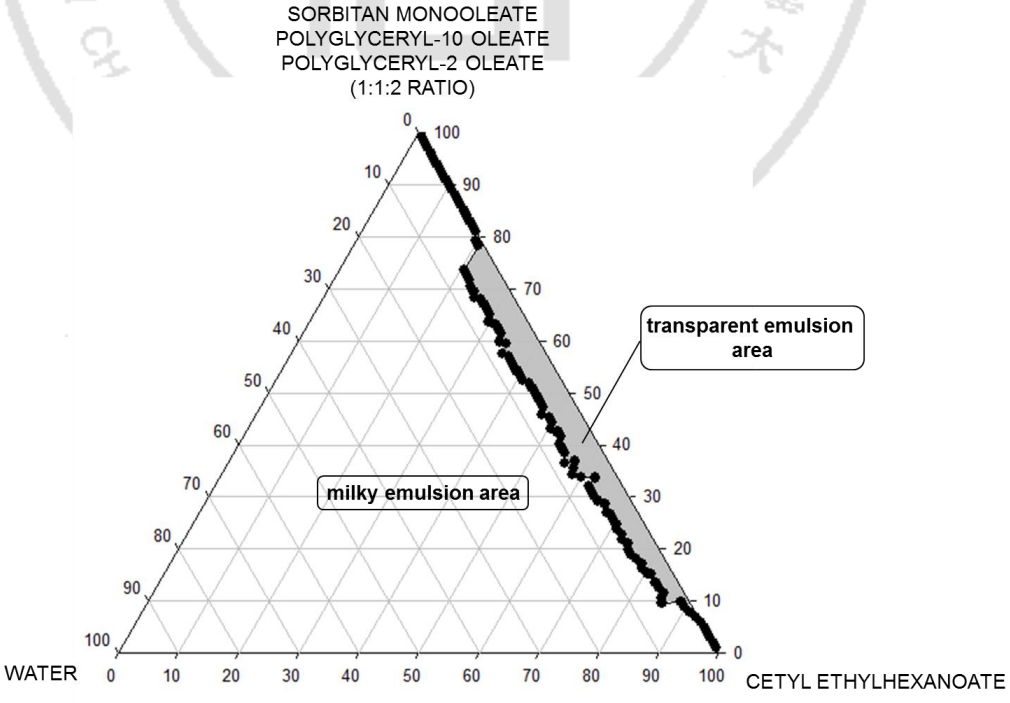
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 แผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียม

งานวิจัยนี้เริ่มต้นจากการศึกษาแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียม โดยทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาขอบเขตของระบบไมโครอิมัลชันที่จะเกิดขึ้นจากวิธีไทเทรชัน ระบบที่ศึกษาในงานวิจัยนี้เลือกใช้ cetyl ethylhexanoate เป็นวัตภาคน้ำมัน ใช้ sorbitan monooleate, polyglyceryl-10 oleate และ polyglyceryl-2 oleate ในอัตราส่วน 1:1:2 เป็นอิมัลซิฟายเออร์ผสม ซึ่งเมื่อคำนวณค่า HLB (hydrophilic-lipophilic balance) ของอิมัลซิฟายเออร์ผสมจะได้เท่ากับ 8.85 โดยประมาณ (การคำนวณแสดงใน ภาคผนวก ก.) วิธีการไทเทรชันทำโดยการไทเทรตน้ำปราศจากไอออน ซึ่งทำหน้าที่เป็นวัตภาคน้ำลงไปในของผสมระหว่างวัตภาคน้ำมันและอิมัลซิฟายเออร์ บันทึกค่าอัตราส่วนของทั้ง 3 วัตภาคที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนลักษณะของอิมัลชัน จากแมคโครอิมัลชันที่มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นเปลี่ยนเป็นไมโครอิมัลชันที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสเมื่อมองด้วยตาเปล่า แล้วจึงนำอัตราส่วนดังกล่าวไปสร้างแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียมได้ดังแสดงในภาพที่ 6 กำหนดให้เรียกเป็นระบบ A

ภาพที่ 6 ขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันที่แสดงในแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียม



จากแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียมในภาพที่ 6 แสดงขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชันในพื้นที่สีเทา พบว่าต้องใช้อิมัลซิฟายเออร์ 29.25% ถึง 73.59% โดยน้ำหนัก จึงสามารถเกิดระบบไมโครอิมัลชันที่มีน้ำเป็นวัตภาคภายในได้ 5.66% ถึง 7.40% และลักษณะของระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่แยกชั้น

จากข้อมูลขอบเขตการเกิดระบบไมโครอิมัลชันดังกล่าว ทำให้สามารถเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นสูตรไมโครอิมัลชันได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกจุดที่ประกอบด้วย cetyl ethylhexanoate 64.44% อิมัลซิฟายเออร์ผสม 31.1% และน้ำปราศจากไอออน 4.46% เพื่อใช้เป็นระบบไมโครอิมัลชันต้นแบบในการศึกษาผลของตัวทำละลายร่วมที่มีต่อแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียมในขั้นตอนต่อไป

4.2 ผลของตัวทำละลายร่วมที่มีต่อแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียม

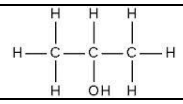
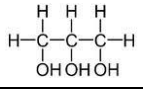
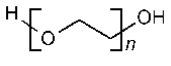
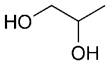
การศึกษาขั้นตอนนี้เลือกจุดที่มีส่วนประกอบเป็นวัตภาคน้ำมัน คือ cetyl ethylhexanoate 64.44% อิมัลซิฟายเออร์ผสม 31.10% และวัตภาคน้ำ คือ น้ำปราศจากไอออน 4.46% จากผลการทดลองตามข้อ 4.1 เป็นอัตราส่วนของระบบไมโครอิมัลชันตั้งต้น เพื่อนำมาศึกษาเปรียบเทียบผลในแง่ลักษณะกายภาพ เมื่อเพิ่มตัวทำละลายร่วมเข้าไปแทนที่วัตภาคน้ำในระบบ ซึ่งตัวทำละลายร่วมที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ คือ isopropyl alcohol (IPA), glycerin (GLY), polyethylene glycol 400 (PEG 400) และ propylene glycol (PG) แสดงลักษณะทางเคมีในตารางที่ 4 ตัวทำละลายร่วมเหล่านี้จะถูกผสมรวมกับน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้เป็นวัตภาคน้ำในการสร้างแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียม

การศึกษาผลของตัวทำละลายร่วมทำโดยการเพิ่มปริมาณวัตภาคน้ำเข้าไปในระบบไมโครอิมัลชันต้นแบบที่เลือกจากข้อ 4.1 กำหนดให้อิมัลซิฟายเออร์มีอัตราส่วนคงที่ แต่ปรับเพิ่มอัตราส่วนวัตภาคน้ำครั้งละ 5% เข้าไปในระบบ การเพิ่มปริมาณวัตภาคน้ำแต่ละครั้งเรียกเป็นสูตร A1, A2, A3 และ A4 ตามลำดับ ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เพื่อเปรียบเทียบความคงตัวทางกายภาพของระบบที่ใช้ตัวทำละลายร่วมต่างชนิดกัน แสดงผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่า ระบบที่ใช้ isopropyl alcohol, glycerin และ polyethylene glycol 400 เป็นตัวทำละลายร่วมผสมกับน้ำอัตราส่วน 1:1 มีลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชันในสูตร A1IPA, A1GLY และ A1PEG400 คงเดิม คือ เป็นของเหลวใสเนื้อเดียว ซึ่งทั้ง 3 สูตรดังกล่าวเป็นอัตราส่วนไมโครอิมัลชันตั้งต้น แต่เมื่อเติมตัวทำละลายร่วมผสมกับน้ำลงไปเพิ่มขึ้นอีก 5% ของระบบ คือ ที่ปริมาณ 9.45% ในสูตร A2IPA, A2GLY และ A2PEG400 ทำให้ระบบไมโครอิมัลชันเกิดความไม่คงตัวทางกายภาพ เปลี่ยนจากของเหลวใสเนื้อเดียวเป็นของเหลวขุ่นหรือแยกชั้น และพบการแยกชั้นอย่างชัดเจนเมื่อปริมาณวัตภาคน้ำเพิ่มขึ้น

