

การตั้งตำรับและการประเมินตำรับยาทาหาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

Formulation and Evaluation of Topical Ketoconazole Nano emulsion

รัชณี วงศ์แสนสุขเจริญ¹

Ratchanee Wongsansukjaroen¹

¹คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย

¹School of Pharmacy, Eastern Asia University

Received: March 28, 2020

Revised: July 1, 2020

Accepted: July 8, 2020

บทคัดย่อ

ในการรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนังจะเริ่มจากการใช้ยาทาในบริเวณที่ติดเชื้อ ส่วนใหญ่ต้องใช้เวลาในการรักษานาน ซึ่งข้อดีของการใช้ยาในรูปแบบทา คือ ลดความเสี่ยงในการเกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยา รวมทั้งลดโอกาสในการเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น แต่ถ้าเป็นโรคเชื้อราที่ผิวหนังบริเวณกว้างหรือเรื้อรังจะต้องใช้ยารับประทานร่วมกับการใช้ยาทา การรักษาการติดเชื้อราที่ผิวหนังโดยใช้ยาทามักจะใช้เวลานานในการรักษา การพัฒนาตำรับยาโดยใช้ระบบนำส่งอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาของยาได้มากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาตำรับยาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเป็นยาทาภายนอก และศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของตำรับ ในการเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) มีการใช้น้ำมัน Caprylic/capric triglyceride และ isopropyl myristate และใช้ non-ionic surfactant ด้วยวิธีการเตรียมนาโนอิมัลชันแบบใช้พลังงานต่ำ โดยทำให้เกิดการกลับวฏภาค (phase inversion) เพื่อให้ได้อนุภาคภายในขนาดเล็กที่สภาวะอุณหภูมิคงที่ และนำสูตรตำรับที่มีความคงสภาพ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 30 วัน มาประเมินประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่าตำรับคีโตโคนาโซล 0.5% w/w นาโนอิมัลชันที่พัฒนาขึ้น ประกอบด้วยน้ำมัน caprylic/capric triglyceride ต่อ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ในอัตราส่วน (4:1) เมื่อเก็บไว้นาน 30 วัน มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 189.4±6.7 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่า zeta potential อยู่ในช่วง -28.4±3.4 มิลลิโวลต์ และยังพบว่าตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่พัฒนาขึ้น มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albican*. บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Agar well diffusion มากกว่ายาครีมในท้องตลาด (2.0% w/w) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$) ดังนั้นตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่พัฒนาขึ้นนี้มีแนวโน้มในการต้านเชื้อราที่ผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: นาโนอิมัลชัน, คีโตโคนาโซล, ยาใช้เฉพาะที่

Abstract

The treatment of fungal skin infections using antifungal drug topical preparations often takes a long time for treatment. The advantages of using topical medication is to reduce the risk of side effects from medication including reducing the chance of interacting with other drugs. But when having a chronic or widespread fungal disease on the skin area, the patient must use oral medication. Due to the treatment of fungal infection with topical drug preparation taking a long time for treatment, the development of delivery systems may increase the effectiveness of treatment. This research aimed to develop ketoconazole nano-emulsion topical preparation and to study the antifungal efficacy of the developed formulation. The nano-emulsion bases were prepared using the low-energy emulsification method. Two types of oils, Caprylic/Capric triglyceride--CT and Isopropyl myristate--IPM were used as the oil phase. A formula with a nanoscale of internal droplets was selected based on stability at 30°C and 45°C for thirty days. After that, the developed ketoconazole nano emulsion was tested for antifungal activity against *Candida albicans* by the agar well diffusion method. It was found the 0.5% (w/w) ketoconazole nano emulsion from CT and non-ionic surfactant was measured at the ratio of 4:1 droplet with the diameter of 189.4±6.7nm. and a zeta potential of -28.4±3.4 mV. The developed formula was physically stable for over thirty days at 30° C and 45° C. Additionally, antifungal activity using agar well diffusion method against *C. albicans* of the developed formulation containing 0.5% w/w of ketoconazole was found to be significantly more effective than that of commercially available ketoconazole creams (2.0% w/w) ($p<.05$). Finally, it can be concluded that the ketoconazole nano emulsion is a promising tool in the effective treatment of fungal skin infections.

Keyword: nano emulsion, ketoconazole, topical formulation



บทนำ

โรคเชื้อราที่ผิวหนังที่พบบ่อย ได้แก่ กลากเกลื้อน เชื้อราที่เล็บ เชื้อราที่ผม และฮ่องกงฟุต ซึ่งการติดต่โรคเกิดจากการได้รับเชื้อจากการสัมผัสและมีปัจจัยเรื่องผิวหนังที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ ปกติจะพบเชื้อราได้ตามสิ่งแวดล้อม การติดเชื้อราส่วนใหญ่เกิดขึ้นบริเวณที่อับชื้น (Luplertlop & Suwanmanee, 2013) ในการรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนังจะเริ่มจากการใช้ยาทาในบริเวณที่ติดเชื้อ จนลักษณะของโรคหายไปและหาต่ออีกระยะหนึ่ง ซึ่งข้อดีของการใช้ยาแบบทา คือ ลดความเสี่ยงในการเกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยา รวมทั้งลดโอกาสในการเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น แต่ถ้าเป็นโรคเชื้อราที่ผิวหนังบริเวณกว้างหรือเรื้อรังจะต้องใช้ยารับประทานร่วมกับการใช้ยาทา (Martin &

Kobayashi, 1999) สำหรับการรักษาด้วยการทายา (Topical treatments) ปัจจุบันมียาที่นิยมใช้ (Luplertlop & Suwanmanee, 2013) คือ กลุ่ม Allylamine (เช่น Terbinafine), กลุ่ม Polyenes (เช่น Nystatin) กลุ่ม Benzylamine derivatives (เช่น Butenafine) กลุ่ม Ciclopirox olamine และกลุ่ม Imidazole (เช่น Clotrimazole, ketoconazole)

