อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัย

การเพิ่มความคงตัวและควบคุมการปลดปล่อยวิตามินเอ

Stability improvement and controlled release of all-*trans* retinoic acid for topical delivery.

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.เนติ วระนุช

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 5 JUL 2011
เลขทะเบียน 15663854
เลขเรียกหนังสือ 3 QP
332
.V5
น7815
2552

พฤษภาคม 2552

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2552

มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร อาจารย์ นิสิตและเจ้าหน้าที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นางสาวอังคณา วิชิต นิสิตปริญญาเอก ที่ช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลงด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2552 จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์การวิจัยครั้งนี้ มุ่งเน้นศึกษาเพิ่มความคงตัวและควบคุมการปลดปล่อยอนุพันธ์วิตามินเอชนิดเรติโนอิกเอซิด ด้วยการบรรจุเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซลชนิดโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์กรดไขมันชนิดต่างๆ (PEG-PE polymeric micelles) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าค่าความเข้มข้นวิกฤต (critical micelle concentration) ของ PEG-PE ชนิดต่างๆ มีค่าระหว่าง 97 – 243 μM ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของส่วนที่ละลายน้ำ (PEG fragment) กับส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (PE fragment) เมื่อศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซล PEG-PE พบว่า อนุภาคไมเซลชนิด PEG_{750}-DPPE มีประสิทธิภาพในการบรรจุเรติโนอิกเอซิดมากที่สุดถึง 82% และให้อนุภาคทรงกลมขนาดไม่เกิน 10 nm เมื่อศึกษาความคงตัวของเรติโนเอซิดที่บรรจุในอนุภาคไมเซลดังกล่าว พบว่า แสงยังเป็นปัจจัยหลักต่อการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิด ที่น่าสนใจคือ อนุภาคไมเซล PEG_{750}-DPPE สามารถชะลอการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อถูกเก็บภายใต้สภาวะที่เต็มไปด้วยก๊าซออกซิเจนและปราศจากแสง อีกทั้ง เมื่อเก็บสารละลายไมเซลของเรติโนอิกเอซิดดังกล่าวในสภาวะห้องและไม่มีแสงเป็นเวลา 28 วัน จากการทดสอบพบว่ามีปริมาณเรติโนอิกเอซิดคงเหลืออยู่ในสารละลายไมเซลอยู่ถึง 86% ในขณะที่ปริมาณเรติโนอิกเอซิดคงเหลืออยู่ในสารละลายควบคุม 43% นอกจากนี้ ผลการทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยเรติโนอิกเอซิดในอนุภาค PEG_{750}-DPPE บนผิวหนัง ด้วยวิธี Franz diffusion cell ในสภาวะ non-occlusion อันเป็นสภาวะจริงของการใช้ พบว่าที่เวลา 8 ชั่วโมงของการทดลองสามารถวิเคราะห์เจอเรติโนอิกเอซิดในชั้นผิวต่างๆ 6% และ receiving solution 16% ตามลำดับ ในขณะที่ 3% และ 11% ของปริมาณเรติโนอิกเอซิดในสารละลายควบคุมสามารถวิเคราะห์พบในชั้นผิวและ receiving solution ตามลำดับ จากการทดสอบครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า การบรรจุเรติโนอิกเอซิดลงในอนุภาคไมเซลชนิด PEG_{750}-DPPE สามารถเพิ่มความคงตัวทางเคมีตลอดจนเพิ่มการปลดปล่อยลงสู่ชั้นผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

The objective of this study is to increase stability and control release of all-*trans* retinoic acid (ATRA) by entrapped in polyethylene glycol conjugated phosphatidylethanolamine (PEG-PE polymeric micelles). Critical micelle concentrations of various PEG-PE types were about 97 – 243 μM depending on structures of both hydrophilic fragment and hydrophobic fragment. The study indicated that PEG_{750}-DPPE polymeric micelles gave highest ATRA entrapment of about 82% comparing to other types. A spherical shape was obtained with diameter size less than 10 nm. The results of chemical stability test indicated that an irradiation was a major factor to ATRA degradation. Interestingly, PEG_{750}-DPPE polymeric micelles could significant retard ATRA degradation under oxygen flux without light exposure. Moreover, ATRA in PEG_{750}-DPPE polymeric micelles was remained about 86% of initial content for 28 days under ambient condition. In contrary, ATRA in 75% methanol / HBS solution was remained about 43%. Furthermore, a study of skin permeation on human foreskin in non-occlusive condition was investigated *in vitro* by Franz diffusion method. At 8 hr of incubation, this result found that the amount of ATRA was accumulated in several skin layers about 6% and released in receiving solution about 16% when the micelles formulation was applied. However, there were only about 3% and 11% of the amount ATRA found in the skin layers and the receiving solution when a normal solution was used. Thus, ATRA in PEG_{750}-DPPE polymeric micelles was successfully retard degradation and effectively control release through the skin.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการทดลองและอภิปรายผล	10
สรุปผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	25

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงค่า CMC ของสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ จากการละลายที่เพิ่มขึ้นของเรติโนอิกเอซิด (n=3)	12
ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ที่มีและไม่มีเรติโนอิกเอซิด (n=3, mean ± SD)	14
ตารางที่ 3 แสดงการกระจายของอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ที่มีและไม่มีเรติโนอิกเอซิด (n=3, mean ± SD)	15
ตารางที่ 4 แสดงค่าประจุบนผิวอนุภาคไมเซลของสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ (n = 3, mean ± SD)	15

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์วิตามินเอ 1= เรตินอล (retinol), 2= เรตินิลเอสเทอร์ (retinyl ester), 3= เรติโนอิก เอซิด (retinoic acid), 4= เรตินอยล์ (retinoid) 1

รูปที่ 2 แสดงวิธีการคำนวณหาค่า CMC ของสาร PEG-PE ด้วยการวัดความเข้มของสารฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้น เช่น สาร pyrene เมื่อสารละลาย PEG-PE มีความเข้มข้นเข้าใกล้บริเวณ CMC 11

รูปที่ 3 ประสิทธิภาพในการบรรจุเรติโนอิกเอซิดในสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ เมื่อปริมาณเรติโนอิกเอซิดเริ่มต้นเท่ากับ 2, 5, 10 µg (n=3, mean ± S.E.) 13

รูปที่ 4 แสดงอนุภาคไมเซลที่ได้จากสาร PEG_{750}-DPPE ที่ไม่ได้บรรจุเรติโนอิกเอซิดไว้ภายใน (กำลังขยาย 150,000 เท่า) 16

รูปที่ 5 แสดงเปอร์เซนต์คงอยู่ของเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซล (◆) และในสารละลายควบคุม (■) ภายใต้สภาวะที่โดนแสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง 17

รูปที่ 6 แสดงเปอร์เซนต์คงอยู่ของเรติโนอิกเอซิดในสารละลายไมเซล (เส้นทึบ, solid line) และในสารละลาย 75% methanol in HBS (เส้นประ, dot line) เมื่อถูกเก็บภายใต้สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องและไม่โดนแสง 18

รูปที่ 7 แสดงเปอร์เซนต์คงอยู่ของเรติโนอิกเอซิดในสารละลายไมเซล (เส้นทึบ, solid line) และในสารละลาย 75% methanol in HBS (เส้นประ, dot line) เมื่อถูกเก็บในสภาวะห้องและไม่โดนแสง 19

รูปที่ 8 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายใน foreskin ด้วยสารละลาย sodium azide ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n=3, mean ± S.E.) 20

รูปที่ 9 แสดงเปอร์เซนต์การสะสมของเรติโนอิกเอซิดที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมันชนิด PEG_{750}-DPPE แพร่ผ่านผิว foreskin (n=4, mean ± S.E.) 21

รูปที่ 10 เปอร์เซนต์การคงเหลือของเรติโนอิกเอซิดในส่วนต่างๆ หลังการทดสอบ 8 ชั่วโมงบนผิว foreskin (n=4, mean ± S.E.) 22

รูปที่ 11 สารละลายไมเซลผสมกับสารละลายอัลจิเนตที่มีการเติมสีน้ำเงิน (ซ้ายมือ) และแคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในมีสารละลายไมเซลกระจายตัวอยู่ในซิลิโคน (ขวามือ) 23

รูปที่ 12 แคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซลที่ย้อมด้วยสีน้ำเงิน (กำลังขยาย 10 เท่า) 24

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 13 แคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซล 24

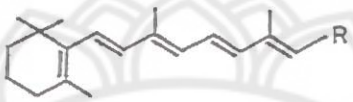
รูปที่ 14 แคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซล 24
(กำลังขยาย 10 เท่า)

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทนำ

1. และ 2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาและการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

อนุพันธ์ของวิตามินเอมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับหมู่สำคัญ (functional group) ที่ต่อเข้ากับโครงสร้าง อาทิเช่น เรตินอล (retinol), เรตินิลเอสเทอร์ (retinyl ester), เรติโนอิก เอซิด (retinoic acid), และเรตินอยล์ (retinoid or retinal) วิตามินเอที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่มีโครงสร้างแบบ all-*trans* ซึ่งทำให้สารจะมีความคงตัวมากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 1



1 : R = $-CH_2OH$
2 : R = $-CH_2OCOC_{17}H_{35}$
3 : R = $-COOH$
4 : R = $-CHO$

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์วิตามินเอ 1= เรตินอล (retinol), 2= เรตินิลเอสเทอร์ (retinyl ester), 3= เรติโนอิก เอซิด (retinoic acid), 4= เรตินอยล์ (retinoid)

