

การกักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามและสารสกัดจาก ผลสมอไทยด้วยไนโอโซมเพื่อการประยุกต์ใช้ในเวชสำอาง

Encapsulation of Tamarind Seed Coat Extract and Chebulic Myrobalan Fruit Extract by Niosome for Cosmeceutical Application

ศรัณยู อุ่ทวิ, คุณัญญา เครือจันทร์, สุขวสา เกษียร และชนัญ ผลประไพ*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

อรุณพร อธิรัตน์

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Saranyou Oontawee, Kununya Kreajun, Sukavasa Kasian and Chanan Phonprapai*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การแก่ชราของผิวหนังทำให้เกิดรอยเหี่ยวย่น ขาดความยืดหยุ่น และมีฝ้าและกระเกิดขึ้น ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันการทำให้ผิวหนังแก่ชราที่อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ จึงมีความนิยมในการพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้าเพื่อชะลอการแก่ชราที่อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ มีการรายงานว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามและสารสกัดจากผลสมอไทยมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงและยังช่วยชะลอการเหี่ยวย่นของผิวหนัง เนื่องจากการกักเก็บสารสกัดในอนุภาคไนโอโซมสามารถรักษาความคงตัวของสารและเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารผ่านผิวหนัง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามและผลสมอไทยและกักเก็บสารสกัดที่ได้ด้วยไนโอโซมซึ่งมีการแปรผันส่วนประกอบในการเตรียมอนุภาคห่อหุ้มจากการสกัดพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (ร้อยละ 21.53±1.22) มีผลได้จากการสกัดน้อยกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย (ร้อยละ 53.33±0.02) อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย โดยที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเป็น 512.66±7.83 และ 300.10±33.40 มิลลิกรัม เทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 เป็น 0.0032±0.0007 และ 0.0037±0.0008 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มากักเก็บด้วยอนุภาคไนโอโซม พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามและสารสกัดจากผลสมอไทยเหมาะสำหรับการกักเก็บในอนุภาคไนโอโซมโดยใช้วัสดุห่อหุ้มที่มีสัดส่วนระหว่าง Span 60 และคอเลสเตอรอล เป็น 2.1 : 1.0 และ 0.9 : 1.0 ตามลำดับ โดยมีขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพการกักเก็บเป็น 223.70 ± 66.75 และ 97.32 ± 0.01 ตามลำดับ สำหรับไนโอโซมที่กักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม และ 135.70 ± 7.21 และ 91.02 ± 0.26 ตามลำดับ สำหรับไนโอโซมที่กักเก็บสารสกัดจากผลสมอไทย จากผลการวิจัยจะเห็นว่าอนุภาคไนโอโซมที่เตรียมได้นี้ มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ชะลอการแก่ชราของผิวหนัง

คำสำคัญ : การกักเก็บสารสกัด; ไนโอโซม; สารต้านอนุมูลอิสระ; สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม; สารสกัดจากผลสมอไทย

Abstract

Skin aging can alter skin physiologies and appearances such as wrinkle, elasticity and pigmentation. These changes can be enhanced progressively by free radicals. However, antioxidants which can scavenge free radicals have been widely composed in cosmeceutical products for preventing skin aging. Pharmacologically, tamarind seed coat extract (TS) and chebulic myrobalan fruit extract (CM) have been enormously reported that they have antioxidant activities and antiaging activities. Before incorporation into cosmeceutical products, the extracts can be encapsulated by using niosomes, non-ionic surfactant nanovesicles, to maintain the stability and increase skin permeability. Thus, this study focused on extraction of tamarind seed coat and chebulic myrobalan fruit and encapsulation of the extracts into niosome nanovesicles, which the ratios of vesicle forming materials were varied to obtain the most suitable nanovesicles. From the extraction of both plants, the results revealed that the extraction yield (EY) of TS (21.53 ± 1.22 %) was lower than that of CM (53.33 ± 0.02 %). However, total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity of TS were found to be higher than those of CM. The TPCs of TS and CM were observed to be respective 512.66 ± 7.83 and 300.10 ± 33.40 mg GAE/g extract. For inhibitory concentration at 50 % (IC_{50}) of TS and CM that indicates higher in antioxidant activity when IC_{50} is lower, it was determined as 0.0032 ± 0.0007 and 0.0037 ± 0.0008 mg/mL, respectively. When the extracts were encapsulated into niosome nanovesicles, the results exhibited that TS and CM were suitable to be prepared by using the ratio between Span 60 (S60) and cholesterol (CHOL) as 2.1 : 1.0 and 0.9 : 1.0, respectively. Particle size and entrapment efficiency (EE) of those niosomes were determined to be respective 223.70 ± 66.75 nm and 97.32 ± 0.01 % for TS-loaded niosome, and 135.70 ± 7.21 nm and 91.02 ± 0.26 % for CM-loaded niosome. As the results, it indicated that the obtaining niosomes were appropriate for using in antiaging cosmeceutical products.

