

การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำฟอสโฟลิพิดจากน้ำมันของเมล็ดยางพาราไปใช้ประโยชน์ในรูปของอนุภาคไลโปโซม

Feasibility study on the utilization of phospholipids derived from para rubber seed oil for liposome particle formation

สุวัชชัย มิสุนา* และ นีรมล ศรีชนะ

Suwatchai Misuna* and Niramol Srichana

Received: 14 October 2024 ; Revised: 22 November 2024 ; Accepted: 13 December 2024

บทคัดย่อ

อนุภาคไลโปโซมสังเคราะห์ขึ้นได้โดยใช้ฟอสโฟลิพิดเป็นสารตั้งต้น ประโยชน์ของอนุภาคไลโปโซมคือสามารถกักเก็บสารสำคัญไว้ภายในเพื่อป้องกันการเสื่อมสลายและเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำฟอสโฟลิพิดจากน้ำมันเมล็ดยางพาราไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบอนุภาคไลโปโซม สกัดน้ำมันจากเมล็ดยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย แยกฟอสโฟลิพิดออกจากน้ำมันโดยการตีกับด้วยความร้อนและน้ำ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟอสโฟลิพิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง สังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมโดยวิธีการระเหยกลับวัฏภาค ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไลโปโซมด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงแบบพลวัต ศึกษาสัณฐานวิทยาของอนุภาคไลโปโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและศึกษาความคงตัวของอนุภาคไลโปโซมที่ระยะเวลา 0-12 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4°C ผลการทดลองพบว่าเมล็ดยางพารามีปริมาณน้ำมัน 45.25±0.04 %w/w ฟอสโฟลิพิดที่พบมากที่สุดไนกัมที่แยกได้จากน้ำมันเมล็ดยางพาราคือฟอสฟาติดีลโคลีนและฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (22.36±3.10 และ 17.39±0.51 มิลลิกรัม/น้ำมัน 100 กรัม) เมื่อใช้ฟอสโฟลิพิดเข้มข้น 0.1-2.0 %w/v ไปสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมด้วยวิธีการระเหยกลับวัฏภาคพบว่าอนุภาคไลโปโซมที่ได้กระจายตัวอยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำมีลักษณะเป็นสารผสมเนื้อเดียวสีเหลือง สัณฐานวิทยาของอนุภาคไลโปโซมมีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดอนุภาคไลโปโซมอยู่ระหว่าง 524-644 นาโนเมตร การกระจายตัวของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 0.33 ถึง 0.46 ค่าประจุบนผิวอนุภาคมีค่าระหว่าง -33 ถึง -58 มิลลิโวลต์ และอนุภาคไลโปโซมที่สังเคราะห์ได้มีความคงตัวสูงสุดที่เวลา 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าฟอสโฟลิพิดที่ได้จากน้ำมันของเมล็ดยางพาราส่งนำไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบอนุภาคไลโปโซมได้

คำสำคัญ: อนุภาคไลโปโซม, ฟอสโฟลิพิด, เมล็ดยางพารา, วิธีการระเหยกลับวัฏภาค

Abstract

Liposome particles can be synthesized using phospholipids as precursors. These particles can encapsulate crucial substances, prevent degradation and enhance the stability of the substances. The primary aim of this research is to investigate the application of phospholipids derived from para rubber seed oil for the formulation of liposome particles. Oil was extracted from para rubber seeds of the RRIM 600 variety using hexane as a solvent. Phospholipids were separated from the oil through a heat and water degumming process. The type and quantity of phospholipids were analyzed via a high-performance liquid chromatography technique. Liposome particles were synthesized using the reverse phase evaporation method, and the physical properties of liposome particles were measured by using the dynamic light scattering technique. The morphology of liposome particles was examined through transmission electron

* สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ต.เมือง อ.เมืองเลย จ.เลย 42000

* Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University, Muang, Muang Loei district, Loei province, 42000

* Corresponding author: E-mail: suwatchai.mis@lru.ac.th

microscopy. Additionally, the stability of the liposome particles was examined over a period of 0 to 12 weeks at 4 °C. The oil content in para rubber seeds was found to be 45.25 ± 0.04 %w/w. The predominant phospholipids identified in the gums isolated from para rubber seed oil were phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine (22.36 ± 3.10 and 17.39 ± 0.51 mg/100g of oil). When synthesizing liposome particles using 0.1-2.0% w/v of phospholipids, a homogeneous yellow mixture was obtained, with particles dispersed in an aqueous phase. These liposomes exhibited a spherical shape, with sizes ranging from 524 to 644 nanometers. The polydispersity index ranged from 0.33 to 0.46. The z-potential of the particles ranged from -33 to -58 mV and the synthesized particles exhibited the highest stability for 8 weeks. In summary, the phospholipids derived from para rubber seed oil can be utilized to form liposome particles.

Keywords: Liposome particles, phospholipid, para rubber seed, reverse phase evaporation method

