



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาแปรรูประดับนาโนที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

โดย ดร. ปราณี เลิศสุทธีวงศ์ และคณะ

กุมภาพันธ์ 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาแปรรูประดับนาโนที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร. ปราณี เลิศสุทธิวงศ์

สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ ดร. อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

น้ำมันขมิ้นชันมีสมบัติในการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย กันยุง ด้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางทางเภสัชกรรม แต่เนื่องจากน้ำมันขมิ้นชันเป็นน้ำมันหอมระเหย ไม่เสถียร และไม่ละลายน้ำ จึงเป็นข้อจำกัดในการพัฒนาสูตรตำรับใหม่ๆ ดังนั้นการบรรจุน้ำมันขมิ้นชันในแคปซูลอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการหลีกเลี่ยงปัญหาข้างต้นและจะยิ่งน่าสนใจหากน้ำมันขมิ้นชันสามารถบรรจุในแคปซูลระดับนาโนเมตร ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือ การเตรียมแคปซูลระดับนาโนที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน และศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่างๆ (ได้แก่เทคนิค sonication อัตราส่วนระหว่างอัลจินตต่อน้ำมันขมิ้นชัน อัตราส่วนระหว่างไคโตซานต่ออัลจินต น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน ลำดับในการเติมไคโตซานในกระบวนการเตรียม) ต่อคุณลักษณะของนาโนแคปซูล (อาทิ ขนาดของนาโนแคปซูล ความเสถียรของนาโนแคปซูล ณ อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ตลอดจนปริมาณน้ำมันขมิ้นชันที่บรรจุในนาโนแคปซูล) ซึ่งวิธีการเตรียมนาโนแคปซูลสามารถเตรียมได้ด้วยการทำอิมัลซิฟิเคชัน (emulsification) ระหว่างน้ำมันขมิ้นชัน สารลดแรงตึงผิว (Tween80[®]) และอัลจินต จากนั้นทำการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (และไคโตซาน) และระเหยเอาตัวทำละลายออก จากผลการทดลองพบว่า การผลิตนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันให้มีขนาดสม่ำเสมอ นั้นสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค sonication และขนาดแคปซูลเล็กลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการ sonication นอกจากนี้ขนาดของแคปซูลยังขึ้นกับอัตราส่วนของอัลจินตต่อน้ำมันขมิ้นชัน โดยขนาดแคปซูลเล็กลง เมื่ออัตราส่วนระหว่างอัลจินตต่อน้ำมันขมิ้นชัน เท่ากับ 1:1 การเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณของไคโตซานยังส่งผลให้ขนาดของแคปซูลใหญ่ขึ้น นอกจากนี้หากเติมแคลเซียมคลอไรด์ก่อนเติมไคโตซานทำให้ได้แคปซูลขนาดใหญ่กว่ากระบวนการที่เติมไคโตซานก่อนแคลเซียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตามน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานและลำดับการเติมไคโตซานในกระบวนการเตรียมนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันไม่มีผลต่อปริมาณน้ำมันที่บรรจุในแคปซูล

กุญแจคำ ไคโตซาน, อัลจินต, น้ำมันขมิ้นชัน, นาโนแคปซูล, อิมัลซิฟิเคชัน, โซนิเคชัน

Abstract

Turmeric oil has been wide used in pharmaceutical applications for antifungal, antibacterial, insect repellent, antioxidant, and anticarcinogenic properties. But the drawback of turmeric oil is volatile, unstable and insoluble in water which resulted in the limitation of new formulation development. Therefore, the preparation of nanocapsules containing turmeric oil might be an alternative way to avoid the above problems and it would be more attractive, if turmeric oil could be formulated into nano-sized-capsules. The aims of this study were to prepare and investigate the effect of sonication, core to wall ratio, chitosan to alginate ratio, molecular weight of chitosan and order of chitosan addition on the physical properties of nanocapsules including their stability at 4°C and 25°C and loading capacity. Nanocapsules containing turmeric oil were prepared in a three-step procedure based on emulsification followed by crosslinking with calcium chloride (or chitosan) and solvent removal. The results show that the best uniformity of nanocapsules was obtained when sonication was applied in the process. The capsule size was found to be decreased with increasing sonication time. The alginate to turmeric oil ratio of 1:1 gave the smallest size. Increasing molecular weight and amount of chitosan resulted in an increase of the size of capsules. The addition of calcium chloride prior to chitosan led to the formation of bigger capsules. However, the molecular weight and order of chitosan addition did not show significant effect on the loading capacity of turmeric oil in nanocapsules.

Keywords: chitosan, alginate, turmeric oil, nanocapsules, emulsification, sonication

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและขึ้นรูปแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันให้ได้ในระดับนาโนเมตร เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ตลอดจนศึกษาอิทธิพลของพารามิเตอร์ต่างๆ (อาทิ ชนิดตัวทำละลาย ความเข้มข้นของน้ำมันขมิ้นชัน อัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่ออัลจินต อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวต่ออัลจินต ตลอดจนผลของการ sonication และการ crosslink ด้วยพอลิเมอร์ธรรมชาติโคโคซาน) ที่มีต่อสมบัติทางกายภาพของนาโนแคปซูล ได้แก่ ขนาดแคปซูล ลักษณะภายนอก (morphology) ประสิทธิภาพในการบรรจุน้ำมันขมิ้นชันในนาโนแคปซูล และเสถียรภาพของแคปซูลหลังตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ซึ่งวิธีการขึ้นรูปแคปซูลมีขั้นตอนดังนี้ คือ นำสารละลายน้ำมันขมิ้นชันในเอทานอล (หรืออะซิโตน) มาหยดลงในสารละลายพอลิเมอร์ (อัลจินต) ที่มีสารลดแรงตึงผิว (Tween80[®]) และทำการกวนอย่างต่อเนื่อง จากนั้นหยดสารละลายเคลือบเคลือบในสารละลายที่ฟอร์มแคปซูลข้างต้น (ในกรณีที่พอลิเมอร์เป็นอัลจินต) จะทำให้แคปซูลแข็งตัวมากขึ้น และตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ก่อนนำมาระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ rotavapor ส่วนการ crosslink แคปซูลอัลจินตข้างต้นด้วยโคโคซานนั้น ทำการศึกษาโดยใช้โคโคซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2 ระดับ (41,000 และ 72,000 ดาลตัน) และทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกหลังตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จากผลการทดลอง พบว่า การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสำหรับน้ำมันขมิ้นชันจะได้แคปซูลที่มีขนาดเล็กกว่าการใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย นอกจากนี้ยังพบว่า หากไม่เติมสารลดแรงตึงผิวจะทำให้ได้แคปซูลที่มีขนาดใหญ่ในระดับไมโครเมตร อย่างไรก็ตามวิธีการขึ้นรูปที่คิดพัฒมานั้นจะได้แคปซูลที่มีขนาดค่อนข้างหลากหลาย ดังนั้นจึงพัฒนาการขึ้นรูปโดยใช้เทคนิค sonication พบว่า การ sonication เป็นเวลา 15 นาทีหลังการหยदन้ำมันจะได้แคปซูลที่มีขนาดต่ำกว่า 100 นาโนเมตร นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำมันขมิ้นชันยังมีผลต่อขนาดของแคปซูล กล่าวคือ น้ำมันขมิ้นชันที่มีความเข้มข้นสูงกว่าจะทำให้แคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันมีขนาดใหญ่กว่า นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่ออัลจินตที่สูงขึ้นทำให้ขนาดของแคปซูลใหญ่ขึ้นและเมื่อนำแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) พบว่า จะบวมขึ้นและกลั่นของขมิ้นชันจะลดลงเร็วกว่าเก็บไว้ในตู้เย็น (4°C) เมื่อเวลาผ่านไป ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของน้ำมันขมิ้นชันที่เหมาะสมสำหรับขึ้นรูปเป็นแคปซูลระดับนาโนเมตร คือ 2% ในเอทานอลและอัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่ออัลจินต คือ 1:1 (w/w) และอัตราส่วนโดยโมลระหว่าง Tween80[®] ต่ออัลจินต ไม่ควรเกิน 2.4:1 (หรือ 1% w/v) และเทคนิคการขึ้นรูปที่พัฒนาขึ้นควรเพิ่มขั้นตอนการ sonication เป็นเวลา 15 นาทีหลังการหยदन้ำมัน

ในกรณีที่มีการ crosslink อัลจินตนาโนแคปซูลด้วยโคโคซานเป็นผลทำให้ขนาดของแคปซูลใหญ่ขึ้น โดยเฉพาะโคโคซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง อย่างไรก็ตามขนาดของโคโคซาน-อัลจินตนาโนแคปซูลไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญหลังตั้งทิ้งไว้ไว้ที่ 4°C และ 25°C เป็นเวลา 60 วัน ในขณะที่อัลจินตนาโนแคปซูลมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 14% หลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพียง 45 วัน ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่านาโนแคปซูลที่ผลิตได้มีความเสถียรทางกายภาพที่อุณหภูมิห้องมากขึ้นเมื่อมีการใช้โคโคซานในกระบวนการเตรียมนาโนแคปซูล นอกจากนี้การยืดอายุการเก็บสามารถทำได้ด้วยการเก็บไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 4°C อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำมันที่กักเก็บไว้ในนาโนแคปซูลมีปริมาณค่อนข้างต่ำ แต่ผลผลิตของผลิตภัณฑ์นาโนแคปซูลที่ได้แต่ละครั้งขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและลำดับการเติมโคโคซานในกระบวนการเตรียม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตั้งแต่ 1 มิถุนายน 2548 ถึง 31 พฤษภาคม 2550 จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณ ศูนย์วัสดุชีวภาพไคติน-ไคโตซาน สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือสำหรับทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและความสะดวกตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัช พิชญางกูร ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (ultracentrifuge) และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้คำปรึกษาและอนุเคราะห์เครื่อง HPLC

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดาและมารดา ผู้ให้การเลี้ยงดูและส่งเสริมด้านการศึกษา/วิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา และขอขอบคุณทุกท่านในครอบครัวที่ให้กำลังใจและสนับสนุนมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)	III
กิตติกรรมประกาศ	IV
สารบัญ	V
สารบัญรูป	VII
สารบัญตาราง	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)	2
บทที่ 2 ขอบเขตของงานวิจัย ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	5
2.1 ขอบเขตของการดำเนินงานวิจัย	5
2.1.1 จัดเตรียม/จัดหาวัตถุดิบและทดสอบสมบัติของวัตถุดิบ	5
2.1.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นและอัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่อพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูปนาโนแคปซูล	5
2.1.3 ศึกษาผลของไคโตซาน อัตราส่วนของไคโตซาน/อัลจินต และลำดับของการเติมไคโตซานในการขึ้นรูปแคปซูล	5
2.1.4 ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน	5
2.2. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	6
2.2.1. ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารละลายน้ำมันขมิ้นชันต่อการขึ้นรูปแคปซูล	8
2.2.2. การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำมันขมิ้นชันต่อขนาดของแคปซูล	8
2.2.3. ผลของการ sonication ระยะเวลาและลำดับการ sonication ต่อขนาดของแคปซูล	11
2.2.4 ผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่ออัลจินตในการขึ้นรูปแคปซูล	13
2.2.5. การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างอัลจินตต่อสารลดแรงตึงผิว	14
2.2.6 ผลการใช้ไคโตซาน	15
2.2.6.1 ผลของน้ำหนักโมเลกุล	15
2.2.6.2. ผลของลำดับการใช้ไคโตซานในกระบวนการผลิตแคปซูล	16
2.2.6.3 ปริมาณน้ำมันขมิ้นชันในนาโนแคปซูล (Loading capacity)	17
บทที่ 3 บทสรุป	19
เอกสารอ้างอิง	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
Output ที่ได้จากโครงการ	23
ภาคผนวก	24
ภาคผนวก 1 บทความ “Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil”	
ภาคผนวก 2 บทความภายในหนังสือพิมพ์ The Nation วันที่ 3 ตุลาคม 2549 ซึ่งรวบรวม อยู่ใน Controlled Release Society Newsletter, Vol. 24(1), 2007	

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างของสารสำคัญในขมิ้นชัน ได้แก่ Turmerone (1), Curcumin (2), Desmethoxycurcumin (3) และ Bisdesmethoxycurcumin (4)	4
2.1	โครงสร้างของ ar-turmerone	7
2.2	ขนาดของนาโนแคปซูลและค่าศักย์ซีต้าที่ความเข้มข้นต่างๆ	9
2.3	นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มีความเข้มข้น 1% ก่อนการระเหยเอาเอทานอลออก (SEM)	10
2.4	นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มีความเข้มข้น 1% หลังการระเหยเอาเอทานอลออก (SEM)	10
2.5	นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มีความเข้มข้น 2% ก่อนการระเหยเอาเอทานอลออก (SEM)	10
2.6	นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มีความเข้มข้น 2% หลังการระเหยเอาเอทานอลออก (SEM)	10
2.7	นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มีความเข้มข้น 4% ก่อนการระเหยเอาเอทานอลออก (SEM)	10
2.8	นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มีความเข้มข้น 4% หลังการระเหยเอาเอทานอลออก (SEM)	10
2.9	ค่าความเป็นกรด-ด่างของแคปซูลในสารละลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	11
2.10	ผลของการ sonication ต่อขนาดและค่าศักย์ซีต้าที่ระยะเวลาในการ sonication ต่างๆ	12
2.11	ภาพถ่ายลักษณะของนาโนแคปซูลจากกระบวนการที่มีการ sonication เป็นเวลา 15 นาทีหลังหยดน้ำมันขมิ้นชันด้วยเครื่อง AFM	13
2.12	ความสัมพันธ์ระหว่าง relative abundance กับอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและอัลจิเนต	15
2.13	ปริมาณสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินในการผลิตแคปซูลที่ซึมผ่านถุง dialysis ที่มี molecular weight cut-off เท่ากับ 12,000 ดาลตัน	15
2.14	ผลของลำดับในการเติมไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ต่อปริมาณน้ำมันขมิ้นชันในนาโนแคปซูลและปริมาณแคปซูลที่ได้	18

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สมบัติของพอลิเมอร์	6
2.2 สมบัติของ Tween80 [®]	6
2.3 สมบัติของน้ำมันขมิ้นชัน	7
2.4 สมบัติของ ar-turmerone	7
2.5 ผลของตัวทำละลายและสารลดแรงตึงผิวต่อขนาดและค่าศักย์ซีต้าของแคปซูล	8
2.6 ผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชัน/อัลจินตต่อสมบัติของนาโนแคปซูลที่เตรียมด้วยการ sonication เป็นเวลา 15 นาที หลังหยคน้ำมันขมิ้นชัน	13
2.7 ความเสถียรทางกายภาพ (physical stability) ของนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน	14
2.8 ผลของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานต่อขนาดของแคปซูลและค่าศักย์ซีต้า	16
2.9 ผลของลำดับการใช้พอลิเมอร์ต่อขนาด	16
2.10 ขนาดของแคปซูลหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4°C	16
2.11 การศึกษาเสถียรภาพของไคโตซาน-อัลจินตแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน เมื่อเก็บไว้ที่ 25°C และ 4°C	17

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เทคนิค encapsulation เป็นเทคนิคในการบรรจุสารออกฤทธิ์ไว้ในจุลยาน อาทิ พาร์ติเคิลหรือแคปซูลเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของยาจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ป้องกันการเกิดออกซิเดชัน หรือเป็นการป้องกันการเกิด incompatibility ระหว่างสารออกฤทธิ์กับยาตัวอื่นในสูตรตำรับ และที่สำคัญหากสามารถบรรจุยาในพาร์ติเคิลหรือแคปซูลระดับนาโนเมตร จะช่วยในการนำส่งยาไปยังเป้าหมาย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการแพทย์ เกษษกรรม และเครื่องสำอาง

การบรรจุสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดในนาโนแคปซูลจำเป็นจะต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ อาทิ ชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูปแคปซูล ชนิด และปริมาณของสารลดแรงตึงผิว ตลอดจนความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่บรรจุภายในแคปซูล นอกจากนี้หากนำมาใช้ในสูตรตำรับที่มีสารตัวอื่นๆ จำเป็นจะต้องตรวจสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเข้ากันได้ (compatibility) และความเสถียร (stability) ของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้น

ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีการนำเทคโนโลยีการบรรจุสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (active ingredient) ไว้ในไมโครแคปซูล เพื่อป้องกันการเสื่อมสลาย (degradation) เมื่อถูกแสง อากาศ หรือความร้อน ซึ่งการบรรจุสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไว้ในแคปซูลจะทำให้สารนั้นมีความเสถียรมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่พยายามศึกษาปัจจัยหาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการลดขนาดของแคปซูลลงให้ได้ในระดับนาโนเมตร ซึ่งส่งผลให้การดูดซึมของสารผ่านชั้นผิวหนังได้ดีขึ้น

