



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมที่มีกรดไขมันเพื่อนำส่ง
กรดโรสมารินิกผ่านทางผิวหนัง

(Development of ultradeformable liposomes with fatty acid
for dermal delivery of rosmarinic acid)

โดย

นสภ.ปาจริย์	เดิมนุติชัย	57210094
นสภ.อภิสราร	นาตินอก	57210096
นสภ.ศิริพร	อมรดิษฐ์	57210141

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ก

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่มีกรดไขมันเพื่อนำส่ง
กรดโรสมารินิกผ่านทางผิวหนัง

(Development of ultradeformable liposomes with fatty acid
for dermal delivery of rosmarinic acid)

โดย

นสภ.ปาจริย์	เดิมนุติชัย	57210094
นสภ.อภิสร	นาตินอก	57210096
นสภ.ศิริพร	อมรดิษฐ์	57210141

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ในปัจจุบันประเทศไทยมีอัตราการเจริญเติบโตและขยายตัวของอุตสาหกรรมเครื่องสำอางอย่างต่อเนื่องทุกปี เนื่องจากประชากรปัจจุบันทั้งเพศหญิงและเพศชายในทุกๆช่วงวัย ต่างให้ความสนใจเกี่ยวกับสุขภาพ ความงาม และผิวพรรณ รวมถึงการดูแลตัวเองมากยิ่งขึ้น โดยผลิตภัณฑ์ดูแลผิวแต่ละรูปแบบมีผลต่อประสิทธิภาพในการนำส่งสารสำคัญผ่านเข้าสู่ผิวหนัง

ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจเกี่ยวกับระบบนำส่งยาผ่านผิวหนัง (dermal drug delivery system) โดยจะศึกษาถึงประสิทธิภาพของอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมชนิดใหม่คือ อัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมที่มีกรดไขมันในการนำส่งสารสำคัญคือกรดโรสมารินิกผ่านทางผิวหนัง ซึ่งสารสำคัญดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase enzyme) จึงมีผลลดการสร้างเม็ดสีผิวเมลานินทำให้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นเครื่องสำอาง การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานทางวิชาการเพื่อสนับสนุนประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้เกษตรกรไทยสามารถเพาะปลูกโรสแมรี่ เพื่อเก็บเกี่ยวนำไปสกัดกรดโรสมารินิกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มรายได้แก่เกษตรกรและอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยหวังว่าการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นองค์ความรู้ในทางวิชาการต่อไป

คณะผู้วิจัย

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง การพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมที่มีกรดไขมันเพื่อนำส่งกรดโรสมารินิกผ่านทาง

ผิวหนัง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.ปาจริย์ เต็มวุฒิชัย รหัส 57210094
2. นสภ.อภิสรนา นาคีนอก รหัส 57210096
3. นสภ.ศิริพร อมรดิษฐ์ รหัส 57210141

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภก.ผศ.ดร. ถิรพิทย์ สุปงกช
2. ภญ.อ.ดร. สมาวดี เปลี่ยนวงษ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมชนิดใหม่ที่มีกรดไขมัน ได้แก่ กรดโอเลอิก กรดไลโนเลนิก และกรดไลโนเลอิก เพื่อเพิ่มการผ่านทางผิวหนังของกรดโรสมารินิก โดยได้ศึกษาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมที่เตรียมได้ทั้งขนาดอนุภาค ประจุพื้นผิว การกระจายขนาดและการแพร่ผ่านผิวหนังทั้งแบบภายนอกร่างกาย โดยพบว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมที่มีกรดไขมันมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยในช่วง นาโนเมตร มีศักย์ซีตาเป็นลบ และมีการกระจายขนาดที่แคบ จากการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังพบว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมที่มีกรดโอเลอิกสามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกได้มากกว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2018

: Development of ultradeformable liposomes with fatty acid for dermal delivery of
rosmarinic acid

By

1. Miss.Pajaree Termwutthichai ID 57210094
2. Miss.Apisara Nadeenok ID 57210096
3. Miss.Siriporn Amorndit ID 57210141

Advisor:

1. Assistant Professor Dr.Thirapit Subongkot (Ph.D.)
2. Dr.Samarwadee Plianwong (Ph.D)

ABSTRACT

This study was aimed to develop novel ultradeformable liposomes that contained fatty acids to improve skin penetration of rosmarinic acid. The fatty acids used for this study were oleic acid, linolenic acid and linoleic acid. The prepared ultradeformable liposomes with fatty acids were characterized for their size, size distribution and surface charge. The obtained ultradeformable liposomes with fatty acids had average size between 50 -130 nm with narrow size distribution and negative surface charge. The *in vitro* skin penetration study revealed that ultradeformable liposomes with oleic acid could significantly increase skin penetration of rosmarinic acid compared to ultradeformable liposomes.

Major Advisor.....

ณ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2561 เรื่องการพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมที่มีกรดไขมันเพื่อนำส่งกรดโรสมารินิกผ่านทางผิวหนังนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถอย่างยิ่งจากอาจารย์อิทธิพิทย์ สุปงกช อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ผู้ซึ่งกรุณาส่งมอบความรู้ ให้คำแนะนำและแนวคิดในการทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้ตั้งแต่กระบวนการดำเนินการวิจัย ตลอดถึงการแก้ไขโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณอาจารย์สมาวดี เปลี่ยนวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางเภสัชกรรมและเจ้าหน้าที่สำนักงานประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านอุปกรณ์เครื่องมือทำการทดลอง คณะกรรมการอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ทางคณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณอย่างสุดซึ้งมา ณ ที่นี้

นสภ.ปาจริย์ เต็มวุฒิชัย

นสภ.อภิสร นาคีนอก

นสภ.ศิริพร อมรดิษฐ์

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ข
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ฅ
1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 กรอบแนวคิดการวิจัย	3
1.4 สมมติฐานการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 การทบทวนวรรณกรรม	5
2.2 สารเคมีและเครื่องมือ	12
3. วิธีการดำเนินการวิจัย	14
3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดโรสมารินิก	14
3.2 การเตรียมตำรับ	14
3.3 การประเมินคุณลักษณะของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซม	16
3.3.1 การวัดขนาด ประจุพื้นผิว การกระจายขนาด การนำไฟฟ้า	16
3.3.2 การหา %Entrapment efficiency (%EE) และ %Loading efficiency (%LE)	15
3.3.3 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกกว้างกาย (<i>in vitro</i> skin penetration test)	15
3.3.3.1 การเตรียมผิวหนัง	15
3.3.3.2 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนัง	16

3.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ	18
3.5 การวิเคราะห์เชิงสถิติ	18
4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	19
4.1 การประเมินคุณลักษณะของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซม	19
4.1.1 ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดและประจุพื้นผิว (ศักย์ซีตา)	19
4.1.2 % Entrapment efficiency (%EE) และ % Loading efficiency (%LE)	20
4.1.3 การแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (<i>in vitro</i> skin penetration study)	21
5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	27

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับของลิโพโซม	15
ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค ประจุพื้นผิว และค่าการนำไฟฟ้าของสูตรต่างๆ	20
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านผิวหนัง	22
ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) กับความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 10 mcg	29
ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) กับความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกในช่วงความเข้มข้น 1 – 1000 mcg	30
ตารางที่ 6 แสดงขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่างๆ	31
ตารางที่ 7 แสดงการกระจายอนุภาคของสูตรตำรับต่างๆ	31
ตารางที่ 8 แสดงค่าศักย์ซีตาของสูตรตำรับต่างๆ	32
ตารางที่ 9 แสดง % Entrapment efficiency (%EE) และ % Loading efficiency (%LE) ของ CL ที่บรรจุกรดโรสมารินิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	32
ตารางที่ 10 แสดง %Entrapment efficiency และ % Loading efficiency ของการบรรจุกรดโรสมารินิกในลิโพโซมสูตรตำรับต่างๆ	33
ตารางที่ 11 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตร 16.64% Rosmarinic acid solution (Sol)	34
ตารางที่ 12 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่าน หนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตรตำรับ Conventional liposome (CL)	34
ตารางที่ 13 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตรตำรับ Ultradeformable liposome (UL)	35
ตารางที่ 14 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตรตำรับ UL with 0.5% Oleic acid	36
ตารางที่ 15 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin	

ของสูตรตำรับ UL with 0.5%Linoleic acid	36
ตารางที่ 16 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin	
ของสูตรตำรับ UL with 0.5%Linolenic acid	37

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างกรดโรสมารินิก	8
รูปที่ 2 แสดง % Entrapment efficiency (%EE) และ % Loading efficiency (%LE) ของกรดโรสมารินิกที่ร้อยละต่างๆของการบรรจุกรดโรสมารินิกในลิโพโซม	21
รูปที่ 3 แสดง %Entrapment efficiency (กราฟแท่ง) และ % Loading efficiency (กราฟเส้น) ของการบรรจุกรดโรสมารินิกในลิโพโซมสูตรตำรับต่างๆ	22
รูปที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดโรสมารินิกในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 10 mcg/ml	29
รูปที่ 5 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดโรสมารินิกในช่วงความเข้มข้น 1 – 1000 mcg/ml	30

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การดูดซึมผ่านทางผิวหนัง (percutaneous absorption) ของยาหรือสารสำคัญนั้นถูกจำกัดด้วยผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งทำหน้าที่เป็นชั้นกำหนดการซึมผ่าน (rate limiting step) สตราตัม คอร์เนียมเป็นผิวหนังชั้นบนสุดของชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ที่ได้รับการออกแบบมาเพื่อทำหน้าที่ปกป้องร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมี เป็นต้น ด้วยการออกแบบเพื่อการปกป้องนี้ทำให้ปริมาณการดูดซึมตัวยาลงผ่านผิวหนังเกิดขึ้นได้น้อย จึงส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของรูปแบบยาชนิดนำส่งผ่านผิวหนังและเครื่องสำอาง

