



เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุกรดซาลิซิลิกโดยใช้
เทคนิคไมโครอิมัลชันและการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน
PREPARATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS LOADED
WITH SALICYLIC ACID BY MICROEMULSION TECHNIQUE
USING BOX-BEHNKEN DESIGN

เกศระวี ปานทับ

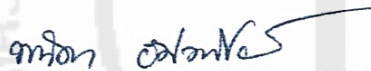
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุกรดซาลิซิลิกโดยใช้เทคนิคไมโครอิมัลชัน
และการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน
PREPARATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS LOADED WITH
SALICYLIC ACID BY MICROEMULSION TECHNIQUE
USING BOX-BEHNKEN DESIGN

เกศระวี ปานทับ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ตรวจสอบและอนุมัติให้
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรเครื่องสำอาง)
เมื่อวันที่ 19 ตุลาคม พ.ศ. 2559



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิดา อัครพิชยนต์
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ



อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก



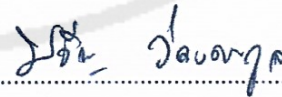
อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
กรรมการ



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทรวิธานุชิต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทรวิธานุชิต
กรรมการ



อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตรเครื่องสำอาง)



รองศาสตราจารย์อัสยา จันทรวิธานุชิต
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทรวิธานุชิต
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุกรดซาลิซิลิกโดยใช้เทคนิคไมโครอิมัลชัน
และการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

เกศระวี ปานทับ 566036

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ปวีณา ว่องตระกูล, Ph.D.

วิชาญ จันทน์วิทยานุกิต, Ph.D.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุกรดซาลิซิลิกโดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยวิธีบ็อกซ์-เบห์นเคน ทำการศึกษาตัวแปรอิสระสามตัวแปรที่จะทำให้นาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีอนุภาคขนาดเล็กที่สุด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองสามารถทำนายระบบอิมัลชันเบื้องต้นซึ่งประกอบด้วยปริมาณไขมันรวม 10% อัตราส่วนระหว่างกรดสเตียริกและแคปพริก/แคปไพพริก ไตรกลีเซอไรด์ เท่ากับ 4:1 และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทวิน 80 เท่ากับ 25% เมื่อนำอิมัลชันมาเตรียมนอนุภาคไขมันพบว่านาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่บรรจุและไม่บรรจุกรดซาลิซิลิกมีขนาดอนุภาคภายหลังหนึ่งวันของการเตรียม เท่ากับ 189.62 ± 1.82 นาโนเมตร และ 369.00 ± 3.37 นาโนเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณไขมันรวมเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคของไขมัน ผลการศึกษาความคงตัวด้านขนาดอนุภาคพบว่า นาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเก็บไว้ 90 วัน พบการตกตะกอนของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่ไม่บรรจุกรดซาลิซิลิกอย่างชัดเจนภายหลัง 1 เดือนของการเก็บรักษา การตรวจสอบลักษณะอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าอนุภาคไขมันมีลักษณะเป็นทรงกลม อนุภาคไขมันมีประจุลบโดยมีค่าศักย์ซีต้าต่ำกว่าค่าสัมบูรณ์ของ 20 มิลลิโวลต์ การศึกษาโครงสร้างผลึกของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันภายหลังการเตรียม 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิคการวัดแยกปริมาณความร้อนแบบส่องกราด พบอนุภาครูปแบบ α ที่อุณหภูมิหลอมเหลว 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเกิดจากการเติมไขมันเหลว แคปพริก/แคปไพพริก ไตรกลีเซอไรด์ และสารลดแรงตึงผิว ภายหลัง 60 วันของการเก็บรักษาพบอนุภาครูปแบบ β' ที่อุณหภูมิหลอมเหลวสูงขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส โครงสร้างดังกล่าวทำให้ความสามารถในการเก็บกักกรดซาลิซิลิกสูงสุดถึง 80% และมีความคงตัวทางเคมีกายภาพจนถึง 90 วันของระยะเวลาการเก็บรักษา

คำสำคัญ: นาโนพาร์ทิเคิลไขมัน กรดซาลิซิลิก กรดสเตียริก แคปพริก/แคปไพพริก ไตรกลีเซอไรด์
บ็อกซ์-เบห์นเคน

PREPARATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS LOADED WITH
SALICYLIC ACID BY MICROEMULSION TECHNIQUE
USING BOX-BEHNKEN DESIGN

KETRAWEE PANTUB 566036

MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCE)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : PAVEENA WONGTRAKUL, Ph.D.

WICHARN JANWITAYANUCHIT, Ph.D.

ABSTRACT

The objective of this study is the preparation of nanostructured lipid carriers (NLCs) loaded salicylic acid by using the design of experiment (DOE), Box-Behnken design. Three independent variables were studied to achieve the target of minimum particle size of lipid particles. From the surface response analysis, the predicted pre-emulsion system consisted of 10% of total lipid, a mixture of stearic acid to capric/caprylic triglyceride at 4:1 ratio and 25% of Tween[®] 80. Using this pre-emulsion to prepare lipid particles, the particles size after one-day preparation of NLCs loaded and unloaded with salicylic acid were 189.62 ± 1.82 nm and 369.00 ± 3.37 nm, respectively. Response surface analysis showed that the amount of total lipid was a main factor affected particle size of lipid carriers. The stability study of particle size revealed that size of NLCs significantly increased after 90-days storage. Precipitation was obviously detected in samples of unloaded NLCs after one month storage. Morphology characterization using scanning electron microscopy revealed that lipid particles were spherical in shape. Lipid particles had a negative charge with the zeta potential lower than absolute value of 20 mV. The crystallization of NLCs examined by differential scanning calorimetry after preparation for 24 hours was α -form with melting temperature at 55°C as a result of the addition of capric/caprylic triglyceride and surfactant. The β' -crystal form with higher melting temperature at 60°C was observed after 60-days storage. This form of structure provided encapsulation efficiency up to 80% with the sufficient stability of 90-days storage.

Keywords: nanostructured lipid carriers, salicylic acid, stearic acid, capric/caprylic triglyceride, Box-Behnken

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาของอาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทร์วิทยานุกิต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พินดา อัสวพิชยนต์ ที่ให้ความรู้ แนวคิดและข้อเสนอแนะจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สุนีย์ ชาญณรงค์ อาจารย์วรัญญา เนียมขำ และอาจารย์ปฐมภรณ์ เชื้อดี สำหรับคำแนะนำเมื่อพบอุปสรรคปัญหา ทั้งเจ้าหน้าที่ประจำห้องทดลองคณะเภสัชศาสตร์ทุกท่านสำหรับข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือต่าง ๆ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ธนิษฐ์ รัตนโอฬาร อาจารย์ประจำภาควิชาครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท บางกอกแล็บ แอนด์คอสเมติก จำกัด ขอขอบพระคุณ ดร.สมพล ปฐมาพจน์ ดร.นรินทร์ บูรณปรีชา และคุณนพพล พิษณุอัศกรกุล สำหรับการพิจารณาให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

เกศระวี ปานทับ

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ช |
| สารบัญแผนภูมิ | ซ |
| สารบัญภาพ | ฅ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 3 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย | 3 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | |
| 2.1 นาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 4 |
| 2.1.1 ส่วนประกอบสำคัญของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 4 |
| 2.1.2 การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 7 |
| 2.1.3 รูปแบบการบรรจุสารสำคัญของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 9 |
| 2.1.4 การประเมินคุณลักษณะเฉพาะของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 10 |
| 2.2 การออกแบบการทดลอง | 12 |
| 2.2.1 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ Box-Behnken design สำหรับนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 13 |
| 2.3 Salicylic acid | 14 |
| 2.3.1 สมบัติทางกายภาพและเคมี | 14 |
| 2.3.2 ประสิทธิภาพการทำงานของ salicylic acid | 15 |
| 2.3.3 ตัวอย่างงานวิจัยการพัฒนาระบบนำส่ง salicylic acid | 16 |
| 2.4 กรอบแนวคิดในการศึกษา | 18 |
| บทที่ 3 ระเบียบวิธีการศึกษา | |
| 3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย | 19 |
| 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย | 19 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| 3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย | 20 |
| 3.3.1 การทดลองเบื้องต้น | 20 |
| 3.3.2 การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design | 21 |
| 3.3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองจาก Box-Behnken design | 23 |
| 3.3.4 การวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ซีต้า | 24 |
| 3.3.5 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา | 24 |
| 3.3.6 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก | 25 |
| 3.3.7 การประเมินความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ | 25 |
| 3.3.8 ความคงตัวทางกายภาพและเคมี | 27 |
| 3.3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ | 27 |
| 3.4 แผนการดำเนินงาน | 27 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | |
| 4.1 การทดลองเบื้องต้น | 28 |
| 4.1.1 การคัดเลือกระบบไขมัน | 28 |
| 4.1.2 การปรับความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิว | 29 |
| 4.2 การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design | 30 |
| 4.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองจาก Box-Behnken design | 32 |
| 4.3.1 การคัดเลือกสมการแบบจำลอง | 32 |
| 4.3.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการแบบจำลอง | 34 |
| 4.3.3 นัยสำคัญของตัวแปรอิสระจากสมการแบบจำลอง | 36 |
| 4.3.4 ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาค | 38 |
| 4.3.5 การประมาณค่าที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้น | 40 |
| 4.4 การประเมินคุณสมบัติเฉพาะของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 41 |
| 4.4.1 ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ซีต้า | 41 |
| 4.4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา | 46 |
| 4.4.3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก | 46 |
| 4.5 การประเมินความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ | 49 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ | |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย | 50 |
| 5.2 อภิปรายผล | 50 |
| 5.2.1 ผลการทดลองเบื้องต้น | 50 |
| 5.2.2 ผลการทดลอง Box-Behnken design | 51 |
| 5.2.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองจาก Box-Behnken design | 52 |
| 5.2.4 คุณสมบัติเฉพาะของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 55 |
| 5.2.5 ผลการประเมินความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ | 58 |
| 5.3 ข้อเสนอแนะ | 58 |
| เอกสารอ้างอิง | 59 |
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก ก การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design | 64 |
| ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ผลการทดลองจาก Box-Behnken design | 66 |
| ภาคผนวก ค ภาพจากกล้อง microscope ECLIPSE 50I กำลังขยาย 40X | 73 |
| ภาคผนวก ง ตัวอย่างการคำนวณค่าร้อยละความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ | 74 |
| ประวัติผู้เขียน | 75 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า | |
|----------|---|----|
| 1 | ไขมันและสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 5 |
| 2 | การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 8 |
| 3 | การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 13 |
| 4 | การกำหนดตัวแปรอิสระและผลตอบสนอง | 22 |
| 5 | ส่วนประกอบในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นจาก Box-Behnken design | 23 |
| 6 | แผนการดำเนินงาน | 27 |
| 7 | ผลการทดสอบความสามารถในการทำละลายของ salicylic acid ของไขมันแต่ละระบบ | 28 |
| 8 | ลักษณะปรากฏของอิมัลชันเบื้องต้น ผลการวัดการกระจายขนาดอนุภาค ความสามารถในการบรรจุสารสำคัญของตัวอย่าง NLCs-SA ที่มี Tween® 80 ความเข้มข้นแตกต่างกัน | 29 |
| 9 | ผลการทดลองจาก Box-Behnken design | 31 |
| 10 | ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของแบบจำลอง | 33 |
| 11 | ผลการพยากรณ์ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA จากสมการแบบจำลอง | 36 |
| 12 | ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระในสมการแบบจำลอง | 37 |
| 13 | ผลการประเมินความคงตัวทางกายภาพในระยะเวลากการเก็บรักษา 90 วัน | 42 |
| 14 | ผลการตรวจสอบระดับความเป็นผลึกด้วยเครื่อง DSC | 47 |

สารบัญแผนภูมิ

| แผนภูมิที่ | | หน้า |
|------------|---|------|
| 1 | จำนวนผลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับระบบนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993 จนถึงช่วงกลางของปี ค.ศ. 2010 | 2 |
| 2 | กรอบแนวคิดในการศึกษา | 18 |
| 3 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง | 26 |
| 4 | กราฟแสดงผลการตรวจสอบข้อมูลเศษเหลือจากการวิเคราะห์ ANOVA | 34 |
| 5 | Contour plot และ response surface plot แสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA | 38 |
| 6 | กราฟแสดงขนาดอนุภาคเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ และลักษณะการตกตะกอนที่ก้นภาชนะบรรจุของตัวอย่างทั้ง 3 ระดับ | 43 |
| 7 | กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคในแต่ละช่วงเวลาตามระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันเมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ของตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs | 44 |
| 8 | ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างผลึกด้วยเครื่อง DSC | 48 |
| 9 | ร้อยละของความสามารถในการบรรจุสารสำคัญในแต่ละช่วงเวลา | 49 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|--|------|
| 1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 4 |
| 2 รูปแบบการบรรจุสารสำคัญของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันชนิด NLCs | 10 |
| 3 โครงสร้างของ salicylic acid | 14 |
| 4 การทำงานของ salicylic acid | 15 |
| 5 ลักษณะปรากฏของอิมัลชันเบื้องต้น ณ อุณหภูมิ 75°C จากการปรับความเข้มข้น Tween [®] 80 เริ่มจากภาพซ้ายเท่ากับ 25, 20, 15, 10 และ 5%w/v ตามลำดับ | 29 |
| 6 ลักษณะอิมัลชันเบื้องต้น ณ อุณหภูมิ 75°C จาก Box-Behnken design | 32 |
| 7 การตั้งค่าผลตอบสนองตามวัตถุประสงค์การทดลองด้วยโปรแกรม MINITAB | 41 |
| 8 ภาพถ่าย SEM ของตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs หลังจากการเตรียมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่กำลังขยาย 1,000 เท่าและ 5,000 เท่า | 46 |
| 9 การเกิด bridging ของโมเลกุล Tween [®] 80 บริเวณผิวอนุภาคของ NLCs-SA | 52 |
| 10 การตกตะกอนในรูปแบบ flocculated system | 56 |
| 11 อนุภาคแขวนลอยที่มีพื้นที่ผิวต่ำและพื้นที่ผิวสูง | 56 |
| 12 การเพิ่มขึ้นของประจุบวกบริเวณพื้นผิวอนุภาคของตัวอย่าง NLCs-SA | 57 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

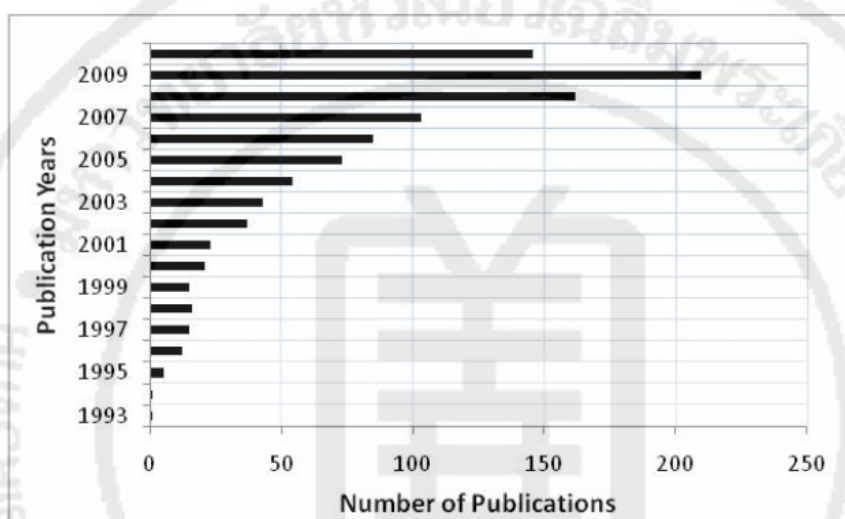
นาโนเทคโนโลยีเป็นความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาวิจัยมุ่งเน้นไปที่ สารที่มีขนาดเล็ก ระดับนาโนเมตร ทำให้เกิดการคิดค้นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับผลิตภัณฑ์ เครื่องสำอาง นาโนเทคโนโลยีได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน การแข่งขันทางเศรษฐกิจทำให้ มีการพัฒนาและสร้างระบบนำส่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบรรจุสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ เครื่องสำอางให้ได้ผลการออกฤทธิ์ที่ดี ลดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ และสามารถเตรียมเป็น ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบหลากหลายเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

ระบบนำส่งนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน เป็นหนึ่งในนาโนเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นมาจากอิมัลชันชนิด น้ำมันในน้ำ โดยนาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีลักษณะของอนุภาคไขมันแข็งที่ห่อหุ้มสารสำคัญไว้ภายใน ผลิตภัณฑ์รุ่นแรกคือ solid lipid nanoparticles (SLNs) ถูกพัฒนาขึ้นในช่วงต้นของศตวรรษที่ 19 โดยการเตรียมระบบสารห่อหุ้มจากไขมันแข็งเพียงชนิดเดียว มีความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ ค่อนข้างจำกัดเพียงประมาณร้อยละ 25 จึงมีการพัฒนาเป็น nanostructured lipid carriers (NLCs) เพื่อช่วยลดข้อจำกัดด้านความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ โดยภายในโครงสร้างของ NLCs จะ ประกอบด้วยไขมันต่างชนิดซึ่งประกอบด้วยไขมันแข็งและน้ำมันร่วมกัน การเลือกใช้ไขมันหลายชนิด ร่วมกันจะช่วยลดโอกาสในการผลัดสารสำคัญออกจากอนุภาคเนื่องจากการจัดเรียงตัวให้เป็นระเบียบ ของไขมันแข็งเพียงชนิดเดียว นอกจากนี้การเลือกชนิดไขมันที่ใกล้เคียงกับไขมันในชั้นผิวจะเป็นการ เพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านผิวหนังและมีความปลอดภัยต่อร่างกายด้วย ^{(1), (2)}

ปัจจุบันมีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่ทำการศึกษเกี่ยวกับคุณสมบัติของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน สำหรับการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งให้กับสารสำคัญทางเภสัชภัณฑ์และเครื่องสำอาง สังเกตได้จาก จำนวนงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่เพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993 จนถึงช่วงกลางของปี ค.ศ. 2010 (แผนภูมิที่ 1) ด้วยข้อดีที่เด่นชัดกว่าระบบนำส่งนาโนคอลลอยด์ชนิดอื่น ๆ (เช่น liposome, niosome และ nanosuspension) ในแง่ของการนำส่งสารสำคัญสู่ผิวหนัง ระบบนาโนพาร์ทิเคิลไขมันจะ สามารถห่อหุ้มสารสำคัญและแผ่เป็นฟิล์มเคลือบคลุมผิวหนังได้อย่างสม่ำเสมอ สามารถควบคุมการ ปลดปล่อยสารสำคัญได้หลายรูปแบบ นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมได้ง่ายและเอื้อต่อการขยายขนาด การผลิตในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้หลากหลายจุดประสงค์ เช่น การใช้เพื่อลดการสลายตัวของสารสำคัญที่ไวต่อแสงหรือปฏิกิริยาทางเคมี การใช้เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวหนัง การใช้บรรจุสารที่มีโอกาสทำให้เกิดการระคายเคือง รวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพใน

การป้องกันรังสียูวีให้กับสารกันแดด โดยสามารถเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ได้ทั้งรูปแบบครีม โลชั่น หรือ เจล^{(3), (4)}

แผนภูมิที่ 1 ผลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับระบบนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่เพิ่มขึ้นจากปี ค.ศ. 1993 จนถึงช่วงกลางของปี ค.ศ. 2010⁽³⁾



กรดซาลิซิลิก (salicylic acid) คือ กรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล จัดอยู่ในกลุ่มของ beta hydroxyl acid (BHA) ความสามารถในการละลายน้ำต่ำและละลายได้ดีใน ระบบไขมัน มีแหล่งที่มาจากรธรรมชาติโดยเริ่มต้นการค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1828 Henri Leroux เกสซ์กรชาวฝรั่งเศสสามารถสกัดกรดซาลิซิลิกได้จากเปลือกต้นหลิวหรือ willow tree กรดชนิดนี้ถูก นำมาใช้ในทางการแพทย์นานกว่า 150 ปี ซึ่งในปัจจุบันมีการสังเคราะห์กรดซาลิซิลิกขึ้นใช้ทดแทน แหล่งธรรมชาติ มีการปรับปรุงพัฒนาสมดุลความเป็นกรดต่างอย่างเหมาะสมทำให้เกิดการระคายเคือง น้อยลง และมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ตัวอย่างพืชในประเทศไทยที่มี salicylic acid เป็นองค์ประกอบ เช่น ดอกดาวเรือง กระดังงา เป็นต้น⁽⁵⁾

ด้วยกลไกการทำงานของ salicylic acid จะเข้าไปช่วยกระตุ้นผิวหนังให้เกิดการระคายเคือง หรือรบกวนผิวหนังชั้น stratum corneum ลดการจับตัวของเคอราติน (keratin) ในชั้นผิว จึงสามารถ ใช้เป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้หลากหลายรูปแบบ เช่น การใช้ในผลิตภัณฑ์ชะลอวัย ผลิตภัณฑ์รักษาสิว ผลิตภัณฑ์ขจัดรังแค⁽⁶⁾ แต่เนื่องจากกรดชนิดนี้สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในสภาวะ pH ต่ำจึงอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและไวต่อแสงแดด ดังนั้นหากนอกเหนือจากการใช้

ทางการแพทย์อาจจำเป็นต้องกำหนดความเข้มข้นที่เหมาะสม และเลือกเตรียมสูตรตำรับที่สามารถนำกรดชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางอย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับงานวิจัยฉบับนี้ผู้วิจัยมีแนวคิดในการพัฒนาระบบนาโนพาร์ทิเคิลไขมันชนิดไขมันแข็งและน้ำมัน (NLCs) เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งให้กับ salicylic acid ที่มีข้อจำกัดในด้านการละลายและโอกาสในการก่อการระคายเคืองบนผิวหนัง โดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติเพื่อกำหนดขอบเขตของตัวแปรและค้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมผลิตภัณฑ์นาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่บรรจุ salicylic acid ได้ในปริมาณสูงและมีความคงตัวที่ดี มีประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง นาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้จะถูกประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพ พร้อมทดสอบความคงตัวในระยะยาว

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุ salicylic acid ให้มีอนุภาคขนาดเล็กโดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติ
2. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่สามารถบรรจุ salicylic acid ได้ในปริมาณสูงและมีความคงตัวที่ดี

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยฉบับนี้เริ่มจากการออกแบบการทดลองเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นโดยใช้ Box-Behnken design เพื่อกำหนดตัวแปรและจำนวนการทดลองในการผลิตนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุ salicylic acid โดยตั้งวัตถุประสงค์ในการเตรียมให้ได้อนุภาคขนาดเล็ก แล้วจึงศึกษาลักษณะเฉพาะทางเคมีกายภาพและประเมินความคงตัวเป็นระยะเวลา 90 วัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลผลิตของงานวิจัยนี้คือนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุ salicylic acid ที่สามารถบรรจุสารสำคัญไว้ได้ในปริมาณสูงและมีลักษณะทางกายภาพที่ดีต่อการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
2. ระบบนาโนพาร์ทิเคิลไขมันจากงานวิจัยนี้สามารถเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบนำส่งสำหรับสารสำคัญชนิดอื่นได้
3. ผลงานวิจัยฉบับนี้สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งระดับประเทศและนานาชาติได้

บทที่ 2

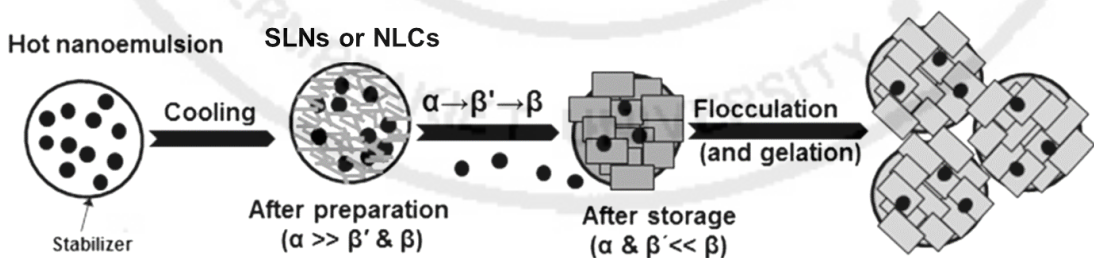
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นาโนพาร์ทิเคิลไขมัน

นาโนพาร์ทิเคิลไขมัน คือระบบนำส่งสารสำคัญในรูปแบบอนุภาคระดับนาโนเมตรที่ผลิตจากไขมัน เป็นหนึ่งในนาโนเทคโนโลยีที่ถูกพัฒนาขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1990s โดยเริ่มจากการพัฒนาระบบโดยใช้ไขมันแข็งหรือเรียกว่า solid lipid nanoparticles (SLNs) ซึ่งต่อมามีการพัฒนาเป็นรุ่นที่สองคือ nanostructured lipid carriers (NLCs) ได้จากการเพิ่มส่วนของไขมันเหลวหรือน้ำมันเข้าไปในโครงสร้างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบรรจุสารสำคัญ

Nanostructured lipid carriers (NLCs) หรืออนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งและน้ำมัน พัฒนาขึ้นเพื่อลดข้อจำกัดของระบบ SLNs ที่มีความสามารถในการบรรจุที่ค่อนข้างจำกัด เนื่องจากการผลิตระยะเริ่มต้นอนุภาคไขมันจะฟอร์มตัวในรูปแบบพลังงานสูงเป็น α หรือ β' -crystal แต่ภายหลังระยะเวลาเก็บรักษา ธรรมชาติของไขมันแข็งจะฟอร์มโครงสร้างผลึกให้มีระเบียบในรูปแบบของ β -crystal ทำให้สารสำคัญมีโอกาสถูกขับออกจากเมทริกซ์ไขมันได้ (ภาพที่ 1) การเติมไขมันเหลวลงไปในระบบจึงช่วยให้อนุภาคคงรูปแบบที่ไร้ระเบียบเป็น α หรือ β' -crystal ได้ดีและมีช่องว่างเพียงพอที่จะสามารถเพิ่มการบรรจุสารสำคัญและลดโอกาสการขับสารสำคัญออกจากอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลระหว่างการเก็บรักษา^{(3), (7)}

ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน⁽⁸⁾



2.1.1 ส่วนประกอบสำคัญของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน

1) ไขมัน การคัดเลือกไขมันที่ใช้เตรียมระบบมีการอธิบายไว้โดย Tamjidi และคณะ (ค.ศ. 2013)⁽⁸⁾ ซึ่งมีหลักการพิจารณาจาก 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ ความสามารถการละลายของสารสำคัญในไขมันหลอม และโมเลกุลของไขมัน ชนิดไขมันแข็งและน้ำมันมีผลต่อสภาพความเป็นผลึกของอนุภาคที่เตรียมได้ ไขมันทั้งสองไม่ควรจะละลายในกันและกันแต่สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันแข็ง หลังจากฟอร์มเป็นอนุภาค ไขมันแข็งจะเรียงเป็น

โครงสร้างผลึกอย่างสมบูรณ์ในขณะที่ไขมันเหลวจะกระจายตัวเป็นหยดอยู่ภายในเมทริกซ์ ชนิดของไขมันแข็งและน้ำมันที่นิยมใช้ในงานวิจัย ได้แก่ stearic acid และ medium chain triglyceride (MCT) ตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วนของไขมันแข็งต่อน้ำมันที่ใช้เป็นได้ตั้งแต่ร้อยละ 70:30 จนถึงร้อยละ 99.9:0.1 ปริมาณไขมันที่เหมาะสมจะมีผลต่อความสามารถในการบรรจุสารสำคัญในอนุภาคด้วย ⁽⁷⁾, ⁽⁸⁾

2) สารลดแรงตึงผิว มีหน้าที่ช่วยลดการเกาะกลุ่มกัน (flocculated) ของอนุภาคแขวนตะกอนระดับนาโนเมตรซึ่งมีพลังงานอิสระที่พื้นผิวสูง บ่งบอกถึงลักษณะของการรักษาความคงตัวที่ดีของระบบ การคัดเลือกสารลดแรงตึงผิวอาศัยหลักการ 2 ข้อ ได้แก่ เลือกใช้สารลดแรงตึงผิวที่ช่วยเพิ่มแรงผลักทางไฟฟ้าที่พื้นผิวอนุภาค (electrostatic repulsion) ซึ่งประเมินได้จากการตรวจวัดค่าศักย์ซีต้า (zeta potential; ZP) และ/หรือ เลือกใช้สารลดแรงตึงผิวไม่มีประจุ (non-ionic stabilizer) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่เพื่อลดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค (steric repulsion) หากเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวมีประจุร่วมกับสารที่ไม่มีประจุจะช่วยให้เกิดแรงผลักทางไฟฟ้าที่สมดุลบนผิวอนุภาคและเกิดระบบที่มีความคงตัวยิ่งขึ้น ⁽⁹⁾

