

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยสายพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) อุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง เหมาะอย่างยิ่งที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาอิมัลชันที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนหรือนาโนอิมัลชันที่เหมาะสมในการกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยโดยประยุกต์ใช้เทคโนโลยีไมโครอิมัลชันมาใช้ในการพัฒนาสูตร งานวิจัยเริ่มต้นจากการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมของระบบไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย cetyl ethylhexanoate เป็นวัฏภาคน้ำมัน น้ำปราศจากไอออนเป็นวัฏภาคน้ำ อิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้ในระบบ คือ sorbitan monooleate, polyglyceryl-10 oleate และ polyglyceryl-2 oleate อัตราส่วน 1:1:2 และใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วมในระบบ พบว่า ระบบดังกล่าวมีความเหมาะสมในการเกิดอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรได้ และ propylene glycol ยังช่วยเพิ่มขอบเขตของระบบไมโครอิมัลชันในแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมให้กว้างขึ้นและลดปริมาณอิมัลซิไฟเออร์ในระบบได้ จากการศึกษาทำให้ได้ระบบไมโครอิมัลชันสูตรที่มีความคงตัวทางกายภาพดี คือ สูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 ซึ่งเป็นระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) ที่นำมาใช้กักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต้นแบบที่ใช้ในงานวิจัยนี้

จากผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพในระบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยสูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 มีความหนืดต่ำและความเป็นกรด-ด่างของสูตรใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์ เมื่อวัดขนาดอนุภาคได้ค่าเท่ากับ 6.6 ± 0.32 และ 14.6 ± 0.46 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0.5 มีขนาดอนุภาคเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเก็บในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ ($45 \pm 1^\circ\text{C}/70 \pm 5\%RH$ และ $5 \pm 1^\circ\text{C}/45 \pm 5\%RH$) เป็นระยะเวลา 150 วัน

เมื่อตรวจสอบความคงตัวทางเคมี พบว่า สาร OPCs ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบมากในเมล็ดองุ่นไทยมีความคงตัวดีในระบบไมโครอิมัลชันทั้งสองสูตรที่เตรียมขึ้น เมื่อเก็บในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ ($45 \pm 1^\circ\text{C}/70 \pm 5\%RH$ และ $5 \pm 1^\circ\text{C}/45 \pm 5\%RH$) เป็นระยะเวลา 150 วัน

นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล O_2^- ทั้งในระบบตรวจวัดการกำจัดอนุมูล O_2^- ของสารกลุ่มที่ละลายได้ในน้ำและกลุ่มที่ละลายในไขมัน อันเนื่องมาจากฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยและส่วนประกอบอื่นในสูตรบางส่วน และมีความปลอดภัยจากผลการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

กล่าวโดยสรุป คือ งานวิจัยนี้สามารถพัฒนานาโนอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยสายพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier ที่มีความคงตัวดีทั้งทางกายภาพและเคมี และเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมลพิษเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ทั้งยังผ่านการตรวจสอบความปลอดภัยเบื้องต้นเป็นที่เรียบร้อย ผลงานวิจัยที่ได้ยังสามารถเผยแพร่ในแวดวงวิชาการหรือถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคอุตสาหกรรม นับเป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเพื่อสร้างมูลค่าและเพิ่มคุณค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้ง (waste/ by products) จากภาคเกษตรกรรม คือ อุตสาหกรรมแปรรูปองุ่นได้อย่างดียิ่ง