เมื่อใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วมผสมกับน้ำอัตราส่วน 1:1 เติมเข้าไปในระบบไมโครอิมัลชัน พบว่า ในสูตร A4PG เป็นสูตรที่สามารถเติมวัตภาคน้ำได้ปริมาณสูงถึง 19.45% ของระบบ โดยใช้อิมัลซิฟายเออร์ผสม 31.10% และ cetyl ethylhexanoate 49.45% และเกิดเป็นระบบไมโครอิมัลชันที่มีลักษณะใส ไม่แยกชั้น ข้อมูลนี้ทำให้สามารถคาดคะเนการขยายขอบเขตบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันได้ว่า หากใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วมผสมกับวัตภาคน้ำในอัตราส่วน 1:1 จะทำให้สามารถเพิ่มปริมาณวัตภาคภายในขึ้นได้ถึงสูงถึง 19.45% โดยประมาณในสูตร ทั้งนี้ยังต้องยืนยันว่า propylene glycol ทำให้เกิดการขยายพื้นที่ของระบบไมโครอิมัลชันด้วยการสร้างเป็นแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียมอีกครั้ง

จากภาพที่ 7 เมื่อสร้างแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียมโดยใช้ propylene glycol ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 เป็นวัตภาคน้ำ (กำหนดให้เรียกเป็นระบบ B) พบว่าขอบเขตของระบบไมโครอิมัลชันมีการขยายบริเวณขึ้นจากระบบ A ที่แสดงในข้อ 4.1 สามารถเพิ่มปริมาณวัตภาคภายในได้มากขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องใช้อิมัลซิฟายเออร์ในปริมาณมากเท่าเดิม ดังนั้น propylene glycol จึงเป็นตัวทำละลายร่วมที่เหมาะสมในการทำระบบไมโครอิมัลชัน

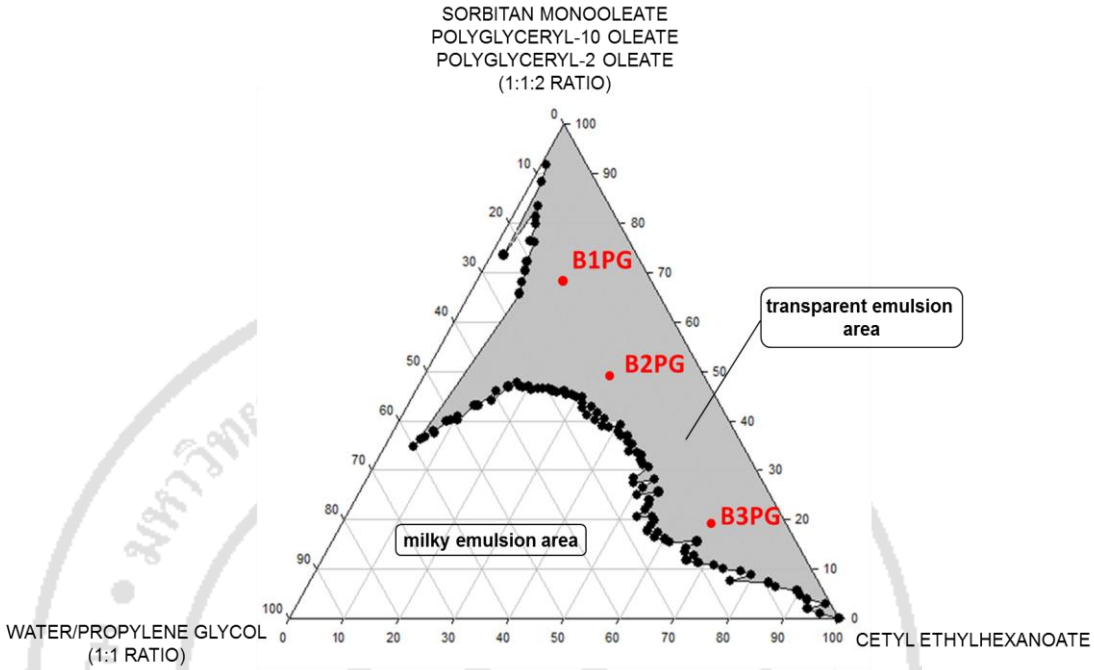
ตารางที่ 4 ลักษณะทางเคมีของตัวทำละลายร่วม [27) , (28)]

	Isopropyl alcohol	Glycerin	Polyethylene glycol 400	Propylene glycol
Molecular Formula	C_3H_8O	$C_3H_5(OH)_3$	$H(OCH_2CH_2)_nOH$	$CH_3CHOHCH_2OH$
Molegular Weight (g/mole)	60.1	92.09	380 - 420	76.1
Dielectric Constant (**ε**)	18.3	47-68	12.4	32.1
Structure				

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะกายภาพของระบบไมโครอิมัลชันเมื่อเติมตัวทำละลาย

Formulations	%Oil	%Surfactant Mixture	%Water+Cosolvent Ratio 1:1	Physical Property (ลักษณะกายภาพ)
A1IPA	64.45	31.10	4.45	อิมัลชันใสเป็นเนื้อเดียว
A2IPA	59.45	31.10	9.45	อิมัลชันส่วนบนค่อนข้างใส แยกชั้น มีตะกอนขาวขุ่น
A3IPA	54.45	31.10	14.45	อิมัลชันส่วนบนขุ่น แยกชั้น มีตะกอนขาวขุ่น
A4IPA	49.45	31.10	19.45	อิมัลชันขาวขุ่น แยกชั้น
A5IPA	44.45	31.10	24.45	อิมัลชันขาวขุ่น แยกชั้น
A1GLY	64.45	31.10	4.45	อิมัลชันใสเป็นเนื้อเดียว
A2GLY	59.45	31.10	9.45	อิมัลชันใสเป็นเนื้อเดียว
A3GLY	54.45	31.10	14.45	อิมัลชันขาวขุ่น
A4GLY	49.45	31.10	19.45	อิมัลชันขาวขุ่น
A5GLY	44.45	31.10	24.45	อิมัลชันขาวขุ่น
A1PEG400	64.45	31.10	4.45	อิมัลชันใส เป็นเนื้อเดียว
A2PEG400	59.45	31.10	9.45	อิมัลชันส่วนบนค่อนข้างใส แยกชั้น มีตะกอนขาวขุ่น
A3PEG400	54.45	31.10	14.45	อิมัลชันส่วนบนค่อนข้างใส แยกชั้น มีตะกอนขาวขุ่น
A4PEG400	49.45	31.10	19.45	อิมัลชันส่วนบนค่อนข้างขุ่น แยกชั้น มีตะกอนขาวขุ่น
A5PEG400	44.45	31.10	24.45	อิมัลชันส่วนบนขุ่น แยกชั้น มีตะกอนขาวขุ่น
A1PG	64.45	31.10	4.45	อิมัลชันใสเป็นเนื้อเดียว
A2PG	59.45	31.10	9.45	อิมัลชันใสเป็นเนื้อเดียว
A3PG	55.45	31.10	14.45	อิมัลชันใสเป็นเนื้อเดียว
A4PG	49.45	31.10	19.45	อิมัลชันใสเป็นเนื้อเดียว
A5PG	44.45	31.10	24.45	อิมัลชันขาวขุ่น

ภาพที่ 7 แผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียมเมื่อใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วมผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:1



4.3 การกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นในระบบไมโครอิมัลชันและความคงตัว

งานวิจัยนี้ต้องการเตรียมอิมัลชันที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร หรืออาจเรียกว่า “นาโนอิมัลชัน” เพื่อใช้กักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จึงเลือกเตรียมผลิตภัณฑ์โดยอาศัยเทคโนโลยีการเกิดไมโครอิมัลชัน จากข้อมูลการศึกษาจากแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียมในภาพที่ 7