Keywords: encapsulation; niosome; antioxidant; tamarind seed coat extract; chebulic myrobalan fruit extract

1. คำนำ

การแก่ชราของผิวหนังบริเวณใบหน้าเป็นสิ่งที่ไม่พึงปรารถนาและเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยากจากการแก่ชราตามวัย เนื่องจากทำให้ผิวหนังเกิดรอยเหี่ยวย่นและขาดความยืดหยุ่น และยังส่งผลให้การผลิตเม็ดสีของเซลล์ผิวหนังผิดปกติ จึงทำให้มีฝ้าและกระเกิดขึ้นบนใบหน้า (Tsukahara *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม การแก่ชราของผิวสามารถเกิดขึ้นได้ก่อนวัย โดยส่วนใหญ่แล้วมีสาเหตุมาจากภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากการมีอนุมูลอิสระมาก (free radical) เกินจุดสมดุลของร่างกาย อนุมูลอิสระเหล่านี้อาจเกิดมาจากความไม่สมดุลในกระบวนการกลูโคสของการขนส่งอิเล็กตรอนซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรียที่อยู่ภายในเซลล์ และอาจเกิดได้จากการกระตุ้นโดยสารเคมีและรังสียูวีจากแสงอาทิตย์ ภาวะเครียดดังกล่าวมาข้างต้นจะกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ย่อยสลายคอลลาเจนที่อยู่รอบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในชั้นหนังแท้ (dermis) ซึ่งจะให้ผิวหนังขาดความยืดหยุ่นและเหี่ยวย่นเป็นร่องลึก (Cadenas and Davies, 2000; Rinnerthaler *et al.*, 2015) ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จึงมีความจำเป็นในการชะลอหรือป้องกันกระบวนการชราก่อนวัยของผิวหนัง ทั้งนี้ สารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในเวชสำอางมักเป็นสารจำพวกวิตามิน ได้แก่ วิตามินซีและวิตามินอี และสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นต้น (Naidoo and Birch-Machin, 2017; Sudjaroen *et al.*, 2005)

มะขาม (*Tamarindus indica* L.) เป็นพืชยืนต้นที่นิยมปลูกเพื่อการบริโภคเนื้อหุ้มเมล็ด จากสถิติในปี พ.ศ. 2558 พบว่าประเทศไทยมีการเก็บเกี่ยวผลมะขามได้มากถึง 7.6 หมื่นตัน (สำนักงานสถิติจังหวัดเพชรบูรณ์, 2559) และเนื่องจากไม่มีการบริโภคเมล็ดมะขาม จึงส่งผลให้เมล็ดมะขามเป็น

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณมากในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (tamarind seed coat) โดยเฉพาะในด้านการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเปลือกเมล็ดมะขามมีสารกลุ่มพอลิฟีนอลจำพวกพอลิเมอร์ิกแทนนินในปริมาณมากถึงร้อยละ 39 โดยน้ำหนัก (Sinchaiyakita *et al.*, 2011) ซึ่งเป็นสารประกอบโพลิโกลิเมอร์ิกโปรไซยานิดินเตตราเมอร์ (oligomeric procyanidin tetramer) ประมาณร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก และจากการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามสามารถป้องกันอนุมูลอิสระภายในเซลล์ผิวหนังได้ โดยที่สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนังปกติแม้จะอยู่ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เนื่องจากสารสกัดนี้สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPx) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase, SOD) ได้ถึงสูง 1.33 และ 1.39 เท่า ตามลำดับ (Nakchat *et al.*, 2014) นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามยังสามารถป้องกันการทำลายตับคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) โดยที่การให้หนูบริโภคสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามปริมาณ 50 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแทนนิกต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสามารถปรับสมดุลเอนไซม์ในตับหนูทดลองที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระให้ใกล้เคียงกับสภาวะปกติได้ (Sandesh *et al.*, 2014)

สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz) เป็นไม้ยืนต้นที่มีการใช้ส่วนของผลในตำรับสมุนไพรการแพทย์อายุรเวทของอินเดียและการแพทย์แผนไทย จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผลสมอไทย (chebulic myrobalan fruit) พบว่ามีฤทธิ์การ

