บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นาโนเทคโนโลยี

การพัฒนาระบบนำส่งในระดับนาโนเมตร หรือที่เรียกว่า “อนุภาคนาโน” ได้มีการพัฒนานำเอาอนุภาคนาโนไปใช้กับยา การนำส่งยาโปรตีน วัคซีน หรือนิวคลีโอไทด์ โดยระบบนำส่งที่พัฒนาขึ้นทั้งในรูปอนุภาคนาโน หรือระบบคอลลอยด์อื่นๆ เหล่านี้ จะไปมีผลต่อค่าเภสัชจลนศาสตร์ การกระจาย และการปลดปล่อยในร่างกาย นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนนำไปใช้ในเครื่องสำอาง ดังจะเห็นได้จากการเติบโตอย่างรวดเร็วในการลงทุนและการจดสิทธิบัตรเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับอนุภาคนาโนเพื่อการใช้ทางผิวหนัง ตัวอย่างเช่น ในผลิตภัณฑ์กันแดด ผลิตภัณฑ์เพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีอนุภาคนาโนเป็นส่วนประกอบนี้ควรได้รับการตรวจสอบเพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ก่อนนำไปใช้ด้วย [5] ปัจจุบันมีการนำนาโนเทคโนโลยีหลายชนิดมาใช้เพื่อเพิ่มความคงตัวและพัฒนาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสำคัญ อาทิเช่น ลิโปโซม (liposomes) ไมโครอิมัลชัน (microemulsions) เป็นต้น

เทคโนโลยีไมโครอิมัลชัน (microemulsion)

อิมัลชัน หมายถึง ผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำและน้ำมัน ถ้าต้องนำมาไว้ด้วยกันในลักษณะที่ผสมผสานเข้าเป็นเนื้อเดียวกันก็ต้องใช้อิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) เป็นตัวผสานทั้งสองเข้าด้วยกัน อิมัลชันที่เกิดขึ้นถ้ามองด้วยตาเปล่าจะเห็นลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันแต่ถ้ามองด้วยกล้องจุลทรรศน์ก็จะเห็นเป็น 2 วัตภาค คือ เห็นเป็นหยดเล็ก ๆ ของของเหลวชนิดหนึ่งที่เรียกว่า “วัตภาคภายใน” (internal or disperse phase) กระจายตัวในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า “วัตภาคภายนอก” (external or continuous phase)

อิมัลชันสามารถแบงไดเปน อิมัลชันหยาบ (macroemulsion) ที่มีขนาดอนุภาค 0.1-100 ไมโครเมตร ไมโครอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 10-100 นาโนเมตร และซับไมโครอิมัลชัน (submicroemulsion) ที่มีขนาดอนุภาค 100-600 นาโนเมตร โดยทั่วไปไมโครอิมัลชันอาจเรียกวา “นาโนอิมัลชัน” เพื่อใหเห็นภาพในขนาดระดับนาโนเมตรของหยดภายในอิมัลชันและเป็นคำที่รวบรัดทำใหเขาใจไดชัดเจน ในขณะที่ซับไมโครอิมัลชันอาจเรียกวา “ลิพิดอิมัลชัน” ลักษณะทางกายภาพของอิมัลชันระดับนาโนจะมีทั้งแบบโปรงแสงและชนิดโปรงใส [6]

ระบบไมโครอิมัลชันได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม และเริ่มเป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมยามากขึ้น เนื่องจากเป็นระบบที่มีความคงตัวดีและมีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์

สามารถเกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะ ระบบไมโครอิมัลชันเป็นอิมัลชันชนิดพิเศษที่มีขนาดเล็กกว่าอิมัลชันธรรมดาและมีลักษณะโปร่งใส เนื่องจากขนาดอนุภาคของวัตภาคภายในที่ขนาดเล็ก ซึ่งทำให้อิมัลชันนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคเล็กกว่าหนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสงที่เรามองเห็น จึงไม่เกิดการกระจายแสงทำให้เรามองเห็นเป็นอิมัลชันใส ขณะที่อิมัลชันโดยทั่วไปจะมีขนาดประมาณ 250-10,000 นาโนเมตร ซึ่งมองด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นของเหลวขุ่นเหมือนน้ำนม ผลิตภัณฑ์นี้เริ่มเป็นที่นิยมในท้องตลาดมากขึ้น เนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพที่น่าใช้และมีขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร จึงสามารถนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยาหรือสารสำคัญได้

ระบบไมโครอิมัลชันเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1943 โดย Hoar และ Schulman เกิดจากการไทเทรตอิมัลชันด้วย hexanol จนได้สารละลายใส ในปี ค.ศ. 1959 Schulman และคณะจึงได้ตั้งชื่อสารละลายใสนี้ว่า “ไมโครอิมัลชัน” หลังจากนั้นก็มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับไมโครอิมัลชันจำนวนมาก ในปี ค.ศ. 1981 Danielsson และ Lindman ได้ให้คำจำกัดความว่า ไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่ประกอบด้วยน้ำ น้ำมัน สารทำอิมัลชันหรือสารลดแรงตึงผิว (emulsifier หรือ surfactant) ซึ่งเป็นตัวกำหนดประเภทว่าเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) หรือน้ำมันในน้ำ (o/w) และตัวทำละลายร่วม (cosolvent) [7] ในปจจุบันกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑเครื่องสําอางและยาสวนใหญจะเตรียมใหอยูในรูปของระบบไมโครอิมัลชัน

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีไมโครอิมัลชันเพื่อสร้างอิมัลชันขนาดนาโน หรือ นาโนอิมัลชันนั้นสามารถทำได้โดยการทำให้เกิดระบบของอิมัลชันที่มีขนาดหยดอนุภาคภายในเล็กกวา 10-75 นาโนเมตร มีลักษณะโปรงใส (transparent) หรือโปรงแสง (translucent) เนื่องจากขนาดของหยดอนุภาคมีขนาดเล็กกวาความยาวหนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสง จึงไมกระจายแสง ทําใหมองเห็นเปนอิมัลชันใสเมื่อสังเกตดวยตาเปลา ไมโครอิมัลชันแบงเปน 2 ประเภท คือไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ จะมีน้ำมันละลายอยูในไมเซลลขยายของสารลดแรงตึงผิว และไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน คือจะมีน้ำอยูภายในไมเซลลขยายของสารลดแรงตึงผิว โดยสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุจะเกิดไมเซลลแบบผกผันในน้ำมัน นอกจากนี้เมื่อสัดสวนของน้ำและน้ำมันใกลเคียงกันจะเกิดโครงสร้างที่เรียกวา bicontinuous structure ซึ่งจะมีโครงตาขายของน้ำในเมทริกซของน้ำมัน และฟลมของสารลดแรงตึงผิวจะมีลักษณะเปนแผนตอเนื่องจนมองไมออกวาน้ำหรือน้ำมันเปนวัตภาคภายใน โดยไมโครอิมัลชันอาจพบในลักษณะของเหลวใสหรือเจลใสซึ่งมีลักษณะกึ่งแข็งก็ได้ สามารถเตรียมได้จากหลายวิธีการ เช่น วิธีไทเทรชัน และวิธีการกลับวัตภาค เป็นต้น

การทดสอบที่เกี่ยวข้องกับอิมัลชัน [8], [9]

1. การทดสอบชนิดของอิมัลชันด้วยการละลายของสี (dye solubility) : โดยใช้สีที่ละลายในน้ำหรือน้ำมันเป็นตัวทดสอบ นาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) จะกระจายตัวได้ดีในสี

ละลายน้ำและแยกออกจากสีละลายน้ำมัน ในทางตรงกันข้ามนาโนอิมัลชันชนิด น้ำในน้ำมัน (w/o) จะกระจายตัวได้ดีในสีละลายน้ำมันและแยกออกจากสีละลายน้ำ

2. สัณฐานวิทยา : สามารถตรวจสอบได้จากกล้อง transmission electron microscope (TEM) มีระบบของการเกิดภาพได้ง่าย ๆ ภาพที่เกิดขึ้นจะปรากฏให้ผู้ใช้เห็นได้โดยตรงบนแผ่นรับภาพและภาพนั้นเกิดความแตกต่างระหว่างความโปร่งใสและความทึบแสงที่ลำแสงอิเล็กตรอนผ่านหรือไม่สามารถจะผ่านได้ ภาพที่ปรากฏ คือ เงาของตัวอย่าง หรือ scanning electron microscope (SEM) ที่ให้ภาพแบบสามมิติ โดยต้องมีการให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม ปกติจะใช้ประมาณ 20 kV แล้ววิเคราะห์ภาพที่ได้ต่อด้วย software เช่น Leica image systems, UK เป็นต้น การเกิดภาพเป็นระบบที่ค่อนข้างจะยุ่งยากไม่ใช่เป็นเงาที่ภาพที่เกิดขึ้นโดยตรงอันเกิดจากลำแสงอิเล็กตรอนผ่านหรือไม่สามารถจะผ่านตัวอย่างแต่เป็นภาพที่เกิดทางอ้อมซึ่งเป็นการรวบรวมสัญญาณจากการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณไฟฟ้าให้เป็นภาพ

3. ขนาดอนุภาค : การกระจายขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) สามารถวัดได้โดยใช้เทคนิค dynamic light scattering (DLS) เป็นเทคนิควัดการกระเพื่อมของความเข้มแสงหรือเรียกว่า photo correlation spectroscopy (PCS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วัดขนาดของสารตัวอย่างในระดับนาโนเมตรได้ตั้งแต่ 0.005 – 5 ไมโครเมตร (μm) สำหรับในอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 5 μm จะเกิดการแพร่กระจายอย่างไร้ทิศทาง (randomly diffuse) ไปทั่วตัวกลาง ในขณะเดียวกันอนุภาคสามารถก่อให้เกิดการกระเจิงของแสงได้เช่นกัน ความถี่ของการกระเพื่อมขึ้นและลง สามารถตรวจจับโดยใช้หลอดทวีพลังแสง (photomultiplier) ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของอนุภาคของนาโนอิมัลชัน และค่าศักย์ซีต้า ที่เป็นค่าความต่างศักย์ทางไฟฟ้าของอนุภาคขึ้นกับปริมาณประจุไฟฟ้าบนผิวของอนุภาค หากมีค่าสูงจะมีแรงผลักกันระหว่างประจุของอนุภาคมากทำให้อนุภาคสามารถแขวนลอยโดยไม่เข้ามาเกาะกลุ่มกันทำให้สามารถทำนายความคงตัวของนาโนอิมัลชันได้คร่าว ๆ

4. ค่าการนำไฟฟ้า : นาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ จะมีค่าการนำไฟฟ้าสูงในขณะที่ชนิดน้ำในน้ำมัน มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำมากหรือไม่นำไฟฟ้าเลย เป็นผลจากสมบัติการนำไฟฟ้าของวัตภาคภายนอกในระบบนั่นเอง และค่าการนำไฟฟ้าจะสามารถทำนายการเกิด bicontinuous phase หรือการเกิด phase inversion ในนาโนอิมัลชันได้

5. ความหนืด : เป็นผลมาจากองค์ประกอบทั้งสามส่วนที่อยู่ในนาโนอิมัลชัน คือ น้ำ สารลดแรงตึงผิวและน้ำมัน การเพิ่มองค์ประกอบส่วนที่เป็นน้ำจะทำให้ความหนืดของนาโนอิมัลชันลดลงในขณะที่การลดปริมาณสารลดแรงตึงผิวและตัวทำละลายร่วม (co-surfactant) จะทำให้แรงตึงที่ผิวหน้าของวัตภาคน้ำและน้ำมันเพิ่มมากขึ้นเป็นผลทำให้ความหนืดของระบบเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นความหนืดจึงมีความสำคัญอย่างมากในแง่ของความคงตัวและประสิทธิภาพในการปลดปล่อยสารสำคัญ โดยปกติแล้วนาโนอิมัลชันที่เป็นชนิดน้ำมันในน้ำจะมีความหนืดต่ำกว่านาโนอิมัลชันที่เป็น

ชนิดน้ำในน้ำมัน ในระบบที่มีความหนืดต่ำจะส่งผลให้มีการปลดปล่อยสารสำคัญได้เร็วกว่าและลดความเหนอะหนะที่ผิวเมื่อใช้ [9]

6. ความสามารถในการซึมผ่านผิวหนัง : โดยใช้ Frans diffusion cell ที่มีเยื่อกั้นเป็นหนังที่สามารถเป็นตัวแทนของผิวหนังมนุษย์ได้ ด้านล่างมีสารละลายรองรับสารที่ซึมผ่านผิวหนังส่วนใหญ่ใช้เป็น phosphate buffer saline pH 7.4 และทำให้ระบบอยู่ในสภาวะ sink condition ตลอดการทดลอง การทดสอบนี้ต้องทำตามมาตรฐานสากลที่เป็นที่ยอมรับ เช่น OEDC guidelines

ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านผิวหนังของอนุภาคขนาดนาโน [10]

1. ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาค เป็นปัจจัยที่มีผลและเป็นตัวกำหนดความสามารถในการซึมผ่านชั้นผิวหนังอย่างชัดเจน

2. ลักษณะของอนุภาคนาโน โดยในอนุภาคขนาดนาโนที่มีความแข็ง (rigid nanoparticles) จะมีการซึมผ่านที่ต่างจากอนุภาคที่มีความยืดหยุ่น อนุภาคนาโนที่ยืดหยุ่นคล้ายของเหลวจะปรับเปลี่ยนรูปร่างได้ง่ายจึงสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ลึกกว่า อนุภาคนาโนที่มีความยืดหยุ่นขนาด 100-150 นาโนเมตร จะสามารถผ่านชั้นหนังกำพร้าและสะสมตรงบริเวณรอยต่อชั้นหนังกำพร้ากับหนังแท้ได้

3. การแบ่งภาคของสารไปอยู่ในชั้นน้ำมันกับน้ำ (partition between oil and water) พันธะระหว่างอนุภาค (อาจทำให้รวมตัวกันมีขนาดใหญ่ขึ้นไม่สามารถแทรกผ่านไปได้) พันธะกับสารต่าง ๆ ในร่างกาย ความเฉื่อยต่อพันธะ/ปฏิกิริยาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างอนุภาคกับของเหลวต่าง ๆ ที่ล้อมรอบ การจับกับโปรตีนหรือถูกร่างกายกำจัดด้วยเอ็นไซม์หรือเมตาบอลิสัม (metabolism)

4. ปริมาณที่สัมผัส ระยะเวลาหรือความถี่ของการสัมผัสซ้ำ ๆ ที่ตำแหน่งเดิม มีผลต่อการรับเอาอนุภาคนาโนเข้าสู่ร่างกาย บริเวณรอยต่อระหว่างชั้นหนังกำพร้ากับหนังแท้มีการยึดกันอย่างแน่นหนาทำให้อนุภาคแทรกตัวผ่านไปได้ยาก แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าอนุภาคจะมีขนาดใหญ่ถึง 1 ไมครอนจะสามารถผ่านชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้เข้าไปได้หากอาศัยการนวดร่วมด้วย

5. สุขภาพของผิวหนัง ผิวหนังปกติจะมีการซึมผ่านของอนุภาคนาโนที่ต่างจากผิวหนังที่มีบาดแผล ผิวถลอก หรือมีอาการแพ้ เนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของชั้นเกราะป้องกันผิวหนัง

ข้อดีของอิมัลชันขนาดนาโน หรือ นาโนอิมัลชัน [8], [11]

1. มีขนาดหยดอนุภาคที่เล็กมากทำให้ลดแรงโน้มถ่วงของโลกที่มากระทำต่ออนุภาคนาโนอิมัลชันได้ ทำให้การเคลื่อนที่แบบ Brownian motion มีผลเพียงพอในการเอาชนะแรงโน้มถ่วงของโลกได้ ทำให้นาโนอิมัลชันไม่เกิดการแยกชั้นครีมระหว่างการเก็บรักษา

2. จากขนาดหยดอนุภาคที่เล็กมากทำให้ป้องกันการเกิดการรวมกลุ่มกันของหยดอนุภาคภายในแบบผันกลับได้ (flocculation) และป้องกันการหลอมรวมกันของหยดอนุภาคภายในแบบผันกลับไม่ได้ (coalescence)

3. อิมัลชันที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรจัดเป็นระบบนำส่งสารสำคัญผ่านผิวหนังที่มีประสิทธิภาพเนื่องจากมีพื้นที่ผิวของระบบมาก ทำให้การซึมผ่านเกิดขึ้นได้ดีและขนาดอนุภาคที่เล็กมากจึงสามารถช่วยเพิ่มการซึมของสารสำคัญในการออกฤทธิ์ผ่านผิวหนังได้ดี ในงานวิจัยของ Khurana et al. [3] ยืนยันผลการศึกษาเกี่ยวกับการซึมผ่านของยา meloxicam nanoemulsion gel โดยใช้กล้อง confocal laser scanning microscopy (CLSM) ว่าสามารถซึมเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้ลึกถึง 130 ไมโครเมตร จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสำคัญ (bioavailability) ในผิวหนัง

4. มีลักษณะโปร่งใสและมีความหนืดน้อยมาก ทำให้มีลักษณะที่สวยงามให้ความรู้สึกที่ดีต่อผิว และเมื่อทาบนผิวสามารถเข้ากับผิวได้เป็นอย่างดี

5. เป็นระบบที่มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์และสามารถสร้างได้จากวิธีการใช้พลังงานต่ำแล้วเกิดกระบวนการ self-emulsification ได้เองหรือให้พลังงานสูงเพื่อช่วยทำให้เกิดอิมัลชันขนาดนาโนได้

6. เป็นระบบนำส่งที่สามารถปรับใช้ได้ทั้งสารออกฤทธิ์ที่ละลายในตัวทำละลายมีขั้วหรือไม่มีขั้วและช่วยป้องกันไม่ให้สารสำคัญที่กักเก็บเสื่อมสลายจากการสัมผัสสภาวะแวดล้อม

ข้อจำกัดของเทคโนโลยีไมโครอิมัลชัน [8]

1. ต้องใช้สารลดแรงตึงผิวหรืออิมัลซิฟายเออร์ในปริมาณมากกว่าแมคโครอิมัลชันและอาจจำเป็นต้องใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมเพื่อช่วยให้เกิดความคงตัวของหยดอนุภาคภายใน

2. สารลดแรงตึงผิวหรืออิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้จะต้องไม่เป็นพิษกับร่างกาย เนื่องจากต้องใช้ในปริมาณมากกว่าปกติ

3. ระบบไมโครอิมัลชันมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบ เช่น สัดส่วนปริมาณสารที่ใช้ อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นต้น

2.2 Oligomeric proanthocyanidins

Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) เป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenols) ชนิดหนึ่งที่พบมากในพืชโดยเฉพาะในผลไม้ เช่น แอปเปิล ลูกแพร์ องุ่น และยังพบในอาหารบางชนิด เช่น ช็อคโกแลต ไวน์และชา เป็นต้น ส่วนใหญ่แล้วจะสกัดสารดังกล่าวมาจากเมล็ดองุ่นและเปลือกสนเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านสารก่อมะเร็ง (anticarcinogenic) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านจุลชีพ (antimicrobial) และช่วยในการขยายตัวของหลอดเลือด(vasodilatory)