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำสารสกัดจากสมุนไพรมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางกันมากขึ้น อาทิ ขมิ้นชัน ซึ่งมีสรรพคุณหลายประการ ได้แก่ สรรพคุณในการต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหย (Turmeric oil) ที่สกัดได้จากขมิ้นชันยังมีสรรพคุณในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา กันขุม ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในเภสัชกรรม แต่เนื่องจากน้ำมันขมิ้นชันเป็นน้ำมันหอมระเหย ไม่เสถียรต่อแสง อากาศ และความร้อน ดังนั้นการบรรจุน้ำมันขมิ้นชันในแคปซูลจึงเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าว และหากแคปซูลที่พัฒนาขึ้นมีขนาดเล็กลงถึงระดับนาโนเมตรจะทำให้ประสิทธิภาพการซึมผ่านชั้นผิวหนังและผนังเซลล์ของเซลล์ผิวหนังดีขึ้น นอกจากนี้การทำเป็นนาโนแคปซูลยังสามารถป้องกันการเกิด incompatibility ระหว่างน้ำมันขมิ้นชันและยาตัวอื่นในสูตรตำรับได้ด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาสูตรนาโนแคปซูลซึ่งบรรจุน้ำมันขมิ้นชันเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยจะทำการศึกษาอิทธิพลของพอลิเมอร์ อัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่อพอลิเมอร์ ลำดับของการเติมพอลิเมอร์ลง ในกระบวนการเตรียมนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน และสารลดแรงตึงผิว ต่อการขึ้นรูปแคปซูลในระดับนาโนเมตร ที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน ตลอดจนประสิทธิภาพของการบรรจุยา (loading capacity of turmeric oil in nanocapsules) และความเสถียร (stability) ของนาโนแคปซูลที่พัฒนาขึ้น ซึ่งองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่สามารถนำมาใช้อธิบายกลไกต่างๆ ที่เกิดขึ้น และเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สามารถต่อยอดไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกิดการใช้ได้จริงในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อพัฒนาและขึ้นรูปแคปซูลที่บรรจุน้ำมันชั้นให้ได้ในระดับนาโนเมตรเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ตลอดจนศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่างๆ ต่อสมบัติทางกายภาพของนาโนแคปซูลที่พัฒนาขึ้น

1.3. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

นาโนแคปซูล

นาโนแคปซูล คือ นาโนพาร์ติเคิลใดๆ ที่ประกอบด้วย ผนัง (wall or shell) และ ช่องว่าง (space) ที่ใช้บรรจุสารที่ต้องการ (desired substance) โดยขนาดของนาโนแคปซูลสามารถควบคุมได้ตามต้องการและสารที่บรรจุภายในอาจจะอยู่ในรูปของแข็งหรือของเหลวก็ได้⁽¹⁻²⁾ ในอดีต liposomes จะถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อควบคุมการปลดปล่อยและป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์จากสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันมีวัสดุที่ใช้ทำนาโนแคปซูลมากขึ้น อาทิ พอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ ไคโตซาน และ อัลจิเนต เป็นต้น และพอลิเมอร์สังเคราะห์ ได้แก่ poly (lactic acid), poly (lactic-co-glycolic acid), poly (ethylene oxide), poly (E-caprolactone), เป็นต้น⁽³⁾ ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

อัลจิเนต

อัลจิเนต (พอลิเมอร์ประจุลบ) พบมากในผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาล (*Phaeophyceae*, mainly *Laminaria*) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีสายยาว (linear unbranched polymer) ประกอบด้วย β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-mannuronic acid (M) and α -(1 $\rightarrow$ 4)-linked L-guluronic acid (G)⁽⁴⁾ มีสมบัติในการสร้างเจลที่แข็งในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออนและเป็นเจลที่เสถียรต่อความร้อน จึงมักใช้เป็นสารเพิ่มความข้น (Thickener)⁽⁵⁾ นอกจากนี้อัลจิเนตที่มีปริมาณ G สูงจะได้เจลที่แข็งและเสถียรต่อความร้อน ในขณะที่อัลจิเนตที่มีค่า M สูง จะได้เจลที่ยืดหยุ่นกว่า (more-elastic gels) อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออน อัลจิเนตที่มีค่า M สูง จะสร้างเจลที่แข็งกว่า

นอกจากนี้การละลายก็เป็นอีกสมบัติหนึ่งของอัลจิเนตที่ควรทราบ โดยพบว่า การละลายของอัลจิเนตนั้น จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยอัลจิเนตจะตกตะกอน เมื่อ pH ต่ำกว่า 3.5 หรือในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออน จากสมบัติดังกล่าว ทำให้อัลจิเนตมักถูกนำมาใช้เป็น อิมัลซิไฟเออร์ (low viscosity emulsifiers)⁽⁴⁾ และสารเพิ่มความข้น

อัลจิเนตสามารถนำมาขึ้นรูปร่วมกับพอลิเมอร์ตัวอื่นๆ อาทิ ไคโตซาน ตัวอย่างเช่น การบรรจุสารชีวภาพ ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) และ hemoglobin ในอัลจิเนตและหุ้มด้วยไคโตซาน⁽⁶⁻⁷⁾ รวมไปถึงการสร้าง polyelectrolyte complexes กับไคโตซาน⁽⁸⁾ นอกจากนี้ ยังสามารถขึ้นรูปร่วมกับ poly-L-lysine โดยอยู่ในรูปของ alginate-poly-L-lysine microcapsule⁽⁸⁾

ไคโตซาน

ไคโตซาน (พอลิเมอร์ประจุบวก) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สกัดได้จากกากของเสียในอุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็ง และกุ้งแปรรูป อาทิ เปลือกและหัวกุ้ง ซึ่งปริมาณกากของเสียนี้คิดเป็นร้อยละ 30-40 ของน้ำหนักกุ้งเริ่มต้น⁽⁹⁾ โดยในปี พ.ศ. 2542 ประเทศไทยมีการส่งออกกุ้งแช่แข็งและกุ้งแปรรูป ประมาณ 240,000 ตัน⁽¹⁰⁾ นั่นหมายถึง ปริมาณของเสียที่

เกิดขึ้นมีประมาณ 72,000–96,000 ตัน ซึ่งเป็นปริมาณที่มากพอที่จะนำมาผลิตเป็นสารที่มีมูลค่าสูง อาทิ โคลโคซาน และเนื่องจากสมบัติที่โดดเด่นของโคลโคซาน ได้แก่ เป็นสารที่มีประจุบวกสูง ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม หรือเม็ดบีดได้ และเป็นสารที่เข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) โคลโคซานจึงมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ⁽¹¹⁾

Paul and sharma⁽¹²⁾ รายงานว่า โคลโคซานถูกนำมาใช้มากทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม อาทิ ในระบบนำส่งยา การสมานแผล และการตกแต่งแผล การทำผิวหนังเทียม เมมเบรนสำหรับทำ dialysis ตลอดจนด้านผลิตภัณฑ์ถนอมผิว นอกจากการประยุกต์ใช้ดังกล่าวแล้ว โคลโคซานยังสามารถใช้ในด้านต่างๆ อีกมากมาย อาทิ ใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E. coli⁽¹³⁾ เป็นสารตกตะกอนและดูดซับสีในน้ำตาล⁽¹⁴⁾ ทำเป็นแผ่นเยื่อบางสำหรับการแยกสาร เป็นสาร color stabilizer ในอุตสาหกรรมอาหาร และเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง⁽¹¹⁾

นอกจากนี้ โคลโคซานยังสามารถขึ้นรูปเป็นเม็ดบีดที่มีรูพรุน ซึ่ง porosity และความแข็งแรงของบีดจะสัมพันธ์กับความเข้มข้น, degree of deacetylation และชนิดของโคลโคซาน^(8,15) นอกจากนี้ โคลโคซานยังสามารถขึ้นรูปเป็นสเฟียร์ทั้งในระดับไมโครเมตร⁽¹⁶⁾ และนาโนเมตร⁽¹⁷⁾ รวมไปถึงพาร์ติเคิลในระดับนาโนเมตร โดยขึ้นรูปร่วมกับพอลิเมอร์ตัวอื่น^(6-8,18)

เทคนิคการขึ้นรูป

โดยทั่วไป เทคนิคที่ใช้ในการขึ้นรูปนาโนแคปซูลสำหรับพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติมีอยู่ 2 วิธี คือ

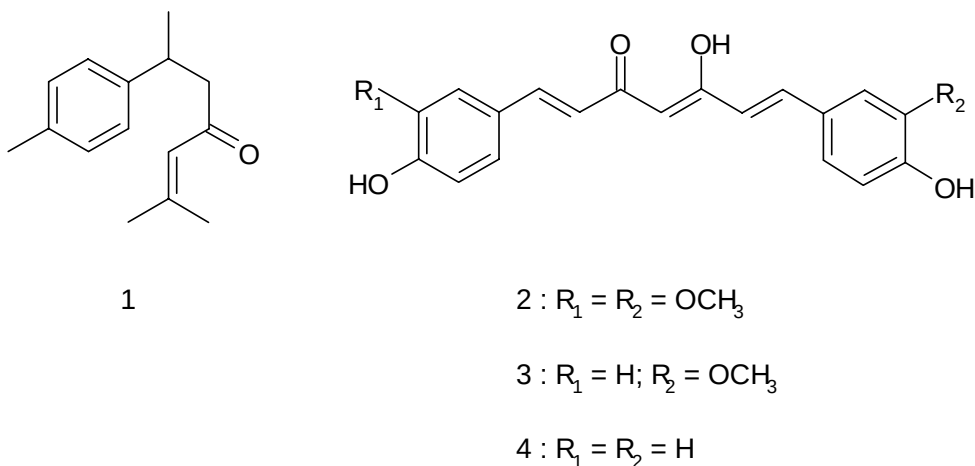
1. Emulsification-diffusion technique: การอิมัลซิฟายสารละลายอแกนิคที่ประกอบด้วย น้ำมัน พอลิเมอร์ และยาในสารละลายที่มี stabilizing agent จากนั้นเติมน้ำลงไปในระบบจะเป็นการกระตุ้นการแพร่ของตัวทำละลาย (solvent diffusion) เข้าไปใน external phase ส่งผลให้เกิดเป็น colloid particles⁽¹⁹⁾ อย่างไรก็ตาม ความยากของวิธีนี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้ stabilizing agent บางตัว อาทิ poly-vinyl alcohol และเมื่อใช้ ultracentrifugation ในการแยกนาโนแคปซูลจาก medium
2. Solvent displacement procedure: การละลายสารชีวภาพที่ชอบน้ำมัน (lipophilic drug) พอลิเมอร์และฟอสฟอลิพิดในตัวทำละลายที่เข้ากันได้กับน้ำ (water-miscible solvent) อาทิ อะซิโตน และเอทานอล จากนั้นนำมาใส่ในสารละลายที่มีสารลดแรงตึงผิวและทำการเขย่าอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งได้อนุภาคขุ่นขาวของนาโนพาร์ติเคิล⁽²⁰⁾

ขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L. หรือ Turmeric) เป็นพืชในตระกูล Zingiberaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน ปลูกในประเทศจีน อินเดีย ศรีลังกา และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย⁽²¹⁾ ส่วนหัวและเหง้า (rhizome) ของขมิ้นชันถูกนำมาใช้เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นยาสามัญประจำบ้านและนำมาใช้เป็นเครื่องเทศในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้⁽²²⁾ และเครื่องสำอางโดยนิยมใช้ทาผิวให้มีสีเหลือง ส่วนในทางการแพทย์นิยมใช้ผงขมิ้นเป็นส่วนผสมในยารักษาโรคต่างๆ เช่น ยารักษาแผลในกระเพาะอาหาร ลดกรด ยาขับลม ยาแก้ปวดท้อง ยาเจริญอาหาร ยาแก้ท้องเสีย และยารักษาโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคผิวหนัง โรคกระเพาะเป็นต้น⁽²³⁾

สารสำคัญที่พบในเหง้าของขมิ้นชันมี 2 ประเภท คือ (1) สารสีเหลืองส้ม ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม curcuminoids ซึ่งประกอบด้วยสาร 3 ชนิด คือ curcumin (diferuloylmethane), desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin และ

(2) น้ำมันหอมระเหยหรือน้ำมันขมิ้นชัน ซึ่งประกอบด้วยสารหลักคือ aromatic turmerone (ar-turmerone), α -turmerone และ β -turmerone (รูปที่ 1.1)⁽²⁴⁾



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสารสำคัญในขมิ้นชัน ได้แก่ Turmerone (1), Curcumin (2), Desmethoxycurcumin (3) และ Bisdesmethoxycurcumin (4)

Curcuminoids มีอยู่ในขมิ้นชันประมาณ 2-9 % ขึ้นกับภูมิประเทศที่เพาะปลูก และอายุพืชที่เก็บเกี่ยว⁽²⁵⁾ และจากการทดลองและวิจัยทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า curcuminoids มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)⁽²⁶⁾ ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ด้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial), ด้านปรสิต (antiparasite), ด้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) และต้านมะเร็ง (anticancer) เป็นต้น⁽²⁷⁾ มีรายงานว่า curcumin มีฤทธิ์ด้านการเกิดมะเร็งของผิวหนัง⁽²⁸⁾ และพบว่า curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin สามารถป้องกันความเป็นพิษต่อตับ (hepato-protective effect) จากสารพิษ⁽²⁹⁾ นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้สาร curcuminoids ติดต่อกันเป็นเวลานาน ไม่พบความเป็นพิษ⁽³⁰⁾

น้ำมันขมิ้นชัน มีสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย⁽³¹⁾ และเชื้อรา⁽²¹⁾ ต้านอนุมูลอิสระ⁽³²⁾ และกันยุง⁽³³⁾ แต่ข้อด้อยของน้ำมันขมิ้นชัน คือ ไม่เสถียรต่อแสงและควรเก็บไว้ในที่ที่ไม่ถูกแสง อากาศ และความชื้น⁽³⁴⁾ ดังนั้นการบรรจุน้ำมันขมิ้นชันในแคปซูลระดับนาโนเมตรจะเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาข้างต้น ตลอดจนส่งผลให้การซึมผ่านทางชั้นผิวหนังดีขึ้น ซึ่งสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

บทที่ 2

ขอบเขตของงานวิจัย ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

2.1 ขอบเขตของการดำเนินงานวิจัย มีรายละเอียดดังนี้

2.1.1 จัดเตรียม/จัดหาวัตถุดิบและทดสอบสมบัติของวัตถุดิบ

ทำการจัดหาวัตถุดิบ อาทิ ไคโตซาน อัลจินเนท น้ำนํนขมิ้นชัน และสารลดแรงตึงผิว (Tween80[®]) ตลอดจนวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของสารแต่ละตัว

2.1.2 ศึกษาผลของความเข้มข้น และอัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่อพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูปนาโนแคปซูล

ในการพัฒนาการขึ้นรูปนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันนั้น ปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำมันขมิ้นชัน ตัวทำละลาย เทคนิคในการเตรียมนาโนแคปซูล อัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่อพอลิเมอร์ ที่มีผลต่อสมบัติทางกายภาพ ความเสถียรทางกายภาพ (physical stability) และปริมาณน้ำมันขมิ้นชันในนาโนแคปซูล (loading capacity of turmeric oil in nanocapsules) ซึ่งวิธีการขึ้นรูปนาโนแคปซูลดัดแปลงมาจาก De and Robinson³⁵ หลักการคือ นำสารละลายน้ำมันขมิ้นชันในเอทานอล (หรืออะซิโตน) มาหยดลงในสารละลายพอลิเมอร์ที่มีสารลดแรงตึงผิว (Tween80[®]) และทำการกวนอย่างต่อเนื่อง จากนั้นหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงในสารละลายที่พอร์มแคปซูลข้างต้น (ในกรณีทีพอลิเมอร์เป็นอัลจินเนท) จะทำให้แคปซูลแข็งตัวมากขึ้น และตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ก่อนนำมาระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ rotavapor จากนั้นนำมาตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ

2.1.3 ศึกษาผลของโคโคซาน อัตราส่วนของโคโคซานต่ออัลจินัท และลำดับของการเติมโคโคซานในการขึ้นรูปแคปซูล

ทำการขึ้นรูปตามกรรมวิธีที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 2.1.2 และเพิ่มขั้นตอนการ crosslink แกปซูลอัลจินทด้วยไคโตซาน ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2 ระดับ ก่อนตั้งทิ้งไว้ 1 คืนและการระเหยเอาตัวทำละลายออก ตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วนระหว่างไคโตซานต่ออัลจินทที่ศึกษานั้น ได้แก่ 0:1, 0.67:1, 0.1:1 และ 0.2:1 สำหรับการศึกษาผลของลำดับในการเติมไคโตซานในการขึ้นรูปนั้น ทำโดยการเติมไคโตซานก่อนหรือหลังการเติมแคลเซียมคลอไรด์