จากภาพที่ 7 แสดงขอบเขตของระบบไมโครอิมัลชันที่ใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วมในระบบ ทำให้สามารถคาดคะเนอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเกิดไมโครอิมัลชันได้ อัตราส่วนที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ คือ อัตราส่วนที่จุด B1PG , B2PG และ B3PG ของแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียม ซึ่งจะใช้เป็นสูตรไมโครอิมัลชันตั้งต้น กำหนดให้เป็นสูตร B1PG 1:0, B2PG 1:0 และ B3PG 1:0 นำมาเจือจางด้วยวัตภาคภายนอก ในอัตราส่วนการเจือจางระบบไมโครอิมัลชันตั้งต้นต่อ cetyl ethylhexanoate ที่อัตราส่วน 1:0.5, 1:1 และ 1:2 จากวิธีการดังกล่าวทำให้เกิดระบบไมโครอิมัลชันจากแผนภาพวัตภาคไตรภาคเทียมทั้งสิ้น 12 สูตร คือ B1PG 1:0, B1PG 1:0.5, B1PG 1:1, B1PG 1:2, B2PG 1:0, B2PG 1:0.5, B2PG 1:1, B2PG 1:2, B3PG 1:0, B3PG 1:0.5, B3PG 1:1 และ B3PG 1:2

จากตารางที่ 5 แสดงสมบัติทางเคมีและกายภาพของระบบไมโครอิมัลชัน ผลการทดสอบพบว่าทั้ง 12 สูตรมีค่าเฉลี่ยความหนืดอยู่ในช่วง 27±0.2 ถึง 1,022±5.5 เซนติพอยส์ (centipoise; cPs) และมีสมบัติการไหล (rheological properties) เป็นแบบนิวโทเนียน (Newtonian) คือ เมื่อให้แรงในอัตราเฉือน (shear rate) ที่เพิ่มขึ้น ของเหลวจะมีค่าความเค้นเฉือน (shear stress) เพิ่มขึ้น ดังแสดงตัวอย่างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเฉือนกับค่าความเค้นเฉือนในภาคผนวก จ ระบบไมโครอิมัลชันนี้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 5.7±0.12 ถึง 6.9±0.12 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับความเป็นกรด-ด่างของผิว และมีค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) อยู่ในช่วง 0.00 ถึง 1.85±0.270 ไมโครซีเมนต์ต่อเซนติเมตร (µS/cm)

ลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของระบบไมโครอิมัลชันทั้ง 12 สูตรดังแสดงในภาพที่ 8 พบว่าระบบไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ส่วนใหญ่มีลักษณะโปร่งใส (transparent) และมีเพียงสูตร B3PG 1:2 เท่านั้นที่มีลักษณะเป็นโปร่งแสง (translucent) และเมื่อพิจารณาผลการวัดขนาดอนุภาคที่วัดด้วยเทคนิค photon correlation spectroscopy พบว่า ไมโครอิมัลชันสูตร B1PG 1:0, B2PG 1:0 และ B3PG 1:0 มีค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคเท่ากับ 0.5±0.1, 4±0.1 และ 5.0±0.0 นาโนเมตรตามลำดับ และเมื่อเจือจางไมโครอิมัลชันด้วยวัตภาคภายนอก จะทำให้ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคมีแนวโน้มใหญ่ขึ้นตามอัตราส่วนการเจือจางที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าในช่วงตั้งแต่ 2.0±0.5 ถึง 72.0±1.3 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 7

ระบบไมโครอิมัลชันทั้ง 12 สูตรที่เตรียมได้จะถูกประเมินลักษณะทางกายภาพและเคมีเบื้องต้นเป็นระยะเวลา 90 วัน เพื่อหาสูตรที่มีความคงตัวทางกายภาพดีแล้วจึงนำไปใช้ในการกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อไป

ภาพที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของระบบไมโครอิมัลชัน

ตารางที่ 6 ผลการประเมินสมบัติทางเคมีและกายภาพของระบบไมโครอิมัลชัน (n=3)

Formulations		Viscosity (cPs)	Rheological Behavior	pH	Conductivity (µs/cm)	Mean Droplet Size (nm)
B1PG	**1:0**	1,022 ± 5.5	Newtonian	5.7± 0.12	0.08±0.070	0.5 ± 0.1
	1:0.5	173 ± 1.1	Newtonian	6.1± 0.09	0.02±0.027	7.4 ± 0.9
	1:1	65 ± 1.7	Newtonian	5.9±0.07	0.06±0.040	2.2 ± 0.5
	1:2	31 ± 0.6	Newtonian	6.1±0.16	0±0.006	3.9 ± 0.4
B2PG	**1:0**	314 ± 0.9	Newtonian	5.9±0.13	0	3.6 ± 0.1
	1:0.5	78 ± 0.3	Newtonian	5.9±0.28	0.12±0.026	6.3 ± 0.6
	1:1	46 ± 0.3	Newtonian	6.0±0.12	0.12±0.030	4.4 ± 0.5
	1:2	27 ± 0.3	Newtonian	6.9±0.12	0.07±0.026	9.3 ± 0.1
B3PG	**1:0**	76 ± 0.5	Newtonian	6.0±0.40	0.01±0.006	5.2 ± 0
	1:0.5	54 ± 0.2	Newtonian	6.4±0.30	0.06±0.040	15.9 ± 0.8
	1:1	47 ± 0.3	Newtonian	5.9±0.08	0.47±0.029	34.6 ± 0.5
	1:2	27 ± 0.2	Newtonian	6.1±0.19	1.85±0.270	71.8 ± 1.3

หมายเหตุ : cPs หมายถึง centipoise
µs/cm หมายถึง microsiemens per centimeter
nm หมายถึง nanometer

ในเบื้องต้นได้ทำการประเมินความคงตัวของระบบไมโครอิมัลชันทั้ง 12 สูตรโดยเก็บตัวอย่างที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ (45±1°C/70±5 %RH และ 5±1°C/45±5 %RH) เป็นเวลา 90 วัน ผลการศึกษาพบว่ามีสูตรที่มีความคงตัวดีจำนวน 6 สูตร คือ B1PG 1:0, B1PG 1:2, B2PG 1:1, B2PG 1:1, B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 โดยทั้ง 6 สูตรดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคในวันที่ 90 แตกต่างจากวันแรกเพียงเล็กน้อย ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 7 ซึ่งไมโครอิมัลชันทั้ง 6 สูตรนี้จะถูกคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum)

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของระบบไมโครอิมัลชันเมื่อเก็บที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิที่ระยะเวลา 90 วัน (n=3, ค่าเฉลี่ย ± S.D.)

Formulations		Mean Droplet Size (nm)			
		Initial	30 Days	60 Days	90 Days
B1PG	1:0	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.2
	1:0.5	7.4 ± 0.9	Unstable*		
	1:1	2.2 ± 0.5	Unstable*		
	1:2	3.9 ± 0.4	4.9 ± 0.2	4.6 ± 0.3	6.0 ± 0.8
B2PG	1:0	3.6 ± 0.1	3.0 ± 0.2	5.7 ± 0.7	Unstable*
	1:0.5	6.3 ± 0.6	5.0 ± 0.1	9.6 ± 3.7	Unstable*
	1:1	4.4 ± 0.5	7.0 ± 0.5	4.4 ± 1.7	4.6 ± 0.1
	1:2	9.3 ± 0.1	10.0 ±1.5	6.0 ± 1.7	5.3 ± 1.0
B3PG	1:0	5.2 ± 0	8.9 ± 0.2	7.8 ± 0.3	5.4 ± 0.2
	1:0.5	15.9 ± 0.8	10.9 ± 0.2	10.9 ± 0.2	8.1 ± 0.2
	1:1	34.6 ± 0.5	Unstable*		
	1:2	71.8 ± 1.3	Unstable*		

หมายเหตุ: nm หมายถึง nanometer

unstable* หมายถึง เกิดความไม่คงตัวทางกายภาพจากกลไก Ostwald ripening

การกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นในระบบอิมัลชันสำหรับงานวิจัยครั้งนี้ จะใช้สารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดจากองุ่นพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) ความเข้มข้น 1% ในสูตรเป็นความเข้มข้นต้นแบบในการศึกษาความเหมาะสมของระบบทั้งทางกายภาพและทางเคมี พิจารณาจากปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ความคงตัวทางกายภาพ ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และความคงตัวทางเคมีของสารพฤกษเคมี (สารสำคัญ) ในสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย โดยสารสกัดจะถูกละลายอยู่ในวัตภาคภายในของระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ส่วนประกอบในสูตรดังแสดงในตารางที่ 8