ยาคีโตโคนาโซล (Ketoconazole) เป็นยาในกลุ่ม Azole derivatives (Imidazole) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (Fungistatic) และออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งเชื้อราและยีสต์ (Martin & Kobayashi, 1999) มีจำหน่ายในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยาเม็ด มีตัวยา 100, 200 มิลลิกรัม ครีม หรือเจล ใน

ความแรง 2 % w/w, แคมฟูในความแรง 1% และ 2% w/w นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาและพัฒนายา คีโตโคนาโซล ในรูปแบบต่าง ๆ (Patel et al., 2013) เช่น liposomes, ethosomes, microemulsion, Solid Lipid Nanoparticle –SLN hydrogel เพื่อเพิ่มการซึมผ่านของยา คีโตโคนาโซล เข้าสู่ผิวหนังให้ดียิ่งขึ้น (Patel et al., 2013)

นาโนอิมัลชันเป็นระบบที่มีความคงตัวทาง จลนศาสตร์ (Kinetic stability) สูง เนื่องจากอนุภาคน้ำมันซึ่งมีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร ทำให้กระจายตัวในน้ำได้ดี อนุภาคน้ำมันมีอัตราการเกาะกลุ่มกันต่ำ (flocculation) อัตราการรวมหยดต่ำ (coalescence) และอัตราการแยกเป็นชั้น (creaming) ต่ำกว่าอิมัลชันที่ประกอบด้วย อนุภาคน้ำมันขนาดใหญ่ (Tadros et al., 2004) ผลิตภัณฑ์นาโนอิมัลชันยาทา ครีม หรือโลชั่น สามารถดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังได้เร็ว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวรอบอนุภาคน้ำมันมาก ดังนั้นระบบนาโนอิมัลชันที่มีอนุภาคภายในเล็กระดับนาโนเมตร จะสามารถซึมผ่านชั้น SC ได้มากกว่ารูปแบบยาครีมที่มีขนาดอนุภาคภายในระดับไมครอน

ปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อราที่ผิวหนัง ใช้รูปแบบยาครีม ซึ่งต้องใช้เวลาในการรักษาที่ต่อเนื่องนานเป็นสัปดาห์ อาจจะทำให้ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือในการรักษา ทำให้มีอุบัติการณ์กลับมาเป็นซ้ำ ดังนั้นหากมีการพัฒนาตำรับยา คีโตโคนาโซลในรูปแบบนาโนอิมัลชัน ซึ่งมีอนุภาคภายในที่ขนาดเล็กระดับนาโนเมตรสามารถเพิ่มการซึมผ่านของยา คีโตโคนาโซลเข้าสู่ผิวหนังให้ดีขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาดีขึ้นได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการตั้งตำรับยา คีโตโคนาโซลรูปแบบยาใช้ภายนอกที่มีขนาดอนุภาคภายในเล็กระดับนาโนเมตร ด้วยวิธีการใช้พลังงานต่ำ (Sadurni et al., 2005) ซึ่งเป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ ไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน โดยใช้เทคนิคการกลับวัฏภาคด้วยสัดส่วนของส่วนประกอบที่เหมาะสม (Phase Inversion Composition--PIC) และประเมินผลทางกายภาพของตำรับ และรวมทั้งทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Candida albican* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการตั้งตำรับ คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่

มีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อราที่ผิวหนังในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย

1. สัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบในตำรับที่ทำให้เกิดระบบนาโนอิมัลชัน

1.1. Pseudo-ternary phase diagram construction

1.2. ประเมินลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ การประเมินความหนืดของตำรับด้วยสายตา การวัดขนาดหยดอนุภาค, ความเป็นกรด-ด่าง ณ เวลาเริ่มต้น

1.3. คัดเลือกสูตรอิมัลชันที่ไม่มีการแยกชั้นมาศึกษาความคงตัว ที่สภาวะ 30°C, 45°C เป็นเวลานาน 7, 14, 21 และ 30 วัน

2. คัดเลือกสูตรที่มีความคงตัวในสภาวะที่ทำให้การศึกษามาเตรียมตำรับ คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่มีความแรง 0.5% และ 1.0% w/w

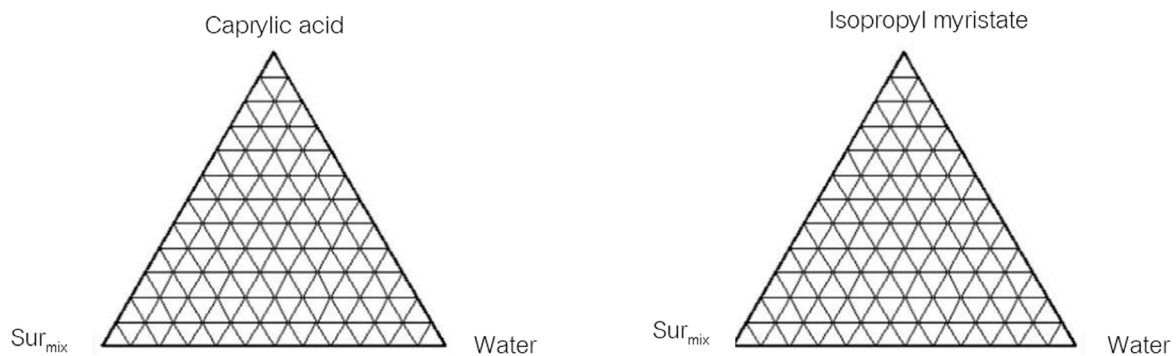
2.1. ศึกษาลักษณะทางกายภาพของตำรับ คีโตโคนาโซลที่เตรียมได้ โดยการวัดขนาดหยดอนุภาค, ความเป็นกรด-ด่าง และประเมินความหนืดของตำรับ

2.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Agar well diffusion

วิธีการวิจัย

1. ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบในตำรับ ที่ทำให้เกิดระบบนาโนอิมัลชัน

1.1 สร้าง Pseudo-ternary phase diagram จากน้ำมัน ได้แก่ Caprylic acid/Capric triglyceride (HLB=11), Isopropyl myristate (HLB=11.5) สารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง Tween 80 (HLB=15.0) กับ Span 80 (HLB=4.3) และน้ำ โดยคำนวณปริมาณสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมให้ได้ตาม required HLB ซึ่งจะสามารถเตรียมได้ 2 ไดอะแกรม ทั้งหมด 36 สูตรในน้ำมันแต่ละชนิด ดังภาพ 1



