

การพัฒนาอิตาสติกลิโฟโซมที่มีคาเฟอีนสำหรับการรักษาเซลล์ไขมัน

นางสาวจินดารัตน์	หาญกิติวัฒน์	5136517733
นางสาวหทัยา	บัลลพานันท์	5136694033
นางสาวอุทัยวรรณ	คุ้มปิติ	5136712733

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

Development of elastic liposomes containing caffeine for cellulite treatment

Miss Jindarat	Hankitiwat	5136517733
Miss Hatthaya	Ballapinant	5136694033
Miss Uthaiwan	Koompeeti	5136712733

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

คำนำ

โครงการปริญญาโทฉบับนี้จัดทำขึ้น โดยมีความมุ่งหวังที่จะนำกาแฟที่มีประโยชน์ในการลด
เซลล์ไขมันมาพัฒนาให้อยู่ในรูปอิตาสติกลิโโซมที่มีความยืดหยุ่น สามารถกักเก็บกาแฟและนำส่ง
กาแฟผ่านผิวหนังไปยังชั้นหนังแท้ได้

ทางคณะผู้ดำเนินโครงการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญาโทฉบับนี้จะสามารถใช้เป็น
ข้อมูลและเป็นแนวทางในการพัฒนาอิตาสติกลิโโซมต่อไป หากโครงการปริญญาโทฉบับนี้มี
ข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้ดำเนินโครงการต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทฉบับนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ภาณุ. ดร.นนทิมา
วรรณนะภุติ อาจารย์ที่ปรึกษา และ รศ. ภาณุ. ดร.วราภรณ์ สุวกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้
คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็น
ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณ ภาณุ.จิตเกษม มีวรรณ ที่ให้คำปรึกษาคำแนะนำในการเตรียมลิโพโซม

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรมและศูนย์เครื่องมือ
วิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำ
โครงการนี้

บทคัดย่อปริญญาโท

- ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การพัฒนาอิลาสติกลิโปโซมที่มีคาเฟอีนสำหรับการรักษาเซลลูไลท์
- ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Development of elastic liposomes containing caffeine for cellulite treatment
- หัวหน้าโครงการ : นางสาวจินดารัตน์ ชาญกิจวิธน์ 5136517733
- ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวหทัยา บัลลพภินันท์ 5136694033
นางสาวอุทัยวรรณ คู่มีปิติ 5136712733
- อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.นนทิมา วรรณระภูติ
- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.วราภรณ์ สุวกุล
- ภาควิชา : วิทยาการเกษตรกรรมและเกษตรอุตสาหกรรม

คาเฟอีนเป็นสารที่มีฤทธิ์ลดเซลลูไลท์ซึ่งเป็นปัญหาที่พบในผู้หญิงส่วนใหญ่ แต่คาเฟอีนมีความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรตำรับที่สามารถนำส่งคาเฟอีนไปยังชั้นหนังแท้ ซึ่งเป็นจุดออกฤทธิ์ ผู้วิจัยเลือกใช้ระบบอิลาสติกลิโปโซมเป็นระบบนำส่ง โดยศึกษาถึงผลของปริมาณ total lipid ต่อการเกิดลิโปโซมซึ่งเตรียมโดยวิธี film hydration ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของ edge activator (Tween® 80 และ Span® 80 5, 10 และ 15% โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้เป็นเฟสน้ำ (7, 10 และ 15% โดยน้ำหนัก) จากการศึกษาพบว่าปริมาณ total lipid ที่เหมาะสมในการเตรียมลิโปโซม คือ 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร ชนิดและปริมาณ edge activator ที่ทำให้เกิดอิลาสติกลิโปโซมที่สมบูรณ์ คือ Tween® 80 10 และ 15% และ Span® 80 5% ความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสม คือ 7% แต่อย่างไรก็ตามพบว่าคาเฟอีนมีผลรบกวนการเกิดอิลาสติกลิโปโซมของสูตรตำรับที่ใช้ Span® 80 5% ทำให้ไม่สามารถเกิดเป็นอิลาสติกลิโปโซมได้ เมื่อหาค่าร้อยละการเก็บกักคาเฟอีนในอิลาสติกลิโปโซมพบว่าสูตรตำรับที่ใช้ Tween® 80 10 และ 15% สามารถกักเก็บคาเฟอีนได้ประมาณ 11.16% และ 32.34% ของปริมาณคาเฟอีนที่ใส่ลงในสูตรตำรับตามลำดับ

ฝ่ายวิชาการ คณะเกษตรศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
คำนำ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่	
1) บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2) ปรีทิสน์วรรณกรรม.....	3
1. เซลลูโลส.....	3
2. การรักษาเซลลูโลส.....	4
3. ระบบอิลาสติกลิโพโซม.....	5
4. กลไกการนำส่ง.....	6
5. การเตรียมอิลาสติกลิโพโซม.....	7
6. การตรวจสอบคุณสมบัติของอิลาสติกลิโพโซม.....	7
7. ประโยชน์ของอิลาสติกลิโพโซมในการนำส่งสารทางผิวหนัง.....	8
3) วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย.....	9
1. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	9
2. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย.....	9
3. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	10
4. วิธีการดำเนินการวิจัย.....	12
4.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ total lipid ต่อการเกิดลิโพโซม.....	12
4.2 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของ edge activator และความเข้มข้นของ ethanol ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโพโซม.....	13
4.3 การศึกษาผลของสูตรตำรับอิลาสติกลิโพโซมต่อความคงตัวทางกายภาพ.....	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 การศึกษาผลของ caffeine ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของ อิลาสติกลิโปโซม.....	16
4.5 การศึกษาผลของ caffeine ต่อความคงตัวทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม.....	18
4.6 การหาค่าความสามารถในการกักเก็บ caffeine ของสูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซมที่ ผ่านการคัดเลือก.....	18
4) ผลและอภิปรายผลการวิจัย.....	20
1. การศึกษาผลของความเข้มข้นของ total lipid ต่อการเกิดลิโปโซม.....	20
2. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของ edge activator และ ethanol ต่อการเกิดและ คุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม.....	22
3. การศึกษาผลของสูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซมต่อความคงตัวทางกายภาพ.....	30
4. การศึกษาผลของ caffeine ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม.....	32
5. การศึกษาผลของ caffeine ต่อความคงตัวทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม.....	36
6. การหาค่าความสามารถในการกักเก็บ caffeine ของสูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C.....	37
5) สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	39
1. สรุปผลการวิจัย.....	39
2. ข้อเสนอแนะ.....	39
เอกสารอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก ก.....	44
ภาคผนวก ข.....	49
ภาคผนวก ค.....	56

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงรหัสสูตรตำรับและส่วนประกอบของอิลาสติกลิโปโซมที่ใช้ในการทดลอง.....	14
ตารางที่ 2 แสดงรหัสสูตรตำรับและส่วนประกอบของอิลาสติกลิโปโซมที่ใช้ในการทดลอง.....	17
ตารางที่ 3 ผลการดูลักษณะจุลทรรศน์ของสูตรตำรับต่างๆ.....	23
ตารางที่ 4 อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง edge activator และ SPC.....	25
ตารางที่ 5 แสดง % อิลาสติกลิโปโซมของสูตรตำรับต่างๆ.....	28
ตารางที่ 6 แสดงขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่างๆ.....	28
ตารางที่ 7 ผลการส่องกล้องจุลทรรศน์ของสูตรตำรับที่ผ่านการคัดเลือกหลังเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	30
ตารางที่ 8 %อิลาสติกลิโปโซมของสูตรตำรับ T10-7, T15-7 และ S5-7 หลังเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	32
ตารางที่ 9 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของอิลาสติกลิโปโซมที่ได้	33
ตารางที่ 10 ผลการส่องกล้องจุลทรรศน์ของสูตรตำรับ T15-7/C และ T10-7/C.....	34
ตารางที่ 11 %อิลาสติกลิโปโซมของสูตรตำรับที่มีเฟสน้ำเป็นสารละลาย caffeine 1.18×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร ใน ethanol 7% T10-7/C และ T15-7/C.....	35
ตารางที่ 12 ผลการส่องกล้องจุลทรรศน์ของสูตรตำรับ T15-7/C และ T10-7/C หลังเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	36
ตารางที่ 13 แสดงค่าร้อยละการกักเก็บ caffeine ของสูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C.....	37
ตารางที่ 14 ขนาดอนุภาคของอิลาสติกลิโปโซมสูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C.....	38
ตารางที่ 15 สรุปปริมาณหรือน้ำหนักของสารที่ใช้ในการเตรียมอิลาสติกลิโปโซม.....	50
ตารางที่ 16 การคำนวณอิลาสติกลิโปโซมของสูตรตำรับต่างๆ.....	51
ตารางที่ 17 การคำนวณอิลาสติกลิโปโซมของสูตรตำรับ T10-7, T15-7 และ S5-7 หลังเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	51
ตารางที่ 18 การคำนวณอิลาสติกลิโปโซมของสูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C.....	52
ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงของ caffeine ใน ethanol 7% ที่ความเข้มข้นต่างๆ (สำหรับผลการทดลองในการศึกษาที่ 4.1).....	52
ตารางที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงของ caffeine ใน ethanol 7% ที่ความเข้มข้นต่างๆ (สำหรับผลการทดลองในการศึกษาที่ 6).....	53
ตารางที่ 21 ปริมาตรที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงและผลการคำนวณหาปริมาณcaffeineในส่วนใส	55

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงลักษณะผิวที่เกิดเซลลูโลสที่ขึ้น.....	3
รูปที่ 2 แสดงลักษณะการเรียงตัวของ fibrous septae ในเพศหญิง (ซ้าย) และเพศชาย (ขวา).....	4
รูปที่ 3 แสดงการผ่านช่องที่มีขนาดเล็กกว่าตัวมันเองของอิลาสติกลิโปโซม.....	6
รูปที่ 4 ลักษณะฟิล์มที่เตรียมได้จาก total lipid ปริมาณต่างๆ.....	20
รูปที่ 5 ลักษณะของ lipid dispersion ที่ได้จากการใช้ SPC 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร.....	21
รูปที่ 6 ลักษณะของลิโปโซมเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (100x).....	21
รูปที่ 7 ลักษณะ maltese cross ที่พบ จากการใช้ SPC 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร (100x).....	21
รูปที่ 8 ลักษณะฟิล์มของสูตรตำรับต่างๆ ที่มีชนิดและปริมาณของ edge activator ต่างกัน.....	22
รูปที่ 9 แสดงลักษณะของอิลาสติกลิโปโซมที่ไม่ผ่านการคัดเลือก.....	24
รูปที่ 10 สูตร S15-15 เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (100x).....	24
รูปที่ 11 แสดงลักษณะของอิลาสติกลิโปโซมที่ผ่านการคัดเลือก.....	25
รูปที่ 12 แสดงลักษณะของอิลาสติกลิโปโซมที่ผ่านการคัดเลือกเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (100x).....	25
รูปที่ 13 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrusion ของสูตรตำรับ T15-7....	26
รูปที่ 14 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrusion ของสูตรตำรับ T10-7....	26
รูปที่ 15 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrusion ของสูตรตำรับ S5-7.....	27
รูปที่ 16 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrusion ของสูตรตำรับที่ไม่ผ่านการคัดเลือก (T15-10).....	28
รูปที่ 17 แสดงลักษณะของลิโปโซมที่ไม่มีความยืดหยุ่น (คู่ซ้าย) และมีความยืดหยุ่น (คู่ขวา).....	29
รูปที่ 18 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T15-7 หลังผ่านการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	31
รูปที่ 19 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T10-7 หลังผ่านการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	31
รูปที่ 20 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ S5-7 หลังผ่านการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	31
รูปที่ 21 UV Spectrum ของ caffeine ในสารละลาย ethanol 7%.....	32
รูปที่ 22 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T15-7/C...	35
รูปที่ 23 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T10-7/C...	35

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 24 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T15-7/C หลังผ่านการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	36
รูปที่ 25 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T10-7/C หลังผ่านการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	37
รูปที่ 26 สูตร โครงสร้างของ caffeine.....	44
รูปที่ 27 สูตร โครงสร้างของ Phosphatidylcholine.....	45
รูปที่ 28 สูตร โครงสร้างของ Tween [®] 80.....	46
รูปที่ 29 สูตร โครงสร้างของ Span [®] 80.....	47
รูปที่ 30 สูตร โครงสร้างของ Ethanol.....	48
รูปที่ 31 กราฟมาตรฐานของสารละลายคาเฟอีนในเอทานอล 7% (สำหรับผลการทดลองในการศึกษา ที่ 4.1)	53
รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานของสารละลายคาเฟอีนในเอทานอล 7% (สำหรับผลการทดลองในการศึกษา ที่ 6)	54
รูปที่ 33 Analytical Balances 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo PG-S)	56
รูปที่ 34 Analytical Balances 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo AG)	56
รูปที่ 35 Analytical Balances 5 ตำแหน่ง (Mettler Toledo AX)	56
รูปที่ 36 LiposoFast [™] (Avestin Inc.)	56
รูปที่ 37 Rotary evaporator (Bushi)	57
รูปที่ 38 Sonicator (Elma [®] Transsonic Digital S)	57
รูปที่ 39 Ultracentrifuge (Beckman L-80)	57
รูปที่ 40 UV-Visible Recording Spectrophotometer (Shimadzu)	57
รูปที่ 41 Vortex-Genie [®] 2.....	57
รูปที่ 42 Zeta Sizer Nano series (Malvern)	57
รูปที่ 43 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E 200).....	58

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญ

เซลลูโลสหรือที่รู้จักกันในนามผิวเปลือกส้มเกิดจากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ในชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) เพิ่มจำนวนขึ้นจนคั่นแผ่นกัน (septae) ซึ่งไม่สามารถยืดหยุ่นได้ขึ้นไปถึงชั้นหนังแท้ (dermis) ทำให้เกิดผิวขรุขระคล้ายเปลือกส้ม สามารถมองเห็นได้ง่ายบริเวณต้นขาและสะโพก มีรายงานว่าผู้หญิงมากกว่า 85% กำลังเผชิญกับปัญหาเซลลูโลส (Hexsel and Soirefmann, 2011) การรักษาเซลลูโลสในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ endermiology, liposuction, subcision, mesotherapy, lasers, ultrasound และ bipolar and unipolar radiofrequency devices แต่วิธีเหล่านี้ไม่มีการพิสูจน์ประสิทธิภาพในการรักษาที่ชัดเจน ประกอบกับมีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือ (Khan et al., 2010)

สารหลายชนิดถูกนำมาใช้ในการลดเซลลูโลสไม่ว่าจะเป็น xanthines, retinoids, lactic acid หรือ สมุนไพรต่างๆ (Avram, 2004) สารที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายรวมถึงมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่ชัดเจนในการลดเซลลูโลสคือ caffeine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม xanthines กลไกการออกฤทธิ์ของ caffeine ในการสลายไขมันมาจากหลายกลไกร่วมกัน ทั้งจากการยับยั้งเอนไซม์ 3',5'-nucleotide phosphodiesterase, การกระตุ้น sodium pump ในเนื้อเยื่อไขมันและการเพิ่มขึ้นของตัวรับ UCP-3 (uncoupling proteins) อุปสรรคสำคัญในการนำส่ง caffeine ทางผิวหนังเพื่อให้ไปถึงจุดออกฤทธิ์เพื่อลดเซลลูโลสที่ชั้นเนื้อเยื่อไขมัน คือ caffeine เป็นสารที่ละลายน้ำ มีค่าการละลายเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 46 มิลลิลิตร และค่า partition coefficient เท่ากับ -0.07 ทำให้มีการซึมผ่านผิวหนังต่ำ (Aulton, 2002; Eseldin et al., 2010) จึงมีการพัฒนาสูตรตำรับเพื่อนำส่ง caffeine ขึ้นมากมายและแต่ละตำรับมีจุดเด่นและจุดด้อยแตกต่างกันไป เช่น ในตำรับสารละลายที่มีตัวเพิ่มการซึมผ่าน (enhancer) เป็นส่วนประกอบสามารถเพิ่มการซึมผ่านของ caffeine ได้ดีเกินไปจนผ่านเข้าสู่กระแสเลือดไม่ได้ไปยังจุดออกฤทธิ์ และไมโครอิมัลชัน (microemulsion) สามารถนำส่ง caffeine ได้ดี แต่อาจจะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ (Bolzinger et al., 2008; Kreilgaard, 2002) ระบบลิโปโซม (liposome) สามารถทำให้ caffeine สะสมในผิวหนังได้นานแต่ไม่สามารถนำส่งยาไปถึงเนื้อเยื่อไขมันได้ (Touitou et al., 1994) เป็นต้น

จากข้อดีของระบบลิโปโซมและการใช้ตัวเพิ่มการซึมผ่าน ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดที่จะพัฒนาระบบนำส่งที่รวมคุณสมบัติทั้ง 2 เข้าด้วยกัน ระบบนำส่งลิโปโซมที่สามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารลงไปถึงชั้นหนังแท้และเนื้อเยื่อไขมันได้ คือ อีลาสติกลิโปโซมซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญนอกเหนือจากลิโปโซม

แบบดั้งเดิม (conventional liposome) คือ edge activator และ ethanol ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเพิ่มการซึมผ่าน ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาระบบอิลาสติกลิโปโซมเพื่อนำส่ง caffeine ทางผิวหนัง โดยศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของ lipid และ ethanol รวมถึงชนิดและความเข้มข้นของ edge activator ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของระบบอิลาสติกลิโปโซม

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไป พัฒนาสูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซมเพื่อใช้ในการนำส่ง caffeine เข้าสู่ผิวหนัง

วัตถุประสงค์เฉพาะ เพื่อศึกษา

1. ผลของความเข้มข้นของ total lipid ต่อการเกิดอิลาสติกลิโปโซม
2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของ edge activator และผลของความเข้มข้นของ ethanol ต่อการเกิด, คุณสมบัติและความคงตัวของอิลาสติกลิโปโซม
3. ผลของ caffeine ต่อการเกิด, คุณสมบัติและความคงตัวของอิลาสติกลิโปโซม
4. ผลของสูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซมต่อการกักเก็บ caffeine

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

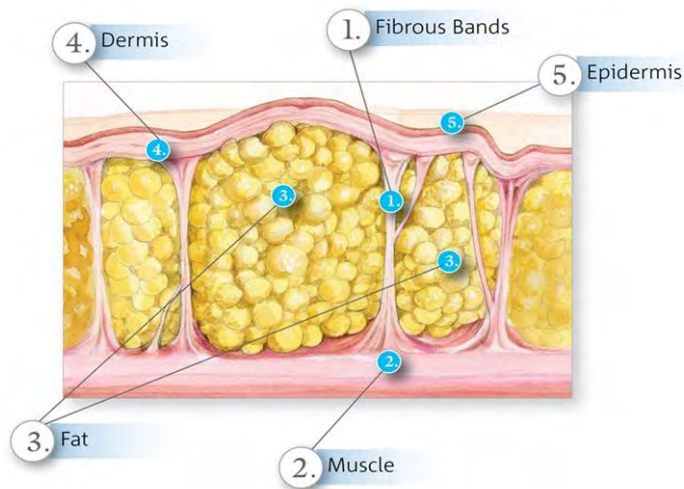
1. ได้สูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซมของ caffeine เป็นแนวทางในการพัฒนาการนำส่ง caffeine ทางผิวหนังต่อไป
2. ได้สูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซม ที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อนำส่งสารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติคล้าย caffeine ได้