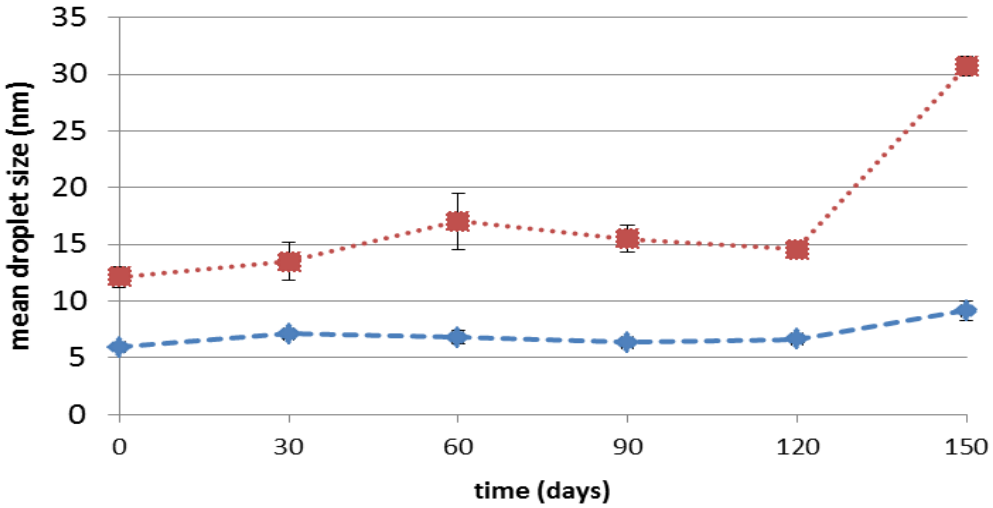
ตารางที่ 8 ส่วนประกอบในระบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย

ส่วนประกอบ	อัตราส่วน
สารสกัดเมล็ดองุ่นไทย *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum)	1%
cetyl ethylhexanoate	60-70% *
sorbitan monooleate/polyglyceryl-10 oleate/ polyglyceryl-2 oleate	10-20% *
propylene glycol	10-20% *
deionized water	10-20% *

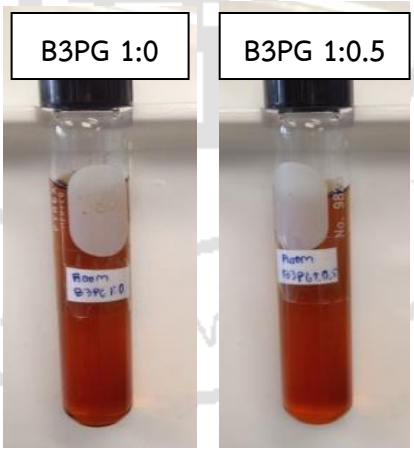
หมายเหตุ: * หมายถึง อัตราส่วนโดยประมาณ

เมื่อพิจารณาเรื่องคงตัวทางกายภาพและขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันสูตร B1PG 1:0, B1PG 1:2, B2PG 1:1, B2PG 1:2, B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตร พบว่า เมื่อสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยถูกกักเก็บในวัตภาคภายในของไมโครอิมัลชันมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นในสูตร B1PG 1:0, B1PG 1:2, B2PG 1:1 และ B2PG 1:2 ซึ่งแตกต่างจากสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่ไม่มีความแตกต่างของขนาดอนุภาคเมื่อเทียบกับขณะที่ยังไม่กักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย และเมื่อเก็บไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นระยะเวลา 150 วัน หรือประมาณ 10 รอบของการสลับอุณหภูมิ พบว่าสูตร B1PG 1:0, B1PG 1:2 และ B2PG 1:1 มีความคงตัวทางกายภาพที่ระยะเวลาน้อยกว่า 30 วัน และสูตร B2PG 1:2 มีขนาดอนุภาคเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจากวันแรกของการเตรียมไมโครอิมัลชันอย่างชัดเจน มีความคงตัวทางกายภาพที่ระยะเวลาไม่เกิน 120 วัน จึงพบว่าสูตรที่มีความคงตัวทางกายภาพดีที่สุด คือ B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ซึ่งมีความคงตัวทางกายภาพ คือ ไม่เกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอน ที่ระยะเวลามากกว่า 150 วัน ในสภาวะการทดสอบแบบสลับอุณหภูมิ

ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 (--●--) และ B3PG 1:0.5 (··■··) เมื่อเก็บที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นเวลา 150 วัน (n=3, ค่าเฉลี่ย±S.D.)



ภาพที่ 10 ระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตร



เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 เปรียบเทียบตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 150 แสดงผลเป็นกราฟในภาพที่ 9 พบว่าในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสูตร B3PG 1:0.5 โดยมีค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคในวันที่ 150 ของการเก็บในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิอยู่ที่ 9±0.8 และ 31±0.9 นาโนเมตร ตามลำดับ

จากข้อมูลความคงตัวทางกายภาพข้างต้น ทำให้ทราบว่าระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 เป็นสูตรที่มีความคงตัวทางกายภาพดีที่สุดเมื่อใช้ในการกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ลักษณะของระบบไมโครอิมัลชันดังกล่าวแสดงในภาพที่ 10 นอกจากข้อมูลข้างต้นแล้ว ยังต้องพิจารณาถึงการกระจายขนาดอนุภาค โดยแสดงเป็นค่าดัชนีการกระจายตัว (polydispersity index; PDI) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 พบว่า ระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 มีค่าดัชนีการกระจายขนาดอนุภาคเท่ากับ 0.295 ± 0.0290 และ 0.347 ± 0.0226 ตามลำดับ โดยค่าการกระจายขนาดอนุภาคในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 แสดงค่า D10, D50 และ D90 เท่ากับ 3.1±0.25, 7.9±0.15 และ 20.6±3.68 นาโนเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สูตร B3PG 1:0.5 แสดงค่า D10, D50 และ D90 เท่ากับ 7.1±1.79, 18.5±0.75 และ 53.7±20.92 นาโนเมตร ตามลำดับ และพบว่าเมื่อเก็บทั้งสองสูตรที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นระยะเวลา 150 วัน ค่าดัชนีการกระจายขนาดอนุภาคไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังแสดงในภาพที่ 11

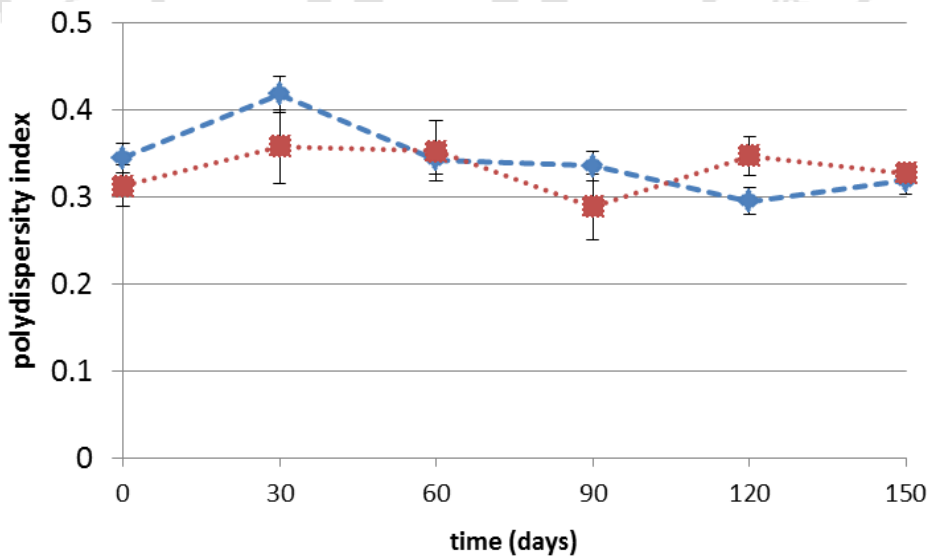
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากทำให้ทราบถึงรูปร่างและลักษณะของวัตภาคภายในของระบบ ในงานวิจัยนี้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน TECNAI^{TM} 20 TWIN transmission electron microscope (TEM) ในการถ่ายภาพระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 ที่กักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยอยู่ในวัตภาคภายใน โดยทั้งสองสูตรถูกย้อมสีด้วย uranyl acetate แล้วนำไปส่องภายใต้กล้อง TEM โดยให้ศักย์ไฟฟ้าที่ 120 kV ปรากฏภาพลักษณะของระบบไมโครอิมัลชันทั้ง 2 สูตรแสดงในภาพที่ 12 พบว่า มีลักษณะเป็นทรงกลมของวัตภาคภายในที่กระจายตัวอยู่ในวัตภาคภายนอก จากภาพถ่าย TEM สามารถคาดคะเนขนาดของระบบไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยได้ว่ามีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค photon correlation spectroscopy

