



สารเพิ่มความคงตัวเพื่อเพิ่มความเข้มข้นและความคงตัวของนิโอโซม

บัญชา ยิ่งงาม¹, ณัฐพันธุ์ ศุกกา², วันดี รังสิจิตรประภา^{3*}

บทคัดย่อ

สารเพิ่มความคงตัวเพื่อเพิ่มความเข้มข้นและความคงตัวของนิโอโซม

บัญชา ยิ่งงาม¹, ณัฐพันธุ์ ศุกกา², วันดี รังสิจิตรประภา^{3*}

บทนำ : นิโอโซมมีแนวโน้มที่จะเป็นตัวพาสำหรับนำส่งสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางและมักจะนำไปกระจายในอิมัลชันหรือเจลพื้นก่อนทาบนผิวหนัง อย่างไรก็ตามปัญหาหลักที่พบเมื่อใช้นิโอโซมเป็นระบบนำส่งคือ การมีน้ำจำนวนมากเป็นส่วนประกอบในตำรับส่งผลให้สารออกฤทธิ์มีอยู่ในความเข้มข้นที่ต่ำมากและอาจจะไม่เพียงพอที่จะเกิดประสิทธิภาพแก่ผิวหนัง ในการศึกษาครั้งนี้สารเพิ่มความคงตัวที่เหมาะสมจึงถูกศึกษาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นและปรับปรุงเสถียรภาพของนิโอโซม **วัสดุและวิธีการทดลอง :** นิโอโซมเปล่าและนิโอโซมกักเก็บสารสกัดหัวเหลืองความเข้มข้น 0.5 %w/v เตรียมโดยวิธีเตรียมฟิล์มและลดขนาดอนุภาคด้วยการปั่นละเอียดโดยใช้ความดันสูงตำรับที่ได้นำมาทำให้แห้งแบบเยือกแข็งเพื่อให้เป็นผงแห้ง โดยปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างสารเพิ่มความคงตัวต่อปริมาณไขมัน ความเข้มข้นของไขมันโดยรวม ชนิดของสารเพิ่มความคงตัว และชนิดของสารลดแรงตึงผิว **ผลการศึกษา :** ผลการศึกษาพบว่า การระเหยแห้งแบบเยือกแข็งของตำรับนิโอโซมโดยใช้น้ำตาลกลูโคส แมนนิทอล กลีเซอรอล และทรีฮาโลสต่อปริมาณไขมันโดยรวมในอัตราส่วนโดยน้ำหนักเท่ากับ 1:3, 1:3, 1:5 และ 1:5 ทำให้นิโอโซมคืนรูปได้ดีและมีอนุภาคกระจายอย่างสม่ำเสมอ นิโอโซมที่ได้สามารถเพิ่มความเข้มข้นขึ้นได้ถึง 10 เท่าเมื่อผสมน้ำตาลทรีฮาโลส กลีเซอรอลและกลูโคส ขณะที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะต่ำกว่าเมื่อใช้น้ำตาลแมนนิทอล (2 เท่า) ในทางตรงกันข้ามการระเหยแห้งแบบเยือกแข็งที่ไม่เติมสารเพิ่มความคงตัวมีผลเพิ่มขนาดอนุภาคแก่นิโอโซมทุกตำรับที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) **สรุปผล :** การระเหยแห้งแบบเยือกแข็งร่วมกับการใช้สารเพิ่มความคงตัวให้แก่อนุภาคที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นและเพิ่มความคงตัวให้แก่ตำรับนิโอโซมได้

คำสำคัญ : นิโอโซม, การระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง, อนุภาคแขวนลอยเข้มข้น, ความคงตัว

Abstract

Lyoprotectants for concentration and stability improvement of niosomes

Yingngam B¹, Supaka N², Rungsevivijitprapa W^{3*}

Introduction : Niosomes are promising vehicle for delivery of cosmetic ingredients and usually used as dispersion in emulsions or gel bases prior to skin application. However, the main problem encountered when using niosomes as delivery system is the large amount of water in the formulation resulting in very low concentration of the actives and may not be sufficient to generate efficiency to skin. In this study, appropriated lyoprotectants for enhancing the concentration and

¹Ph.D., อาจารย์ประจำกลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

²Ph.D., นักวิจัยประจำศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย อ.คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120

³Dr.rer.nat., ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อาจารย์ประจำกลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

ติดต่อผู้พิมพ์: โทรศัพท์ (66 45) 353615 โทรสาร (66 45) 353626. E-mail : wandeem@yahoo.com

¹Ph.D., Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190

²Ph.D., Researcher, National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, Pathumthani 12120

³Dr.rer.nat., Assist Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190

*Corresponding author: Tel (+66 45) 353615. Fax (66 45) 353626. E-mail : wandeem@yahoo.com



improving the stability of niosomes were investigated. **Materials and methods :** Blank and soybean extract (0.5 %w/v) loaded niosomes were prepared by film hydration method, followed by particle size reduction by high pressure homogenization. The obtained niosomes were subsequently lyophilized to obtain dry product. The investigated factors include weight ratios of lyoprotectant to total lipid content, total lipid concentrations, types of lyoprotectant, and types of non-ionic surfactants. **Results :** The results showed that lyophilization of niosomes with glucose, mannitol, glycerol, and trehalose at a weight ratio of 1:3, 1:3, 1:5, and 1:5 were well dispersed with uniformed in their particle sizes after rehydration. Niosomes were also concentrated up to 10X using trehalose, glycerol, and glucose while lower concentration factor was observed when using mannitol (2X). In contrast, lyophilization of niosomes without lyoprotectant significantly increased particle sizes of all formulations ($p < 0.05$). **Conclusion :** Using lyophilization with an appropriated lyoprotectant has potential for enhancing the concentration and improving the stability of niosomes.