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

เซลลูไลท์

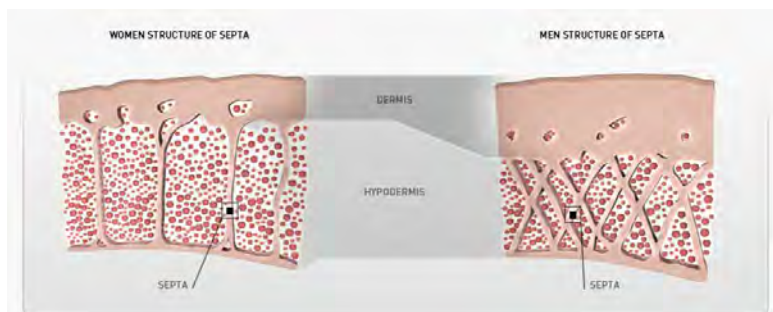
เซลลูไลท์ คือ ลักษณะของผิวหนังที่เปลี่ยนแปลงไปมีลักษณะตะปุ่มตะป่ำคล้ายผิวเปลือกส้มพบมากบริเวณต้นแขน ต้นขา หน้าท้องและก้น สามารถพบได้ในทุกเพศ ทุกวัยโดยเฉพาะในผู้หญิงหลังวัยเจริญพันธุ์ (Goldman et al.,2006) เซลลูไลท์เกิดจากการสะสมของไขมันในชั้นเนื้อเยื่อไขมัน โดยไขมันจะถูกแบ่งเป็นช่องโดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่า fibrous septae ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีความยืดหยุ่นต่ำ เมื่อไขมันสะสมมากขึ้นจึงเกิดการดันชั้นผิวหนังขึ้นไปด้านบนและมีบางส่วนที่ถูก fibrous septae ดึงเอาไว้ทำให้เกิดลักษณะของผิวหนังที่ขรุขระขึ้นดังแสดงในรูปที่ 1 เซลลูไลท์มักพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชายเนื่องจากลักษณะการเรียงตัวของ fibrous septae ที่แตกต่างกัน fibrous septae ของเพศชายจะเรียงตัวประสานกันเป็นตาข่ายที่แน่นหนาในขณะที่ของผู้หญิงจะเรียงตัวในแนวตั้งจากกับผิวหนังดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อเกิดการสะสมของไขมันมากขึ้นจึงดันตัวขึ้นไปด้านบนได้ง่ายกว่า (Hexsel et al.,2011)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะผิวที่เกิดเซลลูไลท์ขึ้น

(What Causes Cellulite[homepage on the internet]. North Carolina: Metabolic Effect Inc.,c2013.

Available from: <http://blog.metaboleffect.com/2012/10/30/can-you-burn-cellulite/>)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะการเรียงตัวของ fibrous septae ในเพศหญิง (ซ้าย) และเพศชาย (ขวา)
(LPG Lipomassage: All information to understand and fight cellulite[homepage on the internet].

Valence: LPG SYSTEMS.,c2013. Available from:

<http://www.lpgsystems.com/endermologie/lipomassage/cellulite.php>)

เซลลูไลท์สามารถแบ่งได้เป็นหลายระยะทั้งจากการแบ่งตามพยาธิสภาพและตามลักษณะภายนอก (Avram, 2004) โดยการแบ่งตามลักษณะภายนอกนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะดังนี้

ระยะที่ 0: ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงบนผิวหนัง

ระยะที่ 1: ผิวหนังบริเวณที่เกิดเซลลูไลท์ขึ้นยังคงเรียบอยู่ แต่จะเห็นลักษณะผิวขรุขระ
เมื่อมีการบิดผิวหนังขึ้นมาหรือขณะที่กล้ามเนื้อหดตัว

ระยะที่ 2: ผิวเปลือกส้มแดงให้เห็นขณะที่ยืน โดยไม่ต้องบิดผิวหนัง

ระยะที่ 3: ลักษณะผิวเปลือกส้มจะนูนและลึกมากขึ้น ผิวมีลักษณะขรุขระ

การรักษาเซลลูไลท์

เซลลูไลท์ส่งผลให้ผิวของผู้ที่เป็นไม่น่ามองจนอาจขาดความมั่นใจได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำสารหลายชนิดมาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบต่างๆ เพื่อช่วยขจัดปัญหาดังกล่าว ได้แก่ สารกลุ่ม PPAR agonists, xanthines, retinoids และ lactic acid (Avram, 2004; Khan et al., 2010; Rawlings, 2006) รวมถึงสมุนไพรบางชนิด เช่น สารสกัดจากเป็ะก๊วย, ชะมดต้น เป็นต้น (Sainio, et al., 2000)

จากการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ลดเซลลูไลท์ในห้องทดลองของ Sainio และคณะ (2000) พบว่าสารที่ถูกนำมาใช้เป็นสารสำคัญมากที่สุด คือ caffeine เนื่องจากเป็นสารที่หาได้ง่ายและมีกลไกการออกฤทธิ์ลดเซลลูไลท์ผ่านหลายกลไกพร้อมกัน คือ ออกฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์ไขมันทำให้เกิดการสลายไขมัน โดยยับยั้งเอนไซม์ 3',5'-nucleotide phosphodiesterase ทำให้ cAMP ในเซลล์ไขมันสูงขึ้น เกิดการกระตุ้น protein kinase ทำให้เอนไซม์ triacylglycerol lipase อยู่ในรูปที่มีฤทธิ์สลาย triglyceride เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล (Rawlings, 2006) รวมถึงการกระตุ้น sodium pump ในเนื้อเยื่อไขมัน ส่งผลให้อิออน sodium

ไหลออกไปยังของเหลวนอกเซลล์ (extracellular fluid) เกิดการสลายไขมันขึ้นในที่สุด (Lesser et al., 1999) นอกจากนี้คาเฟอีนสามารถเพิ่มตัวรับ UCP-3 (uncoupling proteins) ในชั้นเนื้อเยื่อไขมัน ทำให้นเนื้อเยื่อไขมันถูกเปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย (Rawlings, 2006)

การศึกษาความสามารถในการลดเซลล์ลูไลท์ของ caffeine ในสัตว์ทดลองพบว่าเจลที่ผสม caffeine 5% w/w เมื่อทาบนผิวหนังร่วมกับการใช้ ultrasound เป็นระยะเวลา 15 วันสามารถลดความหนาของเนื้อเยื่อไขมันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการทำลายเซลล์ไขมันจนจำนวนเซลล์มีขนาดลดลง ในส่วนตำรับเจลที่ผสม caffeine เพียงอย่างเดียวไม่ได้ผลเช่นเดียวกับการใช้ ultrasound มาช่วยเนื่องจาก ultrasound ช่วยเพิ่มการซึมผ่านของ caffeine ลงไปในชั้นผิวหนัง (Velasco et al., 2008) และจากการศึกษาโดยใช้หนูตัวเมียพบว่า ภายหลังจากทาอิมัลชันผสม caffeine 4% w/w และอิมัลชันผสม siloxanetriol alginate caffeine 6% w/w เป็นระยะเวลา 21 วันสามารถลดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไขมันได้ 17% และ 16% ตามลำดับในขณะที่ตำรับที่เป็นเจลไม่สามารถลดได้เนื่องจากเจลไม่สามารถนำส่งสารสำคัญไปยังจุดออกฤทธิ์ได้ (Pires-de-Campos et al., 2008)

แม้ caffeine จะมีฤทธิ์ในการลดเซลล์ลูไลท์ได้แต่ด้วยตัวของสารเองไม่สามารถลงไปถึงยังจุดออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อไขมัน ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาระบบนำส่ง caffeine เพื่อใช้ในการรักษาเซลล์ลูไลท์ โดยระบบที่สนใจศึกษา คือ อีลาสติกลีโปโซมซึ่งเป็นลิโปโซมประเภทหนึ่งโดยมีความยืดหยุ่น (elasticity) สูงกว่าลิโปโซมแบบดั้งเดิม ความยืดหยุ่นนี้เกิดจากส่วนประกอบสำคัญในโครงสร้างผนังไขมันที่เรียกว่า edge activator ระบบนี้ถูกคิดค้นขึ้นครั้งแรกโดย Gregor Cevc ในปีค.ศ. 1992 และให้ชื่อการค้าว่า Transfersomes[®] ซึ่งประกอบด้วย soya phosphatidylcholine และ sodium cholate (Cevc and Blume, 1992)

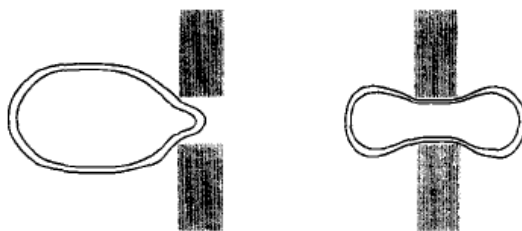
ระบบอีลาสติกลีโปโซม

ระบบอีลาสติกลีโปโซมประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน (Benson et al., 2009) คือ สารไขมัน สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และตัวเพิ่มการซึมผ่าน (enhancer) สารไขมันที่นิยมใช้ คือ phosphatidylcholine ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติ ในการเตรียมอีลาสติกลีโปโซมจะเรียกสารลดแรงตึงผิวว่า edge activator โดยสารลดแรงตึงผิวจะไปแทรกตัวอยู่ระหว่างสารไขมันเกิดเป็นผนังของอีลาสติกลีโปโซมที่มีความยืดหยุ่นส่งผลให้กลไกในการซึมผ่านผิวหนังแตกต่างจากลิโปโซมแบบดั้งเดิม สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้ คือ sodium cholate, deoxycholate, Span[®], Tween[®] และ dipotassium glycyrrhizinate นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารอื่นที่ไม่ใช่สารลดแรงตึงผิวเป็น edge activator ได้ เช่น oleic acid และ limonene เป็นต้น ในส่วนของตัวเพิ่มการซึมผ่านนิยมใช้ ethanol โดยปริมาณที่ใช้ในตำรับมักไม่เกิน 10% แต่ในบางการศึกษาอาจใช้ปริมาณ ethanol ที่มากขึ้น เช่น การใช้อีลาสติกลีโปโซมที่มี ethanol ในตำรับ 15% ในการนำส่งสาร

catechin ไปยังสมอง (Huang et al., 2011) ethanol จะช่วยให้ขนาดของอิลาสติกลีโปโซมเล็กลงรวมถึงเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังด้วย

กลไกการนำส่ง

อิลาสติกลีโปโซมมีผนังที่ยืดหยุ่นต่างจากลิโปโซมแบบดั้งเดิมทำให้อิลาสติกลีโปโซมสามารถผ่านช่องที่มีขนาดเล็กกว่าตัวเอง 3-5 เท่าได้ดังแสดงในรูปที่ 3 (Cevc et al., 1995) ดังนั้นอิลาสติกลีโปโซมจึงสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่าลิโปโซมแบบดั้งเดิมที่ส่วนใหญ่จะอยู่เพียงผิวหนังชั้นนอกสุด (stratum corneum) เท่านั้น กลไกการผ่านผิวหนังที่สำคัญของอิลาสติกลีโปโซม คือ อิลาสติกลีโปโซมจะผ่านชั้นผิวหนังชั้นนอกสุดอย่างรวดเร็วโดยการลอดผ่านรอยต่อขนาดเล็กซึ่งมีความกว้างน้อยกว่า 0.1 ไมโครเมตร ระหว่าง horny cell ซึ่งมี quasi-lamella lipid อยู่ โดยภายหลังผ่านรอยต่อแล้วอิลาสติกลีโปโซมจะมีขนาดเท่าเดิมไม่เปลี่ยนแปลง การเคลื่อนตัวของอิลาสติกลีโปโซมจะอาศัยความแตกต่างระหว่างปริมาณน้ำในหนังกำพร้าชั้นนอกสุดกับน้ำในชั้นผิวที่อยู่ลึกลงไป หนังกำพร้าชั้นนอกสุดจะเป็นส่วนที่แห้งประกอบด้วยน้ำเพียง 15% ในขณะที่ผิวที่อยู่ลึกลงไปอย่างในชั้น basal layer มีน้ำมากกว่าถึง 5 เท่า ดังนั้นเมื่อทาอิลาสติกลีโปโซมลงบนผิวหนังจะเกิดการระเหยของน้ำทำให้เกิดแรงดันอิลาสติกลีโปโซมลงไป และถ้าใช้ในลักษณะ non-occlusive อิลาสติกลีโปโซมจะสามารถนำส่งสารลงไปชั้นผิวที่ลึกมากขึ้นจนถึงระบบไหลเวียนโลหิตได้ (Cevc and Blume, 1992)



รูปที่ 3 แสดงการผ่านช่องที่มีขนาดเล็กกว่าตัวมันเองของอิลาสติกลีโปโซม

(Cevc et al., 1995)

การเตรียมอิลาสติกลิโปโซม (อรัญญาและจิระเดช., 2550)

อิลาสติกลิโปโซมสามารถเตรียมได้จากหลายวิธี เริ่มตั้งแต่แบบดั้งเดิมที่ใช้มือเขย่า (hand-shaken) จนถึงเทคนิคต่างๆ เช่น การระเหย (rotary evaporation), การอัดด้วยความดันสูง (high pressure homogenization) เป็นต้น โดยวิธีที่นิยมในห้องปฏิบัติการ คือ การระเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ในการเตรียมขั้นตอนแรกจะละลายเฟสไขมันในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก เหลือแต่ไขมันแห้งติดเป็นฟิล์มบางๆ เคลือบอยู่บนผิวแก้ว ถ้าสารหรือยาที่ต้องการกักเก็บละลายในน้ำมัน ต้องนำมาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์พร้อมกับไขมัน ถ้าสารหรือยาที่ต้องการกักเก็บละลายน้ำต้องนำมาละลายน้ำก่อน จากนั้นเติมสารละลายน้ำที่อาจมีตัวยาหรือไม่มีตัวยาแต่ในสารละลายน้ำนี้มักมี ethanol ผสมอยู่ด้วยลงบนแผ่นฟิล์ม แผ่นฟิล์มจะค่อยๆ หลุดออกมาเป็นลักษณะคอลลอยด์ของอิลาสติกลิโปโซม

การตรวจสอบคุณสมบัติอิลาสติกลิโปโซม

การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของอิลาสติกลิโปโซม คือ ตรวจสอบการเกิด bilayer โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด polarized-light microscope จะต้องพบลักษณะ maltese cross (Manosroi et al., 2003) คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของอิลาสติกลิโปโซม คือ ความยืดหยุ่นของผนังโดยวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง dynamic light scattering (Prajapati et al., 2011) โดยขนาดอนุภาคก่อนและหลังการ extrusion ผ่าน polycarbonate membrane ที่มีขนาดเล็กกว่าอนุภาคไม่มีการเปลี่ยนแปลง

อิลาสติกลิโปโซมเป็นระบบที่พัฒนาขึ้นเพื่อนำส่งสารจึงต้องมีการประเมินความสามารถในการกักเก็บสาร (%Entrapment efficacy) โดยขั้นตอนการปฏิบัติ คือ แยกอิลาสติกลิโปโซมออกจากสารที่ไม่ถูกกักเก็บก่อนซึ่งอาจใช้วิธีการปั่นด้วยแรงเหวี่ยงสูง (ultracentrifugation) หลังจากปั่นเหวี่ยง อิลาสติกลิโปโซมจะตกตะกอนนอนก้น (sediment) วิเคราะห์หาปริมาณสารหรือยาที่ไม่ได้ถูกกักเก็บในอิลาสติกลิโปโซมจากสารละลายน้ำเหนือตะกอน (supernatant) นำค่าดังกล่าวมาคำนวณหาร้อยละการกักเก็บสารในอิลาสติกลิโปโซมจากสมการต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละการกักเก็บสาร} = \frac{\text{ปริมาณ caffeine ทั้งหมด} - \text{ปริมาณ caffeine ในส่วนใส}}{\text{ปริมาณ caffeine ทั้งหมด}} \times 100$$

ประโยชน์ของอิลาสติกลิโพโซมในการนำส่งสารทางผิวหนัง

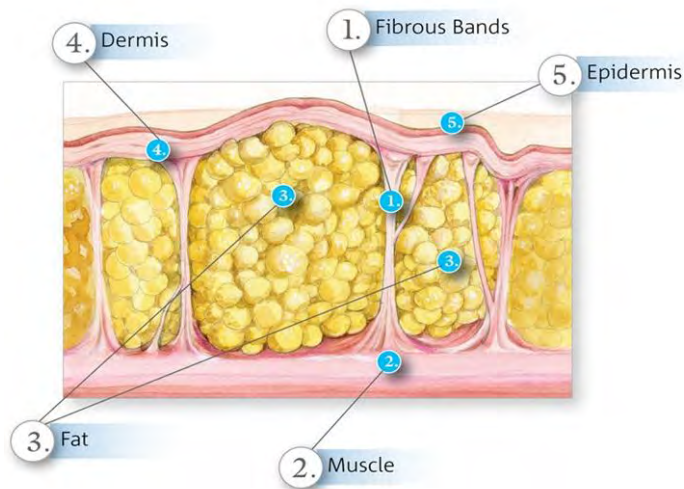
มีการศึกษาการใช้ระบบอิลาสติกลิโพโซมในการนำส่งยาหลายชนิดทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง ได้แก่ ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ เป็นต้น มีการศึกษาเปรียบเทียบตำรับยา diclofenac ในรูปแบบอิลาสติกลิโพโซมและไฮโดรเจลพบว่าระบบอิลาสติกลิโพโซมสามารถนำส่งยาได้ดีกว่า (Cevc and Blume, 2001) ในการศึกษาการนำส่งยา corticosteroid (Cevc et al., 1997) และ triamcinolone acetonide (Cevc and Blume, 2003) ในรูปแบบอิลาสติกลิโพโซมเปรียบเทียบกับตำรับครีมและโลชั่นที่มีขายในท้องตลาด พบว่าอิลาสติกลิโพโซมช่วยให้รอยโรคในสัตว์ทดลองหายได้เร็วกว่า นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้ระบบอิลาสติกลิโพโซมในการนำส่งโปรตีน ได้แก่ insulin พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองได้ (Guo et al., 2000) และมีการใช้อิลาสติกลิโพโซมในการเป็น non-invasive vaccine ด้วยการศึกษาจากความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับ tetanus toxoid จากตำรับอิลาสติกลิโพโซม, ลิโพโซม, นีโอโซมและโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) พบว่าระบบนำส่งอิลาสติกลิโพโซมสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เทียบเท่ากับการฉีดในขณะที่ระบบลิโพโซมและนีโอโซมกระตุ้นได้น้อยกว่า (Gupta et al., 2005)

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

เซลลูไลท์

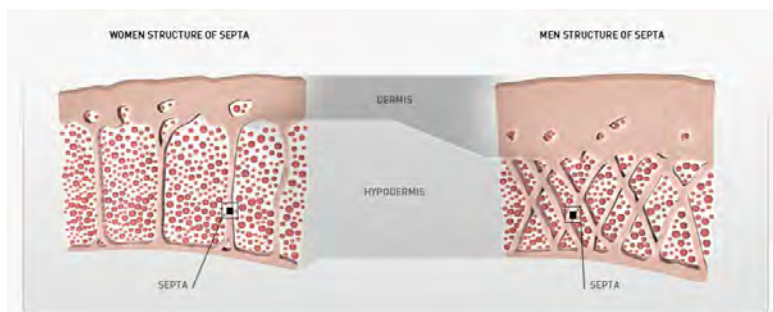
เซลลูไลท์ คือ ลักษณะของผิวหนังที่เปลี่ยนแปลงไปมีลักษณะตะปุ่มตะป่ำคล้ายผิวเปลือกส้มพบมากบริเวณต้นแขน ต้นขา หน้าท้องและก้น สามารถพบได้ในทุกเพศ ทุกวัยโดยเฉพาะในผู้หญิงหลังวัยเจริญพันธุ์ (Goldman et al.,2006) เซลลูไลท์เกิดจากการสะสมของไขมันในชั้นเนื้อเยื่อไขมัน โดยไขมันจะถูกแบ่งเป็นช่องโดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่า fibrous septae ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีความยืดหยุ่นต่ำ เมื่อไขมันสะสมมากขึ้นจึงเกิดการดันชั้นผิวหนังขึ้นไปด้านบนและมีบางส่วนที่ถูก fibrous septae ดึงเอาไว้ทำให้เกิดลักษณะของผิวหนังที่ขรุขระขึ้นดังแสดงในรูปที่ 1 เซลลูไลท์มักพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชายเนื่องจากลักษณะการเรียงตัวของ fibrous septae ที่แตกต่างกัน fibrous septae ของเพศชายจะเรียงตัวประสานกันเป็นตาข่ายที่แน่นหนาในขณะที่ของผู้หญิงจะเรียงตัวในแนวตั้งจากกับผิวหนังดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อเกิดการสะสมของไขมันมากขึ้นจึงดันตัวขึ้นไปด้านบนได้ง่ายกว่า (Hexsel et al.,2011)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะผิวที่เกิดเซลลูไลท์ขึ้น

(What Causes Cellulite[homepage on the internet]. North Carolina: Metabolic Effect Inc.,c2013.