ภาพ 1 Pseudo-ternary phase diagram

1.2 เตรียมอิมัลชันตาม phase diagram ในข้อ 1.1 โดยชั่งน้ำมัน, สารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิดลงในปิกเกอร์ ใส่ magnetic bar แล้วนำไปวางบนเครื่อง magnetic stirrer ผสมให้เข้ากัน นาน 1 นาที จากนั้นตวงน้ำและค่อยๆ หยดลงไปต่อเนื่องแล้วผสมให้เข้ากัน นาน 2 นาที บันทึกผลที่ได้หลังเตรียมเสร็จ ได้แก่ สีหรือความใส, ความหนืด (หมายเหตุ ความหนืดใช้การสังเกตโดยความหนืดมากใช้สัญลักษณ์ ++++ มีลักษณะครีมข้นไหลไม่ได้ สัญลักษณ์ +++ มีลักษณะครีมกึ่งแข็ง, ++ ลักษณะครีมไหลง่ายจนกระทั่งสัญลักษณ์ + มีลักษณะหนืดต่ำเหมือนน้ำ และทำการวัด pH

1.3 ศึกษาความคงตัวโดยแบ่งนาโนอิมัลชันที่เตรียมได้ใส่หลอดทดลองขนาด 10 ml จำนวน 2 หลอดนำไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิ 30°C และ 45°C

1.4 บันทึกผลทางกายภาพโดยสังเกตการแยกชั้น ที่เวลา 7, 14, 21, 30 วัน

1.5 นำสูตรที่ไม่แยกชั้นเมื่อเก็บทั้งที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลานาน 30 วัน มาวัดขนาดอนุภาค, pH, และประเมินความหนืด

1.6 คัดเลือกสูตรที่คงสภาพ และมีขนาดอนุภาคภายในระดับนาโนเมตร ไปพัฒนาต่อโดยการเติมด้วยยา คีโตโคนาโซล

2. เตรียมคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

2.1 คัดเลือกสูตรที่คงสภาพและมีขนาดอนุภาคภายในระดับนาโนเมตรที่ได้จากข้อ 1.6

2.2 ใส่ยาปริมาณ 0.5 %w/w, 1.0% w/w

และ 2.0%w/w ผสมในตำรับนาโนอิมัลชันที่คัดเลือกในน้ำมันแต่ละชนิด พิจารณาปริมาณยาสูงสุดที่ละลายได้ในระบบนาโนอิมัลชัน

2.3 เตรียมคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันโดยนำยาไปละลายในน้ำมัน แล้วจึงนำไปเติมสารลดแรงตึงผิวผสมตามจำนวนในสูตรนาโนอิมัลชันที่คัดเลือก ลงในปิกเกอร์

2.4 ปั่นผสมบนเครื่อง magnetic stirrer ใส่ magnetic bar ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที จากนั้นตวงน้ำตามจำนวนในสูตร และค่อย ๆ หยดลงไปต่อเนื่องแล้วผสมให้เข้ากัน นาน 2 นาที

2.5 บันทึกผลทางกายภาพ เช่นเดียวกับข้อ 1.2 และทำการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน

3. ศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อราของตำรับยา คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

3.1 วิธีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา ด้วยวิธี Agar well diffusion method (15-17)

3.1.1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud's dextrose agar สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา Candida albicans DMST 5815 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ประเทศไทย)

3.1.2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ในขวดฝาเกลียวไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.1.3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงใน sterile petri dish ปริมาณ 20 ml/dish แล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัวเป็น agar plate

3.1.4. เตรียมสารละลายแขวนตะกอนของเชื้อที่ต้องการทดสอบในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile water)

3.1.5. ใช้ไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อซุบลงในสารละลายแขวนตะกอนของเชื้อจนชุ่มบิดปลายสำลีกับข้างหลอดจนหมด แล้วนำไปทาให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ข้าง ๆ หลายครั้ง แล้วทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว สำหรับเชื้อรา (dermatophytes) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.1.6. นำเชื้อราที่เจริญบน อาหารเลี้ยงเชื้อไปกระจายตัวใน Trypticase soy broth 1 ml ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับความขุ่นของ McFarland No.0.5 ซึ่งมีปริมาณเชื้ออยู่ประมาณ 1×10^8 CFU/ml (Santos & Hamdan, 2005)

3.1.7. นำไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อบิดข้างหลอดจนหมดแล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของ Sabouraud 's dextrose agar จากนั้นจะหุ้มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร แล้วใช้ Sterile syringe ดูดสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด และผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่พัฒนาขึ้น ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

3.1.8. นำไปบ่มเพาะเลี้ยงในตู้ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.1.9. เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดให้นำออกมาวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (mm)

3.1.10. ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด กับตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่พัฒนาขึ้น

ผลการวิจัย

1. สัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบในตำรับที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชัน

1.1 สมบัติทางกายภาพของตำรับ

1.1.1 อิมัลชันที่เตรียมจาก Caprylic/Capric triglyceride--CT

ในการศึกษาสัดส่วนของส่วนประกอบที่เหมาะสมในตำรับที่เตรียมจากน้ำมัน CT ทั้งหมด 36 สูตร ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่เตรียมได้ดังผลในตาราง 1 พบว่าสูตรที่เตรียมได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.23–6.79 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมกับผิวหนังไม่ทำให้เกิดการระคายเคือง และสูตรที่ไม่เกิดอิมัลชัน ได้แก่ 1, 2, 9, 16, 22, 27, 34 และ 36 สูตรที่เกิดอิมัลชัน และมีความกึ่งแข็ง (ครีม) ได้แก่ 3, 4, 5, 6, 10-13, 17-19, 23, 24, 28, 29, 30-33 และ 35 สูตรที่เกิดอิมัลชันและมีความหนืดต่ำ (เหลว) ได้แก่ 7, 8, 14, 15, 20, 21, 25 และ 26 เนื่องจากต้องการพัฒนานาโนอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ (++) ที่เหลวไหลง่าย ซึ่งคาดการณ์ว่ามีขนาดอนุภาคภายในที่เล็กกว่าครีมกึ่งแข็ง (+++) เมื่อติดตามผลความคงสภาพที่ 30°C และ 45°C มีสูตรที่ไม่เกิดการแยกชั้นที่ 30 วัน ได้แก่ 8, 14, 15, 20, 21, 25, 26 ซึ่งสังเกตจาก pseudo-ternary phase diagram ในภาพ 2 จะเห็นว่าเกิดอิมัลชันเหลวเมื่อใช้สัดส่วนน้ำมัน 10-40% และสารลดแรงตึงผิวผสม 10-20 %