2.1.4 ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน

- ขนาดของนาโนแคปซูล ตรวจสอบด้วยเครื่อง Zetasizer รุ่น Nano-ZS ยี่ห้อ Malvern Instruments จากประเทศอังกฤษ
- ลักษณะภายนอก (morphology) ของนาโนแคปซูล ตรวจสอบโดยใช้เครื่อง Scanning electron microscope (SEM) และ Atomic force microscope (AFM)
- เสถียรภาพทางกายภาพ (physical stability) ของนาโนแคปซูล เมื่อเก็บไว้ที่ 4°C และ 25°C เป็นเวลา 4 เดือน
- Loading capacity วิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

2.2. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การทดลองในครั้งนี้ใช้พอลิเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ (1) อัลจินทจากสาหร่ายสีน้ำตาล สั่งซื้อจากบริษัท Sigma และ (2) ไคโตซานจากเปลือกกุ้งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (LM-chitosan) สั่งซื้อจากบริษัท อีเบส จำกัด และไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง (MM-chitosan) ที่ผ่านการ deacetylation 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งสมบัติของพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมบัติของพอลิเมอร์

พารามิเตอร์	อัลจินท	ไคโตซาน	
		MM-chitosan	LM-chitosan
แหล่งที่มา	สาหร่ายสีน้ำตาล (<i>Macrocystis pyrifera</i>)	เปลือกกุ้ง	เปลือกกุ้ง
ความชื้น (%)	9.12 ± 0.07	12.6 ± 0.02	5.50 ± 0.04
เถ้า (%)	25.8 ± 0.2	0.05 ± 0.007	1.08 ± 0.13
โปรตีน (%)	-	1.31 ± 0.10	1.64. ± 0.12
Degree of Deacetylation (%)	-	93.7 ± 0.2	89.9 ± 0.2
การละลาย (%)	100 (1% อัลจินท, 25°C)	99.4 ± 0.3 (1% ไคโตซาน, 25°C)	95.8 ± 0.7 (1% ไคโตซาน, 25°C)
ความหนืด (cps)	2,808 ± 43 (2% อัลจินท, 25°C)	56.3 ± 0.9 (1% อัลจินท, 25°C)	25.3 ± 0.9 (1% อัลจินท, 25°C)
น้ำหนักโมเลกุล (Mn) (คาลตัน)	220,000	72,000	41,000
Mannuronic acid/guluronic acid ratio (M/G ratio)	1.56	-	-

สำหรับสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ Tween80[®] หรือ Polyoxyethylene (20) sorbitan monoleate ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม non-ionic surfactant โดยสั่งซื้อจากบริษัท Acros และมีสมบัติดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สมบัติของ Tween80[®]

พารามิเตอร์	Tween80 [®]
สูตรโครงสร้าง	(C ₂ H ₄ O) ₂₀ (OH) ₃ (C ₁₈ H ₃₃ O ₂) ₁ C ₆ H ₈ O
ลักษณะภายนอก	ของเหลวหนืดสีเหลืองใส
ความหนาแน่น (กรัม/ซม ³) ที่ 25°C	1.08
Reflective index (n _D ²⁰)	1.471-1.473
HLB (hydrophilic-lipophilic balance)	15
น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมล)	1,310

ตารางที่ 2.3 แสดงสมบัติของน้ำมันขมิ้นชัน (Turmeric oil) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด โดยน้ำมันขมิ้นชันจัดเป็นน้ำมันหอมระเหยจากธรรมชาติที่สกัดจาก rhizome ของ *Curcuma longa* (Family of Zingiberaceae) โดยองค์ประกอบหลักในน้ำมันขมิ้นชัน ได้แก่ ar-turmerone, β -turmerone และ α -turmerone ตามลำดับ

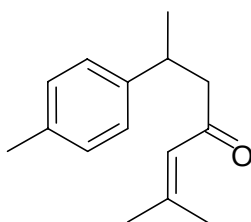
ตารางที่ 2.3 สมบัติของน้ำมันขมิ้นชัน

พารามิเตอร์	น้ำมันขมิ้นชัน
แหล่งที่มา	rhizome ของ <i>Curcuma longa</i> (Family of Zingiberaceae)
ลักษณะภายนอก	ของเหลวใสสีเหลือง ถึงเหลืองมะนาว
ความหนาแน่น (กรัม/ซม ³) ที่ 20°C	0.9160-0.9366
Reflective index (n _D ²⁰)	1.5023-1.5138

ตารางที่ 2.4 แสดงสมบัติของ ar-turmerone หรือ 2-Methyl-6-(4-methylphenyl)-2-hepten-4-one ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพในการบรรจุน้ำมันขมิ้นชันในแคปซูล และโครงสร้างทางเคมีแสดงไว้ในรูปที่ 2.1

ตารางที่ 2.4 สมบัติของ ar-turmerone

พารามิเตอร์	ar-turmerone
แหล่งที่มา	rhizome ของ <i>Curcuma longa</i>
ลักษณะภายนอก	ของเหลวใสสีเหลือง
สูตรเคมี	C ₁₅ H ₂₀ O
น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมล)	216



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ ar-turmerone

2.2.1. ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารละลายน้ำมันชั้นต่อการขึ้นรูปแคปซูล

ทำการเจือจางน้ำมันชั้นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1% โดยใช้อะซิโตนและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปหยดใส่ในสารละลายอัลจินตที่มีความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมีส่วนผสมของ Tween80[®] อยู่ในปริมาณ 1% w/v และทำการเขย่าอย่างต่อเนื่องด้วยความเร็วรอบ 1000 รอบ/นาที ทั้งนี้ปริมาตรของสารละลายน้ำมันชั้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของน้ำมันชั้นต่ออัลจินตซึ่งควบคุมไว้ที่ 1:1 (โดยน้ำหนัก) จากนั้นทำการเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (0.67 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม และเขย่าต่อไปอีก 30 นาที และเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า พบว่า กระบวนการเตรียมแคปซูลที่ใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายสำหรับน้ำมันชั้นมีผลทำให้สารละลายที่มีแคปซูลผสมอยู่มีสีขาวขุ่นและเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า สารละลายแคปซูลที่เตรียมโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายจะมีสีขุ่นขาวน้อยกว่า และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของแคปซูลที่เตรียมจากสารละลายน้ำมันชั้นที่มีความเข้มข้น 1% ด้วยเครื่อง Zetasizer รุ่น Nano-ZS ยี่ห้อ Malvern Instruments ประเทศอังกฤษ พบว่า แคปซูลที่ได้จากการใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายจะมีขนาดประมาณ 369 นาโนเมตร ในขณะที่แคปซูลที่ได้จากการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย มีขนาด 257 นาโนเมตร (ตารางที่ 2.5) ดังนั้นเอทานอลจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการศึกษาในลำดับต่อไป

นอกจากนี้ ยังพบว่า สูตรการเตรียมนาโนแคปซูลที่มีการใช้ Tween80[®] มีค่าศักย์ไฟฟ้าและขนาดของแคปซูลเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่มีการใช้ Tween80[®] ดังแสดงในตารางที่ 2.5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการดูดซับ Tween80[®] ล้อมรอบน้ำมันชั้นและเกิดเป็น micelle โดย Tween80[®] หันส่วนที่มีขั้วไปสร้างพันธะกับอัลจินต ส่งผลให้ความหนาแน่นของประจุบนผิวของอัลจินตนาโนแคปซูลลดลง จึงทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นลบน้อยลงตามไปด้วย

ตารางที่ 2.5 ผลของตัวทำละลายและสารลดแรงตึงผิวต่อขนาดและค่าศักย์ไฟฟ้าของแคปซูล

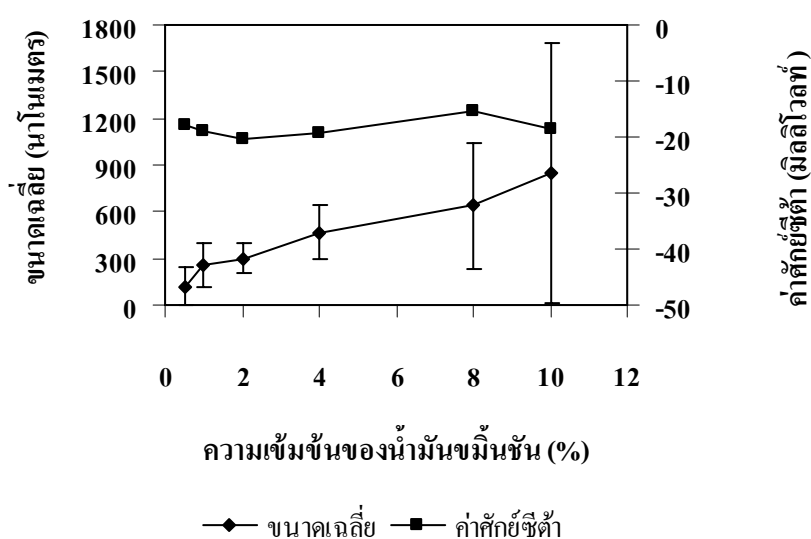
ตัวทำละลาย	สารลดแรงตึงผิว	ขนาดเฉลี่ย (นาโนเมตร)	ค่าศักย์ไฟฟ้า (มิลลิโวลต์)
เอทานอล	√	257 ± 137	-17.4 ± 1.2
เอทานอล	X	677 ± 336	-41.2 ± 0.49
อะซิโตน	√	369 ± 189	-17.3 ± 2.2

2.2.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำมันชั้นต่อขนาดของแคปซูล

เนื่องจากการขึ้นรูปแคปซูลโดยหยดน้ำมันที่ไม่ผ่านการเจือจาง พบว่า สารละลายที่ได้จะเห็นเป็นเม็ดน้ำมันกระจายและบางส่วนลอยอยู่บริเวณผิว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำมันชั้นจำเป็นต้องมีการเจือจางด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมและความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุในนาโนแคปซูล ดังนั้นจึงทำการศึกษา ผลของความเข้มข้นของน้ำมันต่อขนาดของแคปซูลที่พัฒนาขึ้น ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโดยเจือจางน้ำมันชั้นให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5% - 10% ในเอทานอล และอัตราส่วนระหว่างน้ำมันชั้นต่ออัลจินต เท่ากับ 1:1 จากผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของน้ำมันชั้นมีผลต่อขนาดของแคปซูล กล่าวคือ หากใช้น้ำมันชั้นที่มีความเข้มข้นสูงกว่า มีผลทำให้แคปซูลที่บรรจุน้ำมันชั้นมีขนาดใหญ่กว่า ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ตัวอย่างเช่น แคปซูลที่บรรจุน้ำมันชั้นที่

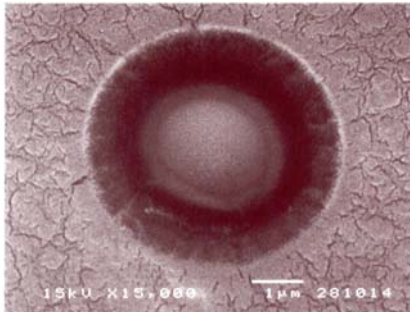
ความเข้มข้น 1% จะมีขนาดเล็กกว่าแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 2% และ 4% ประมาณ 13% และ 45% ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหยดน้ำมันขมิ้นชันที่มีความเข้มข้นสูงกว่าจะมีปริมาณเอทานอลน้อยกว่า ทำให้มีปริมาณเอทานอลที่ซึมผ่านออกจากหยดน้ำมันน้อยกว่าในระหว่างการเตรียมนาโนแคปซูล หรืออีกนัยหนึ่ง คือ ปริมาตรของน้ำมันในแคปซูลสูงส่งผลให้ขนาดของแคปซูลใหญ่ขึ้น³⁶ และเมื่อพิจารณาค่าศักย์ซีต้า (Zeta Potential) พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง -15.4 ถึง -20.3 มิลลิโวลต์

อย่างไรก็ตาม ขนาดของแคปซูลที่ได้ในแต่ละความเข้มข้น พบว่า ค่ามีค่าเบี่ยงเบน (standard deviation) ค่อนข้างสูง หรืออีกนัยหนึ่งคือ แคปซูลที่ได้มีขนาดแตกต่างกันมากในแต่ละสภาวะ (รูปที่ 2.2) ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่เราคาดว่าจะสามารถแก้ไขให้มีขนาดใกล้เคียงกัน คือ การ sonication ซึ่งระยะเวลาและลำดับของการ sonication มีผลต่อขนาดของแคปซูลทั้งสิ้น

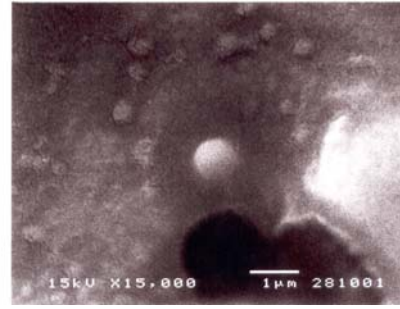


รูปที่ 2.2 ขนาดของนาโนแคปซูลและค่าศักย์ซีต้าที่ความเข้มข้นต่างๆ

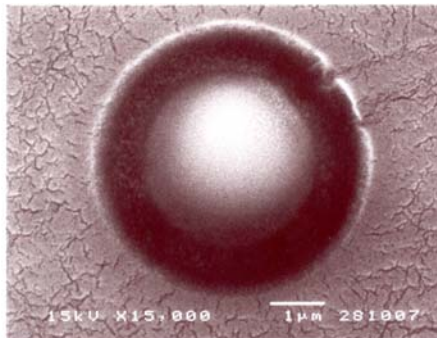
เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง SEM พบว่า แคปซูลที่ได้มีลักษณะค่อนข้างกลมและแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่เจือจางกว่าจะมีขนาดเล็กกว่า นอกจากนี้การระเหยเอทานอลออกจากแคปซูลจะทำให้แคปซูลมีขนาดเล็กลง ดังแสดงในรูปที่ 2.3-2.8 อย่างไรก็ตามแคปซูลที่ได้ด้วยวิธีข้างต้นมีขนาดในระดับไมโครเมตร ดังนั้นการศึกษาในลำดับต่อไปจึงทำการศึกษาผลของ sonication และระยะเวลาในการ sonication ต่อขนาดของแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน



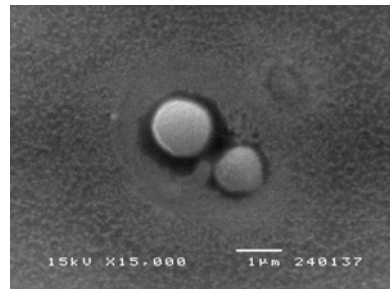
รูปที่ 2.3 นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มี
ความเข้มข้น 1% ก่อนการระเหยเอทานอลออก (SEM)



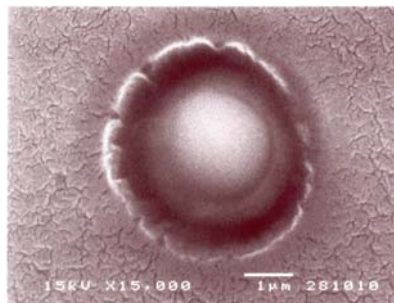
รูปที่ 2.4 นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มี
ความเข้มข้น 1% หลังการระเหยเอทานอลออก (SEM)



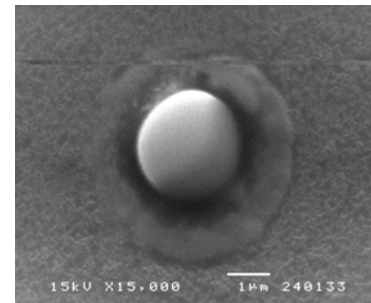
รูปที่ 2.5 นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มี
ความเข้มข้น 2% ก่อนการระเหยเอทานอลออก (SEM)



รูปที่ 2.6 นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มี
ความเข้มข้น 2% หลังการระเหยเอทานอลออก (SEM)