Available from: <http://blog.metaboleffect.com/2012/10/30/can-you-burn-cellulite/>)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะการเรียงตัวของ fibrous septae ในเพศหญิง (ซ้าย) และเพศชาย (ขวา)
(LPG Lipomassage: All information to understand and fight cellulite[homepage on the internet].

Valence: LPG SYSTEMS.,c2013. Available from:

<http://www.lpgsystems.com/endermologie/lipomassage/cellulite.php>

เซลลูไลท์สามารถแบ่งได้เป็นหลายระยะทั้งจากการแบ่งตามพยาธิสภาพและตามลักษณะภายนอก (Avram, 2004) โดยการแบ่งตามลักษณะภายนอกนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะดังนี้

ระยะที่ 0: ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงบนผิวหนัง

ระยะที่ 1: ผิวหนังบริเวณที่เกิดเซลลูไลท์ขึ้นยังคงเรียบอยู่ แต่จะเห็นลักษณะผิวขรุขระ
เมื่อมีการบิดผิวหนังขึ้นมาหรือขณะที่กล้ามเนื้อหดตัว

ระยะที่ 2: ผิวเปลือกส้มแดงให้เห็นขณะที่ยืน โดยไม่ต้องบิดผิวหนัง

ระยะที่ 3: ลักษณะผิวเปลือกส้มจะนูนและลึกมากขึ้น ผิวมีลักษณะขรุขระ

การรักษาเซลลูไลท์

เซลลูไลท์ส่งผลให้ผิวของผู้ที่เป็นไม่น่ามองจนอาจขาดความมั่นใจได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำสารหลายชนิดมาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบต่างๆ เพื่อช่วยขจัดปัญหาดังกล่าว ได้แก่ สารกลุ่ม PPAR agonists, xanthines, retinoids และ lactic acid (Avram, 2004; Khan et al., 2010; Rawlings, 2006) รวมถึงสมุนไพรบางชนิด เช่น สารสกัดจากเป็ะก๊วย, ชะมดต้น เป็นต้น (Sainio, et al., 2000)

จากการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ลดเซลลูไลท์ในห้องทดลองของ Sainio และคณะ (2000) พบว่าสารที่ถูกนำมาใช้เป็นสารสำคัญมากที่สุด คือ caffeine เนื่องจากเป็นสารที่หาได้ง่ายและมีกลไกการออกฤทธิ์ลดเซลลูไลท์ผ่านหลายกลไกพร้อมกัน คือ ออกฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์ไขมันทำให้เกิดการสลายไขมัน โดยยับยั้งเอนไซม์ 3',5'-nucleotide phosphodiesterase ทำให้ cAMP ในเซลล์ไขมันสูงขึ้น เกิดการกระตุ้น protein kinase ทำให้เอนไซม์ triacylglycerol lipase อยู่ในรูปที่มีฤทธิ์สลาย triglyceride เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล (Rawlings, 2006) รวมถึงการกระตุ้น sodium pump ในเนื้อเยื่อไขมัน ส่งผลให้อิออน sodium

ไหลออกไปยังของเหลวนอกเซลล์ (extracellular fluid) เกิดการสลายไขมันขึ้นในที่สุด (Lesser et al., 1999) นอกจากนี้คาเฟอีนสามารถเพิ่มตัวรับ UCP-3 (uncoupling proteins) ในชั้นเนื้อเยื่อไขมัน ทำให้เนื้อเยื่อไขมันถูกเปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย (Rawlings, 2006)

การศึกษาความสามารถในการลดเซลล์ลูไลท์ของ caffeine ในสัตว์ทดลองพบว่าเจลที่ผสม caffeine 5% w/w เมื่อทาบนผิวหนังร่วมกับการใช้ ultrasound เป็นระยะเวลา 15 วันสามารถลดความหนาของเนื้อเยื่อไขมันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการทำลายเซลล์ไขมันจนจำนวนเซลล์มีขนาดลดลง ในส่วนตำรับเจลที่ผสม caffeine เพียงอย่างเดียวไม่ได้ผลเช่นเดียวกับการใช้ ultrasound มาช่วยเนื่องจาก ultrasound ช่วยเพิ่มการซึมผ่านของ caffeine ลงไปในชั้นผิวหนัง (Velasco et al., 2008) และจากการศึกษาโดยใช้หนูตัวเมียพบว่า ภายหลังจากทาอิมัลชันผสม caffeine 4% w/w และอิมัลชันผสม siloxanetriol alginate caffeine 6% w/w เป็นระยะเวลา 21 วันสามารถลดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไขมันได้ 17% และ 16% ตามลำดับ ในขณะที่ตำรับที่เป็นเจลไม่สามารถลดได้เนื่องจากเจลไม่สามารถนำส่งสารสำคัญไปยังจุดออกฤทธิ์ได้ (Pires-de-Campos et al., 2008)

แม้ caffeine จะมีฤทธิ์ในการลดเซลล์ลูไลท์ได้แต่ด้วยตัวของสารเองไม่สามารถลงไปถึงยังจุดออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อไขมัน ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาระบบนำส่ง caffeine เพื่อใช้ในการรักษาเซลล์ลูไลท์ โดยระบบที่สนใจศึกษา คือ อีลาสติกลิโปโซมซึ่งเป็นลิโปโซมประเภทหนึ่งโดยมีความยืดหยุ่น (elasticity) สูงกว่าลิโปโซมแบบดั้งเดิม ความยืดหยุ่นนี้เกิดจากส่วนประกอบสำคัญในโครงสร้างผนังไขมันที่เรียกว่า edge activator ระบบนี้ถูกคิดค้นขึ้นครั้งแรกโดย Gregor Cevc ในปีค.ศ. 1992 และให้ชื่อการค้าว่า Transfersomes[®] ซึ่งประกอบด้วย soya phosphatidylcholine และ sodium cholate (Cevc and Blume, 1992)

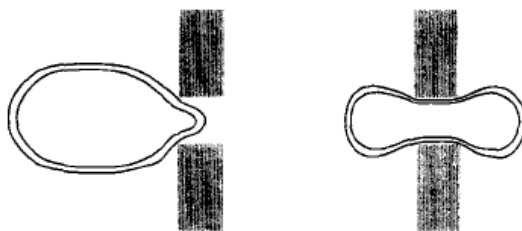
ระบบอีลาสติกลิโปโซม

ระบบอีลาสติกลิโปโซมประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน (Benson et al., 2009) คือ สารไขมัน สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และตัวเพิ่มการซึมผ่าน (enhancer) สารไขมันที่นิยมใช้ คือ phosphatidylcholine ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติ ในการเตรียมอีลาสติกลิโปโซมจะเรียกสารลดแรงตึงผิวว่า edge activator โดยสารลดแรงตึงผิวจะไปแทรกตัวอยู่ระหว่างสารไขมันเกิดเป็นผนังของอีลาสติกลิโปโซมที่มีความยืดหยุ่นส่งผลให้กลไกในการซึมผ่านผิวหนังแตกต่างจากลิโปโซมแบบดั้งเดิม สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้ คือ sodium cholate, deoxycholate, Span[®], Tween[®] และ dipotassium glycyrrhizinate นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารอื่นที่ไม่ใช่สารลดแรงตึงผิวเป็น edge activator ได้ เช่น oleic acid และ limonene เป็นต้น ในส่วนของตัวเพิ่มการซึมผ่านนิยมใช้ ethanol โดยปริมาณที่ใช้ในตำรับมักไม่เกิน 10% แต่ในบางการศึกษาอาจใช้ปริมาณ ethanol ที่มากขึ้น เช่น การใช้อีลาสติกลิโปโซมที่มี ethanol ในตำรับ 15% ในการนำส่งสาร

catechin ไปยังสมอง (Huang et al., 2011) ethanol จะช่วยให้ขนาดของอิลาสติกลีโปโซมเล็กลงรวมถึงเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังด้วย

กลไกการนำส่ง

อิลาสติกลีโปโซมมีผนังที่ยืดหยุ่นต่างจากลิโปโซมแบบดั้งเดิมทำให้อิลาสติกลีโปโซมสามารถผ่านช่องที่มีขนาดเล็กกว่าตัวเอง 3-5 เท่าได้ดังแสดงในรูปที่ 3 (Cevc et al., 1995) ดังนั้นอิลาสติกลีโปโซมจึงสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่าลิโปโซมแบบดั้งเดิมที่ส่วนใหญ่จะอยู่เพียงผิวหนังชั้นนอกสุด (stratum corneum) เท่านั้น กลไกการผ่านผิวหนังที่สำคัญของอิลาสติกลีโปโซม คือ อิลาสติกลีโปโซมจะผ่านชั้นผิวหนังชั้นนอกสุดอย่างรวดเร็วโดยการลอดผ่านรอยต่อขนาดเล็กซึ่งมีความกว้างน้อยกว่า 0.1 ไมโครเมตร ระหว่าง horny cell ซึ่งมี quasi-lamella lipid อยู่ โดยภายหลังผ่านรอยต่อแล้วอิลาสติกลีโปโซมจะมีขนาดเท่าเดิมไม่เปลี่ยนแปลง การเคลื่อนตัวของอิลาสติกลีโปโซมจะอาศัยความแตกต่างระหว่างปริมาณน้ำในหนังกำพร้าชั้นนอกสุดกับน้ำในชั้นผิวที่อยู่ลึกลงไป หนังกำพร้าชั้นนอกสุดจะเป็นส่วนที่แห้งประกอบด้วยน้ำเพียง 15% ในขณะที่ผิวที่อยู่ลึกลงไปอย่างในชั้น basal layer มีน้ำมากกว่าถึง 5 เท่า ดังนั้นเมื่อทาอิลาสติกลีโปโซมลงบนผิวหนังจะเกิดการระเหยของน้ำทำให้เกิดแรงดันอิลาสติกลีโปโซมลงไป และถ้าใช้ในลักษณะ non-occlusive อิลาสติกลีโปโซมจะสามารถนำส่งสารลงไปชั้นผิวที่ลึกมากขึ้นจนถึงระบบไหลเวียนโลหิตได้ (Cevc and Blume, 1992)



รูปที่ 3 แสดงการผ่านช่องที่มีขนาดเล็กกว่าตัวมันเองของอิลาสติกลีโปโซม

(Cevc et al., 1995)

การเตรียมอิลาสติกลิโพโซม (อรัญญาและจิระเดช., 2550)

อิลาสติกลิโพโซมสามารถเตรียมได้จากหลายวิธี เริ่มตั้งแต่แบบดั้งเดิมที่ใช้มือเขย่า (hand-shaken) จนถึงเทคนิคต่างๆ เช่น การระเหย (rotary evaporation), การอัดด้วยความดันสูง (high pressure homogenization) เป็นต้น โดยวิธีที่นิยมในห้องปฏิบัติการ คือ การระเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ในการเตรียมขั้นตอนแรกจะละลายเฟสไขมันในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก เหลือแต่ไขมันแห้งติดเป็นฟิล์มบางๆ เคลือบอยู่บนผิวแก้ว ถ้าสารหรือยาที่ต้องการกักเก็บละลายในน้ำมัน ต้องนำมาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์พร้อมกับไขมัน ถ้าสารหรือยาที่ต้องการกักเก็บละลายน้ำต้องนำมาละลายน้ำก่อน จากนั้นเติมสารละลายน้ำที่อาจมีตัวยาหรือไม่มีตัวยาแต่ในสารละลายน้ำนี้มักมี ethanol ผสมอยู่ด้วยลงบนแผ่นฟิล์ม แผ่นฟิล์มจะค่อยๆ หลุดออกมาเป็นลักษณะคอลลอยด์ของอิลาสติกลิโพโซม

การตรวจสอบคุณสมบัติอิลาสติกลิโพโซม

การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของอิลาสติกลิโพโซม คือ ตรวจสอบการเกิด bilayer โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด polarized-light microscope จะต้องพบลักษณะ maltese cross (Manosroi et al., 2003) คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของอิลาสติกลิโพโซม คือ ความยืดหยุ่นของผนังโดยวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง dynamic light scattering (Prajapati et al., 2011) โดยขนาดอนุภาคก่อนและหลังการ extrusion ผ่าน polycarbonate membrane ที่มีขนาดเล็กกว่าอนุภาคไม่มีการเปลี่ยนแปลง

อิลาสติกลิโพโซมเป็นระบบที่พัฒนาขึ้นเพื่อนำส่งสารจึงต้องมีการประเมินความสามารถในการกักเก็บสาร (%Entrapment efficacy) โดยขั้นตอนการปฏิบัติ คือ แยกอิลาสติกลิโพโซมออกจากสารที่ไม่ถูกกักเก็บก่อนซึ่งอาจใช้วิธีการปั่นด้วยแรงเหวี่ยงสูง (ultracentrifugation) หลังจากปั่นเหวี่ยง อิลาสติกลิโพโซมจะตกตะกอนนอนก้น (sediment) วิเคราะห์หาปริมาณสารหรือยาที่ไม่ได้ถูกกักเก็บในอิลาสติกลิโพโซมจากสารละลายน้ำเหนือตะกอน (supernatant) นำค่าดังกล่าวมาคำนวณหาร้อยละการกักเก็บสารในอิลาสติกลิโพโซมจากสมการต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละการกักเก็บสาร} = \frac{\text{ปริมาณ caffeine ทั้งหมด} - \text{ปริมาณ caffeine ในส่วนใส}}{\text{ปริมาณ caffeine ทั้งหมด}} \times 100$$

ประโยชน์ของอิลาสติกลิโพโซมในการนำส่งสารทางผิวหนัง

มีการศึกษาการใช้ระบบอิลาสติกลิโพโซมในการนำส่งยาหลายชนิดทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง ได้แก่ ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ เป็นต้น มีการศึกษาเปรียบเทียบตำรับยา diclofenac ในรูปแบบอิลาสติกลิโพโซมและไฮโดรเจลพบว่าระบบอิลาสติกลิโพโซมสามารถนำส่งยาได้ดีกว่า (Cevc and Blume, 2001) ในการศึกษาการนำส่งยา corticosteroid (Cevc et al., 1997) และ triamcinolone acetonide (Cevc and Blume, 2003) ในรูปแบบอิลาสติกลิโพโซมเปรียบเทียบกับตำรับครีมและโลชันที่มีขายในท้องตลาด พบว่าอิลาสติกลิโพโซมช่วยให้รอยโรคในสัตว์ทดลองหายได้เร็วกว่า นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้ระบบอิลาสติกลิโพโซมในการนำส่งโปรตีน ได้แก่ insulin พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองได้ (Guo et al., 2000) และมีการใช้อิลาสติกลิโพโซมในการเป็น non-invasive vaccine ด้วยการศึกษาจากความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับ tetanus toxoid จากตำรับอิลาสติกลิโพโซม, ลิโพโซม, นีโอโซมและโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) พบว่าระบบนำส่งอิลาสติกลิโพโซมสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เทียบเท่ากับการฉีดในขณะที่ระบบลิโพโซมและนีโอโซมกระตุ้นได้น้อยกว่า (Gupta et al., 2005)

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Phosphatidylcholine (Phospholipon[®] 90) Lot-No.:70060 Ident-No.:228183 Rhone-Poulenc Rorer
2. Chloroform Analytical Reagent Lot-No.:09 04 1093 Lab-Scan analytical science
3. Tween[®] 80 Lot-No.:16526 Croda
4. Span[®] 80 Namsiang
5. Absolute Ethanol (EMSURE[®]) Lot-No.:603-002-00-5 Merck KGaA
6. Caffeine Analytical Reagent Lot-No.:110M0067V Sigma-Aldrich
7. Caffeine Anhydrous
8. High Purity Nitrogen Lot-No.:1066 Thai Industrial Gas

วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

1. ปีกเกอร์ ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
2. Round bottom flask ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
3. Volumetric flask ขนาด 10, 50, 100, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
4. Volumetric pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร
5. Measuring pipette ขนาด 2, 3, 10 และ 20 มิลลิลิตร
6. Micropipette
7. Micropipette tips
8. Positive-displacement pipette
9. Positive-displacement pipette tips & pistons
10. LiposoFast[™] (Avestin Inc.)
11. หลอดทดลอง

12. Rack
13. Cuvette (Starna Scientific Ltd.)
14. Plastic Cuvette for Zeta sizer
15. Centrifuge Bottles (Beckman)
16. Dropper
17. กระจกนาฬิกา
18. Stirring rod แท่งแก้วคน
19. Slide
20. Coverglass
21. Micro spatula
22. ขวดแก้วสี่ขา
23. ช้อนเขา
24. Ground Glass
25. Parafilm[®]
26. Aluminium Foil
27. ลูกยาง
28. Pasteur pipette