ต้านอนุมูลอิสระสูงเนื่องจากอุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกจำพวกแทนนินปริมาณมากถึงร้อยละ 32 โดยน้ำหนัก (Chang and Lin, 2012) ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรไลส์เอเบิลแทนนิน (hydrolysable tannin) ตัวอย่าง เช่น กรดเชบูลลาจิก (chebulagic acid) และพุนิคาลาจिन (punicalagin) (Afshari *et al.*, 2016; Juang *et al.*, 2004) มีรายงานว่าสารสกัดผลสมอไทยที่ใช้เอทานอลร่วมกับน้ำเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ผิวหนังเหี่ยวและขาดความยืดหยุ่น ได้แก่ เอนไซม์อีลาสเทสและเอนไซม์ไฮยาลูรอนิเดส โดยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ร้อยละ 47.65 และ 48.02 ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากผลสมอไทยนี้ยังกระตุ้นการสังเคราะห์คอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้สูงถึงร้อยละ 56 ที่ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Satardekar and Deodhar, 2010) และสารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนในผิวที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวีบี (UVB radiation) ดังนั้นสารสกัดจากสมอไทยจึงเป็นสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางเพื่อชะลอผิวหนังแก่ชราก่อนวัยเป็นอย่างยิ่ง

สำหรับการรักษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามผ่านผิวหนังสามารถทำได้โดยใช้เทคโนโลยีการนำส่งยา (drug delivery technology) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อใช้ในการรักษาในทั้งมนุษย์และสัตว์ (Tiwari *et al.*, 2012) แม้การนำส่งสารออกฤทธิ์เพื่อใช้กับมนุษย์นั้นมีความหลากหลายช่องทาง แต่การประยุกต์ใช้ในเวชสำอางนั้น นิยมใช้เทคโนโลยีการนำส่งยาผ่านผิวหนัง

(transdermal drug delivery) เนื่องจากเป็นการนำส่งสารเพื่อให้ออกฤทธิ์เฉพาะบริเวณผิวหนังที่ต้องการ ไม่ส่งผลข้างเคียงต่อส่วนอื่นของร่างกาย อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผิวหนังมีชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ที่ทำหน้าที่ป้องกันการซึมผ่านของสารจากภายนอกเข้าสู่ชั้นผิวหนังที่อยู่ลึกลงไป จึงทำให้ยากต่อการนำส่งยาผ่านผิวหนัง ดังนั้นการกักเก็บสารในอนุภาคห่อหุ้มระดับนาโนโดยใช้สารลดแรงตึงผิวจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มความคงตัวและประสิทธิภาพในการซึมผ่านชั้นผิวหนัง โดยใช้สารที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) และไม่เป็นพิษ (non-toxic) เช่น ไลโปโซม (liposome) ที่มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุจำพวกฟอสโฟลิพิด (phospholipid) เป็นตัวสร้างชั้นคล้ายเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ภายในอนุภาคนาโน ซึ่งมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 300 นาโนเมตร เพื่อการซึมผ่านผิวหนังอย่างมีประสิทธิภาพ (Choi and Maibach, 2005)

อย่างไรก็ตาม ไนโอโซม (niosome) ซึ่งเป็นอนุภาคห่อหุ้มระดับนาโนที่ถูกพัฒนาขึ้นมาทดแทนไลโปโซม เนื่องจากไลโปโซมมีความคงตัวต่อสารเคมีต่ำ มีความหลากหลายในความบริสุทธิ์ของฟอสโฟลิพิดสูง และมีต้นทุนในการผลิตสูง ไนโอโซมสามารถเตรียมได้จากการจัดเรียงตัวเองของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) ได้เป็นอนุภาคนาโนที่มีชั้นห่อหุ้มหนึ่งชั้น (unilamella nanovesicle) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ นิยมใช้กักเก็บสารออกฤทธิ์ชนิดมีขั้วหรือสารที่ละลายได้ดีในน้ำ นอกจากนี้ไนโอโซมยังสามารถถูกเตรียมให้มีชั้นห่อหุ้มมากกว่าหนึ่งชั้น (multi-lamella nanovesicle) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บสารออกฤทธิ์ชนิดไม่มีขั้วหรือสารที่ละลายได้ดีในไขมัน (Choi and Maibach, 2005) จากการศึกษาชนิดสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่

เหมาะในการเตรียมอนุภาคไนโอโซม พบว่าซอร์บิแทนโมโนสเตียเรท (sorbitan monostearate) ซึ่งมีชื่อทางการค้าเป็น Span 60 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม เนื่องจากมีค่าสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมันที่ต่ำ (low hydrophilic-lipophilic balance) จึงเหมาะสมต่อการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (oil-in-water emulsion) และมีอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคสูง (high phase transition temperature) ซึ่งจะทำให้อนุภาคนาโนที่ได้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสูง (Kumar and Rajeshwarao, 2011) แม้ว่าคอเลสเทอรอลจะช่วยให้โครงสร้างของอนุภาคมีความแข็งแรงและคงตัวมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การเตรียมไนโอโซมโดยปริมาณคอเลสเทอรอลที่มากเกินไปส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารออกฤทธิ์ของอนุภาคนาโนลดลง (Kumar and Rajeshwarao, 2011; Ruckmani and Sankar, 2010)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามและผลสมอไทยด้วยตัวทำละลายที่คัดเลือกร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง และกักเก็บสารสกัดที่ได้ด้วยไนโอโซมโดยใช้วิธีthin film hydration (thin-film hydration method) และมีการแปรผันส่วนประกอบในการเตรียมอนุภาคห่อหุ้มเพื่อให้ได้ไนโอโซมที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในเวชสำอาง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมสารสกัด

2.1.1 การเตรียมผงพืช

นำเมล็ดมะขามเปรี้ยวที่ซื้อมาจากตลาดไทมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด และนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำเมล็ดมะขามไปอบที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมากะเทาะเปลือก เพื่อนำส่วนเปลือกเมล็ดมะขามมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นผลไม้ ส่วนผล

สมอไทยแห้งที่ซื้อมาจากตลาดไท นำมาทำให้เนื่อกับเมล็ดแยกออกจากกัน และนำส่วนเนื้อหุ้มเมล็ดมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นผลไม้ แล้วนำผงพืชทั้งสองชนิดมาร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 600 ไมโครเมตร เพื่อนำผงละเอียดไปสกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีที่คัดเลือกในขั้นตอนต่อไป

2.1.2 การสกัดผงพืช

ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับสกัดผงเปลือกเมล็ดมะขามและผลสมอไทยเป็นเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนผงพืชต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 10 จากนั้นบรรจุลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปใส่ในอ่างคลื่นความถี่สูง (sonicating bath) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงต่อรอบ และนำมากรองเพื่อนำกากไปสกัดต่อซึ่งได้ทำการสกัดทั้งหมด 3 รอบ นำสารละลายสารสกัดหยาบที่ได้ไประเหยแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำสารสกัดแห้งที่ได้จากการอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มาใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก และนำน้ำหนักแห้งของสารสกัดได้ (W_E) กับน้ำหนักผงพืชที่ใช้ (W_P) มาคำนวณผลได้จากการสกัด (extraction yield, EY) ด้วยสมการที่ 1 คือ $EY (\% w/w) = (W_E \div W_P) \times 100$ ทั้งนี้ในการสกัดพืชแต่ละชนิดจะสกัด 3 ซ้ำ ส่วนสารสกัดที่ได้ถูกนำไปเก็บให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 การศึกษาสมบัติของสารสกัด

2.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

นำสารสกัดมาละลายด้วยเอทานอล แล้วเจือจางด้วยน้ำ 10 เท่า และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content, TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ที่ดัดแปลงจาก Blainski และคณะ (2013) ทั้งนี้ได้เจือจางสารสกัดตัวอย่างแบบอนุกรม 2 เท่า ด้วยเอทานอล

เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ 7 ความเข้มข้น (50 ไมโครลิตร) ในไมโครเพลท (microplate) จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 0.4 โมลาร์ (100 ไมโครลิตร) แล้วเขย่า 1 นาที และบ่มต่อ 4 นาที และเติมโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (75 ไมโครลิตร) แล้วนำไปเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader, BioTek, PowerWave XS2, USA) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และนำค่าความชัน (S_E) ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับความชันของกราฟจากสารมาตรฐานกรดแกลลิก (S_{GA}) เพื่อคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (gallic acid equivalent, GAE) ด้วยสมการที่ 2 คือ TPC (mg GAE/g extract) = $(S_E / S_{GA}) \times 1000$

2.2.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

นำสารสกัดมาละลายด้วยเอทานอล แล้วนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH assay ที่ดัดแปลงจาก Gamez และคณะ (1998) ทั้งนี้สารสกัดตัวอย่างได้ถูกเจือจางแบบอนุกรม 2 เท่า ด้วยเอทานอลให้ได้ 7 ความเข้มข้น (100 ไมโครลิตร) ในไมโครเพลท จากนั้นเติมอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เข้มข้น 1.2 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในเอทานอล (100 ไมโครลิตร) ส่วนตัวควบคุมสีจะเติมตัวทำละลายของ DPPH (เอทานอล) ลงไปแทน DPPH และตัวควบคุม DPPH จะเติมตัวทำละลายของสารสกัด (เอทานอล) ลงไปแทนสารสกัด แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader, BioTek, PowerWave XS2, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงของสาร

สกัด (ODE) ตัวควบคุมสี (ODC) และ DPPH (ODDPPH) ที่ได้มาคำนวณค่าการทำลายอนุมูลอิสระ (radical scavenging, RD) ด้วยสมการที่ 3 คือ RD (%) = $[(OD_{DPPH} - (OD_E - OD_C))] \div OD_{DPPH} \times 100$ นำไปคำนวณค่าความเข้มข้นในการยับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสกัดและการตอบสนอง (dose-response analysis) ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยแบบโลจิสติก 4 ตัวแปร (four-parameter logistic regression) (Ritz *et al.*, 2015) ในฟังก์ชัน $ED\{drm[RD \sim Conc, fct=LL.4(names=c<"Slope", "Lower", "Upper", "ED50">), data=object], 50, type = "absolute"]$ ที่อยู่ในคลัง drc ของโปรแกรม RStudio Version 1.0.143 (R Core Team, 2016) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้กรดแกลลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในการเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับสารสกัด

2.3 การกักเก็บสารสกัดด้วยอนุภาคในไอโซม

2.3.1 การเตรียมอนุภาคในไอโซม

งานวิจัยนี้ได้เตรียมอนุภาคในไอโซมด้วยวิธีทินฟิล์มไฮเดรชัน (thin-film hydration) ที่ดัดแปลงจาก Abdelkader และคณะ (2014) โดยองค์ประกอบของวัสดุห่อหุ้ม (vesicle forming agent) ในการเตรียมไอโซมที่กักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (TS) และสารสกัดจากผลสมอไทย (CM) แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสัดส่วนระหว่าง Span 60 (S60) และคอเลสเตอรอล (CHOL) ได้ผันแปรผัน 0.6:1.0, 0.9:1.0, 1.3:1.0 และ 2.1:1.0 เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กและมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสูง กระบวนการเตรียมอนุภาคในไอโซมนั้น วัสดุห่อหุ้ม (0.232 กรัม) จะถูกละลายด้วยเอทานอล (50 มิลลิลิตร) ในฟลาสก์ระเหย (evaporating flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศา

เซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วลดความดันภายในระบบให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 150 มิลลิบาร์ เพื่อระเหยเอทานอล ซึ่งจะทำให้เกิดฟิล์มบางเคลือบอยู่ภายในฟลาสก์ จากนั้นนำฟลาสก์ไปเก็บในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะให้เกิดการจัดเรียงตัวเป็นอนุภาคในไอโซม (hydrating buffer) ซึ่งสารละลายนี้ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน พีเอช 7.4 เอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการชะล้างห่อหุ้มจะออกมาจากผนังฟลาสก์เพื่อให้ได้อนุภาคในไอโซมที่เป็นอิมัลชันน้ำมันในน้ำ จะเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วหมุนด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที โดยไม่ลดความดัน จากนั้นนำไปแช่ในอ่างคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 4 -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคนขนาดใกล้เคียงกันและมีความคงตัวมากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 1 องค์ประกอบในการเตรียมและค่าที่ได้จากการวิเคราะห์อนุภาคในไอโซม

Formulation	Vesicle forming agents (S60 : CHOL)	Hydrating buffer (mL)		Particle size (nm)	Entrapment efficiency (%)
		TS	CM		
NT1	0.6 : 1.0	50	-	302.07±75.20	96.98±0.05
NT2	0.9 : 1.0	50	-	289.27±40.43	97.21±0.14
NT3	1.3 : 1.0	50	-	255.83±41.73	96.69±0.05
NT4	2.1 : 1.0	50	-	223.70±66.75	97.32±0.01
NC1	0.6 : 1.0	-	50	237.30±38.61	91.22±0.80
NC2	0.9 : 1.0	-	50	135.70±7.21	91.02±0.26
NC3	1.3 : 1.0	-	50	232.10±37.49	90.23±1.03
NC4	2.1 : 1.0	-	50	202.85±6.73	91.84±0.64

S60 = Span 60; CHOL = คอเลสเตอรอล; TS = สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม; CM = สารสกัดจากผลสมอไทย; NT = ในไอโซมที่กักเก็บ TS; NC = ในไอโซมที่กักเก็บ CM

2.3.2 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคในไอโซม

นำอนุภาคในไอโซมไปวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยการกระเจิงของแสง (Light scattering particle size distribution analyzer, LA-950, Horiba, Kyoto, Japan) โดยวิเคราะห์ที่มุมการกระเจิง 90 องศา ค่าของขนาดอนุภาค (particle size) จะเป็นค่าฐานนิยม (mode) จากการวิเคราะห์