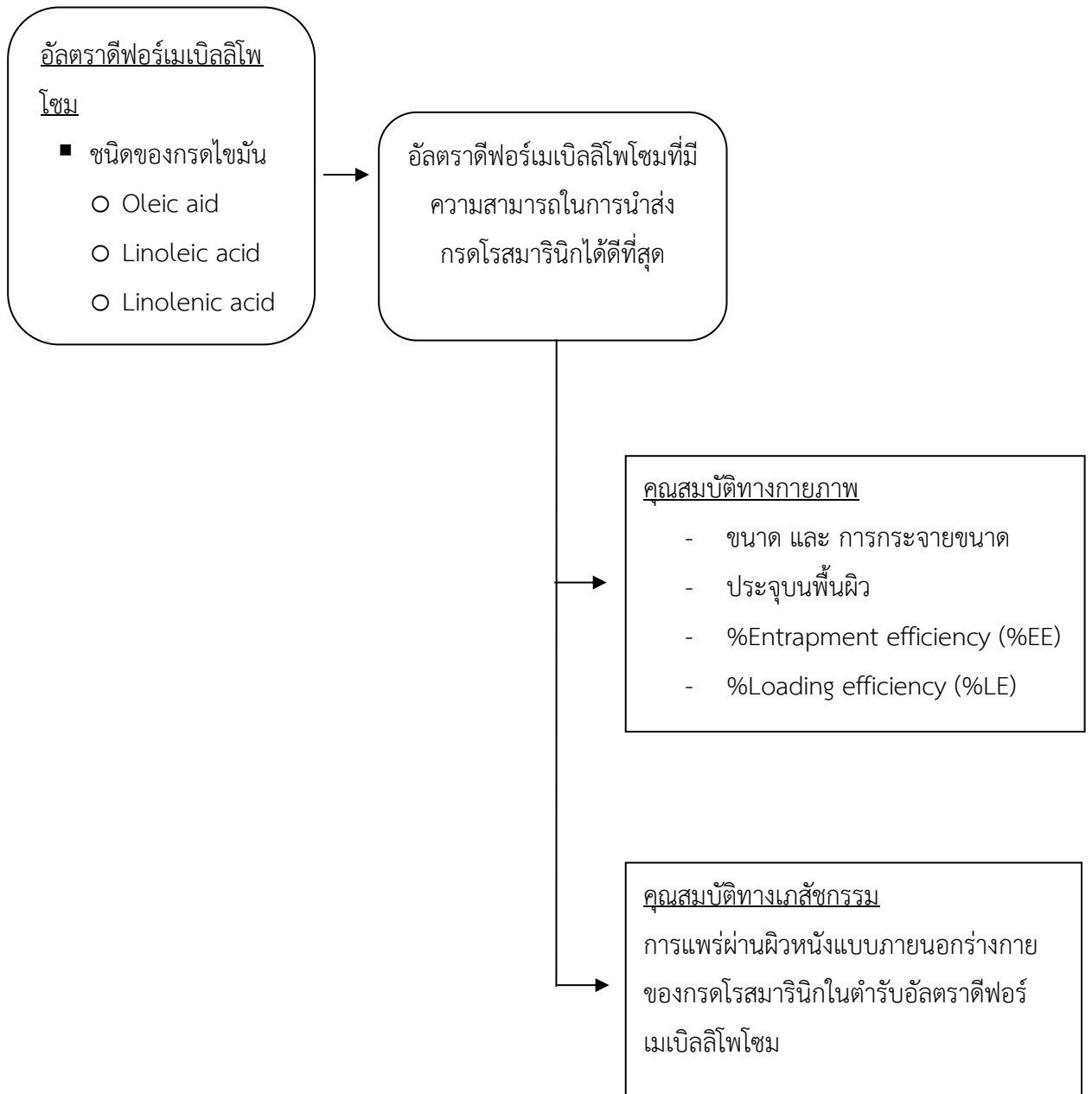
กรดโรสมารินิก (rosmarinic acid) เป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งพบได้ในธรรมชาติจากพืชตระกูลลาเมียซี (Lamiaceae) เช่น โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) เสดจ (*Salvia officinalis*) กะเพรา (*Ocimum sanctum*) เลมอนบาล์ม (*Melissa officinalis*) เป็นต้น โดยมีรายงานการวิจัยพบว่ากรดโรสมารินิกมีฤทธิ์ยับยั้งสารก่อการอักเสบ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase enzyme) ซึ่งมีผลทำให้การสร้างเม็ดสีผิวลดลงได้ด้วยเหตุนี้กรดโรสมารินิกจึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ทำให้ผิวแลดูกระจ่างใสและลบเลือนริ้วรอยได้ อย่างไรก็ตามจากคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมี พบว่ากรดโรสมารินิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 360.31 ดาลตัน $\log P=1.82$ และ $pka=3.13$

ประสิทธิภาพของเครื่องสำอางนั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ผ่านของสารสำคัญเข้าสู่ชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้ เนื่องจากผิวหนังมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ประมาณ 5 ส่งผลให้โมเลกุลของกรดโรสมารินิกมีการแตกตัวมาก ทำให้เกิดการแพร่ผ่านผิวหนังได้ไม่ดี จึงจำเป็นต้องมีระบบนำส่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมผ่านผิวหนัง คณะผู้ทำการวิจัยจึงได้พัฒนาอัลตราดีฟิวส์เมมเบรนไลโปโซมที่มีกรดไขมันซึ่งเป็นระบบนำส่งชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยมาก่อน เพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านกรดโรสมารินิกผ่านทางผิวหนังและพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของอนุภาคอัลตราดีฟอร์เมเบิลโฟโซมที่มีกรดไขมันซึ่งบรรจุกรดโรสมารินิก
2. เพื่อพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลโฟโซมที่มีกรดไขมันในการนำส่งกรดโรสมารินิกผ่านทางผิวหนัง
3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นและชนิดของกรดไขมันจำเป็นในอัลตราดีฟอร์เมเบิลโฟโซมต่อการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิก

กรอบแนวคิด



สมมติฐาน

1. คาดว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีกรดไขมันจะสามารถช่วยในการดูดซึมผ่านผิวหนังได้มากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สูตรตำรับอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีกรดไขมันซึ่งสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกได้
2. ได้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีฤทธิ์เพิ่มความกระชับใสของผิวหนัง
3. เพื่อส่งเสริมให้อุตสาหกรรมในประเทศสามารถผลิตเครื่องสำอางโดยใช้นาโนเทคโนโลยีได้

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ระบบนำส่งยาผ่านผิวหนัง (dermal drug delivery system) เป็นระบบเพื่อนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า(epidermis) และชั้นหนังแท้(dermis) อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญที่กำหนดอัตราการดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังคือผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งเป็นผิวหนังชั้นบนสุดของชั้นหนังกำพร้า ที่ทำหน้าที่ปกป้องร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมี เป็นต้น จึงทำให้การดูดซึมยาหรือสารสำคัญผ่านผิวหนังเกิดขึ้นได้น้อย โดยคุณสมบัติของสารที่สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีนั้นควรมีค่า Log P อยู่ในช่วง 1-3 และมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 500 ดาลตัน [1]

จากการศึกษาของ Menon และคณะ [2] พบว่าผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียมมีความหนาประมาณ 15 ไมโครเมตร ประกอบไปด้วยเซลล์คอร์นีโอไซต์ (corneocyte) จัดเรียงตัวแทรกอยู่ในชั้นไขมันและโปรตีน การแพร่ของสารผ่านชั้นสตราตัม คอร์เนียมสามารถเกิดได้หลายช่องทาง ได้แก่ 1.ช่องทางระหว่างเซลล์ (intercellular) 2.ช่องทางผ่านเซลล์ (transcellular) และ 3.ช่องทางผ่านรูหรือท่อต่างๆ (appendageal) ของผิวหนัง โดยสันนิษฐานว่าช่องทางผ่านรูหรือท่อนั้นไม่ใช่เส้นทางหลักในการผ่านของสารหรือยาเนื่องจากต่อมเหงื่อหรือรูขุมขนมีพื้นที่รวมคิดเป็น 0.1% ของพื้นที่ผิวกายของมนุษย์ทั้งหมด [3] อย่างไรก็ตามการขนส่งยาผ่านช่องทางนี้ก็ยังมีมีความสำคัญสำหรับอนุภาคเช่น อนุภาควัคซีนนาโนเมตร โดยการนำส่งสารชนิดนี้มักต้องใช้กลไกทางกายภาพร่วมด้วย เช่น กลไกการแพร่แบบฟาซิลิเทตของโมเลกุลที่มีประจุโดยใช้ไอออนโตโฟเรซิส (iontophoresis) นอกจากนั้นการผ่านของสารผ่านรูหรือท่อจะเริ่มด้วยการแพร่อย่างรวดเร็วในช่วงแรกก่อนจะช้าลงและเข้าสู่ช่วงสถานะคงที่ (steady-state) โดยสามารถอธิบายได้จากสมการของ Fick's first law

การนำยาหรือสารเข้าสู่ผิวหนังเกิดหลังจากทาตำรับลงบนผิว ตัวยาจะเริ่มถูกปลดปล่อยจากตัวกลาง โมเลกุลของสารจะเกิดการแพร่เป็นผลมาจากความแตกต่างของความเข้มข้นก่อนเกิดการพาร์ทิชันเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าจนถึงชั้นผิวหนังแท้ จากนั้นจะเข้าสู่ระบบหลอดเลือดและน้ำเหลือง ส่งผลให้เกิดการกำจัดยาออกจากผิวหนัง ขณะเกิดการแพร่ผ่านผิวหนังนั้นมักเกิดปฏิกิริยาระหว่างยากับโครงสร้างบางอย่างในผิวหนังเป็นผลให้การซึมผ่านถูกจำกัด โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถเป็นได้ทั้งชนิดผันกลับได้หรือผันกลับไม่ได้ เป็นเหตุให้เกิดการตอบสนองทางกายภาพ เช่น การตอบสนองต่อผลทางการรักษาของยา การตอบสนองต่อปฏิกิริยาการแพ้ยา นอกจากนั้นอาจพบการสะสมของยาใต้ผิวหนัง ซึ่งมักพบในยาที่มีลักษณะชอบไขมันหรือมีค่าพาร์

ทึบขึ้นสูง ส่งผลให้ยามีความสามารถในการแพร่เข้า จากลักษณะของสารหรือยาต่างๆ เหล่านี้ทำให้ผิวหนังมีความสามารถเป็นแหล่งสะสมสารหรือยาบางอย่างได้ โดยเฉพาะสเตียรอยด์

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้เพิ่มการดูดซึมผ่านผิวหนัง โดยวิธีทางกายภาพ ได้แก่ ไฮออนโตโฟเรซิส [4] โซโนโฟเรซิส (sonophoresis) [5] ไมโครนีเดิลส์ (microneedles) [6] และระบบอนุภาค เช่น ลิโพโซม (liposomes) [7] นิโอโซม (niosomes) [8] ไมเซลล์ (micelles) [9] เป็นต้น

อัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซม (ultradeformable liposomes) หรือทรานส์เฟอร์โซม (transfersomes) หรืออัลตราฟลักซ์เบิลลิโพโซม (ultraflexible liposomes) เป็นระบบอนุภาคลิโพโซมชนิดหนึ่งถูกนำเสนอขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Cevc และ Blume [10] อัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซม ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และเอจแอคทีเวเตอร์ (edge activator) โดยเอจแอคทีเวเตอร์มักเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดสายโซ่เดี่ยว (single chain surfactant) แม้ว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมมีประสิทธิภาพดีกว่าคอนเวนชันนอลลิโพโซม (conventional liposomes) อย่างไรก็ตามจากรายงานการวิจัยของ Subongkot และคณะ [11] พบว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังที่น้อยกว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลที่มีสารกลุ่มเทอร์พีนส์ เพื่อให้เกิดการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารสำคัญได้มากขึ้น จึงจำเป็นต้องมีสารเพิ่มการซึมผ่านให้กับระบบอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมผ่านผิวหนังของสารสำคัญ