ไขมันและสารลดแรงตึงผิวที่สามารถใช้เตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันในปัจจุบัน (ค.ศ. 2015) ⁽¹⁰⁾ ได้มีการรวบรวมไว้ในหนังสือ *Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability* ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไขมันและสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน ⁽¹⁰⁾

| Lipids | |
|--------------------------|--|
| <i>Fatty acids</i> | <i>Waxes</i> |
| Dodecanoic acid | Cetyl palmitate |
| Myristic acid | Carnauba wax |
| Palmitic acid | Beeswax |
| Stearic acid | <i>Liquid lipids</i> |
| <i>Monoglyceride</i> | Soya bean oil |
| Glyceryl monostearate | Oleic acid |
| Glyceryl hydroxystearate | Medium chain triglycerides (MCT)/Capric-caprylic triglycerides |
| Glyceryl behenate | α -tocopherol/Vitamin E |
| <i>Diglycerides</i> | Squalene |
| Glyceryl palmitostearate | Hydroxyoctacosanylhydroxystearate |
| Glyceryl dibehenate | Isopropyl myristate |

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| | |
|--------------------------------------|---|
| <i>Triglycerides</i> | <i>Cationic lipids</i> |
| Caprylate triglyceride | Stearylamine |
| Caprate triglyceride | Benzalkonium chloride (alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride) |
| Glyceryl tristearate/Tristearin | Cetrimide (tetradecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) |
| Glyceryl trilaurate/Trilaurin | Cetyl pyridinium chloride (hexadecyl pyridinium chloride, CPC) |
| Glyceryl trimyristate/Trimyristin | Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDAB) |
| Glyceryl tripalmitate/Tripalmitin | N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl ammonium chloride |
| Glyceryl tribehenate/Tribehenin | |
| Surfactants | |
| <i>Ionic surfactants</i> | <i>Non-ionic surfactants</i> |
| Sodium cholate | Tween 20 |
| Sodium glycocholate | Tween 80 |
| Sodium taurocholate | Span 20 |
| Sodium taurodeoxycholate | Span 80 |
| Sodium oleate | Span 85 |
| Sodium diodecyl sulphate | Tyloxapol |
| <i>Amphoteric surfactants</i> | Poloxamer 188 |
| Egg phosphatidylcholine | Poloxamer 407 |
| Soy phosphatidylcholine | Poloxamine 908 |
| Hydrogenated egg phosphatidylcholine | Brij78 |
| Hydrogenated soy phosphatidylcholine | Tego care 450 |
| Egg phospholipid | Solutol HS15 |
| Soy phospholipid | <i>Co-surfactants</i> |
| | Butanol |
| | Butyric acid |

2.1.2 การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน^{(8), (11), (12)}

วิธีการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

1) การปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันที่ความดันสูง (high pressure homogenization, HPH) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากเป็นวิธีที่มีสภาวะผลิตซ้ำได้ (reproducibility) และสามารถขยายการผลิตขนาดใหญ่ได้ง่าย หลักการของวิธี HPH คือการลดขนาดอนุภาคด้วยการอัดความดันสูงให้ได้อนุภาคที่สามารถไหลผ่านช่องแคบขนาดเล็ก ร่วมกับการปั่นอย่างรุนแรงและทำให้อนุภาคแตกออกเป็นอนุภาคขนาดเล็กระดับนาโน โดยทั่วไปวิธีนี้ใช้เตรียมระบบที่มีปริมาณไขมันร้อยละ 5-10 ซึ่งวิธีการเตรียมแบ่งออกเป็น 2 แนวทาง คือ

การผลิตโดยใช้อุณหภูมิสูง เริ่มจากการหลอมตัวยาคู่เข้ากับไขมันโดยใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันเชิงประมาณ 5-10°C และเทส่วนผสมนี้เข้ากับสารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำที่อุณหภูมิเดียวกัน จากนั้นปั่นด้วยความเร็วสูงจนเกิดเป็นอิมัลชันเริ่มต้น (pre-emulsion) แล้วนำไปผ่านเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูง ณ อุณหภูมิเดียวกัน ขั้นตอนข้างต้น (โดยทั่วไปจะใช้ความดัน 500 bar จำนวน 3 รอบ) ทำให้เกิดเป็นนาโนอิมัลชันร้อนชนิดน้ำในน้ำมัน หลังจากการปั่นและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาโนอิมัลชันจะเกิดการกลับมาตกผลึกจนได้เป็นนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน

การผลิตโดยใช้อุณหภูมิต่ำ เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการผลิตเพื่อห่อหุ้มสารที่ละลายตัวได้ง่าย ไม่ทนต่อความร้อนและเป็นสารที่ชอบน้ำ โดยไขมันและสารสำคัญจะหลอมรวมกันภายใต้ไนโตรเจนเหลวหรือน้ำแข็งแห้ง ลดขนาดด้วยการบดจนได้พาร์ทิเคิลไขมันระดับไมโครเมตร จากนั้นนำไปกระจายตัวในสารละลายสารลดแรงตึงผิวในน้ำเย็น ร่วมกับการปั่นด้วยความเร็วสูง แล้วนำไปผ่านเครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูงที่อุณหภูมิเท่ากับหรือต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง (ใช้ความดัน 500 bar จำนวน 5 รอบ) จนได้เป็นนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน

2) การปั่นด้วยความเร็วสูงหรือใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (high speed homogenization/ultrasonication) วิธีนี้มีจุดประสงค์หลักเพื่อการลดขนาดอนุภาคของสารผสมหรืออิมัลชันเบื้องต้นที่เตรียมได้ให้อยู่ในระดับนาโน โดยใช้เทคนิคการปั่นด้วยความเร็วสูงหรือใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เป็นวิธีดั้งเดิมที่เตรียมได้ง่าย สามารถใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไปและขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก การใช้คลื่นเสียงเตรียมได้ 2 รูปแบบ คือ probe ultrasonication และ bath ultrasonication อนุภาคที่ผลิตได้อาจมีการกระจายขนาดในช่วงกว้างไปจนถึงระดับไมโครเมตร และอาจส่งผลต่อความไม่คงตัวของกายภาพได้ บางกรณีจึงจำเป็นต้องใช้สารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นสูงหรือใช้วิธีปั่นความเร็วสูงร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงและใช้ความร้อน เพื่อทำให้ได้อนุภาคที่มีความคงตัวของกายภาพดีและมีการกระจายขนาดที่แคบ

3) เทคนิคไมโครอิมัลชัน (microemulsion technique) เริ่มต้นโดยการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นให้อยู่ในรูปแบบของไมโครอิมัลชันใส ด้วยการคนผสมไขมันหลอมที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันแข็ง 5-10°C จากนั้นกระจายไมโครอิมัลชันขณะร้อนลงในน้ำเย็น 2-3°C ปริมาณมาก (โดยทั่วไปใช้อัตราส่วนไมโครอิมัลชันต่อน้ำประมาณ 1:20) พร้อมการปั่นผสมเป็นเวลา 10-15 นาที จนได้เป็นอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันโดยทั่วไปเทคนิคนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ที่กระจายตัวอยู่ในน้ำปริมาณสูงมากแต่สามารถกำจัดน้ำได้โดยใช้วิธีการกรองหรือการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

4) การทำให้เกิดอิมัลชันด้วยตัวทำละลายและการระเหย (solvent emulsification and evaporation) ทำได้โดยการละลายไขมันในสารละลายอินทรีย์ที่ไม่เข้ากับน้ำ (เช่น toluene, cyclohexane และ chloroform) จากนั้นทำให้เกิดอิมัลชันโดยผสมลงในวัฏภาคน้ำ แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะการลดความดัน (40-60 mbar) ซึ่งในระหว่างที่ทำการระเหยตัวทำละลาย อนุภาคไขมันที่กระจายตัวอยู่จะเกิดการตกตะกอนได้เป็นนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน โดยมีขนาดอยู่ในช่วง 30-100 nm และมีการกระจายขนาดอนุภาคที่ค่อนข้างแคบ วิธีนี้ไม่มีการใช้ความร้อนระหว่างการเตรียม จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เก็บสารสำคัญที่สลายตัวได้ง่าย แต่อาจเกิดปัญหาเรื่องการตกค้างของตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน^{(11), (12)}

| วิธีการเตรียม | ข้อดี | ข้อเสีย |
|--|--|--|
| การปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวที่ความดันสูง | <ol style="list-style-type: none"> ใช้ต้นทุนต่ำ เตรียมได้ง่ายในระดับห้องปฏิบัติการ ผลิตได้ในปริมาณมาก การใช้อุณหภูมิต่ำเหมาะกับสารที่สลายตัวง่าย ไม่ใช้สารละลายอินทรีย์ | <ol style="list-style-type: none"> ใช้พลังงานสูง อนุภาคมีการกระจายขนาดค่อนข้างต่ำ อุณหภูมิไม่คงที่ระหว่างการปั่นผสม |
| การปั่นด้วยความเร็วสูงหรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง | <ol style="list-style-type: none"> เตรียมได้ง่ายในระดับห้องปฏิบัติการ ไม่ใช้สารละลายอินทรีย์ ลดการใช้แรงเหวี่ยงเนื่องจากการปั่นผสม | <ol style="list-style-type: none"> ใช้เวลานาน มีโอกาสปนเปื้อนโลหะจาก probe อนุภาคมีความคงตัวทางกายภาพต่ำ ขนาดอนุภาคไม่สม่ำเสมอ |
| เทคนิคไมโครอิมัลชัน | <ol style="list-style-type: none"> เตรียมได้ง่ายในระดับห้องปฏิบัติการ ใช้พลังงานน้อย สามารถเก็บสารสำคัญที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ อนุภาคที่เตรียมได้มีความคงตัวดี | <ol style="list-style-type: none"> ใช้สารลดแรงตึงผิวปริมาณสูง ได้ผลิตภัณฑ์น้อย ใช้ปริมาณสูง |
| การทำให้เกิดอิมัลชันด้วยตัวทำละลายและการระเหย | <ol style="list-style-type: none"> ได้อนุภาคขนาดเล็ก หลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิสูง | <ol style="list-style-type: none"> การตกค้างของตัวทำละลายอินทรีย์ ขยายขนาดการผลิตได้ยาก |

เทคนิคการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการทดลอง สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกประยุกต์ใช้ เทคนิคการปั่นผสมด้วยความร้อนที่ความเร็วสูง ทำให้สารผสมเนื้อเดียวกันของไขมันและสารสำคัญ แยกตัวเป็นหยดเล็ก ๆ อุณหภูมิขณะร้อนควรสูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันแข็งประมาณ 5-10°C ตามด้วยการกระจายอนุภาคในน้ำเย็นอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิไม่เกิน 4°C โดยการผลิตรววิธีนี้อาจมี ข้อจำกัดในเรื่องของการกระจายขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงกว้างถึงระดับไมโครเมตรและอาจต้องใช้ สารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นสูง แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้สามารถเตรียมได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ และช่วยหลีกเลี่ยงการใช้สารละลายอินทรีย์ที่อาจเกิดการตกค้างระหว่างกระบวนการผลิตได้

2.1.3 รูปแบบการบรรจุสารสำคัญของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน⁽¹⁰⁾

ภาพที่ 2 แสดงรูปแบบการบรรจุสารสำคัญของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันชนิด NLCs โดย แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ดังนี้

1) **รูปแบบผลึกไม่สมบูรณ์ (imperfect crystal)** ภาพที่ 2a แสดงลักษณะของ รูปแบบผลึกไม่สมบูรณ์ของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน โครงสร้างลักษณะนี้จะเกิดขึ้นเมื่อหยดไขมันที่ หลอมเหลวถูกทำให้เย็นตัวอย่างรวดเร็วเพื่อฟอร์มเป็นนาโนพาร์ทิเคิล แต่มีไขมันแข็งบางส่วนเกิดการ ตกตะกอนโดยไม่ห่อหุ้มสารสำคัญ กลายเป็นผลึกไขมันที่แกนกลางไปพร้อมกับสารสำคัญที่ยังเป็น ของเหลวกระจายตัวอยู่ และมีโอกาสทำให้เกิดปลดปล่อยสารสำคัญแบบฉับพลัน (burst release)

ผลึกชนิดนี้เกิดจากการใช้ไขมันกลุ่มกลีเซอไรด์ (glyceride) ที่มีโครงสร้างของกรด ไขมันต่าง ๆ กัน ทำให้เกิดการเรียงตัวที่ไร้ระเบียบของผลึกไขมัน ส่งผลให้มีช่องว่างซึ่งสามารถรองรับ สารสำคัญให้อยู่ภายในผลึกได้

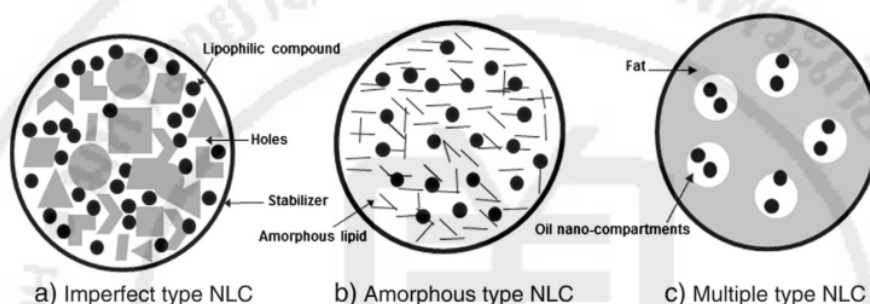
2) **รูปแบบผลึกอสัณฐาน (amorphous crystal)** ภาพที่ 2b รูปแบบนี้จะเกิดขึ้น เมื่อสารสำคัญมีแนวโน้มจะตกผลึกก่อนไขมันในระหว่างการเตรียม เนื่องจากใช้สารสำคัญในปริมาณ ความเข้มข้นสูงใกล้เคียงกับค่าการละลายอิ่มตัวในไขมัน เมื่อทำให้อิมัลชันเบื้องต้นเย็นตัวลงการ ละลายของสารสำคัญในไขมันก็จะลดลงและมีโอกาสที่สารนั้นจะเกิดการตกตะกอนก่อน จากนั้นไขมัน จึงเกิดการแข็งตัวห่อหุ้มสารสำคัญไว้ที่แกนกลาง ส่งผลต่อการเพิ่มระยะทางในการแพร่ผ่านออกจาก ไขมัน และทำให้เกิดการปลดปล่อยแบบทยอย (sustained release)

ผลึกชนิดนี้เกิดจากการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลโดยใช้ไขมันแข็งร่วมกับไขมันบางชนิด เช่น isopropyl palmitate หรือ capric/caprylic triglyceride โดยผลิตภัณท์นาโนพาร์ทิเคิล ที่เตรียมได้จะมีลักษณะเป็นผลึกของแข็งจัดเรียงตัวกันอย่างไร้ระเบียบ ช่วยลดการขับยาออกจาก อนุภาคระหว่างการเก็บรักษา

3) **รูปแบบซ้อน (Multiple crystal)** ภาพที่ 2c เกิดกับสารสำคัญที่มีคุณสมบัติ ละลายได้ดีในไขมันและไม่ต้องอาศัยอุณหภูมิสูงในการเตรียม ในกรณีที่มีการปั่นผสมที่อุณหภูมิสูง

ก็สามารถเกิดรูปแบบนี้ได้โดยทำให้ไขมันกับสารสำคัญที่เป็นเนื้อเดียวกันแตกตัวเป็นหยดเล็ก ๆ ที่กระจายตัวสม่ำเสมอและถูกทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ทำให้หยดไขมันดังกล่าวเกิดการแข็งตัวและมีแนวโน้มที่สารสำคัญกับไขมันจะไม่แยกชั้นออกจากกัน รูปแบบเมทริกซ์นี้เหมาะกับสารที่ต้องการยืดระยะเวลาการปลดปล่อยให้ยาวนานขึ้น (prolonged release)

ภาพที่ 2 รูปแบบการบรรจุสารสำคัญของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันชนิด NLCs⁽⁸⁾



2.1.4 การประเมินคุณสมบัติเฉพาะของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน^{(3), (8), (11)}

1) การวิเคราะห์ขนาดและการกระจายของอนุภาค ใช้หลักการวัดความเข้มข้นแสงที่กระเจิงเนื่องจากการเคลื่อนที่ของอนุภาคด้วยเทคนิค dynamic light scattering (DLS) และแสดงผลขนาดอนุภาคที่ได้จากการคำนวณ อนุภาคที่มีขนาดเล็กจะเกิดการกระเจิงแสงที่มุมกว้างได้มากกว่า โดยใช้สมมติฐานว่าขนาดอนุภาคที่วัดได้นั้นมีรูปร่างเป็นทรงกลม เทคนิค DLS สามารถตรวจวัดอนุภาคที่อยู่ในช่วงนาโนเมตรไปจนถึง 3 ไมครอน และหากจำเป็นต้องตรวจสอบอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นอาจใช้เทคนิค laser diffraction (LD) แทน ซึ่งการตรวจวัดจะอาศัยการเลี้ยวเบนของแสงเลเซอร์ และวัดความเข้มของแสงที่กระเจิงรอบอนุภาคเช่นเดียวกัน แต่วิธี LD สามารถวัดอนุภาคในช่วงกว้างตั้งแต่ นาโนเมตรไปจนถึงมิลลิเมตร

ขนาดอนุภาค (particle size) และค่าดัชนีของการกระจายขนาด (polydispersity index; PI) ของอนุภาคนาโนขึ้นอยู่กับความแข็งของผลึกและพลังงานที่ใช้ในการลดขนาด โดยที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวนั้นมีผลเพียงเล็กน้อย อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีขนาดอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 10-1,000 นาโนเมตร โดยค่า PI จะเป็นตัวบ่งบอกความกว้างและระยะห่างในการกระจายขนาดอนุภาค ค่า PI ที่ยอมรับได้ไม่ควรเกิน 0.5 และการกระจายขนาดที่ดีต่อการประเมินความคงตัวของ การเก็บรักษาในระยะยาว ค่า PI ควรอยู่ในช่วง 0.1-0.25

2) การตรวจวัดค่าศักย์ซีต้า (zeta potential; ZP) เป็นพารามิเตอร์สำคัญในการทำนายความคงตัวของอนุภาคแขวนตะกอนระดับนาโน การตรวจวัดไอออนที่ผิวอนุภาคด้วยเทคนิค

laser doppler electrophoresis (LDE) หรือ electrophoretic light scattering (ELS) โดยวัดจากค่าแรงเฉือนตามแนวแรงเฉือน (shear plane) รอบอนุภาค ซึ่งขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีและหมู่แตกตัวของสารที่ใช้เตรียมรวมถึงไอออนของระบบที่ใช้กระจายอนุภาคด้วย

ค่าศักย์ซีต้าที่แสดงถึงเสถียรภาพความคงตัวที่สูงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาคือมากกว่า ± 60 mV ในขณะที่ค่าศักย์ซีต้าในช่วง 30, 20 หรือน้อยกว่า 5 mV จะแสดงถึงความคงตัวที่ดีอยู่ในช่วงยอมรับได้และระบบที่มีความคงตัวต่ำตามลำดับ หลักการดังกล่าวใช้ได้เพียงระบบที่อาศัยแรงผลักทางไฟฟ้าจากสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุทั่วไปที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แต่หากเป็นกรณีของการใช้ steric repulsion จากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่สามารถทำให้เกิดการเบี่ยงเบนแนวแรงเฉือนที่พื้นผิวของอนุภาคจึงยังไม่มีเกณฑ์การตรวจวัดที่ชัดเจนในปัจจุบัน

3) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เป็นการศึกษาถึงลักษณะทางกายภาพเพื่อประเมินรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน ช่วยยืนยันผลการวัดขนาดอนุภาคที่ได้จากเทคนิค DLS หรือ LD การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) เป็นวิธีที่สามารถใช้ศึกษาลักษณะดังกล่าวโดยอาศัยหลักการตรวจหาอิเล็กตรอนที่ฉายแสงออกมาจากสารตัวอย่างที่ตรวจวัด ผลการตรวจสอบที่ได้แสดงเป็นภาพถ่ายสามมิติ

4) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก (change of crystalline state) เป็นการศึกษาลักษณะผลึกของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน โดยสามารถใช้เทคนิคการวัดแยกปริมาณความร้อนแบบส่องกราด (differential scanning calorimetry; DSC) ในการวิเคราะห์เพื่อประเมินการเปลี่ยนสถานะของผลึกไขมัน ณ อุณหภูมิที่ต้องการศึกษา เช่น จุดหลอมเหลว (melting) เอนทาลปี (enthalpy) สภาพเป็นผลึก (crystallinity) และภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ช่วยในการสังเกตการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกไขมันหลังการเตรียมและในระหว่างการเก็บรักษาตามภาพที่ 1 และสามารถทำนายความคงตัวของการบรรจุสารสำคัญภายในอนุภาคได้

5) ความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ (encapsulation efficiency; EE) ได้จากการคำนวณอัตราส่วนของสารสำคัญที่ถูกกักเก็บภายในเมทริกซ์ไขมันต่อปริมาณสารสำคัญที่ใช้จริงในการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิล คุณค่า 100 ผลคำนวณจะได้เป็นค่าร้อยละประสิทธิภาพของการกักเก็บ (%EE) โดยค่าร้อยละการกักเก็บยังคำนวณได้จากการหาปริมาณสารสำคัญที่ไม่ถูกกักเก็บซึ่งสารนั้นอาจเกิดการตกตะกอนหรือละลายอยู่ในระบบการกระจายตัวและสามารถแยกได้ด้วยวิธีการกรองละเอียดเข้มข้น (ultra filtration method) ร่วมกับการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ centrifuge filter tubes จากนั้นนำตัวอย่างส่วนที่ผ่านการกรองมาหาความเข้มข้นโดยใช้เครื่องมือ UV-visible spectrophotometer หรือ high performance liquid chromatography (HPLC) หรืออาจนำส่วนที่ไม่ผ่านการกรองไปทำละลายด้วยสารละลายอินทรีย์และหาความเข้มข้นด้วยวิธีเดียวกัน

2.2 การออกแบบการทดลอง

การออกแบบการทดลองหรือ design of experiment (DOE) เป็นสิ่งจำเป็นในการช่วยกำหนดและคัดเลือกตัวแปรที่สำคัญสำหรับการทดลองที่ซับซ้อนอย่างเป็นระบบ เพื่อช่วยในการค้นหาผลตอบสนอง (response) ที่ต้องการทราบได้ชัดเจนและแม่นยำยิ่งขึ้นโดยการหาค่าที่เหมาะสม (optimization) จากการใช้แบบจำลองหรือสมการทางคณิตศาสตร์มาอธิบาย การออกแบบการทดลองสามารถศึกษาอิทธิพลจากตัวแปรหลายตัวไปพร้อมกันโดยให้จำนวนการทดลองที่น้อยกว่าการศึกษาครั้งละหนึ่งตัวแปร โดยมีขั้นตอนหลักสามขั้นตอน⁽¹³⁾ ได้แก่

1. การวางแผน (planning) คือการระบุปัญหาหรือวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา การกำหนดตัวแปรตามหรือผลตอบสนอง (dependent variable; X) ที่ต้องการวัดค่าและการกำหนดตัวแปรอิสระ (independent variable; Y) แต่ละระดับ (level) ที่มีผลต่อตัวแปรตาม

2. การออกแบบ (design) คือการกำหนดจำนวนข้อมูลที่ต้องการจากการทดลองของตัวแปรแต่ละระดับ กำหนดรูปแบบการทดลอง กำหนดวิธีการสุ่มตัวอย่างและกำหนดรูปแบบทางคณิตศาสตร์ของการทดลอง

3. การทดลองและการวิเคราะห์ผล (experimental and analysis) คือขั้นตอนการเก็บรวบรวมข้อมูลและคำนวณค่าสถิติที่เหมาะสม โดยใช้หลักการวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วมกับการตีความผลการวิเคราะห์

สำหรับงานวิจัยออกแบบผลิตภัณฑ์นาโนพาร์ทิเคิลนิยมใช้วิธีการออกแบบพื้นที่ตอบสนอง (response surface methodology; RSM) โดยรวมเอาวิธีการวิเคราะห์แบบจำลองการถดถอย (regression analysis) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) มาใช้ในการทำนายจุดที่เหมาะสมของตัวแปร

แผนการทดลองแบบบ็อก-เบห์นเคน (Box-Behnken design) เป็นอีกหนึ่งวิธีในการออกแบบ RSM ที่นิยมใช้ในงานวิจัย Box-Behnken design เป็นการศึกษาค่าผลของตัวแปรที่ประกอบด้วย 3 ระดับได้แก่ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1) โดยใช้หลักการของการทดลองแบบ factorial design 2 ปัจจัย 2 ระดับ (2^2) ผสมกับการทดลองแบบ central composite design (CCD) โดยจะมีประสิทธิภาพมากกว่าใช้การทดลอง factorial 3 ปัจจัย 3 ระดับ (3^3) โดยให้จำนวนของหน่วยทดลอง (run order) น้อยกว่า factorial design ดังตารางที่ 3 เนื่องจากมีการคัดเลือกระดับของตัวแปรที่มีความเป็นไปได้ต่อผลตอบสนอง และไม่รวมระดับของตัวแปรที่ขีดจำกัดบนและล่างซึ่งต้องใช้ทรัพยากรจำนวนมาก การออกแบบการทดลองลักษณะนี้จึงสามารถช่วยลดข้อจำกัดทางกายภาพของกระบวนการทดลองในห้องปฏิบัติการได้เป็นอย่างดี^{(10), (14)}

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการทดลอง Box-Behnken และ full factorial ที่ศึกษาปัจจัย 3 ระดับ ⁽¹⁴⁾

| แบบการทดลอง | จำนวนการทดลอง | คุณสมบัติ |
|----------------|------------------------|---|
| Box-Behnken | 15 (จำนวนทำซ้ำ=3-5) | - เหมาะสำหรับศึกษาปัจจัยเชิงปริมาณ - ประมาณค่าอิทธิพลได้ทั้งรูปแบบเชิงเส้น รูปแบบกำลังสอง และรูปแบบผลกระทบรวม ของ 2 ปัจจัยได้ |
| Full factorial | 27 (จำนวนทำซ้ำ=1) | - ศึกษาได้ทั้งปัจจัยเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ - ประมาณค่าอิทธิพลได้ในรูปแบบกำลังสอง และรูปแบบผลกระทบรวมได้ทุกกรณี - มีจำนวนการทดลองสูง และใช้งบประมาณมาก |

2.2.1 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ Box-Behnken design สำหรับนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน

งานวิจัยในปี ค.ศ. 2011 Jifu และคณะ (ประเทศจีน) ⁽¹⁵⁾ ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นไขมันแข็ง ปริมาณสารลดแรงตึงผิว และอัตราส่วนสารสำคัญต่อไขมัน จำนวน 3 ระดับ ในการผลิต SLNs บรรจุ chloramphenicol ด้วยการออกแบบ Box-Behnken design ในโปรแกรม Design-Expert software โดยกำหนดผลตอบสนองเป็นความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ ได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 17 runs ร่วมกับการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง RSM ได้ผลของค่าตัวแปรอิสระที่เหมาะสม (optimization) ในการเตรียม SLNs คือไขมันแข็ง 8%w/v สารลดแรงตึงผิว 8 %w/v และความเข้มข้นของ chloramphenicol 13.5 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงประสิทธิภาพการบรรจุสารสำคัญถึง 83.29±1.23% ซึ่งมีลักษณะเฉพาะทางกายภาพที่ดีและยังมีประสิทธิภาพในการยืดระยะเวลาการปลดปล่อยสารสำคัญ (prolonged release) มากกว่า 48 ชั่วโมง

ปี ค.ศ. 2013 Mohd Yasir และ U.V.S. Sara (ประเทศอินเดีย) ⁽¹⁶⁾ ได้ออกแบบการทดลอง Box-Behnken design เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนสารสำคัญต่อไขมันแข็ง ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว และความเร็วในการลดขนาดระหว่างการผลิตนาโนพาร์ทิเคิลไขมันแข็งบรรจุ haloperidol แต่ละตัวแปร 3 ระดับ โดยกำหนดผลตอบสนองเป็นขนาดอนุภาคเล็กที่สุด และความสามารถในการบรรจุสารสำคัญสูงสุดที่ระบบสามารถเตรียมได้ ผลจากการทดลองจำนวน 17 runs นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี RSM พบว่าระดับของตัวแปรที่เหมาะสมคืออัตราส่วน 1:2 โดยใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวเท่ากับ 1.625%w/v และความเร็วรอบ 3,000 rpm ตามลำดับ ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ SLNs ที่มีอนุภาคขนาดเล็กเพียง 115.1 nm โดยมีความสามารถในการบรรจุสารสำคัญถึง 71.56%

ปี ค.ศ. 2014 Mousumi Kar และคณะ (ประเทศอินเดีย) ⁽¹⁷⁾ ได้ทำการทดลองผลิต SLNs บรรจุ thiocolchicoside ในการศึกษาอิทธิพลของตัวแปร 3 ระดับ ได้แก่ ปริมาณไขมันแข็ง

