บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระในผิวหนังของมนุษย์เกิดจากขบวนการเผาผลาญในร่างกาย ความเครียด จากสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อสุขภาพร่างกาย หรือรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่แผ่มายังผิวของร่างกาย โดยมีอยู่ในรูปแบบต่างๆ มากมายหลายชนิด เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet -}$) ไฮดรอกซิล (HO•) เปอร์ออกซิล (HOO•) อัลคอกซิล (RO•) อัลคิล (R•) ซัลเฟอร์ (S•) และอนุมูลที่มีคาร์บอนเป็นศูนย์กลาง (C•) เป็นต้น (Jurkovic et al. 2003, Mishra et al. 2012) แม้ว่าในผิวหนังของระบบสิ่งมีชีวิตมีขบวนการการป้องกันโดยปฏิกิริยาอัตโนมัติจากโมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก ได้แก่ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมัสเทส (Superoxide dismutase) คาทาเลส (Catalase) กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) กลูตาไทโอนรีดักเทส (Glutathione reductase) ไธโอรีดอกซินรีดักเทส (Thioredoxin reductase) แอล-เออร์โกไธโอนีอิน (L-Ergothioneine : EGT) เป็นต้น และ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น แอสคอร์เบท (Ascorbate) กลูตาไทโอน (Glutathione) อัลฟาโทโคฟีรอล (α-Tocopherol) ยูบิควินอล (Ubiquinol) และ สารแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เป็นต้น และ การบริโภคอาหารนานาชนิด ผลไม้ และ วิตามิน ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอาหารจะถูกส่งมายังผิวหนังโดยขบวนการทางร่างกายที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมและการละลาย แต่ขบวนการนำส่งสารสามารถส่งสารมายังผิวหนังได้ในปริมาณที่จำกัดและสมรรถนะของสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านั้นถูกจำกัดจากอนุมูลอิสระที่มีมากมาย (Jurkovic et al. 2003, Kaur et al. 2007, Markova et al. 2009) จากอนุมูลอิสระที่มีมากเกินระดับนั้นพบว่าสามารถทำลายโครงสร้างโมเลกุลชีวภาพและเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของสารเหล่านั้นและยังนำไปสู่ความผิดปกติของเซลและอาจทำให้เซลตายได้ โดยผลสะสมของอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะชนิดที่เป็นออกซิเจน (Reactive oxygen species: ROS) สามารถเพิ่มความเครียดในระบบและปรากฏในรูปแบบของปัญหาสุขภาพหลากหลายชนิดซึ่งสามารถนำไปสู่โรคชราก่อนวัยและมะเร็งในผิวหนังได้ (Mishra et al. 2012) ปัจจุบันมีการค้นคว้าพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจมากมายโดยเฉพาะสารที่ได้มาจากธรรมชาติ เพื่อระบบการป้องกันทางผิวหนังและนำมาใช้โดยตรงที่ผิวหนังเป้าหมาย (Kaur et al. 2007, Markova et al. 2009)

จากการศึกษาพบว่าไลโคปีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดของสารแคโรทีนอยด์ที่พบในผิวหนัง โดยไลโคปีนมีฤทธิ์ในการจับอนุมูลออกซิเจนเดี่ยวเป็นสองเท่าของเบต้า-แคโรทีนและเป็นสิบเท่าของแอลฟา-โทโคฟีรอล (α-Tocopherol) จึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก มีการนำไลโคปีนไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ในอุตสาหกรรมยา อาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม อาหารสัตว์ และทางเครื่องสำอาง เป็นต้น โดยมีการใช้ในรูปแบบต่าง ๆ มากมาย (Balachandran and Rao. 2003, Darvin et al. 2008, Liu Donghong et al. 2008, Shi, J. et al. 2008) เนื่องจากไลโคปีนไม่สามารถสังเคราะห์ในร่างกายมนุษย์ได้ (Darvin et al. 2008) ต้องได้รับจากแหล่งสารอาหารภายนอก โดยในแหล่งธรรมชาติสามารถพบไลโคปีนได้ในสารที่เป็นเม็ดสีที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของสารสีแดง สามารถพบได้ในมะขือเทศ ฝรั่ง โรสฮิบ (Rosehip) แตงโม และเสาวรส สีชมพู ซึ่งพบว่ามะเขือเทศเป็นแหล่งที่ดีที่สุดของไลโคปีนโดยสารเม็ดสีของมะเขือเทศมีปริมาณไลโคปีนร้อยละ 80-90 (Kong et al. 2010, L.S. Vaughn Katherine et al. 2008, Shi John et al. 2008) นอกจากนี้มะเขือเทศจัดเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่หาได้ง่ายในประเทศไทย จากข้อมูลสำนักงาน