Keywords : niosomes, lyophilization, concentrated particles, stability

บทนำ

ช่วงสิบปีที่ผ่านมาการใช้เทคโนโลยีเพื่อนำส่งสารออกฤทธิ์ในเครื่องสำอางได้รับความนิยมอย่างมากจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก นีโอโซม (niosomes) เป็นอีกระบบนำส่งหนึ่งที่มีการศึกษาเนื่องจากมีความคงตัวทางเคมีกายภาพดีและสามารถนำส่งสารออกฤทธิ์เข้าสู่ชั้นผิวหนังได้ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาค อนุภาคที่มีขนาดเล็กจะนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ (Yingngam *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามปัญหาหลักที่พบเมื่อนำระบบนำส่งดังกล่าวมาเติมลงในตำรับเครื่องสำอางพื้น เช่น ครีม เจล โลชั่น เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยในสัตว์ทดลองและอาสาสมัครมนุษย์ คือความเข้มข้นของระบบนำส่งที่แขวนลอยในวัตถุนำมามีอยู่ในความเข้มข้นต่ำ ทำให้ไม่สามารถเติมลงในสูตรตำรับเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Yingngam *et al.*, 2011) ดังนั้น จึงควรมีการเพิ่มความเข้มข้นให้แก่ระบบนำส่งและเพิ่มความคงตัวให้แก่สารออกฤทธิ์ที่กักเก็บในระบบนำส่งดังกล่าวก่อนนำไปใช้ การระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) เป็นอีกวิธีที่ใช้เพื่อเพิ่มความคงตัวและเพิ่มความเข้มข้นให้แก่นาโนพาร์ทิเคิล (Chen *et al.*, 2010) การป้องกันไม่ให้อนุภาคของนาโนพาร์ทิเคิลแตกในระหว่างกระบวนการทำให้แห้งจำเป็นต้องมีการเติมสารเพิ่มความคงตัว (lyoprotectant) ลงไปด้วยเพื่อป้องกันไม่ให้โครงสร้างนีโอโซมถูกทำลายโดยผลึกน้ำแข็งในขั้นตอนการระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง รวมทั้งช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคในระหว่างดึงน้ำออกและป้องกันการแยกตัวภาควะหว่างการคืนรูปในสารละลายน้ำ (Vauthier *et al.*, 2008) แม้ว่าจะมีการพัฒนาวิธีระเหยแห้งแบบเยือกแข็งสำหรับ

นาโนพาร์ทิเคิลหลายระบบมาแล้วก็ตาม (Guan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Zillies *et al.*, 2008) แต่จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ายังไม่มีรายงานวิจัยที่ศึกษาในระบบนีโอโซม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมนีโอโซมคั้นรูปผงแห้งเพื่อเพิ่มความเข้มข้นและความคงตัวโดยใช้สารเพิ่มความคงตัวในระหว่างการระเหยแห้งแบบเยือกแข็งต่างชนิดกัน นอกจากนี้ยังทดลองศึกษาความเป็นไปได้โดยใช้สารสกัดถั่วเหลืองเป็นตัวแทนของสารสกัดที่ทดลองบรรจุในนีโอโซมเพื่อพิสูจน์ผลการศึกษาที่ได้ว่าสามารถประยุกต์ใช้กับนีโอโซมที่มีการนำส่งสารสกัดจากสมุนไพร สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษานี้จะนำไปใช้สำหรับเตรียมนีโอโซมผงแห้งคั้นรูปและเพิ่มความเข้มข้นของระบบนำส่งเพื่อผสมลงในตำรับเครื่องสำอางพื้นต่อไป

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยมีดังนี้ Brij 72 (BR72, polyoxyethylene (2) stearyl ether, the East Asiatic Public Company Ltd., Thailand), Span 60 (SP60, sorbitan monostearate), Tween 61 (TW61, polyoxyethylene (4) sorbitol anhydride monostearate), trehalose (Sigma-Aldrich Company, USA), cholesterol (CHOL, Carlo Erba Reagenti SpA, Italy) สารเคมีชนิดอื่นเป็นเกรดที่ใช้สำหรับวิเคราะห์



การเตรียมนิโอโซม

นิโอโซมเตรียมด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชัน (film hydration) และลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องปั่นละเอียดความดันสูง ดังนี้ ละลายสารลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอลลงในขวดก้นกลม จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกภายใต้สุญญากาศ (BÜCHI, Flawil, Switzerland) เติมน้ำปราศจากไอออนและเขย่าที่อุณหภูมิ 60 °C ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Kühner/ISF-1-W Shaker, Switzerland) จากนั้นนำไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องปั่นละเอียดความดันสูงที่ความดัน 500 บาร์ เป็นเวลา 10 นาที (APV 1000, Invensys APV Products, Denmark) สำหรับตำรับนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัดถั่วเหลืองเติมสารสกัดลงในขั้นตอนการเตรียมฟิล์ม

การระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง

นำสารแขวนลอยของนิโอโซม 1 mL บรรจุลงในขวดแก้ว โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่เติมสารเพิ่มความคงตัวและกลุ่มที่ไม่เติมสารเพิ่มความคงตัว โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นและชนิดของสารเพิ่มความคงตัวให้แก่อนุภาคแตกต่างกันแล้วนำไปทำให้เป็นน้ำแข็งโดยแช่แข็งช้าๆ ในอ่างเยือกด้วยอัตราการทำให้เย็นเท่ากับ 0.5 °C/min เริ่มจากอุณหภูมิห้องจนถึง -40 °C จากนั้นนำขวดบรรจุสารตัวอย่างเข้าใส่ประเหยแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -55 °C ความดัน 0.2 mbar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Germany)

การเพิ่มความเข้มข้นของนิโอโซม

ภายหลังจากผลิตนิโอโซมผงแห้งเสร็จแล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงในตำรับเพื่อคืนรูปนิโอโซม โดยลดปริมาตรลงจากปริมาตรเริ่มต้นให้เท่ากับ 1X, 2X, 5X และ 10X ผสมให้เข้ากันแล้วสังเกตผลและวัดขนาดอนุภาคภายหลังการคืนรูปแล้วเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคก่อนทำให้แห้ง

