



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินดามัยซินลิโปโซม
Development of azelaic acid-clindamycin liposome

โดย

นสภ. ปรัชญา ประทุมไทย	57210193
นสภ. อารดา งามละเมียด	57210227
นสภ. อภิสรรา ต่อทีมะ	57210261

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินดามัยซินลิโปโซม

Development of azelaic acid-clindamycin liposome

โดย

นสภ. ปัฐยา ประทุมไทย	57210193
นสภ. อารดา งามละเมียด	57210227
นสภ. อามิสรา ต่อทีชะ	57210261

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

งานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินดามัยซินลิโปโซม เนื่องจากในทางคลินิกมีการนำกรดอะซีลาอิกไปใช้ในการรักษาสิวและสามารถฆ่าเชื้อ *Cutibacterium acnes*. ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดสิบรวมถึงลดการเกิดสิวอุดตันได้และมีความปลอดภัยในเรื่องของผลข้างเคียงจากการใช้ยา การนำกรดอะซีลาอิกและคลินดามัยซินมาใช้ร่วมกัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนสิวและการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยาสูตรตำรับเดียว

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจทำการวิจัยสูตรตำรับผสมระหว่างกรดอะซีลาอิกกับคลินดามัยซินในรูปแบบลิโปโซม เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาและเพิ่มประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและต้านการอักเสบ รวมถึงศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับ ทางผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ หากมีความผิดพลาดประการใดทางคณะผู้วิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

20 ธันวาคม 2561

Senior Project Academic Year 2018

Development of azelaic acid-clindamycin liposome

By

1. Miss. Patthaya Prathumthai ID 57210193

2. Miss. Arada Ngarmliad ID 57210227

3. Miss. Apissara Torteeka ID 57210261

Advisor:

1. Dr. Sumalee Wannachaiyasit

2. Mr. Mikael Laisola

ABSTRACT

This research aims to develop azelaic acid-clindamycin liposome by thin film hydration method using lecithin and cholesterol. The particle size, zeta-potential and the percentage of drug encapsulation efficiency of azelaic acid-clindamycin liposome were determined. The stability of the liposome was investigated. The results showed that the formulation containing lecithin and cholesterol in the ratio of 8:1 (F4) had high percentage of entrapment efficiency of azelaic acid and clindamycin being 61.46% and 74.67%, respectively. The average size of the liposome formulation F4 was 141.24 ± 1.76 nm. The zeta-potential of this liposome was -12.25 ± 0.68 mV. For the stability study of the liposome, the liposome was stored at 10 °C for 7 days. It was found that the particle size did not significantly change ($p\text{-value} > 0.05$) while the zeta potential significantly decreased ($p\text{-value} < 0.05$). The azelaic acid-clindamycin liposome was successfully prepared and it could be a potential delivery system for anti-acne therapy.

Major Advisor.....

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง การพัฒนาสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินดามัยซินลิโปโซม

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1.นสภ. ปัฐยา ประทุมไทย	รหัสนิสิต	57210193
2.นสภ. อารดา งามละเมียด	รหัสนิสิต	57210227
3.นสภ. อากิสรา ต่อซึ่มะ	รหัสนิสิต	57210261

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภญ.อ.ดร. สุมาลี วรรณชัชสิทธิ์
2. อ. มिकाเอล ไลโซลา

บทคัดย่อ

งานวิจัยฉบับนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินดามัยซินลิโปโซมโดยวิธีอินฟิล์มไฮเดรชันและใช้เลซิธินและคอลเลสเตอรอลเป็นสารก่อลิโปโซม ทำการศึกษาขนาดอนุภาค ศักย์ไฟฟ้าและร้อยละการกักกักบยาของกรดอะซีลาอิกและคลินดามัยซินลิโปโซมและประเมินความคงตัวของตำรับลิโปโซม ผลการทดลองพบว่าตำรับที่มีเลซิธินและคอลเลสเตอรอลในอัตราส่วน 8:1 (F4) มีค่าร้อยละการกักกักบยาของกรดอะซีลาอิกและคลินดามัยซิน เท่ากับ 61.46 และ 74.67 ตามลำดับ ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของลิโปโซมตำรับที่ 4 เท่ากับ 141.24 ± 1.76 นาโนเมตร และศักย์ไฟฟ้า -12.25 ± 0.68 มิลลิโวลต์ การศึกษาความคงตัวของลิโปโซมที่ถูกเก็บ โดยศึกษาขนาดอนุภาคและประจุบนพื้นผิวหลังการเก็บลิโปโซมไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าขนาดอนุภาคไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \text{ value} > 0.05$) ในขณะที่ประจุบนพื้นผิวมีลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \text{ value} < 0.05$) การพัฒนาสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินดามัยซินลิโปโซมประสบความสำเร็จและอาจเป็นระบบนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพสำหรับการรักษาผิว

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณา จากอาจารย์ที่ปรึกษา งานวิจัย ภญ.อ.ดร. สุมาลี วรรณาชัยสิทธิ์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักงานวิจัย และอ. มิกาเอล ไชลา เป็นที่ปรึกษาร่วม ที่ได้เสียสละเวลาเป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อ งานวิจัย เพื่อให้รายงานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความ อนุเคราะห์ คำแนะนำการใช้เครื่องมือและตรวจสอบเครื่องมือ อีกทั้งช่วยให้ข้อมูลต่างๆ ที่เอื้อต่อ การทำงานวิจัย คณะผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ไม่มากนักน้อย หากมีข้อผิดพลาด ประการใด ทางคณะผู้วิจัยขออ้อมรับผิดเพียงผู้เดียวและยินดีรับคำติชมจากผู้ที่สนใจงานวิจัย เพื่อ เป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

คณะผู้วิจัย

20 ธันวาคม 2561

สารบัญ

หน้า

ปกใน	ก
คำนำ	ข
Abstract	ค
บทคัดย่อ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 กรอบแนวคิด	2
1.5 นิยามศัพท์	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กรดอะซีลาอิก (Azelaic acid)	4
2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดอะซีลาอิก	4
2.1.2 คุณสมบัติในการรักษาของกรดอะซีลาอิก	5
2.1.3 ความคงตัว (Stability) ของกรดอะซีลาอิก	5
2.1.4 การวิเคราะห์กรดอะซีลาอิก	5
2.2 คลินดามัยซิน (Clindamycin)	6
2.2.1 คุณสมบัติทั่วไปของคลินดามัยซิน	7
2.2.2 คุณสมบัติในการรักษาของคลินดามัยซิน	7
2.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณคลินดามัยซิน	8

2.3 งานวิจัยที่ใช้กรดอะซีลาอิกกับคลินตามัยซินทางคลินิก	11
2.4 ลิโปโซม (Liposome)	13
2.4.1 ประเภทของลิโปโซม	13
2.4.2 วิธีการเตรียมลิโปโซม	16
2.5 หลักการปั่นเหวี่ยง (centrifugation)	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	21
3.1 สารเคมี	21
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	21
3.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	23
3.3.1 ศึกษาข้อมูลบททวนวรรณกรรม	23
3.3.2 ศึกษาวิธีการวิเคราะห์	24
3.3.2.1 วิธีการทำกราฟมาตรฐาน	24
โดยใช้สารมาตรฐานกรดอะซีลาอิก	
3.3.2.2 วิธีการทำกราฟมาตรฐาน	25
โดยใช้สารมาตรฐานคลินตามัยซิน	
3.3.3 ขั้นตอนการเตรียมสูตรตำรับ	26
3.3.4 การศึกษาระยะเวลาในการ sonication ที่	27
มีผลต่อขนาดของลิโปโซม	
3.3.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซีลาอิก	27
3.3.5.1 ขั้นตอนการเตรียม ultracentrifuge tube	27
3.3.5.2 ขั้นตอนการเตรียมสาร	27
3.3.5.3 ขั้นตอนการ centrifuge	27
3.3.6 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณคลินตามัยซิน	28
3.3.7 การหาปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ	29
3.3.8 การศึกษาความคงตัว (stability)	29

บทที่ 4 ผลการวิจัย	30
4.1 ผลการศึกษาระยะเวลาในการลดขนาดอนุภาคลิโปโซม โดยใช้เครื่อง sonicator	30
4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณยา (%Entrapment Efficacy)	33
4.2.1 กราฟมาตรฐานของกรดอะซีลาอิก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	33
4.2.2 กราฟมาตรฐานของคลินดามัยซิน ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	34
4.3 ผลการคำนวณหาปริมาณยาแสดงผลเป็นร้อยละของปริมาณยา ที่ถูกกักเก็บ (% entrapment efficiency)	35
4.4 ผลการศึกษาความคงตัว (stability)	37
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	39
เอกสารอ้างอิง	41

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การเตรียมความเข้มแข็งของกราฟมาตรฐานกรดอะซีลาอิก	24
ตารางที่ 2 การเตรียมความเข้มแข็งกราฟมาตรฐานคลินดามัยซิน	25
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณส่วนประกอบแต่ละตำรับ	26
ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนของส่วนประกอบในสูตรตำรับ	30
ตารางที่ 5 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและ zeta potential ของ liposome เมื่อ sonocate ด้วยระยะเวลาต่างๆ	31
ตารางที่ 6 แสดงผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาด และศักย์ไฟฟ้าของสูตรตำรับที่ 1-6	32
ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณยากรดอะซีลาอิก ด้วยวิธีวิเคราะห์ของกรดอะซีลาอิก	35
ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณยาคลินดามัยซิน ด้วยวิธีวิเคราะห์ของคลินดามัยซิน	36
ตารางที่ 9 แสดงผลขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและศักย์ไฟฟ้าของสูตรตำรับที่ 1-6 ในวันที่ 1 และเมื่อเก็บไว้นาน 7 วัน	37

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดอะซีลาอิก	4
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของคลินดามัยซิน	6
รูปที่ 3 แสดงประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของผิวหนังของยาแต่ละตัวรับ	8
รูปที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดจำนวนผิวหนัง ระหว่างยา Clindamycin 2 % Azelaic acid 5 % และ Azelaic acid-Clindamycin	12
รูปที่ 5 แสดงการแบ่งประเภทลิโปโซมตาม structure parameter	13
รูปที่ 6 แสดงการแบ่งประเภทลิโปโซมตามวิธีการเตรียม	14
รูปที่ 7 แสดงการแบ่งประเภทลิโปโซมตามส่วนประกอบและการนำไปประยุกต์ใช้	15
รูปที่ 8 แสดงเทคนิคการเตรียมลิโปโซม	18
รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการเตรียมลิโปโซมด้วยวิธีอินฟิล์มไฮเดรชัน	19
รูปที่ 10 แสดงความเข้มข้นและกราฟมาตรฐานของกรดอะซีลาอิก	33
รูปที่ 11 แสดงความเข้มข้นและกราฟมาตรฐานของคลินดามัยซิน	34

บทที่ 1

บทนำ

การเกิดสิวมักพบได้บ่อยในช่วงวัยรุ่นซึ่งเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน ประกอบไปด้วย ความผิดปกติของต่อมไขมันที่มีการสร้างซีบัม (sebum) มากขึ้น ความผิดปกติของชั้นผิวหนังที่หนาตัวขึ้น มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) และการอักเสบ (1) เมื่อปัจจัยดังกล่าวรวมกันก่อให้เกิดสิว ส่งผลให้เกิดความไม่สวยงามซึ่งมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต จิตใจ อารมณ์และสังคม ทำให้สูญเสียความมั่นใจในตนเอง หากเป็นสิวปริมาณมาก ผู้ป่วยอาจต้องมาพบแพทย์เพื่อทำการรักษา

สิวแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ สิวอักเสบและสิวไม่อักเสบ โดยสิวไม่อักเสบหรือที่เรียกว่าสิวอุดตัน แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ สิวอุดตันหัวปิดกับสิวอุดตันหัวเปิด หากสิวอุดตันหัวปิดเกิดการอักเสบ จะพัฒนาเป็นสิวอักเสบ ซึ่งมีหลายลักษณะทั้งที่เป็นตุ่มนูน แดง ขนาดเล็ก (papules), ตุ่มหนอง (pustules), ตุ่มนูนแข็งเป็นไต (nodules) หรืออาจมีก้อนนูน แดง นิ่ม ภายในมีหนองปนเลือด (cysts) โดยแต่ละความรุนแรงของสิวอักเสบมีการรักษาที่แตกต่างกันออกไป (2) สำหรับการรักษาพื้นฐานของสิวเริ่มต้นด้วยการใช้ยาทาในกลุ่มอนุพันธ์วิตามินเอ (Topical retinoids) (3,4) มีฤทธิ์ในการผลัดเซลล์ผิวทำให้สิวอุดตันลดลง ซึ่งมีผลข้างเคียงคือ ทำให้ผิวไวต่อแสง ระคายเคืองผิวหนัง และก่อให้เกิดตัวอ่อนวิรูปในสัตว์ทดลอง (3) การศึกษาในปัจจุบันพบว่า มีสารชนิดหนึ่งที่ได้จากพืชตระกูลข้าวบาร์เลย์ หรือสังเคราะห์จาก *Malassezia furfur* ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นของร่างกาย (5) มีฤทธิ์คล้าย Topical retinoids สารนั้นคือ กรดอะซีลาอิก (Azelaic acid)

กรดอะซีลาอิกมีลักษณะโครงสร้างเป็น saturated C9-dicarboxylic acid มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและยับยั้งการอักเสบ (5) ในทางคลินิกมีการนำกรดอะซีลาอิกไปใช้ในการรักษาสิวเนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อ *Cutibacterium acnes* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดสิวและลดการเกิดสิวอุดตันได้ (6) โดยพบว่าประสิทธิภาพในการรักษาสิวเมื่อใช้กรดอะซีลาอิกเข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวล เปรียบเทียบกับเรตินอลเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวล มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากันในการลดสิวอุดตัน (7) อีกทั้งยังพบว่าผลข้างเคียงของกรดอะซีลาอิก ไม่ก่อให้เกิดวิรูปในสัตว์ทดลอง (8) ดังนั้น กรดอะซีลาอิกเข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวล จึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ที่ไม่สามารถใช้ผลิตภัณฑ์จากเรตินอลชนิดใช้ภายนอกได้ (9) หากเป็นสิวในระดับที่รุนแรงขึ้น การใช้ผลิตภัณฑ์

จากเรตินอลหรือกรดอะซีลาอิกเพียงอย่างเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง ประสิทธิภาพในการรักษาอาจไม่เพียงพอ จึงต้องเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโดยพิจารณาเพิ่มยาปฏิชีวนะชนิดใช้ภายนอกและชนิดรับประทานมาใช้ในการรักษา (4,9) ซึ่งตัวยาในรูปแบบยาทาที่นิยมและมีการแนะนำให้ใช้ ได้แก่ คลินดามัยซิน (clindamycin)

นอกจากนี้การพัฒนาสูตรตำรับของยาให้มีชีวประสิทธิผลเพิ่มขึ้น จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งมีการศึกษาการพัฒนาสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกให้อยู่ในรูปแบบของลิโปโซม พบว่าช่วยเพิ่มการซึมผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนัง จึงส่งผลให้ชีวประสิทธิผลเพิ่มขึ้น (10) และมีการศึกษาพบว่าเมื่อใช้กรดอะซีลาอิกชนิดใช้ภายนอกร่วมกับคลินดามัยซินรูปแบบรับประทาน มีประสิทธิภาพในลดการอักเสบได้ดี (11) ดังนั้นถ้าหากสามารถพัฒนาสูตรตำรับผสมระหว่างกรดอะซีลาอิกกับคลินดามัยซินได้ จะช่วยเพิ่มความสะดวกในการบริหารยาของผู้ป่วยและอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผิวให้ดียิ่งขึ้น

จากข้อมูลดังกล่าวทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการวิจัยตำรับสูตรผสมระหว่างกรดอะซีลาอิกกับคลินดามัยซินในรูปแบบลิโปโซม เพื่อนำส่งยาและเพิ่มประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและต้านการอักเสบ รวมถึงศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับ

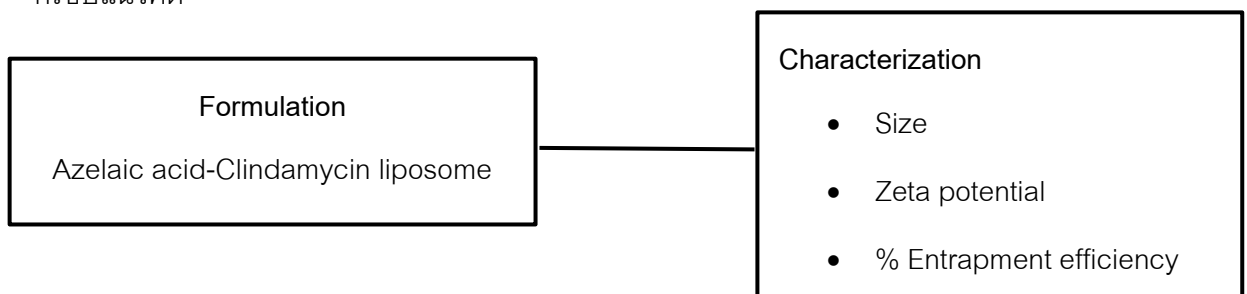
วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาตำรับกรดอะซีลาอิก คลินดามัยซินลิโปโซม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ตำรับลิโปโซมของ azelaic acid-clindamycin ที่มีลักษณะที่ดี

กรอบแนวคิด



นิยามศัพท์ (ถ้ามี)

1. ลิโปโซม (Liposome) คือ อนุภาคที่มีลักษณะเป็นถุงทรงกลมขนาดเล็กของสารที่ประกอบด้วยสารจำพวกไขมันที่มีโครงสร้างแบบแอมฟิพาติก (amphipathic) คือมีทั้งส่วนที่มีขั้ว (polar) ชอบน้ำและส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) ที่ไม่ชอบน้ำอยู่ภายในโมเลกุลเดียวกัน
2. กรดอะซีลาอิก (Azelaic acid) คือ ยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งจะนำมาพัฒนาระบบนำส่งเพื่อดูประสิทธิภาพของยา

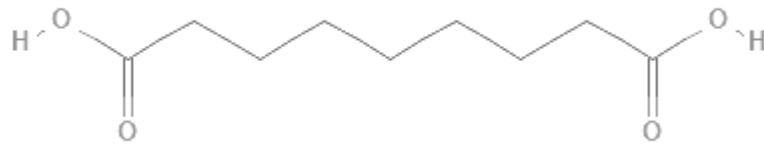
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาประสิทธิภาพสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินดามัยซินลิโปโซม ต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจในส่วนของคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของสารสำคัญ รวมถึงชนิดของลิโปโซม สำหรับวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องมีดังต่อไปนี้

1. กรดอะซีลาอิก (Azelaic acid)

กรดอะซีลาอิกเป็นกรดอินทรีย์ ประกอบด้วยคาร์บอนอิ่มตัว 9 คาร์บอน และ dicarboxylic acid ($\text{COOH}(\text{CH}_2)_7\text{-COOH}$) ที่พบในธัญพืช ข้าวบาร์เลย์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดอะซีลาอิก

Molecular Formula	: $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$
Molecular Weight	: 188.223 g/mol
Melting point	: 106.5 °C
Water Solubility	: 2400 mg/L (at 20 °C)

1. คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี

กรดอะซีลาอิกมีลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกคริสตัลสีขาวหรือสีอมเหลือง ไม่มีกลิ่น คุณสมบัติทางเคมี ค่าการละลายน้ำได้น้อย (poorly soluble) ที่อุณหภูมิ 20 °C (0.24%) แต่ละลายดีในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และ organic solvent ละลายได้เล็กน้อย (slightly soluble) ใน Ethyl, Ether, Benzene และ DMSO มีความคงตัวในสภาวะกรดที่อุณหภูมิและความดันปกติ แต่ไม่คงตัวในสภาวะเบส เกิดความไม่เข้ากันเมื่อผสมกับสารอื่น เช่น Oxidizing agents และ reducing agents (11)

1.2 คุณสมบัติในการรักษา

มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ (anti-inflammation) มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ได้ รวมถึงเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยทางการแพทย์ได้นำกรดอะซีลาอิกมาใช้รักษาสิวประเภทที่มีความรุนแรงน้อยไปจนถึงขั้นปานกลาง มีฤทธิ์ keratolytic และ comedolytic จากความสามารถในการลดการสร้าง keratin ทำให้ยับยั้งการสร้างสิวลุดตัน นอกจากนี้กรดอะซีลาอิกยังมีส่วนช่วยให้ผิวหนังชั้น stratum corneum หนาตัวลดลง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการเกิด oxygen radical จึงมีผลต้านการอักเสบได้โดยตรง (12)

จากการศึกษาของ Leeming J.P และคณะ (1986) ทำการศึกษาวิจัยในหัวข้อ “The in vitro antimicrobial effect of azelaic acid” ผลการวิจัยพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอะซีลาอิกที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ มีค่ามากกว่า 0.25 โมลต่อลิตร (13)

1.3 ความคงตัว (Stability)

จากงานวิจัยของ Sharma A. และคณะ (2016) ทำการศึกษาวิจัยในหัวข้อ “Stability indicating simultaneous validation of azelaic acid, minoxidil and tretinoin with forced degradation behavior study by RP-HPLC in pharmaceutical dosage form” โดยทำการศึกษากการสลายตัวของกรดอะซีลาอิกที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ acid degradation (0.1N HCl เป็นเวลา 4 ชั่วโมง), Base degradation, Oxidative degradation, Thermal degradation (105 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง) Photolytic degradation (สัมผัสแสง UV โดยตรง เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง) ซึ่งผลจากงานวิจัยพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวมากที่สุดคือ Acid degradation โดยกรดอะซีลาอิกสลายตัวประมาณร้อยละ 39 ของปริมาณสารเริ่มต้น ส่วนปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวน้อยสุด คือ แสง UV โดยกรดอะซีลาอิกสลายตัวประมาณร้อยละ 29 ของปริมาณสารเริ่มต้น

1.4 การวิเคราะห์กรดอะซีลาอิก

จากงานวิจัยของ Muhammed A. และคณะ (2012) ทำการศึกษาวิจัยในหัวข้อ “On-Column Approach in the HPLC-UV Analysis of Non-chromophoric Compounds Using Azelaic Acid as a Model” คณะผู้วิจัยพัฒนาการวิเคราะห์ของกรดอะซีลาอิกด้วยเครื่องมือโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (High-performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้ UV detector โดยการสร้างสารอนุพันธ์ของกรดอะซีลาอิก จากการนำ 1,10

phenanthroline มาทำปฏิกิริยากับกรดอะซีติก เพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซีลาอิกได้ โดยใช้ condition ของ HPLC ดังนี้ (14)

Column : Reverse phase C18 column ขนาด 250 mm x 4.6 mm
(diameter = 5 μ m)

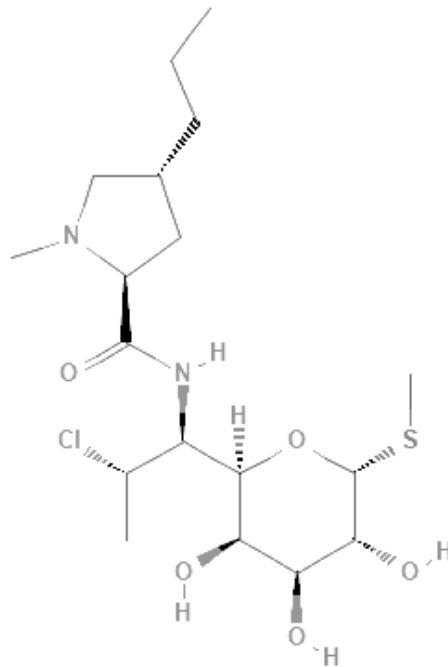
Mobile phase : น้ำต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 8 ผสมกับฟีนแอนโทรอลีน
(phenanthroline) ร้อยละ 20 ไมโครกรัมโดยมวลและปรับ pH = 5

Injection volume : 20 μ L

Flow rate : 0.5 ml/min

Detector : UV detector wavelength 265 nm.

2. คลินดามัยซิน (Clindamycin)



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของคลินดามัยซิน (15)

Molecular Formula : $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$

Molecular weight : 424.981 g/mol

Melting Point : 142 $^{\circ}$ C (hydrochloride salt)

Water Solubility : In water, 30.61 mg/L at 25 $^{\circ}$ C

Storage instruction : Stable in air & light

2.1 คุณสมบัติทั่วไป

คลินดามัยซิน (Clindamycin) เป็นอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ในกลุ่มลินโคมายซิน (Lincomycin) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces actinobacterium lincolnensis* จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ (Gram negative bacteria) คลินดามัยซินมีลักษณะทางกายภาพส่วนใหญ่เป็นของแข็งไม่มีรูปร่างหรือเป็นผลึกคริสตัล (Amorphous solid or crystal) มีสีขาวและอาจมีกลิ่นหรือไม่มีกลิ่น คุณสมบัติทางเคมีของคลินดามัยซินมีโครงสร้างหลักขนาดใหญ่และประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกัน ได้แก่ ไฮโดรคลอไรด์ (Hydrochloride) ปาล์มิตไฮโดรคลอไรด์ (Palmitate Hydrochloride) และฟอสเฟต (Phosphate) การละลายน้ำคลินดามัยซินทุกรูปแบบ (Form) สามารถละลายน้ำได้ดี (Freely soluble) ความสามารถในการคงตัวของ Clindamycin คงตัวได้ที่สภาวะ pH 3-5 และสลายตัวได้ที่สภาวะ pH 1-6.5 เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 2 ปี ที่อุณหภูมิ 25 °C (15)

2.2 คุณสมบัติในการรักษา

คลินดามัยซินมีกลไกการทำงาน คือ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนจากแบคทีเรียโดยการจับกับ ribosomal 50S ของเชื้อแบคทีเรีย ออกฤทธิ์ได้ทั้งการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยา โดยข้อบ่งใช้ของคลินดามัยซิน คือ ใช้สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Streptococci spp.*, *Clostridium spp.* และ *Streptococci microaerophilic* และอาจจะใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ polymicrobial เช่น การติดเชื้อในช่องท้องหรือกระดูกเชิงกราน นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อรักษา Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) และการติดเชื้อทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* และ *Staphylococcus pyogenes* ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่นได้

จากการศึกษา Wen lan lou W. และคณะ (1977) ทำการศึกษาในหัวข้อ "Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to Seventeen antibiotics" ทำการทดสอบความไวของเชื้อ *P. acnes* ต่อยาปฏิชีวนะ 17 ชนิด ในหลอดทดลอง โดยพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของคลินดามัยซินที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ ความเข้มข้น 0.015-0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (16)

จากการศึกษาของ Smieja M.(1998)(17) พบว่าคลินดามัยซิน เป็นยาทางเลือกที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อบริเวณผิวหนัง (Skin and soft tissue infection) ที่เกิดจากการติดเชื้อ Group A *Streptococci* หรือ *Staphylococcus aureus* เมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาโรคที่เกิดจากการติด

เชื้อชนิดเดียวกันด้วยอิริโทมัยซิน (Erythromycin) พบว่าประสิทธิภาพการรักษาเท่าเทียมกันกับการรักษาด้วยยา Erythromycin และการศึกษาของ Guy Webster แสดงให้เห็นว่าการนำคลินดามัยซิน ใช้ร่วมกับกรดอะซีลาอิกมีประสิทธิภาพในการลดการอักเสบได้โดยใช้ระยะเวลาสั้นลงเมื่อเทียบกับการใช้ยาตัวอื่น (18)

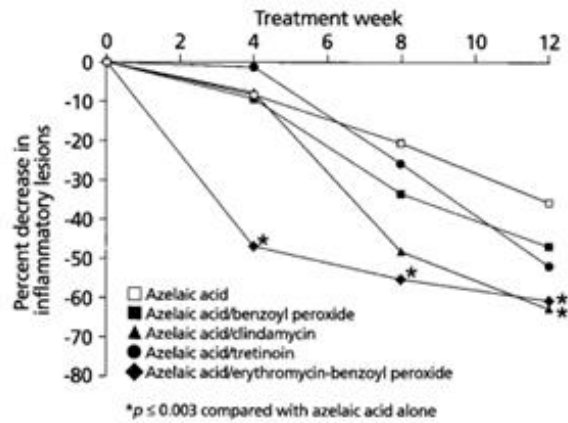


Fig 1. Percent decrease in inflammatory lesions in patients using azelaic acid 20% cream, alone or in combination with benzoyl peroxide 4% gel, clindamycin 1% gel, tretinoin 0.025% cream, or erythromycin 3%/benzoyl peroxide 5% gel. All medications were applied twice daily, except tretinoin, which was applied once daily.

รูปที่ 3 แสดงประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของสิวของยาแต่ละตัวรับ (18)

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณคลินดามัยซินไฮโดรคลอไรด์

จากข้อมูลในเภสัชตำรับ The United State Pharmacopoeia 36th edition ในหัวข้อการวิเคราะห์หาปริมาณคลินดามัยซิน ไฮโดรคลอไรด์ โดยใช้ HPLC มี condition ของ HPLC ดังนี้ (19)

Column	: Reversed phase C18 column ขนาด 250 mm x 4.6mm (diameter = 5 μm)
Mobile phase	: Buffer KH ₂ PO ₄ : Acetonitrile ในอัตราส่วน 75 ต่อ 25
Running time	: 10 min
Injection volume	: 20 μL
Flow rate	: 1 ml/min
Detector	: UV detector wavelength 210 nm

สูตรตำรับของกรดอะซีลาอิกและคลินดามัยซิน

กรดอะซีลาอิก (Azelaic acid)

ผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด

ได้แก่ 20% Azelaic acid cream : Skinoren[®] , Azelex[®]

15% Azelaic acid gel: Finacea[®]

Peira E. และคณะ (2006) ทำการศึกษาวิจัยในหัวข้อ “Azelaic acid sodium salt in the formulation of microemulsions for topical applications” โดยผู้วิจัยทำการพัฒนาระบบนำส่งของกรดอะซีลาอิก ในสูตรตำรับ microemulsions เพื่อเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านชั้นผิวหนัง โดยเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ solutions ซึ่งผลวิจัยพบว่า Azelaic acid microemulsions สามารถสะสมในชั้นผิวหนังได้มากกว่า Azelaic acid solutions และผลการศึกษารูปแบบของ active ingredient ในรูปของกรดอะซีลาอิก กับกรดอะซีลาอิกรูปเกลือโซเดียม (Azelaic acid sodium) ผลการวิจัยพบว่า Azelaic acid sodium microemulsions สามารถสะสมในชั้นผิวหนังได้มากกว่า Azelaic acid microemulsions (20)

Burchacka E. และคณะ (2016) ทำการศึกษาวิจัยในหัวข้อ “New effective azelaic acid liposomal gel formulation of enhanced pharmaceutical bioavailability” ซึ่งทำการพัฒนาระบบนำส่งกรดอะซีลาอิก เพื่อเพิ่มชีวประสิทธิผลของกรดอะซีลาอิก โดยพัฒนาระบบนำส่งให้อยู่ในรูปของลิโปโซม และทำการศึกษาศักยภาพในการซึมผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนังของ Azelaic acid liposome เทียบกับ 20% Azelaic acid cream ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขายอยู่ในท้องตลาด จากงานวิจัยพบว่า Azelaic acid liposome สะสมอยู่ในชั้นผิวหนัง stratum corneum มากกว่า 20% Azelaic acid cream (10)

คลินดามัยซิน (Clindamycin)

ผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด

ได้แก่ คลินดามัยซินไฮโดรคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 (Chinacilin-T[®])

คลินดามัยซินเจลความเข้มข้นร้อยละ 1 (Chinacilin-T[®])

Clindamycin + Benzoyl peroxide gel: Duac gel[®], Benzaclin[®], Acanya gel[®]

Škalko N, Cajkovic M และ Jalšenjak I (1992) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Liposomes with clindamycin hydrochloride in the therapy of Acne vulgaris” ทำการศึกษาการเตรียม clindamycin hydrochloride ในรูปแบบลิโปโซม จากสูตรตำรับที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1) Lotion (I), 2) Non-liposomal emulsion lotion (II) (Hostaphat[®]) และ 3) Liposomal emulsion lotion (III) โดยเปรียบเทียบระหว่างสูตรตำรับคลินดามัยซิน ที่ไม่เป็นลิโปโซม (Non-liposome) กับสูตรตำรับคลินดามัยซินตำรับลิโปโซม (Liposome) เมื่อศึกษาผลการละลายในหลอดทดลอง พบว่ามีการปลดปล่อยตัวยาแบบออกฤทธิ์เนิ่นออกจากสูตรตำรับ Lotion-Emulsion และ Lotion-Liposome Suspension เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับที่ไม่เป็นลิโปโซม ผลทางคลินิกด้านการลดรอยแผล (Skin lesions) พบว่าตำรับ lotion solution, ตำรับ non-liposomal emulsion lotion และ ตำรับ liposomal emulsion lotion ให้ผลในการลดรอยแผลได้ร้อยละ 42.9, 48.3 และ 62.8 ตามลำดับ หลังจากการรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าผลการศึกษานี้สนับสนุนให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของคลินดามัยซินรูปแบบลิโปโซม เนื่องจากช่วยให้ยาออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (21)

Shanmugam S, Song CK และ Nagayya-Sriraman S (2009) ทำการศึกษาวิจัยในหัวข้อ “Physicochemical characterization and skin permeation of liposome formulations containing clindamycin phosphate” การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสมบัติทางเคมีกายภาพและการซึมผ่านของผิวหนัง ในตำรับลิโปโซมสูตรที่มีคลินดามัยซินฟอสเฟต (Clindamycin Phosphate) ที่บรรจุอยู่ภายใน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตำรับในแง่ของค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาค การกระจายตัว (Polydispersity Index, PI) ประสิทธิภาพการกักเก็บยา (Entrapment Efficiency, EE) การเพิ่มขนาดของอนุภาคและความคงตัวของลักษณะทาง

กายภาพของตำรับคลินดามัยซินฟอสเฟตที่บรรจุอยู่ในลิโปโซม ระหว่างการเก็บรักษานาน 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (22)

ในการทดลองมีการเตรียมตำรับลิโปโซมด้วยวิธีการอินฟิล์มไฮเดรชัน (thin-film hydration) โดยใช้คอลเลสเตอร์รอลและเลซิธิน ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 5 อัตราส่วน ได้แก่ คอลเลสเตอร์รอลต่อเลซิธิน เท่ากับ 0.16 (L-1), 0.25 (L-2), 0.33 (L-3), 0.5 (L-4) และ 1 (L-5) พบว่า อัตราส่วนของ คอลเลสเตอร์รอลต่อเลซิธิน ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อขนาดอนุภาค โดยอัตราส่วน 0.5 (L-4) มีองค์ประกอบของไขมันที่เหมาะสมในการเตรียม Clindamycin phosphate-entrapped liposome ทั้งในแง่ของ Polydispersity Index, Entrapment Efficiency ผลงานวิจัยพบว่าคอลเลสเตอร์รอลต่อเลซิธิน ที่อัตราส่วนเท่ากับ 0.5 มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในการวัดขนาดและความสามารถของลิโปโซมเพื่อรักษาคลินดามัยซินฟอสเฟต (22)

ในงานวิจัยได้ทำการศึกษาผลของประจุที่มีผลต่อคุณสมบัติของคลินดามัยซินฟอสเฟตที่บรรจุภายใน ลิโปโซมที่มีประจุเป็นบวก (anionic) และประจุลบ (cationic) เพื่อประเมินว่าประจุที่มีผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพเคมีและการแทรกผ่านผิวหนัง โดยพบว่าการมีประจุบวกมีประโยชน์ในแง่ของการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของขนาดและการปรับปรุงความสามารถของลิโปโซม เพื่อรักษาความคงตัวของคลินดามัยซินฟอสเฟตในลิโปโซม (22)

3. งานวิจัยที่ใช้กรดอะซีลาอิกกับคลินดามัยซินทางคลินิก

Hamidreza Pazoki-Toroudi(2011) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Combination of azelaic acid 5% and clindamycin 2% for the treatment of acne vulgaris” พบว่าการใช้ยาเจลสูตรผสม azelaic acid 5% และ clindamycin 2% สำหรับการรักษาสิวในกลุ่มผู้ป่วย Mild-to-moderate facial acne vulgaris เมื่อใช้เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนสิวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยาสูตรตำรับเดี่ยว โดยพิจารณาจากค่า acne severity index (ASI) (23)

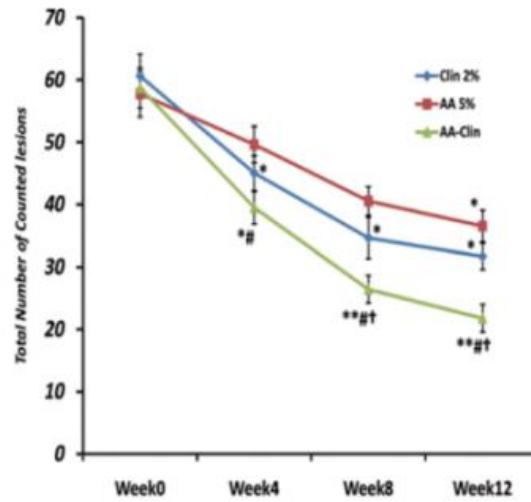


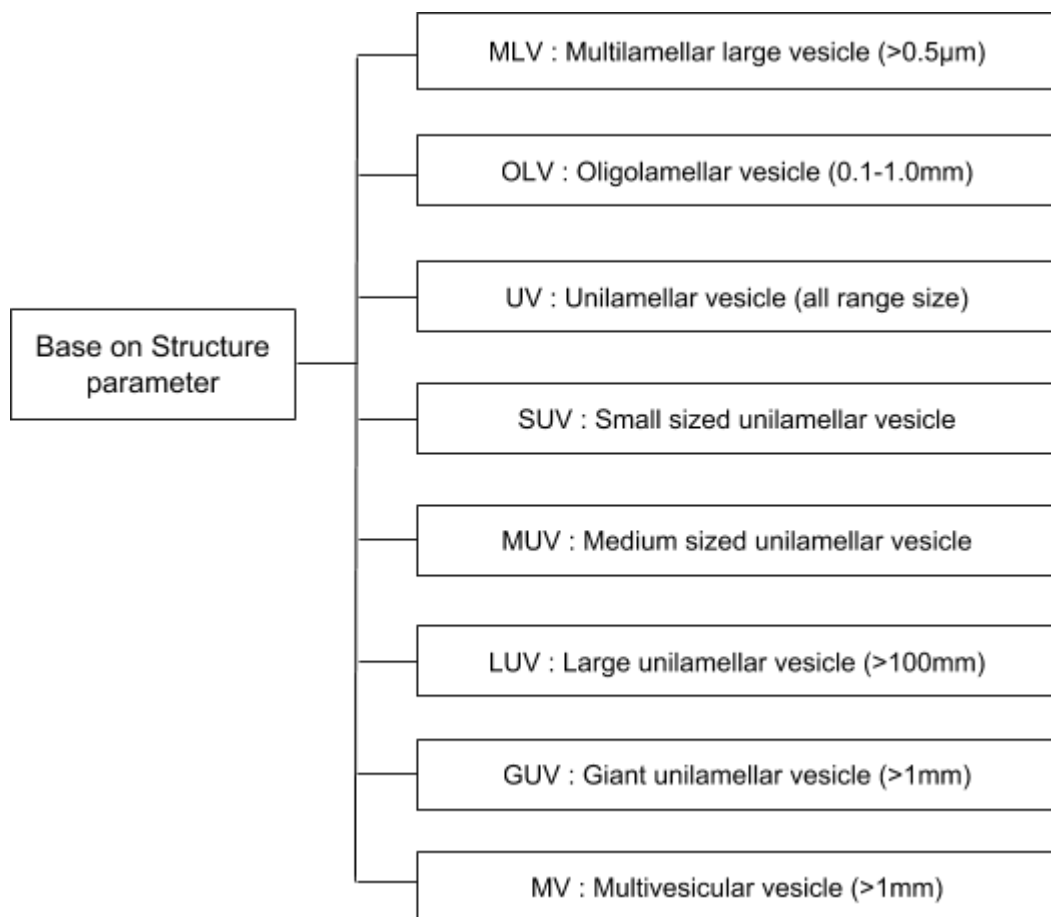
Figure 1. Effects of 12-week treatment with azelaic acid 5% (AA 5%), clindamycin 2% (Clin 2%), or AA 5% plus Clin 2% gel (AA-Clin) on reduction of total number of counted acne lesions. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. week 0 of same group, † $p < 0.05$ vs. AA 5% and ‡ $p < 0.05$ vs. Clin 2%.

รูปที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดจำนวนสิ่วระหว่างยา Clindamycin 2%, Azelaic acid 5% และ Azelaic acid-Clindamycin (23)

4. ลิโปโซม (Liposome)(24),(25)

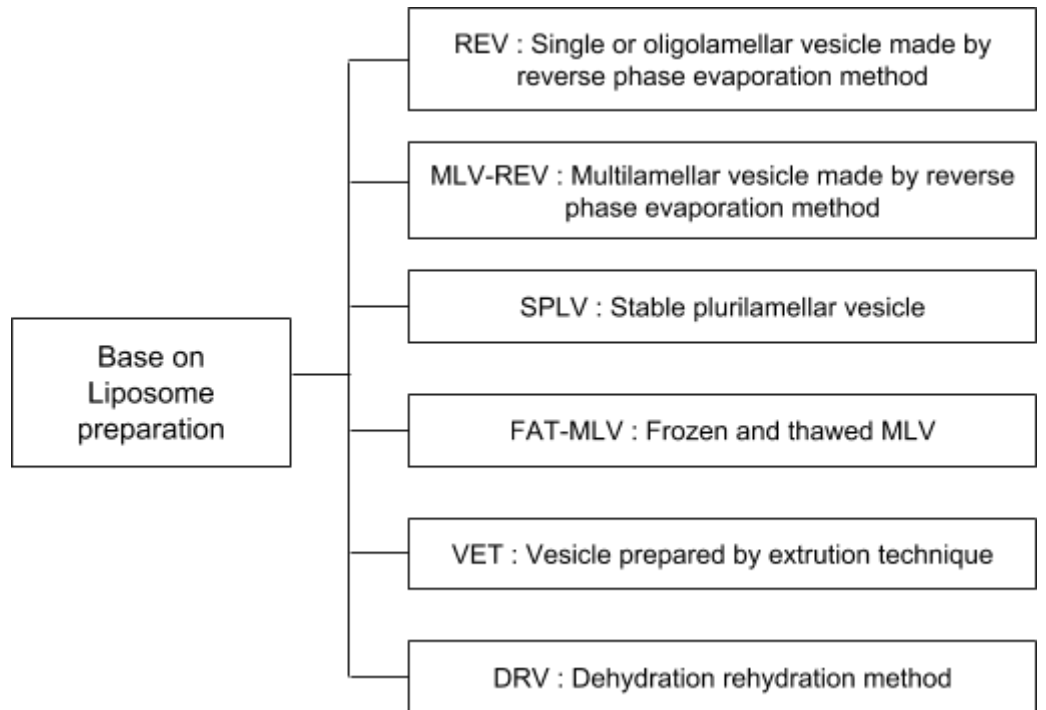
4.1 ประเภทของลิโปโซม แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

4.1.1 แบ่งตามโครงสร้าง (Based on structure parameter)



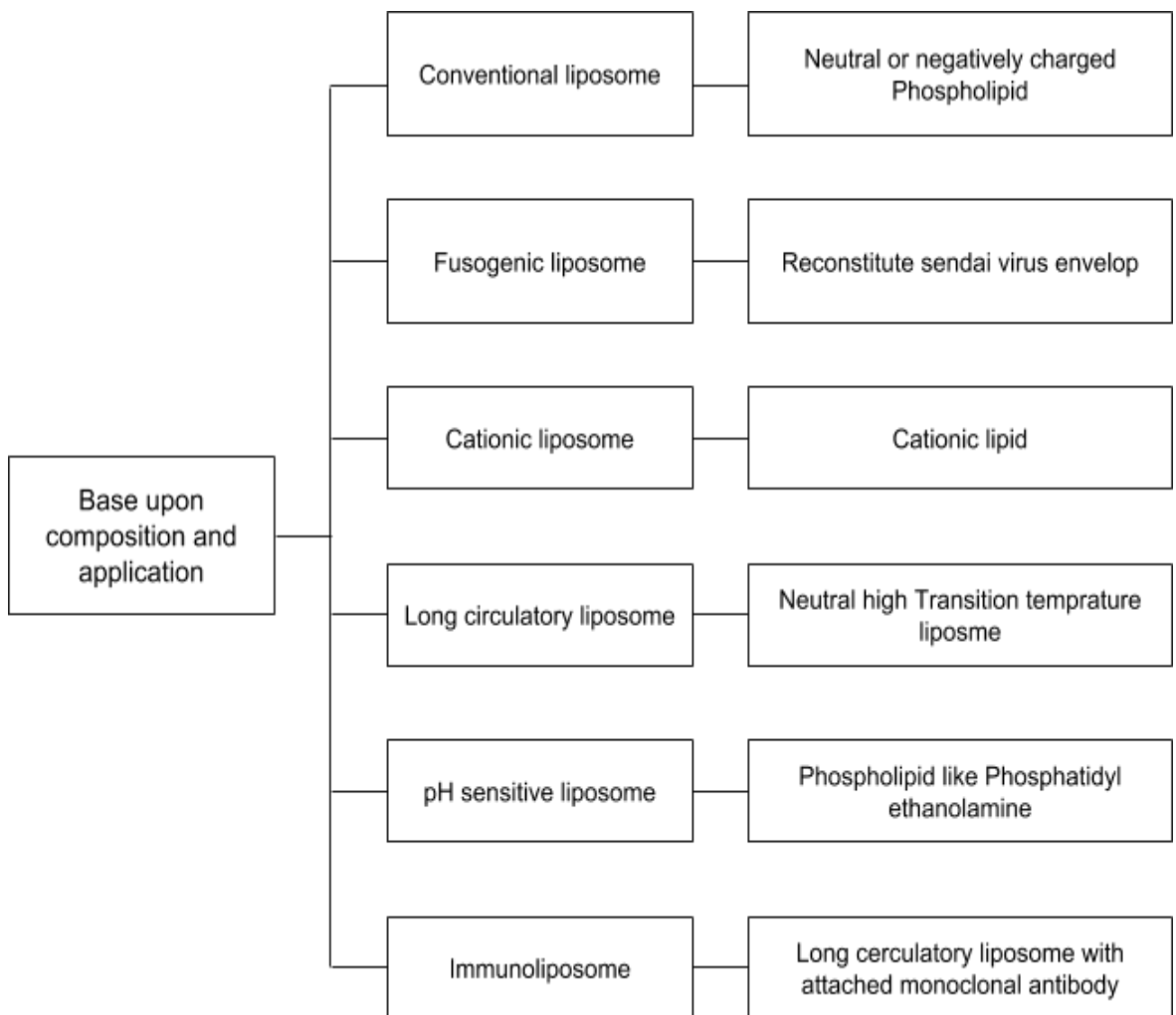
รูปที่ 5 แสดงการแบ่งประเภทลิโปโซมตาม structure parameter

4.1.2 แบ่งตามวิธีการเตรียม (Based on liposome preparation)



รูปที่ 6 แสดงการแบ่งประเภทลิโปโซมตามวิธีการเตรียม

4.1.3 แบ่งตามส่วนประกอบและการนำไปประยุกต์ใช้ (Based on composition and application)



รูปที่ 7 แสดงการแบ่งประเภทลิโปโซมตามส่วนประกอบและการนำไปประยุกต์ใช้

4.2 วิธีการเตรียมลิโปโซม (24)

4.2.1 ส่วนประกอบของลิโปโซม

ส่วนขององค์ประกอบและวิธีการเตรียม ทั้งสองปัจจัยนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อคุณสมบัติพื้นฐานของลิโปโซม เช่น ดัชนีการกระจายขนาด (polydispersity index) ค่าเฉลี่ยของขนาด (mean size) ประสิทธิภาพในการบรรจุยา (drug loading efficiency) และ ค่า zeta potential ส่วนประกอบหลักๆ ที่ใช้ในการเตรียมลิโปโซม มีดังนี้ 1) ฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) 2) สเตอรอล (Sterols) 3) สารเติมแต่งอื่นๆ (Other additives)

4.2.1.1 ฟอสโฟลิพิด (Phospholipids)

ฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น amphiphilic molecules ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนหาง (hydrophobic tail) เป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว และส่วนหัว (hydrophilic head) เป็นส่วนที่มีขั้ว ส่วนหัวของโมเลกุลที่เป็นหมู่ฟอสเฟตของ phospholipid จะเป็นส่วนที่ชอบน้ำ ในขณะที่ส่วนหางของโมเลกุลที่เป็น กรดไขมันจะเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โดยโครงสร้างทางเคมีของ ฟอสโฟลิพิด 1 โมเลกุล เกิดจากกลีเซอรอล (glycerol) 1 โมเลกุล รวมตัวกับกรดไขมัน (fatty acid) 2 โมเลกุล และหมู่ฟอสเฟต 1 หมู่ โดยมีกลีเซอรอลเป็นแกนหลัก เมื่อฟอสโฟลิพิดอยู่ในน้ำ หรือสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย จะเกิดเป็นโครงสร้าง 2 ชั้น โดยส่วนที่ไม่มีขั้วจะหันเข้าหากัน และส่วนที่มีขั้วจะหันเข้าหาโมเลกุลของน้ำ

ฟอสโฟลิพิดหลายกลุ่มถูกนำมาใช้ในการทำลิโปโซมอย่างแพร่หลาย โดยฟอสโฟลิพิดสามารถหาได้จากแหล่งธรรมชาติ จากการทำสารกึ่งสังเคราะห์และ จากการทำการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่

ตัวอย่างฟอสโฟลิพิดที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตลิโปโซม

- Dilauryl phosphatidylcholine (DLPC)
- Distearoyl phosphatidylcholine (DSPC)
- Dimyristoyl phosphatidylethanolamine (DMPE)
- Dilauryl phosphatidylethanolamine (DLPE)
- Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)

- Dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE)
- Dilauryl phosphatidylglycerol (DLPG)
- Distearoyl phosphatidyl serine (DSPS)

4.2.1.2 สเตอรอล (Sterols)

สเตอรอลเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้ม เช่น การซึมผ่าน (permeability) ความคงตัว (stability) และ bilayer fluidity จึงมีการเติมสารสเตอรอลเพิ่มเข้าไปในโครงสร้างของลิโปโซมเพื่อเพิ่มความคงตัวของ vesicle ของลิโปโซม ในขณะเดียวกันยังมีการเพิ่มโมเลกุลของสารที่มีประจุเข้าไปในตำรับเพื่อเพิ่มความคงตัวของสูตรตำรับ

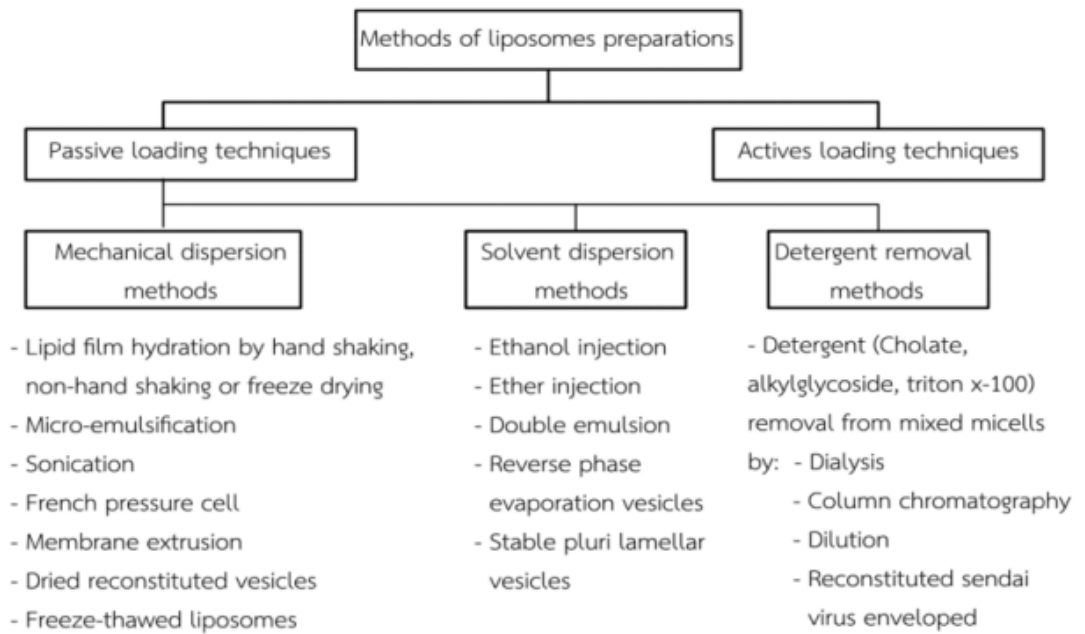
คอเลสเตอรอล (Cholesterol) เป็นโมเลกุลที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการเพิ่มความคงตัวของลิโปโซม เนื่องจากสามารถปรับ bilayer membrane fluidity ได้และยังสามารถป้องกันการเกาะกลุ่มกันจากผลกระทบบของแรงผลักร (steric repulsion) และไฟฟ้าสถิต (electrostatic) นอกจากนี้คอเลสเตอรอลยังสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของเยื่อหุ้มลิโปโซมจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ช่วยลดการซึมผ่านเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังสามารถเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของฟอสโฟลิพิดในชั้น bilayer ทำให้มีผลต่อ bilayer fluidity

4.2.1.3 สารเติมแต่งอื่นๆ (Other additives)

สารเติมแต่งอื่นๆ ทั้งหมด พบว่า PEG เป็นสารสำคัญที่เลือกใช้มากที่สุด พบอยู่บนส่วนพื้นผิวของลิโปโซมช่วยเพิ่มระยะเวลาให้ลิโปโซมอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการสลายตัวของตัวยาและเพิ่ม intracellular uptake ของถุงลิโปโซม (liposomal vesicles)

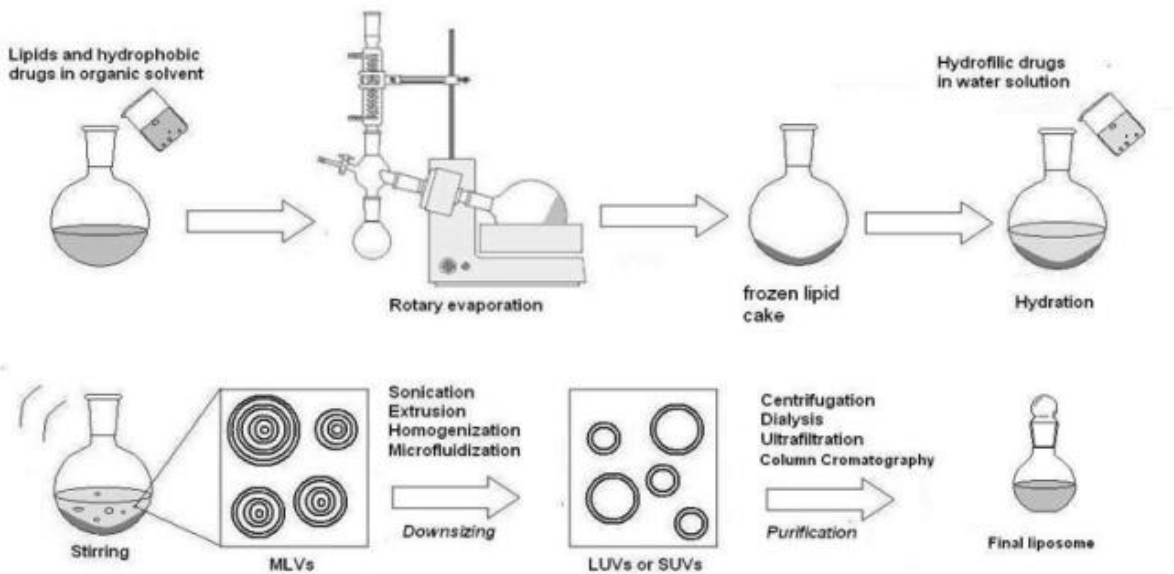
สำหรับลิโปโซมที่มีประจุ (charged liposomal vesicles) มีวิธีการเตรียมโดยทำการเติมลิโปโซมลงในฟอสโฟลิพิดที่มีประจุ (charged phospholipids) เช่น stearyl amine (SA) และ dicethylphosphate (DCP)

4.2.2 เทคนิคการเตรียมลิโปโซม



รูปที่ 8 แสดงเทคนิคการเตรียมลิโปโซม

วิธีการเตรียมลิโปโซมโดยทั่วไปมีขั้นตอนการทำดังนี้



รูปที่ 9 ขั้นตอนการเตรียมลิโปโซมด้วยวิธีอินฟิล์มไฮเดรชัน

Gojjala Venugopalarao และคณะ (2015) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Preparation and characterization of cefditoren pivoxil-loaded liposomes for controlled in vitro and in vivo drug release” ได้ทำการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบลิโปโซมมาใช้ในการเตรียมตำรับยา cefditoren pivoxil ด้วยวิธีอินฟิล์มไฮเดรชัน โดยมีการเตรียม cefditoren pivoxil liposome ใช้ส่วนประกอบ คือ Organic phase ที่ประกอบด้วยตัวยาที่ละลายอยู่ใน organic solvent (chloroform : methanol ; 2:1 v/v) และส่วนประกอบของผนังลิโปโซม คือ soya lecithin, cholesterol ละลายด้วย organic solvent นำไปประเหย organic solvent ออกจนได้ thin film โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และได้ Water phase คือ phosphate-buffered saline (pH 7.4) 10 ml เพื่อไปละลาย thin film ก่อนจะนำไปเขย่าสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เป็น liposome suspension ต่อไป (26)

Eskandar Moghimipour และคณะ (2013) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Formulation and in vitro evaluation of topical liposomal gel of triamcinolone acetonide” การศึกษาอัตราส่วนและปริมาณสารที่ใช้ในตำรับ ผลการศึกษาพบว่าในขั้นตอนการเตรียม triamcinolone acetonide liposomes มีการทดลองปรับเปลี่ยนสูตรตำรับสารกอลิโปโซม โดยเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างเลซิธิน

กับคอลเลสเทอรอล มีทั้งหมด 12 สูตร (F1-12) พบว่าอัตราส่วนที่มี % Entrapment efficiency สูงที่สุด คือ F2 (Lecitin : cholesterol ; 100:10) และรองลงมา คือ F1 (Lecitin : cholesterol ; 100:5) โดยมี % EE อยู่ที่ 90.05 และ 75.80 ตามลำดับ (27)

สำหรับการเตรียมโดยวิธีฟิล์มไฮเดรชันจะได้ลิโปโซมที่มีลักษณะเป็น multilamellar การลดขนาดลิโปโซมสามารถทำได้โดยการ sonicate ซึ่งมี 2 วิธี คือ Bath sonication และ Probe sonication จากงานวิจัย ของ Asmita Singh (28) และคณะในปี 2014 ใช้วิธี Bath sonication ในการลดขนาดลิโปโซมโดยใส่ Ice bath ลงไปใน sonicator bath เพื่อป้องกันการสลายของลิโปโซม จากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเมื่อ sonicate เป็นเวลานาน

5. หลักการปั่นเหวี่ยง (centrifugation)

Krishna Muppidi และคณะ (2012) ทำการศึกษาในหัวข้อ “Development and stability studies of novel liposomal vancomycin formulations” โดยใช้หลักการปั่นเหวี่ยง เพื่อหาปริมาณสาร untrapped solution และ entrapped โดยใช้รอบหมุน 4000 rpm ปั่น เหวี่ยงนาน 15 นาที และใช้ 10% Triton X-100 เป็นสารที่ใช้ละลายลิโปโซม (29)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 สารเคมี

1. Azelaic acid 98% (ACROS[®] china)
2. Clindamycin hydrochloride (HIMEDIA[®] India)
3. Cholesterol AR (SDFCL[®] India)
4. Lecinol S75
5. Ethanol Absolute (PROLABO[®] France)
6. Methanol (PROLABO[®] France)
7. Acetonitrile (PROLABO[®] France)
8. Triton™ X-100 (Sigma-aldrich[®] Netherlands)
9. Potassium dihydrogen orthophosphate (UNIVAR[®] New zealand)
10. di-Potassium hydrogen orthrophosphate (UNIVAR[®] New zealand)
11. 1,10-phenanthroline hydrate (UNIVAR[®] New zealand)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Analytical Balance New Classic MS ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo[®] The United States of America)
2. Centrifuge Sorvall Legend X1R (Thermofisher[®] The United States of America)
3. Centrifuge tube 50 ml
4. Ultrafiltration tube 10 kDA MWCO (Vivaspin 20)
5. Rotary evaporator Rotavapor R-210 (Buchi[®] Switzerland)
6. Round bottom flask 1000 ml (SCHOTT[®] Germany)

7. Vacuum Pump V-700 (Buchi[®] Switzerland)
8. Membrane filter Nylon 0.45 μm diameter 4 mm (Whatman[®] UK)
9. High-performance Liquid Chromatography (SPD-M20A:diode array detector, SIL-20A HT: Auto sampler, LC-20AD:Liquid chromatograph, CTO-10ASvp VP:Column oven, Shimadzu[®] Japan)
10. Column HPLC Hypersil[®] BDS C18 column (Thermo scientific[®] USA)
11. Syringe filter Nylon 13 mm 0.22 μm with luer lock (Lubitech[®])
12. HPLC vial 1.5 ml
13. pH Meter SevenMuti (Mettler Toledo[®] The United States of America)
14. Sonicator bath (Wise clean[®])
15. Vortex mixer (Vertex genie[®])
16. Measuring cylinder 15 ml
17. Measuring cylinder 25 ml
18. Measuring cylinder 50 ml
19. Measuring cylinder 100 ml
20. Measuring cylinder 1000 ml
21. Aluminum foil
22. Funnel 75 mm
23. Beaker 50 ml
24. Beaker 100 ml
25. Beaker 150 ml
26. Beaker 250 ml
27. Beaker 600 ml
28. Beaker 1000 ml
29. Glass stirring rod 7"
30. Watch glass diameter 6 cm

31. Watch glass diameter 10 cm
32. Dropper
33. ข้อนเขาสีดำ
34. Syringe 5 ml
35. ชุดกรองสูญญากาศ
36. Volumetric flask 5 ml
37. Volumetric flask 10 ml
38. Volumetric flask 25 ml
39. Volumetric flask 1000 ml
40. Micropipette 2-20 μ l Finnpiette (Thermo scientific[®] China)
41. Micropipette 100-1000 μ l Finnpiette (Thermo scientific[®] China)
42. Micropipette 1-10 ml Finnpiette (Thermo scientific[®] China)
43. Micropipette tips 0.5-20 μ l (QSP[®])
44. Micropipette tips 100-1000 μ l (Thermo scientific[®] China)
45. Micropipette tips 1-10 ml (Thermo scientific[®] China)
46. Test tube 50 ml
47. Malvern Zetasizer nanoseries (DKSH[®])
48. Cuvette ชนิด Disposable folded capillary cells DTS1070

3. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาข้อมูลทบทวนวรรณกรรม

3.1.1 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดอะซีลาอิกและคลินดา

มัยซิน

3.1.2 ศึกษาผลทางคลินิกของกรดอะซีลาอิกและคลินดามัยซิน

3.1.3 ศึกษาวิธีการทำไลโปโซมด้วยวิธีอินฟิล์มไฮเดรชัน

3.2 ศึกษาวิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาปริมาณสารกรดอะซีลาอิกและคลินดามัยซินจากสูตรตำรับต้องคำนวณจากกราฟมาตรฐาน (HPLC) โดยวิเคราะห์สารด้วยเครื่องมือโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมสารมาตรฐานกรดอะซีลาอิกและคลินดามัยซินดังนี้

3.2.1 วิธีการทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารมาตรฐานกรดอะซีลาอิก

1. เตรียมสารมาตรฐานเข้มข้น 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรด้วยตัวทำละลายน้ำต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 8
2. นำสารมาตรฐานเข้มข้นมาเจือจาง จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 175, 125, 100, 65 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1
3. นำสารละลายที่เจือจางแล้วมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ condition(14) ดังต่อไปนี้

Column	: Reverse phase C18 column ขนาด 250 mm x 4.6 mm (diameter = 5 μ m)
Mobile phase	: น้ำต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 8 ผสมกับฟีนานโทโรลีน (phenanthroline) ร้อยละ 20 ไมโครกรัมโดยมวลและปรับ pH = 5
Injection volume	: 20 μ L
Flow rate	: 0.5 ml/min
Detector	: UV detector wavelength 265 nm.

ตารางที่ 1 การเตรียมความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานกรดอะซีลาอิก

ความเข้มข้นที่ต้องการ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เจือจางมาจากความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรที่นำมา (มิลลิลิตร)	เติมตัวทำละลายน้ำต่อ เมทานอล (มิลลิลิตร)
350	-	-	-
175	350	2.5	2.5
125	350	1.79	3.21
100	350	1.43	3.57
65	350	0.3	4.07
15	350	0.21	4.79

3.2.2 วิธีการทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐานคลินดามัยซิน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานคลินดามัยซินเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6
2. นำสารละลายมาตรฐานเข้มข้นมาเจือจางจนได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2
3. นำสารละลายที่เจือจางมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ condition (20) ดังต่อไปนี้

Column : Reversed phase C18 column ขนาด 250 mm x 4.6mm
(diameter = 5 μ m)

Mobile phase : Buffer KH₂PO₄: Acetonitrile ในอัตราส่วน 75 ต่อ 25

Running time : 10 min

Injection volume : 20 μ L

Flow rate : 1 ml/min

Detector : UV detector wavelength 210 nm

ตารางที่ 2 การเตรียมความเข้มข้นกราฟมาตรฐานคลินดามัยซิน

ความเข้มข้นที่ต้องการ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เจือจางจากความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรที่นำมา (มิลลิลิตร)	เติมสารละลาย Phosphate buffer pH 6 (มิลลิลิตร)
100	1000	0.35	4.65
50	100	2.5	2.5
25	50	2.5	2.5
12.5	25	2.5	2.5
6.25	12.5	2.5	2.5

3.3 ขั้นตอนการเตรียมสูตรตำรับ

กรดอะซิลาอิกและคลินดามัยซินลิโปโซม มีส่วนประกอบได้แก่ กรดอะซิลาอิก, คลินดามัยซิน และส่วนประกอบของลิโปโซม ได้แก่ คอลเลสเตอรอลและเลซิธิน เตรียมตำรับทั้งหมด 6 ตำรับ โดยสูตรตำรับที่ 1-4 ปรับเปลี่ยนปริมาณของเลซิธิน โดยกำหนดปริมาณของคอลเลสเตอรอลคงที่ และสูตรตำรับที่ 5-6 ปรับเปลี่ยนปริมาณของคอลเลสเตอรอล โดยกำหนดปริมาณของเลซิธินคงที่ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บยาและความคงตัวของลิโปโซม แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณส่วนประกอบแต่ละตำรับ

สูตรตำรับ	ส่วนประกอบ (มิลลิกรัม)			
	กรดอะซิลาอิก	คลินดามัยซิน	คอลเลสเตอรอล	เลซิธิน
1	5	1.2	50	100
2	5	1.2	50	200
3	5	1.2	50	300
4	5	1.2	50	400
5	5	1.2	25	100
6	5	1.2	12.5	100

3.3.1 ชั่งปริมาณสารในแต่ละตำรับ ดังแสดงใน ตารางที่ 5

3.3.2 ละลายเลซิธินโคเลสเตอรอล กรดอะซิลาอิก ด้วยเอทานอล 20 มิลลิลิตร จนได้สารละลายใสในขวดก้นกลม

3.3.3 นำไปประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนด้วยระบบสุญญากาศ ที่ความดัน 40 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หมุนด้วยอัตราเร็วระดับ 2 เป็นระยะเวลา 10 นาที

3.3.4 เตรียมสารละลายคลินดามัยซินที่มีความเข้มข้น 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6

3.3.5 บีบอัดสารละลายคลินดามัยซิน ปริมาตร 5 ml เติมลงในขวดก้นกลม

3.3.6 นำขวดก้นกลมไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex-Genie 2) จนได้ของเหลวขาวขุ่น

3.3.7 นำไปลดขนาดลิโปโซมโดยใช้ Sonicator เป็นระยะเวลา 45 นาที

3.4 การศึกษาระยะเวลาในการ sonication ที่มีผลต่อขนาดของลิโปโซม

3.4.1 เตรียมสูตรตำรับที่ 3

3.4.2 ทำการลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Sonicator โดยปิเปตสารออกมาเพื่อวัดขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและประจุ ด้วยเครื่อง Zetasizer ปิเปตสารครั้งละ 1 ml ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที ตามลำดับ

3.4.3 เตรียมสารตัวอย่างก่อนนำไปวัดด้วยเครื่อง โดยนำสารที่ปิเปตได้กรองผ่าน nylon membrane 0.45 μm โดยใช้ Syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร

3.4.4 นำสารตัวอย่างใส่ cuvette แล้วนำวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer

3.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิลาอิก

3.5.1 ขั้นตอนการเตรียม ultracentrifuge tube

1. ปิเปตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลง ultracentrifuge tube
2. นำ ultracentrifuge tube ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง

3.5.2 ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่าง

1. นำนำสารตัวอย่างใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6
2. กรองสารตัวอย่างที่ได้กรองผ่าน nylon membrane pore size 0.45 μm (Syringe filter)

3.5.3 ขั้นตอนการ centrifuge

1. ปิเปตสารที่ผ่านการกรองแล้ว ปริมาตร 3 มิลลิลิตรใส่ลงใน ultracentrifuge tube ที่เตรียมไว้ และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. เมื่อปั่นเหวี่ยงครบ 30 นาที ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงใน ultracentrifuge tube นำไปปั่น

เหวี่ยง ที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง

4. บีบ Triton-X ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร ใส่ลงใน ultracentrifuge tube หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
5. นำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ condition เดียวกับสารมาตรฐาน

3.6 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณคลินดามัยซิน

3.6.1 ขั้นตอนการเตรียม ultracentrifuge tube

1. บีบฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงใน ultracentrifuge tube
2. นำ ultracentrifuge tube ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง

3.6.2 ขั้นตอนการเตรียมสาร

1. นำสารที่ได้มาใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6
2. นำสารที่ได้กรองผ่าน nylon membrane pore size 0.45 μm (Syringe filter)

3.6.3 ขั้นตอนการ centrifuge

1. บีบสารที่ผ่านการกรองแล้ว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงใน ultracentrifuge tube ที่เตรียมไว้ และเติมสารละลาย phosphate buffer pH 6 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. เมื่อปั่นเหวี่ยงครบ 30 นาที บีบสารละลาย phosphate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงใน ultracentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง

4. บีเปต Triton-X ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร ใสลงใน ultracentrifuge tube หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
5. นำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ condition เดียวกับสารมาตรฐาน

3.7 การหาปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ

การหาปริมาณกรดอะซิลาอิกและคลินดามัยซิน รายงานผลปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ โดยแสดงผลเป็นร้อยละ (% entrapment efficiency) สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\% EE = Wc / Wt \times 100$$

โดย Wc = ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้จริง

Wt = ปริมาณยาทั้งหมดที่ใส่ลงสูตรตำรับ

3.8 การศึกษาความคงตัว (stability)

3.8.1 เก็บตำรับที่ 1-6 ไว้นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสแล้วนำมาศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและศักย์ไฟฟ้าของสูตรตำรับ โดยใช้เครื่อง Zetasizer

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาระยะเวลาในการลดขนาดอนุภาคลิโปโซมโดยใช้เครื่อง sonicator

จากขั้นตอนการเตรียมสูตรตำรับกรดอะซิลาอิกและคลินดามัยซินลิโปโซม มีส่วนประกอบสำคัญได้แก่ กรดอะซิลาอิก คลินดามัยซิน คอลเลสเตอรอลและเลซิธิน เตรียมตำรับทั้งหมด 6 ตำรับ โดยสูตรตำรับที่ 1-4 ปรับเปลี่ยนปริมาณของเลซิธิน และกำหนดให้ปริมาณของคอลเลสเตอรอลคงที่ ส่วนสูตรตำรับที่ 5-6 ปรับเปลี่ยนปริมาณของคอลเลสเตอรอลและกำหนดให้ปริมาณของเลซิธินคงที่ ดังแสดงในตารางที่ 4 เพื่อดูประสิทธิภาพในการกักเก็บยาและความคงตัวของลิโปโซม

ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนของส่วนประกอบในสูตรตำรับ

Formulation NO.	Compositions ratio (mg) (Lecithin: Azelaic acid: Clindamycin: Cholesterol)
1	100:5:1.2:50
2	200:5:1.2:50
3	300:5:1.2:50
4	400:5:1.2:50
5	100:5:1.2:25
6	100:5:1.2:12.5

ตารางที่ 5 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและ zeta potential ของ liposome เมื่อ sonicate ด้วยระยะเวลาต่างๆ

sample	Size (nm)	PDI	Zeta (mV)
	average size	average PDI	average zeta
15 min	402.8 ± 27.55	0.53 ± 0.07	-12.11 ± 0.33
30 min	495.90 ± 21.50	0.50 ± 0.03	-12.56 ± 0.45
45 min	203.54 ± 7.66	0.50 ± 0.06	-12.58 ± 0.55
60 min	172.19 ± 1.64	0.41 ± 0.01	-12.16 ± 0.78
75 min	131.5 ± 1.36	0.29 ± 0.02	-12.03 ± 0.56
90 min	94.68 ± 0.91	0.25 ± 0.004	-11.14 ± 0.38
105 min	89.7 ± 1.33	0.24 ± 0.01	-10.82 ± 0.67
120 min	78.79 ± 1.58	0.25 ± 0.01	-9.83 ± 1.00

จากตารางที่ 5 แสดงขนาดของลิโปโซม การกระจายตัวของขนาดและศักย์ไฟฟ้า ผลการศึกษาระยะเวลาในการ sonication ที่มีผลต่อขนาดของลิโปโซม การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้า ของลิโปโซม พบว่าระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นขนาดอนุภาคเล็กลงเรื่อยๆ จากงานวิจัยของ Burchacka E. และคณะ (10) พบว่าขนาดอนุภาคประมาณ 200 นาโนเมตร เพียงพอต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการนำส่งกรดอะซีลาอิกในรูปแบบลิโปโซม ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงใช้ระยะเวลาในการ sonication ที่ 45 นาที ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวลิโปโซมมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 203.54 นาโนเมตร

ตารางที่ 6 แสดงผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและศักย์ไฟฟ้าของสูตรตำรับที่ 1-6

สูตรตำรับ	Size (nm)	PDI	Zeta (mV)
	average size	average PDI	average zeta
1	116.36 ± 1.32	0.261 ± 0.006	-18.34 ± 0.96
2	173.31 ± 1.54	0.296 ± 0.004	-14.82 ± 0.95
3	198.94 ± 5.07	0.425 ± 0.016	-13.00 ± 0.46
4	141.24 ± 1.76	0.285 ± 0.008	-12.25 ± 0.68
5	116.51 ± 1.51	0.234 ± 0.006	-15.80 ± 0.76
6	106.84 ± 1.45	0.267 ± 0.007	-15.64 ± 1.53

จากตารางที่ 6 แสดงผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและศักย์ไฟฟ้าของลิโปโซมที่ทำการลดขนาดอนุภาคด้วย sonicator เป็นเวลา 45 นาที ขนาดอนุภาคในส่วนของตำรับที่ปรับเปลี่ยนปริมาณเลซีธิน มีขนาดอนุภาค ตำรับที่ 1 เท่ากับ 116.36 นาโนเมตร ตำรับที่ 2 เท่ากับ 173.31 นาโนเมตร ตำรับที่ 3 เท่ากับ 198.94 นาโนเมตร และ ตำรับที่ 4 เท่ากับ 141.24 นาโนเมตร ศักย์ไฟฟ้าตำรับที่ 1 เท่ากับ -18.34 mV ตำรับที่ 2 เท่ากับ -14.82 mV ตำรับที่ 3 เท่ากับ -13.00 mV และตำรับที่ 4 เท่ากับ -12.25 mV ส่วนตำรับที่มีการปรับเปลี่ยนปริมาณคอเลสเตอรอล มีขนาดอนุภาคตำรับที่ 5 เท่ากับ 116.51 นาโนเมตรและตำรับที่ 6 เท่ากับ 106.84 นาโนเมตร ศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ย ตำรับที่ 5 เท่ากับ -15.80 mV และตำรับที่ 6 เท่ากับ -15.64 mV

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณยา (%Entrapment Efficacy)

4.2.1 กราฟมาตรฐานของกรดอะซีลาอิก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ condition(14) ดังนี้

Column : Reverse phase C18 column ขนาด 250 mm x 4.6 mm
(diameter = 5 μ m)

Mobile phase : น้ำต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 8 ผสมกับฟีนแอนโทรอลีน
(phenanthroline) ร้อยละ 20 ไมโครกรัมโดยมวลและปรับ pH = 5

Injection volume : 20 μ L

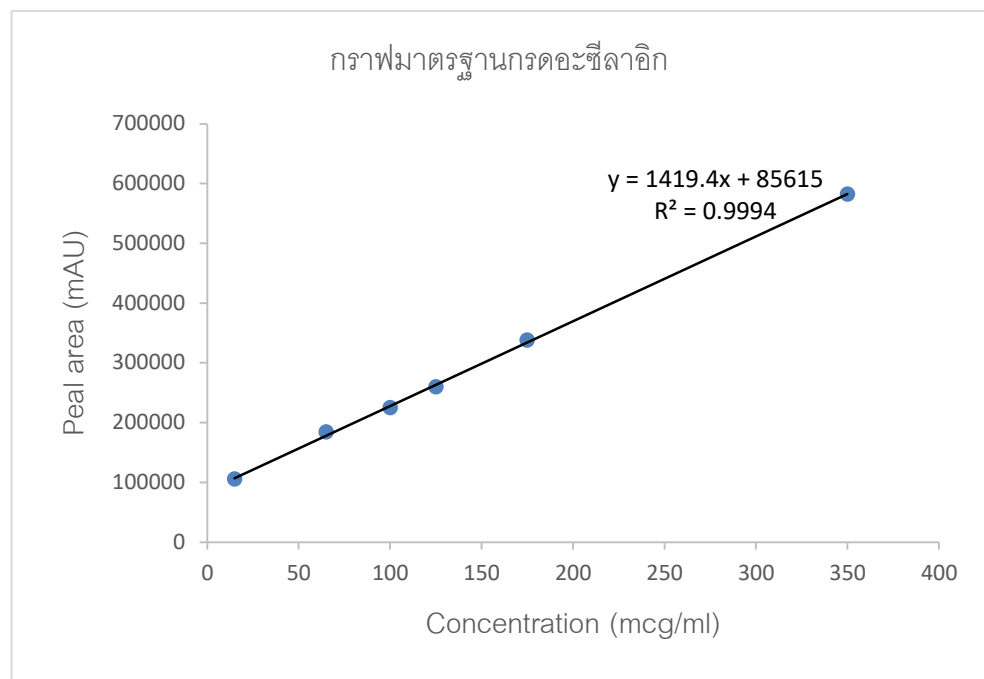
Flow rate : 0.5 ml/min

Detector : UV detector wavelength 265 nm.

กราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 10 ได้สมการระหว่างความเข้มข้นไมโครกรัมต่อมิลลิตร และพื้นที่ใต้กราฟได้สมการ ดังนี้

$$y = 1419.4X + 85615$$

$$R^2 = 0.9994$$



รูปที่ 10 แสดงความเข้มข้นและกราฟมาตรฐานของกรดอะซีลาอิก

4.2.2 กราฟมาตรฐานของคลินดามัยซิน ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ condition (20) ดังนี้

Column : Reversed phase C18 column ขนาด 250 mm x 4.6mm
(diameter = 5 μ m)

Mobile phase : Buffer KH₂PO₄: Acetonitrile ในอัตราส่วน 75 ต่อ 25

Running time : 10 min

Injection volume : 20 μ L

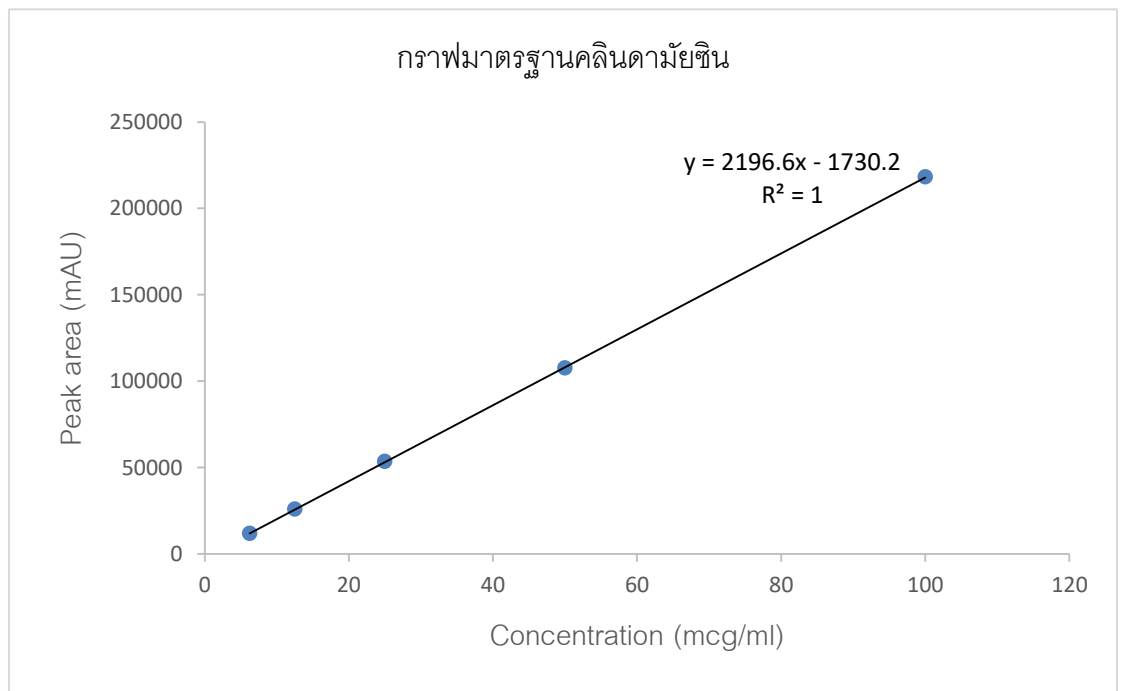
Flow rate : 1 ml/min

Detector : UV detector wavelength 210 nm

กราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 11 ได้สมการระหว่างความเข้มข้นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพื้นที่ใต้กราฟได้สมการ ดังนี้

$$y = 2196.6x + 1730.2$$

$$R^2 = 1$$



รูปที่ 11 ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานคลินดามัยซิน

4.3 ผลการคำนวณหาปริมาณยาแสดงผลเป็นร้อยละของปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ (% entrapment efficiency) ซึ่งอาศัยกราฟมาตรฐานในการคำนวณ นำผลจากการคำนวณปริมาณยาที่ได้แทนในสมการ

$$\% EE = Wc / Wt \times 100$$

โดย Wc = ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้จริง

Wt = ปริมาณยาทั้งหมดที่ใส่ลงสูตรตำรับ

4.3.1 ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณยากรดอะซีลาอิก ด้วยวิธีวิเคราะห์ของกรดอะซีลาอิก

สูตรตำรับ	Compositions ratio (มิลลิกรัม) (Lecithin : Azelaic acid : Clindamycin : Cholesterol)	Entrapment efficacy (%)
1	100:5:1.2:50	39.62
2	200:5:1.2:50	73.49
3	300:5:1.2:50	69.94
4	400:5:1.2:50	61.46
5	100:5:1.2:25	21.06
6	100:5:1.2:12.5	23.02

จากตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณยากรดอะซีลาอิก พบว่าตำรับที่ 1-6 มีร้อยละของปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ ได้แก่ 39.62, 73.49, 69.94, 61.46, 21.06 และ 23.02 ตามลำดับ

4.3.2 ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณยาคลินดามัยซิน ด้วยวิธีวิเคราะห์ของคลินดามัยซิน

สูตรตำรับ	Compositions ratio (มิลลิกรัม) (Lecithin : Azelaic acid : Clindamycin : Cholesterol)	Entrapment efficacy (%)
1	100:5:1.2:50	55.37
2	200:5:1.2:50	47.60
3	300:5:1.2:50	44.11
4	400:5:1.2:50	74.67
5	100:5:1.2:25	40.33
6	100:5:1.2:12.5	38.90

จากตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณยาคลินดามัยซินพบว่าตำรับที่ 1-6 มีร้อยละของปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ ได้แก่ 55.3, 47.60, 44.11, 74.67, 40.33 และ 38.90 ตามลำดับ

4.4 ผลการศึกษาความคงตัว (stability)

การศึกษาคงตัวโดยเก็บตัวอย่างที่ 1-6 ใวนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสแล้ว นำมาศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและศักย์ไฟฟ้าของสูตรตำรับ โดยใช้เครื่อง Zetasizer ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและศักย์ไฟฟ้าของสูตรตำรับที่ 1-6 ในวันที่ 1 และเมื่อเก็บใวนาน 7 วัน

สูตร ตำรับ	Average size (nm)		Average PDI		Average zeta (mV)	
	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 1	วันที่ 7
1	116.36 ± 1.32	146.2 ± 1.79	0.261 ± 0.006	0.143 ± 0.015	-18.34 ± 0.96	-57.63 ± 6.51
2	173.31 ± 1.54	191.55 ± 5.85	0.296 ± 0.004	0.530 ± 0.065	-14.82 ± 0.95	-36.23 ± 21.79
3	198.94 ± 5.07	194.13 ± 5.89	0.425 ± 0.016	0.428 ± 0.021	-13.00 ± 0.46	-44.95 ± 5.78
4	141.24 ± 1.76	135.71 ± 2.81	0.285 ± 0.008	0.350 ± 0.025	-12.25 ± 0.68	-31.7 ± 9.58
5	116.51 ± 1.51	121.36 ± 1.99	0.234 ± 0.006	0.198 ± 0.01	-15.80 ± 0.76	-57.98 ± 8.35
6	106.84 ± 1.45	113.25 ± 1.84	0.267 ± 0.007	0.300 ± 0.028	-15.64 ± 1.53	-44.76 ± 14.65