บทนำ

ไลโปโซมเป็นรูปแบบหนึ่งของเทคโนโลยีเอนแคปซูลชั้นที่ใช้สร้างชั้นป้องกัน ห่อหุ้มหรือกักเก็บสารสำคัญที่อยู่ภายใน เช่น ยา วิตามิน สารต้านการเจริญของเชื้อ จุลินทรีย์และสารต้านออกซิเดชัน เป็นต้น ไลโปโซมสามารถป้องกันปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับสารสำคัญ ลดการเสื่อมสลายของสารสำคัญรวมถึงลดความเป็นพิษและลดการระคายเคืองจากการใช้สารสำคัญนั้นโดยตรง นอกจากนี้ไลโปโซมยังสามารถใช้ส่งสารสำคัญไปสู่อวัยวะเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจงและควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Estevinho *et al.*, 2014) ลักษณะของไลโปโซมเป็นอนุภาคกลมเกิดจากการเรียงตัวกันของสารแอมฟิฟิลล์ที่นำส่วนที่มีขั้วหันออกหาโมเลกุลของน้ำ ในขณะที่เดียวกันจะหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วของโมเลกุลเดียวกันเกิดเป็นอนุภาคที่มีหลายชั้นและหลายขนาด เช่น ไลโปโซมชั้นเดียว (Unilamella vesicle, ULV) ไลโปโซมหลายชั้น (Multilamella vesicle, MLV) ไลโปโซมขนาดเล็กและมีชั้นเดียว (Small unilamellar vesicle, SUV) หรือไลโปโซมขนาดใหญ่กว่า 100 นาโนเมตรและมีชั้นเดียว (Large unilamellar vesicle, LUV) (Madene *et al.*, 2006) โดยสารที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมประกอบไปด้วยสองเฟส คือเฟสภายนอก (Exterior phase) เช่น สารชั้นเคลือบที่อยู่ด้านนอก (Coating) สารที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลัก (Matrix) และสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวพา (Carrier material) ส่วนเฟสภายใน (Internal phase) เป็นส่วนของสารที่ถูกกักเก็บไว้ภายในอนุภาคไลโปโซม (Core material หรือ Active agent) (Terron-Mejia *et al.*, 2018) สารที่นิยมนำมาทำชั้นห่อหุ้มของอนุภาคไลโปโซมได้แก่เลซิทีนและสารในกลุ่มของฟอสโฟลิพิด เช่น ฟอสฟาติดีลโคลีน ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีนและฟอสฟาติดีลอินซิทอล เนื่องจากมีความปลอดภัยและสามารถเข้ากันได้ทั้งทางชีวภาพ (Venugaranti & Perumal, 2009) สำหรับการเตรียมอนุภาคไลโปโซมทำได้หลายวิธี เช่น วิธีอัลตราซาวนด์ วิธีปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูง

วิธีอัลตร้าผ่านแผ่นกรอง วิธีฉีดด้วยตัวทำละลาย วิธีทินฟิล์มไฮเดรชัน (Thin film hydration) และวิธีการระเหยกลับวัฏภาค (Schmidt & Lamprecht, 2009)

ฟอสโฟลิพิดเป็นลิพิดที่เกิดจากการรวมตัวกันระหว่างกลีเซอรอล กรดไขมันและหมู่ฟอสเฟตที่มาจากกรดฟอสฟอริก โครงสร้างทางเคมีของฟอสโฟลิพิดประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วชอบน้ำและส่วนที่ไม่มีขั้วไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุลเดียวกันเรียกว่าแอมฟิฟิลล์ เมื่อนำฟอสโฟลิพิดไปละลายน้ำจะเกิดโครงสร้างได้ 3 แบบ ได้แก่ แบบไมเซลล์ แบบแผ่นชั้นเดียว และแบบแผ่นสองชั้น ความหลากหลายของฟอสโฟลิพิดขึ้นอยู่กับหมู่ที่มาเชื่อมต่อกับหมู่ฟอสเฟต เช่น ฟอสฟาติดีลโคลีน ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน ฟอสฟาติดีลอินซิทอล กรดฟอสฟาติกและไลโซฟอสฟาติดีลโคลีน เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการนำฟอสโฟลิพิดที่ได้จากธรรมชาติในรูปของเลซิทีนไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง โดยสามารถแยกเลซิทีนได้จากน้ำมันของเมล็ดพืช เช่น ถั่วเหลือง เรพซิดและทานตะวัน (Hoogevest & Wendel, 2014) ขั้นตอนการแยกเลซิทีนออกจากราน้ำมันเมล็ดพืชมี 3 ขั้นตอน เริ่มด้วยการสกัดน้ำมัน (Oil extraction) การแยกกัมออกจากน้ำมัน (Degumming) และกำจัดน้ำมัน (Deoiling) จนได้เลซิทีน ถ้าต้องการฟอสโฟลิพิดที่มีความบริสุทธิ์สูงต้องนำเลซิทีนที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายและทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีจนได้ฟอสโฟลิพิดบริสุทธิ์ ตัวอย่างของฟอสโฟลิพิดที่พบมากในเลซิทีนที่ได้จากน้ำมันเมล็ดพืช เช่น เมล็ดถั่วเหลืองพบฟอสฟาติดีลโคลีน ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีนและฟอสฟาติดีลอินซิทอล เมล็ดทานตะวันและเมล็ดเรพซิดพบฟอสฟาติดีลโคลีนและฟอสฟาติดีลอินซิทอลเป็นองค์ประกอบมากที่สุด (Srinuan *et al.*, 2020)

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย พบการเพาะปลูกมากที่สุดที่ภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ผลผลิตหลักที่ได้จากการเพาะปลูกยางพาราคือน้ำยาง น้ำยางสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ

ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย เช่น การผลิตยางรถยนต์ ถูมือยาง รวมถึงเครื่องมือแพทย์ นอกจากนี้ยางแล้วในปัจจุบันพบว่าเมล็ดยางพาราที่เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งถือเป็นผลพลอยได้ของการใช้ประโยชน์จากยางพารา เช่น การนำน้ำมันที่ได้จากเมล็ดยางพาราไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Lourith, 2013) หรือการนำน้ำมันจากเมล็ดยางพาราไปเพิ่มมูลค่าเป็นผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวหน้าเพื่อการล้างเครื่องสำอางและเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว (Raknam *et al.*, 2020) ต้นยางพาราที่มีอายุ 3-5 ปี ให้เมล็ดยางพาราเฉลี่ยไร่ละ 10 กิโลกรัมต่อปี เมล็ดยางพาราจะถูกนำไปเพาะเพื่อทำเป็นต้นตอกก่อนจะเสียบยอดพันธุ์ปละร้อยละ 0.5 อีกร้อยละ 1.5 นำมาสกัดเป็นน้ำมันไบโอดีเซลส่วนที่เหลืออีกกว่าร้อยละ 98 ถูกทิ้ง (Raknam *et al.*, 2020) มีรายงานว่าในเมล็ดยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 มีน้ำมันเป็นส่วนประกอบร้อยละ 41 ในน้ำมันมีกรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 15 และพบว่ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวร้อยละ 83 (Kittigowittana *et al.*, 2013)

