



## อิทธิพลของปริมาณสารสกัดมะเขว่นต่อลักษณะทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของนาโนอิมัลชัน

ปณิดา อาดำ และ สุกัญญา เทพวาที

ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ชฎานันท์ เอี่ยมสำอางค์\* ศิริชญาภรณ์ ห้วยหงษ์ทอง ศักดิ์หิรัญ สกุลเวช ดิเรโกชน รัตนอมร และ โชติทัต ศรีบุญ  
ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

\* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0 2564 7100 อีเมล: jayanant@nanotec.or.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2024.03.014

รับเมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2564 แก้ไขเมื่อ 9 พฤษภาคม 2565 ตอปรับเมื่อ 17 พฤษภาคม 2565 เผยแพร่ออนไลน์ 29 มีนาคม 2567

© 2024 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาณสารสกัดมะเขว่นต่อลักษณะทางเคมีกายภาพ ฤทธิ์ทางชีวภาพและความคงตัวของนาโนอิมัลชัน โดยทำการศึกษาปริมาณสารสกัดมะเขว่นที่แตกต่างกันได้แก่ 1% (ZLNE 1%) 5% (ZLNE 5%) และ 10% (ZLNE 10%) จากนั้นทำการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค ศักย์ซีต้า สี ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสำคัญ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ จากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มปริมาณสารสกัดมะเขว่นส่งผลให้นาโนอิมัลชันมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ค่าศักย์ซีต้าลดลง ค่าสีเขียวและสีเหลืองเพิ่มขึ้น ค่าความสว่างมีแนวโน้มลดลง สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มสาร 4-terpineol พบว่า ZLNE 10% มีร้อยละการห่อหุ้มมากที่สุด คือ 94.73% ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบว่า ZLNE 10% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ มากกว่า ZLNE 5% และ ZLNE 1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กล่าวโดยสรุป การเพิ่มปริมาณสารสกัดมะเขว่นส่งผลให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของนาโนอิมัลชันเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามยังต้องมีการปรับปรุงตำรับนาโนอิมัลชันให้มีความคงตัวมากยิ่งขึ้นเพื่อให้สามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางได้

**คำสำคัญ:** มะเขว่น นาโนอิมัลชัน ปริมาณน้ำมัน ฤทธิ์ทางชีวภาพ ความคงตัว

การอ้างอิงบทความ: ปณิดา อาดำ, สุกัญญา เทพวาที, ชฎานันท์ เอี่ยมสำอางค์, ศิริชญาภรณ์ ห้วยหงษ์ทอง, ศักดิ์หิรัญ สกุลเวช, ดิเรโกชน รัตนอมร และ โชติทัต ศรีบุญ, “อิทธิพลของปริมาณสารสกัดมะเขว่นต่อลักษณะทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของนาโนอิมัลชัน,” วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, ปีที่ 34, ฉบับที่ 2, หน้า 1-13, เลขที่บทความ 242-185837, เม.ย.-มิ.ย. 2567.



## Effect of *Zanthoxylum Limonella* (Dennst.) Alston. Content on Physicochemical Properties and Bioactivity of Nanoemulsion

Panida Adam and Sukanya Thepwatee

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok, Thailand

Jayanant lemsam-arn<sup>\*</sup>, Sirichayaporn Huayhongthong, Sakhiran Sakulwech, Tirapote Rattana-amron and Chotitas Sribun

National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathum Thani, Thailand

<sup>\*</sup> Corresponding Author, Tel. 0 2564 7100, E-mail: jayanant@nanotec.or.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2024.03.014

Received 28 February 2021; Revised 9 May 2022; Accepted 17 May 2022; Published online: 29 March 2024

© 2024 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

### Abstract

The objective of this research was to investigate the effect of *Zanthoxylum Limonella* (Dennst.) Alston. extract (ZL extract) content on physicochemical properties and bioactivity of nanoemulsion. Nanoemulsions were prepared with various amounts of ZL extract including 1% (1% ZLNE), 5% (5% ZLNE) and 10% (10% ZLNE). Particle size, zeta potential, color, encapsulation efficiency, antioxidant activity, phenolic content, and flavonoid content were evaluated. The results showed that increasing the content of the ZL extract significantly enlarged particle size ( $p < 0.05$ ) and reduced the zeta potential of the nanoemulsions. Regarding the color analysis, a higher amount of ZL extract resulted in intense green and yellow color index but tended to decrease lightness of the formulations. For the encapsulation efficiency of 4- terpineol, 10% ZLNE showed the highest encapsulation efficiency of 94.73% . It was in agreement with the antioxidant activity, phenolic content, and flavonoid content showing that 10% ZLNE has significantly higher bioactivity ( $p < 0.05$ ) than ZLNE 5% and ZLNE 1%, respectively. In conclusion, increasing the content of ZL extract promoted the bioactivities of the nanoemulsions. However, the stability of the nanoemulsion formulation requires further improvement before it can be used in pharmaceutical and cosmetics products.

**Keywords:** *Zanthoxylum Limonella* (Dennst.) Alston, Nanoemulsion, Oil Content, Bioactivity, Stability

Please cite this article as: name, "Effect of *Zanthoxylum Limonella* (Dennst.) Alston. content on physicochemical properties and bioactivity of nanoemulsion," *The Journal of KMUTNB*, vol. 34, no. 2, pp. 1–13, ID. 242-185837, Apr.–Jun. 2024 (in Thai).