ตาราง 1

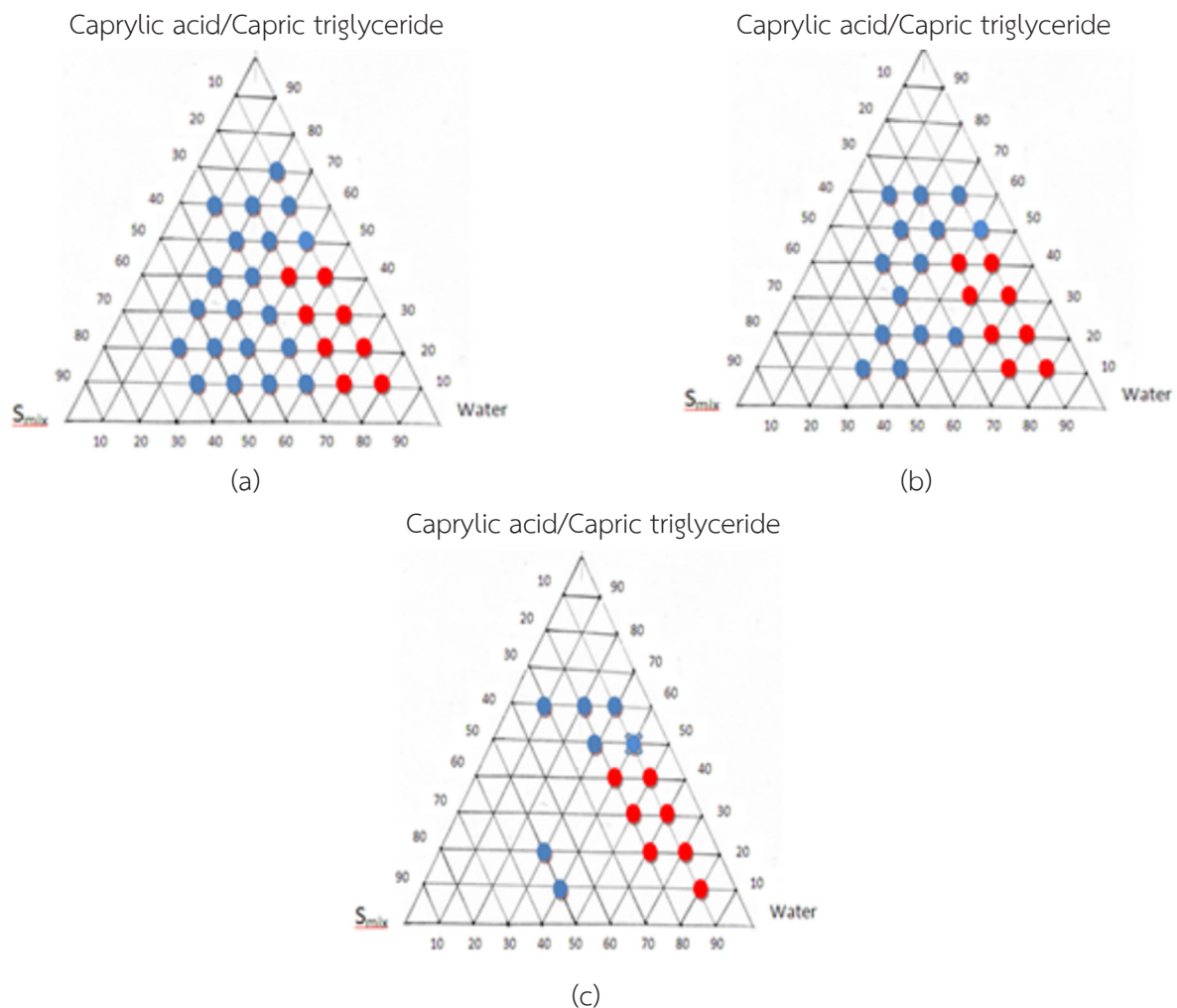
คุณสมบัติทางกายภาพของตำรับที่เตรียมจาก *Caprylic/Capric triglyceride*--CT

สูตร CT	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓), แยกชั้น (×)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30°C				45°C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
1	เหลืองใส	+++	5.75	-	×	×	×	×	×	×	×	×
2	เหลืองขุ่น	+++	5.97	-	×	×	×	×	×	×	×	×
3	ขาวครีม	++++	5.61	+	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	×
4	ขาวครีม	++++	6.79	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	ขาวครีม	++++	6.57	+	✓	✓	×	×	✓	×	×	×
6	ขาวครีม	+++	5.63	+	×	×	×	×	×	×	×	×
7	ขาวเหลือง	++	5.45	+	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	×
8	ขาวเหลือง	++	5.78	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	เหลืองใส	+++	5.42	-	×	×	×	×	×	×	×	×
10	ขาวครีม	++++	5.60	+	×	×	×	×	×	×	×	×
11	ขาวครีม	++++	5.89	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12	ขาวครีม	++++	6.12	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×
13	ขาวครีม	++++	6.24	+	×	×	×	×	×	×	×	×
14	ขาวเหลือง	++	5.89	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	ขาวเหลือง	++	5.74	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	เหลืองใส	+++	5.23	-	×	×	×	×	×	×	×	×
17	ขาวครีม	++++	5.46	+	✓	✓	×	×	×	×	×	×
18	ขาวครีม	++++	5.82	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×
19	ขาวครีม	+++	6.36	+	✓	✓	×	×	✓	×	×	×
20	ขาวเหลือง	++	5.93	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21	ขาวเหลือง	++	5.81	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22	เหลืองใส	+++	5.46	-	×	×	×	×	×	×	×	×
23	ขาวครีม	++++	5.93	+	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	×
24	ขาวครีม	+++++	5.23	+	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	×
25	ขาวเหลือง	++	5.68	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
26	ขาวเหลือง	++	5.79	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27	เหลืองขุ่น	+++	5.93	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
28	ขาวครีม	++++	5.46	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×
29	ขาวครีม	++++	5.67	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
30	ขาวครีม	+++	6.08	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

