

การพัฒนาระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำ

พิชญาวรรณ ศรีมงคล¹, จุติพร เพชรภักดี¹, บังอร ศรีพานิชกุลชัย², คัทลียา เมฆจรสจุล^{3*}

บทคัดย่อ

บทนำ: กระชายดำมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย กระชายดำมีสารสำคัญกลุ่มเมทอกซีฟลาโวนที่พบได้ในปริมาณสูงและออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา แต่สารกลุ่มดังกล่าวมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำและดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้น้อย ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาระบบนำส่งนีโอโซมของสารสำคัญเมทอกซีฟลาโวนของสารสกัดกระชายดำ **วิธีการดำเนินการวิจัย:** เตรียมนีโอโซมด้วยวิธีทีนฟิล์มไฮเดรชันโดยศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิว 3 ชนิด คือ Span®60, Span®80 และ Tween®80 อัตราส่วนโดยมวลระหว่างสารลดแรงตึงผิวต่อคอเลสเตอรอลต่อกระชายดำเท่ากับ 1:1:0.1 นอกจากนี้ยังศึกษาผลของการเติมสารเพิ่มความคงตัว (ไดเอกซ์เตกิลฟอสเฟต) ต่อคุณลักษณะของนีโอโซม **ผลการศึกษาวิจัย:** พบว่านีโอโซมของกระชายดำที่ได้มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 0.164-2.919 μm นีโอโซมที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กที่สุดคือตำรับที่ใช้ Span®80 (0.164 μm , ค่า PDI เท่ากับ 0.503) นีโอโซมของกระชายดำมีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญอยู่ในช่วง 70-99 ซึ่งนีโอโซมที่ใช้ Span®60 มีร้อยละการกักเก็บสารสกัดกระชายดำสูงสุด (97.7-98.4) หลังทำการทดสอบความคงตัวพบว่านีโอโซมในตำรับที่ใช้ Span®60 และ Tween®80 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญลดลง แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญยังอยู่ในช่วงร้อยละ 85-91 ขณะที่ตำรับที่ใช้ Span®80 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 95.4-97.2) ผลของการเติมไดเอกซ์เตกิลฟอสเฟตพบว่าทำให้นีโอโซมที่ใช้ Span®60 และ Span®80 มีขนาดเพิ่มขึ้นและร้อยละการกักเก็บสารสำคัญลดลง แต่ตำรับที่ใช้ Tween®80 พบว่ามีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญเพิ่มขึ้นและขนาดอนุภาคเล็กลงหลังผ่านทดสอบความคงตัว นอกจากนี้ยังพบว่านีโอโซมที่ใช้ Tween®80 เกิดฟองมากในขั้นตอนการนำไปประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ **สรุปผลการวิจัย:** สารลดแรงตึงผิวที่ทำให้ได้ระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำที่ดีที่สุดในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือ Span®60 เนื่องจากเตรียมง่าย ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญสูง และมีความคงตัวสูง

คำสำคัญ: นาโนเทคโนโลยี, นีโอโซม, กระชายดำ, เมทอกซีฟลาโวน, สารลดแรงตึงผิว

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2559; 11(ฉบับพิเศษ): 70-79

¹นิสิตคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

²ปร.ด.; ศาสตราจารย์; ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

³ปร.ด.; อาจารย์หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.

มหาสารคาม 44150

*ติดต่อผู้พิมพ์: อ.ดร.คัทลียา เมฆจรสจุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

อีเมล: catheleeya.m@msu.ac.th

Development of Niosome as a Drug Delivery System of *Kaempferia parviflora*

Extract

Phitchayawan Srimongkon¹, Jutiporn Phechphakdee¹, Bungorn Sripanidkulchai², Catheleeya Mekjaruskul^{3*}

Abstract

Introduction: *Kaempferia parviflora* (KP) showed various pharmacological effects such as anti-inflammation, anti-oxidation, and antimicrobial activities. Its major contents include several methoxyflavones which possess many pharmacological effects. However, the methoxyflavones are known to be hydrophobic property and has low absorption, which limits the utilization of KP. This study was to investigate the feasibility of using niosome as a drug delivery system for KP extracts. **Methods:** Niosomes were prepared by thin film hydration method (using different surfactants including Span®60, Span®80, and Tween®80). The formulations composed of 1:1:0.1 mass ratio of non-ionic surfactant: cholesterol: KP extract as the vesicle forming agents. Furthermore, we also studied the effect of stabilizer (dihexadecyl phosphate) on niosomes properties. **Results:** The results showed particle sizes of the developed niosomes between 0.164-2.919 µm. Span®80-Niosome possessed significantly the lowest size as compared to the other formulations (0.164 µm, PDI 0.503). We successfully entrapped the methoxyflavones in all formulations with entrapment efficiencies between 70-99%. Among the tested formulations, Span®60-Niosome significantly possessed the highest entrapment efficiency (97.7-98.4%). For stability study by using heat-cool cycling method, the entrapment efficiency of Span®60-Niosome and Tween®80-Niosome significantly decreased but their entrapment percentage remained high (85-91%) whereas the entrapment efficiency of Span®80-Niosome significantly increased (95.4-97.2%). The effect of dihexadecyl phosphate on its stability showed that the particle sizes of Span®60-Niosome and Span®80-Niosome significantly increased and its percentage of entrapment significantly reduced. Nevertheless, Tween®80-niosome with dihexadecyl phosphate showed that its particle size was significantly decreased and the percentage of entrapment was significantly increased after keep in heat-cool cycling. However, Tween®80-Niosome contained a lot of bubbles during formulation and it showed phase separation after heat-cool cycling. **Conclusion:** Therefore, Span®60 was proper to be a non-ionic surfactant to formulate the niosome formulation as a novel drug delivery system of KP extract.

