

## การหาสภาวะที่เหมาะสมของยาฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซม ด้วยวิธีตอบสนองของพื้นผิว

ภณิกษา วิชยปรีชา, บัญชา ยิ่งงาม, วันดี รังสิวิจิตรประภา\*

### บทคัดย่อ

การหาสภาวะที่เหมาะสมของยาฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมด้วยวิธีตอบสนองของพื้นผิว

ภณิกษา วิชยปรีชา, บัญชา ยิ่งงาม, วันดี รังสิวิจิตรประภา\*

**บทนำ :** ฟินาสเทอไรด์เป็นยาเพียงชนิดเดียวที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้ใช้รับประทานเพื่อรักษาภาวะผมร่วงในเพศชาย อย่างไรก็ตามผลข้างเคียงที่พบมากที่สุดจากการรับประทานยานี้คือ มีผลทำให้ความต้องการทางเพศลดลงและทำให้เสื่อมสมรรถภาพทางเพศ ดังนั้นเพื่อลดผลข้างเคียงดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทาเฉพาะที่ของยาฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมโดยใช้วิธีตอบสนองของพื้นผิว **วัสดุและวิธีการ :** ยาฟินาสเทอไรด์ถูกกักเก็บในโปรนิโอโซมด้วยวิธีโคเอเซอร์เวชันแบบแยกวัฏภาค โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองของพื้นผิวโดยใช้การออกแบบส่วนผสมกลางเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิต การทดลองแบบแฟกทอเรียลที่มีปัจจัย 3 ระดับ ซึ่งประกอบด้วย ร้อยละของคอเลสเตอรอล( $X_1$ ) ระหว่าง 30-50 % ปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับ ( $X_2$ ) ระหว่าง 10 -30 mM และความเข้มข้นของยาฟินาสเทอไรด์ ( $X_3$ ) ระหว่าง 1.5 - 5 mM **ผลการศึกษา :** สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรนิโอโซมคือ ร้อยละของคอเลสเตอรอลเท่ากับ 3.39 mM, ปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับเท่ากับ 20.26 mM, และความเข้มข้นของฟินาสเทอไรด์เท่ากับ 3.39 mM ค่าที่ได้จากการศึกษาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ขนาดของอนุภาคเท่ากับ  $292 \pm 0.85$  nm, อัตราร้อยละการบรรจุเท่ากับ  $13.14 \pm 0.18$  และอัตราร้อยละการกักเก็บฟินาสเทอไรด์เท่ากับ  $94.47 \pm 1.67$  เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการศึกษากับค่าที่ได้จากการทำนายพบว่ามีค่าอคติของอนุภาค อัตราร้อยละการบรรจุ และอัตราร้อยละการกักเก็บฟินาสเทอไรด์ที่ต่ำเท่ากับ 0.11, 0.68, และ 0.15 ตามลำดับ **สรุปผล :** การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการออกแบบสูตรตำรับด้วยวิธีตอบสนองของพื้นผิวโดยใช้การออกแบบส่วนผสมกลางเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาสูตรตำรับยาฟินาสเทอไรด์กักเก็บในโปรนิโอโซม

**คำสำคัญ :** ฟินาสเทอไรด์, โปรนิโอโซม, วิธีตอบสนองของพื้นผิว, การออกแบบส่วนผสมกลาง

### Abstract

#### Formulation optimization of finasteride proniosomes using response surface methodology

Wichayapreecha P, Yingngam B, Rungseewijitprapa W\*

**Introduction :** Finasteride is an orally administered medication for male pattern hair loss (MPHL). It is the only specific MPHL treatment approved by the U.S. Food and Drug Administration for prescription. The most common side effects reported with orally taken of finasteride are decreased libido and impotence. In order to overcome these side effects, topical formulation of finasteride proniosomes was developed using response surface methodology. **Material and method :** Finasteride loaded proniosomes were prepared by coacervation phase separation method. The response surface methodology using the central composite rotatable design was used to optimize formulation of finasteride proniosomes. The method consisted of three factor factorial designs with three levels include cholesterol concentration ( $X_1$ ) of 30-50 %, total lipid content ( $X_2$ ) of 10-30 mM, and

\*ติดต่อผู้พิมพ์ : โทร: (66 45) 353615 แฟกซ์: (66 45) 288384 อีเมล: wandeem@yahoo.com