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. Rotary evaporator (Bushi Rotavapor R-215)
2. Vortex-Genie[®] 2
3. Sonicator (Elma[®] Transsonic Digital S)
4. UV-Visible Recording Spectrophotometer (Shimadzu)
5. Zeta Sizer Nano series (Malvern)
6. Ultracentrifuge (Beckman L-80)
7. กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E 200)
8. Analytical Balances 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo PG-S)
9. Analytical Balances 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo AG)

10. Analytical Balances 5 ตำแหน่ง (Mettler Toledo AX)
11. Hot-air oven (Memmert[®])

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาผลของความเข้มข้นของ total lipid ต่อการเกิดลิโปโซม

องค์ประกอบของลิโปโซมที่สำคัญ คือ Phospholipid ซึ่งเป็นปัจจัยที่กำหนดคุณสมบัติของฟิล์มและความสามารถในการเกิดเป็นลิโปโซม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาผลของความเข้มข้นของ total lipid ที่ใช้ เพื่อพิจารณาเลือกความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถทำให้เกิดลิโปโซมได้ภายใต้ข้อจำกัดของวิธีการและเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมลิโปโซม lipid ที่ใช้ คือ Soybean Phosphatidylcholine (SPC) โดยศึกษา 3 ความเข้มข้น คือ 60 มิลลิกรัม, 90 มิลลิกรัม และ 120 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร การศึกษาประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

- 1.1 การเตรียมลิโปโซมด้วยวิธี film hydration โดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Touitou (Touitou, 1996) คือ ปิเปตเฟสไขมัน (lipid phase) ได้แก่ SPC (ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม ใน chloroform 1 มิลลิลิตร) ตามปริมาตรที่คำนวณได้ (ภาคผนวก ข) ใส่ลงใน round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตรและเจือจางด้วย chloroform จนครบปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปติดตั้งกับเครื่อง rotary evaporator (Bushi rotavapor R-215) ตั้งความเร็วรอบหมุน 100 rpm ความดัน 200 mBar ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นปรับความดันลดลงจาก 200 เป็น 150, 100 , 50 และ 30 mBar ตามลำดับโดยเว้นระยะเวลาระหว่างความดันแต่ละช่วงตามความเหมาะสมขึ้นกับความเข้มข้นของไขมัน หลังจาก that chloroform ระเหยจนหมดเก็บฟิล์มที่ได้ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปศึกษาลักษณะของฟิล์มที่ได้ต่อไป โดยการสังเกตลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่าและคัดเลือกปริมาณ total lipid จาก 3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเกิดฟิล์มที่มีความหนาสม่ำเสมอและมีขอบเรียบเนียน
- 1.2 การเตรียมลิโปโซมโดยใช้ปริมาณ total lipid ที่คัดเลือกจาก 1.1 ไฮเดรตฟิล์มโดยปิเปต ultrapure[®] water ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงใน round bottom flask ที่มีฟิล์มอยู่ จากนั้นนำไปติดตั้งกับเครื่อง rotary evaporator ความเร็วรอบหมุน 150 rpm สลับกับการ vortex โดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับลักษณะของ lipid dispersion ที่ได้ ลดขนาดของลิโปโซมด้วยการ sonicate 10 นาทีด้วยเครื่อง Sonicator (Elma[®] Transsonic Digital S) เก็บลิโปโซมที่ได้ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติของลิโปโซมต่อไป

1.3 การประเมินคุณสมบัติของลิโปโซมที่เกิดขึ้น ประเมินจาก

1.3.1 ลักษณะภายนอกโดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

1.3.2 ลักษณะของ vesicle โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E200)

1.3.3 การเกิด bilayer โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด polarized-light

(Manosroi et al., 2003)

เลือกความเข้มข้นสูงสุดของ total lipid ที่ทำให้เกิดลิโปโซมที่สมบูรณ์เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป โดยมีเกณฑ์ว่าลิโปโซมที่เกิดขึ้นต้อง

1. มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นขาว กระจายเป็นเนื้อเดียวคล้ายน้ำมัน ไม่พบเศษของไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. พบลักษณะ maltese cross เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด polarized-light

2. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของ edge activator และความเข้มข้นของ ethanol ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม

อิลาสติกลิโปโซม คือ ลิโปโซมที่มีส่วนประกอบของ Phospholipid, edge activator และ ethanol ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ Tween[®] 80 และ Span[®] 80 ความเข้มข้น 5, 10, 15 % w/w และใช้สารละลาย ethanol 7, 10, 15 % w/w ในน้ำเป็นเฟสน้ำ (aqueous phase) โดยใช้ความเข้มข้นของ total lipid จากการศึกษาในข้อ 1 ดังนั้นส่วนประกอบของสูตรตำรับที่ศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยรหัสของสูตรตำรับที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 ประกอบด้วย edge activator, % ของ edge activator ที่ใช้และ % ethanol ที่ใช้

ตัวอย่างสูตร T10-7: T คือ Tween[®] 80

10 คือ Tween[®] 80 10% w/w

7 คือ ใช้สารละลาย ethanol 7% w/w ในการไฮเดรต

ตัวอย่างสูตร S15-10: S คือ Span[®] 80

15 คือ Span[®] 80 15% w/w

10 คือ ใช้สารละลาย ethanol 10% w/w ในการไฮเดรต

ตารางที่ 1 แสดงรหัสสูตรตำรับและส่วนประกอบของอิมัลชันลิโปโซมที่ใช้ในการทดลอง

รหัสสูตรตำรับ	Total lipid (%w/w)			สารละลายที่ใช้ไฮเดรต
	SPC	Tween [®] 80	Span [®] 80	Ethanol (%w/w)
T15-15	85	15	-	15
T15-10	85	15	-	10
T15-7	85	15	-	7
T10-15	90	10	-	15
T10-10	90	10	-	10
T10-7	90	10	-	7
T5-15	95	5	-	15
T5-10	95	5	-	10
T5-7	95	5	-	7
S15-15	85	-	15	15
S15-10	85	-	15	10
S15-7	85	-	15	7
S10-15	90	-	10	15
S10-10	90	-	10	10
S10-7	90	-	10	7
S5-15	95	-	5	15
S5-10	95	-	5	10
S5-7	95	-	5	7

2.1 การเตรียมอิมัลชันลิโปโซมด้วยวิธี film hydration โดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Touitou (Touitou, 1996) คือ ปิเปต SPC (ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม ใน chloroform 1 มิลลิลิตร), edge activator

(ความเข้มข้น 1 กรัม ใน chloroform 10 มิลลิลิตร) ตามปริมาตรที่คำนวณได้ (ภาคผนวก ข) ใส่ลงใน round bottom flask และเจือจางด้วย chloroform จนครบปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปติดตั้งกับเครื่อง rotary evaporator ตั้งความเร็วรอบหมุนและความดันตามความเหมาะสมของสูตรตำรับ ภายใต้สภาวะสุญญากาศ หลังจากที่ chloroform ระเหยจนหมด เก็บฟิล์มที่ได้ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปศึกษาลักษณะของฟิล์มที่ได้ต่อไป คัดเลือกสูตรตำรับที่ทำให้เกิดฟิล์มโดยใช้เกณฑ์เช่นเดียวกับข้อ 1.1

2.2 การเตรียมอิลาสติกลิโปโซมจากสูตรตำรับที่ให้ผลการเกิดฟิล์มดีจากการประเมินในข้อ 2.1 โดยนำฟิล์มที่ได้มาไฮเดรตด้วยวิธีเดียวกับข้อ 1.2 แต่เปลี่ยนจาก ultrapure[®] water เป็นสารละลาย ethanol (ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นกับสูตรตำรับ) เก็บอิลาสติกลิโปโซมที่ได้ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพต่อไป

2.3 ประเมินคุณสมบัติของอิลาสติกลิโปโซมที่เกิดขึ้นดังนี้

2.3.1 ลักษณะภายนอกโดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

2.3.2 ลักษณะของ vesicle โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3.3 การเกิด bilayer โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด polarized-light (Manosroi et al., 2003)

2.3.4 คุณสมบัติความยืดหยุ่นของผนังอิลาสติกลิโปโซม โดยวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Zeta sizer (Malvern, Nano series) เปรียบเทียบก่อนและหลังการ extrude ผ่าน polycarbonate membrane ที่มีขนาดเล็กกว่าอนุภาค 5 เท่า

เลือกสูตรตำรับที่ทำให้เกิดอิลาสติกลิโปโซมที่สมบูรณ์เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป โดยมีเกณฑ์ว่าอิลาสติกลิโปโซมต้อง

1. มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นขาว กระจายเป็นเนื้อเดียวคล้ายน้ำมัน ไม่พบเศษของไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. พบลักษณะ maltese cross เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ polarized-light
3. ขนาดของอิลาสติกลิโปโซมก่อนและหลังผ่าน polycarbonate membrane ไม่ต่างกัน

3. การศึกษาผลของสูตรตำรับอิลาสติกลิโพโซมต่อความคงตัวทางกายภาพ

ศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับอิลาสติกลิโพโซมภายหลังการเตรียม 7 วันเพื่อให้แน่ใจว่าสูตรตำรับที่ผ่านการคัดเลือกนั้นคงสภาพอยู่ตลอดการทดลอง โดยเก็บตำรับอิลาสติกลิโพโซมที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาที่ 2 ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน และประเมินคุณสมบัติของอิลาสติกลิโพโซมเช่นเดียวกับข้อ 2

เลือกสูตรตำรับที่มีความคงตัวทางกายภาพ คือ คุณสมบัติทางกายภาพที่ประเมินในข้อ 2 ทุกคุณสมบัติต้องไม่เปลี่ยนแปลง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4. การศึกษาผลของ caffeine ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโพโซม

4.1 การหาค่าการละลายอิมตัวของ caffeine ในสารละลาย ethanol ที่อุณหภูมิ 4 °C

หาค่าการละลายอิมตัวของ caffeine ในสารละลาย ethanol ที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่งใช้เป็นเฟสน้ำของอิลาสติกลิโพโซมในการศึกษาขั้นต่อไป

4.1.1 การวิเคราะห์ caffeine ในสารละลาย ethanol ความเข้มข้น 7, 10 และ 15% โดยวิธี UV Spectrophotometry (Lun et al., 1995)

1. วิธีการหา λ_{max} คือ scan caffeine ในสารละลาย ethanol ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 200-440 nm แล้วเลือก λ ที่มีค่า absorbance สูงสุดซึ่งเป็น λ_{max} ของการวิเคราะห์ caffeine
2. วิธีการทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่ง caffeine 0.03 กรัม ใส่ลง volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย ethanol ความเข้มข้นที่ต้องการ ให้ได้สารละลาย caffeine 8 ความเข้มข้น ($0.0393 \times 10^{-5} - 3.0000 \times 10^{-5}$ กรัม/มิลลิลิตร) วัดค่าการดูดกลืนแสงของ caffeine แต่ละความเข้มข้นที่ λ_{max} ที่ได้จากข้อ 1 นำข้อมูลที่ได้ไปวาดกราฟมาตรฐาน

4.1.2 การหาค่าการละลายอิมตัวของ caffeine ใน ethanol ความเข้มข้น 7, 10 และ 15%

1. เตรียมสารละลาย caffeine ใน ethanol ความเข้มข้น 7, 10 และ 15% โดยชั่ง caffeine 0.02 กรัมละลายในสารละลาย ethanol 15 มิลลิลิตร เร่งการละลายด้วยการ vortex และ sonicate จนได้สารละลายใส
2. เก็บสารละลายในข้อ 2 ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 วัน สังเกตสารละลายที่ได้ หากยังเป็นสารละลายใสให้เติม caffeine เพิ่มครั้งละ 0.02 กรัม เก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 1 วันอีกครั้งก่อนจะนำมาสังเกตใหม่ ทำเช่นนี้จนพบตะกอนของ caffeine
3. กรองสารละลาย caffeine อิมตัวที่ได้จากข้อ 2 วิเคราะห์ความเข้มข้นอิมตัวโดยใช้วิธี UV Spectrophotometry ที่ได้จากข้อ 4.1.1 คำนวณหาค่าความเข้มข้น 90% ของความเข้มข้นอิมตัวเพื่อใช้เป็นเฟสน้ำของอิลาสติกลิโปโซมต่อไป

4.2 การศึกษาผลของ caffeine ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม

เตรียมอิลาสติกลิโปโซมจากสูตรตำรับที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาที่ 2 โดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 2 แต่ใช้สารละลาย 90% ของสารละลาย caffeine อิมตัวที่ได้จากข้อ 4 เป็นเฟสน้ำ ประเมินการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซมเช่นเดียวกับข้อ 3 โดยในตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของสูตรตำรับทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา ประเมินคุณสมบัติของอิลาสติกลิโปโซมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับข้อที่ 2 และเลือกสูตรตำรับที่เกิดอิลาสติกลิโปโซมที่มีคุณสมบัติเหมาะสมโดยใช้เกณฑ์เช่นเดียวกับข้อ 2 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงรหัสสูตรตำรับและส่วนประกอบของอิลาสติกลิโปโซมที่ใช้ในการทดลอง

รหัสสูตรตำรับ	Total lipid (%w/w)			สารละลายที่ใช้ไฮเดรต
	SPC	Tween [®] 80	Span [®] 80	
T5-7/C	95	5	-	90% ของสารละลาย caffeine อิมตัวใน ethanol ความเข้มข้นต่างๆ
T5-10/C	95	5	-	
T5-15/C	95	5	-	
T10-7/C	90	10	-	
T10-10/C	90	10	-	
T10-15/C	90	10	-	

ตารางที่ 2 แสดงชื่อสูตรตำรับและส่วนประกอบของอิลาสติกลิโปโซมที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

สูตรตำรับ	Total lipid (%w/w)			สารละลายที่ใช้ไฮเดรต
	SPC	Tween [®] 80	Span [®] 80	
T15-7/C	85	15	-	90% ของสารละลาย caffeine อิมตัวใน ethanol ความเข้มข้นต่างๆ
T15-10/C	85	15	-	
T15-15/C	85	15	-	
S5-7/C	95	-	5	
S5-10/C	95	-	5	
S5-15/C	95	-	5	
S10-7/C	90	-	10	
S10-10/C	90	-	10	
S10-15/C	90	-	10	
S15-7/C	85	-	15	
S15-10/C	85	-	15	
S15-15/C	85	-	15	

หมายเหตุ: /C หมายถึง caffeine

5. การศึกษาผลของ caffeine ต่อความคงตัวทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม

ศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซมที่ไฮเดรตด้วยสารละลาย caffeine ใน ethanol ภายหลังจากเตรียม 7 วันเพื่อให้แน่ใจว่าสูตรตำรับที่ผ่านการคัดเลือกนั้นคงสภาพอยู่ตลอดการทดลอง โดยเก็บตำรับอิลาสติกลิโปโซมที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาที่ 4.2 ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน และประเมินคุณสมบัติของอิลาสติกลิโปโซมเช่นเดียวกับข้อ 2 และคัดเลือกสูตรตำรับที่มีความคงตัวทางกายภาพเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

6. การหาค่าความสามารถในการกักเก็บ caffeine ของสูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซมที่ผ่านการคัดเลือก

วิเคราะห์ปริมาณ caffeine และคำนวณค่าร้อยละการกักเก็บสาร (% Entrapment) ในอิลาสติกลิโปโซม โดย เตรียมอิลาสติกลิโปโซมที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาที่ 5 โดยใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 4.2 ปั่นเหวี่ยงอิลาสติกลิโปโซมด้วยเครื่อง ultracentrifuge (Beckman L-80) ที่

ความเร็ว 60,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อแยกอีลาสติกลีโปโซมออกจาก caffeine ที่ไม่ได้ถูกกักเก็บซึ่งจะอยู่ในส่วนใส วิเคราะห์หาปริมาณ caffeine ในส่วนใสด้วยวิธี UV spectrophotometry ที่ได้จากข้อ 4.1.1 และคำนวณค่าร้อยละการกักเก็บสารในอีลาสติกลีโปโซมด้วยสูตร

$$\text{ร้อยละการกักเก็บสาร} = \frac{\text{ปริมาณ caffeine ทั้งหมด} - \text{ปริมาณ caffeine ในส่วนใส}}{\text{ปริมาณ caffeine ทั้งหมด}} \times 100$$

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ total lipid ต่อการเกิดลิโปโซม

การศึกษาผลของความเข้มข้นของ total lipid ต่อการเกิดลิโปโซมโดยใช้ปริมาณ total lipid 60, 90 และ 120 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตรพบว่าฟิล์มที่ได้จากตำรับที่มีปริมาณ total lipid ต่างกันจะมีลักษณะของฟิล์มแตกต่างกันโดยสัมพันธ์กับปริมาณ total lipid ที่เพิ่มขึ้น คือ สูตรตำรับที่มีปริมาณ total lipid 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร เกิดฟิล์มที่มีความบางสม่ำเสมอที่สุดและมีขอบเรียบเนียน ในขณะที่สูตรตำรับที่มีปริมาณ total lipid 120 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตรซึ่งสูงที่สุดในการทดลองทำให้เกิดฟิล์มที่มีลักษณะหนา ทึบไม่สม่ำเสมอและมีขอบขรุขระที่สุด สูตรตำรับที่มีปริมาณ total lipid 90 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตรทำให้เกิดฟิล์มที่มีลักษณะบางกว่าตำรับที่มี total lipid 120 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร ความหนาไม่สม่ำเสมอ ขอบฟิล์มขรุขระ ไม่เรียบเนียน (รูปที่ 4) จากผลการทดลองพบว่าความหนาของฟิล์มแปรผันตามความเข้มข้นของ total lipid ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากพื้นที่ในการเกิดฟิล์มมีเท่ากัน คือ พื้นที่ภายในพลาสติก ก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร และพบว่าความขรุขระของขอบฟิล์มแปรผันตามความเข้มข้นของ total lipid เช่นกัน เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ total lipid จะทำให้ปริมาณของ chloroform ลดลงซึ่งปริมาณของ chloroform ที่น้อยลงทำให้การกระจายของ total lipid ในพลาสติกไม่สม่ำเสมอเมื่อ chloroform ระเหยออกไปจึงเกิดเป็นฟิล์มขรุขระขอบไม่เรียบเนียนขึ้น

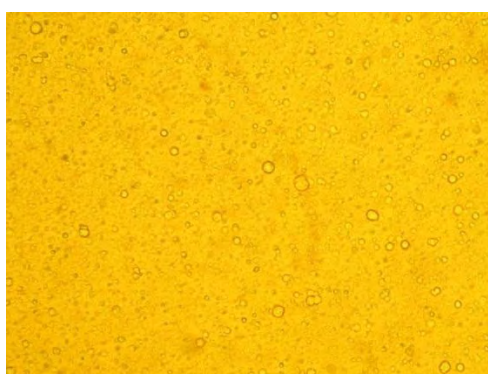
60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร	90 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร	120 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร
		