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว และอัตราส่วนของสารสำคัญต่อไขมัน ด้วย Box-Behnken design โดยกำหนดผลตอบสนองเป็นขนาดอนุภาคเล็กที่สุดและความสามารถในการบรรจุสารสำคัญสูงสุด จากนั้นทำการคัดเลือกระบบที่เหมาะสมจากการทดลองทั้งหมด 17 runs ผลการทดลองพบว่าระบบที่ให้ความสามารถในการบรรจุสารสำคัญสูงสุดถึง 85% คือระบบที่มีปริมาณไขมันแข็งเท่ากับ 250 mg สารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 0.25% และปริมาณ thiocolchicoside เท่ากับ 10 mg โดยผลิตภัณท์ SLNs ที่ได้มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 542 nm

2.3 Salicylic acid

2.3.1 สมบัติทางกายภาพและเคมี

ข้อมูลสำคัญของกรดซาลิซิลิกจาก *U.S. Pharmacopeial Convention* ⁽¹⁸⁾ ระบุไว้ดังต่อไปนี้

ชื่อทางเคมี: 2-Hydroxy benzoic acid หรือ beta-hydroxy benzoic acid

สถานะ: ของแข็ง เป็นผงหรือผลึกสีขาว

สูตรเคมี: $C_7H_6O_3$

โครงสร้างทางเคมี: ภาพที่ 3

มวลโมเลกุล: 138.12 g/mol

ความเป็นกรด: pH 2.4 (รูปแบบสารละลายอิ่มตัวในน้ำ)

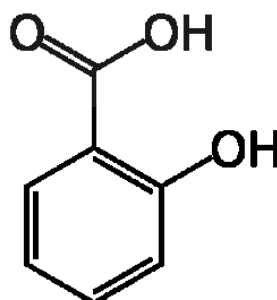
จุดหลอมเหลว: 157-161°C

จุดเยือกแข็ง: 76°C

การละลายในน้ำ: 0.2 g/ 100 ml ที่อุณหภูมิ 2°C

ข้อมูลด้านพิษวิทยา: สามารถทำให้เกิดการระคายเคือง (mild irritation) บนผิวหนังกระต่าย ที่ความเข้มข้น 500 mg ต่อการสัมผัสสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ salicylic acid ⁽¹⁸⁾



2.3.2 ประสิทธิภาพการทำงานของ salicylic acid ⁽¹⁹⁻²¹⁾

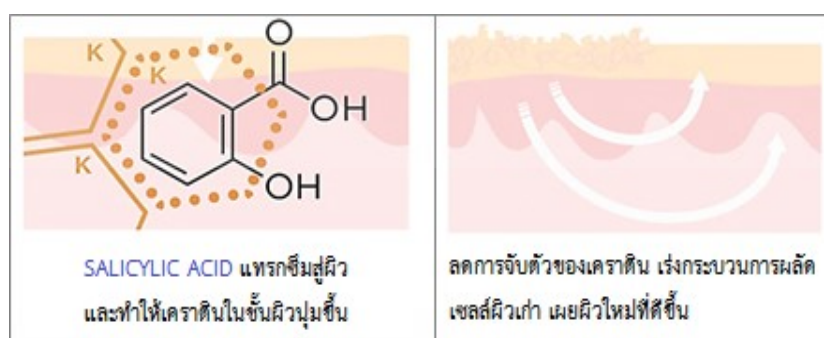
Salicylic acid ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในลักษณะของยาทาภายนอก เพื่อรักษาอาการของผิวหนังที่มีความหนาหรือแข็งกระด้าง เช่น รักษาหูดและตาปลา (ความเข้มข้น 10-20%) หรือรักษาเชื้อราที่ผิวหนัง (ความเข้มข้น 6%) เป็นต้น โดยปกติแล้วผิวหนังของเรามีการผลัดเซลล์ผิวทุก 3 สัปดาห์และจะช้าลงเมื่อมีอายุมากขึ้น จึงเกิดการสะสมของเซลล์ผิวเก่าที่ตายแล้วแต่ยังจับกันแน่นไม่ยอมให้เกิดเซลล์ผิวใหม่ขึ้นมาทดแทน ด้วยกลไกการทำงานของกรดชนิดนี้จะเข้าไปช่วยกระตุ้นผิวหนังให้เกิดการระคายเคืองหรือรบกวนผิวหนังชั้น stratum corneum ลดการจับตัวของเคราตินในชั้นผิว เร่งกระบวนการผลัดเซลล์ผิวหนังกำพร้าที่ตายแล้วแต่ยังจับกันแน่นให้ละลายหลุดลอกได้ง่ายขึ้น ดังภาพที่ 4 จึงกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์ผิวหนังใหม่ตามธรรมชาติและเผยผิวชั้นถัดมาซึ่งมีความเรียบและนุ่มนวลกว่า สำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง salicylic acid สามารถนำมาใช้ได้หลากหลายจุดประสงค์ ได้แก่

ผลิตภัณฑ์รักษาสิว (anti-acne) salicylic acid เป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำมันจึงสามารถเข้าไปละลายสิ่งอุดตันรูขุมขนได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ด้วยความสามารถในการผลัดเซลล์ผิว จึงช่วยให้รอยสิวจุดต่างดำจางลงได้

ผลิตภัณฑ์ชะลอวัย (anti-aging) ผิวหนังที่เกิดรอยเหี่ยวย่นจากความชราของผิวตามธรรมชาติหรืออาจเกิดจากปัจจัยภายนอกอื่นๆ อย่างเช่นแสงแดดและอนุมูลอิสระจะมีลักษณะของร่องผิวที่ไม่สม่ำเสมอ มีเม็ดสีผิวมากขึ้น สูญเสียความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่น การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ salicylic acid สามารถช่วยให้ร่องรอยลึกดังกล่าวตื้นขึ้นได้จากการผลัดเปลี่ยนเซลล์ผิวดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

ผลิตภัณฑ์ขจัดรังแค (anti-dandruff) ใช้หลักการเดียวกันกับการผลัดเซลล์ผิวหนังหรือเคราติน (keratin) ซึ่งช่วยลดปริมาณเซลล์ที่ตายแล้วบนหนังศีรษะให้หลุดออก ส่งผลในการช่วยลดปริมาณรังแคที่เกิดขึ้นบนหนังศีรษะได้

ภาพที่ 4 การทำงานของ salicylic acid ⁽²²⁾



เนื่องจาก salicylic acid สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในสภาวะกรด การใช้ในเครื่องสำอาง โดยทั่วไปที่ความเข้มข้นสูงหรือมีค่า pH ต่ำอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและไวต่อแสงแดด ได้ จึงมีการตั้งข้อกำหนดสำหรับการนำกรดชนิดนี้มาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในรูปแบบการออกฤทธิ์ที่ต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น พ.ร.บ. เครื่องสำอาง พ.ศ. 2535 กำหนดให้ใช้กรดชนิดนี้เป็น สารกันเสียที่ความเข้มข้นไม่เกิน 0.5% (คำนวณในรูปกรด) และห้ามใช้กับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี ยกเว้น แชมพู⁽²³⁾ หรือข้อกำหนดจาก ASEAN cosmetic document กำหนดให้ใช้ในผลิตภัณฑ์รักษาผิว ผลิตภัณฑ์ผิว และขจัดรังแคที่ความเข้มข้นสูงสุดไม่เกิน 2% (ประเทศไทย ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย)⁽²⁴⁾

ด้วยข้อจำกัดจากข้อมูลข้างต้นจึงมีงานวิจัยพัฒนาระบบนำส่งสำหรับ salicylic acid ออกมาอย่างแพร่หลายและมีการประยุกต์ใช้การห่อหุ้มสารสำคัญด้วยไมโครและนาโนเทคโนโลยี (encapsulation technology) เพื่อยืดระยะเวลาการปลดปล่อย ซึ่งนอกจากจะช่วยลดโอกาสการเกิดการระคายเคืองแล้วยังช่วยเพิ่มชีวประสิทธิผล (bioavailability) สำหรับการเตรียมผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่หลากหลายรวมถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ salicylic acid ให้ดียิ่งขึ้น

2.3.3 ตัวอย่างงานวิจัยการพัฒนาระบบนำส่ง salicylic acid

1) ไมโครเอนแคปซูลเลชัน (microencapsulation) Huang และคณะ (ค.ศ. 2014)⁽²⁵⁾ ได้ทำการวิจัยผลิตไมโครแคปซูลจาก maltodextrin (MD) และ gum arabic (GA) เพื่อเป็นระบบนำส่ง salicylic acid โดยใช้วิธีสเปรย์ดราย (spray dry) ผลการทดลองพบว่า การห่อหุ้ม salicylic acid ด้วย maltodextrin ร่วมกับ gum arabic ในอัตราส่วน 1:1 ช่วยปรับปรุงความสามารถละลายน้ำได้มากขึ้นถึง 29 mg/ml และยังช่วยยืดระยะเวลาการปลดปล่อยให้ยาวนานขึ้นกว่าระบบสารละลายในแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ไมโครแคปซูลช่วยชะลอการซึมผ่านผิวหนังให้ เป็นไปอย่างช้าๆ ภายในระยะเวลาการทดลอง 19 ชั่วโมง

2) ไลโปโซม (liposomes) งานวิจัยของ Bhalerao และคณะ (ค.ศ. 2003)⁽²⁶⁾ ศึกษาการผลิตไลโปโซมบรรจุ salicylic acid ด้วยเทคนิค thin film hydration พร้อมกับการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะและความคงตัว ผลจากการออกแบบการทดลองเบื้องต้นด้วย factorial design พบว่าระบบที่เตรียมโดยใช้ lecithin 10% cholesterol 0.25% และความเร็วยกวนในการปั่นผสม 120 rpm ให้ผลการบรรจุ salicylic acid ได้ดีที่สุดคือ 42.60% อนุภาคที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเฉลี่ย 0.2-0.826 μm ผลการศึกษาความคงตัว พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4-5°C เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทดลอง

3) นีโอโซม (niosomes) Junyaprasert และคณะ (ค.ศ. 2008)⁽²⁷⁾ ศึกษาผลของการใช้ membrane additives ต่างชนิดในการผลิตนีโอโซมบรรจุ salicylic acid ประกอบด้วย ชนิด negative charge (dicetylphosphate; DCP) ชนิด positive charge (stearylamine, STR)

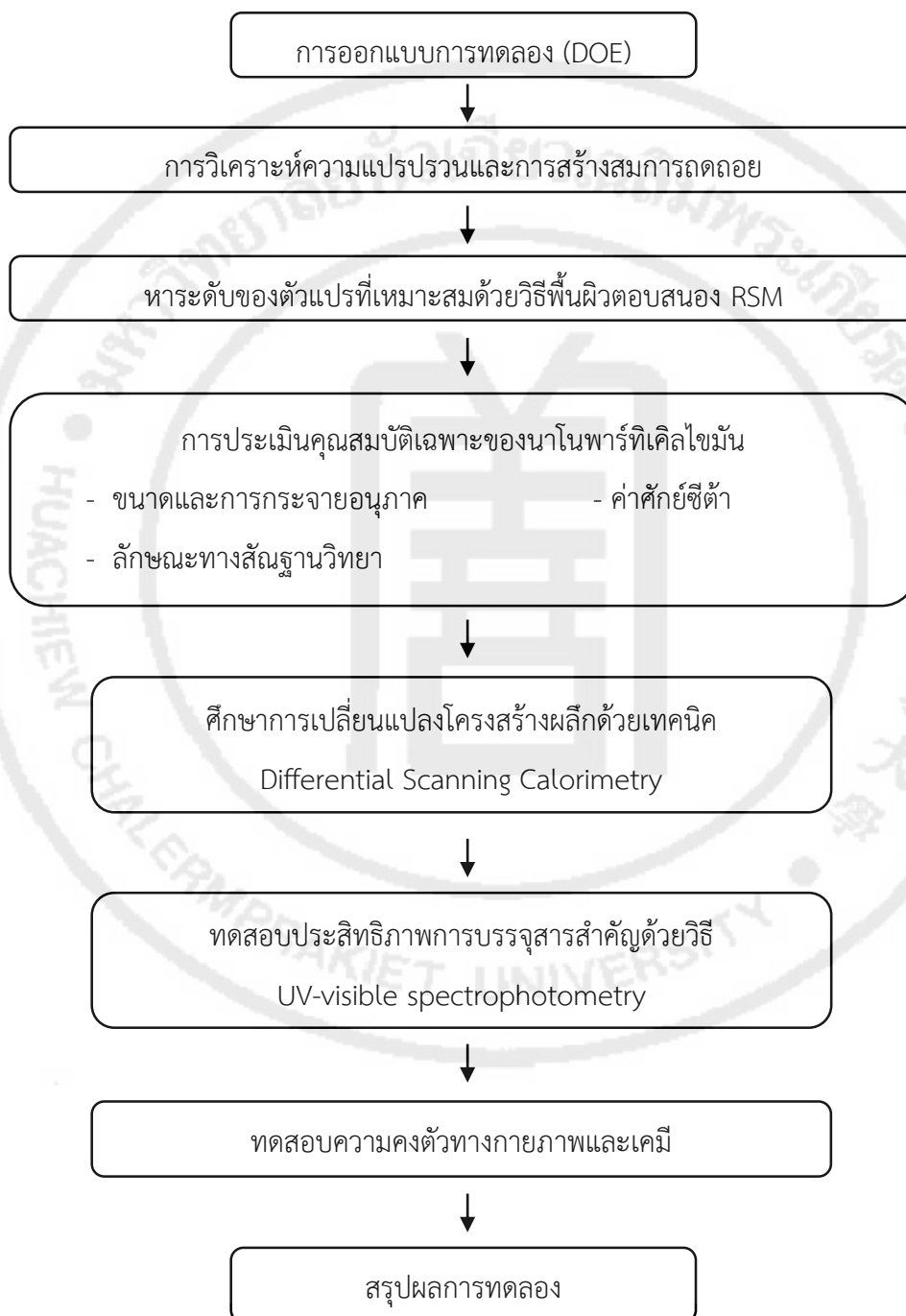
และชนิด non-ionic molecule (cholesteryl poly-24-oxyethylene ether, SC24) โดยทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพ ในระบบที่มีค่า pH ต่างกัน พบว่านี่ไอโซมแต่ละชนิดมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 217–360 nm โดยระบบ pH 3 มีความสามารถในการบรรจุ salicylic acid สูงกว่าที่ pH 5 ทำให้ทราบว่ากรดชนิดนี้ถูกกักเก็บได้ดีในสภาวะที่เป็น unionized form นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่า membrane ชนิดประจุบวก STR มีความสามารถในการบรรจุ salicylic acid สูงสุด ส่วนการศึกษาความคงตัวของ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ในระยะเวลา 3 เดือนแสดงให้เห็นว่า membrane ชนิดประจุบวกและไม่มีประจุสามารถทำให้อนุภาคคงขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตรได้ในขณะที่ membrane ชนิดประจุลบ DCP แสดงความไม่คงตัวที่ pH 3 แต่อย่างไรก็ตามนี่ไอโซมบรรจุกรดซาลิซิลิกทั้ง 3 ชนิด ยังมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญไว้อย่างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง

4) อนุภาคนาโนทรานสเฟอร์โซม (transfersomal nanoparticles) Abdellatif และ Abou-Taleb (ค.ศ. 2016) ⁽²⁸⁾ ได้พัฒนาระบบทรานสเฟอร์โซม (TRSs) เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งให้กับ salicylic acid รูปแบบใหม่โดยใช้วิธีการเตรียมแบบ thin film hydration method และศึกษาลักษณะทางกายภาพเปรียบเทียบกับทรานสเฟอร์โซมที่บรรจุซัลเฟอร์พบว่าขนาดอนุภาคของ TRSs บรรจุ salicylic acid มีขนาดใหญ่กว่า TRSs บรรจุซัลเฟอร์และ TRSs ไม่บรรจุสารสำคัญ คือ 230 ± 0.5 nm 212 ± 0.5 nm และ 210 ± 0.5 nm ตามลำดับ ค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -72 ± 0.5 mV, -24 ± 0.4 mV และ -41 ± 0.5 mV ตามลำดับ อนุภาค TRSs บรรจุ salicylic acid สามารถเตรียมลงในผลิตภัณฑ์เจลและช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานได้ดีกว่าการเตรียมในรูปแบบเจลทั่วไป

5) อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันแข็งและน้ำมัน (NLCs) ปีค.ศ. 2014 งานวิจัยของ Woo และคณะ ⁽²⁹⁾ ได้พัฒนาอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันเพื่ออุมการปลดปล่อย salicylic acid จากไขมันแข็ง stearic acid ร่วมกับไขมันเหลว oleic acid ที่ปริมาณแตกต่างกัน โดยการประยุกต์ใช้วิธี melt emulsification method ร่วมกับ ultra sonication technique พบว่า อนุภาคที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 271 ± 3 nm ถึง 332 ± 3 nm ค่าศักย์ซีต้าแสดงแนวโน้มความคงตัวที่ดีโดยมีค่าอยู่ในช่วง -39.4 ± 0.5 mV ถึง -45 ± 0.7 mV อนุภาคที่มีส่วนประกอบของ oleic acid 40% ของไขมันรวมในระบบ มีความสามารถในการบรรจุสารสำคัญสูงสุดถึง 69% salicylic acid ในรูปแบบสารละลายมีการปลดปล่อยผ่านเมมเบรนอย่างรวดเร็วภายใน 8 ชั่วโมง ในขณะที่อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีลักษณะการควบคุมการปลดปล่อยอย่างช้า ๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง 24 ชั่วโมง

2.4 กรอบแนวคิดในการศึกษา

แผนภูมิที่ 2 กรอบแนวคิดในการศึกษา



บทที่ 3 ระเบียบวิธีการศึกษา

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Centrifuge filter tube Amicon Ultra-4, 10kDa MW cut off จากบริษัท Merck (UFC801008) ประเทศเยอรมัน
2. Stearic acid จากบริษัท Panreac Applichem (Lot 0000587945) ประเทศสเปน
3. Salicylic acid จากบริษัท Ajax Finechem (Lot 1408251902) ประเทศออสเตรเลีย
4. Lexol[®] GT-865 (capric/caprylic triglyceride) จากบริษัท Inolex Chemical (Lot DC7019) ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. Tween[®] 80 (Polysorbate 80) จากบริษัท QRec (Lot 1538090919) ประเทศนิวซีแลนด์
6. Absolute ethanol จากบริษัท จากบริษัท Merck (Lot 1009832500) ประเทศเยอรมัน

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. High speed homogenizer จากบริษัท Heidolph ประเทศเยอรมัน
2. C-MAG HS 7 hot plate stirrer จากบริษัท IKA ประเทศเยอรมัน
3. Nanosizer Delsa[™] Nano C จากบริษัท Beckman Coulter Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Centrifuge จากบริษัท Hettich ประเทศเยอรมัน
5. UV/visible spectrophotometer จากบริษัท Varian ประเทศออสเตรเลีย
6. Microscope ECLIPSE 50i จากบริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น
7. Scanning electron microscope จากบริษัท LEO ประเทศอังกฤษ
8. Differential scanning calorimeter จากบริษัท Perkin Elmer ประเทศญี่ปุ่น
9. Differential scanning calorimeter NETZSCH model จากบริษัท Phoenix ประเทศอังกฤษ
10. Alpha 1-2 freeze dryer จากบริษัท Martin Christ Inc. ประเทศเยอรมัน
11. pH meter จากบริษัท Schott ประเทศเยอรมัน

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การทดลองเบื้องต้น

1) การคัดเลือกระบบไขมัน⁽⁷⁾

การทดลองเบื้องต้นเริ่มจากการคัดเลือกระบบไขมัน โดยทดสอบความสามารถของไขมันหลอมที่ใช้ทำละลาย salicylic acid ประกอบด้วยไขมันแข็ง stearic acid ร่วมกับน้ำมันที่คัดเลือกไว้ 3 ชนิดได้แก่ oleic acid, isopropyl myristate (IPM) และ capric/caprylic triglyceride (การทดลองนี้ใช้ชื่อทางการค้า Lexol[®] GT-865) ในอัตราส่วนไขมันแข็งต่อน้ำมันเท่ากับ 70:30 ทำการหลอมที่อุณหภูมิ 75°C จากนั้นทดสอบการทำละลายโดยค่อยๆหยดไขมันหลอมด้วยกระบอกฉีดยาลงใน salicylic acid ที่ชั่งน้ำหนักเตรียมไว้ 0.5 g ร่วมกับการปั่นผสมที่ 100 rpm ด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 75°C สังเกตการละลายของ salicylic acid ด้วยตาเปล่า เมื่อถึงจุดที่ละลายหมดจะได้ส่วนผสมเป็นสารละลายใสและเปรียบเทียบปริมาณไขมันที่ใช้โดยวิธีการชั่งน้ำหนักก่อน-หลังโดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2) การปรับความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิว

การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันโดยใช้เทคนิคไมโครอิมัลชันมีจุดประสงค์ในการใช้พลังงาน ความร้อน หรือแรงปั่น เพื่อลดขนาดอนุภาคของหยดอิมัลชันเบื้องต้นให้มีขนาดเล็กอยู่ในระดับนาโนเมตร ซึ่งลักษณะภายนอกที่สังเกตได้จะเป็นอิมัลชันใส โดยสีที่ปรากฏนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของไขมันและสารลดแรงตึงผิว ขั้นตอนการผลิตจะเริ่มจากการหลอมละลายส่วนผสมของอิมัลชันเบื้องต้นให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันแข็ง 5-10°C ก่อนที่จะกระจายตัวลงในน้ำเย็นจัดเพื่อฟอร์มเป็นอนุภาคไขมันแข็งระดับนาโนเมตร

งานวิจัยนี้ต้องการผลิตนาโนพาร์ทิเคิลไขมันชนิด NLCs โดยเตรียมเป็นอิมัลชันใสที่สภาวะอุณหภูมิ 75°C ก่อนที่จะทำการกระจายอนุภาคเป็นไขมันแข็งในน้ำเย็น ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นด้วยปริมาณ total lipid เท่ากับ 10%w/v โดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่หาได้ง่ายในห้องปฏิบัติการได้แก่ Tween[®] 80 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 15, 20 และ 25%w/v ร่วมกับ ethanol ความบริสุทธิ์ 95% เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของอิมัลชันเบื้องต้นและผลิตภัณฑ์นาโนพาร์ทิเคิลที่ได้ โดยส่วนประกอบในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นแบ่งออกเป็น 2 ภูมิภาค ดังนี้

| | |
|-----------------------------|---------------------------|
| ภูมิภาคน้ำมัน: Stearic acid | 70% ของปริมาณ total lipid |
| Lexol [®] GT-865 | 30% ของปริมาณ total lipid |
| Salicylic acid | 0.5%w/w |

| | | |
|------------|-----------------|---------------------------------|
| วัฏภาคน้ำ: | Tween® 80 | 5–25%w/v |
| | Ethanol 95% | ร่วมกับ Tween® 80 อัตราส่วน 1:1 |
| | น้ำปราศจากไอออน | ถึง 100% |

ในขั้นตอนการผลิต เริ่มจากการให้ความร้อนแก่สารทั้ง 2 วัฏภาคที่อุณหภูมิ 75°C จากนั้นผสมทั้ง 2 วัฏภาค เข้าด้วยกันที่อุณหภูมิ 75°C ให้เกิดเป็นอิมัลชันเบื้องต้น โดยค่อย ๆ เท วัฏภาคน้ำมันเป็นสายลงในวัฏภาคน้ำพร้อมกับการปั่นผสมด้วยเครื่อง high speed homogenizer โดยใช้ความเร็วรอบเท่ากับ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

เตรียมเป็นนาโนพาร์ทิเคิลโดยการหยดอิมัลชันเบื้องต้นที่ได้ด้วยเข็มฉีดยาลงในน้ำ ปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:20 ที่อุณหภูมิ 2-3°C อย่างรวดเร็วพร้อมการปั่นให้เกิดการกระจายตัว ที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่ได้บรรจุใส่ภาชนะปิดสนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1°C

ประเมินผลิตภัณฑ์โดยการสังเกตลักษณะปรากฏของอิมัลชันเบื้องต้น และตรวจวัด การกระจายขนาดของอนุภาคของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุ salicylic acid (NLCs-SA) และทดสอบ ความสามารถในการบรรจุสารสำคัญเบื้องต้น โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังปรากฏในหัวข้อ 3.3.3 และ 3.3.6 ภายหลังจากการเตรียม 24 ชั่วโมง

3.3.2 การออกแบบการทดลอง

งานวิจัยฉบับนี้ใช้การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design กำหนดตัวแปร อิสระในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MINITAB software (Trial Version 17, Minitab Inc., สหรัฐอเมริกา) จำนวน 3 ตัวแปร ดังปรากฏในภาคผนวก ก เพื่อทำการทดลองเตรียม อิมัลชันเบื้องต้นบรรจุ salicylic acid ให้ได้ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ที่มีอนุภาคขนาดเล็ก ตัวแปรอิสระ ที่ต้องการศึกษา ได้แก่ ปริมาณ total lipid (%w/v) อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol® GT-865 และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 (%w/v) กำหนดให้แต่ละตัวแปรที่ศึกษามีจำนวน 3 ระดับ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การกำหนดตัวแปรอิสระและผลตอบสนอง

| Variables | Levels | | |
|---|---------------------------|-------------------|------------------|
| Independent variables | Low (-1) | Medium (0) | High (+1) |
| $X_1 = \text{Total lipid (\%w/v)}$ | 5 | 7.5 | 10 |
| $X_2 = \text{Stearic acid: Lexol}^{\text{®}} \text{GT-865}$ | 1.5:1 | 2.75:1 | 4:1 |
| $X_3 = \text{Tween}^{\text{®}} \text{80 (\%w/v)}$ | 15 | 20 | 25 |
| Dependent variables | Response optimizer | | |
| $Y = \text{Mean particle size}$ | Minimize | | |

ส่วนประกอบในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นแบบบรรจุ salicylic acid ด้วยเทคนิค ไมโครอิมัลชันจากการออกแบบการทดลอง Box-Behnken design แบ่งออกเป็น 2 ภูมิภาค ดังนี้

| | |
|-----------------------------------|---|
| ภูมิภาคน้ำมัน: Stearic acid | 60-80% ของปริมาณ total lipid |
| Lexol [®] GT-865 | 20-40% ของปริมาณ total lipid |
| Salicylic acid | 0.5%w/w |
| ภูมิภาคน้ำ: Tween [®] 80 | 15-25%w/v |
| Ethanol 95% | ร่วมกับ Tween [®] 80 อัตราส่วน 1:1 |
| น้ำปราศจากไอออน | ถึง 100% |

ในขั้นตอนการผลิต เริ่มจากการให้ความร้อนแก่สารทั้ง 2 ภูมิภาคที่อุณหภูมิ 75°C จากนั้นผสมทั้ง 2 ภูมิภาค เข้าด้วยกันที่อุณหภูมิ 75°C ให้เกิดเป็นไมโครอิมัลชันเบื้องต้นโดยเทภูมิภาค น้ำมันเป็นสายลงในภูมิภาคน้ำพร้อมกับการปั่นผสมด้วยเครื่อง high speed homogenizer โดยเพิ่มความเร็วยกจากการทดลองเบื้องต้นเท่ากับ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

เตรียมเป็นนาโนพาร์ทิเคิลโดยการหยุดอิมัลชันเบื้องต้นที่ได้ด้วยเข็มฉีดยาลงในน้ำ ปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:20 ที่อุณหภูมิ 2-3°C อย่างรวดเร็วพร้อมการปั่นให้เกิดการกระจายตัว ที่ความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่ได้บรรจุใส่ภาชนะปิดสนิทและ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1°C

ประเมินผลิตภัณฑ์ NLCs-SA จากการออกแบบการทดลอง Box-Behnken design โดยการสังเกตลักษณะปรากฏของอิมัลชันเบื้องต้น และตรวจวัดการกระจายขนาดของอนุภาคของ NLCs-SA ภายหลังจากการเตรียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นจาก Box-Behnken design

| Run order | X ₁ Total lipid (%w/v) | X ₂ Stearic acid: Lexol [®] GT-865 | X ₃ Tween [®] 80 (%w/v) |
|-----------|--------------------------------------|---|--|
| 1 | 7.5 | 2.75:1 | 20 |
| 2 | 7.5 | 1.5:1 | 25 |
| 3 | 10 | 1.5:1 | 20 |
| 4 | 7.5 | 2.75:1 | 20 |
| 5 | 7.5 | 2.75:1 | 20 |
| 6 | 7.5 | 1.5:1 | 15 |
| 7 | 7.5 | 2.75:1 | 20 |
| 8 | 5 | 4:1 | 20 |
| 9 | 10 | 2.75:1 | 25 |
| 10 | 7.5 | 4:1 | 25 |
| 11 | 10 | 4:1 | 20 |
| 12 | 7.5 | 4:1 | 15 |
| 13 | 5 | 1.5:1 | 20 |
| 14 | 7.5 | 2.75:1 | 20 |
| 15 | 10 | 2.75:1 | 15 |
| 16 | 5 | 2.75:1 | 25 |
| 17 | 5 | 2.75:1 | 15 |

3.3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองจาก Box-Behnken design

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์จาก Box-Behnken design ดังตารางที่ 5 แล้ว ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี response surface methodology (RSM) โดยการตั้งค่าผลตอบสนองในโปรแกรมสำเร็จรูป MINITAB software (Trial Version 17, Minitab Inc., สหรัฐอเมริกา) อันประกอบด้วย regression analysis, analysis of variance (ANOVA) และ response surface plot เพื่อศึกษาอิทธิพลจาก ตัวแปรอิสระ และประมาณค่าของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นให้ได้ผลตอบสนองเป็นผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ที่มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุดในระบบตัวแปรอิสระที่ทำการศึกษา ตามขั้นตอนดังนี้

