



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมเพื่อนำส่งเอ็กทอยน์

Development Of Ultradeformable Liposomes With Laurocapram For Dermal
Delivery Of Ectoine

โดย

นสภ.นพิน	ศิริโรจน์	รหัสนิสิต 58210062
นสภ.ภัทรพล	เดชศิริพันธ์	รหัสนิสิต 58210087
นสภ.สิขเรศ	คำแก้ว	รหัสนิสิต 58210282

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมเพื่อนำส่งเอ็กทอยน์
Development Of Ultradeformable Liposomes With Laurocapram For Dermal
Delivery Of Ectoine

โดย

นสภ.นพิน	ศิริโรจน์	รหัสบัณฑิต 58210062
นสภ.ภัทรพล	เดชศิริพันธ์	รหัสบัณฑิต 58210087
นสภ.สิขเรศ	คำแก้ว	รหัสบัณฑิต 58210282

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (cosmetics industry) เป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีอัตราการเจริญเติบโตและขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ผู้บริโภคทั้งเพศชาย เพศหญิง ในทุก ๆ ช่วงวัยต่างให้ความสนใจและใส่ใจในการดูแลตัวเอง ทั้งความงามและผิวพรรณ แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้สามารถส่งสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนังยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากผิวหนังไม่ได้ถูกออกแบบมาให้ดูดซึมสาร คณะผู้วิจัยจึงสนใจเกี่ยวกับระบบนำส่งสารผ่านทางผิวหนัง (dermal drug delivery system) คือระบบอัลตราดีฟิออร์เมเบิลลิโพโซมที่มีลอโรคาแฟรม เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านของเอ็กทอยน์ ซึ่งเป็นสารละลายน้ำดีที่มีฤทธิ์ลดริ้วรอยบนผิวหนัง การศึกษาวิจัยนี้จะเป็นหลักฐานทางวิชาการเพื่อสนับสนุนประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

คณะผู้วิจัย

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2562

เรื่อง การพัฒนาอัลตราดีฟอรั่มเมเบิลลิโฟโซมที่มีลอโรคาแพรมเพื่อนำส่งเอ็กทอยน์

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.นพิน ศิวโรจน์ รหัสนิต 58210062
2. นสภ.ภัทรพล เดชศิริพันธ์ รหัสนิต 58210087
3. นสภ.สิขเรศ คำแก้ว รหัสนิต 58210282

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. อ.ดร. ณิชกานต์ ภิระคำ
2. ผศ. ดร. ถิรพิทย์ สุปงกช

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอัลตราดีฟอรั่มเมเบิลลิโฟโซมที่มีลอโรคาแพรม เพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเอ็กทอยน์ และได้ศึกษาอัลตราดีฟอรั่มเมเบิลลิโฟโซมที่เตรียมได้ทั้ง ขนาดอนุภาค การกระจายขนาด ประจุพื้นผิวและการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย โดยพบว่าอัลตราดีฟอรั่มเมเบิลลิโฟโซมและอัลตราดีฟอรั่มเมเบิลลิโฟโซมที่มีลอโรคาแพรมความเข้มข้น ร้อยละ 1 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ที่ 42.90 นาโนเมตร มีศักย์ซีตาเป็นลบ และมีการกระจายขนาดที่ แคบ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังโดยการวัดความเข้มข้นของเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่าน ผิวหนังในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ภายในรีซีฟเวอร์คอมพาร์ทเมนต์ของฟรานซ์ดีฟิวชันเซลล์ พบว่ายังไม่สามารถสรุปได้ว่าอัลตราดีฟอรั่มเมเบิลลิโฟโซมที่มีลอโรคาแพรมมีผลเพิ่มหรือลดการแพร่ ผ่านผิวหนังของเอ็กทอยน์ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวัดปริมาณเอ็กทอยน์ในผิวหนังชั้นหนัง กำพฐาและหนังแท้ในโอกาสต่อไป

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2019

: Development of ultradeformable liposomes with laurocapram for dermal delivery of ectoine

By

1. Ms.Napin Siviroch ID 58210062
2. Mr.Pattarapon Dejsiripan ID 58210087
3. Ms.Sikhares Kamkaew ID 58210282

Advisors:

1. Dr. Nichakan Peerakum
2. Assistant Professor Dr.Thirapit Subongkot (Ph.D.)

ABSTRACT

This study aimed to develop novel ultradeformable liposomes that contained laurocapram to improve skin penetration of ectoine. The prepared ultradeformable liposomes with laurocapram were characterized for their size, size distribution and surface charge. The prepared ultradeformable liposomes with 1 % laurocapram had average size at 42.90 nm with narrow size distribution and negative surface charge. However, the obtained *in vitro* skin penetration study results by measuring ectoine concentration in receiver compartment could not be concluded the effect of ultradeformable liposomes with laurocapram on skin penetration of ectoine. To confirm the results, the *in vitro* skin penetration study should be reinvestigated by direct measurement of the amount of ectoine in epidermis and dermis.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2562 เรื่อง การพัฒนาและศึกษาคุณสมบัติของอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมที่มีลอโรคาแฟรมเพื่อนำส่งเอ็กทอยน์ นี้สำเร็จได้ด้วยดีนั้น เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผศ.ดร.ธีรพิทย์ สุนงกะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ที่ให้ความรู้แนะนำแนวทางและแนวคิดในการทำโครงการวิจัยฉบับนี้ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณฟาร์มหมูเจ๊นา ที่สนับสนุนลูกหมูที่นำมาใช้ในการทดสอบการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ฐิตินันท์ เอื้ออำนวย อาจารย์ผู้เชี่ยวชาญจากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพาที่ช่วยชี้แนะการคำนวณทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัยฉบับนี้ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยต้องขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางเภสัชกรรมและเจ้าหน้าที่สำนักงานประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านอุปกรณ์เครื่องมือทำการทดลอง ตลอดจนแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการวิเคราะห์ข้อมูล รวมถึงคณะกรรมการอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ทางคณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณอย่างสุดซึ้งมา ณ ที่นี้

นสภ.นพิน	ศิริโรจน์
นสภ.ภัทรพล	เดชศิริพันธ์
นสภ.สิขเรศ	คำแก้ว

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 กรอบแนวคิด	3
1.4 สมมติฐาน	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ทบทวนวรรณกรรม	5
2.2 สารเคมีและเครื่องมือ	17
3. วิธีการดำเนินการวิจัย	19
3.1 การตรวจสอบการถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์	19
3.2 สร้างกราฟมาตรฐานของเอ็กทอยน์	19
3.3 การเตรียมตัวรับ	20
3.3.1 การเตรียมฟิล์ม	20
3.3.2 การเตรียมลิโพโซม	20
3.3.3 การเตรียมอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซม	21
3.4 การประเมินคุณลักษณะของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซม	21
3.4.1 ขนาดอนุภาคและประจุบนพื้นผิว	21
3.4.2 % Entrapment efficiency (% EE) และ % Loading efficiency (% LE)	21
3.5 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (<i>in vitro</i> skin penetration test)	22
3.5.1 การเตรียมผิวหนัง	22

	หน้า
3.5.2 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนัง	23
3.6 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ	23
3.7 การวิเคราะห์เชิงสถิติ	23
4. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	24
4.1 การตรวจสอบการถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์	24
4.2 การประเมินคุณลักษณะของอัลตราดีฟอรัสมัลติโฟโซม	24
4.2.1 ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดและประจุพื้นผิว (ศักย์ซีตา)	24
4.2.2 % Entrapment efficiency (% EE)	26
4.2.3 % Loading efficiency (% LE)	26
4.3 การแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (<i>in vitro</i> skin penetration study)	27
5. สรุปผลการวิจัย	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	32

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลการทดลองการป้องกันการถูกทำลายด้วยรังสีไอออนไนซ์ของเอ็กทอยน์	12
ตารางที่ 2 แสดงสูตรตำรับของลิโปโซม	21
ตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการวิเคราะห์ของกระบวนการ	24
ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาคและประจุพื้นผิว	24

สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางที่ 5 แสดงความเที่ยง	34
ตารางที่ 6 แสดงความแม่นยำ	34
ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ (average area under the curve) กับความเข้มข้นของเอ็กทอยน์	35
ตารางที่ 8 แสดงขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ	37
ตารางที่ 9 แสดงการกระจายขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ	38
ตารางที่ 10 แสดงค่าศักย์ซีตาของสูตรตำรับต่าง ๆ	38
ตารางที่ 11 แสดง % Entrapment efficiency (% EE) และ % Loading efficiency (% LE)	39
ตารางที่ 12 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านผนังชั้น SC ของสูตร 0.51 % w/v Ectoine solution (Sol)	40
ตารางที่ 13 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านผนังชั้น SC ของสูตร 0.51 % w/v Ectoine conventional liposome (CL)	41
ตารางที่ 14 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านผนังชั้น SC ของสูตร 0.51 % w/v Ectoine ultradeformable liposome (UL)	42
ตารางที่ 15 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านผนังชั้น SC ของสูตร 0.51 % w/v Ectoine ultradeformable liposome with 1 % laurocapram (UL with 1% laurocapram)	43

	หน้า
ตารางที่ 16 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านหนังชั้น SC ของสูตร 0.51 % w/v Ectoine ultradeformable liposome with 5 % laurocapram (UL with 5 % laurocapram)	44
ตารางที่ 17 แสดงค่าการวิเคราะห์เชิงสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA	45

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของเอ็กทอยน์

หน้า

5

สารบัญรูปภาพภาคผนวก

	หน้า
รูปที่ 2 แสดง % Entrapment efficiency (กราฟแท่ง) และ % Loading efficiency (กราฟเส้น) ของเอ็กทอยน์ที่ร้อยละต่าง ๆ ของการบรรจุเอ็กทอยน์ในลิโปโซม	27
รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานของเอ็กทอยน์ในช่วงความเข้มข้น 0.05-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	36
รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างตำรับที่เตรียมได้จากการทดลอง	37

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ระบบนำส่งยาทางผิวหนัง (dermal drug delivery system) เป็นระบบนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญที่กำหนดอัตราการดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังคือผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งเป็นผิวหนังชั้นบนสุดของชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ที่ทำหน้าที่ปกป้องร่างกาย จากเชื้อจุลชีพ สารเคมี เป็นต้น จึงทำให้การดูดซึมสารสำคัญผ่านผิวหนังเกิดขึ้นได้น้อย

เอ็กทอยน์ (ectoine) เป็นสารที่สามารถสกัดได้จากแบคทีเรีย *Halomonas elongate* โดยแบคทีเรียจะสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต เช่น โดนแสงแดดที่ความเข้มแสงสูง, อุณหภูมิสูง และสภาวะที่แห้งแล้ง เอ็กทอยน์มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ผิวหนังมนุษย์ จากการถูกทำลายด้วยรังสี UVA [1] ป้องกันผิวจากการสูญเสียน้ำ [2] ด้านการอักเสบ [3] จากการศึกษาของ Heinrich และคณะ [4] ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเอ็กทอยน์ ในอาสาสมัครหญิงสุขภาพดีจำนวน 104 คน พบว่าผิวมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีศึกษาประสิทธิภาพของเอ็กทอยน์ ในด้านเครื่องสำอาง ได้อย่างครบถ้วน เช่น ค่าการระเหยของน้ำออกจากชั้นผิว (TEWL), การต้านริ้วรอย เป็นต้น

ในทางทฤษฎีแล้วสารที่สามารถแพร่ผ่านผิวหนังได้ดีนั้นควรมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 500 ดาลตัน และมีค่า $\log P$ อยู่ในช่วง 1 ถึง 3 อย่างไรก็ตามเอ็กทอยน์เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีโดยมีค่า $\log P = -2.5$ [5] ทำให้แพร่ผ่านผิวหนังได้ไม่ดี จึงจำเป็นต้องมีระบบนำส่งเพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนัง

อัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซม (ultradeformable liposomes) คือลิโปโซมที่มีสารลดแรงตึงผิว ซึ่งมีรายงานการวิจัยว่าสามารถช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของสารสำคัญที่ละลายน้ำได้ดี [6]

อย่างไรก็ตามอัลตราดีฟอรัมเบิลลิโโซมยังมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของยาละลายน้ำได้ดีน้อยกว่าอัลตราดีฟอรัมเบิลลิโโซมที่มีเทอร์พีน

ลอโรคาแพรม (laurocapram) หรือ เอโซน (azone) เป็นสารเพิ่มการซึมผ่านซึ่งมีรายงานว่าสามารถ ช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาเมโทรนิดาโซล (metronidazole) ไทโมควิโนน (thymoquinone) คลินดามัยซิน (clindamycin) อิริโทรมัยซิน (erythromycin) ฟลูออโรยูราซิล (fluorouracil) [7] ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) อินโดเมทาซิน (indomethacin) [8] และ ไตรแอมซิโนโลน อะเซโตนไนด์ (triamcinolone acetonide) [9]

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาผลของอัลตราดีฟอรัมเบิลลิโโซมที่มีสารเพิ่มการซึมผ่านเป็นลอโรคาแพรม ซึ่งเป็นระบบใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยมาก่อน เพื่อช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเอ็กทอยน์และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของอนุภาคอัลตราดีฟอรัมเบิลลิโโซมที่มีลอโรคาแพรมซึ่งบรรจุเอ็กทอยน์
2. เพื่อศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของอัลตราดีฟอรัมเบิลลิโโซมที่มีลอโรคาแพรมการนำส่งเอ็กทอยน์
3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของลอโรคาแพรมในอัลตราดีฟอรัมเบิลลิโโซมต่อการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเอ็กทอยน์

1.3 กรอบแนวคิด

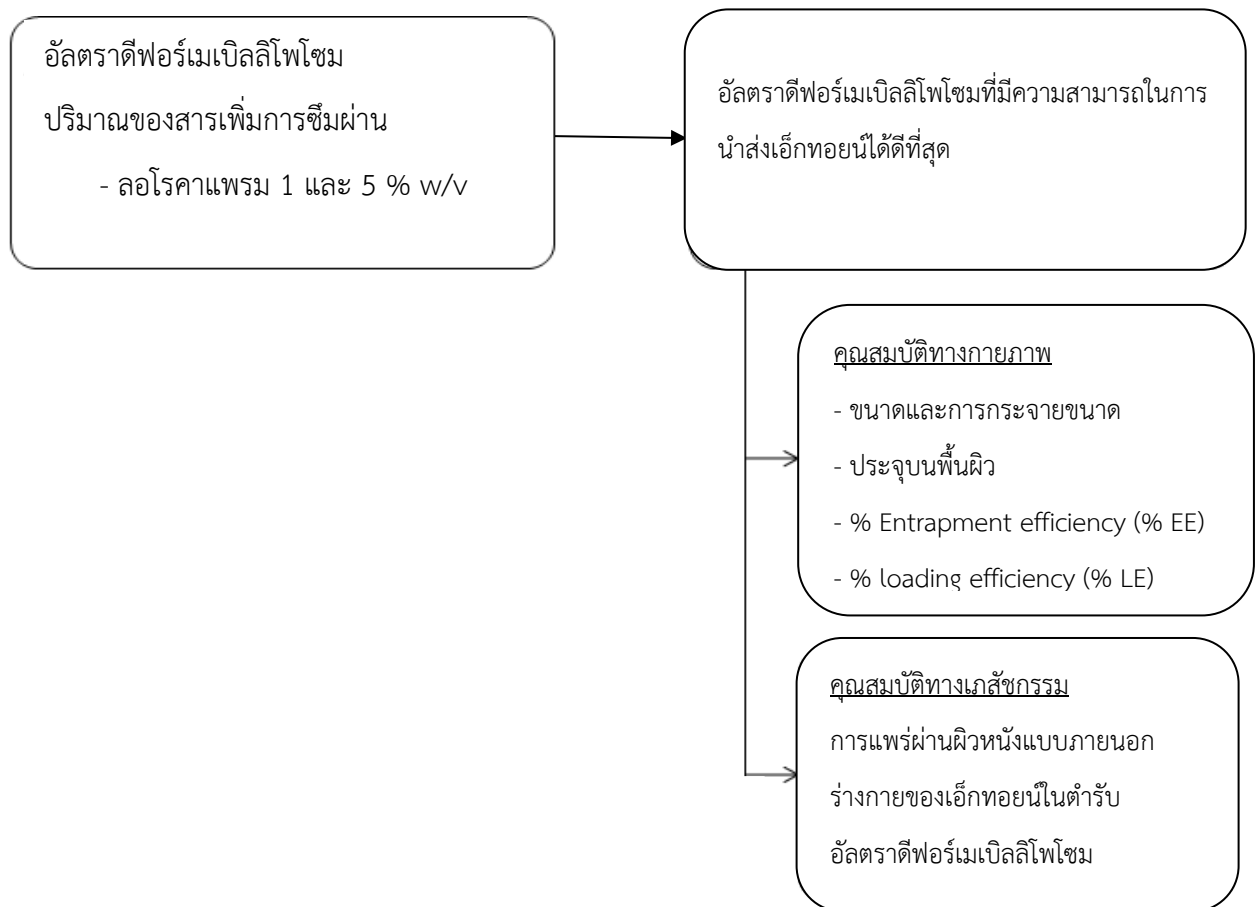
ตัวแปรต้น ชนิดของลิโปโซมและปริมาณของสารช่วยเพิ่มการซึมผ่าน ได้แก่ ลอโรคาแฟรม

ปริมาณ 1 และ 5 % w/v

ตัวแปรตาม ปริมาณของเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านผิวหนัง

ตัวแปรควบคุม ส่วนประกอบอื่น ๆ ของตำรับ วิธีการในการเตรียมตำรับ สภาพแวดล้อมในการ

ทดสอบ



1.4 สมมติฐาน

ระบบของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมที่มีลอโรคาแพรมจะสามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านของเอ็กทอยน์ได้ดีกว่าลิโพโซมทั่วไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

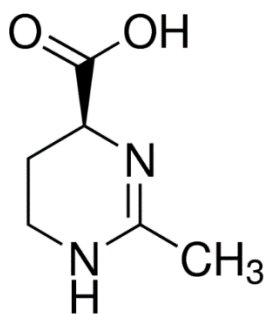
1. ได้สูตรตำรับอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโพโซมที่มีสารเพิ่มการซึมผ่านซึ่งสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของเอ็กทอยน์
2. เพื่อส่งเสริมให้อุตสาหกรรมในประเทศสามารถผลิตเครื่องสำอางโดยใช้นาโนเทคโนโลยีได้

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทบทวนวรรณกรรม

ระบบนำส่งยาทางผิวหนังเป็นระบบนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญที่กำหนดอัตราการดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังคือผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งเป็น ผิวหนังชั้นบนสุดของชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ที่ทำหน้าที่ปกป้องร่างกายจากเชื้อจุลชีพ สารเคมี เป็นต้น จึงทำให้การดูดซึมสารสำคัญผ่านผิวหนังเกิดขึ้นได้น้อยโดยคุณสมบัติของสารที่สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีนั้นควรมีค่า $\log P$ อยู่ในช่วง 1-3 และมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 500 ดาลตัน [11]



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของเอ็กทอยน์ [12]

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย ผู้ใหญ่จะมีขนาดผิวหนังเฉลี่ย 2 ตารางเมตร ซึ่งจะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิดรวมกลุ่มกันหน้าที่หลักของผิวหนังคือป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยจะยับยั้งการดูดซึมโมเลกุลแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และชั้นหนังแท้ (dermis) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของผิวหนัง

ชั้นหนังแท้มีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ประกอบไปด้วยโปรตีนเส้นใย (fibrous protein) ได้แก่ คอลลาเจนและอีลาสติน และ interfibrillar gel ของไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans), เกลือ, น้ำ ซึ่งคอลลาเจนชนิด I และ II นับเป็นร้อยละ 75 ของน้ำหนักแห้งของชั้นหนังแท้ เส้นเลือด, ท่อน้ำเหลือง, ปลายประสาท, รากขน, ต่อมไขมัน และต่อมเหงื่อจะฝังตัวอยู่ในชั้นหนังแท้ รากขนและท่อของต่อมเหงื่อเปิดสู่ภายนอกของผิวหนัง

ชั้นหนังกำพร้า (ไม่รวมชั้นสตราตัมคอร์เนียม) เป็นชั้นนอกสุดที่ยังมีเซลล์ที่ชีวิตอยู่ ชั้นหนังกำพร้าจะไม่มีระบบท่อ และจะได้รับสารอาหารโดยการแพร่มาจาก dermoepidermal junction เพื่อคงให้เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ ในชั้นนี้จะแบ่งออกเป็น 5 ชั้นย่อยโดยเรียงจากในสุดไปยังนอกสุดได้เป็นเจมิเนทีฟเลเยอร์ (germinative layer), สตราตัมสไปโนซั่ม (stratum spinosum), สตราตัมกรานูโลซั่ม (stratum granulosum), สตราตัมลูซิเดียม (stratum lucidum) และสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum)

เซลล์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียมจะเรียกว่าคอร์นีโอไซต์ (corneocytes) โดยจะมีลักษณะคือเกาะกลุ่มกันแน่น, เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว, ไม่มีนิวเคลียส และมีเคราตินอยู่ภายใน ชั้นสตราตัมคอร์เนียมจะเรียงตัวกันเหมือนอิฐกับปูน โดยคอร์นีโอไซต์จะเปรียบเสมือนก้อนอิฐและไขมันระหว่างเซลล์เปรียบเสมือนปูน ซึ่งไขมันจะล้อมรอบคอร์นีโอไซต์โดยในไขมันนั้นจะประกอบไปด้วยเซราไมด์ (ceramides), คอเลสเตอรอล (cholesterol), คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol esters), กรดไขมัน (fatty acids) และเศษเล็ก ๆ ของ คอเลสเตอรอลซัลเฟต (cholesterol sulfate)

ชั้นสตราตัมคอร์เนียมจะประกอบไปด้วยคอร์นีโอไซต์ 15 ถึง 20 ชั้น โดยจะมีความหนาประมาณ 10 ถึง 15 ไมครอนในขณะแห้ง และเมื่อผิวหนังมีความชุ่มชื้น ชั้นนี้จะหนาตัวขึ้นได้ถึง 40 ไมครอนและมีความสามารถในการซึมผ่านเพิ่มมากขึ้น [12]

ความสามารถในการซึมผ่านของสารขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารเองด้วย โดยสารที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 800 ดาลตัน และมีความสามารถในการละลายน้ำและไขมันได้ดีจะสามารถซึมผ่านผิวหนังได้มาก น้ำกระสายยาก็มีส่วนสำคัญในการช่วยเพิ่มการซึมผ่านของยา [13]

อัลตราติฟอร์เมเบิลลิโพโซม หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าทรานส์เฟอร์โซม (transfersomes) เป็นลิโพโซมชนิดหนึ่งที่มีความยืดหยุ่นสูง ซึ่งถูกค้นพบในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งยาผ่านทางผิวหนัง ลิโพโซมชนิดนี้จะแตกต่างจากลิโพโซมทั่วไปโดยลิโพโซมทั่วไปจะไม่สามารถผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้เนื่องจากไม่มีความยืดหยุ่น แตกหักง่าย รวมทั้งมีการรั่วออกของสารมาก แต่ในลิโพโซมชนิดนี้จะสามารถตอบสนองต่อแรงดันออสโมติกและจะเปลี่ยนรูปร่างโดยใช้พลังงานเพียงเล็กน้อย อัลตราติฟอร์เมเบิลลิโพโซมผ่านเข้า

สู่ผิวหนังทางรูซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของมัน โดยจะเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และรวมเข้ากับไขมัน [14] ปัจจัยที่ทำให้ลิโปโซมสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้คือเอจแอคทีเวเตอร์ (edge activator) ซึ่งมักเป็นสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ โซเดียมโคเลท, สเปน 80, ทวิน 80 เป็นต้น [15]

การเตรียมลิโปโซมจะเริ่มจากการเตรียม multi lamellar vesicles (MLV) โดยไขมันลงในตัวทำละลายอินทรีย์ในขวดก้นกลมที่มีฟิล์มบางอยู่บริเวณผนังขวดจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง rotary evaporator ที่สภาวะลดความดันแล้วเติมบัฟเฟอร์และเยื่อ ซึ่งไขมันจะถูกไฮเดรตที่อุณหภูมิสูงกว่า transition temperature ของไขมันหรือที่อุณหภูมิสูงกว่า transition temperature ของสารที่ละลายอยู่มากที่สุดในสารละลายผสม โดยระยะเวลาในการไฮเดรตและวิธีการเขย่าจะส่งผลต่อลักษณะของ MLV ที่แตกต่างกัน วิธีเตรียม MLV ยังมีอีกวิธีคือ spin-label reduction method ซึ่งระยะเวลาในการไฮเดรตและวิธีการเขย่าจะส่งผลต่อจำนวนของ lamellar ของลิโปโซม โดยขนาดของลิโปโซมที่ได้จะมีการกระจายของขนาดที่ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นจะเตรียม small unilamellar vesicles (SUV) โดยการ sonication จะได้ microvesicle ที่ล้อมรอบด้วยน้ำ และนำไปทำ gel filtration chromatography เพื่อเป็นการแยก large multilamellar vesicle ที่เหลือจาก small unilamellar vesicle โดยการ sonication จะทำได้ทั้ง bath type sonicator หรือ probe sonicator ซึ่งการใช้ probe จะทำให้ได้ลิโปโซมที่มีความสามารถในการขนส่งสารได้มากกว่าและยังสลาย MLV ไปเป็นโครงสร้างที่มีขนาดเล็กกว่าได้เร็วขึ้น แต่มีข้อเสียคือการปนเปื้อนด้วยโลหะจากส่วนปลายของหัว probe และหากไม่ระวังก็สามารถทำให้ฟอสโฟลิพิดสลายตัวได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถสร้างละอองจากสารละลายสารกัมมันตรังสี สารเคมีก่อมะเร็งสารเคมีก่อมะเร็งหรือสารที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ ส่วน bath type sonicator จะไม่มีปัญหาเหล่านี้แต่จะต้องให้ความสำคัญกับตำแหน่งในการวางและระยะเวลาในการทำ และมีข้อได้เปรียบคือเป็นระบบปิดซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ วิธีการเตรียม SUV ยังมีวิธีอื่นๆอีก เช่น วิธี detergent removal โดยการกำจัดสารซักฟอกออกจากฟอสโฟลิพิดด้วยการ centrifugation gel-filtration หรือ fast controlled dialysis ซึ่งจะทำให้ได้ unilamellar vesicle ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน วิธี ethanol injection เป็นอีกทางเลือกสำหรับตำรับที่ไม่สามารถทำ sonication และ detergent removal ได้ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว วิธี ether infusion เป็นวิธีที่ง่ายแต่จะแตกต่างจากวิธี ethanol injection คือความเข้มข้นของไขมันที่เติมในตัวทำละลายอินทรีย์ไม่ส่งผลต่อขนาดลิโปโซมที่ได้ ซึ่งวิธี ethanol injection ความเข้มข้นของไขมันที่เติมในตัวทำละลายอินทรีย์จะส่งผลต่อขนาดลิโปโซม [16]

เอ็กทอยน์ เป็นสารประกอบ carboxamidine heterocycle [17] ที่สามารถสกัดได้จาก Halomonas elongate [18] ซึ่งเป็น aerobic, chemoheterotrophic และ halophilic bacteria โดย

แบบที่เรียกว่าสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่สดชื่น เช่น โดนแสงแดดที่ความเข้มแสงสูง, อุณหภูมิสูง และสภาวะที่แห้งแล้ง มีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายและจับกับน้ำได้ดี [19,20]

Graf และคณะ [21] ได้ทดสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บความชุ่มชื้นของเอ็กทอยน์ให้แก่ผิวหนังโดยให้อาสาสมัคร 5 คน ทาเอ็กทอยน์ในรูปแบบอิมัลชันน้ำมันในน้ำ ความเข้มข้นร้อยละ 0 (ยาหลอก), 2 และ 5 บริเวณแขนช่วงล่าง วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยจะใช้เครื่องคอร์นีโอมิเตอร์ (Corneometer®) วัดความชุ่มชื้นก่อนการทา และหลังการใช้ 1 สัปดาห์ จากนั้น 4 ชั่วโมงหลังจากการทาครั้งสุดท้าย จะทาชิลิกาเจล 60 (0.2กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) ซึ่งเป็นตัวแทนของการสูญเสียความชุ่มชื้น ทาทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง เมื่อนาชิลิกาเจลออก จะวัดความชุ่มชื้นของผิวที่เวลา 10 นาที, 2 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เอ็กทอยน์สามารถช่วยป้องกันผิวจากการสูญเสียน้ำและเอ็กทอยน์ยังช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นได้ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอก ซึ่งมีกลีเซอรอลอยู่ร้อยละ 3 และแม้ว่าจะผ่านไปเกิน 24 ชั่วโมง เอ็กทอยน์ก็ยังคงความชุ่มชื้นให้กับผิวได้ดีกว่ายาหลอก

Marini และคณะ [22] ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเอ็กทอยน์ในการรักษาโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนังที่มีความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง ทดสอบโดยให้ผู้ป่วยจำนวน 65 คน ทาครีมที่มีส่วนผสมของเอ็กทอยน์ วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เป็นเวลา 28 วัน เปรียบเทียบกับการใช้อะโทพิกแลร์ (atopiclair) มีตัวยาสำคัญคือกรดกลีเซอริทินิก (glycyrrhetic acid) ซึ่งใช้ในการรักษาโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง ผลการทดลองพบว่าเอ็กทอยน์ครีมมีประสิทธิภาพในการรักษาเทียบเท่าอะโทพิกแลร์ โดยวัดจากค่า SCORAD ซึ่งเป็นการวัดความรุนแรงของโรค

Buenger และ Driller [23] ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเอ็กทอยน์ในการป้องกันการเกิดริ้วรอยก่อนวัยอันควรจากแสงแดด ซึ่งเอ็กทอยน์สามารถป้องกันผิวหนังจากการถูกทำร้ายด้วยรังสียูวีเอ ได้หลายทาง โดยในการศึกษาจะใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture), วิถีแรงเคลื่อนผิวบางประสิทธิภาพสูง (high-performance thin-layer chromatography), gel electrophoresis mobility shift assays, reverse transcriptase polymerase chain reaction, ion exchange chromatography และ UV spectroscopy ในการทดสอบความสามารถในการป้องกันการถูกทำร้ายจากรังสียูวีเอของเอ็กทอยน์และทำการทดสอบในเคราติโนไซต์ (keratinocyte) ของมนุษย์ที่ได้รับ

เอ็กทอยน์ที่ขนาดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นได้รับรังสียูวีเอขนาด 30 J/cm² ความยาวคลื่น 340 - 400 nm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยจะแบ่งเป็นการทดลองย่อยทั้งหมด 4 การทดลอง คือ

1) เอ็กทอยน์กับการเหนี่ยวนำให้หลั่ง second messenger ของรังสียูวีเอ (Ectoin and UVA radiation-induced second messenger release) พบว่าเอ็กทอยน์ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถป้องกันการเกิด secondary messenger formation ที่เกิดจากการกระตุ้นของรังสียูวีเอได้

2) เอ็กทอยน์กับการเหนี่ยวนำให้ AP-2 ทำงานของรังสียูวีเอ (Ectoin and UVA radiation-induced AP-2 activation) ทดสอบโดยแยกนิวเคลียสออกจากเคราตินไซต์ของมนุษย์ที่ได้รับรังสียูวีเอขนาด 30 J/cm² และกระตุ้น transcription factor AP-2 โดย gel electrophoresis mobility shift assays พบว่าเอ็กทอยน์ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถกดการกระตุ้น transcription factor AP-2 ที่เกิดจากการกระตุ้นของรังสียูวีเอได้

3) Protection against UV-induced ICAM-1 expression พบว่าเอ็กทอยน์ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถลดการแสดงออกของ ICAM-1 mRNA ได้

4) การยับยั้งไม่ให้รังสียูวีเอเหนี่ยวนำให้ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียในไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์เกิดความเสียหาย (Block of increased UVA-induced mitochondrial DNA damage in human dermal fibroblasts) ทดสอบในไฟโบรบลาสต์ที่ผิวหนังของมนุษย์ที่ได้รับรังสียูวีเอขนาด 8 J/cm² วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 12 วัน (รวมเป็น 36 ครั้ง) พบว่าเอ็กทอยน์ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถยับยั้งการเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA mutagenesis) ได้

สรุปผลการทดลอง

พบว่าเอ็กทอยน์มีความสามารถในการป้องกันเซลล์ผิวหนังของมนุษย์จากผลเสียที่เกิดจากการกระตุ้นของรังสียูวีเอได้

Heinrich และคณะ [24] ได้ทำการศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอ็กทอยน์ในมนุษย์ โดยทำการเตรียมตำรับเอ็กทอยน์เพื่อวัดคุณสมบัติในการต่อต้านริ้วรอย โดยเปรียบเทียบความเข้ากันของตำรับและประสิทธิภาพในตำรับเอ็กทอยน์กับกระสายยาอิมัลชัน (emulsion) ทำในอาสาสมัครผู้หญิงสุขภาพดี 104 คน อายุระหว่าง 30-60 ปีที่มีผิวปกติ, ผิวแห้ง และผิวแพ้ง่าย โดยห้ามอาสาสมัครเปลี่ยนพฤติกรรมดูแลผิวระหว่างทำการทดลองและไม่มีอาสาสมัครที่ตั้งครรภ์ ให้นมบุตร รับการรักษาที่ซึ่งกระทบต่อผลการทดลองเช่น การอาบแดด

ในการทดลองความเข้ากัน ในทำการทดลองไปก่อนที่จะเริ่ม clinical trial โดยทดสอบผลิตภัณฑ์เอ (product A) เป็นกระสายยา (vehicle) และผลิตภัณฑ์บี (product B) เป็น verum ที่ประกอบด้วยเอ็กทอยน์ร้อยละ 2 เก็บผลการทดลองจากอาสาสมัครเพศหญิงอายุระหว่าง 30-60 ปี โดยใช้วิธี standard test plaster ทดสอบโดยเจือจางและทำให้คงอยู่บนผิวหนังที่สุขภาพดีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ test plaster ออกและสังเกตผลต่อจนครบ 72 ชั่วโมง โดยผลปรากฏว่าไม่พบฤทธิ์ที่ทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังแบบปฏิกิริยาภูมิ

ในการทดสอบความพึงพอใจ ได้ทดสอบในผู้หญิง 30 คนอายุระหว่าง 30-60 ปีที่มีผิวปกติ ผิวแห้งและผิวแพ้ง่ายโดยให้ใช้ผลิตภัณฑ์วันละสองครั้งติดต่อกันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์โดยไม่ให้ใช้ผลิตภัณฑ์ดูแลผิวอื่น ๆ ร่วมด้วยจากนั้นให้ทำแบบสอบถามเกี่ยวกับความพึงพอใจ และประสิทธิภาพโดยทำในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 4 จัดลำดับคะแนนตั้งแต่ 1 ถึง 6 ผลปรากฏว่าทั้งในด้านความชุ่มชื้นของผิวหนัง, visco-elasticity และ biologic elasticity ผลิตภัณฑ์บีมีพัฒนาการสูงที่สุด

ในการทดสอบด้านประสิทธิภาพ ได้ทดสอบในผู้หญิง 24 คน อายุระหว่าง 30-60 ปีที่มีค่าความชุ่มชื้นของผิวอยู่ระหว่าง 30-40 arbitrary unit (AU) ซึ่งวัดจากเครื่องคอร์นีโอมิเตอร์ (Corneometer®) ทดลองที่ปลายแขนด้านในเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยทดลองทั้งผลิตภัณฑ์เอและผลิตภัณฑ์บี โดยทาบริเวณปลายแขนวันละ 2 ครั้งเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ทา

โดยในด้านประสิทธิภาพวัดความชุ่มชื้นของผิวโดยใช้เครื่องคอร์นีโอมิเตอร์ ซีเอ็ม 825 (Corneometer® CM 825) ผลการทดลองพบว่าความชุ่มชื้นของผิวที่ใช้ผลิตภัณฑ์บีมีค่าความชุ่มชื้น

เพิ่มขึ้นจาก 38.1 เป็น 49.6 AU (ร้อยละ 29.5) ใน 4 สัปดาห์ ส่วนผลิตภัณฑ์เอนค่าความชุ่มชื้นเพิ่มขึ้นจาก 39.2 เป็น 47.6 AU (ร้อยละ 21.6)

วัดความยืดหยุ่นของผิวโดยใช้เครื่องคอร์นีโอมิเตอร์ เอสอีเอ็ม 575 (Corneometer® SEM 575) จะวัดค่า R6 (visco-elasticity) และ R7 (biological elasticity) ผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์บีมีค่า R6 ที่ดีขึ้นร้อยละ 7.5 และค่า R7 ที่ดีขึ้นร้อยละ 2.4 โดยเฉลี่ยในขณะที่กลุ่มผลิตภัณฑ์เอและกลุ่มที่ไม่ได้ทาไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การวัดความขรุขระของผิวโดยใช้วิธี surface evaluation of living skin (SELS) โดยใช้เครื่อง วิสซิโอสแกน (Visioscan®) ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ใช้ผลิตภัณฑ์บีมีค่าความขรุขระของผิวนิ่งลดลง จาก 0.40 เป็น 0.19 AU (ร้อยละ 52) ในขณะที่กลุ่มที่ใช้ผลิตภัณฑ์เอค่าความขรุขระลดลงร้อยละ 33 และกลุ่มที่ไม่ได้ทามีค่าความขรุขระลดลงร้อยละ 14

Schröter และคณะ [25] ได้ทำการศึกษาการป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วยรังสีไอออนไนซ์ (ionization radiation) โดยใช้รังสีอิเล็กตรอนพลังงานสูง (high energy electrons) (30 keV) โดยปรับขนาดของกระแสตั้งแต่ 0 ถึง 12.7 nA โดอนรังสีเป็นเวลา 300 วินาที ใส่พลาสมิด (plasmid) pUC19 (2686 bp) ของดีเอ็นเอที่แช่อยู่ในสารละลายเอ็กทอยน์ความเข้มข้น 1M ในน้ำ ultrapure water (pH 6.6) จากนั้นนำไปใส่ในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ใน GelRed ที่ทำมาจาก อะกาโรสเจล (agarose gels) (75 นาโนกรัม) แล้วบันทึกผลโดยใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) และกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (atomic force microscopy; AFM) ที่เป็น เทคนิคพื้นฐานสำหรับ imaging susceptible biomolecules ด้วย nanometer solution ทำโดยใช้ nanotec electronica SL microscope จะสามารถวิเคราะห์โครงสร้าง supercoiled, open circular และ linearized plasmid DNA ได้ พบว่าเอ็กทอยน์มีความสามารถในการป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วยรังสี ไอออนไนซ์ (ionization radiation)

ที่การทดลองเลือกใช้ดีเอ็นเอพลาสมิด (plasmid DNA) นั้นเป็นเพราะว่าเป็น supercoiled isoform ของมันทำให้ไวต่อการถูกทำลายด้วยรังสี และหากโครงสร้าง supercoiled (sc) ถูกทำลายสาย

เดี่ยว (single strand breaks; ssb) จะเกิดกลไกทางความเครียดและ enzymatic activity นำไปสู่โครงสร้าง open circular (oc) แต่หากถูกทำลายแบบทั้งสองสาย (double strand break; dsb) ผลลัพธ์จะทำให้กลายเป็น linearized (lin) DNA และเกิดการสลายตัวของ linearized DNA กลายเป็น fragments สั้น ๆ

ตารางที่ 1 ผลการทดลองการป้องกันการถูกทำลายด้วยรังสีไอออนไนซ์ของเอ็กทอยน์เมื่อทำการทดลองแบบทำซ้ำ 3 ครั้ง (three replicate)

pUC19	Number of primary electrons $[-10^{12}]$ per 300 s	Effective irradiation dose [Gy]	undamaged plasmids				damaged plasmids		
			supercoiled		open circular		Linearized (~913nm)		fragmented
			Gel data relative Fluorescence signal %	AFM data Mean % $\pm$ STD	Gel data relative Fluorescence signal %	AFM data Mean % $\pm$ STD	Gel data relative Fluorescence signal %	AFM data Mean % $\pm$ STD	AFM data
Without ectoine	0.305	0.2	49	63 ± 15	51	35 ± 13	0	2 ± 3	No
	21.14	14.07	*	**	*	**	*	**	Yes**
With ectoine (1mol/l)	0.394	0.26	58	60 ± 3	42	33 ± 3	0	7 ± 2	No
	23.78	15.83	85	84 ± 8	15	15 ± 7	0	1 ± 1	no

สรุปผลการทดลองว่างานศึกษานี้เป็นหลักฐานที่สนับสนุนว่าเอ็กทอยน์มีประสิทธิภาพและจำเพาะกับสารในการป้องกันดีเอ็นเอจากการถูกทำลายโดยรังสีไอออนไนซ์ถ้าเกิดนำเอ็กทอยน์ไปใช้ในยูคาริโอติกเซลล์ (eukaryotic cell) จะสามารถทำหน้าที่เป็น radioprotector สำหรับดีเอ็นเอและอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการแพทย์ได้ในอนาคต เช่น การรักษามะเร็งโดยใช้รังสี

ลอโรคาแพรม เป็นสารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแพร่ผ่านผิวหนัง ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีความชอบไขมัน (lipophilic) สูง มีค่า $\log P = 6.2$ และมีความเข้ากันได้ (miscible) กับตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด ซึ่งความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 0.1 % และ 5 % โดยที่มีความระคายเคืองต่ำ ความเป็นพิษต่ำ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพียงเล็กน้อย [26] เมื่อทาลงบนผิวหนังจะไปทำปฏิกิริยากับไขมันในชั้นสตราตัมคอเรียมและช่วยเพิ่มความสามารถในการแพร่เข้าสู่ผิวหนังของสารที่ละลายน้ำได้ [7]

Sugibayashi และคณะ [27] ได้ศึกษากลไกการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนัง ด้วยลอโรคาแพรมในโมเดลต่าง ๆ และในหนูเพศผู้ สายพันธุ์ WBN/kob ที่ไม่มีขน น้ำหนักประมาณ 150 กรัมในการทดลองที่ต้องใช้สัตว์ทดลอง โดยมีการทดลองดังนี้

การทดลองผลของลอโรคาแพรมที่มีต่อองค์ประกอบในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม โดยลอโรคาแพรมสามารถออกฤทธิ์ต่อไขมันและเคราตินในชั้นสตราตัมคอร์เนียม ซึ่งในการทดลองผลของลอโรคาแพรมที่มีต่อไขมันจะใช้ Lecithin-cholesterol liposome เป็นโมเดลของเยื่อหุ้มไขมัน (lipid membrane) และวัดการปลดปล่อย 6-CF ที่ถูกกักเก็บไว้ในลิโพโซม ซึ่งการปลดปล่อยของ 6-CF จะเพิ่มขึ้นเมื่อ fluidity ของลิโพโซมเพิ่มขึ้นจนทำลายลิโพโซม และจากการทดลองพบว่าลอโรคาแพรมที่ความเข้มข้นต่ำ (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถเพิ่ม fluidity ของลิโพโซมได้เมื่อเทียบกับสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังชนิดอื่น ๆ และยังพบว่าลอโรคาแพรมถูกกักเก็บไว้ในสตราตัมคอร์เนียมจึงอาจส่งผลต่อไขมันในผิวหนังชั้นนี้ ซึ่งลอโรคาแพรมอาจจะมีผลต่อไขมันมากกว่าเคราตินในเรื่องของการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง

จากการทดลองผลของลอโรคาแพรมที่มีต่อเคราตินในชั้นสตราตัมคอร์เนียมโดยวัดความสามารถของลอโรคาแพรมในการช่วยกักเก็บน้ำไว้ในเม็ดเคราตินและความสามารถในการเพิ่มการกักเก็บน้ำหรือความชุ่มชื้นบนผิวหนังของหนู

พบว่าในเม็ดเคราตินที่มีลอโรคาแพรมมีความสามารถในการกักเก็บน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเม็ดที่ไม่มีลอโรคาแพรม โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในเรื่องความเข้มข้นของลอโรคาแพรม และพบว่าลอโรคาแพรมอาจเพิ่มการกักเก็บน้ำหรือความชุ่มชื้นบนผิวหนังของหนูที่ทำด้วยลอโรคาแพรมเจลเมื่อเทียบกับเจลที่ไม่มีสารสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดว่าลอโรคาแพรมมีผลต่อไขมันหรือเคราตินในชั้นสตราตัมคอร์เนียมหรือมีผลต่อทั้งคู่

ดังนั้นผลของลอโรคาแพรมที่มีผลต่อองค์ประกอบในชั้นสตราตัมคอร์เนียมสามารถสรุปได้ดังนี้ คือ ลอโรคาแพรมจะไปเพิ่ม fluidity ให้กับไขมันจึงทำให้ความหนืด (microviscosity) ลดลง และไปเพิ่มการกักเก็บน้ำในชั้นสตราตัมคอร์เนียม

การทดลองผลของลอโรคาแพรมที่มีต่อการซึมผ่านทางผิวหนังของสารต่าง ๆ คือ สารกลุ่มแอลคานอล (alkanol) ได้แก่ เมทานอล บิวทานอล และอ็อกทานอล สารกลุ่มน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส และ ซูโครส ไอออนของสารอนินทรีย์ ได้แก่ Li^+ และ Cl^- (LiCl) Na^+ และ Cl^- (NaCl) K^+ และ Cl^- (KCl) โดยทดสอบในผิวหนังของหนูที่ไม่มีขน ที่ได้และไม่ได้รับลอโรคาแพรม และวัดค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน (permeability coefficient, cm/s) ของแต่ละสารหลังจากที่พรีทรีทเม้นท์ด้วยน้ำและเอทานอล พบว่าลอโรคาแพรมจะช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของ เมทานอล บิวทานอล กลูโคส และ ซูโครส แต่ในทางกลับกันลอโรคาแพรมจะลดการซึมผ่านผิวหนังของอ็อกทานอลหรือสารที่มีความชอบไขมันสูงเนื่องจากอ็อกทานอลสามารถถูกกักเก็บไว้ในเฟสของลอโรคาแพรมได้และมีความชอบไขมันสูง ซึ่งลอโรคาแพรมสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับสตราตัมคอร์เนียมได้ จึงทำให้อ็อกทานอลผ่านสตราตัมคอร์เนียมที่ชุ่มชื้นนั้นได้น้อยลง แต่สารที่ละลายน้ำได้นั้นสามารถซึมผ่านผิวหนังได้มากขึ้น ส่วนความสามารถในการซึมผ่านของไอออนของสารอนินทรีย์ เช่น Na^+ และ K^+ นั้นเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

จากการทดลองจึงสรุปได้ว่าลอโรคาแพรมช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารที่ละลายน้ำได้ดีแต่จะลดการซึมผ่านผิวหนังของสารที่ละลายในไขมัน

Ogiso และคณะ [8] ได้ศึกษาการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังด้วยลอโรคาแพรมในคราบงูที่ได้จากผิวหนังงู *Agkistrodon blomhoffi* ซึ่งล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้งและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและผิวหนังบริเวณหน้าท้องของหนูเพศผู้ น้ำหนัก 130-150 กรัม ซึ่งถูกกำจัดขนด้วย electric razor 24 ชั่วโมงก่อนได้รับยา โดยมีการทดลอง ดังนี้

การทดลองผลของลอโรคาแพรมที่มีต่อการสกัดไขมันจากสตราตัมคอร์เนียมในคราบงู ซึ่งคราบงูมีคุณสมบัติการแพร่ผ่าน (permeability profile) ใกล้เคียงกับสตราตัมคอร์เนียมของมนุษย์และมีองค์ประกอบของไขมันที่คล้ายกันจึงนำมาใช้ทดลองในการหาการปลดปล่อยไขมันออกจากสตราตัมคอร์เนียม โดยได้รับลอโรคาแพรม 3 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1-8 % w/v ใน 55 % เอทานอล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าทำให้ลดปริมาณของโคเลสเตอรอล ฟอสโฟลิพิด และเซราไมด์ในปริมาณมาก แต่ไม่ได้ลดปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ ในผิวหนัง และปริมาณของไขมันจะยิ่งลดลงมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของลอโรคาแพรมเพิ่มขึ้น (2-5 %) โดยโคเลสเตอรอล ฟอสโฟลิพิด และเซราไมด์เป็นไขมันที่อยู่ระหว่างเซลล์

ของสตราตัมคอร์เนียม ซึ่งการเพิ่มการปลดปล่อยของไขมันเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าลอโรคาแพรมเข้าไปทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ระหว่างเซลล์ของสตราตัมคอร์เนียม ซึ่งกลไกนี้จะช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารหรือยาที่ละลายน้ำได้

การทดลองนำผิวหนังของหนูที่ไม่มีขนที่ได้รับลอโรคาแพรม (1 หรือ 5 % w/v) และ 55 % เอทานอลไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณระหว่างเซลล์ คือช่องว่างระหว่างเซลล์ห่างกันมากขึ้นและเซลล์มีการแยกตัวกัน สันนิษฐานว่าเกิดจากการสกัดเอาองค์ประกอบที่เป็นไขมันในระหว่างเซลล์ออกมา ซึ่งช่องว่างที่เกิดขึ้นนี้มีความสำคัญต่อการดูดซึมผ่านผิวหนังของยา

การทดลองการช่วยขนส่งยาที่ละลายน้ำและละลายในไขมันผ่านผิวหนังของลอโรคาแพรมในคราบงูที่พรีทรีทเม้นต์ด้วยลอโรคาแพรม 5 % ใน 55 % เอทานอล พบว่าช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) และ อินโดเมทาซิน (indomethacin) ได้และยังพบว่าอีกหนึ่งกลไกของลอโรคาแพรมคือการซึมผ่านเข้าไปสู่เมทริกซ์ในเซลล์ (intracellular matrix) ไปเพิ่ม fluidity ลด diffusional resistance และเพิ่มรูพรุนให้กับโครงสร้างในเซลล์ซึ่งมีผลช่วยในการขนส่งสารหรือยาผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม

Cato และคณะ [28] ได้ศึกษาผลของลอโรคาแพรมเมื่อเติมลงในตำรับไตรแอมซิโนโลนอะเซโตนไนด์ (triamcinolone acetonide, TA) 0.05 % ครีม ว่าสามารถเพิ่มอัตราการแพร่ผ่านและช่วยให้ฤทธิ์ของยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) ดีขึ้นหรือไม่ โดยเปรียบเทียบระหว่างตำรับ TA 0.05 % /laurocapram (TNX), placebo vehicle (TNX without TA), TA 0.05 % ที่ไม่มีลอโรคาแพรม (TN) และคอร์ติโคสเตียรอยด์ อีก 3 ตำรับ คือ fluocinolone acetonide 0.025 % ointment, betamethasone dipropionate 0.05 % cream และ fluocinonide 0.05 % cream โดยศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 30 คนที่ทำครีมตำรับต่าง ๆ ปริมาณ 10 มิลลิกรัมลงบนปลายแขนทั้ง 2 ข้างเป็นเวลา 4 หรือ 6 ชั่วโมงจากนั้นล้างออก 1 ชั่วโมงก่อนทำการประเมิน และเริ่มประเมินที่ชั่วโมงที่ 5 หรือ 7 หลังจากทาครีม โดยจะเปรียบเทียบตำรับ TNX กับ TN และ placebo vehicle เมื่อทาทิ้งไว้ 4 ชั่วโมงและเปรียบเทียบตำรับ TNX กับคอร์ติโคสเตียรอยด์ทั้ง 3 ตำรับเมื่อทาทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง การประเมิน

จะดูที่ความซีดขาวของผิว (skin blanching) ซึ่งเป็น surrogate marker ของฤทธิ์ทางคลินิกและการแพร่ผ่านผิวหนัง พบว่าหลังจากทาครีม 4 ชั่วโมงฤทธิ์ในการหดตัวของหลอดเลือดของ TNX มากกว่า TN อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และหลังจากทาครีม 6 ชั่วโมงความซีดขาวของผิวเมื่อทา TNX มากกว่า fluocinolone acetonide 0.025 % ointment และ betamethasone dipropionate 0.05 % cream อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.05$)

Cato และคณะ [9] ได้ศึกษาผลของตำรับ 0.05 % triamcinolone acetonide ที่มีลอโรคาแพรม (TNX) เปรียบเทียบกับ standard 0.1 % triamcinolone acetonide cream และคอร์ติโคสเตียรอยด์อีก 3 ตำรับคือ fluocinolone acetonide, amcinonide, และ mometasone furoate โดยศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 60 คน อายุตั้งแต่ 18 – 60 ปีที่ทาครีมตำรับต่าง ๆ ปริมาณ 10 มิลลิกรัมลงบนปลายแขนทั้ง 2 ข้าง พื้นที่ 2 ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 6 หรือ 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างออก และประเมินการหดตัวของหลอดเลือด (skin blanching) ที่ 2 ชั่วโมงต่อมา (ชั่วโมงที่ 8 หรือ 18) โดยการศึกษาที่ 1 ใช้อาสาสมัครจำนวน 29 คนทาครีมดั่งนี้ลงบนแขนทั้งสองข้างคือ TNX และ 0.1 % triamcinolone acetonide จาก 3 แหล่งคือ Kenalog, generic TA และ Aristocort เป็นเวลา 6 หรือ 16 ชั่วโมง การศึกษาที่ 2 ใช้อาสาสมัครจำนวน 32 คนทาครีมดั่งนี้ลงบนแขนเพียงข้างเดียวคือ TNX, amcinonide 0.1 % , mometasone furoate 0.1 % , fluocinolone acetonide 0.025 % และ 0.01 % และ triamcinolone acetonide 0.1 % จาก 3 แหล่ง คือ Kenalog, Geneva และ Aristocort

การศึกษาที่ 1 หลังจากทาครีม 6 และ 16 ชั่วโมง พบว่า TNX มีความซีดขาวของผิวมากกว่า Kenalog, Geneva และ Aristocort อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.001$) โดยความซีดขาวของผิวที่เกิดจาก TNX ที่ 6 ชั่วโมงจะมากกว่าที่ 16 ชั่วโมง

การศึกษาที่ 2 หลังจากทาครีม 16 ชั่วโมง พบว่า TNX มีความซีดขาวของผิวมากกว่า Kenalog, Geneva, Aristocort, fluocinolone acetonide (0.025 % และ 0.01 %) และ amcinonide (0.1 %) อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.05$) และมีความซีดขาวของผิวใกล้เคียงกับ mometasone furoate (0.1 %)

จากการทดลองพบว่าเมื่อเติมลอโรคาแพรมในตำรับจะช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการหดหลอดเลือดและฤทธิ์ของยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ และอาจช่วยเพิ่มการตอบสนองต่อการรักษาด้วยคอร์ติโคสเตียรอยด์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งยาไตรแอมซิโนโลนอะเซโตนไนด์เป็นยาที่ละลายในน้ำ ดังนั้นการเติมลอโรคาแพรมลงไปในตำรับจึงเป็นการช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาได้

2.2 สารเคมีและเครื่องมือ

สารเคมี

1. Ectoine (Ectoine > 98 %) (Tokyo Chemical Industry CO.,Ltd., Japan)
2. Ectoin® Cosmetic (Ectoine, Bitop AG, Witten, Germany)
3. Laurocapram (Laurocapram > 96 %) (Laurocapram, Tokyo Chemical Industry CO.,Ltd., Toshima, Kita-Ku, Japan)
4. Phospholipid (Phosphatidyl Choline>94 %) (Phospholipon 90 G, Lipoid, Cologne, Germany)
5. Cholesterol (Cholesterol from lanolin $\geq$ 99.0 % GC) (Cholesterol, Sigma-Aldrich, MO, USA)
6. Tween 20 (Tween 20, Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
7. Methanol (Methyl alcohol HPLC Grade) (Methanol, Honeywell Burdick & Jackson, Cheoyong-ro Nam-gu, Korea)
8. Chloroform (Chloroform) (Chloroform, RCI Labscan Limited, Samutprakan, Thailand)
9. Phosphate buffer (PBS; pH 7.4)
10. Triton X-100 (Triton-X 100 Reagent Grade) (Triton X-100, VWR Life Science AMRESCO biochemical, OH, USA)

เครื่องมือ

1. Centrifuge (SorvallTM LegendTM X1R Centrifuge, Thermo ScientificTM, MA, USA)
2. Centrifugal Filter Units (Amicon® Ultra-0.5 ml 30K, Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Ireland)
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. Magnetic stirrer (RO 10, IKA® Works (Asia) Sdn Bhd, Rawang, Selangor, Malaysia)
7. Circulation water bath (WCB-11, DAIHAN Scientific, Gangwon-do, Korea)
8. Dynamic light scattering (DLS) particle size analyzer (Zetasizer Nano-ZS; Malvern Instrument, Malvern, UK)
9. Franz diffusion cells
10. High intensity ultrasonic processor with temperature controller (SON-1 VCX-750Z, SONICS&Materials.Inc, CT, USA)
11. Vortex mixer (G560E, SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC., NY, USA)
12. Analytical balance (MS204TS, METTLER TOLEDO, Greifensee, Switzerland)
13. Freeze dryer (LCC-1-7382030, LABCONCO, MO, USA)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การตรวจสอบการถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของเอ็กทอยน์ ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความยาวคลื่นแสงยูวี 210 นาโนเมตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำ ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 250 มิลลิเมตรที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที โดยมีปริมาตรการฉีด (injection volume) 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาคำนวณ %recovery จากสูตรตามสมการที่ 1 และ %RSD จากสูตรตามสมการที่ 2

$$\%Recovery = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่วัดได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารที่ซั่งจริง}} \times 100 \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$\%RSD = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100 \quad \text{สมการที่ 2}$$

3.2 สร้างกราฟมาตรฐานของเอ็กทอยน์

การสร้างกราฟมาตรฐานทำได้โดยการซั่งเอ็กทอยน์ในปริมาณที่ทราบน้ำหนักแน่นอน โดยเครื่องซั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Analytical balance) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำจากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ที่ความยาวคลื่นแสงยูวี 210 นาโนเมตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำ ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 250 มิลลิเมตรที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที โดยมีปริมาตรการฉีด (injection volume) 20 ไมโครลิตร

3.3 การเตรียมตัวรับ

3.3.1 การเตรียมฟิล์ม

เตรียมสารละลายฟอสโฟลิพิดโดยชั่งฟอสโฟลิพิด 0.7730 กรัมแล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อทำละลายจะได้สารละลายเข้มข้นของฟอสโฟลิพิด สารละลายของโคเลสเตอรอลเตรียมโดยชั่งโคเลสเตอรอล 0.0773 กรัมแล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรเพื่อทำละลายจะได้สารละลายเข้มข้นของโคเลสเตอรอล จากนั้นจึงปิเปตสารละลายของฟอสโฟลิพิด 250 ไมโครลิตรและสารละลายของโคเลสเตอรอล 500 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นจึงนำไปประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้แก๊สไนโตรเจนเพื่อให้เกิดเป็นฟิล์มบางรอบหลอดทดลอง แล้วจึงนำฟิล์มบางที่ได้ไปเก็บในโถดูดความชื้น (Desiccator) เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง จนฟิล์มแห้ง

3.3.2 การเตรียมลิโปโซม

การเตรียมคอนเวนชันนอลลิโปโซม (Conventional liposome, CL) เตรียมโดยนำสารละลายของเอ็กทอยนิสไล่งในฟิล์มที่เตรียมไว้ เติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 5 นาที จนฟิล์มหลุดออกจากหลอดทดลองทั้งหมด จากนั้นนำลิโปโซมที่ได้ไปปลดขนาดอนุภาคโดยใช้เครื่อง High intensity ultrasonic processor with temperature controller เป็นเวลา 30 นาทีที่ 20 % แอมพลิจูดโดยวางลิโปโซมบนอ่างน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิ แล้วปิเปตลิโปโซมลงใน microcentrifuge

tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 15000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วดูดเฉพาะส่วน supernatant มาใช้

3.3.3 การเตรียมอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซม

เตรียมโดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 แต่มีการเติม Tween 20 และลอโรคาแพรมโดยมีสัดส่วนตามตารางที่ 2 ก่อนนำไปลดขนาดอนุภาค

ตารางที่ 2 แสดงสูตรตำรับของลิโพโซม

สูตรตำรับ	ฟอสโฟลิพิด (% w/v)	โคเลสเตอรอล (% w/v)	เอ็กทอยน์ (% w/v)	Tween 20 (% w/v)	ลอโรคาแพรม (% w/v)	น้ำ (มิลลิลิตร)
Solution	-	-	0.51	-	-	qs 5
CL	0.7730	0.0773	0.51	-	-	qs 5
UL	0.7730	0.0773	0.51	2	-	qs 5
UL with 1 % laurocapram	0.7730	0.0773	0.51	2	1	qs 5
UL with 5 % laurocapram	0.7730	0.0773	0.51	2	5	qs 5

3.4 การประเมินคุณลักษณะของอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซม

3.4.1 ขนาดอนุภาคและประจุบนพื้นผิว

ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางและ zeta potential วัดโดยใช้เทคนิค Photon Correlation Spectroscopy (PCS) ที่อุณหภูมิห้อง โดยเจือจางสารตัวอย่างด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:9 ก่อนนำมาวัด

3.4.2 % Entrapment efficiency (% EE) และ % Loading efficiency (% LE)

% EE ของเอ็กทอยน์ที่บรรจุอยู่ในลิโพโซม สามารถคำนวณโดยหาอัตราส่วนระหว่างปริมาณเอ็กทอยน์ที่อยู่ในลิโพโซมต่อปริมาณเอ็กทอยน์ทั้งหมดที่ใส่ลงไปในตัวรับ โดยนำลิโพโซม 0.5 มิลลิลิตร ใส่

ลงใน ultrafiltration tube ซึ่งมี molecular weight cutoff ที่ 3,000 ดาลตัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 60 นาที ดูดส่วน filtrate ทิ้ง แล้วจึงเติมน้ำ 0.25 มิลลิลิตร ลงในส่วน retentate จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำให้อนุภาคลิโปโซมแตกออกโดยการเติม 0.1 % w/v Triton X-100 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเติมน้ำ 0.3 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วน filtrate ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอ็กทอยน์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความยาวคลื่นแสงยูวี 210 นาโนเมตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำ ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 250 มิลลิเมตรที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที โดยมีปริมาตรการฉีด (injection volume) 20 ไมโครลิตรโดยจะคำนวณ % EE จากสมการที่ 3

$$\% EE = \left(\frac{C_L}{C_i} \right) \times 100 \quad \text{สมการที่ 3}$$

C_L คือ ปริมาณเอ็กทอยน์ที่อยู่ในลิโปโซม

C_i คือ ปริมาณเอ็กทอยน์ทั้งหมดที่ใส่ลงไปในตัวรับ

และคำนวณหา % LE จากสมการที่ 4

$$\% LE = \left(\frac{D_t}{L_t} \right) \times 100 \quad \text{สมการที่ 4}$$

D_t คือ ปริมาณของเอ็กทอยน์ในลิโปโซม

L_t คือ ปริมาณของโคเลสเตอรอลและฟอสโฟลิพิดที่บรรจุในลิโปโซม

3.5 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro* skin penetration test)

3.5.1 การเตรียมผิวหนัง

ใช้ผิวหนังส่วนหน้าท้องของลูกหมูที่ตายแรกเกิด โดยลอกชั้นไขมันและกล้ามเนื้อออกโดยใช้มีดผ่าตัดและกรรไกร ใช้เฉพาะส่วนหนังกำพร้าและหนังแท้หนาประมาณ 0.6-0.7 มิลลิเมตร ตัวอย่างผิวหนังจะเก็บในช่องแช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส และจะนำมาแช่ใน PBS ก่อนใช้

3.5.2 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนัง

ศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังของเอ็กทอยน์จะใช้ Franz diffusion cells ที่มีพื้นที่การซึมผ่านประมาณ 1.5 ตารางเซนติเมตรเป็นเครื่องมือทดสอบ โดยในส่วนรีซีฟเวอร์คอมพาร์ทเมนต์ บรรจุ PBS 6.5 มิลลิลิตร ซึ่งคนด้วย magnetic bar ที่อัตรา 300 รอบต่อนาที แล้ววางตัวอย่างผิวหนังให้ด้านหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมติดกับโดเนอร์คอมพาร์ทเมนต์และด้านหนังที่ติดกับของเหลวในรีซีฟเวอร์คอมพาร์ทเมนต์โดย diffusion cell แต่ละเซลล์จะต่อกับ circulating water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 32.0 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่สูตรตำรับที่ต้องการทดสอบลงในโดเนอร์คอมพาร์ทเมนต์ 2 มิลลิลิตร โดยจะเก็บสารละลายใน รีซีฟเวอร์คอมพาร์ทเมนต์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 1, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง และเติม PBS 0.5 มิลลิลิตรลงไปทุกครั้ง เพื่อคงปริมาตรให้เท่าเดิม จากนั้นนำสารละลายที่เก็บได้ไปวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC

3.6 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของเอ็กทอยน์ โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความยาวคลื่นแสงยูวี 210 นาโนเมตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำ ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 250 มิลลิเมตรที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที โดยมีปริมาตรการฉีด (injection volume) 20 ไมโครลิตร

3.7 การวิเคราะห์เชิงสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยโปรแกรม IBM® SPSS® Statistics Version 26.0.0.0 64-bit edition โดยใช้วิธีการ Compare Means One-Way ANOVA ตามด้วย post-hoc test โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p -value ต่ำกว่า 0.05

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การตรวจสอบการถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์

ตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการวิเคราะห์ของกระบวนการ

Analytical performance characteristics	%
% Recovery	99.70 $\pm$ 3.47
% RSD	0.20 $\pm$ 0.13

ค่า % recovery มีค่าเฉลี่ยคือร้อยละ 99.70 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 98-108 แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้ให้ผลที่มีความถูกต้องและค่า % RSD มีค่าเฉลี่ยคือร้อยละ 0.20 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 2 แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้ให้ผลที่มีความแม่นยำ

4.2 การประเมินคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของลิโปโซม

4.2.1 ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดและประจุพื้นผิว (ศักย์ซีตา)

ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายขนาดและประจุพื้นผิว (ศักย์ซีตา) แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาคและประจุพื้นผิว

Formulation	Particle size (nm)	Polydispersity index (Pdl)	Zeta potential (mV)
CL	86.89 $\pm$ 2.65*	0.3049 $\pm$ 0.0231	-28.62 $\pm$ 16.47
UL	41.45 $\pm$ 1.86	0.2072 $\pm$ 0.0636	-12.25 $\pm$ 4.58
UL with 1 % laurocapram	42.90 $\pm$ 1.96	0.2480 $\pm$ 0.0107	-18.62 $\pm$ 1.41

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

ขนาดของอนุภาคของคอนเวนชันนอลลิโปโซม (CL) มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 86.89 นาโนเมตร ขนาดอนุภาคของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่ไม่มีลอโรคาแพรม (UL) มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 41.45 นาโนเมตร ขนาดอนุภาคของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 1 (UL with 1 % laurocapram) มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 42.90 นาโนเมตร ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของคอนเวนชันนอลลิโปโซมมากกว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่ไม่มีลอโรคาแพรมและ อัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value=0.000) แสดงให้เห็นว่าการเติม Tween 20 มีผลทำให้ขนาดอนุภาคลิโปโซมเล็กลง ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่ไม่มีลอโรคาแพรมและอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 1 ไม่แตกต่างกัน (p -value=0.154) แสดงให้เห็นว่าการเติมลอโรคาแพรมความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงในสูตรตำรับอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่ไม่มีลอโรคาแพรมไม่มีผลเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาค

จากการวัดค่าการกระจายขนาดของอนุภาค (Pdl) ในทุกสูตรตำรับมีค่าอยู่ระหว่าง 0.2-0.3 แสดงว่าวิธีการเตรียมลิโปโซมดังกล่าวทำให้ได้ลิโปโซมที่มีการกระจายขนาดแคบ

ศักย์ซีตาของคอนเวนชันนอลลิโปโซมมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ -28.62 mV ศักย์ซีตาของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่ไม่มีลอโรคาแพรมมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ -12.25 mV ศักย์ซีตาของอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ -18.62 mV เนื่องจากโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดมีลักษณะเป็น zwitterionic compound คือมีทั้งประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตและประจุบวกจากหมู่โคลีน เนื่องจากฟอสโฟลิพิดมีค่า isoelectric point (pI) อยู่ระหว่าง 6-6.7 เนื่องจากการศึกษาใช้น้ำซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างที่เป็นกลาง (pH=6.98) เป็นตัวทำละลาย เมื่อค่าความเป็นกรดต่างของน้ำสูงกว่าค่า pI โมเลกุลของฟอสโฟลิพิดจึงมีประจุลบ ส่งผลให้พื้นผิวอนุภาคลิโปโซมมีประจุเป็นลบ ส่วนโครงสร้างของเอ็กทอยน์ดังรูปที่ 1 ซึ่งมีทั้งหมู่เอมีโนและหมู่คาร์บอกซิลิกเมื่ออยู่ในน้ำซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างที่เป็นกลางจะเป็นสารที่มีประจุบวกและลบ แต่เนื่องจากเอ็กทอยน์มีปริมาณเพียงร้อยละ 60 ของน้ำหนักไขมันจึงทำให้ประจุของอนุภาคเกิดจากอิทธิพลของประจุของฟอสโฟลิพิดเป็นหลัก

ศักย์ซีตาของสูตรตำรับคอนเวนชันนอลลิโปโซม สูตรอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่ไม่มีลอโรคาแพรมและสูตรอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 1 ไม่แตกต่างกัน เนื่องจาก

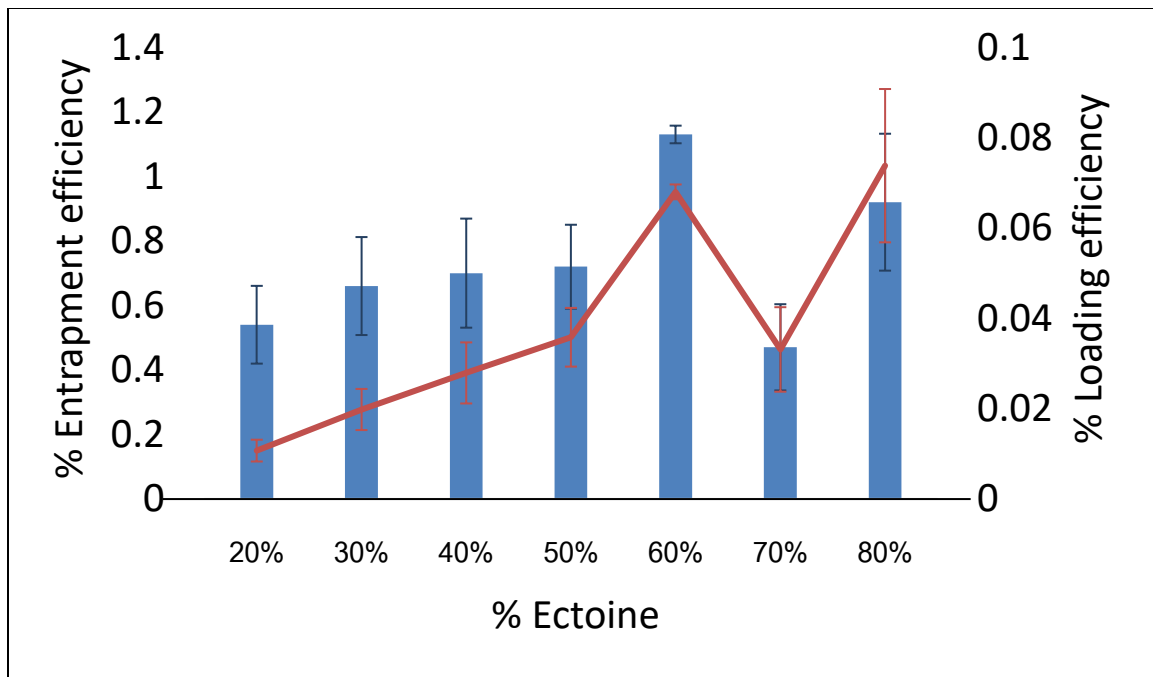
โครงสร้างของ Tween 20 ที่เติมลงไปในตัวรับอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมทั้ง 2 ตัวรับ และลอโรคาแพรม ที่เติมลงไปในตัวรับอัลตราดีฟอรัเมเบิลลิโพโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 1 ไม่มีประจุจึงไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าประจุเฉลี่ยที่พื้นผิวของลิโพโซมในตัวรับ

4.2.2 % Entrapment efficiency (% EE)

% EE ของปริมาณเอ็กทอยน์ที่บรรจุอยู่ในลิโพโซม แสดงในรูปที่ 2 พบว่า % EE มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 0.54 ถึง 1.13 โดยค่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.54 ที่ความเข้มข้นของเอ็กทอยน์ร้อยละ 20 จนถึงร้อยละ 1.13 ที่ความเข้มข้นของเอ็กทอยน์ร้อยละ 60 จากนั้นจึงลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอ็กทอยน์เพิ่มขึ้นแต่ที่ร้อยละ 70 มีค่าลดลงมากซึ่งอาจเนื่องมาจากการวิเคราะห้เชิงปริมาณเกิดความขัดข้องของเครื่องมือ ทำให้ต้องใช้เวลานานในการวิเคราะห์กว่าปกติจึงอาจส่งผลให้ค่าที่วิเคราะห์ได้มีค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าที่ควรจะเป็นอันเนื่องมาจากการสลายตัวของสาร

4.2.3 % Loading efficiency (% LE)

% LE ของปริมาณเอ็กทอยน์ที่บรรจุอยู่ในลิโพโซม แสดงในรูปที่ 2 พบว่า % LE มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 0.0107 ถึง 0.0738 โดยค่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.0107 ที่ความเข้มข้นของเอ็กทอยน์ร้อยละ 20 จนถึงร้อยละ 0.0738 ที่ความเข้มข้นของเอ็กทอยน์ร้อยละ 80 แต่ที่ความเข้มข้นของเอ็กทอยน์ร้อยละ 70 มีค่าลดลงมากกว่าปกติเนื่องจากเหตุผลเดียวกับข้อ 4.1.1



รูปที่ 2 แสดง % Entrapment efficiency (กราฟแท่ง) และ % Loading efficiency (กราฟเส้น) ของเอ็กทอยน์ที่ร้อยละต่าง ๆ ของการบรรจุเอ็กทอยน์ในลิโปโซม

4.3 การแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro* skin penetration study)

จากการศึกษาโดยการนำสารละลายในส่วนรีซีฟเวอร์คอมพาร์ทเมนต์ไปวัดปริมาณเอ็กทอยน์ พบว่ามีเพียงสูตรสารละลายและสูตรคอนเวนชันนอลลิโปโซมที่มีความเข้มข้นของเอ็กทอยน์เพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป ในขณะที่ตำรับอื่นมีความแปรปรวนของความเข้มข้นที่วัดได้ จึงทำให้ไม่สามารถคำนวณค่าฟลักซ์ของสูตรอัลตราดีฟอัมเบลลิโปโซมที่ไม่มีลอโรคาแพรม สูตรอัลตราดีฟอัมเบลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 1 และสูตรอัลตราดีฟอัมเบลลิโปโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 5 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการแพร่ผ่านผิวหนังได้ จึงควรมีการเปลี่ยนแปลงวิธีการประเมินความสามารถในการแพร่ผ่านผิวหนังโดยการวัดปริมาณยาโดยตรงในผิวหนังแทนการวัดปริมาณยาในรีซีฟเวอร์คอมพาร์ทเมนต์

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถเตรียมอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีลอโรค้าแพรมเป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่านในการนำส่งเอ็กทอยน์ผ่านทางผิวหนังได้ โดยอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีลอโรค้าแพรมมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 41-45 นาโนเมตร มีความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาค มีประจุบนพื้นผิวเป็นลบ และปริมาณเอ็กทอยน์ที่สามารถกักเก็บอยู่ในลิพโซม (% EE) ได้มากที่สุดคือร้อยละ 1.13 โดยมี Loading Efficiency (% LE) ได้มากที่สุดคือร้อยละ 0.0738 อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกายของเอ็กทอยน์ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีลอโรค้าแพรมมีผลเพิ่มหรือลดการแพร่ผ่านผิวหนังของเอ็กทอยน์

เอกสารอ้างอิง

1. Chen R, Li R, Liu Q, Bai C, Qin B, Ma Y, et al. Ultradeformable Liposomes: a Novel Vesicular Carrier For Enhanced Transdermal Delivery of Procyanidins: Effect of Surfactants on the Formation, Stability, and Transdermal Delivery. AAPS PharmSciTech. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS); 2016 Nov 10;18(5):1823–32.
2. Gangwar M, Singh R, Goel R, Nath G. Recent advances in various emerging vescicular systems: An overview. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Medknow; 2012 Feb;2(2):S1176–S1188.
3. Graf R, Anzali S, Buenger J, Pfluecker F, Driller H. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. Clinics in Dermatology. Elsevier BV; 2008 Jul;26(4):326–33.
4. Marini A, Reinelt K, Krutmann J, Bilstein A. Ectoine-Containing Cream in the Treatment of Mild to Moderate Atopic Dermatitis: A Randomised, Comparator-Controlled, Intra-Individual Double-Blind, Multi-Center Trial. Skin Pharmacology and Physiology. S. Karger AG; 2014;27(2):57–65.
5. Canadian Metabolomics Conference. ECMDB: Ectoine (ECMDB21379) (M2MDB001775) [Internet]. [cited 2019 Apr 12]. Available from: <http://ecmdb.ca/compounds/M2MDB001775>
6. Subongkot T, Duangjit S, Rojanarata T, Opanasopit P, ngawhirunpat T. Ultradeformable liposomes with terpenes for delivery of hydrophilic compound. J Liposome Res. 2012;22(3):254–62.
7. Laurocapram | C18H35NO - PubChem [Internet]. [cited 2019 Apr 12]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Laurocapram#section=Drug-and-Medication-Information>.

8. Ogiso T, Iwaki M, Bechako K, Tsutsumi Y. Enhancement of percutaneous absorption by laurocapram. *J Pharm Sci.* 1992;81(8):762–767
9. Cato A, Sutton L, Iii GNM. Activity of a 0 . 05 % Triamcinolone Acetonide / Laurocapram Formulation : Double-Blind , Randomized Comparison with Standard 0 . 1 % Triamcinolone Acetonide Creams and with Mild (Class VI) to Potent (Class III) Topical Corticosteroids. *CURR THER RES.* 2001;62(4):231–235.
10. Otto A, Wiechers J, W, Kelly C, L, Hadgraft J, du Plessis J: Effect of Penetration Modifiers on the Dermal and Transdermal Delivery of Drugs and Cosmetic Active Ingredients. *Skin Pharmacol Physiol* 2008;21:326-334.
11. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technolo Today.* 2000; 9:318-326.
12. Ectoine - SigmaAldrich [Internet]. [cited 2019 Nov 18]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e2271?lang=en®ion=TH>
13. Ruela ALM, Perissinato AG, Lino ME de S, Mudrik PS, Pereira GR. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016; 52(3):527–544.
14. Rutter N. Drug absorption through the skin: a mixed blessing. *Archives of Disease in Childhood.* Arch Dis Child. 1987; 62(3): 220–221.
15. Chen R, Li R, Liu Q, Bai C, Qin B, Ma Y, et al. Ultradeformable Liposomes: a Novel Vesicular Carrier For Enhanced Transdermal Delivery of Procyanidins: Effect of Surfactants on the Formation, Stability, and Transdermal Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(5):1823-1832.
16. Gangwar M, Singh R, Goel R, Nath G. Recent advances in various emerging vescicular systems: An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* Medknow; 2012 ;2(2):S1176–S1188.(1)
17. Szoka F, Papahadjopoulos D. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng.* 2003;9(1):467–508.

18. Ectoine | C₆H₁₀N₂O₂ - PubChem [Internet]. [cited 2019 Apr 15]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ectoine?fbclid=IwAR00MnVGpJAle39Kv43OFI8T_A-K75Etc3b_RkTsvSEPVK9sl00wrLNvLV0
19. Czech L, Hermann L, Stöveken N, Richter AA, Höppner A, Smits SHJ, et al. Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: Genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis. *Genes (Basel)*. 2018;9(4):1–58.
20. Smiatek J, Harishchandra R, Rubner O, Galla H, Heuer A. Properties of compatible solutes in aqueous solution. *Biophysical Chemistry*. 2012;160(1):62-68.
21. Bownik A, Stępniewska Z. Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2016;67(4):260-265.
22. Graf R, Anzali S, Buenger J, Pfluecker F, Driller H. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clinics in Dermatology*. Elsevier BV; 2008; 26(4):326–33.
23. Marini A, Reinelt K, Krutmann J, Bilstein A. Ectoine-Containing Cream in the Treatment of Mild to Moderate Atopic Dermatitis: A Randomised, Comparator-Controlled, Intra-Individual Double-Blind, Multi-Center Trial. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014;27(2):57-65.
24. Buenger J, Driller H. Ectoin: An Effective Natural Substance to Prevent UVA-Induced Premature Photoaging. *Skin Pharmacology and Physiology*. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004 Sep-Oct;17(5):232-237.
25. Heinrich U, Garbe B, Tronnier H. In vivo Assessment of Ectoin: A Randomized, Vehicle-Controlled Clinical Trial. *Skin Pharmacology and Physiology*; *Skin Pharmacol Physiol*. 2007;20(4):211-8
26. Hahn MB, Meyer S, Schröter MA, Kunte HJ, Solomun T, Sturm H. DNA protection by ectoine from ionizing radiation: molecular mechanisms. *Phys Chem Chem Phys*. 2017 Sep ;19(37):25717-25722.
27. Narasimha Murthy S, Shivakumar HN. Topical and Transdermal Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery System*;2010 Jan 1;1–36.

28. Sugibayashi K, Nakayama S, Morimoto Y, Meoh A. Mechanism of Skin Penetration-Enhancing Effect by Laurocapram Results and Discussion. *J Pharm Sci.* 1992;81(1).
29. Cato A, Sutton L, Kaplan AS. Activity of a Triamcinolone Acetonide / Laurocapram Formulation : Double-Blind Comparisons with Triamcinolone Acetonide , Placebo Vehicle , and Mid-Strength (Class IV) to Potent (Class II) Corticosteroids. *CURR THER RES.* 2001;62(3):180–6.

ภาคผนวก

1.การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์

1.1. ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ตารางที่ 5 แสดงความเที่ยง

Ectoine (ug)	Conc (ug/mL)	Conc. yield (ug/ml)	%Recovery
0.004096	204.8	199.9169	97.61566
0.002048	102.4	99.73865	97.40102
0.0012288	61.44	61.89416	100.7392
0.0008192	40.96	40.35021	98.51127
0.0002048	10.24	9.996205	97.61919
0.00004096	2.048	2.177229	106.31

1.2 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ตารางที่ 6 แสดงความแม่นยำ

Calculated concentration from calibration curve (ug/ml)					
No.1	No.2	No.3	Average	SD	%RSD
199.6037533	200.1027922	200.0441	199.9169	0.272756	0.136435
99.66386161	99.95741394	99.59467	99.73865	0.19259	0.193095
61.72431941	61.74109383	62.21707	61.89416	0.279772	0.452017
40.31387035	40.36838721	40.36839	40.35021	0.031475	0.078005
9.979430369	10.004592	10.00459	9.996205	0.014527	0.145326
2.181422331	2.177228726	2.173035	2.177229	0.004194	0.192612

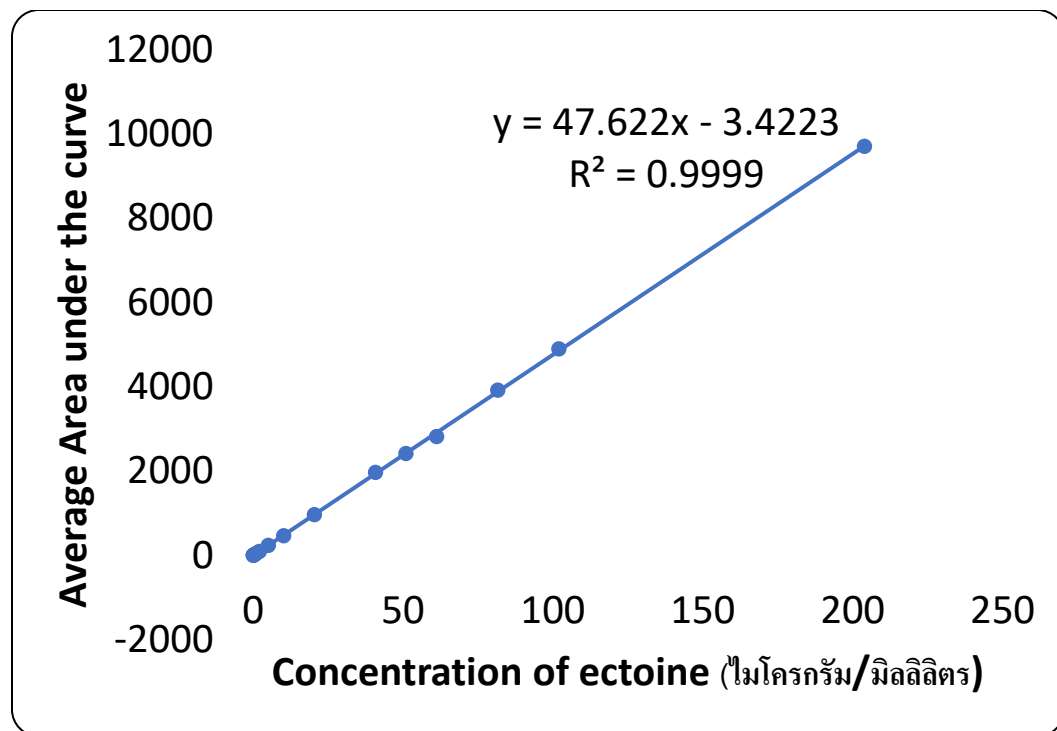
2.กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของเอ็กทอยน์

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ (average area under the curve)

กับความเข้มข้นของเอ็กทอยน์ ในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

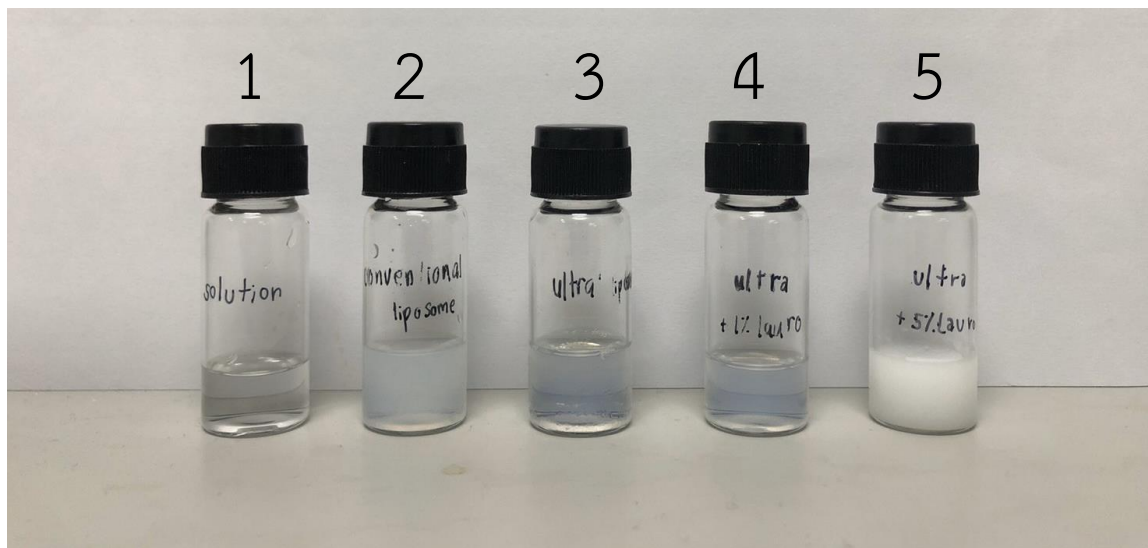
ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	Average area under the curve
0.05	2.70
0.1	5.29
0.2	9.66
0.5	22.11
1	47.70
2	93.58
5	234.90
10	456.86
20	946.86
40	1928.73
50	2372.89
60	2764.46
80	3845.69
100	4799.31
200	9508.68

นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์หาสมการเส้นตรงของ Average area under the curve
กับความเข้มข้นของเอ็กทอยน์



รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานของเอ็กทอยนในในช่วงความเข้มข้น 0.05-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากกราฟจะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเอ็กทอยนกับ average area under the curve เป็น $y = 47.622x - 3.4223$ ($R^2 = 0.9999$)



รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างตำรับที่เตรียมได้จากการทดลอง

1. ตำรับสารละลาย
2. ตำรับคอนเวนชันนอลลิโพโซม
3. ตำรับอัลตราดีฟอร์มเมเบิลลิโพโซม
4. ตำรับอัลตราดีฟอร์มเมเบิลลิโพโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 1
5. ตำรับอัลตราดีฟอร์มเมเบิลลิโพโซมที่มีลอโรคาแพรมร้อยละ 5

2.ขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาคและประจุพื้นผิวของสูตรต่าง ๆ

ตารางที่ 8 แสดงขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ

Formulation	Particle size (nm)			
	N ₁	N ₂	N ₃	Average
Conventional liposomes (CL)	83.87	88.82	87.98	86.89 ± 2.65
Ultradeformable liposome (UL)	39.43	43.09	41.83	41.45 ± 1.86
UL with 1 % laurocapram	44.71	40.81	43.19	42.90 ± 1.96

ตารางที่ 9 แสดงการกระจายขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่าง ๆ

Formulation	Polydispersity index, PDI			
	N ₁	N ₂	N ₃	Average
Conventional liposomes (CL)	0.2783	0.3200	0.3163	0.3049 ± 0.0231
Ultradeformable liposome (UL)	0.1517	0.2767	0.1933	0.2072 ± 0.0636
UL with 1 % laurocapram	0.2543	0.2357	0.2540	0.2480 ± 0.0107

ตารางที่ 10 แสดงค่าศักย์ซีตาของสูตรตำรับต่าง ๆ

Formulation	Zeta potential (mV)			
	N ₁	N ₂	N ₃	Average
Conventional liposomes (CL)	-9.90	-9.49	-36.20	-18.53 ± 15.30
Ultradeformable liposome (UL)	-9.44	-9.77	-17.53	-12.25 ± 4.58
UL with 1 % laurocapram	-18.40	-15.80	-16.60	-16.93 ± 1.33

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

ตารางที่ 11 แสดง % Entrapment efficiency (% EE) และ % Loading efficiency (% LE) ของ CL ที่บรรจุเอ็กทอยน์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

% Ectoine of lipid weight (% w/w)	% EE	% LE
20	0.54 ± 0.12	0.0107 ± 0.0024
30	0.66 ± 0.15	0.0198 ± 0.0046
40	0.70 ± 0.17	0.0279 ± 0.0068
50	0.72 ± 0.13	0.0358 ± 0.0065
60	1.13 ± 0.03	0.0680 ± 0.0016
70	0.47 ± 0.13	0.0331 ± 0.0094
80	0.92 ± 0.21	0.0738 ± 0.0170

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

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านหนังชั้นสตราตัมคอเนียมของสูตร 0.51 % w/v Ectoine solution (Sol)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณยาที่แพร่ผ่านผิวหนัง/พื้นที่ (ไมโครกรัม/cm ²)
N₁	
1	4.14 ± 0.13
2	13.46 ± 2.30
4	18.70 ± 1.07
6	135.55 ± 8.86
8	178.96 ± 16.98
24	947.36 ± 13.80
N₂	
1	1.82 ± 0.11
2	2.09 ± 0.06
4	2.08 ± 0.00
6	2.74 ± 0.32
8	4.48 ± 0.05
24	67.61 ± 0.39
N₃	
1	1.08 ± 0.16
2	1.81 ± 0.08
4	2.03 ± 0.81
6	3.24 ± 1.22
8	5.39 ± 0.01
24	22.37 ± 0.11

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านหนังชั้นสตราตัมคอเนียมของสูตร 0.51 % w/v Ectoine conventional liposome (CL)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณยาที่แพร่ผ่านผิวหนัง/พื้นที่ (ไมโครกรัม/cm ²)
N₁	
1	4.71 ± 0.09
2	5.59 ± 0.06
4	7.27 ± 0.04
6	35.19 ± 1.49
8	62.04 ± 2.69
24	127.37 ± 3.98
N₂	
1	67.60 ± 0.91
2	75.22 ± 2.45
4	78.99 ± 2.80
6	79.60 ± 0.46
8	89.93 ± 1.08
24	148.65 ± 0.93
N₃	
1	64.49 ± 0.31
2	71.83 ± 1.56
4	79.12 ± 1.26
6	81.16 ± 8.34
8	81.97 ± 10.80
24	149.03 ± 1.97

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านหนังชั้นสตราตัมคอเนียมของสูตร 0.51 % w/v Ectoine
ultradeformable liposome (UL)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณยาที่แพร่ผ่านผิวหนัง/พื้นที่ (ไมโครกรัม/cm ²)
N₁	
1	3.64 ± 0.00
2	1.84 ± 0.11
4	2.92 ± 0.03
6	2.88 ± 0.01
8	2.25 ± 2.43
24	97.82 ± 43.12
N₂	
1	0.29 ± 0.00
2	2.45 ± 0.11
4	2.06 ± 0.02
6	1.35 ± 0.00
8	1.37 ± 0.65
24	40.40 ± 2.06
N₃	
1	0.31 ± 0.00
2	246.26 ± 1.09
4	55.86 ± 1.54
6	548.80 ± 3.90
8	418.22 ± 0.84
24	1279.05 ± 3.39

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านหนังชั้นสตราตัมคอเนียมของสูตร 0.51 % w/v Ectoine
ultradeformable liposome with 1 % laurocapram (UL with 1 % laurocapram)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณยาที่แพร่ผ่านผิวหนัง/พื้นที่ (ไมโครกรัม/cm ²)
N₁	
1	6.08 ± 0.02
2	6.00 ± 0.04
4	2.75 ± 0.09
6	6.11 ± 0.59
8	8.96 ± 2.57
24	181.46 ± 7.51
N₂	
1	4.58 ± 4.08
2	2.09 ± 0.02
4	2.03 ± 0.02
6	3.27 ± 0.90
8	2.85 ± 0.41
24	27.19 ± 2.41
N₃	
1	1.74 ± 0.03
2	1.70 ± 0.07
4	1.34 ± 0.02
6	2.65 ± 0.04
8	1.54 ± 0.23
24	9.13 ± 0.29

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณเอ็กทอยน์ที่แพร่ผ่านผนังชั้นสตราตัมคอเนียมของสูตร 0.51 % w/v Ectoine
ultradeformable liposome with 5 % laurocapram (UL with 5 % laurocapram)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณยาที่แพร่ผ่านผิวผนัง/พื้นที่ (ไมโครกรัม/cm ²)
N₁	
1	1.73 ± 0.08
2	1.08 ± 0.10
4	4.06 ± 0.03
6	2.78 ± 0.23
8	4.45 ± 1.15
24	11.20 ± 2.62
N₂	
1	1.37 ± 0.01
2	1.12 ± 0.14
4	0.80 ± 0.00
6	1.11 ± 0.18
8	1.26 ± 0.06
24	75.18 ± 10.17
N₃	
1	0.26 ± 0.00
2	0.64 ± 0.66
4	1.32 ± 0.01
6	2.75 ± 0.48
8	2.42 ± 0.50
24	126.78 ± 15.05

ตารางที่ 17 แสดงค่าการวิเคราะห์เชิงสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Method	(J) Method	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Size	1	2	45.43889*	.98622	.000	43.4034	47.4743
		3	43.98889*	.98622	.000	41.9534	46.0243
	2	1	-45.43889*	.98622	.000	-47.4743	-43.4034
		3	-1.45000	.98622	.154	-3.4855	.5855
	3	1	-43.98889*	.98622	.000	-46.0243	-41.9534
		2	1.45000	.98622	.154	-.5855	3.4855
PDI	1	2	.097667*	.019811	.000	.05678	.13856
		3	.056889*	.019811	.008	.01600	.09778
	2	1	-.097667*	.019811	.000	-.13856	-.05678
		3	-.040778	.019811	.051	-.08167	.00011
	3	1	-.056889*	.019811	.008	-.09778	-.01600
		2	.040778	.019811	.051	-.00011	.08167
Zeta	1	2	6.28222	4.71023	.207	-3.9805	16.5449
		3	1.59667	5.76883	.787	-10.9725	14.1659
	2	1	-6.28222	4.71023	.207	-16.5449	3.9805
		3	-4.68556	4.71023	.339	-14.9483	5.5772
	3	1	-1.59667	5.76883	.787	-14.1659	10.9725
		2	4.68556	4.71023	.339	-5.5772	14.9483

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

หมายเหตุ

Method 1 = ตำรับคอนกรีตมวลสูงลิโฟโซม

Method 2 = ตำรับอัลตราดีฟอรั่มเบลิโฟโซมที่ไม่มีลอร์คาแพรม

Method 3 = ตำรับอัลตราดีฟอรั่มเบลิโฟโซมที่มีลอร์คาแพรมร้อยละ 1

รายงานสรุปการเงิน
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาอัลตราดีฟอร์เมเบิลลิพโซมที่มีลอโรคาแฟรมเพื่อนำส่งเอ็กทอยน์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ. ดร. ถิรพิทย์ สุนงกช

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 21 ธันวาคม 2561 **ถึง** 18 พฤศจิกายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 11 เดือน **ตั้งแต่วันที่** 21 ธันวาคม 2561 **ถึง** 18 พฤศจิกายน 2562

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9,000 บาท เมื่อวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2562

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าสารเคมี	5,000 บาท	18,984 บาท	เกิน 13,984 บาท
2. ค่าอุปกรณ์สำหรับ ปฏิบัติการ	2,500 บาท	3,523 บาท	เกิน 1,023 บาท
3. ค่าถ่ายเอกสาร	500 บาท	200 บาท	เหลือ 300 บาท
4. ค่าโปสเตอร์	500 บาท	300 บาท	เหลือ 200 บาท
5. ค่าเดินทาง	500 บาท	500 บาท	0 บาท
รวม	9,000 บาท	23,507 บาท	เกิน 14,507 บาท

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานวิจัย

Plagiarism Checking Report

Created on Nov 25, 2019 at 11:30 AM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
1449769	Nov 25, 2019 at 11:30 AM	58210087@my.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	การพัฒนาตราดีพอร์เมเบิลลิโพโซมที่มีลอโรคาพรมเพื่อนำส่งเอ็กทอยน์.docx	Completed	0.00 %

Match Overview

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