รูปที่ 4 ลักษณะฟิล์มที่เตรียมได้จาก total lipid ปริมาณต่างๆ

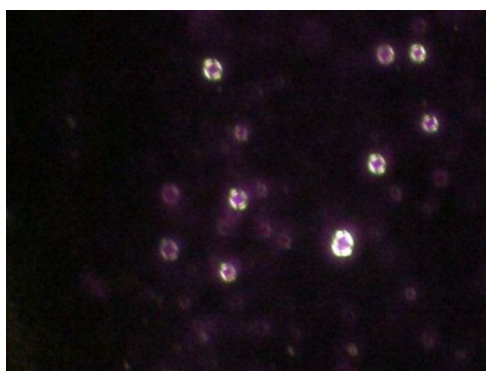
จากลักษณะฟิล์มที่เกิดขึ้นจึงเลือกความเข้มข้นของ total lipid 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร และไฮเดรตด้วยน้ำพบว่าสามารถไฮเดรตได้ง่ายและได้ lipid dispersion ที่ดีไม่มีเศษไขมันทิ้งที่มองเห็น ด้วยตา (รูปที่ 5) และมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 6) นอกจากนี้ยังพบลักษณะ maltese cross เมื่อนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงโพลาไรซ์ (รูปที่ 7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า vesicle ที่เกิดขึ้นนั้นมีลักษณะของ bilayer



รูปที่ 5 ลักษณะของ lipid dispersion ที่ได้จากการรับที่ใช้ SPC 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร



รูปที่ 6 ลักษณะของลิโปโซมเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (100x)

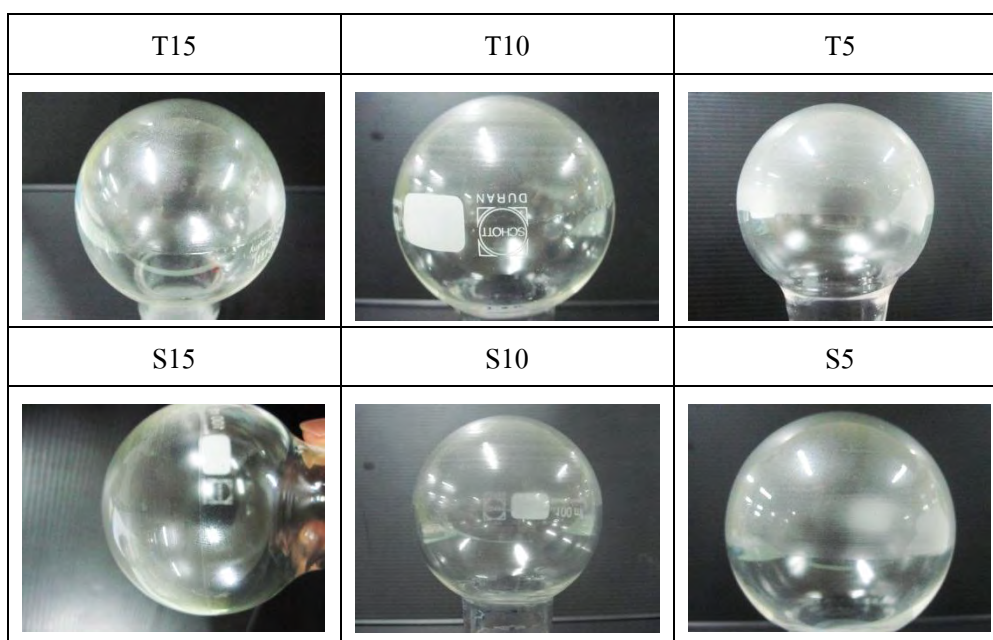


รูปที่ 7 ลักษณะ maltese cross ที่พบ จากการรับที่ใช้ SPC 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร (100x)

ดังนั้นปริมาณของ total lipid ที่เหมาะสมจะนำไปพัฒนาเป็นระบบนำส่งอิลาสติกลิโฟโซมต่อไปคือ 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร เพราะเป็นสูตรตำรับที่ทำให้เกิดฟิล์มที่ดี ไฮเดรตได้ง่ายและเกิดเป็นลิโฟโซมที่สมบูรณ์

2. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของ edge activator และ ethanol ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโฟโซม

ในการเตรียมอิลาสติกลิโฟโซมโดยใช้ปริมาณ total lipid ที่เลือกจากข้อ 1 คือ 60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร และปัจจัยที่สนใจศึกษา คือ ชนิดและความเข้มข้นของ edge activator ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเฟสไขมันต่อผลการเกิดฟิล์มและอิลาสติกลิโฟโซม และความเข้มข้นของ ethanol ซึ่งเป็นเฟสน้ำต่อผลการเกิดอิลาสติกลิโฟโซม พบว่าทุกสูตรตำรับสามารถเกิดฟิล์มบางและขอบเรียบ (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ลักษณะฟิล์มของสูตรตำรับต่างๆ ที่มีชนิดและปริมาณของ edge activator ต่างกัน

จากตารางที่ 3 เมื่อไฮเดรตฟิล์มที่ได้ด้วย ethanol ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสูตร S5-10, S5-15, S10-7, S10-10, S10-15, S15-7 และ S15-10 พบเศษไขมันและเกิดก้อนใสที่คาดว่าเป็น Span[®] 80 กระจายอยู่ทั่วเมื่อมองด้วยตาเปล่าดังรูปที่ 9 สูตรตำรับเหล่านี้จึงไม่ผ่านการคัดเลือก นอกจากนี้พบว่าเมื่อสังเกตลักษณะของ lipid dispersion ที่ได้จากสูตร S15-15 ด้วยตาเปล่าพบว่าได้ลักษณะที่ดีแต่เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์กลับพบเศษไขมันจำนวนมากดังรูปที่ 10 และไม่พบลักษณะ maltese cross จึงไม่ผ่านการคัดเลือกเช่นกัน

ตารางที่ 3 ผลการคัดกรองจุดทรรศน์ของสูตรตำรับต่างๆ

สูตรตำรับ	ผลการทดลอง		
	เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า	เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์	maltese cross
T15-15	×	×	✓
T15-10	×	×	✓
T15-7	×	×	✓
T10-15	×	×	✓
T10-10	×	×	✓
T10-7	×	×	✓
T5-15	×	×	✓
T5-10	×	×	✓
T5-7	×	×	✓
S15-15	×	✓	×
S15-10	✓	-	-
S15-7	✓	-	-
S10-15	✓	-	-
S10-10	✓	-	-
S10-7	✓	-	-
S5-15	✓	-	-
S5-10	✓	-	-
S5-7	×	×	✓

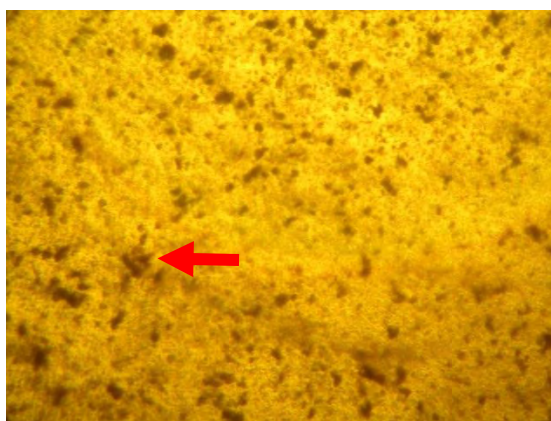
หมายเหตุ: ✓ คือ พบลักษณะตามที่ระบุ (เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า, เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์, ลักษณะ maltese cross)

× คือ ไม่พบลักษณะตามที่ระบุ (เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า, เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์, ลักษณะ maltese cross)

- คือ ไม่มีการสังเกต



รูปที่ 9 แสดงลักษณะของอิลาสติกลิโพโซมที่ไม่ผ่านการคัดเลือก



รูปที่ 10 สุนทร S15-15 เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (100x)

ลักษณะที่ได้หลังไฮเดรตของสูตรตำรับอื่นๆ ได้แก่ T5-7, T5-10, T5-15, T10-7, T10-10, T10-15, T15-7, T15-10, T15-15 และ S5-7 มีลักษณะที่ดีดังรูปที่ 11 คือ ไม่พบเศษไขมันทั้งวิธีสังเกตด้วยตาและสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังแสดงในรูปที่ 12 รวมถึงพบลักษณะ maltese cross ดังแสดงในตารางที่ 3 จากผลการศึกษานี้พบว่าทุกสูตรตำรับที่ใช้ Tween[®] 80 เป็น edge activator เกิดเป็นอิลาสติกลิโพโซมที่สมบูรณ์ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดเหตุการณ์นี้อาจเกิดจากโมเลกุลของ Span[®] 80 ที่มากกว่า Tween[®] 80 เมื่อเทียบเป็นโมลดังแสดงในตารางที่ 4 ทำให้ bilayer ที่เกิดขึ้นมีโมเลกุลของ Span[®] 80 มากเกินไปทำให้ไม่สามารถเกิด vesicle ได้ ดังนั้นจึงเลือกตำรับที่เกิดอิลาสติกลิโพโซมที่ดีเพื่อใช้ศึกษาต่อไปในขั้นตอนการศึกษาคุณสมบัติความยืดหยุ่นของผนัง vesicle ต่อไป

ตารางที่ 4 อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง edge activator และ SPC

สูตรตำรับ	Edge activator: SPC (โมล)
T15	1.030:1
T10	0.647:1
T5	0.307:1
S15	3.194:1
S10	2.014:1
S5	0.946:1



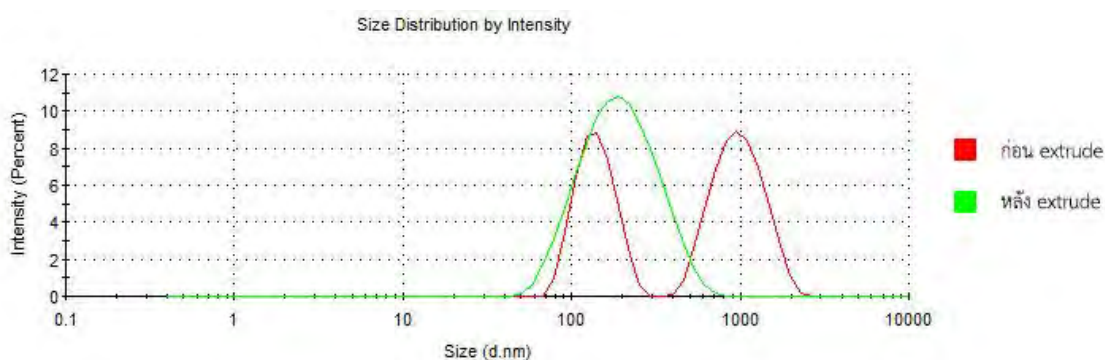
รูปที่ 11 แสดงลักษณะของอิลาสติกลิโโซมที่ผ่านการคัดเลือก



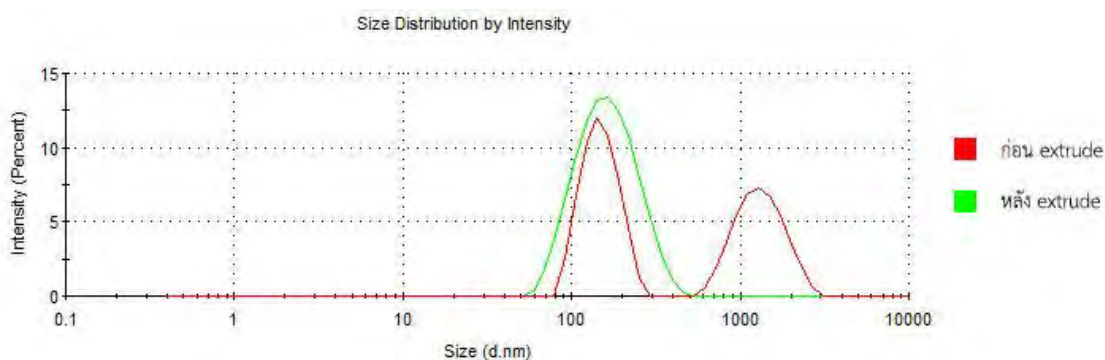
รูปที่ 12 แสดงลักษณะของอิลาสติกลิโโซมที่ผ่านการคัดเลือกเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (100x)

การศึกษาคูณสมบัติความยืดหยุ่นของอิลาสติกลิโโซมของสูตรตำรับพบว่าสูตรตำรับ T10-7, T15-7 และ S5-7 มีความยืดหยุ่นเนื่องจากเมื่อ extrude ผ่านเมมเบรนขนาด 100 nm ซึ่งเป็นขนาดเล็กกว่าอิลาสติกลิโโซมประมาณ 2-3 เท่า พบว่าขนาดของอนุภาคไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักดังแสดงในรูป 13-15 กราฟก่อนการ extrusion ของสูตรตำรับ T15-7 และ T10-7 (รูปที่ 13-14) ประกอบด้วย 2 peak

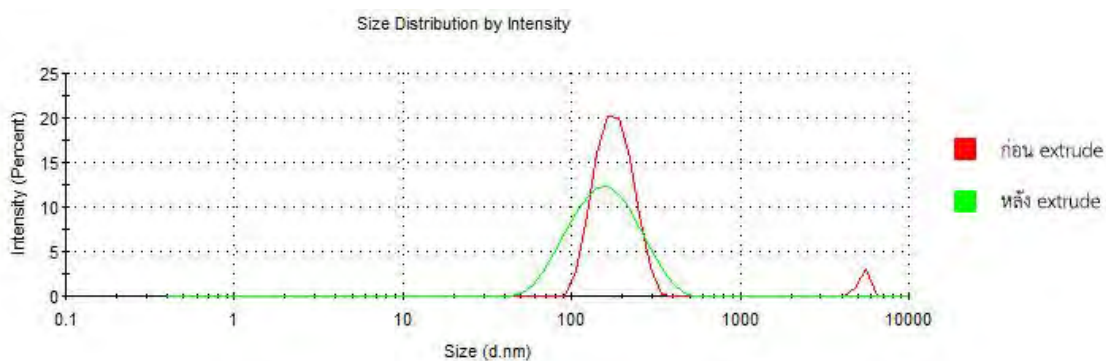
และ peak ที่สองมีขนาดอนุภาคประมาณ 1,000 nm ซึ่งไม่สามารถผ่าน polycarbonate membrane ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 เท่าได้โดยที่ไม่แตก ในขณะที่ peak แรกแสดงให้เห็นถึงขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า peak ที่ 2 จึงสามารถผ่าน polycarbonate membrane ได้โดยขนาดไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นหากต้องการตรวจสอบคุณสมบัติความยืดหยุ่นของสูตรตำรับ T10-7 และ T15-7 อย่างสมบูรณ์ควรใช้ polycarbonate membrane ที่มีขนาดประมาณ 200 nm ในการ extrusion รอบแรกเพื่อประเมินคุณสมบัติความยืดหยุ่นของลิโปโซมที่อยู่ในส่วน peak ที่สองก่อนจะนำมา extrude อีกครั้งด้วย polycarbonate membrane ที่มีขนาดเล็กลงเพื่อประเมินคุณสมบัติความยืดหยุ่นของ ลิโปโซมใน peak แรก ทั้งนี้เพื่อให้สามารถประเมินคุณสมบัติความยืดหยุ่นได้อย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้นหรือหากต้องการข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้นควรแยกอิลาสติกลิโปโซมทั้ง 2 peak ออกจากกันก่อนแล้วจึง extrude ด้วย membrane ที่มีขนาดเหมาะสมต่อไป



รูปที่ 13 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrusion ของสูตรตำรับ T15-7



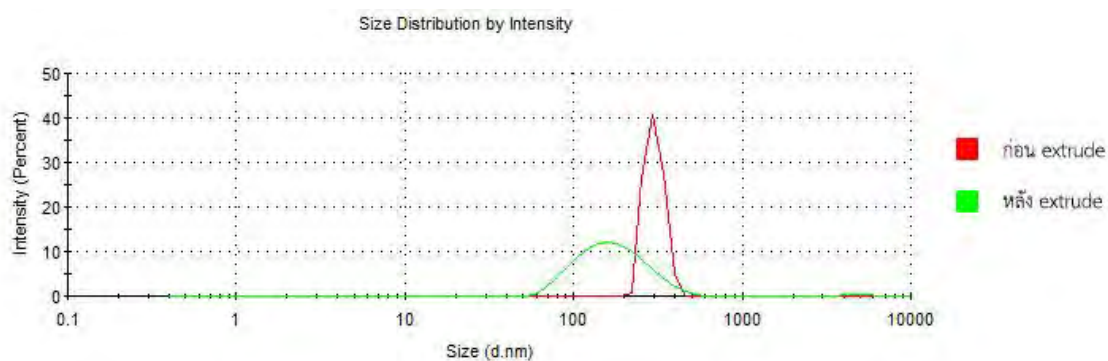
รูปที่ 14 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrusion ของสูตรตำรับ T10-7



รูปที่ 15 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrusion ของสูตรตำรับ S5-7

ต่อมาเมื่อพิจารณาลักษณะกราฟของสูตรตำรับอื่นๆนอกจาก T10-7, T15-7 และ S5-7 พบว่าสูตรตำรับดังกล่าวไม่มีคุณสมบัติความยืดหยุ่นเนื่องจากขนาดก่อนและหลัง extrude เปลี่ยนแปลงมากดังแสดงในรูปที่ 16 อนุภาคที่ผ่านการ extrusion มีขนาดเล็กกว่าขนาดเริ่มต้นและมีการกระจายขนาดกว้างขึ้น จึงสรุปได้ว่าสูตรตำรับที่ให้กราฟลักษณะนี้ไม่มีคุณสมบัติความยืดหยุ่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการคำนวณ %อีลาสติกลิโปโซมจากสัดส่วนของน้ำหนักพื้นที่กราฟ (ภาคผนวก ข) ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าสูตรที่ไม่มีคุณสมบัติความยืดหยุ่นจะมี %อีลาสติกลิโปโซมต่ำ นอกจากนี้ในกรณีของสูตรตำรับที่ใช้ Tween® 80 5% เป็น edge activator ซึ่งมีขนาดก่อน extrude ใหญ่กว่า polycarbonate membrane ที่ใช้ประมาณ 10 เท่า (ตารางที่ 6) ซึ่งไม่สามารถพิสูจน์คุณสมบัติความยืดหยุ่นได้ชัดเจนในการศึกษาเนื่องจากไม่มี membrane ขนาดเหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามสูตรตำรับดังกล่าวอาจจะไม่มีความยืดหยุ่นเนื่องจากมีขนาดใหญ่เกินกว่าขนาดของอีลาสติกลิโปโซมโดยทั่วไป (Benson et al., 2006; Cevc et al., 2001) ดังนั้นถ้าต้องการข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้นควรศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ membrane ที่มีขนาดประมาณ 200 nm ขึ้นไป

เมื่อพิจารณาขนาดของอีลาสติกลิโปโซมแต่ละสูตรตำรับในตารางที่ 6 แล้วพบว่าสูตรตำรับที่มีปริมาณ edge activator น้อยจะมีขนาดใหญ่ (Bergh BAI et al., 2001; Irfan M et al., 2012) เนื่องจากปริมาณ edge activator ที่น้อยลงจะทำให้ความโค้งของผนัง vesicle น้อยลงจึงทำให้ขนาดของ vesicle ใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าตำรับที่ใช้ Span® 80 มีขนาดเล็กกว่าตำรับที่ใช้ Tween® 80 ในอัตราส่วนโดยมวลเดียวกันคือสูตร S5-7 มีขนาด 196.1 nm ในขณะที่สูตร T5-7 มีขนาด 973.2 nm เนื่องจาก Span® 80 จะมีอัตราส่วนโดยโมลสูงกว่า Tween® 80 ที่อัตราส่วนโดยมวลเดียวกันทำให้ผนังของตำรับ S5-7 มีความโค้งมากกว่าตำรับ T5-7