1. คัดเลือกสมการแบบจำลองที่ใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาค
2. ตรวจสอบความเหมาะสมของสมการแบบจำลอง
3. ศึกษานัยสำคัญของตัวแปรอิสระจากสมการแบบจำลอง

4. ศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาค

5. ประมาณค่าของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้น

จากนั้นเตรียมตัวอย่างในรูปแบบของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันไม่บรรจุ salicylic acid (NLCs) เพื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพและความคงตัวในระยะเวลาการทดลอง 90 วัน ที่อุณหภูมิการเก็บรักษา $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$

3.3.4 การวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้า

ประเมินลักษณะทางกายภาพของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่เตรียมได้โดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค Beckman Coulter รุ่น Delsa™ Nano C เจือจางตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs ในอัตราส่วน 1:2 ด้วยน้ำปราศจากไอออนและตั้งทิ้งไว้ที่สภาวะอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาทีแล้วเริ่มวิเคราะห์ตามขั้นตอนดังนี้

1) การวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาค

ทำการวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ย (mean particle size) และดัชนีการกระจายขนาด (polydispersity index; PI) โดยเตรียมตัวอย่างลงใน quartz cuvette cell ให้ถึงระดับที่เซ็นเซอร์สามารถตรวจวัดได้ จากนั้นเริ่มตั้งโปรแกรมการตรวจวัด particle size measurement ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการตรวจวัดที่ 25°C จำนวนซ้ำ 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง บันทึกผลการวัดขนาดอนุภาค พร้อมกับค่า PI

2) การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า

การวัดค่าศักย์ซีต้า (zeta potential; ZP) เตรียมตัวอย่างลงใน flow cell จากนั้นตั้งโปรแกรมการตรวจวัด zeta potential measurement โดยควบคุมอุณหภูมิระหว่างการตรวจวัดที่ 25°C จำนวนซ้ำ 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง บันทึกผลการวัดค่า ZP ในหน่วย mV

3.3.5 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการตรวจสอบลักษณะการกระจายตัวเบื้องต้นของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันจากการทดลอง Box-Behnken design ด้วยกล้อง Nikon microscope ECLIPSE 50i พร้อมกับโปรแกรม NIS element imaging software และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคของตำรับคัดเลือกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) โดยเตรียมหยดตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs ลงบน carbon-coated grid (3 grids ต่อ 1 ตัวอย่าง) รอให้แห้งและปราศจากความชื้นใน desiccator เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย accelerating voltage 15 kV ที่สภาวะอุณหภูมิ 25°C

3.3.6 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก⁽³⁰⁾

ตรวจสอบระดับความเป็นผลึก (degree of crystallization; DC) และติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก (polymorphic transformations) ด้วยเครื่องมือ differential scanning calorimeter (DSC) โดยเตรียมตัวอย่างไขมันแข็ง stearic acid เป็นไขมันอ้างอิงในรูปแบบผลึกสมบูรณ์หรือ 100%DC และเตรียมไขมันผสม stearic acid: Lexol[®] GT-865 ตามอัตราส่วนที่ได้จากการประมาณค่าในหัวข้อ 3.3.3 คือ 4:1 เป็นไขมันต้นแบบ (bulk lipid) ด้วยการหลอมไขมันที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 30 นาที และสำหรับตัวอย่างนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน NLCs-SA และ NLCs เตรียมโดยการทำแห้งในเครื่อง freeze dry เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างทั้งหมดเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±1°C ก่อนทำการวิเคราะห์

ซึ่งตัวอย่าง stearic acid, bulk lipid, NLCs-SA และ NLCs ประมาณ 7-8 mg ลงใน aluminium pan (40 µL) เริ่มการวิเคราะห์ที่สภาวะ heating run 10–200°C โดยใช้ heating-cooling rate ต่อเนื่อง 5 K/min ภายใต้ inert nitrogen 70 ml/min ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงเป็นค่า melting point (m.p.) และค่า enthalpy (ΔH) จากนั้นนำมาคำนวณหาร้อยละของระดับความเป็นผลึกตามสมการ

$$\text{Degree of crystallization, DC (\%)} = \frac{\Delta H_{\text{sample}}}{\Delta H_{\text{bulk lipid}}} \times 100\%$$

เมื่อกำหนดให้ ΔH_{sample} และ $\Delta H_{\text{bulk lipid}}$ คือค่า enthalpy ของตัวอย่างอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันและไขมันต้นแบบตามลำดับ โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของ NLCs-SA และ NLCs ใน 2 ช่วงเวลา คือ ภายหลังจากกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (freshly prepared) และภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1°C เป็นเวลา 60 วัน

3.3.7 การประเมินความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ

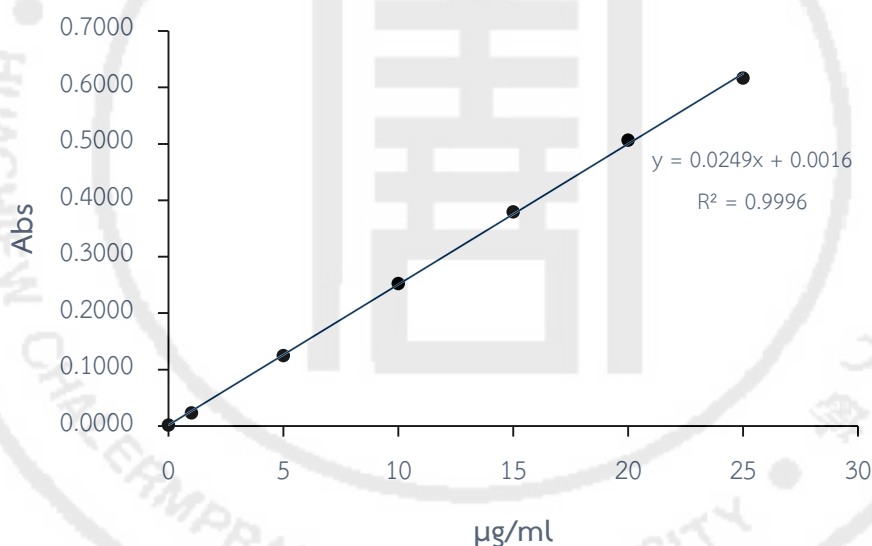
1) สร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย salicylic acid ใน absolute ethanol ร่วมกับน้ำปราศจากไอออนอัตราส่วน 1:9 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 - 25 µg/ml และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 296 nm จากนั้นพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสงดังแผนภูมิที่ 3

2) วิเคราะห์หาปริมาณ free salicylic acid

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค ultra filtration method ⁽²⁹⁾ ในการวิเคราะห์หาปริมาณ salicylic acid ที่ไม่ถูกกักเก็บในอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน โดยเริ่มจากการชั่งตัวอย่างนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุ salicylic acid 4.00 g ลงใน centrifuge filter tube (10kDa MW cut off) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 5 รอบที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นเปิดตัวอย่างส่วนใสจาก centrifuge filter tube เจือจางด้วย absolute ethanol และน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วนเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เตรียมได้ และคำนวณหาปริมาณของ salicylic acid ด้วยสมการ $y = mx + b$ จากกราฟมาตรฐาน

แผนภูมิที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง



ความเข้มข้นที่ได้จากกราฟมาตรฐานคือปริมาณ free salicylic acid ที่พบในส่วนของสารละลายใสจาก filter tube นำมาใช้ประเมินความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญ โดยหักลบจากปริมาณ salicylic acid เริ่มต้นที่เติมในตำรับ คำนวณเป็นค่าร้อยละตามสมการ

$$\text{Encapsulation efficacy, EE (\%)} = \left(\frac{W_T - W_F}{W_T} \right) \times 100$$

เมื่อกำหนดให้ W_T คือปริมาณของ salicylic acid ที่เติมในตำรับ และ W_F คือปริมาณ free salicylic acid ที่ได้จากการวิเคราะห์

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การทดลองเบื้องต้น

4.1.1 การคัดเลือกระบบไขมัน

จากการทดลองคัดเลือกระบบไขมันแข็ง stearic acid ร่วมกับน้ำมันทั้ง 3 ชนิด ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความสามารถในการทำละลาย salicylic acid ของไขมันแต่ละระบบ

| ไขมันแข็ง:น้ำมัน (70:30) | Salicylic acid (g) | ไขมันหลอมที่ใช้ (g) | การละลายของ salicylic acid ต่อไขมันหลอม 1 g |
|---|-----------------------|------------------------|--|
| Stearic acid: Oleic acid | 0.5 | 3.23±0.01 | 0.155 |
| Stearic acid: IPM | 0.5 | 3.44±0.01 | 0.145 |
| Stearic acid: Lexol [®] GT-865 | 0.5 | 2.98±0.01 | 0.168 |

หมายเหตุ: ปริมาณไขมันหลอมที่ใช้แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (mean±SD)

จากการทดสอบการทำละลาย โดยใช้ไขมันหลอมทั้ง 3 ระบบที่อัตราส่วน 70:30 พบว่า ไขมันหลอมที่ใช้ทำละลาย salicylic acid 0.5 g ได้ดีที่สุด ได้แก่ stearic acid: Lexol[®] GT-865 โดยมีค่าความสามารถในการละลายของ salicylic acid เท่ากับ 0.168 g ต่อไขมันหลอม 1 g รองลงมา ได้แก่ ระบบ stearic acid: oleic acid มีความสามารถในการละลายของ salicylic acid เท่ากับ 0.155 g ต่อไขมันหลอม 1 g และระบบที่ทำละลายได้น้อยที่สุดคือ stearic acid: IPM ความสามารถในการละลายของ salicylic acid เท่ากับ 0.145 g ต่อไขมันหลอม 1 g โดยจากการคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากไขมันหลอมทั้ง 3 ระบบ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบนี้ทำให้ทราบว่าหากต้องการเตรียมตัวอย่าง NLCs-SA จำเป็นต้องใช้ปริมาณไขมันหลอมอย่างน้อย 6-7 เท่าของ salicylic acid จึงจะสามารถทำละลายและเตรียมเป็นอิมัลชันเบื้องต้นได้

วิธีทดสอบดังกล่าวเป็นวิธีเบื้องต้นที่ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถตั้งสมมติฐานถึงโอกาสที่ระบบ NLCs จะสามารถบรรจุ salicylic acid ได้ในปริมาณสูง เนื่องจากการละลายได้ดีในระบบไขมันที่เลือกใช้ ผู้วิจัยจึงเริ่มต้นเตรียมตำรับโดยการใช้ระบบไขมัน stearic acid: Lexol[®] GT-865 ซึ่งให้ผลการทำละลาย salicylic acid ได้ดีที่สุดในอัตราส่วน 70:30 มาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.1.2 การปรับความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิว

วิธีการประเมินที่ง่ายที่สุดจากการใช้เทคนิคไมโครอิมัลชันคือการสังเกตอิมัลชันเบื้องต้นที่มีลักษณะใส โดยผลจากการทดลองปรับความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25%w/v ร่วมกับ ethanol ความบริสุทธิ์ 95% ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าลักษณะอิมัลชันเบื้องต้นที่ได้มีความแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 5 ณ อุณหภูมิ 75°C อิมัลชันเบื้องต้นที่มีสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้นเท่ากับ 25%w/v และ 20%w/v มีลักษณะใส ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15%w/v อิมัลชันมีลักษณะค่อนข้างขุ่นเป็นเนื้อเดียวกัน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10%w/v อิมัลชันมีลักษณะแยกชั้น และที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5%w/v อิมัลชันมีลักษณะขุ่นขาว และมีหยดน้ำมันขนาดเล็กกระจายอยู่บนผิวของอิมัลชัน โดยผลการวัดการกระจายขนาดอนุภาคและความสามารถในการบรรจุสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ NLCs-SA หลังจากการเตรียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากอิมัลชันเบื้องต้นทั้ง 5 ดำรับแสดงในตารางที่ 8

ภาพที่ 5 ลักษณะปรากฏของอิมัลชันเบื้องต้น ณ อุณหภูมิ 75°C จากการปรับความเข้มข้นของ Tween® 80 เริ่มจากภาพซ้ายเท่ากับ 25, 20, 15, 10 และ 5%w/v ตามลำดับ



ตารางที่ 8 ลักษณะปรากฏของอิมัลชันเบื้องต้น ผลการวัดการกระจายขนาดอนุภาค และความสามารถในการบรรจุสารสำคัญของตัวอย่าง NLCs-SA ที่มี Tween® 80 ความเข้มข้นต่างกัน

| สารลดแรงตึงผิว (%w/v) | ลักษณะปรากฏ | Particle size (nm) | PI | EE (%) |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------------|------------|--------|
| 25.00 | อิมัลชันใสสีเหลือง | 249.03±3.09 | 0.136±0.01 | 74.70 |
| 20.00 | อิมัลชันใสสีเหลือง | 300.83±1.36 | 0.212±0.03 | 71.66 |
| 15.00 | อิมัลชันค่อนข้างขุ่นเป็นเนื้อเดียวกัน | 349.57±3.13 | 0.245±0.02 | 68.16 |
| 10.00 | อิมัลชันแยกชั้น | 528.33±5.25 | 0.224±0.00 | N/A |
| 5.00 | อิมัลชันขุ่นขาวมีหยดน้ำมันเล็กๆ | 757.73±10.13 | 0.217±0.01 | N/A |

หมายเหตุ: ผลการวัดการกระจายขนาดอนุภาคเป็นค่าเป็นค่าเฉลี่ยจากการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง (mean±SD)

ผลการทดลองตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง NLCs-SA ที่มีสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 ความเข้มข้น 25%w/v มีขนาดอนุภาคเล็ก มีการกระจายขนาดแคบ และมีความสามารถในการบรรจุ salicylic acid ได้สูงถึง 74.70%w/v และตัวอย่างที่มีสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 20%w/v มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น การกระจายขนาดกว้างขึ้น และมีความสามารถในการบรรจุ salicylic acid ลดลงเท่ากับ 71.66%w/v โดยที่ทั้งสองตัวอย่างมีลักษณะของอิมัลชันใส ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสังเกตว่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวอาจมีผลต่อการกระจายขนาดอนุภาคและความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ

หากพิจารณาอีกหนึ่งผลการทดลองเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นของตัวอย่าง NLCs-SA ที่มีสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 15%w/v ไม่ได้มีลักษณะทางกายภาพเป็นอิมัลชันใส แต่อิมัลชันเบื้องต้นยังมีความเป็นเนื้อเดียว และมีความสามารถในการบรรจุสารสำคัญที่ระดับหนึ่ง เมื่อพิจารณาขนาดอนุภาคของ NLCs-SA ที่ได้ยังมีขนาดเล็กกว่า 500 nm และมีค่า PI ต่ำกว่า 0.25 ดังนั้นผู้วิจัยจึงมองเห็นแนวโน้มของโอกาสที่ระบบดังกล่าวจะมีลักษณะทางกายภาพที่ดีขึ้น คือ อาจทำให้อิมัลชันมีลักษณะใส ผลผลิตภัณฑ์ NLCs-SA มีอนุภาคขนาดเล็ก และอาจบรรจุสารสำคัญได้ในปริมาณสูงเมื่อทำการลดสัดส่วนของวัฏภาคน้ำมันโดยใช้สารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 15%w/v

จากการทดลองเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าสิ่งที่ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพของอิมัลชันเบื้องต้นและผลผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ต้องพิจารณาจากหลายปัจจัยประกอบกัน การเตรียมอิมัลชันใสจากเทคนิคไมโครอิมัลชันจำเป็นต้องเตรียมระบบที่มีสัดส่วนของวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันอย่างเหมาะสม ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาระบบการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นด้วยการปรับสัดส่วนของสารองค์ประกอบที่ปริมาณแตกต่างกัน โดยใช้หลักการออกแบบการทดลองทางสถิติเพื่อศึกษาอิทธิพลจากปัจจัยเหล่านั้น และประเมินผลการทดลองที่ได้ด้วยการวัดขนาดอนุภาค ดังแสดงในหัวข้อที่ 4.2

4.2 การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design

ผลจากการทดลอง Box-Behnken design ด้วยตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร ได้แก่ ปริมาณ total lipid (%w/v), อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol® GT-865 และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 (%w/v) ทั้ง 3 ระดับ ได้ผลการวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ย (mean particle size) ของตัวอย่าง NLCs-SA จากระบบอิมัลชันเบื้องต้นทั้งหมด 17 ชุด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9

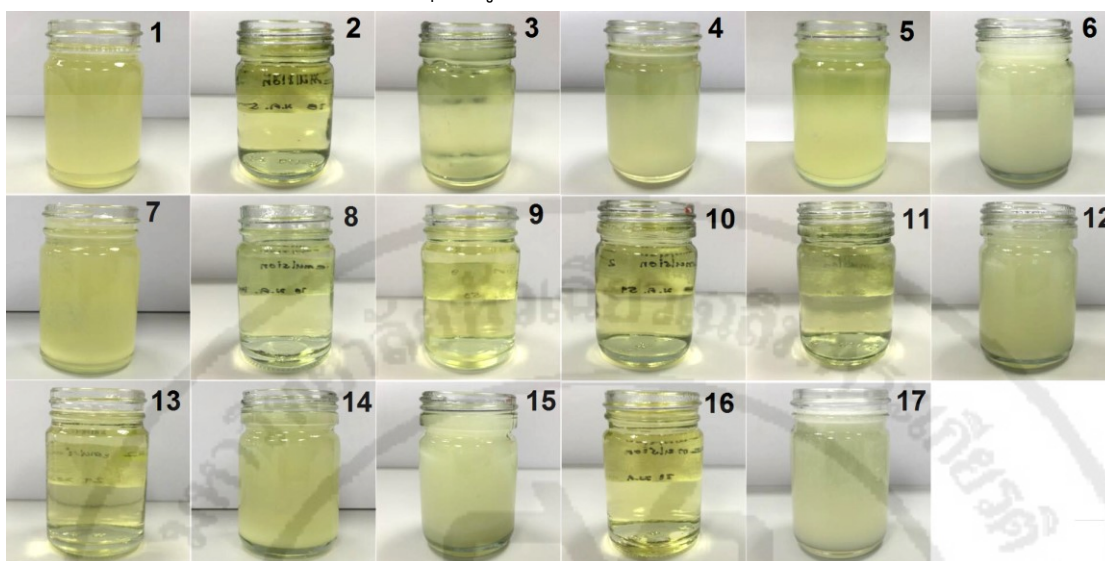
ตารางที่ 9 ผลการทดลองจาก Box-Behnken design

| Run order | X ₁ Total lipid (%w/v) | X ₂ Stearic acid: Lexol® GT-865 | X ₃ Tween® 80 (%w/v) | Y Mean particle size (nm) |
|-----------|---|--|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 321.57±5.82 |
| 2 | 7.5 | 1.5:1 | 25 | 1,418.47±47.51 |
| 3 | 10 | 1.5:1 | 20 | 329.23±2.87 |
| 4 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 338.00±2.90 |
| 5 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 294.61±13.93 |
| 6 | 7.5 | 1.5:1 | 15 | 239.89±2.19 |
| 7 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 307.07±13.51 |
| 8 | 5 | 4:1 | 20 | 1,202.70±41.91 |
| 9 | 10 | 2.75:1 | 25 | 217.87±1.84 |
| 10 | 7.5 | 4:1 | 25 | 386.43±0.97 |
| 11 | 10 | 4:1 | 20 | 196.07±5.12 |
| 12 | 7.5 | 4:1 | 15 | 219.47±1.10 |
| 13 | 5 | 1.5:1 | 20 | 1,074.57±192.83 |
| 14 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 301.60±4.57 |
| 15 | 10 | 2.75:1 | 15 | 312.60±8.53 |
| 16 | 5 | 2.75:1 | 25 | 1,078.97±28.83 |
| 17 | 5 | 2.75:1 | 15 | 249.47±1.16 |

หมายเหตุ: ผลการวัดขนาดอนุภาคเป็นค่าเฉลี่ยจากการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นจำนวน 3 ซ้ำ (mean±SD)

จากผลการทดลอง Box-Behnken design ตารางที่ 9 พบว่าระบบอิมัลชันเบื้องต้นจากตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปร ให้ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยตั้งแต่ 196.07±5.12 nm จนถึง 1,418.47±47.51 nm หลังจากการผลิตและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยระบบอิมัลชันเบื้องต้นจากชุดทดลองที่ 11 คือปริมาณ total lipid เท่ากับ 10%w/v อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol® GT-865 เท่ากับ 4:1 และความเข้มข้นของ Tween® 80 เท่ากับ 20%w/v ให้ผลการวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กที่สุด ซึ่งมีลักษณะอิมัลชันเบื้องต้นเป็นอิมัลชันใสสีเหลือง ดังภาพที่ 6

ภาพที่ 6 ลักษณะอิมัลชันเบื้องต้น ณ อุณหภูมิ 75°C จาก Box-Behnken design



จากภาพที่ 6 อิมัลชันเบื้องต้นที่ปรากฏลักษณะเป็นอิมัลชันใสได้แก่ ชุดการทดลองที่ 2, 3, 8, 9, 10, 11, 13 และชุดการทดลองที่ 16 โดยให้ลักษณะปรากฏเช่นเดียวกันเมื่อเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นทั้งหมด 3 ชั่วโมง หากพิจารณาผลการวัดขนาดอนุภาค NLCs-SA จากชุดการทดลองเหล่านี้พบว่าอิมัลชันใสทั้ง 8 ชุดการทดลอง ให้ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ที่มีขนาดอนุภาคแตกต่างกันคือ $1,418.47 \pm 47.51$ nm, 329.23 ± 2.87 nm, $1,202.70 \pm 41.91$ nm, 217.87 ± 1.84 nm, 386.43 ± 0.97 nm, 196.07 ± 5.12 nm, $1,074.57 \pm 192.83$ nm และ $1,078.97 \pm 28.83$ nm ตามลำดับ ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าส่วนใหญ่ได้ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 1,000 nm

ผลการทดลองข้างต้นช่วยตอบข้อสันนิษฐานของผู้วิจัยที่ว่า การเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นให้มีลักษณะใส ณ อุณหภูมิ 75°C จะได้ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ที่มีอนุภาคขนาดเล็กนั้นอาจไม่เป็นจริงเสมอไป จึงจำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์ผลทางสถิติในการศึกษาอิทธิพลจากตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปรพร้อมกัน เพื่อหาระบบที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นให้ได้ NLCs-SA อนุภาคขนาดเล็กตามวิธีการของ response surface methodology (RSM) ด้วยโปรแกรม MINITAB ตามหัวข้อที่ 4.3

4.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองจาก Box-Behnken design

4.3.1 การคัดเลือกสมการแบบจำลอง

ใช้ตัวเลือก analysis response surface design (ภาคผนวก ข) จากโปรแกรม MINITAB ในการคัดเลือกสมการแบบจำลอง ที่สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคอันเกิดจากตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปร โดยรูปแบบของสมการแบบจำลอง regression analysis มีทั้งหมด 4 รูปแบบ⁽³¹⁾ ดังสมการที่ (1) ถึง (4) โดยกำหนดให้ค่า Y คือขนาดอนุภาคเฉลี่ย X_i คือ

ตัวแปรอิสระ θ_0 คือค่าคงที่ (constant) ของสมการแบบจำลอง และ $\theta_1, \theta_2, \theta_3$ คือค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (coefficient) ของแต่ละตัวแปรอิสระในสมการแบบจำลอง regression model ดังนี้

$$\text{Linear model : } Y = \theta_0 + \theta_1 X_1 + \theta_2 X_2 + \theta_3 X_3 \quad (1)$$

$$\text{Linear+square model : } Y = \theta_0 + \theta_1 X_1 + \theta_2 X_2 + \theta_3 X_3 + \theta_{11} X_1^2 + \theta_{22} X_2^2 + \theta_{33} X_3^2 \quad (2)$$

$$\text{Linear+interaction model : } Y = \theta_0 + \theta_1 X_1 + \theta_2 X_2 + \theta_3 X_3 + \theta_{12} X_1 X_2 + \theta_{13} X_1 X_3 \quad (3)$$

$$\text{Full quadratic model : } Y = \theta_0 + \theta_1 X_1 + \theta_2 X_2 + \theta_3 X_3 + \theta_{11} X_1^2 + \theta_{22} X_2^2 + \theta_{33} X_3^2 + \theta_{12} X_1 X_2 + \theta_{13} X_1 X_3 \quad (4)$$

เกณฑ์การคัดเลือกแบบจำลองที่อธิบายผลการทดลองได้ดีที่สุดคือการพิจารณาจากค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (S) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแต่ละแบบจำลองเปรียบเทียบกัน จากการใช้โปรแกรม MINITAB ประมวลผลด้วยวิธี response surface methodology (RSM) ได้ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของแต่ละแบบจำลองดังตารางที่ 10 โดยค่า R^2_{adj} ในตารางคือค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วใช้ประกอบการพิจารณาเมื่อข้อมูลมีจำนวนน้อยกว่า 30 ตัวอย่าง⁽¹³⁾

ตารางที่ 10 ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของแบบจำลอง

| Model | R^2 | R^2_{adj} | S |
|--------------------|--------|-------------|---------|
| Linear | 0.5662 | 0.4661 | 296.687 |
| Linear+square | 0.7023 | 0.5237 | 280.214 |
| Linear+interaction | 0.7506 | 0.6010 | 256.484 |
| Full quadratic | 0.8867 | 0.7411 | 206.582 |

จากตารางพบว่าแบบจำลอง full quadratic มีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (S) น้อยที่สุดคือ 206.582 และมีค่า R^2 และ R^2_{adj} สูงสุดคือ 0.8867 และ 0.7411 ตามลำดับดังนั้นสมการแบบจำลอง full quadratic มีความเหมาะสมสำหรับการอธิบายอิทธิพลของตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปร ที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคของ NLCs-SA โดยแสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรดังสมการที่ (5)

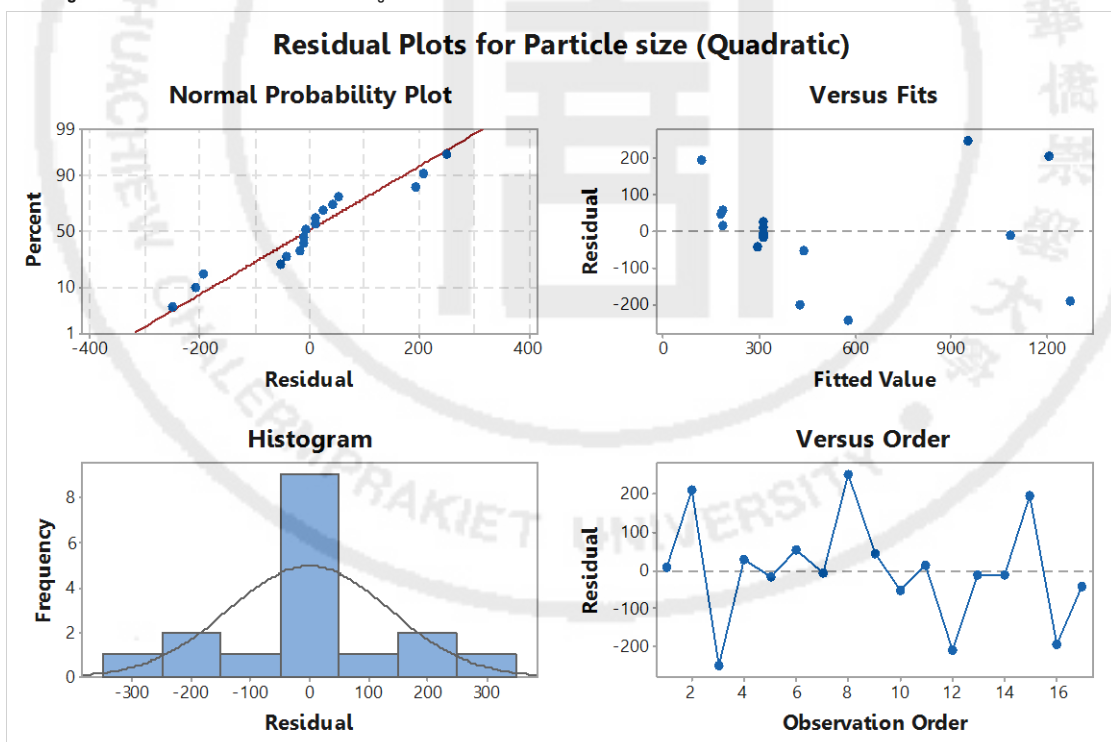
$$\begin{aligned} \text{Particle size (Y)} = & -2,295 -44 X_1 -1X_2 +288 X_3 +22.9 X_1^2 +156.6 X_2^2 +0.35 X_3^2 \\ & -20.9 X_1 X_2 -18.48 X_1 X_3 -40.5 X_2 X_3 \end{aligned} \quad (5)$$

4.3.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการแบบจำลอง ⁽¹⁴⁾, ⁽³²⁾, ⁽³³⁾

1) การตรวจสอบข้อมูลเศษเหลือ

เมื่อได้สมการแบบจำลอง full quadratic ที่ใช้อธิบายอิทธิพลของตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปร ที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคของ NLCs-SA แล้ว การใช้ regression analysis ยังมีเงื่อนไขในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระคือ ข้อมูลเศษเหลือ (residual) มีการกระจายเป็นปกติ และมีความเป็นอิสระต่อกัน ข้อมูลที่ใช้ในการตรวจสอบเงื่อนไขนี้ได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ในโปรแกรม MINITAB โดยแสดงผลเป็นกราฟ residual จำนวน 4 ชุดดังแผนภูมิที่ 4

แผนภูมิที่ 4 ผลการตรวจสอบข้อมูลเศษเหลือจากการวิเคราะห์ ANOVA



Normal probability plot แสดงผลการกระจายของข้อมูลผลการตรวจวัดขนาดอนุภาค ใช้เพื่อตรวจสอบลักษณะการกระจายที่ไม่เป็นปกติของข้อมูล หากจุดบนกราฟเรียงตัวเป็นลักษณะใกล้เคียงเส้นตรงแสดงว่า residual มีลักษณะการกระจายแบบปกติ

Versus fits พล็อตจากค่า residual กับค่าที่ถูกทำนายโดยสมการ ใช้ตรวจสอบความผิดปกติของข้อมูลที่ค่าสูงๆ ลักษณะของกราฟควรมีการกระจายของข้อมูลในลักษณะสุ่ม

อย่างสม่ำเสมอรอบค่าศูนย์ บ่งบอกถึงข้อมูลที่ไม่มีความแตกต่างกันมากเกินไประหว่างค่าที่ทำนายโดยสมการกับค่าที่ทดลองได้จริง

Histogram พล็อตจากค่า residual และความถี่ของข้อมูล หาก histogram นี้มีลักษณะเป็นทรงระฆังคว่ำโดยข้อมูลมีความสมมาตรรอบค่ากลาง แสดงว่าข้อมูลที่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ บ่งบอกถึงความเหมาะสมของสมการแบบจำลองในการใช้อธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปร

Versus order เป็นการพล็อตกราฟระหว่าง residual กับลำดับการทดลอง ใช้เพื่อตรวจสอบการกระจายที่ไม่สม่ำเสมอของข้อมูลตามลำดับการทดลอง ลักษณะของเส้นต่อจุดบนกราฟจะต้องไม่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างเห็นได้ชัด และมีการกระจายแบบสุ่มแบบสม่ำเสมอรอบค่าศูนย์จึงจะเหมาะสมต่อการใช้สมการอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระ

2) การตรวจสอบความแม่นยำในการพยากรณ์

การตรวจสอบความแม่นยำในการพยากรณ์ผลการวัดขนาดอนุภาคจากสมการแบบจำลองพิจารณาจากค่าสถิติ f-value ที่บ่งบอกถึงค่าความผิดพลาด (error) อันเกินจากตัวแปรอิสระ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ ANOVA ในโปรแกรม MINITAB เพื่อทดสอบว่าสมการ full quadratic model ที่คัดเลือกมีความแม่นยำในการพยากรณ์ตัวแปร Y มากเพียงใด โดยกำหนดสมมติฐานที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($\alpha=0.05$) ดังนี้

H_0 : Error ที่เกิดขึ้น (Y) เกิดทั้งหมดมาจากตัวแปรอิสระ

H_1 : Error ที่เกิดขึ้น (Y) ส่วนน้อยเท่านั้นที่มาจากตัวแปรอิสระ

ผลการวิเคราะห์ ANOVA แสดงค่า f-value ของแบบจำลองเท่ากับ 6.09 ที่ค่า p-value เท่ากับ 0.013 ซึ่งค่า f-value มีค่ามากกว่าค่า f วิกฤติจากการวิเคราะห์ probability distribution (f-critical=0.3280, 0.3744) (ภาคผนวก ข) ในโปรแกรมหรือได้จากการเปิดตารางสถิติ f distribution เมื่อค่า f-value สูงกว่า f-critical จะปฏิเสธสมมติฐาน H_0 คือผลวิเคราะห์มี error จากตัวแปรอิสระเพียงเล็กน้อยและมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประมาณค่าตัวแปรอิสระ^{(32), (33)}

เมื่อแทนค่าของตัวแปรอิสระแต่ละชุดทดลองจาก Box-Behnken design ลงในสมการที่ (5) โดยใช้ตัวเลือก predict (ภาคผนวก ข) พบว่าค่า Y_p ที่พยากรณ์ได้มีค่าใกล้เคียงกับการทดลองจริงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการพยากรณ์ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA จากสมการแบบจำลอง

| Run order | X ₁ Total lipid (%w/v) | X ₂ Stearic acid: Lexol® GT-865 | X ₃ Tween®80 (%w/v) | Y Mean particle size (nm) | Y _p Predict |
|-----------|--------------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 321.57±5.82 | 312.57 |
| 2 | 7.5 | 1.5:1 | 25 | 1,418.47±47.51 | 1,211.19 |
| 3 | 10 | 1.5:1 | 20 | 329.23±2.87 | 579.41 |
| 4 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 338.00±2.90 | 312.57 |
| 5 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 294.61±13.93 | 312.57 |
| 6 | 7.5 | 1.5:1 | 15 | 239.89±2.19 | 185.31 |
| 7 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 307.07±13.51 | 312.57 |
| 8 | 5 | 4:1 | 20 | 1,202.70±41.91 | 952.52 |
| 9 | 10 | 2.75:1 | 25 | 217.87±1.84 | 174.97 |
| 10 | 7.5 | 4:1 | 25 | 386.43±0.97 | 441.01 |
| 11 | 10 | 4:1 | 20 | 196.07±5.12 | 184.39 |
| 12 | 7.5 | 4:1 | 15 | 219.47±1.10 | 426.75 |
| 13 | 5 | 1.5:1 | 20 | 1,074.57±192.83 | 1,086.25 |
| 14 | 7.5 | 2.75:1 | 20 | 301.60±4.57 | 312.57 |
| 15 | 10 | 2.75:1 | 15 | 312.60±8.53 | 117.00 |
| 16 | 5 | 2.75:1 | 25 | 1,078.97±28.83 | 1,274.57 |
| 17 | 5 | 2.75:1 | 15 | 249.47±1.16 | 292.37 |

4.3.3 นัยสำคัญของตัวแปรอิสระจากสมการแบบจำลอง

เมื่อได้แบบจำลองที่เหมาะสมในการประมาณค่าของตัวแปรอิสระแล้ว โปรแกรม MINITAB จะแสดงค่าสถิติ t-value ที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของตัวแปรอิสระจากการวิเคราะห์ regression analysis ดังตารางที่ 12 เพื่อทดสอบว่าตัวแปร X_i มีอิทธิพลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ย Y อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยกำหนดสมมติฐานที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha=0.05$) ดังนี้

$$H_0: \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_3 = 0 \quad \text{ตัวแปรอิสระที่ } i (X_i) \text{ ไม่มีอิทธิพลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ย}$$

$$H_1: \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_3 \neq 0 \quad \text{ตัวแปรอิสระที่ } i (X_i) \text{ มีอิทธิพลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ย}$$

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระในสมการแบบจำลอง

| Term | Response particle size (Y) | |
|----------|----------------------------|---------|
| | t-value | p-value |
| Constant | 3.38 | 0.012 |
| X_1 | -4.36 | 0.003 |
| X_2 | -1.81 | 0.113 |
| X_3 | 3.56 | 0.009 |
| X_1^2 | 1.42 | 0.197 |
| X_2^2 | 2.43 | 0.045 |
| X_3^2 | 0.09 | 0.933 |
| X_1X_2 | -0.63 | 0.547 |
| X_1X_3 | -2.24 | 0.060 |
| X_2X_3 | -2.45 | 0.044 |

จากตารางที่ 12 การทดสอบสมมติฐานพิจารณาจากค่าสถิติ t-value โดยเปรียบเทียบกับค่า t-critical จากการวิเคราะห์ probability distribution ในโปรแกรม MINITAB ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.120 (ภาคผนวก ข) เมื่อค่า t-value สูงกว่าค่า t-critical ของตัวแปรอิสระในตารางจะปฏิเสธสมมติฐาน H_0 คือตัวแปรอิสระนั้นมีผลต่อขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยพิจารณาจากแต่ละพจน์ในสมการที่ (5) ดังนี้

Linear terms บ่งบอกถึงอิทธิพลของตัวแปรอิสระ ได้แก่ X_1 (total lipid), X_2 (stearic acid: Lexol[®] GT-865) และ X_3 (Tween[®] 80) ที่มีต่อผลการวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ย Y ในตารางที่ 12 ตัวแปรอิสระที่มีค่า t-value สูงกว่า t-critical ได้แก่ ปริมาณ total lipid และ Tween[®] 80 ที่ค่า p-value เท่ากับ 0.003 และ 0.009 ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณ total lipid และ Tween[®] 80 เป็นตัวแปรอิสระที่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่าสัมประสิทธิ์เชิงลบในสมการแสดงให้เห็นว่าปริมาณ total lipid ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ขนาดอนุภาคของ NLCs-SA ลดลง ในขณะที่ปริมาณ Tween[®] 80 ที่เพิ่มขึ้นนั้นส่งผลให้อนุภาคของ NLCs-SA มีขนาดใหญ่ขึ้น

Square terms บ่งบอกอิทธิพลในเชิงยกกำลังของตัวแปรอิสระ X_1^2 (total lipid²), X_2^2 (stearic acid: Lexol[®] GT-865²), X_3^2 (Tween[®] 80²) ตัวแปรอิสระที่มีค่า t-value สูงกว่าค่า t-critical ได้แก่ stearic acid: Lexol[®] GT-865² ที่ค่า p-value เท่ากับ 0.045 ดังนั้นอัตราส่วนของ

stearic acid: Lexol[®] GT-865 ในรูปแบบยกกกำลัง เป็นตัวแปรอิสระที่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่าสัมประสิทธิ์เชิงบวกในสมการแสดงให้เห็นว่า เมื่อค่ากำลังสองของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 เพิ่มขึ้นมีผลทำให้อนุภาคของ NLCs-SA มีขนาดใหญ่ขึ้น

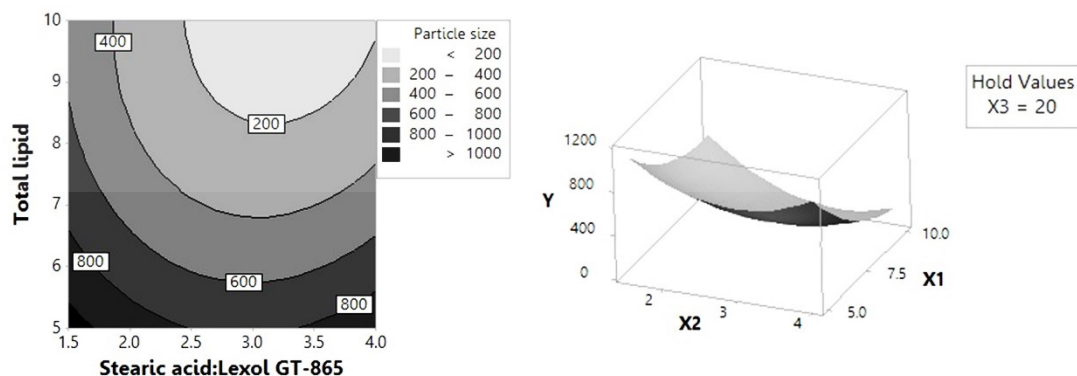
Interaction terms บ่งบอกถึงอิทธิพลร่วมของตัวแปรอิสระ ได้แก่ X_1X_2 (total lipid * stearic acid: Lexol[®] GT-865), X_1X_3 (total lipid * Tween[®] 80), X_2X_3 (stearic acid: Lexol[®] GT-865 * Tween[®] 80) ที่มีต่อผลการวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ย Y โดยอิทธิพลร่วมของตัวแปรที่มีค่า t-value สูงกว่า t-critical ได้แก่ อิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปร total lipid กับ Tween[®] 80 ซึ่งมีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value เท่ากับ 0.060 และอิทธิพลร่วมระหว่าง stearic acid: Lexol[®] GT-865 กับ Tween[®] 80 มีผลต่อขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value เท่ากับ 0.044 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 12)

4.3.4 ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาค

การศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระได้จากตัวเลือก contour plot และ response surface plot ในโปรแกรม MINITAB (ภาคผนวก ข) โดยกำหนดให้ตัวแปรหนึ่งเป็นค่าคงที่จากการทดลอง Box-Behnken design ผู้ทดลองได้กำหนดค่าคงที่ของตัวแปรอิสระตามชุดทดลองที่ 11 เนื่องจากให้ผลการวัดขนาดอนุภาค NLCs-SA เล็กที่สุด ในการแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระในรูปแบบพื้นผิวสองมิติและสามมิติดังแผนภูมิที่ 5

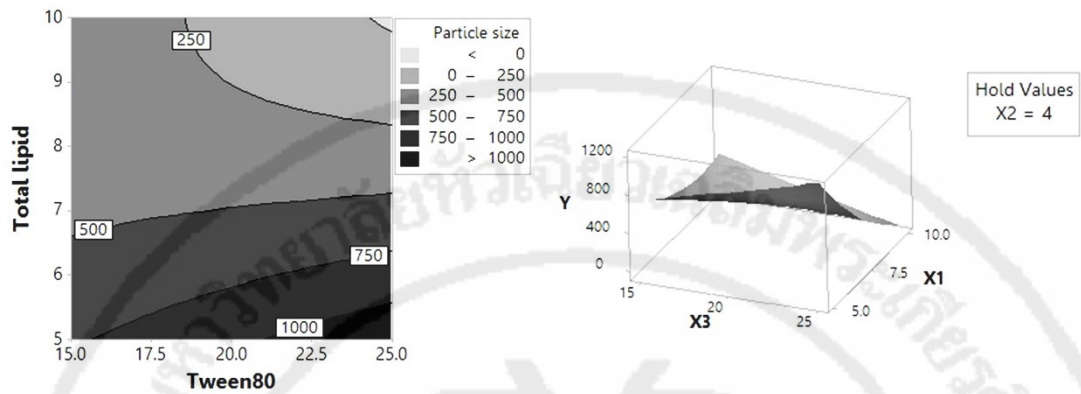
แผนภูมิที่ 5 Contour plot (ซ้าย) และ response surface plot (ขวา) แสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA

- a. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total lipid (X_1) กับอัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 (X_2)

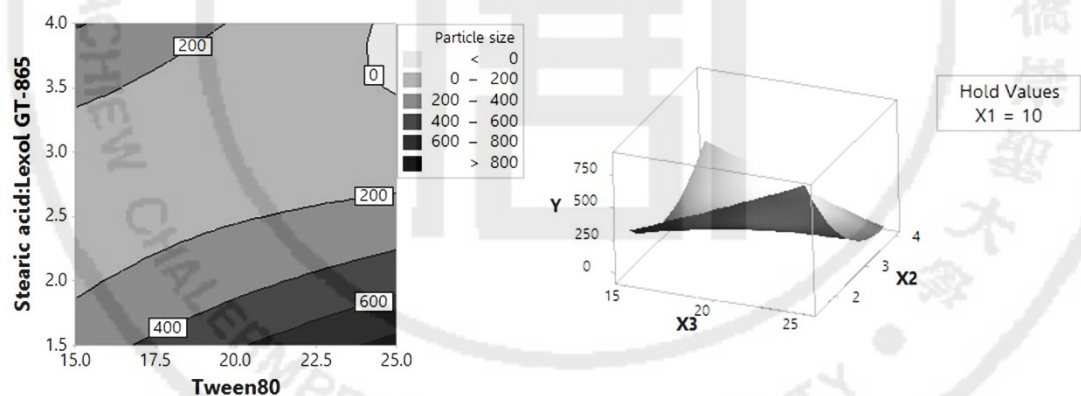


แผนภูมิที่ 5 (ต่อ)

- b. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total lipid (X_1) กับสารลดแรงตึงผิว Tween[®] 80 (X_3)



- c. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 (X_2) กับสารลดแรงตึงผิว Tween[®] 80 (X_3)



แผนภูมิที่ 5a แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total lipid กับอัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA เมื่อกำหนดให้ปริมาณของ Tween[®] 80 คงที่เท่ากับ 20%w/v จากกราฟ contour plot จะเห็นว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA มีแนวโน้มเล็กลง เมื่อปริมาณ total lipid และสัดส่วนของไขมันแข็ง stearic acid เพิ่มขึ้น อิมัลชันเบื้องต้นที่เตรียมจาก total lipid ปริมาณ 8-10%w/v โดยใช้อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 เท่ากับ 2.5-4:1 จะมีโอกาสพบอนุภาคขนาดเล็กกว่า 200 nm เช่นเดียวกับกราฟ response surface plot ที่แสดงให้เห็นแนวโน้มของตัวแปร Y มีค่าต่ำลงเมื่อค่าของตัวแปรอิสระ X_1 และ X_2 เพิ่มขึ้น

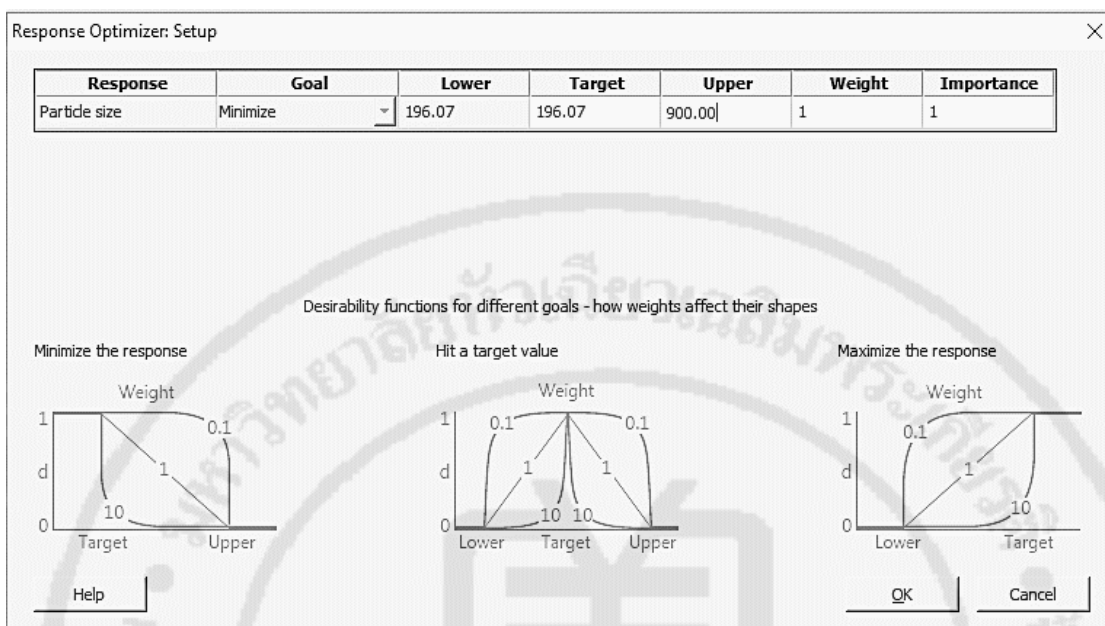
แผนภูมิที่ 5b แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total lipid กับปริมาณสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA เมื่อกำหนดให้อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol® GT-865 คงที่เท่ากับ 4:1 จากกราฟ contour plot จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ total lipid ในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นส่งผลให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA เล็กลง และเมื่อเพิ่มปริมาณ Tween® 80 ส่งผลให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA ใหญ่ขึ้น ในขณะเดียวกันเมื่อเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นด้วย total lipid ปริมาณ 8.5-10%w/v ร่วมกับ Tween® 80 ความเข้มข้น 18-25%w/v จะพบเส้นโค้งแสดงพื้นที่ของขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กกว่า 250 nm สอดคล้องกับกราฟ response surface plot แสดงแนวโน้มของตัวแปร Y ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อค่าของตัวแปรอิสระ X_1 และ X_3 มีความสัมพันธ์ร่วมกันที่ค่าเหมาะสมค่าหนึ่ง โดยจุดต่ำสุดของกราฟแสดงให้เห็นขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กที่สุดในช่วงปริมาณ total lipid และ Tween® 80 เช่นเดียวกับกราฟ contour plot

แผนภูมิที่ 5c แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ stearic acid: Lexol® GT-865 กับปริมาณสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA เมื่อกำหนดให้ปริมาณ total lipid คงที่เท่ากับ 10%w/v จากกราฟ contour plot จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มสัดส่วนของไขมันแข็ง stearic acid ในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นส่งผลให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA เล็กลง และเมื่อเพิ่มปริมาณ Tween® 80 ส่งผลให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA ใหญ่ขึ้น ในขณะเดียวกันเมื่อปรับอัตราส่วนของ stearic acid: Lexol® GT-865 ในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้น เท่ากับ 1.7-3.6:1 จะมีโอกาสพบอนุภาคขนาดเล็กกว่า 200 nm สอดคล้องกับกราฟ response surface plot แสดงแนวโน้มของตัวแปร Y ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อค่าของตัวแปรอิสระ X_2 และ X_3 มีความสัมพันธ์ร่วมกันที่ค่าเหมาะสมค่าหนึ่ง โดยจุดต่ำสุดของกราฟแสดงให้เห็นขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กที่สุดในช่วงของอัตราส่วน stearic acid: Lexol® GT-865 เท่ากับ 3.7-4:1 ร่วมกับ Tween® 80 ปริมาณ 24-25%w/v

4.3.5 การประมาณค่าที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้น

จากผลการวิเคราะห์ ANOVA และ RSM พบว่าตัวแปรอิสระที่จัดทำขึ้นนั้นมีอิทธิพลต่อผลการวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทั้งในรูปของอิทธิพลหลักและอิทธิพลร่วม จึงใช้สมการ full quadratic ในการประมาณค่าที่เหมาะสมสำหรับเตรียมอิมัลชันเบื้องต้น โดยใช้ตัวเลือก response optimizer จากโปรแกรม MINITAB (ภาคผนวก ข) และเนื่องจากต้องการประมาณค่าของตัวแปรอิสระที่สามารถเตรียม NLCs-SA ให้ได้อนุภาคขนาดเล็กที่สุด จึงกำหนดค่าผลตอบแทนเป็น minimize โดยให้ขอบเขตสูงสุดของขนาดอนุภาคไม่เกิน 900 nm ดังภาพที่ 7

ภาพที่ 7 การตั้งค่าผลตอบสนองตามวัตถุประสงค์การทดลองในโปรแกรม MINITAB



เมื่อการกำหนดค่าผลตอบสนองเสร็จสิ้นระบบจะทำการประมาณค่าที่เหมาะสมของตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปรที่สามารถเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นของ NLCs-SA ขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กที่สุดดังนี้

| | |
|--|--------|
| ปริมาณ total lipid (X_1) | 10%w/v |
| อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol [®] GT-865 (X_2) | 4:1 |
| ปริมาณสารลดแรงตึงผิว Tween [®] 80 (X_3) | 25%w/v |

4.4 การประเมินคุณสมบัติเฉพาะของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน

จากหัวข้อ 4.3 เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจากการวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นของ NLCs-SA จากตัวแปรอิสระที่ประมาณค่าได้ และเตรียมตัวอย่าง NLCs เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ จากนั้นทำการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพพร้อมทั้งศึกษาความคงตัวเป็นระยะเวลา 90 วันดังต่อไปนี้

4.4.1 ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ซีต้า

จากการวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาค ณ วันที่ 1 (ภายหลังจากการเตรียม 24 ชั่วโมง) พบว่าตัวอย่าง NLCs-SA มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 189.62 ± 1.82 nm ซึ่งมีขนาดอนุภาคเล็กที่สุดที่ได้จากการทดลอง Box-Behnken design (ตารางที่ 9) เมื่อเตรียมตัวอย่าง NLCs เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบพบว่ามีความคงตัวมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 369.00 ± 3.37 nm การประเมินความคงตัวทางกายภาพที่สภาวะอุณหภูมิ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นระยะเวลา 90 วันแสดงผลดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการประเมินความคงตัวของตัวทางกายภาพในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน

| Sample | Period | Particle size (nm) | PI | ZP (mV) |
|---------|--------|--------------------|-------------|-------------|
| NLCs-SA | Day 1 | 189.62±1.82 | 0.130±0.01 | -5.57±2.85 |
| | Day 7 | 217.22±1.58 | 0.118±0.01 | -7.89±4.02 |
| | Day 15 | 283.54±0.89 | 0.147±0.01 | -6.36±0.71 |
| | Day 30 | 388.90±4.92* | 0.193±0.01 | -6.18±2.60 |
| | Day 60 | 657.77±4.00* | 0.266±0.01 | -5.98±1.26 |
| | Day 90 | 829.31±5.99* | 0.254±0.01 | -3.81±0.64 |
| NLCs | Day 1 | 369.00±3.37 | 0.199±0.02 | -18.83±3.90 |
| | Day 7 | 741.59±36.96* | 0.268±0.01 | -16.65±1.40 |
| | Day 15 | 843.26±48.14* | 0.286±0.01 | -15.61±2.37 |
| | Day 30 | 1,426.56±51.06* | 0.437±0.02* | -15.63±3.12 |
| | Day 60 | unstable | | |
| | Day 90 | unstable | | |

หมายเหตุ: * คือ ขนาดอนุภาคที่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่า mean±SD (n=3)

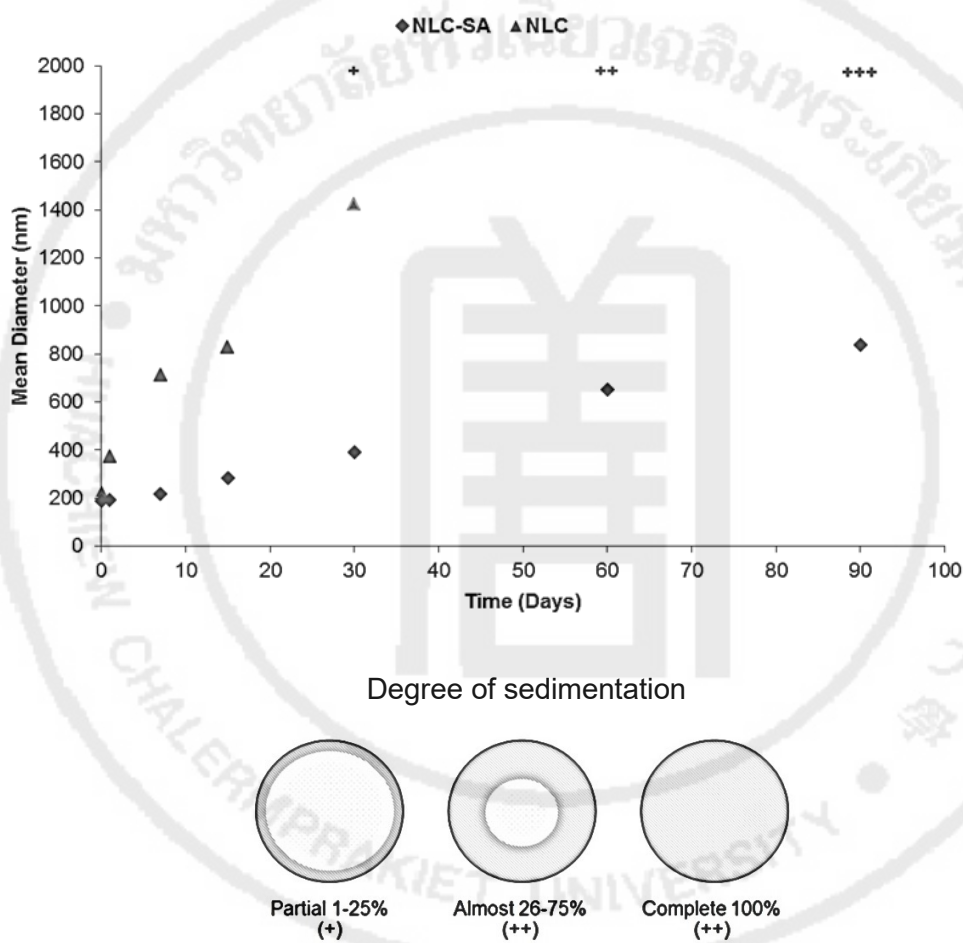
1) ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาค

จากตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคของตัวอย่าง NLCs-SA เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA จากการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นจำนวน 3 ซ้ำ อยู่ในช่วง 189.62 ± 1.82 nm ถึง 829.31 ± 5.99 nm โดยพบการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 30, 60 และ 90 วัน ในขณะที่ตัวอย่าง NLCs มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยจากเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นจำนวน 3 ซ้ำอยู่ในช่วง 369.00 ± 3.37 nm ถึง $1,426.56 \pm 51.06$ nm ในระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน โดยเริ่มพบขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 7 ไปจนถึง 30 วันของการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่าง NLCs มีอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้นเกินกว่าเครื่องมือจะสามารถตรวจวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ยได้ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 60 และ 90 วันตามลำดับ