วิตามินเอและอนุพันธ์ของวิตามินเอ มีความสามารถในการควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ผิว (regulation of proliferation and differentiation of epithelial cells) ในทางการแพทย์ อนุพันธ์ของวิตามินเอถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคทางผิวหนังบางชนิดอย่างแพร่หลาย เช่น เร่งการผลัดเซลล์ผิวของผู้ป่วยที่มีปัญหาผิวไหม้เกรียมอันเนื่องจากการโดนแสงแดด (photodamaged skin) หรือใช้ชะลอการเกิดริ้วรอยบนผิวด้วยการเร่งการผลัดเซลล์ผิวพร้อมกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวใหม่ และใช้ในการรักษาสิวโดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์วิตามินเอที่อยู่ในรูปเรติโนอิกเอซิด อย่างไรก็ตาม เรติโนอิกเอซิดมีความไม่คงตัวสูงเมื่อถูกแสง, ความร้อน การเกิดออกซิเดชัน นอกจากนี้ เรติโนอิกเอซิดมีความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังต่ำมาก (partition coefficient; log $P_{o/w}$ = 6.7) และก่อให้เกิดผลข้างเคียงเมื่อนำมาทาบนผิวโดยตรง อาทิเช่น เกิดผื่นแดง ผิวหนังแห้งและคัน เป็นต้น การใช้เทคโนโลยีทางเภสัชกรรมเกี่ยวกับระบบการนำส่งสารสำคัญ จึงมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารสำคัญสู่อวัยวะเป้าหมาย (target site) อีกทั้งสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญอย่างต่อเนื่อง ระบบการนำส่งสารสำคัญในทางเภสัชกรรมมีหลายรูปแบบ เช่น การเตรียมเป็นไลโปโซม (liposome), ไนโอโซม (niosome), ไมเซล (micelle), ไมโครสเฟียร์ (microsphere), ไมโครแคปซูล (microcapsule) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการนำประโยชน์ของการเกิดไมเซลจากโพลิเมอร์ (polymeric micelle) ชนิดโพลีเอทิลีน ไกลคอลที่เชื่อมต่อกับอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของกรดไขมันมาใช้ในการกักเก็บเรติโนอิกเอซิดซึ่งถือเป็นการกักเก็บชั้นแรก จากนั้นไมเซลที่มีเรติโนอิกเอซิดจะถูกเคลือบด้วยแคลเซียมอัลจิเนตด้วยการสร้างเป็นแคปซูลขนาดเล็ก (nanocapsule) การกักเก็บเรติโนอิกเอซิดไว้ในโพลิเมอร์สองชั้นนั้น อาจมีประโยชน์ในด้านช่วยเพิ่มความคงตัวของเรติโนอิกเอซิดจากการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจากภายนอก อีกทั้งยังเป็นการควบคุมการปลดปล่อยเรติโนอิกเอซิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาความคงตัวทางเคมีและกายภาพของเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซลของโพลิเมอร์ชนิดโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของกรดไขมัน
2. ศึกษาการปลดปล่อยเรติโนอิกเอซิดจากการกักเก็บในอนุภาคของโพลิเมอร์ชนิดโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของกรดไขมัน

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี :

1. สารโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์กรดไขมันชนิดต่างๆ (Polyethylene glycol conjugated phosphatidylethanolamine) ประกอบด้วย

1.1 PEG_{5000}-DPPE หรือ polyethylene glycol MW 5000 Daltons conjugated dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (C16:0)

1.2 PEG_{750}-DMPE หรือ polyethylene glycol MW 750 Daltons conjugated dimyristyl phosphatidylethanolamine (C14:0)

1.3 PEG_{750}-DPPE หรือ polyethylene glycol MW 750 Daltons conjugated dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (C16:0)

1.4 PEG_{750}-DSPE หรือ polyethylene glycol MW 750 Daltons conjugated distearoyl phosphatidylethanolamine (C18:0)

1.5 PEG_{750}-DOPE หรือ polyethylene glycol MW 750 Daltons conjugated dioleyl phosphatidylethanolamine (C18:1)

สารข้างต้นนี้สั่งซื้อจากบริษัท Avanti polar lipids, Inc. (Alabaster. AL,USA)

2. all-*trans* retinoic acid จากบริษัท Sigma-Aldrich
3. HEPES จากบริษัท Sigma-Aldrich
4. Sodium chloride จากบริษัท Sigma-Aldrich
5. Chloroform จากบริษัท Lab-Scan
6. Acetonitrile (HPLC grade) จากบริษัท Lab-Scan
7. Ammonium acetate จากบริษัท Sigma-Aldrich
8. Methanol (HPLC และ analytical grades) จากบริษัท Lab-Scan
9. Ethanol (analytical grade)
10. Sodium azide
11. Deionized water
12. Silicone DC 345
13. Sodium alginate
14. Calcium chloride

11. Deionized water
12. Silicone DC 345
13. Sodium alginate
14. Calcium chloride

อุปกรณ์ :

1. Phenomenex C_{18} column รุ่น Gemini
2. Round bottom ปริมาตร 100 ml
3. Nylon membrane filter มีรูพรุนขนาด 0.45 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 และ 3 cm
4. Cellulose acetate membrane filter มีรูพรุนขนาด 0.2 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว
5. Syringe ขนาด 1 และ 5 ml
6. Auto-sample containers set ประกอบด้วย insert glass ปริมาตร 300 µl, vial container ปริมาตร 1.5 ml, septa และ screw cap
7. Beakers
8. Volumetric flasks
9. Eppendorf ปริมาตร 1.2 ml
10. Glass containers with cap
11. Thermometer
12. Aluminum foil
13. Parafilm
14. Pipette และ tips ขนาดต่างๆ
15. Transparency cuvette
16. ชุด Franz diffusion cell ประกอบด้วย donor compartment, receiving compartment, clamp, แผ่นอะคิลิกใสที่เจาะรูวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 cm (มีพื้นที่สำหรับการแพร่ผ่านเท่ากับ 0.5 cm^2) และชุดเก็บตัวอย่างสารละลาย
17. Magnetic bar
18. Vertical diffusion cell ที่ต่อกับ thermostate

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการทำงานวิจัย

1. การวิเคราะห์ปริมาณเรติโนอิกเอซิดด้วยวิธี HPLC

เมื่อ all-*trans* retinoic acid **หรือเรติโนอิกเอซิดถูกแสงหรือทำปฏิกิริยากับสารอ๊อกซิแดนซ์** จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ของมันในรูปต่างๆ ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิด จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ที่ยังคงอยู่ของเรติโนอิกเอซิด

2. การเตรียมอนุภาคไมเซลด้วยโพลิเมอร์ชนิดโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่ภายในบรรจุด้วยเรติโนอิกเอซิด

ก่อนทำการเตรียมเรติโนอิกเอซิดลงในอนุภาคไมเซล ต้องรู้ความเข้มข้นวิกฤต (critical micelle concentration หรือ CMC) ของสารโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับกรดไขมันชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่สำคัญและจำเพาะของสารแต่ละชนิด โดยมีขั้นตอนการทดลองต่อไปนี้

- นำสาร PEG-PE มาละลายด้วย chloroform ในขวดก้นกลม
- จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 45-50 °C เป็นเวลา 10 นาที
- เมื่อตัวทำละลายระเหยออกจะได้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ กระจายอยู่ที่ก้นขวด ทำการละลายแผ่นฟิล์มด้วยการเติมและเขย่ากับสารละลาย HBS (HEPES buffer saline, pH 7.4) จนกระทั่งได้สารละลาย PEG-PE in HBS ที่มีความเข้มข้น 5 mM
- นำสารละลาย PEG-PE มาเตรียมให้เจือจางด้วย HBS โดยให้มีความเข้มข้นของสารละลาย PEG-PE อยู่ระหว่าง 10^{-4} ถึง 10^{-6} M
- เติมผงเรติโนอิกเอซิดปริมาณที่เท่ากันลงในแต่ละความเข้มข้นของสารละลาย PEG-PE จากนั้นนำสารละลายผสมดังกล่าวไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบในสภาวะที่ป้องกันแสงด้วย aluminum foil
- เมื่อครบเวลา 36 ชั่วโมง กรองตะกอนเรติโนอิกเอซิดที่ไม่ละลายออกจากสารละลาย PEG-PE ด้วย 0.45 μm nylon membrane filter จากนั้นวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเรติโนอิกเอซิดที่ละลายอยู่ในสารละลาย PEG-PE ณ ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี HPLC (ดังแสดงในข้างต้น) เปรียบเทียบกับสารละลายควบคุมที่มีเรติโนอิกเอซิดแต่ไม่มีสาร PEG-PE

เมื่อรู้ค่า CMC ของสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ จากข้างต้นเรียบร้อยแล้ว จึงทำการเตรียมอนุภาคไมเซลที่ภายในบรรจุเรติโนอิกเอซิดด้วยวิธีการระเหยตัวทำละลาย (solvent evaporation) ซึ่งมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการหาค่า CMC ดังที่กล่าวในข้างต้น โดยชั่งปริมาณสาร PEG-PE เท่ากับปริมาณที่สามารถเกิดอนุภาคไมเซลได้

3. ศึกษาคุณลักษณะของไมเซลที่มีเรติโนอิกเอซิด

ทำการศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของไมเซลที่มีและไม่มีเรติโนอิกเอซิด เช่น ความสามารถในการบรรจุเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ, การวัดขนาดอนุภาค, การวัดประจุบนอนุภาค และรูปทรงของอนุภาคไมเซล ซึ่งมีรายละเอียดการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 การหา % entrapment efficiency ของเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซล

มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการหาค่า CMC ของสาร PEG-PE ดังที่กล่าวในข้างต้น กล่าวคือ นำสารละลาย PEG-PE ผสมให้กันกับสารละลายเรติโนอิกเอซิด(ที่ใช้ปริมาณเริ่มต้น 2, 5, 10 μg) ละลายก่อนนำไประเหยเพื่อทำให้เกิดฟิล์มของสาร PEG-PE กับเรติโนอิกเอซิด

- ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเรติโนอิกเอซิดที่ละลายอยู่ในสารละลาย PEG-PE ด้วยวิธี HPLC พร้อมคำนวณ % entrapment efficiency จากสมการ

$$\% \text{ entrapment efficiency} = \frac{\text{เรติโนอิกเอซิดที่วิเคราะห์ได้ในสารละลาย PEG-PE}}{\text{ความเข้มข้นเรติโนอิกเอซิดเริ่มต้น}} \times 100$$

3.2 การวัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ

- เทสารละลายไมเซลใส่ใน transparency cuvette ปริมาตรอย่างน้อย 1 ml
- นำสารละลายดังกล่าววิเคราะห์หาขนาดของอนุภาคไมเซลด้วยเครื่อง BIC Particle Sizing (Brookhaven instrument, Holtsville, NY)

3.3 การวัดประจุอนุภาคไมเซลของสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ

- เทสารละลายไมเซลใส่ใน transparency cuvette ปริมาตร 1 ml
- นำสารละลายดังกล่าววิเคราะห์หาประจุบนอนุภาคไมเซลด้วยเครื่อง Zeta Potential Analyzer (Brookhaven instrument, Holtsville, NY)

3.4 การวิเคราะห์รูปร่างของอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE

การศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์รูปทรงของอนุภาคไมเซลที่ได้จากสาร PEG-PE ด้วยเครื่อง Transmission electron microscopy ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างคร่าวๆ ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องกำลังขยายสูง ดังนี้

- นำสารละลายไมเซลหยดลงบน copper grid ในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายไมเซลแห้งที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างที่ตั้งทิ้งไว้ ทำการซับสารละลายส่วนเกินออกด้วยทิชชู่โดยการค่อยๆ ซับออกจากบริเวณขอบของ copper grid เพียงเบาๆ

- นำสารละลายไมเซลที่แห้งเรียบร้อยแล้วบน copper grid วางบนที่ตั้งของเครื่อง Transmission electron microscopy และทำการบันทึกภาพอนุภาคที่ได้

4. ศึกษาความคงตัวทางเคมีของเรติโนอิกเอซิดในไมเซลที่ได้จากโพลีเอทิลีนไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมัน

ทำการคัดเลือกสาร PEG-PE ที่ให้ความสามารถในการกักเก็บเรติโนอิกเอซิดได้สูงสุดนำมาศึกษาความคงตัวดังต่อไปนี้

4.1 ผลของแสง

ศึกษาผลของแสงที่มีต่อเรติโนอิกเอซิดที่บรรจุในอนุภาคไมเซล เทียบกับสารละลายเรติโนอิกเอซิดที่ไม่ได้บรรจุในอนุภาคไมเซล (สารละลายควบคุม) ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

- เตรียมเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซลและสารละลายควบคุม จากนั้นทำการหาความเข้มข้นของเรติโนอิกเอซิดในสารละลายทั้งสองชนิดด้วยวิธี HPLC

- นำสารละลายทั้งสองชนิดบรรจุลงในขวดแก้ว จากนั้นนำสารละลายทั้งสองชนิดเก็บไว้ในสภาวะที่โดนแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยวางให้ห่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นระยะประมาณ 1-1.5 เมตร

- ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเรติโนอิกเอซิดที่เหลืออยู่ในสารละลายทั้งสองที่เวลาต่างๆ ดังนี้ เวลาเริ่มต้น (t=0), 15, 30, 45 นาที, 1, 3, 6 และ12 ชั่วโมง หลังจากโดนแสง

4.2 ผลของออกซิเจน

การทดลองนี้ ทำการศึกษาผลของสารอ๊อกซิแดนซ์ที่มีต่อการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซล โดยทำการออกแบบการทดลองปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่น ด้วยการบรรจุก๊าซออกซิเจนลงในสารละลายเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซล เปรียบเทียบกับผลของสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนด้วยการบรรจุก๊าซไนโตรเจน และเทียบกับสภาวะห้อง มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

- ทำการเตรียมเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซลและสารละลายเรติโนอิกเอซิดที่ไม่มีอนุภาคไมเซล พร้อมทั้งหาความเข้มข้นของเรติโนอิกเอซิดในสารละลายทั้งสองชนิดด้วยวิธี HPLC จากนั้น นำสารละลายทั้งสองชนิดแบ่งใส่บรรจุภัณฑ์ทึบแสงอย่างละ 3 ขวดในปริมาณที่เท่ากัน

- นำสารละลายไมเซลและสารละลายควบคุมอย่างละ 1 ขวด ใส่ลงในภาชนะปิดที่ภายในอิ่มตัวไปด้วยก๊าซออกซิเจน ทำการพ่นก๊าซออกซิเจนลงในสารละลายอีกครั้งก่อนปิดผนึกด้วยจุกยาง จากนั้น พันรอบจุกอีกครั้งด้วยพาราฟิล์ม โดยขั้นตอนการเตรียมถูกทำในสภาวะที่ไม่โดนแสง

- สำหรับสภาวะควบคุมหรือการบรรจุก๊าซไนโตรเจนลงในสารละลาย ให้ทำการเตรียมแบบเดียวกับการเตรียมสารละลายภายใต้ก๊าซออกซิเจน โดยเปลี่ยนจากก๊าซออกซิเจนเป็นก๊าซไนโตรเจนแทน ส่วนการเตรียมสารละลายในสภาวะห้อง ให้ทำการเตรียมในห้องปฏิบัติการที่ไม่โดนแสง

- จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดทั้ง 6 ขวดเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และทำการวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิดที่เหลืออยู่ในแต่ละสภาวะที่เวลาต่างๆ กัน กล่าวคือ เวลาเริ่มต้น (t=0), วันที่ 1, 3, 5, 7,14, 21, และวันที่ 28 ของการทดสอบ

5. ศึกษาการปลดปล่อยเรติโนอิกเอซิดจากอนุภาคโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมัน

ทำการศึกษาการปลดปล่อยเรติโนอิกเอซิดจากอนุภาคโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมันชนิด PEG_{750}-DPPE ผ่านผิวหนังที่ได้จาก foreskin ด้วยวิธี Franz diffusion ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

- ทำการประกบ foreskin ด้วยแผ่นอะคิลิคใส 2 แผ่น ที่มีพื้นที่วงกลมสำหรับการแพร่ผ่าน 0.5 cm^2 โดยให้ชั้นบนสุด (stratum corneum) ประกบกับ donor compartment และผิวหนังชั้นล่าง (dermis) วางอยู่บน receiving compartment ที่ภายในบรรจุสารละลาย 50% ethanol/HBS containing 0.15 mM sodium azide, pH 7.4 ปริมาตร 8 ml เป็น receiving solution พันล้อมรอบด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันแสง

- นำชุด Franz cell ที่มีแผ่น foreskin วางบนเครื่อง vertical diffusion cell ที่ต่อกับ thermostate ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 32 °C พร้อมทั้งปั่น receiving solution ตลอดการทดสอบ ทำการบ่ม foreskin ให้อิ่มตัวไปด้วยสารละลายจาก receiving solution เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดสอบ

- เติมสารละลายเรติโนอิกเอซิดที่อยู่ในอนุภาค PEG_{750}-DPPE หรือสารละลายเรติโนอิกเอซิดใน 50% ethanol/HBS solution (สารละลายควบคุม) ปริมาณ 77 µl ลงบน foreskin ซึ่งมีปริมาณเรติโนอิกเอซิดเฉลี่ยอยู่ที่ 20 µg

- เก็บตัวอย่างสารละลายจาก receiving solution ที่เวลาต่างๆ กล่าวคือ เวลาเริ่มต้น (t=0), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, และ 8 ชั่วโมงหลังจากการเติมสารละลายทดสอบ โดยหลังจากเก็บตัวอย่างสารละลายจาก receiving solution ให้ทำการเติมสารละลาย 50% ethanol/HBS containing 0.15 mM sodium azide, pH 7.4 ลงในในปริมาณเท่าเดิมเพื่อให้เกิด sink condition ตลอดการทดสอบ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิดในสารละลายอนุภาค PEG_{750}-DPPE และสารละลายควบคุมเพื่อใช้เป็นปริมาณเรติโนอิกเอซิดเริ่มต้น พร้อมทั้งหาปริมาณสารดังกล่าวใน receiving solution ของแต่ละช่วงเวลาด้วยวิธี HPLC

- หลังชั่วโมงที่ 8 ของการทดสอบ ทำการสกัดเรติโนอิกเอซิดที่เหลืออยู่ที่ส่วนต่างๆ ของ Franz cell กล่าวคือ donor compartment (donor cell และแผ่นอะคิลิกที่อยู่ติดกับ donor cell) พร้อมทั้งซับปริมาณเรติโนอิกเอซิดที่เหลืออยู่บนผิว foreskin ออกเบาๆ ด้วยกระดาษทิชชู่

- ทำการแยกชั้น stratum corneum ออกจากชั้น viable epidermis ด้วยวิธี tape stripping จนกระทั่งชั้น SC ถูกแยกออกหมด ส่วนที่เหลือจากชั้น SC ซึ่งได้แก่ viable epidermis และชั้น dermis จะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงใน eppendorf

- นำสารละลาย 50% ethanol ใส่ลงในภาชนะที่บรรจุส่วนประกอบต่างๆ (ข้างต้น) เพื่อสกัดเอาเรติโนอิกเอซิดออก พร้อมวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิดที่มีอยู่ด้วยวิธี HPLC

6. การเตรียมนาโนแคปซูลแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุไมเซลของเรติโนอิกเอซิด

แคปซูลของแคลเซียมอัลจิเนตเป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่าง สารอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์เกิดเป็นเปลือกบางๆ ขึ้นห่อหุ้มของเหลวหรือสารละลายไว้ภายในแคปซูล ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

- นำสารละลายไมเซลของเรติโนอิกเอซิดปริมาณ 7 ml ผสมกับสารละลายอัลจิเนตความเข้มข้น 1.5% w/v ปริมาตร 3 ml กวนผสมเบาๆ ให้เข้ากัน

- หยดสารละลายไมเซลที่มีส่วนผสมของอัลจิเนตลงในซิลิโคน (silicone DC 345) พร้อมปั่นเบาๆ ด้วย magnetic bar บน magnetic stirrer ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm

- ค่อยๆ โปรยผงแคลเซียมคลอไรด์ที่บดละเอียดจำนวน 0.1 g ลงในซิลิโคนที่มีสารละลายไมเซลผสมกับอัลจิเนต ทำการปั่นด้วยความเร็วรอบคงที่เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยากันเป็นเม็ดแคปซูล

- เก็บแคปซูลแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซลของเรติโนอิกเอซิดขึ้นจากซิลิโคนด้วยการกรองผ่านตะแกรงที่มีรูพรุนขนาดเล็ก

ผลการทดลอง

1. สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิด

เริ่มต้นการทดลองด้วย การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิดในสารละลายด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งสภาวะในการวิเคราะห์มีดังนี้

- Shimadzu (Japan) HPLC system with LC-10A pump
- UV-Visible detector
- Controller ; Computer software Class LC10A (Shimadzu, Japan)
- Column ; Phenomenex Luna 5 µm. C18 (250 x 4.60 mm I.D.)
- Guard column ; Phenomenex C 18
- Solvent system ; Acetonitrile : ammonium acetate, pH 3.0 = 75 : 25 v/v
- Flow rate ; 1.5 ml/min (isocratic pump)
- Auto – Injector ; SIL – 10AD VP (Shimadzu, Japan)
- Injection volume ; 20 µl
- Wavelength ; 350 nm
- Retention time ; 25 min

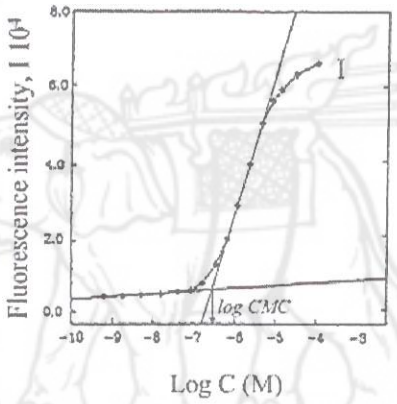
จากสภาวะข้างต้น สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิดในรูป all-*trans* และสามารถวิเคราะห์แยกจากไอโซเมอร์ได้อีกด้วย เช่น 13-*cis* retinoic acid , 9-*cis* retinoic acid เป็นต้น โดยพีคโครมาโตแกรมของเรติโนอิกเอซิดจะถูกชะออกจากคอลัมน์และวิเคราะห์ได้ที่เวลาระหว่าง 20-21 นาทีหลังจากการฉีดด้วยสภาวะนี้

2. เตรียมอนุภาคไมเซลจากสารโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมันชนิดต่างๆ (PEG-PE) ที่ภายในบรรจุเรติโนอิกเอซิด

การทดลองนี้ใช้หลักการการวัดค่าการละลาย (solubilization) ที่เพิ่มขึ้นของเรติโนอิกเอซิด กล่าวคือ เรติโนอิกเอซิดเป็นสารที่ละลายได้ง่ายในน้ำมันหรือตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) แต่มีความสามารถละลายในน้ำได้ต่ำมากๆ ดังนั้นในสารละลายควบคุมที่มีเรติโนอิกเอซิดแต่ไม่มีสาร PEG-PE จึ่งไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิดได้ด้วยเครื่อง HPLC

เมื่อเติมสาร PEG-PE ลงในระบบ ณ ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า CMC สาร PEG-PE จะกระจายอยู่เป็นโมเลกุลเดี่ยวๆ เมื่อความเข้มข้นของสาร PEG-PE เพิ่มขึ้น จำนวนโมเลกุลของสาร PEG-PE ในระบบก็เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งถึง (หรือเข้าใกล้) จุดความเข้มข้นจำเพาะ (CMC) สาร PEG-PE จะหันส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ (โมเลกุลของ PE) เข้าหากัน และถูกล้อมรอบด้วยส่วนที่ละลายในน้ำ (โมเลกุลของ PEG) เกิดเป็นอนุภาคไมเซลขนาดเล็ก โดยเรติโนอิกเอซิดจะถูกรวมกันอยู่ในส่วนของ PE หรือภายในไมเซล (micellar core) จึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณเรติโนอิกเอซิดที่ละลายได้มากขึ้นได้เมื่อเข้าใกล้จุด CMC ของสาร PEG-PE

ค่า CMC ถูกคำนวณจากการสร้างกราฟระหว่างลอการิธึ่มความเข้มข้นของสาร PEG-PE กับความเข้มข้นของเรติโนอิกเอซิดที่วิเคราะห์ได้ จุดตัดแกน x ของเส้นกราฟ 2 เส้น เป็นค่า CMC ของสาร PEG-PE ชนิดนั้นๆ ดังแสดงในรูปข้างล่างนี้



รูปที่ 2 แสดงวิธีการคำนวณหาค่า CMC ของสาร PEG-PE ด้วยการวัดความเข้มของสารฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้น เช่น สาร pyrene เมื่อสารละลาย PEG-PE มีความเข้มข้นเข้าใกล้บริเวณ CMC

จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าค่า CMC ของสาร PEG-PE มีค่าอยู่ในระดับไมโครโมลาร์ (μM) ซึ่งต่ำกว่าค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวทั่วไป (ที่อยู่ในระดับมิลลิโมลาร์, mM) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่า CMC ของสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ จากการละลายที่เพิ่มขึ้นของเรติโนอิกเอซิด (n=3)

PEG-PE copolymers	Critical micelle concentration (M)
PEG_{5000}-DPPE (C16:0)	2.81×10^{-5}
PEG_{750}-DPPE (C16:0)	2.49×10^{-4}
PEG_{750}-DMPE (C14:0)	2.43×10^{-4}
PEG_{750}-DSPE (C16:0)	9.72×10^{-5}
PEG_{750}-DOPE (C16:1)	6.98×10^{-5}

ค่า CMC ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ มีความคลาดเคลื่อนเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการค่า CMC ของสาร PEG-PE ที่ปรากฏในผลงานวิจัยที่ผ่านมา [1] โดยความยาวของสาย PEG และจำนวนโมเลกุลของกรดไขมันมีผลอย่างยิ่งต่อค่า CMC ของสาร กล่าวคือ เมื่อให้ความยาวหรือจำนวนคาร์บอนของกรดไขมันเท่ากันและความยาวสาย PEG แตกต่างกัน พบว่า ค่า CMC ของสารจะลดลงเมื่อเพิ่มความยาวสาย PEG ในขณะเดียวกัน เมื่อให้ความยาวสาย PEG เท่ากันและจำนวนคาร์บอนของกรดไขมันต่างกัน พบว่า จำนวนคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นบนโมเลกุลของกรดไขมันจะทำให้ค่า CMC ของสารลดลง นอกจากนั้น พันธะบนโมเลกุลกรดไขมันก็สามารถส่งผลต่อค่า CMC อีกด้วย

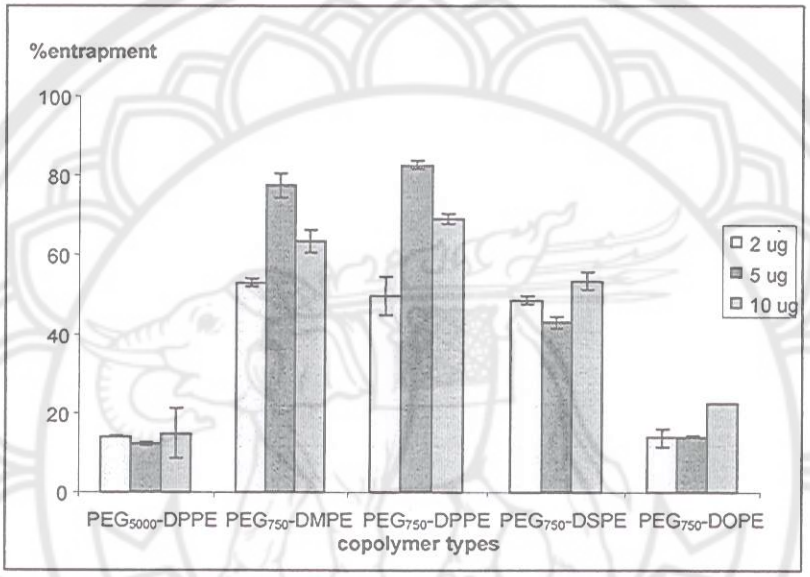
จากผลงานวิจัยที่ถูกตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ กล่าวไว้ว่า วิธีการเตรียม, ชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ ตลอดจนชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ มีผลต่อคุณลักษณะต่างๆ ของอนุภาคไมเซล และมีผลต่อปริมาณและประสิทธิภาพในการบรรจุสารสำคัญในอนุภาค เป็นอย่างยิ่ง [2, 3] อนุภาคไมเซลสามารถเตรียมได้หลายวิธี และจากงานวิจัยที่ผ่าน พบว่า เมื่อเตรียมอนุภาคไมเซลของสาร PEG-PE ด้วยวิธีระเหยตัวทำละลายชนิด chloroform ถือเป็นวิธีการเตรียมที่ง่าย ไม่ยุ่งยากหรือซับซ้อน และอนุภาคไมเซลที่ได้จากสาร PEG-PE มักจะให้รูปร่างแบบ spherical shape เมื่อเทียบกับการเตรียมอนุภาคไมเซลด้วยวิธีอื่นๆ [4, 5]

3. การศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของเรติโนอิกเอซิดเมื่อถูกบรรจุในอนุภาคไมเซลของสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ

หลังจากเตรียมเรติโนอิกเอซิดลงในอนุภาคไมเซลของสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว จึงทำการศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ของอนุภาคไมเซลที่มีและไม่มีเรติโนอิกเอซิดดังต่อไปนี้

3.1 การหา % entrapment efficiency ของเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซล

เป็นการหาประสิทธิภาพการบรรจุเรติโนอิกเอซิดลงในอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ โดยเรติโนอิกเอซิดจะถูกบรรจุไว้ในส่วนใจกลางของอนุภาคไมเซลซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ (โมเลกุลของ PE) อนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการบรรจุเรติโนอิกเอซิดแตกต่างกัน



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพในการบรรจุเรติโนอิกเอซิดในสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ เมื่อปริมาณเรติโนอิกเอซิดเริ่มต้นเท่ากับ 2, 5, 10 μg (n=3, mean ± S.E.)

จากรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าทั้งอนุภาคจากสาร PEG-PE และปริมาณเรติโนอิกเอซิดเริ่มต้นมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญ กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบอนุภาคไมเซลที่มีความยาวสาย PEG ต่างกัน (ระหว่าง PEG_{5000}-DPPE และ PEG_{750}-DPPE) พบว่า เมื่อเพิ่มความยาวสายเพิ่มขึ้นทำให้ความสามารถในการกักเก็บเรติโนอิกเอซิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ เมื่อความยาวสายของกรดไขมันต่างกัน พบว่า มีความสามารถในการกักเก็บเรติโนอิกเอซิดไว้ได้ใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุภาคไมเซลที่ได้จาก PEG_{750}-DMPE และ PEG_{750}-DPPE นอกจากนี้ พันธะคู่ในโมเลกุลกรดไขมันมีผลทำให้ความสามารถในการกักเก็บเรติโนอิกลดลงเมื่อเทียบกับพันธะเดี่ยวในโมเลกุลกรดไขมัน

จากผลการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ปริมาณเรติโนอิกเอซิดเริ่มต้น 5 μg จะให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญสูงสุดโดยเฉพาะเมื่ออยู่ในอนุภาคไมเซลชนิด PEG_{750}-DPPE

6.3.2 การวัดขนาดอนุภาคไมเซลและการกระจายตัวของอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ

ในการทดสอบนี้ เป็นการวัดขนาดของอนุภาคไมเซลที่ได้จากสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ ที่บรรจุและไม่บรรจุเรติโนอิกเอซิด ด้วยเครื่อง BIC Particle Sizing (Brookhaven instrument, Holtsville, NY) นอกจากนี้ ทำการตรวจสอบการกระจายตัวของอนุภาคไมเซลด้วยว่ามีการกระจายตัวอย่างไร

ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ที่มีและไม่มีเรติโนอิกเอซิด (n=3, mean $\pm$ SD)

PEG-PE Copolymers	micelle size (nm)	
	with all-*trans* retinoic acid	without all-*trans* retinoic acid
PEG_{5000}-DPPE	20.3 $\pm$ 1.0	17.3 $\pm$ 3.4
PEG_{750}-DPPE	7.5 $\pm$ 1.3	7.2 $\pm$ 0.9
PEG_{750}-DMPE	6.9 $\pm$ 0.3	6.6 $\pm$ 0.9
PEG_{750}-DOPE	9.7 $\pm$ 0.8	7.6 $\pm$ 1.0
PEG_{750}-DSPE	8.2 $\pm$ 0.7	7.9 $\pm$ 1.1

จากตารางที่ 2 พบว่า ขนาดอนุภาคไมเซลของสาร PEG-PE อยู่ในระดับนาโนเมตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุภาคไมเซลที่ได้จาก PEG 750 Daltons ไมเซลที่ได้มีขนาดไม่เกิน 10 นาโนเมตร จากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าความยาวของสาย PEG มีผลต่อขนาดอนุภาคไมเซลเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคไมเซลที่มีและไม่มีเรติโนอิกเอซิดอยู่ภายในอนุภาค พบว่า ไมเซลมีขนาดใกล้เคียงกันหรือไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 แสดงการกระจายของอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ที่มีและไม่มีเรติโนอิกเอซิด (n=3, mean $\pm$ SD)

PEG-PE Copolymers	Polydispersity index	
	with all-*trans* retinoic acid	without all-*trans* retinoic acid
PEG_{5000}-DPPE	0.394 ± 0.016	0.368 ± 0.001
PEG_{750}-DPPE	0.238 ± 0.028	0.295 ± 0.005
PEG_{750}-DMPE	0.418 ± 0.045	0.415 ± 0.020
PEG_{750}-DOPE	0.537 ± 0.047	0.235 ± 0.012
PEG_{750}-DSPE	0.376 ± 0.021	0.394 ± 0.023

ตารางที่ 3 แสดงผลการกระจายตัวของขนาดอนุภาคไมเซลเมื่อวัดด้วยเครื่อง BIC Particle Sizing จากผลการทดสอบ พบว่าค่า polydispersity indexes ของอนุภาคไมเซลที่มีและไม่มีเรติโนอิกเอซิด มีการกระจายตัวแบบ monodispersion ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไมเซลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีขนาดใกล้เคียงกัน

6.3.3 การวัดประจุบนอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ

นอกจากนี้ ได้ทำการวัดค่าประจุบนผิวของอนุภาคไมเซลที่บรรจุและไม่ได้บรรจุเรติโนอิกเอซิดไว้ภายในอนุภาคด้วยเครื่อง Zeta Potential Analyzer (Brookhaven instrument, Holtsville, NY) ดังแสดงผลในตารางข้างล่างนี้

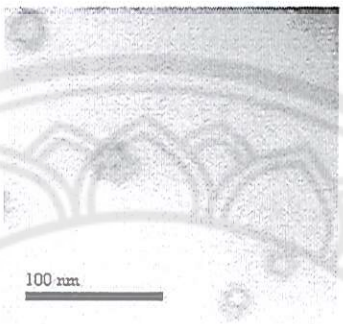
ตารางที่ 4 แสดงค่าประจุบนผิวอนุภาคไมเซลของสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ (n = 3, mean ± SD)

PEG-PE Copolymers	zeta potential (mV)	
	with all-*trans* retinoic acid	without all-*trans* retinoic acid
PEG_{5000}-DPPE	-2.10 ± 1.09	-0.84 ± 2.67
PEG_{750}-DPPE	1.05 ± 0.78	4.29 ± 1.87
PEG_{750}-DMPE	0.99 ± 0.95	1.49 ± 1.27
PEG_{750}-DOPE	0.90 ± 0.80	0.38 ± 0.88
PEG_{750}-DSPE	1.01 ± 0.98	0.97 ± 1.02

ผลการทดสอบในตารางที่ 4 พบว่า ประจุบนอนุภาคไมเซลมีค่าเป็นกลางทั้งที่บรรจุและไม่ได้บรรจุเรติโนอิกเอซิด เนื่องจากโมเลกุลของ PEG มีความเป็นกลาง ดังนั้นเมื่อสาร PEG-PE เกิดเป็นอนุภาคไมเซล การวัดค่าประจุอนุภาคไมเซลจึงเป็นการวัดค่าประจุของ PEG จึงเห็นว่าอนุภาคไมเซลที่ได้นั้นมีค่าเป็นกลางทุกชนิด

6.3.4 การวิเคราะห์รูปร่างของอนุภาคไมเซลจากสาร PEG-PE

ทำการวิเคราะห์รูปทรงของอนุภาคไมเซลที่ได้จากสาร PEG_{750}-DPPE ด้วยเครื่อง Transmission electron microscopy พบว่า อนุภาคไมเซลที่ได้มีรูปทรงกลมขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงอนุภาคไมเซลที่ได้จากสาร PEG_{750}-DPPE ที่ไม่ได้บรรจุเรติโนอิกเอซิดไว้ภายใน (กำลังขยาย 150,000 เท่า)

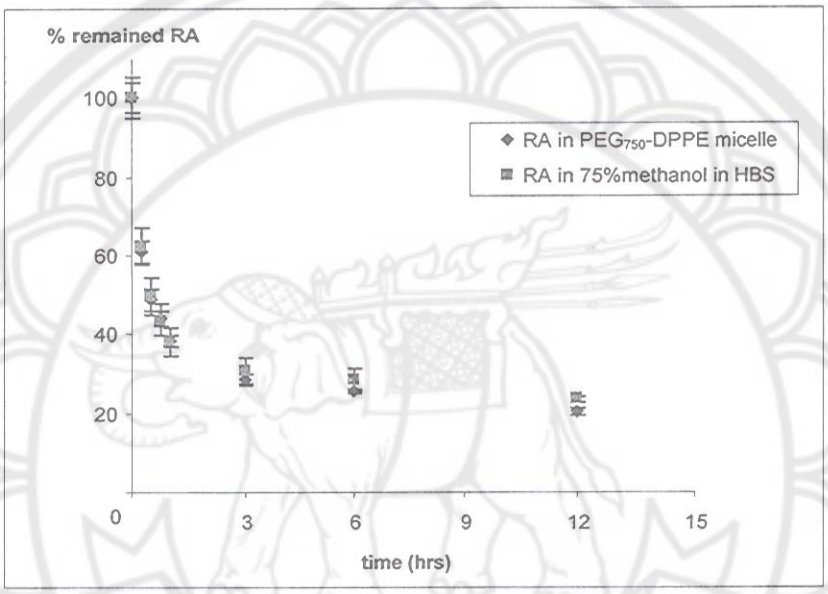
จากผลการทดสอบคุณลักษณะของอนุภาคไมเซลที่ได้จากสาร PEG-PE ชนิดต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น พบว่า อนุภาคไมเซลที่ได้จากสาร PEG_{750}-DPPE มีประสิทธิภาพในการบรรจุเรติโนอิกเอซิดสูงที่สุด อนุภาคที่ได้มีรูปทรงกลมและขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการคัดเลือกไมเซลที่เกิดจากสาร PEG_{750}-DPPE มาใช้เป็นตัวกักเก็บเรติโนอิกเอซิด เพื่อทำการศึกษาความคงตัวและการปลดปล่อยของเรติโนอิกเอซิดต่อไป