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค และค่าการกระจายขนาดอนุภาคของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5

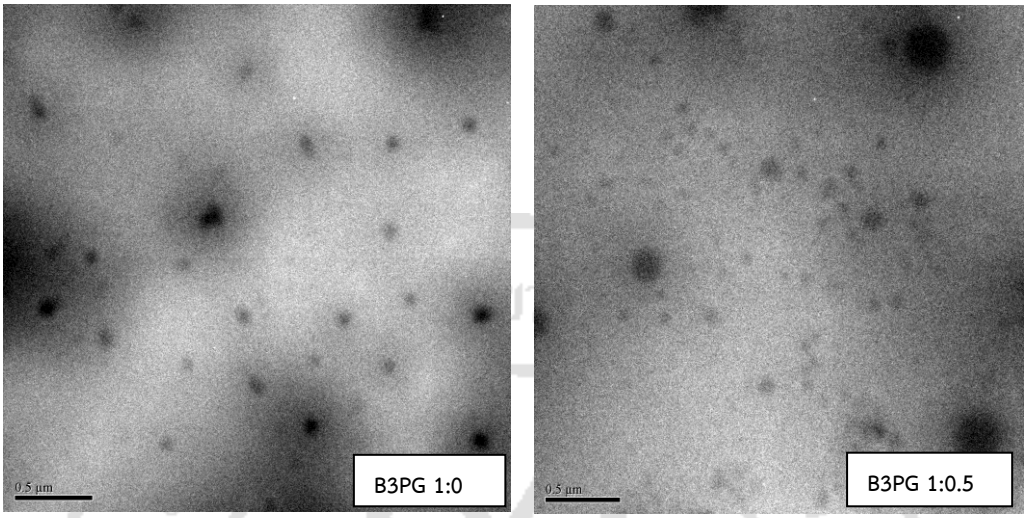
Parameters	Formulations	
	B3PG 1:0	**B3PG 1:0.5**
Mean droplet size (nm)	6.6 ± 0.32	14.6 ± 0.46
PDI	0.295 ± 0.0290	0.347 ± 0.0226
D10	3.1 ± 0.25	7.1± 1.79
D50	7.9 ± 0.15	18.5 ± 0.75
D90	20.6 ± 3.68	53.7 ± 20.92

หมายเหตุ: nm หมายถึง nanometer
PDI หมายถึง polydispersity index
D10 หมายถึง particle size for cumulative 10% finer (nm)
D50 หมายถึง median particle size (nm)
D90 หมายถึง particle size for cumulative 90% finer (nm)

ภาพที่ 11 ค่าดัชนีการกระจายขนาดอนุภาคของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 (—●—) และ B3PG 1:0.5 (··■··) เมื่อเก็บที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นเวลา150 วัน (n=3, ค่าเฉลี่ย ± S.D.)



ภาพที่ 12 ภาพถ่าย TEM ของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย 1% ในสูตร



4.4 ประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน

ระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตร ถูกนำมาประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด $O_2^{\bullet-}$ ด้วยเทคนิค photochemiluminescence ในการทดสอบจะทำการเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ของระบบไมโครอิมัลชันทั้ง 2 สูตรกับกรดแอสคอร์บิกและ Trolox® ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในชุดตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ละลายในน้ำ (ACW reagent kit) และละลายในไขมัน (ACL reagent kit) ตามลำดับ

จากตารางที่ 10 พบว่า เมื่อตรวจวัดด้วย ACW reagent kit ตัวอย่างไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตรปริมาณ 10 ไมโครกรัมสามารถกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ได้เทียบเท่ากับความสามารถของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 1.719±0.0923 และ 1.628±0.1309 นาโนโมล ตามลำดับ และเมื่อตรวจวัดด้วย ACL reagent kit มีฤทธิ์เทียบเท่ากับ Trolox® ที่ความเข้มข้น 1.474±0.0066 และ 1.482±0.0311 นาโนโมล จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า ระบบไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย 1% ในสูตรแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งในชุดตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ละลายในน้ำและละลายในไขมัน

เมื่อนำสารองค์ประกอบอื่นในสูตร คือ สารสกัดเมล็ดองุ่นไทย, sorbitan monooleate, polyglyceryl-10 oleate, polyglyceryl-2 oleate, cetyl ethylhexanoate และ propylene glycol มาทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ พบว่า สารที่แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ สูงที่สุดใน ACW system คือ สารสกัดเมล็ดองุ่นไทย โดยมีความสามารถกำจัด

อนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ได้สูงที่สุด เทียบเท่ากรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 420±19.2 นาโนโมล และ sorbitan monooleate และ polyglyceryl-10 oleate สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้เล็กน้อยเทียบเท่ากรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.254±0.0459 และ 0.241±0.0260 นาโนโมล ตามลำดับ ในขณะที่ polyglyceryl-2 oleate, cetyl ethylhexanoate และ propylene glycol ไม่สามารถกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ได้ เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความสามารถการกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ใน ACL system พบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย, sorbitan monooleate, polyglyceryl-10 oleate, polyglyceryl-2 oleate สามารถกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Trolox® ที่ความเข้มข้น 1.958±0.0389, 0.871±0.2314, 0.628±0.0276 และ 0.259±0.0402 นาโนโมล ตามลำดับ ขณะที่อิมัลซิฟายเออร์ polyglyceryl-2 oleate สามารถกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ได้เฉพาะใน ACL system คือ มีฤทธิ์เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Trolox® ที่ความเข้มข้น 0.259±0.0402 นาโนโมล สำหรับวัตภาคน้ำมัน คือ cetyl ethylhexanoate และตัวทำละลายร่วม คือ propylene glycol ไม่สามารถกำจัดอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ได้เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ตารางที่ 10 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (n=2, ค่าเฉลี่ย ± S.D.)

Sample	Antioxidant Capacity (nmol/10 µg of Sample)	
	Ascorbic Acid Eqv. (nmol)	Trolox® Eqv. (nmol)
B3PG 1:0 (1% grape seed extract)	1.719 ± 0.0923	1.474 ± 0.0066
B3PG 1:0.5 (1% grape seed extract)	1.628 ± 0.1309	1.482 ± 0.0311
Grape seed extract	420 ± 19.2	1.958 ± 0.0389
Sorbitan monooleate	0.254 ± 0.0459	0.871 ± 0.2314
Polyglyceryl-10 oleate	0.241 ± 0.0260	0.628 ± 0.0276
Polyglyceryl-2 oleate	N/A	0.259 ± 0.0402
Cetyl ethylhexanoate	N/A	N/A
Propylene glycol	N/A	N/A

หมายเหตุ: nmol หมายถึง nanomole

µg หมายถึง microgram

Eqv. หมายถึง equivalent

N/A หมายถึง ไม่สามารถกำจัดอนุมูลได้ที่ความเข้มข้น 30 microgram per millilitre

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ (OPCs) ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC)

ในงานวิจัยนี้ทำการตรวจวัดปริมาณสาร oligomeric proanthocyanidins ซึ่งเป็นสารที่พบมากในสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย จึงใช้เป็นตัวชี้วัดความคงตัวและควบคุมคุณภาพของสารพฤกษเคมีในเมล็ดองุ่นไทยเมื่อถูกกักเก็บในระบบไมโครอิมัลชัน แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นเวลา 150 วัน โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography ตามวิธีของ Suwanagul et al.[26] ในการวิเคราะห์ใช้คอลัมน์ reverse phase ชนิด C18 เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.3% phosphoric acid ในน้ำ และ acetonitrile ดังแสดงในตารางที่ 3 อัตราการเคลื่อนที่ 0.7 มิลลิลิตรตอนาที ปริมาตรที่ฉีดตัวอย่างวิเคราะห์ครั้งละ 20 ไมโครลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย 966 diode array detector ที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร แล้วเทียบปริมาณสาร OPCs กับกราฟมาตรฐานของสาร OPCs ที่วิเคราะห์จาก Gravinol SL® ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานในวิจัยนี้