จากการสืบค้นงานวิจัยไม่พบการนำฟอสโฟลิพิดจากน้ำมันของเมล็ดยางพารามาประยุกต์ใช้ในรูปแบบของอนุภาคไลโปโซม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกๆ ที่ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์ของฟอสโฟลิพิดที่ได้จากน้ำมันเมล็ดยางพาราในรูปแบบของอนุภาคไลโปโซม โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาถึงการนำฟอสโฟลิพิดที่ได้จากน้ำมันเมล็ดยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 ที่เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยางไปสังเคราะห์ให้ได้เป็นอนุภาคไลโปโซมด้วยวิธีการระเหยกลั่นวัฏภาค ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไลโปโซม ได้แก่ ขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดอนุภาค ประจุนผิวอนุภาคและศึกษาสัณฐานวิทยาของอนุภาคไลโปโซม รวมถึงความคงตัวของอนุภาคไลโปโซมที่ระยะเวลาต่างๆ

การทดลอง

1. การสกัดน้ำมันและการวิเคราะห์ฟอสโฟลิพิด

การสกัดน้ำมันและแยกฟอสโฟลิพิดจากน้ำมันเมล็ดยางพาราได้ดัดแปลงจากวิธีของ Lourith *et al.* (2014) และวิธีของ Wendel and Hoogevest (2014) ทำได้โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 ในระยะแก่จากบ้านป่าไม้งาม ตำบลโคกขมิ้น อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดเลย แกะเปลือกของเมล็ดยางพาราและนำเอาเฉพาะส่วนเนื้อใน (Figure 1) มาทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่ 70°C บดให้ละเอียดและชั่งตัวอย่างที่แห้งและละเอียด 300 กรัม มาสกัดในเฮกเซน

600 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนกากไปสกัดต่อจนครบ 3 ครั้ง รวมส่วนของสารละลายที่กรองได้เข้าด้วยกันแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ นำน้ำมันที่ได้ไปทำการทดลองในขั้นต่อไป



Figure 1 RRIM 600 para rubber seed A=Para rubber seed, B=Kernel of the para rubber seed

นำน้ำมันเมล็ดยางพารามาให้ความร้อน 80°C ผสมกับน้ำกลั่นร้อยละ 2 กวนด้วยเครื่องกวนสาร เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของกัมที่ได้จะนำไปกำจัดน้ำมันโดยผสมกับเฮกเซนในอัตราส่วนของกัมต่อเฮกเซน 1:5 เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำชั้นตะกอนที่ได้มาสกัดต่อในอะซิโตน โดยใช้อัตราส่วนของกัมต่ออะซิโตน 1:1.5 เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนที่ไม่ละลายมาผสมกับเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 นาที ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสนำไปกำจัดตัวทำละลายโดยการให้ความร้อนด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70°C ตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเฮกเซนต่อไดเอทิลอีเทอร์ในอัตราส่วน 50:50 ปล่อยให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ขึ้นไป 20 เซนติเมตร นำไปส่องใต้กล้องยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานฟอสโฟลิพิด

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟอสโฟลิพิดดัดแปลงจากวิธีของ Rehman *et al.* (2017) ทำได้โดยละลายฟอสโฟลิพิดด้วยเมทานอลแล้วกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เฟสคงที่ที่เป็น C18 reverse phase column (300 mm x 4.5 mm x 5 μ m) แยกตัวอย่างออกจากเฟสคงที่โดยใช้เมทานอลในระบบไอโซเครติกด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจสอบตัวอย่างที่แยกได้ด้วยตัวตรวจวัดชนิดแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร เทียบกับสาร

มาตรฐานฟอสโฟลิพิด คำนวณปริมาณของฟอสโฟลิพิดโดยใช้กราฟมาตรฐานฟอสโฟลิพิดแต่ละชนิด (ฟอสฟาทีดิลโคลีน $Y=8.0559X + 115.63$ ฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีน $Y=12.136X + 121.74$)

2. การสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซม

การสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมดัดแปลงจากวิธีของ Fotini *et al.* (2004) และวิธีของ Azucena *et al.* (2019) ทำได้โดยเตรียมฟอสโฟลิพิดเข้มข้น 0.1-2.0 %w/v ผสมกับคลอเลสเทอรอล 0.001 กรัม ที่ละลายในคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในขวดกันกลม กำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40°C ปรับการหมุนของขวดกันกลมที่ 80 รอบต่อนาที เติมน้ำไดเอทิลอีเทอร์ 3 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เร่งการเกิดอนุภาคโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นกำจัดไดเอทิลอีเทอร์และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 5 มิลลิลิตร นำอนุภาคไลโปโซมที่ได้ไปศึกษาคูณสมบัติทางกายภาพโดยเทคนิคการกระเจิงแสงแบบพลวัต (Dynamic light scattering, DLS) ศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphology) ของอนุภาคไลโปโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านชนิด Field-Emission (Field-Emission Transmission electron microscope, FE-TEM)

3. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและสัณฐานวิทยาของอนุภาคไลโปโซม

เจือจางอนุภาคไลโปโซมด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 เท่า ปิเปตอนุภาคไลโปโซมมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแคพิลลารีชนิด Disposable folded capillary cells วัดขนาดอนุภาค (Particle size) การกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Polydispersity index, PDI) และประจุบนผิวอนุภาค (z-potential) โดยเครื่องวัดขนาดอนุภาคและประจุบนผิวอนุภาค (Zetasizer Nano ZS) วิเคราะห์ผลของขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดอนุภาค ประจุบนผิวอนุภาคด้วยโปรแกรม Zetasizer software

หยดอนุภาคไลโปโซมลงบนแผ่น Carbon film copper grids ขนาด 200 เมช ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านชนิด Field-Emission ยี่ห้อ Thermo Scientific โมเดล Talos F200X G2 ใช้กำลังไฟฟ้า 200 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 1,500,000X และตั้งค่าความสว่าง (Brightness) 1.0×10^9 A/cm²

4. การศึกษาความคงตัวของอนุภาคไลโปโซม

เก็บอนุภาคไลโปโซมที่สังเคราะห์ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ตรวจสอบขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดอนุภาคและประจุบนผิวอนุภาคทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลาทั้งสิ้น 12 สัปดาห์