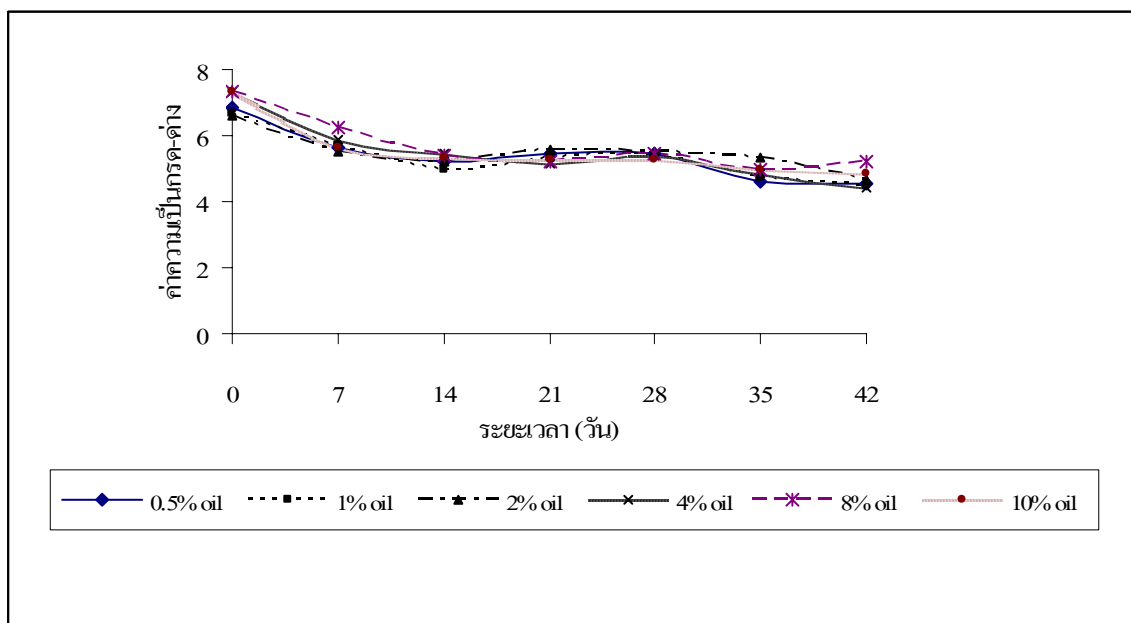


รูปที่ 2.7 นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มี
ความเข้มข้น 4% ก่อนการระเหยเอทานอลออก (SEM)



รูปที่ 2.8 นาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันที่มี
ความเข้มข้น 4% หลังการระเหยเอทานอลออก (SEM)

นอกจากนี้ยังพบว่า แคปซูลที่เตรียมจากน้ำมันขมิ้นชันที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจะเริ่มพองขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วัน และเมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่า มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 14 วันแรกและเริ่มคงที่เมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้เวลา 42 วัน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 7 เป็น 4.6 ดังแสดงในรูปที่ 2.9

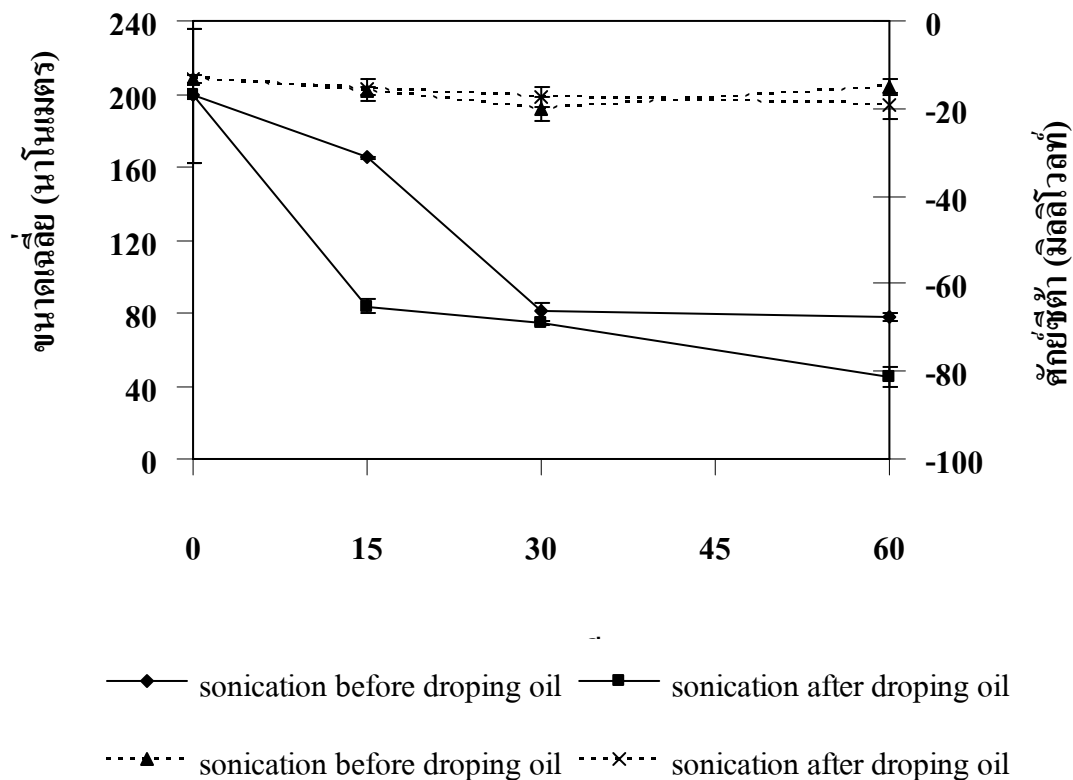


รูปที่ 2.9 ค่าความเป็นกรด-ด่างของแคปซูลในสารละลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

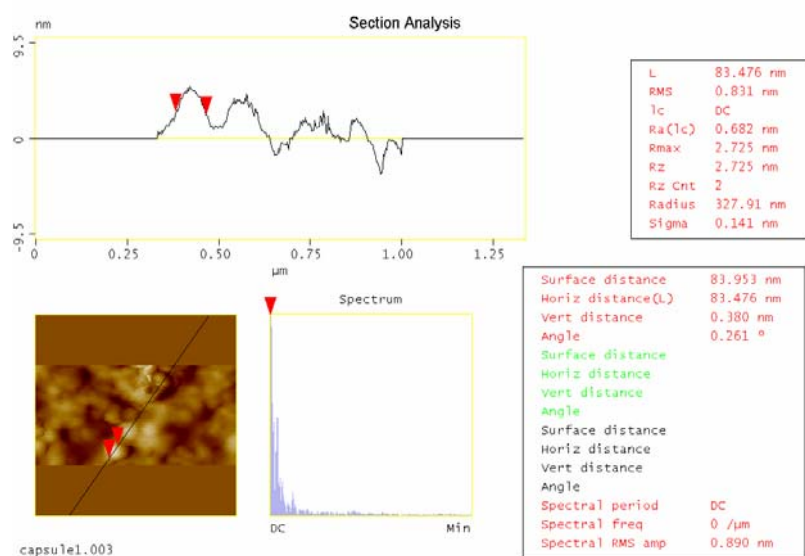
2.2.3. ผลของการ sonication ระยะเวลาและลำดับการ sonication ต่อขนาดของแคปซูล

เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า ขนาดของแคปซูลที่ได้ในแต่ละสภาวะมีความแตกต่างกันอย่างมาก ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของการ sonication ระยะเวลาและลำดับของการ sonication ต่อขนาดของแคปซูล โดยรายละเอียดของการทดลองมีดังนี้: ทำการขึ้นรูปแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันตามวิธีที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น แต่เพิ่มขั้นตอนการ sonication ก่อนหรือหลังหยดสารละลายน้ำมันขมิ้นชัน เป็นเวลา 0, 15, 30 และ 60 นาที นอกจากนี้ใช้น้ำมันขมิ้นชันที่ใช้มีความเข้มข้น เท่ากับ 2% โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และอัตราส่วนของน้ำมันขมิ้นชันต่อพอลิเมอร์ เท่ากับ 1:1 จากการสังเกตด้วยตาเปล่า พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการ sonication ทั้งก่อนและหลังหยดน้ำมันทำให้สารละลายที่มีแคปซูลผสมอยู่นั้นมีความขุ่นน้อยลง ดังนั้นจึงตั้งสมมุติฐานว่ากระบวนการที่ได้สารละลายใสจะมีแคปซูลขนาดเล็กกว่ากระบวนการที่ได้สารละลายขุ่น และจากการพิสูจน์ทราบจากการวัดขนาดด้วยเครื่อง Zetasizer พบว่า ระยะเวลา และลำดับก่อน-หลังของการ sonication มีผลต่อขนาดของแคปซูลทั้งสิ้น ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 2.10 โดยเมื่อระยะเวลาในการ sonication เพิ่มขึ้นขนาดของแคปซูลจะเล็กลง โดยเฉพาะการ sonication หลังหยดน้ำมันขมิ้นชัน ตัวอย่างเช่น การ sonication เป็นเวลา 15 นาทีก่อนหยดน้ำมันทำให้ขนาดแคปซูลที่ได้มีขนาดเล็กกว่ากระบวนการที่ไม่มีขั้นตอนการ sonication ประมาณ 15% และหากทำการ sonication เป็นเวลา 15 นาทีหลังหยดน้ำมันจะได้แคปซูลขนาดเล็กกว่าไม่ผ่านขั้นตอนการ sonication ถึง 60% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการ sonication สารละลายโซเดียมอัลจินตก่อนการหยดน้ำมันขมิ้นชันอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการตัดสายโซ่ของโซเดียมอัลจินตด้วยแรงเชิงกล³⁷ ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลลดลงทำให้นาโนแคปซูลที่ได้มีขนาดเล็กกว่าแคปซูลที่ได้จากการใช้พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อย่างไรก็ตามกระบวนการที่สำคัญไปกว่านั้นคือการรบกวนหยดน้ำมันที่ล้อมรอบด้วยอัลจินตโดยการ sonication หลังหยดน้ำมัน ซึ่งทำให้หยดน้ำมันดังกล่าวแตกเป็นนาโนแคปซูลขนาดเล็กๆ ที่มีขนาดสม่ำเสมอ และลักษณะผิวของนาโนแคปซูลค่อนข้างกลมเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ซึ่งจากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Peltonen และคณะ³⁶ อย่างไรก็ตามการ sonication ก่อนและหลังหยดน้ำมัน ตลอดจนระยะเวลาในการ sonication ไม่มีผลต่อค่าศักย์ซีต้า ดังแสดงรูปที่ 2.10 นอกจากนี้การ sonication ในแต่ละสภาวะยังทำให้ขนาดของแคปซูลมีความสม่ำเสมอ ซึ่งดูได้จากค่า

standard deviation ที่มีค่าค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจากสมมุติฐานข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าแคปซูลในระดับนาโนเมตรสามารถสังเกตได้จากสารละลายที่มีแคปซูลผสมอยู่จะค่อนข้างใส และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับขึ้นรูปแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน โดยคำนึงถึงขนาดประมาณ 100 นาโนเมตรและการประหยัดพลังงานที่ใช้ จึงเลือกกระบวนการที่มีการ sonication เป็นเวลา 15 นาทีหลังหยदन้ำมันขมิ้นชัน นอกจากนี้น้ำมันขมิ้นชันที่ใช้ควรมีการเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 2% ซึ่งขนาดแคปซูลที่ได้ ประมาณ 80 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.10 และรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.10 ผลของการ sonication ต่อขนาดและค่าศักย์ซีต้าที่ระยะเวลาในการ sonication ต่างๆ



รูปที่ 2.11 ภาพถ่ายลักษณะของนาโนแคปซูลจากกระบวนการที่มีการ sonication เป็นเวลา 15 นาทีหลังหยดน้ำมันขมิ้นชันด้วยเครื่อง AFM

2.2.4. ผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่ออัลจินทในการขึ้นรูปแคปซูล

การทดลองในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่ออัลจินท (โดยน้ำหนัก) ที่มีต่อขนาดของแคปซูลที่พัฒนาขึ้น ตลอดจนศึกษาความเสถียรของแคปซูลเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (25°C) และตู้เย็น (4°C) จากผลการทดลอง พบว่า อัตราส่วนของน้ำมันขมิ้นชันต่ออัลจินท เท่ากับ 1:1 จะได้แคปซูลที่มีขนาดเล็กกว่า อัตราส่วนที่ 1:2 ประมาณ 30% และที่อัตราส่วน 1:4 เกิดเป็นเจลใสซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันขมิ้นชันในอัตราส่วนเป็น 4:1 ทำให้ขนาดของแคปซูลใหญ่ขึ้นเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.6 และเมื่อพิจารณาถึงค่าศักย์ซีต้า พบว่า เมื่อปริมาณของอัลจินทมากขึ้นส่งผลให้ค่าศักย์ซีต้ามีความเป็นลบมากขึ้น ในขณะที่เมื่อปริมาณน้ำมันในส่วนผสมไม่มีผลให้ค่าศักย์ซีต้า

ตารางที่ 2.6 ผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชัน/อัลจินทต่อสมบัติของนาโนแคปซูลที่เตรียมด้วยการ sonication เป็นเวลา 15 นาที หลังหยดน้ำมันขมิ้นชัน

อัตราส่วนระหว่าง น้ำมันขมิ้นชัน/อัลจินท	ขนาดเฉลี่ย (นาโนเมตร)	ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)
1:1	78.0 ± 0.6	-14.3 ± 0.3
1:2	116 ± 14	-24.3 ± 2.7
1:4	เจล	-32.5 ± 3.3
4:1	229 ± 16	-16.4 ± 0.6

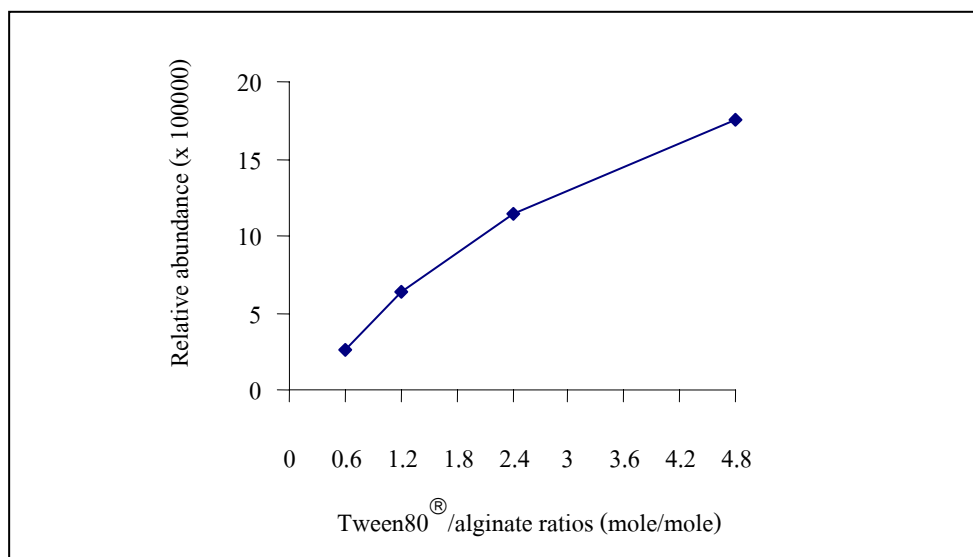
นอกจากนี้ยังพบว่า ขนาดของแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันด้วยอัตรา 1:1 ไม่เปลี่ยนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 45 วัน ในขณะที่ขนาดของแคปซูลใหญ่ขึ้น 14% เมื่อเก็บไว้ที่ 25°C (ตารางที่ 2.7) นอกจากนี้ค่าศักย์ซีต้า เพิ่มขึ้นประมาณ 50% เมื่อเก็บไว้ที่ 4°C และ 25°C เป็นเวลา 45 วัน นอกจากนี้เมื่อเก็บไว้ที่ 25°C ต่อไปจนครบ 90 วัน พบว่าขนาดเพิ่มขึ้นประมาณ 25% และจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิดังกล่าวจนครบ 120 วัน ในทางกลับกัน ขนาดของนาโนแคปซูลลดลงเล็กน้อยเมื่อเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 90 วัน และไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อยืดระยะเวลาการเก็บ จนครบ 120 วัน ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเก็บนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน คือ 4°C

ตารางที่ 2.7 ความเสถียรทางกายภาพ (physical stability) ของนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน

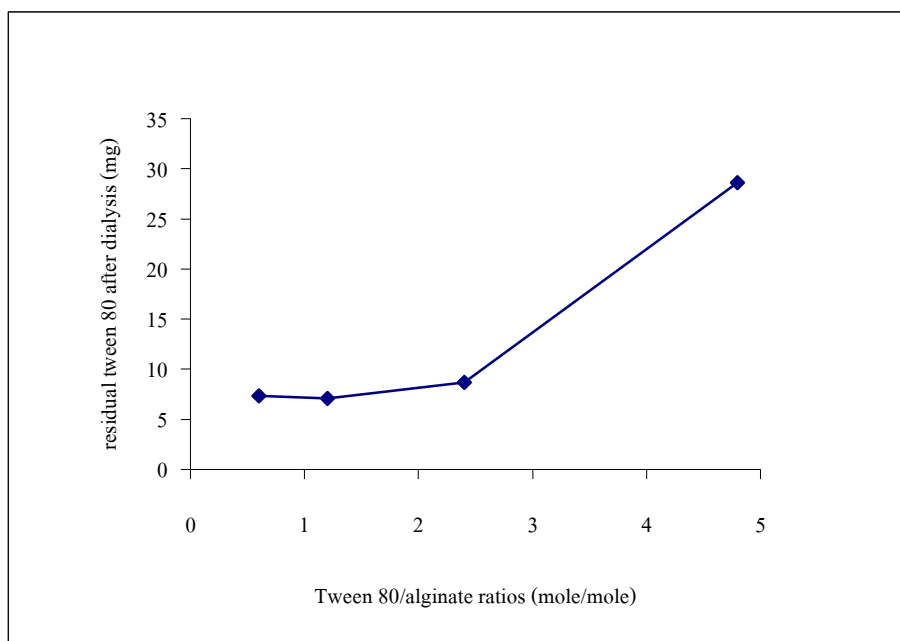
เวลา (วัน)	ขนาดเฉลี่ย (นาโนเมตร)		ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0	78.0 ± 0.6	78.0 ± 0.6	-14.8 ± 1.2	-14.8 ± 1.2
45	75.0 ± 0.6	89.2 ± 1.1	-21.5 ± 3.1	-23.5 ± 2.6
90	66.3 ± 2.5	97.9 ± 0.7	-21.7 ± 3.2	-15.0 ± 2.8
120	66.2 ± 5.4	96.8 ± 0.6	-22.2 ± 1.2	-15.7 ± 1.8

