



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

ผลขององค์ประกอบกรดน้ำดีต่อคุณลักษณะของลิโปโซมที่บรรจุเคอร์คิวมิน

Effect of bile acid composition on the characteristics of curcumin-loaded
liposomes

โดย

- | | | |
|--------------------|-----------|---------------|
| 1. นสภ. จุติกาญจน์ | อัมทรัพย์ | รหัส 56210007 |
| 2. นสภ. พระพงษ์ | ลัมศิริ | รหัส 56210093 |
| 3. นสภ. วิลาสินี | จันทบุตร | รหัส 56210098 |
| 4. นสภ. ทรรศวรณ | ม่วงคำ | รหัส 56210120 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2560

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

ผลขององค์ประกอบกรดน้ำดีต่อคุณลักษณะของลิโพโซมที่บรรจุเคอร์คิวมิน

Effect of bile acid composition on the characteristics of curcumin-loaded liposomes

โดย

- | | | |
|--------------------|-----------|---------------|
| 1. นสภ. จุติกาญจน์ | อัมทรัพย์ | รหัส 56210007 |
| 2. นสภ. พระพงษ์ | ลัมศิริ | รหัส 56210093 |
| 3. นสภ. วิลาสินี | จันทบุตร | รหัส 56210098 |
| 4. นสภ. ทรรศวรณ | ม่วงคำ | รหัส 56210120 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2560

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์เล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต รายวิชาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 (791591) ประจำปีการศึกษา 2560 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในหัวข้อเรื่อง ผลขององค์ประกอบกรดน้ำดีต่อคุณลักษณะของลิโปโซมที่บรรจุเคอร์คิวมิน (Effect of bile acid composition on the characteristics of curcumin-loaded liposomes) จัดทำขึ้นเพื่อเพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบของ Cholic acid, Deoxycholic acid, Sodium deoxycholate และ Phosphatidylcholine และเพื่อศึกษาผลขององค์ประกอบกรดน้ำดีต่อคุณสมบัติของ liposome รวมถึงประสิทธิภาพในการนำส่งยา โดยโครงการวิจัยจะหาสูตรตำรับที่มีความเหมาะสมในการนำส่งยา

คณะผู้วิจัยหวังว่าโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ หรือแนวทางในการศึกษาต่อในผู้ที่สนใจเกี่ยวกับระบบนำส่งยาในรูปแบบลิโปโซม อย่างไรก็ตามงานวิจัยฉบับนี้เป็นเพียงแค่การศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากมีข้อผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

29 พฤศจิกายน 2560

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2559

เรื่อง ผลขององค์ประกอบกรดน้ำดีต่อคุณสมบัติของลิโพโซมที่บรรจุเคอร์คิวมิน

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|--------------------|-----------|---------------|
| 1. นสภ. จุติกาญจน์ | อัมรินทร์ | รหัส 56210007 |
| 2. นสภ. พีระพงษ์ | ลิ้มศิริ | รหัส 56210093 |
| 3. นสภ. วิลาลิณี | จันทบุตร | รหัส 56210098 |
| 3. นสภ. ทรรศวรณ | ม่วงคำ | รหัส 56210120 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|--------------------|-----------|
| 1. ภก. อ. วชิรพงษ์ | แจ่มสว่าง |
| 2. อ. ภิรดา | บุญเนื่อง |
| 3. ภญ. อ. พุทธิพร | คงแก้ว |

บทคัดย่อ

เคอร์คิวมิน (Curcumin) เป็นสาร ที่สกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชัน (Turmeric) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ Curcuma longa ในปัจจุบันมีการนำ Curcumin มาใช้ในทาง การแพทย์อย่างหลากหลาย อย่างไรก็ตาม เคอร์คิวมินมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ (ประมาณ 0.0004 mg/ml) และ Bioavailability ต่ำ จึงทำให้ตัวยาถูกดูดซึมได้น้อย จากปัญหาด้านการละลายและการดูดซึมที่ไม่ดีของ curcumin จึงมีการพัฒนาระบบนำส่งเพื่อเพิ่มค่าการละลายให้ curcumin ซึ่งลิโพโซม (liposome) เป็นหนึ่งในระบบที่ได้รับความสนใจในการนำมาพัฒนาระบบนำส่งยา และมีการศึกษาพบว่าการใช้กรดน้ำดี (bile acid) ในระบบนำส่งจะเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมยาผ่านทางลำไส้ได้มากขึ้น โดยในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบของ Cholic acid, Deoxycholic acid, Sodium deoxycholate และ Phosphatidylcholine และศึกษาผลขององค์ประกอบกรดน้ำดีต่อคุณสมบัติของ liposome รวมถึงประสิทธิภาพในการนำส่งยา ซึ่งการศึกษานี้จะใช้ bile acid 3 ตัว ได้แก่ Cholic acid (CA), Deoxycholic acid (DCA) และ Sodium deoxycholate (NaDCA) ร่วมกับ Phosphatidylcholine ในอัตราส่วนต่างๆ ในการสร้าง liposome เพื่อนำส่งยา curcumin และประเมินคุณสมบัติของ liposome ในทางกายภาพ (physical properties) ได้แก่ ขนาดอนุภาค ประจุพื้นผิวอนุภาค (zeta potential) การวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (% entrapment efficiency) ผลการศึกษาพบว่าสูตรตำรับ liposome ที่เหมาะสมที่สุดคือสูตร PC : NaDCA : Cur (1:8:5) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ nm ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าสูตรอื่นๆ และ zeta potential เฉลี่ยเท่ากับ mV โดยแสดงถึงอนุภาคมีความเสถียรไม่เกาะกลุ่มกัน อีกทั้งยังสามารถกักเก็บตัวยา curcumin ได้ % แต่ไม่ได้แตกต่างจากสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยการกักเก็บตัวยา curcumin ภายใน liposome อาศัยกลไกคือยา curcumin จับกับโครงสร้างส่วน phosphatidylcholine แต่จากการศึกษานี้ทำการศึกษาเพียงลักษณะด้านสมบัติทางกายภาพ ดังนั้นในอนาคตควรทำการศึกษาในด้านอื่นเพิ่มเติม เช่น สมบัติทางเคมี (chemical stability) หรือ สมบัติทางชีววิทยา (biological properties) เพื่อพัฒนาสูตรให้เหมาะสมต่อไป

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2017

: Effect of bile acid composition on the characteristics of curcumin-loaded liposomes

By

- | | | |
|--------------------|----------|-------------|
| 1. Miss. Jutikan | Imsub | ID 56210007 |
| 2. Mr. Peerapong | Limsiri | ID 56210063 |
| 3. Miss. Wilasinee | Juntabut | ID 56210068 |
| 4. Miss. Tatsawan | Muangkam | ID 56210120 |

Advisor

- | | |
|---------------------|-------------|
| 1. Mr. Watcharapong | Chaemsawang |
| 2. Miss. Peerada | Boonpuan |
| 3. Miss. Putthiporn | Khongkeaw |

ABSTRACT

Curcumin is a substance extracted from the rhizomes of turmeric. The scientific name is *Curcuma longa*. Curcumin is currently used in a wide range of medical applications. However, curcumin has low water solubility (about 0.0004 mg / ml) and low bioavailability. The drug is absorbed less. Due to the poor solubility and absorption of curcumin, it has developed a delivery system to increase the solubility of curcumin. The liposome is one of the systems that have been interested in developing lead systems. Drug delivery Studies have shown that the use of bile acids in the delivery system increases the effectiveness of intestinal absorption. In this study, To develop a liposome delivery system containing Cholic acid, Deoxycholic acid, Sodium deoxycholate and Phosphatidylcholine. The effect of bile acid composition on liposome properties as well as its efficacy this study uses 3 bile acids: Cholic acid (CA), Deoxycholic acid (DCA), and Sodium deoxycholate (NaDCA) with Phosphatidylcholine. The ratio of liposome to curcumin and evaluation of liposome properties in physical properties such as particle size, zeta potential, % entrapment efficiency. The most suitable liposome formulation was PC: NaDCA: Cur (1: 8: 5) with an average particle size of nm, which was smaller than the other formulas and the average zeta potential was mV. This shows that the particles are stable and not clustered together. Curcumin retention was statistically not significant ($P < 0.05$). Curcumin retention within the liposome was based on the mechanism of curcumin binds phosphatidylcholine. However, this study only investigated the physical properties. Future studies should be conducted in other areas, such as chemical stability or biological properties, to further develop the formula.

Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย ในหัวข้อเรื่อง ผลขององค์ประกอบกรดน้ำดีต่อคุณลักษณะของลิโพโซมที่บรรจุเคอร์คิวมิน (Effect of bile acid composition on the characteristics of curcumin-loaded liposomes) ในครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยการได้รับความอนุเคราะห์ทุนสนับสนุนการวิจัยจาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีการศึกษา 2560 คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณ คณะกรรมการพิจารณาทุนวิจัยที่เห็นถึงประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ภก. อ. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย และสละเวลาอันมีค่าในการดูแลช่วยเหลือ แก้ปัญหาในเรื่องต่างๆที่เกิดขึ้นเป็นอย่างดี ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ อ.กวีดา บุญเฟื่อน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อ.ภญ.พุทธิพร คงแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ช่วยให้คำแนะนำในการทำวิจัย ให้ข้อมูลเพิ่มเติม ตลอดจนให้การช่วยเหลือ ช่วยแก้ปัญหาต่างๆ

ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่เอื้ออำนวยสถานที่ และเอื้ออำนวยเครื่องมือ และอุปกรณ์ในการวิเคราะห์ดำเนินงานวิจัยจนโครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

29 พฤศจิกายน 2560

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	๗
บทคัดย่อ	๘
กิตติกรรมประกาศ	๑๑
สารบัญ	๑๓
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	41
เอกสารอ้างอิง	42

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome	24
ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดที่อัตราส่วน 1:4, 1:8 และ 1:16	26
ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดและมีการบรรจุด้วยยา curcumin ที่อัตราส่วน 1:4, 1:8 และ 1:16	31
ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency)	38

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดของงานวิจัย	3
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้าง Curcumin	4
รูปที่ 3 แสดงการแบ่งประเภท liposome ตาม structure parameter	6
รูปที่ 4 แสดงการแบ่งประเภท liposome ตามวิธีการเตรียม	7
รูปที่ 5 แสดงการแบ่งประเภท liposome ตามส่วนประกอบและการนำไปประยุกต์ใช้	7
รูปที่ 6 แสดงวิธีการเตรียม liposome ด้วยวิธี thin-film hydration	9
รูปที่ 7 แสดงความคงตัวของ free DXR, micelles DXR และ liposome DXR	10
รูปที่ 8 แสดงประสิทธิภาพของ Calcitonin PLNs และ Calcitonin solution	11
รูปที่ 9 แสดงลักษณะโครงสร้างของฟอสฟาติดีลโคลีน (Phosphatidylcholine)	12
รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของ Cholic acid	14
รูปที่ 11 แสดงโครงสร้างของ Deoxycholic acid	14
รูปที่ 12 แสดงโครงสร้างของ Sodium deoxycholate	15
รูปที่ 13 แสดงความเข้มข้นของ compound 1 และ compound 5 ในเลือดของหนู	16
รูปที่ 14 แสดงความเข้มข้นของ PLGA และ PLGA + Deox ใน serum	17
รูปที่ 15 แสดงค่า half-life ($t_{1/2}$), C_{max} , T_{max} และ AUC_{0-72} ของ Commercial capsules กับ Liposome	18
รูปที่ 16 แสดง zeta potential และขนาดอนุภาคของ Phosphatidylcholine ความเข้มข้นต่างกัน	25

รูปที่ 17 แสดง zeta potential ของ Liposome Cholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน	27
รูปที่ 18 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Cholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน	27
รูปที่ 19 แสดง zeta potential ของ Liposome Deoxycholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน	28
รูปที่ 20 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Deoxycholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน	28
รูปที่ 21 แสดง zeta potential ของ Liposome Sodium deoxycholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน	29
รูปที่ 22 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Sodium deoxycholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน	29
รูปที่ 23 แสดงการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดที่สัดส่วนแตกต่างกัน	30
รูปที่ 24 แสดง zeta potential ของ Liposome Cholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน	32
รูปที่ 25 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Cholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน	32
รูปที่ 26 แสดง zeta potential ของ Liposome Deoxycholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน	33
รูปที่ 27 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Deoxycholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน	33
รูปที่ 28 แสดง zeta potential ของ Liposome Sodium deoxycholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน	34
รูปที่ 29 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Sodium deoxycholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน	34