เมื่อพิจารณาลักษณะปรากฏของตัวอย่าง NLCs พบการตกตะกอนที่ก้นภาชนะบรรจุจากการประเมินด้วยการสังเกต โดยลักษณะการตกตะกอนแบ่งเป็น 3 ระดับ คือระดับที่ 1 พบการตกตะกอนเล็กน้อย 1-25% ระดับที่ 2 พบการตกตะกอน 26-75% และระดับที่ 3 พบการตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ 100%⁽²⁷⁾ จากการทดลองในครั้งนี้พบลักษณะการตกตะกอนระดับที่ 1 ของตัวอย่าง NLCs ที่ก้นภาชนะบรรจุเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน และพบการตกตะกอนที่ระดับ 2 และ

3 ที่ระยะเวลา 60 และ 90 วันตามลำดับ และไม่พบการตกตะกอนของตัวอย่าง NLCs-SA ตลอดระยะเวลาการศึกษา 90 วัน ดังแผนภูมิที่ 6

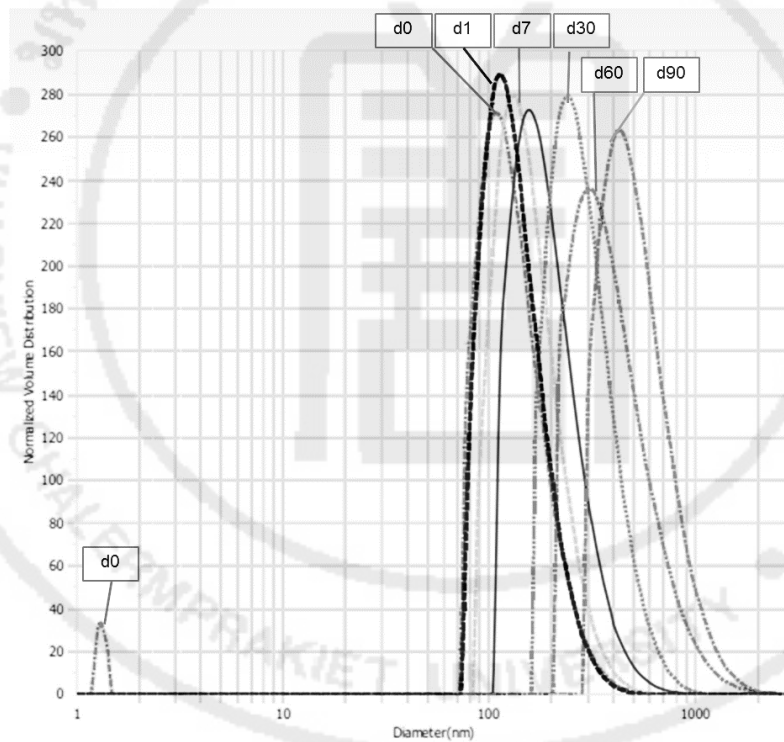
แผนภูมิที่ 6 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ (บน) และลักษณะการตกตะกอนที่กั้นภาชนะบรรจุของตัวอย่างทั้ง 3 ระดับ (ล่าง)



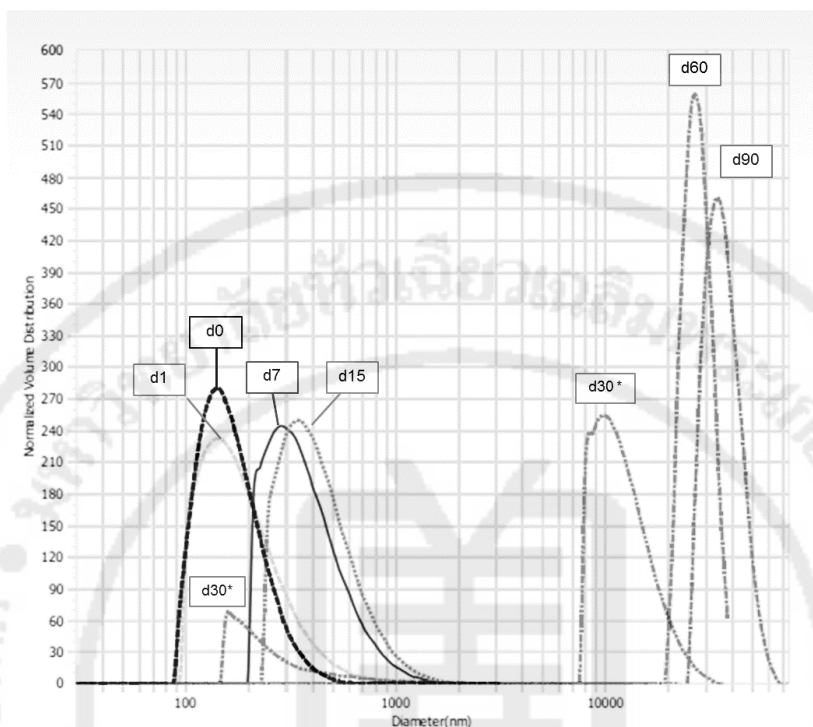
เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดของอนุภาคพบว่าตัวอย่าง NLCs-SA มีการกระจายขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงแคบ กราฟแสดงลักษณะการกระจายขนาดอนุภาคจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Delsa™ Nano C พบว่า ที่ช่วงเวลาเริ่มต้น (d0) การกระจายขนาดแบ่งออกเป็น 2 ช่วงดังแผนภูมิที่ 7 (บน) คือ 1-2 nm กับ 100-400 nm และหลังจากผ่านระยะเวลาการเก็บรักษาพบว่า NLCs-SA มีการกระจายขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100-1,000 nm และมีการกระจายขนาดแคบ ซึ่งมีค่า PI ต่ำกว่า 0.5 และไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึง 90 วัน (ตารางที่ 13)

ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาคของตัวอย่าง NLCs แผนภูมิที่ 7 (ล่าง) พบว่าลักษณะการกระจายขนาดอนุภาคแบ่งเป็น 2 ช่วง คือที่ระยะเวลาเริ่มต้นจนถึง 15 วัน มีลักษณะการกระจายขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงแคบ มีค่า PI ต่ำกว่า 0.3 (ตารางที่ 13) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่เมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วันตัวอย่าง NLCs มีการกระจายขนาดเพิ่มขึ้นถึงระดับไมโครเมตร จึงเป็นเหตุให้พบการตกตะกอนระดับ 1 ที่กั้นภาชนะบรรจุ และเพิ่มขึ้นเป็นระดับ 2 และระดับ 3 เมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 60 และ 90 วันตามลำดับ

แผนภูมิที่ 7 การกระจายขนาดอนุภาคในแต่ละช่วงเวลาตามระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันเมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ของตัวอย่าง NLCs-SA (บน) และ NLCs (ล่าง)



แผนภูมิที่ 7 (ต่อ)



2) ผลการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า

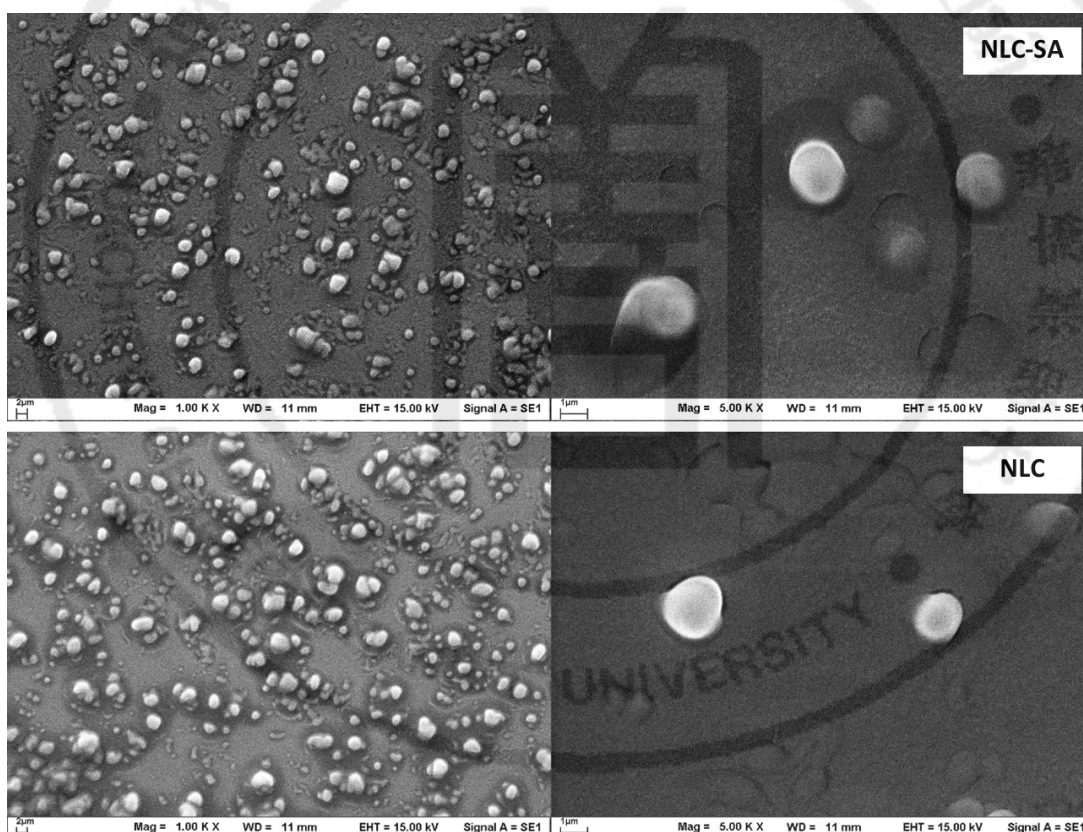
จากตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้าของตัวอย่างเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ในแต่ละช่วงเวลาพบว่าอนุภาคแสดงประจุลบ โดยตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs มีค่า ZP ต่ำกว่า 20 mV ตัวอย่าง NLCs-SA แสดงค่า ZP เฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลาการเก็บรักษา จากการตรวจวัดซ้ำในช่วง -3.81 ± 0.64 mV ถึง -7.89 ± 4.02 mV และตัวอย่าง NLCs แสดงค่า ZP เฉลี่ยจากการตรวจวัดซ้ำในช่วง -15.61 ± 2.37 mV ถึง -18.83 ± 3.90 mV ซึ่งไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญภายในตัวอย่างแต่ละช่วงเวลา

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างผลการวัดค่าศักย์ซีต้าระหว่างสองตัวอย่าง พบว่าตัวอย่าง NLCs-SA มีค่าประจุลบที่พื้นผิวอนุภาคน้อยกว่าตัวอย่าง NLCs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบโดยวัดค่าความเป็นกรดต่างพบว่า ค่าเฉลี่ย pH ของตัวอย่าง NLCs อยู่ในช่วง 5.7-6.0 และตัวอย่าง NLCs-SA มีค่าเฉลี่ย pH อยู่ในช่วง 3.2-3.5 โดยค่า pH ของทั้งสองตัวอย่างไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา จึงเป็นข้อสันนิษฐานว่าการเติม salicylic acid ลงในระบบนาโนพาร์ทิเคิลไขมันเป็นการเพิ่มประจุบวกที่ผิวอนุภาคและส่งผลให้ความคงตัวทางกายภาพอื่น ๆ แตกต่างจากตัวอย่าง NLCs

4.4.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs ด้วยกล้อง SEM แสดงดังภาพที่ 8 พบว่าเมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs มีรูปร่างเป็นทรงกลมและขนาดอนุภาคไม่แตกต่างกันมากนัก สอดคล้องกับผลการทดลองตารางที่ 13 ซึ่งพบว่าขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคของทั้งสองตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาพที่ 8 ภาพถ่าย SEM ของตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs หลังจากการเตรียมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ซ้าย) และ 5,000 เท่า (ขวา)



4.4.3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก

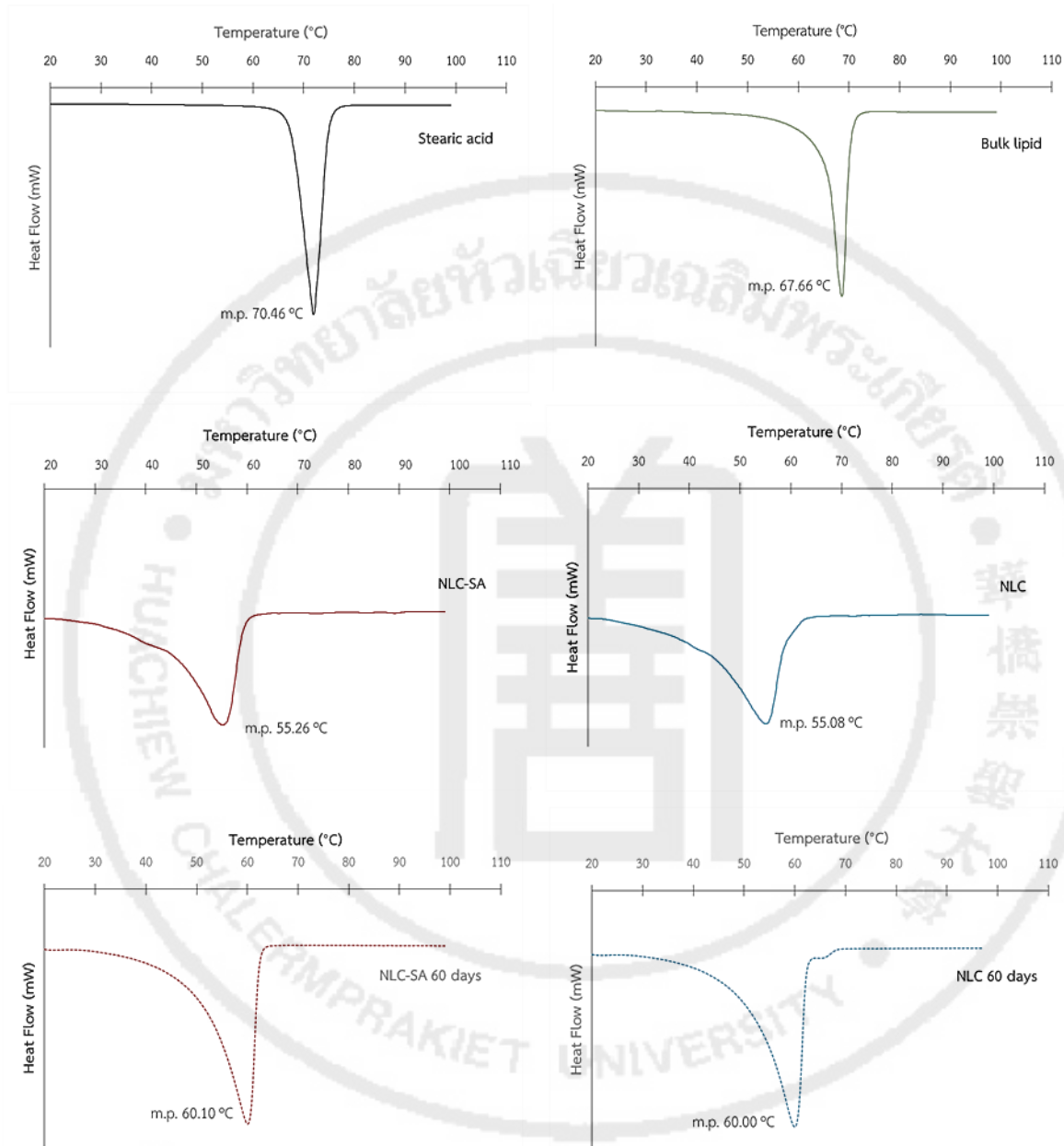
จากผลการวิเคราะห์ DSC ของไขมันต้นแบบ stearic acid, bulk lipid (stearic acid: Lexol[®] GT-865) และตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs พบว่ามีค่า enthalpy (ΔH) และร้อยละของระดับความเป็นผลึกดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบระดับความเป็นผลึกด้วยเครื่อง DSC

| Samples | ΔH (J/g) | DC (%) |
|------------------|------------------|--------|
| Stearic acid | 220.45 | 100.00 |
| Bulk lipid | 180.62 | 81.93 |
| NLCs-SA | | |
| After production | 46.38 | 25.68 |
| 60 days storage | 46.95 | 25.99 |
| NLCs | | |
| After production | 44.74 | 24.77 |
| 60 days storage | 48.15 | 26.65 |

ตารางที่ 14 แสดงค่า enthalpy และผลการคำนวณระดับความเป็นผลึก ของ stearic acid, bulk lipid, ตัวอย่าง NLCs-SA และตัวอย่าง NLCs โดยกำหนดให้ไขมันแข็ง stearic acid เป็นผลึกที่สมบูรณ์และมีค่า %DC เท่ากับ 100% เพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงในการคำนวณระดับความเป็นผลึกของ bulk lipid พบว่า %DC ของ bulk lipid มีค่าเท่ากับ 81.93% และเมื่อเตรียมเป็นตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs พบว่าตัวอย่างมีระดับความเป็นผลึกลดลงจาก bulk lipid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs มี %DC หลังการเตรียม 24 ชั่วโมงเท่ากับ 25.68% และ 24.77% ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอนุภาคที่บรรจุ salicylic acid มีความเป็นผลึกสูงกว่าเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ระดับความเป็นผลึกของตัวอย่างเมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 60 วัน ที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ พบว่า %DC ของ NLCs-SA และ NLCs มีค่าสูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 25.99% และ 26.65% ตามลำดับ

แผนภูมิที่ 8 ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างผลึกด้วยเครื่อง DSC

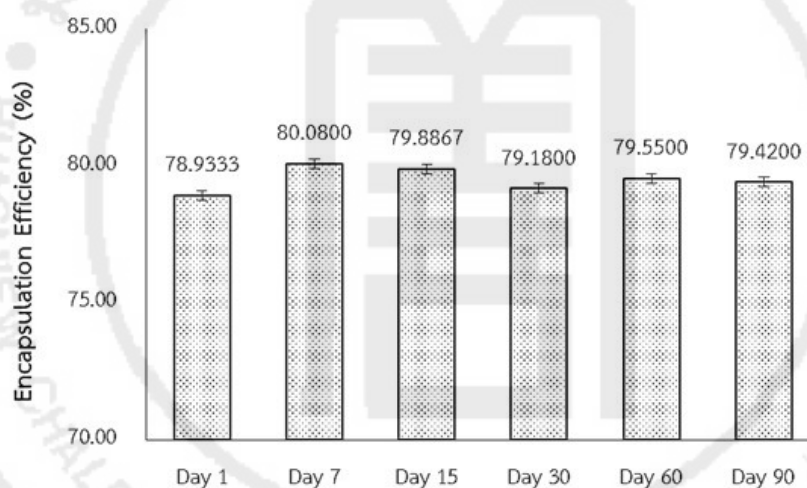


แผนภูมิที่ 8 แสดงกราฟ DSC ของ stearic acid, bulk lipid, ตัวอย่าง NLCs-SA และ ตัวอย่าง NLCs การติดตามสถานะการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างผลึกไขมันในรูปแบบ $\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta$ crystal โดยอ้างอิงข้อมูลการทดลองจากงานวิจัยของ Severino และคณะ (ค.ศ. 2011)⁽³⁰⁾ รูปแบบผลึกเหล่านี้สามารถทำนายได้จากอุณหภูมิที่ใช้ในการตุกกลืนพลังงานความร้อนซึ่งปรากฏเป็นค่า melting point จากผลการทดลองพบว่า stearic acid และ bulk lipid มีค่า melting point เท่ากับ 70.46°C และ 67.66°C ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่า melting point ของตัวอย่าง NLCs-SA และ

NLCs หลังจากการเตรียม 24 ชั่วโมง มีค่า melting point เท่ากับ 55.26°C และ 55.08°C ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs มี melting point ที่แตกต่างจาก bulk lipid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากการเพิ่มสารลดแรงตึงผิวลงในเมทริกซ์ไขมัน โดยช่วง melting point ดังกล่าวเป็นการแสดงลักษณะเฉพาะของผลึกพลังงานสูงรูปแบบ α -crystal และเมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 60 วัน ตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs มี melting point ที่ 60.10°C และ 60.00°C ซึ่งเป็นลักษณะของผลึกพลังงานสูงในรูปแบบ β' -crystal

4.5 การประเมินความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ

แผนภูมิที่ 9 ร้อยละของความสามารถในการบรรจุสารสำคัญในแต่ละช่วงเวลาของ NLCs-SA



หมายเหตุ: %EE แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ตัวอย่าง

ผลจากการวิเคราะห์หาปริมาณ salicylic acid ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคด้วยเทคนิค ultra filtration method และคำนวณเป็น %EE ในแต่ละช่วงเวลาการเก็บรักษา พบว่าตัวอย่าง NLCs-SA มีความสามารถในการบรรจุ salicylic acid อยู่ในช่วง 79-80% ดังแผนภูมิที่ 9 และไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน ผลการทดลองนี้ช่วยพิสูจน์ข้อดีของนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่มีส่วนประกอบของน้ำมันชนิด capric/caprylic triglyceride ที่เพิ่มความยืดหยุ่นให้กับโครงสร้างไขมันแข็ง และสามารถทำละลายกรด salicylic acid ได้ดี ส่งผลให้อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันสามารถบรรจุ salicylic acid ได้ในปริมาณสูงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน ที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการพัฒนา นาโนพาร์ทิเคิลไขมัน เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งให้กับ salicylic acid การทดสอบอิทธิพลและความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระด้วยวิธี response surface methodology (RSM) ช่วยในการประมาณค่าของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมเพื่อเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นให้ได้ NLCs-SA ที่มีอนุภาคขนาดเล็ก คุณสมบัติการละลายได้ดีในระบบไขมันที่คัดเลือกของ salicylic acid ทำให้อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีสมบัติทางกายภาพที่ดี จากการตรวจสอบด้วยกล้อง SEM พบว่าอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีรูปร่างเป็นทรงกลม การศึกษาความคงตัวของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 90 วันพบการตกตะกอน 3 ระดับในตัวอย่าง NLCs ที่ไม่บรรจุ salicylic acid ผลจากการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้าพบว่าอนุภาคมีประจุลบ และมีค่าต่ำ 20 mV ซึ่งได้รับอิทธิพลจากการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ และ H^+ ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของ salicylic acid ที่ทำให้ตัวอย่าง NLCs-SA มีค่า zeta potential ของระบบต่ำกว่าตัวอย่าง NLCs นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างผลึกด้วยเครื่อง DSC ยังแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของ capric/caprylic triglyceride ที่ช่วยเพิ่มความไม่สมบูรณ์ของผลึกไขมันแข็ง และแสดงระดับความเป็นผลึกลดลงเมื่อเตรียมเป็นนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน การมีส่วนประกอบของน้ำมันในอนุภาคนาโนไขมันแข็งจะช่วยเพิ่มพื้นที่ในการละลายของ salicylic acid ได้ดีขึ้น โดยแสดงผลความสามารถในการบรรจุสูงถึง 80%

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 ผลการทดลองเบื้องต้น

จากการทดลองคัดเลือกระบบไขมันแข็งและน้ำมันจำนวน 10 g เพื่อทดสอบการทำละลาย salicylic acid จำนวน 0.5 g ด้วยการปรับสัดส่วนไขมันแข็งและน้ำมัน 3 ระบบ ได้แก่ stearic acid: oleic acid, stearic acid: IPM และ stearic acid: Lexol[®] GT-865 ในอัตราส่วน 70:30 พบว่าระบบไขมันที่สามารถทำละลาย salicylic acid ณ อุณหภูมิ 75°C ได้ดีที่สุดคือการใช้ไขมันแข็ง stearic acid ร่วมกับน้ำมันชนิด capric/caprylic triglyceride (การทดลองใช้ชื่อทางการค้า Lexol[®] GT-865) จึงเป็นระบบไขมันที่นำมาใช้เตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันสำหรับงานวิจัยฉบับนี้ เนื่องจากระบบไขมันที่สามารถทำละลาย salicylic acid ได้ดีจะเป็นส่วนช่วยในการเพิ่มความสามารถในการบรรจุสารสำคัญและความคงตัวที่ดี

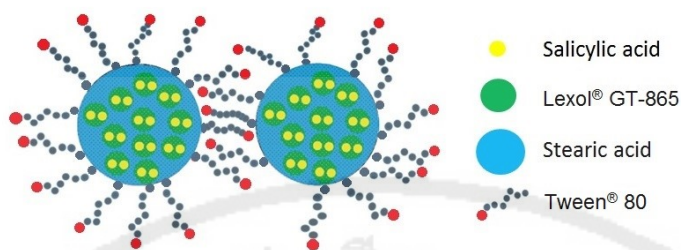
จากผลการทดลองนำระบบไขมัน stearic acid: Lexol® GT-865 อัตราส่วน 70:30 มาเตรียมเป็นอิมัลชันเบื้องต้นสำหรับการผลิต NLCs-SA โดยปรับความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวที่ระดับต่าง ๆ พบว่าการใช้ Tween® 80 เท่ากับ 15%w/v มีลักษณะอิมัลชันเบื้องต้นเป็นเนื้อเดียว และปริมาณ Tween® 80 เท่ากับ 20 และ 25%w/v มีลักษณะเป็นอิมัลชันใสสีเหลือง เมื่อตรวจสอบลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นพบว่า ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 500 nm มีการกระจายขนาดที่แคบ ($PI < 0.25$) นอกจากนี้ยังให้ผลการบรรจุสารสำคัญในปริมาณสูงกว่า 60% ดังนั้นการใช้สารละลาย Tween® 80 ที่ความเข้มข้น 15%w/v ร่วมกับวัฏภาคน้ำมันในสัดส่วนที่เหมาะสมจึงมีโอกาทำให้ NLCs-SA มีลักษณะทางเคมีกายภาพที่ดีขึ้นได้

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเบื้องต้นทำให้ทราบว่า ระบบไขมันและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม ล้วนมีผลต่อคุณสมบัติของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีออกแบบการทดลองทางสถิติ Box-Behnken design ในการศึกษาตัวแปรที่ซับซ้อนอันส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพและความสามารถในการบรรจุสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ NLCs-SA โดยกำหนดค่าของตัวแปรหลายระดับ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมระบบอิมัลชันเบื้องต้นให้เป็นอิมัลชันใสและมีคุณสมบัติเป็นไปตามวัตถุประสงค์การวิจัย

5.2.2 ผลการทดลอง Box-Behnken design

ผลการทดลองจาก Box-Behnken design ด้วยโปรแกรม MINITAB จากการกำหนดตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร ได้แก่ ปริมาณ total lipid (%w/v), อัตราส่วนระหว่าง stearic acid: Lexol® GT-865 และความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 (%w/v) จำนวน 3 ระดับ ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคของ NLCs-SA ได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 17 ชุด จากผลการวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ยพบว่า ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ที่ได้ มีขนาดอนุภาค 196.07 ± 5.12 nm จนถึง $1,418.47 \pm 47.51$ nm โดยชุดการทดลองที่ 11 ให้ขนาดอนุภาคของ NLCs-SA เล็กที่สุด ในขณะที่ชุดทดลอง 2, 3, 8, 9, 10, 13 และ 16 มีลักษณะอิมัลชันใสแต่ได้ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 1,000 nm ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการใช้ Tween® 80 ที่ความเข้มข้นสูง 20-25%w/v มีโอกาทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 ที่ล้อมรอบอนุภาคอย่างหนาแน่นเกิด bridging ดังภาพที่ 9 และเกิดการรวมตัวเป็นอนุภาคขนาดใหญ่⁽⁹⁾

ภาพที่ 9 การเกิด bridging ของโมเลกุล Tween® 80 บริเวณผิวอนุภาคของ NLCs-SA



5.2.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองจาก Box-Behnken design

1) ผลการคัดเลือกสมการแบบจำลอง

ผลการวิเคราะห์ด้วย analysis response surface ทำให้สามารถคัดเลือกสมการที่ใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาค NLCs-SA อันเกิดจากตัวแปรอิสระทั้งสามตัวแปร โดยพิจารณาจากค่า R^2 หากมีค่าเข้าใกล้ 1 หมายถึงสมการมีความเหมาะสมอย่างมากในการใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาค NLCs-SA โดยสมการแบบจำลอง full quadratic model ที่คัดเลือกได้นั้นมีค่า R^2 เท่ากับ 0.8867 ดังนั้นสมการที่คัดเลือกได้จึงเหมาะสมในการใช้อธิบายอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ NLCs-SA

2) ผลการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการแบบจำลอง

จากการตรวจสอบข้อมูลเศษเหลือโดยการวิเคราะห์ ANOVA พบว่า ค่า residual มีลักษณะการกระจาย และการแจกแจงแบบปกติ ข้อมูลมีความเป็นอิสระต่อกัน บ่งบอกถึงความเหมาะสมในการใช้สมการ full quadratic model ในการอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระ นอกจากนี้ จากการตรวจสอบค่าสถิติ f-value ของแบบจำลองแสดงให้เห็นว่า error ที่เกิดขึ้นจากตัวแปรอิสระนั้นมีเพียงเล็กน้อยจึงมีความเหมาะสมในการใช้ประมาณค่าของตัวแปรอิสระที่ p-value เท่ากับ 0.013