2.3.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บของอนุภาคในไอโซม

นำสารละลายอิมัลชันในไอโซมไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บ (entrapment efficiency, EE) ด้วยวิธีทางอ้อม ซึ่งจะวัดประมาณสารสกัดที่คงเหลือจากการกักเก็บ โดยนำสารละลายอิมัลชันไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อนำส่วนใส (supernatant) มาวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณสารสกัดที่ไม่ถูกกักเก็บ (non-entrapped extract concentration, NE) ด้วยสมการเส้นตรงจากการพหุคูณมาตรฐานของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ($y = 237.13x$) และสารสกัดจากผลสมอไทย ($y = 117.90x$) แล้วจึงนำมาคำนวณค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บ (entrapment efficiency, EE) จากการใช้ค่าความเข้มข้นก่อนการกักเก็บ (initial extract concentration, IE) ด้วยสมการที่ 4 คือ $EE (\%) = [(IE - NE) \div IE] \times 100$

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยนั้นใช้วิธีการทดสอบทางสถิติ two sample t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม RStudio version 1.0.143 โดยใช้ฟังก์ชัน `t.test(x1, x2, var.equal = TRUE)` ที่อยู่ในคลัง `stats` ทั้งนี้ `x1`

และ `x2` เป็นวัตถุ (object) ที่ได้จากฟังก์ชัน `rnorm(N, mean = X, sd = SD)` ซึ่งใช้จำนวนประชากร (N) ค่าเฉลี่ย (X) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของประชากรกลุ่มที่ 1 และประชากรกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ (R Core Team, 2016)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเตรียมสารสกัด

การสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอทานอลและผลสมอไทยด้วยน้ำโดยใช้คลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 1 ชั่วโมงต่อรอบ จำนวน 3 รอบ พบว่าผลได้จากการสกัด (EY) มีค่าเป็นร้อยละ 21.53 ± 1.22 และ 53.33 ± 0.02 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลได้จากการสกัด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม และสารสกัดจากผลสมอไทย

Extract	EY (%)	TPC (mg GAE/g extract)	IC ₅₀ (mg/mL)
TS	21.53 ± 1.22	512.66 ± 7.83	0.0032 ± 0.0007
CM	53.33 ± 0.02	300.10 ± 33.40	0.0037 ± 0.0008

EY = ผลได้จากการสกัด; TPC = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม; IC₅₀ = ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์; TS = สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม; CM = สารสกัดจากผลสมอไทย

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content, TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม (TS) และสารสกัดจากผลสมอไทย (CM) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเป็น 512.66 ± 7.83 และ 300.10 ± 33.40 มิลลิกรัม เทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract) ตามลำดับ ดัง

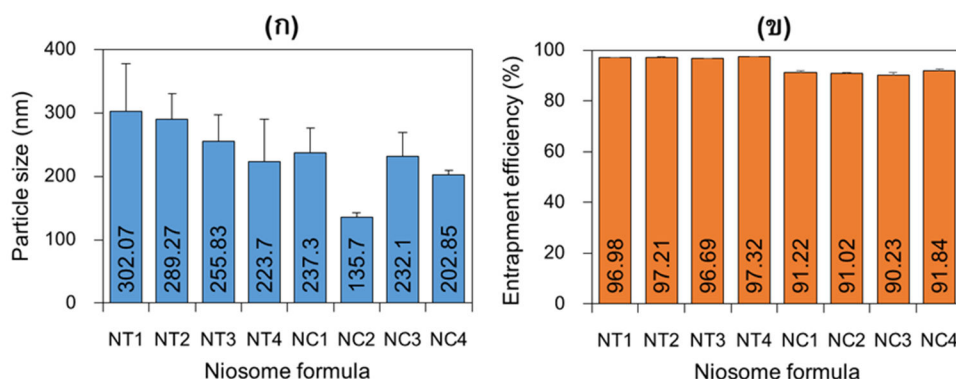
แสดงในตารางที่ 2 ส่วนค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่ามีค่า 0.0032 ± 0.0007 และ 0.0037 ± 0.0008 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีค่าสูงกว่าสารสกัดจากผลสมอไทยอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} <$

0.05) ซึ่งสารสกัดที่มีสารประกอบฟีนอลิกรวมปริมาณมากกว่า อาจสามารถอนุมานได้ว่าสารสกัดชนิดนั้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่า เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ และสามารถยืนยันได้จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ที่ซึ่งสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย เนื่องจากมีค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีค่าสูงกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างค่า IC_{50} ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของมีสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ยังคงต่ำกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (กรดแกลลิก) ที่ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด เป็น 0.0013 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 การกักเก็บสารสกัดด้วยอนุภาคในไอโซม