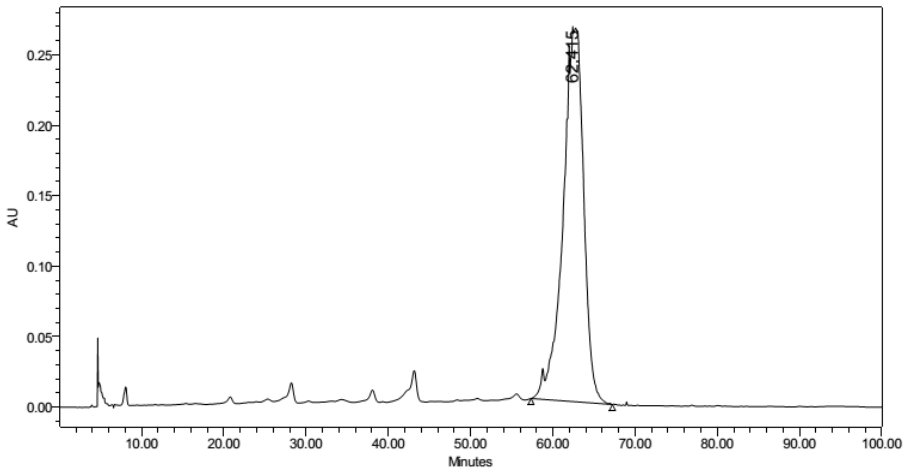
4.5.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ตัวแปรที่ใช้ทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ คือ ความจำเพาะเจาะจง (selectivity), ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity), ความแม่นยำ (precision) และความเที่ยงตรง (accuracy)

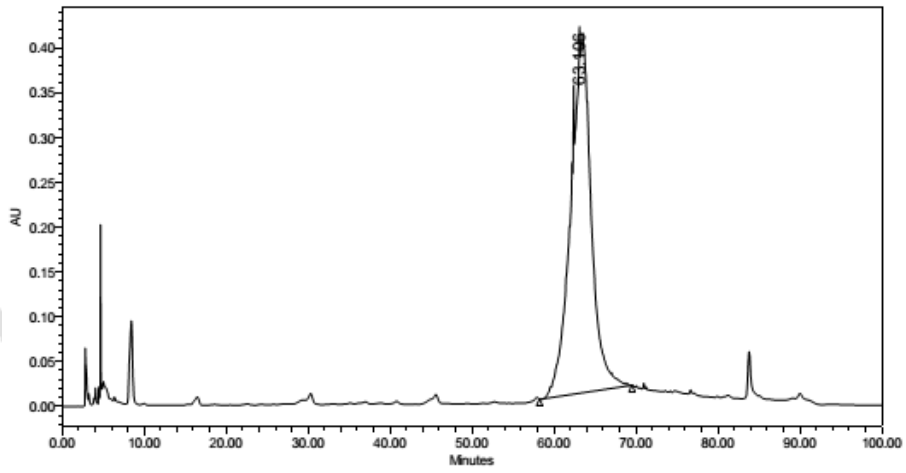
1) ความจำเพาะเจาะจง

ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ทำเพื่อทดสอบว่าสารองค์ประกอบอื่นที่มีในระบบไม่มีผลรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณสาร OPCs ที่อยู่ในระบบไมโครอิมัลชัน ทำโดยการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมระหว่างสาร Gravinol SL® (ภาพที่ 13) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน OPCs ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ สารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในเอทานอล (ภาพที่ 14) ระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตร (ภาพที่ 15 และภาพที่ 16) ระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่ไม่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย (ภาพที่ 17 และภาพที่ 18) และ 95% เอทานอล (ภาพที่ 19) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ พบว่า Gravinol SL® แสดงพีค (peak) ของ OPCs ที่เวลาประมาณ 63 นาที ตรงกับพีคที่ปรากฏในโครมาโทแกรมของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตร ขณะที่โครมาโทแกรมของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่ไม่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยและ 95% เอทานอล ไม่ปรากฏพีคที่สามารถคำนวณพื้นที่ใต้พีค (area under the curve) จากโครมาโทแกรมดังกล่าวได้

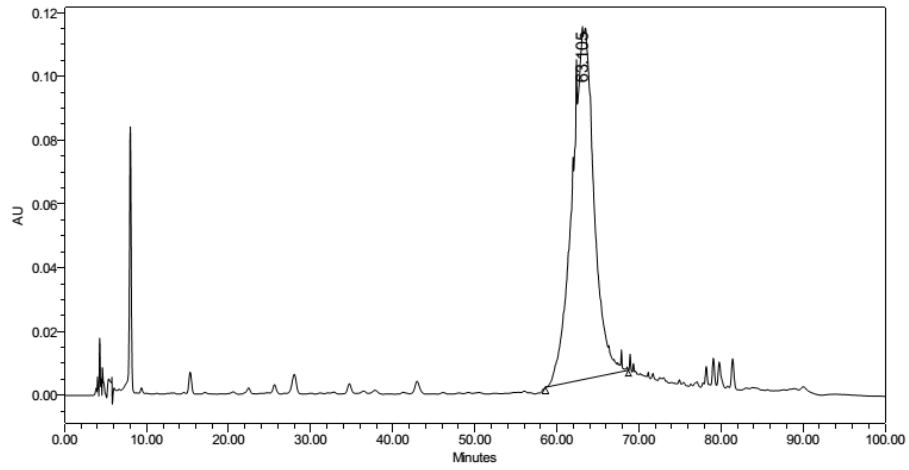
ภาพที่ 13 โครมาโทแกรมของ Gravinol SL® เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



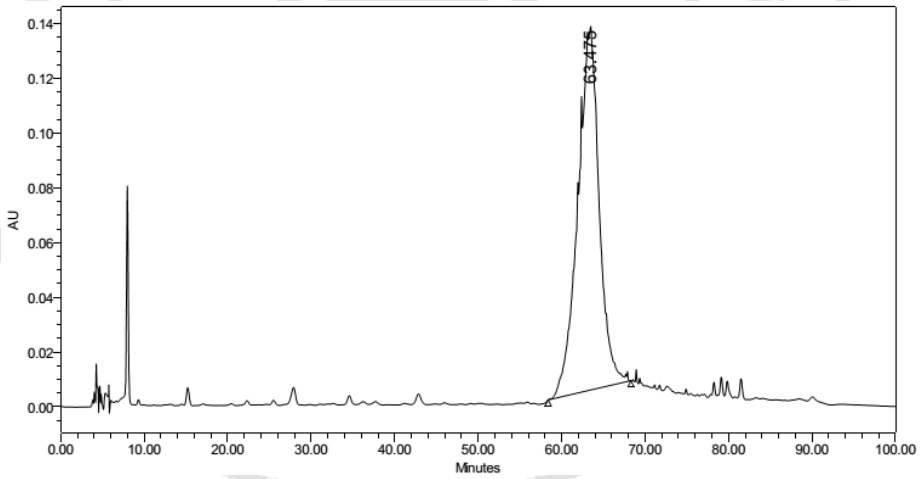
ภาพที่ 14 โครมาโทแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้นข้น 1% ในเอทานอลเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



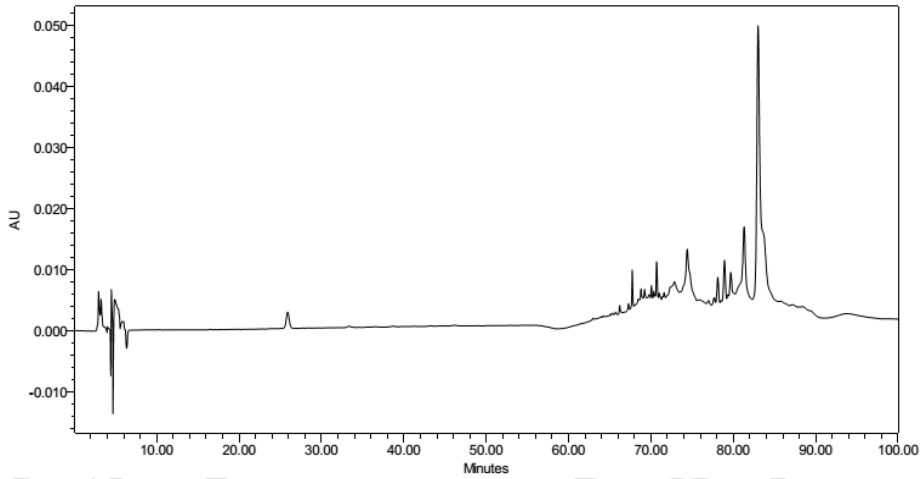
ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