\*Corresponding author: Tel. (66 45) 353615, Fax. (66 45) 288384, E-mail: wandeem@yahoo.com



finasteride concentration ( $X_3$ ) of 1.5 - 5 mM. **Results :** The optimized proniosome formulation was found at cholesterol concentration of 39.03 %, total lipid content of 20.26 mM, and finasteride concentration of 3.39 mM. The experimental values of the optimized formulation exhibited mean particle size of  $292 \pm 0.85$  nm, drug loading capacity of  $13.14 \pm 0.18$  %, and encapsulation efficiency of  $94.47 \pm 1.67$  %. Comparison of the experimental values with those of the predicted values was almost identical with low percentage bias of particle size, drug loading capacity, and encapsulation efficiency of 0.11 %, 0.68 %, and 0.15 %, respectively. **Conclusion :** The response surface methodology with central composite rotatable design was an efficient method for optimization of finasteride proniosomes.

**Keyword :** finasteride, proniosomes, response surface methodology, central composite rotatable design

## บทนำ

ฟินาสเทอไรด์เป็นยาต้านพรอสแตตตีตเพียงชนิดเดียวที่ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาให้ใช้รักษาภาวะผมร่วงในเพศชาย (Hao *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามการใช้ยาดังกล่าวพบผลข้างเคียงที่สำคัญคือมักส่งผลทำให้ความต้องการทางเพศลดลงและก่อให้เกิดภาวะเสื่อมสมรรถภาพทางเพศได้ (Rogers and Avram, 2008) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนายาฟินาสเทอไรด์รูปแบบโปรนิโอโซมในรูปแบบผลิตภัณฑ์ทาเฉพาะที่ให้ได้ค่าขนาดอนุภาคในช่วงนาโนเมตร มีค่าอัตราการละลายการบรรจุยา และอัตราการละลายการกักเก็บยาที่สูง โดยใช้วิธีตอบสนองพื้นผิว (response surface methodology, RSM) ร่วมกับการออกแบบส่วนผสมกลาง (central composite rotatable design, CCRD) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับ วิธีนี้เป็นการนำสมการทางคณิตศาสตร์และการคำนวณทางสถิติมาใช้นับพื้นฐานของสมการพหุนาม (polynomial equation) เพื่อนำไปสู่ข้อมูลที่ใช้ในการทดลองมาอธิบายอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อตัวแปรตาม ซึ่งมีข้อดีที่เหนือกว่าการออกแบบสูตรตำรับโดยใช้วิธีดั้งเดิมคือ สามารถศึกษาอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรได้ในเวลาเดียวกันจึงช่วยลดความผิดพลาดจากการศึกษาที่ละปัจจัยของวิธีดั้งเดิมได้และทำให้ได้สูตรตำรับที่มีความเหมาะสม

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### วัสดุและอุปกรณ์

ฟินาสเทอไรด์ (Aurisco, China), สเปน 60 (Sigma-Aldrich Inc., USA), คลอเรสเตอรอลและอะซิโตนไนไตรท์ (Carlo

Erba Reagenti SpA, Italy), เอทิลแอลกอฮอล์ (RCI labscan, Thailand)

### การเตรียมโปรนิโอโซม (Vora *et al.*, 1998)

เตรียมยาฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมด้วยวิธีโคอะเซเวชันแบบแยกตัวภาค (coacervation phase separation) โดยเตรียมปริมาณ 100 mL ดังนี้ ชั่งยาฟินาสเทอไรด์, สเปน 60, และคลอเรสเตอรอลลงในภาชนะบรรจุ เติมน้ำเอทิลแอลกอฮอล์และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ  $70^\circ\text{C}$  จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมน้ำเพื่อให้เกิดเป็นสารละลายใส และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจะเกิดเป็นโปรนิโอโซมเจล จากนั้นเติมน้ำ 80 mL ลงไปในตำรับ โปรนิโอโซมที่ได้แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ  $60^\circ\text{C}$  ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้โปรนิโอโซมเปลี่ยนเป็นนิโอโซมเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

### ออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวร่วมกับการออกแบบส่วนผสมกลาง (Aslan, 2007)

การออกแบบการศึกษานี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert 8.0.1.0 (Stat Ease, USA) ปัจจัยที่ต้องการศึกษาในการเตรียมตำรับฟินาสเทอไรด์กักเก็บในโปรนิโอโซม ประกอบด้วย (1) สัดส่วนของคลอเรสเตอรอลในตำรับ ( $X_1$ ), (2) ปริมาณไขมันทั้งหมด ( $X_2$ ), และ (3) ความเข้มข้นของยาฟินาสเทอไรด์ ( $X_3$ ) โดยกำหนดค่าของตัวแปรต้นดังนี้  $X_1$  มีค่าอยู่ระหว่าง 30-50 %,  $X_2$  มีค่าอยู่ระหว่าง 10-30 mM, และ  $X_3$  มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5-5 mM ค่าของตัวแปรเหล่านี้ได้จากการศึกษาเบื้องต้น และตัวแปรตามที่ต้องการศึกษาประกอบด้วย (1) ขนาดอนุภาคของระบบนำส่ง, (2) อัตราการละลายการบรรจุตัวยา, และ (3) อัตราการละลายการกักเก็บยารายละเอียดการออกแบบการทดลองแสดงดังตารางที่ 1



ตารางที่ 1 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรที่ศึกษา

| ตัวแปร         | ระดับ  |       |       |       |        |
|----------------|--------|-------|-------|-------|--------|
|                | -1.682 | -1    | 0     | +1    | +1.682 |
| X <sub>1</sub> | 23.18  | 30.00 | 40.00 | 50.00 | 56.82  |
| X <sub>2</sub> | 3.18   | 10.00 | 20.00 | 30.00 | 36.82  |
| X <sub>3</sub> | 0.31   | 1.50  | 3.25  | 5.00  | 6.19   |

#### การวัดขนาดและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค

ขนาดอนุภาคของระบบนำส่งวัดด้วยวิธีการกระเจิงแสงเลเซอร์และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาควัดด้วยวิธีการสะท้อนของประจุที่พื้นผิวของอนุภาค โดยใช้เครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) โดยเจือจางตำรับนิโอโซมด้วยน้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วน 1:1000 จากนั้นนำไปวัดขนาดอนุภาคและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคและแสดงค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการวัด 3 ครั้ง

#### การวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์ที่กักเก็บและบรรจุในโปรนิโอโซม

ขั้นตอนการวิเคราะห์ทำโดยนำตำรับที่ศึกษามานับปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 50,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Optima™ L-100K ultracentrifuge, Beckman, UK) จากนั้นเก็บส่วนใสด้านบนนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 µm แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (Waters, USA) โดยแยกบนคอลัมน์ C18-ODS ด้วยตัวทำละลายที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรล์และน้ำ ที่อัตราส่วน 60:40 อัตราเร็ว 1 mL/min ปริมาณสารตัวอย่างเท่ากับ 20 µL และวิเคราะห์ปริมาณสารที่ความยาวคลื่น 210 nm จากนั้นนำค่าปริมาณของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ไปคำนวณหา อัตราร้อยละ

การกักเก็บและอัตราร้อยละการบรรจุยาฟีนาสเตอไรด์ในโปรนิโอโซม ดังสมการที่ 1 และ 2

อัตราร้อยละการกักเก็บตัวยา

$$(\% \text{ entrapment efficiency}) = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \quad (1)$$

อัตราร้อยละการบรรจุตัวยา

$$(\% \text{ drug loading capacity}) = \frac{C_t - C_s}{C_t - C_s + C_l} \times 100 \quad (2)$$

โดย C<sub>t</sub> คือ ปริมาณตัวยาทั้งหมด

C<sub>s</sub> คือ ปริมาณตัวยาที่อยู่ไม่ถูกกักเก็บ

C<sub>l</sub> คือ ปริมาณไขมันทั้งหมด

#### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีตอบสนองพื้นผิวร่วมกับการออกแบบส่วนผสมกลาง (Central composite rotatable design - response surface methodology (CCRD - RSM)) เพื่อเลือกขนาดอนุภาคที่เหมาะสมในการใช้นำส่งยา, อัตราร้อยละการกักเก็บตัวยา, และอัตราร้อยละการบรรจุตัวยา ได้ผลดังตารางที่ 2 พบว่าโปรนิโอโซมมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 219-346 นาโนเมตร, อัตราร้อยละการบรรจุตัวยา อยู่ในช่วง 1.20 - 43.05% และอัตราร้อยละการกักเก็บยาอยู่ในช่วง 71.95-95.44 ซึ่งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ต้องการศึกษากับค่าการตอบสนองของปัจจัย สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม Design Expert 8.0.1.0 โดยใช้แบบจำลองการถดถอยที่ระดับนัยสำคัญ  $\alpha = 0.05$  พบว่าแบบจำลอง Quadratic มีความเหมาะสม โดยพิจารณาจากค่า P-value ( $P < 0.5$ ) Lack of fit ( $P \geq 0.05$ ) และค่าทางสถิติ (Std.Dev และ PRESS มีค่าต่ำ  $R^2$  และ  $R^2 \text{ adj}$  มีค่าสูง) ประกอบกัน