ตาราง 1 (ต่อ)

สูตร	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓), แยกชั้น (×)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30°C				45°C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
31	ขาวครีม	+++	6.43	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
32	ขาวครีม	+++	5.85	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
33	ขาวครีม	+++	6.49	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
34	แยกชั้น	+++	5.28	-	×	×	×	×	×	×	×	×
35	ขาวครีม	+++	5.34	+	×	×	×	×	×	×	×	×
36	แยกชั้น	+++	5.66	-	×	×	×	×	×	×	×	×

หมายเหตุ ความหนืดใช้การสังเกตโดยความหนืดมากใช้สัญลักษณ์ (+++++) มีลักษณะเป็นครีมแข็ง สัญลักษณ์ +++ เป็นครีมกึ่งแข็ง สัญลักษณ์ ++ มีความหนืดต่ำคล้ายโลชั่น และ สัญลักษณ์ + มีความหนืดต่ำสุดเหมือนน้ำ อิมัลชันไม่แยกชั้น (✓), แยกชั้น (×)



ภาพ 2 Pseudo-ternary phase diagram ของตำรับที่เตรียมจาก CT ที่ไม่แยกชั้น

● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเนื้อครีม ● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเหลว

(a) ตำรับเริ่มต้น (b) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 30°C, 30 วัน (c) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 45°C, 30 วัน

1.1.2 อิมัลชันที่เตรียมจาก Isopropyl myristate--IPM

Isopropyl myristate เมื่อนำมาเตรียมอิมัลชันทั้งหมด 36 สูตร พบว่าสูตรที่เตรียมได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.3–6.6 และสูตรที่ไม่เกิดอิมัลชัน ได้แก่ 1, 2, 9, 16, 22, 27, 34 และ 36 สูตรที่เกิดอิมัลชันและมีความแข็งแรง ได้แก่ 3-6, 10-13, 17-19, 23-25, 28, 29, 31, 32

และ 35 สูตรที่เกิดอิมัลชันและมีความหนืดต่ำ ได้แก่ 7, 8, 14, 15, 20, 21, 26, 30, 33 และเมื่อติดตามผลความคงสภาพอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ พบว่าที่ 30°C และ 45°C มีสูตรที่ 8, 14, 15, 20, 21, 26, 30 และ 33 ที่อิมัลชันไม่เกิดการแยกชั้นที่เวลา 30 วัน ซึ่งสังเกตจาก pseudo-ternary phase diagram ในภาพ 3 จะเห็นเกิดอิมัลชันเหลวเมื่อใช้สัดส่วนน้ำมัน 10-60% และสารลดแรงตึงผิวผสม 10-20%

ตาราง 2

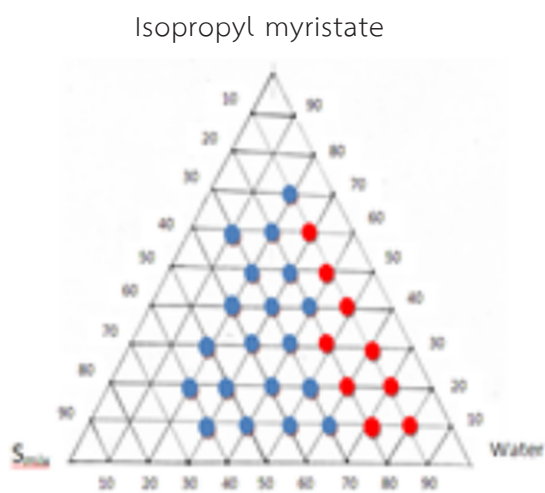
คุณสมบัติทางกายภาพของตำรับที่เตรียมจาก Isopropyl myristate--IPM

สูตร IPM	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓), แยกชั้น (×)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30°C				45°C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
1	เหลืองใส	+++	5.54	-	×	×	×	×	×	×	×	×
2	เหลืองขุ่น	+++	5.67	-	×	×	×	×	×	×	×	×
3	ขาวครีม	++++	5.61	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×
4	ขาวครีม	++++	6.19	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	ขาวครีม	++++	6.57	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	ขาวครีม	+++	6.63	+	×	×	×	×	×	×	×	×
7	ขาวเหลว	+++	5.35	+	✓	×	×	×	✓	×	×	×
8	ขาวเหลว	++	5.98	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	เหลืองใส	+++	5.42	-	×	×	×	×	×	×	×	×
10	เหลืองขุ่น	++++	5.30	+	×	×	×	×	×	×	×	×
11	เหลืองขุ่น	++++	5.72	+	✓	×	×	×	✓	×	×	×
12	ขาวครีม	++++	6.52	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	ขาวครีม	++++	6.34	+	×	×	×	×	×	×	×	×
14	ขาวเหลว	++	5.69	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	ขาวเหลว	++	5.74	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	เหลืองใส	+++	5.53	-	×	×	×	×	×	×	×	×
17	เหลืองขุ่น	++++	5.86	+	×	×	×	×	×	×	×	×
18	ขาวครีม	++++	5.82	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	ขาวครีม	+++	6.36	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	ขาวเหลว	++	5.83	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