## 1. บทนำ

ในปัจจุบันพืชสมุนไพร หรือสารสกัดจากธรรมชาติ ได้รับความนิยมนำมาใช้ในการนำมาใช้เป็นยาโรค และ เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง สาเหตุเนื่องมาจากการยอมรับผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติที่ได้รับความนิยมลดลง ซึ่งเกิดจากความกังวลเกี่ยวกับผลข้างเคียงที่อาจส่งผลกระทบต่อร่างกาย และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Shukla และคณะ [1] เกี่ยวกับผลเสียของอนุภาคนาโนไททาเนียมไดออกไซด์ (Nano-TiO<sub>2</sub>) ซึ่งเป็นหนึ่งในห้าอันดับแรกของอนุภาคนาโนที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ยา ครีมกันแดด และโลชั่น พบว่า การใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวทาลงบนผิวหนังส่งผลให้เกิดการเหนียวทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจส่งผลให้มีการทำลายดีเอ็นเอหรือเซลล์ในร่างกายได้ หรืองานวิจัยของ Spisni และคณะ [2] เปิดเผยผลกระทบของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ (Nano-ZnO) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผลิตภัณฑ์กันแดด ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น สาหร่ายทะเล และโคเอดอม

*Zanthoxylum Limonella* (Dennst.) Alston. หรือมะแขว่น เป็นพืชเศรษฐกิจท้องถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทย ชาวเหนือนิยมนำผลมะแขว่นแห้งมาประกอบอาหาร แต่งกลิ่น แต่งรส เนื่องจากผลแห้งมีกลิ่นหอมแรง และมีรสเผ็ดร้อน Janpen และคณะ [3] ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผลมะแขว่นแห้งบดที่สกัดโดยใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำ (Hydrodistillation) ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรสโกปี พบว่ามีสารประกอบกลุ่มโมโนเทอร์พีนมากที่สุด (88.3%) รองลงมา คือ ออกซิเจนเตตเต-โมโนเทอร์พีน (7.6%) และเซสควิเทอร์พีน (1.4%) สารสกัดมะแขว่นมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ด้านแบคทีเรีย และต้านอนุมูลอิสระ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiwajinda และคณะ [4] ที่พบว่า สารสกัดเอทานอลจากผลแห้งของมะแขว่นที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 28.4% และที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Human Promyelocytic Leukemia (HL-60) และ

อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (NO<sup>•</sup>) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู ได้ถึง 89.4% และ 23.4% ตามลำดับ จากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดมะแขว่น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำสารสกัดมะแขว่นมาพัฒนาเป็นองค์ประกอบของยาและเครื่องสำอาง เพื่อช่วยเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจและยกระดับมาตรฐานสมุนไพรของไทย

แม้ว่าสารสกัดมะแขว่นจะมีฤทธิ์ที่ดีและน่าสนใจในการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของยาและเครื่องสำอาง แต่สารสกัดมะแขว่นยังมีข้อจำกัดในการละลายน้ำต่ำ นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบได้ยาก และสารออกฤทธิ์เกิดการสลายตัวได้ง่ายเมื่อเจอความร้อน หรืออากาศ ในระหว่างกระบวนการผลิต [5]-[7] ดังนั้นเทคโนโลยีการห่อหุ้ม (Encapsulation Technology) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจและมีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถนำไปใช้แก้ปัญหาดังกล่าวได้เนื่องจากสารสำคัญที่ถูกห่อหุ้มสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น ทนต่อสภาพแวดล้อมได้มากขึ้น เสื่อมสภาพช้าลง ทำให้สารสำคัญยังคงออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญ และช่วยเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังได้ด้วย [8], [9] เทคโนโลยีการห่อหุ้มแบ่งออกได้หลายประเภท เช่น อนุภาคนาโนไขมันที่ประกอบด้วยไขมันแข็ง (Solid Lipid Nanoparticle; SLN) อนุภาคนาโนไขมันที่ประกอบด้วยส่วนผสมระหว่างไขมันแข็งและไขมันเหลว (Nanostructured Lipid Carrier; NLC) และอิมัลชัน (Emulsion) ที่ประกอบไปด้วย 3 องค์ประกอบหลัก ๆ คือ วัฏภาคน้ำ วัฏภาคน้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว หากแบ่งประเภทของอิมัลชันตามเสถียรภาพแล้ว สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ นาโนอิมัลชัน (Nanoemulsion) มีความเสถียรแบบจลนศาสตร์และไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) มีความเสถียรแบบอุณหพลศาสตร์ และสามารถแบ่งเป็นประเภทย่อย ๆ ตามชนิดของวัฏภาคภายในและภายนอก อีก 2 ประเภท ได้แก่ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) และอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) ความคงตัวของระบบอิมัลชันจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวและน้ำมัน สัดส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและ



น้ำมัน และเครื่องมือในการลดขนาดอนุภาค เป็นต้น [10] ในการศึกษาที่ทางทีมวิจัยได้ใช้เทคโนโลยีการห่อหุ้มในรูปแบบอิมัลชันประเภทนาโนอิมัลชันสำหรับห่อหุ้มสารสกัดมะแขว่น เนื่องจากนาโนอิมัลชันมีความสามารถในการบรรจุหรือสารสำคัญที่ไม่มีขั้วได้มากกว่าประเภทไมโครอิมัลชัน [11] จากการศึกษาปัจจัยชนิดของน้ำมัน ชนิดของสารลดแรงตึงผิวและค่าสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน (Hydrophile-Lipophile Balance; HLB) ของสารลดแรงตึงผิวพบว่า นาโนอิมัลชันที่ประกอบด้วย สารสกัด มะแขว่น 1% น้ำมันยูคาลิปตัส สารลดแรงตึงผิว สเปน 20 และทวิน 80 ที่มีค่า HLB รวมของสารลดแรงตึงผิวในระบบเท่ากับ 12 ให้ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดี รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงตัวมากที่สุด มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย  $212.87 \pm 3.28$  นาโนเมตร ค่าศักย์ซีต้า  $-25.30 \pm 0.36$  มิลลิโวลต์ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ร้อยละ 55.94 จากการศึกษารายงานของ Valente และคณะ [12] พบว่า การเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหย *Oenanthe crocata* L. มีผลช่วยเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ที่ถูกสังเคราะห์จากเซลล์ของเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบได้ดียิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาปัจจัยการเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในนาโนอิมัลชัน เนื่องจากอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้ดียิ่งขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในนาโนอิมัลชันอาจส่งผลกระทบต่อลักษณะทางเคมีกายภาพและความคงตัวของตำรับ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลปริมาณสารสกัดมะแขว่นต่อลักษณะทางเคมีกายภาพ ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความคงตัว ของนาโนอิมัลชัน เพื่อเป็นแนวทางในการต่อยอดในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและยาต่อไป