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมและผลของตัวทำละลายร่วม

งานวิจัยนี้เริ่มต้นจากการศึกษาแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม โดยทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาขอบเขตของระบบไมโครอิมัลชันที่สามารถเกิดเป็นอิมัลชันขนาดนาโน หรืออาจเรียกว่าเป็นนาโนอิมัลชันจากวิธีไทเทรชัน เจือไนซ์ของระบบไมโครอิมัลชันที่ต้องการ คือ ต้องเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน เนื่องจากต้องการนำไปใช้เป็นระบบนำส่งสารสำคัญในสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenol) ที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้ว สารสำคัญจะถูกกักเก็บในวัฏภาคภายในขนาดเล็ก ซึ่งส่งผลดีในแง่ของการซึมผ่านชั้นผิวหนังเข้าไปสู่ตำแหน่งเป้าหมายได้ดีขึ้น ทั้งยังเป็นการปกป้องสารสำคัญที่มีโอกาสเสื่อมสลายจากการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้ระบบไมโครอิมัลชันต้องสามารถเกิดขึ้นได้โดยใช้อิมัลซิฟายเออร์ในปริมาณต่ำเพื่อลดปัญหาสารพิษตกค้างหรือความระคายเคืองที่เกิดจากอิมัลซิฟายเออร์ ซึ่งเป็นผลดีในแง่ความปลอดภัยของผู้บริโภค

จากแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมในภาพที่ 6 ที่ใช้ cetyl ethylhexanoate เป็นวัฏภาคน้ำมัน ใช้อิมัลซิฟายเออร์ผสมระหว่าง sorbitan monooleate, polyglyceryl-10 oleate และ polyglyceryl-2 oleate ในอัตราส่วน 1:1:2 และใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นวัฏภาคน้ำ สามารถเกิดเป็นอิมัลชันที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนได้จากความเหมาะสมของอิมัลซิฟายเออร์ในระบบ ที่สามารถลดแรงตึงผิวประจันวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันได้ โดยระบบที่เกิดขึ้น พบว่า มีลักษณะใส เนื่องจากการมีอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่ตามนุษย์สามารถมองเห็นได้⁽²⁹⁾ ลักษณะเฉพาะดังกล่าว จึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการเกิดอิมัลชันขนาดนาโนในเบื้องต้นจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่าได้ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณสารลดแรงตึงผิวหรืออิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ในการทำอิมัลชันถือว่ายังอยู่ในระดับที่สูง อาจทำให้เกิดความเป็นพิษเนื่องจากอิมัลซิฟายเออร์ในระบบที่มีปริมาณมาก ดังนั้นจึงต้องพัฒนาสูตรต่อไปด้วยการเพิ่มตัวทำละลายร่วมเข้าไปในระบบ เพื่อหวังผลในการเพิ่มความสามารถการละลายของวัฏภาคภายใน ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณวัฏภาคน้ำที่เป็นวัฏภาคภายในได้มากขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องใช้อิมัลซิฟายเออร์ในปริมาณที่สูงเกินไป

ตัวทำละลายร่วมในงานวิจัยนี้ หมายถึง สารจำพวกสารละลายอินทรีย์ที่รวมตัวกับน้ำได้ดี และใช้เป็นตัวช่วยเพิ่มการละลายของสารที่ละลายได้น้อยในตำรับยา⁽³⁰⁾ โดยทั่วไปจะเป็นสารในกลุ่ม แอลกอฮอล์ที่มีความเป็นพิษหรือก่อให้เกิดความระคายเคืองต่ำ จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า isopropyl alcohol, glycerin และ polyethylene glycol 400 เป็นตัวทำละลายร่วมที่ไม่เหมาะสมในการช่วยเพิ่มการละลายของวิตามินในในระบบ A แต่เมื่อใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วมที่ผสมในวิตามินอัตราส่วน 1:1 สามารถช่วยขยายขอบเขตของระบบไมโครอิมัลชัน ดังแสดงในภาพที่ 7 กล่าวคือ สามารถเพิ่มปริมาณวิตามินภายในของระบบได้มากขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องใช้อิมัลซิฟายเออร์ในปริมาณมาก ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วมที่ดีในระบบไมโครอิมัลชัน เมื่อพิจารณาถึงชนิดของตัวทำละลายร่วม พบว่าลักษณะโครงสร้างของ propylene glycol เป็นแอลกอฮอล์สายโซ่สั้น ที่มีความยืดหยุ่นของโมเลกุลมากทำให้แรงดึงระหว่างผิวของหยดอนุภาคภายในลดลง สิ่งนี้จึงช่วยทำให้สามารถขยายขอบเขตของระบบไมโครอิมัลชันให้กว้างขึ้นได้⁽³¹⁾ และอาจเป็นผลจากค่า dielectric constant ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความมีขั้วของโมเลกุลของตัวทำละลายนั้น ใน isopropyl alcohol และ polyethylene glycol 400 จัดอยู่ในกลุ่มสารที่มีค่า dielectric constant ต่ำ ขณะที่ glycerin ก็มีค่า dielectric constant ที่สูง แต่สำหรับ propylene glycol จัดอยู่ในกลุ่มตัวทำละลายที่มีค่า dielectric constants ปานกลาง หรืออาจเรียกว่า “ตัวทำละลายแบบกึ่งมีขั้ว” เป็นอีกเหตุผลที่ช่วยเพิ่มการละลายของวิตามินและน้ำมันให้เข้ากันได้เป็นอย่างดี⁽²⁷⁾ จึงเลือกใช้ propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วมของระบบไมโครอิมัลชันเพื่อพัฒนาต่อเป็นระบบที่ใช้ในการกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยในขั้นต่อไป