Keywords: nanotechnology, niosome, *Kaempferia parviflora*, methoxyflavones, surfactant

IJPS 2016; 11(Supplement): 70-79

¹Doctor of Pharmacy student in Pharmaceutical Care, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44150 Thailand

²Ph.D.; Professor, Center for Research and Development of Herbal Health Product, Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

³Ph.D.; Lecturer, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44150 Thailand

*Corresponding author: Catheleeya Mekjaruskul, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44150 Thailand Email: catheleeya.m@msu.ac.th

บทนำ

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*, KP) อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae นิยมปลูกกันมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย มีสรรพคุณทางยามากมายที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่สมัยโบราณ เช่น ในอดีตชาวเขาเผ่าม้งนิยมนำกระชายดำติดตัวไว้เพื่อกินเวลาปวดเมื่อย ซึ่งเชื่อกันว่ากระชายดำสามารถบรรเทาอาการปวดเมื่อยและอ่อนเพลียได้ (Sripanidkulchai, 2010) กระชายดำถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการบำรุงร่างกาย ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ กระตุ้นระบบประสาททำให้กระชุ่มกระชวย และยังเชื่อกันว่าเป็นยาอายุวัฒนะ (Daodee, 2010) จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเหง้ากระชายดำพบว่ามีสารประกอบกลุ่ม methoxyflavones โดยเฉพาะ 5,7-dimethoxyflavone (DMF), 5,7,4'-trimethoxyflavone (TMF) และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PMF) ซึ่งพบว่าเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพบได้ในปริมาณสูง (Sutthanut et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าสารสกัดกระชายดำและสารสำคัญในกระชายดำมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (Sae-wong et al., 2009) ยับยั้งแบคทีเรีย (Kumme et al., 2008) เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ (Chaturapanich et al., 2008) ต้านการแพ้ (Tewtrakul et al., 2008) ลดความอ้วน (Akase et al., 2011) ต้านอนุมูลอิสระ (Malakul et al., 2011) และรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate et al., 2005) เป็นต้น

นีโอโซม (Niosome) มีลักษณะเป็นถุงทรงกลม (vesicle) ที่มีโครงสร้างผนังเซลล์สองชั้น เกิดจากการเรียงตัวของโมเลกุลที่มีคุณสมบัติมีขั้วและไม่มีขั้วเข้าด้วยกันเป็นโมเลกุลเดียว จากการที่นีโอโซมที่มีลักษณะเป็นถุงกลมนี้นี้ทำให้นีโอโซมสามารถกักเก็บสารได้หลากหลายชนิด สารที่มีคุณสมบัติมีขั้วจะถูกกักเก็บในบริเวณตรงกลางของ vesicle ส่วนสารที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้วจะถูกกักเก็บไว้บริเวณส่วนผนังสองชั้น (bilayer membrane) จากคุณสมบัติดังกล่าวจะเห็นว่านีโอโซมสามารถนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยาทั้งที่

มีคุณสมบัติชอบหรือไม่ชอบไขมันได้ (Thanaketpaisarn, 2012)

จากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดและสารสำคัญของกระชายดำทั้ง 3 ชนิด (DMF, TMF และ PMF) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ เหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับลดการปวดอักเสบของกล้ามเนื้อ แต่เนื่องจากสารกลุ่มดังกล่าวมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้น้อย ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีนำส่งสารสกัดกระชายดำเพื่อเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านทางผิวหนัง (Skin permeability) โดยใช้ระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซม ซึ่งเป็นระบบที่ได้รับความนิยมในการนำมาเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านทางผิวหนัง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและสารเคมี

HPLC (Hitachi, China), คอลัมน์รุ่น Intertsil® ODS-3 ขนาด 5 μ m (4.6 x 250 mm, GLSciences, Japan), rotary evaporator (Heidolph, Germany), zetasizer (Malvern, UK) และ ultracentrifuge (Sorvall, USA) สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ dihexadecyl phosphate (Sigma Aldrich, Thailand), chloroform (BDH, UK), methanol (Fisher Scientific, UK) สารเคมีอื่นๆ สำหรับการเตรียมตัวรับเกรด Pharmaceutical เช่น Span®60, Span®80 และ Tween®80 และสารเคมีอื่นๆ สำหรับการวิเคราะห์เป็นเกรด analytical grade เช่น ethanol เป็นต้น