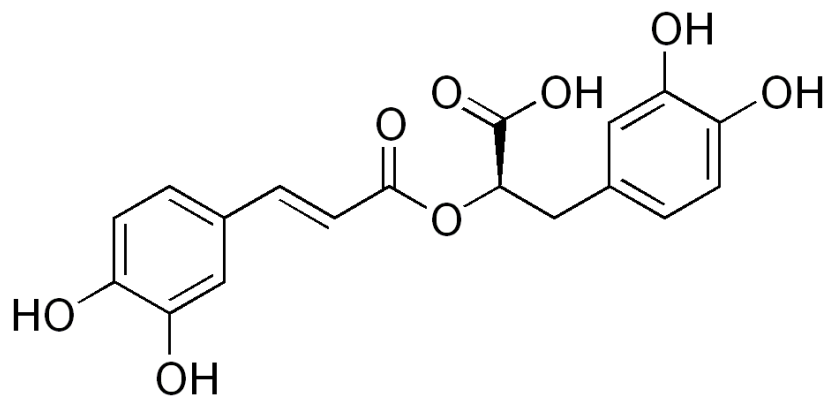
ปัจจุบันมีรายงานการใช้สารเคมีเพื่อใช้เป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังหลายชนิด เช่น สารลดแรงตึงผิว แอลกอฮอล์ เอไมด์ กรดไขมัน ไคคอล ไพโรลิโดล เทอร์พีนส์ เป็นต้น [12] โดยกรดไขมันที่นำมาใช้เป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง ได้แก่ Lauric acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Myristic acid, Oleic acid, Palmitic acid, Stearic acid และ Isostearic acid

กรดไขมันแบ่งออกได้ 2 ประเภทคือ 1. กรดไขมันไม่จำเป็น (non-essential fatty acids) ได้แก่ Lauric acid, Myristic acid และ Palmitic acid เป็นต้น อย่างไรก็ตามกรดไขมันดังกล่าวมีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังได้ [15] 2. กรดไขมันจำเป็น (essential fatty acids) ได้แก่ ไลโนเลนิก (linolenic acid หรือ omega-3) ไลโนเลอิก (linoleic acid หรือ omega-6) โอเลอิก (oleic acid หรือ omega-9) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ โดยมีรายงานว่ากรดไขมันจำเป็นสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่นให้กับผิวหนังได้ [16] และยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาถึงประสิทธิภาพของกรดไขมันจำเป็นร่วมกับอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมในการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง

Arati Naik และคณะ [3] ได้ศึกษาถึงกลไกของกรดโอเลอิกในการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังในมนุษย์ (*in vivo*) โดยทำการศึกษาในอาสาสมัครที่มีอายุ 25-50 ปี ไม่เคยมีประวัติเป็นโรคผิวหนัง การทดลองจะทำบริเวณท้องแขนของปลายแขนด้านในพื้นที่ 12 ตารางเซนติเมตร แขนด้านหนึ่งจะถูกทาด้วยสารละลายกลุ่มควบคุม ส่วนแขนอีกข้างจะถูกทาด้วยสารละลายทดสอบ ก่อนทำการทดสอบจะใช้แผ่นสำลีชุบน้ำมาดๆ เช็ดบริเวณท้องแขนก่อนที่จะทาสารละลายดังกล่าวทั้งสองข้างรวมถึงจะให้อาสาสมัครอยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ $21 \pm 1^\circ\text{C}$ มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 30-40 เป็นเวลา 45 นาที และใช้เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (ATR-IR spectroscopy) ซึ่งเป็นวิธีแบบ non-invasive ตรวจสเปกตรัมบริเวณผิวที่เวลา 25, 35 และ 45 นาที หลังจากครบเวลา 45 นาทีจะเริ่มการทดสอบโดยทาสารละลายควบคุมคือเมทานอลบริเวณท้องแขนข้างหนึ่งกว้าง 12 ตารางเซนติเมตร ส่วนแขนอีกข้างหนึ่งทาด้วยสารทดสอบคือ $[^2\text{H}]$ OA (deuterated oleic acid) ในเอทานอลเป็นบริเวณกว้าง 12 ตารางเซนติเมตรเช่นเดียวกันกับแขนอีกข้าง วิธีที่จะทำโดยจะเทสารละลายดังกล่าวลงบนแผ่นสำลีที่ใช้สำหรับการผ่าตัดกว้าง 1.5×8 เซนติเมตร หลังจากนั้นแปะทับด้วย Tegaderm[®] ขนาด 10×12 เซนติเมตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะนำแผ่นสำลีออกและเช็ดทำความสะอาดผิวด้วยแผ่นสำลีชุบเอทานอล จากนั้นให้บริเวณที่ทำการทดสอบโดนอากาศและปล่อยให้แห้งเอง 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเริ่มการวัดสเปกตรัมบริเวณที่ทดสอบและใช้เทปกาวยี่ห้อ Scotch[®] Book Tape no. 845 (3M, St. Paul, MN) ในการแปะและลอกผิว (stripping procedure) บริเวณที่ทำการทดสอบหลังตรวจวัดสเปกตรัมเสร็จทุกครั้งโดยปริมาณครั้งมากที่สุดคือ 20 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าผิวหนังบริเวณชั้นสตราตัมคอร์เนียมถูกนำออกไปกับเทปกาวจริงจึงมีการวัดน้ำหนักของเทปกาวทั้งก่อนและหลังการลอก ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักของเทปกาวซึ่งลอกมากจากแขนข้างที่ใช้ดำรับที่มี $[^2\text{H}]$ OA มีปริมาณมากกว่าน้ำหนักของเทปกาวที่ลอกมากจากข้างที่ทาด้วยสารละลายควบคุมอาจเป็นผลมาจาก $[^2\text{H}]$ OA เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไขมันชั้นสตราตัมคอร์เนียมในส่วนของชั้นที่ลึกขึ้นนั้นผลของทั้งสองดำรับไม่แตกต่างกันอาจเป็นผลเนื่องมาจากความเข้มข้นของ $[^2\text{H}]$ OA ลดลงในชั้นผิวหนังที่ลึกลงไป จากการทดลองดังกล่าวทางผู้วิจัยพบกลไกที่ทำให้การไขมันโอเลอิกสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังมนุษย์ 2 กลไก คือ 1. Lipid fluidization 2. Lipid phase separation โดยกลไกที่หนึ่งพบว่ามีผลทำให้ไขมันมีความหนืดลดลงเพียงชั้นไขมันชั้นบนเท่านั้น ส่วนกลไกที่สองเกิดจากกรดโอเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีการจัดเรียงตัวแบบ *cis*-unsaturated fatty acid รวมตัวเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นไขมันอิ่มตัวซึ่งอยู่ระหว่างชั้นไขมันที่มีลักษณะเป็นของเหลวและ

ของแข็ง จึงทำให้กรดไขมันโอเลอิกสามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านจากกลไกดังกล่าวได้โดยกลไกที่สองพบว่าอาจเป็นกลไกหลักของกรดโอเลอิกในการเพิ่มการซึมผ่านของผิวหนัง

กรดโรสมารินิก (rosmarinic acid) เป็นสารประเภทฟีนอลิก มักพบในพืชตระกูลลาเมียซี (Lamiaceae) เช่น โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) เสดจ (*Salvia officinalis*) กระเพรา (*Ocimum tenuiflorum*) เลมอน บาล์ม (*Melissa officinalis*) มีการศึกษาพบว่าโรสมารินิกมีฤทธิ์ยับยั้งสารก่อการอักเสบ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [21] และสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) มีผลทำให้เกิดการสร้างเม็ดสีผิวที่น้อยลง [17] จึงมีศักยภาพในการนำมาเป็นสารสำคัญในเครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ทำให้ผิวแลดูกระจ่างใส อย่างไรก็ตามจากคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีกรดโรสมารินิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 360.31 g/mol, log P=3, pKa=3.13 [18] แต่เนื่องจากผิวหนังมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ประมาณ 5 ทำให้กรดโรสมารินิกสามารถแตกตัวได้มาก จึงเกิดการแพร่ผ่านผิวหนังได้น้อยลง จึงจำเป็นต้องมีระบบนำส่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมผ่านผิวหนัง



รูปที่ 1 โครงสร้างกรดโรสมารินิก [13]

จากการศึกษาของ Moon DO และคณะ [19] พบว่ากรดโรสมารินิกสามารถเพิ่มการทำงานของ TNF-alpha ในการทำให้เซลล์ leukemia U937 มนุษย์ตายแบบ apoptosis โดยการกีดการทำงานของ nuclear transcription factor-kappaB (NF-kappaB) และ reactive oxygen species (ROS) และพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของกรดโรสมารินิกจะยิ่งทำให้การตอบสนองของ TNF-alpha มากยิ่งขึ้น ได้ในเซลล์ไฟโบรบลาสผิวหนังของมนุษย์โดยการยับยั้งกระบวนการ phosphorylation และ degradation ของ IkappaBalpha

จากการศึกษาของ Lee JS และคณะ [20] พบว่ากรดโรสมารินิกมีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการอักเสบได้ทั้งทาง classical pathway C3-convertase และ alternative pathway convertase แต่มีผลกับ classical pathway convertase มากกว่า ผลดังกล่าวเป็นแบบ dose-dependent โดยการศึกษาดังกล่าวได้ทำแบบ *in vitro* คือซีรัมของมนุษย์และกระต่าย

จากการศึกษาของ Kang MA และคณะ [21] พบว่าโรสมารินิกมีฤทธิ์ด้านการอักเสบและยับยั้งอนุมูลอิสระ ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ากรดโรสมารินิกสามารถยับยั้ง T-cell antigen receptor (TCR) ที่มีผลต่อการแสดงออกของ interleukin2 (IL-2) และสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell ได้ ส่วนในการทดลองนี้ได้ทำการประเมินกลไกของกรดโรสมารินิกที่มีผลต่อการส่งสัญญาณ TCR พบว่ากรดโรสมารินิกกุดการส่งสัญญาณของ TCR ซึ่งนำไปสู่การเคลื่อนที่ของแคลเซียมไอออนและมีผลยับยั้งการทำงานของ NF-AT โดยปิดกั้นเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณส่วนปลาย นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งกระบวนการ tyrosine phosphorylation ของ inducible T cells kinase (Itk) และ PLC-gamma 1