สถิติการเกษตรปี 2554 พบว่ามีการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวมะเขือเทศได้ถึง 145,060 ตัน และยังเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่แพร่หลายทั่วโลก (สมพร ภูติยานันต์. 2546)

สารไลโคปีนจากมะเขือเทศสามารถแยกออกมาได้โดยการสกัด ซึ่งวิธีการสกัดมีหลายวิธี ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) เช่น ในรายงานการศึกษาของ Lee, M.T และ Chen, B.H. (2001) สกัดด้วยตัวทำละลายผสมของเฮกเซน อะซีโตน และเอทธานอลได้สารไลโคปีน 20.76 ไมโครกรัมต่อกรัมมะเขือเทศสด เป็นต้น การสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction) โดยในงานวิจัยของวิชชุลดา ชัยพร (2549) ได้ทำการสกัดโดยใช้คาร์บอนได้ออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดได้สารไลโคปีน 596 ไมโครกรัมต่อกรัมมะเขือเทศแห้ง นอกจากนี้ในการศึกษาของ Liu Yongfeng และคณะ (2004) พบว่ามีการสกัดด้วยอัลตราซาวด์ ไมโครเวฟ และการสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด แต่การสกัดดังกล่าวเป็นการใช้อุปกรณ์ในการสกัดที่มีต้นทุนสูง อย่างไรก็ตามการสกัดไลโคปีนสามารถทำได้ง่ายจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย ซึ่งเป็นวิธีที่มีความสะดวกในระดับปฏิบัติการ ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความซับซ้อนและราคาสูง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้เอทธิลอะซีเตทซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (L.S. Vaughn Katherine et al. 2008, Liu Yongfeng et al. 2004) สารสกัดจากมะเขือเทศด้วยตัวทำละลายที่ได้เบื้องต้นพบว่าในสารสกัดประกอบด้วยสารหลายชนิดมากมายรวมทั้งสารไลโคปีนที่ต้องการไปใช้ ควรนำมาทำการแยกสารรบกวน (Interfering substances) ที่ไม่ต้องการและเพื่อให้ได้สารสกัดไลโคปีนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยวิธีที่นิยมมีหลายวิธีได้แก่ การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด (Liquid-liquid extraction) การกลั่น (Distillation) การตกผลึกแยกส่วน (Fractional crystallization) การเหวี่ยง (Centrifugation) อิเล็กโทรโฟเลซิส (Electrophoresis) และโครมาโทกราฟี (Chromatography) โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารให้ได้ปริมาณมาก (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547)

เนื่องจากสภาพความคงตัวของไลโคปีนอาจจะแปรเปลี่ยนได้ตามความแตกต่างของแหล่งที่มา กระบวนการเตรียมและสภาพการเก็บรักษา อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการ (Lee, M.T. and Chen, B.H. 2002, Shi John et al. 2008) หากใช้ระบบการกักเก็บสารระดับนาโนเทคโนโลยีจะสามารถช่วยยืดอายุความคงตัวของไลโคปีนได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่เปลี่ยนแปลงธรรมชาติทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร (Kaur et al. 2007) ทั้งยังใช้เป็นตัวนำส่งสารไปยังเป้าหมายได้อีกด้วย (Uchegbu and Vyas. 1998) โดยเทคโนโลยีการกักเก็บสารระดับนาโนที่ใช้ในการรักษาสภาพความคงตัวของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น การทำให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Complexation) เอนแคปซูเลชัน (Encapsulation) การดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี (Chemical structure modification) และระบบนำส่งแบบถุง (Vesicle delivery system) เป็นต้น (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552, Jurkovic et al. 2003, Kaur et al. 2007)

