การพัฒนาอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมในรูปผงแห้ง

นางสาว พรพรรณ บานเย็น
นาย วิทยา นาคาชน

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2549

DEVELOPMENT OF ACYCLOVIR PROLIPOSOMAL DRY POWDER

MISS PORNPAN BANYEAN
MR. WITTAYA NAKACHON

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFIMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ

เรื่อง การพัฒนาอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมในรูปผงแห้ง

.....

(นางสาวพรพรรณ บานเย็น)

.....

(นายวิทยา นาคาชน)

.....

(ศ.ดร. ณรงค์ สาริสุต)

อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อ
การพัฒนาอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมในรูปผงแห้ง

พรพรรณ บานเย็น, วิทยา นาคาชน
อาจารย์ที่ปรึกษา: ณรงค์ สาริสุต*
*ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ: อะซัยโคลเวีย, โปรไลโปโซม, ไลโปโซม, แกรนูล, ยาเม็ด

ไลโปโซม สามารถทำหน้าที่เป็น "ระบบนำส่งยาตรงเป้า" (drug targeting) อย่างเฉพาะเจาะจงได้ แต่มีปัญหาทางด้านความคงตัวทั้งทางเคมีและกายภาพ ซึ่งการนำมาเตรียมในรูปแบบของโปรไลโปโซมจะช่วยแก้ปัญหาความคงตัวของไลโปโซมได้ ในการพัฒนาอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมในรูปผงแห้งนี้ทำโดยการเตรียมแกรนูลอะซัยโคลเวีย ซึ่งมีอัตราส่วนของอะซัยโคลเวียและแมนนิทอล เท่ากับ 1:1 และ 1:3 แล้วทำการเคลือบด้วยส่วนผสมของฟอสฟาติดิลโคลีนและโคเลสเตอรอล ในอัตราส่วน 5:5 และ 7:3 ในสารละลายไดคลอโรมีเทน ทำโดยค่อยๆ ฉีดพ่นสารละลายลงบนแกรนูลซึ่งกลิ้งอยู่ในหม้อเคลือบแก้วที่ติดไว้กับเครื่องเคลือบยาเม็ดที่หมุนรอบตลอดเวลา แล้วทิ้งให้สารละลายที่เคลือบแห้ง จากผลการทดลอง พบว่า ลักษณะภายนอกของโปรไลโปโซมแกรนูลตำรับที่มีปริมาณฟอสฟาติดิลโคลีนและโคเลสเตอรอล เท่ากับ 7:3 (ตำรับที่ 3 และ 4) มีลักษณะค่อนข้างเหนียว แกรนูลมักเกาะกลุ่มรวมกัน มีค่า % compressibility เท่ากับ 6.67 % และ 10.00 % ตามลำดับ ส่วนตำรับที่มีปริมาณฟอสฟาติดิลโคลีนและโคเลสเตอรอล เท่ากับ 5:5 (ตำรับที่ 1 และ 2) สามารถไหลได้ดี มีค่า % compressibility เท่ากับ 2.22 % และ 2.22 % ตามลำดับ เมื่อนำโปรไลโปโซมแต่ละตำรับไปไฮเดรทด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 จะได้ไลโปโซมที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีลักษณะเป็นถุงกลมขนาดเล็ก จากการประเมินคุณสมบัติของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่ได้พบว่า ตำรับที่ 1 และ 2 มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าตำรับที่ 3 และ 4 สำหรับประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของตำรับที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 23.88 %, 23.07 %, 32.87 % และ 15.75 % ตามลำดับ จากนั้นนำโปรไลโปโซมแกรนูลตำรับที่ 3 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาสูงที่สุดมาทำการตอกเม็ดและตรวจสอบคุณสมบัติของยาเม็ด ได้แก่ น้ำหนัก, ความหนา, เวลาในการแตกตัว และนำมาไฮเดรท เพื่อหาประสิทธิภาพในการกักเก็บ พบว่ามีค่า เท่ากับ 19.50 % ซึ่งต่ำกว่าโปรไลโปโซมแกรนูล

Abstract

Development of acyclovir proliposomal dry powder

Pornpan Panyean, Wittaya Nakachon

Project advisor: Narong Sarisuta*

*Department of Manufacturing Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: Acyclovir, Proliposomes, Liposomes, Granules, Tablets

Liposomes have been well recognized as drug targeting system that could be specifically directed to target sites but suffered from their chemical and physical instability. Preparation in the form of proliposomes has been proposed to avoid such problems. In this study acyclovir proliposomes dry powder were manufactured by first preparing the acyclovir granules with acyclovir to mannitol ratios of 1:1 and 1:3, and then coating with solution of phosphatidylcholine (PC) and cholesterol (CHOL) mixture at ratios of 5:5 and 7:3 in rotating granules in a glass pan mounted on the rotating coating machine with drying air. It was found that physical appearance of proliposome granules with PC to CHOL ratio of 7:3 (formulation 3 and 4) are tacky and aggregated, having % compressibility of 6.67 % and 10.00 %, respectively. In the case of proliposome granules with PC to CHOL ratio of 5:5 (formulation 1 and 2) possessed good flowability with % compressibility of 2.22 % and 2.22 %, respectively. Hydration of all formulation of proliposomes with phosphate buffer pH 6.8 resulted in colloidal dispersions, which exhibited microscopic vesicular structure by examination under microscope. Physicochemical characterization of acyclovir liposomes revealed that formulations 1 and 2 possessed particle sizes larger than formulations 3 and 4. Trapping efficiencies of formulations 1, 2, 3 and 4 were 23.88 %, 23.07 %, 32.87 % and 15.57 %, respectively. The proliposome granules with the maximum trapping efficiency, formulation 3, were selected to be compressed into tablets and subject to physical testing such as weight, thickness and disintegration time. Liposomes obtained by hydration of proliposome tablets were found to have lower trapping efficiency at 19.50% as compared to those of granules.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมายได้ด้วยความช่วยเหลือและให้คำแนะนำจาก ศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ สาริสุต ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยมหิดล นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือจากนักศึกษาปริญญาโท-เอก ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรมทุกท่าน ในการให้คำแนะนำและแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำโครงการพิเศษนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเภสัชอุตสาหกรรม ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ จึงใคร่ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

พรพรรณ บานเย็น

วิทยา นาคาชน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	3
วัสดุและวิธีการวิจัย	15
วิธีการดำเนินงาน	16
ผลการวิจัย	22
วิจารณ์ผลการวิจัย	36
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการออกแบบสูตรตำรับอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม	16
2	แสดง % Compressibility และ ค่าความพรุนของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวีย	23
3	แสดงปริมาณอะซัยโคลเวียที่กักเก็บในไลโปโซมซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอลเท่ากับ 1:1 และ 1:3	28
4	การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ1 : 3 และ เลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3	31
5	น้ำหนัก, ความหนา และ เวลาที่ใช้ในการแตกตัวของยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม	35

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของไลโปโซมชนิด multilamellar แสดงให้เห็นชั้น lipid bilayers สลับกับชั้นของน้ำซึ่งเห็นเป็นส่วนทึบแสงในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	4
2	ภาพวาดแสดงตำแหน่งต่าง ๆ ที่สารหรือตัวยาจะสามารถถูกกักได้ในไลโปโซมชนิด multilamellar	5
3	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นลักษณะถุงเล็ก ๆ (vesicles) ของไลโปโซม	6
4	แผนภาพหน้าตัดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของไลโปโซมชนิด multilamellar แสดงโครงสร้างเมมเบรน 2 ชั้น (lipid bilayers)	7
5	ภาพวาดแสดงเครื่องมือสำหรับเตรียมอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมแกรนูล	17
6	ภาพแสดงลักษณะทางกายภาพของแกรนูลโปรไลโปโซม (physical appearance). (A) ตำรับที่ 1, (B) ตำรับที่ 2, (C) ตำรับที่ 3 และ(D) ตำรับที่ 4.	22
7	ภาพแสดงลักษณะภายนอก (microscopic appearance) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซม. (A) ตำรับที่ 1, (B) ตำรับที่ 2, (C) ตำรับที่ 3 และ(D) ตำรับที่ 4.	25
8	กราฟมาตรฐานของอะซัยโคลเวียในน้ำกลั่นที่ความยาวคลื่น 251 นาโนเมตร	26
9	กราฟแสดงปริมาณยาทั้งหมด (drug content) ของไลโปโซมทั้ง 4 ตำรับ	27
10	กราฟแสดงประสิทธิภาพในการกักเก็บ (trapping efficiency) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซมเฉลี่ยโดยวิธีโปรไลโปโซม ซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ 1 : 3	29
11	กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ 1 : 3	32

12 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วน อะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1:1 และ 1:3 33

สัญลักษณ์ และ คำย่อ

AC	=	อะซัยโคลเวีย
°C	=	องศาเซลเซียส
CHOL	=	โคเลสเตอรอล
g	=	กรัม
MAN	=	แมนนิทอล
mcg	=	ไมโครกรัม
mg	=	มิลลิกรัม
min	=	นาที
ml	=	มิลลิลิตร
nm	=	นาโนเมตร
PC	=	ฟอสฟาติดิลโคลีน
rpm	=	รอบต่อนาที
λ	=	ความยาวคลื่น

บทนำ

อะซัยโคลเวีย (Acyclovir) คือ ยาต้านไวรัสที่เป็น acyclic analogue ของ deoxyguanosine (1) ซึ่งเป็นส่วนประกอบตามปกติของ deoxyribonucleic acid หรือ DNA ซึ่งนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจาก herpes simplex, varcella zoster, cytomegalo virus และ Epstein Barr virus รูปแบบของอะซัยโคลเวียที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ชนิดขี้ผึ้งป้ายตา ชนิดครีมทาผิวหนัง ชนิดเม็ด และชนิดหยดเข้าหลอดเลือดดำ โดยเฉพาะรูปแบบของยารับประทาน การดูดซึมอะซัยโคลเวียจากทางเดินอาหารมีความแปรผันและไม่สมบูรณ์โดยมีการดูดซึมประมาณ 10-30% จากขนาดยาที่รับประทาน (2) ซึ่งยาในรูปแบบดังกล่าวจะต้องใช้หลายครั้งต่อวันจึงจะได้ระดับความเข้มข้นของยาอยู่ในช่วงที่รักษา(therapeutic range) แต่ก็ไม่จำเป็นเสมอไปว่าระดับยาในอวัยวะที่เกิดพยาธิสภาพจะคงที่และมีปริมาณเพียงพอจะรักษาพยาธิสภาพบริเวณนั้นๆได้ นอกจากนี้ยังมีการกระจายของยาไปยังอวัยวะที่ปกติด้วย หากมีสารที่ทำหน้าที่เป็นระบบนำส่งยา (drug delivery system) ที่สามารถนำส่งหรือพายาไปสู่เป้าหมายที่ต้องการอย่างเฉพาะเจาะจงได้ ซึ่งอาจเป็นเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะส่วนต่างๆยังผลให้ตัวยาออกฤทธิ์โดยตรงต่อส่วนดังกล่าวก็จะเป็นการขจัดปัญหาที่กล่าวแล้วข้างต้น ทั้งยังช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันได้มีการค้นพบว่าไลโปโซม (liposomes) สามารถทำหน้าที่เป็น “ระบบนำส่งยาตรงเป้า” (drug targeting) ไลโปโซม คือ อนุภาคเล็ก ๆ หรือ ถุงเล็ก ๆ (vessicle) ที่เกิดการเรียงตัวเป็นโครงสร้างของเมมเบรน 2 ชั้น (phospholipids bilayer membranes) โดยธรรมชาติหุ้มล้อมรอบส่วนที่เป็นน้ำหรือสารละลายไว้ภายใน โดยทั่วไปมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.025-10 ไมโครเมตร เมมเบรนที่หุ้มมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเมมเบรนของเซลล์ตามธรรมชาติ ไลโปโซมเตรียมจากสารพวกไขมันที่มีในธรรมชาติ ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษและสามารถถูกเมตาบอไลท์หรือกำจัดได้ในร่างกาย แม้ว่าไลโปโซมจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ แต่ตัวไลโปโซมเองก็มีปัญหาทางด้านความคงตัวทางเคมีกายภาพ (physiochemical stability) เช่น aggregration, sedimentation, fusion, phospholipid hydrolysis และ/หรือ oxidation ในการปรับปรุงปัญหาทางด้านความคงตัวของไลโปโซม Mayer et al.(1986) (3) และ Payne et al.(1986) (4) ได้เสนอวิธีใหม่ในการเตรียมไลโปโซมในรูปแบบของโปรไลโปโซม โปรไลโปโซม คือ ผงแกรนูลแห้ง ไหลได้ดี ซึ่งหลังจากเติมน้ำผงแห้งนี้จะกลายเป็นสารแขวนลอยของไลโปโซม (liposomal suspension) ดังนั้นการพัฒนาอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมในรูปผงแห้งจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนารูปแบบยาใหม่ซึ่งน่าจะเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสดังกล่าว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตั้งตำรับและทดลองเตรียมอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมในรูปผงแห้ง
2. เพื่อประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรไลโปโซมที่เตรียมได้ เช่น การกระจายขนาดอนุภาค,ปริมาณยาที่กักเก็บ เป็นต้น
3. เพื่อทดลองนำอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมที่เตรียมในรูปผงแห้งไปเตรียมในรูปยาเม็ด/แคปซูลเพื่อใช้รับประทาน