การกักเก็บสารออกฤทธิ์ด้วยอนุภาคในไอโซมนั้นมีหลากหลาย ทั้งนี้งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธี thin-film hydration (thin-film hydration) เนื่องจากวิธีนี้ทำให้ได้ไอโซมที่มีผนังห่อหุ้มหลายชั้น (multi-lamella niosome) (Ag Seleci *et al.*, 2016) ซึ่งสามารถกักเก็บสารที่ไม่มีขั้วได้มากปริมาณมากขึ้นจากการที่อนุภาคมีผนังหลายชั้น (Kumar and Rajeshwarao, 2011) ทั้งนี้จากการเตรียมอนุภาคในไอโซมพบว่าการกักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (TS) ทำให้ได้อนุภาคในไอโซมที่มีขนาดใหญ่กว่าการกักเก็บสารสกัดจากผลสมอไทย (CM) นอกจากนี้ ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีค่ามากกว่าการกักเก็บสารสกัดจากผลสมอไทย โดยที่การกักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยสูตร NC2 ซึ่งมีสัดส่วนระหว่าง S60:CHOL เป็น 0.9:1.0 ทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุดเป็น 135.70 ± 7.21 นาโนเมตร

และมีประสิทธิภาพการกักเก็บเป็น 91.02 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการกักเก็บสารสกัดจากผลสมอไทยด้วยสูตร NT4 ซึ่งมีสัดส่วนระหว่าง S60:CHOL เป็น 2.1:1.0 ทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุดเป็น 223.70 ± 66.75 นาโนเมตร และมีประสิทธิภาพการกักเก็บเป็น 97.32 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ รูปที่ 1 แม้ว่า NT4 มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า NC2 แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ และจากการศึกษาของ Mali และคณะ (2013) ที่ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังหน้าท้องหนูขาวใหญ่ของไนโอโซมที่กักเก็บยาไมน็อกซิดิล (minoxidil) พบว่าไนโอโซมที่เตรียมได้จากการใช้ S60 และ CHOL (2.0:1.0) ซึ่งมีขนาดอนุภาคประมาณ 219 นาโนเมตร นั้นมีการสะสมอยู่ในผิวหนังมากกว่าการใช้เจลปกติถึง 3.6 เท่า และการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่า NT4 นั้นมีประสิทธิภาพการกักเก็บมากกว่า NC2 อย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ดังนั้น NT4 จึงยังคงไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางได้จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามซึ่งได้มาจากการสกัดด้วยเอทานอลเหมาะสำหรับการกักเก็บในอนุภาคในไอโซมโดยใช้วัสดุห่อหุ้มที่มีปริมาณ Span 60 (S60) มากกว่าคอลเลสเตอร์รอล (CHOL) ส่วนสารสกัดจากผลสมอไทยซึ่งได้มาจากการสกัดด้วยน้ำเหมาะสำหรับการกักเก็บในอนุภาคในไอโซมโดยใช้วัสดุห่อหุ้มที่มีปริมาณ Span 60 (S60) น้อยกว่าคอลเลสเตอร์รอล (CHOL) จากการวิจัยจะเห็นได้ว่าอนุภาคในไอโซมที่เตรียมได้นี้มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ชะลอการแก่ชราของผิวหนัง ทั้งนี้ไนโอโซมที่เตรียมได้ควรมีการศึกษาความคงตัวในการเก็บรักษาและศึกษาประสิทธิภาพการซึมเข้าสู่ผิวหนัง รวมทั้งควรมีการศึกษาความระคายเคืองต่อผิวหนัง เพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางในลำดับต่อไป



รูปที่ 1 ขนาดอนุภาค (ก) และประสิทธิภาพการกักเก็บ (ข) ของไนโอโซมที่กักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (NT) และไนโอโซมที่กักเก็บสารสกัดจากผลสมอไทย (NC)

4. สรุป

การสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอทานอล ได้สกัดมากกว่าการสกัดผลสมอไทยด้วยน้ำ โดยสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย เมื่อนำสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มากักเก็บด้วยอนุภาคไนโอโซม พบว่าการกักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ทำให้ได้อนุภาคไนโอโซมที่มีขนาดใหญ่และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บมากกว่าการกักเก็บสารสกัดจากผลสมอไทย ซึ่งการกักเก็บสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยสูตร NT4 ซึ่งมีสัดส่วนระหว่าง S60:CHOL เป็น 2.1:1.0 และการกักเก็บสารสกัดจากผลสมอไทยด้วยสูตร NC2 ซึ่งมีสัดส่วนระหว่าง S60:CHOL เป็น 0.9:1.0 ทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุด จากการวิจัยครั้งนี้จะเห็นได้ว่าอนุภาคไนโอโซมที่เตรียมได้นี้ มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ชะลอการแก่ชรา ก่อนวัยของผิวหนัง ทั้งนี้ไนโอโซมที่เตรียมได้ควรมีการศึกษาความคงตัวในการเก็บรักษาและประสิทธิภาพการซึมเข้าสู่ผิวหนัง รวมทั้งควรมีการศึกษาความระคายเคืองต่อผิวหนัง เพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่จัดสรรทุนสนับสนุนการวิจัยในโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2559