6.4 ศึกษาความคงตัวทางเคมีของเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซลที่ได้จากสารโพลีเอทิลีนไกลคอลเชื่อมต่อกับกรดไขมัน

เนื่องจากเรติโนอิกเอซิดเป็นสารที่มีค่าการละลายน้อยมากในน้ำหรือในสารละลายบัฟเฟอร์ ดังนั้น การเตรียมสารละลายเรติโนอิกเอซิดที่ไม่มีอนุภาคไมเซลทำได้โดย ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (เช่น methanol) เข้ามาช่วยละลายและเตรียมเป็นสารละลายเรติโนอิกเอซิดที่ละลายอยู่ใน 75% methanol in HBS solution

6.4.1 ผลของแสงที่มีต่ออนุภาคไมเซลของเรติโนอิกเอซิด

แสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิดเป็นอย่างมาก โดยเรติโนอิกเอซิดจะเกิดการบิดของโครงสร้างอย่างรวดเร็วกลายเป็นไอโซเมอร์ในรูปต่างๆ เช่น 13-*cis* retinoic acid, 9-*cis* retinoic acid เป็นต้น ในการทดลองนี้ ทำการศึกษาผลของแสงที่มีต่อเรติโนอิกเอซิดที่บรรจุในอนุภาคไมเซลจาก PEG_{750}-DPPE in HBS solution เทียบกับสารละลายเรติโนอิกเอซิดที่ไม่ได้บรรจุในอนุภาคไมเซล (สารละลายควบคุม)



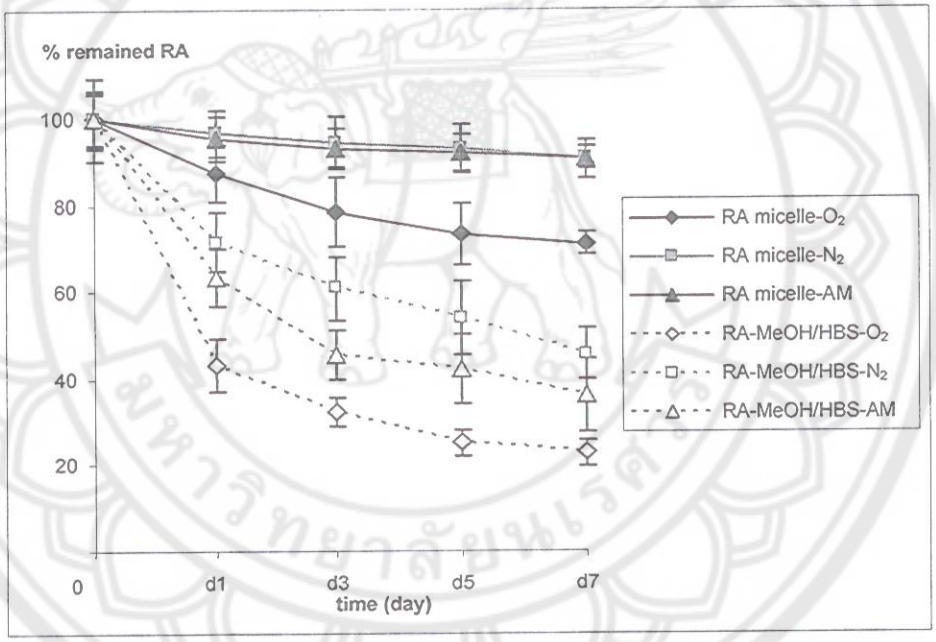
รูปที่ 5 แสดงเปอร์เซนต์คงอยู่ของเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซล (◆) และในสารละลายควบคุม (■) ภายใต้สภาวะที่โดนแสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

จากผลการทดลองของแสง ที่มีต่อความเข้มข้นของเรติโนอิกเอซิดที่บรรจุในอนุภาคไมเซลจาก PEG_{750}-DPPE และในสารละลายควบคุม พบว่า ความเข้มข้นของเรติโนอิกในอนุภาคไมเซลจะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงเกือบ 50% ภายในเวลา 15 นาทีเมื่อโดนแสง ในขณะที่เรติโนอิกเอซิดในสารละลายควบคุมก็สลายตัวอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความคงตัวของเรติโนอิกเอซิดเมื่อถูกบรรจุใน liposome และ niosome [6, 7] สามารถอธิบายได้ว่า เนื่องจากสารละลายที่มีอนุภาคไมเซลมีลักษณะเป็นสารละลาย ใส จึงทำให้แสงทะลุผ่านไปได้ จึงเห็นว่าถึงแม้ เรติโนอิกเอซิดถูกบรรจุในอนุภาคไมเซลก็ยังคงเกิดการสลายตัวเช่นเดียวกันกับเรติโนอิกเอซิดในสารละลายควบคุม จากการทดลองนี้แสดงว่า แสงยังคงเป็นปัจจัยหลักของการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิด โดยทำให้เรติโนอิกเอซิดเกิดการบิดโครงสร้างกลายเป็นไอโซเมอร์ แต่อย่างไร

ก็ตาม จากการวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ไอโซเมอร์ของเรติโนอิกเอซิดก็มีฤทธิ์หรือประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเรติโนอิกเอซิด [8, 9]

6.4.2 ผลของออกซิเจนที่มีต่ออนุภาคไมเซลของเรติโนอิกเอซิด

นอกจากถูกกระตุ้นได้ง่ายด้วยแสงแล้ว เรติโนอิกเอซิดยังสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกอ๊อกซิไดซ์ด้วยสารอ๊อกซิแดนซ์ (oxidizing agent) ผ่านทางปฏิกิริยา epoxidation เกิดเป็น all-*trans* 5,6-epoxy retinoic acid เป็นต้น ซึ่งปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นของสารเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง สารต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยานี้จะถูกทำปฏิกิริยาด้วยออกซิเจนหรืออนุมูลอิสระที่อยู่ในระบบ ทำให้เกิดการสลายตัวหรือเปลี่ยนรูปของสารตั้งต้นไปเรื่อยๆ นอกจากนี้ ในชั้นผิวหนังไม่มีเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยน epoxy products ให้กลายเป็น all-*trans* retinoic acid

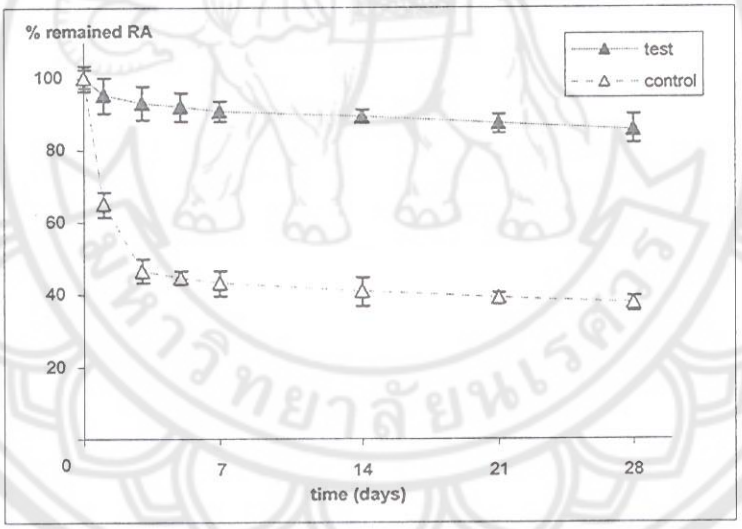


รูปที่ 6 แสดงเปอร์เซนต์คงอยู่ของเรติโนอิกเอซิดในสารละลายไมเซล (เส้นทึบ, solid line) และในสารละลาย 75% methanol in HBS (เส้นประ, dot line) เมื่อถูกเก็บภายใต้สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องและไม่โดนแสง

รูปที่ 6 เป็นผลการทดลองเพื่อเปรียบเทียบเรติโนอิกเอซิดที่ไม่ได้เตรียมในอนุภาคไมเซลกับที่บรรจุในอนุภาคไมเซลของ PEG_{750}-DPPE พบว่า อนุภาคไมเซลของ PEG_{750}-DPPE สามารถชะลอการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับไม่มีอนุภาคไมเซลในทุกๆ สภาวะ (สภาวะก๊าซออกซิเจน, สภาวะไนโตรเจน และสภาวะห้อง) เมื่อถูกเก็บรักษาใน

อุณหภูมิห้องและไม่โดนแสง โดยมีปริมาณเรติโนอิกเอซิดในสารละลายไมเซลเหลืออยู่ 87%, 97%, และ 95% เมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจน, ไนโตรเจน, และสภาวะห้องเป็นเวลา 1 วัน ตามลำดับ ในขณะที่เรติโนอิกมีการสลายตัวมากกว่า 20% ในสารละลายควบคุม โดยเรติโนอิกเอซิดมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วที่สุดเมื่อไม่มีอนุภาคไมเซลและอยู่ในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของออกซิเจนที่มีต่อการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิด พบว่า อนุภาคไมเซลของ PEG_{750}-DPPE ช่วยลดการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิดได้อย่างชัดเจน โดยมีปริมาณเรติโนอิกเอซิดในสารละลายไมเซลเหลืออยู่ 87% ในขณะที่สารละลายควบคุมมีปริมาณเหลืออยู่ 43% เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและไม่โดนแสง จากการทดสอบนี้ สามารถสรุปได้ว่าโมเลกุล PEG_{750}-DPPE ที่ล้อมรอบโมเลกุลเรติโนอิกเอซิดสามารถชะลอการสลายตัวอันเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นจากก๊าซออกซิเจนได้ ที่น่าสนใจอีกอย่างนึงจากการทดสอบนี้คือ เมื่อเก็บสารละลายเรติโนอิกเอซิดในอนุภาคไมเซลในสภาวะที่ไม่มีก๊าซออกซิเจนและสภาวะห้องที่อุณหภูมิห้องและปราศจากแสง พบว่า เรติโนอิกมีการสลายตัวเพียง 10% เท่านั้นหลังเก็บรักษา 7 วัน เมื่อทำการติดตามผลของปริมาณเรติโนอิกเอซิดที่เหลืออยู่ในสารละลายไมเซลเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า มีเรติโนอิกเอซิดเหลืออยู่ในสารละลายไมเซลถึง 86% (ดังแสดงในรูปที่ 7)