รูปที่ 30 แสดงการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดที่สัดส่วนแตกต่างกันซึ่งบรรจุ Curcumin	35
รูปที่ 31 แสดงลักษณะทางกายภาพของ phosphatidylcholine (PC) ต่อกรดน้ำดี 3 ชนิดที่ สัดส่วนแตกต่างกันซึ่งบรรจุ Curcumin	35
รูปที่ 32 แสดง standard curve ของยา curcumin	37
รูปที่ 33 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency) ในสูตร PC : CA : Cur ในอัตราส่วนต่างๆ	38
รูปที่ 34 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency) ในสูตร PC : DCA : Cur ในอัตราส่วนต่างๆ	39
รูปที่ 35 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency) ในสูตร PC : NaDCA : Cur ในอัตราส่วนต่างๆ	39

บทที่ 1

บทนำ

เคอร์คูมิน (Curcumin) เป็นสารประกอบธรรมชาติ diphenolic ที่สกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชัน (Turmeric) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma longa* ในปัจจุบันมีการนำ Curcumin มาใช้ในทางการแพทย์อย่างหลากหลาย เช่น การรักษาโรคมะเร็งในมนุษย์ โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) โดยการควบคุมโมเลกุลของเซลล์ signal transductions หลายตัว ซึ่งผลของการปรับสัญญาณของเซลล์ signaling pathways ทำให้ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้⁽¹⁾ แต่เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของ curcumin เป็น Lipophilic จึงมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ (ประมาณ 0.0004 mg/ml) และตัวยากถูกดูดซึมได้น้อยส่งผลให้มีค่าชีวประสิทธิผล (Bioavailability) ต่ำ⁽²⁾ และให้ประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควรได้รับ

จากปัญหาด้านการละลายและการดูดซึมที่ไม่ดีของ curcumin จึงมีการพัฒนาระบบนำส่งเพื่อเพิ่มค่าการละลายให้ curcumin ซึ่งลิโพโซม (liposome) เป็นหนึ่งในระบบนำส่งที่น่าสนใจ ทำให้คณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ซึ่งเป็นระบบนำส่งยาแบบ nanovesicle ที่มีขนาดอนุภาคขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน (submicron) มีโครงสร้างหลักเป็น phospholipid ที่มีคุณสมบัติเป็น amphiphatic คือมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในโมเลกุล โดยจะเรียงตัวซ้อนกันเป็นผนังสองชั้น (lipid bilayer) ซึ่งระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome มีข้อดีหลายอย่าง เช่น สามารถออกแบบให้จำเพาะต่อการนำส่งยาสู่เซลล์เป้าหมาย เพิ่มประสิทธิภาพและความคงตัว ปรับปรุงเภสัชจลนศาสตร์ (ปรับปรุงความสามารถด้านการละลายและการดูดซึมของตัวยา) และยังสามารถลดอาการข้างเคียงจากการใช้ยา⁽³⁾ จากการศึกษาของ Gert Fricker และคณะ พบว่าระบบนำส่งยา

ในรูปแบบ liposome สามารถเพิ่ม bioavailability และลด eliminated half-life ของตัวยาได้⁽⁴⁾ ซึ่งจากข้อดีนี้เองจึงสนใจนำระบบส่งยาในรูปแบบ liposome มาพัฒนาและออกแบบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของตัวยาและผลการรักษา แต่การจะเพิ่มประสิทธิภาพนั้นจะต้องออกแบบ liposome ให้มีความเหมาะสมกับเซลล์เป้าหมายและตัวยานั้นๆ

อย่างไรก็ตามการเพิ่มประสิทธิภาพให้ลิพโซมมีความสามารถในการดูดซึมดีขึ้นยังเป็นเรื่องที่ทำให้ความสนใจอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งมีการศึกษาพบว่าการใช้กรดน้ำดี (bile acid) ในระบบนำส่งจะเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมยาผ่านทางลำไส้ได้มากขึ้น

จากงานวิจัยของ Mengmeng Niu และคณะพบว่า การเติมกรดน้ำดีลงในระบบ liposome เพื่อนำส่ง insulin ทาง oral พบว่าการเติมกรดน้ำดีลงไปสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมได้ดีขึ้น เนื่องจากกรดน้ำดีเพิ่มความจำเพาะของระบบนำส่งที่จำเพาะกับ Bile Receptor (ASBT)⁽⁵⁾ ที่อยู่บริเวณลำไส้เล็กให้มากขึ้น ดังนั้นในการศึกษานี้ ทางผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการเตรียมอนุภาคลิพโซมมีองค์ประกอบของกรดน้ำดี โดยศึกษาผลของชนิดกรดน้ำดีต่อคุณลักษณะของลิพโซมเพื่อใช้พัฒนาเป็นระบบนำส่งยาที่เหมาะสมต่อไปในอนาคต

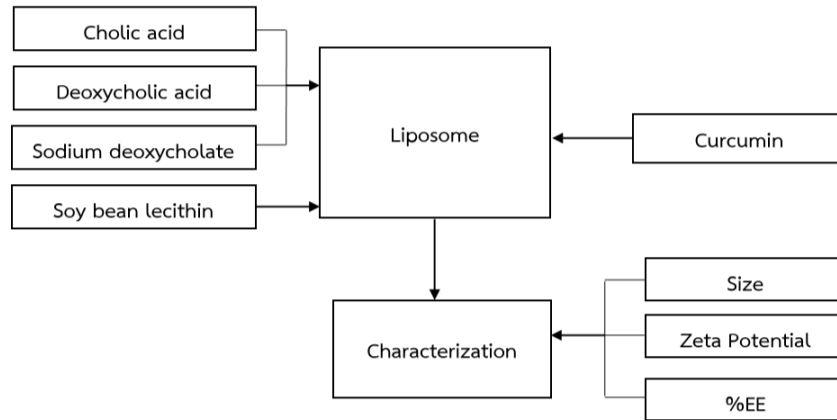
วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบของ Cholic acid, Deoxycholic acid, Sodium deoxycholic acid และ Soybean
2. เพื่อศึกษาผล Cholic acid, Deoxycholic acid และ Sodium deoxycholic acid ต่อคุณสมบัติของ liposome

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่เหมาะสมต่อการนำส่งยา
2. ได้องค์ความรู้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์รูปแบบ liposome ที่มีประสิทธิภาพไปยังเซลล์เป้าหมาย
3. ได้องค์ความรู้ในกระบวนการวิจัย

กรอบแนวคิด



รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดของงานวิจัย

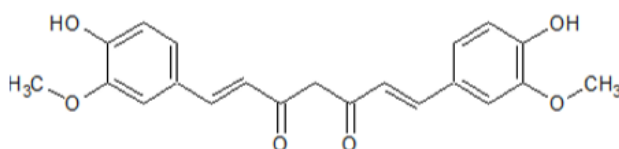
นิยามศัพท์

1. Liposome คือ อนุภาคทรงกลมขนาดเล็กมีลักษณะเป็นถุงเล็กหรือเวสิเคิล (vesicle) ที่ประกอบด้วยไขมันชนิดที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (amphiphilic lipids)
2. Bile acid คือ กรดน้ำดีได้แก่ Cholic acid, Deoxycholic acid, Sodiumdeoxycholate นำมาใช้ในการพัฒนาระบบนำส่งยา เพื่อแก้ไขคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมทางด้านต่างๆของยา เช่น Solubilities, Stabilities, Absorption, Toxicities และ Side effect ของยา
3. Thin film hydration คือวิธีการเตรียมโดยละลายสาร phospholipid ในตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วทำให้เกิดฟิล์มของ phospholipid ด้วยการระเหยเอาส่วนของตัวทำละลายออก

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1. เคอร์คูมิน (Curcumin)⁽⁶⁾



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้าง Curcumin

Molecular Formula: $C_{21}H_{20}O_6$

Molecular Weight: 368.385 g/mol

1.1 คุณสมบัติโดยทั่วไป

เคอร์คูมิน (Curcumin) คือ อนุพันธ์ธรรมชาติที่ได้จากขมิ้นชัน เป็น 1 ใน 3 สารสำคัญหลักในกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) นอกเหนือจาก demethoxycurcumin และ bisdemethoxy curcumin มีลักษณะทางกายภาพเป็นแบบผงคริสตัล สีเหลืองอมส้ม คุณสมบัติทางเคมีเป็น Lipophilic จึงมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ (low solubility in water) และ Bioavailability ต่ำ แต่สามารถละลายได้ดีในเอทานอล (Very soluble in ethanol) และละลายได้เล็กน้อยในอะซิโตน (Very slightly

soluble in acetone) เป็นต้น ความสามารถในการคงตัว สามารถคงตัวได้ในอุณหภูมิสูงและสภาวะกรด แต่ไม่คงตัวในสภาวะเบส^(7, 8)

1.2 คุณสมบัติในการใช้รักษา

ปัจจุบันมีการนำ Curcumin มาใช้ในทางการแพทย์อย่างหลากหลาย เช่น การรักษาโรคมะเร็งในมนุษย์ โดยเหี้ยมนำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) โดยการควบคุมโมเลกุลของเซลล์ signal transductions หลายตัว เช่น NF- κ B, Akt, MAPK, p53, Nrf2, Notch-1, JAK / STAT, β -catenin และ AMPK เป็นต้น ซึ่งผลของการปรับสัญญาณของเซลล์ signaling pathways จะทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดเซลล์ death signals และทำให้เกิด apoptosis ทำให้ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้⁽¹⁾ จากงานวิจัยของ Nita Chainani-Wu และคณะ แสดงให้เห็นถึงการให้ curcumin แบบรับประทานกับหนู Rats พบว่าในหนู Rats สามารถลดระดับของ Gp A 72 (Glycoprotein ที่พบในหนู Rats ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ) ได้มากกว่า control ถึง 73% ปรากฏว่าการอักเสบที่บริเวณอุ้งเท้ามีอาการลดลง จากการศึกษาดำเนินการโดยให้อาหารที่มีปริมาณของ curcumin 0%, 1% และ 5% ในหนู Rats เป็นเวลา 14 วัน ไม่พบผลข้างเคียง ที่เกิดจากปริมาณของ curcumin ที่ได้รับดังกล่าว

2. ลิโพโซม (Liposome)

ลิโพโซม (Liposome) คือ อนุภาคทรงกลมขนาดเล็กมีลักษณะเป็นถุงเล็กหรือเวสิเคิล (vesicle) ที่ประกอบด้วยไขมันชนิดที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (amphiphilic lipids) จัดเรียงตัวเองโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน เกิดเป็นผนังห่อหุ้มสารไว้ภายใน และค่อยๆปลดปล่อยสารออกมาภายนอก เวสิเคิลเหล่านี้สามารถกักเก็บทั้งสารที่ละลายดีในน้ำและสารที่ละลายดีในไขมัน⁽⁹⁾ อีกทั้งลิโพโซม (Liposome) ยังสามารถบรรจุยาและเป็นประโยชน์ในระบบการนำส่งยาเพื่อรักษาโรคมะเร็งและโรคอื่นๆ⁽³⁾

2.1 ข้อดีของลิโพโซม (Liposome)

- 1.) มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย (Selective targeting to tumor)

2.) เพิ่มประสิทธิภาพทางการรักษา (Increased efficacy and therapeutic index)

3.) เพิ่มความคงตัว (Increased stability)

4.) ลดความเป็นพิษ (Reduce toxicity)

5.) สามารถหลีกเลี่ยงผลกระทบต่อเซลล์ข้างเคียง (Site avoidance effect)

6.) พัฒนากลไกทางเภสัชจลนศาสตร์ (Improve Pharmacokinetic effect)

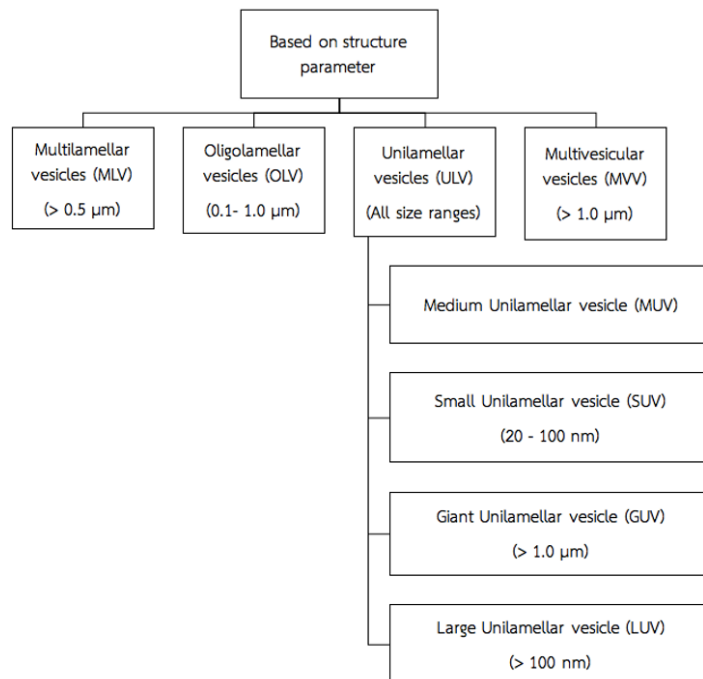
ได้แก่ ลดการทำลาย และสามารถอยู่ในระบบไหลเวียนเลือดได้นานขึ้น