#### ตารางที่ 1 องค์ประกอบนาโนอิมัลชันมะแขว่น

สูตรนาโนอิมัลชัน	วัฏภาคน้ำมัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)			วัฏภาคน้ำ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	
	มะแขว่น	น้ำมันยูคาลิปตัส	สเปน 20	ทวิน 80	น้ำปราศจากไอออน
ZLNE 1%	1.00	1.00	1.97	3.03	93.00
ZLNE 5%	5.00	1.00	1.97	3.03	89.00
ZLNE 10%	10.00	1.00	1.97	3.03	84.00

ZLNE คือ ตำรับนาโนอิมัลชันมะแขว่น ย่อมาจาก *Zanthoxylum Limonella* nanoemulsion

## 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### 2.1 การเตรียมสารสกัดมะแขว่น

ทำการเตรียมสารสกัดมะแขว่นด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้ผลมะแขว่นแห้งและเอทานอลในอัตราส่วน 100 กรัม ต่อ 1 ลิตร ใส่ในภาชนะปิดและทำการหมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรอง และระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator; Heidolph Instruments) จะได้สารสกัดมะแขว่นเข้มข้น

### 2.2 การเตรียมนาโนอิมัลชันมะแขว่น

เตรียมตำรับนาโนอิมัลชันโดยซึ่งองค์ประกอบต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ลงในบีกเกอร์โดยแบ่งออกเป็น 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคน้ำมัน และวัฏภาคน้ำ จากนั้นให้ความร้อนพร้อมกันทั้ง 2 บีกเกอร์ ด้วยเครื่องกวนสารด้วยแท่งแม่เหล็กที่ความเร็วการหมุน 500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำมัน ผสมให้เข้ากันด้วยความเร็วการหมุน 700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดขนาดอิมัลชันตั้งต้นด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (High Speed Homogenizer) ที่ความเร็วการหมุน 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และลดขนาดอีกครั้งด้วยเครื่องอัลตราโซนิคชนิดโพรบ (Ultrasonic Probe Sonicator) ด้วยแอมพลิจูด (Amplitude) 30% โดยใช้รูปแบบความถี่แบบสลับช่วง (Pulse on-off; 30 วินาที) ใช้หัวกำเนิดความถี่สูงชนิด 219B เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำนาโนอิมัลชันมะแขว่นไปวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพ

## 2.3 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาค ดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค และศักย์ซีต้า

วิเคราะห์ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (Z-average) ดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Polydispersity Index; PDI) และค่าศักย์ซีต้า (Zeta Potential;  $\zeta$ ) ของอนุภาค โดยใช้เทคนิคการกระเจิงแสงแบบไดนามิก (Dynamic Light Scattering; DLS) ด้วยเครื่อง Zetasizer (Malvern Nano ZS; USA) เตรียมตัวอย่างโดยเจือจางนาโนอิมัลชันในน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วน นาโนอิมัลชัน : น้ำปราศจากไอออน เท่ากับ 2 : 100 โดยปริมาตร บรรจุใน Disposable วิเคราะห์โดยใช้มุม 175 องศา ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และบันทึกผล

## 2.4 การวิเคราะห์สี

วิเคราะห์สีของตำรับนาโนอิมัลชันโดยเตรียมตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร บรรจุในจานแก้ว (Glass Petri Dish) และนำไปวัดค่าสีโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์รุ่น CM-700d ซึ่งอาศัยหลักการการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry) วิเคราะห์ด้วยระบบ CIELab ซึ่งแสดงค่าสีด้วยค่า  $L^*a^*b^*$  โดย  $L^*$  แสดงถึงความสว่างของสี (Lightness) โดยมีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) ถึง 100 (สีขาว) แกน  $a^*$  แสดงค่าสีแดงและสีเขียว โดยค่าเป็นบวก ( $+a^*$ ) มีความเป็นสีแดงมากขึ้น หากค่าเป็นลบ ( $-a^*$ ) มีความเป็นสีเขียวมากขึ้น ส่วนแกน  $b^*$  แสดงค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน โดยค่าเป็นบวก ( $+b^*$ ) มีความเป็นสีเหลืองมากขึ้น และค่าเป็นลบ ( $-b^*$ ) มีความเป็นสีน้ำเงินมากขึ้น [13], [14]

## 2.5 การศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสำคัญ

การศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสำคัญทำการวิเคราะห์โดยเตรียมตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดสกัดสาร (Amicon®) ปั่นแยกสารด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายในหลอดส่วนบน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ในอัตราส่วน ตัวอย่าง:เฮกเซน เท่ากับ 1 : 1 นำไปผสมด้วย

เครื่องเขย่าสาร จากนั้นแยกส่วนใส และส่วนตะกอน (Pellet) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที นำส่วนใสใส่ขวดเก็บตัวอย่าง (Vial) และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Rawiwan และคณะ [15] ในงานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณสารสำคัญ 4-terpineol ในสารสกัดมะแขว่น และคำนวณหาร้อยละการห่อหุ้มสาร 4-terpineol (%Encapsulation Efficiency; %EE) จากสมการที่ (1)

$$\text{ร้อยละการห่อหุ้ม} = ((\text{ปริมาณสาร 4-terpineol ทั้งหมดในตำรับ} - \text{ปริมาณสาร 4-terpineol ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม}) / \text{ปริมาณสาร 4-terpineol ทั้งหมดในตำรับ}) / 100 \quad [16]$$