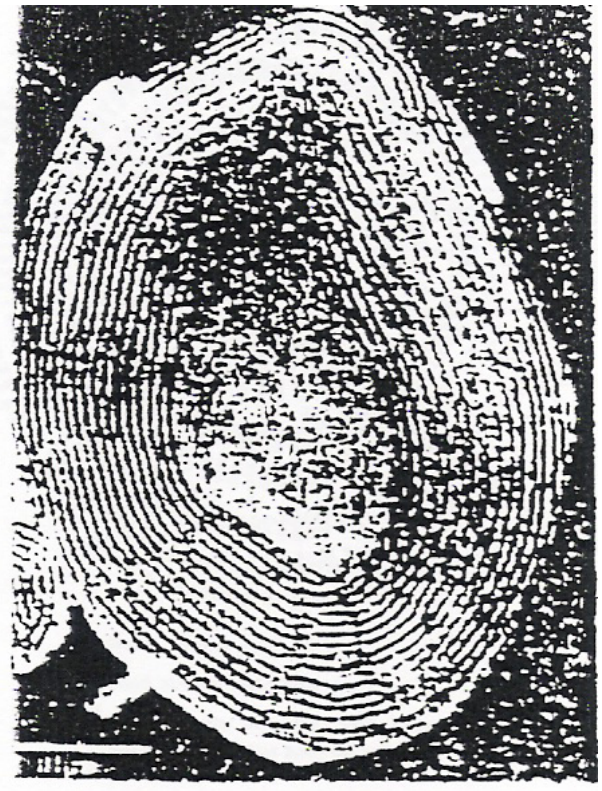
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตโปรไลโปโซมที่สามารถช่วยแก้ปัญหาทางความคงตัวทางเคมีกายภาพของไลโปโซมได้ และมีคุณสมบัติต่าง ๆ ถูกต้องตามต้องการ
2. สามารถนำข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษา เพื่อหาแนวทางในการพัฒนาตำรับยาต่อไป

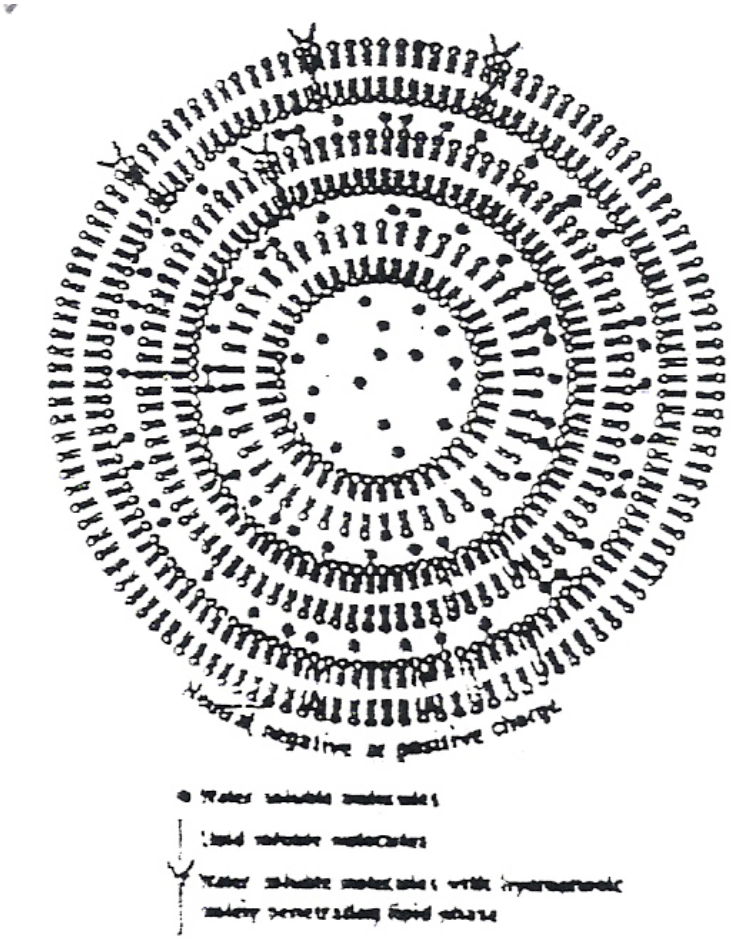
ทบทวนวรรณกรรม

ลักษณะของไลโปโซม

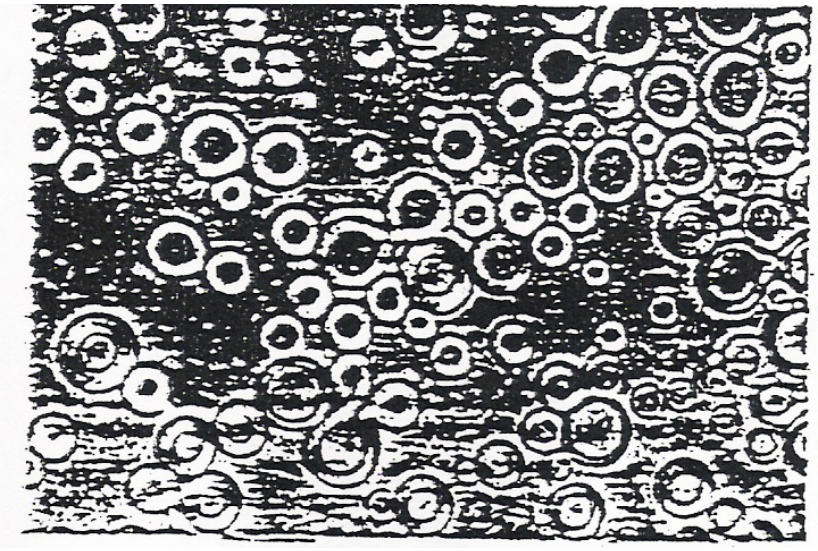
ไลโปโซม คือ อนุภาคกลมเล็ก ๆ หรือถุงเล็ก ๆ (vesicles) ที่เกิดจากการเรียงตัวเป็นโครงสร้างเมมเบรน 2 ชั้น (phospholipid bilayer membranes) โดยธรรมชาติหุ้มล้อมรอบส่วนที่เป็นน้ำหรือสารละลายไว้ภายใน โดยทั่วไปมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.025 – 10 ไมครอน เมมเบรนที่หุ้มอยู่มีความหนาเพียง 2 ชั้น และมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเมมเบรนตามธรรมชาติ ไลโปโซมเตรียมได้จากสารที่ไม่เป็นพิษ และสามารถถูกทำลายได้ในร่างกาย สารที่ใช้เตรียมไลโปโซมเป็นพวกไขมันที่มีในธรรมชาติ และสามารถถูกเมตาบอไลท์หรือกำจัดได้ในร่างกายไลโปโซมที่เตรียมขึ้นมีลักษณะเป็นพวกคอลลอยด์ (colloids) เมื่อฉีดเข้าร่างกายส่วนใหญ่จะถูกดักจับโดยระบบของ reticuloendothelial systems ในตับ ม้าม ปอด และไขกระดูก และจะปล่อยตัวยาออกมาแสดงฤทธิ์ได้ (5) รูปที่ 1 คือภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของไลโปโซมชนิด multilamllar แสดงให้เห็นชั้น lipid bilayers สลับกับชั้นของน้ำซึ่งเห็นเป็นส่วนทึบแสงในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (6) รูปที่ 2 คือภาพวาดแสดงตำแหน่งต่าง ๆ ที่สารหรือตัวยาจะสามารถถูกักได้ในไลโปโซมชนิด multilamellar (7) รูปที่ 3 คือภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์นำแสดงให้เห็นลักษณะถุงเล็ก ๆ (vesicles) ของไลโปโซม (6) รูปที่ 4 แผนภาพหน้าตัดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของไลโปโซมชนิด multilamellar แสดงโครงสร้างเมมเบรน 2 ชั้น (lipid bilayer) (8)



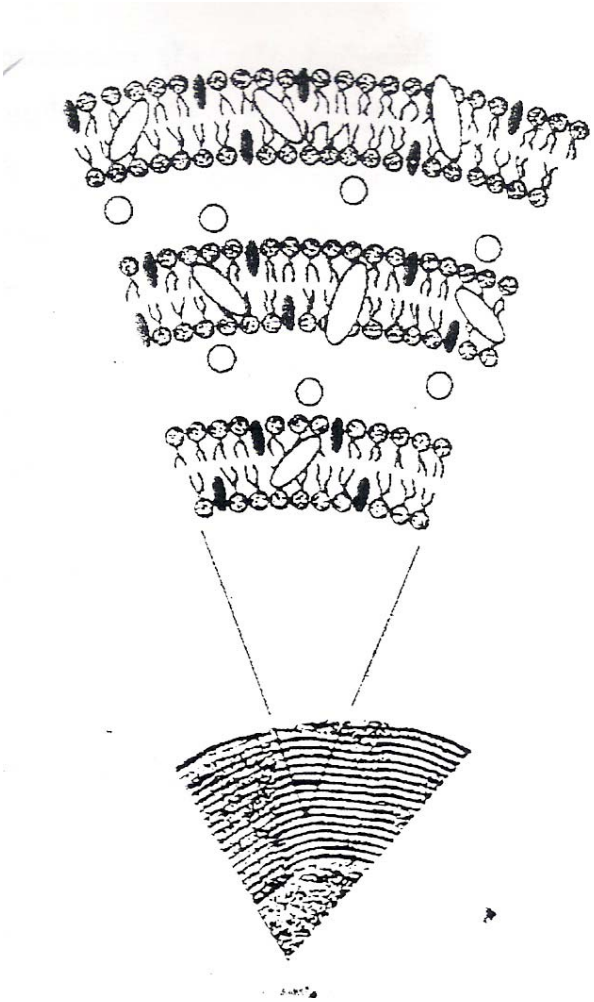
รูปที่ 1 คือภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของไลโปโซมชนิด multilamellar แสดงให้เห็นชั้น lipid bilayers สลับกับชั้นของน้ำซึ่งเห็นเป็นส่วนทึบแสงในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (6)



รูปที่ 2 คือภาพวาดแสดงตำแหน่งต่าง ๆ ที่สารหรือตัวยาจะสามารถถูกกักได้ในไลโปโซมชนิด multilamellar (7)



รูปที่ 3 คือ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นลักษณะถุงเล็ก ๆ (vesicles) ของไลโปโซม (6)



รูปที่ 4 คือ แผนภาพหน้าตัดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของไลโปโซมชนิด multilamellar แสดงโครงสร้างเมมเบรน 2 ชั้น (lipid bilayers) (8)

○ คือ ตัวยาที่ถูกกักเก็บอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำ

● คือ โมเลกุล cholesterol ที่แทรกอยู่ในเมมเบรน

⬭ คือ ตัวยาที่ละลายได้ในเมมเบรนและแทรกอยู่ในเมมเบรน

การเกิดไลโปโซมและประโยชน์ของไลโปโซม (9,10)

การที่ phospholipids เกิดการเรียงตัวเป็นถุงกลมขนาดเล็กหุ้มของเหลวไว้ภายในได้เอง ตามธรรมชาติเมื่อผสมกับน้ำ เนื่องจากโมเลกุลมีลักษณะเป็น amphiphiles ประกอบด้วยส่วนหัวที่ชอบน้ำและมีขั้ว (hydrophilic polar headgroups) และส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำและไม่มีขั้ว (hydrophobic non polar-fatty chains) เมื่อปริมาณความเข้มข้นของ phospholipids ที่มากพอผสมกับน้ำ ส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำจะรวมเป็นกลุ่มเข้าหากันและไล่น้ำออกไป ในขณะที่ส่วนหัวที่ชอบน้ำจะยึดเกาะกับน้ำ ผลที่ได้คือ จะเกิดการเรียงตัวกันของโมเลกุล phospholipids เป็นเมมเบรน 2 ชั้น ส่วนหางของ fatty acid หันเข้าหากันและอยู่ภายในเมมเบรน และส่วนหัวที่มีขั้วจะหันออกด้านนอก กลุ่มมีหัวที่ผิวด้านหนึ่งของเมมเบรนจึงชี้ไปยังไลโปโซมและกลุ่มมีหัวที่ผิวอีกด้านหนึ่งของเมมเบรนชี้ออกสู่บริเวณภายนอกที่ล้อมรอบ คุณลักษณะพิเศษในการเกิดปฏิกิริยากับน้ำของ phospholipids นี้เองที่สามารถทำให้กักเก็บยาไว้ได้ภายในไลโปโซม นอกจากนี้ ยังพบว่าไลโปโซมที่เตรียมได้จาก phospholipids ไม่ทำให้เกิดการแพ้ เพราะมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับเซลล์เมม-เบรนของมนุษย์ (biological membranes) สำหรับตัวยาที่ไม่คงตัวเนื่องจากอาจถูกทำลาย หรือถูกย่อยในน้ำย่อยในเลือดหรือในเนื้อเยื่อนั้น ก็สามารถป้องกันได้เมื่อตัวยาถูกกักเก็บอยู่ในไลโป-โซม

ไลโปโซมได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมมากมาย โดยใช้เป็นระบบนำส่งตัวยาในการรักษาโรคต่าง ๆ หลายชนิด เช่น การรักษาโรคติดเชื้อโดยใช้ยาปฏิชีวนะ และยาต้านจุลชีพ, การรักษาโรคพยาธิติดเชื้อในตับและม้าม (leishmaniasis), การใช้ไลโปโซมในทางภูมิคุ้มกัน (liposomal immunomodulators), การรักษาโรคโลหะเป็นพิษ โดยใช้สารประเภท chelating agents, การผลิต insulin ชนิดรับประทาน และการรักษาโรคมะเร็ง

ข้อดีของไลโปโซม

ไลโปโซมมีข้อได้เปรียบหลายประการในการใช้เป็นระบบนำส่งยา

1. ไลโปโซมไม่มีพิษ ทั้งนี้เนื่องจากไลโปโซมเตรียมจากสารพวกไขมันที่มีในธรรมชาติและสามารถถูกเมตาบอไลท์ หรือกำจัดได้ในร่างกาย ดังนั้นจึงไม่เป็นอันตรายและไม่ทำให้เกิดอาการแพ้เมื่อเข้าสู่ร่างกาย อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาพบว่าถ้าใช้สารไขมันที่ไม่บริสุทธิ์