2. การเตรียมสารสกัดกระชายดำ และสารสำคัญ methoxyflavones

เหง้ากระชายดำจากจังหวัดเพชรบูรณ์สกัดด้วย 95% ethanol ตามวิธีในอนุสิทธิบัตรเลขที่ 4048 ขอรับอนุสิทธิบัตรเมื่อวันที่ 3 พ.ค. 2550 สารสำคัญ methoxyflavones ได้จากการแยกสารในสารสกัดกระชายดำด้วยวิธี column chromatography (Sutthanut et al., 2007)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ DMF, TMF และ PMF ด้วยวิธี HPLC

วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดโดยดัดแปลงจาก Mekjaruskul et al. (2013) ใช้คอลัมน์รุ่น Intertsil® ODS-3 (5 µm 4.6 x 250 mm) และใช้ 30% acetonitrile และ 70% ของ 0.5% formic acid ที่ละลายในน้ำเป็น วัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นค่อยๆ เพิ่มระดับให้ถึง 50% acetonitrile และ 50% formic acid ในเวลา 60 นาที ด้วยอัตราการไหล 1 mL/min และฉีดสารปริมาณ 20 µl เข้าไปในระบบ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร

4. การพัฒนาระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำ

4.1 การเตรียมระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซม

เตรียมตำรับนีโอโซมด้วยวิธีการทำให้เกิดฟิล์ม (Thin Film hydration method) โดย ชั่ง สารสกัดกระชายดำ คอเลสเทอรอล และเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุชนิดต่างๆ ได้แก่ Span®60, Span®80 และ Tween®80 ในอัตราส่วนคอเลสเทอรอล:สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่อัตราส่วน 1:1 และเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีเดียวกันแต่เติม dihexadecyl phosphate เพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับนีโอโซม ในอัตราส่วนคอเลสเทอรอล:สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ:dihexadecyl phosphate ที่อัตราส่วน 1:1:0.1 นำส่วนผสมดังกล่าวมาละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (methanol:chloroform = 1:1) ในขวดก้นกลมขนาด 100 ml จากนั้นเติมสารสกัดกระชายดำที่ละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (methanol:chloroform = 1:1) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกไปด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วในการหมุน 50 รอบต่อนาทีจนกระทั่งเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแห้งแล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อให้แผ่นฟิล์มพองตัวเข้ากับบัฟเฟอร์ (ดัดแปลงมาจาก Waddad et al., 2013)

การพัฒนาระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำทำทั้งหมด 6 ตำรับ ได้แก่ ตำรับที่ 1, 2

และ 3 ใช้ Span®60, Span®80, และ Tween®80 เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีขั้วตามลำดับ อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีขั้วต่อคอเลสเทอรอลต่อสารสกัดกระชายดำเป็น 1:1:0.1 โดยน้ำหนัก ส่วนตำรับที่ 4, 5 และ 6 ตั้งตำรับเช่นเดียวกับตำรับที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ แต่เติมสารเพิ่มความคงตัว คือ dihexadecyl phosphate 0.1 g

4.2 การประเมินคุณลักษณะของระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำ

ประเมินคุณลักษณะของนีโอโซมที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุชนิดต่างๆ ด้วยวิธีดังต่อไปนี้ เพื่อพิจารณาเลือกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่เหมาะสม

4.2.1 การศึกษาขนาดและการกระจายอนุภาคนีโอโซม

เจือจางนีโอโซม (100 µL) ด้วยน้ำที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 µm (900 µL) วัดขนาดและการกระจายอนุภาคนีโอโซมด้วยเครื่อง Zetasizer (3 ซ้ำ) ซึ่งรายงานผลออกมาเป็นค่า Z-Average และค่าการกระจายอนุภาคนีโอโซม แสดงค่า Polydispersity Index (PDI)

4.2.2 การวิเคราะห์หรรยาละการกักเก็บของ DMF, TMF และ PMF ในระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำ (ดัดแปลงมาจาก Waddad et al., 2013)

วิเคราะห์หรรยาละการกักเก็บสารสำคัญในนีโอโซมโดยปั่นเหวี่ยงนีโอโซมที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็ว 18,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 90 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย acetonitrile เพื่อเตรียมไปวัดหาปริมาณของสารสำคัญ (DMF, TMF และ PMF) ที่ไม่ถูกกักเก็บในนีโอโซม ด้วยเทคนิค HPLC คำนวณหรรยาละการกักเก็บจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{หรรยาละการกักเก็บ} = \frac{\text{ปริมาณของสารสกัดทั้งหมด} - \text{ปริมาณสารสกัดอิสระ}}{\text{ปริมาณสารสกัดทั้งหมดที่ใช้}} \times 100$$

5. การทดสอบความคงตัวของระบบนำส่ง อนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำด้วยวิธี heat-cool cycling