(1)

## 2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH' (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) ของนาโนอิมัลชันมะแขว่น ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Otohinoi และคณะ [17] ดังนี้ เตรียมตัวอย่างนาโนอิมัลชันมะแขว่นในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปิดสารละลายตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH' ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายผสมปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสมการที่ (2)

$$\text{ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ} = ((\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (สาร DPPH ในตัวทำละลายเมทานอล)} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง}) / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม}) \times 100 \quad [18]$$

(2)



2.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] picrylhydrazyl ดัดแปลงจากวิธีของ Loganayaki และคณะ [19] ซึ่งต้องทำการเตรียมสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ก่อนนำไปทดสอบ โดยนำสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 15.5 มิลลิโมลาร์ ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 4.88 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นระยะเวลา 14–16 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน ABTS เป็น ABTS<sup>•+</sup> ก่อนทำการทดสอบนำสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> มาเจือจางกับตัวทำละลายเอทานอลเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ  $0.700 \pm 0.02$  จากนั้นเตรียมตัวอย่างนาโนอิมัลชันมะเขว่นในเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วน 1 : 1 เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายผสมปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสมการที่ (3)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ = ((ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (สาร ABTS<sup>•+</sup> ในตัวทำละลายเอทานอล) - ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง)/ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม)  $\times$  100 [18] (3)

## 2.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในนาโนอิมัลชันมะเขว่นทำโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ดัดแปลงจากวิธีของ Azlim และคณะ [20] ในการทดลองนี้ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยเตรียมความเข้มข้นให้อยู่ในช่วง 0.025–1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม

ตัวอย่างนาโนอิมัลชัน มะเขว่นในเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่ถูกเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 เท่า ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารผสมปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

## 2.8 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในนาโนอิมัลชันมะเขว่น ทำโดยใช้วิธี Aluminum Chloride Colorimetry ดัดแปลงจากวิธีของ Pourmorad และคณะ [21] ซึ่งใช้สารเคอร์ซีตินเป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายเคอร์ซีตินในตัวทำละลายเมทานอลให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1.25–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมตัวอย่างนาโนอิมัลชันมะเขว่นในเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารอลูมิเนียมคลอไรด์ ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร นำสารผสม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมจากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน

## 2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

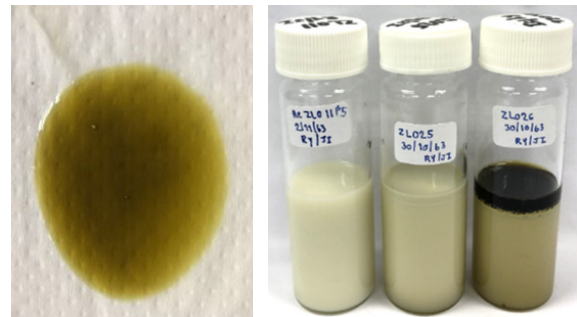
ในการนำเสนอข้อมูลได้ทำการเสนอเป็นค่าเฉลี่ยของการทดสอบข้อมูลที่ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง และใช้ซอฟต์แวร์ GraphPad Prism สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติ

นัยสำคัญทางสถิติของความแตกต่างได้รับการทดสอบโดยใช้การทดสอบชนิด t-test และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ในการพิจารณาว่า  $p$ -value หากพบว่า ค่า  $p$ -value มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 ขนาดอนุภาค ดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค และศักย์ซีต้า

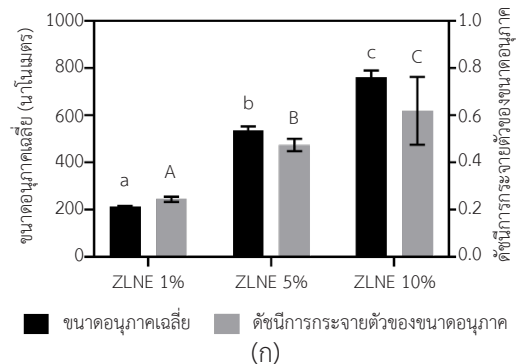
การพัฒนา นาโนอิมัลชันให้มีขนาดอนุภาคเล็กและมีความคงตัวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ชนิดของสารลดแรงตึงผิว ชนิดของน้ำมัน ปริมาณสารลดแรงตึงผิว และปริมาณน้ำมัน เป็นต้น [22], [23] ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาปริมาณสารสกัดมะแขว่นที่ใช้เป็นองค์ประกอบของนาโนอิมัลชัน ซึ่งเปรียบเสมือนการศึกษาปริมาณน้ำมันเนื่องจากสารสกัดมะแขว่นที่สกัดได้จากผลมะแขว่นแห้งมีลักษณะเป็นน้ำมันดังแสดงในรูปที่ 1 (ก) ผลการทดลองอิทธิพลของปริมาณสารสกัดมะแขว่นต่อลักษณะทางกายภาพพบว่า การเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในตำรับจาก 1% เป็น 5% และ 10% ส่งผลให้ตำรับนาโนอิมัลชันเกิดการแยกชั้นเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 (ข) โดยตำรับที่มีปริมาณสารสกัดมะแขว่น 1% 5% และ 10% จะเกิดการแยกชั้นหลังจากระยะเวลาผ่านไป 3 เดือน 1 วัน และครึ่งชั่วโมง ตามลำดับ โดยเมื่อนำไปเขย่ายังสามารถรวมตัวกลับมาเป็นเนื้อเดียวกันได้ ซึ่งแสดงถึงความไม่เสถียรของนาโนอิมัลชันในรูปแบบการเกิดครีม (Creaming) [24] เมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ขนาดอนุภาคและดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคพบว่า ให้ผลสอดคล้องกับลักษณะการแยกชั้น คือ ตำรับที่มีการเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นมากขึ้นมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นตามไปด้วย ดังแสดงในรูปที่ 2 (ก) ตำรับนาโนอิมัลชันที่มีปริมาณสารสกัดมะแขว่น 1%, 5% และ 10% มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย  $212.87 \pm 3.28$   $538.03 \pm 14.91$  และ  $760.83 \pm 28.34$  นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากสารสกัดมะแขว่นที่มีลักษณะเป็นน้ำมันถูกห่อหุ้มด้วยสารลดแรงตึงผิวที่มีปริมาณเท่าเดิมจึงทำให้มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น