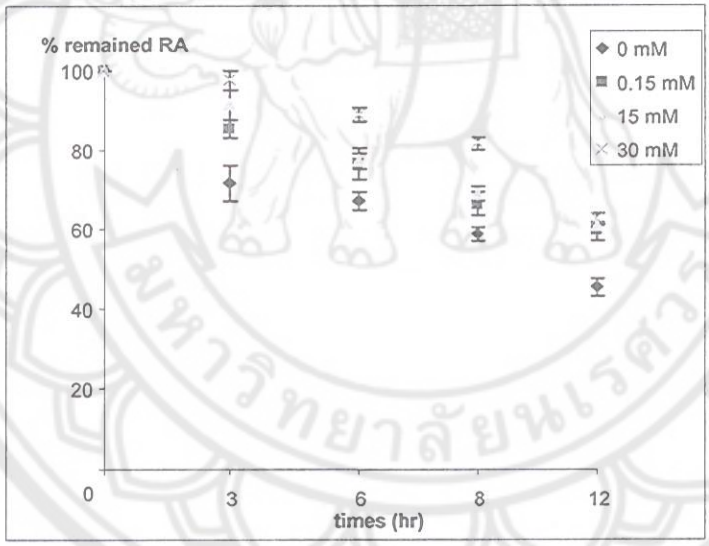


รูปที่ 7 แสดงเปอร์เซนต์คงอยู่ของเรติโนอิกเอซิดในสารละลายไมเซล (เส้นทึบ, solid line) และในสารละลาย 75% methanol in HBS (เส้นประ, dot line) เมื่อถูกเก็บในสภาวะห้องและไม่โดนแสง

6.5 ศึกษาการปลดปล่อยเรติโนอิกเอซิดจากอนุภาคโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมัน

ภายในร่างกายมีกระบวนการสลายเรติโนอิกเอซิดซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของทุกๆ เซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ผิวหนัง ดังนั้น ในขั้นตอนแรกทำการศึกษาการยับยั้งการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิดอันเนื่องจากเอนไซม์ภายในเซลล์ด้วยสาร sodium azide ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.15, 15, 30 mM ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการไม่ใช้สาร sodium azide

จากการทดสอบ พบว่า เกือบ 40% ของปริมาณเรติโนอิกเอซิดสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ภายใน foreskin เมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องปราศจากแสง นอกจากนี้ พบว่าสาร sodium azide มีความสามารถในการยับยั้งการสลายตัวของเรติโนอิกเอซิดจากการทำงานของเอนไซม์ภายใน foreskin ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยความสามารถในการยับยั้งการสลายตัวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร sodium azide ที่ใช้ดังแสดงในรูปที่ 8



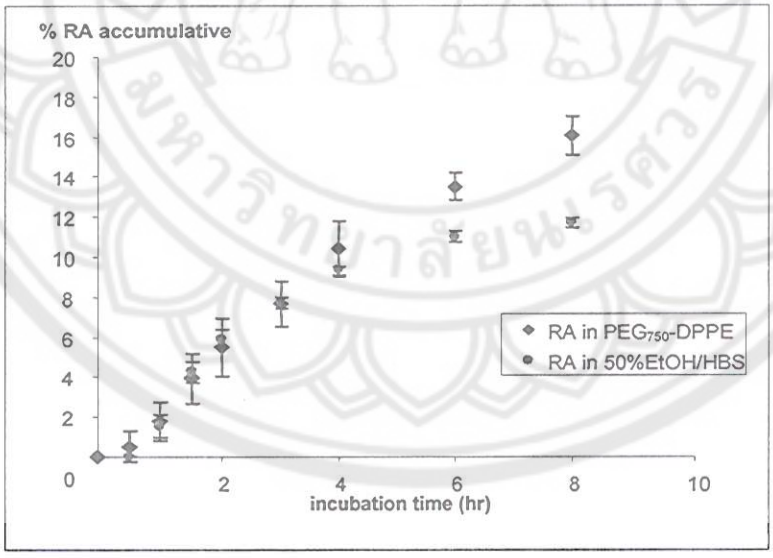
รูปที่ 8 แสดงผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายใน foreskin ด้วยสารละลาย sodium azide ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n=3, mean $\pm$ S.E.)

แต่อย่างไรก็ตามสาร sodium azide มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ethanol ได้น้อย โดยที่ความเข้มข้น 0.15 mM เมื่อถูกเตรียมให้อยู่ในรูปสารละลาย 50% ethanol/HBS containing sodium azide จะได้สารละลายใส ไม่เกิดผลึกของสาร sodium azide

ในขณะที่เมื่อเตรียมด้วยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดการตกผลึกของสาร sodium azide ดังนั้น receiving solution ที่ใช้การในทดสอบจึงมีสาร sodium azide ผสมร่วมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.15 mM ด้วย นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณเรติโนอิกเอซิดคงเหลืออยู่ 66% ของปริมาณเรติโนอิกเอซิดเริ่มต้น

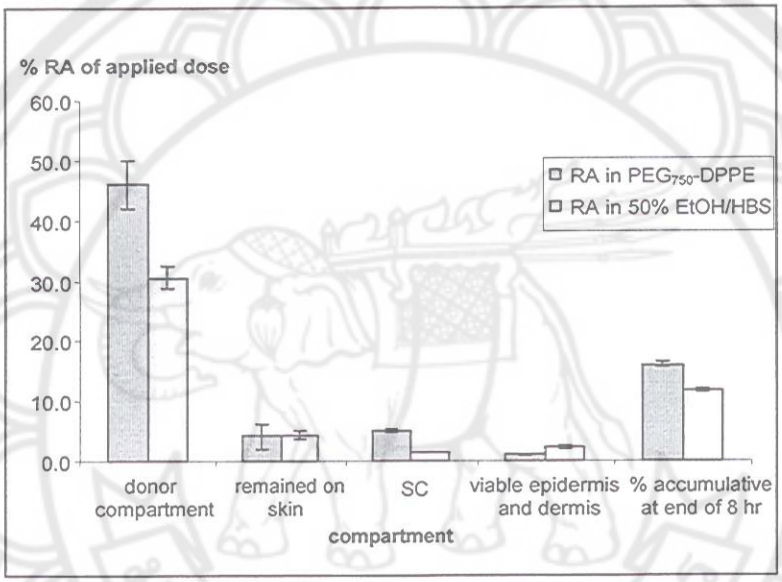
เนื่องจากผิวหนังที่ได้จาก foreskin มีพื้นที่สำหรับการทดสอบจำกัด จึงทำการประกบแผ่น foreskin ด้วยแผ่นอะคิลิกซึ่งกำหนดให้พื้นที่สำหรับการแพร่ผ่านเท่ากับ 0.5 cm^2 แทนการวางบนชุด Franz cell โดยตรง

เมื่อทำการทดสอบการปลดปล่อยเรติโนอิกเอซิดจากอนุภาคโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมันชนิด PEG_{750}-DPPE ผ่านผิว foreskin พบว่า เรติโนอิกเอซิดสามารถถูกวิเคราะห์ได้ใน receiving solution ตั้งแต่เวลา 30 นาทีหลังการหยดสารละลายลงบนผิว foreskin และเรติโนอิกเอซิดจะถูกปลดปล่อยอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 8 ชั่วโมงของการทดสอบ ในขณะที่เมื่อเตรียมเรติโนอิกเอซิดในรูปสารลายละลาย 50% ethanol/HBS พบว่า เรติโนอิกเอซิดถูกปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการทดสอบ และเริ่มปลดปล่อยช้าลงที่เวลา 4 ชั่วโมงของการทดสอบเป็นต้นไป โดยเมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่า 16% ของปริมาณเรติโนอิกเอซิดเริ่มต้น สามารถแพร่ผ่านผิว foreskin ได้เมื่อถูกเตรียมในอนุภาค PEG_{750}-DPPE ในขณะที่ 12% ของปริมาณเริ่มต้นสามารถแพร่ผ่านได้เมื่อเตรียมในรูปสารละลาย 50% ethanol/HBS (ดังแสดงในรูปที่ 9)



รูปที่ 9 แสดงเปอร์เซนต์การสะสมของเรติโนอิกเอซิดที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคโพลีเอทิลีน ไกลคอลเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของกรดไขมันชนิด PEG_{750}-DPPE แพร่ผ่านผิว foreskin (n=4, mean $\pm$ S.E.)