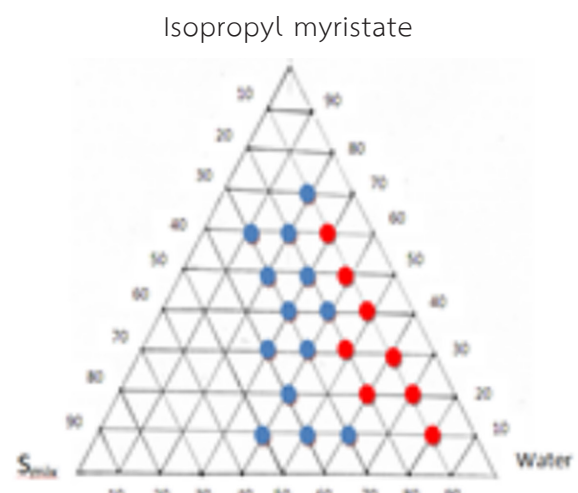
ตาราง 2 (ต่อ)

สูตร IPM	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓), แยกชั้น (×)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30°C				45°C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
21	ขาวเหลว	++	5.84	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22	เหลืองใส	+++	5.56	-	×	×	×	×	×	×	×	×
23	เหลืองขุ่น	++++	5.93	+	×	×	×	×	×	×	×	×
24	ขาวครีม	+++++	5.83	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
25	ขาวครีม	+++	5.68	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×
26	ขาวเหลว	++	5.67	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27	เหลืองใส	+++	5.93	-	×	×	×	×	×	×	×	×
28	ขาวครีม	++++	5.46	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
29	ขาวครีม	++++	5.67	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
30	ขาวเหลว	+++	6.08	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
31	เหลืองขุ่น	+++	6.21	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
32	ขาวครีม	+++	5.85	+	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	×
33	ขาวเหลว	+++	6.28	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
34	แยกชั้น	+++	5.58	-	×	×	×	×	×	×	×	×
35	ขาวครีม	+++	5.84	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×
36	แยกชั้น	+++	5.66	-	×	×	×	×	×	×	×	×

หมายเหตุ ความหนืดใช้การสังเกตโดยความหนืดมากใช้สัญลักษณ์ (+++++) และความหนืดน้อยลงไปตามลำดับ (++++,+++,++,+) อิมัลชันไม่แยกชั้น (✓) , แยกชั้น (×)

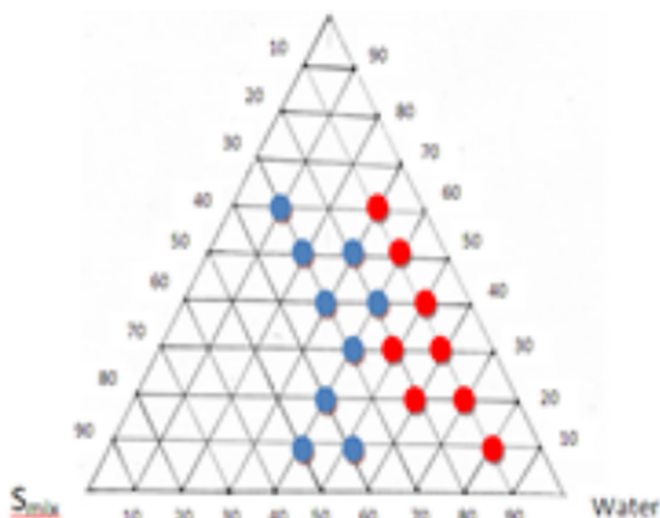


(a)



(b)

Isopropyl myristate



(c)

ภาพ 3 Pseudo-ternary phase diagram ของตำรับที่เตรียมจาก IPM ที่ไม่แยกชั้น

● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเนื้อครีม ● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเหลว

(a) ตำรับเริ่มต้น (b) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 30°C, 30 วัน (c) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 45°C, 30 วัน

1.2 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า

(Zeta potential)

1.2.1 อิมัลชันที่เตรียมจาก CT

เมื่อวัดขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าด้วยเครื่อง zeta sizer พบว่าขนาดอนุภาคเริ่มต้นของอิมัลชันความหนืดต่ำสัญลักษณ์ ++ (สูตรที่ 7, 8, 14, 15, 20, 21, 25, 26) อยู่ในช่วง 108.9–247.7 นาโนเมตร และเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่าขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 130.0–295.1 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 132.4–305.3 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเริ่มต้นอยู่ในช่วง -9.25 mV ถึง -42.7 mV และเมื่อเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 30 วัน ที่ 30°C มีค่าอยู่ในช่วง -8.78 mV ถึง -38.7 mV และที่สภาวะ 45°C มีค่าอยู่ในช่วง -8.19 mV ถึง -38.2 mV

1.2.2.อิมัลชันที่เตรียมจาก Isopropyl myristate--IPM

เมื่อวัดขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าด้วยเครื่อง Zeta sizer พบว่าขนาดอนุภาคเริ่มต้นของอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำสัญลักษณ์ ++ (สูตรที่ 8, 14, 15, 20, 21,

26) อยู่ในช่วง 108.7-269.6 นาโนเมตร และเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 109.4–266.5 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 30°C และมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 116.7–246.3 นาโนเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 45°C ส่วนค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า ณ จุดเริ่มต้น อยู่ในช่วง -26.7 mV ถึง -40.8 mV ที่ 30°C นาน 30 วัน ตั้งแต่ -14.7 mV ถึง -33.7 mV และที่ 45°C นาน 30 วัน ตั้งแต่ -14.2 mV ถึง -31.2 mV

จากผลการศึกษาเตรียมอิมัลชันจากน้ำมันทั้ง 2 ชนิด คือ CT และ IPM ด้วยเทคนิคการใช้พลังงานต่ำ (PIC) พบว่าอิมัลชันมีความหนืดต่ำ มีสัดส่วนของน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และน้ำที่พอเหมาะ ที่จะเกิดอิมัลชันที่มีอนุภาคภายในที่ต่ำกว่า 300 nm. และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าซึ่งมีค่าสูงกว่า 30 mV. จึงทำให้อิมัลชันคงสภาพที่สภาวะอุณหภูมิ 30°C และ 45°C นาน 30 วัน

2 การเตรียมคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

จากผลการศึกษาความคงสภาพของนาโนอิมัลชันและสัดส่วนของน้ำมันที่สูงและใช้สารลดแรงตึงผิวในปริมาณน้อย รวมทั้งยาคีโตโคนาโซลสามารถละลายใน CT ได้ดีกว่า IPM เนื่องจากค่า Log P ของคีโตโคนาโซล (4.3)

ใกล้เคียงกับของ CT (5.4) จึงทำให้สูตร 26 ของน้ำมัน CT ซึ่งมีสัดส่วนของ oil: surfactant: water เป็น 40:10:50 ถูกเลือกมาใช้ในการพัฒนาตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน เมื่อเตรียมตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน โดยใช้สูตรที่ 26 ของ CT โดยให้มีตัวยา 0.5% และ 1.0% w/w พบว่า อิมัลชันมีสีขาวขุ่น ความหนืดต่ำ มีค่า pH ประมาณ 6 มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 200 nm และมีค่า zeta potential อยู่ในช่วง -25 mV ถึง -29 mV ผลดังตาราง 3 และมีค่า

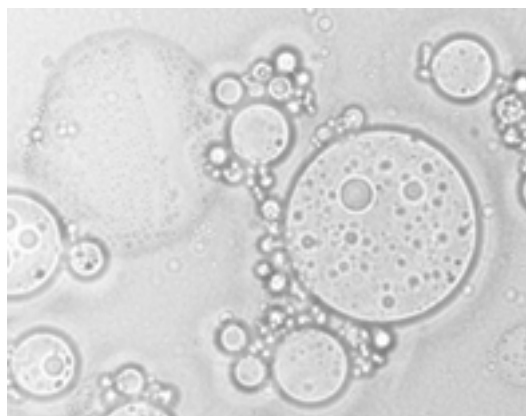
การกระจายขนาด (Poly Dispersity Index--PDI) ที่ต่ำกว่า 0.50 ซึ่งบ่งชี้ถึงขนาดอนุภาคที่ใกล้เคียงกัน จากการศึกษาความคงสภาพของตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่ความแรง 0.5% w/w และ 1.0% w/w เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (1000x) พบว่า ปรากฏผลึกยาที่ละลายไม่หมดอย่างชัดเจนในตำรับ 1.0% ในขณะที่ไม่ปรากฏผลึกยาดังกล่าวในตำรับ 0.5% ดังภาพ 4

ตาราง 3

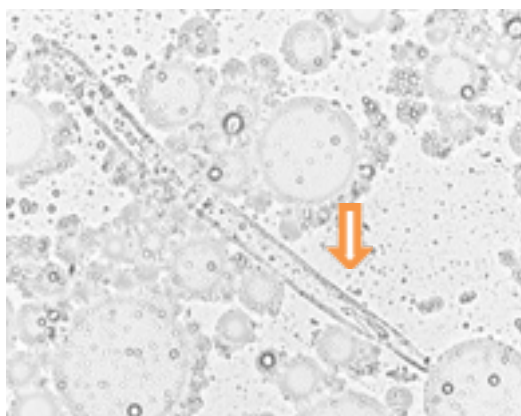
ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

ตำรับยา	เวลา	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
KNE	(วัน)	Mean+SD	Mean+SD	Mean+SD
0.5%	0	185.2 + 8.1	0.34 + 0.1	-27.5 + 4.4
	30	189.4 + 6.7	0.31 + 0.1	-28.4 + 3.4
1.0%	0	191.4 + 7.3	0.33 + 0.0	-28.9 + 6.1
	30	297.2 + 6.8	0.46 + 0.1	-24.2 + 7.0

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง



(a)



(b)

(a) ตำรับ 0.5% (b) ตำรับ 1.0%; ลูกศรชี้ตำแหน่งผลึกยา (↴)

ภาพ 4 ตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเมื่อดูด้วยกล้อง Optical Microscope (1000x)

จากผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับ คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน 0.5% และ 1.0% w/w ที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าตำรับ 0.5% ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และอนุภาคภายในมีขนาดเล็กกว่า 300 nm ส่วนในตำรับ 1.0 % มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวอมชมพูอ่อน ที่ 30°C มีสีขาวอมชมพูชัดเจนที่ 45°C พบตะกอนที่ก้นหลอด เกิด creaming บนผิวหน้าของอิมัลชัน และมีขนาดอนุภาคภายในใหญ่ขึ้น ดังนั้นตำรับ 0.5% w/w จึงมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาต่อไป

3 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *C. albicans* ของ คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน (KNE)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อของ ตัวอย่าง 0.5% w/w KNE และ ผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด 2.0% คีโตโคนาโซล cream™ พบว่าคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันทำให้เกิดโซนยับยั้งเชื้อกว้างกว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 22.5+0.5 mm ผลดังภาพ 5 จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *C. albicans* พบว่า ยาพื้นนาโนอิมัลชัน (NE) ไม่เกิดโซนยับยั้งเชื้อ ส่วนตัวอย่างทดสอบ 0.5% KNE, 0.5% diluted cream™ และ 2.0% cream™ พบโซนยับยั้งเชื้อมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย เท่ากับ 22.5+0.5 mm, 14.0+0.5 mm และ 10.5+0.5 mm ตามลำดับ และเมื่อทดสอบข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางของ โซนยับยั้งเชื้อที่ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยสถิติ T-test ที่มีสูตรคำนวณข้างล่างนี้

$$T\text{-test} = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{N}}}$$

พบว่าตำรับ 0.5% KNE สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ได้ดีกว่าตำรับคีโตโคนาโซล 2% cream™ และตำรับครีมที่เจอจากใ้มีความเข้มข้น 0.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)



ภาพ 5 โซนยับยั้งเชื้อ *C. albicans*

(ก) ตำรับยาพื้นนาโนอิมัลชัน (NE Base),
(ข) 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน (KNE),
(ค) 0.5% diluted cream™ และ (ง) 2.0% cream™