หรือที่อาจทำให้เกิดอาการแพ้ในคนในการเตรียมไลโปโซมแล้วก็อาจจะทำให้คนไข้ที่ได้รับไลโปโซมนั้นเกิดอาการแพ้ได้

2. ไลโปโซมช่วยลดความเป็นพิษของสารที่ถูกกักเก็บ เนื่องจากการดัดแปลงคุณสมบัติของไลโปโซม โดยการเลือกส่วนประกอบไขมันที่เหมาะสม และลดขนาดของไลโปโซมจะสามารถควบคุมการกระจายตัวและการออกฤทธิ์ของไลโปโซมที่เตรียม เช่น การลดความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง หรือการลดการแพ้ของแบคทีเรีย หรือสารพิษที่ใช้ในการเตรียมวัคซีนเมื่อนำมากักเก็บในไลโปโซม เป็นต้น

3. สามารถดัดแปลงคุณสมบัติของไลโปโซมได้ง่าย โดยการเลือกส่วนประกอบของไขมันและเทคนิคหรือวิธีการเตรียมไลโปโซม ซึ่งจะทำให้ได้ไลโปโซมที่มีขนาดอนุภาคและประจุลบหรือบวก

4. ไลโปโซมช่วยเพิ่มความคงตัวของสารที่ถูกกักเก็บซึ่งจะช่วยป้องกันสารที่ถูกกักเก็บไว้ในไลโปโซม ไม่ว่าสารนั้นจะถูกเก็บในชั้นน้ำหรือชั้นไขมันของไลโปโซม โดยการป้องกันจากการถูกทำลายโดยสิ่งแวดล้อม เช่น กรด หรือน้ำย่อยในทางเดินอาหาร พบว่าไลโปโซมสามารถป้องกันยาหรือสารเคมีต่าง ๆ จากการถูกย่อยโดยเอนไซม์หรือน้ำย่อยในเลือดหรือเนื้อเยื่อได้

5. สามารถให้ไลโปโซมเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง เช่น การฉีดเข้าเส้นเลือดดำ ฉีดเข้ากล้าม ฉีดเข้าช่องท้อง การให้ทางปาก การสูดดมเข้าทางจมูกและปอด การใช้ทาผิวหนัง เป็นต้น

6. ไลโปโซมสามารถเก็บสารต่าง ๆ ได้หลายชนิด สารเหล่านี้อาจเป็นฮอร์โมน ยาต้านมะเร็ง ยาปฏิชีวนะ สารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ (cell modifying agents) ไวรัส แบคทีเรีย หรือยีน โดยไม่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับโครงสร้าง คือคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารหรือตัวยาที่จะนำมากักเก็บในไลโปโซม

7. ไลโปโซมมีคุณสมบัติเป็นสารช่วย (adjuvant) ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการเตรียมวัคซีนโดยช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน มีประสิทธิภาพดีในการเกิดภูมิคุ้มกันหลังฉีดด้วยวัคซีนที่เตรียมเป็นไลโปโซม

8. ไลโปโซมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารที่กักเก็บอยู่ภายใน และยาในรูปแบบไลโปโซมจะสามารถกระจายตัวออกจากบริเวณที่ฉีดได้มากกว่ายาที่มิได้อยู่ในรูปแบบไลโปโซม ทั้งนี้อาจเนื่องจากการที่ไลโปโซมเป็นส่วนประกอบของสารไขมันที่คล้ายคลึงกับสารไขมันในร่างกาย จึงสามารถกระจายตัวและถูกดูดซึมออกจากบริเวณที่ฉีดมากกว่า

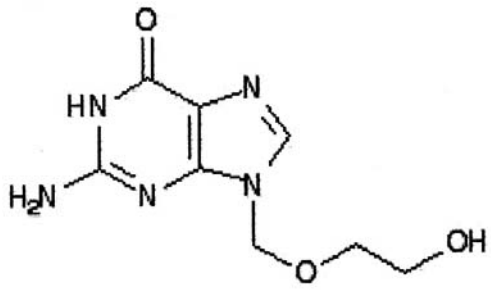
ลักษณะของโปรไลโปโซมและความสำคัญของการเตรียมโปรไลโปรโซมอะซัยโคลเวีย

โปรไลโปโซม คือ สารที่เป็นส่วนผสมของไขมันและองค์ประกอบอื่น ๆ ในลักษณะผงแกรนูลแห้งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ไหลได้ดี หลังเติมน้ำเพื่อกระจายหรือละลายผงแห้งนี้จะกลายเป็นสารแขวนลอย isotonic multilamellar liposomal suspension คอลลอยด์ของไลโปโซมที่เตรียมได้อาจมีปัญหาหลายประการ เช่น aggregation fusion และ phospholipids hydrolysis ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดของอายุไลโปโซม สามารถป้องกันปัญหาเหล่านี้โดยการเตรียมเป็นโปรไลโปโซม ซึ่งมีลักษณะเป็นผงแห้งสามารถเก็บบรรจุไว้ใน vials เมื่อต้องการใช้จึงนำมา reconstitute ด้วย water for injection จะเกิดเป็นไลโปโซมสามารถใช้ได้ทันที ในการเตรียมโปรไลโปโซม ควรเลือกสารที่มีคุณสมบัติละลายได้ดีในน้ำเพื่อให้ง่ายต่อการ hydrate ไลโปโซม และไม่ควรละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อให้ง่ายต่อการเตรียม โดยทั่วไป สารที่นิยมใช้เป็นตัวพา (carrier material) คือ mannitol ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมดังกล่าว ทำการเคลือบผงตัวพาด้วยสารละลายของ phospholipids ทิ้งให้สารละลายที่เคลือบแห้งจะได้โปรไลโปโซม ที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง เมื่อนำมากระจายในน้ำหรือสารละลายเกิดเป็นไลโปโซม (isotonic multiamellar liposomal suspension) (4,6,11)

ยาต้านไวรัสอะซัยโคลเวียที่ใช้ในปัจจุบันอยู่ในรูปแบบขี้ผึ้งป้ายตา ครีมทาผิวหนัง ยาเม็ด และยาฉีดชนิดหยดเข้าหลอดเลือดดำ อย่างไรก็ตามโดยเฉพาะในรูปแบบยาเม็ดใช้รับประทานมีค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ของอะซัยโคลเวียมีความแปรปรวนสูงอยู่ในช่วงประมาณ 15-30% อะซัยโคลเวียที่เตรียมในรูปแบบใช้ภายนอกมีการซึมผ่านชั้นผิวหนังต่ำ และเนื่องจากขีดการละลาย (solubility) ของอะซัยโคลเวียมีค่าจำกัด คือประมาณ 1.4 mg/ml ณ อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ฉะนั้นถ้าเตรียมในรูปสารละลายอะซัยโคลเวียชนิดฉีด จะต้องใช้ตัวทำละลายที่มีค่า pH สูงมาก ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อหลอดเลือดได้ มีรายงานว่าไลโปโซมสามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมยาหลายชนิดผ่านทางเดินอาหารได้ ได้แก่ salmon calcitonin (12), silymarin (13) เป็นต้น

คุณสมบัติของสารที่ใช้ในการทดลอง (14,15)

1. Acyclovir

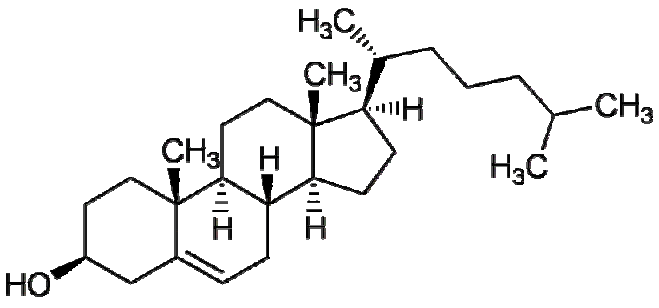


ชื่ออื่น : 6H-Purin-6-one,2-amino-1,9-dihydro-9-[(2-hydroxyethoxy)-methyl]- 9-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]guanine

มวลโมเลกุล : 225.20

ลักษณะยาและการละลาย : ผงผลึกสีขาวหรือค่อนข้างขาว ละลายในน้ำได้น้อยละลายได้ดีใน dimethylsulphoxide ละลายได้น้อยมากในแอลกอฮอล์ และทำให้เป็นสารละลายเจือจางได้ใน mineral acid และ alkali hydroxide

2. Cholesterol

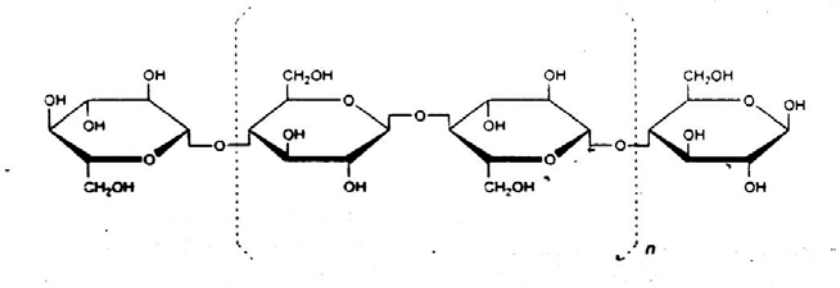


ชื่ออื่น : Cholcest – 5-en-3-ol,(3β)- Chlicest – 5 –en-3β-ol

มวลโมเลกุล : 386.65

ลักษณะยาและการละลาย : ผงผลึกสีขาวหรือค่อนข้างขาว ไม่ละลายน้ำ ละลายในacetone ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์และไวต่อแสง นิยมใช้เป็นสารก่ออีมัลชั่น

3. Cellulose, Microcrystalline

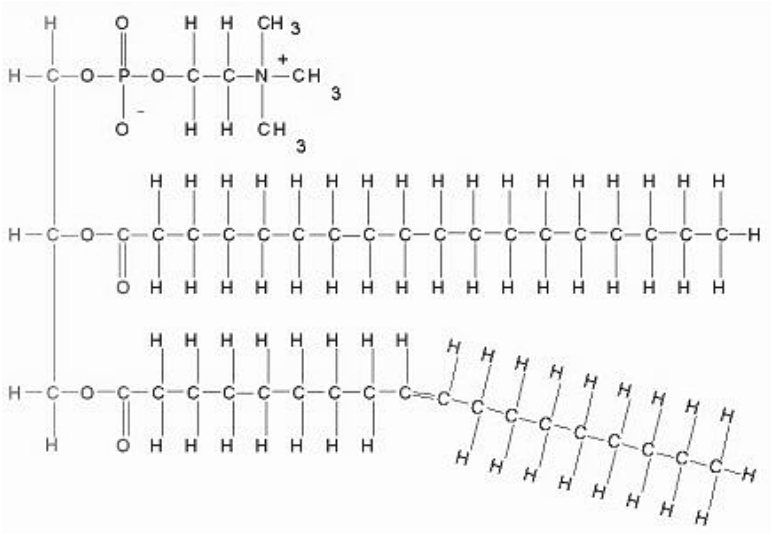


ชื่ออื่น : Avicel PH; Celex; Cellulose gel; Celphere; Ceolus KG; crystalline cellulose; E460; Emcocel; Ethispheres; Fibrocel; Pharmacel; Tobulose; Vivapur

มวลโมเลกุล : ~ 36,000

ลักษณะยาและการละลาย : ผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส เป็นผลอนุภาคที่มีรูพรุน ละลายได้เล็กน้อยใน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5% ไม่ละลายน้ำ, สารละลายกรดเจือจาง และตัวทำละลายอินทรีย์

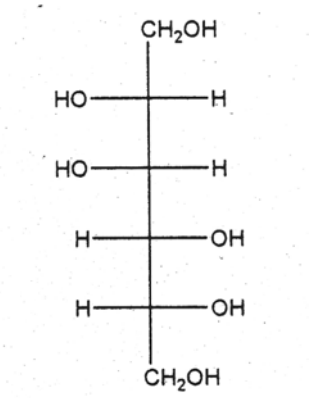
4. Lecithin



ชื่ออื่น : E322; egg lecithin; LSC; mixed soybean phosphatides; ovo-lecithin; Phosal 53 MCT; Phospholipon 100 H; soybean lecithin; soybean phospholipids; Sternpur; Sternwet; vegetable lecithin; Yollkin IP 4913

ลักษณะยาและการละลาย : เป็นสารละลายประกอบเชิงซ้อนซึ่งประกอบไปด้วย phosphatidylcholine เป็นส่วนประกอบหลัก มีลักษณะเป็น semi-liquids ที่ค่อนข้างเหนียว สีเหลืองอ่อน – น้ำตาล, ละลายได้ใน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน, mineral oil และ fatty acid ไม่ละลายในสารละลายที่มีขั้ว (polar solvent)

5. **Mannitol**

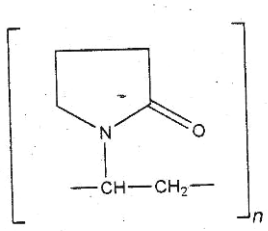


ชื่ออื่น : D-mannitol, Cordycepic acid; E421; manna sugar; D-mannite;
Mannogem; Pearlitol

มวลโมเลกุล : 182.17

ลักษณะยาและการละลาย : ผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสหวาน โดยมีความหวานเท่ากับกลูโคส และหวานเป็นครึ่งหนึ่งของซูโครส ละลายได้ดีในน้ำ ละลายได้น้อยมากในแอลกอฮอล์ และไม่ละลายในอีเทอร์

6. **Povidone**



ชื่ออื่น : E1201; Kollidon; Plasdone; poly[1-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)ethylene;
polyvidone; polyvinylpyroolidone; PVP; 1-vinyl-2-pyrrolidinone polymer

มวลโมเลกุล : ~ 50,000

ลักษณะยาและการละลาย : ผงละเอียดสีขาว – ครีม ไม่มีกลิ่น ดูดความชื้น (hygroscopic) ละลายได้ดีในสารละลายกรด คลอโรฟอร์ม เอทานอล คีโตน เมทานอล และน้ำ ไม่ละลายในอีเทอร์ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน และ mineral oil

7. Sodium lauryl sulphate (SLS)

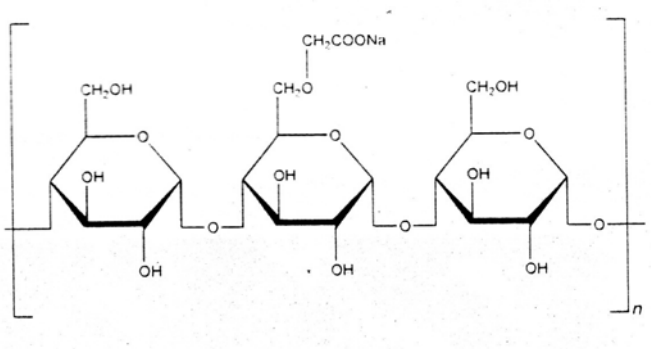
ชื่ออื่น : Sulfuric acid monododecyl ester sodium salt.