5.2.2 การกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยในระบบไมโครอิมัลชันและความคงตัว

ในขั้นตอนนี้ได้เตรียมไมโครอิมัลชันจากระบบไมโครอิมัลชันต้นแบบทั้ง 3 สูตร คือ B1PG, B2PG และ B3PG โดยการเจือจางระบบไมโครอิมัลชันด้วยวิตามินนอก วิธีนี้เป็นการเตรียมโดยใช้พลังงานต่ำ งบประมาณด้านเครื่องมือไม่สูงนัก และเป็นวิธีที่เตรียมได้ง่ายในระดับห้องปฏิบัติการ และยังช่วยลดการสลายตัวของสารสำคัญจากการให้พลังงานในระหว่างกระบวนการได้ สูตรไมโครอิมัลชันทั้ง 12 สูตรที่เตรียมได้มีค่าความหนืดต่ำลงจากสูตรไมโครอิมัลชันตั้งต้น เนื่องจากระบบถูกเจือจางด้วยวิตามินที่มีค่าความหนืดต่ำ และการเจือจางนี้ยังส่งผลดีในแง่การลดอัตราส่วนของอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ในระบบได้อีกด้วย และทุกสูตรมีสมบัติการไหลแบบนิวโทเนียน กล่าวคือ หากต้องการให้ของเหลวในระบบเคลื่อนตัวได้ดีขึ้น จำเป็นจะต้องมีการให้แรงเพิ่มมากขึ้น โดยการให้แรงที่เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหนืดของระบบของเหลว สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างพบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 5.7 ± 0.12 ถึง 6.9 ± 0.12 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับความเป็นกรด-ด่างของผิว และมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำเข้าใกล้ศูนย์ ซึ่งเป็นสมบัติที่ใช้อธิบายโครงสร้างของระบบที่ประกอบด้วยน้ำ

น้ำมันและสารสกัดแรงดึงผิว ระบบดังกล่าว ได้แก่ อิมัลชันทุกชนิด โดยหากค่าการนำไฟฟ้ามีค่ามากกว่า 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ขึ้นไป ระบบนั้นจะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำซึ่งเข้ากับน้ำได้ดี แต่หากมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำกว่านี้ ระบบจะมีโครงสร้างเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน⁽²⁹⁾ มีรายงานการวิจัยยืนยันว่าอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่ยังไม่มีการเจือจางจะมีค่าการนำไฟฟ้าเข้าใกล้ศูนย์⁽³¹⁾ จึงสามารถยืนยันได้ว่าระบบไมโครอิมัลชันทั้ง 12 สูตรที่เตรียมได้อยู่ในรูปของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน การที่ระบบไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้เป็นชนิดน้ำในน้ำมันนั้นนับเป็นผลดีแก่งานวิจัย เนื่องจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการเตรียมระบบเพื่อใช้กักเก็บและนำส่งสารสำคัญในเมล็ดตองุ่นไทยที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีการหมัก (marceration) โดยใช้ 95% เอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขี้้ว จึงทำให้สารสกัดมีความเหมาะสมที่จะกักเก็บในส่วนที่เป็นวัตถุดิบน้ำซึ่งเป็นวัตถุดิบภายในของระบบที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ และจะสามารถอาศัยการมีหยดขนาดเล็กในการนำส่งสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนังได้อีกด้วย