รูปที่ 16 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrusion ของสูตรตำรับที่ไม่ผ่านการคัดเลือก (T15-10)

ตารางที่ 5 แสดง % อีลาสติกลีโพรซิมของสูตรตำรับต่างๆ

สูตรตำรับ	% อีลาสติกลีโพรซิม
T5-7	3.51
T5-10	28.82
T5-15	31.44
T10-7*(E)	58.48
T10-10	38.51
T10-15	26.37
T15-7*(E)	49.22
T15-10	26.64
T15-15	23.34
S5-7 (E)	63.85

*peak แรกของกราฟก่อน extrude ซ้อนอยู่ในกราฟหลังการ extrude ทั้งหมด (E) เกิดอีลาสติกลีโพรซิม

ตารางที่ 6 แสดงขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่างๆ

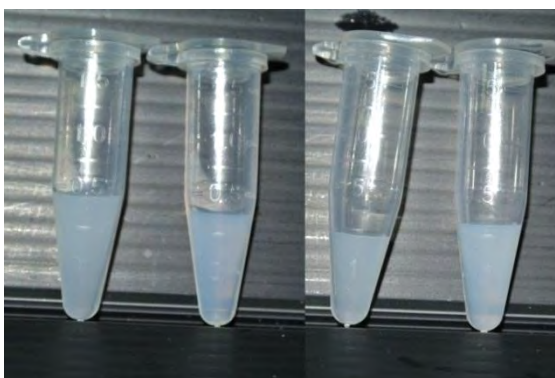
รหัส	Z-ave	Peak1	Peak2
T5-7	973.2	851.3	-
T5-10	882.4	371.9	-
T5-15	1214	301.3	-

ตารางที่ 6 แสดงขนาดอนุภาคของสูตรตำรับต่างๆ (ต่อ)

รหัส	Z-ave	Peak1	Peak2
T10-7	239.0	166.3	1653
T10-10	463.8	283.3	-
T10-15	438.8	314.6	-
T15-7	254.5	155.4	1276
T15-10	455.6	308.4	-
T15-15	397.4	293.5	-
S5-7	196.1	206.0	-

นอกจากนี้จากการศึกษานี้ยังพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อความยืดหยุ่นของผนังอิลาสติกลิโปโซมที่สำคัญ คือ ความเข้มข้นของ ethanol ที่ใช้ไฮเดรต ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสูตรตำรับที่มีความยืดหยุ่นคือ สูตรตำรับที่ใช้สารละลาย ethanol 7% ในการไฮเดรตซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ เนื่องจากถึงแม้ ethanol จะสามารถเพิ่มความยืดหยุ่นของผนัง bilayer ที่มี edge activator ได้ แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้โครงสร้างของผนัง bilayer ไม่คงตัว (Watcher, 2008)

นอกจากการประเมินคุณสมบัติความยืดหยุ่นโดยการวัดขนาดอนุภาคก่อนและหลังการ extrusion แล้วยังสามารถสังเกตเบื้องต้นได้จากความใสของ lipid dispersion ก่อนและหลังการ extrusion ซึ่งนำมาเป็นข้อมูลประกอบได้ จากการทดลองนี้พบว่าตำรับที่ไม่มีคุณสมบัติความยืดหยุ่นจะมีลักษณะของ lipid dispersion หลังผ่านการ extrusion ใสมาก่อน extrusion อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับตำรับที่มีความยืดหยุ่น (รูปที่ 17) แสดงให้เห็นว่า vesicle หลังผ่านการ extrusion แตกและมีขนาดเล็ก



รูปที่ 17 แสดงลักษณะของลิโปโซมที่ไม่มี ความยืดหยุ่น (คู่ซ้าย) และมีความยืดหยุ่น (คู่ขวา)

ดังนั้นสูตรตำรับที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการศึกษาต่อไปคือ T15-7, T10-7 และ S5-7 เนื่องจากให้ฟิล์มที่ดี ไฮดรอลิ์ได้ง่ายและได้อีลาสติกลีโพลิโไซมที่มีคุณสมบัติครบถ้วน

3. การศึกษาผลของสูตรตำรับอีลาสติกลีโพลิโไซมต่อความคงตัวทางกายภาพ

จากผลการเก็บอีลาสติกลีโพลิโไซมที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 3 ตำรับ คือ T15-7, T10-7 และ S5-7 ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน ไม่พบเศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ยังพบลักษณะ maltese cross เหมือนกับตารางที่ 3 (ตารางที่ 7) แสดงว่าทั้งสามตำรับยังมีลักษณะเป็น bilayer vesicle ซึ่งเป็นคุณสมบัติของลิโพลิโไซมอยู่

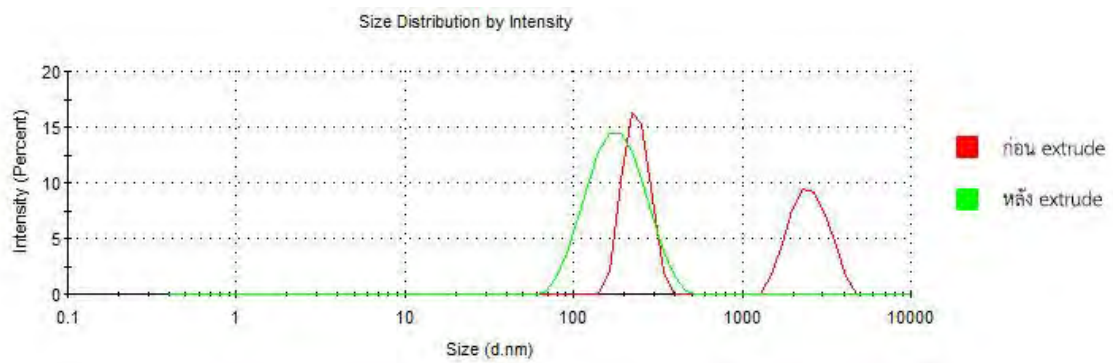
ตารางที่ 7 ผลการส่องกล้องจุลทรรศน์ของสูตรตำรับที่ผ่านการคัดเลือกหลังเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

สูตรตำรับ	ผลการทดลอง		
	เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า	เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์	maltese cross
T15-7	×	×	✓
T10-7	×	×	✓
S5-7	×	×	✓

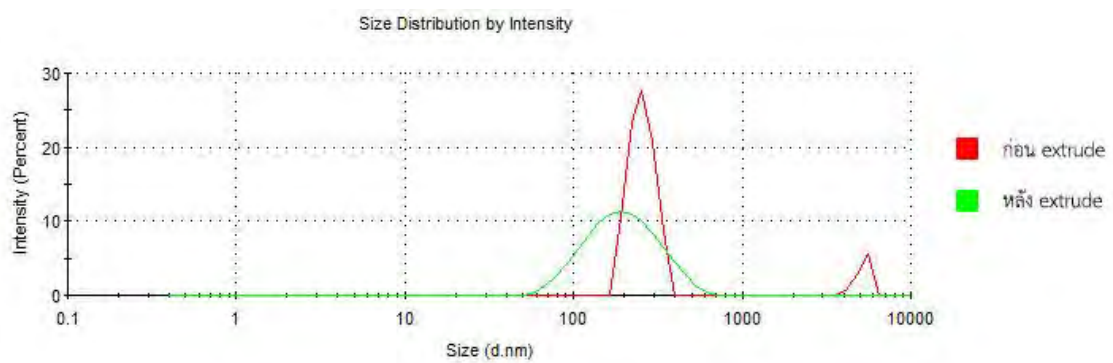
หมายเหตุ: ✓ คือ พบลักษณะตามที่ระบุ (เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า, เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์, ลักษณะ maltese cross)

× คือ ไม่พบลักษณะตามที่ระบุ (เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า, เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์, ลักษณะ maltese cross)

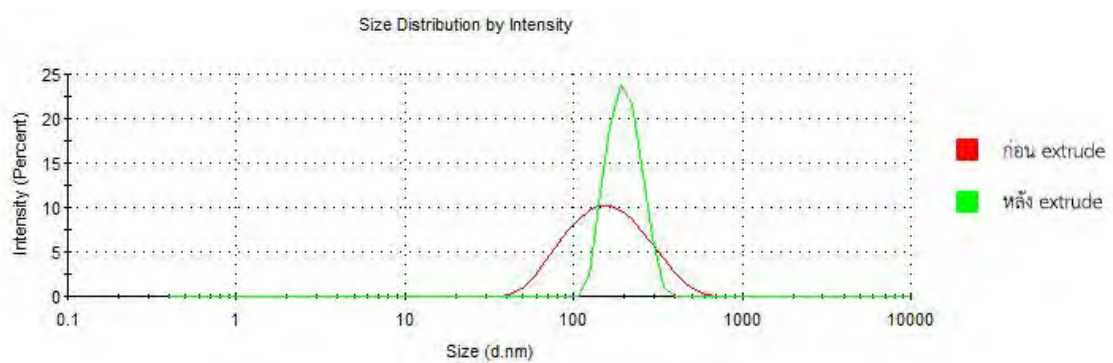
เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติความยืดหยุ่นของทั้งสามตำรับจากการวัดขนาดอนุภาคก่อนและหลังการ extrusion พบว่าทั้งสามตำรับยังคงสภาพความเป็นอีลาสติกลีโพลิโไซมได้ดังแสดงในรูปที่ 18-20 ดังนั้นจึงแสดงว่าสูตรตำรับทั้ง 3 สูตรตำรับมีความคงตัวทางกายภาพที่อุณหภูมิ 4 °C ภายใน 7 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า %อีลาสติกลีโพลิโไซมหลังเก็บเป็นเวลา 7 วันไม่แตกต่างกับหลังเตรียมเสร็จใหม่ๆ มากนัก (ตารางที่ 8)



รูปที่ 18 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T15-7
หลังผ่านการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 19 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T10-7
หลังผ่านการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 20 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ S5-7
หลังผ่านการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

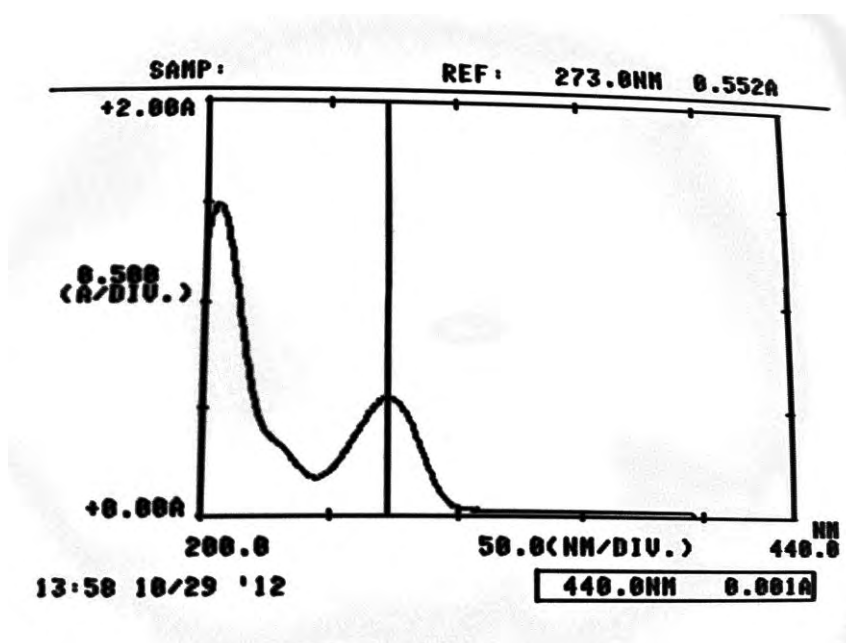
ตารางที่ 8 %อิลาสติกลิโพโซมของสูตรตำรับ T10-7, T15-7 และ S5-7 หลังเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

สูตรตำรับ	%อิลาสติกลิโพโซม หลังเตรียมเสร็จใหม่	%อิลาสติกลิโพโซม หลัง เตรียม 7 วัน
T10-7	58.48	45.45
T15-7	49.22	46.01
S5-7	63.85	56.28

4. การศึกษาผลของ caffeine ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโพโซม

4.1 การหาค่าการละลายอิมตัวของ caffeine ในสารละลาย ethanol ที่อุณหภูมิ 4 °C

จากผลการคัดเลือกสูตรตำรับที่ผ่านมามีเพียงสูตรตำรับที่ใช้สารละลาย ethanol 7% เป็นเฟสน้ำ ดังนั้นการศึกษาในส่วนนี้จึงได้หาค่าการละลายอิมตัวของ caffeine ในสารละลาย ethanol 7% และพบว่า λ_{max} ของ caffeine ในสารละลาย ethanol 7% คือ 273 nm (รูปที่ 21)




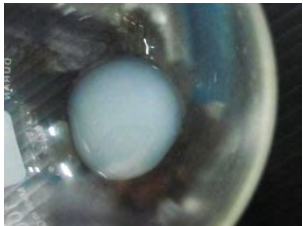

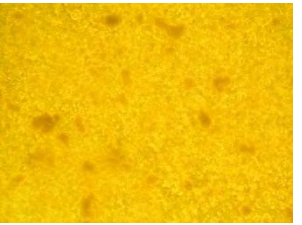

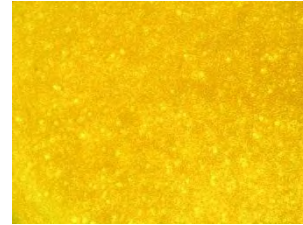
รูปที่ 21 UV Spectrum ของ caffeine ในสารละลาย ethanol 7%

หาค่าการละลายอิมตัวของ caffeine ใน ethanol 7% ที่ 4 °C โดยวิเคราะห์ caffeine ด้วยวิธี UV Spectrometry และ นำค่า UV Absorbance ที่ได้คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) พบว่าค่าการละลายอิมตัวของ caffeine เท่ากับ 1.31×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นความเข้มข้น 90% ของค่าการละลายอิมตัวของ caffeine ใน ethanol 7% ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่งเป็นเฟสน้ำที่จะใช้ไฮเดรตในการศึกษาต่อไป คือ 1.18×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร

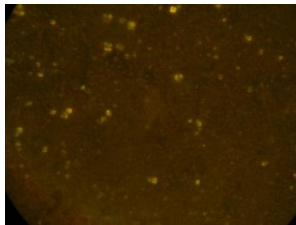
4.2 การศึกษาผลของ caffeine ต่อการเกิดและคุณสมบัติทางกายภาพของอิลาสติกลิโปโซม

จากการศึกษาพบว่าเมื่อไฮเดรตอิลาสติกลิโปโซม 3 ตำรับที่เลือกจากข้อ 3 ด้วยสารละลาย caffeine ใน ethanol 7% 1.18×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร สูตรตำรับ T15-7/C และ T10-7/C ทำให้เกิด lipid dispersion ที่ดี ไม่พบเศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและมองผ่านกล้องจุลทรรศน์และพบลักษณะ maltese cross ในขณะที่สูตรตำรับ S5-7/C ได้ lipid dispersion ที่มีผงสีขาวเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า (ตารางที่ 9-10) เนื่องจาก caffeine มีผลต่อ ionic strength ของสารละลายทำให้อิลาสติกลิโปโซมเกิด aggregation (Crommelin et al., 1984) ดังนั้นถ้ามีความสนใจที่จะใช้สูตรตำรับ S5-7 บรรจุ caffeine ควรทำการทดลองโดยใช้สารละลาย caffeine ความเข้มข้นต่างๆ ในการไฮเดรตเพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเกิดอิลาสติกลิโปโซมได้โดยที่ไม่เกิด aggregation

ตารางที่ 9 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของอิลาสติกลิโปโซมที่ได้

สูตรตำรับ	S5-7/C*	T10-7/C	T15-7/C
ภาพถ่ายแสดงลักษณะของอิลาสติกลิโปโซม			
อิลาสติกลิโปโซมเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ (100x)			

ตารางที่ 9 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของอิลาสติกลิโปโซมที่ได้ (ต่อ)

สูตรตำรับ	S5-7/C*	T10-7/C	T15-7/C
Maltese cross		Maltese cross เล็กมากจน ไม่สามารถถ่ายรูปได้	Maltese cross เล็กมากจน ไม่สามารถถ่ายรูปได้

*รูปของ lipid dispersion ของตำรับ S5-7/C แตกต่างจากตำรับอื่นๆ เนื่องจากถ้าถ่ายในลักษณะเดียวกัน
สูตรตำรับอื่นๆ จะไม่สามารถมองเห็นเศษไขมันได้ชัดเจน

ตารางที่ 10 ผลการส่องกล้องจุลทรรศน์ของสูตรตำรับ T15-7/C และ T10-7/C

สูตรตำรับ	ผลการทดลอง		
	เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า	เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์	maltese cross
T15-7/C	×	×	✓
T10-7/C	×	×	✓
S5-7/C	×	×	✓

หมายเหตุ: ✓ คือ พบลักษณะตามที่ระบุ (เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า, เศษไขมันผ่านกล้อง
จุลทรรศน์, ลักษณะ maltese cross)

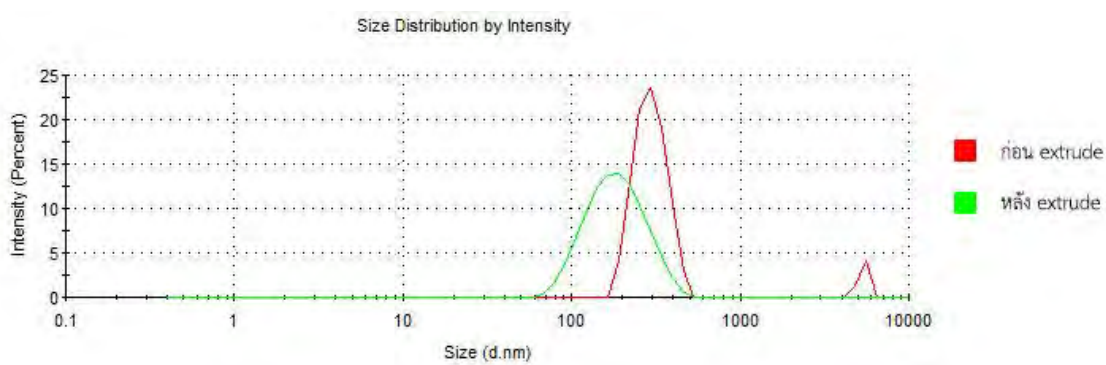
× คือ ไม่พบลักษณะตามที่ระบุ (เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า, เศษไขมันผ่าน
กล้องจุลทรรศน์, ลักษณะ maltese cross)