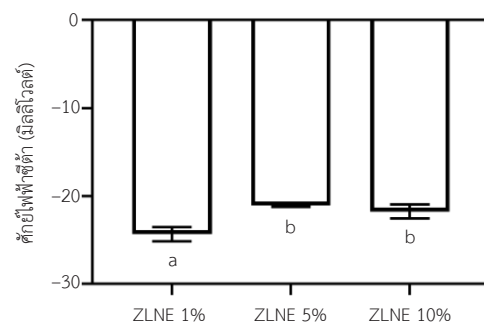
(ก)

(ข)

รูปที่ 1 (ก) ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดมะแขว่น (ข) ลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชันที่มีปริมาณสารสกัดมะแขว่นแตกต่างกัน



(ก)



(ข)

รูปที่ 2 อิทธิพลของการเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นต่อลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชัน(ก) ขนาดอนุภาคเฉลี่ย และดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (ข) ศักย์ซีต้า ตัวอย่างที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

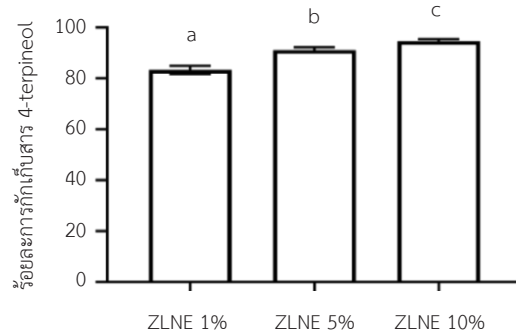


ซึ่งสัดส่วนของน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวที่ไม่สมดุล ส่งผลให้ขนาดอนุภาคมีความแตกต่างกันมากขึ้นด้วย สังเกตจากค่าดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ความคงตัวของตำรับนาโนอิมัลชันลดน้อยลงและเกิดการแยกชั้นได้ง่ายขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sakeena และคณะ [25] และ Komaiko และคณะ [26]

ค่าศักย์ซีต้า คือ ค่าประจุบริเวณพื้นผิวของอนุภาค ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งส่งผลต่อความเสถียรของระบบคอลลอยด์ เนื่องจากประจุบนพื้นผิวของอนุภาคจะส่งผลให้เกิดแรงผลักระหว่างอนุภาค ป้องกันไม่ให้อนุภาคเกิดการรวมตัวกันเป็นอนุภาคขนาดใหญ่และเกิดการแยกชั้น [27] โดยมีรายงานว่าอิมัลชันที่มีค่าศักย์ซีต้ามากกว่า  $\pm 30$  มิลลิโวลต์ จะให้ลักษณะทางกายภาพที่ดี และมีความคงตัว [28], [29] จากการทดลองพบว่า นาโนอิมัลชันที่มีองค์ประกอบสาร สกัดมะแขว่น 1% มีค่าศักย์ซีต้าติดลบมากกว่านาโนอิมัลชันที่มีสารสกัดมะแขว่น 5% และ 10% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 2 (ข) อย่างไรก็ตามนาโนอิมัลชันมะแขว่นทั้ง 3 ตำรับยังคงมีค่าศักย์ซีต่าน้อยกว่า  $-30$  มิลลิโวลต์ ซึ่งส่งผลต่อระยะเวลาความคงตัวของนาโนอิมัลชันที่ได้ [29]

### 3.2 สีของนาโนอิมัลชันมะแขว่น

จากผลการวิเคราะห์ค่าสีของนาโนอิมัลชันมะแขว่น ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ค่า  $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$  ของทุกตำรับนาโนอิมัลชันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสารสกัดมะแขว่นที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้ม โดยสารสกัดมะแขว่นที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มมีค่า  $L^*$  เข้าใกล้ 0 ส่วนค่า  $a^*$  และ  $b^*$  มีค่าเป็น + แสดงถึงสีของตำรับที่มีลักษณะสีแดงปนเหลืองและมีลักษณะสีเขียว ในขณะทีนาโนอิมัลชันมะแขว่นมีค่า  $L^*$  เข้าใกล้ 100 มีค่า  $a^*$  เป็น - และค่า  $b^*$  เป็น + แสดงสีของตำรับที่มีลักษณะเขียวปนเหลืองและมีลักษณะความสว่าง ซึ่งเป็นผลมาจากสารสกัดมะแขว่นถูกห่อหุ้มด้วยระบบนาโนอิมัลชัน จึงทำให้มีลักษณะสีอ่อนลง ทั้งนี้เมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในตำรับนาโนอิมัลชันส่งผลให้ลักษณะสีของตำรับมีสีเขียวและสีเหลืองเพิ่มมากขึ้น และค่าความสว่างมีแนวโน้มลดลง



รูปที่ 3 ร้อยละการห่อหุ้มสาร 4-terpineol ในตำรับนาโนอิมัลชันที่มีปริมาณสารสกัดมะแขว่นแตกต่างกัน ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 2 ค่าสีของนาโนอิมัลชันมะแขว่น

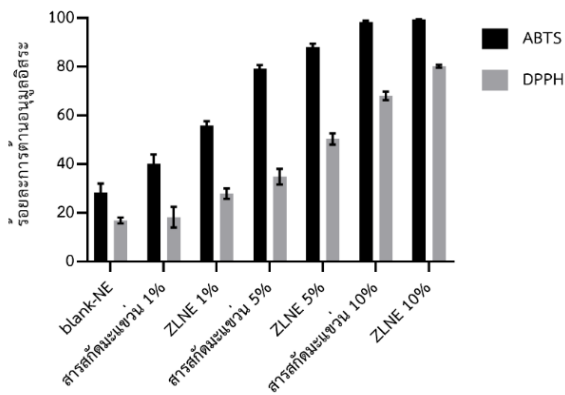
ตัวอย่าง	$L^*$	$a^*$	$b^*$
ZLNE 1%	62.13±0.07*	-3.52±0.00*	8.73±0.06*
ZLNE 5%	70.73±0.03*	-3.59±0.01*	11.22±0.01*
ZLNE 10%	55.25±0.49*	-4.11±0.05*	16.64±0.59*
สารสกัดมะแขว่น	6.53±0.09	2.21±0.03	0.98±0.32

สัญลักษณ์ดอกจันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างสารสกัดมะแขว่น

### 3.3 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสำคัญ

แม้ว่าการเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในตำรับส่งผลในเชิงลบกับขนาดอนุภาคและความคงตัวของนาโนอิมัลชัน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการห่อหุ้มสาร 4-terpineol ของตำรับนาโนอิมัลชันมะแขว่นพบว่าการเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในตำรับส่งผลให้มีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสาร 4-terpineol มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยตำรับนาโนอิมัลชันที่มีปริมาณสารสกัดมะแขว่น 1% 5% และ 10% สามารถห่อหุ้มสาร 4-terpineol ได้ร้อยละ  $83.43 \pm 1.64$   $91.30 \pm 1.04$  และ  $94.74 \pm 0.76\%$  ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3





รูปที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของนาโนอิมัลชันที่มีปริมาณสารสกัดมะแขว่นแตกต่างกัน (blank-NE คือ นาโนอิมัลชันที่ไม่มีสารสกัดมะแขว่น) ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

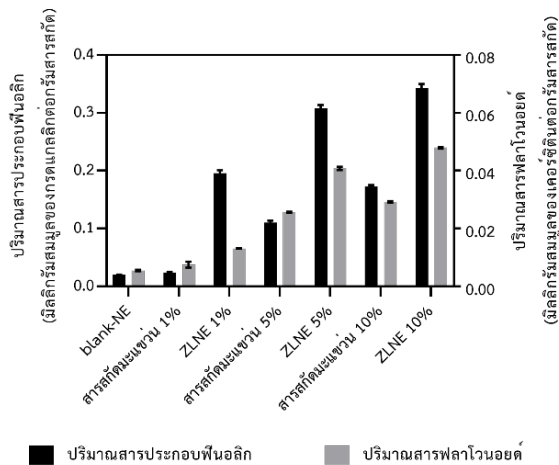
### 3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

รูปที่ 4 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะแขว่น ตำรับนาโนอิมัลชัน และ blank นาโนอิมัลชัน โดยใช้วิธี DPPH และ ABTS ผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน คือ นาโนอิมัลชันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารละลายสารสกัดมะแขว่นในเอทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากัน และการเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในตำรับนาโนอิมัลชันส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังนี้ ZLNE 1% < ZLNE 5% < ZLNE 10% ซึ่งประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของนาโนอิมัลชันที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในตำรับ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสำคัญที่เพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นเดียวกัน คือ ZLNE 1% < ZLNE 5% < ZLNE 10% โดยผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า ZLNE 10% มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ  $80.30 \pm 0.60$  และ  $99.35 \pm 0.21$  ตามลำดับ ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบด้วยวิธี ABTS แสดงค่าสูงกว่าผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH สอดคล้องกับงานวิจัยของ Floegel และคณะ [30]

และYangและคณะ [31] ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากสาร ABTS<sup>•+</sup> สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับสารต้านอนุมูลอิสระทั้งชนิดที่มีขั้วและไม่ขั้ว และสามารถใช้งานได้ในช่วง pH ที่กว้าง ในขณะที่ DPPH<sup>•</sup> สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่ไม่มีขั้ว และใช้งานได้ดีในช่วงประมาณ pH เท่ากับ 5.5 เท่านั้น [32]

### 3.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของนาโนอิมัลชันมะแขว่นโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร จะนำค่าความยาวคลื่นที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกโดยแทนค่าที่ตัวแปร  $x$  ในสมการ  $y = 1.7618x + 0.067$  ( $R^2$  เท่ากับ 0.9991) และค่า  $y$  ที่ได้คือปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic acid equivalent/g of extract) จากผลการทดลองในรูปที่ 5 พบว่า นาโนอิมัลชันมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสารละลายสารสกัดมะแขว่นใน เอทานอลที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน โดยที่ตำรับ ZLNE 1% ZLNE 5% และ ZLNE 10% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ  $0.19 \pm 0.00$   $0.31 \pm 0.01$  และ  $0.34 \pm 0.01$  มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดมะแขว่น ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างหลักประกอบ ด้วยวงแหวนอะโรมาติก และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เป็นหมู่แทนที่ จากโครงสร้างดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเมื่ออนุมูลอิสระดึง  $H^+$  ไปจากโครงสร้างของสารฟีนอลิก จะเกิดสารประกอบฟีนอลิกที่มีอนุมูลอิสระในโครงสร้าง ซึ่งด้วยลักษณะโครงสร้างที่มีวงอะโรมาติก อิเล็กตรอนโดดเดี่ยวจึงสามารถเคลื่อนที่ไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้มีความเสถียร และหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ [33]



รูปที่ 5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของนาโนอิมัลชันที่มีปริมาณสารสกัดมะแขว่นแตกต่างกัน (blank-NE คือนาโนอิมัลชันที่ไม่มีสารสกัดมะแขว่น)