จากการศึกษาของ Lee JS และคณะ [22] ได้พิจารณาผลของกรดโรสมารินิกในการเพิ่มเม็ดสีผิว พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของกรดโรสมารินิกจะทำให้ปริมาณของเมลานินและการแสดงออกของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มมากขึ้นจากการกระตุ้นสัญญาณ protein kinase A (PKA)

จากการศึกษาของ Lee JS และคณะ [23] ในการประเมินผลของกรดโรสมารินิกต่อโรคผิวหนังอักเสบ (atopic dermatitis) โดยทา Rosmarinic acid (0.3%) emulsion บริเวณข้อศอกของผู้ป่วย 2 ครั้งต่อวันคือตอนเช้าและตอนเย็นหลังจากนั้นทำการติดตามผลหลังจากให้การรักษาไป 4 และ 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่ารอยแดงบริเวณด้านในของข้อพับแขนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาของ Ortensia และคณะ [24] เพื่อดูประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสารต้านอนุมูลอิสระกรดโรสมารินิกที่จับอยู่กับสารประกอบพอลิเมอร์ชนิดใหม่คือเดกแทรน (dextran) การประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ทำใน *in vitro* ส่วนการศึกษาความคงตัวทำแบบ *in vivo* และการศึกษาความเข้ากันระหว่างเดกแทรนและกรดโรสมารินิก วิเคราะห์โดยใช้สาร 3-[4,5-Dimethylthiaoly]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) และ EPISKIN™ model จากผลการศึกษาพบว่ากรเพิ่มเดกแทรนทำให้สารต้านอนุมูลอิสระสามารถออกฤทธิ์ได้นานมากกว่าและมีความคงตัวมากกว่าไม่มีสารพอลิเมอร์ดังกล่าว

จากการศึกษาของ Subongkot และคณะ [25] ได้ศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังของ Sodium fluorescein (NaFI) ซึ่งเป็นสารละลายน้ำดี (hydrophilic) ผ่านทางผิวหนัง โดยใช้อัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมที่มีเทอร์พีนเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนัง โดยจะทำการศึกษาถึงผลของ liposome formulation, functional groups ของโมโนเทอร์พีนซึ่งจะมีผลต่อลักษณะทางเคมีและกายภาพ (physiochemical characteristic) เช่น ขนาดของอนุภาค ประจุบนพื้นผิว entrapment efficiency (%EE) และ loading efficiency (%LE) กับการเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนังใน *in vitro* โดยใช้ confocal laser scanning microscopy (CLSM) ในการศึกษาการซึมผ่านทางผิวหนัง จากการศึกษพบว่าอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมที่ประกอบไปด้วย Phosphatidylcholine(PC) Cholesterol และ Tween 20 โดยมีเทอร์พีนเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนัง สามารถเพิ่มการซึมผ่านของ NaFI ทางผิวหนังได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการศึกษาในหนังหมู

สำหรับกลไกการผ่านผิวหนังของลิโพโซมนั้น ได้มีการศึกษาของ Subongkot และคณะ [11] โดยมีจุดประสงค์เพื่อพิจารณากลไกการผ่านผิวหนังของลิโพโซมที่ถูกดัดแปลงด้วยการเติมเทอร์พีนเพื่อช่วยให้ผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น ในการทดลองจะทำการติดตามอนุภาคลิโพโซมด้วยตัวสาร 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine triethylammonium salt (Rh-PE) และ NaFI โดยใช้เครื่อง TEM และ CLSM ในการตรวจวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่าอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมมีกลไกในการซึมผ่านทางผิวหนังได้ทั้ง 2 กลไก คือ เป็นทั้งตัวช่วยเพิ่มการซึมผ่านของผิวหนังและเป็นระบบนำส่งยา อธิบายได้จากอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมจะทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนในเซลล์และคอร์นีโอเดสโมโซม (corneodesmosomes) รวมถึงรบกวนการจับกันของไขมันระหว่างเซลล์จึงเป็นผลทำให้อัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมดังกล่าวมีผลช่วยซึมผ่านทางผิวหนังได้ทั้งช่องทางระหว่างเซลล์และภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อหากลไกต่อผิวหนังที่ใช้ในการขนส่งสารด้วยอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมของ Subongkot และคณะ [27] พบว่าลิโพโซมจะสัมผัสกับผิวหนังก่อนปลดปล่อยตัวยาออกมา หลังจากนั้นลิโพโซมจะซึมเข้าสู่ผิวหนังทางรูขุมขนและทำการปลดปล่อยตัวยาออกมาในชั้นผิวหนังที่ลึกลงไป อย่างไรก็ตามมีลิโพโซมบางส่วนที่ซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังทางอื่นที่ไม่ใช่ทางรูขุมขนแต่มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าการขนส่งยาผ่านทางผิวหนังส่งด้วยอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมนั้นใช้ transfollicular pathway เป็นช่องทางหลัก โดยมี intercellular pathway และ transcellular pathway เป็นช่องทางรองในการขนส่ง

สำหรับวิธีในการวิเคราะห์กรดไขมันจากการศึกษาของ Jing Liu และคณะ [28] ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์สารระหว่างการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว

สมรรถนะสูงและ Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) พบว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว และเหมาะสมต่อการวิเคราะห์กรดโรสมารินิกมากที่สุด สำหรับเงื่อนไขในการวิเคราะห์นั้น ผู้ศึกษาได้เลือกใช้ UV detection ที่ความยาวคลื่น 330 nm วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น 0.1% (v/v) formic acid in water : acetonitrile ในสัดส่วน 88 : 12 ใน 30 นาทีแรก แล้วจึงปรับเปลี่ยนสัดส่วนเป็น 80 : 20 เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น 70 : 30 เป็นเวลาอีก 15 นาที รวมทั้งหมด 60 นาที โดยมีอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1.0 ml/min ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตลอดทั้งการวิเคราะห์

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการวิเคราะห์กรดโรสมารินิก จากการศึกษาของ Sara Baptista da Silva และคณะ [29] ได้ทำการศึกษาพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เคอควิทิน (quercetin) และกรดโรสมารินิกทั้งในรูปแบบ สารบริสุทธิ์ สารสกัดจากพืช (sage และ savoury) และอนุภาคนาโนที่สร้างจาก encapsulated chitosan โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ในคอลัมชนิด C-18 เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และใช้ methanol:formic acid:water 92.5:2.5:5 (v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการไหลเท่ากับ 0.75 ml/min โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ในการวิเคราะห์ จากวิธีการวิเคราะห์นี้พบว่า สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างแม่นยำที่ความเข้มข้น 0.05–1 mg/ml ($R^2 = 1.00$) ทั้งระดับใน interday และ intraday โดยมีความถูกต้องอยู่ที่อัตราการ recovery เท่ากับ $90.5 \pm 0.6\%$ จึงสรุปได้ว่า สามารถใช้วิธีและเงื่อนไขดังกล่าวในการวิเคราะห์เคอควิทินและกรดโรสมารินิกในทั้งสารสกัดจากธรรมชาติ และในอนุภาคไคโตซานชนิดนาโนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2 สารเคมีและเครื่องมือ

สารเคมี

1. Rosmarinic acid (Rosmarinic acid 96%) (Rosmarinic acid , Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
2. Phospholipid (Phosphatidyl Choline>94%) (Phospholipon 90 G, Lipoid, Cologne, Germany)
3. Cholesterol (Cholesterol from lanolin $\geq$ 99.0% GC) (Cholesterol, Sigma-Aldrich, USA)
4. Tween 20 (Tween 20, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
5. Ethanol (Denatured ethanol 99.9%) (Ethanol, QReC, New Zealand)
6. Methanol (Methyl alcohol HPLC Grade) (Methanol, Honeywell Burdick & Jackson, Cheoyong-ro Nam-gu, Korea)
7. Acetonitrile (Acetonitrile isocratic grade for liquid chromatography) (Acetonitrile, LiChosolv, China)
8. Chloroform (Chloroform) (Chloroform, RCI Labscan Limited, Samutprakan province, Thailand)
9. Formic acid (Formic acid 98-100%) (Merck Emsure, Finland)
10. Phosphate buffer (PBS; pH 7.4)
11. Oleic acid (Oleic acid) (Oleic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
12. Linoleic acid (Linoleic acid) (Linoleic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
13. Linolenic acid (Linolenic acid > 70%) (Linolenic acid, Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd., Toshima, Kita-Ku, Tokyo, Japan)
14. Triton X-100 (Triton-X 100 Reagent Grade) (Triton X-100, VWR Life Science AMRESCO biochemical, Ohio, USA)

เครื่องมือ

1. Magnetic stirrer (IKA)
2. Centrifuge (SorvalITMLegend™ X1R Centrifuge, Thermo Scientific™, MA, USA)
3. HPLC (Agilent 1260 infinity II LC systems, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)
4. C18 reversed-phase column (VertiSep UPS C18, Vertical Chromatography; Nonthaburi, Thailand)
5. Sonicator bath (WUC-D22H, DAIHAN Scientific, Gangwon-do, Korea)
6. Tape strip (Scotch 3M Transparent Tape 500 24 mm x 33 m)
7. Dynamic light scattering (DLS) particle size analyzer (Zetasizer Nano-ZS; Malvern Instrument, Malvern, UK)
8. Franz diffusion cell
9. Transmission Electron Microscopy (TEM)
10. High intensity ultrasonic processor with temperature controller (SON-1 VCX-750Z, SONICS&Materials.Inc, Connecticut, USA)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดโรสมารินิก

การสร้างกราฟมาตรฐานทำการโดยการชั่งกรดโรสมารินิก ในปริมาณที่ทราบน้ำหนักแน่นอน โดยเครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Analytical balance) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 50ng/ml 100ng/ml 200ng/ml 500ng/ml 800ng/ml 1mcg/ml 2mcg/ml 10mcg/ml 20 mcg/ml 50 mcg/ml 80 mcg/ml 100 mcg/ml 200 mcg/ml 400 mcg/ml 500 mcg/ml 800 mcg/ml และ 1 mg/ml แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.2 การเตรียมตำรับ

สูตรตำรับลิโพโซมแสดงในตารางที่ 1 โดยสารละลายของกรดโรสมารินิก (rosmarinic acid solution หรือ Sol) เตรียมโดยชั่งกรดโรสมารินิก 6.39 มิลลิกรัมลงในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติมเมทานอล 0.15 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 5 มิลลิลิตร