เก็บนีโอโซมในสภาวะที่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมงสลับกับการให้ความร้อนทันทีในตู้อบอุณหภูมิ 45°C นาน 24 ชั่วโมงสลับกันเช่นนี้ 6 รอบ แล้ววัดขนาดและการกระจายอนุภาค และหาร้อยละการกักเก็บ

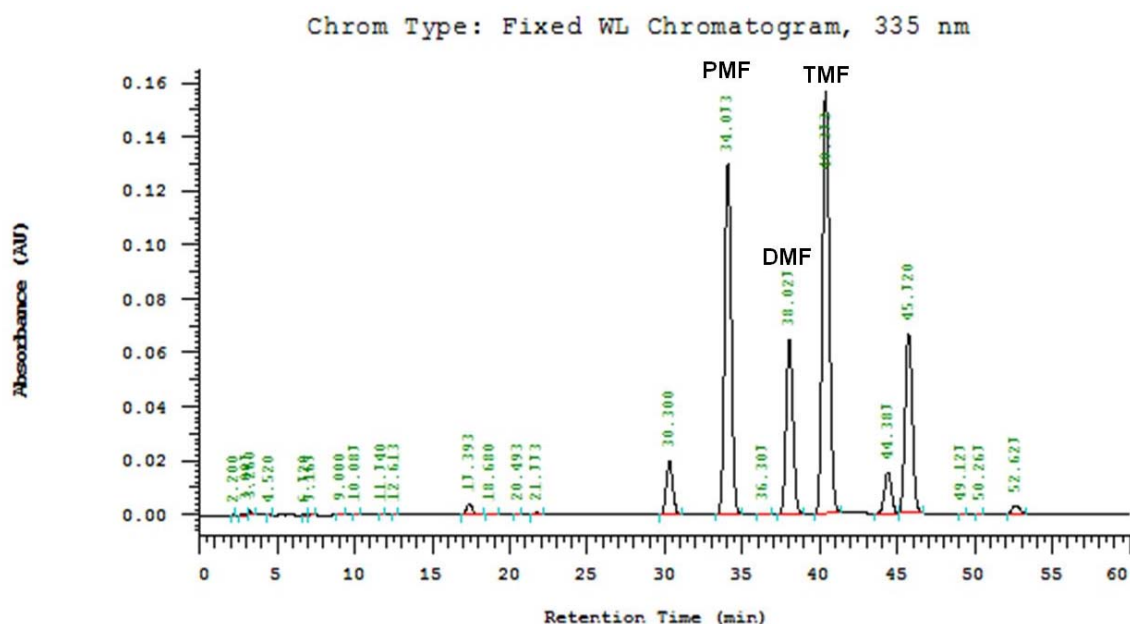
6. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างข้อมูลก่อนและหลังทดสอบความคงตัวด้วยสถิติ Paired-

sample t-test และทดสอบความแตกต่างทางสถิติทั้ง 6 สูตรด้วยสถิติ One way ANOVA และใช้ LSD สำหรับ Post Hoc analysis โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0

ผลการวิจัย

สารสกัดกระชายดำใน 95% ethanol ที่ได้มี %yields เท่ากับ 5.71% มีปริมาณสารสำคัญ DMF, TMF และ PMF เท่ากับ 0.98, 4.80 และ 4.69 mg/g of extract ตามลำดับซึ่งวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดกระชายดำ แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดกระชายดำ

1. ขนาดและการกระจายอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำ

ตำรับที่ใช้ Span®60 นีโอโซมที่ได้มีขนาดอนุภาคเท่ากับ $1.427 \pm 0.003 \mu\text{m}$ และค่า PDI เท่ากับ 0.745 ± 0.013 (ตารางที่ 1) ลักษณะของนีโอโซมหลังเตรียมเสร็จทันทีมีลักษณะเป็นอิมัลชันขาวขุ่นเป็นเนื้อเดียวกัน และหนึ่ง หลังจากทำการทดสอบความคงตัวในสภาวะ heat-cool cycling พบว่านีโอโซมมีขนาดอนุภาคเล็กลง ($0.878 \pm 0.003 \mu\text{m}$) แต่

ความหนืดลดลง สามารถไหลได้ ตำรับที่ใช้ Span®80 นีโอโซมที่ได้มีขนาดอนุภาคเท่ากับ $0.164 \pm 0.004 \mu\text{m}$ และค่า PDI เท่ากับ 0.503 ± 0.015 ลักษณะของนีโอโซมหลังเตรียมเสร็จทันทีมีลักษณะเป็นสารแขวนลอย ขุ่นทึบ สีน้ำตาลเข้ม หลังจากทำการทดสอบความคงตัวพบว่านีโอโซมมีขนาดอนุภาคไม่แตกต่างจากก่อนทดสอบความคงตัว ($0.174 \pm 0.004 \mu\text{m}$) และค่า PDI เท่ากับ 0.663 ± 0.015 ลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่าพบว่ามีการแยกชั้น มีตะกอนสี