Sodium monododecyl sulphate

ลักษณะยาและการละลาย :ผงผลึกสีขาวหรือเหลืองอ่อน ละลายได้ดีในน้ำ ให้สารละลายสีเหลืองอ่อน ละลายได้บางส่วนในแอลกอฮอล์

เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภท detergent ซึ่งสามารถทำลายโครงสร้างของไลโปโซมโดยการละลายผนังไขมันสองชั้นของไลโปโซม ทำให้สามารถตรวจสอบวิเคราะห์ปริมาณยาที่กักเก็บอยู่ภายในไลโปโซมได้

8. Sodium Starch Glycolate



ชื่ออื่น : Carboxymethyl starch, sodium salt; Explotab; Primojel; Vivastar P.

มวลโมเลกุล : $5x10^5 – 1x10^6$

ลักษณะยาและการละลาย : ผงสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ไหลได้ดี ประกอบด้วยแกรนูลรูปไข่ หรือ กลม ละลายได้บ้างในเอทานอล ไม่ละลายน้ำ

วัสดุและวิธีการวิจัย

เคมีภัณฑ์

1. Acyclovir (Zhejiang Wuyi Pharmaceutical Factory, China)
2. Avicel PH 101
3. Cholesterol (Merck, Germany)
4. Dichloromethane (Lab Scan Asia Co., Ltd., Thailand)
5. Explotab
6. Lecithin (Union Chemical 1986 Co. Ltd., Thailand)
7. Mannitol
8. Magnesium stearate
9. Monobasic potassium phosphate (Famitalia Carlo ERBA, Italy)
10. PVP K-30
11. Sodium hydroxide (Famitalia Carlo ERBA, Italy)
12. Sodium lauryl sulphate (Srichand United Dispensaty,Thailand)

เครื่องมือ

1. Air compressor (PP-35, PUMA Industeial Co., Ltd., Taiwan)
2. Burette 50 ml
3. CKD Filter regulator W3000 (SM 16510, Sartorius, Germany)
4. Conventional coating pan
5. Microscopic, equipped with camera (Nikon® elipses E400, Nikon Instech Co., Ltd., Japan)
6. pH meter (model MP 220, Mettler Toledo, Switzerland)
7. Pneumatic air brush gun
8. Sieve No. 18 , No. 20
9. Spectrophotometer (DU® 650i spectrophotometer, Becman, USA)
10. Submicron particle analyzer model N4 MD (Coulter® model N4 MD, Coulter Corporate Communicate, USA)
11. Ultracentrifuge (Sorvall® RC-5C PLUS, Kendro Laboratory Products, USA)

วิธีการดำเนินงาน

1. การจัดเตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธีโปรไลโปโซม

จัดเตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับใช้เตรียมโปรไลโปโซม โดยประยุกต์ใช้เครื่องเคลือบยาเม็ด (conventional pan coater) ดังรูปที่ 5

2. ออกแบบสูตรตำรับโปรไลโปโซม

ในการทดลองนี้สารที่ใช้เป็นตัวพา (carrier material) คือ Granule ของ Mannitol และ Acyclovir ซึ่งมี PVP K-30 เป็น binder รายละเอียดส่วนประกอบของแกรนูล แมนนิทอลและอะซัยโคลเวีย และของ structural lipids แสดงในตารางที่ 1 structural lipids คือ เลซิตินและโคเลสเตอรอล ในอัตราส่วน 5:5 และ 7:3 และ hydration solution คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8

ตารางที่ 1 แสดงการออกแบบสูตรตำรับอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม

ตำรับที่	อะซัยโคลเวีย : แมนนิทอล	เลซิติน : โคเลสเตอรอล
1	1 : 1	5 : 5
2	1 : 3	5 : 5
3	1 : 1	7 : 3
4	1 : 3	7 : 3

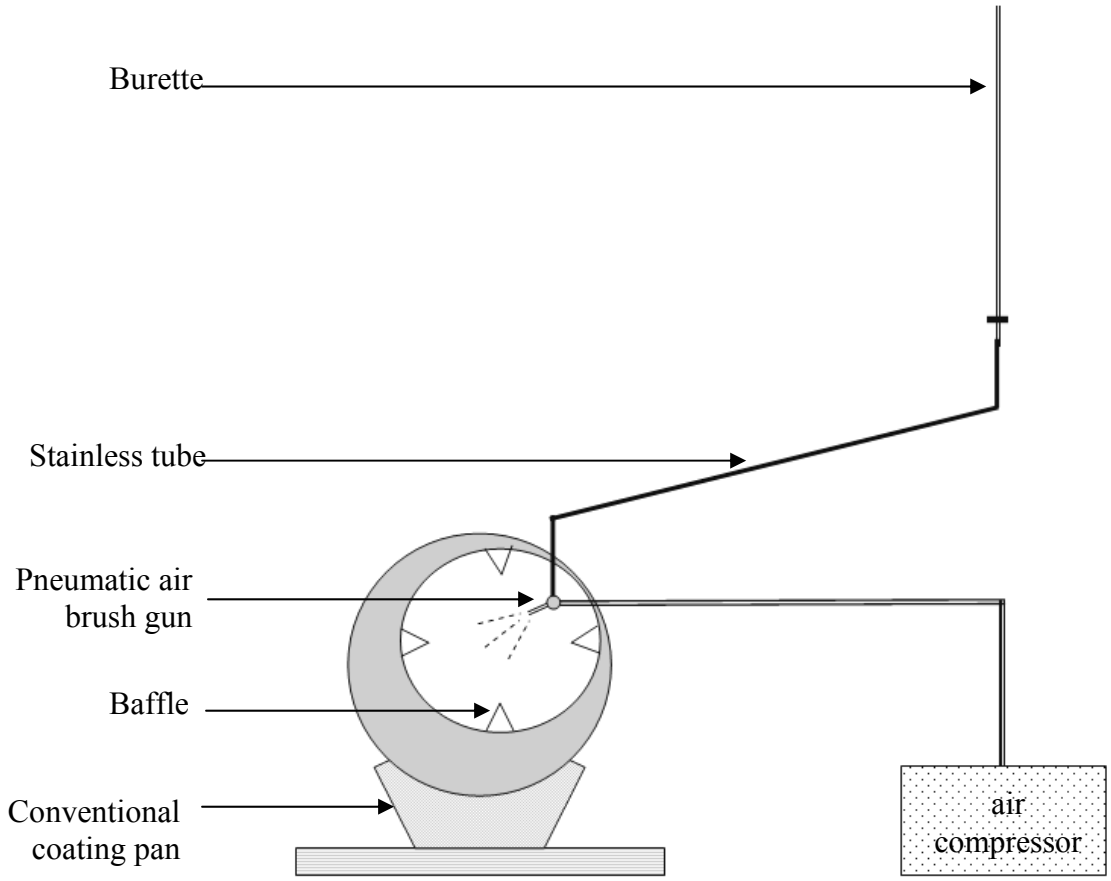
3. การเตรียมไลโปโซมอะซัยโคลเวียโดยวิธีโปรไลโปโซม

3.1. การเตรียมแกรนูล

3.1.1. ชั่งอะซัยโคลเวีย และแมนนิทอลตามอัตราส่วนตามที่กำหนดในแต่ละตำรับ

3.1.2. บดผสมให้เข้ากันโดยผสมอะซัยโคลเวีย และแมนนิทอลลงในโกร่งโดยวิธี geometric dilution

3.1.3. เตรียม PVP K-30 10% w/w ในน้ำ



รูปที่ 5 ภาพวาดแสดงเครื่องมือสำหรับเตรียมอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมแกรนูล

3.1.4. ค่อย ๆ เติมสารละลายยึดเกาะจาก (3.1.3) ลงใน (3.1.2) นวดให้เข้ากันจนได้เป็น damp mass

3.1.5. นำ damp mass ที่ได้ผ่านลงบนแร่งขนาด 18 mesh จะได้แกรนูลเปียก

3.1.6. นำแกรนูลเปียกไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอบประมาณ 2 ชั่วโมง

3.1.7. นำแกรนูลแห้งผ่านแร่งขนาด 18 mesh จากนั้นนำแกรนูลที่ได้ผ่านแร่งขนาด 20 mesh เพื่อกำจัดเศษผงออก

3.1.8. เก็บแกรนูลที่ค้างอยู่บนแร่งขนาด 20 mesh เพื่อนำไปเคลือบด้วย structural lipids

3.2. การเตรียมโปรไลโปโซมแกรนูล

3.2.1. นำเลซิติน และโคเลสเตอรอลในอัตราส่วนต่าง ๆ กันตามที่กำหนด (รวมใช้ structural lipids ทั้งหมด 5 กรัม) มาละลายในไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) จำนวน 50 มล.

3.2.2. ใช้ pneumatic air brush gun ฉีดพ่นสารละลายที่ได้ลงบนแกรนูลจำนวน 10 กรัม ซึ่งกลิ้งอยู่ในหม้อเคลือบแก้วที่หมุนรอบตลอดเวลาโดยประกอบเข้ากับเครื่อง conventional pan coater

3.2.3. ทิ้งไว้ให้สารละลายที่เคลือบระเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3. การเตรียมไลโปโซม

3.3.1. นำโปรไลโปโซมที่เตรียมได้ซึ่งมีปริมาณอะซัยโคลเวีย 200 ก. มากระจายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 จำนวน 100 มล. ใน shaker water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะได้ไลโปโซมที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์รวมทั้งหมด 4 ตำรับ

3.3.2. นำไลโปโซมที่ได้จำนวน 25 มล. มา centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 30 นาที

3.3.3. ดูด supernatant ทิ้ง เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 เพื่อล้างตะกอนและแยกยาที่ไม่ถูกกักเก็บ

3.3.4. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 20 นาที แล้วล้างตะกอนซ้ำจนครบ 4 ครั้ง

3.3.5. นำตะกอนไลโปโซมที่ได้มากระจายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8

3.3.6. บรรจุสารแขวนลอยไลโปโซมลงใน vial ขนาด 25 มล. แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การประเมินคุณสมบัติ (Characterization)

4.1. การประเมินคุณสมบัติของอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมแกรนูล

4.1.1. การตรวจสอบลักษณะทางกายภาย (Physical appearance)

ตรวจคุณลักษณะภายนอกของโปรไลโปโซมแกรนูลที่เตรียมได้ทั้ง 4 ตำรับ ด้วยตาเปล่า

4.1.2. % Compressibility (16)

นำโปรไลโปโซมแกรนูลที่เตรียมได้ในแต่ละตำรับมาหา bulk density และ tapped density โดยใช้เครื่อง jolting volumeter จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Compressibility} = \frac{(\text{tapped density} - \text{bulk density}) \times 100}{\text{tapped density}} \quad (1)$$

4.1.3. ความพรุนของแกรนูล (% Porosity)

นำโปรไลโปโซมแกรนูลที่เตรียมได้ในแต่ละตำรับมาหา bulk density และ true density โดยใช้ pycnometer (17) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Porosity} = \frac{(\text{true density} - \text{bulk density}) \times 100}{\text{true density}} \quad (2)$$

4.2. การประเมินคุณสมบัติของอะซัยโคลเวียไลโปโซม

4.2.1. การตรวจสอบคุณลักษณะภายนอก (Microscopic appearance)

ตรวจคุณลักษณะภายนอกของไลโปโซมที่ได้จากข้อ 3.3.6. โดยส่องกล้องจุลทรรศน์

4.2.2. ปริมาณยาทั้งหมด (drug content)

4.2.2.1. เตรียมกราฟมาตรฐานของอะซัยโคลเวียที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4, 6, 8, 10 และ 12 มคก./มล.