ผลการวัดขนาดอนุภาคช่วยยืนยันได้ว่า ระบบไมโครอิมัลชันที่ได้จากแผนภาพวัตถุดิบไตรภาคเทียมสามารถสร้างอิมัลชันที่มีขนาดในวัตถุดิบภายในเล็กน้อยในระดับนาโนเมตรได้ ซึ่งสอดคล้องกับสันนิษฐานในเบื้องต้น และหลังจากการเจือจางไมโครอิมัลชันด้วยวัตถุดิบภายนอก จากลักษณะการเรียงตัวของโมเลกุลอิมัลซิฟายเออร์และตัวทำละลายร่วมเดิมที่จัดเรียงตัวอยู่บริเวณพื้นผิวประจันระหว่างวัตถุดิบภายในและภายนอกของระบบไมโครอิมัลชัน แต่เมื่อระบบถูกรบกวนจากการเติมวัตถุดิบภายนอกลงไป ทำให้โมเลกุลอิมัลซิฟายเออร์และตัวทำละลายร่วมบางส่วนเปลี่ยนตำแหน่งไปละลายอยู่ในวัตถุดิบภายนอก ความสามารถในการคงความเสถียรของหยดวัตถุดิบภายในจึงเปลี่ยนไป ทำให้มีขนาดอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น⁽³²⁾

ส่วนประกอบของวัตถุดิบภายในที่มี propylene glycol เป็นตัวทำละลายร่วม นอกจากจะช่วยให้เพิ่มปริมาณวัตถุดิบภายในระบบให้มากขึ้น ยังมีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายสารสกัดเมล็ดตองุ่นไทยได้อีกด้วย เนื่องจากตัวอย่างสารสกัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้จากกระบวนการสกัดเมล็ดตองุ่นด้วย 95% เอทานอล ซึ่งทำให้ได้สารสกัดที่มีขี้้วสูง (polar compounds) ที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขี้้ว

เมื่อเก็บระบบไมโครอิมัลชันในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ เพื่อประเมินความคงตัวในระยะสั้นที่เวลา 90 วัน พบการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นในสูตร B1PG 1:0.5, B1PG 1:1, B2PG 1:0, B2PG 1:0.5, B3PG 1:1 และ B3PG 1:2 สำหรับสูตรที่มีความคงตัวทางกายภาพดีจะนำไปใช้ในการกักเก็บสารสกัดเมล็ดตองุ่นไทยที่ความเข้มข้น 1% ในสูตร ซึ่งใช้เป็นความเข้มข้นต้นแบบในการศึกษาความเป็นไปได้ของการกักเก็บสารสกัดเมล็ดตองุ่นไทยในระบบไมโครอิมัลชันที่เตรียมขึ้น โดยสารสกัดจะถูกละลายในวัตถุดิบน้ำของระบบ แล้วจึงผสมกับอิมัลซิฟายเออร์และวัตถุดิบน้ำมันตามอัตราส่วนในแต่ละสูตร

ภายหลังการกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสุตร แล้วเก็บในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ พบว่า มีสูตรที่เกิดความไม่คงตัวทางกายภาพ คือ สูตร B1PG 1:0, B1PG 1:2, B2PG 1:1 และ B2PG 1:2 เหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจเกิดจากการที่โมเลกุลของสารสกัดรวมกลุ่มสะสมกันอยู่ในบริเวณผิวหน้าของหยดวัตถุภายใน⁽³³⁾ ทำให้เกิดการรบกวนความเสถียรของบริเวณรอยต่อผิวประจัน ที่อาจเป็นสาเหตุนำไปสู่ความไม่คงตัวทางกายภาพในระยะเวลาดังกล่าว ทำให้ได้ระบบไมโครอิมัลชันที่มีความคงตัวทางกายภาพและสามารถกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสุตรได้ที่ระยะเวลามากกว่า 150 วันหรือ 10 รอบการทดสอบในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ คือ สูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 โดยระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสูตร B3PG 1:0.5 การเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคนี้สามารถอธิบายได้จากการเกิด Ostwald ripening โดยมีกลไกของความไม่คงตัว คือ วัตถุภาคน้ำซึ่งเป็นวัตถุภายในที่มีขนาดเล็กเกิดการแพร่ของโมเลกุลไปสู่อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า ทำให้อิมัลชันมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยรวมเพิ่มขึ้นตามเวลา⁽³⁴⁾ แต่ในสูตร B3PG 1:0.5 สามารถลดปริมาณการใช้อิมัลซิฟายเออร์เพื่อสร้างอิมัลชันขนาดเล็กในระดับนาโนลงได้ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึงค่าดัชนีการกระจายตัว เพื่อศึกษาว่าระบบไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้มีลักษณะการกระจายขนาดอนุภาคแบบใด จากการวัดขนาดอนุภาคทำให้ทราบค่าดัชนีการกระจายตัว ซึ่งแสดงถึงการกระจายตัวของคอลลอยด์อยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ คือ มีค่าใกล้เคียง 1 แต่หากค่าดัชนีการกระจายตัวสูงจนกระทั่งเข้าใกล้ 1 นั้นหมายถึงว่าการกระจายตัวของคอลลอยด์ไม่อยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้⁽³⁵⁾ และอาจมีคงตัวทางกายภาพในระยะเวลาดังนั้น นอกจากนี้ ยังทำให้ทราบว่าอิมัลชันที่เตรียมได้นั้นมีลักษณะการกระจายขนาดอนุภาคแบบแคบ (narrow size distribution) การรายงานผลที่แสดงเป็นค่า D10, D50 และ D90 ช่วยทำให้ทราบถึงขนาดอนุภาคชัดเจนยิ่งขึ้น กล่าวคือ ค่า D10 ของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 เท่ากับ 3.1 ± 0.25 นาโนเมตร หมายถึง มีอนุภาคที่ขนาดเล็กกว่า 3.1 ± 0.25 นาโนเมตร อยู่ 10% มีค่า D50 หรือค่ามัธยฐาน (median) ของขนาดอนุภาคเท่ากับ 7.9 ± 0.15 นาโนเมตร และมีค่า D90 หรือมีอนุภาคที่เล็กกว่า 20.6 ± 3.68 นาโนเมตร อยู่ 90% ในทำนองเดียวกัน ระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0.5 มีค่า D10, D50 และ D90 เท่ากับ 7.1 ± 1.79 , 18.5 ± 0.75 และ 53.7 ± 20.92 นาโนเมตร ตามลำดับ

ภาพถ่าย TEM สอดคล้องกับผลการวัดขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค photon correlation spectroscopy คือ ทั้งสองสูตรมีขนาดวัตถุภายในมีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร แต่เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องมือที่ต้องให้พลังงานในระดับสูงเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอน จึงอาจทำให้อิมัลชันที่เป็นของเหลวขนาดเล็กเกิดการลู่ใหม่ในขณะที่ถ่ายภาพไปบ้างบางส่วน ทำให้ไม่สามารถถ่ายภาพอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่านี้ได้