การเตรียมคอนเวนชันนอลลิโพโซม (Conventional liposomes, CL) เตรียมจาก สารละลายของกรดโรสมารินิก (rosmarinic acid stock solution) สารละลายของฟอสโฟลิพิด และสารละลายของโคเลสเตอรอล โดยสารละลายของกรดโรสมารินิกเตรียมโดยชั่งกรดโรสมารินิก 125 มิลลิกรัมลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายของกรดโรสมารินิกในเมทานอลความเข้มข้น 25 mg/ml สารละลายของ ฟอสโฟลิพิดเตรียมโดยชั่งฟอสโฟลิพิด 0.773 กรัม แล้วจึงเติมสารละลายของคลอโรฟอร์ม:เมทานอล อัตราส่วน 2:1 v/v ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อทำละลาย จะได้สารละลายเข้มข้น (stock solution) ของฟอสโฟลิพิด สารละลายของโคเลสเตอรอลเตรียมโดยชั่งโคเลสเตอรอล 0.0618 กรัม แล้วจึงเติมสารผสมของคลอโรฟอร์ม:เมทานอล อัตราส่วน 2:1 v/v ปริมาตร 8 มิลลิลิตรเพื่อทำละลาย จะได้สารละลายเข้มข้น (stock solution) ของโคเลสเตอรอล จากนั้นจึงปิเปตสารละลาย

กรดโรสมารินิก 255.6 ไมโครลิตร สารละลายของฟอสโฟลิพิด 250 ไมโครลิตร และสารละลายของโคเลสเตอรอล 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองจากนั้นจึงนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจนเพื่อให้เกิดเป็นฟิล์มบางรอบหลอดทดลอง แล้วจึงนำฟิล์มบางที่ได้ไปเก็บในโถดูดความชื้น (Desiccator) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ต่อมาจึงเติมน้ำ 5 กรัมลงในหลอดทดลอง ก่อนจะนำไปเขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำลิโพโซมที่ได้วางลงใน ice bath แล้วนำไปลดขนาดโดยใช้ probe sonicator ที่ 10,000 จูล 20% แอมพลิจูด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วดูเอาเฉพาะส่วน supernatant ไปใช้ศึกษาต่อ

การเตรียมอัลตราดีฟอ์เมเบิลลิโพโซม (Ultradeformable liposomes, UL) เตรียมโดยนำฟิล์มบางที่ได้มาจากการผสมของสารละลายกรดโรสมารินิก ฟอสโฟลิพิดและโคเลสเตอรอล จากนั้นเติม tween 20 โดยมีสัดส่วนตามตารางที่ 1 แล้วจึงปรับน้ำหนักด้วยน้ำให้ครบ 5 กรัม จากนั้นนำไปทำการผสมด้วยเครื่องผสมสารละลาย และลดขนาดโดยใช้ probe sonicator ดังที่ได้บรรยายไปแล้วข้างต้น สำหรับการเตรียมอัลตราดีฟอ์เมเบิลลิโพโซมที่มีกรดไขมันนั้น เตรียมโดยเติมกรดไขมันที่ต้องการในสัดส่วนตามตารางที่ 1 ลงในตำรับพร้อมกับ tween 20 ก่อนนำไปปรับน้ำหนักด้วยน้ำและนำไปลดขนาดด้วย probe sonicator ตามที่ได้บรรยายไป

ตารางที่ 1 แสดงสูตรตำรับของลิโพโซม

สูตรตำรับ	โรสมารินิก (%w/w)	ฟอสโฟลิพิด (%w/w)	โคเลสเตอรอล (%w/w)	Tween 20 (%w/w)	กรดไขมัน (%w/w)	น้ำ (g)
Conventional liposomes (CL)	0.1278	0.69	0.078	-	-	qs 100
Ultradeformable liposomes (UL)	0.1278	0.69	0.078	2	-	qs 100
UL with oleic acid	0.1278	0.69	0.078	2	0.5	qs 100
UL with linoleic acid	0.1278	0.69	0.078	2	0.5	qs 100
UL with linolenic acid	0.1278	0.69	0.078	2	0.5	qs 100

3.3 การประเมินคุณลักษณะของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซม

3.3.1 การวัดขนาด ประจุพื้นผิวและการกระจายขนาด

วัดค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค ศักย์ซีตาและการกระจายขนาด โดยใช้เครื่อง photon correlation spectroscopy (PCS) particle size analyzer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) โดยใช้มุมกระเจิงที่ 173 องศา

3.3.2 การหา % Entrapment efficiency (%EE) และ % Loading efficiency (%LE)

คำนวณ %EE ของกรดโรสมารินิกที่บรรจุอยู่ในลิโพโซม โดยหาอัตราส่วนระหว่างปริมาณกรดโรสมารินิกที่บรรจุอยู่ในลิโพโซมกับปริมาณกรดโรสมารินิกทั้งหมดที่ใส่ลงไปในตัวรับ โดยการนำลิโพโซมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน ultrafiltration tube with a molecular weight cutoff of 3,000 ดาลตัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็วรอบ 10,000 ×g เป็นเวลา 60 นาที ที่ซึ่งสารละลายที่กรองออกมาได้แล้วจึงเติมน้ำ 0.25 มิลลิลิตรลงใน retentate device ก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นจึงทำให้อนุภาคลิโพโซมที่บรรจุกรดโรสมารินิกแตกออกโดยการเติม 0.1% w/v Triton X-100 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดโรสมารินิกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยจะคำนวณ %EE จากสมการที่ 1

$$\%EE = \frac{C_L}{C_i} \times 100 \quad (\text{สมการที่ 1})$$

โดย C_L คือ ปริมาณกรดโรสมารินิกที่บรรจุอยู่ในลิโพโซม และ

C_i คือ ปริมาณกรดโรสมารินิกทั้งหมดที่ใส่ลงไปในตัวรับ

และคำนวณหา %LE จากสมการที่ 2

$$\%LE = \frac{D_t}{L_t} \times 100 \quad (\text{สมการที่ 2})$$

โดย D_t คือ ปริมาณของกรดโรสมารินิกในลิโพโซม

L_t คือ ปริมาณของโคเลสเตอรอลและฟอสโฟลิพิดที่บรรจุในลิโพโซม

3.3.3 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro* skin penetration test)

3.3.3.1 การเตรียมผิวหนัง

ใช้ผิวหนังส่วนหน้าท้องของลูกหมูที่ตายแรกเกิด โดยลอกชั้นไขมันออก ใช้เฉพาะ ส่วนหนังกำพร้าและหนังแท้

3.3.3.2 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนัง

ศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกโดยใช้ Franz diffusion cells โดยในส่วน receiver compartment บรรจุ 50% v/v เอทานอลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งคนด้วย magnetic bar โดย diffusion cell แต่ละเซลล์ นั้นจะต่อกับ circulating water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 32 องศาเซลเซียสตลอดเวลา โดยจะเก็บสารละลาย ใน receiver compartment ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย ที่เก็บมาไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดโรสมารินิกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง (HPLC) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดโรสมารินิกที่อยู่ผิวหนัง ของหมูในชั้นสตราตัม คอร์เนียมกับชั้นของ viable epidermis และ dermis โดยใช้ กระดาษที่ชุบผิวหนังหมูด้านสตราตัม คอร์เนียม 20 ครั้ง แล้วนำผิวหนังไปแช่น้ำหนัก และวัดความหนา จากนั้นนำไปลอกชั้นสตราตัม คอร์เนียมออกโดยวิธี Tape strip method โดยใช้เทปกาวยี่ห้อ Scotch 3M Transparent Tape 500 ขนาด 24 mm x 33 mm แบนลงบนผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียมแล้วลอกออกทั้งหมด 40 ครั้ง จากนั้นนำเทป กาวทั้งหมดใส่ลงในขวดแล้วเติมเอทานอล 10 มิลลิลิตรลงไปแล้วนำไปวางใน sonicator baths เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายเอทานอลที่ได้ 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 15,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ สารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณกรดโรสมารินิกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะ สูงเพื่อหาปริมาณสารในผิวหนังชั้นสตราตัม คอร์เนียมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ กรดโรสมารินิกที่อยู่ผิวหนังของหมูในชั้น viable epidermis และชั้นหนังแท้ค้นหาได้จากการ นำหนังหมูที่เหลือจากการลอกสตราตัม คอร์เนียมออก ซึ่งผิวหนังจะเหลือเพียงชั้น viable epidermis และชั้นหนังแท้มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเติมเอทานอล 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป วางใน sonicator baths เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายเอทานอลที่ได้ 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณกรดโรสมารินิกด้วย เครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อหาปริมาณของกรดโรสมารินิกในผิวหนังชั้น viable epidermis และชั้นหนังแท้

3.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

วิเคราะห์ปริมาณกรดโรสมารินิก โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น Acetonitrile:0.5% v/v formic acid อัตราส่วน 30:70 v/v ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ที่อัตราการไหล 1 ml/min โดยมีปริมาตรการฉีด (injection volume) 20 ไมโครลิตร

3.5 การวิเคราะห์เชิงสถิติ

ใช้ Analysis of variance (One way ANOVA) ตามด้วย Post hoc test โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P-value ต่ำกว่า 0.05

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การประเมินคุณลักษณะของอัลตราติฟอรัเมเบิลลิโพโซม

4.1.1 ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดและประจุพื้นผิว (ศักย์ซีตา)

ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายขนาดและประจุพื้นผิว (ศักย์ซีตา) แสดงในตารางที่ 2 จากการศึกษาพบว่าขนาดอนุภาคของลิโพโซมจากทุกสูตรตำรับอยู่ในช่วง 50.37 - 130.37 นาโนเมตร CL มีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคที่มากกว่า UL, UL with oleic acid, UL with linolenic acid และ UL with linoleic acid อย่างมีนัยสำคัญ และ UL มีค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคที่มากกว่า UL with linolenic acid และ UL with linoleic acid อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของ UL ไม่แตกต่างจาก UL with oleic acid ในส่วนของอัลตราติฟอรัเมเบิลลิโพโซมที่มีกรดไขมันนั้นมีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 50.37 - 59.82 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคของ UL with oleic acid, UL with linolenic acid และ UL with linoleic acid ไม่แตกต่างกัน เนื่องจาก UL มีค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคมากกว่า CL อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการเติม tween 20 มีผลให้ขนาดอนุภาคลิโพโซมเล็กลง นอกจากนั้นการเติมกรดไลโนเลอิกและกรดไลโนเลนิกส่งผลให้ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของอัลตราติฟอรัเมเบิลลิโพโซมที่เตรียมได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ขนาดของอนุภาคลิโพโซมที่เตรียมได้ในทุกสูตรตำรับมีค่าการกระจายขนาดแคบ ($PDI < 0.4$) แสดงให้เห็นว่าในแต่ละสูตรอนุภาคลิโพโซมที่เตรียมได้มีขนาดที่สม่ำเสมอ