4.2.2.2. ละลายและเจือจางไลโปโซมที่ได้จากข้อ 3.3.1. ให้เป็น 200 เท่า ด้วยสารละลาย 2% sodium lauryl sulphate รวมทั้งหมด 4 ตำรับ

4.2.2.3. วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 251 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

4.2.2.4. นำค่า absorbance ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานอะซัย-โคลเวีย

ปริมาณยาทั้งหมด = ความเข้มข้นของอะซัยโคลเวีย x 100 x 200 (3)

4.2.3. ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา (Trapping efficiency)

4.2.3.1. ละลายและเจือจางตะกอนไลโปโซมที่ได้จากข้อ 3.3.6 ให้เป็น 100 เท่า ด้วยสารละลาย 2% sodium lauryl sulphate รวมทั้งหมด 4 ตำรับ

4.2.3.2. วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 251 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

ปริมาณยาที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม = ความเข้มข้นของอะซัยโคลเวีย x 100 x 25 x 4 (4)

$$\text{ประสิทธิภาพการกักเก็บตัวยา (\%)} = \frac{\text{ปริมาณยาที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม x 100}}{\text{ปริมาณยาทั้งหมด}} \quad (5)$$

4.2.4. การวัดขนาด (Particle size measurement)

ขนาดอนุภาคและการกระจายของขนาดอนุภาคไลโปโซมที่เตรียมได้วัดด้วยเครื่อง submicron particle analyzer model N4 MD

5. การเตรียมตำรับยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม

5.1. ตำรับยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม

5.1.1. เลือกตำรับอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บตัวยาดีที่สุดมาทำการตอกเป็นเม็ดดังสูตรตำรับต่อไปนี้

- อะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม (มีปริมาณอะซัยโคลเวีย 200 มล.)
- Explotab 10%
- Avicel PH 101 15%
- Magnesium stearate 1%

5.1.2. นำอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม, Explotab และ Avicel PH 101 มาผสมกัน หลังจากนั้นเติม magnesium stearate ตามปริมาณที่ระบุในตำรับ ผสมเป็นเวลา 2 นาที

5.1.3. นำส่วนผสมที่ได้ไปตอกเป็นเม็ดยาโดยใช้เครื่องตอกยาเม็ดชนิดสากเดียว EKO

5.1.4. ประเมินผล ความหนา (thickness), น้ำหนักยาเม็ด และเวลาที่ใช้ในการแตกตัวของยาเม็ด (disintegration time)

5.2. การเตรียมไลโปโซม

5.2.1. นำยาเม็ดที่เตรียมได้จากข้อ 5.1.3. มากระจายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 จำนวน 100 มล. ใน shaker water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะได้ไลโปโซมที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์

5.2.2. นำไลโปโซมที่เตรียมได้ ทำตามวิธีในข้อ 3.3.2. - 3.2.6.

5.3. การประเมินคุณสมบัติ (Characterization) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซม

5.3.1. ปริมาณยาทั้งหมด (Drug content) ตามวิธีในข้อ 4.2.2.

5.3.2. ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา (Trapping efficiency) ตามวิธีในข้อ 4.2.3.

5.3.3. การวัดขนาด (Particle size measurement) ตามวิธีในข้อ 4.2.4.

ผลการวิจัย

1. แกรนูลโปรไลโปโซม (Proliposome Granules)

1.1. การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ (Physical Appearance)

แกรนูลโปรไลโปโซมที่ผลิตขึ้นในแต่ละตำรับมีรูปร่างกลมรีเล็กน้อย เมื่อมองจากลักษณะภายนอก สำหรับตำรับที่ 1 และ 2 มีสีขาวนวล สามารถไหลได้ดี ส่วนตำรับที่ 3 และ 4 มีสีเหลืองอ่อน ค่อนข้างเหนียวและเกาะรวมกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 6

รูปที่ 6 ภาพแสดงลักษณะทางกายภาพของแกรนูลโปรไลโปโซม (physical appearance). (A) ตำรับที่ 1, (B) ตำรับที่ 2, (C) ตำรับที่ 3 และ(D) ตำรับที่ 4.

1.2. % Compressibility

ตารางที่ 2 แสดง % compressibility และ ค่าความพรุน (% porosity) ของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวียที่เตรียมได้ทั้ง 4 ตำรับ พบว่า ตำรับที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่า % compressibility เท่ากับ 2.22%, 2.22%, 6.67% และ 10.00% ตามลำดับ โดย % compressibility จะแปรผกผันกับ ความสามารถในการไหล (flowability) ดังนั้น ตำรับที่มีการไหลดีที่สุดคือตำรับที่ 1 และ 2 รองลงมาคือ ตำรับที่ 3 และ 4 ตามลำดับ แต่พบว่า % Compressibility ของตำรับที่ 3 และ 4 ก็ยังคงอยู่ในช่วงที่แสดงความสามารถในการไหลที่ดีอยู่ (16) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะพื้นผิวที่ค่อนข้างเหนียวของตำรับที่ 3 และ 4

1.3. **ค่าความพรุนของแกรนูล** (% Porosity)

จากตารางที่ 2 แสดง % compressibility และ ค่าความพรุนของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวีย จะเห็นได้ว่าทั้ง 4 ตำรับมีค่าความพรุนใกล้เคียงกัน โดยตำรับที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าความพรุน เท่ากับ 66.39%, 68.26%, 73.73% และ 62.98% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดง % Compressibility และ ค่าความพรุนของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวีย

ตำรับที่	% Compressibility	ค่าความพรุน (%)
1	2.22	66.39
2	2.22	68.26
3	6.67	73.73
4	10.00	62.98

2. ไลโปโซมอะซัยโคลเวีย

2.1. การตรวจสอบคุณลักษณะภายนอก (Microscopic Appearance)

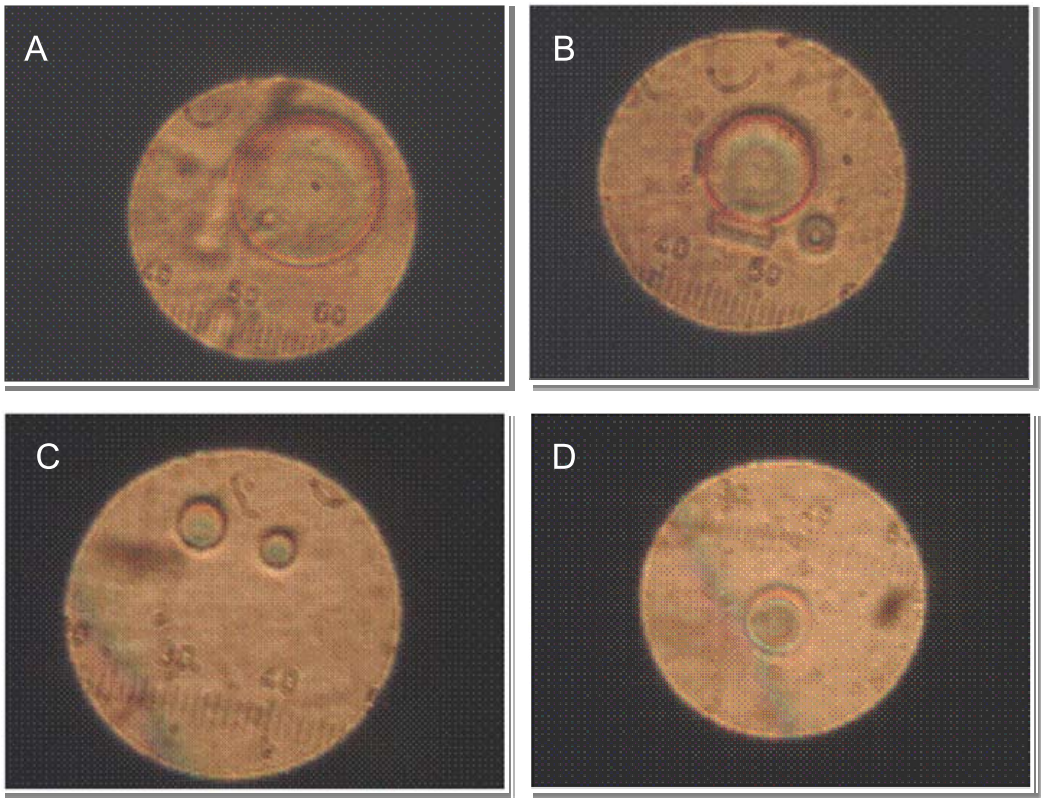
จากการตรวจสอบคุณลักษณะภายนอกของไลโปโซมโดยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นถุงอนุภาคกลมเล็ก ๆ (vesicles) ของไลโปโซมที่เกิดจากการเรียงตัวเป็นโครงสร้างเมนเบรน 2 ชั้น (phospholipids bilayers) และมีชั้นของเมนเบรนหลายชั้น (multilamellars vesicles) ดังแสดงในรูปที่ 7

2.2. ปริมาณยาทั้งหมด (Drug Content)

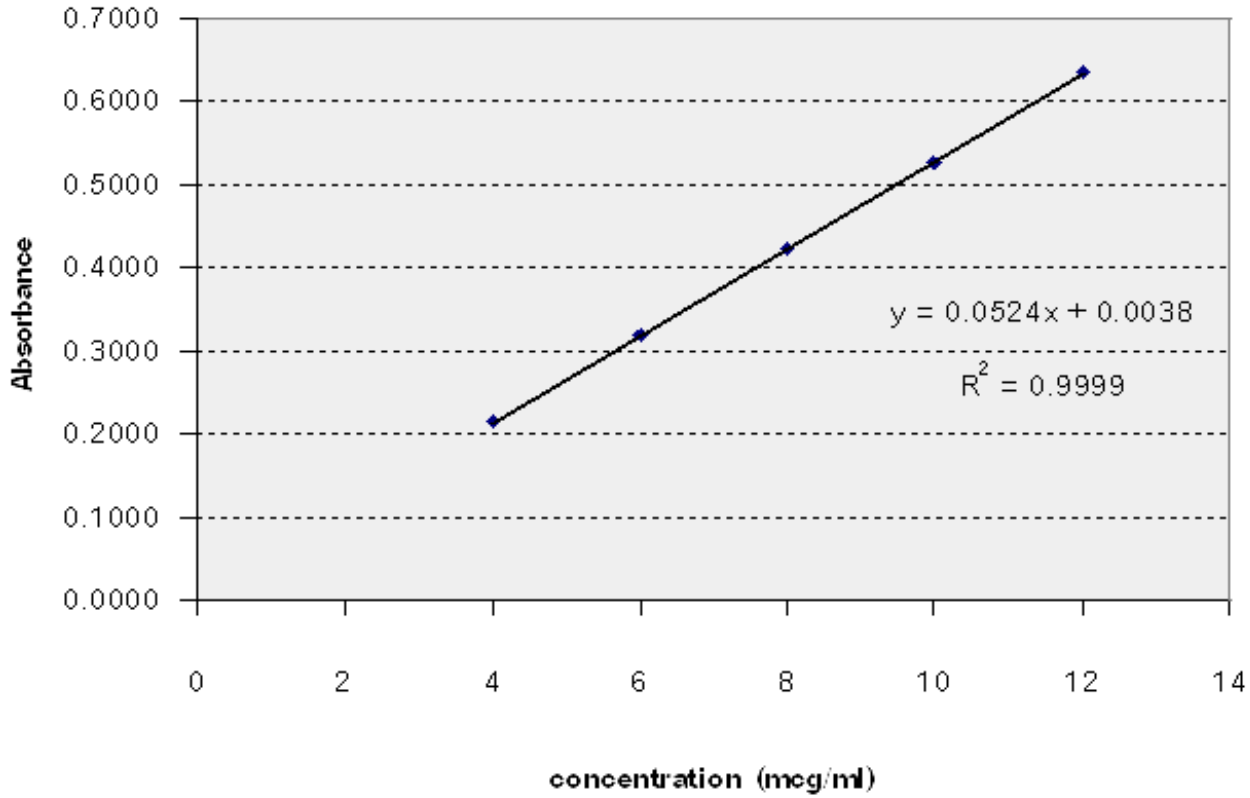
รูปที่ 8 คือ กราฟมาตรฐานของอะซัยโคลเวียในน้ำกลั่น ที่ความยาวคลื่น 251 นาโนเมตร และรูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณยาทั้งหมด (drug content) ของไลโปโซมทั้ง 4 ตำรับ พบว่า จากการชั่งแกรนูลโปรไลโปโซมในปริมาณที่เท่ากันทั้ง 3 ครั้ง โดยให้มีปริมาณอะซัยโคลเวีย 200 มก. เมื่อนำมากระจายตัวในน้ำ และนำมาหาปริมาณอะซัยโคลเวียที่มีอยู่ในแต่ละตำรับ ปริมาณอะซัยโคลเวียที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณอะซัยโคลเวียอยู่ในช่วง 198.2 – 232.2 มก.

2.3. ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา (Trapping Efficiency)

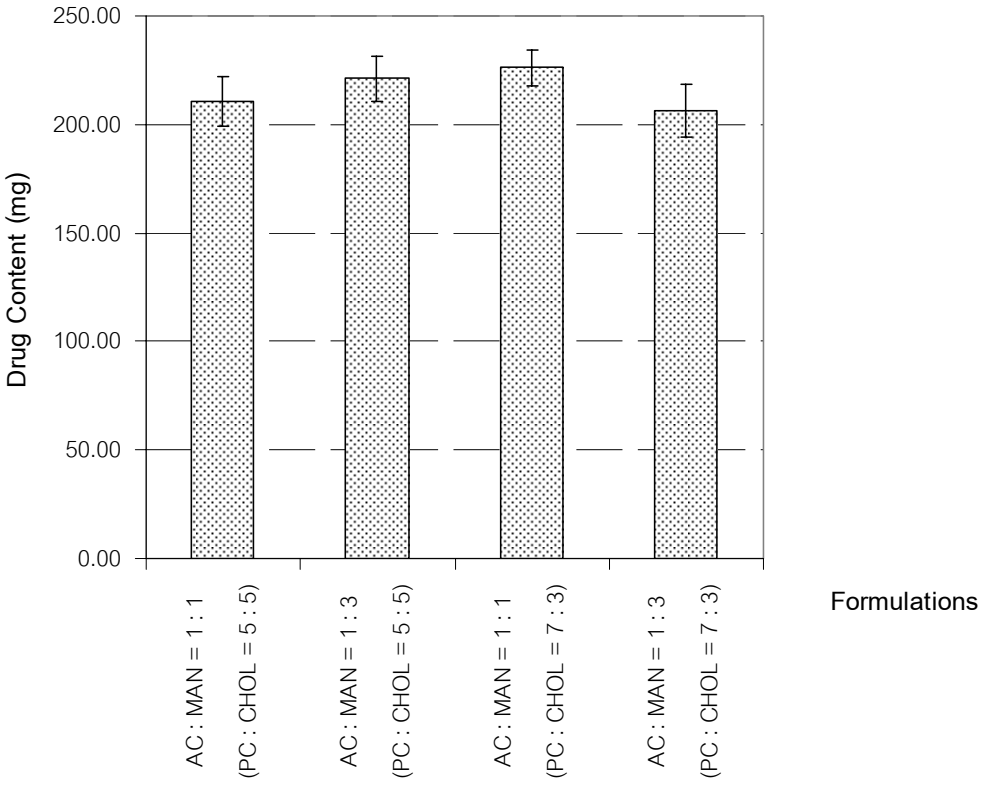
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณอะซัยโคลเวียที่กักเก็บในไลโปโซมซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอลเท่ากับ 1:1 และ 1:3 และรูปที่ 10 กราฟแสดงประสิทธิภาพในการกักเก็บ (trapping efficiency) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซมเฉลี่ยโดยวิธีโปรไลโปโซม ซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ 1 : 3 พบว่า ตำรับที่ 3 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 32.87% (SD=8.55) ส่วนตำรับที่ 1 และ 2 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยารองลงมา และกักเก็บได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 23.88% (SD=7.56), 23.07% (SD=2.70) ตามลำดับ ในขณะที่ตำรับที่ 4 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาต่ำที่สุด เท่ากับ 15.75% (SD=5.43)



รูปที่ 7 ภาพแสดงลักษณะภายนอก (microscopic appearance) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซม. (A) ตำรับที่ 1, (B) ตำรับที่ 2, (C) ตำรับที่ 3 และ(D) ตำรับที่ 4.