นอกจากชื่อเรียก oligomeric proanthocyanidins แล้วยังมีชื่อพ้องอื่น ๆ ที่นิยมใช้ ได้แก่ proanthocyanidins, procyanidilic oligomers (PCOs), leucoanthocyanins, condensed

tannins หรือ pycnogenols เป็นต้น ในบางครั้งยังเรียกตามชื่อการค้า Pycnogenol® ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดเปลือกสนมาริไทม์ (maritime pine) จากประเทศฝรั่งเศสด้วย

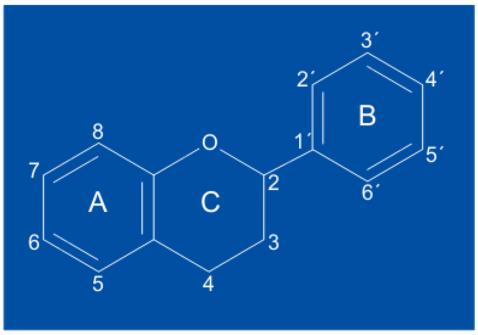
ผู้ที่เริ่มศึกษาเกี่ยวกับสาร OPCs เป็นคนแรกคือ Jacques Masquelier แห่ง University of Bordeaux ประเทศฝรั่งเศส จากคำแนะนำของชาวพื้นเมืองในแถบลุ่มแม่น้ำเซนต์ลอว์เรนซ์ (Saint Lawrence river) ที่ให้ทดลองดื่มน้ำต้มจากเปลือกสนเพื่อรักษาอาการโรคลักปิดลักเปิด จนนำมาสู่การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารสำคัญที่มีในเปลือกสน แล้วทราบต่อมาในภายหลังว่าคือ oligomeric proanthocyanidins [12]

ข้อมูลทางชีวเคมี (biochemistry)

Proanthocyanidins เป็นสารพฤกษเคมีที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอยู่รวมกันเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomers) มีโครงสร้างพื้นฐานมาจากฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (แสดงในภาพที่ 1) คือ catechin หรือ epicatechin ประกอบขึ้นจากโครงสร้างที่เป็นวงคาร์บอน 6 อะตอม 2 วงเชื่อมต่อกันด้วยสายไฮโดรคาร์บอน 2 อะตอม ซึ่งฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 1) นั้นก็เป็นหนึ่งในกลุ่มของสารประกอบพอลิฟีนอลิก (polyphenolic compounds) ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อ catechin หรือ epicatechin เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่งไฮโดรเจนอะตอมที่ว่างอยู่จึงเกิดเป็นสารประกอบใหม่ เรียกว่า oligomeric proanthocyanidins หรือ proanthocyanidins แต่หากมีโครงสร้างที่มาเชื่อมต่อกันมากกว่า 10 โครงสร้างจะเรียกเป็น condensed tannins [13] โดยตำแหน่งที่เชื่อมต่อโครงสร้างยังมีผลต่อสมบัติทางเคมีและมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันโดย procyanidins B1 ถึง B4 จะมีการเชื่อมต่อเกิดที่ตำแหน่ง C4- C8 และ procyanidins B5 ถึง B8 จะมีการเชื่อมต่อเกิดที่ตำแหน่ง C4-C6 ดังแสดงในภาพที่ 2 [14]

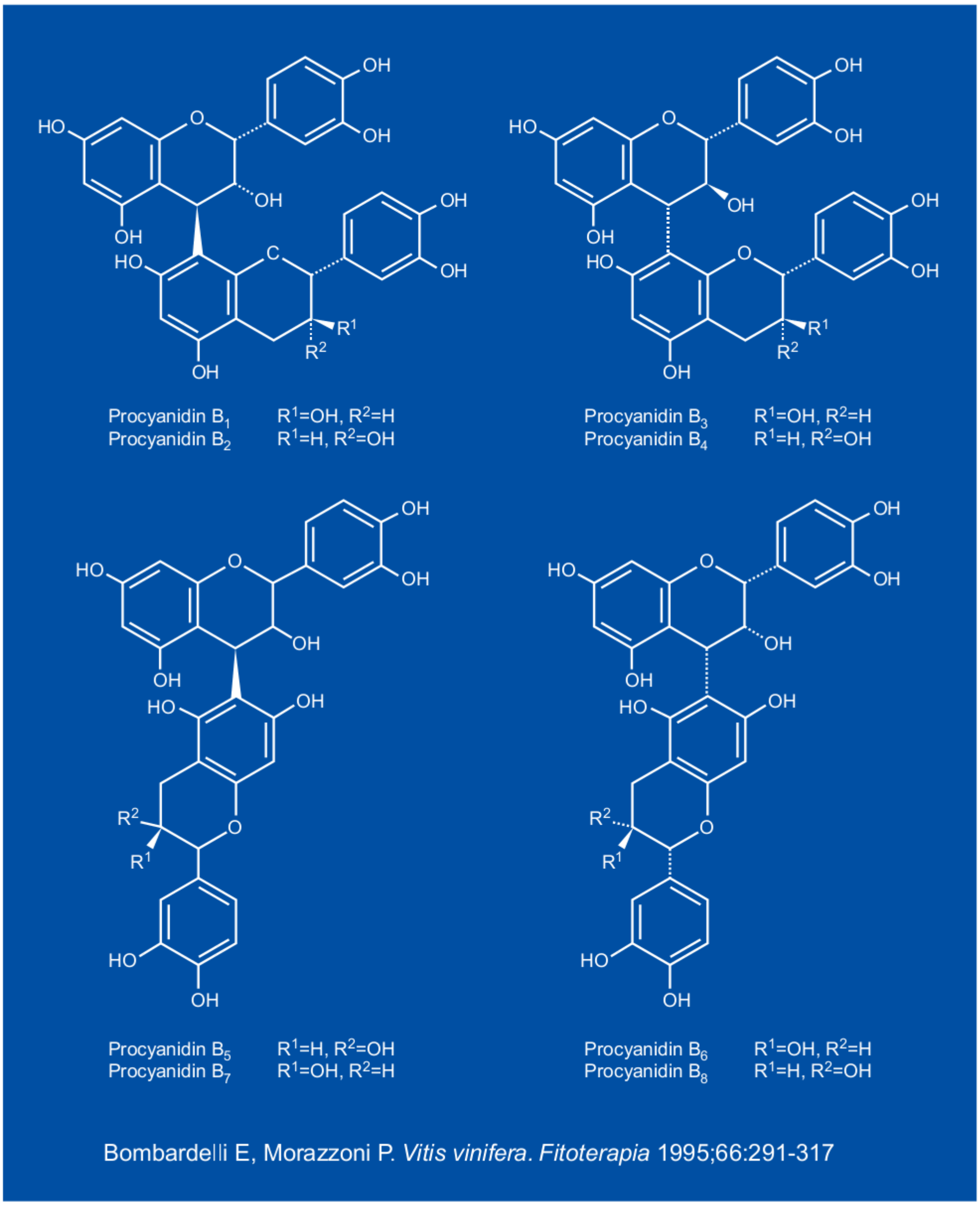
ภาพที่ 1 โครงสร้างและตำแหน่งของฟลาโวนอยด์ [14]

Figure 1: Basic Structure and Numbering System of Flavonoids

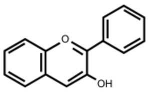
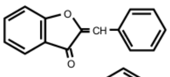
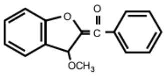
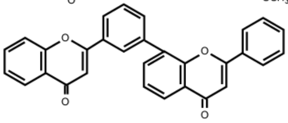
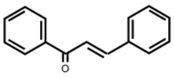
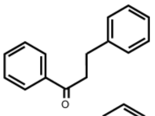
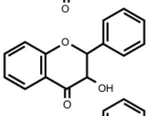
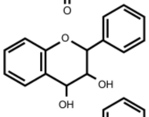
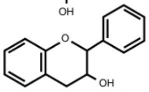
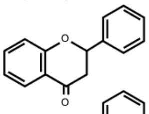
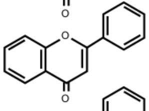
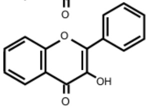
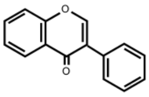
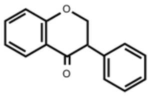
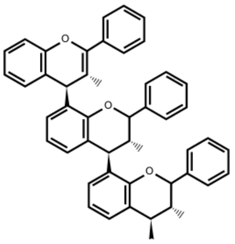


ภาพที่ 2 โครงสร้าง procyanidins B1-B8 [14]

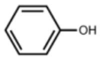
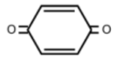
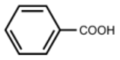
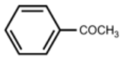
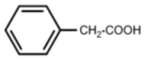
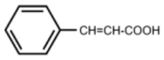
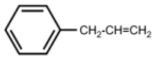
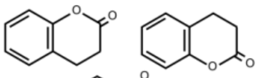
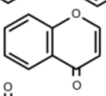
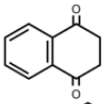
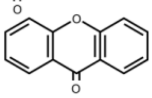
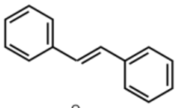
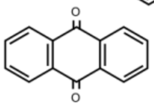
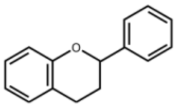
Figure 2: Structure of the Main Procyanidin Dimers from *V. vinifera*



ตารางที่ 1 สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (14)

Flavonoid	Basic Structure
Anthocyanidin	
Aurones	 
Biflavonoids	
Chalcones	
Dihydrochalcones	
Dihydroflavonol	
Flavandiol or leucoanthocyanidin	
Flavanol	
Flavanones	
Flavones	
Flavonols	
Isoflavonoids	 
Proanthocyanidins or condensed tannins	

ตารางที่ 2 การจำแนกสารในกลุ่มของสารประกอบพอลิฟีนอลิก [14]

Class	Basic Skeleton	Basic Structure
Simple phenols	C_6	
Benzoquinones	C_6	
Phenolic acids	C_6-C_1	
Acetophenones	C_6-C_2	
Phenylacetic acids	C_6-C_2	
Hydroxycinnamic acids	C_6-C_3	
Phenylpropenes	C_6-C_3	
Coumarins, isocoumarins	C_6-C_3	
Chromones	C_6-C_3	
Naftoquinones	C_6-C_4	
Xanthones	C_6-C_1-C_6	
Stilbenes	C_6-C_2-C_6	
Anthraquinones	C_6-C_2-C_6	
Flavonoids	C_6-C_3-C_6	
Lignans, neolignans	$(C_6\text{-}C_3)_2$	
Lignins	$(C_6\text{-}C_3)n$	

ประสิทธิภาพของ oligomeric proanthocyanidins [13]

1. ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (free radical trapping) ได้ดี และจากการทดลองในหนูพบว่าสามารถยับยั้งสารเคมีที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation, DNA fragmentation และการตายของเซลล์ (apoptosis) ที่จะไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย ได้ เมื่อศึกษาในมนุษย์เมื่อตรวจวัดปริมาณ low-density lipoprotein cholesterol พบว่ามีค่าลดลง มาจากการยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ในร่างกายและตรวจพบการจับอนุมูลอิสระมากขึ้น เมื่อบริโภคไวน์แดงที่มีส่วนผสมของ oligomeric proanthocyanidins

2. ลดการเกิดอักเสบ ได้จากการยับยั้งการเกิด peroxide generation, proinflamatory cytokines และ interleukin 1-beta เมื่อไม่เกิดกระบวนการและสารกระตุ้นการอักเสบเหล่านี้ก็จะทำให้อาการอักเสบต่าง ๆ ทุเลาลง

3. กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน เนื่องจาก OPCs สามารถรวมกับคอลลาเจนได้ดีและช่วยหยุดการสลายตัวของคอลลาเจนอันเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อาการบวมน้ำเหลืองและเกิดริ้วรอยได้

4. ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของหลอดเลือดจากการที่ OPCs จะทำให้เกิดการเชื่อมโยงและเรียงตัวกันแน่นของคอลลาเจนในผนังหลอดเลือด จึงช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่ผนังหลอดเลือด ช่วยลดการซึมไหลของสารในหลอดเลือดออกมาและมีการไหลเวียนเลือดที่ดีขึ้น

5. ต้านมะเร็ง จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า OPCs สามารถเกิดพิษกับเซลล์มะเร็งได้โดยไม่ทำลายเซลล์ปกติของมนุษย์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการสกัดสารสำคัญจากเมล็ดองุ่นแดงไทยพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) ทำให้ทราบว่า OPCs จากเมล็ดองุ่นแดงของไทย มีคุณสมบัติต้านการกลายพันธุ์และต้านการทำลายดีเอ็นเอ (DNA) จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์และอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิด TK6 [2] และมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของ OPCs ต่อ tight junction ที่เป็นโครงสร้างสำคัญทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างเซลล์ พบว่า OPCs ช่วยเสริมความสามารถในการทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ ระหว่างเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน claudin-4 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2 ซึ่งมีผลช่วยยับยั้งการอักเสบของลำไส้ได้ [15]

2.3 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ เป็นสารที่มีอิเล็คตรอนอิสระ (unpaired-electron) อยู่ในวงนอกของ อะตอมหรือโมเลกุลมีที่มาทั้งแหล่งภายนอกร่างกายได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ($\dot{N}O$) ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา

และยาบางชนิด เช่น doxorubicin, penicillamine และ paracetamol เป็นต้น และถูกสร้างขึ้นในร่างกายของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากกระบวนการออกซิเดชัน–รีดักชัน (oxidation-reduction หรือ redox) นอกจากนี้ ยังรวมถึงกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) ที่มีออกซิเจนเป็นแกนกลางด้วย เช่น superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HClO), hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$), singlet oxygen ($O_2^{\bullet-}$), ozone (O_3) อย่างไรก็ดี ร่างกายสิ่งมีชีวิตมีกลไกที่จะกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ 2 วิธี คือ การใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ในร่างกายเช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) และการไม่ใช้เอนไซม์ได้แก่ สารประกอบหรือโปรตีนบางชนิด เช่น albumin, bilirubin, ceruloplasmin, transferrin เป็นต้น หรืออาศัยวิตามินชนิดต่าง ๆ ได้แก่วิตามินอี เบตา-คาโรทีน (β-carotene) และวิตามินซี ซึ่งสารเหล่านี้ทำหน้าที่ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ในกรณีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมจะมีผลทำให้ ROS เพิ่มปริมาณสูงขึ้น และหากมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณที่มากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย [16]

เทคนิคโฟโตเคมิลูมิเนสเซนส (photochemiluminescence; PCL)

หลักการพื้นฐานของเครื่องมือที่ใช้ตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค photochemiluminescence ซึ่งมีชื่อทางการค้าคือ PHOTOCHEM™ (Analytik Jena, Germany) ดังแสดงในภาพที่ 3 คือ ใช้สารเคมีลูมินอล (luminol) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น photosensitizer compound เป็นตัวสร้างอนุมูลอิสระชนิด superoxide anion radical ขึ้นโดยผ่านการกระตุ้นจากแสงอัลตราไวโอเลต (UV irradiation) ที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ภายในเครื่อง PHOTOCHEM™ และมีอัตราการเกิดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ มากกว่าสภาวะปกติในเซลล์ถึง 100 เท่า

อนุมูล $O_2^{\bullet-}$ เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับ detector substance และในระหว่างปฏิกิริยาจะมีการปล่อยโฟตอน (photon) ในรูปของ chemiluminescence ซึ่งถูกจับสัญญาณและตรวจวัดโดย photomultiplier tube (PMT) และหากสารที่ใช้ทดสอบมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนตี้ออกซิแดนท์ จะทำให้เกิดการยับยั้งจำนวนอนุมูลอิสระ $O_2^{\bullet-}$ ที่เกิดขึ้น และแปรค่าเป็นประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) โดยแสดงค่าเป็นประสิทธิภาพเทียบเท่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) และอนุพันธ์วิตามินอี (Trolox®) [17]

มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในพืชพื้นเมืองของประเทศโรมาเนีย (Romania) หลายชนิด อาทิเช่น oregano (*Origanum vulgare*), tarragon (*Artemisia dracunculus*) และ wild thyme (*Thymus serpyllum*) โดยใช้เครื่อง PHOTOCHEM™ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว มีความไวต่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใน

การวิเคราะห์และมีเคราะห์ผลได้แม่นยำ โดยให้ผลว่าพืชในกลุ่มดังกล่าว มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ [18]

ในประเทศไทย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกของผลฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis*; GAC fruit) โดย 100 ไมโครกรัมของสารสกัดมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ 1.873±0.034 และ 0.166 ±0.007 นาโนโมลของวิตามินอีและวิตามินซีตามลำดับ [19]

ภาพที่ 3 เครื่อง PHOTOCHEM™

2.4 นาโนเทคโนโลยีและความปลอดภัย

นวัตกรรมจากนาโนเทคโนโลยีมีส่วนในการพัฒนาวัสดุอุปกรณ์ยุคใหม่รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และเครื่องสำอาง ทำให้เครื่องอุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันเพิ่มประสิทธิภาพด้วยขนาดที่เล็กลงและมีรูปลักษณ์ทันสมัยขึ้น แต่การผลิตสิ่งที่มีขนาดเล็กมากจนมองด้วยตาเปล่าไม่เห็นทำให้เกิดคำถามในแง่ความปลอดภัยและความเสี่ยงต่อสุขภาพ นอกจากนี้ นาโนเทคโนโลยียังเป็นนวัตกรรมใหม่และด้วยขนาดที่เล็กมาก ๆ ทำให้คาดการณ์ว่าสามารถแทรกซึมผ่านเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายได้ง่ายขึ้น แม้ว่าวัสดุหรืออนุภาคนาโนจะมีโอกาสก่อพิษ แต่มิได้หมายความว่าวัสดุหรืออนุภาคนาโนทุกชนิดจะมีพิษ ทั้งนี้เพื่อให้ตระหนักถึงความสำคัญของการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับพิษที่มีความจำเพาะเมื่ออนุภาคมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรโดยต้องแยกแยะพิษที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารเคมีที่ประกอบขึ้นเป็นอนุภาคนาโน และพิษที่อาจเกิดจากสิ่งปนเปื้อนในกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนก็เป็นได้ [10]

อนุภาคนาโนที่ใช้ในเครื่องสำอางอาจจำแนกได้เป็นอนุภาคไม่สามารถละลายได้ เช่น ไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) และอนุภาคที่สามารถละลายได้ เช่น นาโนอิมัลชัน ลิโปโซม (liposome) นีโอโซม (neosome) ทั้งนี้ยังไม่พบข้อมูลที่แสดงถึงความเป็นพิษจากการซึมผ่านของอนุภาคที่มีขนาดเล็กเข้าสู่ร่างกาย และอนุภาคนาโนเหล่านี้ประกอบขึ้นจากสารเคมีที่ใช้โดยทั่วไปทางเครื่องสำอาง จึงกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนที่ใช้งานทางเครื่องสำอางในปัจจุบันไม่ส่งผลกระทบต่อ