2.2.5. การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างอัลจินตต่อสารลดแรงตึงผิว

ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อขนาดของแคปซูลโดยที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง Tween80[®] ต่ออัลจินต เท่ากับ 0.6:1, 1.2:1, 2.4:1, 4.8:1 ซึ่งการทดลองครั้งนี้ไม่มีการเติมน้ำมันขมิ้นชัน เมื่อทำการเขย่า สารละลายอัลจินตที่มี Tween80[®] ในอัตราส่วนข้างต้นด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และทำการ sonication เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมแคลเซียมคลอไรด์และเขย่าต่ออีก 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืนก่อนบรรจุลงในถุง dialysis ที่มี molecular weight cutoff เท่ากับ 12,000 ดาลตัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำการวัดหาปริมาณ Tween80[®] ส่วนเกินที่ซึมผ่านออกจากถุง dialysis ด้วยเครื่อง Mass spectrophotometer รุ่น QuatroMicro API 2000 จากบริษัท Micro Mass พบว่า เมื่ออัตราส่วนของ Tween80[®] เพิ่มขึ้น ค่า relative abundance ที่วัดได้จากเครื่องก็จะมากขึ้นตามไปด้วย นั่นหมายถึง ปริมาณสารลดแรงตึงผิวมีปริมาณมากเกินไปในการขึ้นรูปแคปซูล โดยส่วนเกินนี้จะซึมผ่านถุง dialysis ดังแสดงในรูปที่ 2.12 และเมื่อพิจารณาจากกราฟระหว่างปริมาณ Tween80[®] ที่ซึมผ่านถุง dialysis และอัตราส่วนระหว่าง Tween80[®] และอัลจินต พบว่า ปริมาณสารลดแรงตึงผิวต่ออัลจินตที่ใช้ในการขึ้นรูปแคปซูลไม่ควรเกิน 2.4:1 (โมล/โมล) หรือ 1% (w/v) ทั้งนี้เนื่องจาก ถ้าใช้สารลดแรงตึงผิวมากกว่านี้ จะทำให้มีสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินมากขึ้น (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.12 ความสัมพันธ์ระหว่าง relative abundance กับอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและอัลจิเนต



รูปที่ 2.13 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินในการผลิตแคปซูลที่ซึมผ่านถุง dialysis ที่มี molecular weight cut-off เท่ากับ 12,000 คาลตัน

2.2.6 ผลการใช้ไคโตซาน

2.2.6.1 ผลของน้ำหนักโมเลกุล

การศึกษาในส่วนนี้ เป็นการ crosslink แคปซูลอัลจิเนต (พอลิเมอร์ประจุลบ) ที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันด้วยไคโตซาน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2 ระดับ คือ 41,000 และ 72,000 คาลตัน โดยคาดหวังว่าไคโตซานจะทำให้

แคปซูลมีความเสถียรมากขึ้น โดยเฉพาะที่อุณหภูมิห้องซึ่งการทดลองได้ใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำมันขมิ้นชันต่ออัลจิเนตต่อไคโตซาน เท่ากับ 1:1:0.1 (โดยน้ำหนัก) จากผลการทดลอง พบว่า การ crosslink ด้วยไคโตซานทำให้แคปซูลมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยเฉพาะไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง อย่างไรก็ตาม น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานไม่มีผลต่อค่าศักย์ซีต้า ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ผลของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานต่อขนาดของแคปซูลและค่าศักย์ซีต้า

ไคโตซาน	ขนาดเฉลี่ย (นาโนเมตร)	ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)
MM-Chitosan	608 ± 58	-21.8 ± 1.6
LM-Chitosan	418 ± 59	-21.7 ± 2.3

2.2.6.2. ผลของลำดับการใช้ไคโตซานในกระบวนการผลิตแคปซูล

จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะให้ขนาดแคปซูลที่เล็กกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง ดังนั้นจึงเลือกใช้ LM-chitosan ในการศึกษาผลของลำดับการใช้ไคโตซานในกระบวนการผลิตต่อขนาดของแคปซูล

เมื่อพิจารณาถึงขนาดของแคปซูล พบว่า การเติมไคโตซานก่อนเคลือบเคลือบเคลือบอะไรก็ได้แคปซูลขนาดเล็กกว่าการเติมไคโตซานหลังเคลือบเคลือบเคลือบอะไรก็ได้ ประมาณ 50% ดังแสดงในตารางที่ 2.9 ซึ่งข้อดีของการใช้ไคโตซานในปริมาณที่เหมาะสมและถูกวิธีทำให้เสถียรภาพของแคปซูลดีขึ้น ซึ่งดูได้จากลักษณะภายนอกที่สังเกตและขนาดของแคปซูลหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C เป็นเวลา 60 วัน พบว่า ขนาดของนาโนแคปซูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (ตารางที่ 2.10 และ 2.11) ในขณะที่กระบวนการที่ไม่เติมไคโตซาน เมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เพียง 45 วัน พบว่า มีขนาดใหญ่ขึ้น ประมาณ 14% ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.9 ผลของลำดับการใช้พอลิเมอร์ต่อขนาด

ลำดับการใช้พอลิเมอร์	ขนาดเฉลี่ย (นาโนเมตร)	ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)
Alginate -> oil -> CaCl ₂ -> chitosan	418 ± 59	-21.7 ± 2.3
Alginate -> oil -> chitosan -> CaCl ₂	190 ± 17	-24.5 ± 1.3

ตารางที่ 2.10 ขนาดของแคปซูลหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4°C

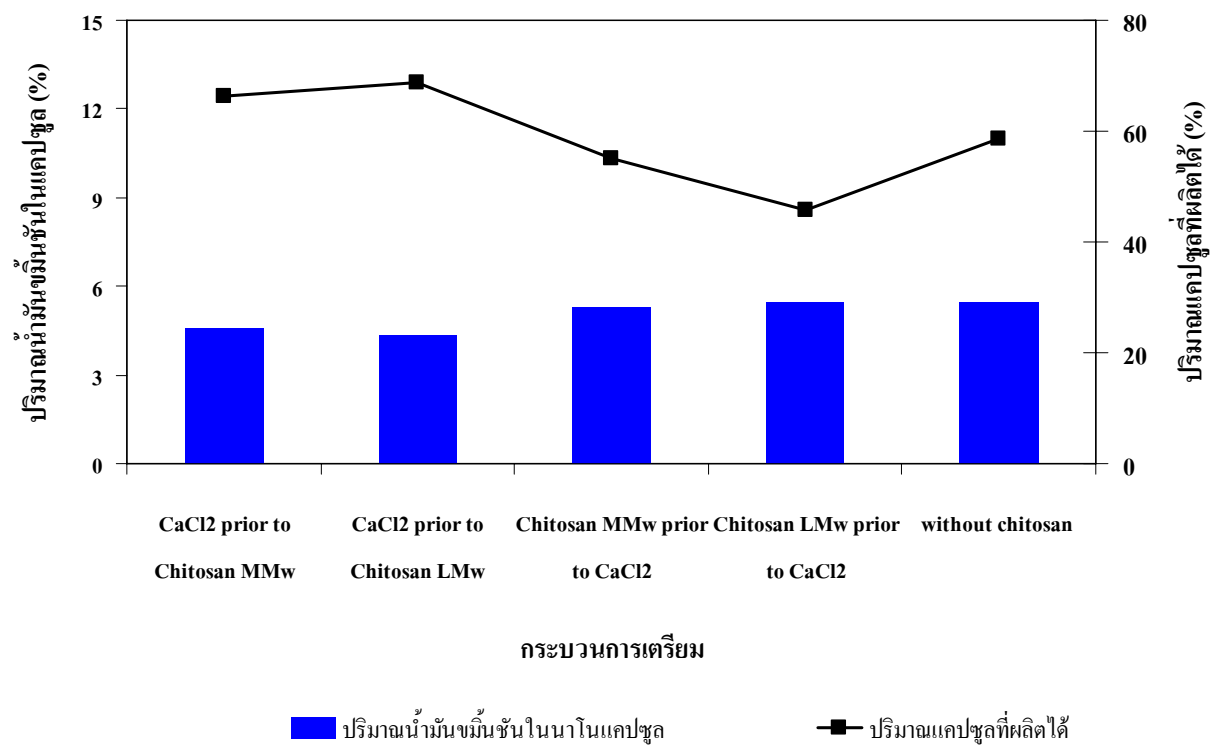
ระยะเวลา (วัน)	ขนาดแคปซูล (นาโนเมตร)		ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)	
	25°C	4°C	25°C	4°C
0	418 ± 59	418 ± 59	-21.7 ± 2.3	-21.7 ± 2.3
60	359 ± 132	438 ± 69	-24.5 ± 1.7	-24.4 ± 2.5

ตารางที่ 2.11 การศึกษาเสถียรภาพของไคโตซาน-อัลจิเนทแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชัน เมื่อเก็บไว้ที่ 25°C และ 4°C

ระยะเวลา (วัน)	อุณหภูมิ (°C)	
	25°C	4°C
0	ขุ่นเล็กน้อยและไม่เกิดเจล	ขุ่นเล็กน้อยและไม่เกิดเจล
60	ขุ่นเล็กน้อยและไม่เกิดเจล	ขุ่นเล็กน้อยและไม่เกิดเจล

2.2.6.3 ปริมาณน้ำมันขมิ้นชันในนาโนแคปซูล (Loading capacity)

จากผลการทดลองพบว่า การเตรียมนาโนแคปซูลจากพอลิเมอร์ธรรมชาติสามารถกักเก็บน้ำมันได้ แต่ปริมาณค่อนข้างต่ำ (รูปที่ 2.14) ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำมันขมิ้นชันเป็นน้ำมันหอมระเหย และความเข้ากันได้ของน้ำมันกับอัลจิเนท และปริมาณน้ำมันขมิ้นชันที่ใช้ค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ Setty และคณะ³⁸ ให้เหตุผลว่า ความสามารถในการกักเก็บสารออกฤทธิ์ของอัลจิเนทที่เกิดจากความพรุนของเจล ซึ่งมีขนาดใหญ่พอที่จะเป็นสาเหตุให้เกิดการรั่วของยาที่บรรจุออกมาจากเม็ดปิด นอกจากนี้การเติมไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ในกระบวนการเตรียมนาโนแคปซูลด้วยลำดับการเติมที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการกักเก็บน้ำมัน ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำมันขมิ้นชันในแคปซูลของทุกวิธีการให้ผลใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 4.5-5.5% นอกจากนี้ยังพบว่าในกระบวนการเตรียมนาโนแคปซูลที่ไม่ใช้ไคโตซานให้ผลใกล้เคียงกับกระบวนการที่มีการใช้ไคโตซาน ซึ่งนั่นหมายถึง การใช้ไคโตซานไม่สามารถช่วยลดการสูญเสียน้ำมันในระหว่างการผลิตเพื่อให้ได้มาซึ่งนาโนแคปซูล อย่างไรก็ตามการเติมไคโตซานในกระบวนการผลิตมีผลต่อปริมาณนาโนแคปซูลที่ผลิตได้ (yield of the product) ยกตัวอย่างเช่น เมื่อเติมไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือ ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง หลังการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ทำให้ได้ปริมาณนาโนแคปซูลมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการที่เติมแคลเซียมคลอไรด์หลังเติมไคโตซาน



รูปที่ 2.14 ผลของลำดับในการเติมไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ต่อปริมาณน้ำมันขมิ้นชันในนาโนแคปซูลและปริมาณแคปซูลที่ได้

บทที่ 3

บทสรุป

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไคโตซานและอัลจิเนทเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สามารถนำมาใช้ในการเตรียมนาโนแคปซูลสำหรับกักเก็บน้ำมันหอมระเหยซึ่งในที่นี้ใช้น้ำมันขมิ้นชันเป็นยาต้นแบบ โดยกระบวนการเตรียมมีอยู่ 3 ขั้นตอน คือ (1) o/w emulsification, (2) gelification และ (3) การละลายเอกตัวทำละลายออก นอกจากนี้ การทำให้ขนาดของนาโนแคปซูลมีความสม่ำเสมอขึ้นจำเป็นต้องมีการใช้เทคนิค sonication ในกระบวนการเตรียมนาโนแคปซูล และที่สำคัญชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมและการใช้สารลดแรงตึงผิวมีอิทธิพลต่อสมบัติทางกายภาพของนาโนแคปซูลทั้งสิ้น นอกจากนี้สมบัติของนาโนแคปซูลที่บรรจุน้ำมันขมิ้นชันยังขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน สำหรับปริมาณน้ำมันที่กักเก็บไว้ในนาโนแคปซูล พบว่า มีปริมาณค่อนข้างต่ำ แต่ผลผลิตของผลิตภัณฑ์นาโนแคปซูลที่ได้แต่ละครั้งขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและลำดับการเติมไคโตซาน อย่างไรก็ตามนาโนแคปซูลที่ผลิตได้มีความเสถียรทางกายภาพเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

- (1) http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=585#_What_Are_Nanocapsules
- (2) [http://www.kittolife.co.kr/eng_html/business/busi_04_pro\(m\)_06.htm](http://www.kittolife.co.kr/eng_html/business/busi_04_pro(m)_06.htm)
- (3) Bouchemal, K., Briancon, S., Perrier, E., Fessi, H., Bonnet, I. and Zydowicz, N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly (ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *Int. J. Pharm.*, 2004; 269: 89-100.
- (4) <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>
- (5) http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/006/Y4765E/y4765e07.htm
- (6) Huguet, M.L. and Dellacherie, E. Calcium alginate beads coated with chitosan: effect of structure encapsulated materials on their release. *Process Biochemistry*, 1996a; 31: 745-751.
- (7) Huguet, M.L., Neufeld, R.J. and Dellacherie, E. Calcium alginate beads coated with polycationic polymers: comparison of chitosan and DEAE-dextran. *Process Biochemistr*, 1996b; 31: 347-353.
- (8) Kumar, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm Pharmaceut Sci.*, 2000; 3(2): 234-258.
- (9) Kungsuwan, A., Ittipong, B., Chandkrachang, S., Kiatkangwalkrai, P., Rao, M.S. and Stevens, W.F. Batch fermentation on shrimp heads. *Proc. 2nd Asia Pacific Symposium, Chitin and Chitosan: Environmental friendly and versatile biomaterials*. Bangkok 1996; 34-40.
- (10) สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2544. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง รวมกุ้งปรุงแต่งของประเทศไทย.
- (11) Technical Insight Inc. Chitin and Chitosan: Specialty biopolymers for foods, medicine and industry. New Jersey 1989.
- (12) Paul, W. and Sharma, C.P. Chitosan, a drug carrier for the 21th century: a review. *S.T.P. Pharma Sci.*, 2000; 10(1): 5-22.
- (13) Tsai, G.J. and Su, W.H. Extrinsic factors on the antibacterial activity of chitosan. *Advan. Chitin Sci.*, Taiwan 1998; 3: 323-327.
- (14) Pan, Y., Montet, D., Rakshit, S.K., Nuchnoi, P., Chandkrachang, S. and Stevens, W.F. Utilization of Partially Deacetylated Chitin and Chitosan as Flocculent and Decolorant in Refining Sugar. *Advan. Chitin Sci.*, Taiwan 1998; 3: 481-488.
- (15) Ida, G., Monica, C., Annalia, A., Bice, C. and Luisa, M. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Carbohydr. Polym.*, 1998; 36: 81-88.
- (16) Yao, K.-D., Peng, T., Yu, J.-J., Xu, M.-X. and Goosen, M.F.A. Microcapsules/ microspheres related to chitosan. *J.M.S.-Rev. Macromol. Chem. Phys.*, 1995; C35: 155-180.
- (17) Yoksan, R., Matsusaki, M., Akashi, M. and Chirachanchai, s. Controlled hydrophobic/hydrophilic chitosan: colloidal phenomena and nanosphere formation. *Colloid and Polymer Science*, 2004; 282: 337-342.