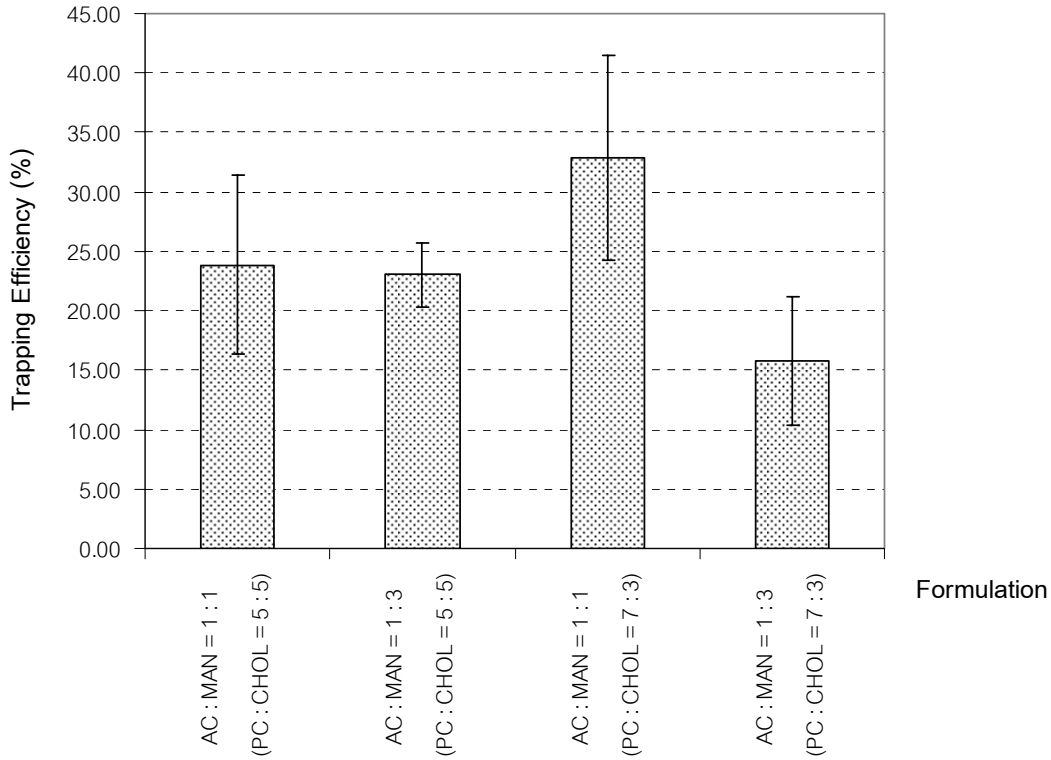
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของอะซัยโคลเวียในน้ำกลั่นที่ความยาวคลื่น 251 nm



รูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณยาทั้งหมด (drug content) ของไลโปโซมทั้ง 4 ตำรับ

ตารางที่ 3 ปริมาณอะซัยโคลเวียที่กักเก็บในไลโปโซมซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ1 : 3 และ เลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3

Formulations	Acyclovir : Mannitol	Lecithin : Cholesterol	Sampling No.	Absorbance At λ = 251 nm	Concentration (mcg/ml)	Trapping efficiency (%)	Mean	SD
1	1 : 1	5 : 5	1	0.1852	3.463	17.47	23.88	7.562
			2	0.2577	4.846	21.96		
			3	0.3640	6.874	32.22		
2	1 : 3	5 : 5	1	0.2860	5.386	25.43	23.07	2.698
			2	0.2351	4.413	20.13		
			3	0.2917	5.494	23.66		
3	1 : 1	7 : 3	1	-	-	-	32.87	8.554
			2	0.3271	6.171	26.82		
			3	0.4763	9.017	38.92		
4	1 : 3	7 : 3	1	-	-	-	15.75	5.434
			2	0.0682	1.229	11.91		
			3	0.2282	4.282	19.59		



รูปที่ 10 กราฟแสดงประสิทธิภาพในการกักเก็บ (trapping efficiency) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซมเฉลี่ยโดยวิธีโปรไลโปโซม ซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ 1 : 3

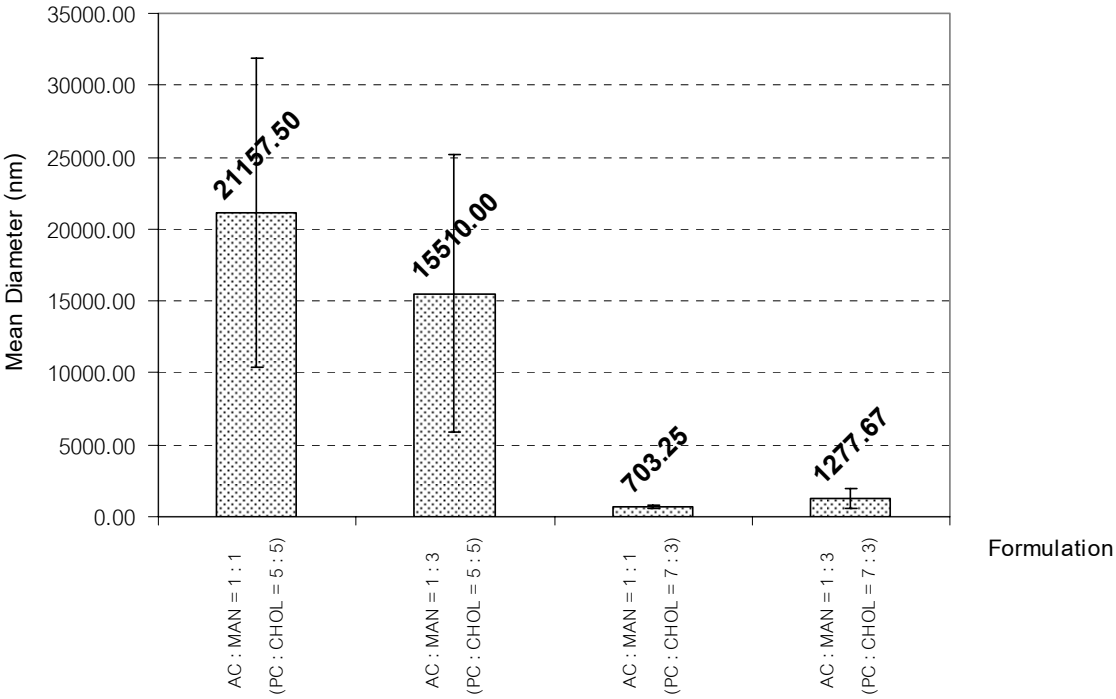
2.4. **การวัดขนาดอนุภาคไลโปโซม** (Particle Size Measurement)

ตารางที่ 4 และรูปที่ 11 แสดงการกระจายขนาดอนุภาคของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1:1 และ 1:3 พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่เตรียมได้จากตำรับที่ 1 ซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ เลซิทิน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเฉลี่ยใหญ่ที่สุด เท่ากับ 21,160 นาโนเมตร (SD=10,740 นาโนเมตร) และตำรับที่ 3 ซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ เลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 7 : 3 มีขนาดอนุภาคเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเล็กที่สุด เท่ากับ 703 นาโนเมตร (SD=111 นาโนเมตร) และยังพบว่าขนาดอนุภาคในตำรับที่ 3 และ 4 มีขนาดเล็กกว่าแตกต่างจากตำรับที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน

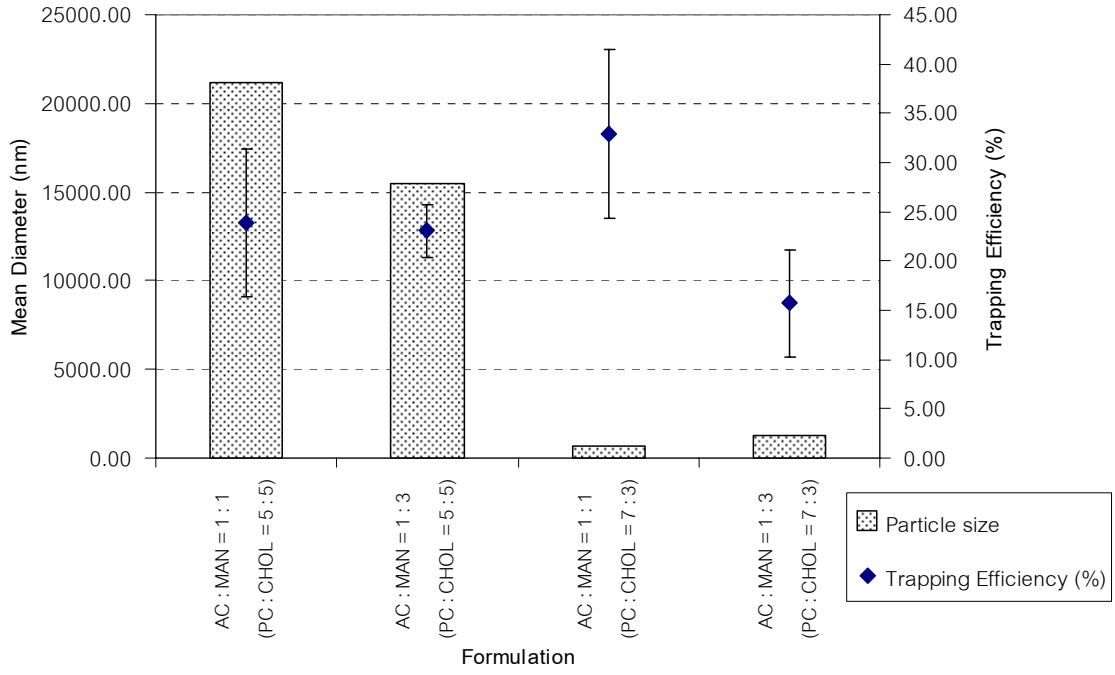
รูปที่ 12 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วน อะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1:1 และ 1:3 พบว่า อะซัยโคลเวียไลโปโซมที่เตรียมได้จากตำรับที่ 1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยใหญ่ที่สุด และใหญ่กว่าตำรับที่ 2 แต่ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของตำรับที่ 1 และตำรับที่ 2 ไม่แตกต่างกัน ขณะที่ตำรับที่ 3 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยามากที่สุด แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเล็กที่สุด

ตารางที่ 4 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ1 : 3 และ เลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3

Formulations	Acyclovir : Mannitol	Lecithin : Cholesterol	Sampling No.	Diameter (nm)	Mean Diameter (nm)	SD
1	1 : 1	5 : 5	1	12,498	21,160	10,740
			2	27,850		
			3	23,125		
2	1 : 3	5 : 5	1	3,530	15,500	9,660
			2	20,050		
			3	22,950		
3	1 : 1	7 : 3	1	781	703	111
			2	698		
			3	631		
4	1 : 3	7 : 3	1	758	1,280	650
			2	2,148		
			3	928		



รูปที่ 11 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ 1 : 3



รูปที่ 12 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วน อะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1:1 และ 1:3

3. ตำรับยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม

3.1. การประเมินคุณสมบัติยาเม็ด

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนัก, ความหนา และ เวลาที่ใช้ในการแตกตัวของยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม จำนวน 6 เม็ด พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของยาเม็ดมีค่า เท่ากับ 630 มิลลิกรัม (%RSD = 0.79), ความหนาเฉลี่ย เท่ากับ 6.600 มิลลิเมตร (%RSD =1.106) และ เวลาที่ใช้ในการแตกตัวเฉลี่ย (Disintegration time) เท่ากับ 76.46 นาที (%RSD = 69.92)

3.2. ปริมาณยาทั้งหมด (Drug Content)

จากการหาปริมาณยาทั้งหมดที่มีอยู่ในยาเม็ดอะซัยโคลเวียโดยใช้วิธีการเดียวกับการหาปริมาณยาทั้งหมดในโปรไลโปโซมแกรนูล มีค่าเท่ากับ 226.0 มิลลิกรัม

3.3. ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา (Trapping Efficiency)

ปริมาณยาที่กักเก็บอยู่ในไลโปโซมที่ได้จากยาเม็ดอะซัยโคลเวีย มีค่าเท่ากับ 44.08 มิลลิกรัม คิดเป็นประสิทธิภาพในการกักเก็บยาได้ เท่ากับ 19.50 %

3.4. การวัดขนาดอนุภาคไลโปโซม (Particle Size Measurement)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเฉลี่ยของไลโปโซมที่ได้จากยาเม็ดอะซัยโคลเวีย มีค่าเท่ากับ 884.88 นาโนเมตร (%RSD = 19.290)

ตารางที่ 5 น้ำหนัก, ความหนา และ เวลาที่ใช้ในการแตกตัวของยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม

Tablet No.	Weight (mg)	Thickness (mm)	Disintegration Time (min)
1	632	6.700	34.58
2	625	6.560	65.51
3	634	6.645	144.13
4	621	6.508	29.28
5	625	6.545	144.22
6	630	6.639	41.41
Mean	630	6.600	76.46
SD	5.0	0.07298	53.46
% RSD	0.79	1.106	69.92

ผลการวิจัย

1. แกรนูลโปรไลโปโซม (Proliposome Granules)

1.1. การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ (Physical Appearance)

แกรนูลโปรไลโปโซมที่ผลิตขึ้นในแต่ละตำรับมีรูปร่างกลมรีเล็กน้อย เมื่อมองจากลักษณะภายนอก สำหรับตำรับที่ 1 และ 2 มีสีขาวนวล สามารถไหลได้ดี ส่วนตำรับที่ 3 และ 4 มีสีเหลืองอ่อน ค่อนข้างเหนียวและเกาะรวมกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 6

รูปที่ 6 ภาพแสดงลักษณะทางกายภาพของแกรนูลโปรไลโปโซม (physical appearance). (A) ตำรับที่ 1, (B) ตำรับที่ 2, (C) ตำรับที่ 3 และ(D) ตำรับที่ 4.