ระบบนำส่งแบบถุง (Vesicle delivery system) เป็นรูปแบบหนึ่งของระบบนำส่งยาระดับนาโนเทคโนโลยีที่น่าสนใจที่ช่วยคงสภาพและช่วยนำส่งสารที่กักเก็บในทางผิวหนัง เริ่มมีการศึกษาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1965 เพื่อใช้เป็นต้นแบบของเมมเบรนทางชีวภาพจากลิโพโซม (Liposome) ซึ่งเตรียมจากสารฟอสโฟลิพิด มีโครงสร้างเป็นถุงทรงกลม (Sperical shape) มีอนุภาคขนาดเล็ก โมเลกุลของสารที่ใช้ด้านหนึ่งชอบน้ำและอีกด้านหนึ่งชอบไขมัน (Amphiphile) จะเรียงตัวต่อกันเป็นผนังสองชั้น (Bilayer) โดยหันส่วนหัวที่ชอบน้ำออก ชั้นของผนังสองชั้นจะโอบล้อมเป็นถุงทรงกลมล้อมรอบส่วนของสารละลายน้ำไว้ ปัจจุบันมีการค้นคว้าพัฒนามากมายโดยสามารถเตรียมได้จากสารหลายชนิดและอาจใช้ชื่อตามสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการสร้างผนังถุงเช่น การใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Nonionic surfactants) เรียกว่า ไนโอโซม (Niosome) สารสฟิงโกลิพิด (Spingolipid) เรียกว่า สฟิงโกโซม (Sphingosome)

สารซีรามายด์ (Ceramide) เรียกว่า ซีรามายด์ (Ceramide) สารกลีเซอริลไดลอเรต (Glyceryl dilaurate) เรียกว่า โนวาโซม (Novasome) หรือสารแอสคอร์บิลปาล์มมิเตท (Ascorbyl palmitate) เรียกว่า แอสปาโซม (Aspasome) เป็นต้น (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552) ในงานวิจัยของ Gopinath, D. และคณะ (2004) ได้ทำการเตรียมแอสปาโซมเพื่อใช้ในการกักเก็บตัวยาอะซิโดไธมิดีน (Azidothymidine) และศึกษาการปลดปล่อยยาในหลอดทดลองแบบฟรานซ์ดิฟฟิวชันเซล (Franz diffusion cell) พบว่าตัวยาอะซิโดไธมิดีนที่กักเก็บในแอสปาโซมมีการซึมผ่าน (Permeation) สูงกว่าสารละลายอะซิโดไธมิดีน โดยจากงานวิจัยดังกล่าวนี้พบว่าสารแอสคอร์บิลปาล์มมิเตทที่นำมาใช้ในการเตรียมอนุภาคเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถเตรียมเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงได้ซึ่งทำให้มีความน่าสนใจในการนำมาเตรียมพร้อมทั้งศึกษาสภาพความคงตัวซึ่งไม่พบในงานวิจัยดังกล่าวเพื่อนำมาใช้ในการกักเก็บสารสกัดไลโคปีน

จุดมุ่งหมายในการศึกษานี้ เพื่อทำการเตรียมสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศด้วยวิธีการหมักแบบ (Maceration) จากนั้นทำการแยกสารสกัดมะเขือเทศเพื่อให้ได้ปริมาณไลโคปีนที่เข้มข้นขึ้นด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการแยกสารให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำสารไปกักเก็บด้วยระบบนำส่งแบบถุง โดยทำการเตรียมสูตรตำรับอนุภาคนำส่งแบบถุงและตรวจคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ ที่เตรียมจากแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มิเตท และคอเลสเตอรอล เพื่อนำสูตรตำรับอนุภาคนำส่งแบบถุงที่มีสภาพความคงตัวมาใช้ในการกักเก็บสารสกัดไลโคปีนและตรวจสอบการกักเก็บของสารสกัดไลโคปีนในอนุภาคนำส่งแบบถุงด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ (Kamil et al. 2011) และทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงและสารละลายสารสกัดไลโคปีนด้วยวิธี DPPH Assay (Brand-Williams et al. 1995, Liu Donghong et al. 2008) เพื่อนำผลที่ได้มาประเมินประสิทธิภาพอนุภาคนำส่งแบบถุงในการช่วยคงสภาพสารสกัดไลโคปีนทางด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1) เพื่อทำการเตรียมสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศ

2) เพื่อทำการเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงที่ไม่ได้กักเก็บและที่กักเก็บสารสกัดไลโคปีนที่มีความคงสภาพทางเคมีกายภาพ

3) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บและที่ไม่ได้กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุง

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1) เตรียมสารสกัดไลโคปีน
   1.1 เตรียมมะเขือเทศโดยการนำมะเขือเทศสดมาอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน
   1.2 ทำการหมักมะเขือเทศแห้งด้วยการหมักแบบมาเซอเรชัน
   1.3 ทำการแยกสารรบกวนจากสารสกัดมะเขือเทศด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี
2) ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดไลโคปีนด้วยรงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง
3) ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์รงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง
4) ตรวจเอกลักษณ์สารสกัดไลโคปีนด้วยนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์และแมสสเปกโทรเมทรี
5) เตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงที่ไม่ได้กักเก็บและที่กักเก็บสารสกัดไลโคปีนด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชัน
6) ตรวจคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของอนุภาคนำส่งแบบถุงที่ไม่ได้กักเก็บและที่กักเก็บสาร

สกัดไลโคปีนโดยการตรวจสอบดังนี้

6.1 สัณฐานวิทยาของอนุภาค

6.1.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์ (Polarized light microscopy)

6.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy)

6.2 วัดขนาดอนุภาค (Vesicle size) การกระจายอนุภาค (Polydispersity index) ศักย์ไฟฟ้าของอนุภาค (Zeta potential) โดยเครื่อง Delsa™ Nano C

6.3 ตรวจสอบสภาพความคงตัวของอนุภาคนำส่งแบบถุงที่ไม่ได้กักเก็บและที่กักเก็บสารสกัดไลโคปีน ภายใต้สภาวะในที่มืดที่อุณหภูมิ (4±2 ºC) และ ที่อุณหภูมิห้อง (28±2 ºC) เป็นเวลา 3 เดือน โดยตรวจคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของอนุภาคตามข้อ 6.1, 6.2 และ 6.3 ทุกเดือน

6.4 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR)

7) ตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บและที่ไม่ได้กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงด้วยวิธี DPPH Assay ภายใต้สภาวะการเก็บดังนี้

7.1 ในห้องที่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง (28±2 ºC) เป็นเวลา 5 วัน และทำการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทุก 24 ชั่วโมง

7.2 ในที่มืด ที่อุณหภูมิ (4±2 ºC) และที่อุณหภูมิห้อง (28±2 ºC) เป็นเวลา 3 เดือน

1.4 คำย่อหรือสัญลักษณ์

ºC	องศาเซลเซียส
ca.	ประมาณ (circa)
cm	เซนติเมตร
$DPPH^{\bullet}$	อนุมูล 2,2,-ไดฟีนิล-1-พิคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)
HPTLC	รงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง (High performance thin layer chromatography)
g	กรัม
µg	ไมโครกรัม
µl	ไมโครลิตร
µm	ไมโครเมตร
µmol	ไมโครโมล
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
n	จำนวนครั้ง
nm	นาโนเมตร
ppm	ส่วนในล้านส่วน (part per million)
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)
TLC	ทีแอลซี หรือรงคเลขผิวบาง (Thin layer chromatography)
%	ร้อยละ
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถเตรียมสารสกัดไลโคปีนกักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงได้

2) ทราบถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บและที่ไม่ได้กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงด้วยวิธี DPPH Assay

3) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอางได้