

การเตรียมและวิเคราะห์คุณลักษณะของอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจิ
ไนเซอร์แรงดันสูง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Preparation and Characterization of liposome for arbutin encapsulation using High-
pressure homogenizer



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---------------------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การเตรียมและวิเคราะห์คุณลักษณะของอนุภาคลิพโซม สำหรับกักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดัน สูง |
| โดย | นายรัชพล ชูทับ |
| สาขาวิชา | วิศวกรรมเคมี |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิวัฒน์ สุทธิธารวัช |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | ดร.อุรชา รักษัตานนท์ชัย |

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

----- คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

----- ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพร คิม)

----- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิวัฒน์ สุทธิธารวัช)

----- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.อุรชา รักษัตานนท์ชัย)

----- กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

----- กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สุวิมล สุรัสโม)

รัชพล ชูทับ : การเตรียมและวิเคราะห์คุณลักษณะของอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง. (Preparation and Characterization of liposome for arbutin encapsulation using High-pressure homogenizer) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.อภิรักษ์ สุทธิธรรวัช, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.อุรษา รัชชานนท์ชัย

การกักเก็บสารสำคัญในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซม เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากอนุภาคลิโปโซมมีส่วนประกอบที่สามารถเข้ากับร่างกายได้ ไม่มีความเป็นพิษ และสามารถย่อยสลายได้เอง รวมไปถึงช่วยเพิ่มเสถียรภาพของสารที่นำมากักเก็บให้ดีขึ้น วิธีการเตรียมอนุภาคลิโปโซมเพื่อกักเก็บสารเป็นหนึ่งในปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึง เพราะจะส่งผลกระทบต่อการกระจายตัวและขนาดของอนุภาค รวมไปถึงอัตราการปลดปล่อยของสารและเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมด้วย งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาการเตรียมอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง เนื่องจากอาร์บูตินเป็นสารที่มีเสถียรภาพต่ำการกักเก็บสารในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมมีความเป็นไปได้ที่จะช่วยเพิ่มเสถียรภาพให้กับสารอาร์บูติน การเตรียมอนุภาคด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สามารถเตรียมอนุภาคลิโปโซมได้ในปริมาณที่มาก อีกทั้งยังมีความต่อเนื่องของกระบวนการโดยไม่ต้องผ่านหลายขั้น โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยต้องการศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิด คลอเรสเตอรอล และสารอาร์บูติน อัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินและเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซม รวมไปถึง สภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ได้แก่ ความดันและจำนวนรอบ ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคลิโปโซมเพื่อกักเก็บสารอาร์บูติน จากการศึกษาพบว่า การเตรียมอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงทำให้ได้ลิโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว ซึ่งจะมีขนาดของอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความดันและจำนวนรอบของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง โดยมีขนาดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 150 ถึง 200 นาโนเมตร ผลการทดลองของความเข้มข้นของลิพิดต่อความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูติน พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดประสิทธิภาพการกักเก็บสารมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสารเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 74.29 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการกักเก็บสารสำคัญไว้ในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมและมีการเติมสารคลอเรสเตอรอลลงไปจะสามารถช่วยควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารสำคัญได้ รวมไปถึงช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวให้กับอนุภาคลิโปโซมได้อีกด้วย ดังนั้น สภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงและสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูติน คือ ความดัน 1000 บาร์ จำนวน 3 รอบ ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล 10:2 โดยน้ำหนัก และสภาวะอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6170253721 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORD: Arbutin, Liposome, High-pressure homogenizer

Ratchapon Chootab : Preparation and Characterization of liposome for arbutin encapsulation using High-pressure homogenizer. Advisor: Asst. Prof. APINAN SOOTTITANTAWAT, Ph.D. Co-advisor: Uracha Ruktanonchai, Ph.D.

Liposomes are extensively used as encapsulating and carriers for active compounds. Because liposomes contain components that are compatible with the body. It is non-toxic and biodegradable as well as improving the stability of the substances. The method of preparing liposomes for containment is one factor to consider as it affects the dispersion and particle size, as well as the release rate and stability of the liposomes. In this study, preparation, and characterization of liposome for arbutin encapsulation using high-pressure homogenizer, because arbutin is a low stability substance, encapsulation in the form of liposome particles is likely to enhance the stability of arbutin. High-pressure homogenizer is efficient multipurpose tools that can rapidly produce a large volume of liposomes in a continuous and reproducible manner led to further reduction in vesicle diameter and uniform vesicles. The objectives of this research were to study factors such as the ratio between phospholipid cholesterol and arbutin, the release rate of arbutin and the stability of liposomes. Including the conditions of the high-pressure homogenizer, such as the pressure and number of cycles required to prepare the liposomes for arbutin encapsulation. Preparation of liposome for arbutin encapsulation using high-pressure homogenizer resulted in a small unilamellar vesicles. The particle size was significantly reduced with increasing pressure and the number of cycles of the high-pressure homogenizer with an average size between 150 and 200 nm. Lipid concentration was increased, the entrapment efficiency was increased with the highest average efficiency of 74.29%. In addition, encapsulation of the active substance in form of liposome particles and addition of cholesterol can help to control the release rate of the active substance as well as improve its stability with liposome particles. Therefore, the conditions of the high-pressure homogenizer and the optimal ratio of phospholipids to cholesterol in the preparation of liposomes for arbutin encapsulation are 3 cycles of pressure 1000 bar at a lipid concentration of 2% (w/w), phospholipid to cholesterol ratio of 10:2 (w/w) and a storage temperature condition of 4 degrees Celsius.

Field of Study: Chemical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภินันท์ สุทธิธารธวัช และ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.อรุชา รักซ์ตานนท์ชัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำงานวิจัย รวมทั้งชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ซึ่งช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพร คิม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล และ ดร.สุวิมล สุรัสโม ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนเสนอข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวนารินทร์ ไพบูลย์ และพี่ๆที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (NANOTEC) ทุกท่าน สำหรับคำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ ตลอดจนกำลังใจที่ดี รวมไปถึง ขอขอบคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (NANOTEC) ที่อนุเคราะห์ให้ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบิดา และมารดา ที่คอยเป็นกำลังใจอย่างดี คอยสนับสนุนในทุกเรื่องมาโดยตลอด ซึ่งเป็นแรงใจสำคัญในการศึกษาและการทำงานวิจัยนี้ รวมทั้ง ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและทำให้งานวิจัยสำเร็จด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รัชพล ชูทับ

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....ค | ค |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง | ง |
| กิตติกรรมประกาศ.....จ | จ |
| สารบัญ.....ฉ | ฉ |
| สารบัญตาราง.....ญ | ญ |
| สารบัญรูปภาพ.....ฎ | ฎ |
| บทที่ 1 บทนำ..... 1 | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ..... 1 | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 3 | 3 |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 3 | 3 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3 | 3 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4 | 4 |
| 2.1 กระบวนการกักเก็บสาร (Encapsulation)..... 4 | 4 |
| 2.2 ลิโปโซม (Liposome)..... 4 | 4 |
| 2.2.1 ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid)..... 5 | 5 |
| 2.2.2 คอเลสเตอรอล (Cholesterol) 5 | 5 |
| 2.3 ชนิดของลิโปโซม (Classification)..... 8 | 8 |
| 2.3.1 ลิโปโซมที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (Multilamellar vesicles, MLV)..... 8 | 8 |
| 2.3.2 ลิโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (Large multilamellar vesicles, LMV).. 8 | 8 |
| 2.3.3 ลิโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Small unilamellar vesicles, SUV) 8 | 8 |
| 2.3.4 ลิโปโซมขนาดกลางที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Intermediate vesicles, IUV)..... 8 | 8 |

| | |
|---|----|
| 2.3.5 ลิโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Large unilamellar vesicles, LUV) | 9 |
| 2.4 วิธีการเตรียมอนุภาคลิโปโซม (Preparation of liposome) | 10 |
| 2.4.1 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีทางเคมี (Chemical method) | 10 |
| 2.4.2 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical method) | 11 |
| 2.4.3 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมโดยใช้เทคนิค Detergent removal dialysis | 15 |
| 2.5 การทดสอบความคงตัวของลิโปโซม (Stability) | 15 |
| 2.6 อาร์บูติน (Arbutin) | 16 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย | 20 |
| 3.1 วัสดุและสารเคมี | 20 |
| 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ | 20 |
| 3.3 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมกักเก็บสารอาร์บูติน | 21 |
| 3.4 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคลิโปโซม | 22 |
| 3.5 การวิเคราะห์ขนาดและค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซม | 23 |
| 3.6 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บสารอาร์บูติน (Entrapment Efficiency) | 23 |
| 3.7 การวิเคราะห์ค่าการเปลี่ยนแปลงทางความร้อน | 24 |
| 3.8 การวิเคราะห์อัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูติน | 25 |
| บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูล | 26 |
| 4.1 การศึกษาสภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงในการเตรียมอนุภาคลิโปโซม | 26 |
| 4.1.1 ผลการวิเคราะห์ขนาดและค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซม | 26 |
| 4.1.2 ผลการวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของอนุภาค | 29 |
| 4.1.3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ | 32 |
| 4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด | 33 |
| 4.2.1 ผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดต่อขนาดของอนุภาคลิโปโซม | 33 |
| 4.2.2 ผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสาร | 33 |

| | |
|---|----|
| 4.2.3 ผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดต่อเสถียรภาพความคงตัว | 36 |
| 4.3 การศึกษาผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล | 37 |
| 4.3.1 ผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อขนาดของอนุภาคลิโปโซม..37 | |
| 4.3.2 ผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสาร | 40 |
| 4.3.3 ผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อเสถียรภาพความคงตัว | 42 |
| 4.3.4 ผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่ออัตราการปลดปล่อยสาร | 44 |
| 4.4 การศึกษาเสถียรภาพความคงตัวของสภาวะอุณหภูมิในการเก็บรักษาอนุภาคลิโปโซม | 48 |
| 4.4.1 ผลของความดันละจํานวนรอบ | 48 |
| 4.4.2 ผลความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดและสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล | 48 |
| 4.4.3 ผลของความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูติน | 49 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ | 52 |
| 5.1 สรุปผลการทดลอง | 52 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ | 53 |
| ภาคผนวก ก. วิธีกรคำนวณ | 59 |
| 1.การคำนวณหาความสามารถในการกักเก็บสาร (Entrapment Efficiency)..... | 59 |
| 2. การคำนวณหาปริมาณการปลดปล่อยของสารอาร์บูติน | 60 |
| ภาคผนวก ข. ข้อมูลจากการทดลอง | 62 |
| 1. ตารางการคำนวณปริมาณการปลดปล่อยของสาร | 62 |
| 2. กราฟการปลดปล่อยของสารตามแบบจำลอง Higuchi..... | 67 |
| บรรณานุกรม | 70 |
| ประวัติผู้เขียน | 72 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 คุณสมบัติและรายละเอียดของสารอาร์บูติน ^[7] | 16 |
| ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ..... | 21 |
| ตารางที่ 3 สภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC..... | 24 |
| ตารางที่ 4 สภาวะการทำงานของเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC)..... | 24 |
| ตารางที่ 5 ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย (k) ของสารอาร์บูติน | 47 |
| ตารางที่ 6 วิธีการคำนวณปริมาณการสะสมของสาร..... | 60 |
| ตารางที่ 7 ปริมาณการสะสมของสารละลายอาร์บูติน..... | 62 |
| ตารางที่ 8 ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเทอรอล..... | 63 |
| ตารางที่ 9 ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเทอรอล..... | 64 |
| ตารางที่ 10 ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเทอรอล (หลังล้างอาร์บูตินอิสระ) | 65 |
| ตารางที่ 11 ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเทอรอล (หลังล้างอาร์บูตินอิสระ) | 66 |

สารบัญรูปภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1 บริเวณของอนุภาคลิโปโซมที่ใช้กักเก็บสาร ^[20] | 5 |
| รูปที่ 2 โครงสร้างของคลอเรสเตอร์อล ^[23] | 5 |
| รูปที่ 3 การวิเคราะห์ผลของคลอเรสเตอร์อลด้วยเทคนิค DSC ^[24] | 6 |
| รูปที่ 4 การวิเคราะห์ผลของปริมาณคลอเรสเตอร์อลด้วยเทคนิค DSC ^[25] | 7 |
| รูปที่ 5 ลักษณะของอนุภาคลิโปโซมชนิดต่างๆ ^[20] | 9 |
| รูปที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมโดยวิธี Thin film hydration ^[29] | 9 |
| รูปที่ 7 กลไกการเกิดลิโปโซมสองชั้นด้วยเทคนิค Double emulsions (w/o/w) ^[32] | 11 |
| รูปที่ 8 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical method) ^[22] | 12 |
| รูปที่ 9 ผลของความดันและจำนวนรอบต่อขนาดของอนุภาคลิโปโซม ^[34] | 12 |
| รูปที่ 10 การเกิดออกซิเดชันของฟอสโฟลิพิด (เลซิทีน) ^[4] | 13 |
| รูปที่ 11 ขนาดของอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้จาก 3 วิธี ^[5] | 14 |
| รูปที่ 12 โครงสร้างของอาร์บูติน ^[6] | 16 |
| รูปที่ 13 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารอาร์บูติน ^[8] | 17 |
| รูปที่ 14 ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินในชั้นผิวหนังชั้นนอกและชั้นหนังแท้ ^[9] | 17 |
| รูปที่ 15 ผลการทดสอบด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ^[10] ... | 18 |
| รูปที่ 16 เปรียบเทียบร้อยละการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินระหว่างสารอาร์บูตินบริสุทธิ์ กับสารประกอบเชิงซ้อนในรูปแบบอนุภาคนาโน ^[11] | 19 |
| รูปที่ 17 ขั้นตอนการเตรียมอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูติน | 22 |
| รูปที่ 18 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ^[38] | 22 |
| รูปที่ 19 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ^[36] | 23 |
| รูปที่ 20 เครื่อง Franz Diffusion Cell ^[37] | 25 |

| | |
|--|----|
| รูปที่ 21 ขนาดและค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ2 (B) ร้อยละ5 (C) ร้อยละ8 และ (D) ร้อยละ11 โดยน้ำหนัก | 28 |
| รูปที่ 22 ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ2 (B) ร้อยละ5 (C) ร้อยละ8 และ (D) ร้อยละ11 โดยน้ำหนัก | 31 |
| รูปที่ 23 ลักษณะรูปร่างของอนุภาคลิโปโซมที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน..... | 32 |
| รูปที่ 24 ผลความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดต่อความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูติน..... | 34 |
| รูปที่ 25 ปริมาณการไหลตของสารอาร์บูตินที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก (B) ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก..... | 35 |
| รูปที่ 26 อนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้หลังจากผ่านไป 3 วันที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ 2 (B) ร้อยละ5 (C) ร้อยละ8 และ (D) ร้อยละ11 โดยน้ำหนัก..... | 37 |
| รูปที่ 27 ขนาดอนุภาคลิโปโซมที่สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล 10:0, 10:1 และ 10:2 โดยน้ำหนัก (A) ความดัน 500 บาร์ (B) ความดัน 1000 บาร์ (ที่ความเข้มข้นของลิพิดร้อยละ 2) | 38 |
| รูปที่ 28 ขนาดอนุภาคลิโปโซมที่สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล 10:0, 10:1 และ 10:2 โดยน้ำหนัก (A) ความดัน 500 บาร์ (B) ความดัน 1000 บาร์ (ที่ความเข้มข้นของลิพิดร้อยละ 5) | 39 |
| รูปที่ 29 ผลความเข้มข้นของสารอาร์บูตินและสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูติน (ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก)..... | 40 |
| รูปที่ 30 อนุภาคลิโปโซมปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอลที่เตรียมได้หลังจากผ่านไป 1 วัน ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ 2 (B) ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก | 41 |
| รูปที่ 31 อนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอลที่เตรียมได้หลังจากผ่านไป 3 วัน ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ 2 (B) ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก | 41 |
| รูปที่ 32 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) (A) ฟอสโฟลิพิด (B) คลอเรสเตอรอล (C) อาร์บูติน | 43 |
| รูปที่ 33 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง (DSC) ของอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล | 43 |
| รูปที่ 34 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง (DSC) ของอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล | 44 |

| | |
|--|----|
| รูปที่ 35 ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูติน..... | 45 |
| รูปที่ 36 ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินในอนุภาคลิโพโซมที่มีการล้างอาร์บูตินอิสระ | 46 |
| รูปที่ 37 ขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโพโซมที่ความเข้มข้นลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 เดือน..... | 50 |
| รูปที่ 38 ขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโพโซมที่ความเข้มข้นลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 เดือน | 50 |
| รูปที่ 39 ขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโพโซมที่ความเข้มข้นลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ สภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 เดือน | 51 |
| รูปที่ 40 ค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บสารอาร์บูตินที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ ในระยะเวลา 3 เดือน.. | 51 |
| รูปที่ 41 กราฟมาตรฐานของสารอาร์บูติน (Calibration curve)..... | 59 |
| รูปที่ 42 การปลดปล่อยสะสมของสารละลายอาร์บูตินตามแบบจำลอง Higuchi..... | 67 |
| รูปที่ 43 การปลดปล่อยสะสมของอนุภาคลิโพโซมที่มีการเติมคลอเรสเทอร์อล ตามแบบจำลอง Higuchi | 67 |
| รูปที่ 44 การปลดปล่อยสะสมของอนุภาคลิโพโซมที่มีการเติมคลอเรสเทอร์อล (หลังล้างอาร์บูติน อิสระ) ตามแบบจำลอง Higuchi..... | 68 |
| รูปที่ 45 การปลดปล่อยสะสมของอนุภาคลิโพโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเทอร์อล ตาม แบบจำลอง Higuchi..... | 68 |
| รูปที่ 46 การปลดปล่อยสะสมของอนุภาคลิโพโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเทอร์อล (หลังล้างอาร์บู ตินอิสระ) ตามแบบจำลอง Higuchi | 69 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

กระบวนการกักเก็บสารเป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องและมีบทบาทในหลายอุตสาหกรรม อาทิ อุตสาหกรรมยา อาหาร รวมถึงเครื่องสำอาง โดยกระบวนการกักเก็บสารเป็นการนำสารสำคัญมาเคลือบหรือห่อหุ้มด้วยสารชนิดอื่น ซึ่งอาจมีขนาดหลายร้อยนาโนเมตรไปจนถึงหลายมิลลิเมตร วัตถุประสงค์ของการกักเก็บสารสำคัญนั้น เพื่อป้องกันสารสำคัญจากสภาวะต่างๆ เช่น ความร้อน ความชื้น แสง หรือออกซิเจน รวมทั้งช่วยยืดอายุการเก็บรักษา เพิ่มเสถียรภาพความคงตัว และควบคุมการปลดปล่อยของสารเพื่อส่งสารสำคัญไปยังเป้าหมายโดยตรง

การกักเก็บสารสำคัญในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซม (Liposome encapsulation) เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากอนุภาคลิโปโซมมีส่วนประกอบที่สามารถเข้ากับร่างกายได้ ไม่มีความเป็นพิษ และสามารถย่อยสลายได้เอง รวมถึงช่วยเพิ่มเสถียรภาพของสารที่นำมาเก็บให้ดีขึ้น^[1] ซึ่งลิโปโซม (Liposome) มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็กที่มีผนังชั้นเดียว หรือผนัง 2 ชั้น (bilayers) เป็นสารไขมันประเภทฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) โดยโครงสร้างของฟอสโฟลิพิดจะประกอบไปด้วยส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว จึงทำให้อนุภาคลิโปโซมสามารถกักเก็บได้ทั้งสารที่ละลายน้ำและสารไม่ละลายน้ำ^[2]

วิธีการเตรียมอนุภาคลิโปโซมเพื่อกักเก็บสารเป็นหนึ่งในปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึง เพราะจะส่งผลกระทบต่อการกระจายตัวและขนาดของอนุภาค รวมถึงไปถึงอัตราการปลดปล่อยของสารและเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมด้วย วิธีการเตรียมสามารถแบ่งได้เป็นสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรก เป็นขั้นตอนในการสร้างอนุภาคลิโปโซมซึ่งสามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น Lipid film hydration, Double emulsion, Reverse phase evaporation, Ethanol injection เป็นต้น และขั้นตอนที่สอง เป็นขั้นตอนในการลดขนาดของอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีการต่างๆ เช่น Membrane extrusion, Sonication, High pressure homogenization เป็นต้น^[3] มีงานวิจัยที่ศึกษาผลของวิธีการลดขนาดอนุภาคลิโปโซม โดย Selen Guner และคณะ (2017)^[4] ได้ศึกษาวิธีการลดขนาดอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้จากเลซิดินชนิดไข่และถั่วเหลือง ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างวิธี Ultrasonication กับ High pressure homogenization พบว่า อนุภาคลิโปโซมจากเลซิดินทั้งสองชนิดที่ได้จากวิธี High pressure homogenization นั้นมีขนาดเล็กและมีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอของอนุภาคมากกว่าวิธี Ultrasonication รวมถึง Juan David Beltran และคณะ(2020)^[5] ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซม ซึ่งพบว่าวิธีการลดขนาดอนุภาคลิโปโซมเมื่อเปรียบเทียบ

ระหว่าง Ultrasonication, High pressure homogenization และ Rotor stator ความคงตัวของอนุภาคลิโพโซมเมื่อเวลาผ่านไป 35 วัน ด้วยวิธี High pressure homogenization ให้เสถียรภาพที่ดี เพราะมีความเปลี่ยนแปลงของอนุภาคลิโพโซมน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอีกสองวิธี

อาร์บูติน (Arbutin, Hydroquinone β -D-glucopyranoside)^[6,7] เป็นสารจากธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่จะสกัดมาจากส่วนต่างๆ ของพืชหลายชนิด เช่น แบริเบอร์รี่ แครนเบอร์รี่ บลูเบอร์รี่ และ ลูกแพร์ คุณสมบัติของสารอาร์บูตินจัดเป็นยาสมุนไพรที่ช่วยรักษาการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ รวมไปถึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ช่วยยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ในกระบวนการผลิตเม็ดสีผิวเมลานิน (Melanin) ซึ่งจะช่วยปรับสีผิวให้สม่ำเสมอ ลบเลือนจุดต่างดำ รอยแผลเป็น และความหมองคล้ำได้^[8]

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้ทำการศึกษาการกักเก็บสารอาร์บูตินไว้ในรูปแบบต่างๆ เนื่องจากอาร์บูตินเป็นสารที่มีเสถียรภาพต่ำ ทำให้มีข้อจำกัดในการใช้งานและประสิทธิภาพของสาร ดังนั้น จึงได้มีการกักเก็บสารอาร์บูตินเอาไว้ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสาร โดย Ai-Hua Wen และคณะ (2006)^[9] ได้ศึกษาการกักเก็บสารอาร์บูตินในรูปแบบของอนุภาคลิโพโซม Pimporn Leelapornpisid และคณะ (2010)^[10] ได้ศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโคโดซานและสารอาร์บูตินในรูปแบบของอนุภาคนาโน Yun Li และคณะ (2016)^[11] ได้ศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารอาร์บูตินกับไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน รวมไปถึง Supawan และคณะ (2019)^[12] ศึกษาความเป็นไปได้ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารอาร์บูตินกับเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งในผลของงานวิจัยทั้งหมดพบว่า เมื่อนำสารอาร์บูตินมาทำการกักเก็บสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและควบคุมการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินได้ดียิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาการเตรียมอนุภาคลิโพโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องไฮโมจิเนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer) เนื่องจากอาร์บูตินเป็นสารที่มีเสถียรภาพต่ำการกักเก็บสารในรูปแบบของอนุภาคลิโพโซมมีความเป็นไปได้ที่จะช่วยเพิ่มเสถียรภาพให้กับสารอาร์บูติน โดยการเตรียมอนุภาคด้วยเครื่องไฮโมจิเนเซอร์แรงดันสูงเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สามารถเตรียมอนุภาคลิโพโซมได้ในปริมาณที่มาก อีกทั้งยังมีความต่อเนื่องของกระบวนการโดยไม่ต้องผ่านหลายขั้นตอน^[13] ซึ่งอนุภาคที่ได้จะมีขนาดเล็กและมีการกระจายตัวของขนาดที่สม่ำเสมอ งานวิจัยนี้จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการกักเก็บสารในรูปแบบของอนุภาคลิโพโซมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารอาร์บูตินหรือสารสำคัญอื่นๆ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรมให้มีมูลค่ามากยิ่งขึ้น

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมและวิเคราะห์คุณลักษณะของอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer) ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษา ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิด คลอเรสเตอรอล และสารอาร์บูติน อัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินและเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซม รวมไปถึง สภาวะของเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง ได้แก่ ความดันและจำนวนรอบ ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคลิโปโซมเพื่อกักเก็บสารอาร์บูติน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะการเตรียมอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูติน ด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer)

1.2.1 เพื่อศึกษาอัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูติน และเสถียรภาพของอนุภาคลิโปโซม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาสภาวะของเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer) ในการเตรียมอนุภาคลิโปโซมกักเก็บสารอาร์บูติน ที่ความดัน (Pressure) 500, 1000, 1500 บาร์ และที่จำนวนรอบ (Number of cycles) 1, 3, 5 รอบ เพื่อดูผลของขนาดอนุภาคลิโปโซมและค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสารอาร์บูติน (Encapsulation efficiency)

1.3.2 ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิด คลอเรสเตอรอล และสารอาร์บูติน

- ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2, 5, 8 และ 11 โดยน้ำหนัก

- สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล 10:0, 10:1 และ 10:2 โดยน้ำหนัก

- ความเข้มข้นของสารอาร์บูติน ร้อยละ 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนัก

1.3.3 ศึกษาอัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินจากอนุภาคลิโปโซม

1.3.4 ศึกษาเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมที่ใช้กักเก็บสารอาร์บูติน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถใช้ประโยชน์จากวิธีการกักเก็บสารในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมเพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารอาร์บูติน

1.4.2 สามารถนำมาเป็นแนวทางในการพัฒนาอนุภาคลิโปโซมสำหรับใช้ในการกักเก็บสารสำคัญต่างๆ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.4.3 สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสารอาร์บูตินหรือสารสำคัญอื่นๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้มีมูลค่ามากยิ่งขึ้น

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

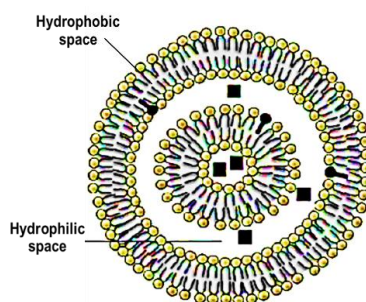
2.1 กระบวนการกักเก็บสาร (Encapsulation)

กระบวนการกักเก็บสารเป็นการนำสารสำคัญมาเคลือบหรือห่อหุ้มด้วยสารชนิดอื่น ซึ่งอาจมีขนาดหลายร้อยนาโนเมตรไปจนถึงหลายมิลลิเมตร โดยสารที่ใช้เคลือบจะต้องไม่เกิดปฏิกิริยากับอนุภาคของสารที่ถูกเคลือบและไม่เกิดการเสื่อมสลายก่อนนำไปใช้งาน ซึ่งเมื่อนำสารไปเคลือบแล้วต้องปลดปล่อยอนุภาคที่เคลือบออกมาได้ตามที่ต้องการ^[14] กระบวนการกักเก็บสารมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันสารที่ต้องการกักเก็บจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ความร้อน ความชื้น แสง หรือออกซิเจน ที่อาจทำให้ตัวสารเกิดความไม่คงตัวและเสื่อมสลายได้ง่าย อีกทั้งยังช่วยในการกลบกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ของสารที่ถูกเคลือบ รวมไปถึงช่วยยืดอายุการเก็บรักษา เพิ่มเสถียรภาพความคงตัว และควบคุมการปลดปล่อยของสารเพื่อส่งสารสำคัญไปยังเป้าหมายโดยตรง^[15,16]

2.2 ลิโปโซม (Liposome)

ลิโปโซม คือ อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน (submicron) ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงกลมๆ ของสารไขมัน โดยสารไขมันเหล่านี้เป็นสารชนิดแอมฟิพาติก (amphipathic) ที่ประกอบไปด้วยส่วนมีขั้ว (polar) ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไขมันประเภทฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) ทั้งที่ได้จากธรรมชาติและเป็นการสังเคราะห์ขึ้นมา เช่น Phosphatidyl choline (lecithin), Phosphatidyl glycerol, Phosphatidyl inositol, และ Phosphatidyl ethanolamine เป็นต้น^[17]

การกักเก็บสารสำคัญในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซม (Liposome encapsulation) เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากอนุภาคลิโปโซมไม่เป็นพิษ เพราะเตรียมได้จากไขมันที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของสิ่งที่มีชีวิตและสามารถย่อยสลายได้เองภายในร่างกาย อีกทั้งอนุภาคลิโปโซมยังช่วยเพิ่มความคงตัวของสารที่ถูกเก็บกักและช่วยป้องกันการสลายตัวของสาร ไม่ว่าจะสารนั้นจะถูกกักเก็บไว้ในชั้นน้ำหรือในชั้นไขมันของลิโปโซม ซึ่งเป็นการป้องกันสารจากการถูกทำลายโดยสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ นอกจากนี้ยังสามารถดัดแปลงคุณสมบัติของลิโปโซม โดยการเลือกส่วนประกอบไขมันและเทคนิคหรือวิธีการเตรียมอนุภาคลิโปโซมให้เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานให้เกิดประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น^[18,19]



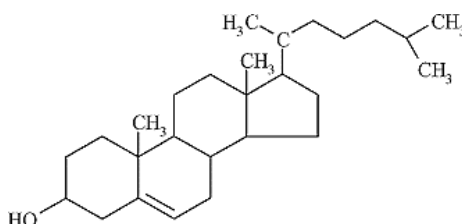
รูปที่ 1 บริเวณของอนุภาคลิโปโซมที่ใช้กักเก็บสาร^[20]

2.2.1 ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid)

ฟอสโฟลิพิดเป็นโมเลกุลที่มีลักษณะคล้ายกับโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล เนื่องจากประกอบไปด้วยโมเลกุลของกลีเซอรอลและกรดไขมันเหมือนกัน แต่โมเลกุลของฟอสโฟลิพิดจะมีกรดไขมันเพียงสองโมเลกุล ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลสองหมู่ของกลีเซอรอล โดยโมเลกุลของกรดไขมันที่พบในฟอสโฟลิพิดมักมีโมเลกุลหนึ่งที่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวและอีกโมเลกุลหนึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ลักษณะของโมเลกุลฟอสโฟลิพิดจะมีทางสองทางที่มีคุณสมบัติแบบ ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) คือ ไม่รวมตัวกับน้ำ และส่วนที่เป็นหมู่ฟอสเฟตจะมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนมีคุณสมบัติแบบไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ขอบรวมตัวกับน้ำ ซึ่งเรียกคุณสมบัติของโมเลกุลลักษณะแบบนี้ว่า แอมฟิพาธิก (amphipathic) จากคุณสมบัติดังกล่าว หากนำฟอสโฟลิพิดไปกระจายตัวในน้ำ โมเลกุลของฟอสโฟลิพิดจะเกิดการเรียงตัวกันเป็นสองชั้น เรียกว่า ลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) โดยหันส่วนหางที่ไม่รวมตัวกับน้ำเข้าหากันและหันส่วนหัวที่ชอบน้ำเข้าหาส่วนที่เป็นน้ำ^[21]

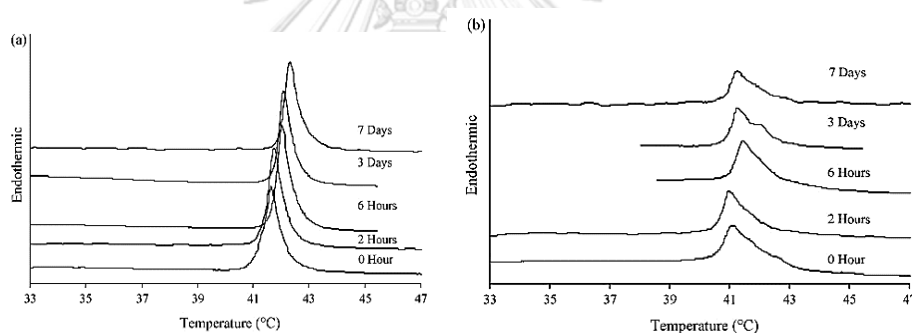
2.2.2 คอเลสเตอรอล (Cholesterol)

คอเลสเตอรอล จัดเป็นลิพิดชนิดหนึ่งในกลุ่มสเตอรอลที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งการเติมคอเลสเตอรอลลงไปจะช่วยให้อนุภาคลิโปโซมมีเสถียรภาพความคงตัวที่ดีขึ้น เพราะโมเลกุลของคอเลสเตอรอลจะไปเติมเต็มช่องว่างในผนังชั้นไขมันของฟอสโฟลิพิด ทำให้ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของผนังลิโปโซมซึ่งสามารถลดการซึมผ่านของสารที่ถูกกักเก็บให้มีระยะเวลาที่นานยิ่งขึ้น^[22]



รูปที่ 2 โครงสร้างของคอเลสเตอรอล^[23]

Lingyun Zhao และคณะ (2007)^[24] ได้นำเทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) มาศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์ของสารภายในโมเลกุลของอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมด้วยวิธี Thin film hydration โดยสารที่นำมาศึกษาคือสาร paclitaxel ซึ่งเป็นสารประเภท hydrophobic และทำการศึกษาเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมที่มีผลมาจากการเติมคลอเรสเตอรอล (Cholesterol) รูปที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์จากเทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอลมีการเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากสาร paclitaxel ถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคลิโปโซมเมื่อระยะเวลาผ่านไปเพียง 7 วัน ซึ่งต่างจากตัวอย่างที่มีการเติมคลอเรสเตอรอลลงไป สาร paclitaxel ที่ถูกกักเก็บอยู่ในส่วนของผนังชั้นไขมัน (lipid bilayer) ทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโมเลกุลฟอสโฟลิพิดกับสาร paclitaxel ส่งผลให้ผนังของลิโปโซมมีความยืดหยุ่นและไม่แข็งแรง แต่เมื่อเติมคลอเรสเตอรอลลงไป ผลของ DSC ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เพราะโมเลกุลของคลอเรสเตอรอลจะช่วยเติมเต็มช่องว่างในผนังชั้นไขมันของลิโปโซม ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมได้ดีขึ้น

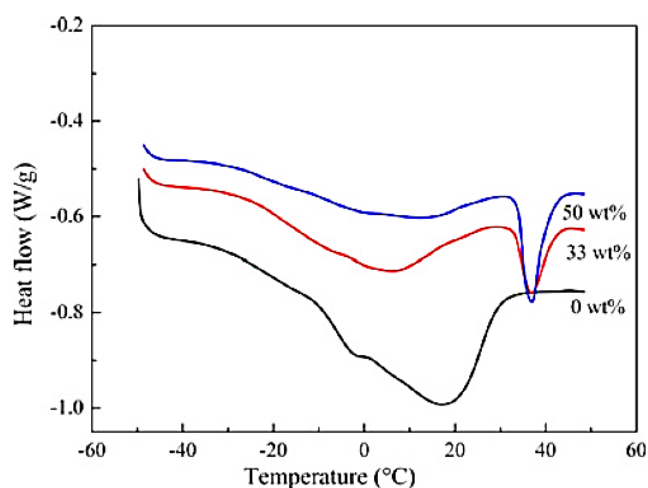


รูปที่ 3 การวิเคราะห์ผลของคลอเรสเตอรอลด้วยเทคนิค DSC^[24]

- (a) อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล
 (b) อนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล

Jinlong Yang และคณะ (2013)^[25] ได้ศึกษาการเตรียมลิโปโซมเพื่อกักเก็บสารประเภท high valence counterions (HVCI) โดยวิธี reverse phase evaporation จากรูปที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์จากเทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) พบว่าอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมโดยปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล แสดงช่วงอุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสที่หลากหลาย ตั้งแต่ 15 องศาเซลเซียส ถึง 25 องศาเซลเซียส สิ่งนี้บ่งชี้ว่าอนุภาคลิโปโซมจะปลดปล่อยสารที่ถูกกักเก็บไว้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ซึ่งยากที่จะควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารออกมา อย่างไรก็ตามด้วยการเติมคลอเรสเตอรอลลงไปทำให้กราฟแสดงค่าการเปลี่ยนเฟสที่แคบลง ยิ่งไปกว่านั้นค่าที่จุดสูงสุดของกราฟ

จะชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณคอเลสเทอรอลเพราะโมเลกุลของคอเลสเทอรอลจะช่วยเติมเต็มช่องว่างในผนังชั้นไขมันของลิโปโซมทำให้สารมีปฏิสัมพันธ์ที่ดีขึ้น สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมคอเลสเทอรอลจะช่วยเพิ่มความเสถียรของอนุภาคลิโปโซมได้



รูปที่ 4 การวิเคราะห์ผลของปริมาณคอเลสเทอรอลด้วยเทคนิค DSC^[25]

Sureewan และคณะ (2016)^[26] ได้ทำการศึกษาการเตรียมสูตรตำรับลิโปโซมที่ประกอบไปด้วย ฟอสฟาทีดิลโคลีน กรดเอลลาจิก (สารที่นำมาสกัด) และสัดส่วนของคอเลสเทอรอล (สารเพิ่มความคงตัว) กับกรดโอเลอิก (สารเร่งการซึมผ่าน) ในปริมาณ 0 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์โมล ซึ่งทำการประเมินคุณลักษณะต่างๆของสูตรตำรับ ได้แก่ ขนาดของอนุภาค การกระจายตัวของขนาด ประจุพื้นผิว และประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร รวมไปถึงการประเมินเสถียรภาพความคงตัวของสูตรตำรับ โดยผลการวิจัยพบว่า คอเลสเทอรอลและกรดโอเลอิกมีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และเสถียรภาพความคงตัวของสูตรตำรับอย่างมีนัยสำคัญ วิธีทางคอมพิวเตอร์แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างคอเลสเทอรอลและกรดโอเลอิกที่มีต่อคุณลักษณะของอนุภาคได้อย่างชัดเจนกว่าวิธีทดลองแบบดั้งเดิม โดยการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมพบว่าสูตรตำรับที่มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและเสถียรภาพความคงตัวที่ดีคือสูตรที่มีสัดส่วนคอเลสเทอรอลและกรดโอเลอิก 40 ต่อ 40 เปอร์เซ็นต์โมล มีค่าความพึงพอใจเท่ากับ 0.8222 (จากคะแนนเต็ม 1.000) จากนั้นนำสูตรที่ทำนายได้ไปเตรียมตำรับลิโปโซมด้วยการทดลองจริงและนำผลที่ได้จากการทำนาย (predicted value) กับผลการทดลองจริง (experimental value) มาเปรียบเทียบกันซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

2.3 ชนิดของลิโปโซม (Classification)

สามารถแบ่งได้ตามวิธีการผลิต จำนวนผนัง bilayer หรือ ขนาดของอนุภาคลิโปโซม ดังนี้^[19,27,28]

2.3.1 ลิโปโซมที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (Multilamellar vesicles, MLV)

ลิโปโซมลักษณะนี้จะมีผนัง bilayer หลายชั้นโดยมีน้ำเป็นตัวกั้นในแต่ละชั้น ซึ่งสามารถเตรียมได้จากการกระจายตัวหรือการพองตัวของไขมันในสารละลายน้ำ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.05 ถึง 10 ไมโครเมตร จัดเป็นลิโปโซมชนิดแรกที่ถูกค้นพบ สามารถบรรจุสารได้ดี มีความคงตัวของอนุภาคที่ดี แต่ขนาดของอนุภาคลิโปโซมที่ได้มีความแตกต่างกันมาก การปลดปล่อยของสารที่ถูกกักเก็บนั้นจะถูกปลดปล่อยโดยผ่านชั้นของผนังชั้นไขมันสองชั้น (bilayer) ไปสู่ชั้นน้ำ ทั้งนี้สามารถนำลิโปโซมประเภทผนังสองชั้นหลายชั้น (MLV) มาเตรียมเป็นลิโปโซมที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (SUV) ได้โดยผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การใช้คลื่นความถี่สูง (sonication) หรือ การกรองผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane extrusion) เป็นต้น

2.3.2 ลิโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (Large multilamellar vesicles, LMV)

ลิโปโซมลักษณะนี้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.5 ถึง 10 ไมโครเมตร มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารในชั้นน้ำร้อยละ 5 ถึง 15 สามารถเตรียมได้โดยใช้เครื่องเขย่า (mechanical stirring หรือ vortex) นอกจากนั้นลิโปโซมประเภทนี้จะมีความกตัตนผิวเท่ากับศูนย์กลางและมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆของผนังชั้นไขมันสองชั้น (bilayer) กลายเป็นผนังชั้นเดียว จากนั้นสารที่ถูกกักเก็บจะค่อยๆถูกปลดปล่อยออกมาสู่ชั้นน้ำ

2.3.3 ลิโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Small unilamellar vesicles, SUV)

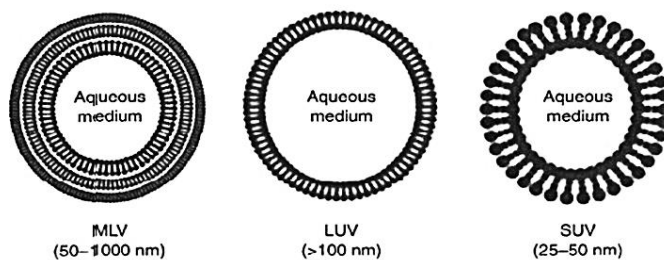
ลิโปโซมลักษณะนี้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.025 ถึง 0.1 ไมโครเมตร มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารในชั้นน้ำร้อยละ 0.5 ถึง 1 แม้จะบรรจุสารได้น้อยแต่ขนาดของอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้ค่อนข้างสม่ำเสมอและมีความคงตัวที่ดี สามารถเตรียมได้โดยการนำลิโปโซมที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (MLV) มาผ่านการใช้คลื่นความถี่สูง (sonication)

2.3.4 ลิโปโซมขนาดกลางที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Intermediate vesicles, IUV)

ลิโปโซมลักษณะนี้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 1 ถึง 10 ไมโครเมตร มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารในชั้นน้ำมากกว่าลิโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (SUV) แต่น้อยกว่าลิโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (LUV)

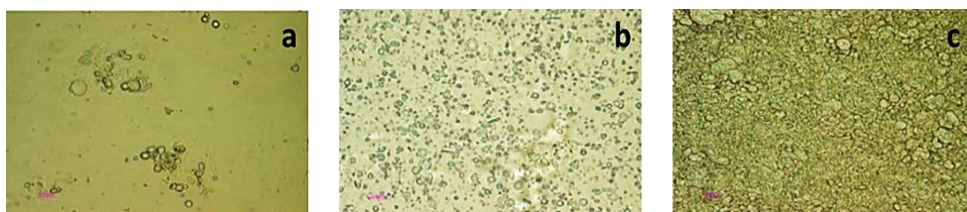
2.3.5 ลิโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Large unilamellar vesicles, LUV)

ลิโปโซมลักษณะนี้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 1 ถึง 40 ไมโครเมตร มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารในชั้นน้ำร้อยละ 35 ถึง 65 และมีปริมาตรในชั้นน้ำมากกว่าลิโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (LMV) ถึง 10 เท่า แต่ขนาดของอนุภาคลิโปโซมที่ได้ไม่ค่อยสม่ำเสมอและมีความคงตัวไม่ค่อยดี



รูปที่ 5 ลักษณะของอนุภาคลิโปโซมชนิดต่างๆ^[20]

Somlak และคณะ (2007)^[29] ได้ทำการศึกษาการเตรียมอนุภาคลิโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลู ด้วย 2 เทคนิค คือ Reverse phase evaporation และ Thin film hydration โดยใช้ฟอสโฟลิพิด (PC) จาก 3 แหล่ง คือ PC ที่สกัดจาก PC ความบริสุทธิ์ต่ำ (PPC), PC ความบริสุทธิ์ต่ำที่ซื้อมาจากบริษัทก่อนการสกัด (CPC) และ PC ความบริสุทธิ์สูง (HPC) ผลการศึกษาพบว่า PPC, CPC และ HPC ที่เตรียมด้วยเทคนิค Thin film hydration ที่อัตราส่วนฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล 1:1 ให้อนุภาคลิโปโซมชนิดผนังหลายชั้น โดยขนาดอนุภาคของลิโปโซม คือ 204.32, 246.99 และ 243.45 นาโนเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมจาก PPC และ CPC มีลักษณะของผนังหลายชั้นเหมือนกับ HPC แต่อนุภาคลิโปโซมที่เตรียมจาก CPC มีลักษณะของผนังที่ไม่ค่อยสมบูรณ์ และมีค่าการกระจายตัวของขนาดสูงกว่าอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมจาก PPC และ HPC รวมไปถึงการศึกษาความคงตัวของอนุภาค ซึ่งเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า รูปร่างของอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมจากทุกแหล่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมโดยวิธี Thin film hydration^[29]

(a) ฟอสโฟลิพิด PCP, (b) ฟอสโฟลิพิด HCP, (c) ฟอสโฟลิพิด CPC

2.4 วิธีการเตรียมอนุภาคลิโปโซม (Preparation of liposome)

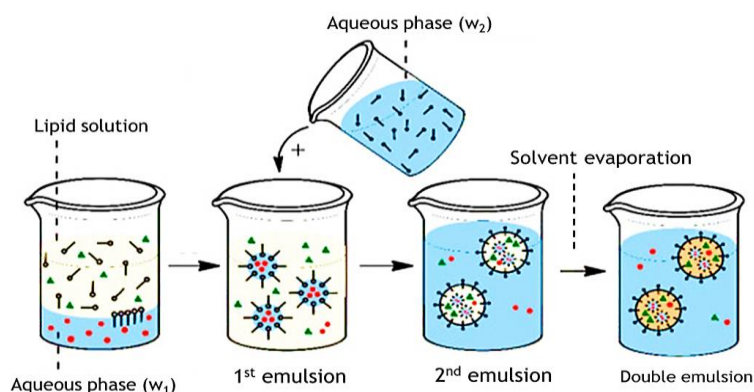
การเตรียมอนุภาคลิโปโซมจะมีผลต่อการกระจายตัวของของสารที่ถูกกักเก็บ (homogenous หรือ heterogenous) รวมไปถึง ขนาด และจำนวนผนังชั้นไขมันของอนุภาคลิโปโซม^[30] โดยการเตรียมในทุกวิธีจะประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนพื้นฐาน ดังนี้

- (1) การละลายฟอสโฟลิพิดในตัวทำละลายที่เหมาะสม
- (2) การแยกตัวทำละลายออกจากฟอสโฟลิพิด
- (3) การกระจายตัวของฟอสโฟลิพิดในตัวกลางที่เป็นน้ำ
- (4) การแยกสารที่ไม่ถูกกักเก็บออกจากลิโปโซมที่เตรียมได้

ซึ่งความแตกต่างของแต่ละวิธีขึ้นอยู่กับการใช้ตัวทำละลาย วิธีการละลายฟอสโฟลิพิด รวมไปถึงการแยกเอาตัวทำละลายออก โดยจะอธิบายการเตรียมอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีต่างๆ ดังต่อไปนี้^[19,28,31]

2.4.1 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีทางเคมี (Chemical method)

การเตรียมอนุภาคลิโปโซมโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent dispersion method) คือ การนำสารละลายฟอสโฟลิพิดในตัวทำละลายอินทรีย์ มากระจายตัวในวัฏภาคของน้ำซึ่งอาจมีหรือไม่มีตัวละลายอยู่ วัฏภาคน้ำจะถูกกระจายตัวและถูกทำให้คงตัวด้วยฟอสโฟลิพิด โดยโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดจะเกิดการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) ซึ่งเป็นจุดตั้งต้นของการเกิดเป็นผนังสองชั้น (bilayer) ของอนุภาคลิโปโซม มีหลายเทคนิคที่นิยมใช้ ตัวอย่างเช่น การเตรียมอิมัลชันโดยใช้วิธีการเตรียมอิมัลชันแบบ 2 ครั้ง (double emulsion technique) เป็นเทคนิคที่เริ่มจากการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) ด้วยการใส่สารละลายน้ำปริมาณน้อยลงในสารละลายฟอสโฟลิพิดที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นปั่นให้สารละลายน้ำแตกออกเป็นอนุภาคขนาดเล็ก โดยใช้อ่างกำเนิดคลื่นความถี่สูง (bath sonication) หรือวิธีการอื่นให้เข้ากันจนเกิดเป็นอิมัลชัน อนุภาคน้ำขนาดเล็กเหล่านี้สามารถคงตัวอยู่ได้โดยที่โมเลกุลของฟอสโฟลิพิดเรียงตัวกันเป็นอนุภาคทรงกลมหุ้มโมเลกุลของน้ำเอาไว้ภายใน เช่นเดียวกับการเกิดไมเซลล์ที่ฟอสโฟลิพิดต้องมีจำนวนมากพอจึงจะเกิดผนังสองชั้นขึ้น จากนั้นนำอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) ที่เตรียมได้มาเติมสารละลายน้ำในปริมาณมากเพื่อเตรียมเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำ (w/o/w) ซึ่งมีอนุภาคของฟอสโฟลิพิดเรียงตัวเป็นผนังอีกชั้นหนึ่งรอบชั้นฟอสโฟลิพิดเดิม เมื่อระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกไปผนังฟอสโฟลิพิดชั้นนอกกับชั้นในจะชิดติดกันเกิดเป็นผนังสองชั้นของลิโปโซมขึ้น ซึ่งจะได้อนุภาคลิโปโซมที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว การกักเก็บสารที่ละลายน้ำด้วยวิธีการนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง

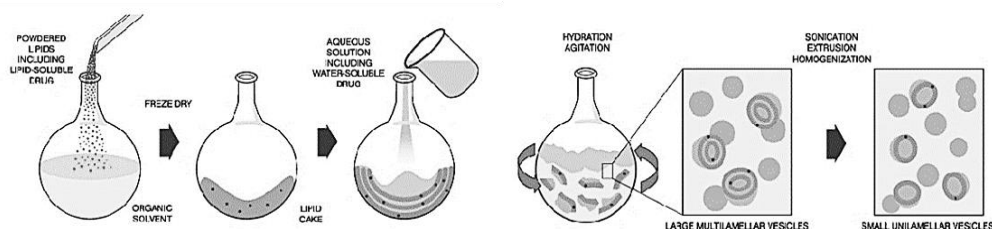


รูปที่ 7 กลไกการเกิดลิโปโซมสองชั้นด้วยเทคนิค Double emulsions (w/o/w)^[32]

Wang และคณะ (2006)^[33] ได้ทำการศึกษาการเตรียมอนุภาคลิโปโซมประเภทผนังชั้นเดียว (Unilamellar liposome) โดยใช้วิธีการเตรียมแบบ Double emulsion ผลการทดลองพบว่า อนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้ทั้งหมดเป็นลิโปโซมประเภทผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว โดยมีค่าประสิทธิภาพการกักเก็บ (Encapsulation efficiency) ของสาร calcein ร้อยละ 87 สาร 5-fluorouracil ร้อยละ 19 และ สาร flurbiprofen ร้อยละ 93 หลังจากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคลิโปโซม ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยสภาวะปราศจากแสง พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาคลิโปโซม

2.4.2 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical method)

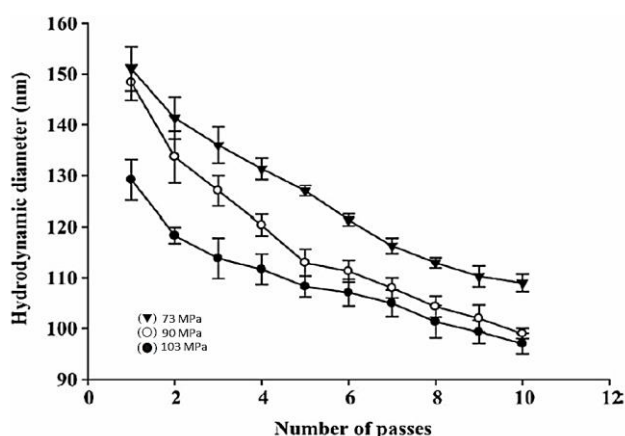
วิธีการนี้เป็นการกระจายโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดในน้ำ โดยอาศัยพลังงานกลเพื่อช่วยให้เกิดการรวมตัวเป็นผนังสองชั้น (bilayer) ซึ่งจะละลายฟอสโฟลิพิดในตัวทำละลายอินทรีย์แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกจนกลายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆเคลือบอยู่ จากนั้นเติมวัฏภาคน้ำที่มีสารต้องการกักเก็บละลายอยู่ แผ่นฟิล์มเกิดการไฮเดรชันและพองตัวขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของน้ำจะไปล้อมรอบในส่วนที่มีชั้นของไขมัน แผ่นฟิล์มจึงลอกออกมาแล้วมีวนตัวประสานกันเป็นอนุภาคลิโปโซม ซึ่งจะได้ลิโปโซมที่มีผนังหลายชั้น (MLV) ที่มีการกระจายตัวของขนาดไม่สม่ำเสมอ และ ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารที่ละลายน้ำได้น้อย เพียงร้อยละ 5 ถึง 10 เท่านั้น วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการเตรียมอนุภาคลิโปโซม ดังนั้นจึงต้องนำอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้ไปผ่านวิธีอื่นเพื่อให้ได้อนุภาคลิโปโซมที่มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ พร้อมกับประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถทำได้โดยวิธีต่อไปนี้



รูปที่ 8 การเตรียมนอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical method)^[22]

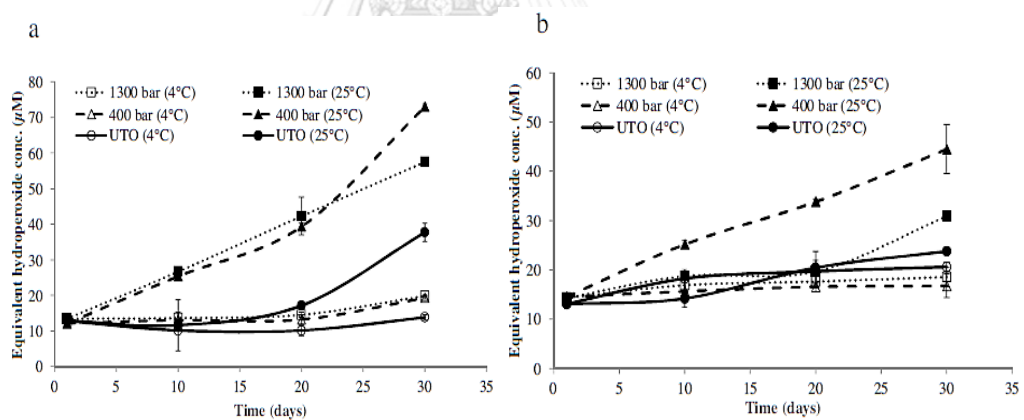
2.4.2.1 เทคนิคการเตรียมด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenization) เป็นการนำอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมขึ้นก่อนด้วยวิธีเบื้องต้นมาผ่านเครื่องตีปั่น (homogenizer) จนได้อนุภาคลิโปโซมขนาดเล็กที่มีการกระจายตัวของอนุภาคสม่ำเสมอขึ้น แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ได้อนุภาคลิโปโซมที่มีขนาดเล็กมากและมีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (SUV) ซึ่งทำให้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารได้ต่ำ

Thompson และคณะ (2006)^[34] ได้ทำการเตรียมนอนุภาคลิโปโซมโดยใช้ฟอสโฟลิพิดที่ได้มาจากเนย (buttermilk) ซึ่งศึกษาผลของความดันและจำนวนรอบของเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer) จากรูปที่ 9 แสดงผลขนาดของอนุภาคลิโปโซม พบว่า เมื่อเพิ่มความดันและจำนวนรอบขึ้นทำให้ขนาดของอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 100 ถึง 150 นาโนเมตร เมื่อผ่านจำนวนรอบหลายครั้งทำให้การกระจายตัวของอนุภาคลิโปโซมมีความสม่ำเสมอมากขึ้นซึ่งมีค่าการกระจายตัวอยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 0.6



รูปที่ 9 ผลของความดันและจำนวนรอบต่อขนาดของอนุภาคลิโปโซม^[34]

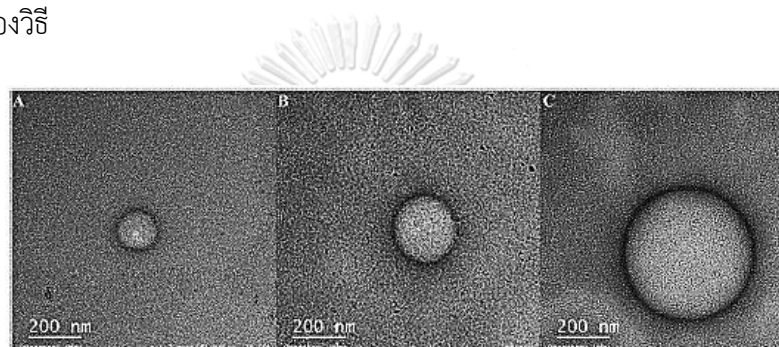
Selen Guner และคณะ (2017)^[4] ได้ศึกษาวิธีการลดขนาดอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้จากเลซิตินชนิดไข่และถั่วเหลือง ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างวิธี Ultrasonication กับ High pressure homogenization เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีในระหว่างการเก็บรักษา ลิโปโซม ซึ่งได้แก่ ขนาดของอนุภาค, ประจุพื้นผิว, และความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมที่เก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กับ 25 องศาเซลเซียส โดยวัดจากการเกิดออกซิเดชันของโมเลกุลพอลิฟลิพิด ผลการทดลองพบว่า อนุภาคลิโปโซมจากเลซิตินทั้งสองชนิดที่ได้จากวิธี High pressure homogenization นั้นมีขนาดเล็กและมีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอของอนุภาคมากกว่าวิธี Ultrasonication ซึ่งสามารถลดขนาดได้เล็กถึง 31 นาโนเมตร โดยผลจากการเพิ่มความดัน แต่วิธี Ultrasonication ขนาดของอนุภาคไม่มีลดลงหลังผ่านการ sonicate ไป 5 นาที จากรูปที่ 10 แสดงการเกิดออกซิเดชันของโมเลกุลพอลิฟลิพิด (เลซิติน) ทั้งสองชนิด พบว่า ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าการก่อตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของพอลิฟลิพิดชนิดไข่มีมากกว่าพอลิฟลิพิดชนิดถั่วเหลืองซึ่งตรงข้ามกับที่สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมจากพอลิฟลิพิดชนิดถั่วเหลืองเหมาะแก่การเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่อนุภาคลิโปโซมที่เตรียมจากพอลิฟลิพิดชนิดไข่เหมาะแก่การเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 10 การเกิดออกซิเดชันของพอลิฟลิพิด (เลซิติน)^[4]

- (a) พอลิฟลิพิด (เลซิติน) ชนิดถั่วเหลือง
(b) พอลิฟลิพิด (เลซิติน) ชนิดไข่

Juan David Beltran และคณะ (2020)^[5] ได้ทำการเตรียมอนุภาคลิโปโซมเพื่อกักเก็บน้ำมันปาล์มโอเลอิก (oleic palm oil) โดยศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีการลดขนาดอนุภาคที่ต่างกัน ซึ่งพบว่าวิธีการลดขนาดอนุภาคลิโปโซมเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Ultrasonication, High pressure homogenization และ Rotor stator ทั้ง 3 วิธีสามารถลดขนาดอนุภาคได้น้อยกว่า 200 นาโนเมตร แต่วิธี High pressure homogenization ให้ค่าการกระจายตัวของอนุภาคที่ดีที่สุด (0.13) และสามารถลดขนาดอนุภาคได้เล็กกว่าวิธีอื่น จากนั้นได้ทำการทดสอบความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมที่เวลาผ่านไป 35 วัน พบว่า วิธี High pressure homogenization ให้เสถียรภาพที่ดีเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคลิโปโซมน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอีกสองวิธี



รูปที่ 11 ขนาดของอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้จาก 3 วิธี^[5]

(a) High pressure homogenization, (b) Ultrasonication, (c) Rotor stator

2.4.2.2 เทคนิคการเตรียมโดยใช้คลื่นความถี่สูง (Sonication) เป็นเทคนิคที่ใช้พลังงานคลื่นเหนือเสียง (Ultrasonic) ในการลดขนาดอนุภาคลิโปโซมที่มีผนังหลายชั้น (MLV) ให้เล็กลงกลายเป็นผนังชั้นเดียว (ULV) และมีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอ โดยคลื่นเหนือเสียงจะทำให้อนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้แตกออกแล้วกลับมาเรียงตัวกันใหม่ ซึ่งต้องควบคุมระยะเวลาที่ให้คลื่นความถี่สูงในระหว่างการเตรียมให้เหมาะสม แบ่งเป็น 2 เทคนิค (1) Probe sonication ทำได้โดยการจุ่มโพรบลงไปในสารแขวนตะกอนของลิโปโซม แล้วเปิดเครื่องให้สัญญาณคลื่นความถี่ ข้อดีคือเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ เพราะมีราคาถูก โดยขนาดและอนุภาคของลิโปโซมที่ได้ขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของคลื่นความถี่และระยะเวลาที่อนุภาคลิโปโซมสัมผัสกับโพรบ (2) Bath sonication เหมาะสำหรับการเตรียมอนุภาคลิโปโซมในปริมาณมาก แต่จะใช้เวลานานในการเตรียม

2.4.2.3 เทคนิคการเตรียมโดยอัดผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane extrusion) เป็นเทคนิคในการลดขนาดอนุภาคลิโปโซมโดยการอัดผ่านแผ่นเมมเบรนพอลิคาร์บอเนตที่มีขนาดรูที่แน่นอน ทำให้ลิโปโซมมีขนาดเล็กลงซึ่งจะมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของรูเมมเบรน เทคนิคนี้ใช้ความดันต่ำในการอัดผ่าน ทำให้สามารถอัดผ่านได้หลายครั้ง โดยเมื่ออัดผ่านรูเมมเบรนอนุภาคลิโปโซมจะเกิดการแตกออกแล้วรวมตัวกันใหม่จนได้ขนาดที่เล็กลง

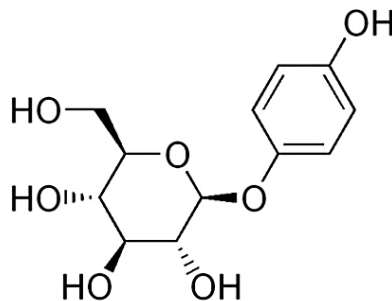
2.4.3 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมโดยใช้เทคนิค Detergent removal dialysis

เทคนิคนี้เป็นการใช้สารลดแรงตึงผิวประเภททีเทอร์เจนต์ เช่น Triton X-100 ซึ่งเป็นสารที่ช่วยละลายฟอสโฟลิพิดในน้ำ ให้เกิดเป็น Mixed micelles ระหว่างสารทีเทอร์เจนต์กับฟอสโฟลิพิด จากนั้นสารทีเทอร์เจนต์จะถูกแยกออกจากระบบโดยกระบวนการ dialysis หรือ gel permeation chromatography เมื่อทีเทอร์เจนต์ถูกดึงออกไปโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดจะเกิดการเรียงตัวกันใหม่ อนุภาคลิโปโซมที่ได้จะมีหลายชนิด เช่น ลิโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (SUV) หรือ ลิโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (LUV) ที่มีขนาดระหว่าง 30 ถึง 180 นาโนเมตร เทคนิคนี้มีข้อจำกัดคือ สารที่นำมาเก็บเก็บต้องมีความคงตัวต่อสารทีเทอร์เจนต์ รวมไปถึงฟอสโฟลิพิด ต้องไม่ซึมผ่านเมมเบรนออกมาพร้อมกับสารทีเทอร์เจนต์ในขั้นตอน dialysis

2.5 การทดสอบความคงตัวของลิโปโซม (Stability)

การทดสอบความคงตัวของอนุภาคลิโปโซม (stability) เป็นเครื่องชี้วัดที่บ่งชี้ถึงลักษณะรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมว่ามีอายุการเก็บรักษา (shelf-life) ได้มากน้อยเพียงใด โดยจะนำอนุภาคลิโปโซมไปเก็บไว้ในภาวะต่างๆ ที่จะนำไปใช้งานจริง เช่น การทดสอบความคงตัวของอนุภาคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นจะมีการประเมินผลด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ การวัดขนาดของอนุภาค การแยกชั้นของสาร การวัดความหนืด การวัดความคงตัวทางเคมี รวมไปถึงการรั่วของสารที่เก็บกักในอนุภาคลิโปโซม เป็นต้น^[19] ในระหว่างการเก็บรักษา อนุภาคลิโปโซมเริ่มมีขนาดที่ไม่สม่ำเสมอมากขึ้น จากนั้นจะเริ่มหลอมรวมกันจนมีขนาดใหญ่ ทำให้สารที่ถูกกักเก็บเกิดการรั่วออกจากอนุภาคลิโปโซม รวมไปถึงมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของฟอสโฟลิพิดที่อาจเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือไฮโดรไลซิส จนเป็นสาเหตุทำให้การซึมผ่านเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้อิทธิพลอื่นที่มีผลต่อความคงตัวของอนุภาคลิโปโซม เช่น ปัจจัยที่เกิดขึ้นระหว่างการเตรียมอนุภาคลิโปโซม (ค่า pH ชนิดของบัฟเฟอร์ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์) รวมไปถึงปัจจัยแวดล้อมระหว่างการเก็บรักษา (อุณหภูมิ แสง ออกซิเจน การปนเปื้อนโลหะหนักที่เป็นสาเหตุการเร่งปฏิกิริยาทางกายภาพและเคมี) เป็นต้น^[35]

2.6 อาร์บูติน (Arbutin)



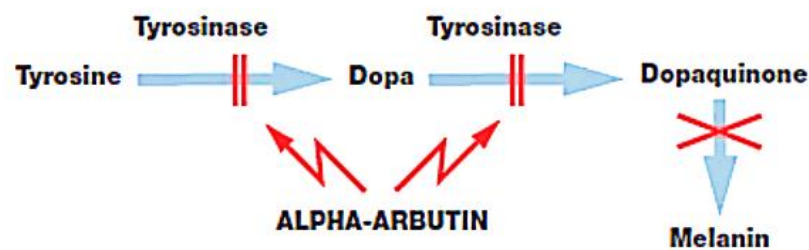
รูปที่ 12 โครงสร้างของอาร์บูติน^[6]

อาร์บูติน (Arbutin, Hydroquinone β -D-glucopyranoside)^[6,7] เป็นสารอนุพันธ์ของสารไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติที่ส่วนใหญ่จะสกัดมาจากส่วนต่างๆ ของพืชหลายชนิด เช่น แบร์เบอร์รี่ แครนเบอร์รี่ บลูเบอร์รี่ และลูกแพร์ คุณสมบัติของสารอาร์บูตินจัดเป็นยาสมุนไพรที่ช่วยรักษาการติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ รวมไปถึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ช่วยยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ในกระบวนการผลิตเม็ดสีผิวเมลานิน (Melanin) ซึ่งจะช่วยให้ผิวขาวใส ลดรอยจุดด่างดำ รอยแผลเป็น และความหมองคล้ำได้ โดยสารอาร์บูตินจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ แอลฟาอาร์บูติน (α -Arbutin) และ เบต้าอาร์บูติน (β -Arbutin) ซึ่งในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางจะนิยมใช้สารแอลฟาอาร์บูตินเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีและปลอดภัยกว่าสารไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) โดยสารไฮโดรควิโนนเป็นสารที่ยังไม่ผ่านการรับรองทางกายภาพเนื่องจากเป็นสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองได้ง่าย และยังเป็นอันตรายต่อผิวหนังเมื่อใช้ในระยะเวลา

ตารางที่ 1 คุณสมบัติและรายละเอียดของสารอาร์บูติน^[7]

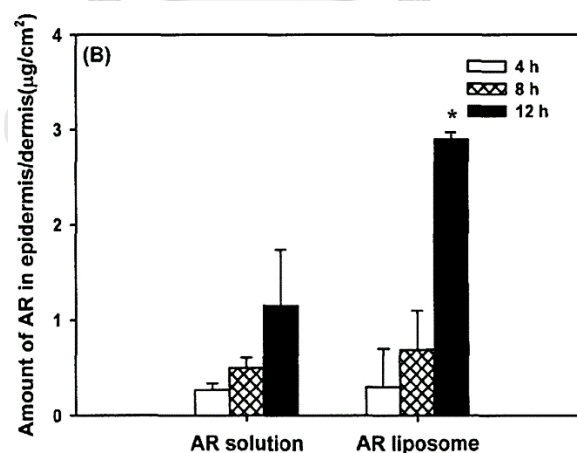
| คุณสมบัติ | รายละเอียด |
|------------------------|---------------------------------------|
| สูตรโมเลกุล | $C_{12}H_{16}O_7$ |
| มวลโมเลกุล | 272.253 กรัมต่อโมล |
| จุดหลอมเหลว | 199 °C |
| การละลายในน้ำ ที่ 25°C | 5 กรัม/100 มิลลิลิตร |
| ความดันไอ | 2.30×10^{12} mm Hg ที่ 25 °C |
| ลักษณะ | ผงสีขาว |

การทำงานของสารอาร์บูตินในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนสารไทโรซีน (Tyrosine) และโดปามีน (Dopamine) ให้เป็นเมลานิน เพราะเอนไซม์ไทโรซิเนสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างสารสีน้ำตาลดำซึ่งทำให้เกิดการหมองคล้ำของผิวหนัง ดังนั้นฤทธิ์ของสารอาร์บูตินจะช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสส่งผลให้เกิดเมลานินลดลง ซึ่งจะช่วยให้ผิวขาวสว่างขึ้น^[8]



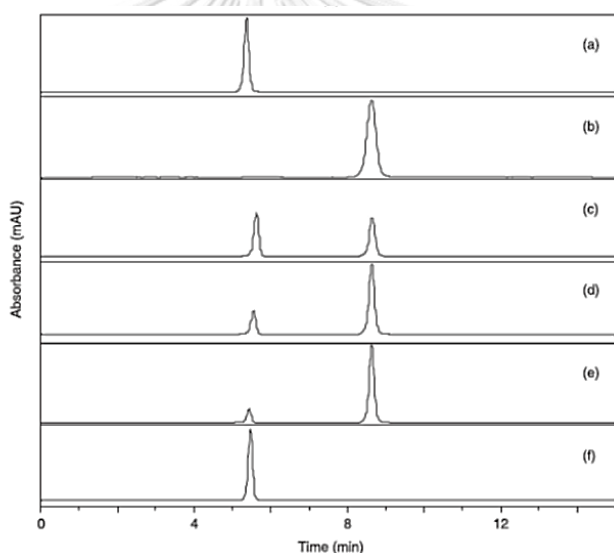
รูปที่ 13 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารอาร์บูติน^[8]

Ai-Hua Wen และคณะ (2006)^[9] ได้ทำการศึกษาการกักเก็บสารอาร์บูตินในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซม (Liposome) ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการซึมผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนังของสารอาร์บูตินที่ถูกกักเก็บในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมนั้นมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารอาร์บูตินบริสุทธิ์ แต่จะมีปริมาณการสะสมในผิวหนังชั้นนอกและชั้นหนังแท้มากขึ้น ซึ่งเป็นชั้นผิวหนังในบริเวณที่มีเซลล์เมลานโนไซต์ (Melanocyte) ที่ทำหน้าที่ผลิตเมลานิน



รูปที่ 14 ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินในชั้นผิวหนังชั้นนอกและชั้นหนังแท้^[9]

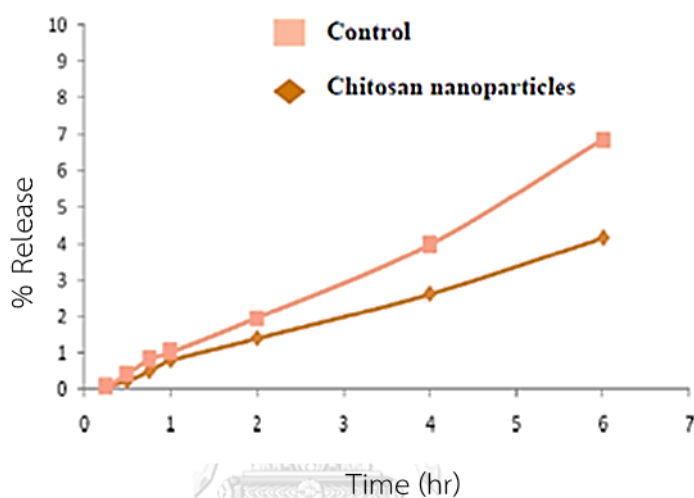
Seo-Hyun Bang และคณะ (2008)^[10] ได้ทำการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของสารอาร์บูตินที่จะเปลี่ยนไปเป็นสารไฮโดรควิโนน เนื่องจากสารไฮโดรควิโนนเป็นสารที่มีพิษและในปัจจุบันได้มีมาตรการไม่ให้ใช้สารตัวนี้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางอีก โดยในการทดลองจะใช้แบคทีเรียบนผิวหนังของมนุษย์ ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งในผลการทดลองเกิดการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนั้น จะใช้ปริมาณของแบคทีเรีย 0.16-4.51 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม จากรูปที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารอาร์บูตินเมื่อทำการผสมกับแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* พบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของสารอาร์บูตินไปเป็นสารไฮโดรควิโนน เนื่องจากสารอาร์บูตินถูกไฮโดรไลซิสจนกลายเป็นสารไฮโดรควิโนน



รูปที่ 15 ผลการทดสอบด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)^[10]

- (a) สารอาร์บูตินมาตรฐาน
- (b) สารไฮโดรควิโนนมาตรฐาน
- (c) 10 นาทีหลังจากทำการเขย่าสารอาร์บูติน พร้อมกับ *S.epidermidis*
- (d) 30 นาทีหลังจากทำการเขย่าสารอาร์บูตินพร้อมกับ *S.epidermidis*
- (e) 1 ชั่วโมงหลังจากทำการเขย่าสารอาร์บูตินพร้อมกับ *S.epidermidis*
- (f) 1 ชั่วโมงหลังจากทำการเขย่าสารอาร์บูติน

Pimporn Leelapornpisid และคณะ (2010)^[11] ได้ทำศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตซาน (Chitosan) และสารอาร์บูตินในรูปแบบของอนุภาคนาโน (Nanoparticles) ซึ่งในผลการทดลองพบว่า ขนาดของอนุภาคเล็กที่สุด คือ 466.93 นาโนเมตร โดยมีค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บสารอยู่ที่ 40.89% และจากรูปที่ 16 แสดงให้เห็นว่า ที่เวลาเท่ากันการกักเก็บสารอาร์บูตินในสารประกอบเชิงซ้อนมีการกักเก็บได้ดีกว่า เมื่อดูจากค่าอัตราการปลดปล่อยสารที่เทียบกับสารอาร์บูตินบริสุทธิ์



รูปที่ 16 เปรียบเทียบร้อยละการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินระหว่างสารอาร์บูตินบริสุทธิ์กับสารประกอบเชิงซ้อนในรูปแบบอนุภาคนาโน^[11]

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 สารสกัดอาร์บูติน (Arbutin) บริษัท Topscience Biotech ประเทศจีน
- 3.1.2 ฟอสโฟลิพิด (Phospholipon 90 G) บริษัท Look Chem ประเทศจีน
- 3.1.3 คอเลสเตอรอล (Cholesterol) บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.1.4 เอทานอล (Ethanol) บริษัท Duksan Pure Chemicals ประเทศเกาหลี
- 3.1.5 เมทานอล (Methanol) เกรด HPLC บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.1.6 กรดแอซีติก (Acetic acid) บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.1.7 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.2.1 เครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง รุ่น EmulsiFlex-C3 บริษัท AVESTIN ประเทศเยอรมัน
- 3.2.2 เครื่องปั่นความเร็วสูง รุ่น Ultra Turrax บริษัท IKA ประเทศเยอรมัน
- 3.2.3 เครื่องคลื่นความถี่สูง (Sonicator) รุ่น VCX 750 บริษัท Crest ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.4 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) รุ่น RCT basic บริษัท IKA ประเทศเยอรมัน
- 3.2.5 เครื่อง Vortex รุ่น vortex genie 2 บริษัท Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.6 เครื่อง Ultracentrifuge รุ่น L-100XP บริษัท Beckman Coulter ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.7 เครื่อง Franz Diffusion Cell ขนาด 14 มิลลิเมตร
- 3.2.8 เครื่องวัดขนาดอนุภาค รุ่น Nano ZS บริษัท Malvern instruments ประเทศอังกฤษ
- 3.2.9 เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) รุ่น DSC 214 บริษัท NETZSCH ประเทศเยอรมัน
- 3.2.10 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Alliance e2695
ต่อกับ Photodiode Array (PDA) Detector รุ่น 2475 บริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.11 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) รุ่น JEM-2100 บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น

3.3 การเตรียมอนุภาคลิโปโซมกักเก็บสารอาร์บูติน

วิธีการเตรียมอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer) ในงานวิจัยจะแบ่งออกเป็นขั้นตอน ดังนี้

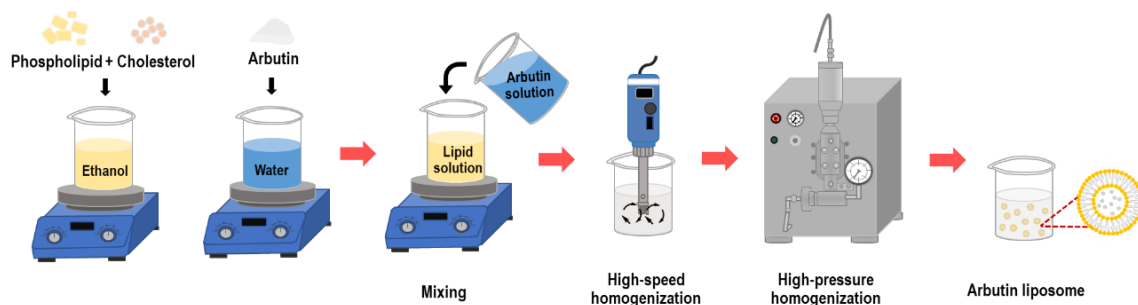
1. นำฟอสโฟลิพิดและคลอเรสเตอรอลไปละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งใช้เป็นความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด และสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลตามค่าที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 ด้วยเครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) รุ่น RCT basic บริษัท IKA ประเทศเยอรมัน เพื่อให้สารทั้งสองละลายเข้ากันจนหมด

2. ค่อยๆเติมสารละลายอาร์บูตินที่ความเข้มข้นต่างๆตามค่าในตารางที่ 2 ลงไป จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นความเร็วสูง (High speed homogenizer) รุ่น Ultra Turrax บริษัท IKA ประเทศเยอรมัน ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการเตรียมอนุภาคเบื้องต้นเพื่อให้อนุภาคมีความเข้ากันได้ดีและไม่เกิดการแยกชั้นกัน

3. นำอนุภาคที่เตรียมได้ในขั้นตอนที่ 2 ไปเข้าเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer) รุ่น Emulsiflex-C3 บริษัท AVESTIN ประเทศเยอรมัน ซึ่งใช้สภาวะตามค่าในตารางที่ 2 หลังจากนั้นนำตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Ultracentrifuge) รุ่น L-100XP บริษัท Beckman Coulter ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยความเร็วรอบ 100,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อทำการแยกอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินไปวิเคราะห์คุณลักษณะของอนุภาคลิโปโซมในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ

| ปัจจัย | สภาวะที่ใช้ |
|---|-------------------------------|
| ความดัน | 500, 1000, 1500 บาร์ |
| จำนวนรอบ | 1, 3, 5 รอบ |
| ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด | ร้อยละ 2, 5, 8, 11 โดยน้ำหนัก |
| สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดและคลอเรสเตอรอล | 10:0, 10:1, 10:2 โดยน้ำหนัก |
| ความเข้มข้นของสารอาร์บูติน | ร้อยละ 2, 4, 6 โดยน้ำหนัก |



รูปที่ 17 ขั้นตอนการเตรียมอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูติน

3.4 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคลิโปโซม

ตรวจสอบลักษณะรูปร่าง (Morphology) ของอนุภาคลิโปโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron photomicrograph, TEM) รุ่น JEM-2100 บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น โดยการนำอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI water) แล้วหยดลงบน Carbon-coated grid หลังจากนั้นซับตัวอย่างออกแล้วเคลือบด้วย Phosphotunstate ความเข้มข้น 0.5% (w/w) 1 รอบ และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนอีก 3 รอบ หลังจากที่ตั้งตัวอย่างแห้งแล้วจึงนำไปส่องดูลักษณะรูปร่างของอนุภาคลิโปโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)



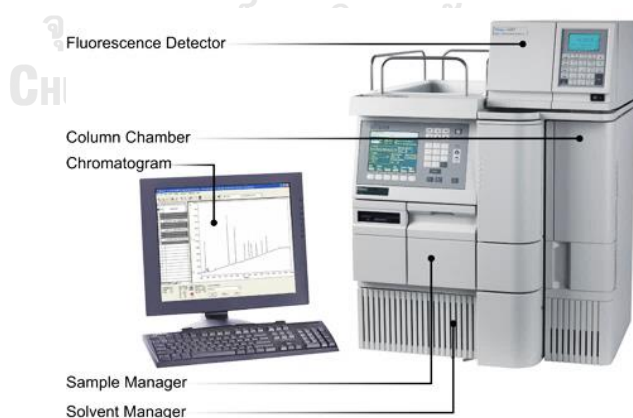
รูปที่ 18 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน^[38]

3.5 การวิเคราะห์ขนาดและค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซม

นำตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาขนาดของอนุภาค (Size), ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI), และค่าประจุบนพื้นผิว (Zeta potential) ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร (Zeta sizer) รุ่น Nano ZS บริษัท Malvern instruments ประเทศอังกฤษ โดยจะทำการผสมกันระหว่างน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ปริมาณ 980 ไมโครลิตร กับตัวอย่างลิโปโซม 20 ไมโครลิตร แล้วทำการเขย่าด้วยเครื่อง Vortex รุ่น vortex genie 2 บริษัท Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา ก่อนนำตัวอย่างใส่ลงไปในเครื่องเพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์

3.6 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บสารอาร์บูติน (Entrapment Efficiency)

นำตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการกักเก็บสารอาร์บูติน (Entrapment Efficiency) โดยนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Ultracentrifuge) รุ่น L-100XP บริษัท Beckman Coulter ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยความเร็วรอบ 100,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งจะเกิดการแยกชั้นเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นสารละลายใสกับส่วนที่เป็นตะกอนของอนุภาคลิโปโซม จากนั้นนำทั้งสองส่วนมาวิเคราะห์หาปริมาณสารอาร์บูตินด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Alliance e2695 ที่ต่อกับ Photodiode Array (PDA) Detector รุ่น 2475 บริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่สภาวะการทำงานตามตารางที่ 3



รูปที่ 19 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)^[36]

ตารางที่ 3 สภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC

| | |
|---------------------------------|--|
| คอลัมน์ | C18 (250×4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมครอน) |
| วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) | (กรดแอสซิติค : เมทานอล : น้ำ) 5 : 10 : 85 |
| อัตราการไหล | 0.7 (มิลลิลิตรต่อนาที) |
| ปริมาณการฉีดตัวอย่างเข้าคอลัมน์ | 20 (ไมโครลิตร) |

สมการการคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการกักเก็บ (%EE)

$$\text{Entrapment Efficiency} = \frac{[\text{Arbutin(ppm)}]_{\text{total}} - [\text{Arbutin(ppm)}]_{\text{free}}}{[\text{Arbutin(ppm)}]_{\text{total}}} \times 100$$

3.7 การวิเคราะห์ค่าการเปลี่ยนแปลงทางความร้อน

วิเคราะห์ค่าการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimeter (DSC) โดยการชั่งตัวอย่างของสารให้มีน้ำหนักไม่เกิน 2 มิลลิกรัม ลงในอะลูมิเนียมแพน และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) รุ่น DSC 214 บริษัท NETZSCH ประเทศเยอรมัน โดยมีสภาวะการทำงานของเครื่องตามตารางที่ 4

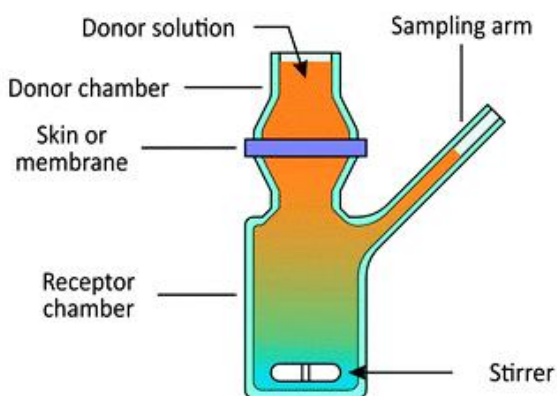
ตารางที่ 4 สภาวะการทำงานของเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC)

| | |
|---|-----|
| อุณหภูมิเริ่มต้น (องศาเซลเซียส) | 20 |
| อุณหภูมิสิ้นสุด (องศาเซลเซียส) | 300 |
| อัตราการไหลของไนโตรเจน (มิลลิลิตรต่อนาที) | 40 |
| อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (องศาเซลเซียสต่อนาที) | 10 |

3.8 การวิเคราะห์อัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูติน

อัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูติน จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Franz Diffusion Cell ขนาด 14 มิลลิเมตร โดยใช้เมมเบรนที่มีขนาดของ Molecular weight cut off เท่ากับ 1000 ดาลตัน ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษา ได้แก่ สารละลายอาร์บูติน ตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูติน และตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมที่มีการล้างอาร์บูตินอิสระออก

นำตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมใส่ลงบนแผ่นเมมเบรนโดยเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 5.5 ซึ่งระบบทั้งหมดจะทำการทดลองที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และมีการปั่นกวนสารอย่างต่อเนื่อง หลังจากนั้นเก็บสารตัวอย่างตามระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณของอาร์บูตินด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Alliance e2695 ที่ต่อกับ Photodiode Array (PDA) Detector รุ่น 2475 บริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา



รูปที่ 20 เครื่อง Franz Diffusion Cell^[37]

บทที่ 4

ผลการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูล

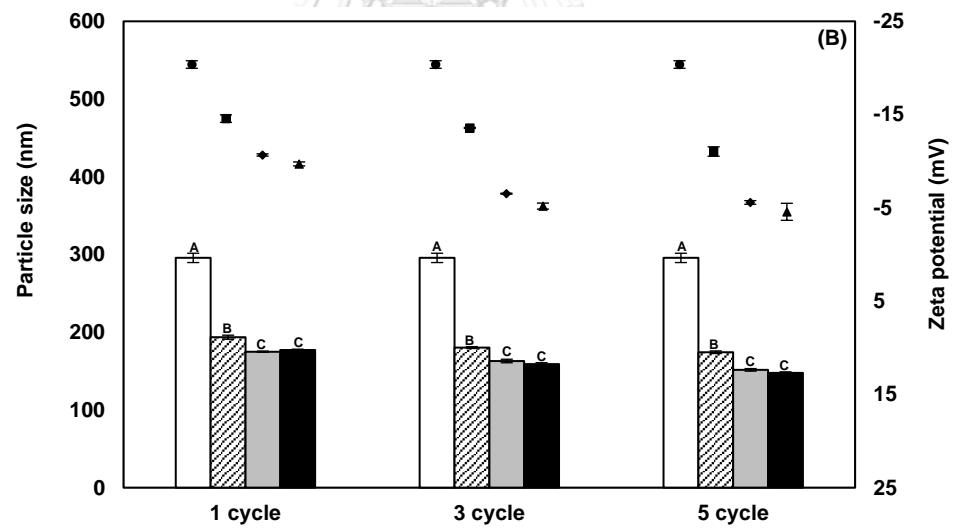
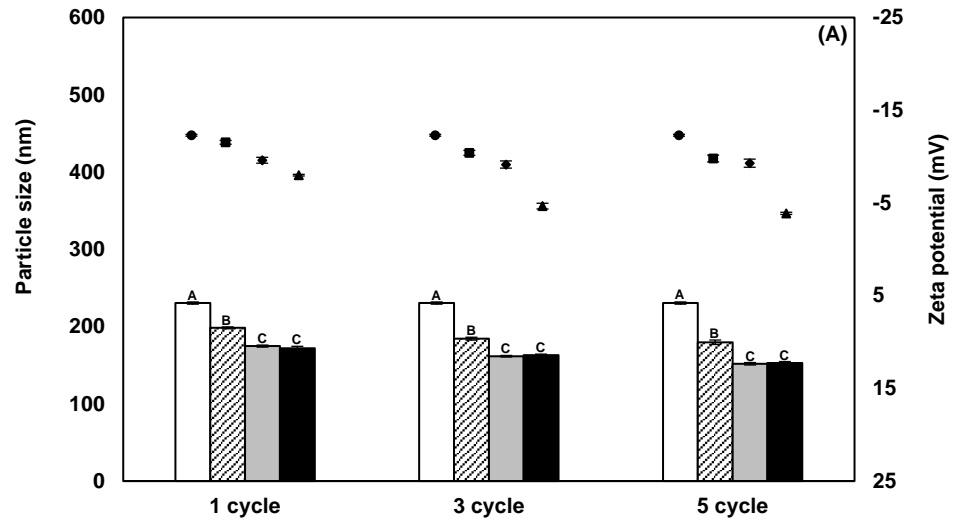
ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมและวิเคราะห์คุณลักษณะของอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer) ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษา ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิด คลอเรสเตอรอล และสารอาร์บูติน อัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินและเสถียรภาพของอนุภาคลิโปโซม รวมไปถึง สภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ซึ่งได้แก่ ความดันและจำนวนรอบ ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคลิโปโซมเพื่อกักเก็บสารอาร์บูติน

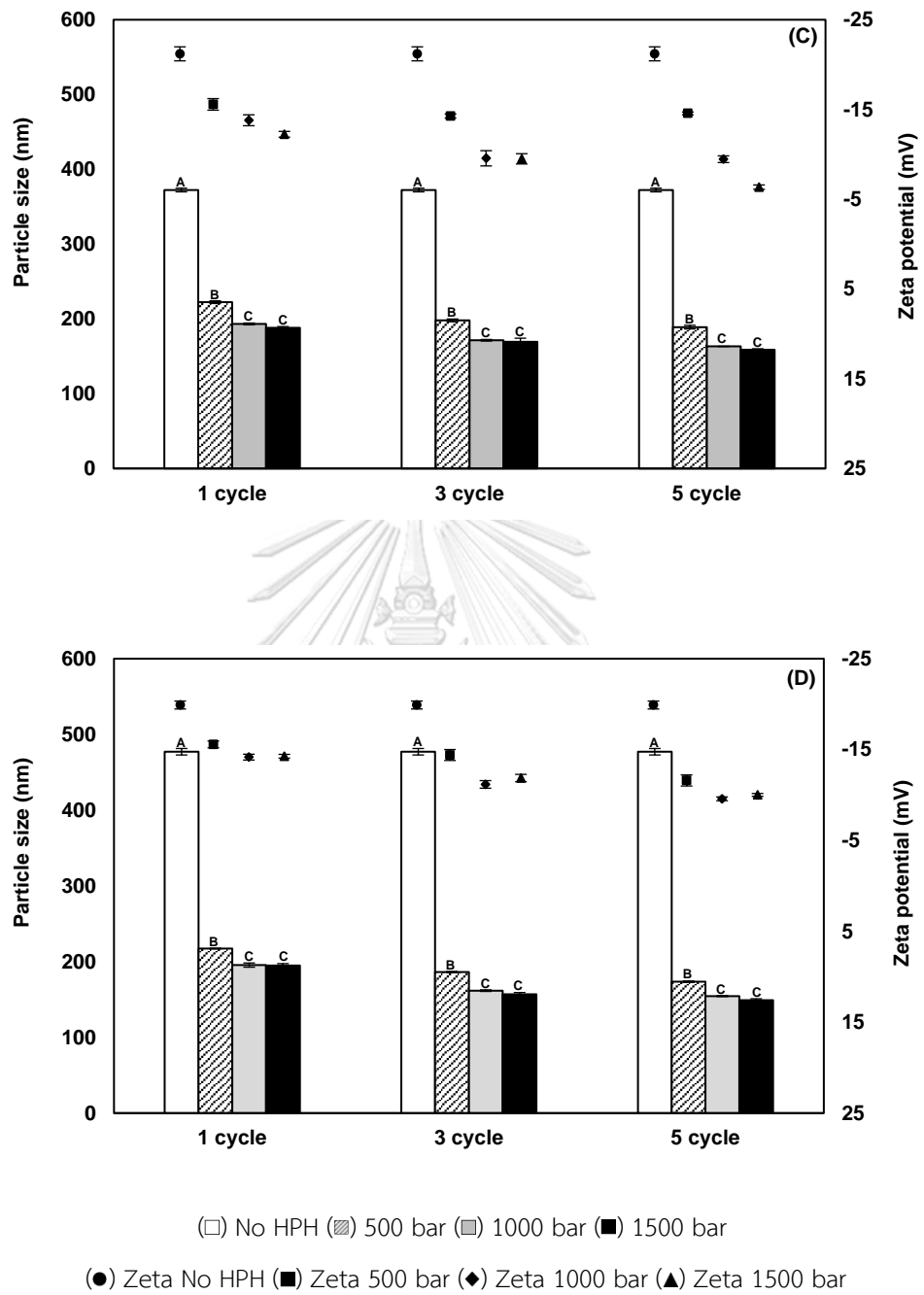
4.1 การศึกษาสภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงในการเตรียมอนุภาคลิโปโซม

4.1.1 ผลการวิเคราะห์ขนาดและค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซม

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของขนาดและค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซม ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2, 5, 8, 11 โดยน้ำหนัก และสภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ที่ความดัน 500, 1000, 1500 บาร์ และจำนวนรอบ 1, 3, 5 รอบ ตามลำดับ

จากผลการศึกษานขนาดและค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซม ซึ่งแสดงในรูปที่ 21 พบว่าขนาดของอนุภาคมีค่าลดลงเมื่อมีการเพิ่มความดันและจำนวนรอบ เมื่อพิจารณาจากขนาดของอนุภาคในทุกความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (ร้อยละ 2, 5, 8, 11 โดยน้ำหนัก) ก่อนการนำไปผ่านเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง พบว่า ขนาดของอนุภาคมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ซึ่งที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 11 โดยน้ำหนัก มีค่าขนาดของอนุภาคใหญ่สุด อยู่ที่ 447.1 ± 4.2 นาโนเมตร ทั้งนี้ เมื่อนำอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้มาผ่านเข้าเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ที่ความดัน 500, 1000, 1500 บาร์ และจำนวนรอบ 1, 3, 5 รอบ ตามลำดับ พบว่า ขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมมีค่าลดลง โดยมีค่าขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วง 147.6 ± 1.3 ถึง 217.2 ± 0.4 นาโนเมตร และมีค่าประจุพื้นผิวอยู่ในช่วง -3.8 ± 1.9 ถึง -21.2 ± 2.4 มิลลิโวลต์ แสดงให้เห็นว่า การเตรียมอนุภาคลิโปโซมด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงสามารถช่วยลดขนาดของอนุภาคได้โดยการเพิ่มความดันและจำนวนรอบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thompson และคณะ (2006)^[34] ที่ได้ทำการเตรียมอนุภาคลิโปโซมโดยใช้ฟอสโฟลิพิดที่ได้มาจากเนย (buttermilk) ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความดันและจำนวนรอบขึ้น ทำให้ขนาดของอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 100 ถึง 150 นาโนเมตร



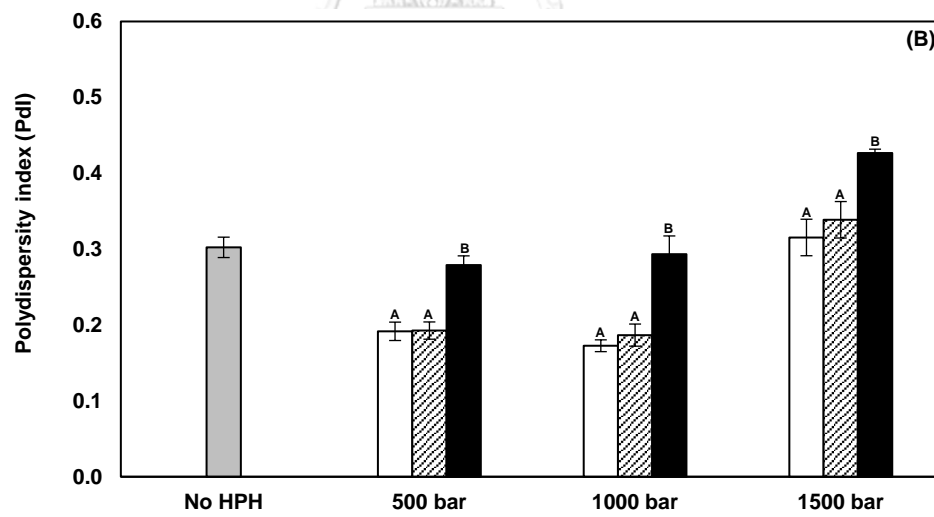
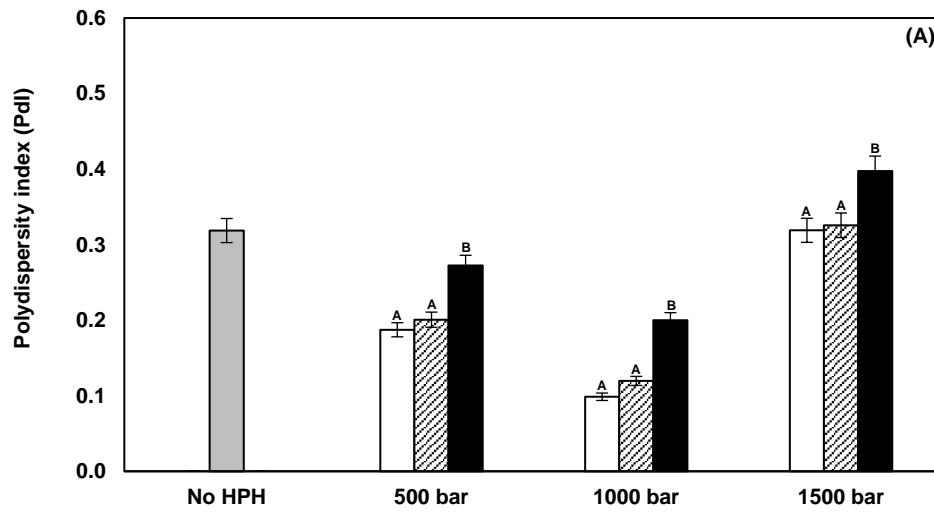


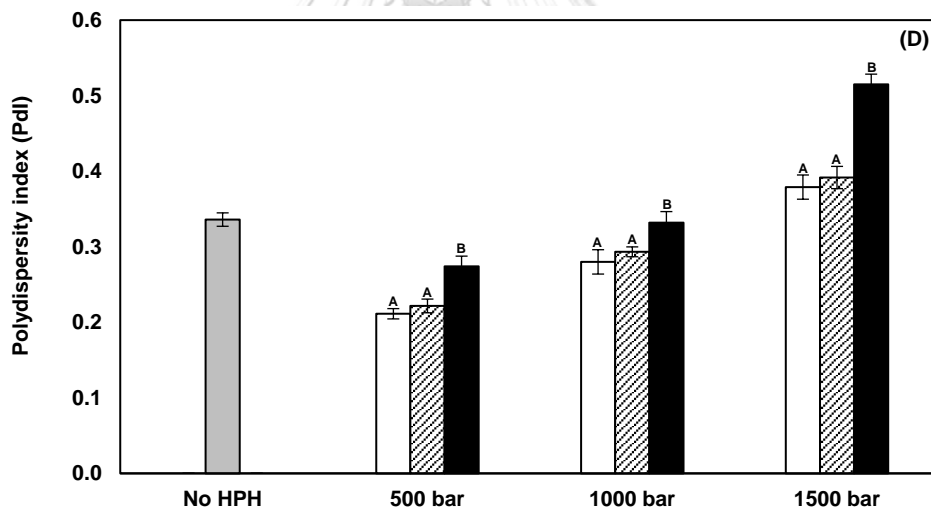
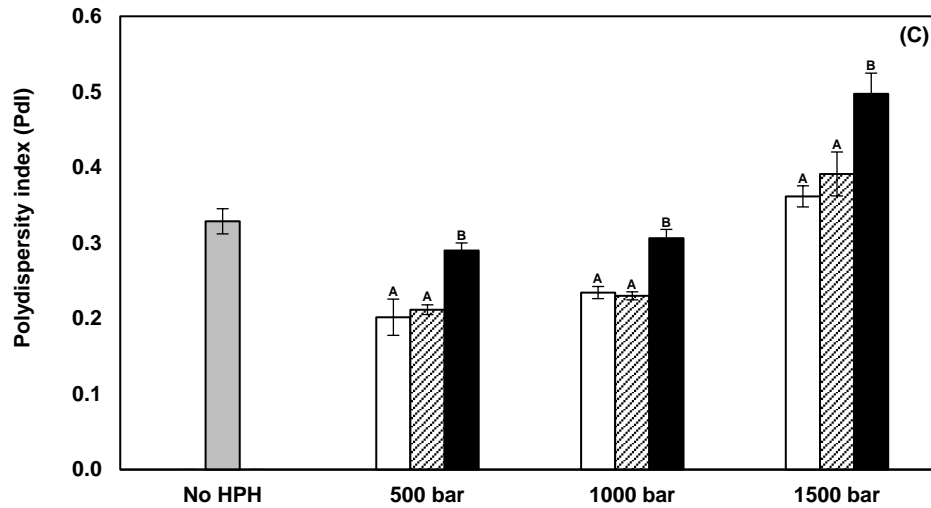
รูปที่ 21 ขนาดและค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ2 (B) ร้อยละ5 (C) ร้อยละ8 และ (D) ร้อยละ11 โดยน้ำหนัก
 A, B, C ที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแต่ละแท่งกราฟมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.1.2 ผลการวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของอนุภาค

จากผลการศึกษาค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ดังแสดงในรูปที่ 22 ซึ่งค่าการกระจายตัวโดยเฉลี่ยของอนุภาคอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.5 โดยเมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของอนุภาคตามการเพิ่มขึ้นของความดัน (500, 1000, 1500 บาร์) พบว่า ที่ความดัน 1500 บาร์ มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคที่สูงเมื่อเทียบกับความดัน 500 และ 1000 บาร์ ในทุกความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (ร้อยละ 2, 5, 8, 11 โดยน้ำหนัก) นอกจากนั้น เมื่อเปรียบเทียบค่าการกระจายตัวของอนุภาคตามจำนวนรอบที่ผ่านเข้าเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง (1, 3, 5 รอบ) พบว่า ที่จำนวนการผ่านเข้าเครื่อง 5 รอบ มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคสูงที่สุดในทุกความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด เนื่องมาจากอนุภาคลิโปโซมมีส่วนประกอบของฟอสโฟลิพิดที่มีคุณสมบัติแบบ ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ และคุณสมบัติแบบไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ที่ชอบรวมตัวกับน้ำ จากคุณสมบัติดังกล่าว หากนำฟอสโฟลิพิดไปกระจายตัวในน้ำ โมเลกุลของฟอสโฟลิพิดจะเกิดการเรียงตัวกันเป็นสองชั้น เรียกว่า ลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) โดยหันส่วนหางที่ไม่รวมตัวกับน้ำเข้าหากันและหันส่วนหัวที่ชอบน้ำเข้าหาส่วนที่เป็นน้ำจนเกิดเป็นถุงอนุภาคลิโปโซมขึ้น^[21] ดังนั้น เมื่อมีการลดขนาดด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงที่มีการผ่านเข้าเครื่องหลายรอบและใช้ความดันที่สูงเกินไป อาจส่งผลทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นอนุภาคลิโปโซมที่มีหลายขนาด จึงทำให้มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความดันต่ำและจำนวนรอบที่น้อยกว่า

ดังนั้น จากผลการศึกษาสภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงในการเตรียมอนุภาคลิโปโซม พบว่า สามารถช่วยลดขนาดของอนุภาคได้ ซึ่งหลังจากผ่านเข้าเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงทำให้ขนาดของอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 147.60 ± 1.31 ถึง 217.27 ± 0.46 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ความดัน 1000 และ 1500 บาร์ มีขนาดอนุภาคที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ที่ความดัน 1500 บาร์ กับจำนวนการผ่านเข้าเครื่อง 5 รอบ พบว่า มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคสูงกว่าที่สภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในทุกความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด งานวิจัยนี้จึงเลือกสภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ที่ความดัน 500, 1000 บาร์ และจำนวนรอบ 1, 3 รอบ เพื่อทำการศึกษาในหัวข้อต่อไป





(■) No HPH (□) 1 cycle (▨) 3 cycle (■) 5 cycle

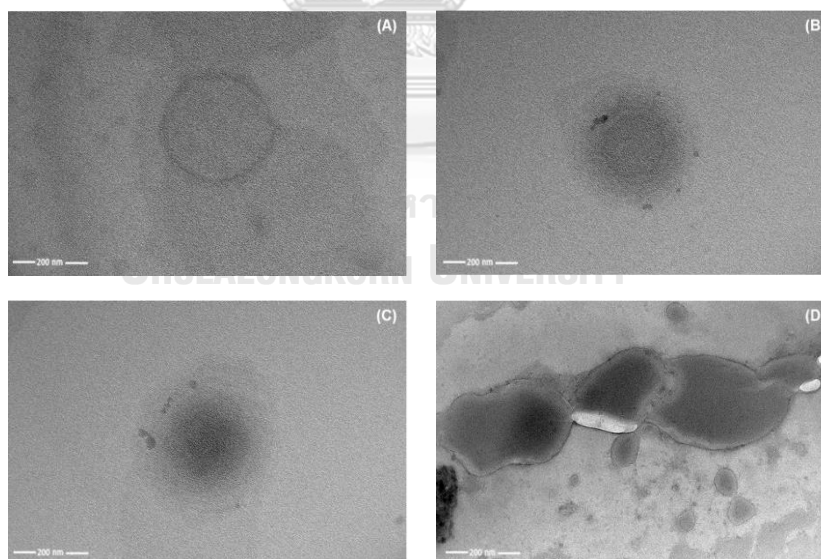
รูปที่ 22 ค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด

(A) ร้อยละ2 (B) ร้อยละ5 (C) ร้อยละ8 และ (D) ร้อยละ11 โดยน้ำหนัก

A, B ที่มีอักษรกำกับค่าแตกต่างกันในแต่ละแท่งกราฟมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.1.3 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ

งานวิจัยนี้ได้มีการตรวจสอบลักษณะรูปร่าง (Morphology) ของอนุภาคลิโปโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron photomicrograph, TEM) โดยรูปที่ 23 แสดงรูปร่างลักษณะของ (A) อนุภาคลิโปโซมปราศจากการเติมสารอาร์บูติน (B) อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูติน (C) อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูติน (หลังล้างอาร์บูตินอิสระ) และ (D) อนุภาคลิโปโซมที่เกิดการตกตะกอน จากผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ พบว่า การเตรียมอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ทำให้ได้ลิโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Small unilamellar vesicles, SUV) โดยจะมีการกักเก็บสารอาร์บูตินไว้ตรงกลาง เนื่องจากอาร์บูตินเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ จากคุณสมบัติของฟอสโฟลิพิดที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่น้ำมัน เมื่อนำมากระจายตัวในน้ำโมเลกุลจะจัดเรียงโครงสร้างโดยการหันส่วนที่ชอบน้ำมันเข้าหากันและหันส่วนที่ชอบน้ำออก เกิดเป็นอนุภาคลิโปโซมทรงกลมที่มีการห่อหุ้มน้ำอยู่ภายใน^[21] ดังนั้น ลิโปโซมในลักษณะนี้จึงเหมาะแก่การกักเก็บสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี นอกจากนี้หากพิจารณาจากรูปที่ 23(D) พบว่า ลักษณะรูปร่างของอนุภาคลิโปโซมเกิดการรวมตัวกันขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการแยกชั้นหรือการตกตะกอน จึงส่งผลทำให้อนุภาคลิโปโซมมีเสถียรภาพความคงตัวที่ลดลง



รูปที่ 23 ลักษณะรูปร่างของอนุภาคลิโปโซมที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (A) อนุภาคลิโปโซมปราศจากการเติมสารอาร์บูติน (B) อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูติน (C) อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินหลังล้างอาร์บูตินอิสระ (D) อนุภาคลิโปโซมที่เกิดการตกตะกอน

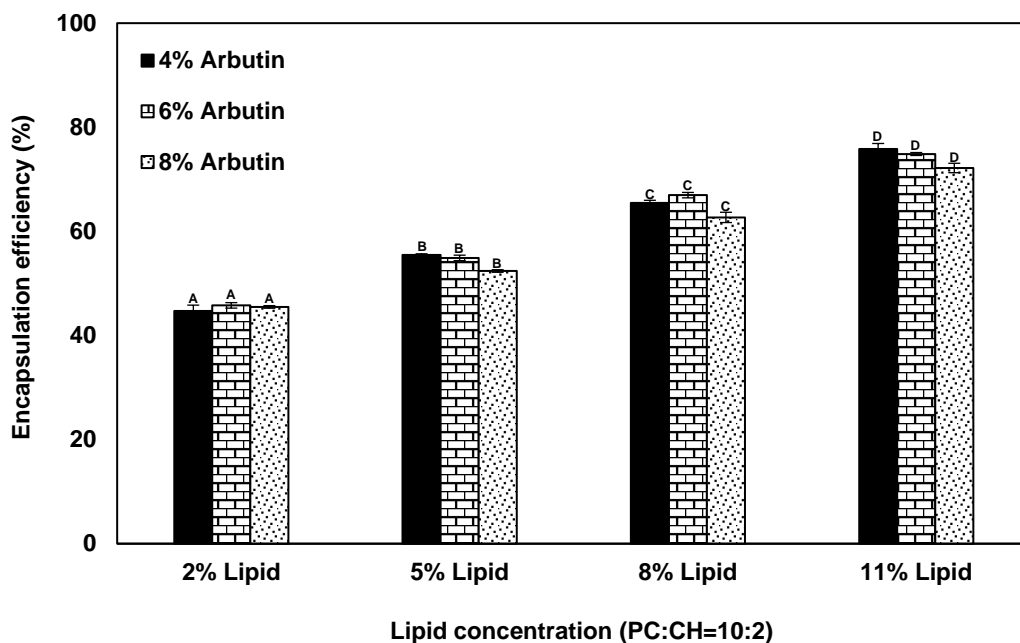
4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิปิต

4.2.1 ผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิปิตต่อขนาดของอนุภาคลิโปโซม

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิปิต (ร้อยละ 2, 5, 8 และ 11 โดยน้ำหนัก) ในการเตรียมอนุภาคลิโปโซม พบว่า ขนาดของอนุภาคลิโปโซมก่อนนำไปผ่านเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ แรงดันสูงที่ใช้ความเข้มข้นโดยรวมของลิปิตต่างกันส่งผลให้มีขนาดของอนุภาคที่ต่างกัน โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโดยรวมของลิปิตทำให้ขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิปิต ร้อยละ 11 โดยน้ำหนัก มีค่าขนาดอนุภาคใหญ่สุด อยู่ที่ 447.1 ± 4.2 นาโนเมตร อย่างไรก็ตาม เมื่อนำอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้มาผ่านเข้าเครื่องโฮโมจิไนเซอร์แรงดันสูง พบว่า ขนาดของอนุภาคลิโปโซมมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งในทุกความเข้มข้นโดยรวมของลิปิต (ร้อยละ 2, 5, 8 และ 11 โดยน้ำหนัก) มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วง 147.6 ± 1.3 ถึง 217.2 ± 0.4 นาโนเมตร

4.2.2 ผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิปิตต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสาร

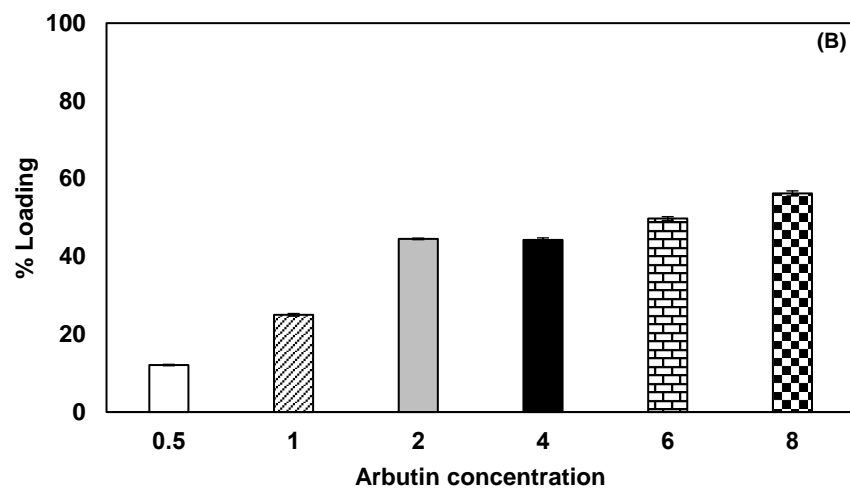
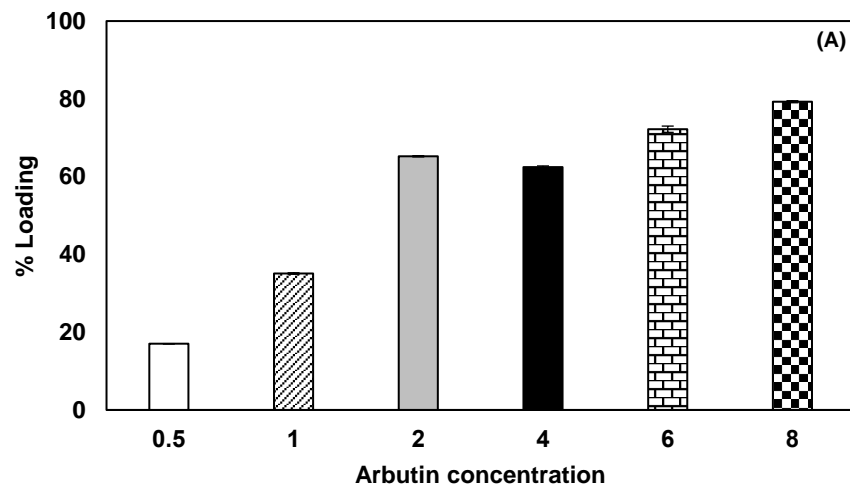
จากการศึกษาผลของความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูติน (Entrapment Efficiency) ต่อความเข้มข้นโดยรวมของลิปิต ดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่า ค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสารเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโดยรวมของลิปิต ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสารเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 74.2 ± 0.7 เปอร์เซ็นต์ (ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิปิต ร้อยละ 11 โดยน้ำหนัก) เนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของฟอสโฟลิปิตส่งผลทำให้มีการรวมตัวกันเป็นถุงอนุภาคลิโปโซมมากขึ้นจึงทำให้ความสามารถในการกักเก็บสารเพิ่มขึ้นด้วย โดยเมื่อฟอสโฟลิปิตมีการรวมตัวกันเป็นอนุภาคลิโปโซม สารอาร์บูตินที่ละลายอยู่ในเฟสน้ำจะถูกกักเก็บไว้ภายในอนุภาคลิโปโซมส่งผลทำให้ความเข้มข้นของสารอาร์บูตินในเฟสน้ำลดลง (Takashi และคณะ 1984)^[47] จากงานวิจัยของ Ai Hua Wen และคณะ (2006)^[9] ได้ศึกษาการกักเก็บสารอาร์บูตินในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมด้วยวิธีการเตรียมแบบ Thin Film Hydration โดยศึกษาผลความเข้มข้นของลิปิตที่ 2, 5, 8 (%w/v) และปริมาณความเข้มข้นของอาร์บูตินที่ 2, 3, 4 (%w/v) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสารเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของลิปิต โดยมีค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสูงสุดอยู่ที่ 17.6 ± 1.3 เปอร์เซ็นต์ (ที่ความเข้มข้นของลิปิต 8%) แต่ปริมาณความเข้มข้นของอาร์บูตินไม่มีผลต่อความสามารถในการกักเก็บสาร อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาถึงเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมจากผลการศึกษาในหัวข้อที่ 4.2.3 พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นโดยรวมของลิปิตสูง (ที่ร้อยละ 8 และ 11 โดยน้ำหนัก) จะทำให้อนุภาคมีเสถียรภาพความคงตัวไม่ดี ซึ่งเกิดการตกตะกอนขึ้นหลังจากผ่านไป 3 วัน เนื่องมาจากการใช้สัดส่วนของฟอสโฟลิปิตในปริมาณที่มากเกินไปส่งผลทำให้เกิดความไม่คงตัวของอนุภาคลิโปโซมขึ้น



รูปที่ 24 ผลความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดต่อความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูติน

A, B, C, D ที่มีอักษรกับค่าแตกต่างกันในแต่ละแห่งกราฟมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

นอกจากนี้ ในงานวิจัยได้มีการศึกษาปริมาณการโหลด (% Loading) ของสารอาร์บูตินดังแสดงในรูปที่ 25 พบว่า ปริมาณการโหลดของสารอาร์บูตินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารอาร์บูตินที่เติมเข้าไป อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก กับร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก พบว่า ปริมาณการโหลดของสารอาร์บูตินในอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้จากความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มีค่ามากกว่าที่เตรียมได้จากความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 5 ซึ่งอาจเกิดมาจากปริมาณความเข้มข้นของลิพิดที่มากจนทำให้มีความหนาแน่นของอนุภาคมากขึ้น ส่งผลให้ความยืดหยุ่น (elasticity) ของอนุภาคลิโปโซมลดลงจึงมีค่าปริมาณการโหลดของสารอาร์บูตินที่ลดลง (Selaaly และคณะ 2015)^[42]



รูปที่ 25 ปริมาณการโหลดของสารอาร์บูตินที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิปิด
(A) ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก (B) ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก

4.2.3 ผลของความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดต่อเสถียรภาพความคงตัว

เสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคจะสังเกตจากการตกตะกอนหรือการแยกชั้นของอนุภาค จากรูปที่ 26 พบว่า อนุภาคลิโปโซมที่เตรียมจากความเข้มข้นของลิพิดที่ร้อยละ 8 และ 11 โดยน้ำหนัก ให้เสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคไม่ดี โดยเกิดการตกตะกอนขึ้นหลังจากผ่านไป 3 วัน ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่มากเกินไปทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นตะกอนได้ง่าย นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่าประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมหลังผ่านเข้าเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง จากผลการทดลองที่ 4.1.1 พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง -3.8 ± 1.9 ถึง -15.5 ± 1.4 มิลลิโวลต์ ซึ่งอาจเป็นผลทำให้ความคงตัวของอนุภาคลดลง เนื่องจากค่าประจุพื้นผิวที่ต่ำจะมีแรงผลักระหว่างอนุภาคน้อย จึงมีโอกาสเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคได้ง่าย โดยค่าประจุพื้นผิวที่เหมาะสมควรมีค่ามากกว่า -30 และ $+30$ มิลลิโวลต์ (Selen Guner และคณะ 2017)^[4] และจากงานวิจัยของ Sulkowski และคณะ (2005)^[39] รายงานว่า การเตรียมลิโปโซมโดยใช้ฟอสโฟลิพิดและคลอเรสเตอรอลจะช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับอนุภาคลิโปโซมได้ จึงควรใช้อัตราส่วนของฟอสโฟลิพิดต่อคลอเรสเตอรอลในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสาร (Entrapment efficiency) โดยหากใช้ปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่น้อยเกินไปจะทำให้มีประสิทธิภาพการกักเก็บสารน้อย และหากใช้ในปริมาณที่สูงอาจส่งผลทำให้เกิดความไม่คงตัวแบบเกาะกลุ่ม (Aggregation) ขึ้นได้ ดังนั้น จึงต้องเลือกสัดส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้มีความสามารถในการกักเก็บสารที่ดี รวมไปถึงช่วยทำให้อนุภาคลิโปโซมมีเสถียรภาพความคงตัวที่ดีขึ้นด้วย



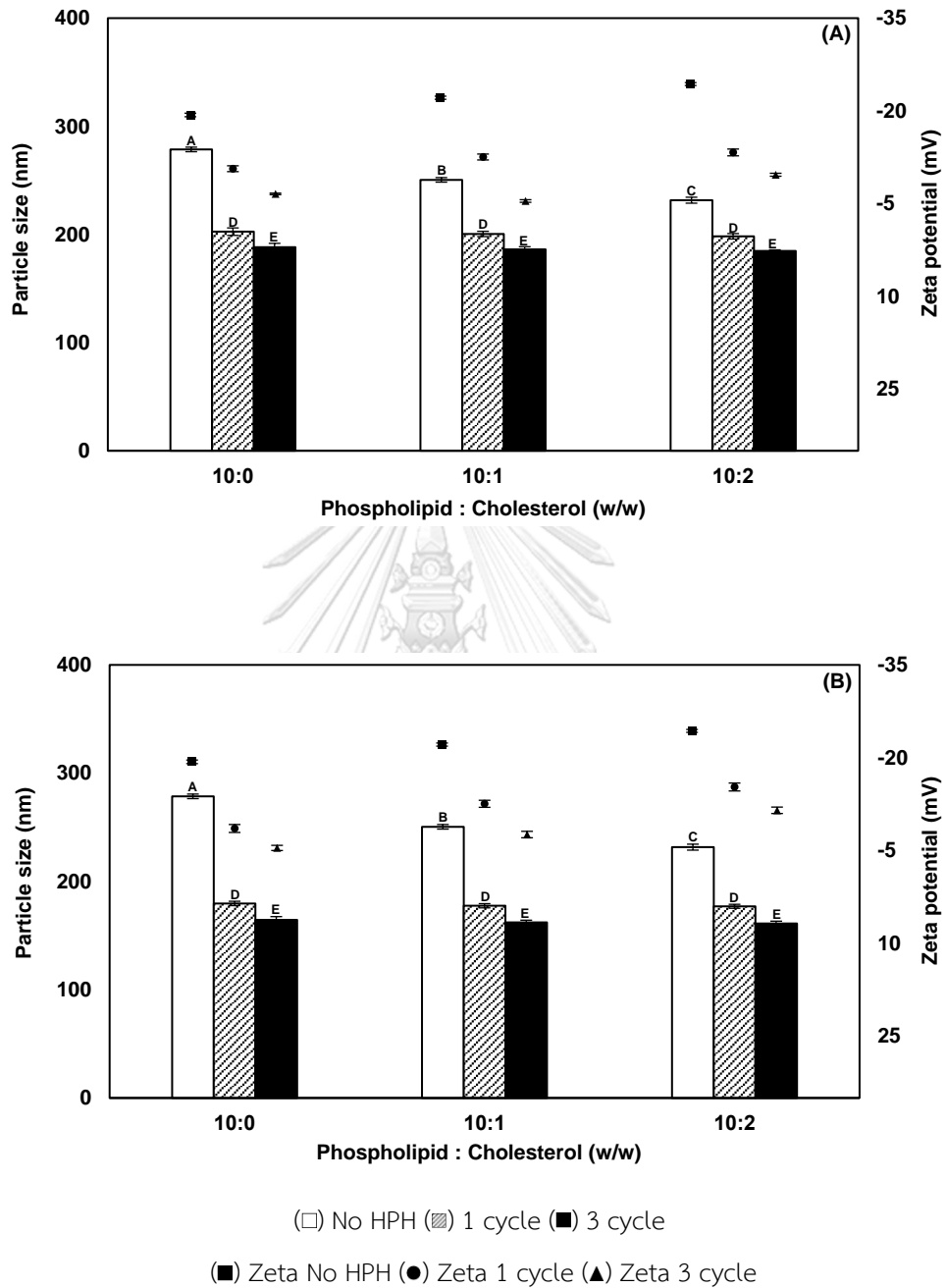


รูปที่ 26 อนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้หลังจากผ่านไป 3 วันที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด
(A) ร้อยละ2 (B) ร้อยละ5 (C) ร้อยละ8 และ (D) ร้อยละ11 โดยน้ำหนัก

4.3 การศึกษาผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล

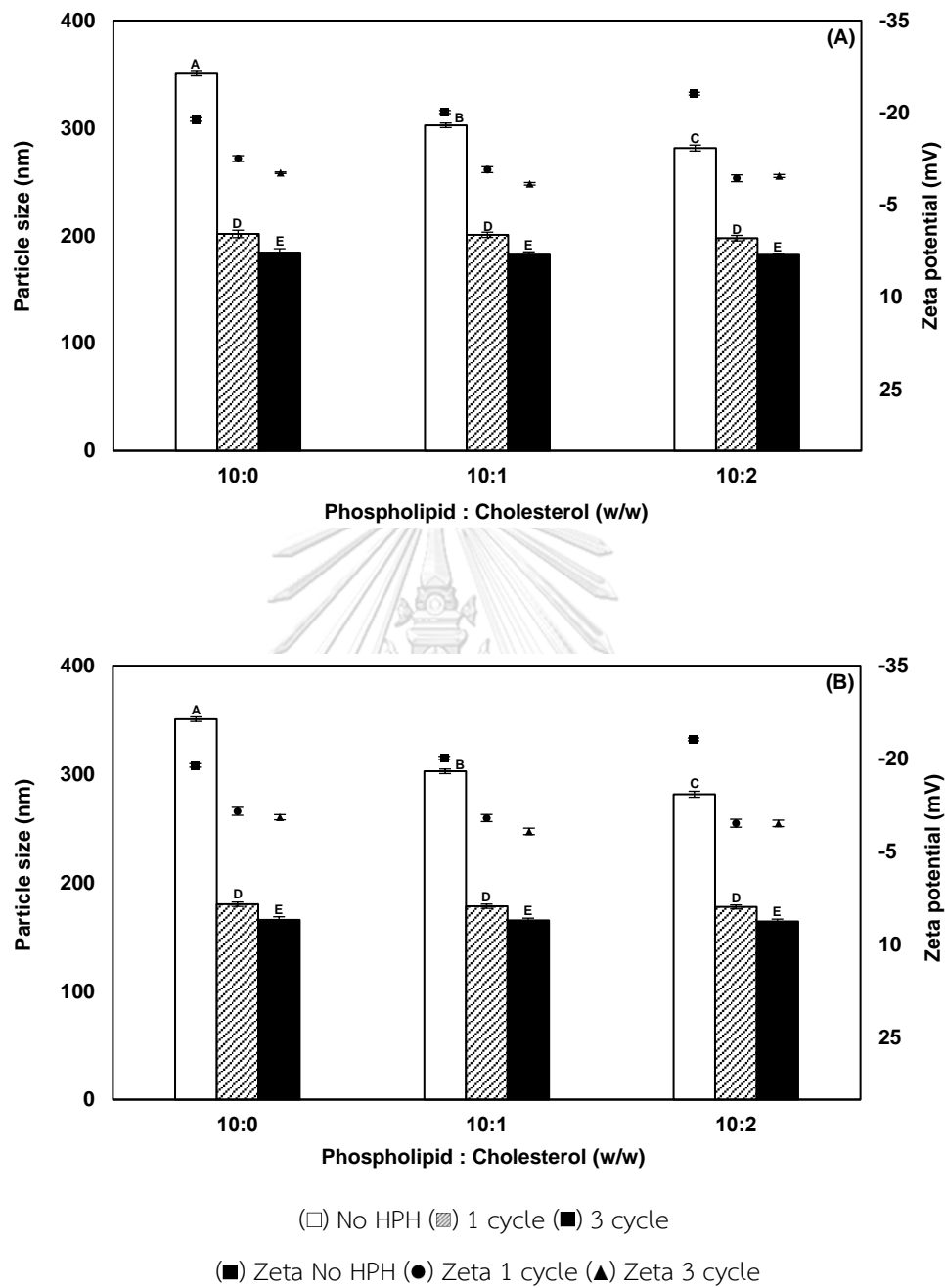
4.3.1 ผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อขนาดของอนุภาคลิโปโซม

จากผลการศึกษาในหัวข้อที่ 4.1 สมภาวะที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคลิโปโซม ได้แก่ ความดัน 500, 1000 บาร์ และจำนวนรอบ 1, 3 รอบ โดยจะศึกษาผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลที่ 10:0, 10:1 และ 10:2 โดยน้ำหนัก ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 27 และรูปที่ 28 พบว่า เมื่อนำอนุภาคผ่านเข้าเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงทำให้ขนาดของอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ หากพิจารณาขนาดของอนุภาคก่อนผ่านเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง พบว่า ที่สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลที่ 10:0, 10:1 และ 10:2 โดยน้ำหนัก มีขนาดของอนุภาคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเมื่อสัดส่วนของคลอเรสเตอรอลเพิ่มขึ้นอนุภาคลิโปโซมมีแนวโน้มของขนาดที่เล็กลง เนื่องจากคลอเรสเตอรอลเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างโซ่ของฟอสโฟลิพิด ทำให้อนุภาคของฟอสโฟลิพิดมีการจัดเรียงตัวกันแน่นขึ้น จึงส่งผลทำให้ขนาดของอนุภาคลิโปโซมเล็กลง (Kirby และคณะ 1980)^[40]



รูปที่ 27 ขนาดอนุภาคลิโปโซมที่สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคอเลสเตอรอล 10:0, 10:1 และ 10:2 โดยน้ำหนัก (A) ความดัน 500 บาร์ (B) ความดัน 1000 บาร์ (ที่ความเข้มข้นของลิพิดร้อยละ 2)

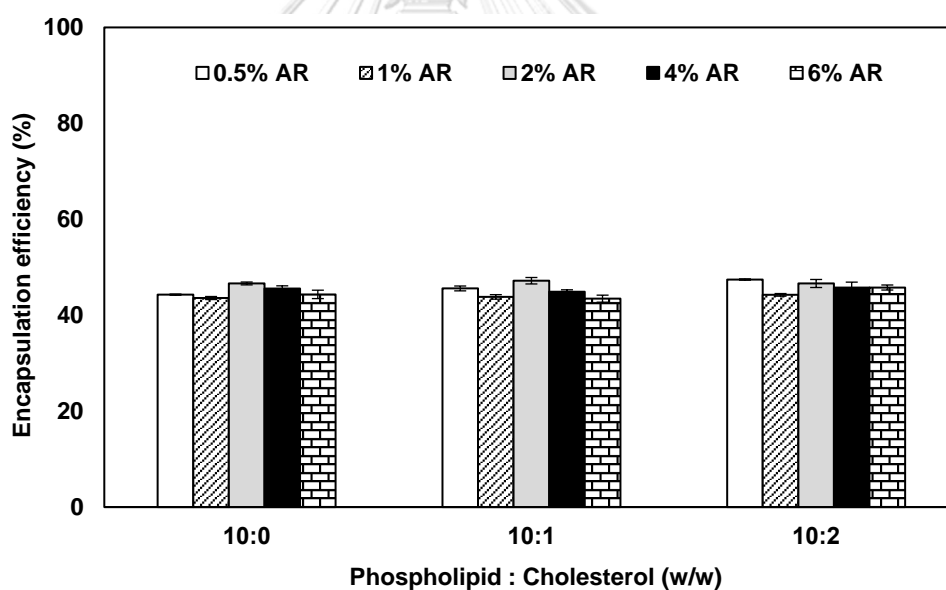
A, B, C, D, E ที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแต่ละแท่งกราฟมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 28 ขนาดอนุภาคลิโปโซมที่สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคอเลสเตอรอล 10:0, 10:1 และ 10:2 โดยน้ำหนัก (A) ความดัน 500 บาร์ (B) ความดัน 1000 บาร์ (ที่ความเข้มข้นของลิโปดร้อยละ 5)

A, B, C, D, E ที่มีอักษรกำกับค่าแตกต่างกันในแต่ละแท่งกราฟมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.3.2 ผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสาร จากผลการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของสารอาร์บูตินและสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูตินดังแสดงในรูปที่ 29 พบว่า สัดส่วนของคลอเรสเตอรอลและปริมาณความเข้มข้นของสารอาร์บูติน ไม่มีผลต่อความสามารถในการกักเก็บสาร โดยจะมีค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสารเฉลี่ยอยู่ที่ 45.2 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคดังแสดงในรูปที่ 30 พบว่า การเตรียมอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล มีการตกตะกอนเกิดขึ้นหลังจากการเตรียม 1 วัน แสดงว่าการเติมคลอเรสเตอรอลอาจมีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับอนุภาคลิโปโซมได้ ซึ่งจากงานวิจัยของ Liang และคณะ (2004)^[41] รายงานว่า การเติมคลอเรสเตอรอลจะช่วยเข้าไปแทรกระหว่างสายกรดไฮโดรคาร์บอนของฟอสโฟลิพิด ทำให้อนุภาคมีการเรียงตัวกันแน่นขึ้น เยื่อหุ้มลิโปโซมจึงมีความแข็งแรงมากขึ้น ส่งผลให้ความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมเพิ่มขึ้นด้วย



รูปที่ 29 ผลความเข้มข้นของสารอาร์บูตินและสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูติน (ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก)



รูปที่ 30 อนุภาคลิโปโซมปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอลที่เตรียมได้หลังจากผ่านไป 1 วัน ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ 2 (B) ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก



รูปที่ 31 อนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอลที่เตรียมได้หลังจากผ่านไป 3 วัน ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด (A) ร้อยละ 2 (B) ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก

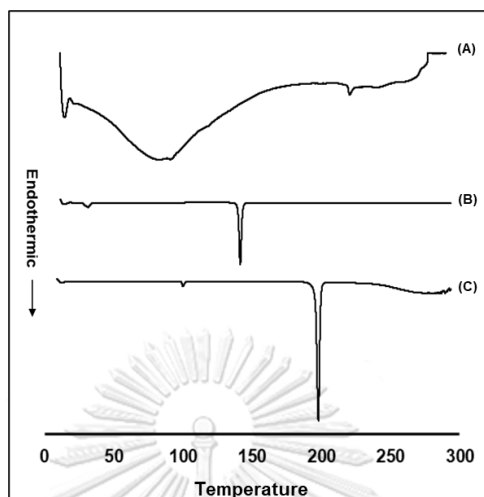
4.3.3 ผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อเสถียรภาพความคงตัว

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่อเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซม จากการวิเคราะห์ค่าการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimeter (DSC) โดยวิเคราะห์จากอุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสของโมเลกุลฟอสโฟลิพิด ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงตรงส่วนของโซ่ไฮโดรคาร์บอนของโมเลกุลฟอสโฟลิพิด^[44] จากรูปที่ 33 กราฟ (A) และรูปที่ 34 กราฟ (A) แสดงอุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสของอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล และอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล โดยมีค่าอุณหภูมิอยู่ที่ 110 องศาเซลเซียส และ 104 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งพบว่า อุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสของอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอลมีค่าที่สูงกว่า เนื่องมาจากการเติมคลอเรสเตอรอลจะช่วยเพิ่มปฏิสัมพันธ์ที่ดีของสารในผนังชั้นไขมันของโมเลกุลฟอสโฟลิพิด ทำให้โมเลกุลมีการจัดเรียงตัวกันแน่นขึ้นซึ่งช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวให้กับเยื่อหุ้มผนังของลิโปโซมได้

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 33 กราฟ (B) และรูปที่ 34 กราฟ (B) ซึ่งเป็นอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมสารอาร์บูติน พบว่า อุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสของทั้งสองกราฟมีค่าลดลง อาจเป็นเพราะอนุภาคลิโปโซมมีการกักเก็บสารอาร์บูตินไว้ภายในทำให้มีการเกิดปฏิสัมพันธ์กับผนังชั้นไขมันของฟอสโฟลิพิด ส่งผลให้อุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสของสารมีค่าลดลง ซึ่งจากงานวิจัยของ Rui-Guang Wu และคณะ (2012)^[45] รายงานว่า อุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสของสารลดลงเมื่อมีการเพิ่มสัดส่วนของปริมาณสารสำคัญที่นำมากักเก็บ แสดงให้เห็นว่า อนุภาคลิโปโซมมีการกักเก็บสารสำคัญไว้ภายในซึ่งจะทำให้สารมีปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลของฟอสโฟลิพิด ส่งผลให้อุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสมีค่าต่างไปจากเดิม

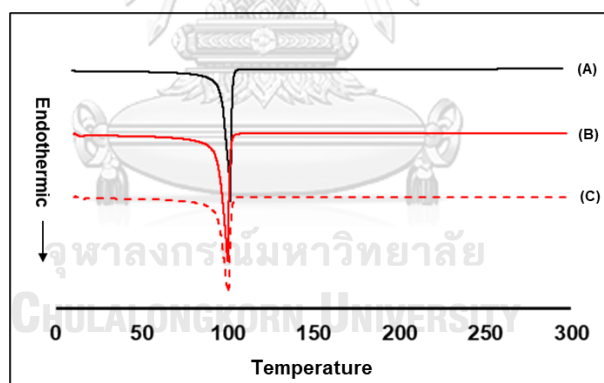
นอกจากนั้น หากพิจารณาถึงเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมในระยะเวลา 3 เดือน พบว่า อุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสของอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล (รูปที่ 34 กราฟ C) มีค่าเปลี่ยนไปจากเดิม (จาก 102 องศาเซลเซียส เป็น 107 องศาเซลเซียส) ในขณะที่อุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสของอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล (รูปที่ 33) ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องมาจากอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอลมีเสถียรภาพความคงตัวที่ไม่ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lingyun Zhao และคณะ (2007)^[24] ที่ได้นำเทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) มาศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์ของสารภายในโมเลกุลของอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมด้วยวิธี Thin film hydration จากงานวิจัยพบว่า อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอลมีการยับยั้งของ Endothermic peak โดยจะเปลี่ยนเฟสตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากสารกักเก็บถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคลิโปโซมเมื่อระยะเวลาผ่านไปเพียง 7 วัน ซึ่งต่างจากตัวอย่างที่มีการเติมคลอเรสเตอรอลลงไปผลของกราฟ Endothermic peak ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องมาจากโมเลกุลของคลอเรสเตอรอลจะช่วยเติมเต็มช่องว่างในผนังชั้นไขมัน

ของลิโปโซมทำให้ผนังของเยื่อหุ้มลิโปโซมมีความแข็งแรงมากขึ้น ดังนั้น การเติมคลอเรสเตอรอลสามารถช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวให้กับอนุภาคลิโปโซมได้ดีขึ้น



รูปที่ 32 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC)

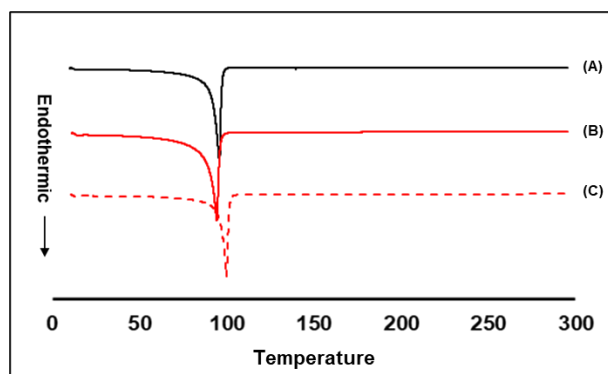
(A) ฟอสโฟลิพิด (B) คลอเรสเตอรอล (C) อาร์บูติน



รูปที่ 33 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง (DSC) ของอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล

(ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด และความเข้มข้นของอาร์บูติน ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก)

- (A) อนุภาคลิโปโซมปราศจากการเติมสารอาร์บูติน
- (B) อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินที่เตรียมได้จากวันแรก
- (C) อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินหลังจากผ่านไป 3 เดือน



รูปที่ 34 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง (DSC) ของอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล (ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด และความเข้มข้นของอาร์บูติน ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก)

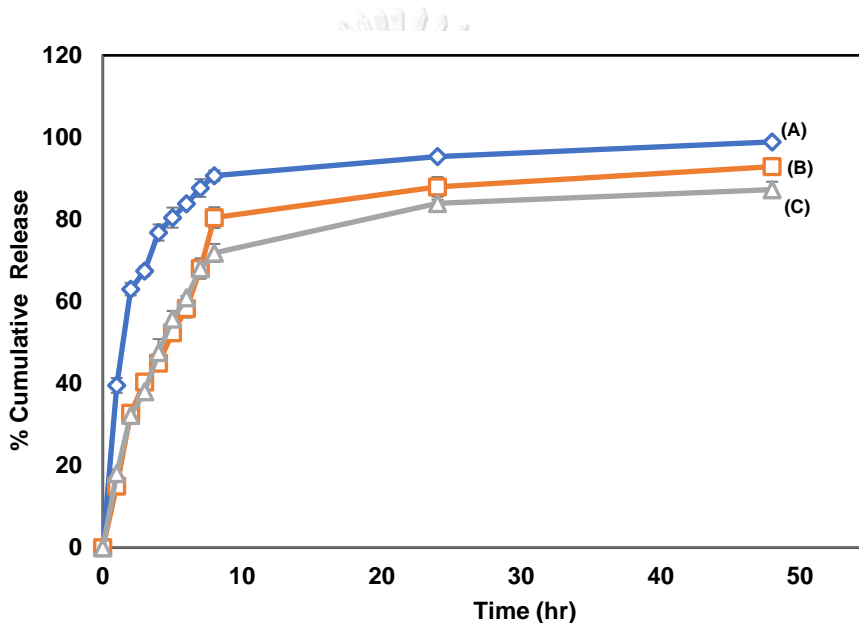
- (A) อนุภาคลิโปโซมปราศจากการเติมสารอาร์บูติน
- (B) อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินที่เตรียมได้จากวันแรก
- (C) อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินหลังจากผ่านไป 3 เดือน

4.3.4 ผลของสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลต่ออัตราการปลดปล่อยสาร

ในการศึกษาอัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูติน จะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Franz Diffusion Cell ซึ่งเป็นการศึกษาการแพร่ของสารผ่านเมมเบรน โดยใช้เมมเบรนที่มีขนาดของ Molecular weight cut off เท่ากับ 1000 ดาลตัน ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้จากความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก โดยใช้สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลที่ 10:0, 10:2 โดยน้ำหนัก และตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมที่มีการล้างอาร์บูตินอิสระ

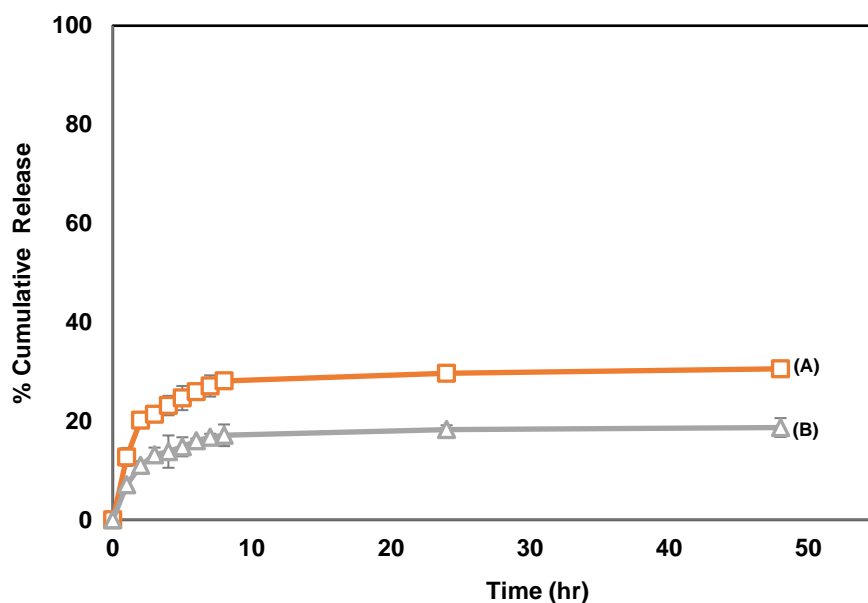
จากรูปที่ 35 แสดงปริมาณการสะสมของ (A) สารละลายอาร์บูติน (B) อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล และ (C) อนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล โดยผลการศึกษาพบว่า ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น ซึ่งหากเปรียบเทียบระหว่างสารละลายอาร์บูติน (กราฟ A) กับอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูติน (กราฟ B) ปริมาณการสะสมของสารละลายอาร์บูตินมีค่ามากกว่าในทุกช่วงเวลา แสดงให้เห็นว่า การกักเก็บสารอาร์บูตินในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมสามารถช่วยควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารได้ ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาปริมาณการสะสมระหว่างอนุภาคลิโปโซม (รูปที่ 35) กับอนุภาคลิโปโซมที่มีการล้างอาร์บูตินอิสระออก (รูปที่ 36) พบว่า ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโปโซมที่ไม่ได้ล้างอาร์บูตินอิสระออก (รูปที่ 35) มีค่ามากกว่า เนื่องมาจากเป็นปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินอิสระที่ไม่ถูกกักเก็บไว้ในอนุภาคลิโปโซม

การศึกษาสัดส่วนของคลอเรสเตอร์อลต่ออัตราการปลดปล่อยของสาร ดังแสดงในรูปที่ 34 และ รูปที่ 35 พบว่า ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินในอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอร์อล (รูปที่ 34 กราฟ B และ รูปที่ 35 กราฟ A) มีค่ามากกว่าอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอร์อล (รูปที่ 34 กราฟ C และ รูปที่ 35 กราฟ B) แสดงว่าการเติมคลอเรสเตอร์อลสามารถช่วยควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารได้ เนื่องจากโมเลกุลของคลอเรสเตอร์อลจะไปช่วยเติมเต็มช่องว่างระหว่างชั้นไขมันของฟอสโฟลิพิดให้มีการเรียงตัวกันแน่นขึ้น ซึ่งทำให้เยื่อหุ้มผนังของลิโปโซมมีความแข็งแรงและช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคให้ดีขึ้น (Liang และคณะ 2004)^[41]



รูปที่ 35 ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูติน

- (A) สารละลายอาร์บูติน
- (B) อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอร์อล
- (C) อนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอร์อล



รูปที่ 36 ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินในอนุภาคลิโพโซมที่มีการล้างอาร์บูตินอิสระ

(A) อนุภาคลิโพโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล

(B) อนุภาคลิโพโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล

กลไกการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินสามารถอธิบายด้วยการพิกกราฟแบบจำลองของ Higuchi ซึ่งเป็นแบบจำลองที่ใช้อธิบายการปลดปล่อยของสารสำคัญกับรากที่สองของเวลา โดยกลไกที่ใช้อธิบายอัตราการปลดปล่อยของสารสำคัญนั้นจะถูกควบคุมด้วยการแพร่ผ่าน^[46] ดังแสดงในสมการที่ 4.1

$$\text{Higuchi's equation } Q_t = k\sqrt{t}$$

เมื่อ Q_t คือ ปริมาณของสารที่ถูกปลดปล่อย ณ เวลา t

k คือ ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย

t คือ เวลา

สามารถหาค่าตัวแปรในสมการ Higuchi ได้จากการวาดกราฟระหว่างแกน y คือ ปริมาณของสารที่ถูกปลดปล่อย ณ เวลา t และ แกน x คือ รากที่สองของเวลา โดยค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยของสาร (k) คือ ค่าความชันของกราฟ

ตารางที่ 5 ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย (k) ของสารอาร์บูติน

| สารตัวอย่าง | k (10 ⁻² /hr.) | R ² |
|---|---------------------------|----------------|
| สารละลายอาร์บูติน (a) | 1240.1 | 0.935 |
| อนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล (b) | 1081.9 | 0.969 |
| อนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล หลังล้างอาร์บูตินอิสระ (c) | 120.8 | 0.954 |
| อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากเติมคลอเรสเตอรอล (d) | 1194.8 | 0.924 |
| อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล หลังล้างอาร์บูตินอิสระ (e) | 168.2 | 0.942 |

จากตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินระหว่างสารละลายอาร์บูติน (k_a) กับ อนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล (k_b) และ ปราศจากเติมคลอเรสเตอรอล (k_d) จะเห็นได้ว่าค่าของ $k_b < k_a$ และ $k_d < k_a$ ซึ่งสารอาร์บูตินที่ถูกกักเก็บไว้ในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมมีค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยน้อยกว่าตัวอย่างที่เป็นสารละลายอาร์บูติน แสดงให้เห็นว่า การกักเก็บสารสำคัญไว้ในอนุภาคลิโปโซมสามารถช่วยควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารสำคัญได้

เมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยระหว่างอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล (k_b) กับ อนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล หลังล้างอาร์บูตินอิสระ (k_c) และ อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากเติมคลอเรสเตอรอล (k_d) กับ อนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล หลังล้างอาร์บูตินอิสระ (k_e) จะเห็นได้ว่า ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยของ $k_c < k_b$ และ $k_e < k_d$ ซึ่งอนุภาคลิโปโซมที่ไม่มีการล้างอาร์บูตินอิสระออก มีค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยมากกว่าอนุภาคลิโปโซมที่มีการล้างอาร์บูตินอิสระออก เนื่องมาจากเป็นปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินอิสระที่ไม่ถูกกักเก็บไว้ในอนุภาคลิโปโซม นอกจากนั้น เมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยระหว่างอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล (k_b, k_c) กับอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล (k_d, k_e) จะเห็นได้ว่า ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยของ $k_b < k_d$ และ $k_c < k_e$ ซึ่งอนุภาคลิโปโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล มีค่าคงที่อัตราการปลดปล่อยน้อยกว่าอนุภาคลิโปโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล แสดงให้เห็นว่า คลอเรสเตอรอลสามารถช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคให้ดีขึ้นและช่วยควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารสำคัญได้

4.4 การศึกษาเสถียรภาพความคงตัวของสถานะอุณหภูมิในการเก็บรักษาอนุภาคลิโปโซม

ในงานวิจัยนี้ได้นำตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้ไปทดสอบเสถียรภาพความคงตัว ที่สถานะอุณหภูมิ 4, 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน จากนั้นนำมาประเมินคุณลักษณะต่างๆ ได้แก่ ขนาดของอนุภาค ค่าประจุบนพื้นผิว และค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร โดยสถานะที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างคือ ที่ความดัน 500, 1000 บาร์ จำนวนรอบ 1, 3 รอบ ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2, 5 โดยน้ำหนัก และสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล 10:1, 10:2 โดยน้ำหนัก

4.4.1 ผลของความดันและจำนวนรอบ

สถานะที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมเพื่อทดสอบเสถียรภาพความคงตัว คือ ที่ความดัน 500, 1000 บาร์ และจำนวนรอบ 1, 3 รอบ โดยจากผลการทดลองตลอดระยะเวลา 3 เดือน พบว่า การเตรียมตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมจากสถานะความดัน 1000 บาร์ และจำนวนรอบ 3 รอบ มีเสถียรภาพความคงตัวที่ดีกว่าการเตรียมตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมจากสถานะความดัน 500 บาร์ และจำนวนรอบ 1 รอบ เนื่องมาจากการเตรียมอนุภาคที่สถานะความดันต่ำและจำนวนรอบน้อยของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ทำให้อนุภาคลิโปโซมมีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่แตกกันส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันเป็นตะกอนได้ง่าย (Selen Guner และคณะ 2017)^[4] ดังนั้น จากผลการทดลอง (รูปที่ 37 ถึง 39) แสดงให้เห็นว่าการเตรียมตัวอย่างอนุภาคลิโปโซมจากสถานะความดัน 1000 บาร์ และจำนวนรอบ 3 รอบ ทำให้มีเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซมที่ดี ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้ในทุกสถานะอุณหภูมิ (4, 30 และ 40 องศาเซลเซียส)

4.4.2 ผลความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดและสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล

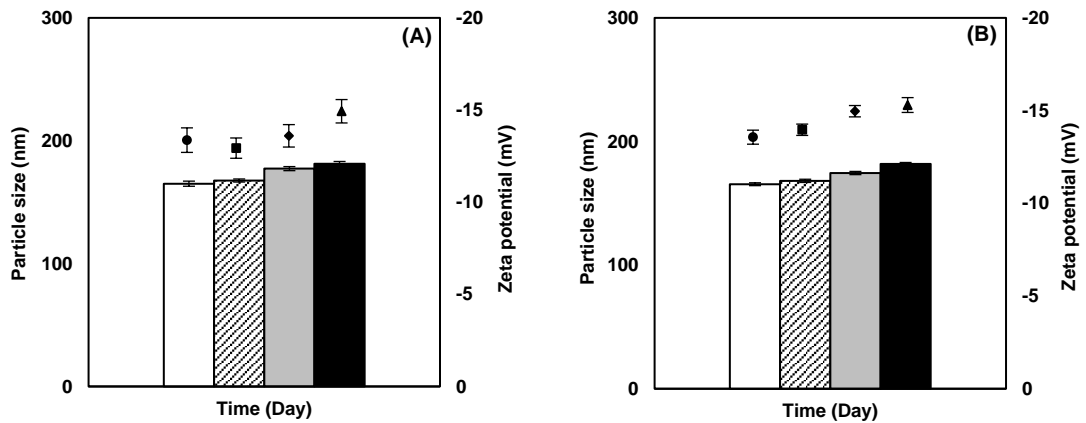
จากรูปที่ 37 ถึง 39 แสดงค่าขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมของความเข้มข้นลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ไม่เกิดการตกตะกอนหรือเกิดการแยกชั้นขึ้นภายในระยะเวลา 3 เดือน พบว่า ขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากวันแรกที่เตรียมได้ ซึ่งที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มีเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคที่ดีกว่าความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เนื่องจากที่ความเข้มข้นของลิพิด ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก มีการตกตะกอนเกิดขึ้นหลังจากผ่านไป 2 เดือน นอกจากนั้น เมื่อพิจารณาสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล พบว่า สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลที่ 10:2 ให้เสถียรภาพความคงตัวที่ดีกว่าสัดส่วน 10:1 เนื่องจากสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลที่ 10:2 สามารถเก็บรักษาได้ในทุกสถานะอุณหภูมิ (4, 30 และ 40 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3

เดือน โดยไม่มีการตกตะกอนหรือการแยกชั้นของอนุภาคเกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่า สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอลที่เหมาะสมสามารถช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวให้กับอนุภาคลิโปโซมได้ (Sulkowski และคณะ 2005)^[39]

4.4.3 ผลของความสามารถในการกักเก็บสารอาร์บูติน

เมื่อพิจารณาค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร (Entrapment Efficiency) ที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 40 พบว่า ค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บสารลดลงเมื่ออุณหภูมิในการเก็บรักษาสูงขึ้น เนื่องมาจากอุณหภูมิที่สูงทำให้เยื่อหุ้มผนังของลิโปโซมเกิดการรั่วไหลของสารที่กักเก็บส่งผลให้เสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลดลง จากงานวิจัยของ Sarah Brown และคณะ (2012)^[43] รายงานว่า ลิโปโซมมีความไวต่ออุณหภูมิที่สูง โดยจะเกิดการพองตัวจนทำให้เยื่อหุ้มผนังแตกออกจากกัน ซึ่งผลการทดลองพบว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เกิดการรั่วไหลของอนุภาคมากกว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สภาวะอุณหภูมิต่ำจึงเหมาะแก่การเก็บรักษาอนุภาคลิโปโซมได้ดีกว่าที่สภาวะอุณหภูมิสูง

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง คือ ที่ความดัน 1000 บาร์ จำนวน 3 รอบ โดยใช้ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก สัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเตอรอล 10:2 โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิในการเก็บรักษาอนุภาคลิโปโซมอยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส



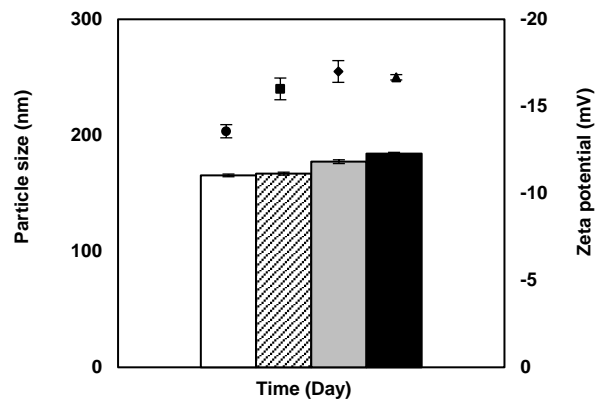
(□) Size Day 0 (▨) Size Day 30 (▩) Size Day 60 (■) Size Day 90

(●) Zeta Day 0 (■) Zeta Day 30 (◆) Zeta Day 60 (▲) Zeta Day 90

รูปที่ 37 ขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมที่ความเข้มข้นลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 เดือน

(A) สัดส่วนฟอสโฟลิพิดกับคอเลสเตอรอล 10:1

(B) สัดส่วนฟอสโฟลิพิดกับคอเลสเตอรอล 10:2

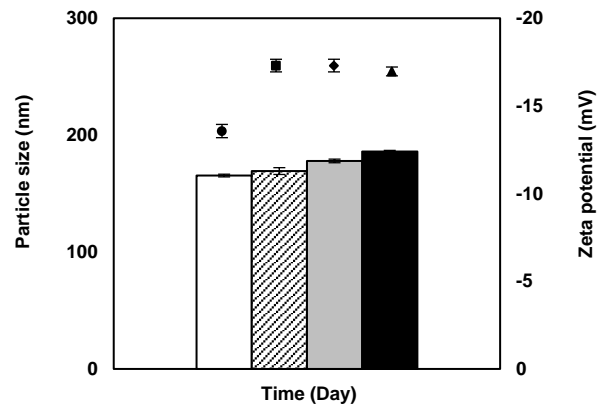


(□) Size Day 0 (▨) Size Day 30 (▩) Size Day 60 (■) Size Day 90

(●) Zeta Day 0 (■) Zeta Day 30 (◆) Zeta Day 60 (▲) Zeta Day 90

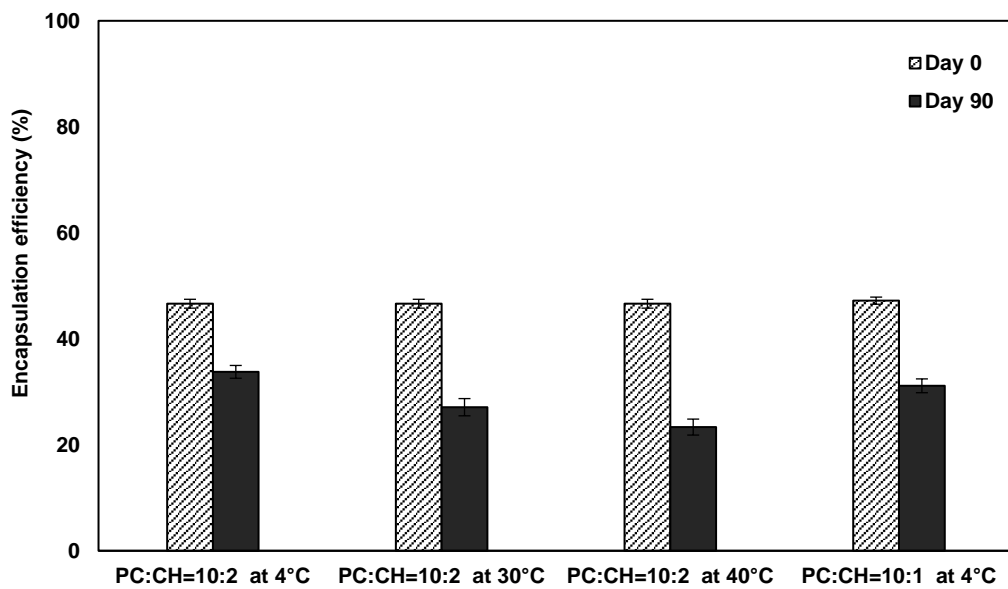
รูปที่ 38 ขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมที่ความเข้มข้นลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 เดือน

(สัดส่วนฟอสโฟลิพิดกับคอเลสเตอรอล 10:2)



(□) Size Day 0 (▨) Size Day 30 (▩) Size Day 60 (■) Size Day 90
 (●) Zeta Day 0 (■) Zeta Day 30 (◆) Zeta Day 60 (▲) Zeta Day 90

รูปที่ 39 ขนาดและประจุพื้นผิวของอนุภาคลิโปโซมที่ความเข้มข้นลิพิด ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่สภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 เดือน (สัดส่วนฟอสโฟลิพิดกับคอเลสเตอรอล 10:2)



รูปที่ 40 ค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บสารอาร์บูตินที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ ในระยะเวลา 3 เดือน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมและวิเคราะห์คุณลักษณะของอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง (High pressure homogenizer) ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษา ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเทอรอล อัตราการปลดปล่อยของสารอาร์บูตินและเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโปโซม รวมไปถึง สภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ซึ่งได้แก่ ความดันและจำนวนรอบ ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคลิโปโซมเพื่อกักเก็บสารอาร์บูติน จากผลการทดลอง พบว่า การเตรียมอนุภาคลิโปโซมที่กักเก็บสารอาร์บูตินด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง ทำให้ได้ลิโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Small unilamellar vesicles, SUV) ซึ่งมีขนาดของอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความดันและจำนวนรอบของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง โดยมีขนาดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 150 ถึง 200 นาโนเมตร

ผลการทดลองในส่วนของคุณสมบัติในการกักเก็บสารอาร์บูติน (Entrapment Efficiency) พบว่า ค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสารเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโดยรวมของลิพิด ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพการกักเก็บสารเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 74.2 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม อนุภาคลิโปโซมที่เตรียมได้จากความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดที่สูงและปราศจากการเติมคลอเรสเทอรอลจะส่งผลให้มีเสถียรภาพความคงตัวที่ต่ำ นอกจากนั้น ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการกักเก็บสารสำคัญไว้ในรูปแบบของอนุภาคลิโปโซมและมีการเติมสารคลอเรสเทอรอลลงไปจะสามารถช่วยควบคุมอัตราการปลดปล่อยของสารสำคัญได้ รวมไปถึงช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวให้กับอนุภาคลิโปโซมได้อีกด้วย ดังนั้น จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สภาวะของเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูงและสัดส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเทอรอลที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคลิโปโซมสำหรับกักเก็บสารอาร์บูติน คือ ความดัน 1000 บาร์ จำนวน 3 รอบ ที่ความเข้มข้นโดยรวมของลิพิดร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนระหว่างฟอสโฟลิพิดกับคลอเรสเทอรอล 10:2 โดยน้ำหนัก และสภาวะอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

5.2 ข้อเสนอแนะ

- ศึกษาวิธีการเตรียมอนุภาคลิโพโซมแบบอื่นที่ช่วยทำให้มีความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญมากขึ้น
- ศึกษาชนิดของสารอื่นที่ช่วยเพิ่มเสถียรภาพความคงตัวของอนุภาคลิโพโซม
- ศึกษาชนิดของสารสำคัญอื่นที่นำมากักเก็บในอนุภาคลิโพโซมที่เตรียมได้จากเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แรงดันสูง



บรรณานุกรม

1. Akbarzadeh, A., et al., Liposome: classification, preparation, and applications. 2013. 8(1): p. 102.
2. Ahmed, K.S., et al., Liposome: Composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. 2019. 27(7): p. 742-761.
3. Pradhan, B., et al., Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application. 2015. 3(3): p. 01-08.
4. Guner, S., et al., Food grade liposome systems: Effect of solvent, homogenization types and storage conditions on oxidative and physical stability. 2017. 513: p. 468-478.
5. Beltrán, J.D., et al., Effect of homogenization methods on the physical stability of nutrition grade nanoliposomes used for encapsulating high oleic palm oil. 2020. 118: p. 108801.
6. Couteau, C. and L.J.C. Coiffard, Overview of skin whitening agents: Drugs and cosmetic products. 2016. 3(3): p. 27.
7. Progr, N.T.P.J.N.T., Chemical information review document for arbutin [CAS No. 497-76-7] and extracts from *Arctostaphylos uva-ursi*. 2006: p. 1-38.
8. Pentapharm benefiting society through science. ALPHA-ARBUTIN.
9. Wen, A.-H., M.-K. Choi, and D.-D.J.A.o.p.r. Kim, Formulation of liposome for topical delivery of arbutin. 2006. 29(12): p. 1187.
10. Leelapornpisid, P., et al., Application of chitosan for preparation of arbutin nanoparticles as skin whitening. 2010. 20(3): p. 101-105.
11. Li, Y., et al., Structural characterization of inclusion complex of arbutin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. 2016. 15(10): p. 2227-2233.

12. ศุภวรรณ รุจีไพโรจน์, การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของอาร์บูตินและเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2562.
13. Mehta, P.P., et al., Recent advances in inhalable liposomes for treatment of pulmonary diseases: Concept to clinical stance. 2020. 56: p. 101509.
14. Lee, V.H.J.J.o.C.R., Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, Volume 1 and 2-Edith Mathiowitz, editor. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999, 1057 pp. 2001. 3(71): p. 353-354.
15. F. Gibbs, S.K., Intez Alli, Catherine N. Mulligan, Encapsulation in the food industry: a review. International journal of food sciences and nutrition. 1999. 50(3): p. 213-224.
16. Young, S., X. Sarda, and M.J.J.o.D.S. Rosenberg, Microencapsulating properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. 1993. 76(10): p. 2868-2877.
17. Pathak, Y. and D. Thassu, Drug delivery nanoparticles formulation and characterization. Vol. 191. 2016: CRC Press.
18. Amin, S.G., D.A. Shah, and R.H. Dave, Formulation and evaluation of liposomes of fenofibrate prepared by thin film hydration technique. 2017, Long Island University, The Brooklyn Center.
19. อรัญญา มโนสร้อย และ จีระเดช มโนสร้อย, ไลโปโซมทางยาและเครื่องสำอาง, 2545, กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
20. อัมพล ไมตรีเวช, ณรงค์ สาริสุต, ดวงมณี มณีโรจน์ภักดี, สุ วิฑูรย์สฤกษ์ศิลป์ และ โกศล แซ่ตั้ง, การพัฒนาอนุภาคนาโนและระบบนำส่ง ตอนที่ 1. ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

21. พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, คู่มือประกอบสื่อการสอน วิชาชีววิทยาเรื่อง Triacylglycerol และ phospholipid. สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน(สพฐ.) และ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2555..
22. Andhale, V., et al., Liposome: an emerging tool in drug carrier system. 2016. 8(1): p. 10982-11011.
23. Chen, C. and C.P.J.B.e.B.A.-B. Tripp, A comparison of the behavior of cholesterol, 7-dehydrocholesterol and ergosterol in phospholipid membranes. 2012. 1818(7): p. 1673-1681.
24. Zhao, L., et al., DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. 2007. 338(1-2): p. 258-266.
25. Yang, J., et al., Direct coagulation casting of alumina suspension via controlled release of high valence counterions from thermo sensitive liposomes. 2013. 96(1): p. 62-67.
26. Duangjit, S.J.I.J.o.P.S., Effect of cholesterol and oleic acid on physicochemical properties and stability of liposomes. 2015. 11(5): p. 1-13.
27. Fielding, R.M.J.C.p., Liposomal drug delivery. 1991. 21(3): p. 155-164.
28. Vemuri, S. and C.J.P.A.H. Rhodes, Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. 1995. 70(2): p. 95-111.
29. สมลักษณ์ คงเมือง, มาลัย สติรพันธุ์ และ อุทัย โสธนะพันธุ์, ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลูและความคงตัวของไลโปโซม. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2550
30. Walde, P. and S.J.B.e. Ichikawa, Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. 2001. 18(4): p. 143-177.

31. รัชชัย แพขมัต, ระบบการควบคุมการปลดปล่อยและนำส่งยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. นครปฐม: ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2547.
32. Peres, L.B., et al., Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. 2016. 140: p. 317-323.
33. Wang, T., et al., Preparation of submicron unilamellar liposomes by freeze-drying double emulsions. 2006. 1758(2): p. 222-231.
34. Thompson, A. and H.J.J.o.D.S. Singh, Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. 2006. 89(2): p. 410-419.
35. Edwards, K.A. and A.J.J.T. Baeumner, Analysis of liposomes. 2006. 68(5): p. 1432-1441.
36. <https://www.waters.com>
37. <https://www.particlesciences.com>
38. <http://www.strec.chula.ac.th>
39. Sułkowski, W., et al., The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. Journal of molecular structure, 2005. 744: p. 737-747.
40. Kirby, C., J. Clarke, and G. Gregoriadis, Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. Biochemical Journal, 1980. 186(2): p. 591-598.
41. Liang, X., G. Mao, and K.S. Ng, Mechanical properties, and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. Journal of colloid and interface science, 2004. 278(1): p. 53-62.
42. Sebaaly, C., et al., Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. Food chemistry, 2015. 178: p. 52-62.

43. Brown, S. and D.R. Khan, The treatment of breast cancer using liposome technology. *Journal of drug delivery*, 2012. 2012.

44. Demetzos, C., Differential scanning calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *Journal of liposome research*, 2008. 18(3): p. 159-173.

45. Wu, R.-G., et al., A DSC study of paeonol-encapsulated liposomes, comparison the effect of cholesterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior of liposomes. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 2012. 109(1): p. 311-316.

46. ธวัชชัย ทิพย์ทินกร, สิทธิพงษ์ สุวพรศิลป์, กิ่งตฤทัย บุญทรงธรรม, การพัฒนาตำรับยาเม็ดไดโคล พีแนคโซเดียมรูปแบบปลดปล่อยแบบทยอยที่เตรียมจากยูดราจิตเอ็นอีสี่สี่บีดี. *HCU Journal*, 2017. 21(41): p. 41-52.

47. OHSAWA, T., H. MIURA, and K. HARADA, Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by the freeze-thawing method. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 1985. 33(9): p. 3945-3952.

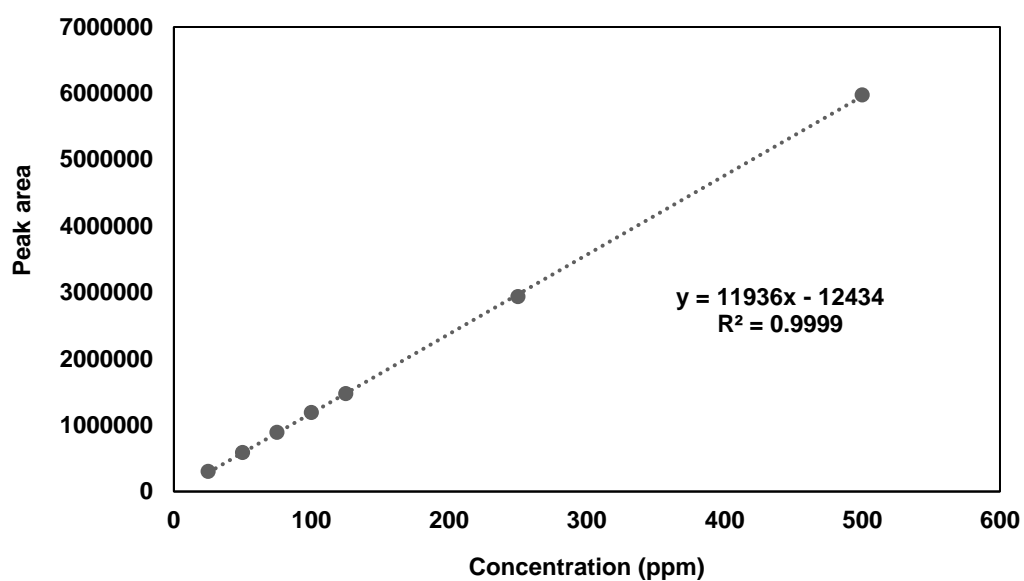
ภาคผนวก ก. วิธีการคำนวณ

1. การคำนวณหาความสามารถในการกักเก็บสาร (Entrapment Efficiency)

สมการการคำนวณหาประสิทธิภาพการกักเก็บ (%EE)

$$\text{Entrapment Efficiency} = \frac{[\text{Arbutin(ppm)}]_{\text{total}} - [\text{Arbutin(ppm)}]_{\text{free}}}{[\text{Arbutin(ppm)}]_{\text{total}}} \times 100$$

ความเข้มข้นของสารอาร์บูติน สามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดังแสดงในรูปที่ 38



รูปที่ 41 กราฟมาตรฐานของสารอาร์บูติน (Calibration curve)

2. การคำนวณหาปริมาณการปลดปล่อยของสารอาร์บูติน

ตารางที่ 6 วิธีการคำนวณปริมาณการสะสมของสาร

| Time (hr.) | Area (1) | Conc. (ppm) (2) | Amount in sampling vol. (ug) (3) | Cumulative in sampling vol. (ug) (4) | Amount in receptor cell (ug) (5) | Cumulative amount release (ug) (6) | % Cumulative Release (7) |
|------------|----------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 2964732 | 249.43 | 124.71 | 124.71 | 3491.98 | 3491.98 | 37.98 |
| 2 | 4920837 | 413.31 | 206.66 | 331.37 | 5786.34 | 5911.06 | 64.29 |
| 3 | 4893318 | 411.00 | 205.50 | 536.87 | 5754.07 | 6085.43 | 66.19 |
| 4 | 5486629 | 460.71 | 230.36 | 767.23 | 6449.97 | 6986.84 | 76.00 |
| 5 | 5699113 | 478.51 | 239.26 | 1006.48 | 6699.20 | 7466.43 | 81.21 |
| 6 | 5663804 | 475.56 | 237.78 | 1244.26 | 6657.79 | 7664.27 | 83.36 |
| 7 | 5964935 | 500.78 | 250.39 | 1494.66 | 7010.99 | 8255.25 | 89.79 |
| 8 | 5938118 | 498.54 | 249.27 | 1743.92 | 6979.53 | 8474.19 | 92.17 |
| 24 | 6012561 | 504.78 | 252.39 | 1996.31 | 7066.85 | 8810.77 | 95.84 |
| 48 | 6043671 | 507.38 | 253.69 | 2250.00 | 7103.34 | 9099.65 | 98.98 |

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. ความเข้มข้นของสารอาร์บูติน (2) คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดังแสดงในรูปที่ 38

2. ปริมาณของสารอาร์บูตินที่ถูกดึงออกไป (Amount in sampling vol.) (3) หน่วยเป็น ไมโครกรัม เช่น ความเข้มข้นสารของอาร์บูติน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (2) × ปริมาตรสารที่ดึงออกไป (มิลลิลิตร)

$$249.43 \times 0.5 = 124.71 \text{ ไมโครกรัม}$$

3. ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินตามเวลา (Cumulative in sampling vol.) (4) หน่วยเป็น ไมโครกรัม เป็นการที่นำค่าปริมาณของสารอาร์บูตินที่ถูกดึงออกไป (Amount in sampling vol.) (3) มารวมกันตามเวลา เช่น ที่ชั่วโมงที่เวลา 3 ชั่วโมง คือ การนำค่าปริมาณของสารอาร์บูตินที่ถูกดึงออกไป ของชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 มารวมกัน ดังแสดงตามตารางที่ 6

$$124.71 (1\text{ ชั่วโมง}) + 206.66 (2\text{ ชั่วโมง}) + 205.50 (3\text{ ชั่วโมง}) = 536.87 \text{ ไมโครกรัม}$$

4. ปริมาณของสารอาร์บูตินที่อยู่ภายในเครื่อง (Amount in receptor cell) (5) หน่วยเป็น ไมโครกรัม โดยที่เครื่องมีขนาด เท่ากับ 14 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการคำนวณความเข้มข้นของสารย้อนกลับ เช่น ความเข้มข้นของสารอาร์บูติน (2) \times ปริมาตรของเครื่อง (มิลลิลิตร)

$$249.43 \times 14 = 3491.98 \text{ ไมโครกรัม}$$

5. ปริมาณการปลดปล่อยสะสมของสารอาร์บูติน (Cumulative amount release) (6) หน่วยเป็น ไมโครกรัม คือ ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินตามเวลา (Cumulative in sampling vol.) (4) ของเวลาก่อนหน้า + ปริมาณของสารอาร์บูตินที่อยู่ภายในเครื่อง (Amount in receptor cell) (5) ของเวลาที่เรากำลังคำนวณ

เช่น ที่ชั่วโมงที่ 3 คือการนำค่า ปริมาณการสะสมของสารอาร์บูตินตามเวลา (Cumulative in sampling vol.) ของชั่วโมงที่ 2 มารวมกับ ปริมาณของสารอาร์บูตินที่อยู่ภายในเครื่อง (Amount in receptor cell) ของชั่วโมงที่ 3

$$331.37 (2 \text{ ชั่วโมง}) + 5754.07 (3 \text{ ชั่วโมง}) = 6085.43 \text{ ไมโครกรัม}$$

6. ปริมาณการแพร่สะสมของสาร (% Cumulative release) (7) คือ ปริมาณการปลดปล่อยสะสมของสารอาร์บูติน (Cumulative amount release) (6) ส่วนด้วยปริมาณสารอาร์บูตินทั้งหมด $\times 100$

$$(9099.65 / 9193.67) \times 100 = 98.98 \%$$

ภาคผนวก ข. ข้อมูลจากการทดลอง

1. ตารางการคำนวณปริมาณการปลดปล่อยของสาร

ตารางที่ 7 ปริมาณการสะสมของสารละลายอาร์บูติน

| Time (hr.) | Area (1) | Conc. (ppm) (2) | Amount in sampling vol. (ug) (3) | Cumulative in sampling vol. (ug) (4) | Amount in receptor cell (ug) (5) | Cumulative amount release (ug) (6) | % Cumulative Release (7) |
|------------|----------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 2964732 | 249.43 | 124.71 | 124.71 | 3491.98 | 3491.98 | 37.98 |
| 2 | 4920837 | 413.31 | 206.66 | 331.37 | 5786.34 | 5911.06 | 64.29 |
| 3 | 4893318 | 411.00 | 205.50 | 536.87 | 5754.07 | 6085.43 | 66.19 |
| 4 | 5486629 | 460.71 | 230.36 | 767.23 | 6449.97 | 6986.84 | 76.00 |
| 5 | 5699113 | 478.51 | 239.26 | 1006.48 | 6699.20 | 7466.43 | 81.21 |
| 6 | 5663804 | 475.56 | 237.78 | 1244.26 | 6657.79 | 7664.27 | 83.36 |
| 7 | 5964935 | 500.78 | 250.39 | 1494.66 | 7010.99 | 8255.25 | 89.79 |
| 8 | 5938118 | 498.54 | 249.27 | 1743.92 | 6979.53 | 8474.19 | 92.17 |
| 24 | 6012561 | 504.78 | 252.39 | 1996.31 | 7066.85 | 8810.77 | 95.84 |
| 48 | 6043671 | 507.38 | 253.69 | 2250.00 | 7103.34 | 9099.65 | 98.98 |

ตารางที่ 8 ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโพโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล

| Time (hr.) | Area (1) | Conc. (ppm) (2) | Amount in sampling vol. (ug) (3) | Cumulative in sampling vol. (ug) (4) | Amount in receptor cell (ug) (5) | Cumulative amount release (ug) (6) | % Cumulative Release (7) |
|------------|----------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 1141738 | 96.70 | 48.35 | 48.35 | 1353.75 | 1353.75 | 14.94 |
| 2 | 2597157 | 218.63 | 109.32 | 157.66 | 3060.85 | 3109.20 | 34.32 |
| 3 | 3112446 | 261.80 | 130.90 | 288.57 | 3665.24 | 3822.91 | 42.20 |
| 4 | 3220711 | 270.87 | 135.44 | 424.00 | 3792.23 | 4080.79 | 45.04 |
| 5 | 3740859 | 314.45 | 157.23 | 581.23 | 4402.32 | 4826.32 | 53.27 |
| 6 | 3988933 | 335.24 | 167.62 | 748.85 | 4693.29 | 5274.52 | 58.22 |
| 7 | 4597386 | 386.21 | 193.11 | 941.95 | 5406.96 | 6155.81 | 67.95 |
| 8 | 5467378 | 459.10 | 229.55 | 1171.50 | 6427.39 | 7369.35 | 81.34 |
| 24 | 5972513 | 501.42 | 250.71 | 1422.21 | 7019.88 | 8191.38 | 90.42 |
| 48 | 5906279 | 495.87 | 247.94 | 1670.15 | 6942.19 | 8364.40 | 92.33 |



ตารางที่ 9 ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโพอโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอร์อล

| Time (hr.) | Area (1) | Conc. (ppm) (2) | Amount in sampling vol. (ug) (3) | Cumulative in sampling vol. (ug) (4) | Amount in receptor cell (ug) (5) | Cumulative amount release (ug) (6) | % Cumulative Release (7) |
|------------|----------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 1460712 | 123.42 | 61.71 | 61.71 | 1727.89 | 1727.89 | 19.19 |
| 2 | 2487891 | 209.48 | 104.74 | 166.45 | 2932.69 | 2994.40 | 33.26 |
| 3 | 2875422 | 241.95 | 120.97 | 287.42 | 3387.23 | 3553.68 | 39.47 |
| 4 | 3505200 | 294.71 | 147.35 | 434.78 | 4125.91 | 4413.33 | 49.02 |
| 5 | 3977009 | 334.24 | 167.12 | 601.89 | 4679.31 | 5114.08 | 56.80 |
| 6 | 4187767 | 351.89 | 175.95 | 777.84 | 4926.51 | 5528.40 | 61.40 |
| 7 | 4545779 | 381.89 | 190.94 | 968.78 | 5346.43 | 6124.27 | 68.02 |
| 8 | 4521432 | 379.85 | 189.92 | 1158.71 | 5317.87 | 6286.66 | 69.82 |
| 24 | 5486929 | 460.74 | 230.37 | 1389.08 | 6450.33 | 7609.03 | 84.51 |
| 48 | 5342321 | 448.62 | 224.31 | 1613.39 | 6280.71 | 7669.79 | 85.18 |



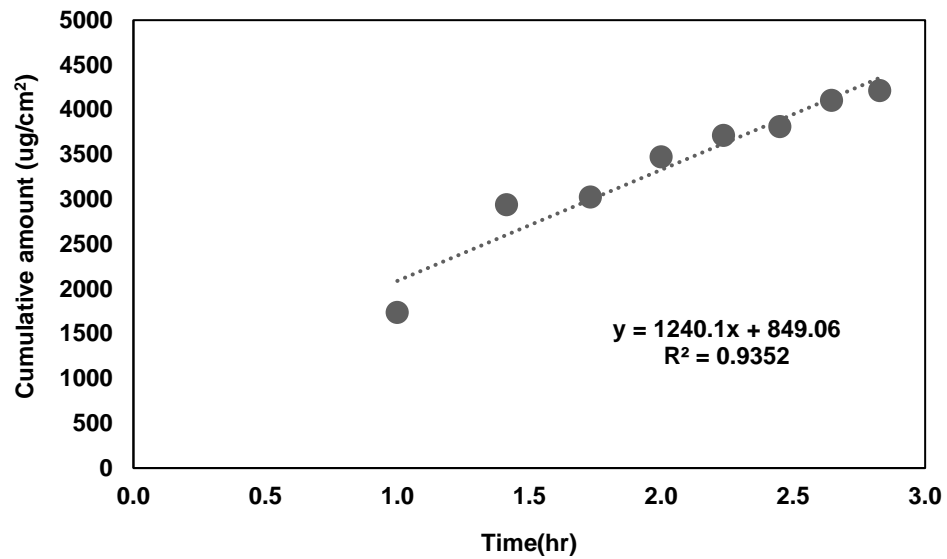
ตารางที่ 10 ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโพโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล (หลังล้างอาร์บูตินอิสระ)

| Time (hr.) | Area (1) | Conc. (ppm) (2) | Amount in sampling vol. (ug) (3) | Cumulative in sampling vol. (ug) (4) | Amount in receptor cell (ug) (5) | Cumulative amount release (ug) (6) | % Cumulative Release (7) |
|------------|----------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 462340 | 39.78 | 19.89 | 19.89 | 556.87 | 556.87 | 12.62 |
| 2 | 708308 | 60.38 | 30.19 | 50.08 | 845.37 | 865.26 | 19.61 |
| 3 | 745595 | 63.51 | 31.75 | 81.83 | 889.11 | 939.19 | 21.28 |
| 4 | 786255 | 66.91 | 33.46 | 115.29 | 936.80 | 1018.63 | 23.08 |
| 5 | 808154 | 68.75 | 34.37 | 149.67 | 962.49 | 1077.78 | 24.42 |
| 6 | 843983 | 71.75 | 35.88 | 185.54 | 1004.51 | 1154.18 | 26.15 |
| 7 | 847756 | 72.07 | 36.03 | 221.57 | 1008.94 | 1194.48 | 27.07 |
| 8 | 841286 | 71.52 | 35.76 | 257.34 | 1001.35 | 1222.92 | 27.71 |
| 24 | 886106 | 75.28 | 37.64 | 294.98 | 1053.92 | 1311.25 | 29.71 |
| 48 | 887501 | 75.40 | 37.70 | 332.68 | 1055.55 | 1350.53 | 30.60 |

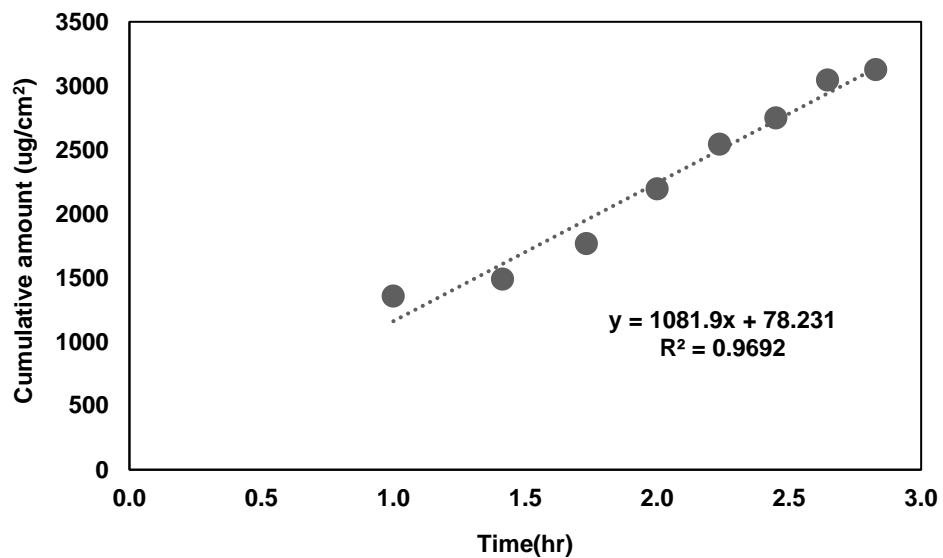
ตารางที่ 11 ปริมาณการสะสมของอนุภาคลิโพอโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอล (หลังล้างอาร์บูติน
อิสระ)

| Time (hr.) | Area (1) | Conc. (ppm) (2) | Amount in sampling vol. (ug) (3) | Cumulative in sampling vol. (ug) (4) | Amount in receptor cell (ug) (5) | Cumulative amount release (ug) (6) | % Cumulative Release (7) |
|---------------|-------------|-----------------------|---|---|---|---|-----------------------------------|
| 1 | 245417 | 21.60 | 10.80 | 10.80 | 302.44 | 302.44 | 6.78 |
| 2 | 391381 | 33.83 | 16.92 | 27.72 | 473.64 | 484.44 | 10.86 |
| 3 | 464020 | 39.92 | 19.96 | 47.68 | 558.84 | 586.56 | 13.15 |
| 4 | 476880 | 40.99 | 20.50 | 68.17 | 573.93 | 621.60 | 13.94 |
| 5 | 493582 | 42.39 | 21.20 | 89.37 | 593.52 | 661.69 | 14.84 |
| 6 | 523189 | 44.87 | 22.44 | 111.81 | 628.24 | 717.61 | 16.09 |
| 7 | 531625 | 45.58 | 22.79 | 134.60 | 638.14 | 749.95 | 16.82 |
| 8 | 530502 | 45.49 | 22.74 | 157.34 | 636.82 | 771.42 | 17.30 |
| 24 | 555257 | 47.56 | 23.78 | 181.12 | 665.86 | 823.20 | 18.46 |
| 48 | 564159 | 48.31 | 24.15 | 205.28 | 676.30 | 857.42 | 19.23 |

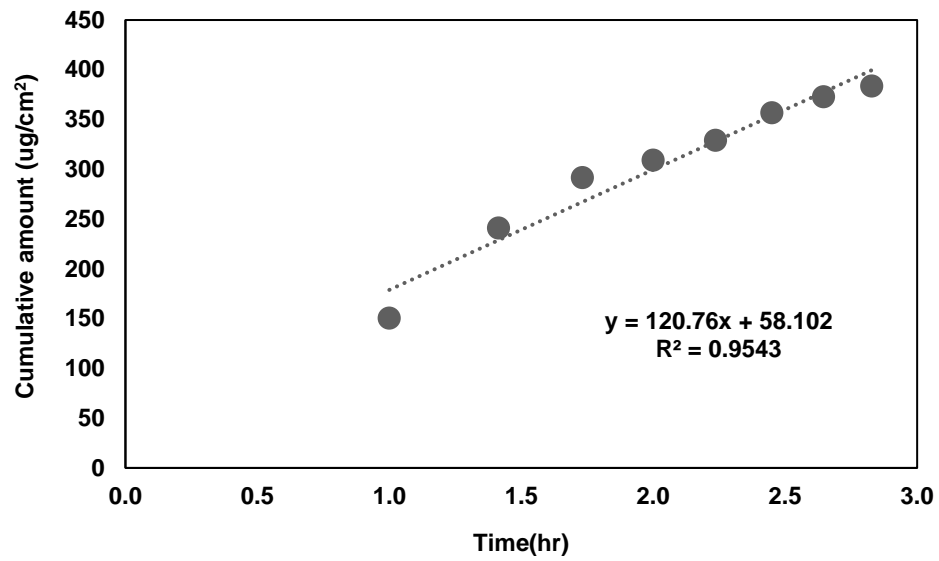
2. กราฟการปลดปล่อยของสารตามแบบจำลอง Higuchi



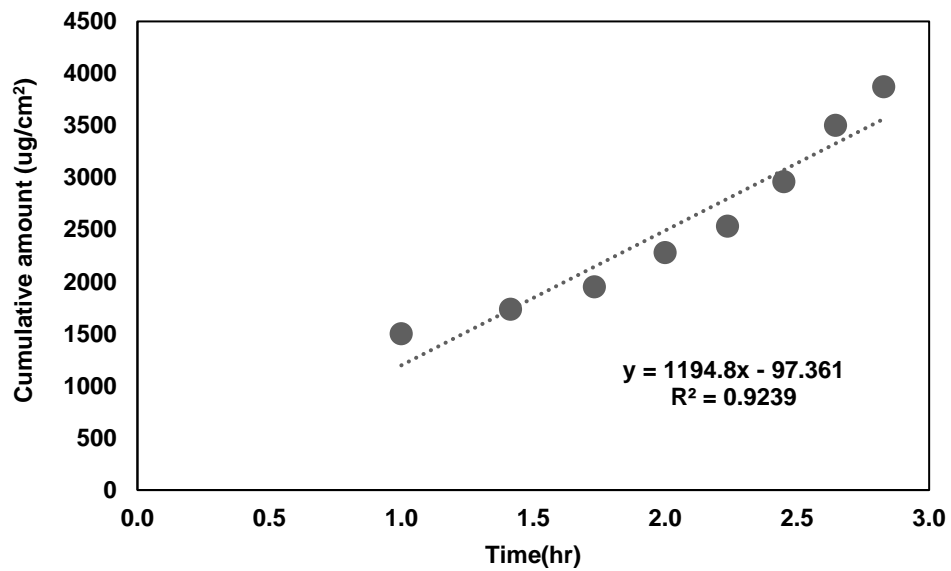
รูปที่ 42 การปลดปล่อยสะสมของสารละลายอาร์บูตินตามแบบจำลอง Higuchi



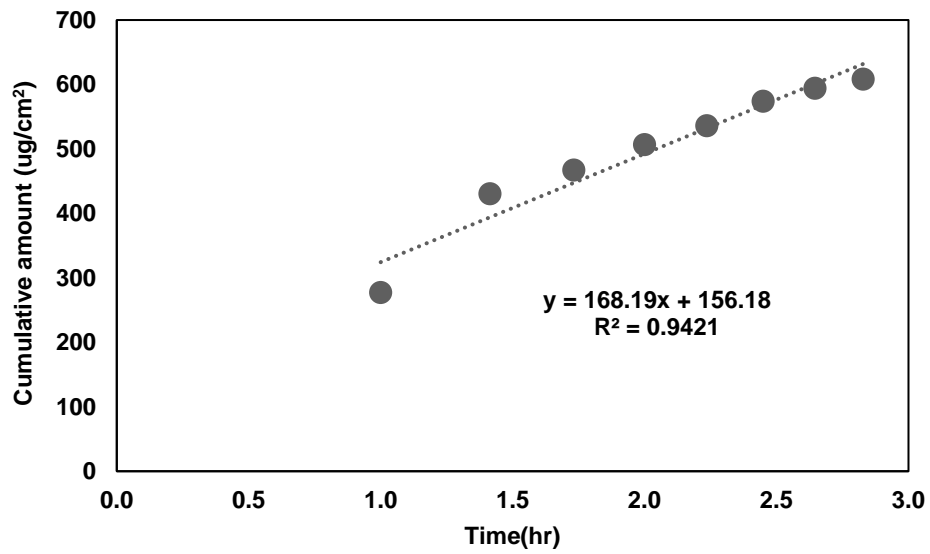
รูปที่ 43 การปลดปล่อยสะสมของอนุภาคลิโพโซมที่มีการเติมคลอเรสเตอรอลตามแบบจำลอง Higuchi



รูปที่ 44 การปลดปล่อยสะสมของอนุภาคลิพโซมที่มีการเติมคลอโรสเตรอล (หลังล้างอาร์บูตินอิสระ) ตามแบบจำลอง Higuchi



รูปที่ 45 การปลดปล่อยสะสมของอนุภาคลิพโซมที่ปราศจากการเติมคลอโรสเตรอล ตามแบบจำลอง Higuchi



รูปที่ 46 การปลดปล่อยสะสมของอนุภาคลิโพโซมที่ปราศจากการเติมคลอเรสเตอรอล (หลังล้างอาร์บูตินอิสระ) ตามแบบจำลอง Higuchi



บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

รัชพล ชูทับ

วัน เดือน ปี เกิด

4 กุมภาพันธ์ 2538

วุฒิการศึกษา

ปริญญาตรี : สำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยศิลปากร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY