

ระบบนำส่งนีโอโซมในทางเภสัชกรรม

อรนุช ธนเขตไพศาล^{1*}

บทคัดย่อ

ระบบนำส่งนีโอโซมในทางเภสัชกรรม

อรนุช ธนเขตไพศาล^{1*}

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2555; 8(2) : 12-26

Received : 14 February 2012

Accepted : 30 June 2012

นีโอโซมเป็นถุงอนุภาคมีผนังเป็นชั้น ที่เกิดจากการพองตัวของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับไขมัน เช่น คอเลสเตอรอล เป็นต้น แรกเริ่มมีรายงานการใช้นีโอโซมในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ปัจจุบันระบบอนุภาคชนิดนี้สามารถนำมาใช้เป็นระบบนำส่งสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบหรือไม่ชอบไขมันได้เช่นเดียวกับลิโปโซม นีโอโซมมีข้อดีที่เหนือกว่าลิโปโซมคือมีความคงตัวทางเคมีดีกว่า เนื่องจากลิโปโซมมีฟอสโฟลิพิดที่สามารถสลายตัวได้ง่าย นีโอโซมจึงเป็นตัวเลือกที่ดีของระบบนำส่งยา ที่มีความเป็นพิษต่ำ สามารถปรับดัชนีในการรักษาให้จำกัดและควบคุมการออกฤทธิ์เฉพาะเซลล์เป้าหมายได้ บทความวิจารณ์มีเนื้อหาเกี่ยวกับภาพรวมของปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดนีโอโซม เทคนิคการเตรียมนีโอโซม การประเมินลักษณะของนีโอโซมและการประยุกต์ใช้นีโอโซมในทางเภสัชกรรม

คำสำคัญ: นีโอโซม, อนุภาคของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ, คอเลสเตอรอล

Abstract

Niosome Delivery Systems in Pharmaceutical Applications

Oranuch Thanaketpaisarn^{1*}

IJPS, 2012; 8(2) : 12-26

Niosomes are lamellar non-ionic surfactant vesicles obtained from hydration of synthetic nonionic surfactants, with or without incorporation of cholesterol. Niosomes were first reported in the cosmetic industries. Recently, these vesicular systems can be used as carriers of hydrophilic and lipophilic drugs as liposomes. Niosomes exhibit more chemically stable than liposomes, in which the phospholipid degradation generally occurs. Niosomes are promising vehicle and serve as an alternative drug delivery system. They are less toxic and improve the therapeutic index of drug by restricting its action to target cells. This review article presents an overview of theoretical concept of

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

* ติดต่อผู้พิมพ์: ออรนุช ธนเขตไพศาล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190
Tel: 045-353630, Fax: 045-288384, E-mail: toranuch@yahoo.com, oranucht9@gmail.com

factors affecting niosome formation, techniques of niosome preparation, evaluation of niosome characterization and pharmaceutical applications of niosome.

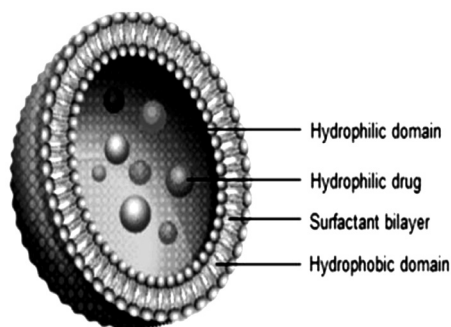
Keywords: Niosomes, Non-ionic surfactant vesicles, Cholesterol

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

* Corresponding author: Oranuch Thanaketsaisarn, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani 34190
Tel: 045-353630, Fax: 045-288384, E-mail: toranuch@yahoo.com, oranucht9@gmail.com

บทนำ

นโนโซมมีลักษณะเป็นถุงทรงกลมขนาดเล็ก คล้ายกระเปาะที่เก็บกักสารต่างๆ ไว้ภายใน อนุภาคเหล่านี้มีลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นผนังสองชั้น ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวที่มีคุณสมบัติขั้ว และไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ทำให้เกิดการจับตัวโดยนำส่วนที่มีคุณสมบัติเหมือนกันเข้าหากัน และมีการซ้อนกันเป็นผนังอาจเรียงตัวเป็นชั้นเดียวหรืออาจเกิดได้มากกว่าหนึ่งชั้น นโนโซมส่วนใหญ่มีขนาดอนุภาคในช่วง 30-120 nm (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของนโนโซม (Buckton, 1995)

ข้อแตกต่างของนโนโซมและลิโปโซม

นโนโซมเป็นระบบที่ใช้อย่างกว้างขวางเพื่อนำส่งยาโดยองค์ประกอบเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุซึ่งมีความเป็นพิษต่ำ แสดงพฤติกรรมคล้ายลิโปโซม อยู่ในกระแสเลือดได้นาน สามารถเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวไปยังอวัยวะต่างๆ และเพิ่มความคงตัวต่อระบบเมแทบอลิซึมได้ ในขณะที่ลิโปโซมเป็นระบบที่ใช้อย่างกว้างขวางเพื่อนำ

ส่งยาโดยองค์ประกอบเป็นฟอสโฟลิพิด ซึ่งสลายตัวง่าย ต้องมีการเก็บรักษาอย่างเหมาะสมและใช้ฟอสโฟลิพิดชนิดที่มีความบริสุทธิ์สูง ฟอสโฟลิพิดที่นำมาเตรียมอาจไม่มีประจุหรือมีประจุก็ได้ นโนโซมมีข้อดีกว่าตำรับลิโปโซมที่มีความคงตัวมากกว่าเนื่องจากฟอสโฟลิพิดไวต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ และฟอสโฟลิพิดยังมีราคาที่สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุอีกด้วย

ข้อดีของนโนโซม (Niosomes)

1. นโนโซมเป็นอนุภาคที่กระจายตัวในวัฏภาคน้ำ จึงได้รับการยอมรับจากผู้ป่วยมากกว่าระบบที่มีรูปแบบยาเตรียมเป็นน้ำมัน (oil base system)
2. โครงสร้างของนโนโซมมีส่วนที่ชอบน้ำและชอบน้ำมัน ดังนั้น จึงสามารถใช้กับตัวยาที่มีคุณสมบัติการละลายแตกต่างกันได้หลายชนิด
3. ลักษณะของนโนโซมที่เป็นถุงทรงกลมซึ่งกักเก็บตัวยาไว้ภายใน สามารถควบคุมการปลดปล่อยและเพิ่มความคงตัวของยาได้ทั้งนี้ความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) และคุณสมบัติออสโมติกของนโนโซมมีความสำคัญต่อการควบคุมการปลดปล่อยยา (Arunothayanun *et al.*, 1999)
4. นโนโซมเป็นระบบนำส่งที่สามารถควบคุมคุณสมบัติต่างๆ เช่น ขนาด จำนวนชั้น (lamellarity) ประจุที่ผิวอนุภาค ปริมาตรของอนุภาค และความเข้มข้นของยาได้ตามต้องการ
5. นโนโซมสามารถเพิ่มชีวประสิทธิผลของยา
6. นโนโซมสามารถเพิ่มการซึมผ่านยาทางผิวหนังได้

7. สารลดแรงตึงผิวที่เป็นองค์ประกอบของนิโอโซมสามารถละลายตัวได้ในร่างกาย เข้ากันได้กับร่างกาย และไม่เป็นสารก่อให้เกิดภูมิคุ้มกัน (Handjani-vila *et al.*, 1979)

8. เป็นระบบที่สามารถบริหารยาได้หลายวิธี เช่น ทางรับประทาน ยาฉีด และ ยาที่ใช้สำหรับผิวหนัง เป็นต้น และยังใช้เป็นตำรับสำหรับดวงตาได้ โดยพบว่านิโอโซมไม่ระคายเคืองต่อดวงตาและเพิ่มการดูดซึมยาผ่านดวงตาได้

9. เป็นระบบที่ทำให้ยาอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น

10. นิโอโซมสามารถนำส่งยาสู่เซลล์หรืออวัยวะเป้าหมายได้

องค์ประกอบของนิโอโซม

องค์ประกอบหลักของนิโอโซมมีดังนี้

1. สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (*non-ionic surfactant*)

นิโอโซมเป็นระบบที่เกิดจากการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่นิยมใช้ ได้แก่ Glucosyl dialkyl ethers, Crown ethers, Ester linked surfactant, Polyoxyethylene alkyl ethers (เช่น Tween®) และ Sorbitan esters (เช่น Span®) เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้สามารถจัดเรียงตัวรวมกันได้เอง จนมีลักษณะทรงกลม จัดเรียงตัวเป็นชั้นเดียวหรือหลายชั้นก็ได้ หรือจัดเรียงตัวโดยมีลักษณะรูปทรงหลายเหลี่ยมที่เรียกว่า "Polyhedral structures" หรือจัดเรียงตัวกลับที่เรียกว่า "Inverse structure" เมื่อมีการจัดเรียงตัวในของเหลวชนิดไม่มีขั้ว

2. สารเพิ่มความแข็งแรงของผนังนิโอโซม

ที่ผิวอนุภาคหรือผนังอนุภาคจะมีการเสริมความแข็งแรงโดยใช้คอเลสเตอรอล และสารประเภท "Poly(oxyethylene) cholesteryl ether" ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า "Solulan C24®" เป็นต้น มีรายงานพบว่านิโอโซมที่มีองค์ประกอบของ Solulan C24® ซึ่งเป็นสารที่มีส่วนที่ขบให้น้ำขนาดใหญ่ จะสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นานและเพิ่มการสะสมของยาหรือนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น (Uchegbuet *et al.*, 1995) คอเลสเตอรอล มีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสถานะของผนังอนุภาค เนื่องจากหากอุณหภูมิสูง ผนัง

อนุภาคนิโอโซมจะอยู่ในลักษณะผลึกเหลว (liquid crystal) มากกว่าสถานะเจล ดังนั้นการใช้สารในกลุ่มคอเลสเตอรอล ทำให้ผนังอนุภาคยังคงอยู่ในสถานะเจลที่มีการเลื่อนไหลได้ (Cable, 1989)

3. สารเพิ่มความคงตัว

องค์ประกอบที่สำคัญของนิโอโซมจะประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุและสารเพิ่มความแข็งแรงในผนังนิโอโซมเป็นหลัก อย่างไรก็ตามยังอาจมีสารที่ทำให้เกิดประจุของอนุภาคได้ เพื่อให้ผิวอนุภาคเกิดมีแรงผลักระหว่างประจุไฟฟ้าเพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับอนุภาค (electrostatic stabilization) เช่น dicetyl phosphate และ phosphotidic acid ที่มีประจุลบ และ stearylamine และ stearyl pyridinium chloride ที่มีประจุเป็นบวก เป็นต้น โดยส่วนใหญ่สารเพิ่มประจุจะใช้ในความเข้มข้น 2.5-5%(w/w) หากใช้ในปริมาณมากเกินไปอาจจะไปยับยั้งการเกิดนิโอโซมได้ นอกจากนี้ยังมีสารเพิ่มความคงตัวที่เป็นสารพอลิเมอร์ซึ่งเคลือบที่ผิวเพื่อทำให้ผนังของอนุภาคนิโอโซมไม่มารวมตัวกัน (steric stabilization) โดยพบว่าพอลิเมอร์ชนิดที่มีหมู่ poly(oxyethylene) สามารถป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาคได้ ทำให้ระบบนี้มีความคงตัวมากขึ้น (Beugin-Deroo *et al.*, 1998)

การเตรียมนิโอโซม

วิธีการเตรียมนิโอโซมมีหลายวิธี โดยทั่วไปแล้วกระบวนการเตรียมนิโอโซมมักใช้พลังงานมาเกี่ยวข้อง เช่น ความร้อนและแรงเฉย เป็นต้น วิธีการเตรียมมีผลต่อลักษณะของนิโอโซม โดยนิโอโซมอาจมีลักษณะเป็นถุงอนุภาคชั้นเดียวหรือหลายชั้นก็ได้ ซึ่งนิโอโซมอาจมีขนาดเล็กได้ถึงระดับนาโนเมตร นอกจากวิธีการเตรียมมีผลต่อจำนวนชั้นของอนุภาค แล้วยังมีผลต่อขนาดและการกระจายตัวของขนาดอนุภาค ประสิทธิภาพในการกักเก็บยา และความสามารถในการซึมผ่านเมมเบรนของอนุภาคด้วย วิธีการเตรียมนิโอโซมมีดังนี้

1. การเตรียมนิโอโซมโดยการใช้อีเทอร์ (Ether injection method)

เตรียมโดยการนำสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุมาละลายในอีเทอร์ แล้วฉีดสารละลายนี้ด้วยเข็มเบอร์ 14 ลงในน้ำหรือบัฟเฟอร์ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60°C จนสารละลายทั้งไว้เพื่อระเหยอีเทอร์ ขณะที่อีเทอร์ระเหยออกไปจะเกิด

การเรียงตัวกันของสารลดแรงตึงผิวเกิดเป็นถุงอนุภาคชั้นเดียว ขนาดอนุภาค 50-1000 nm ข้อเสียของการเตรียมวิธีนี้คือ กำจัดอีเธอร์ออกจากระบบได้ยาก ความสามารถในการกักเก็บยาเมื่อเตรียมโดยวิธีนี้ประมาณ 67.7% (Bhaskaran and Lakshmi, 2009)

2. การเตรียมนโนโซมโดยทำให้เกิดฟิล์มและเขย่าด้วยมือ (Hand-shaking method)

สารลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอลถูกละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (เช่น อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม หรือ เมธานอล เป็นต้น) ในขวดก้นกลมแล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จนกระทั่งเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแห้งแล้วเติมบัฟเฟอร์หรือน้ำ เพื่อให้เกิดการพองตัวที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะ (Phase transition temperature: T_c) ของสารลดแรงตึงผิวและคอเลสเตอรอลที่ใช้ แล้วเขย่าของเหลวในระหว่างที่แผ่นฟิล์มพองตัวเข้ากับบัฟเฟอร์ จะเกิดการพองตัวเป็นอนุภาคนโนโซมที่มีการจัดเรียงตัวหลายชั้น การเติมตัวยาในขั้นตอนใดจะขึ้นกับคุณสมบัติการละลายของตัวยา หากตัวยาละลายน้ำได้ตัวยาก็จะถูกผสมในน้ำหรือบัฟเฟอร์ และจะถูกกักเก็บไว้ในตัวทำละลายอินทรีย์และจะถูกกักเก็บในชั้นที่ไม่ชอบน้ำของนโนโซม ตัวอย่างตำรับที่เตรียมโดยวิธีนี้เช่น องค์ประกอบ 3 ชนิด ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว (เช่น Span[®] 40, 60 หรือ 80 เป็นต้น) คอเลสเตอรอล และ dicetyl phosphate ถูกนำมาผสมในอัตราส่วน 47.5: 47.5: 5 เพื่อนำส่งยาเมโทเทรกเซต (methotrexate) (Chandraprakash *et al.*, 1993) เป็นต้นความสามารถในการกักเก็บยาเมื่อเตรียมโดยวิธีนี้ประมาณ 78% (Bhaskaran and Lakshmi, 2009)

3. การเตรียมนโนโซมโดยการใช้คลื่นเสียง (Sonication method)

วิธีนี้เตรียมโดยการนำสารละลายของยามาเติมลงในของผสมสารลดแรงตึงผิวกับคอเลสเตอรอลในขวดแก้วขนาด 10 mL แล้วนำหัวปล่อยคลื่นเสียงชนิดไทเทเนียม (probe sonication) มาลดขนาดอนุภาคในสภาวะอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลานาน 3 นาที อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กเรียงตัวเพียงชั้นเดียว มีขนาดไม่น้อยกว่า 100 nm

4. การเตรียมนโนโซมโดยการใช้เครื่องไมโครฟลูอิดไดเซออร์ (Microfluidizer)

การเตรียมนโนโซมวิธีนี้เตรียมโดยการนำสารละลายของยามาเติมลงในของผสมสารลดแรงตึงผิวกับคอเลสเตอรอลแล้วนำมาผ่านเครื่องไมโครฟลูอิดไดเซออร์ ซึ่งใช้แรงดันของเหลวผ่านช่องที่มีขนาดเล็กด้วยความเร็วสูง (100 mL/min) ทำให้อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กและการกระจายขนาดอนุภาคแคบหากใช้เวลาในการผ่านเครื่องไมโครฟลูอิดไดเซออร์นานขึ้นจะส่งผลทำให้ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคลดลง การเตรียมวิธีนี้จะให้ขนาดอนุภาคใกล้เคียงกันในแต่ละครั้งที่ทำการผลิต (Khandare *et al.*, 1994)

5. การเตรียมนโนโซมโดยการใช้แรงดันผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาดเล็ก (Multiple membrane extrusion method)

สารลดแรงตึงผิว คอเลสเตอรอล และ dicetyl phosphate ถูกละลายในคลอโรฟอร์มแล้วนำมาระเหยให้เกิดแผ่นฟิล์ม เติมน้ำหรือบัฟเฟอร์เพื่อทำให้แผ่นฟิล์มเกิดการพองตัว นำของผสมมาลดขนาดอนุภาคโดยการใช้แรงดันผ่านแผ่นกรองชนิดโพลีคาร์บอเนตที่มีขนาดรูพรุน 100-200 nm จำนวน 8 รอบ ซึ่งเป็นวิธีที่ดีสำหรับการควบคุมขนาดอนุภาคโดยเฉพาะกับสารที่ละลายตัวเมื่อถูกความร้อน (Khandare *et al.*, 1994)

6. การเตรียมนโนโซมโดยวิธีการกลั้วภาควิภาค (Reverse Phase Evaporation Technique: REV)

วิธีนี้เตรียมโดยการละลายสารลดแรงตึงผิวกับคอเลสเตอรอลในอัตราส่วน 1: 1 ในคลอโรฟอร์ม เติมสารละลายยาลงไปจะเกิดของเหลวขาวขุ่น ควบคุมสภาวะของผสมให้มีอุณหภูมิ 4-5 °C แล้วใช้คลื่นเสียง จนได้เจลที่มีลักษณะใสหลังจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปพร้อมกับเขย่า นำของผสมมาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C และลดความดันด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ยาเตรียมที่ได้จะมีลักษณะเหนียว นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที จนเกิดเป็นนโนโซมที่มีการจัดเรียงชั้นเดียวขนาดอนุภาค 500 nm ตัวอย่างการเตรียมวิธีนี้ เช่น การเตรียมนโนโซมที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุเป็น Tween 85[®] และคอเลสเตอรอล สำหรับนำส่งยาไดโคลฟีแนค โซเดียม (Diclofenac sodium) (Naresh *et al.*, 1994)

7. การเตรียมนีโอโซมโดยกักเก็บยาจากความแตกต่างของสภาวะความเป็นกรดต่าง (Khandare *et al.*, 1994)

การเตรียมนีโอโซมด้วยวิธีนี้เป็นกรกักเก็บยาแบบ “remote loading” โดยอาศัยความแตกต่างของสภาวะกรดต่างเตรียมโดยการละลายสารลดแรงตึงผิวกับคอเลสเตอรอลในคลอโรฟอร์มแล้วระเหยจนเกิดเป็นแผ่นฟิล์มในขวดก้นกลมเช่นกัน ต่างกันที่ ทำให้แผ่นฟิล์มพองตัวโดยใช้สารละลายกรดซิตริก (300 mM citric acid, pH 4.0) พร้อมกับเขย่าขวดก้นกลมจนเกิดเป็นอนุภาคหลายชั้นแล้วนำมาแช่แข็งและอุ่นจนเหลว (frozen-thawed) จำนวน 3 รอบแล้วใช้คลื่นเสียงลดขนาดอนุภาค จนได้สารแขวนลอยของนีโอโซม เติมสารละลายของตัวยาในความเข้มข้น 10 mg/mL นำไปเขย่า ค่า pH ของยาเตรียมจะถูกเปลี่ยนจาก pH 4 เป็น 7-7.2 ด้วยการเติม 1 M disodium phosphate แล้วนำอนุภาคที่มีอุณหภูมิ 60 °C เพื่อให้ยาเคลื่อนที่เข้าไปยังนีโอโซมการเปลี่ยนแปลงสภาวะความเป็นกรดต่างจะทำให้เกิดการกักเก็บยาไว้ภายในอนุภาคได้ ความสามารถในการกักเก็บยาเมื่อเตรียมโดยวิธีนี้ประมาณ 87.5% (Bhaskaran and Lakshmi, 2009)

8. การเตรียมนีโอโซมโดย “The Bubble Method” (Chauhan and Luorence, 1989)

เป็นวิธีเตรียมนีโอโซมแบบใหม่ที่สามารถเตรียมได้โดยใช้เพียงขั้นตอนเดียวและไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ระบบจะเป็นขวดก้นกลมที่มีข้อต่อทั้งหมด 3 ส่วน ข้อต่อนี้จะทำให้เกิดการควบแน่นของไอน้ำให้กลับเข้ามาในระบบและมีข้อต่อหนึ่งที่มีช่องทางสำหรับให้ก๊าซไนโตรเจนเข้ามาแทนที่ก๊าซออกซิเจนในระบบ วิธีนี้เตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมดในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ที่อยู่ในขวดก้นกลมภายใต้อุณหภูมิ 70 °C หลังจากนั้นปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมความแรงสูงทันทีเป็นเวลานาน 15 วินาทีของผสมจะมีการเกิดเป็นนีโอโซมเนื่องจากใช้อุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงและควบคุมขนาดอนุภาคให้มีขนาดเล็ก

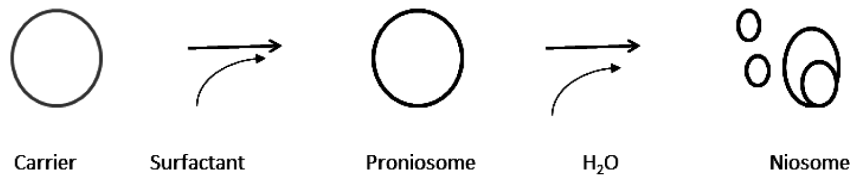
9. การเตรียมนีโอโซมจากโพรนีโอโซม (proniosome)

วิธีนี้เป็นกรเตรียมนีโอโซมโดยการเคลือบผงของสารที่ละลายน้ำได้ เช่น ซอร์บิทอล ซูโครสเตียเรท กลูโคส โมโนไฮเดรต แลคโตสโมโนไฮเดรต ผงสเปรย์แลคโตสแห้ง และมอลโตเดกซ์ทริน เป็นต้น ด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิด

ไม่มีประจุ สารที่ละลายน้ำนี้เปรียบเสมือนเป็นตัวกลางที่ช่วยกระจายตัวของสารลดแรงตึงผิวเมื่อมีน้ำเติมเข้ามาในระบบ (รูปที่ 2) ทั้งนี้ น้ำหรือบัฟเฟอร์ที่เติมลงไปจะต้องมีอุณหภูมิมากกว่าค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะ (Tc) ของสารลดแรงตึงผิว และในระหว่างการเติมบัฟเฟอร์ให้เขย่าเพื่อให้เกิดการกระจายตัว ดังนั้นโพรนีโอโซมจึงมีลักษณะเป็นผงที่พร้อมจะเกิดนีโอโซมเมื่อมีการเติมสารละลายบัฟเฟอร์นั่นเอง ข้อดีของการเตรียมในรูปแบบโพรนีโอโซมคือ เป็นตำรับผงแห้ง มีความคงตัวดีทั้งในระหว่างการทำปราคาจากเชื้อและการเก็บรักษา และง่ายต่อการผลิตและการขนส่งในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังสามารถนำมาผ่านกระบวนการตอกอัดเป็นเม็ดหรือบรรจุในแคปซูลเพื่อสะดวกในการใช้งานได้อีกด้วย

นอกจากกระบวนการเตรียมจะส่งผลต่อขนาดและจำนวนชั้นของนีโอโซมแล้ว ขนาดและจำนวนชั้นของนีโอโซมที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิด polyoxyethylene alkyl ethers และคอเลสเตอรอลสามารถเปลี่ยนแปลงได้จากหลายหนทาง เช่น การเพิ่มอุณหภูมิที่สูงกว่า 60 °C จะทำให้เกิดการเปลี่ยนจากถุงอนุภาคชั้นเดียวเป็นถุงอนุภาคหลายชั้นขนาดใหญ่ได้ ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าเกิดจากการที่หมู่ poly(oxyethylene) ของสารลดแรงตึงผิว เกิดการสูญเสียน้ำและทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล ทำให้ความแข็งแรงของผนังอนุภาคลดลง ในขณะที่หากมีการเขย่าอย่างรุนแรงที่อุณหภูมิห้อง จะทำให้เกิดผลตรงกันข้ามคือ จะเกิดการเปลี่ยนจากถุงอนุภาคหลายชั้นไปเป็นอนุภาคชั้นเดียว (Kaneshina *et al.*, 1982)

โดยทั่วไปยาอิสระที่ไม่ถูกกักเก็บในนีโอโซมจะถูกแยกออกจากยาเตรียมโดยวิธีการกรองผ่านเจล (gel filtration) นิยมใช้เจล Sephadex-50[®] และใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นของเหลวสำหรับผลักให้อนุภาคออกมา นอกจากนี้ยังสามารถแยกยาอิสระด้วยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) หรือแยกโดยใช้แรงปั่นเหวี่ยง (centrifugation) อย่างไรก็ตามการปั่นแยกโดยใช้แรงเหวี่ยงอาจไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะในกรณีที่มีความแตกต่างของความหนาแน่นของนีโอโซมกับยาอิสระน้อย ซึ่งจะทำให้การแยกเกิดขึ้นได้ยากวิธีที่อาจแก้ไขปัญหานี้ได้คือการเติมโปรตามีน (protamine) ลงไปในยาเตรียมเพื่อทำให้เกิดการแยกง่ายขึ้นขณะปั่นเหวี่ยง



รูปที่ 2 ขั้นตอนการเกิดนโนโซมจากโพรนโนโซม (proniosome) (Kumar *et al.*, 2011)

การประเมินคุณลักษณะของนโนโซม

1. ความสามารถในการกักเก็บยา

หลังจากที่ได้แยกตัวยาอิสระที่ไม่ถูกกักเก็บภายในนโนโซมออกไปแล้ว วิเคราะห์ปริมาณยาที่ถูกกักเก็บไว้ในนโนโซมโดยการให้นโนโซมแตกด้วย 50%(v/v) n-propanol หรือ 0.1%(w/v) Triton X-100 หรือ 2.5%(w/v) sodium lauryl sulfate (Balasubramaniam *et al.*, 2002) แล้วนำของเหลวมาปั่นผสมและปั่นเหวี่ยงแยกได้ของเหลวใสส่วนบน มาวิเคราะห์หาปริมาณด้วยยาสำคัญความสามารถในการกักเก็บยาคำนวณดังนี้

ความสามารถในการกักเก็บยาที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียม โดยพบว่าการเตรียมนโนโซมด้วยวิธีการใช้ไฮโดร จะสามารถกักเก็บยาได้ดีมากกว่าการเตรียมโดยวิธีการทำให้เกิดฟิล์มและเขย่าด้วยมือ นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บยาจะลดลงเมื่อมีการใช้คอเลสเตอรอลมากขึ้นในนโนโซมที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิด glycerol surfactant (Baillie *et al.*, 1985)

2. ขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค

ส่วนใหญ่ของอนุภาคนโนโซมมีลักษณะเป็นทรงกลม จึงมีการวัดขนาดอนุภาคจากเส้นผ่านศูนย์กลางซึ่งทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เช่น กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy: TEM) และกล้องจุลทรรศน์ชนิด freeze fracture electron microscopy เป็นต้น ปัจจุบันมีเครื่องมือที่ใช้แสงเลเซอร์ในการวัดขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค โดยเทคนิคการกระเพื่อมของความเข้มแสง (Dynamic light scattering) (เช่น เครื่อง Zetasizer™ ของบริษัท Malvern) และเทคนิคการเลี้ยวเบนของแสง (Laser Diffraction) (เช่น เครื่อง Mastersizer™ ของบริษัท Malvern) เป็นต้น ซึ่งทำให้วัดได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว การวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคสามารถนำมาใช้ในการประเมินความคงตัวของตำรับนโนโซมได้ โดยอาจเก็บยาเตรียมในสภาวะแช่แข็งที่ -20 °C เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการให้ความร้อนเพื่อให้ยาเตรียมเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง (Freeze thawing) แล้วทำการวัดขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคเพื่อประเมินความคงตัวของยาเตรียม โดยพิจารณาจากการรวมตัวกันของอนุภาคทำให้ขนาดอนุภาคใหญ่มากขึ้น

3. ประจุที่ผิวอนุภาค (Surface charge)

ตำรับนโนโซม อาจมีองค์ประกอบของสารอิเล็กโตรไลต์เพื่อเพิ่มประจุบนผิวอนุภาค ศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (Zeta potential) เป็นค่าที่บ่งบอกความคงตัวของนโนโซมได้ ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$f = \frac{\mu E \pi \eta}{\Sigma}$$

เมื่อกำหนดให้ f = ค่าศักย์ไฟฟ้า (Zeta Potential), μE = การเคลื่อนที่อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoretic mobility), η = ความหนืดของตำรับ, Σ = ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant)

การลดประจุไฟฟ้าที่ผิวจะเพิ่มอัตราเร็วในการเกิดการจับกลุ่มอย่างหลวมและรวมตัวกันของอนุภาคได้ ปัจจุบันสามารถวัดค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคได้ง่ายและรวดเร็ว ด้วยการใช้เครื่องมือเช่น เครื่อง Zetasizer™ ของบริษัท Malvern เป็นต้น

4. การศึกษาการปลดปล่อยยาออกจากถุงอนุภาค

การศึกษาการปลดปล่อยยาทำได้โดยใช้วิธีถุงไดอะไลซิส ที่เขย่าด้วยอัตราคงที่และควบคุมอุณหภูมิ แล้วทำการสูดตัวอย่างสารละลายบัฟเฟอร์ที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยวิธีที่เหมาะสม

5. การตรวจสอบการจัดเรียงตัวเป็นชั้นของนโนโซมและจำนวนชั้นที่จัดเรียงตัว

ถุงอนุภาคที่เกิดจากการจัดเรียงตัวเองเป็นชั้นของสารลดแรงตึงผิวสามารถตรวจสอบได้โดยการตัดแบ่งนโนโซม (cross section) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โพลาไรซ์ (light polarization microscopy) จำนวนชั้นที่จัดเรียงตัว

สามารถตรวจสอบได้โดยการใช้เครื่องมือ NMR spectroscopy, small angle X-ray scattering และ electron microscopy เป็นต้น

6. การศึกษาการกระจายตัวของยาในร่างกาย

การศึกษาการกระจายตัวของยาในร่างกาย นิยมใช้สัตว์ทดลองเป็นหนูขาว (albino rat) ที่สุขภาพดี ใช้นิโอสอมเปล่าเป็นกลุ่มควบคุม และตำรับนิโอสอมที่มียาเป็นกลุ่มทดลอง อาจมีการฉีดตำรับที่มียาในท้องตลาดเพื่อเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ภายหลังจากการฉีดตำรับนิโอสอมแล้ว ทำการผ่าหน้าโดยการตัดอวัยวะที่ต้องการศึกษาเช่น ตับ ม้าม ไต ปอด และเก็บตัวอย่างเลือดของหนู มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีและเครื่องมือที่เหมาะสม

ความคงตัวและความเป็นพิษของนิโอสอม

นิโอสอมเป็นระบบนำส่งยาที่อยู่ในรูปแบบสารแขวนลอย จึงมักเกิดปัญหาด้านความไม่คงตัวของกายภาพ ได้แก่ การเกาะกลุ่มกันของอนุภาค การรวมตัวกัน และการรั่วของผนังอนุภาค เป็นต้น ปัญหานี้อาจแก้ไขโดยการเติมสารเพิ่มความคงตัว นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ คุณสมบัติของสารที่เก็บกักภายในถุงอนุภาค ปริมาณสารลดแรงตึงผิวและไขมัน รวมทั้งอุณหภูมิ การศึกษาความคงตัวของนิโอสอม อาจทำได้โดยการเก็บรักษาตำรับในสภาวะปกติหรือสภาวะเร่ง เป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในตำรับ มีการศึกษาความคงตัวของนิโอสอมชนิด Sucrose stearate พบว่าขนาดอนุภาคนิโอสอมไม่เปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามความสามารถในการกักเก็บยาลดลง 10% เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลานาน 90 วัน (Abd-Elbary *et al.*, 2008) สารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้เตรียมนิโอสอมอาจก่อให้เกิดพิษต่อร่างกายได้ อย่างไรก็ตามรูปแบบยาเตรียมนิโอสอมไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียง (Azminet *et al.*, 1985) และ พบว่าเมื่อทดสอบความเป็นพิษในหนู รูปแบบยาเตรียมนิโอสอมหรืออาการข้างเคียงที่เกิดจากตัวยาได้ (Rogerson *et al.*, 1987)

ปัจจัยที่มีผลต่อการตั้งตำรับนิโอสอม

1. ตัวยาสำคัญ

การกักเก็บตัวยาสำคัญในนิโอสอมจะทำให้ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น เป็นไปได้ว่าเกิดจากการจับกันของตัวยากับส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวและการเพิ่มประจุและ

แรงผลักรันภายในชั้นของสารลดแรงตึงผิว นอกจากนี้ความชอบน้ำหรือไขมันของตัวยาสำคัญยังมีผลต่อระดับการกักเก็บยาภายในนิโอสอมด้วย

2. ปริมาณและชนิดของสารลดแรงตึงผิว

การเลือกชนิดสารลดแรงตึงผิวจะคำนึงถึงในแง่ความปลอดภัยและความคงตัวของระบบ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิด ether type surfactants ที่มีหนึ่งสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (alkyl ether chain) จะมีความเป็นพิษมากกว่าชนิดที่มีสองสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (dialkyl ether chain) และพบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิด ester type surfactant (เช่น Span®) จะมีความคงตัวทางเคมีและความเป็นพิษน้อยกว่าชนิด ether type surfactants เนื่องจากหมู่เอสเทอร์ของสารลดแรงตึงผิวชนิด ester type surfactant จะสามารถสลายตัวได้โดยเอนไซม์เอสเทอเรสเกิดเป็นไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันภายในร่างกาย (Hunter *et al.*, 1988) Span® ที่มีค่าความชอบน้ำต่อไขมัน (Hydrophilic-lipophilic Balance: HLB) ระหว่าง 4-8 สามารถเกิดเป็นถุงอนุภาคได้ (Yoshioka *et al.*, 1994) แต่สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ระหว่าง 14-17 ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการเตรียมนิโอสอม ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคนิโอสอมจะเพิ่มขึ้นตามความชอบน้ำหรือการเพิ่มขึ้นของค่าความชอบน้ำต่อไขมันของสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากค่าพลังงานอิสระที่ผิวลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความชอบไขมันของสารลดแรงตึงผิว นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความชอบน้ำต่อไขมันมีผลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บยาโดยการลดลงของค่าดังกล่าวจาก 8.6 ไปยัง 1.7 มีผลทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บยาลดน้อยลงตามลำดับ (Shahiwala and Misra, 2002) ส่วนใหญ่สารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้เตรียมนิโอสอมจะมีความยาวของสายโซ่คาร์บอน 12-18 คาร์บอนอะตอม (Nasseri and Florence, 2003, Ozer *et al.*, 1991) มีการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีสายคาร์บอนยาว 18 อะตอม (stearyl chain) จะแสดงความสามารถในการกักเก็บยาได้มากกว่าที่มีสายคาร์บอนยาว 12 อะตอม (lauryl chain) ถุงอนุภาคที่เกิดจาก Span® ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีโอกาสเกิดการรั่วน้อยและมีความคงตัวมากขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติก (Bouwstra *et al.*, 1997)

โดยทั่วไปปริมาณของสารลดแรงตึงผิวต่อไขมันมากที่สุดในการเตรียมระบบนำส่งนิโอสอมคือ 10-30 mM (1-2.5%w/w) เมื่อสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อไขมันมาก

ขึ้นจะส่งผลเพิ่มความสามารถในการกักเก็บยา ซึ่งจะมีผลทำให้ระบบมีความหนืดเพิ่มขึ้นด้วย (Uchegbu and Vyas, 1998)

การจัดเรียงตัวเป็นชั้นของอนุภาคนโนโซมอาจจะอยู่ในสถานะของเหลวหรือเจล ขึ้นกับอุณหภูมิ ชนิดของไขมันหรือสารลดแรงตึงผิวและองค์ประกอบอื่น เช่น คอเลสเตอรอล เป็นต้น ดังนั้นอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะ (Tc) ซึ่งเป็นอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะของสารลดแรงตึงผิว จึงมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาคือ เช่น Span 60[®] ที่มีค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะสูงจะช่วยทำให้การกักเก็บสารดีขึ้น

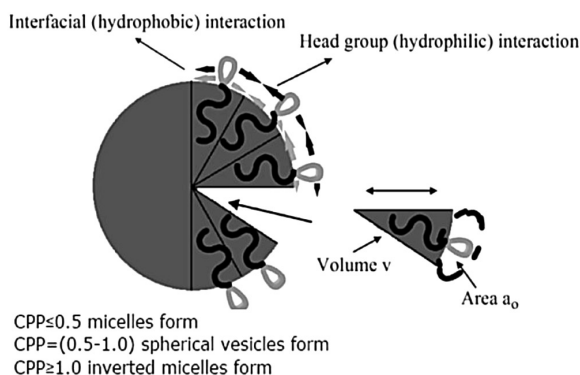
3. โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว

ลักษณะโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวมีผลต่อค่า critical packing parameters (CPP) ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกการจัดเรียงตัวและรูปร่างของนโนโซม ขึ้นกับสัดส่วนที่ชอบและไม่ชอบน้ำ ดังสมการ

$$CPP = \frac{V}{al}$$

โดยที่ V = ปริมาตรของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ, l = ความยาวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ, a = พื้นที่ของส่วนที่ชอบน้ำ

หากค่าของ CPP น้อยกว่า 0.5 นโนโซมที่ได้เป็นอนุภาครวมกลม หากอยู่ระหว่าง 0.5-1 เป็นไมเซลล์ที่เรียงตัวเป็นทรงกลม (spherical vesicle) และหากมากกว่า 1 จะมีการจัดเรียงตัวเป็นอินเวิร์ตไมเซลล์ (invert micelle) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของโมเลกุล มีผลต่อการจัดเรียงตัวและรูปร่างของนโนโซม (Uchegbu and Vyas, 1998)

4. ปริมาณของคอเลสเตอรอล และประจุ

คอเลสเตอรอลมีผลในการเพิ่มขนาดของอนุภาคและเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บยามากขึ้น เนื่องจากไปเพิ่ม

ความแข็งแรงของผนังอนุภาคและลดอัตราการปลดปล่อยตัวยาลง (Yoshida *et al.*, 1992) สำหรับประจุอาจส่งผลทำให้เกิดแรงผลักระหว่างชั้นของสารลดแรงตึงผิวทำให้มีปริมาตรในการกักเก็บยามากขึ้นปริมาณของคอเลสเตอรอลในตำรับขึ้นกับค่าความชอบน้ำต่อน้ำมันของสารลดแรงตึงผิว หากสารลดแรงตึงผิวมีค่าความชอบน้ำต่อน้ำมันมากกว่า 10 อาจเพิ่มปริมาณของคอเลสเตอรอลได้เพื่อชดเชยการมีส่วนที่ชอบน้ำมากขึ้นของสารลดแรงตึงผิว (Uchegbu and Vyas, 1998)

5. องค์ประกอบของผนังอนุภาคหรือองค์ประกอบในตำรับนโนโซม

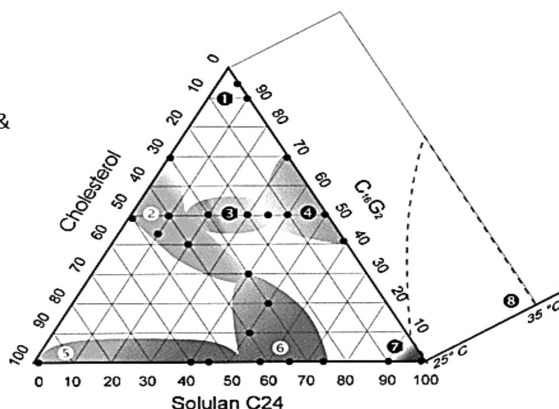
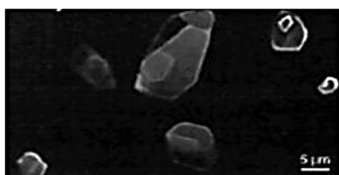
องค์ประกอบอื่นที่เพิ่มเข้ามาในตำรับจะส่งผลต่อรูปร่าง, ความสามารถในการซึมผ่านของผนังอนุภาค และความคงตัวของนโนโซม การเติม Solulan C24[®] (cholesteryl poly-24-oxyethylene ether) จะส่งผลเพิ่มความคงตัวจากส่วนที่ชอบน้ำของโมเลกุลที่ทำหน้าที่ป้องกันการรวมกันของอนุภาค (steric stabilization) ตัวอย่างระบบนโนโซมที่ประกอบด้วยสาร 3 ชนิดได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุชนิด Hexadecyl diglycerol ether (C16G2), Solulan C24[®] และคอเลสเตอรอล มีรูปร่างและลักษณะที่เกิดขึ้นแตกต่างกันตามความเข้มข้นหรือสัดส่วนที่นำมาผสมกัน (รูปที่ 4) การเติม Solulan C24[®] และ คอเลสเตอรอล ลงในสารลดแรงตึงผิวชนิด C16G2 ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน จะเกิดการรวมตัวกันได้เป็นถุงขนาดใหญ่ (giant vesicles) ที่เรียกว่า "discomes" ซึ่งมีขนาดอนุภาค 25-100 μm ระบบนำส่งนี้ไวต่ออุณหภูมิ อาจเกิดการรั่วของอนุภาคได้หากมีอุณหภูมิมากกว่า 37 $^{\circ}\text{C}$ (Uchegbu and Vyas, 1998) และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ในการนี้ระบบมีการเติมคอเลสเตอรอล ลงไปในระดับต่ำหรือไม่เติมคอเลสเตอรอลพบว่าเกิดการจัดเรียงตัวที่เรียกว่า "polyhedral vesicles" (รูปที่ 4) ซึ่งจะสามารถกักเก็บสารที่ชอบน้ำไว้ได้โดยผนังของอนุภาคจะอยู่ในสถานะเจล และมีรูปอนุภาครูปแปดเหลี่ยมขนาดใหญ่ 2-10 μm ทำให้เกิดการปลดปล่อยยาอย่างช้าๆ นำมาเตรียมยาสำหรับตา ยาฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนังและยาฉีดเข้ากล้ามเนื้อได้ พบว่าที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ อนุภาอยังคงอยู่ในรูปแปดเหลี่ยมได้แต่มีการปลดปล่อยตัวยามากขึ้น และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 43-45 $^{\circ}\text{C}$ ผนังอนุภาคจะมีการเปลี่ยนสถานะจากเจลไปเป็นของเหลวทำให้รูปร่างของอนุภาคเปลี่ยนเป็นทรงกลมและทำให้ความหนืดของนโนโซมลดลง เมื่อเย็นตัวลงจะไม่สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นรูปทรง

แปดเหลี่ยมได้อย่างสมบูรณ์ (Florence *et al.*, 1999, Nasser and Florence, 2003) การตอบสนองต่ออุณหภูมิขึ้นกับ Solulan C24[®] เนื่องจาก Solulan C24[®] มีส่วนที่ชอบน้ำมาก เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ส่วนนี้เกิดการอุ้มน้ำน้อยลง (dehydration) และส่งผลทำให้พันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมกันของโมเลกุลน้อยลงตามไปด้วยทำให้ผนังของอนุภาครั่วและมีการซึมผ่านของสารออกไปได้ง่ายขึ้น ปัจจุบันพบว่าระบบที่สามารถทำให้เกิดอนุภาครูปแปดเหลี่ยมได้ ได้แก่ ระบบที่ไม่มีคอเลสเตอรอล แต่มี Solulan C24[®] ผสมกับ

สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุลบ เช่น poly(oxyethylene)-5-cetyl ether และ poly(oxyethylene)-5-stearyl ethers (Florence *et al.*, 1999) เป็นต้น อนุภาคนี้นสามารถรวมตัวกันจนมีลักษณะเป็นท่อเรียงตัวหลายชั้นได้ซึ่งมีความยาวของอนุภาค 80 μm นีโอโซมรูปทรงแปดเหลี่ยม ที่เกิดจาก C16G2: Solulan C24[®] ในอัตราส่วน 91: 9 มีขนาดใหญ่ ($8.0 \pm 0.03 \mu\text{m}$) มากกว่า นีโอโซมรูปทรงหรือกลมที่เกิดจาก C16G2: คอเลสเตอรอล: Solulan C24[®] ในอัตราส่วน 49: 49: 2 ($6.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$) (Arunothayanun *et al.*, 2000)

- ① Polyhedral Vesicles (2-10 μ)
- ② Spherical, helical, tubular Vesicles (0.5-10 μ)
- ③ Discomes (10-30 μ) + small spherical & helical vesicles (0.5-10 μ)
- ④ Discomes (12-60 μ) + mixed micelles
- ⑤ Cholesterol crystals
- ⑥ Spherical vesicles (0.5-10 μ)
- ⑦ Solulan C24[®] mixed micelles
- ⑧ Polyhedral Vesicles
- ⑨ Mixed micelles as temperature increases from room temperature to 35°C

Polyhedral Vesicles



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงสถานะ (phase diagram) ของระบบที่ประกอบด้วยสาร 3 ชนิดได้แก่ Hexadecyl diglycerol ether (C16G2), คอเลสเตอรอลและ Solulan C24[®] โดยพบว่าจะมีการจัดเรียงตัวเป็น “Polyhedral vesicles” เมื่อใช้คอเลสเตอรอลในความเข้มข้นต่ำกว่า 10% (Uchegbu *et al.*, 1997)

6. วิธีการเตรียม

วิธีการเตรียมนีโอโซมมีผลต่อขนาดอนุภาค พบว่าวิธีการเตรียมนีโอโซมโดยทำให้เกิดฟิล์มและเขย่าด้วยมือจะได้นีโอโซมขนาด 0.35-13 nm ซึ่งดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมนีโอโซมโดยใช้ฮีโร (50-1000 nm) (Khandareet *et al.*, 1994) การเตรียมนีโอโซมโดยวิธีการกลับวัฏภาค (REV) ให้นีโอโซมขนาดเล็กและการใช้เครื่องไมโครฟลูอิดิเคชันจะช่วยทำให้นีโอโซมมีขนาดอนุภาคเล็กและการกระจายขนาดอนุภาคแคบ

7. อุณหภูมิในช่วงทำให้แผ่นฟิล์มพองตัว

อุณหภูมิในช่วงทำให้แผ่นฟิล์มพองตัวมีผลมากต่อขนาดและรูปร่างของอนุภาคนีโอโซม โดยปกติในระหว่างการเตรียมให้เกิดขึ้นนีโอโซมจะต้องใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะ (T_c) ของสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากหากสถานะของสารลดแรงตึงผิวเป็นของเหลวจะทำให้ง่ายต่อการการจัดเรียงตัวใหม่เป็นอนุภาค อนุภาคนีโอโซมรูปทรงแปดเหลี่ยม (polyhedral vesicle) ที่ประกอบด้วย C16G2: Solulan C24[®] (91: 9) พบว่ามีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลมที่อุณหภูมิ 48 °C ในขณะที่อนุภาค

นํ้าไอโซมที่ประกอบด้วย C16G2: คอเลสเทอรอล: Solulan C24[®] (49: 49: 2) ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Arunothayanun *et al.*, 2000) นอกจากนี้ปริมาณของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการพองตัวและเวลาที่ใช้ในการพองตัวของแผ่นฟิล์มเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อความคงตัวของนํ้าไอโซมเช่นกัน

8. ความต้านทานต่อความดันออสโมติก

การเติมเกลือที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลทำให้นํ้าไอโซมมีขนาดเล็กลง แต่ในสภาวะไฮโปโทนิก (hypotonic solution) เริ่มแรกนํ้าไอโซมจะเกิดการปลดปล่อยยาช้าลงจากการพองตัวเพียงเล็กน้อยของนํ้าไอโซมหลังจากนั้นจะมีการปลดปล่อยยาเร็วมากขึ้นเนื่องจากผนังของอนุภาคนํ้าไอโซมเกิดการจัดเรียงตัวที่หลวมมากขึ้นภายใต้แรงดันออสโมติก (Malhotra and Jain, 1994)

9. สภาวะความเป็นกรดต่างของสารละลาย

สภาวะความเป็นกรดต่างของสารละลายมีผลอย่างมากต่อความสามารถในการกักเก็บยา มีการศึกษาพบว่านํ้าไอโซม กักเก็บยาเฟอบีโพรเฟน (flurbiprofen) มากที่สุดที่ 94.6% ในสภาวะที่เป็นกรด (pH 5.5) ความสามารถในการกักเก็บยานี้จะลดลงอย่างมากเมื่อสารละลายมี pH มากกว่า 6.8 เนื่องจากยาคอนิไดน์จะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดทำให้สามารถเข้าไปกักเก็บอยู่ในส่วนชั้นไขมันของนํ้าไอโซมได้ดี (Mokhtar *et al.*, 2008)

ระบบนำส่งชนิดพิเศษ

1. Aspasomes (Ascorbyl palmitate vesicles):

มีการพัฒนาระบบนำส่งโดยใช้สาร Ascorbyl palmitate คอเลสเทอรอลและสารให้ประจุลบ diacetyl phosphate เรียกระบบนี้ว่า Aspasomes ทั้งนี้เนื่องจากระบบนี้มีองค์ประกอบหลักเป็น Ascorbyl palmitate ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวที่สามารถจัดเรียงตัวเป็นถุงทรงกลมได้ ลักษณะพิเศษของระบบ Aspasome คือมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยตัวเองจากคุณสมบัติของ Ascorbyl palmitate ปริมาณคอเลสเทอรอลมีผลน้อยมากต่อขนาดอนุภาคและการกักเก็บยา หากใช้คอเลสเทอรอล 45% จะส่งผลให้มีการปลดปล่อยยาแบบเน้น นอกจากนี้ยังพบว่าระบบนำส่ง Aspasome สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ในปริมาณที่สูงกว่ายาเตรียมในรูปสารละลายและยากระจายตัว จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการนำส่งยาทางผิวหนัง (Gopinath *et al.*, 2004)

2. Vesicles in water and oil system (V/W/O):

Yoshioka และคณะ (Yoshioka *et al.*, 1994) เริ่มพัฒนาโดยการนำระบบนํ้าไอโซมมากระจายตัวในน้ำมัน จนเกิดเป็นอิมัลชันชนิด V/W/O ตัวอย่างเช่น การเตรียมนํ้าไอโซมที่เกิดจาก sorbitol monostearate, คอเลสเทอรอล และ Solulan C24[®] มากระจายตัวในน้ำมันที่อุณหภูมิ 60 °C จะเกิดระบบชนิด V/W/O ซึ่งสามารถกักเก็บโปรตีน ป้องกันการสลายตัวในระบบทางเดินอาหาร และควบคุมการปลดปล่อยยาได้ นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งระบบ V/W/O และ W/O สามารถใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (immunogenicity properties) (Murdan *et al.*, 1999)

3. นํ้าไอโซมที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดโบลา (Bola surfactant containing niosomes):

เป็นตำรับนํ้าไอโซมที่มีสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวชนิด omega-hexadecyl-bis-(1-aza-18 crown-6) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดโบลา (bola surfactant) ต่อ Span[®] 80 ต่อ คอเลสเทอรอล ในอัตราส่วนโมล เป็น 2: 3: 1 มีรายงานว่าตำรับโบลานํ้าไอโซมของยาแอมโมเนียมกลีเซอไรซินเนต (ammonium glycyrrhizinate) สามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ (Donatella *et al.*, 2007)

การใช้นํ้าไอโซมเพื่อเป็นระบบนำส่งยาในทางเภสัชกรรม

ชีวประสิทธิผลของตำรับยานํ้าไอโซมขึ้นอยู่กับปริมาณของยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาที่อวัยวะเป้าหมาย โดยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุที่นิยมใช้มากที่สุดคือ sorbitan amphiphiles (Span[®] 20, 40, 60, 80) การประยุกต์ใช้นํ้าไอโซมทางเภสัชกรรมมีดังนี้

1. ระบบนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

นํ้าไอโซมของ sorbitan monostearate ที่เคลือบด้วย poly(oxyethylene) และ Solulan C24[®] จะสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้นและถูกส่งไปยังตับและม้าม ระดับยาในกระแสเลือดสูงขึ้น 6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับยาในรูปสารละลาย และพบว่านํ้าไอโซมที่ไม่ถูกเคลือบด้วย poly(oxyethylene) ของยาเมโทเทรกเซต (Methotrexate) และวินคริสติน (Vincristine) ก็แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งดีขึ้นเช่นกัน (Uchegbu *et al.*, 1996, Unezaki *et al.*, 1995) ยามะเร็งอื่นที่ใช้ระบบนำส่งนํ้าไอโซมได้แก่ ดาอูโนรูบิซิน (Daunorubicin) (Balasubramaniam *et al.*, 2002) ดอกโซรูบิซิน (Doxorubicin) (Uchegbu *et al.*, 1995) และ บลีโอมัยซิน (Bleomycin) (Naresh *et al.*, 1996) เป็นต้น

2. ระบบนำส่งยาให้ออกฤทธิ์ที่ตับ

อวัยวะเป้าหมายของการนำส่งยารักษาโรค ไขมันเยื่อหรือโรคตับหลายชนิดคือตับ พบว่าการใช้นีโอโซมที่มีองค์ประกอบของ Hexadecyl triglycerol เพื่อนำส่งยาโซเดียม สติโบกลูโคเนต (sodium stibogluconate) มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคดังกล่าวได้ โดยสามารถทำให้ระดับของแอนติโมนี (antimony) ที่ตับสูงขึ้นเป็น 2 เท่า เป็นไปได้ว่ากลไกที่ทำให้ยาไปยังตับเกิดจากการจับของแมคโครฟาจ (macrophage) แล้วนำพาให้นีโอโซมเข้าสู่เซลล์ตับและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยานี้เพิ่มขึ้น 10 เท่า มีรายงานว่าสามารถลดผลอันตรายต่อหัวใจ ตับ และไตจากการใช้นีโอโซมนี้ด้วย (Baillie *et al.*, 1986) นอกจากนี้ตำรับยาซิลิมาริน (silymarin) ในรูปแบบนีโอโซมเมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนังสามารถป้องกันพิษที่ตับจากการกระตุ้นด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ได้ดีกว่าตำรับยาในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน (Mohamed *et al.*, 2012)

3. ระบบนำส่งยาเข้าสู่สมอง

นีโอโซมที่มีการเคลือบลิแกนด์ซึ่งเป็นน้ำตาลบางชนิด สามารถนำส่งยาประเภทเปปไทด์ผ่านผนังกั้นในสมอง (blood brain barrier: BBB) เนื่องจากอาศัยการนำส่งยาผ่านทางระบบขนส่งกลูโคส (glucose transporter) ที่ผนังกั้นในสมอง ตัวอย่างระบบนีโอโซมนำส่งสารเข้าสู่สมอง ได้แก่ ระบบ Radiolabelled (I^{125}) vasoactive intestinal peptide (VIP)-loaded glucose-bearing niosomes (Dufes *et al.*, 2004) สารสำคัญของตำรับนี้คือ VIP มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและสามารถควบคุมอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อประสาท จึงสามารถนำมาใช้ในการรักษาอัลไซเมอร์

4. ระบบนำส่งทางผิวหนัง

มีการนำระบบนำส่งยานีโอโซม ไปใช้กันอย่างกว้างขวางทางเครื่องสำอาง เนื่องจากสามารถนำส่งสารสำคัญซึมผ่านผิวหนังได้ดีและมีราคาถูกกว่าลิปโซม โดยเฉพาะการเตรียมระบบนำส่งในรูปแบบที่เรียกว่า "flexible/elastic vesicle" ซึ่งเตรียมได้โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิด poly(oxyethylene)-7-dodecyl ether (VanHal *et al.*, 1996) หรือ poly(oxyethylene)-8-lauryl ester (Honeywell-Nguyen and Bouwstra, 2003) ระบบนี้มีลักษณะคล้ายกับทรานส์เฟอร์โซม (transferosomes) (Cevc *et al.*, 1995, 1996) ซึ่งเป็นถุงอนุภาคลิปโซมที่มีความยืดหยุ่นสูง ได้จากการใช้

ไขมันชนิดฟอสโฟลิพิดร่วมกับสารลดแรงตึงผิว เช่น sodium cholate หรือ deoxycholate โดยเชื่อว่าอนุภาคชนิดนี้สามารถบีบตัวผ่านช่องว่างของเซลล์ในชั้นผิวหนังด้านบนได้ กลไกในการนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังของนีโอโซมมีหลายกลไกดังนี้

(1) การดูดซับบริเวณผิวหนังส่วนนอกสุดแล้วเกิดการแตกและเพิ่มแรงส่งให้ยาเข้าสู่ผิวหนังได้ดีขึ้น

(2) การซึมเข้าสู่ผิวหนังชั้นนอกสุดหลอมรวมกับส่วนของไขมันในชั้นนี้ และเกิดการปลดปล่อยสาร โดยทำหน้าที่เป็นเหมือนตัวเก็บกักยาให้ค่อยๆ ปลดปล่อยออกมาทำให้เกิดประสิทธิภาพที่ยาวนานขึ้น

มีการพัฒนาระบบนีโอโซมมาผสมกับเจลาติน (1%w/w Carbopol® 934 gel) ที่มีลิเซอรอลและโพรพิลีนไกลคอลเป็นองค์ประกอบ (Shahiwala and Misra, 2002) หรือเจลไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (Hydroxypropyl methyl Cellulose: HPMC) ที่มีลิเซอรอลเป็นองค์ประกอบ (Reddy and Udupa, 1993) พบว่าสามารถซึมผ่านผิวหนังด้วยอัตราการซึมผ่านที่สูงขึ้น และสำหรับการนำส่งยาบรรเทาอาการอักเสบพบว่าระบบนี้สามารถยับยั้งอาการบวมจากอาการอักเสบที่เกิดจากการฉีดสารวุ้นที่อุ้งเท้าหนู ดีกว่ารูปแบบเจลปกติตัวอย่างสารสำคัญที่นำมาเตรียมเป็นตำรับนีโอโซมทางผิวหนังได้แก่ ลิโดเคน (Lidocaine) (Carafa *et al.*, 2002), เอสตราไดออล (Estradiol) (Hoffland and Hans *et al.*, 1995), และเมโทเทรกเซต (Methotrexate) (Lakshami *et al.*, 2007) เป็นต้น

5. ระบบนำส่งทางตา

นีโอโซมที่เตรียมจาก sorbitan monostearate และเคลือบด้วยคาร์โบพอล (Carbopol® 934P) และ/หรือไคโตซานได้ถูกพัฒนาเพื่อนำส่งยาอะเซตาโซลไมด์ (acetazolamide) หรือทิโมลอล มาลีเอท (timolol maleate) เพื่อรักษาโรคต้อหิน (glaucoma) (Aggarwal *et al.*, 2004, Aggarwal and Kaur, 2005) การออกแบบระบบนำส่งยาโดยการเคลือบผิวด้วยสารที่เพิ่มการยึดเกาะ (bioadhesion) จะช่วยเพิ่มระยะเวลาการสัมผัสของยาเตรียมกับตาได้โดยพบว่าการเคลือบด้วยไคโตซานจะมีคุณสมบัติการยึดเกาะมากกว่าการใช้คาร์โบพอล (Aggarwal and Kaur, 2005) ระบบนีโอโซมของยาอะเซตาโซลไมด์ (acetazolamide) สามารถออกฤทธิ์ได้ยาวนานถึง 6 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับยาต้อโรโซลไมด์ (dorzolamide: Dorzox®) ในท้องตลาด และ

ระบบนโนโซมของยาทิโมลอล มาลีเอท (timolol maleate) ให้ผลดีขึ้นเป็น 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับยาในรูปแบบเจล ในท้องตลาด นอกจากนี้ยังมีระบบนำส่งนโนโซมชนิดที่เรียกว่า discome ก็สามารถนำส่งยาทางตา โดย discome จะมีขนาดอนุภาค 16 μm มีองค์ประกอบเป็น sorbitan monopalmitate เช่นการใช้ discome ชนิดนี้นำส่งยาทิโมลอล มาลีเอท (timolol maleate) (Vyas *et al.*, 1998) สามารถควบคุมความดันภายในลูกตาได้ เป็นไปได้ว่าขนาดอนุภาคของ discome ที่ค่อนข้างใหญ่จะส่งผลลดการกำจัดยาออกจากตาได้ ดังนั้นนโนโซมจึงเป็นรูปแบบเภสัชภัณฑ์หนึ่งที่เหมาะสมสำหรับให้ยาทางตา และให้ผลที่ดีมากกว่ารูปแบบสารละลายนอกจากนี้ยากลอสเฟนิคอล ถูกนำมาเตรียมเป็นตำรับนโนโซมเพื่อใช้เป็นยาฆ่าเชื้อสำหรับตา พบว่าไม่ทำให้เกิดอาการระคายเคืองและให้การปลดปล่อยยาแบบเนิ่นทำให้ลดจำนวนครั้งของการใช้ยาได้เมื่อเปรียบเทียบกับยาในรูปแบบสารละลาย (Yasin *et al.*, 2012)

6. ระบบนำส่งวัคซีน

นโนโซมสามารถนำส่งแอนติเจน และดีเอ็นเอที่มีรหัสของแอนติเจน (DNA encoding for antigens) (Perrie *et al.*, 2004) ส่งผลทำให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน แม้ว่าตัวสารลดแรงตึงผิวเองจะมีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Hilgers *et al.*, 1989) แต่นโนโซมก็เป็นระบบนำส่งวัคซีนที่ดีและเป็นสาร adjuvant ที่ช่วยเสริมประสิทธิภาพในการเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ ตำรับนโนโซมที่มีองค์ประกอบของ 1-monopalmitoyl glycerol: คอลเลสเตอรอล: dicetyl phosphate ในอัตราส่วน 5: 4: 1 ของโอวัลบูลมิน หรือ T-cell epitope สามารถเป็นวัคซีนเพิ่มภูมิคุ้มกันเมื่อบริหารยาโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (Brewer *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีวัคซีนที่ใช้ระบบนำส่งนโนโซมเช่น วัคซีนป้องกันเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ ซิมเพล็กซ์ (herpes simplex virus type I) (Hassan *et al.*, 1996) เป็นต้น

7. ระบบนำส่งสารฉายภาพเพื่อวินิจฉัย (imaging agents)

การวินิจฉัยมะเร็งสามารถทำได้โดยการนำส่งสารฉายภาพไปยังเซลล์มะเร็งได้โดยผ่านทางกลูโคสรีเซพเตอร์ที่อยู่บนผิวของเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างเช่น การวินิจฉัยเซลล์มะเร็งชนิด PC3 ด้วยการฉีดนโนโซม “N-palmitoyl glucosamine niosomes” ที่เคลือบด้วย poly(oxyethylene) ของสารฉายภาพแกโดลิเนียม (gadolinium salts) เข้าเส้นเลือดดำของหนู กลูโคซามีนที่ใช้ในระบบนำส่งนโนโซม

จะทำหน้าที่จับกับกลูโคสรีเซพเตอร์บนผิวของเซลล์มะเร็ง (Luciani *et al.*, 2002, 2004)

บทสรุป

ในช่วงสามสิบปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยานโนโซมมากขึ้น ซึ่งพบว่าสามารถกักเก็บยาหรือสารสำคัญได้หลายชนิด ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยาไปยังอวัยวะที่ต้องการและเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา อีกทั้งนโนโซมเป็นรูปแบบที่มีการผลิตง่าย มีราคาถูก และมีความคงตัวมากกว่าลิโปโซม ปัจจุบันมีการใช้นโนโซมเป็นระบบนำส่งยาหรือสารวินิจฉัยเข้าสู่เซลล์มะเร็งและอวัยวะต่างๆ เช่น สมอง ตับ ตา และผิวหนัง เป็นต้น ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดอาการข้างเคียงของตัวยาได้ ระบบนำส่งนโนโซมจึงเป็นรูปแบบยาหนึ่งที่เหมาะสมในการนำมาใช้ทางเภสัชกรรม

References

- Abd-Elbary A, El-laithy HM, Tadros MI. Sucrose stearate-based proniosome-derived niosomes for the nebulisable delivery of cromolyn sodium. *Int J Pharm* 2008; 357(1-2): 189-198.
- Aggarwal D, Garg A, Kaur IP. Development of a topical niosomal preparation of acetazolamide: Preparation and evaluation. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1509-1517.
- Aggarwal D, Kaur IP. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm* 2005; 290: 155-159.
- Arunothayanun P, Bernard MS, Craig DQ, Uchegbu IF, Florence AT. The effect of processing variables on the physical characteristics of nonionic surfactant vesicles (niosomes) formed from hexadecyl diglycerol ether. *Int J Pharm* 2000; 201(1): 7-14.
- Arunothayanun P, Uchegbu IF, Florence AT. Osmotic behaviour of polyhedral non-ionic surfactant vesicles (niosomes). *J Pharm Pharmacol* 1999; 51(6): 651-7.