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองและอภิปรายผล

ปริมาณน้ำมัน ชนิดและปริมาณฟอสโฟลิพิดในน้ำมันเมล็ดยางพารา

ปริมาณน้ำมันจากเมล็ดยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 เท่ากับ 45.24 ± 0.04 %w/w (Figure 2A และ Table 1) ในส่วนของกัม (Polar lipid) ที่แยกได้จากน้ำมันเมล็ดยางพารามีปริมาณกัมเท่ากับ 16.34 ± 0.11 %w/w (Figure 2B-2C และ Table 1) สำหรับฟอสโฟลิพิดที่เป็นองค์ประกอบมากที่สุดคือน้ำมันเมล็ดยางพาราฟอสฟาทีดิลโคลีน (PC) และฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีน (PE) คิดเป็น 22.36 ± 3.10 และ 17.39 ± 0.51 มิลลิกรัม/น้ำมัน 100 กรัม ตามลำดับ (Figure 2D-2E และ Table 1) การศึกษาครั้งนี้พบว่าฟอสโฟลิพิดที่พบในน้ำมันเมล็ดยางพาราโดยเฉพาะฟอสฟาทีดิลโคลีนมีปริมาณใกล้เคียงกับที่พบในถั่วเหลือง (20-22 มิลลิกรัม/น้ำมัน 100 กรัม) เมล็ดทานตะวัน (20-26 มิลลิกรัม/น้ำมัน 100 กรัม) และเมล็ดเรพชีพ (23-31 มิลลิกรัม/น้ำมัน 100 กรัม) (Srinuan *et al.*, 2020) ในขณะที่ฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีนในน้ำมันเมล็ดยางพารามีปริมาณใกล้เคียงกับที่พบในถั่วเหลือง (16-22 มิลลิกรัม/น้ำมัน 100 กรัม) แต่มากกว่าในเมล็ดทานตะวัน (4-10 มิลลิกรัม/น้ำมัน 100 กรัม) และเมล็ดเรพชีพ (9-15 มิลลิกรัม/น้ำมัน 100 กรัม) (Srinuan *et al.*, 2020)

โครงสร้างทางเคมีของฟอสฟาทีดิลโคลีนและฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีนประกอบไปด้วยหมู่โคลีนหรือหมู่เอทานอลามีนที่ต่ออยู่กับหมู่ฟอสเฟต (Figure 3A-3B) จัดเป็นส่วนที่มีขั้วมีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) ในขณะที่ส่วนไฮโดรคาร์บอนเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) โดยส่วนนี้ประกอบไปด้วยกรดไขมันแต่ละชนิด (R และ R') ที่จะต่ออยู่กับคาร์บอนอะตอมที่ 1 และ 2 ของกลีเซอรอล (Figure 3A-3B) จากคุณสมบัติการชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของฟอสโฟ

ลิพิดจึงสามารถนำฟอสโฟลิพิดที่ได้จากน้ำมันของเมล็ดยางพาราไปสังเคราะห์เป็นอนุภาคไลโปโซมได้ต่อไป

ลักษณะทางกายภาพ ขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดอนุภาคและประจุบนผิวอนุภาคไลโปโซม

เมื่อใช้ฟอสโฟลิพิดจากน้ำมันเมล็ดยางพาราเข้มข้น 0.1-2.0 %w/v ไปสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมพบว่าลักษณะของสารผสมที่ได้เป็นสารผสมเนื้อเดียวสีเหลืองตามความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดที่ใช้ (Figure 4) โดยอนุภาคไลโปโซมจะกระจายตัวอยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำ ขนาดของอนุภาคไลโปโซมอยู่ระหว่าง 524.40 ± 16.15 ถึง 644.70 ± 12.75 นาโนเมตร ขึ้นอยู่กับปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่ใช้ในการสังเคราะห์ (Figure 5(A)-5(C) และ Table 2) พบว่าเมื่อใช้ฟอสโฟลิพิดที่เข้มข้น 0.25-1.00 %w/v ขนาดของอนุภาคไลโปโซมจะเล็กกว่าเมื่อใช้ฟอสโฟลิพิด 0.10 และ 2.00 %w/v (Table 2)

การกระจายตัวของขนาดอนุภาคไลโปโซมมีค่าระหว่าง 0.33 ± 0.02 ถึง 0.46 ± 0.03 (Table 2) พบว่าเมื่อใช้ฟอสโฟลิพิด 1.00 %w/v ให้ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคน้อยที่สุด ส่วนของค่าประจุบนผิวอนุภาคไลโปโซมอยู่

ในช่วง -33.96 ± 2.75 ถึง -58.73 ± 0.15 มิลลิโวลต์ (Figure 5(D)-5(F) และ Table 2) พบว่าเมื่อใช้ฟอสโฟลิพิด 0.5-2.00 %w/v อนุภาคไลโปโซมมีค่าประจุบนผิวอนุภาคเป็นประจุลบมากกว่าการใช้ฟอสโฟลิพิดที่เข้มข้น 0.1-0.25 %w/v

จากการใช้ฟอสโฟลิพิดที่ได้จากน้ำมันเมล็ดยางพารา มาสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมด้วยวิธีการระเหยกลีบวัฏภาค พบว่าอนุภาคไลโปโซมที่ได้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 524-548 นาโนเมตร และ 601-644 นาโนเมตร (Table 2) โดยขนาดอนุภาคไลโปโซมจะขึ้นอยู่กับปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่ใช้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิด 0.25-1.00 %w/v ทำให้อนุภาคไลโปโซมมีขนาดเล็กกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิด 0.10 หรือ 2.00 %w/v (Table 2) เนื่องจากปริมาณฟอสโฟลิพิดที่ต่ำเกินไปทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มไลโปโซมมีความบางจึงทำให้อนุภาคไลโปโซมเกิดการรวมตัว (Aggregation) ได้ง่าย ส่งผลให้อนุภาคไลโปโซมมีขนาดใหญ่ขึ้น (Sturm & Poklar Ulrich, 2021; Ang *et al.*, 2023)

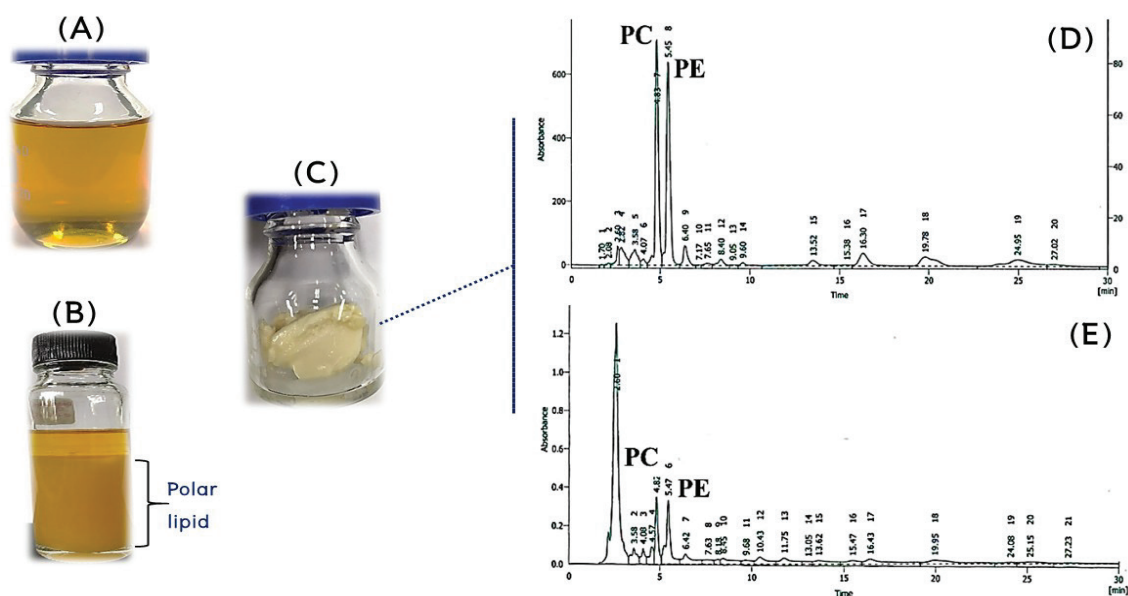


Figure 2 Characteristics of oil, polar lipid (gum) and HPLC-UV chromatogram of phospholipids extracted from para rubber seed oil

- (A) Para rubber seed oil (B) Precipitated gum from para rubber seed oil (C) Gum from para rubber seed oil
(D) Phospholipid Standards (PC = Phosphatidylcholine and PE = Phosphatidylethanolamine)
(E) Types of phospholipids in para rubber seed oil

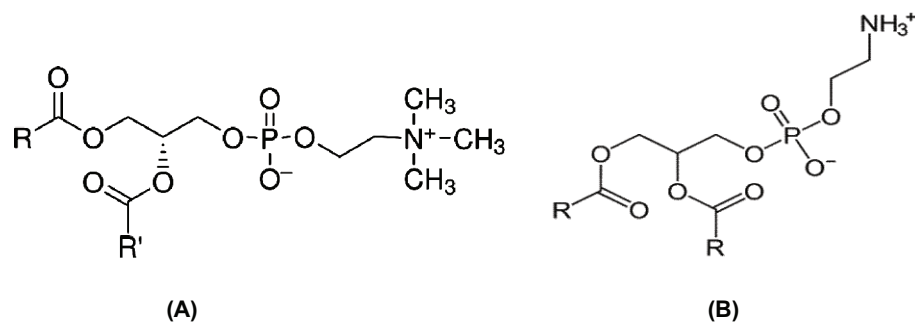


Figure 3 Phospholipid structures. (A) Phosphatidylcholine (PC), (B) Phosphatidylethanolamine (PE),
R, R' = Fatty acid residues

Table 1 Oil content, types and amounts of phospholipids in para rubber seed oil.

Oil (%w/w)	Gum (%w/w)	Phospholipid (mg/oil 100 g)	
		Phosphatidylcholine (PC)	Phosphatidylethanolamine (PE)
45.24±0.04	16.34±0.11	22.36±3.10	17.39±0.51

ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้ปริมาณฟอสโฟลิพิดที่สูงเกินไป (ในการทดลองนี้คือ 2.0 %w/v) สารผสมที่ได้จะมีความหนืดเพิ่มขึ้นทำให้การกระจายตัวของอนุภาคไลโปโซมทำได้ยากขึ้น อนุภาคไลโปโซมจึงมีแนวโน้มรวมตัวเป็นกลุ่มใหญ่และมีขนาดใหญ่ขึ้น (Šturm & Poklar Ulrih, 2021; Ang *et al.*, 2023) การทดลองนี้ยืนยันว่าการเลือกใช้ความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดที่ได้จากเมล็ดยางพาราในปริมาณที่เหมาะสม (0.25-1.00 %w/v) มีผลต่อขนาดของอนุภาคไลโปโซมโดยตรง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Akbarzadeh *et al.* (2013) และ Mozafari *et al.* (2008)

ค่าการกระจายตัวของอนุภาคเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวของอนุภาคที่มีค่าน้อยบ่งชี้ถึงขนาดของอนุภาคมีความสม่ำเสมอมากกว่า ค่าการกระจายตัวของอนุภาคที่มีค่ามาก เกณฑ์มาตรฐานของค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่ยอมรับได้สำหรับอนุภาคไลโปโซมควรมีค่าน้อยกว่า 0.30 เพื่อแสดงถึงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่มีความสม่ำเสมอ (Danaei *et al.*, 2018) การที่อนุภาคไลโปโซมมีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคต่ำกว่า 0.30 บ่งชี้ว่าอนุภาคไลโปโซมมีขนาดที่ใกล้เคียงกันส่งผลให้ระบบมีความเสถียรเหมาะสมสำหรับนำอนุภาคไลโปโซมไปประยุกต์ใช้ในการขนส่งสารสำคัญอื่นๆ (Danaei *et al.*, 2018) จากการทดลองพบว่าอนุภาคไลโปโซมที่สังเคราะห์จากฟอสโฟลิพิดจากน้ำมันเมล็ดยางพารามีค่าการกระจายตัวของอนุภาคระหว่าง 0.33 ถึง 0.46 (Table 2) ซึ่งใกล้เคียงกับเกณฑ์มาตรฐาน (น้อยกว่า 0.30) โดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิด 1.0 %w/v ให้ค่าการกระจายตัวของอนุภาค