- (18) Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. and Alonso, M.J. Novel hydrophilic chitosan-poly (ethylene oxide) nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1997; 63: 125-132.
- (19) Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E. and Doelker, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm.*, 1996; 143: 133-141.
- (20) Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P. Ammoury, N. and Betina, S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int J. Pharm.*, 1989; 55: R1-R4.
- (21) Apisariyakul, A., Vanittanakom, N. and Buddhasukh, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J. Ethnopharmacology*, 1995; 49: 163-169.
- (22) คู่มือสมุนไพรเพื่อการสาธารณสุขมูลฐานขั้น (2532)
- (23) รายงานผลการศึกษาวิจัย ตลาดพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ
- (24) การรักษาด้วยยาบนหลักฐานวิชาการสำหรับเภสัชกร แนวทางในการพัฒนายาขั้น (2543)
- (25) Jayaprakasha G.K., Jagan Mohan Rao L. and Sakariah K.K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, Desmethoxycurcumin, and bisDesmethoxycurcumin. *J. Agric. Food. Chem.*, 2002; 50(13):3668-72.
- (26) Reddy, A.C.P. and Lokesh, B.R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol. Cell. Biochem.*, 1997; 111: 117-124.
- (27) Srimal, R. C. Turmeric: a brief review of medicinal properties. *Fitoterapia*, 1997; 68: 483-493.
- (28) Limtrakul, P., Lipigornngoson, S., Namwong, O., Apisariyakul, A. and Dunn, F.W. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.*, 1997; 116: 197-203.
- (29) Song, E.K., Cho, H., Kim, J.S., Kim, N.Y., An, N.H., Kim, J.A., Lee, S.H. and Kim, Y.C. Diarylheptanoids with Free Radical Scavenging and Hepatoprotective Activity in vitro from *Curcuma longa*. *Planta Med.*, 2001; 67: 876-877.
- (30) Sharma, R.A., McLelland, H.R., Hill, K.A., Ireson, C.R., Euden, S.A. and Manson, M.M. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral *Curcuma* extract in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 1984-1990.
- (31) Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Janga Mohan Rao, L. and Sakariah K.K. Antibacterial activity of Turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J. Agric. Food Chem.*, 1999; 47(10): 4297-4300.
- (32) Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S., Negi, P.S. and Sakariah, K.K. Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: a byproduct from curcumin production. *Z Naturforsch [C]*, 2002; 57(9-10): 828-835.
- (33) Roth, G. N., Chandra, A., & Nair, M. G. Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *Journal of Natural Products*, (1998); 61(4): 542-545.
- (34) www.fao.org/inpho/compend/text/ch29/ch29.htm
- (35) De, S. and Robinson, D. Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine-alginate nanospheres. *J. Control. Rel.*, 2003; 89: 101-112.

- (36) Peltonen, L., Koistinen, P., Karjalainen, M., Häkkinen, A. and Hirvonen, J. The effect of cosolvents on the formation of nanoparticles from low-molecular-weight poly (l) lactide. *AAPS PharmSciTech.*, 2002; 3(4): article 32.
- (37) Wasikiewicz, J.M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Wach, R.A. and Mitomo, H. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Rad. Phys. Chem.*, 2005; 73: 287-295.
- (38) Setty, C.M., Sahoo, S.S. and Sa, B. Alginate-coated alginate-polyethyleneimine beads for prolonged release of furosemide in simulated intestinal fluid. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2005; 31: 435-446.

Output ที่ได้จากโครงการ

- 1 บทความตีพิมพ์ใน *Carbohydrate Polymers* (accepted for publication on February 19, 2008) ซึ่งมี impact factor เท่ากับ 1.784 (ดูในภาคผนวก 1)
- 2 บทสัมภาษณ์ในหนังสือพิมพ์ The Nation วันที่ 3 ตุลาคม 2549 ซึ่งรวบรวมอยู่ใน Controlled Release Society Newsletter, Vol. 24(1), 2007 (ดูในภาคผนวก 2)
- 3 สัมภาษณ์ในรายการ Morning Talk ช่อง 11 วันที่ 6 พฤศจิกายน 2549 (รายละเอียดใน VCD ที่แนบมานี้)
- 4 การเชื่อมโยงกับอาจารย์และนักวิจัยที่ทำวิจัยทางด้านวัสดุนาโนและระบบนำส่งยา เช่น คณะเภสัชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสร้างความสัมพันธ์อันดีกับผู้เชี่ยวชาญจาก School of Life Sciences and Biotechnology มหาวิทยาลัยเกาหลี ประเทศเกาหลี

ภาคผนวก

Accepted for publication in *Carbohydrate Polymers* on February 19, 2008

Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil

Pranee Lertsutthiwong^{a,*}, Khanittha Noomun^a, Nutthapon Jongaroonngamsang^b,
Pornchai Rojsitthisak^b, Ubonthip Nimmannit^c

^a*Center for Chitin-Chitosan Biomaterials, Metallurgy and Materials Science Research Institute,
Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand*

^b*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,*

^c*Pharmaceutical Technology Program (International), Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand*

Abstract

To encapsulate turmeric oil, a model oily compound, with an alginate biopolymer coating, alginate nanocapsules were prepared in a three-step procedure using emulsification, crosslinking with calcium chloride, and solvent removal. The type of solvent, concentration of turmeric oil, sonication, and oil/alginate mass ratio affected the characteristics of the nanocapsules in terms of average size, zeta potential, morphology, loading capacity, and stability at 4°C and 25°C. Dissolution of turmeric oil in ethanol and presence of Tween 80[®] in the formulation were found to be optimal in the preparation process. An increase in the oil concentration or oil/alginate mass ratio resulted in an increase in the average size of the nanocapsules. To obtain uniform-sized nanocapsules, sonication is required. In addition, alginate nanocapsules show good physical stability in long-term storage at 4°C and data on loss of oil in key steps in the process may facilitate improvement in the procedure to produce an increased loading capacity.

Keywords: Alginate; Nanocapsules; Turmeric oil; Emulsification; Gelification; Sonication

* Corresponding author. Tel.: 662 218 4221; Fax: 662 611 7586.
E-mail address: Pranee.L@chula.ac.th (P. Lertsutthiwong).

Accepted Manuscript

Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil

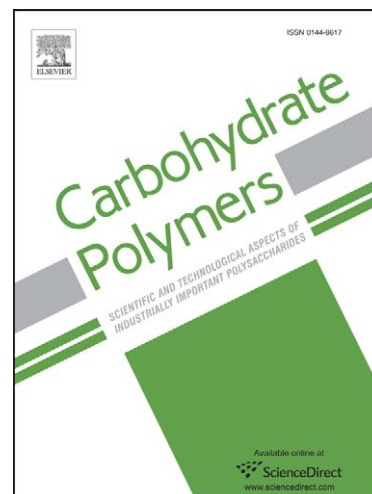
Pranee Lertsutthiwong, Khanittha Noomun, Nutthapon Jongaroonngamsang,
Pornchai Rojsitthisak, Ubonthip Nimmannit

PII: S0144-8617(08)00081-7
DOI: [10.1016/j.carbpol.2008.02.009](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.02.009)
Reference: CARP 3719

To appear in: *Carbohydrate Polymers*

Received Date: 30 October 2007
Revised Date: 11 February 2008
Accepted Date: 19 February 2008

Please cite this article as: Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P., Nimmannit, U., Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil, *Carbohydrate Polymers* (2008), doi: [10.1016/j.carbpol.2008.02.009](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.02.009)



This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil

Pranee Lertsutthiwong^{a,*}, Khanittha Noomun^a, Nutthapon Jongaroonngamsang^b,

Pornchai Rojsitthisak^b, Ubonthip Nimmannit^c

^a*Center for Chitin-Chitosan Biomaterials, Metallurgy and Materials Science Research*

Institute, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

^b*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,*

^c*Pharmaceutical Technology Program (International), Faculty of Pharmaceutical Sciences,*

Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

* Corresponding author. Tel.: 662 218 4221; Fax: 662 611 7586.

E-mail address: Pranee.L@chula.ac.th (P. Lertsutthiwong).

Abstract

To encapsulate turmeric oil, a model oily compound, with an alginate biopolymer coating, alginate nanocapsules were prepared in a three-step procedure using emulsification, crosslinking with calcium chloride, and solvent removal. The type of solvent, concentration of turmeric oil, sonication, and oil/alginate mass ratio affected the characteristics of the nanocapsules in terms of average size, zeta potential, morphology, loading capacity, and stability at 4°C and 25°C. Dissolution of turmeric oil in ethanol and presence of Tween 80 in the formulation were found to be optimal in the preparation process. An increase in the oil concentration or oil/alginate mass ratio resulted in an increase in the average size of the nanocapsules. To obtain uniform-sized nanocapsules, sonication is required. In addition, alginate nanocapsules show good physical stability in long-term storage at 4°C and data on loss of oil in key steps in the process may facilitate improvement in the procedure to produce an increased loading capacity.

Keywords: Alginate; Nanocapsules; Turmeric oil; Emulsification; Gelification; Sonication

1. Introduction

Oily compounds are used widely in pharmaceutical and cosmetic applications (Edris, 2007). Oily drugs are conventionally prepared as emulsions and are preferably administered orally, but may be unacceptable to patients due to their taste (You et al., 2005). In cosmetic applications, poor aqueous solubility and instability of oily compounds cause problems in formulation and product stability (Müller, Petersen, Hommoss & Pardeike, 2007). One approach to overcome these difficulties is to encapsulate oily compounds in capsules, and for a drug delivery system such an approach is more attractive if the size of the capsules is reduced to a nanometer scale (Bouchemal, Briançon, Perrier & Fessi, 2004; Letchford & Burt, 2007; Müller, Mäder & Gohla, 2000; Müller-Goymann, 2004; Pandey, Ahmad, Sharma & Khuller, 2005). Biopolymeric nanocapsules are used in a variety of applications, and particularly in drug delivery systems. These nanocapsules are colloidal-sized, vesicular systems in which the drug is confined to a reservoir or within a cavity surrounded by a polymer membrane or coating (Soppimath, Aminabhavi, Kulkarni & Rudzinski, 2001). Frequently, the vesicle comprises a core of oily liquid surrounded by a single layer of polymer, and the most common method of producing nanocapsules is by interfacial deposition of preformed polymers with subsequent solvent displacement (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury & Benita, 1989). However, some polymers are toxic and immunogenic when injected into the body (De & Robinson, 2003) and some require solvents that cause unwanted effects (Soppimath et al., 2001). To avoid these problems, sodium alginate, which is a naturally occurring biopolymer that is non-toxic and water soluble, was selected for preparation of nanocapsules.

Alginate is an anionic biopolymer produced by marine brown algae, and is of interest as a biopolymer to prepare nanocapsules owing to its good biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, mucoadhesion, gelation and film formation properties (Lapasin & Pricl, 1995;

76 Phillips, Williams & Wedlock, 1990). Alginate consists of linear chains of α L-guluronic acid
 77 (G) and β D-mannuronic acid (M) residues joined by 1,4-glycosidic linkages (Fig. 1)
 78 (Johnson, Craig & Mercer, 1997). Soluble sodium alginate can be crosslinked using calcium
 79 chloride, with formation of insoluble calcium alginate particles on a nanometer scale
 80 depending on the concentrations of sodium alginate and calcium chloride (Rajaonarivony,
 81 Vauthier, Couarraze, Puisieux & Couvreur, 1993). Alginate has been widely studied for
 82 particle formation in the size range of 100 nm to 2 mm for drug delivery (Anal & Stevens,
 83 2005; Babu, Sairam, Hosamani & Aminabhavi, 2007; Martins, Sarmento, Souto & Ferreira,
 84 2007; Liu et al., 2004; Rajaonarivony et al., 1993; Sarmento, Ferreira, Jorgensen & van de
 85 Weert, 2007; Sarmento, Ferreira, Veiga & Ribeiro, 2006; Zhao, Han, Wang, Gao, Peng &
 86 Shen, 2007), but it has not been used for formulation of nanocapsules containing a volatile
 87 oily drug.

88 Turmeric (from the rhizome of *Curcuma longa*) belongs to the family of Zingiberaceae
 89 and is widely used as a food additive, condiment and household medicine in Southern Asia.
 90 Turmeric is composed of curcuminoids, essential oil, sugars, oleoresin and other compounds
 91 (e.g. minerals, vitamins, protein, etc.) (Leung, 1980). The essential oil, turmeric oil, in which
 92 the major constituent is ar-turmerone (2-methyl-6-(4-methylphenyl)-2-hepten-4-one) (Chang,
 93 Jong, Huang, Nien & Chang, 2006; He, Lin, Lian & Lindenmaier, 1998; Raina, Srivastava,
 94 Jain, Ahmad, Syamasundar & Aggarwal, 2002), is used in pharmaceutical applications for its
 95 antifungal (Apisariyakul, Vanittanakom & Buddhasukh, 1995; Gowda, Malathi & Suganthi,
 96 2004), antibacterial (Negi, Jayaprakasha, Rao & Sakariah, 1999), insect repellent (Roth,
 97 Chandra & Nair, 1998), antioxidant, antimutagenic (Jayaprakasha, Jena, Negi & Sakariah,
 98 2002) and anticarcinogenic (Aratanechemuge, Komiya, Moteki, Katsuzaki, Imai & Hibasami,
 99 2002) activities. However, turmeric oil itself is volatile and insoluble in water, and this has
 100 limited development of new formulations. Preparation of nanocapsules containing turmeric

oil may provide a solution to these problems, and therefore the current study was undertaken to examine the influence of solvent, turmeric oil concentration, sonication, and turmeric oil/alginate mass ratio on the size, zeta potential, physical stability and loading capacity in the preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Commercially available turmeric oil containing 21.5% (w/v) of ar-turmerone was provided by Thai-China Flavours and Fragrances Industry Co., Ltd., Ayuthaya, Thailand. Sodium alginate with a molecular weight of 80,000-120,000 Da and a low guluronic acid content ($F_G = 0.39$) was purchased from Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA. A 2% (w/v) aqueous solution of sodium alginate exhibited a viscosity of $2,808 \pm 43$ cps at 25°C. Standard ar-turmerone was purchased from ChromaDex™, Santa Ana, CA, USA. All other chemicals, including Tween 80®, acetic acid, ethanol and calcium chloride, were of analytical grade and acetonitrile was of HPLC grade.

2.2 Preparation of alginate nanocapsules

A sodium alginate solution was prepared by dissolution in ultrapure water at 50°C for 45 min and filtration using glass microfiber filters (GF/C) for removal of any impurity before use. Turmeric oil was diluted with either ethanol or acetone. Alginate nanocapsules were prepared using o/w emulsification, followed by crosslinking using calcium chloride and solvent removal, using modified versions of the methods described by Bouchemal et al. (2004), De and Robinson (2003), and Malone and Appelqvist (2003). Briefly, the sodium alginate o/w emulsion was made by dispersion of diluted turmeric oil into appropriate volumes of 0.6 mg/ml alginate solution containing 1% Tween 80 (w/v) under continuous

mechanical stirring at room temperature. An appropriate volume of 0.67 mg/ml CaCl_2 was then added into the resulting emulsion and stirred for an additional 30 min. The turmeric oil-loaded nanocapsule suspension was equilibrated overnight before removal of the solvent under reduced pressure at 40-45°C for 20 min. Nanocapsules containing turmeric oil were obtained as a dispersion in aqueous solution.

2.3 Variation of parameters in the formulation

Factors affecting the size of nanocapsules were investigated with the turmeric oil to alginate ratio fixed at 1:1. Turmeric oil concentrations of 0.5% to 10% (w/v) in ethanol were used, the effects of using acetone and ethanol solvents were examined, and nanocapsule formation with or without surfactant (Tween 80®) was also investigated. Once the turmeric oil concentration was optimized, the effect of sonication on the size of the nanocapsules was investigated by varying the time of sonication from 0 to 60 min. Sonication was applied either before or after addition of diluted oil with a fixed turmeric oil to alginate ratio (1:1) and a fixed Tween80 content (1% w/v). To study the influence of the turmeric oil to alginate mass ratio on the characteristics of the nanocapsules, formulations were prepared using mass ratios of 1:1, 1:2, 1:4, and 4:1, with a constant Tween 80® content of 1% (w/v). The effect of the preparation process on loading capacity was examined using the turmeric oil to alginate mass ratios of 0.1:1, 0.25:1, 0.5:1 and 1:1. The turmeric oil solutions were prepared from a stock ethanol solution of appropriate concentration.