ผลการศึกษาความคงตัวของตำรับโดยทำการวัดขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาด และศักย์ไฟฟ้าของตำรับที่ 1-6 หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาานาน 7 วัน ขนาดอนุภาคในส่วนของตำรับที่ปรับเปลี่ยนปริมาณ เลซิธิน ขนาดอนุภาคตำรับที่ 1 วันที่ 1 เท่ากับ 116.36 ± 1.32 นาโนเมตร วันที่ 7 เท่ากับ 146.2 ± 1.79 นาโนเมตร, ตำรับที่ 2 วันที่ 1 เท่ากับ 173.31 ± 1.54 นาโนเมตร วันที่ 7 เท่ากับ 191.55 ± 5.85 นาโนเมตร, ตำรับที่ 3 วันที่ 1 เท่ากับ 198.94 ± 5.07 นาโนเมตร วันที่ 7 เท่ากับ 194.13 ± 5.89 นาโนเมตรและตำรับที่ 4 วันที่ 1 เท่ากับ 141.24 ± 1.76 นาโนเมตร วันที่ 7 เท่ากับ 135.71 ± 2.81 นาโนเมตร และศักย์ไฟฟ้าตำรับที่ 1 วันที่ 1 เท่ากับ -18.34 ± 0.96 mV วันที่ 7 เท่ากับ -57.63 ± 6.51 mV, ตำรับที่ 2 วันที่ 1 เท่ากับ -14.82 ± 0.95 mV วันที่ 7 เท่ากับ -36.23 ± 21.79 mV, ตำรับที่ 3 วันที่ 1 เท่ากับ -13.00 ± 0.46 mV วันที่ 7 เท่ากับ -44.95 ± 5.78 mV และ ตำรับที่ 4 วันที่ 1 เท่ากับ -12.25 ± 0.68 mV วันที่ 7 เท่ากับ -31.7 ± 9.58 mV

ส่วนตัวรับที่มีการปรับเปลี่ยนปริมาณคอลเลสเตอรอลมีขนาดอนุภาค ตัวรับที่ 5 วันที่ 1 เท่ากับ 116.51 ± 1.51 นาโนเมตร วันที่ 7 เท่ากับ 121.36 ± 1.99 นาโนเมตรและ ตัวรับที่ 6 วันที่ 1 เท่ากับ 106.84 ± 1.45 นาโนเมตร วันที่ 7 เท่ากับ 113.25 ± 1.84 นาโนเมตร ศักย์ไฟฟ้าตัวรับที่ 5 วันที่ 1 เท่ากับ -15.80 ± 0.76 mV วันที่ 7 เท่ากับ -57.98 ± 8.35 mV และตัวรับที่ 6 วันที่ 1 เท่ากับ -15.64 ± 1.53 mV วันที่ 7 เท่ากับ -44.76 ± 14.65 mV พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยของสูตรตัวรับที่ 1-6 ระหว่างวันที่ 1 และวันที่ 7 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value >0.05) แต่ ศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value <0.05)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการพัฒนาประสิทธิภาพสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินตามัยซินลิโปโซมโดยใช้วิธีอินฟิล์มไฮเดรชัน โดยมีการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารก่อลิโปโซม ได้แก่ เลซิธินและคอลเลสเตรอล ในการศึกษาทำการศึกษาศึกษา 6 สูตรตำรับ (ตำรับที่ 1-6) ซึ่งตำรับที่ 1-4 มีการปรับเปลี่ยนปริมาณของเลซิธินโดยกำหนดปริมาณของโคเลสเตรอลให้คงที่ สำหรับสูตรตำรับที่ 5-6 ปรับเปลี่ยนปริมาณของคอลเลสเตรอลโดยกำหนดปริมาณของเลซิธินให้คงที่

ในงานวิจัยนี้ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของลิโปโซม (physical properties) ได้แก่ ขนาดอนุภาค การกระจายตัวของขนาดและศักย์ไฟฟ้า (zeta potential) และการวิเคราะห์ปริมาณตัวยาที่ถูกกักเก็บ (% entrapment efficiency; % EE) พบว่าการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารก่อลิโปโซม โดยอัตราส่วนเลซิธินที่เพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณยาที่ถูกกักเก็บเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น มีพื้นที่ในการกักเก็บเพิ่มขึ้น โดยสูตรตำรับที่สามารถกักเก็บยาทั้ง 2 ชนิด ได้ดีที่สุด ได้แก่ สูตรตำรับที่ 4 ที่มีอัตราส่วนเลซิธินมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Anayatollah salami และคณะ (2015) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ โดยปรับเปลี่ยนอัตราของสารก่อลิโปโซมและระยะเวลาในการเขย่า พบว่าอัตราส่วนของลิโปโซมเพิ่มขึ้นและระยะเวลาในการเขย่าเพิ่มขึ้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ (30)

ผลการศึกษาระยะเวลาในการลดขนาดอนุภาคที่มีผลต่อขนาดของลิโปโซมพบว่าเมื่อระยะเวลาในการลดขนาดเพิ่มขึ้น ขนาดอนุภาคจะยิ่งเล็กลง โดยจากงานวิจัยของ Burchacka E. และคณะ (10) พบว่าขนาดอนุภาคลิโปโซมที่บรรจุกรดอะซีลาอิกประมาณ 200 นาโนเมตร เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการนำส่งกรดอะซีลาอิกในรูปแบบลิโปโซม ดังนั้นจึงเลือกการใช้ระยะเวลาในการลดขนาดลิโปโซมเป็นเวลา 45 นาที และการศึกษาความคงตัวของตำรับ พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยของสูตรตำรับที่ 1-6 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างวันที่ 1 และวันที่ 7 พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value >0.05) จากการศึกษาของ Sumaira Naeem และคณะ (2015) ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับลิโปโซมโดยใช้ dispersion medium ที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำกลั่น และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ซึ่งพบว่าเมื่อใช้น้ำกลั่นเป็น dispersion medium ศักย์ไฟฟ้าบนพื้นผิวของลิโปโซมมีประจุลบ ในขณะที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 เป็น dispersion medium ศักย์ไฟฟ้าบนพื้นผิวของลิโปโซมมีประจุบวก

และเมื่อดูความคงตัวของสูตรตำรับโดยใช้ระยะเวลาในการศึกษา 10 วัน พบว่าศักย์ไฟฟ้าบนพื้นผิวของลิโปโซมจะค่อยๆ เปลี่ยนจากประจุบวกไปเป็นประจุลบ (31)

ในการศึกษาของคณะผู้วิจัยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 เป็น dispersion medium พบว่า ศักย์ไฟฟ้าบนพื้นผิวของลิโปโซมทุกตำรับมีศักย์ไฟฟ้าเป็นประจุลบตั้งแต่วันแรกและมีประจุลบเพิ่มขึ้นเมื่อศึกษาความคงตัวของตำรับเป็นระยะเวลา 7 วัน จากการศึกษาของ Sumaira Naeem และคณะ เป็นการศึกษาสารก่อลิโปโซมที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพและทางเคมี ไม่มีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง

จากการเปรียบเทียบความคงตัวของศักย์ไฟฟ้า พบว่าศักย์ไฟฟ้าเฉลี่ยของวันที่ 7 ลดลงจากวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value < 0.05) ซึ่งอาจเกิดได้จากการดูดซับศักย์ไฟฟ้าจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์หรืออาจเกิดจากกรดอะซีลาอิกแตกตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่ใช้ในการเตรียมตำรับ ส่งผลให้มีประจุลบในตำรับเพิ่มขึ้น ซึ่งความคงตัวของตำรับที่ระยะเวลา 7 วัน มีความคงตัวดี แต่ทั้งนี้ควรทำการศึกษาความคงตัวในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น เนื่องจากระยะเวลาในการศึกษาเพียง 7 วัน ไม่เพียงพอต่อการสรุปผลการศึกษาความคงตัว

อย่างไรก็ตามงานวิจัยการพัฒนาสูตรตำรับกรดอะซีลาอิกคลินดามัยซินลิโปโซมศึกษาเพียงลักษณะทางกายภาพและทางเคมี รวมถึงความสามารถในการกักเก็บยาเพียงเท่านั้น หากจะนำไปใช้ประโยชน์ทางคลินิก อาจมีการศึกษาในด้านอื่นๆเพิ่มเติม เช่น ด้านประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังของตำรับ ฤทธิ์ในการยับยั้งและการฆ่าเชื้อ เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. ศรีศุภลักษณ์ สิงคาลวณิช. Update management of acne in adolescent. กุมารเวชสาร. 2009;6:180-6.
2. ลีลาวดี เตชาเสถียร. หน้าใส ไร้สิว. ศรีนครินทร์เวชสาร. 2016;31:42-5.
3. Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, Alikhan A, Baldwin HE, Berson DS, et al. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. J Am Acad Dermatol. 2016;74(5):945-73 e33.
4. Titus S, Hodge J. Diagnosis and treatment of acne. Am Fam Physician. 2012. 15;86(8):734-40.
5. Del Rosso JQ. Azelaic Acid Topical Formulations: Differentiation of 15% Gel and 15% Foam. J Clin Aesthet Dermatol. 2017;10(3): 37-40.
6. Leeming JP, Holland KT, Bojar RA. The in vitro antimicrobial effect of azelaic acid, Br J Dermatol. 1986;115(5):551-6.
7. Katsambas A, Graupe K, Stratigos J. Clinical studies of 20% azelaic acid cream in the treatment of acne vulgaris. Comparison with vehicle and topical tretinoin. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1989;143:35-9.
8. Chien AL, Qi J, Rainer B, Sachs DL, Helfrich YR. Treatment of Acne in pregnancy. J Am Board Fam Med. 2016;29(2):254-62.
9. Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, et al. Pharmacotherapy handbook. 9th edition. New York: The McGraw-Hill. 2014;135-40.
10. Burchacka E, Potaczek P, Paduszynski P, Karlowicz-Bodalska K, Han T, Han S. New effective azelaic acid liposomal gel formulation of enhanced pharmaceutical bioavailability. Biomed Pharmacother. 2016;83:771-5.
11. Santa Cruz Biotechnology [Internet].California:Azelaic acid sc-257106 ;2011[cited 16 February 2018]. Available from: <http://datasheets.scbt.com/sc-257106.pdf>

12. Azelaic acid [Internet]. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. U.S. National Library of Medicine; [cited 16 February 2018]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2266#section=Pharmacology>
13. Muhammed A, Yusuf M.A, Talal A. On-column approach in the HPLC-UV analysis of non-chromophoric compounds using azelaic acid as a model. JJPS. 2012; 5(3): 243-51.
14. Clindamycin [Internet]. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; 2018 [cited 16 February 2018]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/29029>.
15. Oesterling T. Aqueous Stability of Clindamycin. J Pharm Sci. 1970;59(1):63–7.
16. Wen lan lou W. et al. Susceptibility of Propionibacterium acnes to Seventeen antibiotics. Microbiol Resour Announc. 1977;11(1):171-73
17. Smieja M. Current Indications for the Use of Clindamycin: A Critical Review. Can J Infect Dis. 1998;9(1):22–8.
18. Webster G. Combination azelaic acid therapy for acne vulgaris. J Am Acad Dermatol. 2000;43(2).
19. Clindamycin Hydrochloride. The United state pharmacopoeia, 36th edition. 2013;2:3028-29
20. Peira E, Carlotti ME, Cavalli R, Trotta M. Azelaic acid sodium salt in the formulation of microemulsions for topical applications. J Drug Deliv Sci and Technol. 2006;16(5):375-9.
21. Škalko N, Cajkovic M, Jalšenjak I. Liposomes with clindamycin hydrochloride in the therapy of acne vulgaris. Int J Pharm. 1992;85(1-3):97–101.
22. Shanmugam S, Song CK, Nagayya-Sriraman S, Baskaran R, Yong CS, Choi HG, et al. Physicochemical characterization and skin permeation of liposome formulations containing clindamycin phosphate. Arch Pharm Res. 2009;32(7):1067-75.

23. Pazoki-Toroudi H. Combination of azelaic acid 5% and clindamycin 2% for the treatment of acne vulgaris. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 2011;30(4):286–291.
24. Shah MR, Imran M, Ullah S. Liposomes. *Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis*. William Andrew.2017:63-110.
25. Mansoori M, Agrawal S, Jawade S, Khan M. I. A review on liposome. *IJARPB*. 2012;2(4):453-464.
26. Venugopalarao G, Lakshmipathy R, Sarada NC. Preparation and characterization of cefditoren pivoxil-loaded liposomes for controlled in vitro and in vivo drug release. *Int J Nanomedicine*. 2015;10 Suppl 1:149–57.
27. Moghimipour E, Tafaghodi M, Balouchi A, Handali S. Formulation and in vitro evaluation of topical liposomal gel of triamcinolone acetonide. *RJPBCS*. 2013;4 Suppl 1:101-7.
28. Singh A, et al. Design, development and characterization of liposomal neem gel. *Int J Pharm Sci Res*. 2014;5(4):140-8.
29. Muppidi K, Pumerantz AS, Wang J, Betageri G. Development and stability studies of novel liposomal vancomycin formulations. *ISRN Pharm*. 2012;2012:1-8.
30. Salami A, Moghimipour E, Monjezi M. Formulation and evaluation of liposomes for transdermal delivery of celecoxib. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2015;10(1):e17653.
31. Naeem S, Kiew LV, Chung LY, Fui KS, Misran MB. A comparative approach for the preparation and physicochemical characterization of lecithin liposomes using chloroform and non-halogenated solvents. *J Surfact Deterg*. 2015;18:579-87.