เท่ากับ 0.33 การที่อนุภาคไลโปโซมที่สังเคราะห์ได้มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคที่สูงเนื่องมาจากการเตรียมอนุภาคที่แตกต่างกัน มีรายงานว่า การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่นานเกินไปทำให้เยื่อหุ้มของอนุภาคไลโปโซมเกิดความเสียหายและเพิ่มความหลากหลายของขนาดอนุภาคส่งผลให้ค่าการกระจายตัวของอนุภาคเพิ่มสูงขึ้น (Šturm & Poklar Ulrih, 2021; Mozafari *et al.*, 2008) หรือการใช้วิธีการสังเคราะห์หลายขั้นตอน (Multi step) เช่น การอัดผ่านเมมเบรน (Extrusion) หลังจากการเตรียมไลโปโซมขั้นต้นจะช่วยทำให้ขนาดของอนุภาคมีความสม่ำเสมอมากขึ้น ลดค่าการกระจายตัวของอนุภาคได้ดีกว่าการใช้วิธีเพียงขั้นตอนเดียว เช่น การละลายฟอสโฟลิพิดในตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (Akbarzadeh *et al.*, 2013) ค่าประจุบนผิวอนุภาคเป็นตัวบ่งชี้สำคัญถึงคุณภาพและความเสถียรของอนุภาคไลโปโซมที่สังเคราะห์ได้ ค่าประจุบนผิวอนุภาคในช่วง 0 ถึง ±10 มิลลิโวลต์ ทำให้อนุภาคมีโอกาสมีก่อตัวกันอย่างรวดเร็วเนื่องจากแรงยึดเหนี่ยวระหว่างอนุภาคสูงทำให้อนุภาคมีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอมีแนวโน้มที่จะตกตะกอน ค่าประจุบนผิวอนุภาคในช่วง ±10 ถึง ±30 มิลลิโวลต์ อนุภาคเริ่มมีความเสถียรแต่ยังไม่เพียงพอต่อการป้องกันการเกาะกลุ่มมีโอกาสนำอนุภาคจะรวมตัวและตกตะกอนได้ แต่ถ้าค่าประจุบนผิวอนุภาคสูงกว่า ±30 มิลลิโวลต์ บ่งบอกถึงอนุภาคมีความเสถียรที่ดีขึ้น โดยเฉพาะเมื่อค่ามากกว่า ±60 มิลลิโวลต์ แสดงถึงอนุภาคมีความเสถียรที่ดีเยี่ยมทำให้อนุภาคมีความคงตัว ไม่รวมตัวกันตกตะกอน (Németh *et al.*, 2022) ผลการทดลองพบว่าอนุภาคไลโปโซมที่สังเคราะห์จากฟอสโฟลิพิดของน้ำมันเมล็ดยางพารามีค่า

ประจุบนผิวอนุภาคสูงกว่า ± 30 มิลลิโวลต์ (Table 2) โดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิด 1.0 %w/v แสดงให้เห็นว่าอนุภาคไลโปโซมที่ได้มีเสถียรภาพที่ดีไม่จับกลุ่มกัน

ตกตะกอนเนื่องจากการมีค่าประจุลบในระดับสูงจะช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาคจากแรงผลักรันทางไฟฟ้าสถิตเป็นผลดีต่อการคงเสถียรภาพของอนุภาคไลโปโซมในระยะยาว

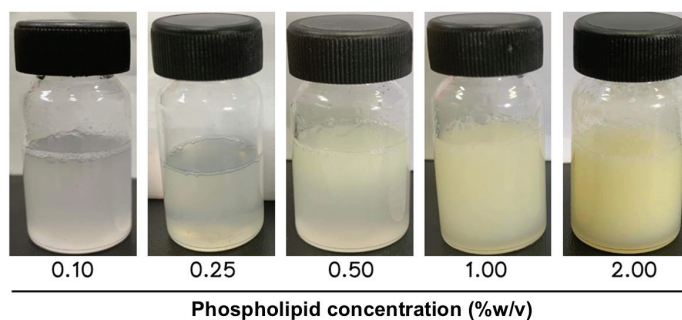


Figure 4 Characteristics of a mixture containing liposome particles dispersed in an aqueous phase

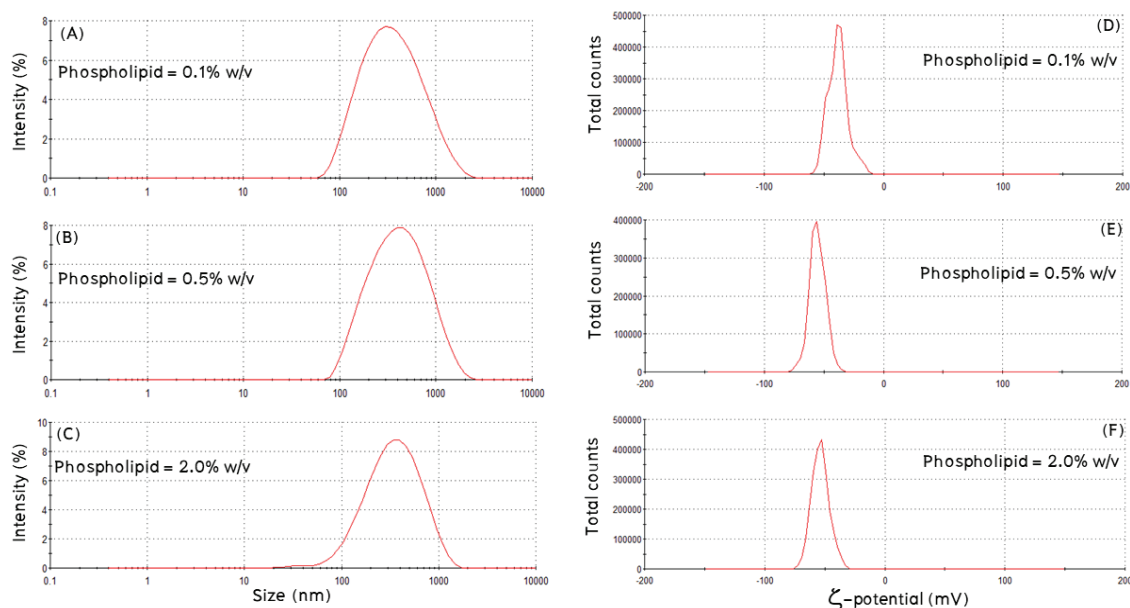


Figure 5 Particle size and z-potential of liposome particles using dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS: (A) - (C) Particle size, (D) - (F) z-potential