2.4 Characterization of nanocapsules

The average size and zeta potential of alginate nanocapsules containing turmeric oil was measured using a Zetasizer model Nano-ZS, Malvern Instruments, England. Nanocapsules were visualized using atomic force microscopy (AFM, model multimode SPM, nanoscope 4,

Veeco, USA). Freshly prepared nanocapsules were diluted with distilled water and deposited onto a glass substrate, followed by drying in a desiccator. The morphology of the nanocapsules was obtained using the tapping mode with a silicon cantilever (resonance frequency 280KHz). Nanocapsules were also observed by transmission electron microscopy (TEM, model JSM-2100, Japan). The nanocapsule suspension was deposited onto a Formvar-coated copper grid and stained with a 1% uranyl acetate solution. The physical stability of the turmeric oil-loaded nanocapsules was determined by assessment of average size after storage at 4°C and 25°C over a period of 4 months.

The amount of turmeric oil in the formulated alginate nanocapsules was assayed using HPLC, according to the method of Chang et al. (2006) with modifications. Briefly, the sample was diluted with ethanol and injected onto an Altima C18 column (4.6mm x 150mm i.d., 5µm particle size) at 33°C. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water (65:35, v/v). The injection volume was 20 µl, and elution was isocratic with a flow rate of 1.0 ml/min. Detection was carried out at 254 nm. The total chromatographic analysis time per sample was 25 min with ar-turmerone eluting at a retention time of 11.5 min. The ar-turmerone content in the commercially available turmeric oil was found to be 21.5% (w/v). Turmeric oil loading capacity was calculated from the total amount of turmeric oil in the nanocapsules after ultracentrifugation as a percentage of the total dry mass of nanocapsules.

2.5 Statistical analysis

All experiments were repeated a minimum of three times and measurements were performed in triplicate in each experiment. Results are presented as means $\pm$ S.D. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA using Microsoft Excel (Microsoft Corporation) with $p < 0.05$ considered to indicate statistical significance.

3. Results and Discussion

3.1. Effects of solvent and turmeric oil concentration on formation of nanocapsules

Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil was carried out using a multistep process of o/w emulsification, gelification and solvent removal. Dispersion of diluted turmeric oil in an aqueous alginate solution containing Tween 80® caused immediate formation of micelles with an oil core. The alginate shell was then solidified by crosslinking with calcium chloride, and subsequently the solvent (ethanol or acetone) used to dissolve the turmeric oil was removed from the system by evaporation under pressure.

Previous work (Lertsutthiwong et al., unpublished data) suggested that formation of turmeric oil-loaded nanocapsules using the proposed protocol is unsuccessful if the turmeric oil is not diluted before use, with appearance of droplets of oil on the surface of the aqueous solution being a particular problem. Therefore, turmeric oil was diluted in ethanol or acetone at a concentration of 1% (w/v) before use. Dropwise addition of turmeric oil in acetone into sodium alginate solution containing Tween 80® resulted in immediate turbidity, whereas use of ethanolic turmeric oil gave a less turbid solution. Nanocapsules formed with turmeric oil in acetone were larger than those formed with ethanol as solvent ($p < 0.05$), but the zeta potentials of the capsules did not differ significantly ($p > 0.05$) between the solvents (Table 1). The effect of ethanol and acetone on the average size of the nanocapsules can be explained by the lipophilicity and dielectric constant of the solvents. Acetone is more lipophilic ($\log P = -0.24$) and has a lower dielectric constant ($k = 20.7$) compared to ethanol ($\log P = -0.30$ and $k = 24.3$). Therefore, acetone used to solubilize turmeric oil slowly diffused from the oil droplet into the aqueous phase during nanocapsule formation, causing a large particle size for the nanocapsules. In contrast, ethanol is more miscible with water and diffused from the oil droplet into the aqueous phase much faster than acetone, resulting in smaller nanocapsules.

Turmeric oil in ethanol was able to form oil droplets in alginate solution without surfactant, but the average size of the nanocapsules was larger and zeta potential was more negative than in the presence of surfactant ($p < 0.05$), as shown in Table 1. These results suggest that interactions occurred among the compounds in the system. That is, Tween 80 formed a micelle surrounding the oil droplets and the hydrophilic head of Tween 80 bound with the alginate shell following crosslinking using CaCl_2 . This led to a reduction in charge density on the surface of the alginate nanocapsules, resulting in a less negative zeta potential. In addition, the average size of the nanocapsules in the presence of surfactant was about 60% smaller than those formed without Tween 80. This may be accounted for by a decrease in the interfacial tension and migration of the insoluble polymer towards the o/w interface, where it is deposited to form the nanoparticle membrane (Fessi et al., 1989).

As expected, an increase in the turmeric oil concentration resulted in a significant increase in the average size of the nanocapsules ($p < 0.05$) (Fig. 2), since the droplet contains a higher concentration of turmeric oil and relatively less ethanol. With less ethanol to diffuse out of the droplet during nanocapsule formation, a higher volume of oil is included in the inner phase of the capsules during preparation, and this leads to an increased capsule size (Peltonen, Koistinen, Karjalainen, Häkkinen & Hirvonen, 2002). To get the average size < 300 nm, a turmeric oil concentration of $\leq 2\%$ was required (Fig. 2). However, the zeta potential of the nanocapsules showed no dependence on turmeric oil concentration ($p > 0.05$).

3.2. *Effect of sonication on nanocapsule size homogeneity*

With mechanical stirring only, the nanocapsules showed a wide range of sizes at each concentration of turmeric oil (Fig. 2). This suggests that stirring is insufficient to prepare nanocapsules of uniform size. Landfester, Bechtold, Tiarks and Antonietti (1999) and Pérez-Maqueda, Duran and Pérez-Rodríguez (2005) suggested that sonication was essential for

production of uniform-sized nanocapsules, and that the size of the nanocapsules could be controlled by the time of sonication. Therefore, the current study was carried out by applying sonication for 0, 15, 30 and 60 min either before or after addition of turmeric oil to the sodium alginate solution. The results indicated that the average size of nanocapsules was more uniform than that achieved with mechanical stirring only, regardless of the timing and extent of sonication (Fig. 3). For example, the average size of nanocapsules without sonication was 199 ± 37 nm, whereas a size of 83.6 ± 4.4 nm was achieved with sonication for 15 min after addition of oil. The zeta potential showed little variation with the timing or period of sonication, remaining within a range of -13 to -20 mV for all periods of sonication (Fig. 3).

An increased sonication time either before or after addition of turmeric oil resulted in smaller capsules (Fig. 3), but sonication applied after addition of turmeric oil gave the smallest capsules; for example, sonication for 15 min after adding turmeric oil produced nanocapsules that were about 50% smaller than those formed with sonication before addition of oil. Sonication of the sodium alginate solution before dropwise addition of oil may cause some degradation of the sodium alginate chains in aqueous solution via mechanical force (Wasikiewicz, Yoshii, Nagasawa, Wach, & Mitomo, 2005), and the presence of degraded lower molecular weight polymer could conceivably produce smaller nanocapsules relative to those formed with a higher molecular weight polymer. However, the more important process may be disturbance of oil droplets surrounding the alginate wall via sonication after addition of oil, which might split the capsules into larger numbers of smaller nanocapsules with a uniform size. The morphological surface of the uniform-sized nanocapsules formed using ethanol as a solvent appeared to be round (Fig. 4), as also observed by Peltonen et al. (2002).

The results also indicate that the optimal sonication time depends on the size requirement. For example, the dynamic light scattering data in Fig. 3 show that preparation of

nanocapsules of < 100 nm requires sonication for 15 min after dropwise addition of oil. To confirm the dynamic light scattering data, capsule sizes were determined by AFM and TEM following preparation of nanocapsules under these conditions. The morphology and horizontal width of nanocapsules determined by AFM are shown in Fig. 4(a), and these data indicate a nanocapsule diameter of 83.5 nm. Similarly, the average size of nanocapsules estimated from TEM was about 95 nm (Fig. 4(b)). Therefore, both AFM and TEM give nanocapsule sizes in good agreement with the sizes predicted from light scattering data.

3.3. *Effect of the core-to-wall ratio*

The influence of the oil/alginate (core-to-wall) ratio on the characteristics of nanocapsules containing turmeric oil is shown in Table 2. An oil/alginate mass ratio of 1:1 gave nanocapsules almost 30% smaller than those formed at a ratio of 1:2, and a 1:4 ratio produced an aggregated gel. An increase in the amount of oil to give a 4:1 ratio resulted in a large increase in the size of the capsules ($p < 0.05$). A higher amount of alginate resulted in a more negative zeta potential, whereas the zeta potential did not show a strong dependence on the amount of oil in the preparation (1:1 vs. 4:1 ratios, Table 2). The observation is in agreement with that of Vanichtanunkul, Vayumhasuwan and Nimmannit (1998), and it was concluded that a high core-to-wall ratio resulted in an increased particle size.

3.4. *Physical stability*

The effects of storage temperature (4°C and 25°C) and duration of storage on the physical stability of nanocapsules containing turmeric oil (oil/alginate ratio = 1:1) were evaluated. The size of the capsules was unchanged with storage at 4°C for 45 days, but at 25°C the size increased by about 14% (Table 3). The zeta potential increased by about 50% over 45 days of storage at 4°C and 25°C. Storage for 90 days at 25°C resulted in an increase in size of about

25%, with no further change after storage for 120 days. In contrast, the size of the nanocapsules decreased after storage at 4°C for 90 days and remained at this size after 120 days. The preferred temperature for storage of the nanocapsules was 4°C, since aggregation occurred more quickly at 25°C.

3.5. Loading capacity

The loading capacity of turmeric oil in the alginate nanocapsules increased in proportion to the amount of turmeric oil added in the process (Table 4). A loading capacity of $1.62 \pm 0.15\%$ (based on the dry mass of nanocapsules) was obtained with an oil/alginate ratio of 0.25:1 and the loading capacity reached $3.21 \pm 0.20\%$ and $5.47 \pm 0.21\%$ at oil/alginate ratios of 0.5:1 and 1:1, respectively. However, the loading capacity of turmeric oil in alginate nanocapsules is relatively low under all conditions, because turmeric oil is volatile and easily lost during processing. Teixeira, Alonso, Pinto and Barbosa (2005) have also suggested that a drug with low affinity for the polymer might diffuse from the organic phase to the external aqueous medium during formation of nanoparticles, thus leading to a low drug loading capacity.

The loading capacities of $5.47 \pm 0.21\%$ and $10.4 \pm 0.50\%$ were obtained for processes with and without solvent evaporation, respectively. Without solvent evaporation, about 30% of the turmeric oil was lost during formation of the turmeric oil-loaded nanocapsules (Table 4). Addition of solvent removal to the process caused a total loss of about 42% of the turmeric oil, suggesting that the evaporation process is responsible for loss of 14% of the total oil. About a further 40% of the oil was lost during separation using ultracentrifugation at 45,000 rpm for 1 hour.

299

300 **4. Conclusion**

301 Alginate is an effective biopolymer for encapsulation of a volatile oily drug using a
302 three-step process of o/w emulsification, gelification and solvent removal. Sonication is
303 required for size homogeneity and the choice of solvent for the oil and the presence of a
304 surfactant influence the size of the nanocapsules. Dissolution of turmeric oil in ethanol and
305 inclusion of Tween 80 in the sodium alginate were found to be optimal in the preparation
306 process. Alginate nanocapsules also show good physical stability in long-term storage at 4°C.
307 However, the loading capacity of turmeric oil in the nanocapsules is relatively low. To
308 address this issue, the loss of turmeric oil in key steps in the process was quantified and these
309 data may facilitate improvements in the procedure to produce an increased loading capacity.

310

311 **Acknowledgements**

312 The authors would like to express their gratitude to the Thailand Research Fund, the
313 Commission on Higher Education and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund for
314 providing research funds. We also thank the Center for Chitin-Chitosan Biomaterials,
315 Metallurgy and Materials Science Research Institute, Department of Biochemistry, Faculty of
316 Science, Chulalongkorn University for providing facilities, and Dr. Ian S. Haworth
317 (University of Southern California) for his comments on the manuscript.

References

- Anal, A. K., & Stevens, W.F. (2005). Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 290, 45-54.
- Apisariyakul, A., Vanittanakom, N., & Buddhasukh, D. (1995). Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 49, 163-169.
- Aratanechemuge, Y., Komiya, T., Moteki, H., Katsuzaki, H., Imai, K., & Hibasami, H. (2002). Selective induction of apoptosis by ar-turmerone isolated from turmeric (*Curcuma longa* L) in two human leukemia cell lines, but not in human stomach cancer cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, 9, 481-484.
- Babu, V. R., Sairam, M., Hosamani, K. M., & Aminabhavi, T. M. (2007). Preparation of sodium alginate-methylcellulose blend microspheres for controlled release of nifedipine. *Carbohydrate Polymers*, 69, 241-250.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 280, 241-251.
- Chang, L. H., Jong, T. T., Huang, H. S., Nien, Y. F., & Chang, C. M. J. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn and purification of turmerones. *Separation and Purification Technology*, 47, 119-125.

- De, S., & Robinson, D. (2003). Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-l-lysine-alginate nanospheres. *Journal of Controlled Release*, 89, 101-112.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55, R1-R4.
- Gowda, N. K. S., Malathi, V., & Suganthi, R. U. (2004). Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Animal Feed Science and Technology*, 116, 281-291.
- He, X. G., Lin, L. Z., Lian, L. Z., & Lindenmaier, M. (1998). Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma long*). *Journal of Chromatography A*, 818, 127-132.
- Jayaprakasha, G. K., Jena, B. S., Negi, P. S., & Sakariah, K. K. (2002). Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: a byproduct from curcumin production. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 828-835.

- 366 Johnson, F. A., Craig, D. Q. M., & Mercer, A. D. (1997). Characterization of the block
367 structure and molecular weight of sodium alginates. *Journal of Pharmacy and*
368 *Pharmacology*, 49, 639-643.
- 369
- 370 Landfester, K., Bechtold, N., Tiarks, F., & Antonietti, M. (1999). Formulation and stability
371 mechanisms of polymerizable miniemulsions. *Macromolecules*, 32, 5222-5228.
- 372
- 373 Lapasin, R., & Pricl, S. (1995). Pharmaceutical and medical applications. *Rheology of*
374 *industrial polysaccharides: Theory and applications* (pp. 138). UK: Blackie Academic and
375 Professional.
- 376
- 377 Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic
378 block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and
379 polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 259-269.
- 380
- 381 Leung, A. Y. (1980). Encyclopedia of common natural ingredients used in foods. *Drugs and*
382 *Cosmetics* (pp. 313). New York: John Wiley & Sons.
- 383
- 384 Liu, X., Xue, W., Liu, Q., Yu, W., Fu, Y., Xiong, X., Ma, X., & Yuan, Q. (2004). Swelling
385 behaviour of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal
386 gelation technology. *Carbohydrate Polymers*, 56, 459-464.
- 387
- 388 Malone, M. E., & Appelqvist, I. A. M. (2003). Gelled emulsion particles for the controlled
389 release of lipophilic volatiles during eating. *Journal of Controlled Release*, 90, 227-241.
- 390

- 391 Martins, S., Sarmiento, B., Souto, E. B., & Ferreira, D. C. (2007). Insulin-loaded alginate
392 microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical
393 properties and release profile. *Carbohydrate Polymers*, 69, 725-731.
- 394
- 395 Müller-Goymann, C. C. (2004). Physicochemical characterization of colloidal drug delivery
396 systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical
397 administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 343-356.
- 398
- 399 Müller, R. H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled
400 drug delivery- a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and*
401 *Biopharmaceutics*, 50, 161-177.
- 402
- 403 Müller, R. H., Petersen, R. D., Hommoss, A., & Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid
404 carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 522-530.
- 405
- 406 Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., Rao, L. J. M., & Sakariah, K. K. (1999). Antibacterial
407 activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *Journal of Agricultural and*
408 *Food Chemistry*, 47, 4297-4300.
- 409
- 410 Pandey, R., Ahmad, Z., Sharma, S., & Khuller, G. K. (2005). Nano-encapsulation of azole
411 antifungals: potential applications to improve oral drug delivery. *Internal Journal of*
412 *Pharmaceutics*, 301, 268-276.
- 413

- 414 Peltonen, L., Koistinen, P., Karjalainen, M. Häkkinen, A., & Hirvonen, J. (2002). The effect
415 of cosolvents on the formation of nanoparticles from low-molecular-weight poly (l) lactide.
416 *AAPS PharmSciTech.*, 3(4), article 32.
- 417
- 418 Pérez-Maqueda, L. A., Duran, A., & Pérez-Rodríguez, J. L. (2005). Preparation of submicron
419 talc particles by sonication. *Applied Clay Science*, 28, 245-255.
- 420
- 421 Phillips, G. O., Williams, P. A., & Wedlock, D. J. (1990). Applications of alginates. *Gums*
422 *and stabilizers for the food industry* 5 (pp. 553). New York: IRL Press at Oxford University
423 Press.
- 424
- 425 Raina, V. K., Srivastava, S. K., Jain, N., Ahmad, A., Syamasundar, K. V., & Aggarwal, K. K.
426 (2002). Essential oil composition of *Curcuma longa* L. cv. Roma from the plains of northern
427 India. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 99-102.
- 428
- 429 Rajaonarivony, M., Vauthier, C., Couarraze, G., Puisieux, F., & Couvreur, P. (1993).
430 Development of a new drug carrier made from alginate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*,
431 82(9), 912-917.
- 432
- 433 Roth, G. N., Chandra, A., & Nair, M. G. (1998). Novel bioactivities of *Curcuma longa*
434 constituents. *Journal of Natural Products*, 61(4), 542-545.
- 435
- 436 Sarmento, B., Ferreira, D., Veiga, F., & Ribeiro, A. (2006). Characterization of insulin-
437 loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR
438 studies. *Carbohydrate Polymers*, 66, 1-7.