ดังนั้นจึงเลือกสูตรตำรับ T15-7/C และ T10-7/C เพื่อศึกษาต่อในด้านคุณสมบัติความยืดหยุ่น
พบว่าถึงแม้ T15-7/C จะมี %อิลาสติกลิโปโซมลดลงจากก่อนบรรจุ caffeine (ตารางที่ 11) แต่เมื่อ
พิจารณาจากรูปที่ 22 แล้วพบว่าสูตรตำรับ T15-7/C มีความยืดหยุ่นดีเนื่องจากขนาดเริ่มต้นของ vesicle
นั้นมีทั้งขนาดที่ควรผ่าน membrane ได้ (peak แรก) และไม่สามารถผ่าน membrane ได้ (peak ที่สอง) แต่
เมื่อผ่านการ extrusion แล้วปริมาณ vesicle ที่มีขนาดเล็กกว่า membrane นั้นมีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับ
จำนวนของ vesicle ใน peak ที่สอง แสดงให้เห็นถึงความยืดหยุ่นของผนัง vesicle อย่างไรก็ตามควร
มีการใช้ membrane ที่มีขนาดเล็กกว่า vesicle ใน peak ที่สอง 5 เท่าในการ extrusion เพื่อยืนยันผล ใน

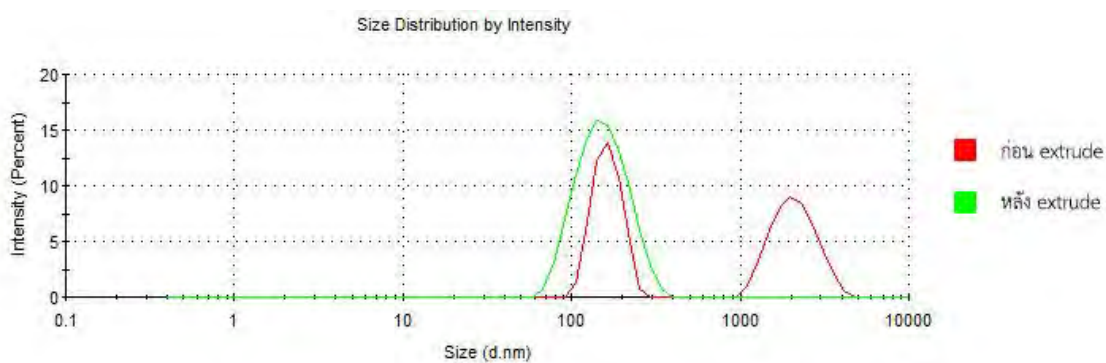
ส่วนของ T10-7/C พบว่ามี %อิลาสติกลิโโซมค่อนข้างใกล้เคียงกับอิลาสติกลิโโซมที่ใช้ ethanol ในการไฮดรตต์ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 22-23

ตารางที่ 11 %อิลาสติกลิโโซมของสูตรตำรับที่มีเฟสน้ำเป็นสารละลาย caffeine 1.18×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร ใน ethanol 7% T10-7/C และ T15-7/C

สูตรตำรับ	% อิลาสติกลิโโซม
T10-7/C	51.33
T10-7	58.48
T15-7/C	30.06
T15-7	49.22



รูปที่ 22 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T15-7/C



รูปที่ 23 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T10-7/C

5. การศึกษาผลของ caffeine ต่อความคงตัวของกายภาพของอิลาสติกลิโฟโซม

เมื่อเก็บอิลาสติกลิโฟโซม T10-7/C และ T15-7/C ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน ไม่พบเศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะ maltese cross เหมือนเดิม (ตารางที่ 12) และมีคุณสมบัติความยืดหยุ่นเหมือนเดิม ดังแสดงในรูปที่ 24 และ 25 ดังนั้น สูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C มีความคงตัวดีทางกายภาพที่ 4 °C ภายใน 7 วัน

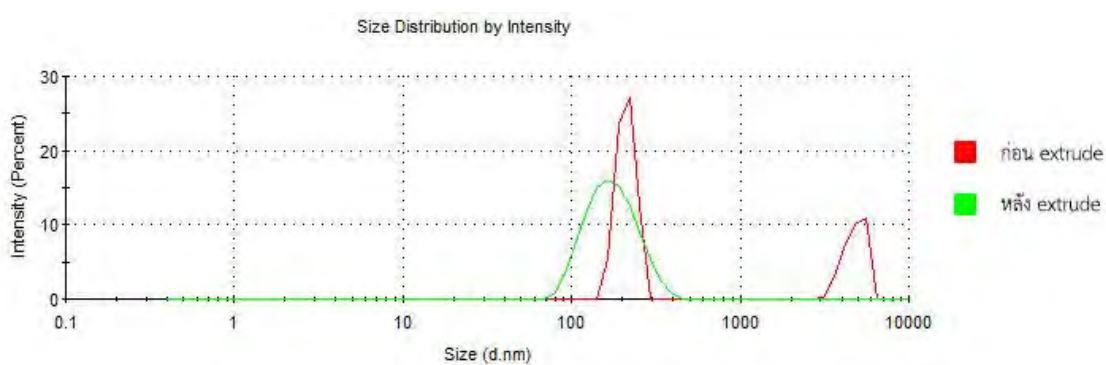
ตารางที่ 12 ผลการส่องกล้องจุลทรรศน์ของสูตรตำรับ T15-7/C และ T10-7/C หลังเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

สูตรตำรับ	ผลการทดลอง		
	เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า	เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์	maltese cross
T15-7	×	×	✓
T10-7	×	×	✓

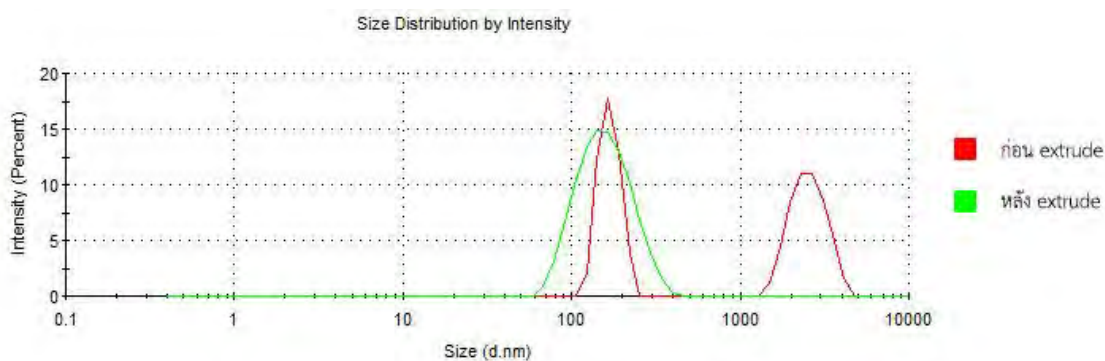
หมายเหตุ: ✓ คือ พบลักษณะตามที่ระบุ (เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า, เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์, ลักษณะ maltese cross)

×

คือ ไม่พบลักษณะตามที่ระบุ (เศษไขมันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า, เศษไขมันผ่านกล้องจุลทรรศน์, ลักษณะ maltese cross)



รูปที่ 24 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T15-7/C หลังผ่านการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 25 กราฟแสดงขนาดอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังผ่านการ extrude ของสูตรตำรับ T10-7/C หลังผ่านการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

6. การหาค่าความสามารถในการกักเก็บ caffeine ของสูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ caffeine ในส่วนใสซึ่งแยกโดยวิธี ultracentrifugation โดยใช้วิธี UV Spectrophotometry ที่ λ_{max} 273 nm และคำนวณค่าร้อยละของการกักเก็บ caffeine โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่าตำรับ T10-7/C สามารถกักเก็บ caffeine ได้สูงกว่า T15-7/C (ภาคผนวก ข) ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งความแตกต่างของร้อยละการกักเก็บ caffeine ระหว่างสองสูตรตำรับนี้น่าจะเกิดจากความแตกต่างด้านขนาดดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งพบว่าสูตรตำรับ T10-7/C มีขนาดใหญ่กว่า T15-7/C จึงเก็บ caffeine ได้มากกว่า นอกจากนี้ค่าร้อยละการกักเก็บสารในอิลาสติกลีโพโซมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ อาจไม่เพียงพอที่จะสรุปผลถึงความแตกต่างได้แน่นอนเนื่องจากทำการทดลองเพียงครั้งเดียวทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ นอกจากนี้ในขั้นตอนการแยกส่วนใสและส่วนนอนก้นอาจแยกออกจากกันได้ไม่หมด ดังนั้นหากมีเวลาในการทดลองควรเพิ่มจำนวนครั้งของการทดลองและอาจใช้วิธีอื่นในการแยกส่วนใสและส่วนนอนก้นออกจากกันแทน เช่น การใช้วิธี gel filtration

ตารางที่ 13 แสดงค่าร้อยละการกักเก็บ caffeine ของสูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C

สูตรตำรับ	ร้อยละการกักเก็บ caffeine
T10-7/C	32.34%
T15-7/C	11.16%

ตารางที่ 14 ขนาดอนุภาคของอิลาสติกลิโพโซมสูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C

สูตรตำรับ	ขนาด (nm)
T10-7/C	293.57
T15-7/C	255.7

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้สามารถเตรียมอิลาสติกลิโปโซมที่บรรจุ caffeine ได้โดยใช้วิธี film hydration เช่นเดียวกับการวิจัยของ Touitou, 1996 และพบว่าความเข้มข้นของ total lipid เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดลิโปโซมภายใต้ข้อจำกัดของวิธีการที่เลือกใช้ในการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดและปริมาณของ edge activator, ความเข้มข้นของ ethanol และ caffeine เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดและคุณสมบัติของอิลาสติกลิโปโซม โดยที่ความเข้มข้นของ caffeine มีผลต่อ ionic strength ของระบบส่งผลให้เกิด aggregation ของอิลาสติกลิโปโซม ความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษานี้มีผลต่ออิลาสติกลิโปโซมที่ใช้ Span[®] 80 5% w/w เป็น edge activator แต่ไม่มีผลกับอิลาสติกลิโปโซมที่ใช้ Tween[®] 80 10 และ 15% w/w เป็น edge activator และปริมาณของ edge activator เป็นปัจจัยที่มีผลต่อขนาดและการกักเก็บสารของอิลาสติกลิโปโซม

สูตรตำรับที่สามารถเกิดอิลาสติกลิโปโซมที่สมบูรณ์และกักเก็บ caffeine ได้มากที่สุด คือ ตำรับที่ใช้ Tween[®] 80 10% w/w เป็น edge activator ไฮเดรตด้วยสารละลาย caffeine ใน ethanol 7%

2. ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ควรเพิ่มจำนวนครั้งในการหาละการกักเก็บสารเป็นอย่างน้อย 3 ครั้งและวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติเพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น นอกจากนี้หากต้องการนำสูตรตำรับอิลาสติกลิโปโซมที่บรรจุคาเฟอีนนี้ไปพัฒนาต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ควรทำการศึกษาความคงตัวในระยะเวลาที่นานขึ้น คือ 1 ปี (Nava G. et al) และศึกษาความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังโดยวิธีการทดลองแบบนอกกาย (in vitro) เช่น การใช้ Franz diffusion cell ก่อนและหลังพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และแบบในกาย (in vivo) เช่น วัดผลการลดเซลล์โลที่ในอาสาสมัครหลังจากพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Aulton ME. *Pharmaceutics transdermal drug delivery*. 2th ed. New York: Churchill Livingstone; 2002.
- Avram MM. Cellulite: a review of its physiology and treatment. *Journal of Cosmetic Laser Therapy*. 2004; 6: 181-195.
- Bergh BAI, Wertz PW, Junginger HE, Bouwstra JA. Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;217:13-24.
- Benson HA. Elastic liposomes for topical and transdermal drug delivery. *Current Drug Delivery*. 2009; 6(3): 217-226.
- Bolzinger MA, Briancon S, Pelletier J, Fessi H, Chevalier Y. Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008; 68: 446-451.
- Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992; 1104(1): 226-232.
- Cevc G, Schatzein A, Blume G. Transdermal drug carriers, basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. *Journal of Controlled Release*. 1995; 36: 3-16.
- Cevc G, Blume G, Schatzein A. Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. *Journal of Controlled Release*. 1997; 45(3): 211-226.
- Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001; 1514(2): 191-205.
- Cevc G, Blume G. Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug carriers, Transfersomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1614(2): 156-164.

- Crommelin DJ. Influence of lipid composition and ionic strength on the physical stability of liposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984;73(11):1559–1563.
- Eseldin K, Rakesh KS, Esmail B, Abd-alkadar ZA. Transdermal drug delivery system- design and evaluation. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* 2010: 201-211.
- Goldman MP, Bacci PA, Leibaschoff G, Hexsel D, Angelini F, eds. *Cellulite pathophysiology and treatment*. New York: Taylor & Francis Group, LLC; 2006.
- Guo J, Ping Q, Zhang L. Transdermal delivery of insulin in mice by using lecithin vesicles as a carrier. *Drug delivery*. 2000; 7(2): 113-116.
- Gupta PN, Mishra V, Rawat A et al. Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 293(1-2): 73-82.
- Herman A, Herman AP. Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin pharmacology and physiology*. 2013; 26: 8–14.
- Hexsel D, Soirefmann M. Cosmeceuticals for cellulite. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 2011; 30(3): 167-170.
- Huang YB, Tsai MJ, Wu PC, Tsai YH, Wu YH, Fang JY. Elastic liposomes as carriers for oral delivery and the brain distribution of (+)-catechin. *Journal of Drug Targeting*. 2011; 19(8): 709-718.
- Irfan M, Verma S, Ram A. Preparation and characterization of ibuprofen loaded transfersome as a novel carrier for transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2012; 5(3): 162-65.
- Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002; 54: 77-98
- Khan MH, Victor F, Rao B, Sadick NS. Treatment of cellulite: Part II. Advances and controversies. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010; 62(3): 373-384.
- Lesser T, Ritvo E, Moy LS. Modification of subcutaneous adipose tissue by a methylxanthine formulation: a double-blind controlled study. *Dermatologic Surgery*. 1999; 25: 455–464.
- Lun R, Shiu WY, Mackay D. Aqueous solubilities and octanol-water partition coefficients of chloroveratroles and chloroanisoles. *Journal of Chemical and Engineering Data* 1995; 40:959-962.

- Manosroi A, Wongtrakul P, Manosroi J, Sakai H, Sugawara F, Yuasa M, et al. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003; 30: 129-138.
- Nava G, Piñón E, Mendoza L, Mendoza N, Quintanar D, Ganem A. Formulation and in Vitro, ex Vivo and in Vivo Evaluation of Elastic Liposomes for Transdermal Delivery of Ketorolac Tromethamine. *Pharmaceutics*. 2011; 3, 954-970.
- Pires-de-Campos MS, Leonardi GR, Chorilli M, Spadari-Bratfisch RC, Polacow ML, Grassi-Kassisse DM. The effect of topical caffeine on the morphology of swine hypodermis as measured by ultrasound. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2008; 7: 232–237.
- Prajapati ST, Patel CG, Patel CN. Transfersomes: A vesicular carrier system for transdermal drug delivery. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*. 2011; 2: 507-524.
- Rawlings AV. Cellulite and its treatment. *International Journal of Cosmetic Science*. 2006; 28: 175-90.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, eds. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009.
- Sainio EL, Rantanen T, Kanerva L. *Ingredients and safety of cellulite creams*. 2000;[1 screen]. Available at: <http://www.jle.com/fr/revues/medecine/ejd/e-docs/00/01/86/B1/article.phtml>. Accessed December 19, 2012.
- Touitou E, Levi-Schaffer F, Dayan N, Alhaique F, Riceieri F. Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: Liposomes versus permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* 1994; 103: 131-136.
- Touitou, E. Composition of applying active substance to or through the skin, US patent no. 5,716,638. 1996; 5: 716.
- Velasco MV, Tano CT, Machado-Santelli GM, Consiglieri VO, Kaneko TM, Baby AR. Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: histological evaluation. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2008; 7: 23–29.
- Wachter CU. Development of ultradeformable lipid vesicle comprising polyoxyethylene oleyl ether for targeted drug delivery across the skin. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2008: 77-78.

Zubair MU, Hasson MMA, Al-Meshel IA. Caffeine. In: Florey K,ed. Analytical Profile of Drug Substance and Excipients. Vol 15. New York: Academic Press Inc; 1986. P.71-150.

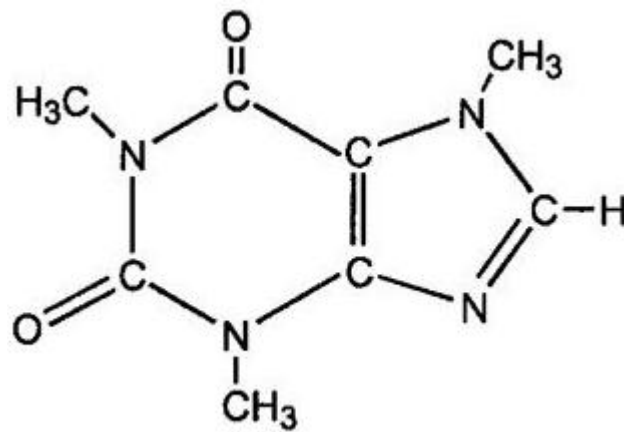
อรัญญา มโนสร้อย และจิระเดช มโนสร้อย. "ไลโปโซม สำหรับยาผ่านทางผิวหนังและเครื่องสำอาง. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์; 2550.