เหลืองอยู่ด้านล่าง ตำรับที่ใช้ Tween®80 นีโอโซมที่ได้ มีขนาดอนุภาคเท่ากับ $1.173 \pm 0.003 \mu\text{m}$ และค่า PDI เท่ากับ 1.000 ± 0.000 ลักษณะของนีโอโซมหลังเตรียมเสร็จทันทีที่มีลักษณะเป็นสารแขวนตะกอน มีการแยกชั้น ส่วนใสสีเหลืองน้ำตาล ตะกอนสีขาว มีฟองอากาศอยู่ด้านบนเล็กน้อย หลังจากทำการทดสอบความคงตัวพบว่านีโอโซมมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น

เท่ากับ 6.047 ± 0.003 มีการแยกชั้น ตะกอนสีขาวอยู่ด้านล่าง

ตำรับที่เติม dihexadecyl phosphate เพื่อเพิ่มความคงตัวทำให้ขนาดอนุภาคของนีโอโซมที่เตรียมโดยใช้ Span®60, Span®80 และ Tween®80 มีขนาดใหญ่ขึ้น (ตารางที่ 1) และมีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญอยู่ในช่วง 70-99 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ขนาดอนุภาคของนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี heat-cool cycling

ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	ขนาดอนุภาค (μm)		Polydispersity index (PDI)	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
Span®60	1.427 ± 0.003	$0.878 \pm 0.003^*$	0.745 ± 0.013	$0.029 \pm 0.002^*$
Span®80	0.164 ± 0.004	$0.174 \pm 0.004^*$	0.503 ± 0.015	$0.663 \pm 0.015^*$
Tween®80	1.173 ± 0.003	$6.047 \pm 0.003^*$	1.000 ± 0.000	$0.050 \pm 0.003^*$
Span®60 + DCP	2.919 ± 0.005	$0.806 \pm 0.003^*$	0.995 ± 0.005	$0.217 \pm 0.021^*$
Span®80 + DCP	0.584 ± 0.006	$0.303 \pm 0.002^*$	0.992 ± 0.010	$0.948 \pm 0.004^*$
Tween®80 + DCP	2.113 ± 0.002	$2.082 \pm 0.004^*$	0.997 ± 0.006	$0.583 \pm 0.015^*$

*สภาวะก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$, DCP: dihexadecyl phosphate

2. การวิเคราะห์หรร้อยละการกักเก็บของ DMF, TMF และ PMF ในระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำ

ตำรับที่ใช้ Span®60 พบว่าก่อนทำการทดสอบความคงตัว นีโอโซมมีร้อยละการกักเก็บสาร DMF, TMF และ PMF เท่ากับ 97.68 ± 0.74 , 98.44 ± 0.39 และ 97.88 ± 0.87 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อทำการทดสอบความคงตัวแล้ว พบว่ามีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (87.56 ± 1.16 , 85.59 ± 0.60 และ 90.65 ± 0.99 ตามลำดับ)

ตำรับที่ใช้ Span®80 พบว่าก่อนทำการทดสอบความคงตัวนีโอโซมมีร้อยละการกักเก็บสาร DMF, TMF และ PMF เท่ากับ 83.26 ± 0.69 , 82.88 ± 0.18 และ 83.59 ± 0.66 ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบความคงตัวแล้ว พบว่ามีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (97.19 ± 0.27 , 96.04 ± 1.05 และ 95.46 ± 1.11 ตามลำดับ) ตำรับที่ใช้ Tween®80 พบว่าก่อนทำการทดสอบความคงตัวนีโอโซมมีร้อยละการกักเก็บสาร DMF, TMF และ PMF เท่ากับ 98.26 ± 0.33 , 98.15 ± 0.15 และ 97.67 ± 0.59 ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบความคงตัวแล้วพบว่า มีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (91.51 ± 0.79 , 91.55 ± 0.68 และ 91.54 ± 0.58 ตามลำดับ)

ตำรับที่เติม dihexadecyl phosphate มีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญน้อยกว่าตำรับที่ไม่ได้เติม เมื่อ

ทำการทดสอบความคงตัวตำรับที่ใช้ Span®60 มีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญลดลง ($P < 0.05$) ในขณะที่ตำรับที่ใช้ Span®80 และ Tween®80 พบว่ามีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เมื่อเก็บในสภาวะ heat-cool cycling (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ร้อยละในการกักเก็บสารสำคัญของตำรับนีโอโซมก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวด้วยวิธีทำ heat-cool cycling

*สภาวะก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.0$, DCP: dihexadecyl phosphate

ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญในนีโอโซม						
ชนิดของสารลดแรงตึงผิว	DMF		TMF		PMF	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
Span®60	97.68 ± 0.74	$87.56 \pm 1.16^*$	98.44 ± 0.39	$85.59 \pm 0.60^*$	97.88 ± 0.87	$90.65 \pm 0.99^*$
Span®80	83.26 ± 0.69	$97.19 \pm 0.27^*$	82.88 ± 0.18	$96.04 \pm 1.05^*$	83.59 ± 0.66	$95.46 \pm 1.11^*$
Tween®80	98.26 ± 0.33	$91.51 \pm 0.79^*$	98.15 ± 0.15	$91.55 \pm 0.68^*$	97.67 ± 0.59	$91.54 \pm 0.58^*$
Span®60 + DCP	89.34 ± 0.66	$82.32 \pm 1.14^*$	87.83 ± 0.21	$80.58 \pm 0.68^*$	91.62 ± 0.63	$87.55 \pm 0.60^*$
Span®80 + DCP	70.31 ± 0.92	$96.18 \pm 1.03^*$	70.44 ± 0.57	$95.32 \pm 1.11^*$	72.44 ± 0.60	$95.53 \pm 0.81^*$
Tween®80 + DCP	97.48 ± 0.16	$99.11 \pm 0.27^*$	97.07 ± 0.16	$98.88 \pm 0.27^*$	97.20 ± 0.80	99.02 ± 0.14