ศักย์ซีตาของสูตรตำรับลิโพโซมทุกสูตรมีค่าเป็นลบอยู่ในช่วง -13.20 ถึง -18.20 mV ค่าเฉลี่ยศักย์ซีตาของ CL ไม่แตกต่างจาก UL โดย UL มีค่าศักย์ซีตาเป็นลบน้อยกว่า UL with oleic acid และ linoleic acid ส่วนค่าเฉลี่ยศักย์ซีตาของสูตรตำรับ UL with oleic acid และ UL with linoleic acid ไม่แตกต่างกัน โมเลกุลของฟอสฟาติดีลโคลีนนั้นมีลักษณะเป็น zwitterionic compound คือมีทั้งประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตและประจุบวกจากหมู่โคลีน โดยมีค่า isoelectric point (pI) อยู่ระหว่าง 6-6.7 เนื่องจากการเตรียมลิโพโซมนั้นใช้น้ำเป็นตัวทำละลายโดยมีค่าความเป็นกรดต่างที่เป็นกลาง ($pH \sim 7$) ซึ่งสูงกว่าค่า pI ทำให้โมเลกุลของฟอสฟาติดีลโคลีนแสดงประจุลบ พื้นผิวอนุภาคลิโพโซมจึงมีประจุเป็นลบจากหมู่ฟอสเฟตในโครงสร้างของฟอสฟาติดีลโคลีน นอกจากนี้กรดโรสมารินิกมีค่า

$pka=3.13$ ในสภาวะดังกล่าวกรดโรสมารินิกจึงแตกตัวให้ประจุลบด้วย ค่าศักย์ซีตาของ CL และ UL จึงเป็นลบ

เนื่องจากโมเลกุลของกรดไขมัน (oleic acid, linolenic acid, linoleic acid) มีหมู่คาร์บอกซิลิกที่สามารถแตกตัวแสดงประจุลบได้ จึงทำให้ค่าศักย์ซีตาของสูตรลิโพโซมที่มีกรดไขมันมีประจุเป็นลบมากกว่า CL และ UL

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาคและประจุพื้นผิว

Formulation	Particle size (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)
CL	130.37 $\pm$ 5.06	0.3977 $\pm$ 0.0699	-15.57 $\pm$ 0.21
UL	71.28 $\pm$ 7.50	0.2787 $\pm$ 0.0238	-14.80 $\pm$ 0.78
UL with 0.5% oleic acid	59.82 $\pm$ 17.27	0.3217 $\pm$ 0.1001	-18.03 $\pm$ 0.35
UL with 0.5% linoleic acid	50.37 $\pm$ 0.31	0.2447 $\pm$ 0.0078	-18.20 $\pm$ 2.43
UL with 0.5% linolenic acid	53.39 $\pm$ 2.34	0.2653 $\pm$ 0.0140	-13.20 $\pm$ 0.70

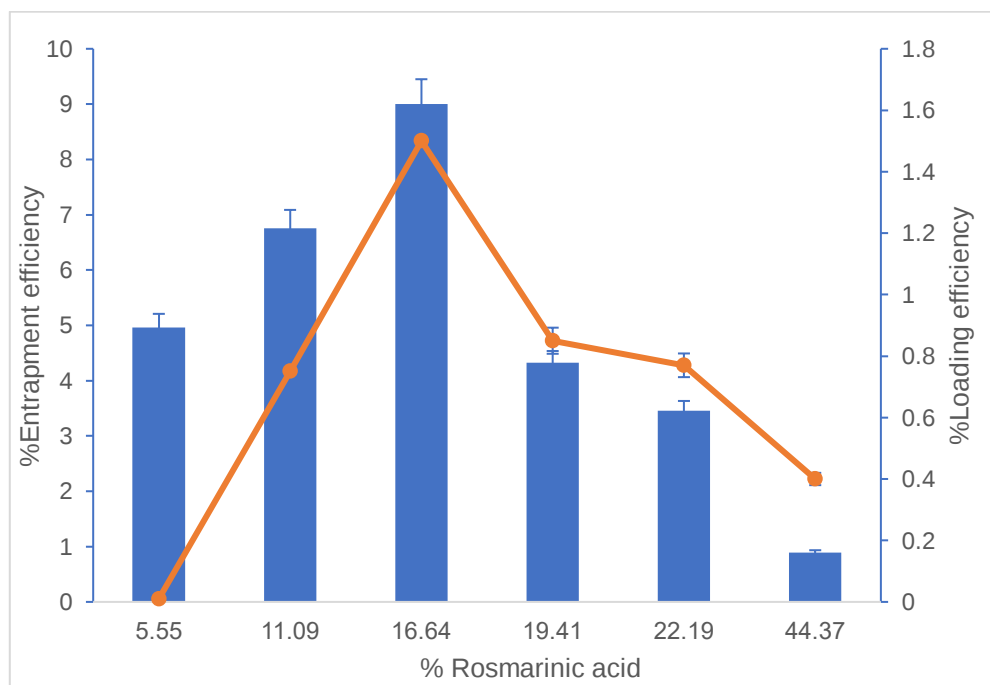
Each value represents the mean $\pm$ standard deviation (n = 3).

4.1.2 % Entrapment efficiency (%EE) และ % Loading efficiency (%LE)

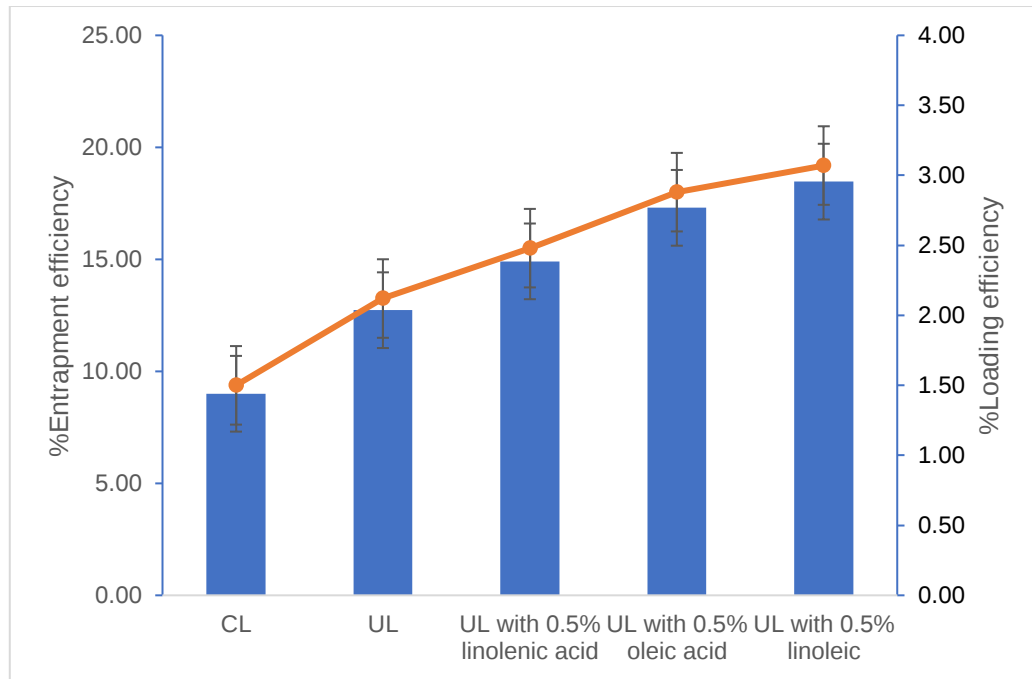
%EE และ %LE ของปริมาณกรดโรสมารินิกที่บรรจุอยู่ในลิโพโซม แสดงในรูปที่ 2 พบว่า %EE มีค่าอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 0.89 ถึงร้อยละ 9.00 เมื่อดูจากค่า %EE พบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4.96 ที่ความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกร้อยละ 5.5 จนถึงร้อยละ 9.00 ที่ความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกร้อยละ 16.64 หลังจากนั้นจึงมีแนวโน้มของ %EE ที่ลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกมากขึ้น เมื่อพิจารณา ค่า %LE พบว่ามีแนวโน้มเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับ %EE คือมีค่าร้อยละ 0.01 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.55 และเพิ่มสูงสุดที่ร้อยละ 1.5 ที่ความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกร้อยละ 16.64 เช่นเดียวกัน และความเข้มข้นที่มากขึ้นก็พบว่า %LE มีแนวโน้มที่ลดลง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาณการบรรจุกรดโรสมารินิกในลิโพโซมความเข้มข้นร้อยละ 16.64 w/w เมื่อเทียบกับน้ำหนักของไขมันที่ใช้ในการเตรียมลิโพโซม ซึ่งให้ค่า %EE และ %LE มากที่สุด

%EE และ %LE ของปริมาณกรดโรสมารินิกที่ความเข้มข้น 16.64 %w/w ที่ถูกบรรจุอยู่ในลิโพโซมในแต่ละสูตรตำรับ แสดงในรูปที่ 3 พบว่า %EE มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ

9.00 ถึงร้อยละ 18.47 ส่วนค่า %LE อยู่ในช่วงร้อยละ 1.50 ถึงร้อยละ 3.07 เมื่อดูจากค่า %EE พบว่า CL มีค่าน้อยกว่า UL, UL with linolenic acid, UL with oleic acid และ UL with linoleic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย UL มี %EE น้อยกว่า UL with oleic acid และ UL with linoleic acid ส่วน UL with linolenic acid, UL with oleic acid และ UL with linoleic acid มีค่า %EE ไม่แตกต่างกัน เมื่อดูค่า %LE พบว่า CL มีค่าน้อยกว่า UL, UL with linolenic acid, UL with oleic acid และ UL with linoleic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย UL มีค่า %LE น้อยกว่า UL with oleic acid และ UL with linoleic acid ส่วน UL with linolenic acid, UL with oleic acid และ UL with linoleic acid มี %LE ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากกรดโรสมารินิกสามารถละลายได้ดีในไขมัน การเติม tween 20 และกรดไขมันจึงสามารถเพิ่มการกักเก็บของกรดโรสมารินิกในลิโพโซมได้



รูปที่ 2 แสดง % Entrapment efficiency (กราฟแท่ง) และ % Loading efficiency (กราฟเส้น) ของกรดโรสมารินิกที่ร้อยละต่างๆของการบรรจุกรดโรสมารินิกในลิโพโซม



รูปที่ 3 แสดง % Entrapment efficiency (กราฟแท่ง) และ % Loading efficiency (กราฟเส้น) ของการบรรจุกรดโรสมารินิกในลิโปโซมสูตรตำรับต่างๆ

4.1.3 การแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro* skin penetration study)

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกแบบภายนอกร่างกายของสูตร Sol, UL, UL with 0.5% oleic acid, UL with 0.5% linoleic acid และ UL with 0.5% linolenic acid

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านผิวหนัง

Formulation	SC (mcg/cm ²)	Deeper skin (mcg/cm ²)	ER ¹	ER ²
Sol	2.70 ± 0.53	0.19 ± 0.03	-	-
UL	0.38 ± 0.16	0.43 ± 0.22	2.26	-
UL with 0.5% oleic acid	1.13 ± 0.10	1.76 ± 0.41	9.26	4.09
UL with 0.5% linoleic acid	0.46 ± 0.16	1.40 ± 0.72	7.37	3.26
UL with 0.5% linolenic acid	1.91 ± 0.64	1.11 ± 0.99	5.84	2.58

Each value represents the mean ± standard deviation (n = 3).

หมายเหตุ

- Deeper skin = viable epidermis and dermis

- ER^1 = ปริมาณของกรดโรสมารินิกที่อยู่ในผิวหนังชั้น Deeper skin (mcg/cm^2) / ปริมาณของกรดโรสมารินิกที่อยู่ในผิวหนังชั้น Deeper skin ของตำรับ Sol (mcg/cm^2)
- ER^2 = ปริมาณของกรดโรสมารินิกที่อยู่ในผิวหนังชั้น Deeper skin (mcg/cm^2) / ปริมาณของกรดโรสมารินิกที่อยู่ในผิวหนังชั้น Deeper skin ของตำรับ UL (mcg/cm^2)

สูตรตำรับของลิโพโซม ได้แก่ UL, UL with 0.5% oleic acid, UL with 0.5% linoleic acid และ UL with 0.5% linolenic acid สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกได้มากกว่า Sol ได้อย่างมีนัยสำคัญ มีเพียง UL with 0.5% oleic acid ที่สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกได้มากกว่า UL อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกระหว่าง UL with 0.5% oleic acid, UL with 0.5% linoleic acid และ UL with 0.5% linolenic acid

เมื่อพิจารณาจาก ER^1 พบว่า UL with 0.5% oleic acid, UL with 0.5% linoleic acid และ UL with 0.5% linolenic acid สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกได้มากกว่า Sol 9.88, 8.10 และ 6.56 เท่าตามลำดับ เมื่อพิจารณาจาก ER^2 พบว่า UL with 0.5% oleic acid, UL with 0.5% linoleic acid และ UL with 0.5% linolenic acid สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกได้มากกว่า UL 5.78, 4.42 และ 4.58 เท่าตามลำดับ

การแพร่ของสารผ่านชั้นผิวหนังสามารถเกิดได้หลายช่องทาง ได้แก่ ช่องทางระหว่างเซลล์ (Intercellular pathway) ช่องทางผ่านเซลล์ (Transcellular pathway) และช่องทางผ่านรูหรือท่อต่างๆ (transappendageal pathway) จากการศึกษาของ Subongkot และคณะ [11,25] พบว่าอัลตราดีฟอรัสมิลลิโพโซมที่ประกอบไปด้วยเทอร์พีนสามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของ NaFl ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยนำส่งผ่านทาง Appendage เป็นช่องทางหลัก และผ่านทาง Intercellular และ Transcellular เป็นช่องทางรอง สันนิษฐานว่าอัลตราดีฟอรัสมิลลิโพโซมที่ประกอบด้วยกรดโอเลอิกจะสามารถนำส่งกรดโรสมารินิกทางผิวหนังผ่านช่องทาง Appendageal เป็นช่องทางหลักเช่นกัน โดยกรดโอเลอิกจะช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังจากการทำให้โปรตีนและคอร์นีโอเดสโมโซม (corneodesmosome) เสียสภาพ นอกจากนี้ยังทำให้การจัดเรียงตัวของไขมันในชั้นผิวหนังหละหลวมขึ้น ส่งผลให้อัลตราดีฟอรัสมิลลิโพโซมที่ประกอบด้วยกรดโอเลอิกสามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิก

เนื่องจาก UL with 0.5% oleic acid สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านทางผิวหนังของกรดโรสมารินิกได้มากที่สุดจึงเลือกสูตรตำรับนี้ไปทำการศึกษาต่อ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการเตรียมอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีกรดไขมันเพื่อนำส่งกรดโรสมารินิกผ่านทางผิวหนัง อนุภาคอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีกรดไขมันนั้นมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 50 - 60 นาโนเมตร มีประจุพื้นผิวเป็นลบและมีการกระจายขนาดที่แคบ จากการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิกพบว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีกรดไขมันสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้มากกว่ารูปแบบสารละลายและอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมแสดงให้เห็นว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีกรดไขมันมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของกรดโรสมารินิก และมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสูตรตำรับเครื่องสำอางต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technolo Today*. 9 (2000) 318-326.
2. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm*. 435 (2012) 3-9.
3. Naik A, Pechtold LARM, Potts RO, Guy RH. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement *in vivo* in humans. *J Control Release*. 37 (1995) 299-306.
4. Lobo S, Yan G. Improving the direct penetration into tissues underneath the skin with iontophoresis delivery of a ketoprofen cationic prodrug. *Int J Pharm*. 535 (2018) 238-236.
5. Souza J, Meira A, Volpato NM, Mayorga P, Gottfried C.
Effect of phonophoresis on skin permeation of commercial antiinflammatory gels: sodium diclofenac and ketoprofen. *Ultrasound Med Biol*. 39 (2013) 1623-1630.
6. Ripolin A, Quinn J, Larrañeta E, Vicente-Perez EM, Barry J, Donnelly RF. Successful application of large microneedle patches by human volunteers. *Int J Pharm*. 521 (2017) 92-101.
7. Shah SM, Ashtikar M, Jain AS, Makhija DT, Nikam Y, Gude RP, et.al.
LeciPlex, invasomes, and liposomes: A skin penetration study. *Int J Pharm*. 490 (2015) 391-403.
8. Balakrishnan P, Shanmugam S, Lee WS, Lee WM, Kim JO, Oh DH, et al.
Formulation and *in vitro* assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery. *Int J Pharm*. 377 (2009) 1-8.
9. Laredj-Bourezg F, Bolzinger MA, Pelletier J, Valour JP, Rovère MR, Smatti B, et.al.
Skin delivery by block copolymer nanoparticles (block copolymer micelles). *Int J Pharm*. 496 (2015) 1034-1046.
10. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta*. 1104 (1992) 226-232.

11. Subongkot T, Duangjit S, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Ultradeformable liposomes with terpenes for delivery of hydrophilic compound. *J Liposome Res.* 22 (2012) 254-262.
12. Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* 447 (2013) 12-21.
13. Parisi OI, Puoci F, Restuccia D, Farina G. Polyphenols and Their Formulations: Different Strategies to Overcome the Drawbacks Associated with Their Poor Stability and Bioavailability. *Academic press.* 1 (2014) 29-45.
14. Williams AC, Barry BW. Terpene and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm Res.* 8 (1991) 17-24.
15. NOAA Office of Response and Restoration U. Lauric acid CAMEO Chemicals [database on the Internet]. *Cameochemicals.noaa.gov.* 2018 [cited 30 March 2018]. Available from: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/17822>
16. Declair V. The usefulness of topical application of essential fatty acids (EFA) to prevent pressure ulcers. *Ostomy Wound Manage.* 43 (1997) 48-52.
17. Lin L, Dong Y, Zhao H, Wen L, Yang B, Zhao M. Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedalin isolated from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA as inhibitors of tyrosinase and α -glucosidase. *Food Chem.* 129 (2011) 884-889.
18. Showing Compound Rosmarinic acid (FDB002427). *FoodDB* [database on the Internet]. *Foodb.ca.* 2018 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://foodb.ca/compounds/FDB002427>
19. Moon D, Kim M, Lee J, Choi Y, Kim G. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Letters.* 288 (2010) 183-191.
20. Peake P, Pussell B, Martyn P, Timmermans V, Charlesworth J. The inhibitory effect of rosmarinic acid on complement involves the C5 convertase. *Int J Immunopharmacol.* 13 (1991) 853-857.

21. Kang M. Rosmarinic acid inhibits Ca^{2+} -dependent pathways of T-cell antigen receptor-mediated signaling by inhibiting the PLC-gamma 1 and Itk activity. *Blood*. 101 (2003) 3534-3542.
22. Lee J, Kim Y, Park D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. *Biochem Pharmacol*. 74 (2007) 960-968.
23. Lee J, Jung E, Koh J, Kim Y, Park D. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *J Dermatol*. 35 (2008) 768-771.
24. Parisi O, Malivindi R, Amone F, Ruffo M, Malanchin R, Carlomagno F, et al. Safety and Efficacy of Dextran-Rosmarinic Acid Conjugates as Innovative Polymeric Antioxidants in Skin Whitening: What Is the Evidence. *Cosmetics*. 4 (2017) 28.
25. Subongkot T, Pamornpathomkul B, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Investigation of the mechanism of enhanced skin penetration by ultradeformable liposomes. *Int J Nanomedicine*. 9 (2014) 3539-3550.
26. Subongkot T, Ngawhirunpat T. Effect of liposomal fluidity on skin permeation of sodium fluorescein entrapped in liposomes. *Int J Nanomedicine*. 10 (2010) 4581-4529.
27. Subongkot T, Wonglertnirant N, Songprakhon P, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Visualization of ultradeformable liposomes penetration pathways and their skin interaction by confocal laser scanning microscopy. *Int J Pharm*. 441 (2013) 151-161.
28. Liu J, Wan Y, Zhao Z, Chen H. Determination of the content of rosmarinic acid by HPLC and analytical comparison of volatile constituents by GC-MS in different parts of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Chem Cent J*. 7 (2013) 61.
29. da Silva S, Oliveira A, Ferreira D, Sarmiento B, Pintado M. Development and Validation Method for Simultaneous Quantification of Phenolic Compounds in Natural Extracts and Nanosystems. *Phytochem Anal*. 24 (2013) 638-644.

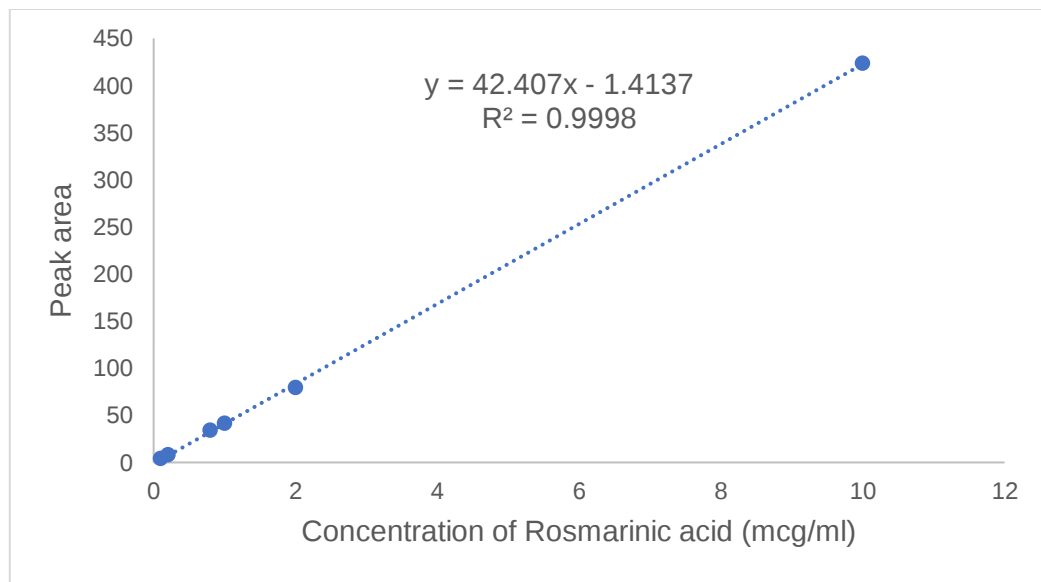
ภาคผนวก

1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของกรดโรสมารินิก

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ (average peak area) กับความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 10 mcg/ml

ความเข้มข้น (mcg/ml)	Average peak area
0.1	3.85
0.1	7.9
0.8	33.75
1	41.25
2	79.4
10	423.3

นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์หาสมการเส้นตรงของ average peak area กับความเข้มข้นของกรดโรสมารินิก



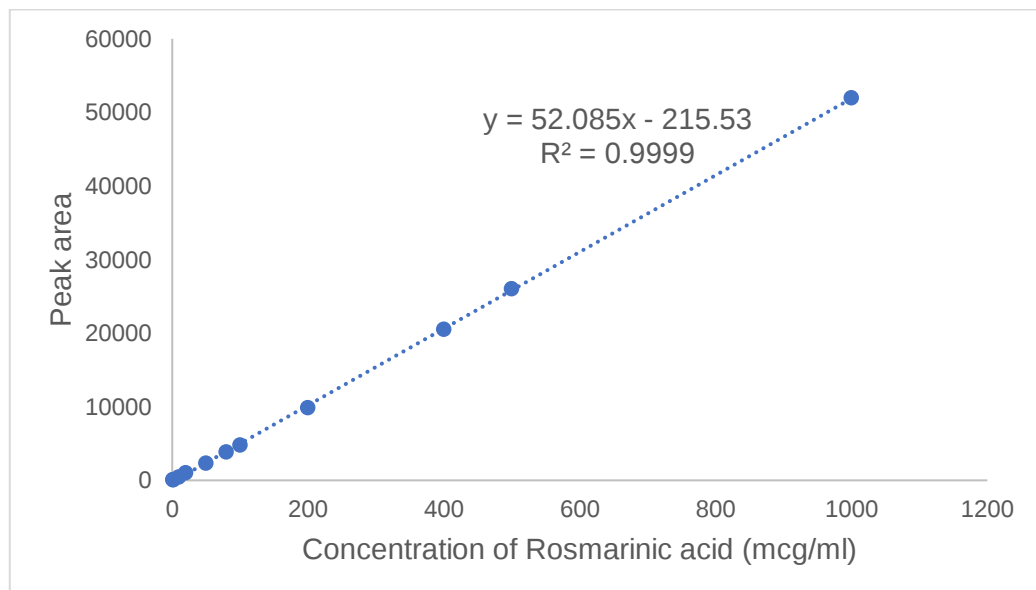
รูปที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดโรสมารินิกในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 10 mcg/ml

จากกราฟจะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกกับ average peak area เป็น $y = 42.407x - 1.4137$ ($R^2 = 0.9998$)

ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ (average peak area) กับความเข้มข้นของกรดโรสมารินิกในช่วงความเข้มข้น 1 – 1000 mcg/ml

ความเข้มข้น (mcg/ml)	Average peak area
1	41.25
2	79.4
10	423.3
20	983.45
50	2306.45
80	3810.4
100	4770.1
200	9841.05
400	20509.1
500	26019.75
1000	51921.45

นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์หาสมการเส้นตรงของ average peak area กับความเข้มข้นของกรดโรสมารินิก



รูปที่ 5 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดโรสมารินิกในช่วงความเข้มข้น 1 – 1000 mcg/ml

จากกราฟจะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของกรดโรสมารินิก กับ average peak area เป็น $y = 52.085x - 215.53$ ($R^2 = 0.9999$)

2. ขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค ประจุพื้นผิว และค่าการนำไฟฟ้าของสูตรต่างๆ

ตารางที่ 6 แสดงขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่างๆ

Formulation	Particle size (nm)		
	N1	N2	N3
Conventional liposomes (CL)	125.50	130.00	135.60
Ultradeformable liposome (UL)	63.75	71.33	78.75
UL with 0.5% oleic acid	49.28	50.44	79.75
UL with 0.5% linoleic acid	50.20	50.72	50.18
UL with 0.5% linolenic acid	50.83	53.90	55.43

ตารางที่ 7 แสดงการกระจายขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่างๆ

Formulation	Polydispersity index (PDI)		
	N1	N2	N3
Conventional liposomes (CL)	0.3170	0.4370	0.4390
Ultradeformable liposome (UL)	0.2830	0.2530	0.3000
UL with 0.5% oleic acid	0.2500	0.2790	0.4360
UL with 0.5% linoleic acid	0.2470	0.2510	0.2360
UL with 0.5% linolenic acid	0.2520	0.2800	0.2640

ตารางที่ 8 แสดงค่าศักย์ซีตาของสูตรตำรับต่างๆ

Formulation	Zeta potential (mV)		
	N1	N2	N3
Conventional liposomes (CL)	-15.8	-15.5	-15.4
Ultradeformable liposome (UL)	-14.3	-15.7	-14.4
UL with 0.5% oleic acid	-18	-17.7	-18.4
UL with 0.5% linoleic acid	-15.4	-19.5	-19.7
UL with 0.5% linolenic acid	-12.4	-13.5	-13.7

3. % Entrapment efficiency (%EE) และ % Loading efficiency (%LE)

ตารางที่ 9 แสดง % Entrapment efficiency (%EE) และ % Loading efficiency (%LE) ของ CL ที่บรรจุกรดโรสแมรินิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

%Rosmarinic acid of lipid weight (%w/w)	%EE	%LE
5.55	4.96 ± 0.25	0.01 ± 0.01
11.09	6.75 ± 0.04	0.75 ± 0.00
16.64	9.00 ± 0.46	1.50 ± 0.08
19.41	4.32 ± 0.29	0.85 ± 0.07
22.19	3.46 ± 0.43	0.77 ± 0.10
44.37	0.89 ± 0.06	0.40 ± 0.03

ตารางที่ 10 แสดง %Entrapment efficiency และ % Loading efficiency ของการบรรจุกรดไขมันในลิโปโซมสูตรตำรับต่างๆ

Formulation	%EE	%LE
CL	9.00 ± 0.46	1.50 ± 0.08
UL	12.73 ± 4.16	2.12 ± 0.69
UL with 0.5% linolenic acid	14.91 ± 0.84	2.48 ± 0.03
UL with 0.5% oleic acid	17.30 ± 1.00	2.88 ± 0.17
UL with 0.5% linoleic	18.47 ± 0.16	3.07 ± 0.14

4. การแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro* skin penetration study)

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตร 16.64% Rosmarinic acid solution (Sol)

SC				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	76	1.825493433	2.139107	2.560171276
N2	70.7	1.700514066	2.270714	2.246668756
N3	98.1	2.34663381	2.139107	3.291046886
avg				2.69929564

Deeper skin				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	5.38079	0.160220954	2.139107	0.22470258
N2	3.93985	0.12624213	2.270714	0.166787358
N3	3.60247	0.118286368	2.139107	0.165891236
avg				0.185793725

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตรตำรับ Conventional liposome (CL)

SC				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	5.7	0.167748249	2.689107	0.187141957
N2	3.4	0.11351192	2.270714	0.149968583
N3	2.4	0.089930908	2.270714	0.118814048
avg				0.151974863

Deeper skin				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	42.2	1.028455208	2.689107	1.147356957
N2	18.4	0.467227109	2.270714	0.617286601
N3	40.6	0.990725588	2.270714	1.308917267
avg				1.024520275

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตรตำรับ Ultradeformable liposome (UL)

SC				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	19	0.481375716	2.689107	0.537028519
N2	10.6	0.283295211	2.139107	0.397308612
N3	6.1	0.177180654	2.40625	0.220900556
avg				0.385079229

Deeper skin				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	18	0.457794704	2.689107	0.510721258
N2	4.2	0.13237673	2.139107	0.185652326
N3	19.1	0.483733818	2.40625	0.603096708
avg				0.433156764

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตรตำรับ UL with 0.5% Oleic acid

SC				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	36.8	0.90111774	2.689107	1.005297751
N2	36.8	0.90111774	2.270714	1.190530036
N3	38.8	0.948279765	2.40625	1.182270876
avg				1.126032888

Deeper skin				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	50.9	1.233610017	2.689107	1.376230121
N2	68.7	1.653352041	2.270714	2.184359687
N3	57.4	1.386886599	2.40625	1.72910537
avg				1.763231726

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตรตำรับ UL with 0.5% Linoleic acid

SC				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	19.1	0.483733818	2.689107	0.539659245
N2	15.6	0.401200274	2.139107	0.562665084
N3	7.6	0.212552173	2.270714	0.280817628
avg				0.461047319

Deeper skin				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	20.9	0.52617964	2.689107	0.587012313
N2	48.3	1.172299385	2.139107	1.644096417
N3	61.6	1.485926852	2.270714	1.963162492
avg				1.398090407

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณกรดโรสมารินิกที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC และ Deeper skin ของสูตรตำรับ UL with 0.5%Linolenic acid

SC				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	82.7	1.983486217	2.270714	2.620523171
N2	58.3	1.40810951	2.40625	1.755565104
N3	39.7	0.969502676	2.139107	1.359683283
avg				1.911923853

Deeper skin				
	auc	conc(mcg/ml)	Surface area (cm ²)	mcg/cm ²
N1	5.7	0.167748249	2.270714	0.221624012
N2	72.8	1.750034192	2.40625	2.181860811
N3	26.7	0.662949513	2.139107	0.929756454
avg				1.111080426

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ

การพัฒนาอัลตราตีฟอร์มเบิลลิโพโซมที่มีกรดไขมันเพื่อนำส่งกรดโรสมารินิกผ่านทางผิวหนัง

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ภก.ผศ.อ.ดร. ธีรพิทย์ สุปงกช

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม ถึงวันที่ 20 ธันวาคม 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 11 เดือน 20 วัน ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2561

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ 10,500 บาท เมื่อวันที่ 4 กันยายน 2561

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าวัสดุ	10,500	10,500	0
รวม	10,500	10,500	0

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

Plagiarism Checking Report

Created on Dec 19, 2018 at 16:22 PM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
1081567	Dec 19, 2018 at 16:22 PM	57210096@my.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	Projectfinal_rosmarinic.docx	Completed	0.00 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
No data available in table				

TEXT FROM SUBMITTED DOCUMENT

TEXT FROM SOURCE DOCUMENT(S)