1.2. % Compressibility

ตารางที่ 2 แสดง % compressibility และ ค่าความพรุน (% porosity) ของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวียที่เตรียมได้ทั้ง 4 ตำรับ พบว่า ตำรับที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่า % compressibility เท่ากับ 2.22%, 2.22%, 6.67% และ 10.00% ตามลำดับ โดย % compressibility จะแปรผกผันกับ ความสามารถในการไหล (flowability) ดังนั้น ตำรับที่มีการไหลดีที่สุดคือตำรับที่ 1 และ 2 รองลงมาคือ ตำรับที่ 3 และ 4 ตามลำดับ แต่พบว่า % Compressibility ของตำรับที่ 3 และ 4 ก็ยังคงอยู่ในช่วงที่แสดงความสามารถในการไหลที่ดีอยู่ (16) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะพื้นผิวที่ค่อนข้างเหนียวของตำรับที่ 3 และ 4

1.3. **ค่าความพรุนของแกรนูล** (% Porosity)

จากตารางที่ 2 แสดง % compressibility และ ค่าความพรุนของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวีย จะเห็นได้ว่าทั้ง 4 ตำรับมีค่าความพรุนใกล้เคียงกัน โดยตำรับที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าความพรุน เท่ากับ 66.39%, 68.26%, 73.73% และ 62.98% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดง % Compressibility และ ค่าความพรุนของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวีย

ตำรับที่	% Compressibility	ค่าความพรุน (%)
1	2.22	66.39
2	2.22	68.26
3	6.67	73.73
4	10.00	62.98

2. ไลโปโซมอะซัยโคลเวีย

2.1. การตรวจสอบคุณลักษณะภายนอก (Microscopic Appearance)

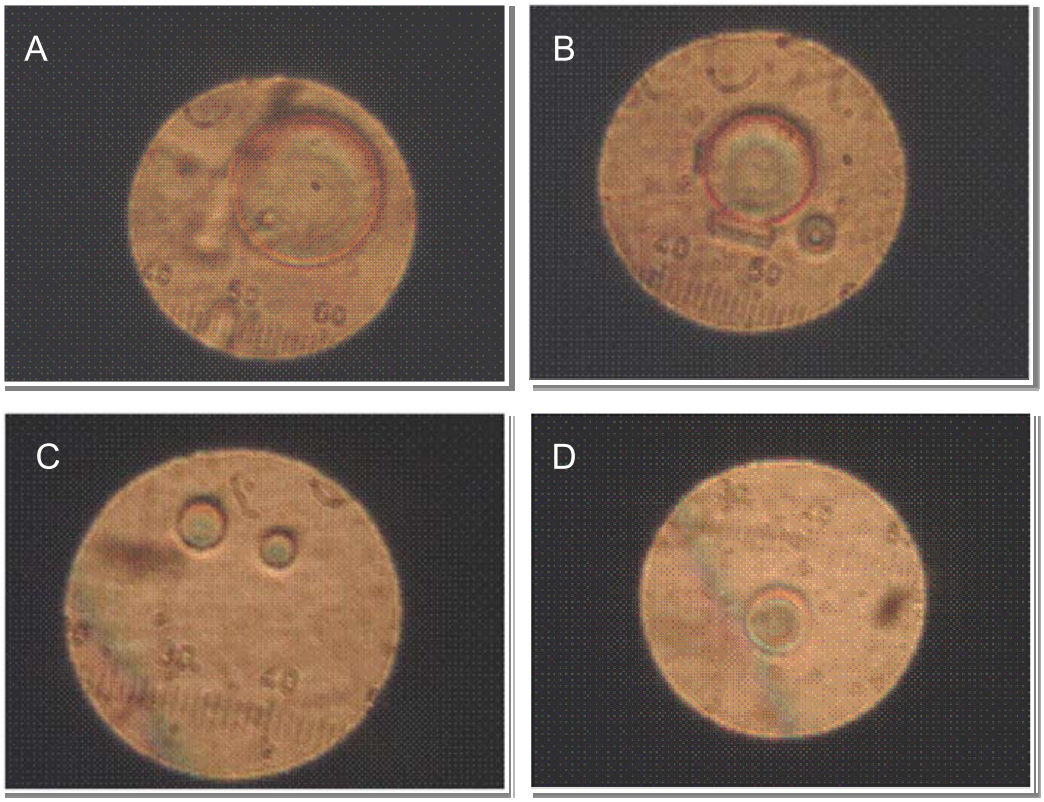
จากการตรวจสอบคุณลักษณะภายนอกของไลโปโซมโดยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นถุงอนุภาคกลมเล็ก ๆ (vesicles) ของไลโปโซมที่เกิดจากการเรียงตัวเป็นโครงสร้างเมนเบรน 2 ชั้น (phospholipids bilayers) และมีชั้นของเมนเบรนหลายชั้น (multilamellars vesicles) ดังแสดงในรูปที่ 7

2.2. ปริมาณยาทั้งหมด (Drug Content)

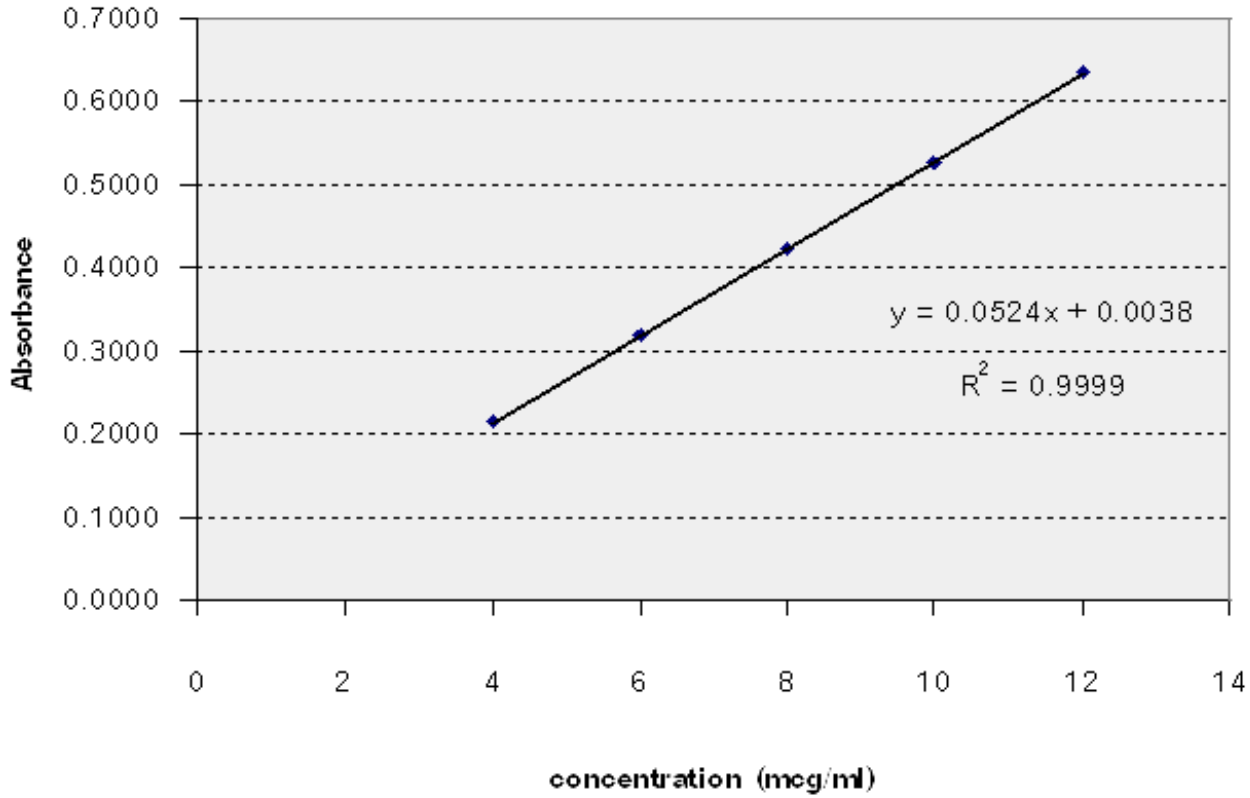
รูปที่ 8 คือ กราฟมาตรฐานของอะซัยโคลเวียในน้ำกลั่น ที่ความยาวคลื่น 251 นาโนเมตร และรูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณยาทั้งหมด (drug content) ของไลโปโซมทั้ง 4 ตำรับ พบว่า จากการชั่งแกรนูลโปรไลโปโซมในปริมาณที่เท่ากันทั้ง 3 ครั้ง โดยให้มีปริมาณอะซัยโคลเวีย 200 มก. เมื่อนำมากระจายตัวในน้ำ และนำมาหาปริมาณอะซัยโคลเวียที่มีอยู่ในแต่ละตำรับ ปริมาณอะซัยโคลเวียที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณอะซัยโคลเวียอยู่ในช่วง 198.2 – 232.2 มก.

2.3. ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา (Trapping Efficiency)

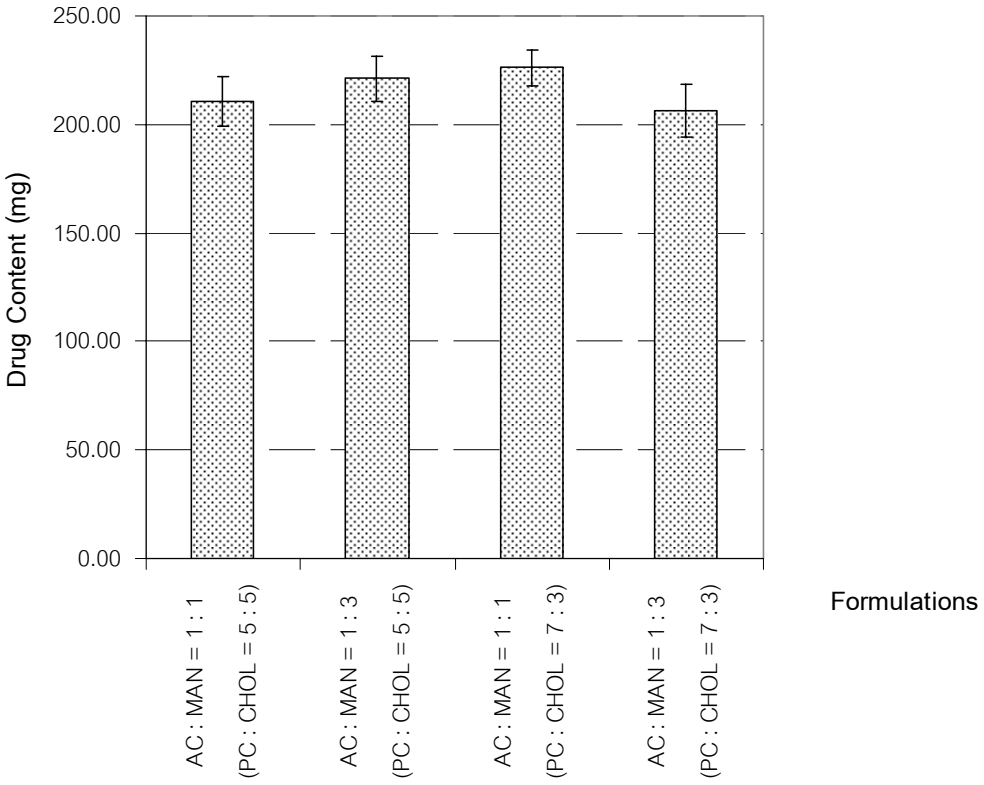
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณอะซัยโคลเวียที่กักเก็บในไลโปโซมซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอลเท่ากับ 1:1 และ 1:3 และรูปที่ 10 กราฟแสดงประสิทธิภาพในการกักเก็บ (trapping efficiency) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซมเฉลี่ยโดยวิธีโปรไลโปโซม ซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ 1 : 3 พบว่า ตำรับที่ 3 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 32.87% (SD=8.55) ส่วนตำรับที่ 1 และ 2 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยารองลงมา และกักเก็บได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 23.88% (SD=7.56), 23.07% (SD=2.70) ตามลำดับ ในขณะที่ตำรับที่ 4 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาต่ำที่สุด เท่ากับ 15.75% (SD=5.43)



รูปที่ 7 ภาพแสดงลักษณะภายนอก (microscopic appearance) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซม. (A) ตำรับที่ 1, (B) ตำรับที่ 2, (C) ตำรับที่ 3 และ(D) ตำรับที่ 4.