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

กระชายดำเป็นพืชที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยาที่หลากหลายตั้งแต่สมัยโบราณ จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่ากระชายดำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ (Yenjai et al., 2004; Sutthanut et al., 2007) แต่เนื่องด้วยสารสำคัญมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ จึงทำให้ซึมผ่านผิวหนังได้น้อย ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำเพื่อเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังโดยศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่มีความเหมาะสมในการตั้งตำรับ 3 ชนิด คือ Span®60, Span®80 และ Tween®80 จากการเตรียมนีโอโซมทั้ง 6 ตำรับพบว่าตำรับที่มีขนาดอนุภาคของนีโอโซมเล็กที่สุด ($0.164 \pm 0.004 \mu\text{m}$) และการกระจายตัวดีที่สุด (PDI เท่ากับ 0.503 ± 0.015) คือตำรับที่ใช้ Span®80 (ตำรับที่ 2) รองลงมาคือ Tween®80 (ตำรับที่ 3) และ Span®60 (ตำรับที่ 1) ตามลำดับ ($P < 0.05$) และเมื่อทำการศึกษาความคงตัว

โดยวิธี heat-cool cycling พบว่านีโอโซมทุกตำรับมีค่าการกระจายตัวที่ดี ($PDI \leq 1$) โดยตำรับที่มีการกระจายตัวของอนุภาคดีที่สุด (PDI 0.029 ± 0.002) คือตำรับที่ใช้ Span®60 (ตำรับที่ 1) ($P < 0.05$) และตำรับที่ใช้ Span®80 มีขนาดอนุภาคของนีโอโซมเล็กที่สุดเช่นเดิม นอกจากนี้ยังพบว่าตำรับที่มีลักษณะทางกายภาพดีเช่นเดิมคือตำรับที่ใช้ Span®60 (ตำรับที่ 1)

สำหรับชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่จะก่อตัวเป็นถุงอนุภาคนีโอโซมได้ควรมีค่าความชอบน้ำต่อไขมัน (hydrophilic-lipophilic balance: HLB) ที่เหมาะสม โดยการศึกษาของผู้วิจัยมีการใช้ Span®60, Span®80 และ Tween®80 ซึ่งมีค่า HLB เท่ากับ 4.7, 4.3 และ 15 ตามลำดับ (Griffin, 1949) พบว่าสารลดแรงตึงผิวทั้งสามชนิดมีการก่อตัวเป็นถุงอนุภาคนีโอโซมได้ ซึ่งการใช้ Span®60 และ Span®80 ให้ผลสอดคล้องกับศึกษาของ Yoshioka et al. (1994) ที่พบว่า Span® ที่มีค่า HLB อยู่ในช่วง 4 - 8 สามารถก่อตัวเป็นถุงอนุภาคนีโอโซมได้ แต่สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB อยู่

ในช่วง 14 - 17 ไม่เหมาะที่จะนำมาเตรียมนีโอโซม (Yoshioka et al., 1994) ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ ผู้วิจัยที่ใช้ Tween®80 ที่มีค่า HLB เท่ากับ 15 แต่สามารถก่อตัวเป็นอนุภาคนีโอโซมได้ และยังพบว่า มีร้อยละในการกักเก็บสารสำคัญสูงถึง 90 ซึ่งให้ผล สอดคล้องกับการศึกษาของ Waddad et al (2013) ที่มีการใช้ Tween®60 ซึ่งมีค่า HLB เท่ากับ 14.9 มีร้อยละ ในการกักเก็บสารสำคัญสูงถึง 93.4

ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญของตำรับนีโอโซม กระชายดำ 6 ตำรับ พบว่าทั้ง 6 ตำรับมีร้อยละการกัก เก็บสารสำคัญอยู่ในช่วง 70-99 โดยพบว่านีโอโซมที่ใช้ Span®60 และ Tween®80 มีความสามารถในการกัก เก็บสารสกัดกระชายดำที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดย อยู่ในช่วงร้อยละ 85-98 ซึ่งสูงกว่าตำรับที่ใช้ Span®80 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Shahiwal และ Misra (2002) ที่พบว่าค่า HLB มีผลต่อ ประสิทธิภาพการกักเก็บยาโดยค่า HLB ที่ลดลงจะทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บยาลดน้อยลง