นอกจากการพิจารณา f-value ของแบบจำลองแล้ว การวิเคราะห์ด้วย regression analysis ยังมีค่าสถิติ f-value จากการทดสอบการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack-of-fit) ซึ่งคำนวณได้จากผลบวกกำลังสองของค่า error จากการทดลองซ้ำ กล่าวคือการทดสอบนี้จะจัดทำขึ้นเมื่อข้อมูลที่ได้จากการออกแบบการทดลองมีการทำซ้ำและผลที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมาก⁽¹⁴⁾ ผลจากการทดลองพบว่าค่า f-value ของ lack-of-fit เท่ากับ 330.00 และมีค่า p-value ต่ำกว่า 0.0001 บ่งบอกถึงสมการขาดความเหมาะสมของสมการอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การพิจารณาของผู้วิจัยว่าข้อมูลที่มีการทำซ้ำนั้นมีความแตกต่างกันมากเพียงใด โดยเมื่อตรวจสอบความแตกต่างของผลการทดลองซ้ำจาก Box-Behnken design ได้แก่ชุดทดลองที่ 1, 4, 5, 7 และ 14

(ตารางที่ 9) พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับงานวิจัยนี้จึงไม่นำ lack-of-fit มาพิจารณา

อีกกรณีหนึ่ง ค่า lack-of-fit ที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอาจมีสาเหตุมาจากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ เนื่องจากระดับของตัวแปรอิสระในงานวิจัยฉบับนี้ไม่ได้เกิดจากการเก็บข้อมูลแบบสุ่ม แต่ได้จากการกำหนดค่าเป็นช่วง ๆ และตัวแปรอิสระทุกตัวนั้นมีความสัมพันธ์กันอย่างมากในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้น ในเชิงสถิติถือว่าตัวแปรอิสระลักษณะนี้คือสภาพที่เกิดสหสัมพันธ์ (multicollinearity) หมายถึงตัวแปรอิสระตัวหนึ่งอาจมีอิทธิพลทับซ้อนกับอีกตัวหนึ่ง ยกตัวอย่างเช่น ปริมาณ Tween[®] 80 ที่ระดับต่าง ๆ มีผลทำให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยเปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน ในขณะที่อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 ก็เป็นอีกหนึ่งตัวแปรสำคัญที่ส่งผลให้ขนาดอนุภาคเกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน

การสังเกตการเกิด multicollinearity ด้วยวิธีที่ง่ายที่สุดคือดูจากค่านัยสำคัญของตัวแปรอิสระ จากการวิเคราะห์ regression analysis หากตัวแปรอิสระทั้งหมด หรือตัวแปรอิสระบางตัวแปรส่งผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยอย่างไม่มีนัยสำคัญ แสดงว่ามีโอกาสเกิด multicollinearity ขึ้นได้ (32), (33)

3) นัยสำคัญของตัวแปรอิสระจากสมการแบบจำลอง

จากการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับนัยสำคัญของตัวแปรอิสระโดยพิจารณาจากค่าสถิติ t-value พบว่าจากสมการแบบจำลอง full quadratic model ในพจน์ linear terms ปริมาณ total lipid และ Tween[®] 80 มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value เท่ากับ 0.003 และ 0.009 ตามลำดับ ส่วนในพจน์ square terms พบว่าตัวแปรอิสระ stearic acid: Lexol[®] GT-865 (รูปแบบยกกำลัง) เป็นตัวแปรอิสระที่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value เท่ากับ 0.045 หมายความว่าอัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 อาจมีอิทธิพลร่วมกับตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาพจน์ Interaction terms จึงพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง stearic acid: Lexol[®] GT-865 กับ Tween[®] 80 นั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value เท่ากับ 0.044

การทดสอบนัยสำคัญของตัวแปรอิสระนี้มีประโยชน์ต่อการพิจารณารูปสมการแบบจำลอง ในกรณีที่ต้องการคัดเลือกเฉพาะตัวแปรที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมาใช้ในสมการ โดยจะทำให้การพยากรณ์ค่าตัวแปร Y มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น ซึ่งกรณีนี้จะเหมาะสมต่อเมื่อตัวแปรอิสระที่ออกแบบมีความเป็นอิสระต่อกันหรือไม่มีความสัมพันธ์ทับซ้อน การพิจารณาใช้วิธีลดรูปสมการแบบจำลอง ดูได้จากค่า R² ของสมการที่สร้างขึ้นใหม่ หาก R²

นี้มีค่าเข้าใกล้ 1 มากขึ้น แสดงว่าสมการมีความแม่นยำและเหมาะสมในการนำมาใช้พยากรณ์ค่า Y ⁽¹⁴⁾, ⁽³²⁾

ผู้วิจัยได้ทดลองใช้วิธีลดรูปสมการให้เหลือเพียงพจน์ของตัวแปรอิสระที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ X_1 , X_3 , X_2^2 และ X_{23} ปรากฏว่าค่า R^2 ที่ได้มีค่าต่ำลงเท่ากับ 0.7131 จึงเป็นสิ่งที่ช่วยยืนยันความเหมาะสมของการเลือกใช้ full quadratic model แบบเต็มรูปแบบในการพยากรณ์ค่า Y

4) ความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาค

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระด้วยกราฟ contour plot และ response surface plot แสดงให้เห็นว่า ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total lipid และอัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคของ NLCs-SA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ตัวอย่างเช่น การเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นด้วยปริมาณ total lipid เท่ากับ 10%w/v โดยใช้อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 ที่ระดับต่าง ๆ จะไม่ส่งผลให้ขนาดอนุภาคของ NLCs-SA แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ total lipid กับปริมาณ Tween[®] 80 พบว่าตัวแปรอิสระทั้งสองมีอิทธิพลร่วมกันระดับหนึ่ง (p-value=0.060) โดยจะเห็นว่าในช่วงแรกตัวแปรอิสระทั้งสองมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคในเชิงตรงข้ามกัน แต่เมื่อปริมาณ total lipid และ Tween[®] 80 มีจุดที่เหมาะสม ได้แก่ ช่วง 8.5-10%w/v และ 18-25%w/v ตามลำดับ สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแนวโน้มของขนาดอนุภาคไปในทิศทางเดียวกัน เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Tween[®] 80 กับอัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 อิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปรอิสระทั้งสองมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value= 0.044) คือเมื่ออัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 และ Tween[®] 80 มีจุดที่เหมาะสมได้แก่ช่วง 3.7-4:1 และ 24-25%w/v ตามลำดับ สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแนวโน้มของขนาดอนุภาคไปในทิศทางเดียวกัน

5) การประมาณค่าที่เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้น

จากการตั้งค่าผลตอบสนองเป็นค่า minimize และได้ผลประมาณค่าระดับของตัวแปรอิสระที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง NLCs-SA อนุภาคขนาดเล็กคือ ปริมาณ total lipid เท่ากับ 10%w/v, อัตราส่วนของ stearic acid: Lexol[®] GT-865 เท่ากับ 4:1 และความเข้มข้นของ Tween[®] 80 เท่ากับ 25%w/v ซึ่งพบว่าผลการประมาณค่าที่ได้เป็นไปตามผลการวิเคราะห์ ANOVA และ regression analysis เมื่อทดลองเตรียมอิมัลชันเบื้องต้นจากตัวแปรอิสระชุดนี้พบว่าสามารถเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ที่มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุดได้จริง

5.2.4 คุณสมบัติเฉพาะของนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน

1) ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดอนุภาค

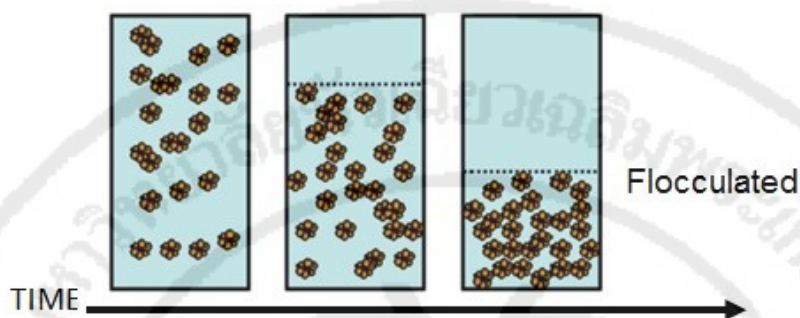
จากผลการประมาณค่าของตัวแปรอิสระที่สามารถเตรียม NLCs-SA ขนาดอนุภาคเล็กที่สุดที่สามารถเตรียมได้ พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์ NLCs-SA ขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 189.62 ± 1.82 nm และเมื่อเตรียมเป็นตัวอย่าง NLCs พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 369.00 ± 3.37 nm โดยไม่พบความแตกต่างของขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างทั้งสอง สำหรับการศึกษาความคงตัวทางกายภาพเมื่อผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าตัวอย่าง NLCs-SA มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน ในขณะที่ตัวอย่าง NLCs มีขนาดใหญ่อขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 7 และพบการตกตะกอน 1-25% ที่ก้นภาชนะบรรจุเมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน

การวิเคราะห์การกระจายอนุภาคของ NLCs-SA พบว่ามีการกระจายขนาดเป็น 2 ช่วงคือช่วงที่มีขนาด 1-2 nm และขนาด 100-400 nm และมีการกระจายขนาดในช่วงแคบหลังจากผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแสดงค่า PI ไม่เกิน 0.5 ตลอดจน 90 วัน โดยสันนิษฐานว่าการกระจายขนาดเป็น 2 ช่วงของ NLCs-SA อาจเกิดจากการที่ผลึกยังอยู่ในรูปพลังงานสูง และยังไม่พอร์มเป็นนาโนพาร์ทิเคิลไขมันอย่างสมบูรณ์ภายหลังจากการเตรียมไม่ถึง 24 ชั่วโมง ทำให้ผลการวัดพบอนุภาคในช่วงขนาด 1-2 nm ส่วนการกระจายขนาดอนุภาคของตัวอย่าง NLCs แสดงค่า PI เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน ซึ่งการกระจายขนาดแบ่งเป็น 2 ช่วงคือ 150-900 nm และขนาดใหญ่กว่า $1 \mu\text{m}$ โดยพบการตกตะกอนที่ก้นภาชนะบรรจุเพิ่มขึ้นเป็น 26-75% และ 100% เมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 60 และ 90 วันตามลำดับ

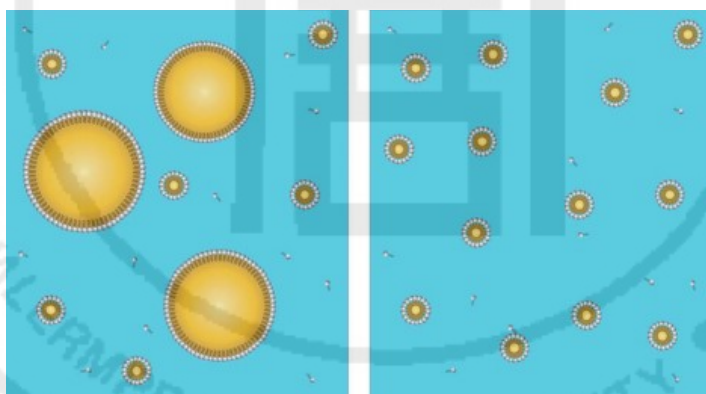
สาเหตุของการเพิ่มขนาดอนุภาคอย่างรวดเร็วและเกิดการตกตะกอนที่ภาชนะบรรจุของตัวอย่าง NLCs เกิดจากสาเหตุเดียวกันกับหัวข้อที่ 5.2.2 เนื่องจากการใช้ Tween[®] 80 ที่ความเข้มข้นสูงถึง 25%w/v ในขณะที่ขนาดอนุภาคของ NLCs ณ วันเริ่มต้นมีขนาดใหญ่มากกว่า NLCs-SA และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันที่ 7 ของการเก็บรักษา คือจาก 369.00 ± 3.37 nm เป็น 741.59 ± 36.96 nm จึงมีโอกาที่ขนาดอนุภาคจะเพิ่มขึ้นถึงระดับไมครอนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถพบการตกตะกอนอันเกิดจากการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคขนาดใหญ่ในรูปแบบของ flocculated system ดังภาพที่ 10 แตกต่างจากกรณีของตัวอย่าง NLCs-SA ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กและอยู่ในช่วงนาโนเมตร ถึงแม้จะพบขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 30 จนถึง 90 วัน ระบบที่มีขนาดอนุภาคเล็กนั้นจะมีที่พื้นผิวสูง (ภาพที่ 11) จึงมีความต้องการแรงตึงผิวในการหุ้มล้อมรอบอนุภาคมากกว่าตัวอย่าง NLCs ในขณะที่ใช้ Tween[®] 80 ความเข้มข้นเดียวกัน ด้วยสาเหตุดังกล่าวตัวอย่าง NLCs-SA จึงไม่เกิดการเรียงตัวของโมเลกุล

สารลดแรงตึงผิวอัดแน่นซ้อนทับกันจนทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่เพิ่มขึ้น และไม่พบการตกตะกอนในรูปแบบ flocculated system ในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน⁽⁹⁾

ภาพที่ 10 การตกตะกอนในรูปแบบ flocculated system⁽⁹⁾



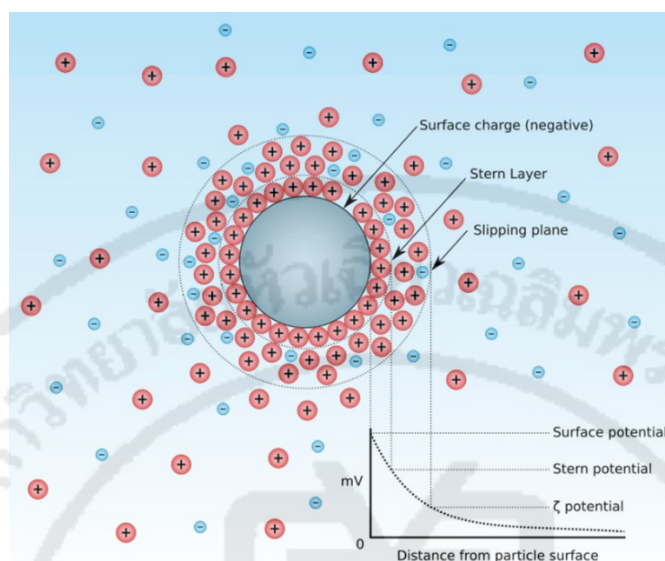
ภาพที่ 11 อนุภาคแขวนลอยที่มีพื้นที่ผิวต่ำ (ซ้าย) และพื้นที่ผิวสูง (ขวา)⁽³⁴⁾



2) ผลการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า

สำหรับการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้าพบว่าอนุภาคมีประจุลบ และมีค่า ZP ต่ำกว่า 20 mV โดยตัวอย่าง NLCs-SA พบค่า ZP ในช่วง -3.81 ± 0.64 mV ถึง -7.89 ± 4.02 mV ในขณะที่ตัวอย่าง NLCs พบค่า ZP ในช่วง -15.61 ± 2.37 mV ถึง -18.83 ± 3.90 mV และเมื่อตรวจสอบด้วยการวัดค่า pH ของทั้งสองตัวอย่าง พบว่าตัวอย่าง NLCs-SA มีค่า pH เท่ากับ 3.2-3.5 จึงเป็นสิ่งยืนยันว่าค่า ZP ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของทั้งสองตัวอย่างนั้นเกิดจาก salicylic acid ที่สามารถแตกตัวให้ H^+ แก่ระบบ และเพิ่มประจุบวกที่พื้นผิวของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันดังภาพที่ 12 ค่าประจุลบที่ตรวจวัดได้ที่ชั้นสะเทินจึงมีค่าต่ำกว่าตัวอย่าง NLCs

ภาพที่ 12 การเพิ่มขึ้นของประจุวบบริเวณพื้นผิวอนุภาคของตัวอย่าง NLCs-SA ⁽³⁵⁾



3) ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้อง SEM พบว่าภายหลังจากการเตรียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs มีขนาดอนุภาคที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยสอดคล้องกับผลการวัดขนาดอนุภาคที่ไม่พบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอนุภาคมีรูปร่างเป็นทรงกลมจึงช่วยยืนยันความถูกต้องของผลการวัดขนาดและการกระจายอนุภาคด้วยเครื่องมือ Delsa™ Nano C ด้วยเทคนิค dynamic light scattering ในการตรวจวัดการกระจายแสงจากอนุภาคทรงกลม ⁽³⁾

4) ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DSC ค่า enthalpy และค่าระดับความเป็นผลึก แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นผลึกเมื่อเติม capric/caprylic triglyceride ในเมทริกซ์ไขมัน โดยเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นผลึกของ stearic acid จาก 100% เป็น 81.93% ในขณะที่ระดับความเป็นผลึกของตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs ภายหลังจากกระบวนการเตรียม 24 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 25.68% และ 24.77% ตามลำดับ เนื่องจากตัวอย่างผ่านการเตรียมเป็นอิมัลชันเบื้องต้นซึ่งมีสารลดแรงตึงผิว Tween® 80 เป็นส่วนประกอบถึง 25%w/v แต่เมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 60 วัน พบว่า ระดับความเป็นผลึกของทั้งสองตัวอย่างเพิ่มขึ้น ซึ่งหากพิจารณาร่วมกับ DSC เทอร์โมแกรมจะพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของ stearic acid เมื่อนำมาเตรียมอยู่ในรูปแบบของ bulk lipid โดยพบว่า melting point ที่ลดลงจาก 70.46°C เป็น 67.66°C เกิดจากรูปแบบของผลึกไขมันเปลี่ยนแปลงจาก β -crystal เป็น β' -crystal และเมื่อเตรียมเป็นตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs จึงเปลี่ยนแปลงเป็นรูปแบบผลึกพลังงานสูง α -crystal ที่ melting point 55.26°C

และ 55.08°C ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของตัวอย่างทั้งสองเป็น β' -crystal เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 60 วัน

จะเห็นได้ว่าเมื่อตัวอย่าง NLCs-SA และ NLCs ผ่านกระบวนการผลิตร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิว ทำให้ระดับความเป็นผลึกของอนุภาคน้อยลงซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าความเป็นผลึกของตัวอย่างทั้งสองเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 60 วัน ลักษณะดังกล่าวนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างผลึกให้อยู่ในสถานะเสถียรมากขึ้น โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Severino และคณะ (ค.ศ. 2011) ⁽³⁰⁾ ที่ได้รายงานไว้ว่าโครงสร้างผลึกรูปแบบ β' -crystal ของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันที่เตรียมจาก stearic acid และ capric/caprylic triglyceride เป็นโครงสร้างที่เสถียรและสามารถบรรจุสารสำคัญให้คงตัวอยู่ได้ในระหว่างการเก็บรักษา

5.2.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุสารสำคัญ

ผลความคงตัวทางเคมีจากการทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุสารสำคัญด้วยการหาปริมาณ free salicylic acid ที่ไม่ถูกกักเก็บภายในอนุภาคโดยใช้เทคนิค ultra filtration method แสดงผลการคำนวณร้อยละของประสิทธิภาพการบรรจุสารสำคัญอยู่ในช่วง 79-80% ผลการทดสอบความสามารถในการบรรจุสารสำคัญนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการเตรียม NLCs-SA โดยใช้ stearic acid ร่วมกับ capric/caprylic triglyceride เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Woo และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 ⁽²⁹⁾ ซึ่งเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันโดยใช้ stearic acid ร่วมกับ oleic acid โดยให้ผลการวัดขนาดอนุภาคเท่ากับ 332 ± 3 nm พบว่าสามารถบรรจุ salicylic acid จำนวน 10 mg ได้สูงสุด 69% ที่อัตราส่วนไขมันแข็งกับน้ำมันเท่ากับ 1.5:1 หรือ 60:40% ของปริมาณไขมันทั้งหมด

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลไขมันบรรจุ salicylic acid ผู้วิจัยสามารถสรุปข้อเสนอแนะเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาได้ดังนี้

1. การออกแบบการทดลองทางสถิติโดยเพิ่มตัวแปรตอบสนองอีกหนึ่งตัวแปร ได้แก่ ความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ
2. การศึกษาถึงคุณสมบัติของ salicylic acid ที่มีส่วนทำให้อนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีลักษณะทางกายภาพที่ดีขึ้น
3. การทดลองเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุในการเตรียมอิมัลชันเบื้องต้น เพื่อเพิ่มแรงผลักทางไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคและทำให้นาโนพาร์ทิเคิลไขมันมีความคงตัวมากขึ้น
4. การทดสอบการปลดปล่อย salicylic acid จากนาโนพาร์ทิเคิลไขมันจะช่วยให้การทำนายตำแหน่งของ salicylic acid ภายในอนุภาคได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Muller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54(1):131-155.
2. Das S, Ng WK, Tan RBH. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;47:139-151.
3. Guimaraes KL, Re MI. Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: the first (SLN) and the second generation (NLC). Springer. 2011:101-122.
4. Padeike J, Hommoss A, Muller R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009; 366:170-184.
5. Drug pharmacy of PSU. การใช้ salicylic acid ในเครื่องสำอาง. [cited 2015 July 15]. Available from: <http://drug.pharmacy.psu.ac.th/wbfile/25254610104>
6. พิมพ์กร สีสวรรค์. เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส. พรินติ้ง เฮ้าส์; 2551.
7. Shah KA, Date AA, Joshi MD, Patravale VB. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;345:163-171.
8. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2013;19:29-43.
9. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011;63:456-469.
10. Shah R, Eldrige D, Palombo E, Harding I. Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability. [cited 2015 July]. Available from: <http://www.springer.com/978-3-319-10710-3>

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

11. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. นาโนเทคโนโลยีในการนำส่งทางผิวหนัง. กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชน จำกัด; 2555.
12. Ekambaram P, Sathali AAH, Priyanka K. Solid lipid nanoparticles: a review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*. 2012;2(1):80-102
13. ทศนีย์ สวัสดิ์พาณิชย์. การหาสภาวะที่เหมาะสมทางสถิติของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำด้วยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2550. เข้าถึงได้จาก: http://agkb.lib.ku.ac.th/ku/search_detail/result/153907
14. ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา, พงศ์ชนัน เหลืองโพบูลย์. สถิติวิเคราะห์เพื่อการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: บริษัท สำนักพิมพ์ท็อป จำกัด; 2551.
15. Hao J, Fang X, Zhou Y, Wang J, Guo F, Li F, Peng X. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:683-692.
16. Yasir M, Sara UVS. Preparation and optimization of haloperidol loaded solid lipid nanoparticles by Box-Behnken design. *Journal of Pharmacy Research*. 2013;7:551-558.
17. Kar M, G.P. P, Jain DK. Design and Development of Solid Lipid Nanoparticles of Thiocolchicoside by Box-Behnken design. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 2014;4:1187-1196.
18. US Pharmacopeial convention. Salicylic acid. [cited 2015 july]. Available from: <http://www.usp.org/reference-standards>
19. Bashir SJ, Dreher F, Chew AL, Zhai H, Levin C, Stern R, Maibach HI. Cutaneous bioassay of salicylic acid as a keratolytic. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;292:187-194.
20. Madan RK, Levit J. A review of toxicity from topical salicylic acid preparations. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70:788-792.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

21. Date AA, Naik B, Nagarsenker MS. Novel Drug Delivery Systems: Potential in Improving Topical Delivery of Antiacne Agents. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2006;19:2-16.
22. Harkins I. How Salicylic Acid Works. [cited 2016 March]. Available from: <http://www.isabelsbeautyblog.com/wp-content/uploads/How-Salicylic-Acid-Works1.png>
23. Ratchakitcha. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2558. [cited 2016 October]. Available from: <http://www.ratchakitcha.soc.go.th>
24. ASEAN Cosmetic Documents. Food and Drug Administration (FDA). 2006;93-105.
25. Huang Y, Li Y, Fan H, Xia Q. Preparation and characterization of salicylic acid-loaded microcapsules as delivery systems for cosmetics. *Integrated Ferroelectrics: An International Journal*. 2014;152(1):22-28.
26. Bhalerao SS, Harshal AR. Preparation, Optimization, Characterization, and Stability Studies of Salicylic Acid Liposomes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2003;29(4):451-467.
27. Junyaprasert VB, Teeranachaideekul V, Supapaerm T. Effect of Charged and Non-ionic Membrane Additives on Physicochemical Properties and Stability of Niosomes. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2008;9(3):851-859.
28. Abdellatif AAH, Abou-Taleb HA. Transfersomal Nanoparticles of Keratolytic and Antibacterial Agents for Enhanced Transdermal Delivery. *Journal of Nanotechnology & Advanced Materials*. 2016;4(1):19-23.
29. Woo JO, Misran M, Lee PF, Ran LP. Development of a Controlled Release of Salicylic Acid Loaded Stearic Acid-Oleic Acid Nanoparticles in Cream for Topical Delivery. *The Scientific World Journal*. 2014;1-7.
30. Severino P, Pinho SC, Souto EB, Santana MHA. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloid and Surface B: Biointerfaces*. 2011;86:125-130.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

31. Tekindal MA, Bayrak H, Ozkaya B, Genc Y. Box-Behnken experimental design in factorial experiments: the importance of bread for nutrition and health. Turkish Journal of Field Crops. 2012;17(2):115-123.
32. บุญธรรม กิจปรีดาบริสุทธิ์. สถิติวิเคราะห์เพื่อการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: จามจุรีโปรดักท์; 2549.
33. ฉลอง สีแก้วสีว. Regression Analysis / Correlation Analysis. [cited 2016 February]. Available from: <https://sites.google.com/site/mystatistics01/home>
34. Schematic diagram of surface area. [cited 2016 November]. Available from: https://www.researchgate.net/profile/David_McClements/publication/255765585/figure/
35. Zeta Potential Information. [cited 2016 November]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential

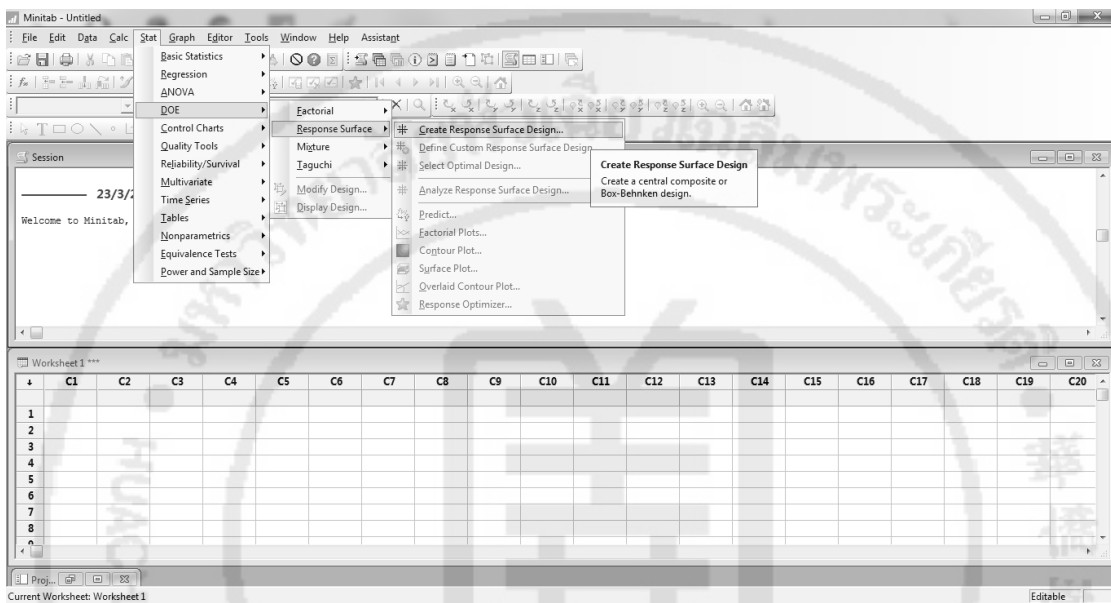


ภาคผนวก

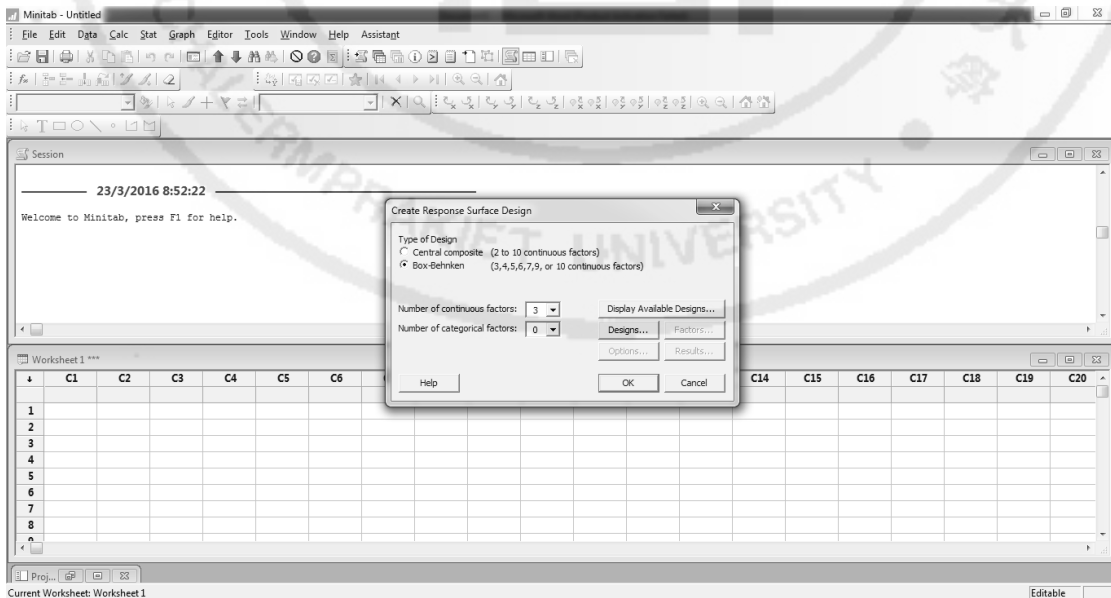
ภาคผนวก ก

การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design ในโปรแกรม MINITAB

■ Create response surface design



■ เลือก Box-Behnken design และจำนวนของตัวแปรอิสระ



■ ตั้งค่าระดับของตัวแปรอิสระ

23/3/2016 8:52:22

Welcome to Minitab, press F1 for help.