- Azmin MN, Florence AT, Handjani-Vila RM, Stuart JF, Vanlerberghe G, Whittaker JS. The effect of non-ionic surfactant vesicle (niosome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice. *J Pharm Pharmacol* 1985; 37: 237-242.
- Baillie AJ, Florence AT, Hume LR, Muirhead GT, Rogerson A. The preparation and properties of niosomes- Non-ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol* 1985; 37: 863-868.
- Baillie AJ, Coombs GH, Dolan TF. Non-ionic surfactant vesicles, niosomes, as delivery system for the anti-leishmanial drug, sodium stibogluconate, *J Pharm Pharmacol* 1986; 38: 502-505.
- Balasubramaniam A, Kumar VA, Pillai KS. Formulation and *in vivo* evaluation of niosome encapsulated daunorubicin hydrochloride. *Drug Dev and Ind Pharm* 2002; 28: 1181-1193.
- Beugin-Deroo S, Ollivon M, Lesieur S. Bilayer stability and impermeability of nonionic surfactant vesicles sterically stabilized by PEG-cholesterol conjugates. *J Colloid Interface Sci* 1998; 202: 324-333.
- Bhaskaran S, Lakshmi PK. Comparative evaluation of niosome formulations prepared by different techniques. *Acta Pharm Sci* 2009; 51: 27-32.
- Bouwstra JA, VanHal DA, Hofland HEJ. Preparation and characterization of nonionic surfactant vesicles. *Colloid Surf A Phy Eng Asp* 1997; 123-124: 71-80.
- Brewer JM, Roberts CW, Conacher M, McColl J, Blarney BA, Alexander J. An adjuvant formulation that preferentially induces T helper cell type 1 cytokine and CD8+cytotoxic responses is associated with up-regulation of IL-12 and suppression of IL-10 production. *Vaccine Res* 1996; 5: 77-89.
- Buckton GH, editor. *Interfacial phenomena in Drug Delivery and Targeting*. Switzerland: Academic Publishers; 1995. 154-155.
- Cable C. An examination of the effects of surface modifications on the physicochemical and biological properties of non-ionic surfactant vesicles. [PhD thesis] Pharmaceutical Sciences, University of Strathclyde. Glasgow: 1989.
- Carafa M, Santucci E, Lucania G. Lidocaine-loaded non-ionic surfactant vesicles: characterization and *in vitro* permeation studies. *Int J Pharm* 2002; 231: 21-32.
- Cevc G, Schatzlein A, Blume G. Transdermal drug carriers-basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. *J Control Rel* 1995; 36: 3-16.
- Cevc G, Blume G, Schatzlein A, Gebauer D, Paul A. The skin: A pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Adv Drug Del Rev* 1996; 18: 349-378.
- Chandraprakash KS, Udupa N, Umadevi P, Pillai GK. Effect of macrophage activation on plasma disposition of niosomal 3H-Methotrexate in sarcoma-180 bearing mice. *J Drug Target* 1993; 1(2): 143-145.
- Chauhan S, Luorence MJ. The preparation of polyoxyethylene containing non-ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol* 1989; 41: 6.
- Donatella P, Rita M, Antonio R, *et al.*, *In vitro* and *in vivo* evaluation of Bola-surfactant containing niosomes for transdermal delivery. *Biomed Microdevices*, 2007; 9: 421-433.
- Dufes C, Gaillard F, Uchegbu IF, Schatzlein AG, Olivier JC, and Muller JM. Glucosetargeted niosomes deliver vasoactive intestinal peptide (VIP) to the brain. *Int J Pharm* 2004; 285: 77-85.
- Florence AT, Arunothayanun P, Kiri S, Bernard MS, Uchegbu IF. Some Theological properties of nonionic surfactant vesicles and the determination of surface hydration. *J Phys Chem B* 1999; 103: 1995-2000.

- Gopinath D, Ravi D, Rao BR, Apte SS, Renuka D, Rambhau D. Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and application. *Int J Pharm* 2004; 271(1-2): 95-113
- Handjani-vila RM, Ribier A, Rondot B, Vanlerberghie G. Dispersions of lamellar phases of non-ionic lipids in cosmetic products. *Int J cosmet Sci* 1979; 1(5): 303-314.
- Hassan Y, Brewer JM, Alexander J, Jennings R. Immune responses in mice induced by HSV-1 glycoproteins presented with ISCOMS or NISV delivery systems. *Vaccine* 1996; 14: 1581-1589.
- Hilgers LA, Zigtermann GJWJ, Snippe H. Immunomodulating properties of amphiphilic agents. In: Kammuller ME, Bioksma N, Sienen W, editors. *Autoimmunity and Toxicology*, Amsterdam: Elsevier; 1989. 294-306.
- Hofland HEJ, Geest VR, Bodde HE, Junginger E, Bouwstra JA. Estradiol Permeation from Nonionic Surfactant Vesicles Through Human Stratum Corneum *in Vitro*. *Pharm Res*, 1995; 11: 659-664.
- Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. The *in vitro* transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles through human skin: A suggested mechanism of action. *J Control Rel* 2003; 86: 145-156.
- Hunter CA, Dolan TF, Coombs GH, Baillie AJ. Vascular systems (niosomes and liposomes) in experimental murine visceral leishmaniasis for delivery of sodium stibogluconate. *J Pharm Pharmacol* 1988; 40: 161- 165.
- Kaneshina S, Shibata O, Nakamura M. The effect of pressure on the mutual solubility of a nonionic surfactant water system. *Bull Chem Soc Japan* 1982; 55: 951-952.
- Khandare JN, Madhavi G, Tamhankar BM. Niosomes novel drug delivery system. *The Eastern Pharmacist* 1994; 37: 61-64.
- Kumar A, Pal J, Jaiswal A, Singh V. Review on niosomes as novel drug delivery system. *Int Res J Pharm* 2011; 2(5): 61-65.
- Lakshami PK, Gayathri SD, Bhaskaran S, Sacchdanand S. Niosomal methotrexate gel in the treatment of localized psoriasis: Phase I and phase II studies *Indian J Dermatol Venerol Leprol*, 2007; 73: 157-161.
- Luciani A, Olivier J, Clement OG, Siauve N, Fria G, Cuenod C. Glucose receptor directed stealth niosomes for MR tumor detection: Preliminary studies in mice. *Radiology* 2002; 225: 123-123.
- Luciani A, Olivier JC, Clement O, *et al*. Glucose-receptor MR imaging of tumors: Study in mice with PEGylated paramagnetic Niosomes. *Radiology* 2004; 231: 135-142.
- Malhotra M, Jain NK. Niosomes as Drug Carriers. *Indian Drugs* 1994; 31(3): 81-86.
- Mohamed SE, Alia AB, Marwa MS, Amira MM. Niosomes as a novel pharmaceutical formulation encapsulating the hepatoprotective drug silymarin. *Int J Pharm Pharm Sci* 2012; 4(1): 549-559.
- Mokhtar M, Sammourb OA, Hammad MA, Megrab NA. Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes. *Int J Pharm* 2008; 361: 104-11.
- Murdan S, Gregoriadis G, Florence AT. Sorbitan monostearate/ Polysorbate20 organogels containing niosomes: a delivery vehicle for antigen. *Eur J Pharm Sci* 1999; 8(3): 177-186.
- Naresh RA, Chandrashekhar G, Pillai GK, Udupa N. Antiinflammatory activity of Niosome encapsulated diclofenac sodium with Tween 85 in Arthritic rats. *Ind J Pharmacol* 1994; 26: 46-48.
- Naresh RA, Udupa N, Devi PU. Toxicity and antitumor activity of niosomal bleomycin in tumor bearing mice. *Indian J Exp Biol*. 1996 Aug; 34(8): 764-72.

- Nasseri B, Florence AT. Microtubules formed by capillary extrusion and fusion of surfactant vesicles. *Int J Pharm* 2003; 266: 91-98.
- Ozer AY, Hincal AA, Bouwstra JA. A novel drug delivery system nonionic surfactant vesicles. *Eur J Pharm Biopharm* 1991; 37: 75-79.
- Perrie Y, Barralet JE, McNeil S, Vangala A. Surfactant vesicle-mediated delivery of DNA vaccines via the subcutaneous route. *Int J Pharm* 2004; 284: 311.
- Reddy DN, Udupa N. Formulation and evaluation of oral and transdermal preparations of flurbiprofen and piroxicam incorporated with different carriers. *Drug Dev Ind Pharm* 1993; 19: 843-852.
- Rogerson A, Cummings J, Florence AT. Adriamycin-loaded niosomes-drug entrapment, stability and release. *J Microencap* 1987; 4: 321-328.
- Shahiwal A, Misra A. Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide. *J Pharma Sci* 2002; 5: 220-225.
- Uchegbu IF, Florence AT. Nonionic surfactant vesicles (Niosomes)-physical and pharmaceutical chemistry. *Adv Coll Interf Sci* 1995; 58:1-55.
- Uchegbu IF, Double JA, Turton JA, Florence AT. Distribution, metabolism and tumoricidal activity of doxorubicin administered in sorbitan monostearate (Span 60) niosomes in the mouse. *Pharm Res* 1995; 12: 1019-1024.
- Uchegbu IF, Vyas SP. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *Int J Pharm* 1998; 172: 33-70.
- Uchegbu IF, Schatzlein A, Vanlerberghe G, Morgatini N, Florence AT. Polyhedral Non-ionic Surfactant Vesicles. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49(6): 606-610.
- Uchegbu IF, Double JA, Kelland LR, Turton JA, Florence AT. The activity of doxorubicin niosomes against an ovarian cancer cell line and three in vivo mouse tumour models. *J Drug Target* 1996; 3(5): 399-409.
- Unezaki S, Maruyama K, Ishida O, Suganaka A, Hosoda J, Iwatsuru M. Enhanced tumour targeting and improved antitumour activity of doxorubicin by long circulating liposomes containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Int J Pharm* 1995; 126: 41-48.
- Van Hal D, Van Rensen A, de Vringer T, Junginger H, Bouwstra J. Diffusion of estradiol from non-ionic surfactant vesicles through human stratum corneum *in vitro*. *STP Pharma Sci* 1996; 6: 72-78.
- Vyas SP, Mysore N, Jaitely V, Venkatesan N. Discoidal niosome based controlled ocular delivery of timolol maleate. *Pharmazie* 1998; 53: 466-469.
- Yasin MN, Hussain S, Malik F, *et al.* Preparation and characterization of chloramphenicol niosomes and comparison with chloramphenicol eye drops (0.5%w/v) in experimental conjunctivitis in albino rabbits. *Pak J Pharm Sci* 2012; 25(1): 117-121.
- Yoshioka T, Sternberg B, Florence AT. Preparation and properties of Vesicles (Niosomes) of sorbitan monoesters (Span-20, Span-40, Span-60 and Span-80) and a Sorbitan Triester (Span-85). *Int J Pharm* 1994; 105:1-6.
- Yoshida H, Lehr CM, Kok W, Junginger HE, Verhoef JC, Bouwstra JA. Niosomes for oral delivery of peptide drugs. *J Control Rel* 1992; 21: 145-153.