แต่อย่างไรก็ตามลิโพโซม (Liposome) ยังคงพบปัญหาเกี่ยวกับความไม่อิ่มตัว (unsaturated), การออกซิเดชัน (Oxidation) และการเก็บรักษา (ต้องเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ภาชนะกันแสงและแก้วที่ปิดสนิท)

2.2 ประเภทของลิโพโซม (Liposome)

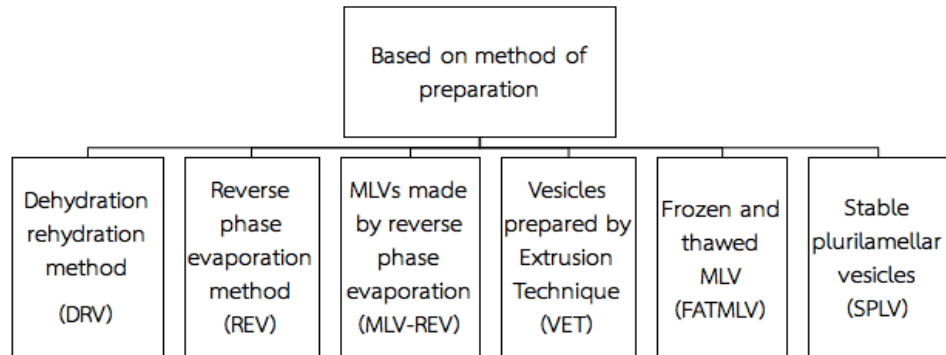
สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1.) แบ่งตามโครงสร้าง (Structure parameters)



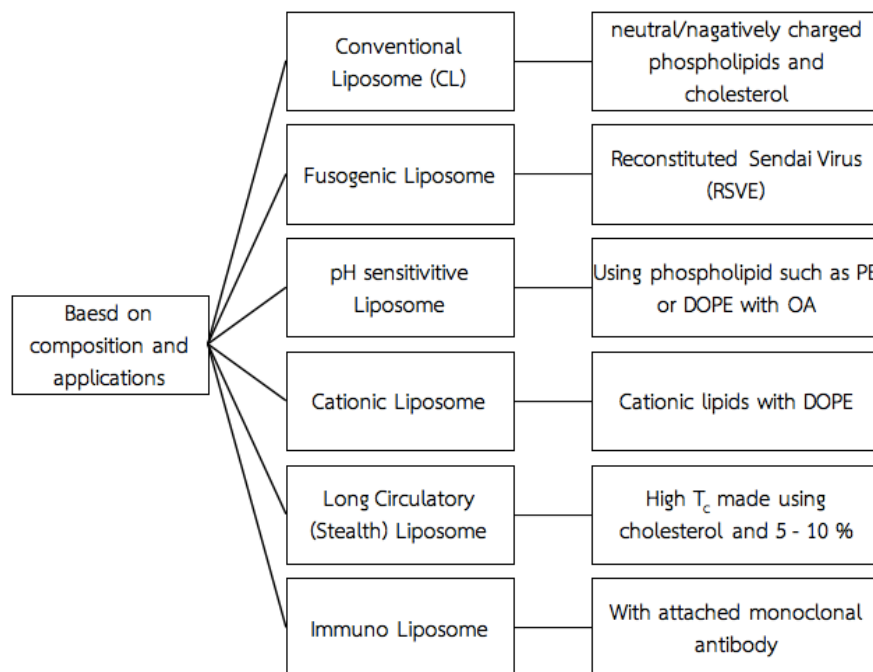
รูปที่ 3 แสดงการแบ่งประเภท liposome ตาม structure parameter

2.) แบ่งตามวิธีการเตรียม (Method of preparation)



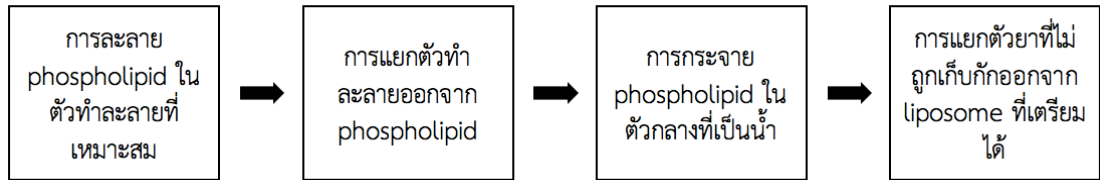
รูปที่ 4 แสดงการแบ่งประเภท liposome ตามวิธีการเตรียม

3.) แบ่งตามส่วนประกอบและการนำไปประยุกต์ใช้ (Composition & Application)



รูปที่ 5 แสดงการแบ่งประเภท liposome ตามส่วนประกอบและการนำไปประยุกต์ใช้

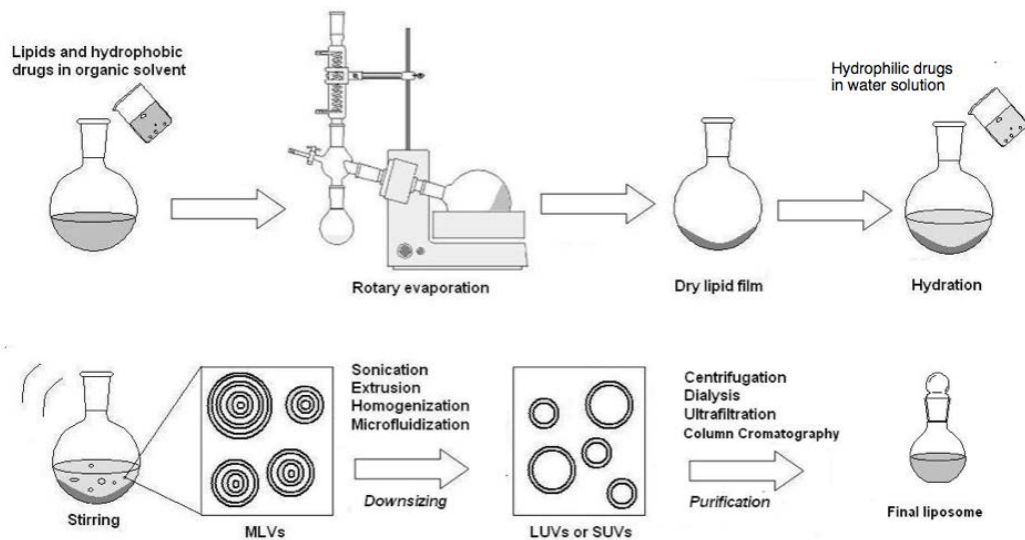
2.3 วิธีการเตรียม liposome



การเตรียม liposome ทำได้หลายวิธี ทุกวิธีจะประกอบด้วย 4 ขั้นตอนพื้นฐาน ดังนี้ โดยการเลือกวิธีการเตรียม liposome ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่

- 1.) ลักษณะทางเคมีของสารที่จะนำเข้าสู่ liposome
- 2.) ลักษณะทางเคมีของสารที่ใช้สร้าง liposome
- 3.) ความเหมาะสมของขนาด polydispersity และ shelf-life ของ liposome
- 4.) ขนาดการผลิต

ซึ่งจากการศึกษาพบว่า วิธี thin-film hydration เป็นวิธีที่แพร่หลาย เนื่องจากการเตรียมที่ไม่ซับซ้อนและเหมาะสมกับสารที่นำมาใช้สร้าง liposome คือ phospholipid ซึ่งเตรียมโดยละลายสาร phospholipid ในตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วทำให้เกิดฟิล์มของ phospholipid ด้วยการระเหยเอาส่วนของตัวทำละลายออก จากนั้นเติมน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ (rehydration) ฟิล์มที่กลับมาเปียกจะได้เป็น liposome ชนิด Multimellar vesicles (MLV) สำหรับการเติมตัวยาจะต้องคำนึงถึงความสามารถด้านการละลายของตัวยานั้น ถ้าตัวยาละลายน้ำได้ดี จะเติมลงในสารละลายน้ำในช่วงการทำให้ฟิล์มเปียก แต่ถ้าตัวยาละลายน้ำไม่ดี จะเติมลงในสารละลาย phospholipid ในช่วงการสร้างฟิล์ม



รูปที่ 6 แสดงวิธีการเตรียม liposome ด้วยวิธี thin-film hydration

2.4 ข้อดีของระบบนำส่งยา liposome เมื่อเทียบกับระบบนำส่งยาอื่น

ระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome เป็นอีกหนึ่งระบบนำส่งที่น่าสนใจ ในการนำมาศึกษา เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการรักษาให้ดีขึ้น เนื่องจากมีหลักฐานจากหลายงานวิจัยที่บอกว่าระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome มีความคงตัวสูง มีค่า bioavailability ดี

ตัวอย่างเช่น จากงานวิจัยของ Yoshihisa Tsukioka และคณะ ได้ทำการศึกษาความแตกต่างทาง Pharmaceutical และ Biomedical ของตัวยา Doxorubicin (DXR) ในรูปแบบระบบนำส่งยาแบบ micelles และ ระบบนำส่งยาแบบ liposome พบว่าคณะผู้วิจัยแนะนำว่า ระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome (liposome DXR) จะมีประสิทธิภาพในการนำส่งยา DXR ไปยังเซลล์เป้าหมาย (จากงานวิจัย เซลล์เป้าหมายคือ solid tumor) ได้ดีกว่าระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelles (micelles DXR) เนื่องจาก liposome DXR มีความคงตัวใน plasma มากกว่า⁽⁴⁾

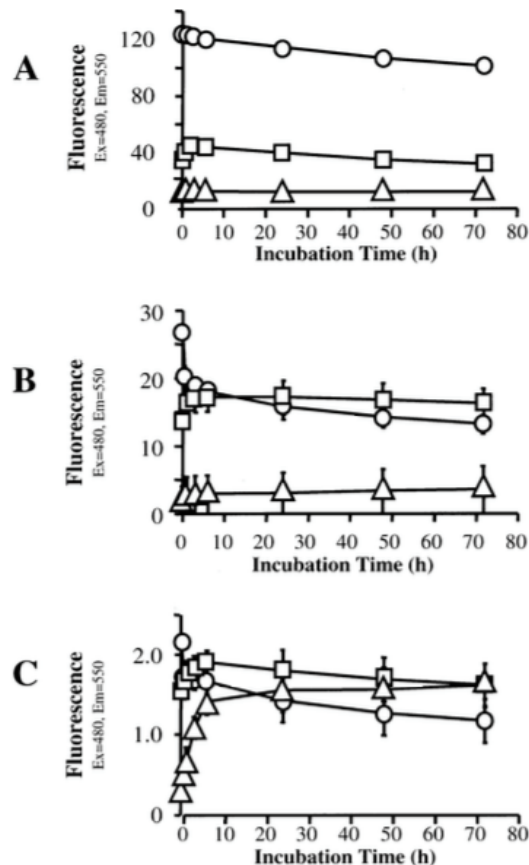


Fig. 1. Change in the fluorescence intensity of free DXR, NK911 and Doxil in PBS solution at 37°C. Free DXR (○), NK911 (□) and Doxil (△) were incubated in PBS at 37°C at a DXR dose-equivalent of 20 μ M (A), 2 μ M (B) and 0.2 μ M (C). The fluorescence intensity of each solution was measured using a fluorescence spectrophotometer, at an excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 550 nm, after 0.5, 1, 3, 6, 24, 48, and 72 h of incubation.