ตารางที่ 2 อัตราร้อยละการกักเก็บตัวยา อัตราร้อยละการบรรจุตัวยา และขนาดอนุภาคที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RSM-CCRD

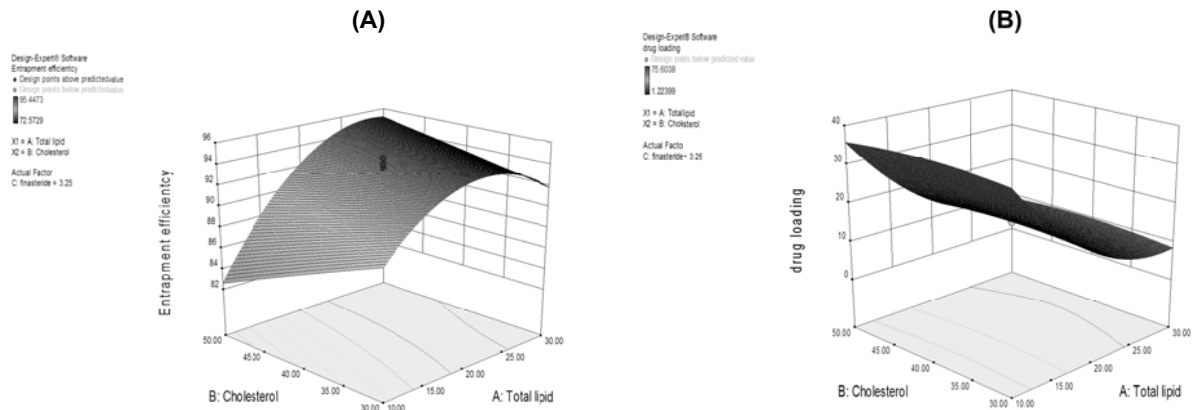
| สูตรตำรับ | ไขมันทั้งหมดในตำรับ (mM) | ร้อยละความเข้มข้นของคลอเรสเตอรอล (%) | ความเข้มข้นของฟีนาสเตอไรด์ (mM) | อัตราร้อยละการกักเก็บตัวยา (%) | อัตราร้อยละการบรรจุตัวยา (%) | ขนาดอนุภาค (nm) |
|-----------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 1         | 10.00                    | 30.00                                | 1.50                            | 89.45                          | 11.83                        | 261.6           |
| 2         | 20.00                    | 40.00                                | 3.25                            | 92.47                          | 13.06                        | 291.2           |
| 3         | 30.00                    | 30.00                                | 1.50                            | 92.00                          | 4.39                         | 335.6           |
| 4         | 36.82                    | 40.00                                | 3.25                            | 91.61                          | 7.48                         | 329.4           |
| 5         | 20.00                    | 56.82                                | 3.25                            | 91.26                          | 12.91                        | 285.6           |