การวัดขนาดอนุภาค

การวัดขนาดอนุภาคของนิโอโซมก่อนและหลังการทำให้แห้งวัดด้วยใช้หลักการ photon correlation spectroscopy (PCS) โดยใช้เครื่อง Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) โดยวัดขนาดอนุภาคที่อุณหภูมิ 25 °C การทดลองวัดผลซ้ำ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยใช้ข้อมูลจากการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 15.0 for Windows (SPSS, Chicago, USA) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ศึกษานำมาเปรียบเทียบโดยใช้ Student's *t*-test และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

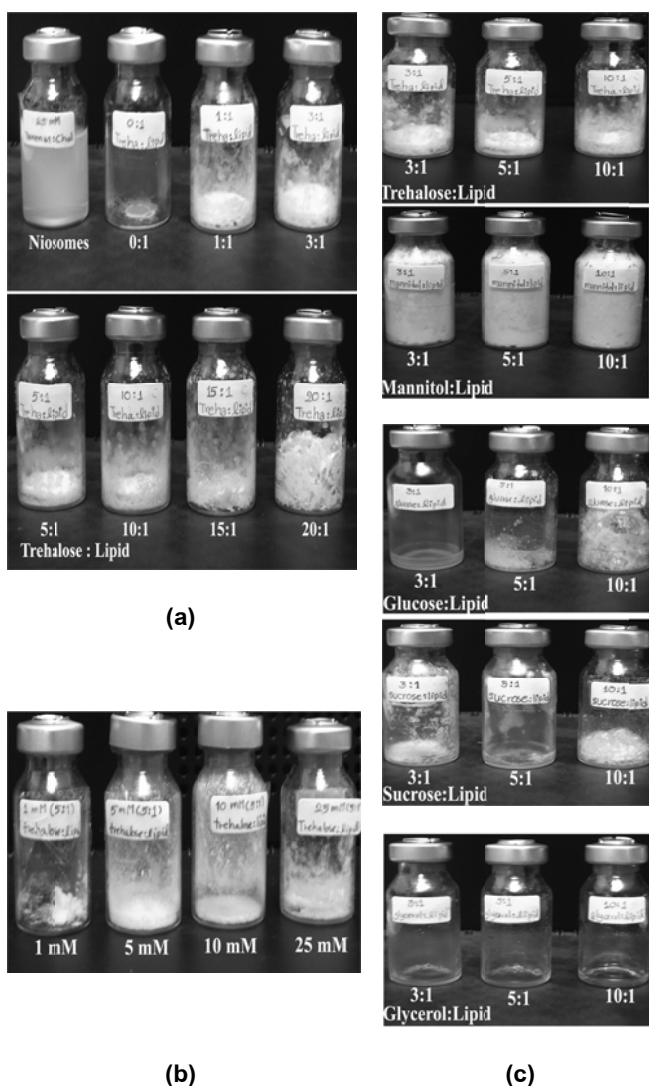
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลของอัตราส่วนระหว่างสารเพิ่มความคงตัวต่อไขมัน

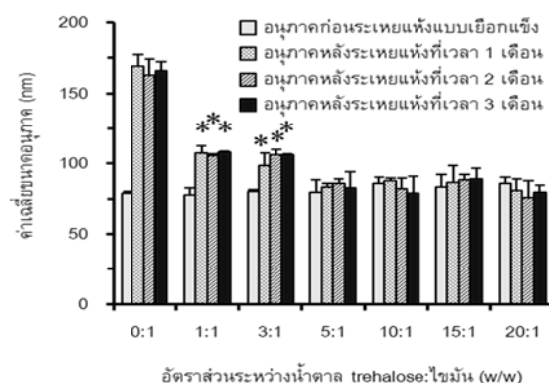
การศึกษานี้เตรียมตำรับนิโอโซมจาก TW61:CHOL อัตราส่วนต่อโมลเท่ากับ 1:1 ความเข้มข้นเท่ากับ 25 mM เป็นสูตรตำรับตั้งต้นสำหรับศึกษาสภาวะการทำแห้งแบบเยือกแข็งขนาดอนุภาคเริ่มต้นที่ผลิตได้เท่ากับ 80 ± 8 nm และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างการผลิตแต่ละรุ่น ($p > 0.05$) จากนั้นศึกษาอัตราส่วนระหว่างน้ำตาล trehalose ต่อไขมันรวมตั้งแต่ 0:1 ถึง 20:1 โดยน้ำหนัก พบว่าการเติมน้ำตาลลงในสูตรตำรับช่วยทำให้นิโอโซมผงแห้งมีลักษณะเป็นสีขาวและเกาะกันอย่างหลวมๆ ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 1a และ 2 สัดส่วนที่แตกต่างกันระหว่างสารเพิ่มความคงตัวและปริมาณไขมันมีผลต่อความเร็วในการคืนรูปภายหลังการเติมน้ำปราศจากไอออน ดังนี้ นิโอโซมผงแห้งที่ไม่เติมสารเพิ่มความคงตัวจะคืนรูปได้ยากและอนุภาคส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน การเพิ่มปริมาณน้ำตาล trehalose ลงในตำรับตั้งแต่ 1:1 ถึง 3:1 ช่วยทำให้ตำรับคืนรูปได้ ที่อัตราส่วนน้ำตาลต่อไขมันเท่ากับ 5:1 และ 10:1 ช่วยทำให้นิโอโซมผงแห้งคืนรูปได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาเพียง 5 วินาที ขณะที่การเติมน้ำตาลในความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีเพิ่มระยะเวลาการคืนรูปนานขึ้นถึง 20 วินาทีและอนุภาคทั้งหมดกระจายตัวได้อย่างสมบูรณ์ โดยกราฟเปรียบเทียบสัดส่วนดังกล่าวแสดงไว้ในรูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยอนุภาคของนิโอโซมที่เตรียมจาก TW61:CHOL วัดก่อนและหลังทำให้แห้ง พบว่าตำรับที่ไม่เติมน้ำตาล trehalose จะทำให้อนุภาคของนิโอโซมเพิ่มจาก 79 ± 2 nm เป็น 170 ± 8 nm ($p < 0.05$) ขณะที่การเติมน้ำตาลต่อไขมันที่อัตราส่วน 1:1 ทำให้อนุภาคของนิโอโซมเพิ่มขึ้นมาเล็กน้อยเป็น 108 ± 5 nm ($p < 0.05$) ผลดังกล่าวเป็นไปได้ว่าเกิดการเกาะกลุ่มกันและหลอมรวมกันของอนุภาคนิโอโซมที่ไม่ได้เติมสารเพิ่มความคงตัวหรือเติมเพียงเล็กน้อย การเพิ่มปริมาณน้ำตาล trehalose ต่อไขมันเท่ากับ 5:1 หรือสูงกว่าขึ้นไป สัดส่วนดังกล่าวเพียงพอในการทำให้นิโอโซมมีขนาดอนุภาคเท่าเดิมได้ ($p > 0.05$) กลไกป้องกันอนุภาคเกาะกลุ่มกันสามารถอธิบายได้จากอันตรกิริยาอ่อนๆ ระหว่างหมู่ CH- และ CH₂- ของน้ำตาล trehalose และโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวบริเวณผนังของนิโอโซมทำให้เกิดการรักษาโครงสร้างของนิโอโซมภายใต้การระเหยแห้งแบบสุญญากาศได้ (Chen *et al.*, 2010)

ผลของสารเพิ่มความคงตัวต่อความเข้มข้นของไขมันโดยรวม

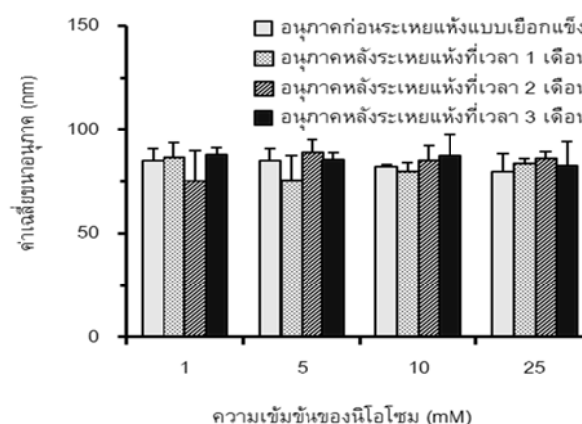
ผลของความเข้มข้นของไขมันโดยรวมต่อขนาดอนุภาคของนีโอโซมแสดงในรูปที่ 1b และ 3 อัตราส่วนของน้ำตาล trehalose ต่อไขมันกำหนดให้คงที่เท่ากับ 5:1 และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไขมันในตำรับนีโอโซมโดยรวมตั้งแต่ 1-25 mM พบว่าน้ำตาล trehalose ที่ใช้สามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคของนีโอโซมได้ทุกตำรับและอนุภาคนั้นมีความคงตัวได้ถึง 3 เดือน โดยอนุภาคที่วัดได้ ณ เดือนที่ 1, 2 และ 3 ไม่ต่างจากอนุภาคเริ่มต้น ($p > 0.05$)



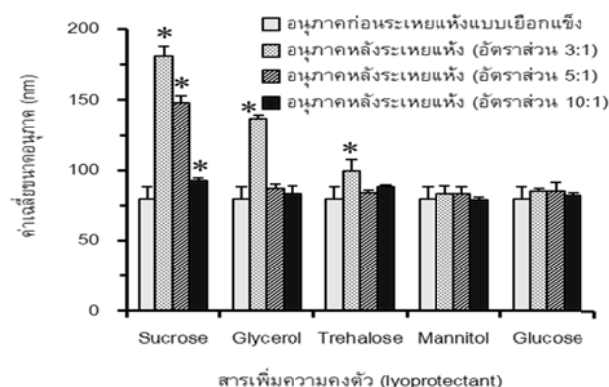
รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของตำรับนีโอโซมเปล่าก่อนและหลังการทำให้เยือกแข็งแบบเยือกแข็ง เมื่อ (a) คือ ผลของการใช้น้ำตาล trehalose เป็นสารเพิ่มความคงตัวระหว่างการทำให้เยือกแข็งที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน, (b) คือ ผลของการใช้นีโอโซมที่มีความเข้มข้นต่างกัน, และ (c) คือ ผลของการใช้สารเพิ่มความคงตัวระหว่างการทำให้เยือกแข็งต่างชนิดกันที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน



รูปที่ 2 ผลของการใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำตาล trehalose และไขมันที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อขนาดอนุภาคของนีโอโซมที่เตรียมจาก TW61:CHOL อัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 25 mM (* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคก่อนการเยือกแข็งแบบเยือกแข็ง)

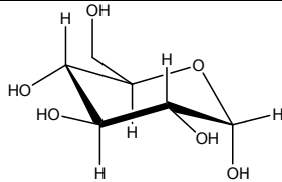
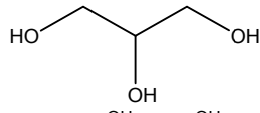
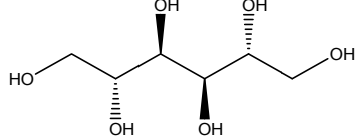
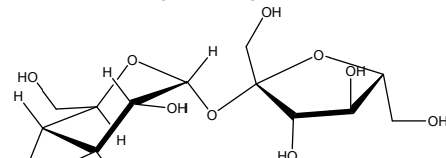
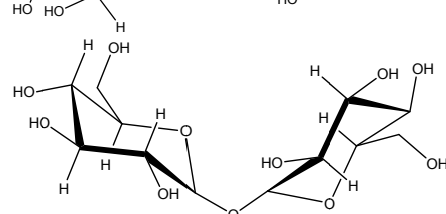


รูปที่ 3 ผลของความเข้มข้นของนีโอโซมต่อขนาดอนุภาคภายหลังการเยือกแข็งแบบเยือกแข็ง โดยกำหนดความเข้มข้นของน้ำตาล trehalose ต่อไขมันเท่ากับ 5:1



รูปที่ 4 ผลของการใช้สารเพิ่มความคงตัวระหว่างการทำให้เยือกแข็งต่างชนิดกันต่อขนาดอนุภาคของนีโอโซมที่เตรียมจาก TW61:CHOL อัตราส่วน 1:1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารเพิ่มความคงตัวระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

สารเพิ่มความคงตัว	โครงสร้างเคมี	Tg' (°C)	Tg (°C)
Glucose		-40	30
Glycerol		-30	65, 77
Mannitol		-40	30
Sucrose		-30	65
Trehalose		-28	107, 110, 120

Tg' คือ glass transition temperature of the mainly freeze-concentrated fraction

Tg คือ glass transition temperature of lyoprotectant

ผลของชนิดสารเพิ่มความคงตัว

การใช้สารเพิ่มความคงตัวเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ควรพิจารณาในการระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง ในการศึกษานี้ได้ทดสอบสารเพิ่มความคงตัว 5 ชนิด คือ trehalose, glucose, mannitol, sucrose และ glycerol เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมของชนิดสารเพิ่มความคงตัวเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มกันและหลอมรวมกันของอนุภาค คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารแต่ละชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยกำหนดให้สูตรตำรับนีโอโซมที่ศึกษาคือ TW61:CHOL อัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 25 mM ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 1c และ 4 ตำรับที่เติมน้ำตาล mannitol เป็นสารเพิ่มความคงตัวต่อไขมันเท่ากับ 3:1, 5:1 และ 10:1 หรือน้ำตาลกลูโคสต่อไขมันเท่ากับ 10:1 มีผลทำให้นีโอโซมผงแห้งมีลักษณะเป็นผงฟูสีขาวคล้ายหิมะ (รูปที่ 1c) ขณะที่การเติมน้ำตาล trehalose ต่อไขมันเท่ากับ 3:1, 5:1, 10:1 หรือน้ำตาลกลูโคสต่อไขมันเท่ากับ 3:1, 5:1 และน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 3:1, 5:1 และ 10:1 ทำให้นีโอโซมผงแห้งมีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ายเกลือ ซึ่งแตกต่างจากการใช้ glycerol เป็นสารเพิ่มความคงตัวจะได้ นีโอโซมลักษณะของเหลวหนืดและอนุภาค

กระจายได้ง่ายภายหลังการเติมน้ำกลั่นเพื่อทำให้นีโอโซมคืนรูป อย่างไรก็ตามความง่ายในการคืนรูปเดิมจะเกิดได้ยากเมื่อนำน้ำตาล glucose และ sucrose เป็นสารเพิ่มความคงตัว และคืนรูปได้ยากที่สุดเมื่อใช้ mannitol เพราะผงแห้งที่ได้มีลักษณะฟูและมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับตำรับอื่น โดยสรุปความง่ายในการคืนรูปของนีโอโซมเรียงลำดับจากง่ายไปหายากเป็นดังนี้ glycerol > trehalose > glucose = sucrose > mannitol

ในบรรดาสารที่ทดสอบสารที่เป็นของเหลวเพียง 1 ชนิดคือ glycerol แม้ว่าจะทำให้นีโอโซมคืนรูปได้ง่ายแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืด ส่วนสารที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ 2 ชนิด คือ trehalose และ sucrose ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานมาแล้วว่าช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับโครงสร้างแบบผนังสองชั้นของระบบนำส่งและช่วยป้องกันการรั่วของสารที่กักเก็บไว้ก่อนออกนอกอนุภาคเพราะมีค่า Tg ที่สูง (Chen *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาล trehalose ในรูปที่ไม่มียามีข้อดีที่เหนือกว่าการใช้น้ำตาล sucrose คือ น้ำตาล trehalose สามารถเกิดผลึกกับไอน้ำได้ 2 โมเลกุลขณะที่น้ำตาล sucrose จะไม่เกิดผลึกกับไอน้ำ ดังนั้น trehalose จึงสามารถช่วยปกป้อง



อนุภาคของนิโอโซมได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่นในระหว่างการเก็บรักษา การใช้น้ำตาล glucose เป็นสารเพิ่มความคงตัวให้แก่อนุภาคเป็นสารอีกชนิดที่นิยมใช้เพิ่มความคงตัวของอนุภาคนานาโมเมตรในระหว่างการระเหยแห้งแบบเยือกแข็งเช่นกัน (Li *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามน้ำตาลชนิดนี้มีค่า Tg ที่ต่ำจึงทำให้อาจเกิดปัญหาคับตัวเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานได้ (Chen *et al.*, 2010) ส่วนการใช้น้ำตาล mannitol แม้ว่าจะทำให้นิโอโซมผงแห้งคิณรูปได้ง่ายแต่จะผลิตได้ผลผลิตที่ต่ำและมีปริมาตรสูงกว่าตำรับอื่นจึงต้องใช้ น้ำกลั่นปริมาณมากเพื่อละลายให้กลับมามีอยู่ในรูปเดิม ทำให้การทำให้นิโอโซมเข้มข้นขึ้นเป็นไปได้ยากกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น

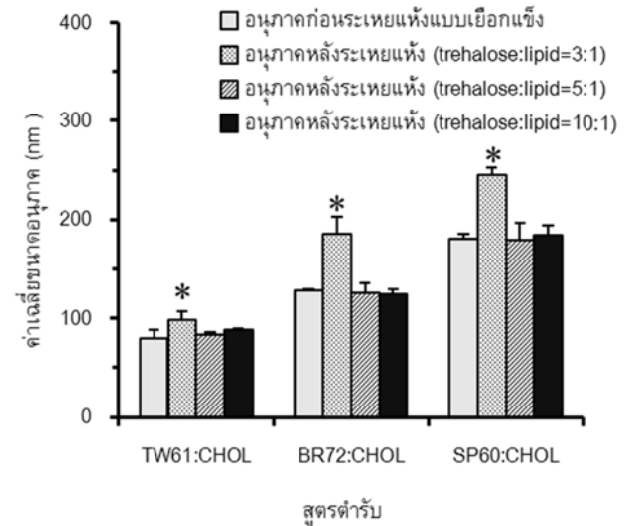
ผลของสารเพิ่มความคงตัวต่อนิโอโซมที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน

จากผลการศึกษาข้างต้นได้แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาล trehalose เป็นสารที่ช่วยเพิ่มเนื้อสารให้แก่นิโอโซมผงแห้งได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารเพิ่มความคงตัวชนิดอื่น ในการศึกษาได้เลือกน้ำตาล trehalose เพื่อศึกษาผลต่อสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่นที่ใช้เตรียมนิโอโซม โดยเตรียมนิโอโซมจากสารลดแรงตึงผิว 3 ชนิด คือ BR72:CHOL, SP60:CHOL และ TW 61:CHOL อัตราส่วนต่อคอเลสเตอรอลเท่ากับ 1:1 พบว่าขนาดอนุภาคของนิโอโซมเริ่มต้นเท่ากับ 80 ± 9 nm, 128 ± 2 nm, และ 128 ± 6 nm ตามลำดับ โดยตำรับที่เตรียมโดยใช้ น้ำตาล trehalose ต่อไขมันอย่างน้อยเท่ากับ 5:1 ไม่ทำให้ขนาดอนุภาคก่อนและหลังการทดสอบแตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 5

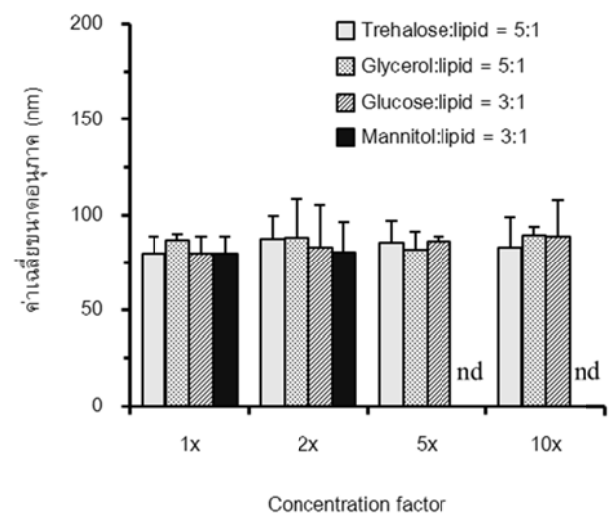
ผลของสารเพิ่มความคงตัวต่อการเพิ่มความเข้มข้นของนิโอโซม

ข้อจำกัดของการบรรจุนิโอโซมที่กักเก็บสารออกฤทธิ์ลงในตำรับเครื่องสำอางพื้นคือ มีปริมาณอนุภาคของระบบนำส่งที่กระจายในวัตถุดิบในปริมาณต่ำซึ่งเป็นปัญหาเดียวกับที่ เกิดในระบบนาโนพาร์ทิเคิลชนิดอื่น (Tiyaboonchai *et al.*, 2007; Vauthier *et al.*, 2008) ในขณะที่เกี่ยวกับการเตรียมนิโอโซมที่มีความเข้มข้นสูงมากเกินไปจะมีผลทำให้อนุภาคอยู่ใกล้กันและเกาะกลุ่มกันได้ง่าย ดังนั้นการลดปริมาณน้ำที่ใช้ในการผสมเพื่อให้ได้นิโอโซมคิณรูปได้จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้ได้ระบบนำส่งที่เข้มข้นขึ้นและสามารถบรรจุลงในตำรับเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการได้ง่าย ในการศึกษาได้ทดลองลดปริมาณน้ำลงในขั้นตอนการคิณรูปผงนิโอโซมเท่ากับ 1X, 2X, 5X และ 10X ได้ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 6 ความเข้มข้นของนิโอ

โซมสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้มากที่สุดเท่ากับ 10X เมื่อใช้น้ำตาล trehalose, glycerol และ glucose เป็นสารเพิ่มความคงตัว ยกเว้นการใช้น้ำตาล mannitol จะได้ความเข้มข้นของนิโอโซมมากที่สุดเท่ากับ 2X ของปริมาณน้ำเริ่มต้น



รูปที่ 5 ผลของสูตรตำรับนิโอโซมที่แตกต่างกันต่อขนาดอนุภาคของนิโอโซมที่ได้ก่อนและหลังการระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง ความเข้มข้นของน้ำตาล trehalose ต่อไขมันเท่ากับ 5:1



รูปที่ 6 ผลของการใช้สารเพิ่มความคงตัวของนิโอโซมระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งแตกต่างชนิดกันต่อค่าความเข้มข้นของนิโอโซมที่เพิ่มได้ เมื่อนิโอโซมที่เตรียมจาก TW61:CHOL อัตราส่วน 1:1 (ND = not determined เพราะไม่สามารถละลายนิโอโซมผงแห้งได้)

การเตรียมนิโอโซมกักเก็บสารสกัดหัวเหลืองคีนรูปผงแห้ง

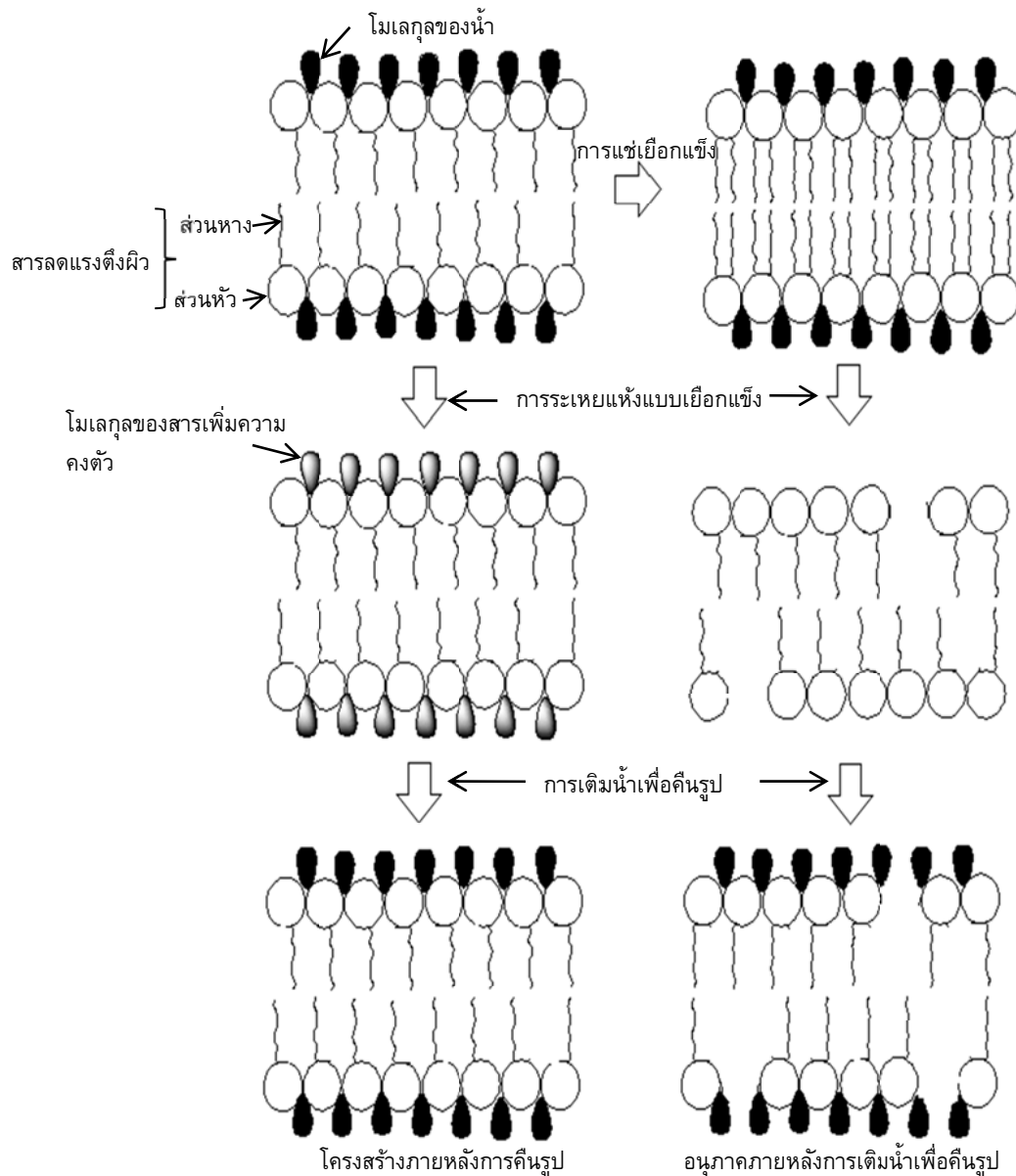
การศึกษานี้ทดลองโดยกักเก็บสารสกัดหัวเหลืองคีนรูปผงแห้งเข้มข้น 0.5 %w/v โดยเตรียมในตำรับนิโอโซมที่แตกต่างกัน 3 ตำรับ คือ BR72:CHOL, SP60:CHOL และ TW61:CHOL ตำรับที่ได้มีลักษณะสีขาวโปร่งแสง เมื่อเติมน้ำตาล mannitol ลงไปในตำรับอัตราส่วนของน้ำตาลต่อไขมันเท่ากับ 3:1 ความเข้มข้นนี้ทำให้นิโอโซมคีนรูปได้ง่ายโดยมีขนาดอนุภาคภายหลังคีนรูปเท่ากับ 121 ± 5 nm, 183 ± 6 nm และ 80 ± 5 nm และมีค่าดัชนีการกระจายอนุภาคต่ำกว่า 0.3 สำหรับตำรับ BR72:CHOL, SP60:CHOL และ TW61:CHOL ตามลำดับ และไม่ได้แตกต่างจากอนุภาคเริ่มต้น ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2) เมื่อเก็บตำรับผงแห้งที่เตรียมได้ไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 °C ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 70% เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าอนุภาคไม่แตกต่างจากอนุภาคเริ่มต้น ($p > 0.05$) ตำรับที่ได้มีความเป็นกรดอ่อนๆ โดยมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ประมาณ 4 และมีความคงตัวของไอโซฟลาโวนเครื่องหมาย (marker) คือ genistin, daidzin, genistein และ dadizein คงเหลือมากกว่า 98% แสดงให้เห็นว่าตำรับนิโอโซมผงแห้งที่เติมสารเพิ่มความคง

ตัวช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคและทำให้ไอโซฟลาโวนมีความคงตัวทางเคมีได้

แม้ว่ากลไกที่สารเพิ่มความคงตัวในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะยังไม่ทราบแน่ชัด แต่กลไกที่มีความเป็นไปได้ที่สารช่วยเพิ่มความคงตัวระหว่างการระเหยแห้งแบบเยือกแข็งทำให้นิโอโซมคงตัวสามารถอธิบายได้จากทฤษฎีการแทนที่น้ำซึ่งเสนอขึ้นได้ Crowe และคณะ (1987) ดังนั้น อันตรกิริยาระหว่างน้ำตาลและสารลดแรงตึงผิวในสภาวะผงแห้งจะช่วยลดค่า T_m (gel to liquid crystalline phase transition temperature) ของไขมันที่ผนังระบบนำส่งได้ โดยหมูนํ้าตาลจะช่วยรักษาพื้นที่ว่างบริเวณส่วนหัวที่มีขั้วและช่วยลดอันตรกิริยาของแรง van der Waals ระหว่างสายโซ่บริเวณส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวลงได้ ขณะที่ตำรับที่ไม่ได้เติมสารเพิ่มความคงตัวเมื่อถึงออกออกจะทำให้อนุภาคถูกอัดกันไว้อย่างแน่น และเมื่อเติมนํ้าลงไปจึงเกิดการหลุดของของสารที่ประกอบกันเป็นอนุภาค ดังแสดงในรูปที่ 7 จึงทำให้อนุภาคนิโอโซมใหญ่ขึ้นและคีนรูปได้ยาก

ตารางที่ 2 ลักษณะของนิโอโซมผงแห้งที่เตรียมจาก 25 mM TW61:CHOL อัตราส่วน 1:1

ตำรับ	ก่อนการระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง			หลังการระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง		
	ขนาดอนุภาค (nm)	ประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	การกระจายของอนุภาค	ขนาดอนุภาค (nm)	ประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (mV)	การกระจายของอนุภาค
นิโอโซมเปล่า						
BR72:CHOL	128 ± 9	-13 ± 3	0.21 ± 0.02	127 ± 26	-15 ± 4	0.17 ± 0.01
SP60:CHOL	180 ± 6	-38 ± 2	0.11 ± 0.03	179 ± 7	-39 ± 5	0.15 ± 0.07
TW61:CHOL	80 ± 8	-23 ± 2	0.11 ± 0.01	83 ± 3	-23 ± 2	0.07 ± 0.03
นิโอโซมกักเก็บ 0.5% (w/v) สารสกัดหัวเหลือง						
BR72:CHOL	117 ± 9	-51 ± 4	0.21 ± 0.01	121 ± 5	-49 ± 7	0.22 ± 0.03
SP60:CHOL	181 ± 4	-52 ± 3	0.22 ± 0.01	183 ± 6	-49 ± 3	0.23 ± 0.03
TW61:CHOL	79 ± 4	-34 ± 2	0.12 ± 0.11	80 ± 5	-36 ± 3	0.18 ± 0.04



รูปที่ 7 แบบจำลองการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของนิโอโซมระหว่างตำรับที่เติมสารเพิ่มความคงตัวในขั้นตอนการระเหยแบบเยือกแข็งเปรียบเทียบกับตำรับที่ไม่มีสารเพิ่มความคงตัว

สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ทำการทดลองเพื่อเลือกใช้ความเข้มข้นของสารเพิ่มความคงตัวที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนิโอโซมผงแห้งคั่นรูป เพราะความเข้มข้นที่เจือจางเกินไปของนิโอโซมที่กักเก็บสารออกฤทธิ์เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ไม่สามารถเติมระบบนำส่งดังกล่าวลงไปในตำรับเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการใช้พบว่าอัตราส่วนของน้ำตาล trehalose ต่อไขมันเท่ากับ 5:1 สามารถทำให้นิโอโซมสามารถคืนรูปและมีขนาดอนุภาคไม่แตกต่างจากอนุภาคเริ่มต้นได้ สัดส่วนดังกล่าวครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของนิโอโซมตั้งแต่ 1-25 mM การใช้ glycerol เป็นสารเพิ่มความคงตัวให้ผลเช่นเดียวกันกับการใช้ trehalose แต่

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นของเหลวข้นหนืด ดังนั้นสารเพิ่มความคงตัวที่เหมาะสมคือ trehalose, mannitol และ glycerol ที่อัตราส่วนสารเพิ่มความคงตัวต่อไขมันเท่ากับ 5:1, 3:1 และ 5:1 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสม โดยสามารถเพิ่มความเข้มข้นของนิโอโซมได้มากที่สุด 10X ของปริมาตรเริ่มต้นโดยไม่มีผลทำให้อนุภาคเกาะกลุ่มกัน ยกเว้นการใช้ mannitol สามารถเพิ่มความเข้มข้นได้มากที่สุดเท่ากับ 2X สัดส่วนดังกล่าวสามารถใช้กับระบบนำส่งนิโอโซมที่กักเก็บสารสกัดหัวเหลืองความเข้มข้น 0.5% โดยมีความคงตัวได้ถึง 3 เดือน ส่วนกลูโคสอาจเสี่ยงการใช้เนื่องจากเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่อาจเพิ่มปฏิกิริยาไกลเคชันกับโปรตีนที่ผิวหนังทำให้เร่งการแก่ให้แก่ผิวได้ ดังนั้น การ



เผยแพร่งานวิจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารเพิ่มความคงตัวจึงเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มความเข้มข้นและทำให้สารออกฤทธิ์ที่กักเก็บในระบบนำส่งมีความคงตัวได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และทุนส่งเสริมและพัฒนานักศึกษามหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน

References

- Chen C, Han D, Cai C, *et al.* An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J Controlled Rel* 2010; 142(3): 299-311.
- Crowe JH, Spargo BJ, Crowe LM. Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1537-1540.
- Guan T, Miao Y, Xu L., *et al.* Injectable nimodipine-loaded nanoliposomes: preparation, lyophilization and characterization. *Int J Pharm* 2011; 410(1-2): 180-187.
- Kim KR, Ahn KY, Park JS, *et al.* Lyophilization and enhanced stability of fluorescent protein nanoparticles. *Biopharm Biophys Res Commun* 2011; 408(2): 225-229.
- Li F, Wang T, He HB, *et al.* The properties of bufadienolides-loaded nano-emulsion and submicro-emulsion during lyophilization. *Int J Pharm* 2008; 349(1-2): 291-299.
- Tiyaboonchai W, Tungpradit W, Plianbangchang P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 2007; 337(1-2): 299-306.
- Vauthier C, Cabane B, Labarre D. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69(2): 466-475.

Wang T, Wang N, Hao A, *et al.* Lyophilization of water-in-oil emulsions to prepare phospholipid-based anhydrous reverse micelles for oral peptide delivery. *Eur J Pharm Sci* 2010; 39(5): 373-379.

Yingngam B, Supaka N, Rungseewijitprapa W. Efficacy for delaying the loss of skin elasticity of fermented soy extract encapsulated nano-, micro-niosomes and conventional gel. Proceeding of the 3rd North Eastern Pharmacy Conference, 2011 Feb 13-14; Ubon Ratchathani, Thailand.

Yingngam B, Supaka N, Rungseewijitprapa W. Influence of vesicle sizes on skin permeation of dual flavonoids loaded niosomes. Proceeding of the Pure and Apply Chemistry Organic Conference, 2010 Jan 21-23; Ubon Ratchathani, Thailand.

Zillies JC, Zworek K, Hoffman F, *et al.* Formulation development of freeze-dried oligonucleotide-loaded gelatin nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70(2): 514-521.