รูปที่ 7 แสดงความคงตัวของ free DXR, micelles DXR และ liposome DXR

(Yoshihisa Tsukioka et al. Jpn. J. Cancer Res. 2002)

และอีกหนึ่งงานวิจัย เป็นงานวิจัยของ Gert Fricker และคณะ ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาเอาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome มาใช้ในยาในรูปแบบรับประทาน จากผลการศึกษาพบว่า ระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome สามารถเพิ่ม bioavailability ของยาในรูปแบบรับประทาน และพัฒนา Eliminated half-life ให้ไปในทิศทางที่ดีขึ้น รวมถึงยังสามารถแก้ไขปัญหาระบบทางเดินอาหารและการเสริมสารช่วย (Excepients)⁽¹⁰⁾ ซึ่งเป็นปัญหาที่พบบ่อยในการบริหารยาทางรูปแบบรับประทาน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nartaya Thirawong และคณะ ที่ได้ทำการศึกษา

เกี่ยวกับการพัฒนาเพื่อเพิ่มการดูดซึม Calcitonin ในลำไส้ด้วยระบบนำส่งยาในรูปแบบ Pectin-liposome nanocomplex (PLNs) จากการศึกษพบว่า Calcitonin PLNs มีประสิทธิภาพในเพิ่มการดูดซึมในลำไส้ได้ดีกว่า Calcitonin solution⁽¹¹⁾

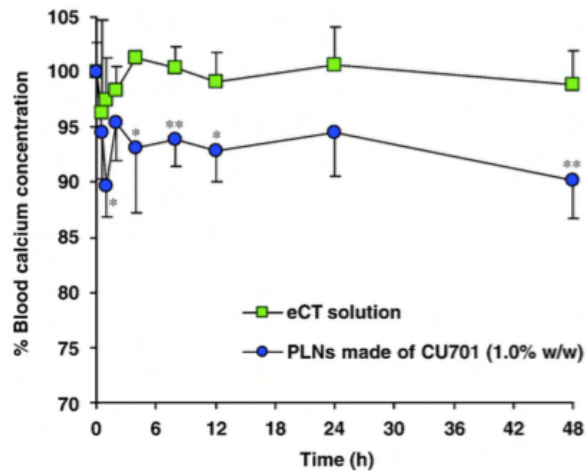
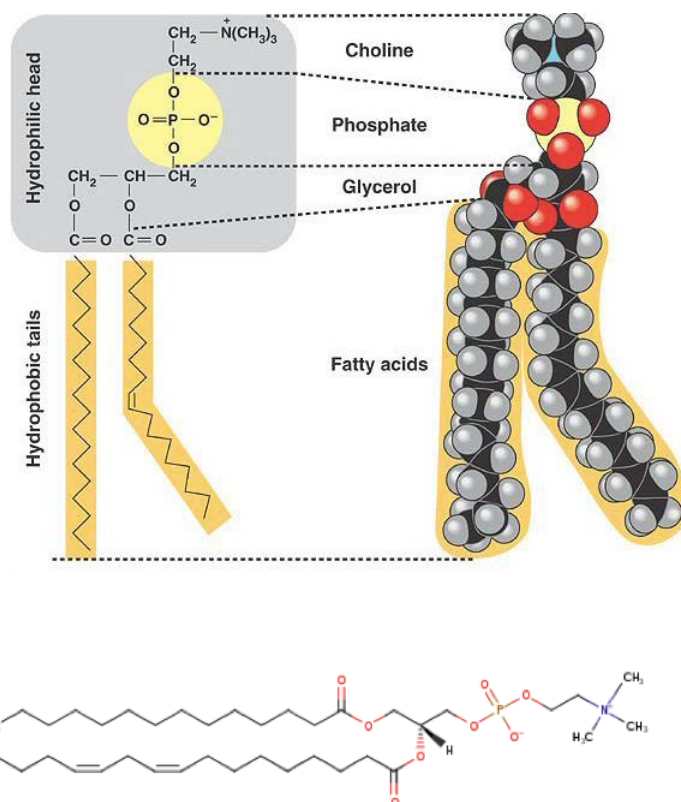


Fig. 6. Plasma calcium concentration after intragastric administration of eCT solution and PLNs made of CU701 (1.0% w/w) in the dose of 500 IU/kg rat. The means and standard deviations of three measurements are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, significantly difference from eCT solution.

รูปที่ 8 แสดงประสิทธิภาพของ Calcitonin PLNs และ Calcitonin solution

(Fricker G et al. Pharm res. 2010)

3. ฟอสฟาติดิลโคลีน (Phosphatidylcholine)⁽¹²⁾



รูปที่ 9 แสดงลักษณะโครงสร้างของฟอสฟาติดิลโคลีน (Phosphatidylcholine)

Molecular Formula: $C_{40}H_{76}NO_8P$

Molecular Weight: 730.0071 g/mol

3.1 คุณสมบัติโดยทั่วไป

ฟอสฟาติดิลโคลีน (Phosphatidylcholine) เป็นสารที่มีอยู่ในไข่ ถั่วเหลือง มัสตาร์ด ดอกทานตะวันและอาหารอื่นๆ คำว่า phosphatidylcholine บางครั้งใช้สลับกันได้ด้วย เลซิติน

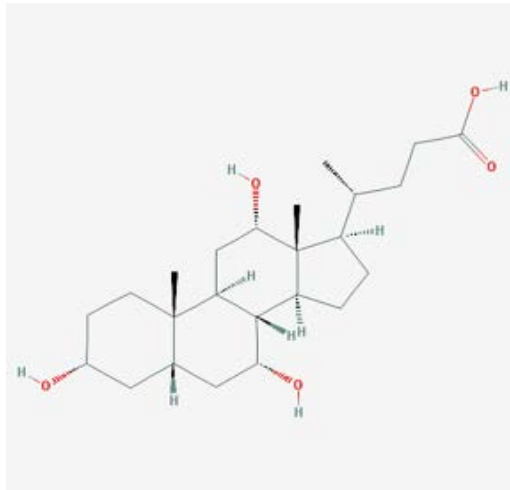
(lecithin) เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกันโดยโคลีน (Choline) เป็นส่วนประกอบของ phosphatidylcholine ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ lecithin Phosphatidylcholine มีคุณสมบัติเป็น amphipathic มีทั้งส่วน hydrophilic และ hydrophobic จึงสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและไขมัน จึงนิยมนำมาพัฒนาใช้ร่วมกับ liposome⁽¹³⁾

จากงานวิจัยของ Muhammad Imran และคณะ พบว่าการเตรียม Liposome จากเลซิตินถั่วเหลือง (Soybean lecithin) SL 5 g / 100 ml ให้ % Entrapment (%EE) ดีที่สุด (47%) และมีความคงตัวทางกายภาพสูง ส่วนผสมทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาในปัจจุบันไม่เป็นพิษ (แม้แต่ทางโภชนาการ เช่น PUFA, GRAS (nisin)) นอกจากนี้การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังยืนยันว่าประสบความสำเร็จในการฟอร์มตัวของ liposomes

4. กรดน้ำดี (Bile acid)

4.1 Cholic acid

Molecular Formula	: $C_{24}H_{40}O_5$
Molecular Weight	: 408.579 g/mol
Melting Point	: 198 °C
Water Solubility	: 175 mg/L (at 20 °C)
Storage in struction	: Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของ Cholic acid

4.2 Deoxycholic acid

Molecular Formula : $C_{24}H_{40}O_4$

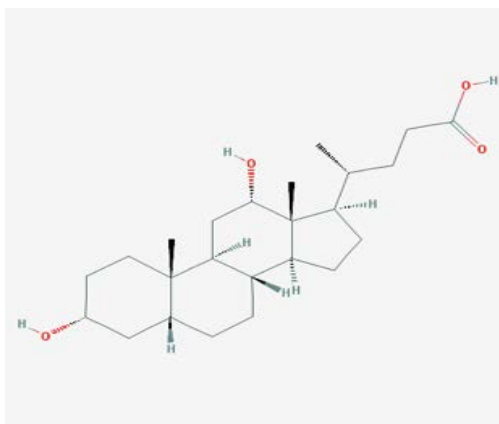
Molecular Weight : 392.58 g/mol

Melting Point : 177 °C

Water Solubility : 43.6 mg/L (at 20 °C)

Storage in struction : Keep container tightly closed in a dry and well-

ventilated place



รูปที่ 11 แสดงโครงสร้างของ Deoxycholic acid

4.3 Sodium deoxycholate

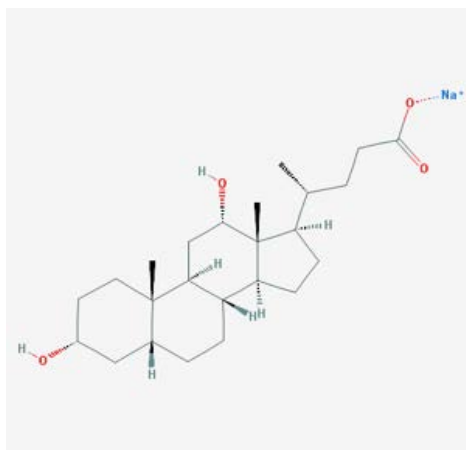
Molecular Formula : $C_{24}H_{40}O_4$

Molecular Weight : 392.58 g/mol

Melting Point : 177 °C

Water Solubility : 43.6 mg/L (at 20 °C)

Storage in struction : Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place



รูปที่ 12 แสดงโครงสร้างของ Sodium deoxycholate

มีการศึกษาพบว่าการใช้กรดน้ำดี (bile acid) ในระบบนำส่งจะเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมยาผ่านทางลำไส้ได้มากขึ้น ดังนั้นในการศึกษานี้ ทางผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการเตรียมอนุภาคลิโพโซมที่มีองค์ประกอบของกรดน้ำดี โดยศึกษาผลของชนิดกรดน้ำดีต่อคุณลักษณะของลิโพโซมเพื่อใช้พัฒนาเป็นระบบนำส่ง ปัจจุบันมีการนำ Bile acid มาใช้ในการพัฒนาระบบนำส่งยา เพื่อแก้ไขคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสม ทางด้านต่างๆของยา เช่น Solubilities, Stabilities, Absorption, Toxicities และ Side effect ของยา

เซ่นงานวิจัยที่ได้ศึกษาระบบนำส่งยาโดยใช้ Cholic Acid conjugate เพื่อพัฒนาการดูดซึมของยานี้คือ Cholic acid และ อนุพันธ์ของ Cholic acid มาใช้ในการนำส่งยา Cytarabine ซึ่งมีปัญหาในการดูดซึม โดยเป็นการทดลอง *in vivo* เพื่อทดสอบการแพร่ผ่านของ Cytarabine และ Cytarabine ที่ conjugate กับ อนุพันธ์ของ Cholic acid โดยการทดสอบ Pharmacokinetics ในหนูโดยทำตามวิธีของงานวิจัยของ Mengmeng Niu และคณะ โดยวัดปริมาณของยาในเลือดพบว่า Cytarabine ที่ Conjugate กับ Cholic Acid มีผลเพิ่มการดูดซึมและการแพร่ของยา Cytarabine อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้พัฒนาระบบนำส่ง Curcumin

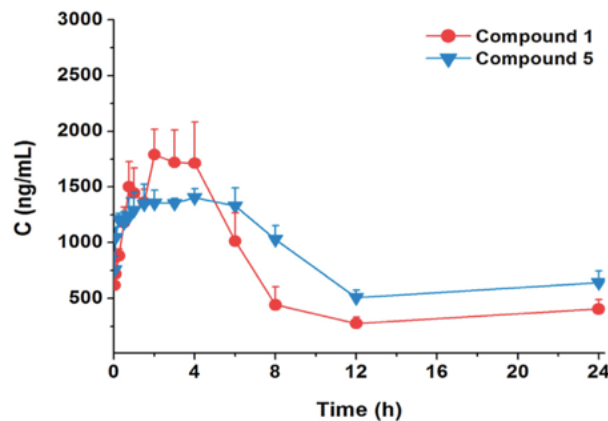


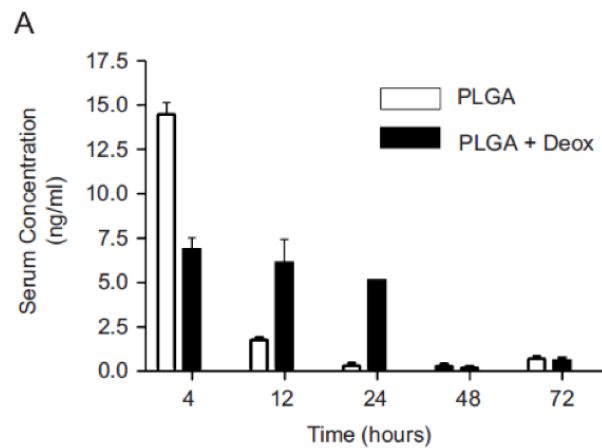
Fig. 7. Mean plasma concentration-time profiles of cytarabine following oral administration of compounds 1 and 5 at 30 mg/kg (calculated as cytarabine) in SD rats (mean + S.E. n = 6).

รูปที่ 13 แสดงความเข้มข้นของ compound 1 และ compound 5 ในเลือดของหนู

(D. Zhang et al. Int J Pharm 2016)

จากรูปที่ 13 Compound 1 คือ ความเข้มข้นของ Cytarabine ในเลือดของหนู และ Compound 5 คือความเข้มข้นของ Cytarabine ที่ conjugate กับอนุพันธ์ของ Cholic acid ในเลือดของหนูตามตามผลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า Cytarabine ที่ conjugate กับอนุพันธ์ของ Cholic acid มี T_{max} $T_{1/2}$ AUC สูงกว่า Cytarabine ซึ่งจากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า Cytarabine ที่ conjugate กับอนุพันธ์ของ Cholic acid มีการดูดซึมที่ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีงานวิจัยที่

ศึกษาถึงความสามารถในการเพิ่ม Oral Bioavailability ของ PLGA Nanoparticle โดยใช้ Deoxycholic Acid โดยทำตามวิธีของงานวิจัยของ Robert M. Samstein และคณะ⁽¹⁴⁾ ซึ่งทำโดยทดสอบการใช้ Deoxycholic Acid เป็นตัวช่วยในการเพิ่ม Bioavailability โดยเปรียบเทียบผล Serum concentration ของ PLGA Nanoparticle Alone (PLGA), Deoxycholic Acid + PLGA Nanoparticle (PLGA + Deox) ซึ่งจากการทดลองพบว่า PLGA + Deox มีค่า AUC และ T_{max} สูงกว่า PLGA (รูปที่ 14) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ Deoxycholic Acid ในระบบนำส่งยาช่วยเพิ่ม Oral Bioavailability ของ PLGA Nanoparticle



รูปที่ 14 แสดงความเข้มข้นของ PLGA และ PLGA + Deox ใน serum

(R.M. Samstein et al. Biomaterials 2008)

อีกทั้งมีงานวิจัยศึกษาถึงความสามารถในการเพิ่ม Oral bioavailability ของ Itraconazole โดยใช้ Liposome Containing Sodium deoxycholate โดยใช้ตามวิธีงานวิจัยของ Zhenbao Li และคณะ⁽¹⁵⁾ ทำโดยทดสอบการใช้ Liposome Containing Sodium deoxycholate เป็นตัวช่วยในการเพิ่ม Oral Bioavailability โดยเปรียบเทียบผล Serum concentration ของ Commercial capsules กับ Liposome containing Sodium deoxycholate (ITZ-Lip-NaDC) ซึ่งจากการ

ทดลองพบว่า ITZ-Lip-NaDC มีค่า AUC , C_{max} , T_{max} และ $F\%$ สูงกว่า Commercial capsules ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ Sodium deoxycholate ในระบบนำส่งยาช่วยเพิ่ม Oral bioavailability ของ Itraconazole

Table 2 – Pharmacokinetic parameters of ITZ in rats after oral administration of commercial capsules and ITZ-Lip-NaDC solution at a dose of 20 mg/kg ITZ, respectively (mean + SD, n = 6).				
Preparations	$t_{1/2}$ (h)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{0-72} (ng/mL·h)
Commercial capsules	13.5 ± 8.0	270.9 ± 133.3	4.5 ± 2.3	3484.6 ± 1658.2
ITZ-Lip-NaDC	12.7 ± 5.7	416.5 ± 134.9	5.5 ± 2.1	5547.8 ± 1951.8

รูปที่ 15 แสดงค่า half-life ($t_{1/2}$), C_{max} , T_{max} และ AUC_{0-72} ของ Commercial capsules กับ

Liposome containing Sodium deoxycholate (ITZ-Lip-NaDC)

(Zhenbao Li et al. Asian journal of pharmaceutical sciences 2017)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

- | | |
|--|------------------|
| 1. Rotary evaporator | 8. Zetasizer |
| 2. HPLC vial | 9. Test tube |
| 3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง | 10. Pipette |
| 4. Cylinder ขนาด 10, 25, 50, 100 ml | 11. Dropper |
| 5. Beaker ขนาด 10, 25, 50, 100, 250, 400 และ 1000 ml | 12. Vortex mixer |
| 6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) | 13. Sonicators |
| 7. Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 ml | 14. Syringe |

2. สารเคมี

1. Curcumin
2. Cholic acid (CA)
3. Deoxycholic acid (DCA)
4. Sodium deoxycholate (NaDCA)
5. Soy bean lecithin
6. 70% Ethanol
7. Methanol

8. Water distillation

9. Acetonitrile AR grade

ตอนที่ 1 : ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบของ Phosphatidylcholine

ศึกษาผลของ Phosphatidylcholine (PC) ต่อการเกิด liposome ซึ่งเตรียม liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้

1. นำ Phosphatidylcholine (PC) ปริมาณ 50, 100, 200 และ 300 mg ละลายด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ใน round-bottom flask
2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่ความดัน 40 mbar, อุณหภูมิ 50°C และรอบหมุน 2.5 rpm
3. ทำการ rehydration ด้วยการเติมสารละลาย DI water จำนวน 10 ml เพื่อทำให้เกิด liposome
4. นำอนุภาค liposome ที่ได้มาลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate ในน้ำแข็ง โดยใช้ระยะเวลา 15 นาที
5. ประเมินลักษณะ liposome ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

ตอนที่ 2 : ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบของ Phosphatidylcholine และ Cholic acid / Phosphatidylcholine และ Deoxycholic acid / phosphatidylcholine และ Sodium deoxycholate

ศึกษาผลของ Cholic acid, Deoxycholic acid และ Sodium deoxycholate ต่อการเกิด liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้

1. เตรียมสารละลาย phosphatidylcholine (PC) และ Cholic acid/Deoxycholic acid/Sodium deoxycholate ในอัตราส่วน PC: Cholic acid, PC: Deoxycholic acid และ PC: Sodium deoxycholate ต่างๆดังนี้ 1:4 1:8 และ 1:16 ซึ่งละลายด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ใน round-bottom flask
2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่ความดัน 40 mbar, อุณหภูมิ 50 °C และรอบหมุน 2.5 rpm
3. Rehydration ด้วยการเติมสารละลาย DI Water จำนวน 10 ml เพื่อทำให้เกิด liposome
4. นำอนุภาค liposome ที่ได้มาลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate ในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 15 นาที
5. ทำการประเมินลักษณะ liposome ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

ตอนที่ 3 : ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบของ Phosphatidylcholine และ Cholic acid / Phosphatidylcholine และ Deoxycholic acid / phosphatidylcholine และ Sodium deoxycholate ที่มีการ load ยา curcumin 5 mg

ศึกษาผลของ Cholic acid, Deoxycholic acid และ Sodium deoxycholate ต่อการเกิด liposome และการ load ยา curcumin ลงในอนุภาค liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้

1. เตรียมสารละลาย phosphatidylcholine (PC) และ Cholic acid/Deoxycholic acid/Sodium deoxycholate ในอัตราส่วน PC: Cholic acid, PC: Deoxycholic acid และ PC: Sodium deoxycholate ต่างๆดังนี้ 1:4 1:8 และ 1:16 โดยมีการเติมยา curcumin ปริมาณ 5 mg เท่ากันในทุกสูตรตำรับ ซึ่งละลายด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ใน round-bottom flask
2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่ความดัน 40 mbar, อุณหภูมิ 50°C และรอบหมุน 2.5 rpm
3. Rehydration ด้วยการเติมสารละลาย DI Water จำนวน 10 ml เพื่อทำให้เกิด liposome
4. นำอนุภาค liposome ที่ได้มาลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate ในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 15 นาที
5. ประเมินลักษณะ liposome ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer
6. นำ liposome จากขั้นตอน 5. มากรองด้วย membrane ขนาด 0.45 μm เพื่อกรอง Curcumin ที่ไม่ถูกกักเก็บใน liposome ออก
7. เตรียมสารละลายยา curcumin standard จำนวน 5 ความเข้มข้นได้แก่ 10, 50, 100, 150 และ 300 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งละลายด้วย methanol
8. นำสารละลาย curcumin standard และสารละลายที่กรองได้มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยยา (% entrapment efficiency) ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ condition ในการวิเคราะห์ ได้แก่

- Column : C-18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)
- Mobile phase : acetonitrile และ DI water ในอัตราส่วน 50:50 v/v
- Running time : 10 นาที
- Injection volume : 20 μL
- Flow rate : 1 ml/min
- Retention time : 7.2 นาที
- Detector : UV detector wavelength 421 nm

โดยคำนวณปริมาณด้วยยา (%entrapment) จากสูตรต่อไปนี้

$$EE\% = W_c / W_t \times 100 ; c = \text{drug content}, t = \text{total drug}$$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

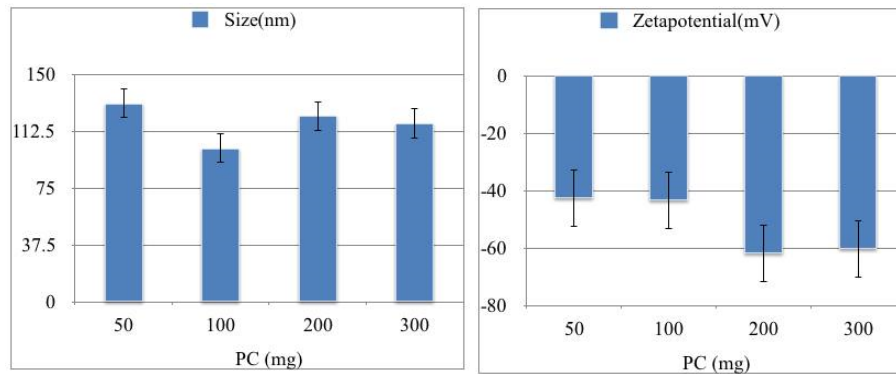
ตอนที่ 1 ศึกษาผลของ phosphatidylcholine (PC) ต่อการเกิด liposome ซึ่งเตรียม liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method

1.1 ผลการศึกษาผลของ phosphatidylcholine (PC) ต่อการเกิด liposome

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome

PC (mg)	Size (nm±SD)	Zeta potential (mV±SD)
50	130.98 ± 19.56	-42.64 ± 10.27
100	101.41 ± 11.71	-43.24 ± 9.66
200	122.40 ± 18.35	-61.73 ± 1.10
300	117.91 ± 8.67	-60.36 ± 3.58

1.1.1 ผลการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ phosphatidylcholine ความเข้มข้นต่างกัน



รูปที่ 16 แสดง zeta potential และขนาดอนุภาคของ Phosphatidylcholine ความเข้มข้นต่างกัน

จากตารางที่ 1 แสดงผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่ทำการลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate เป็นเวลา 15 นาทีและมีปริมาณ phosphatidylcholine (PC) ต่างกัน ได้แก่ 50 mg, 100 mg, 200 mg และ 300 mg พบว่าการเตรียม liposome จาก phosphatidylcholine 100 mg เป็นปริมาณที่ให้ผลดีที่สุด เนื่องจากให้ขนาดอนุภาคที่เหมาะสม⁽¹⁶⁾ โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ $101.41 \text{ nm} \pm 11.71 \text{ nm}$ รวมถึงให้ค่า zeta potential ที่อยู่ในเกณฑ์ดี (good)⁽¹⁷⁾ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $-43.24 \text{ mV} \pm 9.66 \text{ mV}$

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของกรดน้ำดีต่อการเกิด liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method

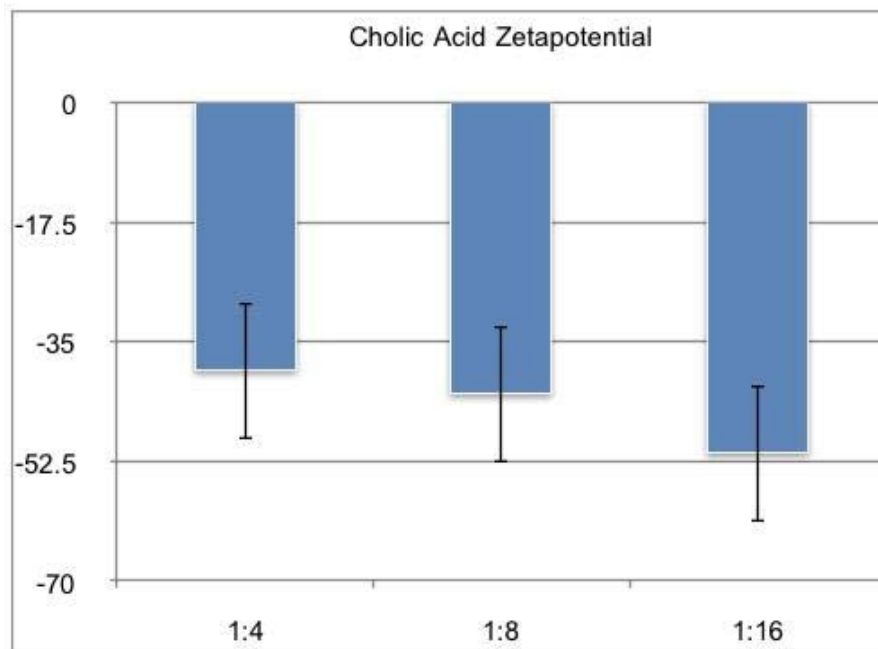
2.1) ผลการศึกษาของสัดส่วนระหว่างกรดน้ำดี 3 ชนิดคือ Cholic acid, Deoxy cholic acid, Sodium deoxycholate และ phospholipid (lecitin) ต่อการเกิด liposome

ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดที่อัตราส่วน

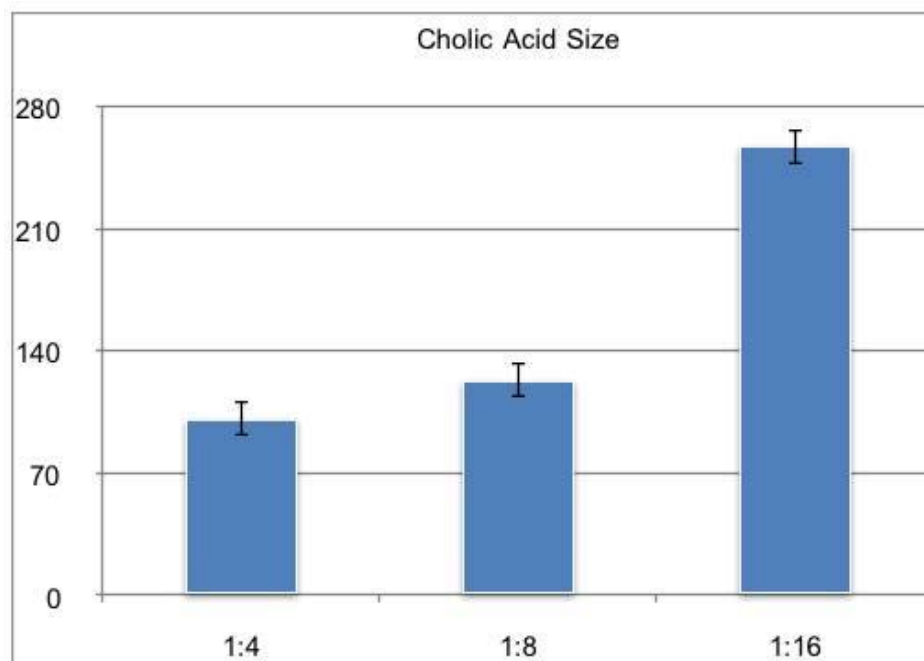
1:4, 1:8 และ 1:16

Formulation	Size(nm)	Zeta Potential (mV)
PC:CA (4:1)	100.77	-39.2
PC:CA (8:1)	122.87	-42.70
PC:CA (16:1)	256.90	-51.43
PC:DCA (4:1)	84.92	-36.80
PC:DCA (8:1)	149.33	-41.33
PC:DCA (16:1)	105.73	-46.43
PC:NaDCA (4:1)	119.40	-44.63
PC:NaDCA (8:1)	126.23	-44.50
PC:NaDCA (16:1)	175.17	-49.77

2.1.1) ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ PC : CA ที่อัตราส่วน 1:4, 1:8 และ 1:16

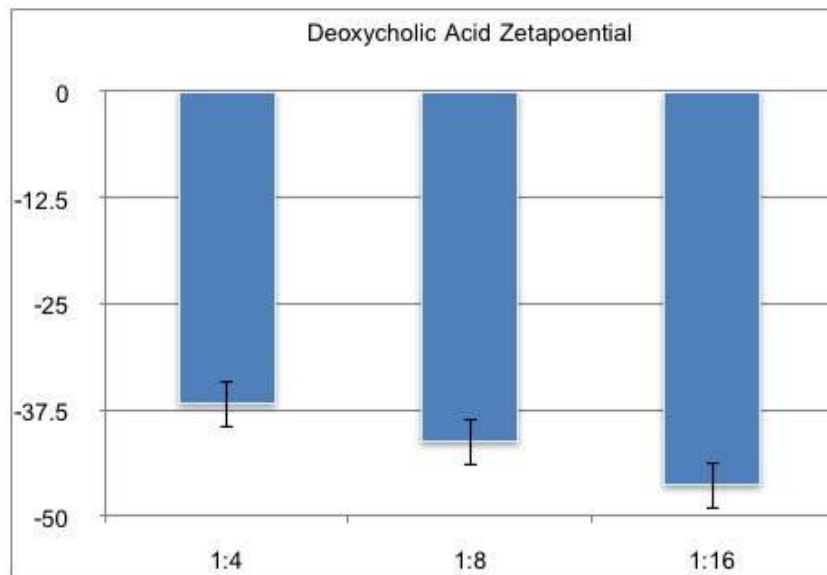


รูปที่ 17 แสดง zeta potential ของ Liposome Cholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน

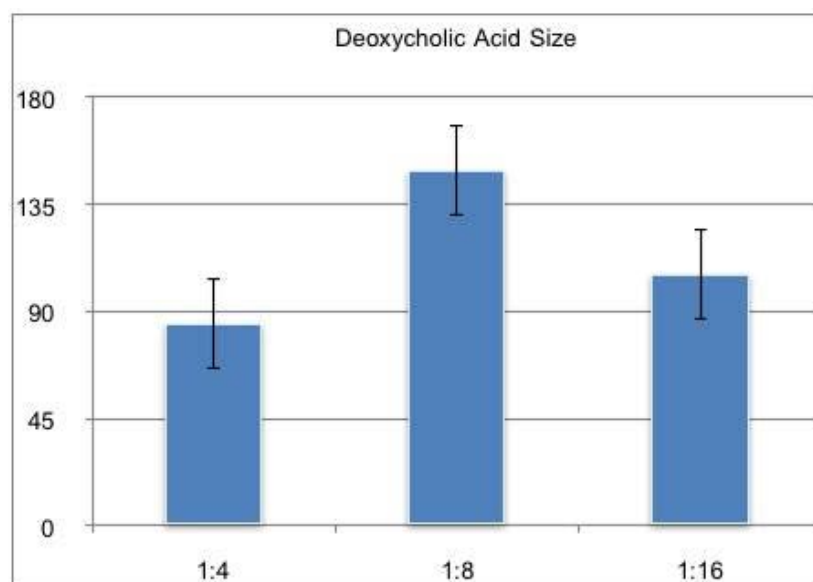


รูปที่ 18 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Cholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน

2.1.1.2) ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ PC : DCA ที่อัตราส่วน 1:4, 1:8 และ 1:16

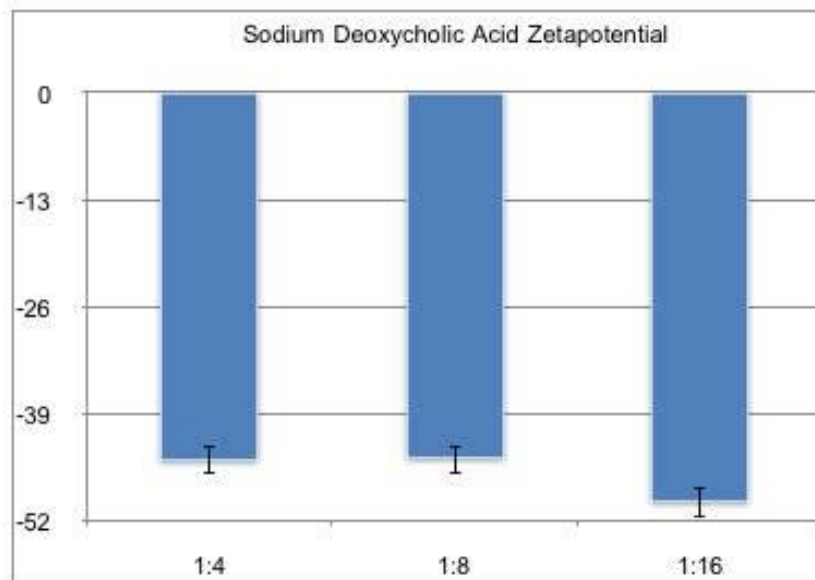


รูปที่ 19 แสดง zeta potential ของ Liposome Deoxycholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน

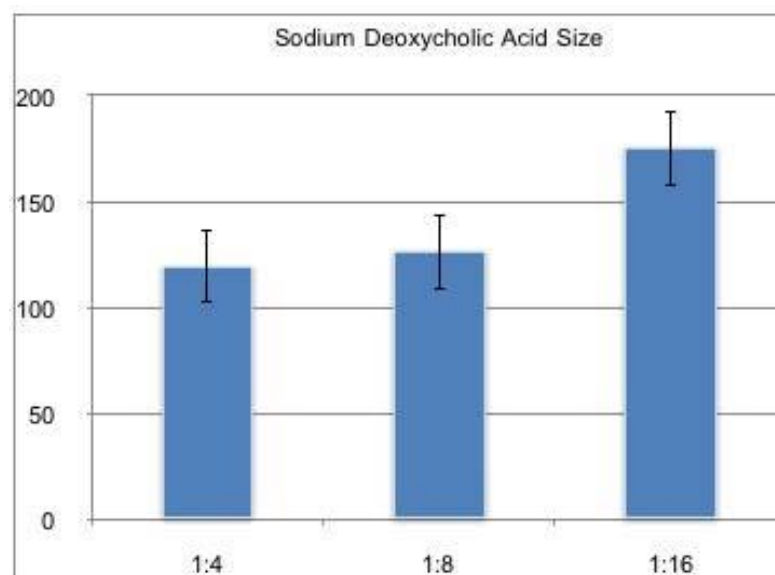


รูปที่ 20 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Deoxycholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน

2.1.3) ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ PC : sodium deoxycholate ที่อัตราส่วน 1:4, 1:8 และ 1:16



รูปที่ 21 แสดง zeta potential ของ Liposome Sodium deoxycholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน

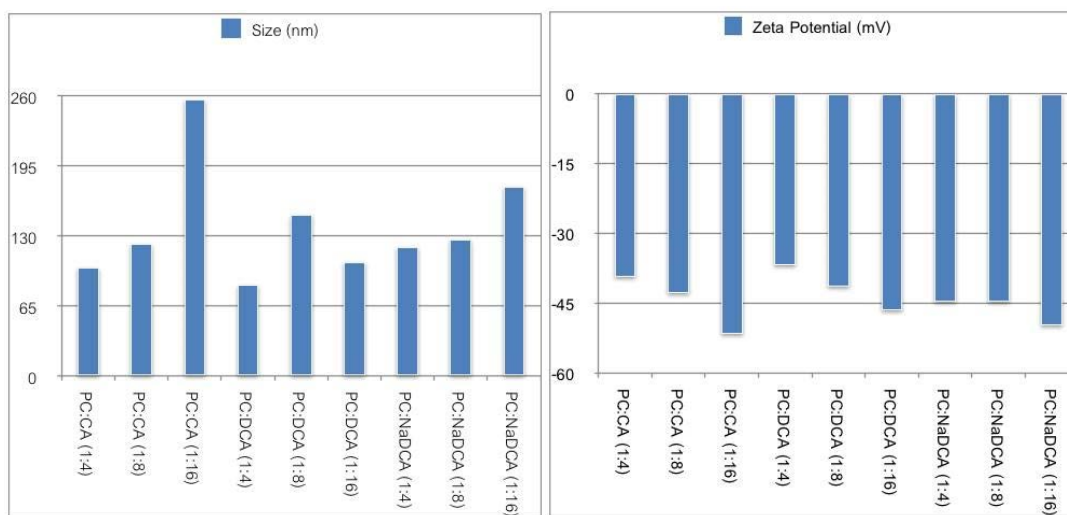


รูปที่ 22 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Sodium deoxycholic Acid ในสัดส่วนที่ต่างกัน

จากตารางที่ 2 ซึ่งแสดงผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มี phosphatidylcholine (PC) และกรดน้ำดี เป็นองค์ประกอบในสัดส่วนความเข้มข้นที่ต่างกัน ได้แก่ 1:4, 1:8 และ 1:16 พบว่าความเข้มข้นของ phosphatidylcholine (PC) และกรดน้ำดี มีผลต่อขนาดของอนุภาค และ zeta potential ของ liposome โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ phosphatidylcholine (PC) ทำให้ขนาดอนุภาคเล็กลงและมีค่า zeta potential เป็นลบมากขึ้น เนื่องจาก phosphatidylcholine (PC) มีโครงสร้างประกอบไปด้วย phosphate ซึ่งมีประจุเป็นลบ ดังนั้นเมื่อเพิ่มสัดส่วนของ phosphatidylcholine (PC) มากขึ้น liposome จึงให้ค่า zeta potential ที่เป็นลบมากขึ้นด้วยเช่นกัน zeta potential มีค่าที่เหมาะสมคือติดลบมากกว่า -30 mV ขึ้นไป⁽¹⁷⁾ ในขณะเดียวกันถ้าเพิ่มความเข้มข้นของกรดน้ำดีจะทำให้ได้ liposome ที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น เนื่องจากกรดน้ำดีจะแทรกตัวอยู่ในชั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของ phospholipid bilayer โดยขนาดอนุภาคที่เหมาะสมของ liposome จะอยู่ที่ช่วง $100 - 200$ nm⁽¹⁶⁾ เนื่องจากถ้ามีขนาดใหญ่กว่านี้จะทำให้การดูดซึมไม่ดีเท่าที่ควร และ ถ้าเล็กกว่านี้จะมีผลทำให้กักเก็บปริมาณตัวยาได้น้อยลง⁽¹⁸⁾

2.1.4) ผลการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี

3 ชนิดที่สัดส่วนแตกต่างกัน



รูปที่ 23 แสดงการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดที่สัดส่วนแตกต่างกัน

จากการศึกษาผลของกรดน้ำดีต่อการเกิด liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method พบว่า สูตรที่มี phosphatidylcholine กับ deoxycholic acid (PC : DCA) ที่อัตราส่วน 4 : 1 มีขนาดอนุภาคเล็กกว่าสูตรอื่น โดยมีขนาดเฉลี่ย 84.92 ± 2.89 nm. แต่ทุกสูตรให้ค่า zeta potential ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

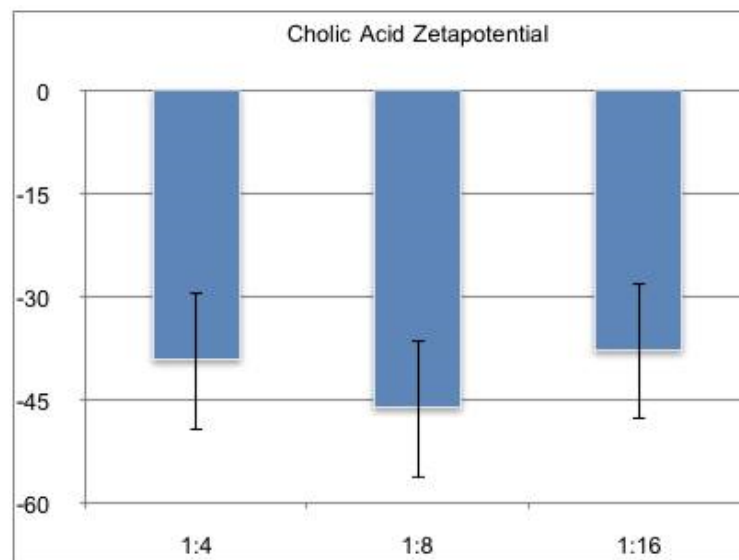
ตอนที่ 3 ศึกษาผลของกรดน้ำดีต่อการเกิด liposome และการบรรจุตัวยา curcumin ลงในอนุภาค liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method

3.1) ผลการศึกษาของสัดส่วนสัดส่วนระหว่างกรดน้ำดี 3 ชนิดคือ Cholic acid, Deoxy cholic acid, Sodium deoxycholate และการบรรจุตัวยา curcumin ต่อ liposome

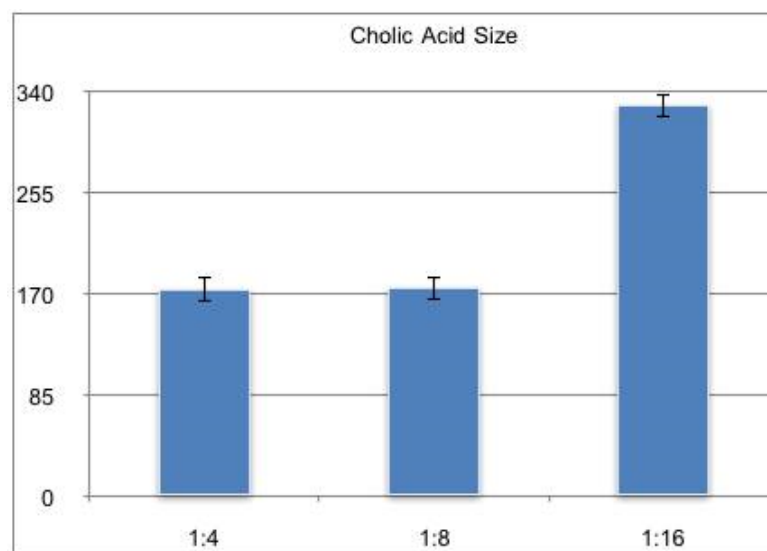
ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดและมีการบรรจุตัวยา curcumin ที่อัตราส่วน 1:4, 1:8 และ 1:16

Formulation	Size(nm)	Zeta Potential (mV)
PC:CA:Cur (4:1:5)	173.86	-39.27
PC:CA:Cur (8:1:5)	174.86	-46.20
PC:CA:Cur (16:1:5)	327.56	-37.88
PC:DCA:Cur (4:1:5)	207.37	-37.36
PC:DCA:Cur (8:1:5)	335.43	-49.44
PC:DCA:Cur (16:1:5)	503.00	-52.47
PC:NaDCA:Cur (4:1:5)	180.15	-57.84
PC:NaDCA:Cur (8:1:5)	109.30	-54.22
PC:NaCA:Cur (16:1:5)	146.83	-37.14

3.1.1) แสดงผลการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ Zeta potential ของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) : cholic acid (CA) : curcumin แตกต่างกัน

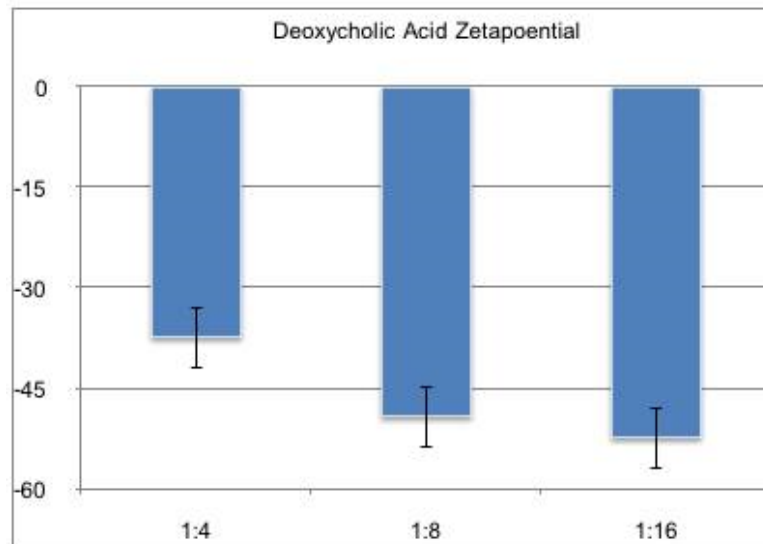


รูปที่ 24 แสดง zeta potential ของ Liposome Cholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน

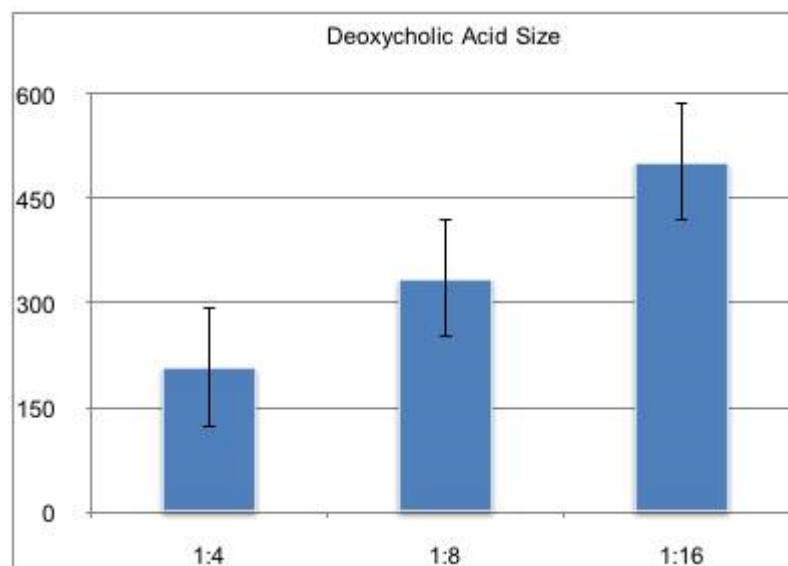


รูปที่ 25 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Cholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน

3.1.2) แสดงผลการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ Zeta potential ของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) และ deoxycholic acid (DCA) : curcumin แตกต่างกัน

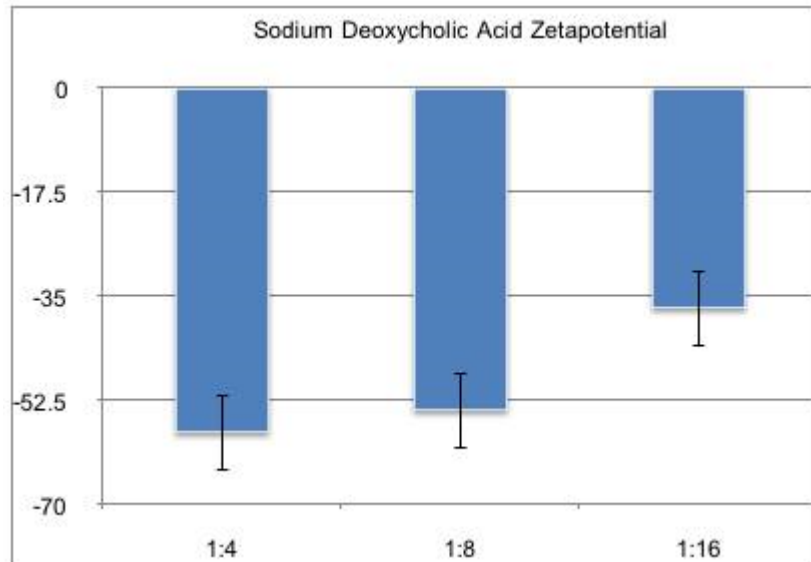


รูปที่ 26 แสดง zeta potential ของ Liposome Deoxycholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน

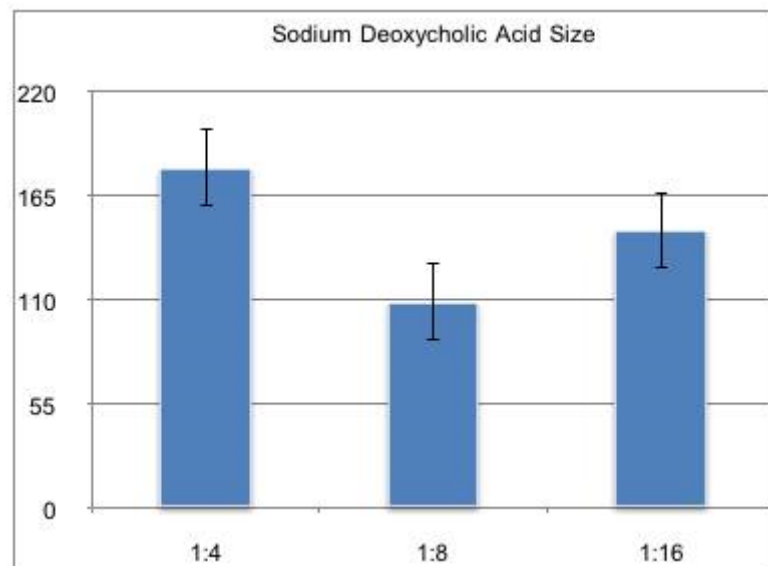


รูปที่ 27 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Deoxycholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน

3.1.3) แสดงผลการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ Zeta potential ของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) และ sodium deoxycholate : curcumin แตกต่างกัน

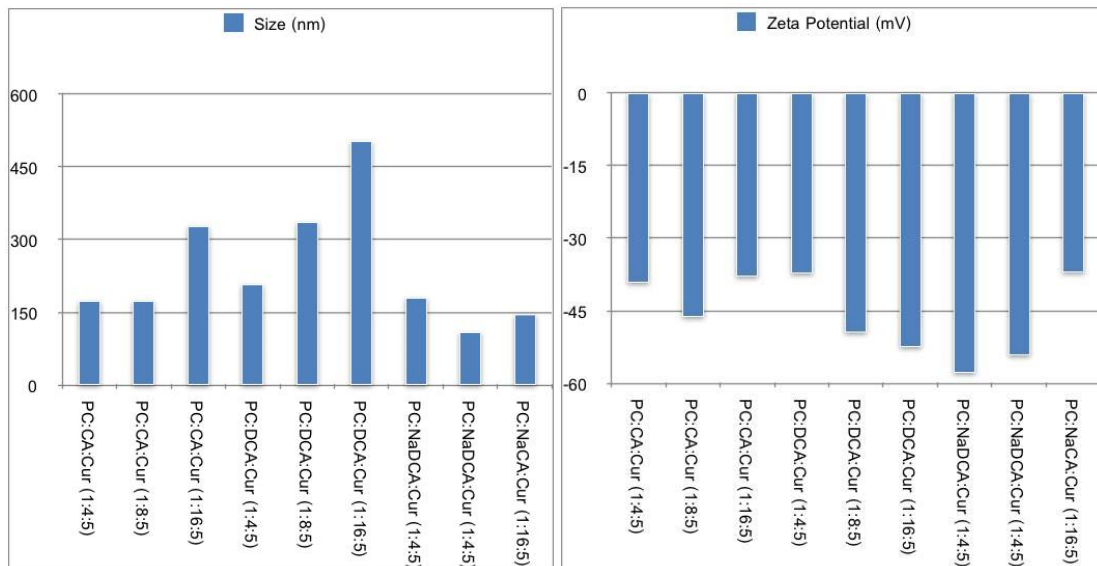


รูปที่ 28 แสดง zeta potential ของ Liposome Sodium deoxycholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน

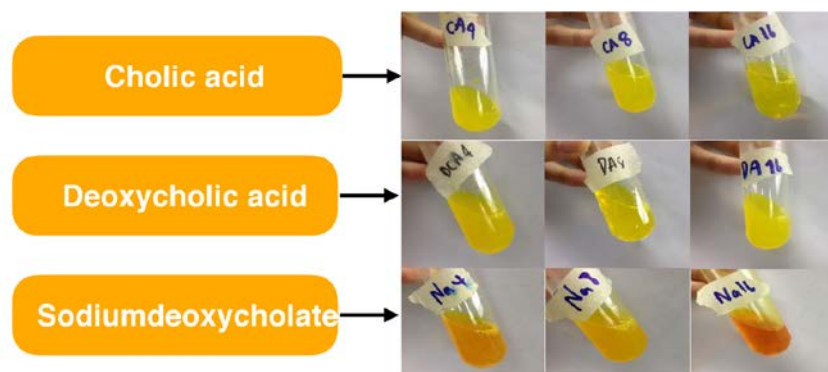


รูปที่ 29 แสดงขนาดอนุภาคของ Liposome Sodium deoxycholic Acid ที่บรรจุ Curcumin ในสัดส่วนที่ต่างกัน

3.1.4) ผลการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดที่สัดส่วนแตกต่างกันซึ่งบรรจุ Curcumin



รูปที่ 30 แสดงการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome ที่มีกรดน้ำดี 3 ชนิดที่สัดส่วนแตกต่างกันซึ่งบรรจุ Curcumin



รูปที่ 31 แสดงลักษณะทางกายภาพของ phosphatidylcholine (PC) ต่อกกรดน้ำดี 3 ชนิดที่สัดส่วนแตกต่างกันซึ่งบรรจุ Curcumin

จากตารางที่ 3 ซึ่งแสดงขนาดของอนุภาค และ zeta potential ของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) : Bile Salt : curcumin ที่แตกต่างกัน พบว่าขนาดอนุภาคของ liposome ที่บรรจุ curcumin มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับขนาดอนุภาคของ liposome ที่ไม่ได้บรรจุ curcumin แต่เป็นการเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจาก curcumin มีคุณสมบัติเป็นสารที่การละลายน้ำไม่ดี (solubility in water < 0.1mg/ml) จะเข้าแทรกตัวอยู่ในชั้นที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของ phospholipid bilayer เช่นเดียวกับกรดน้ำดี ทำให้อนุภาคของ liposome มีขนาดใหญ่มากขึ้น ส่วนผลของค่า zeta potential ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3.1.5) ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency)

1.) Standard curve ของ curcumin ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ condition ดังนี้

Column: C-18 column (250 mm x 4.6 mm, 5um)

Mobile phase: Acetonitrile และ DI water ในอัตราส่วน 50:50 v/v

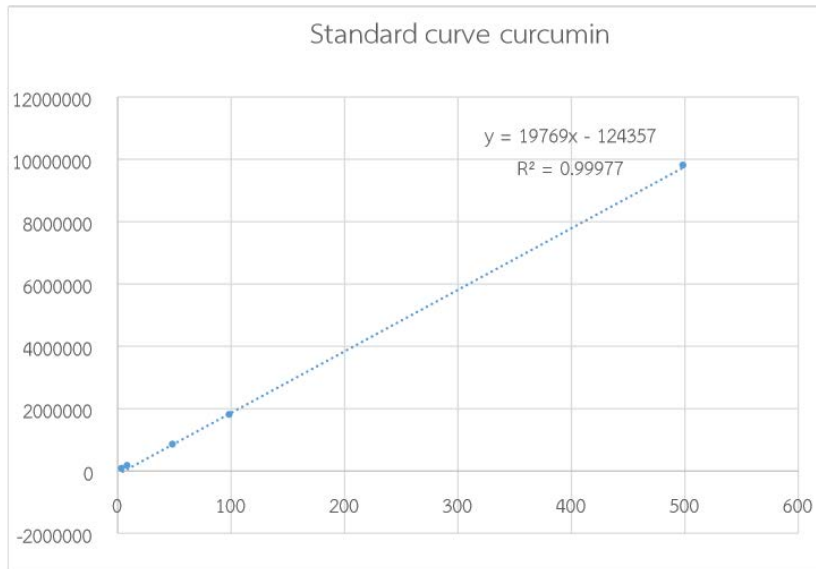
Running time: 10 นาที

Injection volume: 20 uL

Flow rate: 1 ml/min

Retention time: 7.2 นาที

Detector: UV detector wavelength 421 nm



รูปที่ 32 แสดง standard curve ของยา curcumin

การวิเคราะห์ปริมาณสารต่ำสุด ได้แก่

Limit of detection (LOD) = 1 μ m

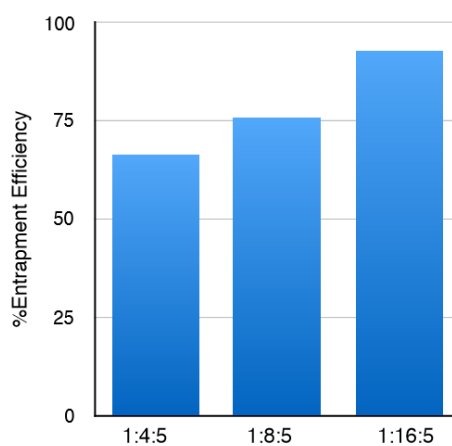
Limit of quantification (LOQ) = 0.5 μ m

2.) ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency) ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency)

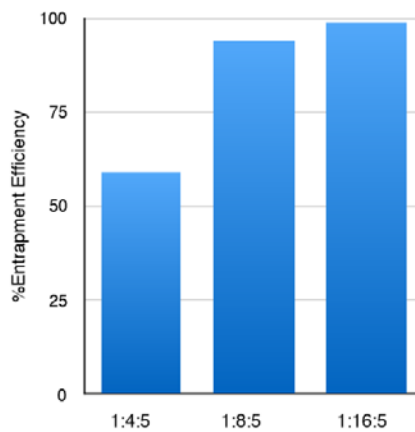
Formulation	AUC	%Entrapment
PC : CA : Cur (1:4:5)	1023806.333	66.5136
PC : CA : Cur (1:8:5)	1347382.667	75.9503
PC : CA : Cur (1:16:5)	1416189.333	92.8903
PC : DCA : Cur (1:4:5)	1038790.111	58.8373
PC : DCA : Cur (1:8:5)	1824511.500	93.8740
PC : DCA : Cur (1:16:5)	1785956.833	98.6159
PC : NaDCA : Cur (1:4:5)	1642114.167	88.3432
PC : NaDCA : Cur (1:8:5)	1841092.667	99.4200
PC : NaDCA : Cur (1:16:5)	1864184.889	99.1714

Each value presents the mean $\pm$ S.D. (n=3); *P < 0.05 compared in all formulation

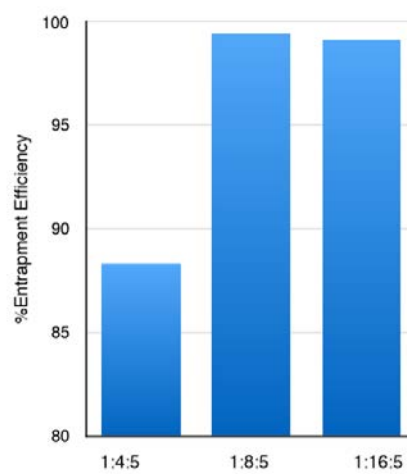


รูปที่ 33 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency) ในสูตร PC : CA : Cur ในอัตราส่วนต่างๆ

(*P < 0.05 compared with PC : CA : Cur in all formulation)



รูปที่ 34 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency) ในสูตร PC : DCA : Cur ในอัตราส่วนต่างๆ (*P < 0.05 compared with PC : DCA : Cur in all formulation)



รูปที่ 35 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณตัวยา (%Entrapment Efficiency) ในสูตร PC : NaDCA : Cur ในอัตราส่วนต่างๆ (*P < 0.05 compared with PC : NaDCA : Cur in all formulation)

จากตารางที่ 4 ซึ่งแสดงค่า %EE ของ liposome ที่มี phasphatidylcholine, กรดน้ำดีและ curcumin เป็นองค์ประกอบ โดยในแต่ละสูตรจะมีสัดส่วนความเข้มข้นและชนิดของกรดน้ำดีที่แตกต่างกัน เมื่อทำการศึกษาผลของชนิดกรดน้ำดีต่อค่า %EE ของ liposome พบว่าค่า %EE ของ liposome ที่มี sodium deoxycholate เป็นองค์ประกอบมีแนวโน้มที่ให้ค่า %EE สูงกว่าสูตรที่มี cholic acid (CA) และ deoxycholic acid (DCA) เป็นองค์ประกอบ แต่ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า %EE อยู่ที่ 99.42% ในสูตร PC : NaDCA : Cur (1:8:5) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arafat M et al. ว่า sodium deoxycholate มีความสามารถในการกักเก็บปริมาณตัวยาได้ค่อนข้างสูง⁽¹⁹⁾

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลวิจัย

จากการศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome โดยใช้กรดน้ำดี 3 ชนิด ได้แก่ cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA) และ sodium deoxycholate ร่วมกับ phosphatidylcholine (PC) ในอัตราส่วนต่างๆ ในการสร้าง liposome เพื่อนำส่งยา curcumin เมื่อประเมินคุณสมบัติของ liposome ในทางกายภาพ (physical properties) ได้แก่ ขนาดอนุภาค ประจุพื้นผิวอนุภาค (zeta potential) การวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (% entrapment efficiency; %EE) พบว่าสูตร liposome ที่เหมาะสมคือสูตร PC : NaDCA : Cur (8:1:5) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 109.30 nm ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าสูตรอื่นๆ และ zeta potential เฉลี่ยเท่ากับ -54.22 mV โดยแสดงถึงอนุภาคมีความเสถียรไม่เกาะกลุ่มกัน⁽¹⁷⁾ อีกทั้งยังสามารถกักเก็บตัวยา curcumin ได้ 99.42 % แต่ไม่ได้แตกต่างจากสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยการกักเก็บตัวยา curcumin ภายใน liposome อาจยกเว้นคือตัวยา curcumin จับกับโครงสร้างส่วน phosphatidylcholine

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มี bile acid (cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA) และ sodium deoxycholate (NaDCA)) เป็นองค์ประกอบนั้นมีลักษณะด้านสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมในการนำส่งยาได้ แต่จากการศึกษานี้ทำการศึกษาเพียงลักษณะด้านสมบัติทางกายภาพ ซึ่งควรทำการศึกษาด้านอื่นเพิ่มเติม เช่น สมบัติทางเคมี (chemical properties) หรือ สมบัติทางชีววิทยา (biological properties) เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

1. Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action: Signal transduction. *BioFactors*. 2013;39(1):27-36.
2. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today*. 2012;17(1-2):71-80.
3. J.S.Dua PACR, Dr. A.K. Bhandari. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS April-June, 2012/14-20 Vol. III (Issue II).
4. Tsukioka Y, Matsumura Y, Hamaguchi T, Koike H, Moriyasu F, Kakizoe T. Pharmaceutical and Biomedical Differences between Micellar Doxorubicin (NK911) and Liposomal Doxorubicin (Doxil). *Japanese Journal of Cancer Research*. 2002;93(10):1145-53.
5. Niu M, Tan Yn, Guan P, Hovgaard L, Lu Y, Qi J, et al. Enhanced oral absorption of insulin-loaded liposomes containing bile salts: A mechanistic study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;460(1-2):119-30.
6. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=969516 hpnngcaM, 2017).
7. Tekulapally K, Chandrakala MP, Mathur S. AN EXPERIMENTAL EVALUATION OF ANTICONVULSIVE EFFECTS OF CURCUMIN IN WISTAR RATS.
8. Sciencelab.com. Material Safety Data Sheet
Curcumin MSDS 2013 [updated 05/21/2013 12:00 PM; cited 2017 20 Feb]. Available from: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923607>.
9. Information NCfB. PubChem Compound Database; CID=969516. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516>.
10. Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H, et al. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharmaceutical research*. 2010;27(8):1469-86.
11. Thirawong N, Thongborisute J, Takeuchi H, Sriamornsak P. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes. *Journal of controlled release*. 2008;125(3):236-45.
12. Database NMC. PHOSPHATIDYLCHOLINE WebMD [cited 2017 25 Feb]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/curcumin>.
13. Imran M, Revol-Junelles A-M, Paris C, Guedon E, Linder M, Desobry S. Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;62(1):341-9.
14. Samstein RM, Perica K, Balderrama F, Look M, Fahmy TM. The use of deoxycholic acid to enhance the oral bioavailability of biodegradable nanoparticles. *Biomaterials*. 2008;29(6):703-8.
15. Li Z, Zhang M, Liu C, Zhou S, Zhang W, Wang T, et al. Development of liposome containing sodium deoxycholate to enhance oral bioavailability of itraconazole. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016.
16. Thanappapasr K. Cancer Nanotheranostics. *Songkla Med J*. 2014;32(5):339-52.

17. Zahir SHaF. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2) Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2013;12(2):265-73.
18. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters. 2013;8(1):102-.
19. Arafat M ea. Nanosized Liposomes Containing Bile Salt: A Vesicular Nanocarrier for Enhancing Oral Bioavailability of BCS Class III Drug. J Pharm Pharm Sci. 2017;20(0):305-18.