5.2.3 ประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน

การประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูล O_2^- ในงานวิจัยนี้ทดสอบโดยใช้วิธี photochemiluminescence โดยใช้หลักการที่เมื่อสารลูมินอล ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น photosensitizer เข้าทำปฏิกิริยาเคมีกับอนุมูล O_2^- แล้วถูกกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงพลังงานภายในของสารไปอยู่ในสภาวะเร้า เมื่อกลับคืนมาสู่สภาวะพื้นจะมีการเปล่งแสงออกมา เรียกคลื่นแสงนี้ว่า chemiluminescence ซึ่งสามารถวัดความเข้มของคลื่นแสงที่เปล่งออกมานี้ซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณอนุมูล O_2^- โดยใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม เช่น หลอดขยายสัญญาณแสง (photomultiplier tube) แต่เมื่อมีสารเคมีที่สามารถกำจัดอนุมูล O_2^- ได้อยู่ในระบบ จะทำให้ความเข้มคลื่นแสงที่เปล่งออกมาน้อยลง จึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูล O_2^- ของสารตัวอย่างได้

มูลเหตุที่ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาความสามารถของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ในการกำจัดอนุมูล O_2^- เนื่องจากเป็นหนึ่งใน reactive oxygen species ที่เกิดขึ้นในร่างกาย ยิ่งไปกว่านั้นยังเป็นอนุมูลตั้งต้น (primary radical) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลชนิดอื่นตามมา⁽³⁶⁾ ดังนั้น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์จึงเป็นอนุมูลมีความสำคัญและร้ายแรงที่ทำให้เกิดความเสื่อมของร่างกาย และหากสารต้านอนุมูลอิสระใดที่สามารถกำจัดอนุมูล O_2^- ได้ก็จะยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ ที่จะเกิดตามมาได้ด้วย

จากผลการทดลองในข้อ 4.4 ทำให้ทราบว่า ไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดตองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตรสามารถแสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (O_2^- scavenging activity) ได้เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและ Trolox[®] การที่ระบบไมโครอิมัลชันทั้ง 2 สูตรดังกล่าว มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล O_2^- เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกรดแอสคอร์บิกในระบบตรวจวัดสารในกลุ่มละลายในน้ำนั้น อาจมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดตองุ่นไทยที่ละลายอยู่ในวัตถุดิบน้ำของอิมัลชัน เนื่องจากสารสกัดเมล็ดตองุ่นนี้ได้จากการสกัดเมล็ดตองุ่นไทยด้วย 95% เอทานอล ทำให้ได้สารสกัดที่มีขั้วสูง ประกอบกับสารพอลิเมอร์ที่พบมากในสารสกัดเมล็ดตองุ่น มักเป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอลที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีเยี่ยม และสารสกัดเมล็ดตองุ่นไทย ยังสามารถละลายได้ดีในวัตถุดิบที่มีน้ำและ propylene glycol เป็นส่วนประกอบในระบบไมโครอิมัลชัน จึงทำให้ระบบไมโครอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดเมล็ดตองุ่นสามารถกำจัดอนุมูล O_2^- ได้ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ผลการทดสอบนี้อาจทำให้กล่าวได้ว่าระบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดตองุ่นไทยที่เตรียมขึ้นมีลักษณะกลไกการกำจัดอนุมูล O_2^- ในทำนองเดียวกับปฏิกิริยาของกรดแอสคอร์บิก และจะสามารถช่วยกำจัดอนุมูล O_2^- ที่เกิดขึ้นในระบบของเหลวของร่างกายที่ประกอบด้วยน้ำ เช่น ในระบบเลือด เป็นต้น และยังมีข้อมูลที่กล่าวว่าการ

แอสคอร์บิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกำจัดอนุมูลอิสระที่อยู่ในเลือดของมนุษย์และเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการป้องกันโรคและกระบวนการเสื่อมในร่างกาย⁽³⁷⁾

สำหรับการตรวจวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูล O_2^- เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox[®] พบว่า ระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัดเมล็ดดองุ่นไทย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีองค์ประกอบอื่นในสูตรที่แสดงฤทธิ์ร่วมกับสารสกัดเมล็ดดองุ่นไทย โดยยืนยันได้จากข้อมูลความสามารถในการกำจัดอนุมูล O_2^- ของอิมัลซิฟายเออร์ คือ sorbitan monooleate, polyglyceryl-10 oleate และ polyglyceryl-2 oleate ซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ทำไมโครอิมัลชันในงานวิจัยนี้ อิมัลซิฟายเออร์เหล่านี้สามารถกำจัดอนุมูล O_2^- ได้เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox[®] ประกอบกับการทำอิมัลชันต้องใช้อิมัลซิฟายเออร์มากถึง 10–20% โดยประมาณ จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้ระบบไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดเมล็ดดองุ่นไทยในสูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 มีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูล O_2^- เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox[®] สูงตามไปด้วย และมีงานวิจัยที่ระบุว่า Trolox[®] สามารถช่วยป้องกันการเกิด lipid peroxidation เมื่อทดสอบกับเบซัลเซลล์ (basal cell) ได้⁽³⁸⁾ หากผลิตภัณฑ์ระบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดดองุ่นไทยสามารถทำหน้าที่กำจัดอนุมูล O_2^- ได้ทั้งเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิกและ Trolox[®] ก็นับว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่จะใช้เพื่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ในร่างกาย

5.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ (OPCs) ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำเป็นต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่เลือกใช้ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้อง ตัวแปรที่ใช้ทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ คือ ความจำเพาะเจาะจง ความสัมพันธ์เชิงเส้น ความแม่นยำ และความเที่ยงตรง

ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง ปรากฏพบพีคบริเวณในนาฬิกาที่ 65 ถึง 90 ซึ่งเกิดจากพีคของสารส่วนประกอบที่อยู่ในระบบไมโครอิมัลชันและพีคตัวทำลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม พีคบริเวณเหล่านี้มีปริมาณเพียงเล็กน้อยจนไม่สามารถทราบพื้นที่กราฟของพีคบริเวณดังกล่าวได้ และในการวิเคราะห์ครั้งนี้เป็นเพียงการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบ พีคบริเวณที่เกิดขึ้นจึงมีผลต่อการวิเคราะห์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

การวิเคราะห์สารมาตรฐาน Gravinol SL[®] ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับความเข้มข้นสารมาตรฐาน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9998 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.995 ตามเกณฑ์การยอมรับ

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่ตรวจสอบใน 2 ลักษณะ คือ การศึกษาความแม่นยำในวันเดียวกันและการศึกษาความแม่นยำต่างวัน ได้ค่า % RSD น้อยกว่า 2 จึงยอมรับความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

การหาค่า %recovery เพื่อตรวจสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ได้ค่าเท่ากับ 88.59 ± 0.528 % ถึง 94.76 ± 0.677 % ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับเมื่อค่า %recovery อยู่ในช่วง 80 ถึง 120 %

จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ข้างต้น สามารถยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์และสถานะที่เลือกใช้ในการตรวจวัดปริมาณ oligomeric proanthocyanidins ในระบบไมโครอิมัลชันมีความเหมาะสม ถูกต้อง แม่นยำและเที่ยงตรง สามารถนำไปใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสาร OPCs ในสูตร เมื่อเก็บที่สภาวะเร่งแบบสลับอลูมิเนียมเป็นเวลา 150 วันได้ ผลการศึกษาทำให้ทราบว่าระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยสายพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) ความเข้มข้น 1% ในสูตรที่เตรียมขึ้นมีความคงตัวทางเคมีของสารสำคัญ คือ สาร OPCs ที่เป็นสารพฤษเคมีที่พบมากในเมล็ดองุ่น เนื่องจากปริมาณ OPCs ในการทดสอบเชิงเปรียบเทียบของการเปลี่ยนแปลงปริมาณ OPCs ในแต่ละสูตรที่ไม่ขึ้นต่อกันเมื่อเก็บตัวอย่างภายใต้สภาวะเร่งแบบสลับอลูมิเนียมในระยะเวลา 150 วัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ %recovery ของปริมาณ OPCs ในระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 มีค่าในช่วง 68.4% ถึง 71.2% และ 78.7% ถึง 83.2% ตามลำดับ