สัณฐานวิทยาของอนุภาคไลโปโซม

เมื่อนำอนุภาคไลโปโซมไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านชนิด Field-Emission ลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคไลโปโซมที่ได้มีรูปร่างเป็นทรงกลม (Spherical shape) ในทุกความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดที่ใช้ในการสังเคราะห์

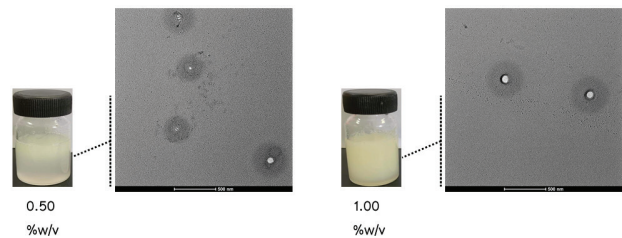
(Figure 6) ผลการศึกษาสัณฐานวิทยายืนยันว่าเมื่อนำฟอสโฟลิพิดจากน้ำมันเมล็ดยางพารามาสังเคราะห์เป็นอนุภาคไลโปโซม พบการจัดเรียงตัวของฟอสโฟลิพิดที่เป็นระเบียบ บ่งชี้ถึงเสถียรภาพของอนุภาคไลโปโซมที่ได้ ผลการทดลองในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ

Table 2 Particle size, Polydispersity index and z-potential of liposome particles

Phospholipid (%w/v)	Particle size (nm)	Polydispersity index (PDI)	z-potential (mV)
0.10	601.50±28.71 ^a	0.45±0.05 ^a	-33.96±2.75 ^a
0.25	548.95±13.78 ^b	0.42±0.01 ^b	-39.66±1.73 ^b
0.50	538.93±19.07 ^b	0.37±0.01 ^c	-54.20±0.26 ^c
1.00	524.40±16.15 ^b	0.33±0.02 ^d	-58.73±0.15 ^d
2.00	644.70±22.75 ^a	0.46±0.03 ^a	-53.76±1.20 ^c

Note: Values in the same column followed by different letters (^{a-d}) are significantly different ($p < 0.05$). Each value in table is represented as means $\pm$ SD ($n=3$).

Liu *et al.* (2013) และ Farouk *et al.* (2023) ที่ใช้ฟอสโฟลิพิดและเลซิทีนมาสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมเพื่อกักเก็บแลคโตเฟอริน (Lactoferrin) และกักเก็บของเหลวที่สกัดได้จาก *Allolobophora caliginosa* ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอนุภาคไลโปโซมที่ได้มีการจัดเรียงตัวของฟอสโฟลิพิดที่เป็นระเบียบ มีความเสถียรภาพที่ดี ไม่เกาะกลุ่มและรวมตัวกันตกตะกอนได้ง่าย

**Figure 6** Morphological of liposome particles**Table 3** Changes in particle size and z-potential of liposome particles over a period of 12 weeks

Physical properties	Weeks						
	0	2	4	6	8	10	12
Particle size (nm)	524.40±16.15 ^a	519.06±26.40 ^a	534.95±23.78 ^a	548.40±16.15 ^a	535.20±27.54 ^a	604.70±32.75 ^b	689.50±37.49 ^b
z-potential (mV)	-58.73±0.15 ^a	-56.24±2.16 ^a	-51.35±1.48 ^b	-48.11±1.37 ^c	-43.27±1.32 ^d	-33.52±2.05 ^e	-26.19±1.81 ^f

Note: Physical property values in the same row followed by different letters (^{a-f}) are significantly different ($p < 0.05$). Each value in table is represented as means $\pm$ SD ($n=3$).

ความคงตัวของอนุภาคไลโปโซม

เมื่อนำอนุภาคไลโปโซมไปไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C วัดขนาดอนุภาคและประจุบนผิวอนุภาคทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลาทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ พบว่าอนุภาคไลโปโซมเริ่มมีขนาดที่เปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนตั้งแต่สัปดาห์ที่ 10 เป็นต้นไป (ในที่นี้คือขนาดใหญ่ขึ้น) (Table 3) ในขณะที่ประจุบนผิวอนุภาคเริ่มเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 (Table 3) แต่ในสัปดาห์ที่ 8 อนุภาคไลโปโซมยังมีค่าประจุบนผิวอนุภาคสูงกว่า ± 30 มิลลิโวลต์ แสดงให้เห็นว่าอนุภาคไลโปโซมที่ได้มีเสถียรภาพที่ดีไม่จับกลุ่มกันตกตะกอนแม้ว่าจะผ่านไปถึง 8 สัปดาห์

สรุปผลการทดลอง

ฟอสโฟลิพิดที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันเมล็ดงาพาราสาสายพันธุ์ RRIM 600 คือฟอสฟาติดีลโคลีนและฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน สามารถนำฟอสโฟลิพิดที่ได้ไปเป็น

สารตั้งต้นเพื่อสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมทำให้ได้อนุภาคไลโปโซมที่มีขนาด 524-644 นาโนเมตร อนุภาคไลโปโซมที่ได้มีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคระหว่าง 0.33 ถึง 0.46 มีค่าประจุบนผิวอนุภาคไลโปโซม -33 ถึง -58 มิลลิโวลต์ และอนุภาคไลโปโซมที่สังเคราะห์ได้มีความคงตัวสูงสุดที่เวลา 8 สัปดาห์ โดยอนุภาคไลโปโซมที่ได้สามารถนำไปต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในรูปแบบอื่นๆ ได้อีกในอนาคต เช่น เป็นตัวนำส่งหรือตัวกักเก็บสารสำคัญซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเมล็ดงาพาราสาสายพันธุ์ RRIM 600 ที่เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมยาง

ข้อเสนอแนะ

ในการสังเคราะห์อนุภาคไลโปโซมอาจใช้วิธีอื่น เช่น วิธีอัลตราซาวนด์ วิธีปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูง วิธีอัลตร้าผ่านแผ่นกรอง วิธีฉีดด้วยตัวทำละลายหรือวิธีทินฟิล์มไฮดรอนเพื่อให้อนุภาคไลโปโซมที่มีขนาดเล็กในระดับนาโน

ควรศึกษาถึงประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญไว้ภายในอนุภาคไลโปโซมและประสิทธิภาพในการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากอนุภาคไลโปโซม

ในการศึกษาสัณฐานวิทยาของอนุภาคไลโปโซมเพื่อให้ได้ลักษณะของอนุภาคไลโปโซมที่ชัดเจนยิ่งขึ้นอาจต้องนำอนุภาคไลโปโซมไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านชนิดเย็นจัด (Cryo-TEM)

ในการศึกษาความคงตัวของอนุภาคไลโปโซมควรเพิ่มสภาวะในการศึกษาอื่นๆ เช่น สภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกันหรืออุณหภูมิที่แตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 (รหัสข้อเสนอการวิจัย 65A152000001 รหัสโครงการ 172523) โดยสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ผู้เขียนขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ที่ให้การสนับสนุนสารเคมี อุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาคและประจุบนผิวอนุภาครวมถึงกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านชนิด Field-Emission

เอกสารอ้างอิง

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifepour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>

Ang, S. S., Thoo, Y. Y., & Siow, L. F. (2023). Encapsulation of hydrophobic apigenin into small unilamellar liposomes coated with chitosan through ethanol injection and spray drying. *Food Bioprocess Technology*, 16(6), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03140-y>

Azucena, G. G., Saifuddin, S., Kenji, M., & Zeinab, H. (2019). Liposomal nanovesicles for efficient encapsulation of staphylococcal antibiotics. *ACS Omega*, 4(1), 10866–10876. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00825>

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanazadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

Estevinho, B. N., Damas, A. M., Martins, P., & Rocha, F. (2014). The influence of microencapsulation with a modified chitosan (water soluble) on β -galactosidase activity. *Drying Technology*, 32(13), 1575–1586. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.909843>

Farouk, A. E., Fahmy, S. R., & Soliman, A. M. (2023). A nano-liposomal formulation potentiates antioxidant, anti-inflammatory, and fibrinolytic activities of *Allophora caliginosa* coelomic fluid: Formulation and characterization. *BMC Biotechnology*, 23, 28. <https://doi.org/10.1186/s12896-023-00795-5>

Fotini, M., Sophia, H., Kostas, D., Dimitrios, K., & Costas, D. (2004). Liposome formulation from phospholipids of Greek almond oil, properties, and biological activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(3–4), 330–334. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-5-607>

Hoogevest, V. P., & Wendel, A. (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(9), 1088–1107. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400219>

Kittigowittana, K., Wongsakul, S., Krisdaphong, P., Jimtaisong, A., & Saewan, N. (2013). Fatty acid composition and biological activities of seed oil from rubber (*Hevea brasiliensis*) cultivar RRIM 600. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 6(2), 1–7.

Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., & Singh, H. (2013). Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane derived phospholipids. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 2061–2070. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6072>

Lourith, N. (2013). *Biological activities and essential fatty acids in cosmetics in rubber seed of RRIM 600 cultivar*. Thailand Science Research and Innovation.

- Lourith, N., Kanlayavattanukul, M., Sucontphunt, A., & Ondee, T. (2014). Para rubber seed oil: New promising unconventional oil for cosmetics. *Journal of Oleo Science*, 63(7), 709–716. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14015>
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavor encapsulation and controlled release—a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18(4), 309–327. <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>
- Németh, Z., Csóka, I., Semnani Jazani, R., Sipos, B., Haspel, H., Kozma, G., Kónya, Z., & Dobó, D. G. (2022). Quality by design-driven zeta potential optimization study of liposomes with charge imparting membrane additives. *Pharmaceutics*, 14(9), 1798. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091798>
- Raknam, P., Pinsuwan, S., & Amnuaikit, T. (2020). Rubber seed cleansing oil formulation and its efficacy of makeup remover. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(1), 146–155. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11\(1\).146-55](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.11(1).146-55)
- Rehman, S., Welter, D., Wildenauer, D., & Ackenheil, M. (2017). Simple and rapid separation and determination of phospholipid by HPLC-UV system. *Annals of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 1–3.
- Schmidt, C., & Lamprecht, A. (2009). *Nanocarriers in drug delivery: Design, manufacture and physicochemical properties*. Pan Stanford Publishing.
- Srinuan, C., Kritsunankul, O., & Singanusong, R. (2020). *Effect of extraction conditions on lecithin from rice bran gum and soybean gum*. In Proceedings of RSU International Research Conference (pp. 588–595). Rangsit University.
- Šturm, L., & Poklar Ulrih, N. (2021). Basic methods for preparation of liposomes and studying their interactions with different compounds, with the emphasis on polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6547. <https://doi.org/10.3390/ijms22126547>
- Terron-Mejia, A. K., Martinez-Benavidez, E., Higuera-Ciapara, I., Virues, C., Hernandez, J., & Dominguez, Z. (2018). Mesoscopic modeling of the encapsulation of capsaicin by lecithin/chitosan liposome nanoparticles. *Nanomaterials*, 8(6), 425. <https://doi.org/10.3390/nano8060425>
- Venugaranti, V. V., & Perumal, O. P. (2009). *Nanosystems for dermal and transdermal drug delivery*. Informa Healthcare USA.
- Wendel, A., & Hoogevest, V. P. (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(9), 1088–1107. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400219>