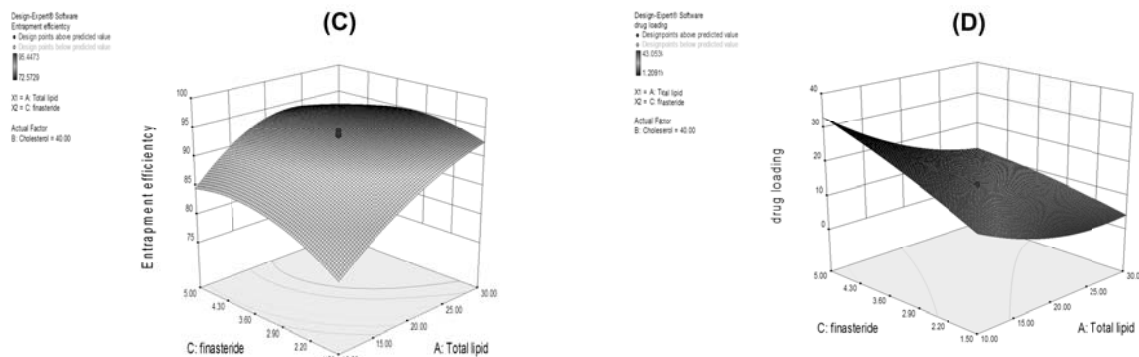
|    |       |       |      |       |       |       |
|----|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| 6  | 20.00 | 40.00 | 6.19 | 90.31 | 21.85 | 255.8 |
| 7  | 30.00 | 50.00 | 5.00 | 94.73 | 13.63 | 300.2 |
| 8  | 20.00 | 40.00 | 3.25 | 93.68 | 13.21 | 290.6 |
| 9  | 20.00 | 40.00 | 3.25 | 94.57 | 13.32 | 292.2 |
| 10 | 20.00 | 40.00 | 3.25 | 94.05 | 13.25 | 295.0 |
| 11 | 30.00 | 30.00 | 5.00 | 83.24 | 12.18 | 332.4 |
| 12 | 10.00 | 50.00 | 5.00 | 89.36 | 30.88 | 223.0 |
| 13 | 10.00 | 50.00 | 1.50 | 72.57 | 9.81  | 220.2 |
| 14 | 20.00 | 40.00 | 0.31 | 79.77 | 1.20  | 258.2 |
| 15 | 20.00 | 23.18 | 3.25 | 95.44 | 13.42 | 346.0 |
| 16 | 10.00 | 30.00 | 5.00 | 84.77 | 29.77 | 261.2 |
| 17 | 3.18  | 40.00 | 3.25 | 71.95 | 43.05 | 242.8 |
| 18 | 30.00 | 50.00 | 1.50 | 88.21 | 4.22  | 263.4 |
| 19 | 20.00 | 40.00 | 3.25 | 93.35 | 13.17 | 293.0 |
| 20 | 20.00 | 40.00 | 3.25 | 93.60 | 13.20 | 292.6 |

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาคือ ร้อยละของคลอเรสเตอรอล, ปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับและความเข้มข้นของยาฟิโนสเทอไรด์ กับค่าการตอบสนองของปัจจัย (อัตราร้อยละการกักเก็บตัวยา อัตราร้อยละการบรรจุตัวยา และขนาดของอนุภาค) สามารถแสดงเป็นกราฟสามมิติได้แสดงดังรูปที่ 1 (A+B) กราฟสามมิติที่ได้จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับ จะทำให้อัตราร้อยละการกักเก็บยามีค่าเพิ่มขึ้น แต่อัตราร้อยละการบรรจุตัวยาลดลง และเมื่อเพิ่มปริมาณของคลอเรสเตอรอลจะให้อัตราร้อยละการกักเก็บยาลดลง และอัตราร้อยละการบรรจุตัวยามีค่าคงที่ แม้ว่าการเพิ่มปริมาณของคลอเรสเตอรอลจะช่วยเพิ่มอัตราร้อยละการบรรจุตัวยา (Mokhtar *et al.*, 2008) แต่ปริมาณของคลอเรสเตอรอลที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณที่ต่ำ โดยการเพิ่มของคลอเรสเตอรอลจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของอัตราร้อยละการบรรจุตัวยาเมื่อเพิ่มปริมาณของคลอเรสเตอรอลมากกว่า 20 Mol% (Mohammed and Perrie, 2005) และการเพิ่มปริมาณของคลอเรสเตอรอลจะมีผลต่อความคงตัวของระบบนิโอโซมและการซึมผ่านผิว (Rogerson *et al.*, 1987) และจากกราฟสามมิติรูปที่ 2 (C+D) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาฟิโนสเทอไรด์จะทำให้มีค่าอัตราร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยาเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Xiaoyun *et al.* (Zhang *et al.*, 2010) ที่ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของยา dihydroartemisinin ด้วยระบบนำส่งไขมันโดยใช้วิธีตอบสนองพื้นผิวพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาจะให้ค่า