เมื่อศึกษาความคงตัวโดยวิธี heat-cool cycling พบว่านีโอโซมตำรับที่ใช้ Span®60, Tween®80 และ Span®60 ร่วมกับ dihexadecyl phosphate มี ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญลดลงอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพใน การกักเก็บสารสำคัญยังอยู่ในช่วงร้อยละ 80-91 ซึ่งค่า ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญที่ได้จากการพัฒนานีโอ โซมในงานวิจัยนี้ยังมีค่ามากกว่าการศึกษาอื่นๆ เช่น การทำนีโอโซม Punicalagin จากเปลือกของทับทิมมี ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญในตำรับที่ดีที่สุดเพียง 65.93 (Hanu and Harmanpreet, 2012) การทำนีโอ โซมตรีผลามีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญในตำรับเพียง 47.65 ± 1.56 (Ramrit et al., 2014) และการพัฒนานีโอ โซมของสารสกัดใบมะม่วงมีร้อยละการกักเก็บ สารสำคัญ ใน ตำรับ เพียง 39.45-73.17 (Jiranaikulwanitch and Teeraniti, 2005) เป็นต้น ใน ตำรับที่มีการใช้ Span®80 พบว่าหลังจากศึกษาความ คงตัวโดยวิธี heat-cool cycling ตำรับดังกล่าวมี ความสามารถในการกักเก็บสารสกัดกระชายดำสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก Span®80 ใช้ระยะเวลาในการ พองตัวเป็นนีโอโซมนานกว่าสารลดแรงตึงผิวตัวอื่นๆ

ซึ่ง Kato et al. (2008) ได้ทำการศึกษาพบว่า Span®80 ต้องใช้ระยะเวลาหนึ่งในการเกิดเป็นนีโอโซม ที่สมบูรณ์ โดยพบว่าต้องใช้เวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C หรือ 25°C

Waddad et al. (2013) ศึกษาการเตรียมนีโอ โซม ของ Morin hydrate และ การศึกษา ของ Abdelbary และ El-gendy (2008) ได้ทำการศึกษาการ เตรียม นีโอโซมของยา gentamicin โดยทั้งสอง การศึกษา มีรายงานว่า การเติม dihexadecyl phosphate ในตำรับสามารถป้องกันการเกาะกลุ่มกัน ของอนุภาคนีโอโซมและเพิ่มความคงตัวในการกระจาย ตัวของอนุภาค ดังนั้นในการศึกษาของผู้วิจัยจึงได้นำ วิธีนี้มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความคงตัวของตำรับนีโอ โซมกระชายดำ และเมื่อทำการเปรียบเทียบตำรับที่มี การเติมและไม่เติม dihexadecyl phosphate หลังจาก การเตรียมเสร็จทันทีที่ตำรับที่เติม dihexadecyl phosphate มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น ทั้งนี้อาจ เนื่องมาจากนีโอโซมมีมวลเพิ่มขึ้นในการก่อตัวเป็นนีโอ โซม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Abdelbary และ El-gendy (2008) ที่พบว่าตำรับที่เติม dihexadecyl phosphate มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น หลังจาก ทำการศึกษาความคงตัวโดยวิธี heat-cool cycling พบว่าการ dihexadecyl phosphate ทำให้ค่า PDI ลดลง การศึกษาผลของการเติม dihexadecyl phosphate ต่อผลการเพิ่มร้อยละการกักเก็บสารสำคัญ พบว่าก่อนทำการศึกษาความคงตัวโดยวิธี heat-cool cycling นีโอโซมใน ตำรับ ที่เติม dihexadecyl phosphate มีความสามารถในการกักเก็บสารสกัด กระชายดำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่ไม่เติม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทุกตำรับ ยกเว้น Tween®80 ที่ความสามารถในการกักเก็บสารสกัด กระชายดำลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) ซึ่งการศึกษาของ Waddad et al. (2013) ได้อภิปราย ผลของ dihexadecyl phosphate ต่อร้อยละการกักเก็บ สารสำคัญพบว่าร้อยละการกักเก็บสารสำคัญจะลดลง เมื่อปริมาณ dihexadecyl phosphate เพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ ความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญไม่ได้ขึ้นอยู่กับ dihexadecyl phosphate เพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับ ชนิดของสารลดแรงตึงผิวและปริมาณของ

คอเลสเตรอลด้วย หลังทำการศึกษาความคงตัวโดยวิธี heat-cool cycling พบว่านีโอโซมในตำรับที่ใช้ Tween®80 และเติม dihexadecyl phosphate มีความสามารถในการกักเก็บสารสกัดกระชายดำมากกว่าตำรับที่ไม่เติม dihexadecyl phosphate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สำหรับการเติม dihexadecyl phosphate ในนีโอโซมที่ใช้ Span®60 พบว่ามีความสามารถในการกักเก็บสารสกัดกระชายดำน้อยกว่าตำรับที่ไม่เติม dihexadecyl phosphate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการเติม dihexadecyl phosphate ในนีโอโซมที่ใช้ Span®80 มีผลทำให้ความสามารถในการกักเก็บสาร DMF และ TMF น้อยกว่าตำรับที่ไม่เติม dihexadecyl phosphate แต่ PMF สูงกว่าตำรับที่ไม่เติม dihexadecyl phosphate (ตำรับที่ 2) แต่ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$)

จากการพัฒนาระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำพบว่าระบบนำส่งอนุภาคนีโอโซมที่มีส่วนประกอบของ Span®80 มีขนาดอนุภาคเล็กและการกระจายตัวดีที่สุด และนีโอโซมที่มีส่วนประกอบของ Span®60 และ Tween®80 เป็นตำรับที่มีร้อยละการกักเก็บสารสกัดกระชายดำสูงสุด ถึงแม้ว่านีโอโซมที่ใช้ Tween®80 จะมีร้อยละในการกักเก็บสารสกัดกระชายดำที่สูงเทียบเท่ากับนีโอโซมที่ใช้ Span®60 แต่เมื่อพิจารณาถึงขั้นตอนในการเตรียมแล้วพบว่านีโอโซมในตำรับที่ใช้ Tween®80 มีขั้นตอนในการเตรียมค่อนข้างยาก เนื่องจากในขั้นตอนการนำไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่อง rotary evaporator นีโอโซมตำรับนี้เกิดฟองค่อนข้างมากจนฟองเข้าไปในตัวเครื่อง ดังนั้น Span®60 จึงเป็นสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเตรียมตำรับนีโอโซมของสารสกัดกระชายดำ เพราะได้นีโอโซมที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดี ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญสูง ขนาดอนุภาคเล็ก และสามารถเตรียมได้ง่าย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

References

- Abdelbary G, El-gendy N. Niosome-encapsulated gentamicin for ophthalmic controlled delivery. *Pharm Sci Tech* 2008; 9: 740-747.
- Akase T, Shimada T, Terabayashi S, et al. Antibesity effects of *Kaempferia parviflora* in spontaneously obese type II diabetic mice. *J Nat Med* 2011; 65: 73-80.
- Chaturapanich G, Chaiyakul S, Verawatnapakul V, et al. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatid blood flow in male rats. *Reproduction* 2008; 136: 515-522.
- Daoodee S. Products of *Kaempferia parviflora*. In: Sripanidkulchai B, editors. *Kaempferia parviflora*: Research and development. Khon Kaen: Klungnanavittaya printing; 2010. 333. [in Thai]
- Griffin W.C. Classification of surface active agents by HLB. *J Soc Cosmet Chem* 1949; 1: 311-326.
- Hanu P, Harmanpreet S. Formulation and evaluation of niosome containing punicalagin from peels of *Punica granatum*. *J Drug Deliv Therapeutics* 2012; 2(6): 56-67.
- Jiranaikulwanitch J, Teeraniti N. Preparation of mango leaf extract niosomes. A special project submitted in partial fulfillment of the requirement for the Bachelor degree of science in pharmacy 2005. [in Thai]

- Kato K, Walde P, Koine N, et al. Temperature-sensitive nonionic vesicles prepared from Span® 80 (Sorbitan Monooleate). *Langmuir* 2008; 24: 10762-10770.
- Kummee S, Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Antimicrobial activity of the ethanol extract and compounds from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Songklanakarin J Sci Technol* 2008; 30(4): 463-466.
- Malakul W, Ingkaninan K, Sawasdee P, et al. The ethanolic extract of *Kaempferia parviflora* reduces ischaemic injury in rat isolated hearts. *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 184-191.
- Mekjaruskul C, Yang YT, Leed MGD, et al. Novel formulation strategies for enhancing oral delivery of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* by SMEDDS or complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm.* 2013; 445: 1-11.
- Ramrit T, Yingngam B, Rungseewijitprapa W. Development of Tripala niosomes. *IJPS* 2014; 9: 22-26. [in Thai]
- Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D, et al. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J Ethnopharmacol* 2005; 102: 120-122.
- Sae-wong C, Tansakul P, Tewtrakul S. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW264.7) and in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 2009; 124: 576-80.
- Sripanidkulchai B. Botanical characteristics of *Kaempferia parviflora*. In: Sripanidkulchai B, editors. *Kaempferia parviflora*: Research and development. Khon Kaen: Klungnanavittaya printing; 2010. 47-48. [in Thai]
- Sutthanut K, Sripanidkulchai B, Yenjai C, et al. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *J Chromatogr A* 2007; 1143 (1-2): 227-233.
- Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Kummee S. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 191-193.
- Thanaketaipaisarn O. Niosome delivery systems in pharmaceutical applications. *IJPS* 2012; 8(2): 12-26. [in Thai]
- Waddad AY, Abbad S, Yu F, et al. Formulation characterization and pharmacokinetics of Morin hydrate niosomes prepared from various non-ionic surfactants. *Int J Pharm.* 2013; 456: 446-456.
- Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, et al. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* 2004; 75(1): 89-92.
- Yoshioka T, Sternberg B, Florence AT. Preparation and properties of vesicles (Niosomes) of sorbitan monoesters (Span-20, Span-40, Span-60 and Span-80) and a Sorbitan Triester (Span-85). *Int J Pharm* 1994; 105:1-6.