จากรูปที่ 10 เมื่อวิเคราะห์เปอร์การคงเหลือของเรติโนอิกเอซิดเมื่อเตรียมอยู่ในอนุภาค PEG_{750}-DPPE ในส่วนต่างๆ ของผิว foreskin พบว่า 22% ของปริมาณที่ใช้ สามารถแพร่ผ่านชั้น Stratum corneum และชั้น viable epidermis ตลอดจนชั้น dermis ได้ในปริมาณ 1% และ 16 % ตามลำดับ โดย 50% ของปริมาณที่ใช้คงเหลืออยู่บนผิว foreskin ในขณะที่เมื่อเตรียมเรติโนอิกเอซิดในรูปสารละลาย 50% ethanol/HBS พบว่า 1% ของปริมาณที่ใช้สามารถวิเคราะห์ได้ที่ชั้น Stratum corneum และ 2% สามารถวิเคราะห์ได้ในชั้น viable epidermis และชั้น dermis โดยคงเหลืออยู่บนผิว foreskin อยู่ 35% ของเรติโนอิกเอซิดที่ใช้



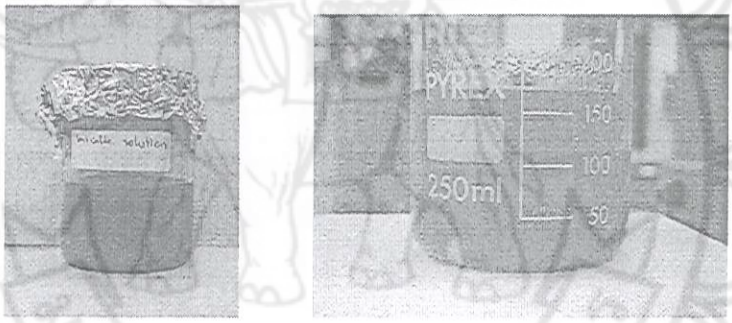
รูปที่ 10 เปอร์เซนต์การคงเหลือของเรติโนอิกเอซิดในส่วนต่างๆ หลังการทดสอบ 8 ชั่วโมง บนผิว foreskin (n=4, mean $\pm$ S.E.)

จากการทดสอบครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า อนุภาค PEG_{750}-DPPE ช่วยเพิ่มความสามารถในการแพร่ผ่านเรติโนอิกเอซิดลงสู่ผิว ทั้งนี้อาจเนื่องจากโมเลกุลของโพลีเอทิลีน ไกลคอลและกรดไขมันซึ่งมีหน้าที่เป็น chemical enhancer โดยเพิ่ม fluidity และ permeability ของชั้นไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ [10] ซึ่งทั้งสองปัจจัยนี้ ทำให้เพิ่มความสามารถในการนำส่งสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ผิว

6.6 การเตรียมนาโนแคปซูลแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุไมเซลของเรดิโนอิกเอซิด

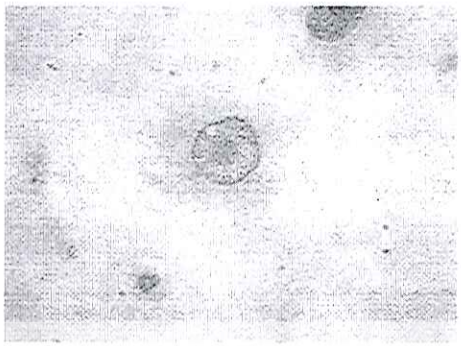
แคปซูลของแคลเซียมอัลจิเนตเป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่าง สารอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์เกิดเป็นเปลือกบางๆ ขึ้นห่อหุ้มของเหลวหรือสารละลายไว้ภายในแคปซูล แต่เนื่องจากสารละลายไมเซลมีลักษณะใส โปร่งแสง เมื่อทำเป็นเม็ดแคปซูลจะไม่สามารถมองเห็นได้ว่าสารละลายไมเซลถูกกักเก็บอยู่ในเม็ดแคปซูลจริงหรือไม่ ดังนั้นจึงทำการทดสอบโดยการใช้สีน้ำเงินซึ่งละลายในน้ำมันผสมลงในสารละลายไมเซล

จากรูปที่ 11 เป็นสารละลายไมเซลที่ผสมกับสารละลายอัลจิเนต (รูปซ้ายมือ) จะได้สารละลายไมเซลสีน้ำเงินเข้ม จากนั้นทำการหยดสารละลายไมเซลที่ผสมอัลจิเนตลงในซิลิโคน (ที่ไม่ละลายในน้ำ) ที่มีการปั่นเบาๆ จะได้อนุภาคทรงกลมขนาดเล็กสีน้ำเงิน เมื่อทำการโปรยแคลเซียมคลอไรด์ลงในบีกเกอร์ พร้อมปั่นเบาๆ จนกระทั่งเกิดการทำปฏิกิริยากันระหว่างอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ จะได้อนุภาคขนาดเล็กสีน้ำเงินกระจายอยู่ในซิลิโคน (รูปขวามือ)



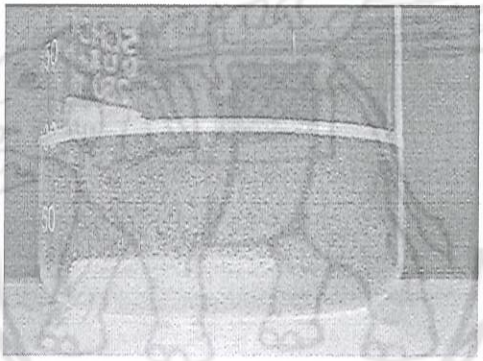
รูปที่ 11 สารละลายไมเซลผสมกับสารละลายอัลจิเนตที่มีการเติมสีน้ำเงิน (ซ้ายมือ) และแคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในมีสารละลายไมเซลกระจายตัวอยู่ในซิลิโคน (ขวามือ)

เมื่อดูรูปทรงอนุภาคแคลเซียมอัลจิเนตที่ได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่า อนุภาคที่ได้มีลักษณะทรงกลม ขนาดเล็ก ชั้นในสุดเป็นสารละลายไมเซลสีน้ำเงินที่ถูกล้อมรอบด้วยเปลือกของแคลเซียมอัลจิเนต (รูปที่ 12)

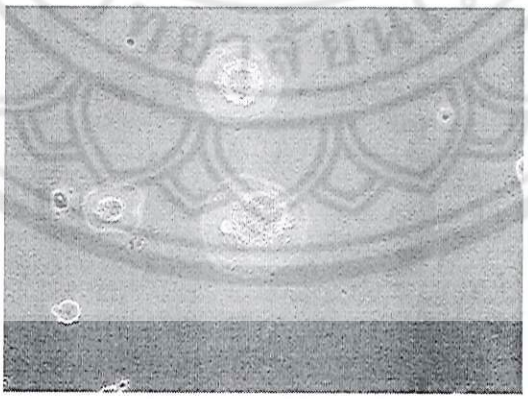


รูปที่ 12 แคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซลที่ย้อมด้วยสีน้ำเงิน (กำลังขยาย 10 เท่า)

จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมดังกล่าวสามารถใช้เตรียมแคปซูลแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซลของเรติโนอิกเอซิดได้



รูปที่ 13 แคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซล



รูปที่ 14 แคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซล (กำลังขยาย 10 เท่า)

2 GP
T22
.V5
ม๖๖๕

สำนักหอสมุด

รูปที่ 13 และ 14 แสดงอนุภาคขนาดเล็กจากการทำปฏิกิริยาของแคลเซียมคลอไรด์และอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซล และแคปซูลทรงกลมของแคลเซียมอัลจิเนตที่ภายในบรรจุสารละลายไมเซล ตามลำดับ

- 5 JUL 2011

สรุปผลการทดลอง

จากการวิจัยครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า เรติโนอิกเอซิดจะมีความคงตัวทางเคมีเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกักเก็บในอนุภาคไมเซลของสาร PEG_{750}-DPPE โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อถูกเก็บในสภาวะที่ไม่มีแสงที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอนุภาคไมเซลที่ได้มีอนุภาคทรงกลมขนาด 7 นาโนเมตร นอกจากนี้ อนุภาคไมเซลจาก PEG_{750}-DPPE ยังเพิ่มความสามารถในการปลดปล่อยเรติโนอิกเอซิดเข้าสู่ผิว และสามารถเตรียมเป็นแคปซูลขนาดเล็กของแคลเซียมอัลจิเนตได้ง่าย เพื่อทำการกักเก็บอนุภาคไมเซลไว้ภายใน

เอกสารอ้างอิง

[1] A.N. Lukyanov, Z. Gao, L. Mazzola, V.P. Torchilin, Polyethylene glycol-diacyllipid micelles demonstrate increased accumulation in subcutaneous tumors in mice. Pharmaceutical Research 19(10) (2002).

[2] C. Allen, D. Maysinger, A. Eisenberg, Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 16(1-4) (1999) 3-27.

[3] G. Gaucher, M.-H. Dufresne, V.P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, J.-C. Leroux, Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. Journal of Controlled Release 109(1-3) (2005) 169-188.

[4] A.N. Lukyanov, Z. Gao, V.P. Torchilin, Micelles from polyethylene glycol/phosphatidylethanolamine conjugates for tumor drug delivery. Journal of Controlled Release 91(1-2) (2003) 97-102.

[5] A.N. Lukyanov, V.P. Torchilin, Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. Advanced Drug Delivery Reviews 56(9) (2004) 1273-1289.

[6] M. Brisaert, M. Gabiels, V. Matthijs, J. Plaizier-Vercammen, Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 26 (2001) 909-917.

[7] M. Manconi, D. Valenti, C. Sinico, F. Lai, G. Loy, M.A. Fadda, Niosomes as carriers for tretinoin II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. International Journal of Pharmaceutics 260 (2003) 261-272.

[8] D.J. Elbaum, Comparision of the stability of topical isotretinoin and topical tretinoin and their efficacy in acne. Journal of the American Academy of Dermatology 19(3) (1988) 486-491.

[9] L. P.E., I. H., M. A.J., P. A.D.J., C.P.F. Redfern, 9-cis retinoic acid-a better retinoid for the modulation of differentiation, proliferation and gene expression in human neuroblastoma. Journal of Neuro-Oncology 31 (1997) 85-91.

[10] D.W. Osborne, A.H. Amann, Drugs and the pharmaceutical sciences volume 42: Topical drug delivery formulations, Marcel Dekker, New York, 1990.