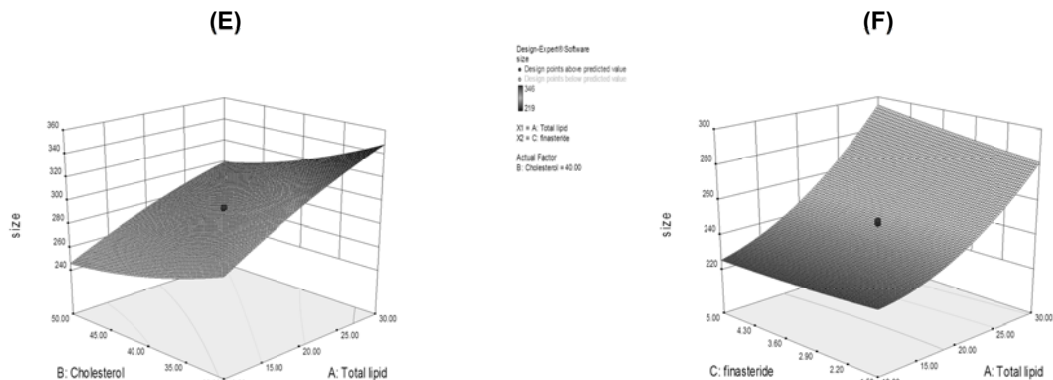
อัตราร้อยละการบรรจุยาเพิ่มขึ้นและเมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับจะทำให้อัตราร้อยละการกักเก็บยามีค่าเพิ่มขึ้นและได้ขนาดอนุภาคที่ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของไขมันจะทำให้อัตราร้อยละการบรรจุตัวยามีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีช่องว่างของไขมันเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ยาฟิโนสเทอไรด์ซึ่งเป็นยาประเภทชอบละลายในไขมันสามารถแทรกอยู่บริเวณช่องว่างของไขมันนี้ได้ การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าไขมันมีผลต่ออัตราร้อยละการบรรจุตัวยา และขนาดของอนุภาค นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Mahmoud *et al.* (Mokhtar *et al.*, 2008) ที่ศึกษาปัจจัยในตำรับที่มีผลกระทบต่อการกักเก็บยา flurbiprofen และอัตราเร็วในการปลดปล่อยยาของตำรับโปรนิโอโซม พบว่าการเพิ่มไขมันในตำรับและความเข้มข้นของยาจะมีผลให้อัตราร้อยละการกักเก็บยาเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณของยาที่บรรจุภายในจะลดลงเมื่อเทียบกับไขมันทั้งหมดและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาต่อไขมันจะทำให้ร้อยละการกักเก็บและร้อยละการบรรจุยาเพิ่มขึ้น กราฟสามมิติรูปที่ 3 (E-F) เป็นกราฟที่แสดงปัจจัยที่มีผลต่อขนาดอนุภาคคือ ไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละปริมาณของคลอเรสเตอรอล และความเข้มข้นของยาฟิโนสเทอไรด์ พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคมากที่สุดคือ ไขมันทั้งหมดในตำรับ โดยเมื่อเพิ่มปริมาณไขมันในตำรับจะให้ขนาดของอนุภาคที่เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของคลอเรสเตอรอล และความเข้มข้นของยาฟิโนสเทอไรด์จะให้ขนาดที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย



รูปที่ 1 กราฟสามมิติแสดงการตอบสนองของอัตราร้อยละการกักเก็บตัวยา (A) อัตราร้อยละการบรรจุตัวยา (B) ต่อไขมันทั้งหมดในตำรับและร้อยละปริมาณของคลอเรสเตอรอล



รูปที่ 2 กราฟสามมิติแสดงการตอบสนองของอัตราร้อยละการกักเก็บตัวยา (C) อัตราร้อยละการบรรจุตัวยา (D) ต่อไขมันทั้งหมดในตำรับและความเข้มข้นของยาฟินาสเทอไรด์



รูปที่ 3 กราฟสามมิติแสดงการตอบสนองของขนาดอนุภาค ต่อไขมันทั้งหมดในตำรับและร้อยละปริมาณของคลอเรสเตอรอล (E) และการตอบสนองของขนาดอนุภาค ต่อไขมันทั้งหมดในตำรับกับความเข้มข้นของยาฟินาสเทอไรด์ (F)

จากการทดลองข้างต้นสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับค่าการตอบสนองของปัจจัยเป็นสมการการถดถอยได้ โดยแสดงสมการเป็นร้อยละการกักเก็บ ร้อยละการ

บรรจุยาและขนาดของอนุภาคและมีค่า  $R^2$  เป็น 0.9522, 0.9517, และ 0.9607 ตามลำดับ ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{อัตราร้อยละการกักเก็บยา} &= 93.62 + 3.78 X_1 - 0.85 X_2 + 2.02 X_3 + 2.50 X_1 X_2 - 1.79 + X_1 X_3 + 4.59 X_2 X_3 - 3.79 X_1^2 - 0.068 X_2^2 - 3.01 X_3^2 \\ \text{อัตราร้อยละการบรรจุยา} &= 13.28 - 7.88 X_1 - 0.036 X_2 + 6.66 X_3 + 0.27 X_1 X_2 - 2.73 X_1 X_3 + 0.59 X_2 X_3 + 3.79 X_1^2 - 0.49 X_2^2 - 1.07 X_3^2 \\ \text{ขนาดอนุภาค} &= 292.80 + 30.11 X_1 - 20.91 X_2 + 2.34 X_3 - 3.10 X_1 X_2 + 3.90 X_1 X_3 + 5.40 X_2 X_3 - 4.61 X_1^2 + 5.89 X_2^2 - 14.90 X_3^2 \end{aligned}$$



จากนั้นจึงนำผลการทดลองมาหาอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุด ภายใต้การกำหนดเงื่อนไข ดังตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาเงื่อนไขดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตนิโอโซมให้มีปริมาณอัตราร้อยละการกักเก็บ และอัตราร้อยละการบรรจุยามากที่สุด และมีขนาดใหญ่มากที่สุด คือ ร้อยละความเข้มข้นของคลอเรสเตอรอลเท่ากับ 39.03 % ไขมันทั้งหมดในตำรับเท่ากับ 20.26 mM และความเข้มข้นของยาฟีนาสเทอโรลด์เท่ากับ 3.39 mM จากนั้นจึงนำสภาวะที่เหมาะสมไปทดลอง

ซ้ำและเปรียบเทียบค่าที่ได้จริงกับค่าที่ได้จากการทำนายได้ผลดังตารางที่ 4 จากผลการทดลองที่ได้พบว่าค่าอัตราร้อยละการกักเก็บตัวยา อัตราร้อยละการบรรจุตัวยา และขนาดของอนุภาคที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกันและเมื่อพิจารณาข้ออคติ (Bias) พบว่ามีค่าเป็น 0.15 %, 0.68 % และ 0.11 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้นั้นมีค่าน้อยกว่า 5% จึงกล่าวได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมตำรับโปรตีนโอโซมมีความน่าเชื่อถือ

ตารางที่ 3 การกำหนดเกณฑ์ของระดับปัจจัยที่มีผลต่อค่าตอบสนองเพื่อวิเคราะห์หาค่าที่เหมาะสม

| ปัจจัย                             | เป้าหมาย    | ระดับต่ำ | ระดับสูง |
|------------------------------------|-------------|----------|----------|
| ร้อยละปริมาณของคลอเรสเตอรอล        | อยู่ในเกณฑ์ | 30.00    | 50.00    |
| ไขมันทั้งหมดในตำรับ (mM)           | อยู่ในเกณฑ์ | 10.00    | 30.00    |
| ความเข้มข้นของยาฟีนาสเทอโรลด์ (mM) | อยู่ในเกณฑ์ | 1.50     | 5.00     |
| ร้อยละการกักเก็บ                   | มากที่สุด   | 72.57    | 95.44    |
| ร้อยละการบรรจุยา                   | มากที่สุด   | 1.20     | 43.05    |
| ขนาดอนุภาค                         | มากที่สุด   | 219.00   | 346.00   |

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

| ค่าตอบสนองปัจจัย | ค่าที่ได้จากการทดลอง | ค่าที่ได้จากการทำนาย | ค่าอคติ (Bias) |
|------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| ร้อยละการกักเก็บ | 94.477               | 94.619               | 0.150          |
| ร้อยละการบรรจุยา | 13.138               | 13.228               | 0.676          |
| ขนาดอนุภาค       | 292.485              | 292.796              | 0.106          |

\*Bias คำนวณจาก [(ค่าที่ได้จากการทำนาย – ค่าที่ได้จากการทดลอง)/ค่าที่ได้จากการทำนาย] × 100

ตารางที่ 5 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายขนาดและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

| สูตรตำรับ           | ขนาดอนุภาค (nm) | ค่าการกระจายขนาด | ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา (mV) |
|---------------------|-----------------|------------------|------------------------|
| นิโอโซมเปล่า        | 287.00±3.05     | 0.244±0.059      | -33.40±0.98            |
| นิโอโซมที่กักเก็บยา | 292.00±0.85     | 0.327±0.010      | -31.60±1.08            |