ภาคผนวก ก

คุณสมบัติของสารที่ใช้ในการวิจัย

1. Caffeine (Zubair, et al., 1986)

ชื่อทางเคมี: 1,3,7-Trimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-purine



รูปที่ 26 สูตรโครงสร้างของ caffeine

สูตรโมเลกุล: C₈H₁₀N₄O₂

น้ำหนักโมเลกุล: 194.19

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

ลักษณะทางกายภาพ: ผงสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสขม

จุดหลอมเหลว: 235-237.5°C

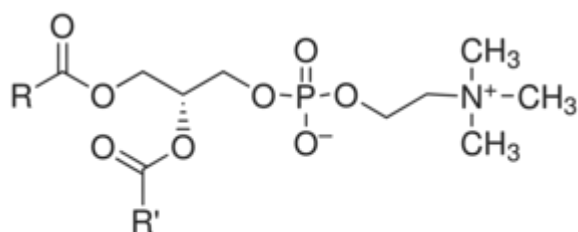
ความหนาแน่น: d_4^{18} 1.23 g/cm³

ค่าการละลาย: 1 กรัม caffeine ละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตร, alcohol 75 มิลลิลิตรและ
chloroform 6 มิลลิลิตร

Log P: -0.07 (Aulton, 2002; Eseldin et al., 2010)

2. Phosphatidylcholine (Rowe, et al., 2009)

ชื่อทางเคมี: 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine



R, R' = fatty acid residues

รูปที่ 27 สูตร โครงสร้างของ Phosphatidylcholine

น้ำหนักโมเลกุล: 776 (เฉลี่ย)

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

ลักษณะทางกายภาพ: ข่องแข็งสีเหลือง

Transition temperature: < 1°C

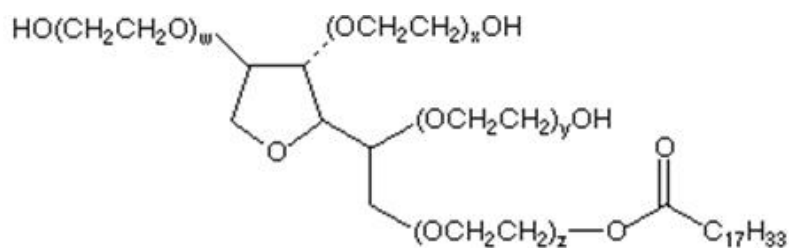
ความหนาแน่น: 0.5 g/ml

ค่าการละลาย: Phosphatidylcholine สามารถละลายได้ใน chloroform
ไม่ละลายในน้ำ

สถานะในการเก็บ: ควรเก็บในภาชนะภาชนะที่ปิดสนิท ป้องกันจากแสงและการออกซิเดชัน เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0°C

3. Tween[®] 80 (Rowe, et al., 2009)

ชื่อทางเคมี: Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate



รูปที่ 28 สูตรโครงสร้างของ Tween[®] 80

สูตรโมเลกุล: $C_{64}H_{124}O_{26}$

น้ำหนักโมเลกุล: 1310

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

ลักษณะทางกายภาพ: ของเหลว ใส สีเหลือง มีกลิ่นเฉพาะตัว

Flash point: 149°C

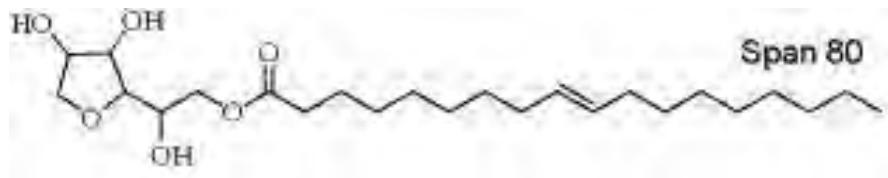
ความถ่วงจำเพาะ: 1.08 g/ml

ค่าการละลาย: Tween[®] 80 ละลายได้ในน้ำและแอลกอฮอล์ ไม่ละลายใน mineral oil และ vegetable oil

สถานะในการเก็บ: ควรเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทและป้องกันจากแสง เก็บในที่เย็นและแห้ง

4. Span[®] 80 (Rowe, et al., 2009)

ชื่อทางเคมี: (Z)-Sorbitan mono-9-octadecenoate



รูปที่ 29 สูตรโครงสร้างของ Span[®] 80

สูตรโมเลกุล: $C_{24}H_{44}O_6$

น้ำหนักโมเลกุล: 429

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

ลักษณะทางกายภาพ: ของเหลว สีเหลือง

Flash point: $>149^{\circ}C$

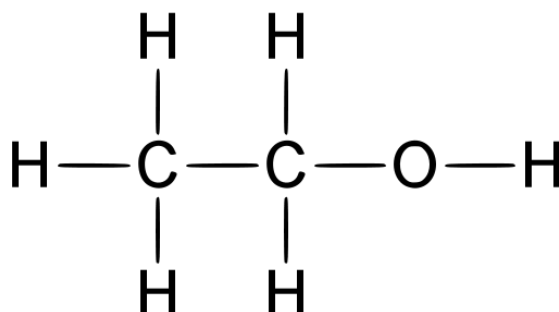
ค่าการละลาย: ละลายได้ในน้ำมันและ organic solvent

กระจายตัวได้ในน้ำแต่ไม่ละลายในน้ำ

สถานะในการเก็บ: ควรเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่เย็นและแห้ง

5. Ethanol

ชื่อทางเคมี: Ethanol



รูปที่ 30 สูตรโครงสร้างของ Ethanol

สูตรโมเลกุล: $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$

น้ำหนักโมเลกุล: 46.07

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

ลักษณะทางกายภาพ: ของเหลว สี ไม่มีสี เป็น volatile liquid มีกลิ่นเฉพาะตัวและ

มีรสชาติเผ็ดร้อน

จุดเดือด: 78.15°C ความถ่วงจำเพาะ: 0.8119-0.8139 g/ml ที่ 20°C

ค่าการละลาย: เข้ากันได้กับน้ำและ chloroform

ภาคผนวก ข

1. การคำนวณเพื่อเตรียมส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้เตรียมอิลาสติกลิโปโซม

เตรียม stock solution

- Soybean Phosphatidylcholine (SPC) ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- Tween[®] 80 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- Span[®] 80 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารที่ต้องใช้ในการเตรียมลิโปโซมที่มี total lipid 60 มิลลิกรัมต่อ

2 มิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณของ SPC Stock solution ที่ใช้คือ } \frac{60 \text{ mg}}{200 \text{ mg/ml}} = 300 \mu\text{l}$$

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารที่ต้องใช้ในการเตรียมอิลาสติกลิโปโซมในสูตรตำรับ T10-7

ใช้ Tween[®] 80 10%w/w ของ Total lipid ที่ผ่านการคัดเลือก (60 มิลลิกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร)

ดังนั้นต้องใช้ SPC 54 มิลลิกรัม และ Tween[®] 80 6 มิลลิกรัม

$$\text{ใช้ SPC stock solution } \frac{54 \text{ mg}}{200 \text{ mg/ml}} = 270 \mu\text{l}$$

$$\text{ใช้ Tween}^{\circledR}80 \text{ stock solution } \frac{6 \text{ mg}}{100 \text{ mg/ml}} = 60 \mu\text{l}$$

ตารางที่ 15 สรุปปริมาณหรือน้ำหนักของสารที่ใช้ในการเตรียมอิมัลชันโพลีเมอร์

สูตร ตำรับ	องค์ประกอบของสูตรตำรับ (มิลลิกรัม)			SPC stock solution (ไมโครลิตร)	Tween [®] 80 stock solution (ไมโครลิตร)	Span [®] 80 stock solution (ไมโครลิตร)
	SPC	Tween [®] 80	Span [®] 80			
T15-15	51	9	-	255	90	-
T15-10	51	9	-	255	90	-
T15-7	51	9	-	255	90	-
T10-15	54	6	-	270	60	-
T10-10	54	6	-	270	60	-
T10-7	54	6	-	270	60	-
T5-15	57	3	-	285	30	-
T5-10	57	3	-	285	30	-
T5-7	57	3	-	285	30	-
S15-15	51	-	9	255	-	90
S15-10	51	-	9	255	-	90
S15-7	51	-	9	255	-	90
S10-15	54	-	6	270	-	60
S10-10	54	-	6	270	-	60
S10-7	54	-	6	270	-	60
S5-15	57	-	3	285	-	30
S5-10	57	-	3	285	-	30
S5-7	57	-	3	285	-	30

2. การคำนวณ %อิลาสติกลิโโซม

การคำนวณ %อิลาสติกลิโโซมทำเพื่อยืนยันคุณสมบัติความยืดหยุ่นจากการวัดขนาดก่อนและหลังการ extrusion ผ่าน polycarbonate membrane ทำได้โดยการพิมพ์กราฟที่ได้จากการวัดขนาดโดยเครื่อง Zeta sizer บนกระดาษที่มีน้ำหนักเท่ากันแล้วตัดกระดาษตามรูปกราฟที่ได้โดยตัดสองชิ้นจากหนึ่งกราฟ คือ ส่วนที่ซ้อนกันของกราฟก่อนและหลัง extrusion และส่วนที่ผ่าน extrusion แล้ว จากนั้นชั่งน้ำหนักกระดาษของกราฟทั้งสองส่วนและคำนวณโดยสูตรด้านล่างได้ผลดังแสดงในตารางที่ 16-18

$$\frac{\text{น้ำหนักกราฟส่วนที่ซ้อนทับกัน}}{\text{น้ำหนักกราฟส่วนที่ผ่าน } \textit{extrusion} \text{ แล้ว}} \times 100 = \% \text{อิลาสติกลิโโซม}$$

ตารางที่ 16 การคำนวณอิลาสติกลิโโซมของสูตรตำรับต่างๆ

สูตรตำรับ	น.น. ส่วนที่ overlap (a)	น.น. ส่วนที่ extrude (b)	% อิลาสติกลิโโซม(a100/b)
T5-7	0.0004	0.0114	3.51
T5-10	0.0022	0.0076	28.82
T5-15	0.0020	0.0065	31.44
T10-7*(E)	0.0193	0.0330	58.48
T10-10	0.043	0.1117	38.51
T10-15	0.0024	0.0091	26.37
T15-7*(E)	0.0474	0.0963	49.22
T15-10	0.0024	0.0091	26.64
T15-15	0.0027	0.0116	23.34
S5-7 (E)	0.0118	0.0185	63.85

ตารางที่ 17 การคำนวณอิลาสติกลิโโซมของสูตรตำรับ T10-7, T15-7 และ S5-7 หลังเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

สูตรตำรับ	น.น. ส่วนที่ overlap (a)	น.น. ส่วนที่ extrude (b)	% อิลาสติกลิโโซม(a100/b)
T10-7	0.0070	0.0154	45.45
T15-7	0.0104	0.0226	46.01
S5-7	0.0103	0.0183	56.28

ตารางที่ 18 การคำนวณอิลาสติกลิโพโซมของสูตรตำรับ T10-7/C และ T15-7/C

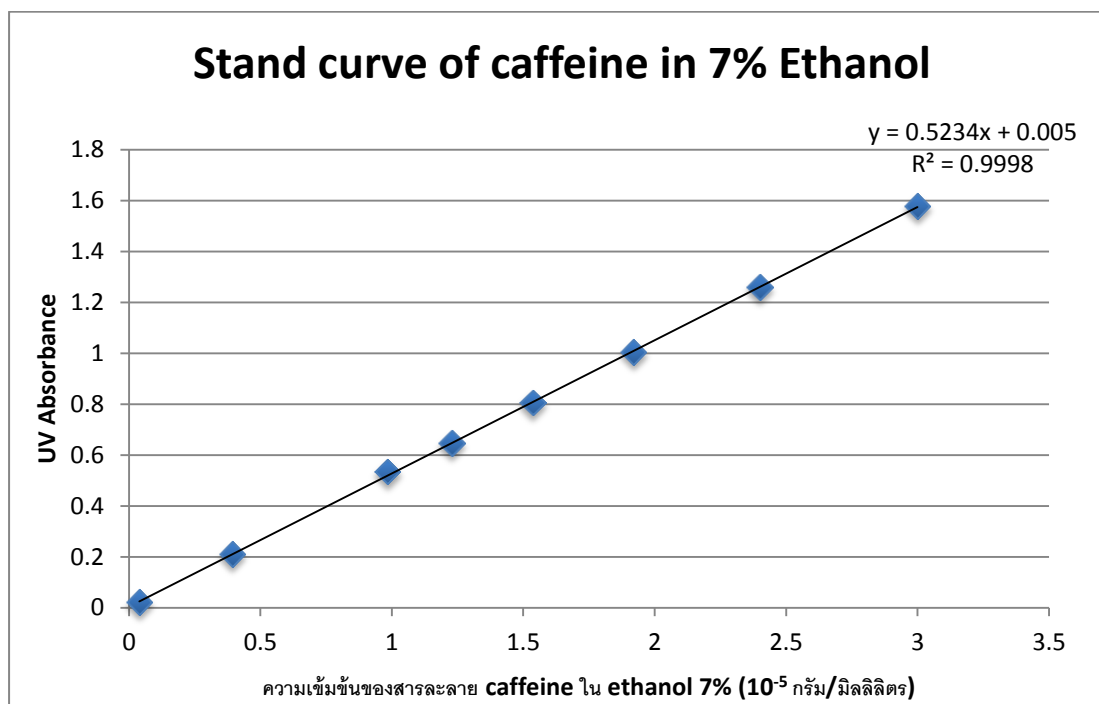
สูตรตำรับ	น.น.ส่วนที่ overlap (a)	น.น.ส่วนที่ extrude (b)	% อิลาสติกลิโพโซม(a100/b)
T10-7/C	0.0154	0.0300	51.33
T15-7/C	0.0116	0.0296	30.06

3. การสร้างกราฟมาตรฐานของ caffeine ในสารละลาย ethanol 7%

เตรียมสารละลาย caffeine โดยชั่ง caffeine 30 มิลลิกรัม ใส่ลงใน volume metric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย ethanol 7% จนครบ 10 มิลลิลิตร นำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย ethanol 7% ดังแสดงในตารางที่ 19 และ 20 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 273 nm โดยใช้เครื่อง UV Spectrophotometry นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 31 และ 32

ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงของ caffeine ใน ethanol 7% ที่ความเข้มข้นต่างๆ (สำหรับผลการทดลองในการศึกษาที่ 4.1)

ความเข้มข้น ($\times 10^{-5}$ กรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.0393	0.021
0.3932	0.209
0.9830	0.536
1.2288	0.646
1.5360	0.806
1.9200	1.005
2.4000	1.260
3.0000	1.577

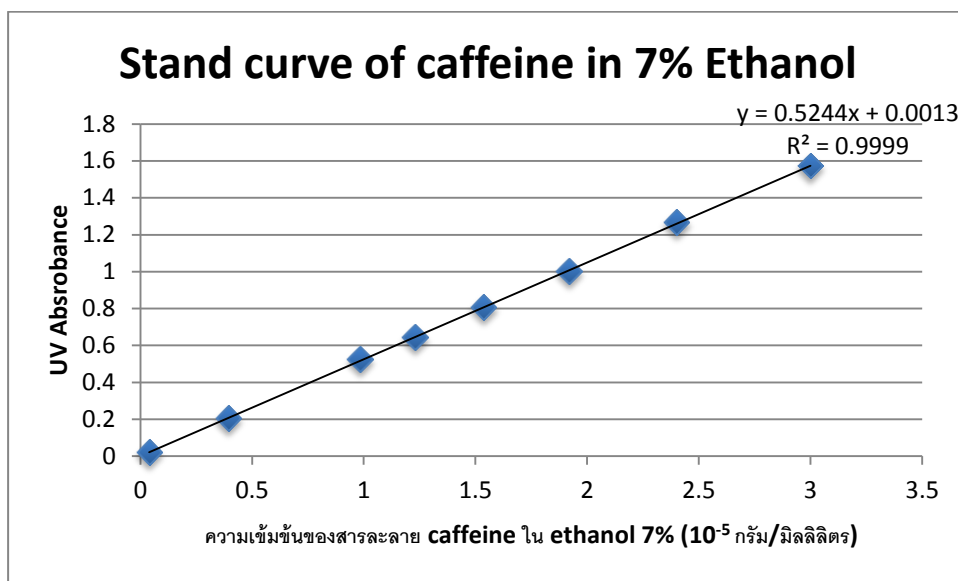


รูปที่ 31 กราฟมาตรฐานของสารละลาย caffeine ใน ethanol 7%

(สำหรับผลการทดลองในการศึกษาที่ 4.1)

ตารางที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงของ caffeine ใน ethanol 7% ที่ความเข้มข้นต่างๆ (สำหรับผลการทดลองในการศึกษาที่ 6)

ความเข้มข้น (10^{-5} กรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.0393	0.002
0.3932	0.206
0.9830	0.526
1.2288	0.644
1.5360	0.806
1.9200	1.000
2.4000	1.266
3.0000	1.573



รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานของสารละลาย caffeine ใน ethanol 7%
(สำหรับผลการทดลองในการศึกษาที่ 6)

4. การหาค่าร้อยละของการกักเก็บ caffeine ในอิลาสติกลิโพโซม

ทำการปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสกับอิลาสติกลิโพโซมที่นอนก้น ใช้ auto pipette ดูดส่วนใสมา 30 μl ใส่ใน volume metric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย ethanol 7% เจือจางจนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 273 nm ด้วยวิธี UV Spectrophotometry ได้ แทนค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับสมการมาตรฐานของสารละลาย caffeine ใน ethanol 7% $y = 0.5244x + 0.0013$ แล้วคำนวณกลับเพื่อหาปริมาณ caffeine ทั้งหมดที่มีอยู่ในส่วนใสที่ดูดออกมาทั้งหมดด้วย pasteur pipette ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ปริมาตรที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงและผลการคำนวณหาปริมาณ caffeine ในส่วนใส

สูตร	ปริมาตรที่ใช้ (μl)	ค่าการดูดกลืนแสง*	ความเข้มข้น (g/มิลลิลิตร)	Dilution factor	ความเข้มข้น (g/มิลลิลิตร)	ปริมาณทั้งหมด (g)
T15-7/C	30	0.599	1.14×10^{-5}	1111.11	1.27×10^{-3}	5.25×10^{-2}
		0.600	1.14×10^{-5}	1111.11	1.27×10^{-3}	5.26×10^{-2}
		0.606	1.15×10^{-5}	1111.11	1.28×10^{-3}	5.31×10^{-2}
เฉลี่ย						5.27×10^{-2}
T10-7/C	30	0.462	8.79×10^{-6}	1111.11	9.77×10^{-4}	3.99×10^{-2}
		0.464	8.82×10^{-6}	1111.11	9.80×10^{-4}	4.01×10^{-2}
		0.465	8.84×10^{-6}	1111.11	9.82×10^{-4}	4.01×10^{-2}
เฉลี่ย						4.00×10^{-2}

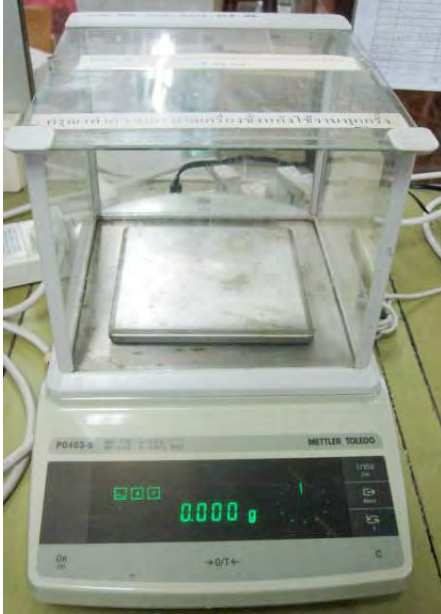
*ค่าการดูดกลืนแสงได้จากการวัดซ้ำโดยใช้ sample เดิม

$$\text{ร้อยละการกักเก็บ caffeine ของสูตรตำรับ T10-7/C} = \frac{(6.29 - 4.00) \times 10^{-2}}{7.08 \times 10^{-2}} \times 100 = 32.34\%$$

$$\text{ร้อยละการกักเก็บ caffeine ของสูตรตำรับ T15-7/C} = \frac{(6.06 - 5.27) \times 10^{-2}}{7.08 \times 10^{-2}} \times 100 = 11.16\%$$

ภาคผนวก ก

วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย



รูปที่ 33 Analytical Balances 3 ตำแหน่ง
(Mettler Toledo PG-S)



รูปที่ 34 Analytical Balances 4 ตำแหน่ง
(Mettler Toledo AG)



รูปที่ 35 Analytical Balances 5 ตำแหน่ง
(Mettler Toledo AX)



รูปที่ 36 LiposoFast™ (Avestin Inc.)



រូបទី 37 Rotaty evaporator (Bushi)



រូបទី 38 Sonicator (Elma® Transsonic Digital S)



រូបទី 39 Ultracentrifuge (Beckman L-80)



រូបទី 40 UV-Visible Recording Spectrophotometer
(Shimadzu)



រូបទី 41 Vortex-Genie® 2



រូបទី 42 Zeta Sizer Nano series (Malvern)



รูปที่ 43 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse E 200)