- Webb, C., Khadke, S., Schmidt, S. T., Roces, C. B., Forbes, N., Berrie, G., & Perrie, Y. (2019). The Impact of Solvent Selection: Strategies to Guide the Manufacturing of Liposomes Using Microfluidics. *Pharmaceutics*, 11(12), 653.
- Wegner, T., Laskar, R., & Glorius, F. (2022, December). Lipid mimetics: A versatile toolbox for lipid biology and beyond. *Current Opinion in Chemical Biology*, 71(1), 102209.
- Zhao, L., Temelli, F., Curtis, J. M., & Chen, L. (2015). Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Elects of phospholipids and sterols. *Food Research International*, 77, 63–72.
- Zheng, M., (1989). An experimental study of the anti-HSV-II action of 500 herbals drugs. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 9, 113.

Zook, J. M., & Vreeland, W. N. (2010). Effects of temperature, acyl chain length, and flow-rate ratio on liposome formation and size in a microfluidic hydrodynamic focusing device. *Soft Matter*, 6(1), 1352–1360.