ผิวหนังหรือสุขภาพของมนุษย์[20] อย่างไรก็ตาม การพัฒนาระบบนำส่งโดยอาศัยอนุภาคนาโน นอกเหนือจากการทดสอบถึงลักษณะทางเคมีกายภาพและความคงสภาพของอนุภาคนาโนและประสิทธิภาพแล้วยังต้องคำนึงถึงความปลอดภัยในแง่ของสารเคมีที่นำมาใช้ด้วย ซึ่งสามารถทดสอบได้หลายวิธี ขึ้นกับวัตถุประสงค์และการนำไปใช้ประโยชน์ โดยสามารถจำแนกวิธีการทดสอบได้ 2 ประเภท คือ การทดสอบในร่างกายสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย (*in vivo* test) เช่น หนู กระต่าย และการทดสอบภายนอกร่างกายและภายใต้สภาวะควบคุม (*in vitro* test) เช่น การทดสอบกับเซลล์ (cell lines หรือ cell culture) ในหลอดทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษ (toxicity test)

การเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องเช่น ความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบ ชนิดของเซลล์ การตอบสนองของเซลล์ วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ และรูปแบบหรือกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่ใช้ทดสอบ ดังนั้น ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงมีความหมายแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับลักษณะที่ทำการศึกษา กล่าวคือ เซลล์ต่างชนิดกันย่อมมีการตอบสนองและแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ไม่เหมือนกัน รวมถึงระดับความเป็นพิษอาจแตกต่างกันไป ปัจจุบันกระบวนการตรวจสอบความเป็นพิษของสารเคมีที่มีผลต่อการตายของเซลล์มีหลายวิธี

มีงานวิจัยที่ศึกษาความเป็นพิษของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่ใช้กักเก็บสาร quercetin โดยใช้วิธี MTT assay หรือ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสท์ (fibroblasts) ของหนูเพื่อประเมินความเป็นพิษก่อนนำไปทดสอบการระคายเคืองกับผิวหนังมนุษย์ ซึ่งผลทดสอบพบว่าแม้ในไมโครอิมัลชันจะประกอบไปด้วยสารลดแรงตึงผิวและน้ำมันปริมาณมาก แต่ก็ไม่มีผลเป็นพิษกับเซลล์ fibroblasts ของหนู จึงมีความปลอดภัยพอที่จะนำไปทดสอบกับมนุษย์ต่อได้ [21] สำหรับในงานวิจัยครั้งนี้ จะกล่าวถึงหลักการความเป็นพิษในระดับเซลล์ของนาโนอิมัลชันด้วยวิธี MTT assay

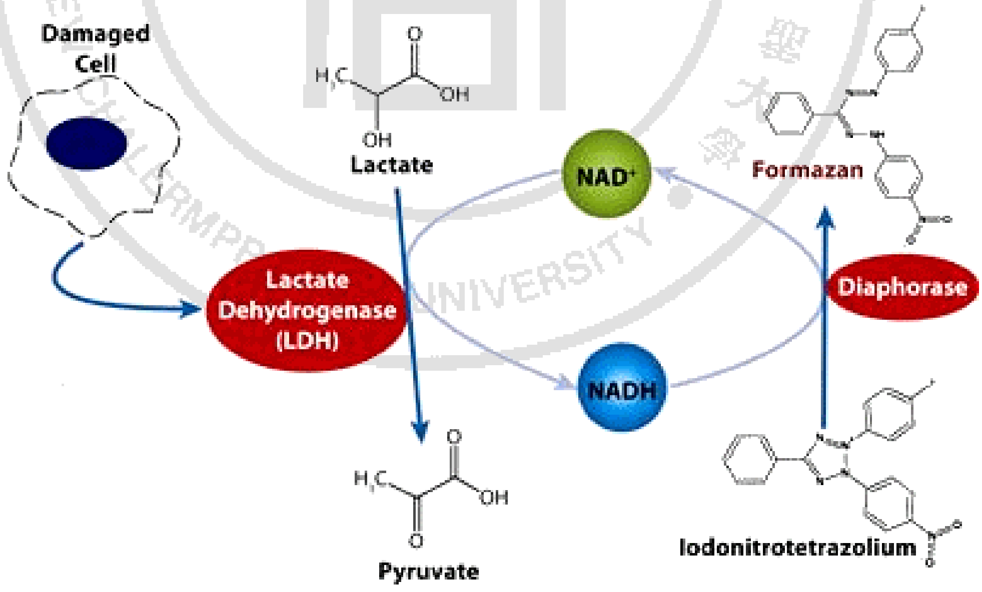
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

วิธีทดสอบ MTT assay เป็นการวิเคราะห์ผลความเป็นพิษต่อเซลล์เชิงปริมาณ โดยทดสอบหาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) โดยอาศัยหลักการที่ว่าเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่จะสามารถใช้เอ็นไซม์ซักซิเนสดีไฮโดรจิเนส (succinate dehydrogenase) ที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ส่วนที่เรียกว่า ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ทำปฏิกิริยากับสาร MTT ซึ่งเป็นสารเคมีของเกลือ tetrazolium salt ที่มีสีเหลืองและมีคุณสมบัติการละลายน้ำได้ดี ในกระบวนการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีที่สนใจต่อเซลล์ที่ต้องการใช้ในการศึกษาด้วยวิธี MTT อาศัยหลักการคือ ภายในเซลล์ที่รอดชีวิตจากการทดสอบกับสารเคมีจะมีการดำเนินไปของกระบวนการเมตาบอลิสัมและมีการสร้าง $NADH+H^+$ จากการที่กรดแลกติก (lactic acid) เปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) อย่างเป็นปกติ โดย $NADH+H^+$ ที่เกิดขึ้นสามารถถูกออกซิไดส์ได้ด้วย tetrazolium salt เกิดเป็นผลึกสี

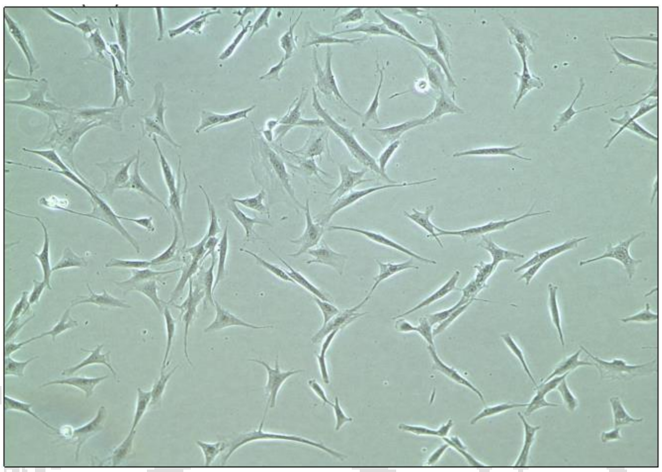
ม่วงของ formazan ซึ่งไม่ละลายน้ำ ดังนั้นในการประเมินผลจำเป็นต้องเติมตัวทำละลาย คือ dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงไปเพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นจึงนำไปประเมินผลด้วยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ภายใต้เครื่อง UV-visible photometry ในช่วงความยาวคลื่น 540-570 นาโนเมตร แต่ในทางตรงกันข้าม ถ้าเซลล์เกิดการตายจากการได้รับสารพิษที่ใช้ทดสอบ กระบวนการเมตาบอลิสัมภายในเซลล์จะหยุดลง และจะไม่มีการสร้าง $NADH+H^+$ ขึ้น ดังนั้น tetrazolium salt จึงไม่สามารถรีดิวซ์โปรตอน (proton) ให้เกิดเป็นผลึกสีม่วงของ formazan ได้ดังกลไกที่แสดงในภาพที่ 4 และค่าการดูดกลืนรังสี UV-visible ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งเซลล์ผลิตขึ้นสามารถนำไปคำนวณค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ได้โดยเปรียบเทียบระหว่างค่าดูดกลืนแสงของเซลล์กลุ่มที่ได้รับตัวอย่างทดสอบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม [22]

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของนาโนอิมัลชันด้วยวิธี MTT assay ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ normal human dermal fibroblasts (NHDF) ดังแสดงในภาพที่ 5 เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลักษณะรูปร่างยาวเรียว เจริญเติบโตแบบเรียงตัวเกาะบนภาชนะ (adhesion cells) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ชนิด Dulbecco’s modified eagle medium (DMEM)

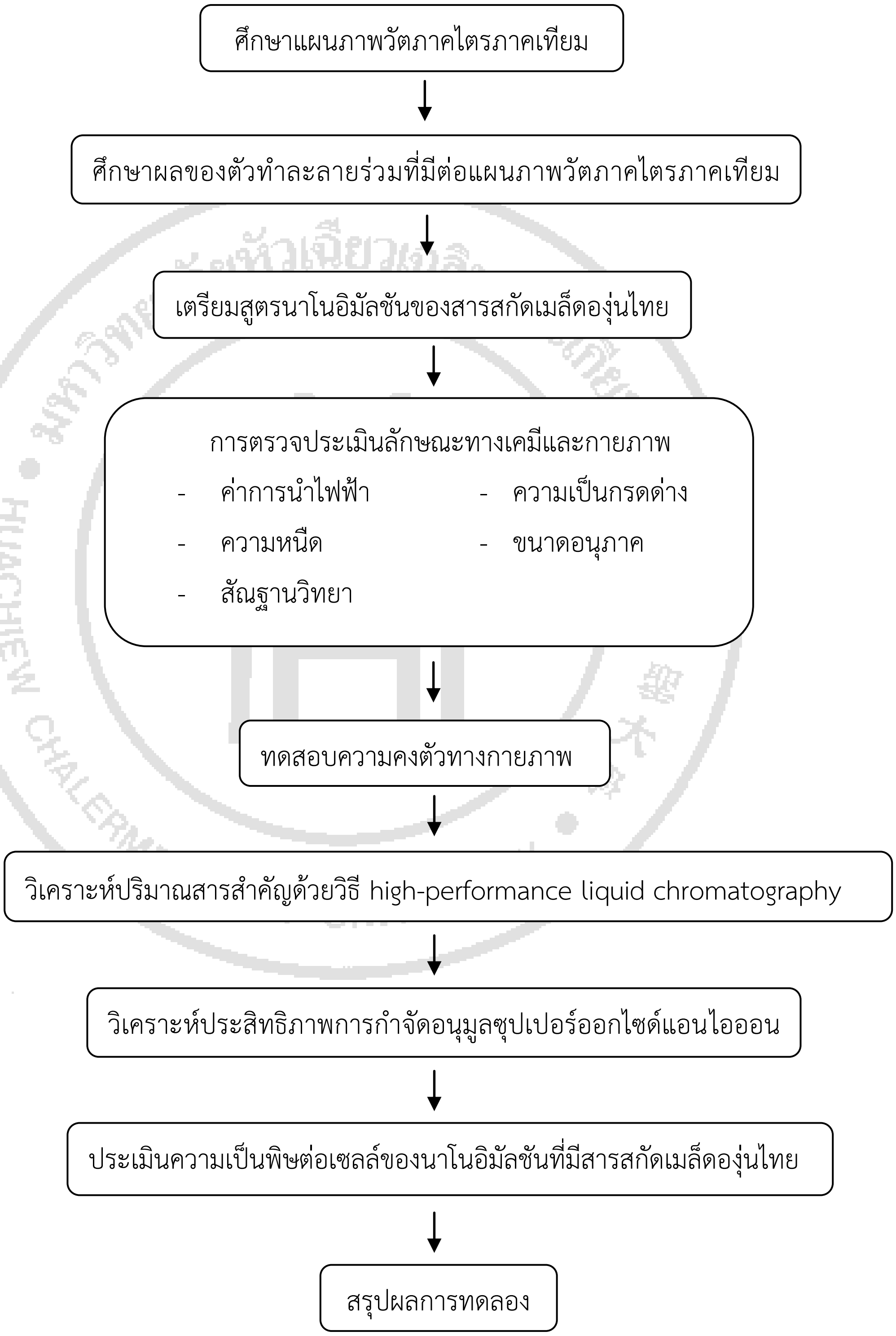
ภาพที่ 4 กลไกการเกิดผลึก formazan ภายในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ [23]



ภาพที่ 5 เซลล์ normal human dermal fibroblasts [24]



มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ • HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY • 華僑崇聖大學

2.5 กรอบแนวคิดในการศึกษา

แผนภูมิที่ 1 กรอบแนวคิดในการศึกษา