6. รายการอ้างอิง

- สำนักงานสถิติจังหวัดเพชรบูรณ์, วิเคราะห์สถานการณ์มะขามหวานจังหวัดเพชรบูรณ์ 2559, แหล่งที่มา : http://phchabun.nso.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=290:tam58&catid=81:2011-10-11-07-21-04, 30 พฤษภาคม 2560.
- Abdelkader, H., Farghaly, U. and Moharram, H., 2014, Effects of surfactant type and cholesterol level on niosomes physical properties and in vivo ocular performance using timolol maleate as a model drug, J. Pharm. Investig. 44(5): 329-337.
- Afshari, A.R., Sadeghnia, H.R. and Mollazadeh, H., 2016, A review on potential mechanisms of *Terminalia chebula* in Alzheimer's disease, Adv. Pharmacol. Sci. 2016: 1-14.
- Ag Seleci, D., Seleci, M., Walter, J.G., Stahl, F.

- and Scheper, T., 2016, Niosomes as nanoparti-cular drug carriers: Fundamentals and recent applications. J. Nanomater. 2016: 1-13.
- Blainski, A., Lopes, G. and de Mello, J., 2013, Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L., Molecules 18: 6852-6865.
- Cadenas, E. and Davies, K.J.A., 2000, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, Free Radic. Biol. Med. 29: 222-230.
- Chang, C.L. and Lin, C.S., 2012, Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* Retzius extracts, J. Evid. Based Comple-mentary Altern. Med. 2012: 1-7.
- Choi, M.J. and Maibach, H.I., 2005, Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems, Skin Pharmacol. Physiol. 18: 209-219.
- Gamez, E.J.C., Luyengi, L., Lee, S.K., Zhu, L.F., Zhou, B.N., Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M. and Kinghorn, A.D., 1998, Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*, J. Nat. Prod. 61: 706-708.
- Juang, L.J., Sheu, S.J. and Lin, T.C., 2004, Determination of hydrolyzable tannins in the fruit of *Terminalia chebula* Retz. by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, J. Sep. Sci. 27: 718-724.
- Kumar, G.P. and Rajeshwarrao, P., 2011, Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery: An overview, Acta Pharm. Sin. B. 1: 208-219.
- Mali, N., Darandale, S. and Vavia, P., 2013, Niosomes as a vesicular carrier for topical administration of minoxidil: formulation and *in vitro* assessment, Drug Deliv. Transl. Res. 3: 587-592.
- Naidoo, K. and Birch-Machin, M., 2017, Oxidative stress and ageing: The influence of environmental pollution, sunlight and diet on skin, Cosmetics 4: 1-8.
- Nakchat, O., Nalinratana, N., Meksuriyen, D. and Pongsamart, S., 2014, Tamarind seed coat extract restores reactive oxygen species through attenuation of glutathione level and antioxidant enzyme expression in human skin fibroblasts in response to oxidative stress, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4: 379-385.
- R Core Team, 2016, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M.K., Trost, A. and Richter, K., 2015, Oxidative stress in aging human skin, Biomolecules 5: 545-589.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. and Gerhard, D., 2015, Dose-response analysis using R, PLoS ONE 10(12): 1-13.
- Ruckmani, K. and Sankar, V., 2010, Formulation and optimization of Zidovudine niosomes, AAPS Pharm. Sci. Tech. 11: 1119-1127.
- Sandesh, P., Velu, V. and Singh, R.P., 2014, Antioxidant activities of tamarind (*Tamarin-*

- dus indica*) seed coat extracts using *in vitro* and *in vivo* models, Food Sci. Technol. 51: 1965-1973.
- Satardekar, K.V., and Deodhar, M.A., 2010, Anti-ageing ability of *Terminalia* species with special reference to hyaluronidase, elastase inhibition and collagen synthesis *in vitro*, Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res. 2(3): 30-34.
- Sinchaiyakita, P., Ezureb, Y., Sripranga, S., Pongbangphoc, S., Povichitb, N., Suttajit, M., 2011, Tannins of tamarind seed husk: preparation, structural characterization, and antioxidant activities, Nat. Prod. Commun. 6: 829-834.
- Sudjaroen, Y., Haubner, R., Würtele, G., Hull, W.E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Bartsch, H. and Owen, R.W., 2005, Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp, Food Chem. Toxicol. 43: 1673-1682.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P. and Bannerjee, S.K., 2012, Drug delivery systems: An updated review, Int. J. Pharm. Investig. 2: 2-11.
- Tsukahara, K., Takema, Y., Fujimura, T., Moriwaki, S., Kitahara, T. and Imokawa, G., 2000, Determination of age-related changes in the morphological structure (sagging) of the human cheek using a photonumeric scale and three-dimensional surface parameters, Int. J. Cosmet. Sci. 22: 247-258.