เมื่อนำตำรับโปรตีนโอโซมที่ได้นี้ไปวัดขนาด ค่าการกระจายขนาดและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคได้ผลดังตารางที่ 5 การศึกษาขนาดของอนุภาค ค่าการกระจายขนาดและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเป็นการทำนายความคงตัวทางกายภาพของตำรับโปรตีนโอโซมระหว่างการเก็บ โดยขนาดวัดด้วยวิธีการกระเจิงแสงแบบพลวัต ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่ขึ้นลงของความเข้มของแสงที่กระเจิงซึ่งเกิดจากการเคลื่อนที่ของอนุภาค (Zhang et al., 2010) โดยขนาดของอนุภาคควรมีขนาดที่ใกล้เคียงกันเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคและส่งผลให้เกิดการตกตะกอน ค่าการกระจายขนาดของอนุภาคจะบ่งบอกถึงขนาดของอนุภาคในตำรับว่ามีค่าใกล้เคียงกันมากน้อยเพียงใด ค่านี้

ควรมีค่าที่แคบ และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความคงตัวของตำรับโปรตีนโอโซม ค่านี้จะวัดปริมาณของอิเล็กตรอนที่ผิวตรงบริเวณ shear plane ถ้าค่านี้มีค่ามากกว่า ±30 mV แสดงว่าระบบมีความคงตัวดีและถ้ามีค่าสูงถึง 60 mV แสดงว่าระบบมีความคงตัวที่ดีมาก (Mehnert et al., 2001) จากการทดลองนี้พบว่าโปรตีนโอโซมที่เตรียมได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมมีขนาดของอนุภาคเท่ากับ 292 ± 0.85 nm ค่าการกระจายขนาดเท่ากับ 0.327 ± 0.01 และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเท่ากับ -31.6 ± 1.08 mV ซึ่งถือว่าระบบที่ได้นั้นมีความคงตัวทางกายภาพดี



## สรุปผล

การศึกษานี้เป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมยาพินาสเตอไรด์กักเก็บในโปรนิโอโซมโดยใช้วิธีตอบสนองพื้นผิวร่วมกับการออกแบบส่วนผสมกลาง ตัวแปรต้นที่ศึกษาประกอบด้วยความเข้มข้นของคลอเรสเตอรอล ไขมันในสูตรตำรับและยาพินาสเตอไรด์ ส่วนตัวแปรตามคือ ขนาดอนุภาค อัตราร้อยละการบรรจุยาและอัตราร้อยละการกักเก็บยา ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมตำรับดังกล่าว คือ สูตรตำรับโปรนิโอโซมที่ประกอบด้วยสัดส่วนของ Span 60 เท่ากับ 60.07% และคลอเรสเตอรอลเท่ากับ 39.03% ปริมาณไขมันในตำรับเท่ากับ 20.26 mM และความเข้มข้นของพินาสเตอไรด์เท่ากับ 3.39 mM จะได้โปรนิโอโซมที่มีขนาดอนุภาคเท่ากับ  $292 \pm 0.85$  nm ร้อยละการบรรจุยาเท่ากับ  $13.14 \pm 0.18\%$  และอัตราร้อยละการกักเก็บยาเท่ากับ  $94.48 \pm 1.67\%$  ซึ่งมีความคงตัวทางกายภาพที่ดี ดังนั้น ตำรับที่ผลิตขึ้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทาเฉพาะที่เพื่อรักษาภาวะผมร่วงในเพศชายต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และบริษัทฟาร์มา นูวา จำกัด ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม

## References

- Hao Y, Zhao F, Li N, *et al.* Studies on a high encapsulation of colchicine by a niosome system. *Inter J Pharm* 2002; 244(1-2):73-80
- Rogers NE, Avram MR. Medical treatments for male and female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59(4):547-566.
- Vora B, Khopade AJ, Jain NK. Proniosome based transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception. *J Control* 1998; 54:149-165
- Aslan N. Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling the influence of some operating variables of a Multi-Gravity Separator for coal cleaning. *Fuel* 2007; 769-776.

- Mokhtar M, Sammour OA, Hammad MA, *et al.* Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes. *Int J Pharm* 2008; 361(1-2):104-111.
- Mohammed AR and Perrie Y. Liposome solutions for poorly soluble drug. *Drug Delivery Report Autumn/Winter* 2005; 74-76.
- Rogerson A, Cummings J, Florence AT. Adryamycin-loaded niosomes: drug entrapment, stability and release. *J Microencapsul* 1987; 4(4):321-328.
- Zhang X, Liu J, Qiao H, *et al.* Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using repose surface methodology. *Power Technol* 2010; 197(1-2):120-128.
- Zhenhua M, Henk GM, Jan G.A.E de Smet, *et al.* New developments in particle characterization by laser diffraction: size and shape. *Powder Tech* 2000; 111(1-2):66-78.
- Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and application. *Adv Drug Delivery Rev* 2001; 47(2-3):165-196.