Create Response Surface Design: Factors

| Factor | Name | Low | High |
|--------|-------------|-----|------|
| A | Total lipid | 5 | 10 |
| B | Waxoil | 1.5 | 4 |
| C | Tween80 | 15 | 25 |

Worksheet1 ***

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C14 | C15 | C16 | C17 | C18 | C19 | C20 |
|---|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | |

Current Worksheet: Worksheet1

■ ผลการออกแบบ Box-Behnken design

Worksheet1 ***

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 | C11 | C12 | C13 | C14 | C15 | C16 | C17 | C18 | C19 | C20 |
|----|----------|----------|--------|--------|-------------|--------|---------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | StdOrder | RunOrder | PtType | Blocks | Total lipid | Waxoil | Tween80 | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 13 | 1 | 0 | 1 | 7.5 | 2.75 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 11 | 2 | 2 | 1 | 7.5 | 1.50 | 25 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 2 | 3 | 2 | 1 | 10.0 | 1.50 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 17 | 4 | 0 | 1 | 7.5 | 2.75 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 16 | 5 | 0 | 1 | 7.5 | 2.75 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 9 | 6 | 2 | 1 | 7.5 | 1.50 | 15 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 14 | 7 | 0 | 1 | 7.5 | 2.75 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 3 | 8 | 2 | 1 | 5.0 | 4.00 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 8 | 9 | 2 | 1 | 10.0 | 2.75 | 25 | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 12 | 10 | 2 | 1 | 7.5 | 4.00 | 25 | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 4 | 11 | 2 | 1 | 10.0 | 4.00 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 10 | 12 | 2 | 1 | 7.5 | 4.00 | 15 | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 1 | 13 | 2 | 1 | 5.0 | 1.50 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 15 | 14 | 0 | 1 | 7.5 | 2.75 | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 6 | 15 | 2 | 1 | 10.0 | 2.75 | 15 | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 7 | 16 | 2 | 1 | 5.0 | 2.75 | 25 | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 5 | 17 | 2 | 1 | 5.0 | 2.75 | 15 | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 22 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Current Worksheet: Worksheet1

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ผลการทดลองจาก Box-Behnken design

■ Analysis response surface design

The screenshot shows the Minitab interface with a worksheet containing a Box-Behnken design. The design table is as follows:

| RunOrder | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 |
|----------|----|----|----|----|------|------|----|---------|----|
| 1 | 13 | 1 | | | | | | | |
| 2 | 11 | 2 | | | | | | | |
| 3 | 2 | 3 | | | | | | | |
| 4 | 17 | 4 | | | | | | | |
| 5 | 16 | 5 | | | | | | | |
| 6 | 9 | 6 | | | | | | | |
| 7 | 14 | 7 | | | | | | | |
| 8 | 3 | 8 | 2 | 1 | 5.0 | 4.00 | | | |
| 9 | 8 | 9 | 2 | 1 | 10.0 | 2.75 | | | |
| 10 | 12 | 10 | 2 | 1 | 7.5 | 4.00 | 25 | 386.43 | |
| 11 | 4 | 11 | 2 | 1 | 10.0 | 4.00 | 20 | 196.07 | |
| 12 | 10 | 12 | 2 | 1 | 7.5 | 4.00 | 15 | 219.47 | |
| 13 | 1 | 13 | 2 | 1 | 5.0 | 1.50 | 20 | 1074.57 | |
| 14 | 15 | 14 | 0 | 1 | 7.5 | 2.75 | 20 | 301.60 | |
| 15 | 6 | 15 | 2 | 1 | 10.0 | 2.75 | 15 | 312.60 | |
| 16 | 7 | 16 | 2 | 1 | 5.0 | 2.75 | 25 | 1078.97 | |
| 17 | 5 | 17 | 2 | 1 | 5.0 | 2.75 | 15 | 249.47 | |

The 'Analyze Response Surface Design' menu path is highlighted, showing options like 'Fit a model to a response surface design'.

● การคัดเลือกสมการแบบจำลอง

The screenshot shows the 'Analyze Response Surface Design: Terms' dialog box. The 'Include the following terms' dropdown is set to 'Full quadratic'. The 'Available Terms' list includes 'Linear', 'Linear + squares', 'Linear + interactions', and 'Full quadratic'. The 'Selected Terms' list includes 'A:Total lipid', 'B:Wax:oil', 'C:Tween80', 'AA', 'BB', 'CC', 'AB', 'AC', and 'BC'. The 'Include blocks in the model' checkbox is unchecked.

- ผลการวิเคราะห์ ANOVA

Response Surface Regression: Full quadratic model

Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|-------------------------|----|---------|--------|---------|---------|
| Model | 9 | 2339090 | 259899 | 6.09 | 0.013 |
| Linear | 3 | 1493521 | 497840 | 11.67 | 0.004 |
| Total lipid | 1 | 812774 | 812774 | 19.05 | 0.003 |
| Wax:oil | 1 | 139786 | 139786 | 3.28 | 0.113 |
| Tween80 | 1 | 540961 | 540961 | 12.68 | 0.009 |
| Square | 3 | 359107 | 119702 | 2.80 | 0.118 |
| Total lipid*Total lipid | 1 | 86544 | 86544 | 2.03 | 0.197 |
| Wax:oil*Wax:oil | 1 | 252129 | 252129 | 5.91 | 0.045 |
| Tween80*Tween80 | 1 | 325 | 325 | 0.01 | 0.933 |
| 2-Way Interaction | 3 | 486462 | 162154 | 3.80 | 0.066 |
| Total lipid*Wax:oil | 1 | 17068 | 17068 | 0.40 | 0.547 |
| Total lipid*Tween80 | 1 | 213550 | 213550 | 5.00 | 0.060 |
| Wax:oil*Tween80 | 1 | 255844 | 255844 | 5.99 | 0.044 |
| Error | 7 | 298734 | 42676 | | |
| Lack-of-Fit | 3 | 297533 | 99178 | 330.36 | 0.000 |
| Pure Error | 4 | 1201 | 300 | | |
| Total | 16 | 2637824 | | | |

Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|---------|--------|-----------|------------|
| 206.582 | 88.67% | 74.11% | 0.00% |

- ผลการวิเคราะห์ regression analysis

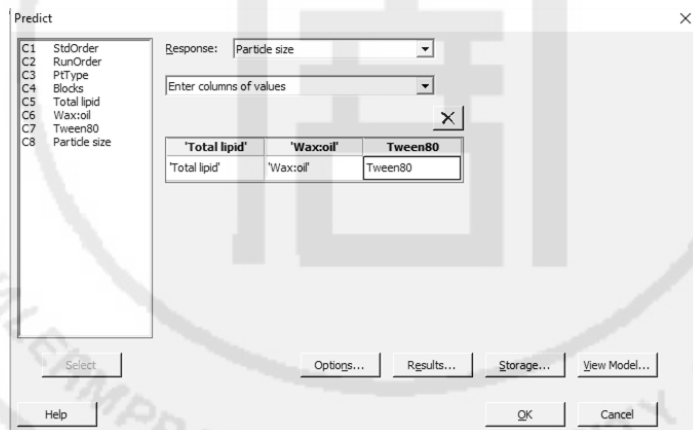
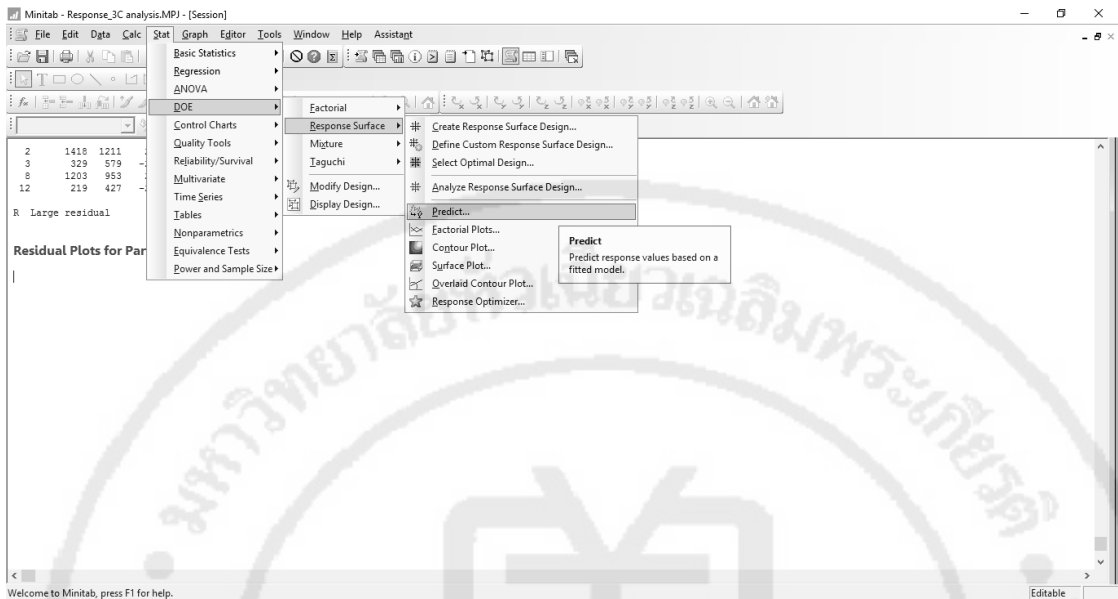
Coded Coefficients

| Term | Effect | Coef | SE Coef | T-Value | P-Value | VIF |
|-------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|------|
| Constant | | 312.6 | 92.4 | 3.38 | 0.012 | |
| Total lipid | -637.5 | -318.7 | 73.0 | -4.36 | 0.003 | 1.00 |
| Wax:oil | -264.4 | -132.2 | 73.0 | -1.81 | 0.113 | 1.00 |
| Tween80 | 520.1 | 260.0 | 73.0 | 3.56 | 0.009 | 1.00 |
| Total lipid*Total lipid | 287 | 143 | 101 | 1.42 | 0.197 | 1.01 |
| Wax:oil*Wax:oil | 489 | 245 | 101 | 2.43 | 0.045 | 1.01 |
| Tween80*Tween80 | 18 | 9 | 101 | 0.09 | 0.933 | 1.01 |
| Total lipid*Wax:oil | -131 | -65 | 103 | -0.63 | 0.547 | 1.00 |
| Total lipid*Tween80 | -462 | -231 | 103 | -2.24 | 0.060 | 1.00 |
| Wax:oil*Tween80 | -506 | -253 | 103 | -2.45 | 0.044 | 1.00 |

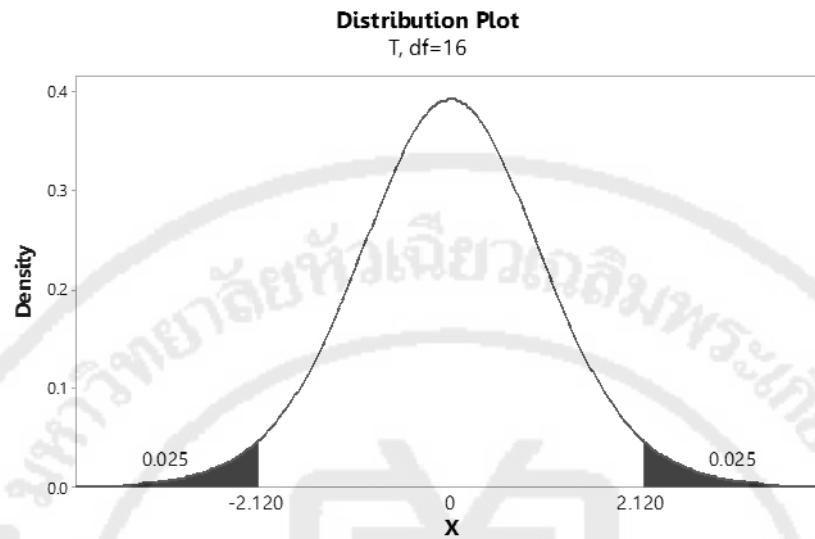
Regression Equation in Uncoded Units

Particle size = -2295 - 44 Total lipid - 1 Wax:oil + 288 Tween80
 + 22.9 Total lipid*Total lipid + 156.6 Wax:oil*Wax:oil + 0.35 Tween80*Tween80
 - 20.9 Total lipid*Wax:oil - 18.48 Total lipid*Tween80 - 40.5 Wax:oil*Tween80

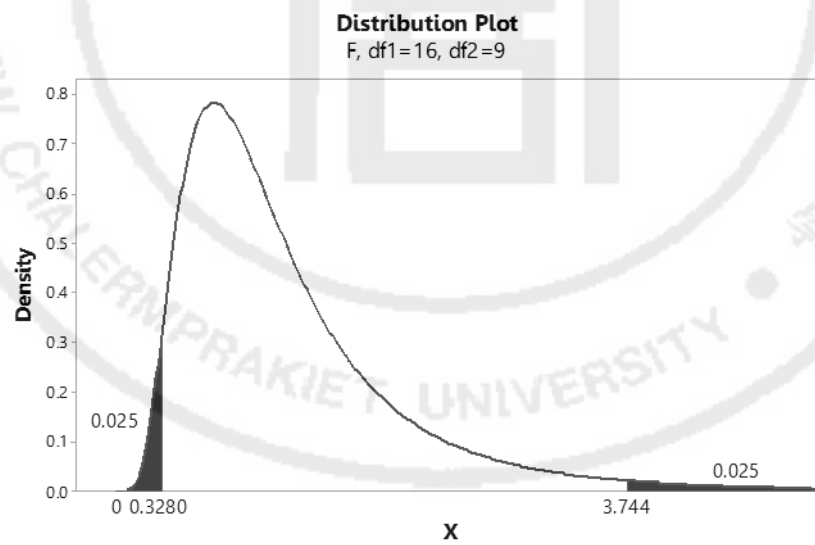
■ Response prediction



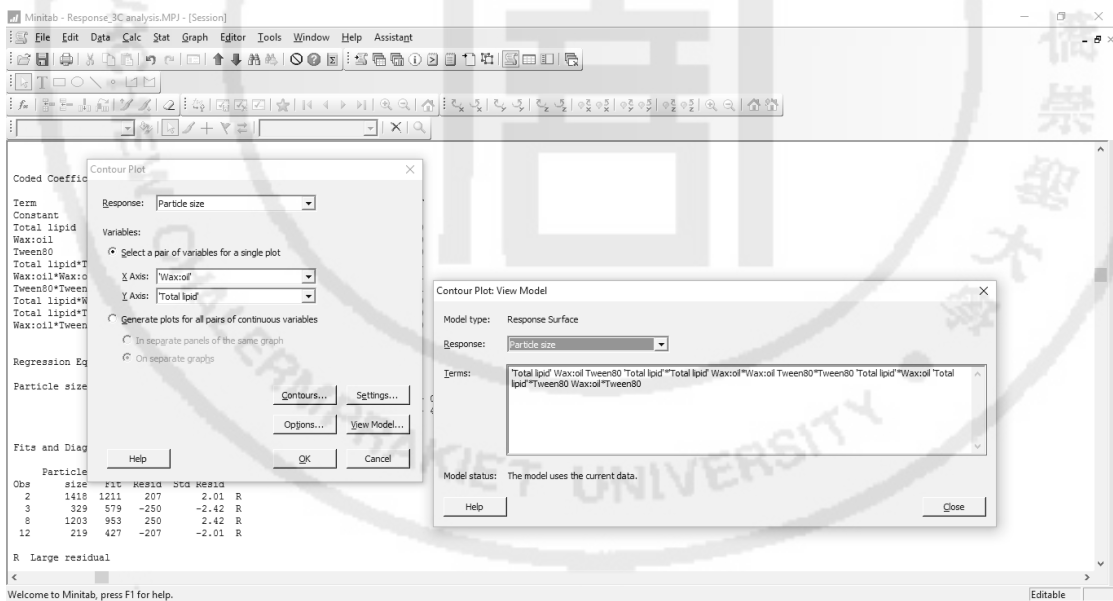
- Propability distribution ของค่าสถิติ t-critical



- Propability distribution ของค่าสถิติ f-critical



■ การสร้าง contour plot



■ การสร้าง response surface plot

Stat > DOE > Response Surface > Surface Plot

Surface Plot
Plot the relationship between two continuous predictors and a fitted response with a 3-D surface.

Coded Coefficients

| | | | | | |
|-------------------------|------|------|-----|-------|-------|
| Term | | | | | |
| Constant | | | | | |
| Total lipid | | | | | |
| Wax:oil | | | | | |
| Tween80 | | | | | |
| Total lipid*Total lipid | | | | | |
| Wax:oil*Wax:oil | | | | | |
| Tween80*Tween80 | 18 | 9 | 101 | 0.09 | 0.933 |
| Total lipid*Wax:oil | -131 | -65 | 103 | -0.63 | 0.547 |
| Total lipid*Tween80 | -462 | -231 | 103 | -2.24 | 0.060 |
| Wax:oil*Tween80 | -506 | -253 | 103 | -2.45 | 0.044 |

Regression Equation in Uncoded Units

Particle size = -2295 - 44 Total lipid - 1 Wax:oil + 288 Tween80
 + 22.9 Total lipid*Total lipid + 156.6 Wax:oil*Wax:oil + 0.95 Tween80*Tween80
 - 20.9 Total lipid*Wax:oil - 19.48 Total lipid*Tween80 - 40.5 Wax:oil*Tween80

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

| Obs | size | Fit | Resid | Std Resid | |
|-----|------|------|-------|-----------|---|
| 2 | 1418 | 1211 | 207 | 2.01 | R |
| 3 | 329 | 579 | -250 | -2.42 | R |
| 8 | 1203 | 953 | 250 | 2.42 | R |
| 12 | 219 | 427 | -207 | -2.01 | R |

R Large residual

Surface Plot

Response: Particle size

Variables:
 Select a pair of variables for a single plot
 Generate plots for all pairs of continuous variables
 In separate panels of the same graph
 On separate graphs

X Axis: Tween80
 Y Axis: Total lipid

Settings... Options... View Model...
 Help OK Cancel

Surface Plot: View Model

Model type: Response Surface
 Response: Particle size

Terms: Total lipid Wax:oil Tween80 Total lipid**Total lipid Wax:oil Tween80 Tween80 Total lipid*Wax:oil Total lipid**Tween80 Wax:oil**Tween80

Model status: The model uses the current data.
 Help Close

Coded Coefficients

| | | | | | |
|-------------------------|--|--|--|--|--|
| Term | | | | | |
| Constant | | | | | |
| Total lipid | | | | | |
| Wax:oil | | | | | |
| Tween80 | | | | | |
| Total lipid*Total lipid | | | | | |
| Wax:oil*Wax:oil | | | | | |
| Tween80*Tween80 | | | | | |
| Total lipid*Wax:oil | | | | | |
| Total lipid*Tween80 | | | | | |
| Wax:oil*Tween80 | | | | | |

Regression Equation

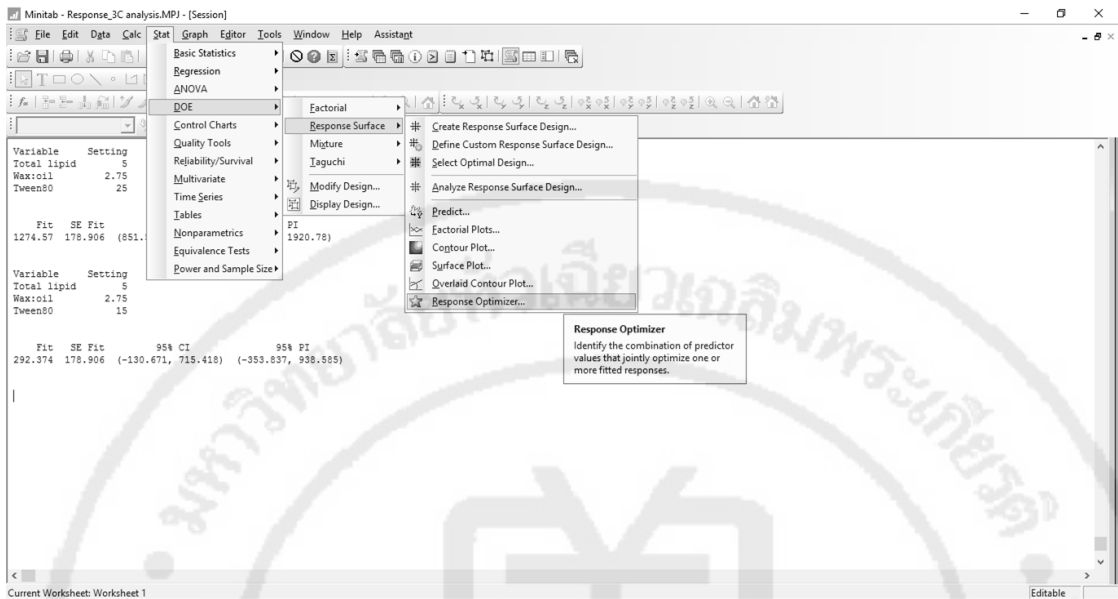
Particle size = -2295 - 44 Total lipid - 1 Wax:oil + 288 Tween80
 + 22.9 Total lipid*Total lipid + 156.6 Wax:oil*Wax:oil + 0.95 Tween80*Tween80
 - 20.9 Total lipid*Wax:oil - 19.48 Total lipid*Tween80 - 40.5 Wax:oil*Tween80

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

| Obs | size | Fit | Resid | Std Resid | |
|-----|------|------|-------|-----------|---|
| 2 | 1418 | 1211 | 207 | 2.01 | R |
| 3 | 329 | 579 | -250 | -2.42 | R |
| 8 | 1203 | 953 | 250 | 2.42 | R |
| 12 | 219 | 427 | -207 | -2.01 | R |

R Large residual

การวิเคราะห์ response optimizer



Minitab - Response_3C analysis.MPJ - [Session]

File Edit Data Calc Stat Graph Editor Tools Window Help Assisatg

Basic Statistics
Regression
ANOVA
DOE
Control Charts
Quality Tools
Reliability/Survival
Multivariate
Time Series
Tables
Nonparametrics
Equivalence Tests
Power and Sample Size

Factorial
Response Surface
Mixture
Taguchi
Modify Design...
Display Design...
PI
1920.78)

Response Surface
Create Response Surface Design...
Define Custom Response Surface Design...
Select Optimal Design...
Analyze Response Surface Design...
Predict...
Factorial Plots...
Contour Plot...
Surface Plot...
Overlaid Contour Plot...
Response Optimizer...

Response Optimizer
Identify the combination of predictor values that jointly optimize one or more fitted responses.

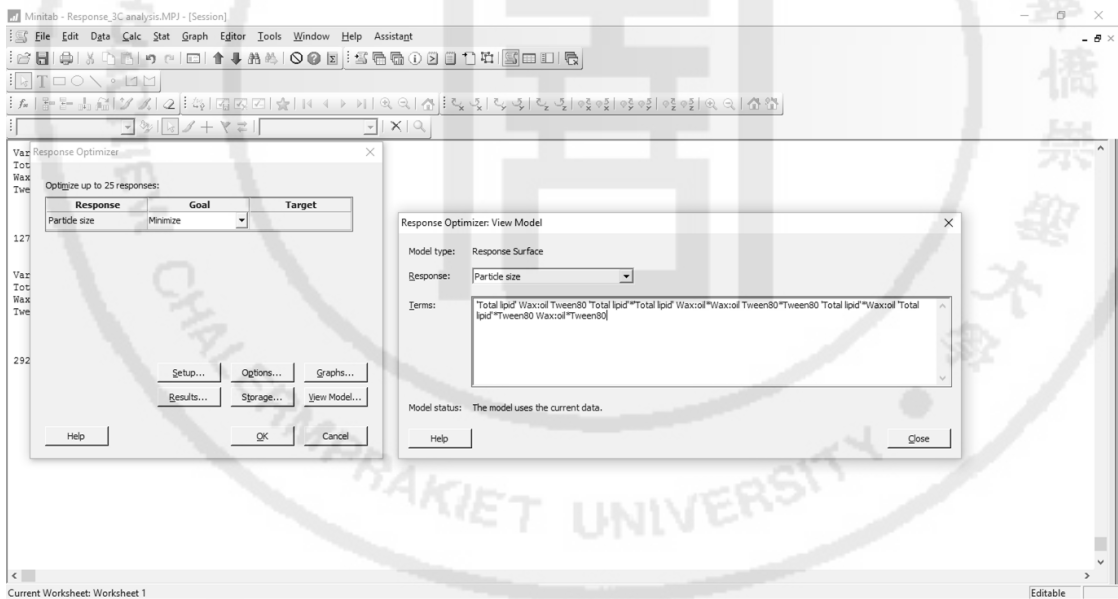
Variable Setting
Total lipid 5
Max:oil 2.75
Tween80 25

Fit SE Fit
1274.57 178.906 (851.

Variable Setting
Total lipid 5
Max:oil 2.75
Tween80 15

Fit SE Fit 95% CI 95% PI
292.374 178.906 (-130.671, 715.418) (-353.837, 838.585)

Current Worksheet: Worksheet 1



Minitab - Response_3C analysis.MPJ - [Session]

File Edit Data Calc Stat Graph Editor Tools Window Help Assisatg

Response Optimizer

Optimize up to 25 responses:

| Response | Goal | Target |
|---------------|----------|--------|
| Particle size | Minimize | |

Setup... Options... Graphs...
Results... Storage... View Model...
Help OK Cancel

Response Optimizer: View Model

Model type: Response Surface
Response: Particle size

Terms:
Total lipid*Wax:oil*Tween80 Total lipid**Total lipid*Wax:oil**Wax:oil*Tween80**Tween80*Total lipid*Wax:oil Total lipid**Tween80 Wax:oil**Tween80

Model status: The model uses the current data.
Help Close

Current Worksheet: Worksheet 1

ภาคผนวก ค

ภาพจาก Microscope ECLIPSE 50i (Nikon, ประเทศญี่ปุ่น)

- ลักษณะอนุภาคเบื้องต้นของ NLCs-SA หลังจากการเตรียม 24 ชั่วโมง



- ลักษณะอนุภาคเบื้องต้นของ NLCs หลังจากการเตรียม 24 ชั่วโมง



ภาคผนวก ง

ตัวอย่างการคำนวณหาค่าร้อยละความสามารถในการบรรจุสารสำคัญ

| | | | | | |
|---|------------------------|--|---------------------------|---|-----|
| ตำรับอิมัลชัน | 100.00 g | salicylic acid | 0.05 | g | |
| กระจายตัวในน้ำเย็น (1:20) | 1.00 | g มี salicylic acid | 0.0050 | g | |
| ตั้งนั้น นาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 21 | g มี salicylic acid | 0.0050 | g | (1) |
| ซึ่งตัวอย่างนาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 4.0006 | g ลงใน centrifuge filter tube | | | |
| ปิเปตตัวอย่างส่วนใสจาก filter tube | 0.8 | ml เจือจางเป็น 10 ml (dilution factor) | | | |
| ค่าการดูดกลืนแสง free salicylic จากตำรับเท่ากับ | 0.3884 | | | | |
| สมการจากกราฟมาตรฐาน | $y = 0.0249x + 0.0016$ | | | | |
| ได้ความเข้มข้น free salicylic acid จากกราฟ | 15.527 | $\mu\text{g/ml}$ (x dilution factor) | | | |
| ตั้งนั้น ปริมาณ free salicylic acid จาก filter tube เท่ากับ | 194.0875 | μg | | | |
| นาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 4.0006 | g พบ free salicylic acid | 194.0875×10^{-6} | g | |
| นาโนพาร์ทิเคิลไขมัน | 21 | g จะพบ free salicylic acid | 0.001019 | g | (2) |

$$\begin{aligned}
 \text{Encapsulation efficacy (\%)} &= \frac{(1) - (2)}{(1)} \times 100 \\
 &= \frac{0.0050 - (0.001019)}{0.0050} \times 100 \\
 &= 79.62\%
 \end{aligned}$$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล นางสาวเกศระวี ปานทับ
วัน เดือน ปีเกิด 14 ธันวาคม 2532
ที่อยู่ปัจจุบัน 64 ถนนประชาราษฎร์ ตำบลเมือง อำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย
ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2550 โรงเรียนสวรรคค่อนันต์วิทยา (วิทย์-คณิต)
พ.ศ. 2554 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม
ประวัติการทำงาน
พ.ศ. 2555 บริษัท คิเนติกส์ เอ็นจิเนียริง จำกัด
เจ้าหน้าที่ห้องทดสอบและคลังสำรอง