อภิปรายและสรุปผล

ในการศึกษาการเตรียมนาโนอิมัลชันรูปแบบ O/W โดยใช้พลังงานต่ำ ด้วยเทคนิคการกลับวัฏภาคโดย สัดส่วน (PIC) ซึ่งมีการใส่สารลดแรงตึงผิวผสมทั้งหมดใน วัฏภาคน้ำมัน และค่อย ๆ เติมวัฏภาคน้ำลงไป โดยเมื่อ สัดส่วนปริมาตรของน้ำเพิ่มมากขึ้นจนถึงจุดใกล้กลับวัฏ ภาค พบว่าอิมัลชันมีความหนืดสูงสุด และเมื่อเกิดการกลับ วัฏภาคแล้วพบว่าอิมัลชันมีความหนืดลดลง ทำให้สารลด แรงตึงผิวห่อหุ้มรอบหยด เกิดเป็นอนุภาคภายในที่มีขนาด เล็กกระต๋บนานาเมตรได้ (Skiba et al., 2000) และพบว่า น้ำมัน CT เป็น medium chain triglyceride สามารถ เตรียมระบบนาโนอิมัลชันที่มีความคงสภาพได้ (Patel et al., 2014) ตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่พัฒนาขึ้นมีขนาด อนุภาคภายในต่ำกว่า 300 nm. และมีการกระจายขนาด ของอนุภาคภายในต่ำกว่า 0.5 ซึ่งทำให้ระบบมีเสถียรภาพ มากขึ้น

จากผลการทดสอบตัวอย่าง 0.5% KNE มีประสิทธิภาพ ในการต้านเชื้อ *C. albicans* มากกว่าตัวอย่าง 0.5% diluted cream™ และ 2.0% cream™ อาจเนื่องมาจากตัวอย่าง ทดสอบเป็นอิมัลชันที่มีลักษณะทางกายภาพที่มีความหนืดต่ำ มีตัวยาสสำคัญละลายอยู่ในหยดน้ำมันที่มีขนาดอนุภาค ระดับนาโนเมตรที่กระจายตัวอยู่ในวัฏภาคน้ำ จึงทำให้ ตำรับยาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันแผ่กระจายได้ดี (Skiba et al., 2000) อาจทำให้สัมผัสกับผนังเซลล์ของเชื้อได้ดี กว่ารูปแบบยาครีม จึงทำให้มีการปลดปล่อยตัวยาวออกมา

ได้ดี และมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Martin & Kobayashi, 1999)

การศึกษานี้มีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในแง่ของการเตรียมตำรับยาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่มีความเข้มข้น 0.5% w/w ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา ได้มากกว่ายาครีมในท้องตลาดที่มีความเข้มข้นของ

ยาคีโตโคนาโซล 2.0% w/w จึงเป็นการใช้ปริมาณยาที่ลดลงทำให้ต้นทุนต่ำลง และด้วยขั้นตอนการผลิตที่ไม่ซับซ้อนในการพัฒนางานวิจัยนี้ควรจะมีการศึกษาความคงสภาพตามข้อกำหนด ICH Q1A Guideline และประสิทธิภาพในการใช้ในมนุษย์ยังต้องการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



References

- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharmacy Research*, 28(5), 978–985. doi: 10.1007/s11095-010-0309-1.
- Balouiri, M., Sadki, M., & Ibsouda, K. (2016). Method for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Gingor, S., Erdal, M. S., & Aksu, B. (2013). New formulation strategies in topical antifungal therapy. *Journal of Cosmetics Dermatological Sciences and Applications*, 3, 56-65.
- Junyaprasert, V. (2009). *Nanotechnology: Skin delivery of drugs and cosmetics*. Bangkok: Prachachon Co., Ltd. (in Thai)
- Luplertlop, N., & Suwanmanee, S. (2013). Dermatophytosis: from bench to bedside. *Journal Tropical Medicine*, 36, 75-87. Available online at www.ptat.thaigov.net. (in Thai)
- Martin, A. G., & Kobayashi, G. S. (1999). *Superficial fungal infection: Dermatophytosis, Tinea unguis, piedra*. In: Freeberg IM, Eisen AZ, Fitzpatrick's dermatology in general medicine. New York: McGraw-Hill .
- Patel, R. R., Patel, Z. K., Patel, K. R., & Patel, D. R. (2014) Formulation and evaluation of Micro-emulsion based gel of Ketoconazole. *International Journal of Universal Pharmacy and Biology Science*, 3(2), 93-111.
- Patel, H. C., Parmar, G., Seth, A. K., Patel, J. D., & Patel, S. R. (2013). Formulation and evaluation of o/w Nanoemulsion of Ketoconazole. *Pharma Science Monitor*, 4(4 Supp. 1), 338-351. http://pharmasm.com/current_issue2.php?archive=39
- Petranyl, G., Meingassner, J. G., & Mieth, H. (1987). Antifungal activity of the Allylamine Derivative Ierbinafine in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(9), 1365-1368. doi: 10.1128/aac.31.9.1365
- Rangsimawong, W., & Ngawhirunpat, T. (2014). Nanoemulsions in transdermal drug delivery system. *The Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 46-61. (in Thai)
- Sadurni, N., Solans, C., Azemar, N., & Garcia, M. J. (2005). Studies on the formation of o/w Nanoemulsions by Low-energy Emulsification Methods suitable for pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(5), 438-445. doi: 10.1016/j.ejps.2005.08.001
- Santos, D. A., & Hamdan, J. S., (2005). Evaluation of broth Microdilution Antifungal susceptibility testing conditions for Trichophyton rubrum. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 1917–1920.

- Skiba, M., Lahiani, M. S., Marchais, H., Duclos, R., & Arnaud, P. (2000). Stability assessment of Ketoconazole in aqueous formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 198(1), 1-6. doi: 10.1016/s0378-5173(99)00279-3.
- Tassaneeyakul, W. (2016), *Antifungal Agents*. Khon Kaen: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. (in Thai)
- Tebaidi, D. C. (2014). *Development of Ketoconazole-based Nanoemulsions stabilized by Polymeric surfactant. XIV.SLAP/XII CIP, October 12-16th* (pp. 1-3). Porto de Galinhas, Brazil: Associação Brasileira de Polímeros
- Wooster, J., Golding, M., & Sanguansri, P. (2008). Impact of oil type on Nanoemulsion formulation and ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24(22), 12758-12765. doi: 10.1021/la801685v.