### 3.6 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

การทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในนาโนอิมัลชันมะแขว่นทำโดยวิธี Aluminum Chloride Colorimetry โดยทำการคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์เทียบกับกราฟของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน ซึ่งมีสมการดังนี้  $y = 0.0039x + 0.042$  ( $R^2 = 0.9992$ ) โดยค่า  $y$  คือปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม และค่า  $x$  คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างหลังการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ค่า  $y$  ที่ได้จะออกมาในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of quercetin equivalent/g of extract) จากผลการทดลอง พบว่านาโนอิมัลชันมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าสารละลายสารสกัดมะแขว่นในเอทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยที่ตำรับ ZLNE 1% ZLNE 5% และ ZLNE 10% มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ  $0.01 \pm 0.00$   $0.04 \pm 0.00$  และ  $0.05 \pm 0.00$  มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมของสารสกัดมะแขว่น ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากสาร

ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกประเภทฟลิวอนอยด์ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก 2 วงขึ้นไป และมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล [34]

### 4. อภิปรายผลและสรุป

งานวิจัยนี้ศึกษาอิทธิพลของปริมาณสารสกัดมะแขว่นต่อลักษณะทางเคมีกายภาพ ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความคงตัวของนาโนอิมัลชันที่มีส่วนประกอบของ น้ำมันยูคาลิปตัส สารลดแรงตึงผิวสแปน 20 และทวิน 80 โดยแต่ละสูตรตำรับมีปริมาณสารสกัดมะแขว่นแตกต่างกัน คือ 1% (ZLNE 1%), 5% (ZLNE 5%) และ 10% (ZLNE 10%) ผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นส่งผลให้นาโนอิมัลชันมีความคงตัวลดลง เนื่องจากขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น ดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคสูงขึ้น และศักย์ซีตาลดลง อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณสารสกัดมะแขว่นในนาโนอิมัลชันส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงขึ้น ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสาร 4-terpineol ดีขึ้น เป็นผลให้ตำรับนาโนอิมัลชันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า นาโนอิมัลชันมะแขว่นทั้ง 3 ตำรับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดมะแขว่นที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มด้วยระบบนาโนอิมัลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่านาโนอิมัลชันเป็นระบบที่ดีสำหรับการห่อหุ้มสารสำคัญจากสารสกัดมะแขว่น เนื่องจากสามารถบรรจุสารสำคัญได้ปริมาณมาก มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสารสำคัญที่ไม่ละลายน้ำได้ดี สามารถเตรียมตำรับได้ง่าย และใช้องค์ประกอบน้อย [35] ซึ่งถือว่าเป็นระบบที่มีคุณประโยชน์มากเหมาะสำหรับการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของยาเวชสำอางและเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตามตำรับ ZLNE 10% ยังต้องมีการพัฒนาและศึกษาความคงตัวทางด้านกายภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยมีแนวทางในการพัฒนาตำรับนาโนอิมัลชันมะแขว่นให้มีลักษณะทางกายภาพที่คงตัวมากขึ้น โดยเสนอให้ทำการ

ศึกษาการปรับเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวในสัดส่วนที่เหมาะสมกับน้ำมันในระบบเพื่อให้สารลดแรงตึงผิวสามารถห่อหุ้มสารสกัดมะเขว่นและน้ำมันในระบบได้ดียิ่งขึ้น และอาจใช้เครื่องมือลดขนาดอนุภาคชนิดพลังงานสูงร่วมกัน เช่น เครื่องอัลตราโซนิกชนิดโพรวร่วมกับเครื่องปั่นผสมความดันสูง (High Pressure Homogenizer) เป็นต้น [36]

### 5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (NANOTEC) ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี รวมถึงการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือทดสอบต่าง ๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่เกี่ยวข้องซึ่งคอยช่วยเหลือติดต่อประสานงาน และขอขอบคุณ คณาจารย์ และภาควิชาเคมี อุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ที่ให้ความอนุเคราะห์ความรู้ และคำแนะนำต่าง ๆ ในการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

- [1] R. K. Shukla, V. Sharma, A. K. Pandey, S. Singh, S. Sultana, and A. Dhawan, “ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells,” *Toxicology in Vitro*, vol. 25, no. 1, pp. 231–241, 2011.
- [2] E. Spisni, S. Seo, S. H. Joo, and C. Su, “Release and toxicity comparison between industrial- and sunscreen-derived nano-ZnO particles,” *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 13, no. 10, pp. 2485–2494, 2016.
- [3] J. Tangjitjaroenkun, W. Chavasiri, S. Thunyaharn, and C. Yompakdee, “Bactericidal effects and time-kill studies of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella* on multi-drug

resistant bacteria,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 24, no. 4, pp. 363–370, 2012.

- [4] S. Jiwajinda, V. Santisopasri, A. Murakami, O.-K. Kim, H. W. Kim, and H. Ohigashi, “Suppressive effects of edible Thai plants on superoxide and nitric oxide generation,” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 3, no. 3, pp. 215–223, 2002.
- [5] L. Pommer. (2003). *Oxidation of terpenes in indoor environments: a study of influencing factors* [Online]. Available: <https://www.finna.fi/Record/vaari.1134031>
- [6] L. Wang and L. Wang, “Atmospheric oxidation mechanism of sabinene initiated by the hydroxyl radicals,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 122, no. 44, pp. 8783–8793, 2018.
- [7] C. Turek and F. C. Stintzing, “Stability of essential oils: A review,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 12, no. 1, pp. 40–53, 2013.
- [8] V. Piazzini, E. Monteforte, C. Luceri, E. Bigagli, A. R. Bilia, and M. C. Bergonzi, “Nanoemulsion for improving solubility and permeability of *Vitex agnus-castus* extract: formulation and in vitro evaluation using PAMPA and Caco-2 approaches,” *Drug Delivery*, vol. 24, no. 1, pp. 380–390, 2017.
- [9] F. Shakeel and W. Ramadan, “Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 356–62, 2010.
- [10] S. Ariyaprakai, “Nanoemulsion production by simple and low energy method,” *Food and Applied Bioscience Journal*, vol. 5, no. 3, pp. 155–164, 2017.