- 439 Sarmento, B., Ferreira, D. C., Jorgensen, L., & van de Weert, M. (2007). Probing insulin's
440 secondary structure after entrapment into alginate/chitosan antiparticles. *European Journal of*
441 *Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 10-17.
- 442
- 443 Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001).
444 Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled*
445 *Release*, 70, 1-20.
- 446
- 447 Teixeira, M., Alonso, M. J., Pinto, M. M. M., & Barbosa, C. M. (2005). Development and
448 characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-
449 methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59, 491-500.
- 450
- 451 Vanichtanunkul, D., Vayumhasuwan, P., & Nimmannit, U. (1998). The effect of core-to-wall
452 ratio and span 80 concentration on the properties of ascorbic acid microcapsules. *Journal of*
453 *Microencapsulation*, 15(6), 753-759.
- 454
- 455 Wasikiewicz, J. M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Wach, R. A., & Mitomo, H. (2005).
456 Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and
457 ultraviolet methods. *Radiation Physics and Chemistry*, 73, 287-295.
- 458
- 459 You, J., Cui, Fu-de, Li, Qing-po, Han, X., Yu, Ying-wei, & Yang, Ming-shi. (2005). A novel
460 formulation design about water-insoluble oily drug: preparation of zedoary turmeric oil
461 microspheres with self-emulsifying ability and evaluation in rabbits. *International Journal of*
462 *Pharmaceutics*, 288, 315-323.
- 463

464 Zhao, Q., Han, B., Wang, Z., Gao, C., Peng, C., & Shen, J. (2007). Hollow chitosan-alginate
465 multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in
466 vivo studies. *Nanomedicine*, 3, 63-74.

Vitae

Pranee Lertsutthiwong is a researcher at the Metallurgy and Materials Science Research Institute (MMRI), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. She has been the Vice Center-Head of the Center for Chitin-Chitosan Biomaterials (CCB), Chulalongkorn University since 2005.

Khanittha Noomun is a research assistant at CCB, Bangkok, Thailand.

Nutthapon Jongaroonngamsang is a Masters Student in the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Pornchai Rojsitthisak is an Assistant Professor in the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Ubonthip Nimmannit is an Associate Professor in the Pharmaceutical Technology Program (International), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

490

491 **Figure captions**

492 Figure 1. Molecular structure of alginate.

493 Figure 2. Effect of turmeric oil concentration on average size and zeta potential of alginate
494 nanocapsules produced using mechanical stirring.495 Figure 3. Effect of sonication before and after addition of turmeric oil on average size and
496 zeta potential of alginate nanocapsules.497 Figure 4. Morphology and size of turmeric oil-loaded alginate nanocapsules prepared with 15
498 min of sonication after dropwise addition of turmeric oil in ethanol at a concentration of 2%
499 (oil/alginate ratio of 1:1). (a) AFM characterization of nanocapsules indicating a diameter of
500 83.5 nm. (b) TEM characterization of nanocapsules, indicating an average size of about 95
501 nm.

502

503

504

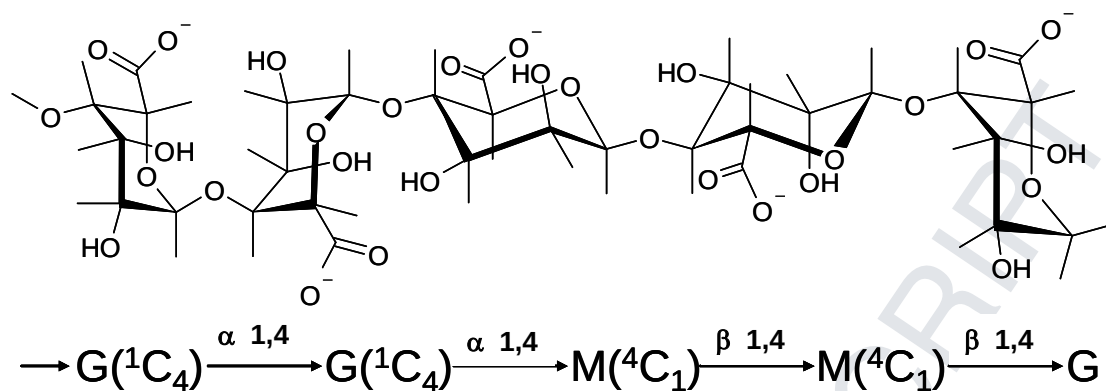
Figure 1

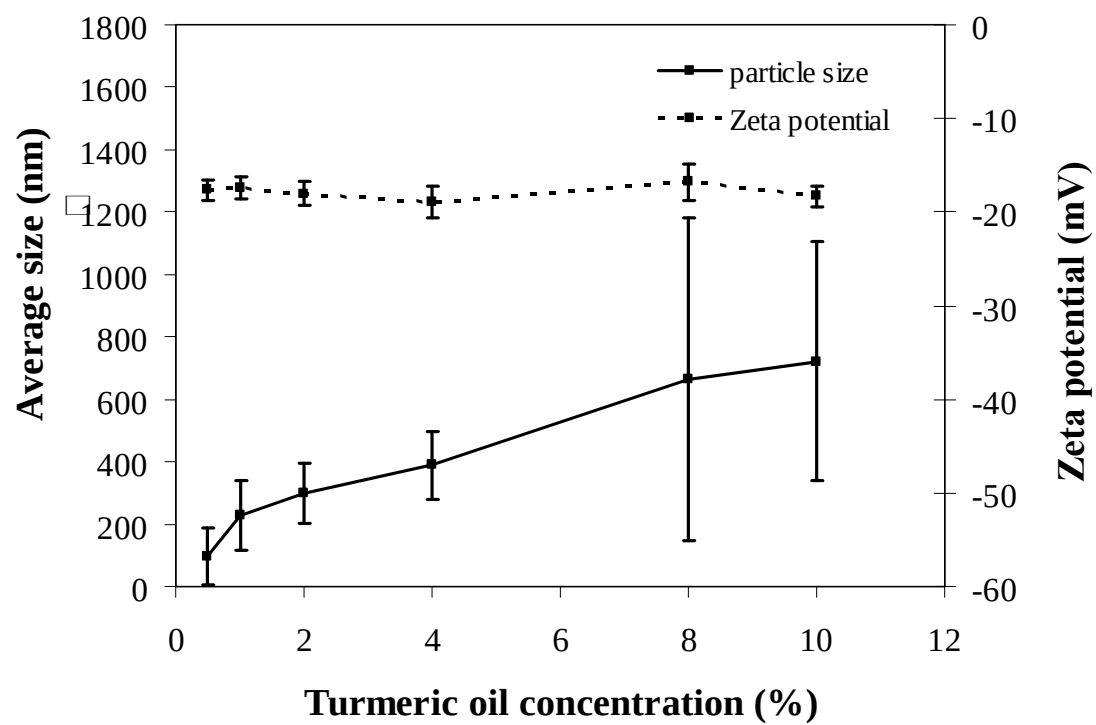
Figure 2

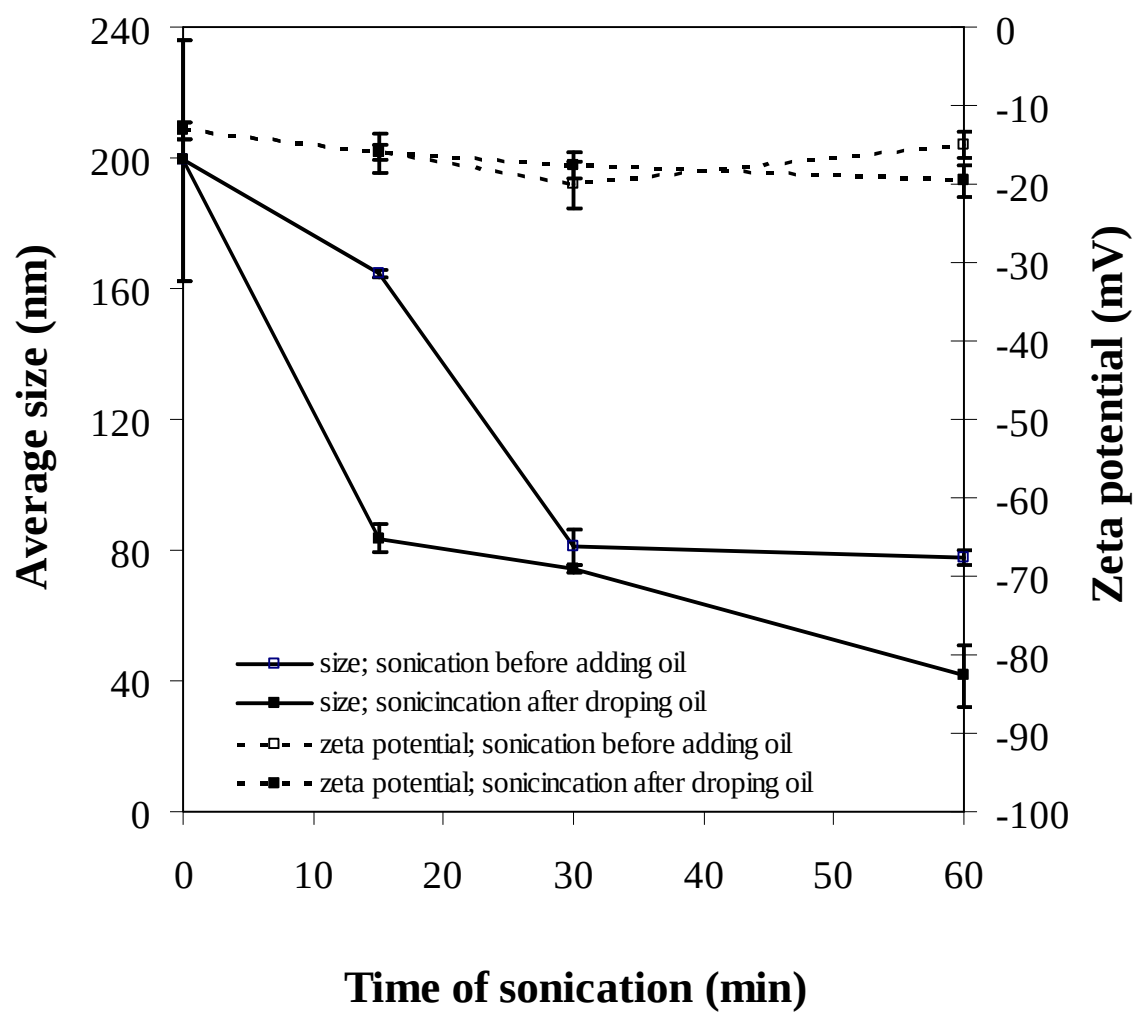
Figure 3

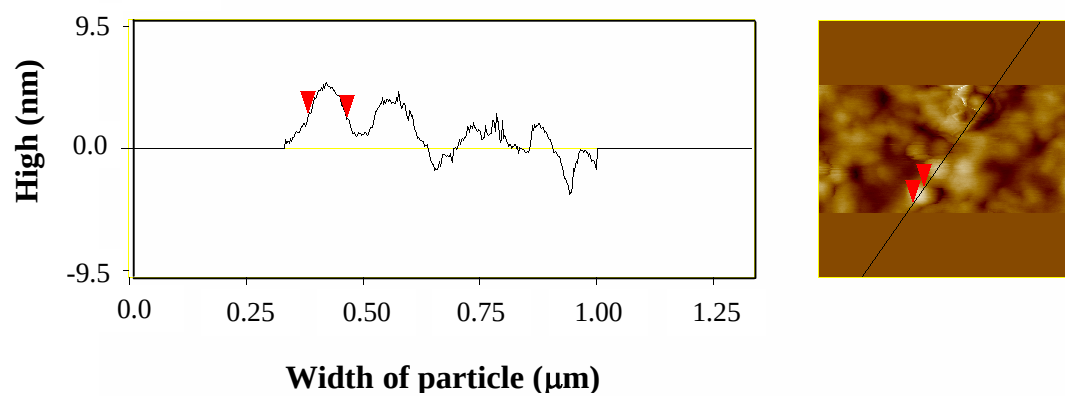
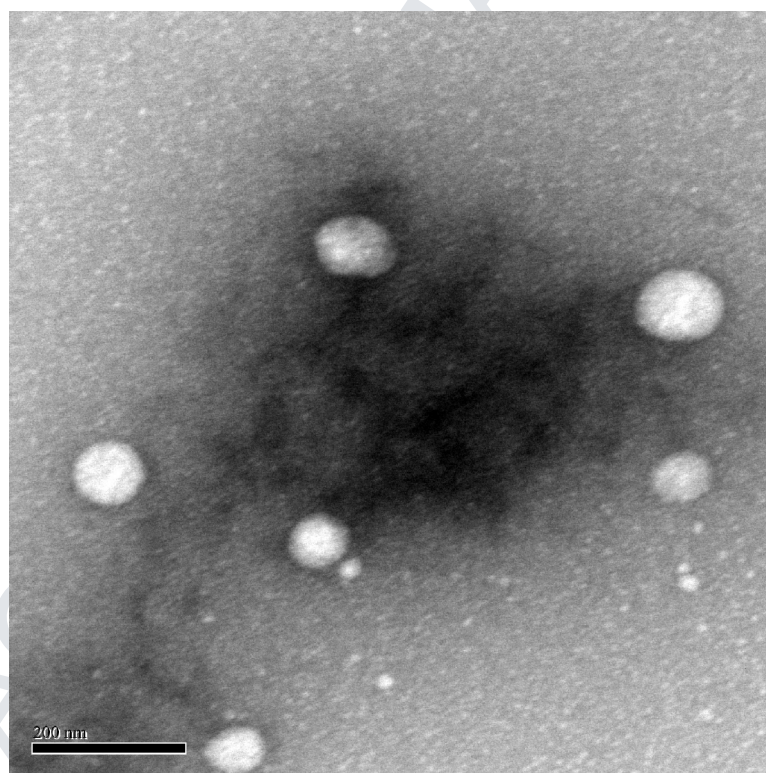
Figure 4**(a)****(b)**

Table 1. Effects of solvent and surfactant on average size and zeta potential of alginate nanocapsules containing turmeric oil (oil/alginate ratio of 1:1).

Solvent	Surfactant (Tween 80 [®])	Average size (nm)	Zeta potential (mV)
Acetone	yes	373 ± 100	-17.3 ± 2.2
Ethanol	yes	263 ± 68	-17.4 ± 1.2
Ethanol	no	677 ± 336	-41.2 ± 0.5

Table 2. Effect of turmeric oil/alginate ratio on average size and zeta potential in formulations prepared with sonication for 15 min after addition of turmeric oil.

Oil/alginate mass ratios	Average size (nm)	Zeta potential (mV)
1:1	78.0 ± 0.6	-14.3 ± 0.3
1:2	116 ± 14	-24.3 ± 2.7
1:4	gel aggregate	-32.5 ± 3.3
4:1	234 ± 21	-16.4 ± 0.6

Table 3. Physical stability of turmeric oil-loaded alginate nanocapsules with a turmeric oil/alginate ratio of 1:1

Time (days)	Average size		Zeta potential	
	(nm)		(mV)	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0	78.0 ± 0.6	78.0 ± 0.6	-14.8 ± 1.2	-14.8 ± 1.2
45	75.0 ± 0.6	89.2 ± 1.1	-21.5 ± 3.1	-23.5 ± 2.6
90	66.3 ± 2.5	97.9 ± 0.7	-21.7 ± 3.2	-15.0 ± 2.8
120	66.2 ± 5.4	96.8 ± 0.6	-22.3 ± 1.2	-15.7 ± 1.8

Table 4. Effect of the preparation process on the amount of turmeric oil in the system.

Oil/alginate ratio	Solvent evaporation	Amount of turmeric oil (mg)				Loading capacity (%)
		Total added	In suspension	In supernatant	In nanocapsules	
0.1:1	Yes	1.20	0.74	0.48	0.05	0.78 ± 0.01
0.25:1	Yes	2.91	1.80	1.23	0.12	1.62 ± 0.15
0.5:1	Yes	5.79	3.61	2.36	0.25	3.21 ± 0.20
1:1	Yes	11.66	6.55	3.45	0.39	5.47 ± 0.21
1:1	No	11.75	8.26	4.06	0.64	10.38 ± 0.50