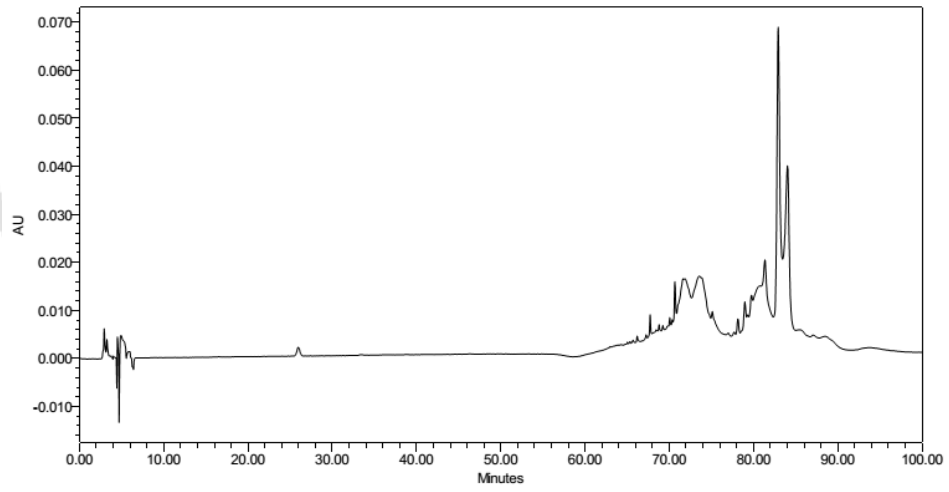
ภาพที่ 16 โครมาโทแกรมของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



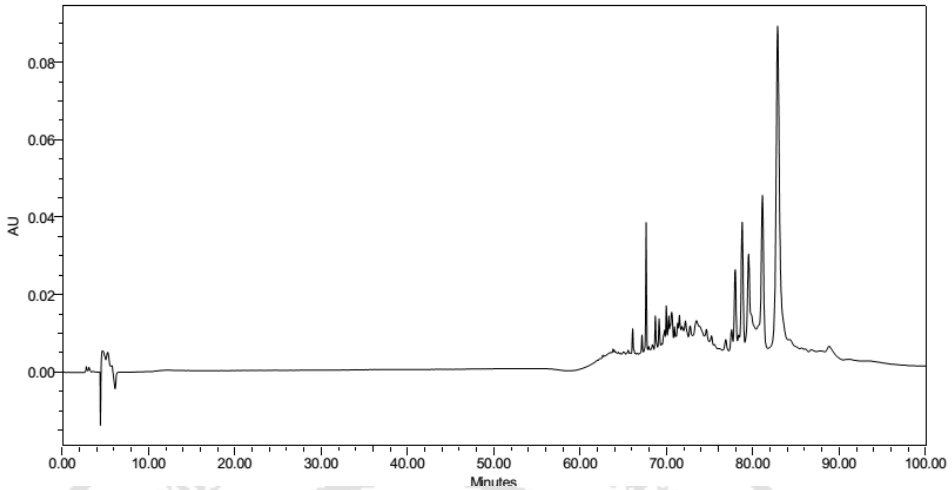
ภาพที่ 17 โครมาโทแกรมของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 ที่ไม่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



ภาพที่ 18 โครมาโทแกรมของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0.5 ที่ไม่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



ภาพที่ 19 โครมาโทแกรมของ 95% เอทานอลเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



2) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

ทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Gravinol SL® จำนวนทั้งสิ้น 5 ความเข้มข่น คือ 81, 405, 810, 2,025 และ 4,050 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำคาที่ได่มาเขียนกราฟระหว่างความเข่มข่นสารมาตรฐานในหนวยมิลลิกรัมตอลิตรกับพื้นที่ใต้กราฟ เมื่อคำนวณผลแล้วได้สมการเส้นตรง คือ y = 24043x – 2000000 และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9998 ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลวิเคราะห์ปริมาณ OPCs ในสารมาตรฐาน Gravinol SL®

Concentration (µg/mL)	Area Under the Curve					
	1st Day	2nd Day	3rd Day	Average	S.D.	% RSD
81	616368	605332	621259	614319	8159	1.33
405	7806779	7792083	7695066	7764642	60701	0.78
810	17638915	17738915	18127086	17834972	257872	1.45
2,025	45506538	46612436	46579320	46059487	781988	1.36
4,050	95055940	96570312	96292805	95973019	806243	0.84
R^2	**0.9998**	**0.9999**	**0.9999**	**0.9998**		

หมายเหตุ: µg/mL หมายถึง ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3) ความแม่นยำ

ความแมนยำของวิเคราะห์ทราบได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำหลายครั้ง ความแตกตางของผลการวิเคราะหที่ได่จากการวิเคราะหซ้ำแสดงเปน % RSD ซึ่งจะยอมรับความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมื่อ % RSD มีค่าน้อยกว่า 2 ในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์ใน 2 ลักษณะ คือ การศึกษาความแม่นยำในวันเดียวกัน (repeatability) และการศึกษาความแม่นยำต่างวัน (reproducibility)

ตารางที่ 12 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำในวันเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ทั้งสิ้น 10 ครั้ง ผลการคำนวณได้ % RSD เท่ากับ 1.87 และ 1.19 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ ดังนั้น วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่มีความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง

สำหรับการวิเคราะห์ความแม่นยำต่างวัน อาศัยผลวิเคราะห์สาร Gravinol SL® ที่ 5 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยทำการวิเคราะห์ต่างวันเป็นเวลา 3 วัน คำนวณค่า % RSD ได้เท่ากับ 1.33, 0.78, 1.45, 1.36 และ 0.84 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้

4) ความเที่ยงตรง

ทำการทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงในสารละลายไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ได่ผลการทดลองดังตารางที่ 13 แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไป ได้ค่า %recovery อยู่ในช่วงตั้งแต่ 88.59±0.528 % ถึง 94.76±0.677 % ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของงานวิจัยนี้

ตารางที่ 12 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่างในวันเดียวกัน

Injection	B3PG 1:0		B3PG 1:0.5	
	Area Under the Curve	Concentration Founded (µg/mL)	Area Under the Curve	Concentration Founded (µg/mL)
1	20325075	762	23517278	895
2	20251722	759	24013304	916
3	20427859	766	23836831	908
4	20711483	778	23503018	894
5	20231937	758	23732782	904
6	20483348	769	23339533	888
7	20197337	757	24113809	920
8	20585046	773	24008633	915
9	20188522	756	23921059	912
10	19447161	726	23916768	912
ค่าเฉลี่ย	20284949	761	23790302	906
S.D.	342565.8	14.3	258390.0	10.8
% RSD	1.69	1.87	1.09	1.19

หมายเหตุ: µg/mL หมายถึง microgram per millilitre

% RSD หมายถึง % relative standard deviation

ตารางที่ 13 แสดงค่า % recovery ในการทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

Formulations	Concentration Added (ug/mL)	Concentration Founded (ug/mL)	% Recovery	% RSD
B3PG 1:0	Unspike	315.73 ± 4.451	-	-
	1,012.5	959.44 ± 6.855	94.76 ± 0.677	0.71
	2,025	1793.92 ± 10.855	88.59 ± 0.528	0.60
B3PG 1:0.5	Unspike	338.01 ± 7.194	-	-
	1,012.5	956.84 ± 11.095	94.50 ± 1.096	1.16
	2,025	1,821.12 ± 8.171	89.93 ± 0.404	0.45

หมายเหตุ: µg/mL หมายถึง microgram per millilitre

% RSD หมายถึง % relative standard deviation

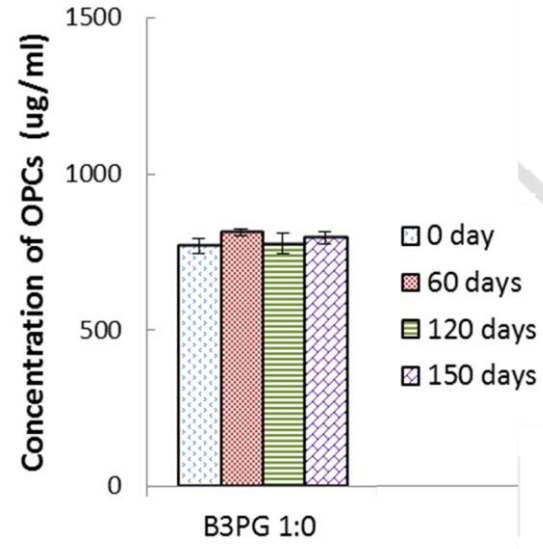
4.5.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ OPCs

การวิเคราะหเชิงเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณ OPCs ในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่เตรียมขึ้น เมื่อเก็บในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ (45±1°C/70±5%RH และ 5±1°C/45±5%RH) ที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC ในวันแรกของการเตรียมไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตร (0 day) เปรียบเทียบกับเมื่อระยะเวลาผ่านไป 60, 120 และ 150 วัน โดยใช OPCs เป็น marker ในการวิเคราะห์ ตามวิธีที่อธิบายโดย Suwanakul et al. [26] ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามข้อมูลที่แสดงข้างต้นแล้ว เมื่อนำผลวิเคราะห์ที่ได้ไปสร้างกราฟเปรียบเทียบปริมาณ OPCs ที่เวลาต่าง ๆ พบว่า ที่วันแรกของการเตรียมไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 มีปริมาณ OPCs เท่ากับ 770±8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง เมื่อเวลาผ่านไปครบ 150 วัน พบว่าปริมาณ OPCs ในสูตร B3PG 1:0 วิเคราะห์ได้เท่ากับ 797±19.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ซึ่งปริมาณ OPCs ที่วิเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงอยางไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับวันแรกของการเตรียมระบบไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยสูตร B3PG 1:0 ดังแสดงในภาพที่ 20 และเมื่อคำนวณหา %recovery ของปริมาณ OPCs ในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 พบว่า มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 68.4% ถึง 71.2% ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

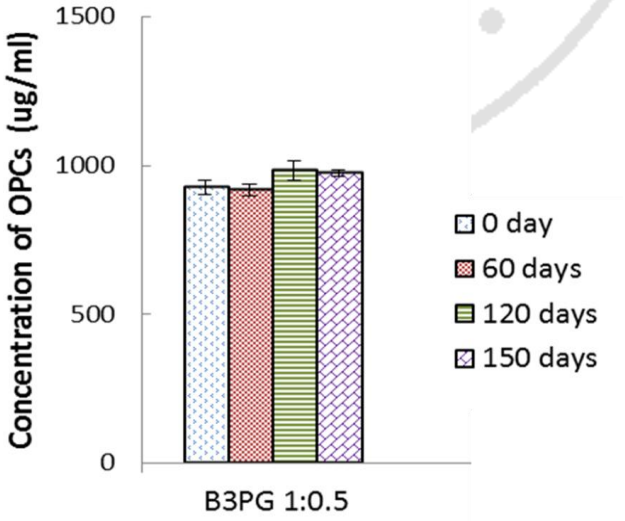
ภาพที่ 21 แสดงปริมาณ OPCs ในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0.5 ที่วันแรกของการเตรียมสูตร พบว่ามีปริมาณ OPCs เท่ากับ 928±51.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง เมื่อครบระยะเวลา 150 วัน มีปริมาณ OPCs ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 976±10.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงอยางไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เช่นเดียวกับสูตร B3PG 1:0

คำนวณ %recovery ของปริมาณ OPCs ในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG1:0.5 มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 78.7% ถึง 83.2% ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

ภาพที่ 20 ปริมาณ OPCs ในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 เมื่อเก็บที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นระยะเวลา 150 วัน (n=3, ค่าเฉลี่ย±S.D.)



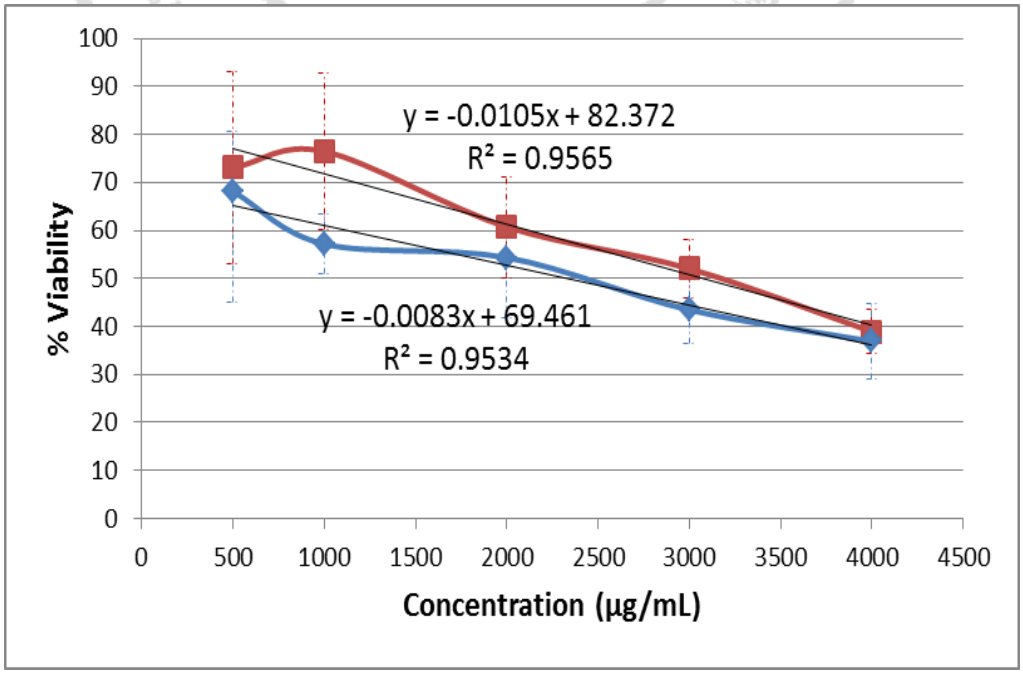
ภาพที่ 21 ปริมาณ OPCs ในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0.5 เมื่อเก็บที่สภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นระยะเวลา 150 วัน (n=3, ค่าเฉลี่ย±S.D.)



4.6 ผลการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการทดสอบความเป็นพิษของระบบไมโครอิมัลชันที่มีต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ที่ได้จากผิวหนังมนุษย์ (normal human dermal fibroblast; NHDF) ซึ่งได้รับการพัฒนาจากผิวหนังของผู้ป่วยโรคเนื้องอกในสมอง โดยใช้วิธี MTT assay ตามที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.8 กำหนดให้มีเซลล์ควบคุม (control) คือ เซลล์ที่ปราศจากสารทดสอบ และเซลล์ทดสอบ (treated cells) คือ เซลล์ที่เลี้ยงในสารละลายไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย (B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5) ที่ความเข้มข้น 4,000 , 3,000 , 2,000 , 1,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อคำนวณค่าการดูดกลืนแสงยูวีของเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ได้รับสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรตามสมการที่ 2 จะได้ค่า % cell viability ซึ่งหมายถึง อัตราการมีชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งแสดงผลเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของระบบไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่น (แกน X) กับ % viability (แกน Y) ดังแสดงในภาพที่ 22 พบว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์ในการทดสอบลดลงสัมพันธ์กับความเข้มข้นของระบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่ได้รับเพิ่มขึ้น ที่ค่า R^2 เท่ากับ 0.9565 และ 0.9534 ตามลำดับ

ภาพที่ 22 ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบกับระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 (—●—) และ B3PG 1:0.5(—■—) (n=2, ค่าเฉลี่ย±S.D.)



จากกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของระบบไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตรที่ทำให้เซลล์ตายลงครึ่งหนึ่งจากจำนวนเซลล์ทั้งหมด หรือ ค่า IC_{50} ได้ดังแสดงในตารางที่ 14 ระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย 1% ในสูตร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3,083 และ 2,344 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 14 ค่า IC_{50} ของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยในระบบไมโครอิมัลชันเมื่อทดสอบกับเซลล์ NHDF เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Formulations	IC_{50} (µg/mL)
B3PG 1:0	3,083
B3PG 1:0.5	2,344

หมายเหตุ : IC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50%
µg/mL หมายถึง microgram per millilitre