- [11] A. Simonazzi, A. G. Cid, M. Villegas, A. I. Romero, S. D. Palma, and J. M. Bermúdez, “Nanotechnology applications in drug controlled release,” in *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, 2018, pp. 81–116.
- [12] J. Valente, M. Zuzarte, M. J. Gonçalves, M. C. Lopes, C. Cavaleiro, L. Salgueiro and M. T. Cruz, “Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil,” *Food Chem Toxicol*, vol. 62, pp. 349–54, 2013.
- [13] B. C. K. Ly, E. B. Dyer, J. L. Feig, A. L. Chien, and S. D. Bino, “Research techniques made simple: Cutaneous colorimetry: A reliable technique for objective skin color measurement,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 140, no. 1, pp. 3–12.e1, 2020.
- [14] M. Hernandez-Carrion, M. Moyano-Molano, L. Ricaurte, A. Clavijo-Romero, and M. X. Quintanilla-Carvajal, “The effect of process variables on the physical properties and microstructure of HOPO nanoemulsion flakes obtained by refractance window,” *Scientific reports*, vol. 11, no. 1, pp. 9359, 2021.
- [15] R. Charoensup, T. Duangyod, P. Phuneerub, and C. Singharachai, “Pharmacognostic specification of *Zanthoxylum limonella* (Dennst.) Alston: Fruits and seeds in Thailand,” *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, vol. 7, no. 4, pp. 134–138, 2016.
- [16] T. H. Chou, D. S. Nugroho, J. Y. Chang, Y. S. Cheng, C. H. Liang, and M. J. Deng, “Encapsulation and characterization of nanoemulsions based on an anti-oxidative polymeric amphiphile for topical apigenin delivery,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 7, 2021.
- [17] D. A. Otohinoiyi, O. Ekpo, and O. Ibraheem, “Effect of ambient temperature storage on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) as a free radical for the evaluation of antioxidant activity,” *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, vol. 8, no. 3, 2014.
- [18] F. Ullah, N. Iqbal, M. Ayaz, A. Sadiq, I. Ullah, S. Ahmad, and M. Imran, “DPPH, ABTS free radical scavenging, antibacterial and phytochemical evaluation of crude methanolic extract and subsequent fractions of *Chenopodium botrys* aerial parts,” *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 30, no. 3, pp. 761–766, 2017.
- [19] N. Loganayaki, P. Siddhuraju, and S. Manian, “Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 50, no. 4, pp. 687–95, 2013.
- [20] A. A. Almey, C. A. J. Khan, I. S. Zahir, K. M. Suleiman, M. Aisyah, and K. K. Rahim, “Total phenolic content and primary antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of aromatic plants' leaves,” *International Food Research Journal*, vol. 17, no. 4, 2010.
- [21] F. Pourmorad, S. Hosseinimehr, and N. Shahabimajd, “Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, no. 11, 2006.
- [22] D. S. Shaker, R. A. H. Ishak, A. Ghoneim, and M. A. Elhuoni, “Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of

- hydrophobic and hydrophilic drugs,” *Scientia Pharmaceutica*, vol. 87, no. 3, 2019.
- [23] D. J. McClements, “Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 6, pp. 2297–2316, 2011.
- [24] Q. Liu, H. Huang, H. Chen, J. Lin, and Q. Wang, “Food-grade nanoemulsions: Preparation, stability and application in encapsulation of bioactive compounds,” *Molecules*, vol. 24, no. 23, 2019,
- [25] M. H. F. Sakeena, E. S. Mahdi, A. S. Munavvar, and A. M. Noor, “Effects of oil and drug concentrations on droplets size of palm oil esters (POEs) nanoemulsion,” *Journal of Oleo Science*, vol. 60, no. 4, pp. 155–158, 2011.
- [26] J. Komaiko and D. J. McClements, “Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size,” *Journal of Food Engineering*, vol. 146, pp. 122–128, 2015.
- [27] R. Wongsagonsup, S. Shobsngob, B. Oonkhanond, and S. Varavinit, “Zeta potential ( $\zeta$ ) and Pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches,” *Starch - Stärke*, vol. 57, no. 1, pp. 32–37, 2005.
- [28] K. GURPREET and S. K. SINGH, “Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques,” *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 781–789, 2018.
- [29] M. Arulprakasajothi, K. Elangovan, U. Chandrasekhar, and S. Suresh, “Performance study of conical strip inserts in tube heat exchanger using water based titanium oxide nanofluid,” *Thermal Science*, vol. 22, no. 1 Part B, pp. 477–485, 2018.
- [30] A. Floegel, D.-O. Kim, S.-J. Chung, S. I. Koo, and O. K. Chun, “Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 24, no. 7, pp. 1043–1048, 2011.
- [31] J. Yang, X. Ou, X. Zhang, Z. Zhou, and L. Ma, “Effect of different solvents on the measurement of phenolics and the antioxidant activity of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) with accelerated solvent extraction,” *Journal of Food Science*, vol. 82, no. 3, pp. 605–612, 2017.
- [32] I. G. Munteanu and C. Apetrei, “Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 7, 2021.
- [33] A. Zeb, “Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods,” *Journal of Food Biochemistry*, vol. 44, no. 9, Art. no. e13394, 2020.
- [34] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, “Flavonoids: An overview,” *Journal of Nutritional Science*, vol. 5, pp. e47, 2016.
- [35] B. Ojha, V. K. Jain, S. Gupta, S. Talegaonkar, and K. Jain, “Nanoemulgel: a promising novel formulation for treatment of skin ailments,” *Polymer Bulletin*, pp. 1–25, 2021.
- [36] S. Calligaris, S. Plazzotta, F. Bot, S. Grasselli, A. Malchiodi, and M. Anese, “Nanoemulsion preparation by combining high pressure homogenization and high power ultrasound at low energy densities,” *Food Research International*, vol. 83, pp. 25–30, 2016.