5.2.5 ผลการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์

เนื่องจากอิมัลชันที่มีวัดภาคภายในขนาดเล็กหรือ “นาโนอิมัลชัน” ในงานวิจัยนี้ เตรียมขึ้นโดยอาศัยเทคโนโลยีของการเกิดระบบไมโครอิมัลชัน ซึ่งประกอบขึ้นจากน้ำ ตัวทำละลายร่วม น้ำมันและอิมัลซิฟายเออร์ในปริมาณมาก ซึ่งเป็นที่ทราบจากการทดสอบในหลายงานวิจัยกล่าวว่าอิมัลซิฟายเออร์เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความระคายเคืองต่อเซลล์ที่มีชีวิต (living cells)⁽²¹⁾ จึงอาจทำให้ระบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยที่เตรียมขึ้นเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังได้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันถึงความปลอดภัยเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้ทำการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์โดยการทดสอบหาค่าความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด NHDF ของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทย 1% ในสูตร ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญเติบโตแบบยึดเกาะ (adhesive cell line) สามารถเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์และถ่ายเลี้ยง (subculture) ได้ในจำนวนครั้งที่มากกว่าเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells)⁽²²⁾ และมีงานวิจัยที่ยืนยันเกี่ยวกับการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (human skin fibroblasts) ในการทดสอบการระคายเคืองของสารลดแรงตึงผิวต่อผิวหนัง โดยให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบการระคายเคืองกับผิวหนังมนุษย์โดยตรง (human skin patch test)⁽³⁹⁾ จึงมี

ความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของระบบไมโครอิมัลชันในงานวิจัยนี้ ผลการทดสอบทำให้ทราบว่า การตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะความเป็นพิษสัมพันธ์กับปริมาณสารทดสอบที่ได้รับ (dose-response toxicity) อย่างชัดเจน โดยสามารถคำนวณเป็นค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดพิษจนเซลล์ตายลงครึ่งหนึ่งได้ค่า IC_{50} ของระบบไมโครอิมัลชันสูตร B3PG 1:0 และสูตร B3PG 1:0.5 ที่มีสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตรเท่ากับ 3,083 และ 2,344 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งในสูตร B3PG 1:0.5 มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าในสูตร B3PG 1:0 อาจเกี่ยวข้องกับอัตราส่วนในการเจือจางระบบไมโครอิมัลชันด้วย cetyl ethylhexanoate ที่ทำให้ปริมาณอิมัลซิฟายเออร์ในระบบลดลงด้วย และเมื่อจัดระดับความเป็นพิษของระบบไมโครอิมัลชันทั้งสองให้ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ด้วย MTT assay พบว่า ทั้ง B3PG 1:0 และ B3PG 1:0.5 ต่างมีค่า IC_{50} ในความเข้มข้นที่สูงเกินกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีแนวโน้มไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (potentially non toxic)⁽⁴⁰⁾

จากผลการทดลองข้างต้น จึงกล่าวได้ว่า ระบบไมโครอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยความเข้มข้น 1% ในสูตร มีความปลอดภัยจากการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ในเบื้องต้น ซึ่งเป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สำหรับการทดสอบแบบ *in vivo* หรือการใช้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไปในอนาคต

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยพัฒนานาโนอิมัลชันของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยสายพันธุ์ *Vitis vinifera* cv. Ribier (Pok Dum) ผู้วิจัยสามารถสรุปข้อเสนอแนะเพื่อเป็นแนวทางของการพัฒนาในอนาคตได้ดังต่อไปนี้

1. ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเพียงความเข้มข้นต้นแบบในการศึกษาความเป็นไปได้ของการกักเก็บสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยในระบบไมโครอิมัลชันที่เตรียมขึ้น อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดเมล็ดองุ่นไทยที่สามารถกักเก็บได้ในระบบ ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น

2. จากข้อมูลเบื้องต้นด้านประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและข้อมูลด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการทดสอบผลิตภัณฑ์กับอาสาสมัครโดยตรง (*in vivo* clinical efficiency tests) ซึ่งสมควรอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต เนื่องจากจะช่วยยืนยันถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น