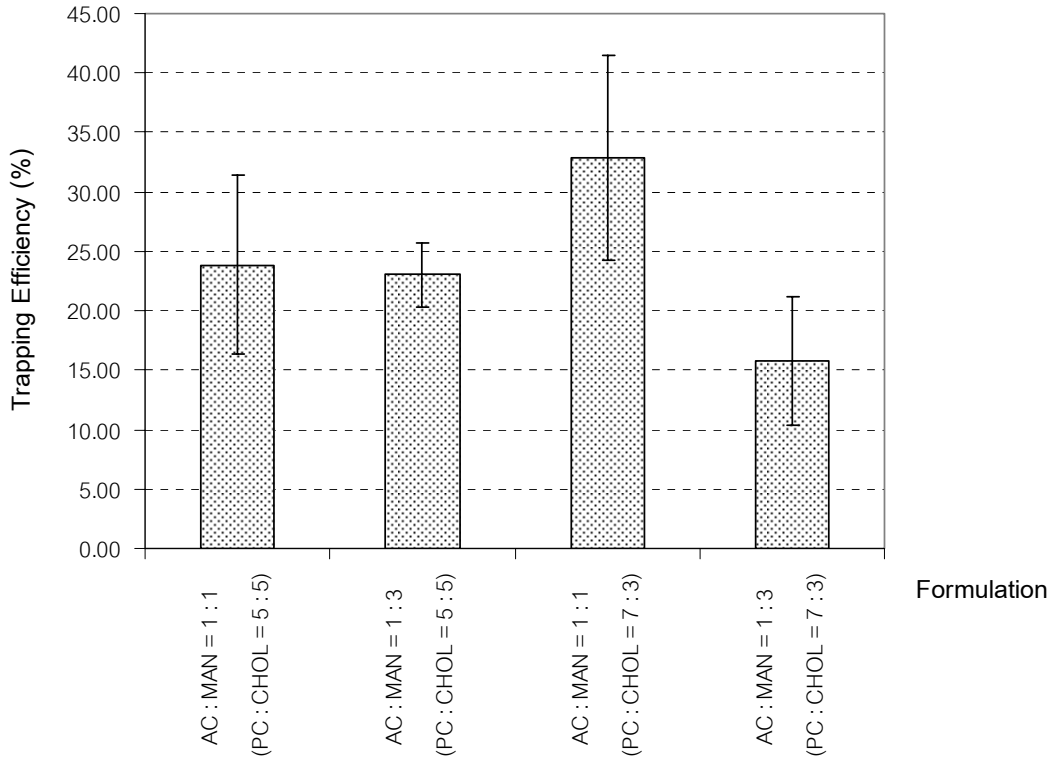
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของอะซัยโคลเวียในน้ำกลั่นที่ความยาวคลื่น 251 nm



รูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณยาทั้งหมด (drug content) ของไลโปโซมทั้ง 4 ตำรับ

ตารางที่ 3 ปริมาณอะซัยโคลเวียที่กักเก็บในไลโปโซมซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ1 : 3 และ เลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3

Formulations	Acyclovir : Mannitol	Lecithin : Cholesterol	Sampling No.	Absorbance At λ = 251 nm	Concentration (mcg/ml)	Trapping efficiency (%)	Mean	SD
1	1 : 1	5 : 5	1	0.1852	3.463	17.47	23.88	7.562
			2	0.2577	4.846	21.96		
			3	0.3640	6.874	32.22		
2	1 : 3	5 : 5	1	0.2860	5.386	25.43	23.07	2.698
			2	0.2351	4.413	20.13		
			3	0.2917	5.494	23.66		
3	1 : 1	7 : 3	1	-	-	-	32.87	8.554
			2	0.3271	6.171	26.82		
			3	0.4763	9.017	38.92		
4	1 : 3	7 : 3	1	-	-	-	15.75	5.434
			2	0.0682	1.229	11.91		
			3	0.2282	4.282	19.59		



รูปที่ 10 กราฟแสดงประสิทธิภาพในการกักเก็บ (trapping efficiency) ของอะซัยโคลเวียไลโปโซมเฉลี่ยโดยวิธีโปรไลโปโซม ซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ 1 : 3

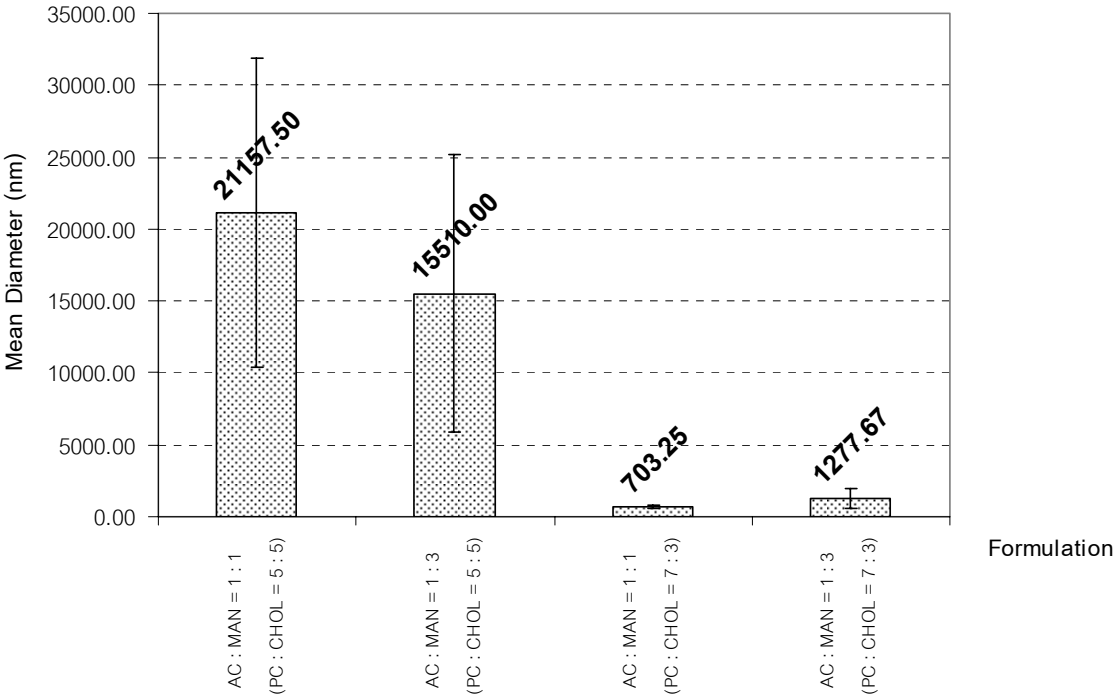
2.4. **การวัดขนาดอนุภาคไลโปโซม** (Particle Size Measurement)

ตารางที่ 4 และรูปที่ 11 แสดงการกระจายขนาดอนุภาคของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1:1 และ 1:3 พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่เตรียมได้จากตำรับที่ 1 ซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ เลซิทิน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเฉลี่ยใหญ่ที่สุด เท่ากับ 21,160 นาโนเมตร (SD=10,740 นาโนเมตร) และตำรับที่ 3 ซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ เลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 7 : 3 มีขนาดอนุภาคเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเล็กที่สุด เท่ากับ 703 นาโนเมตร (SD=111 นาโนเมตร) และยังพบว่าขนาดอนุภาคในตำรับที่ 3 และ 4 มีขนาดเล็กกว่าแตกต่างจากตำรับที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน

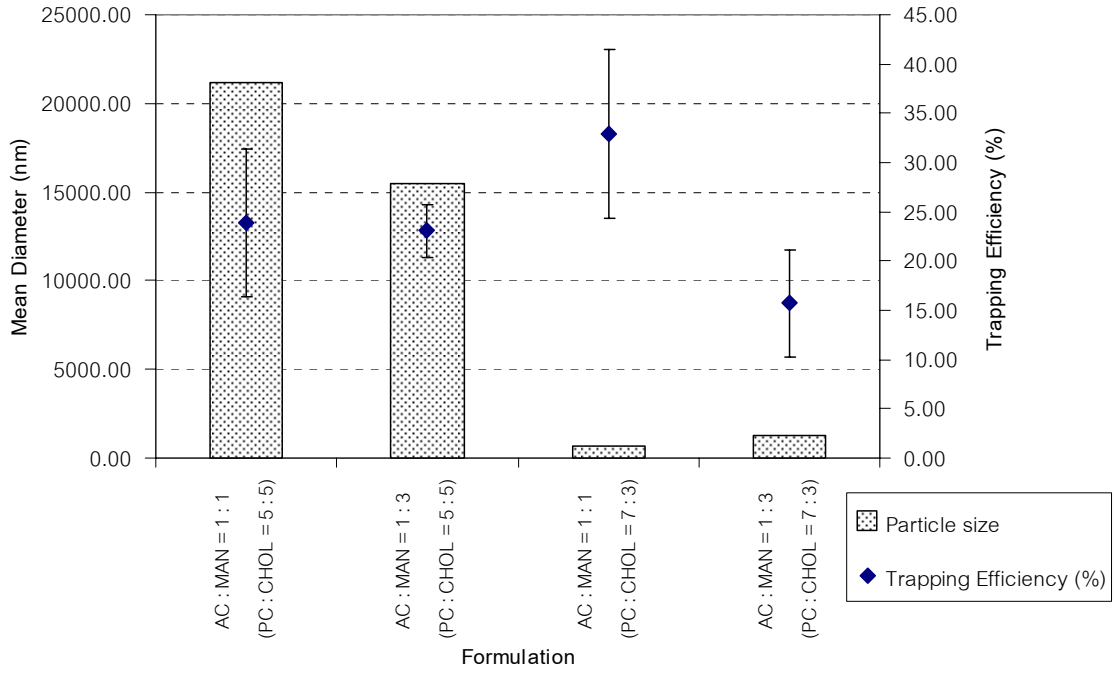
รูปที่ 12 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วน อะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1:1 และ 1:3 พบว่า อะซัยโคลเวียไลโปโซมที่เตรียมได้จากตำรับที่ 1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยใหญ่ที่สุด และใหญ่กว่าตำรับที่ 2 แต่ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของตำรับที่ 1 และตำรับที่ 2 ไม่แตกต่างกัน ขณะที่ตำรับที่ 3 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยามากที่สุด แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเล็กที่สุด

ตารางที่ 4 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมซึ่งมีอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ1 : 3 และ เลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3

Formulations	Acyclovir : Mannitol	Lecithin : Cholesterol	Sampling No.	Diameter (nm)	Mean Diameter (nm)	SD
1	1 : 1	5 : 5	1	12,498	21,160	10,740
			2	27,850		
			3	23,125		
2	1 : 3	5 : 5	1	3,530	15,500	9,660
			2	20,050		
			3	22,950		
3	1 : 1	7 : 3	1	781	703	111
			2	698		
			3	631		
4	1 : 3	7 : 3	1	758	1,280	650
			2	2,148		
			3	928		



รูปที่ 11 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วนอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1 : 1 และ 1 : 3



รูปที่ 12 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของอะซัยโคลเวียไลโปโซมที่มีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 และอัตราส่วน อะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล เท่ากับ 1:1 และ 1:3

3. ตำรับยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม

3.1. การประเมินคุณสมบัติยาเม็ด

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนัก, ความหนา และ เวลาที่ใช้ในการแตกตัวของยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม จำนวน 6 เม็ด พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของยาเม็ดมีค่า เท่ากับ 630 มิลลิกรัม (%RSD = 0.79), ความหนาเฉลี่ย เท่ากับ 6.600 มิลลิเมตร (%RSD =1.106) และ เวลาที่ใช้ในการแตกตัวเฉลี่ย (Disintegration time) เท่ากับ 76.46 นาที (%RSD = 69.92)

3.2. ปริมาณยาทั้งหมด (Drug Content)

จากการหาปริมาณยาทั้งหมดที่มีอยู่ในยาเม็ดอะซัยโคลเวียโดยใช้วิธีการเดียวกับการหาปริมาณยาทั้งหมดในโปรไลโปโซมแกรนูล มีค่าเท่ากับ 226.0 มิลลิกรัม

3.3. ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา (Trapping Efficiency)

ปริมาณยาที่กักเก็บอยู่ในไลโปโซมที่ได้จากยาเม็ดอะซัยโคลเวีย มีค่าเท่ากับ 44.08 มิลลิกรัม คิดเป็นประสิทธิภาพในการกักเก็บยาได้ เท่ากับ 19.50 %

3.4. การวัดขนาดอนุภาคไลโปโซม (Particle Size Measurement)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเฉลี่ยของไลโปโซมที่ได้จากยาเม็ดอะซัยโคลเวีย มีค่าเท่ากับ 884.88 นาโนเมตร (%RSD = 19.290)

ตารางที่ 5 น้ำหนัก, ความหนา และ เวลาที่ใช้ในการแตกตัวของยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม

Tablet No.	Weight (mg)	Thickness (mm)	Disintegration Time (min)
1	632	6.700	34.58
2	625	6.560	65.51
3	634	6.645	144.13
4	621	6.508	29.28
5	625	6.545	144.22
6	630	6.639	41.41
Mean	630	6.600	76.46
SD	5.0	0.07298	53.46
% RSD	0.79	1.106	69.92

ผลการวิจัย

1. แกรนูลโปรไลโปโซม (Proliposome Granules)

1.1. การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ (Physical Appearance)

แกรนูลโปรไลโปโซมที่ผลิตขึ้นในแต่ละตำรับมีรูปร่างกลมรีเล็กน้อย เมื่อมองจากลักษณะภายนอก สำหรับตำรับที่ 1 และ 2 มีสีขาวนวล สามารถไหลได้ดี ส่วนตำรับที่ 3 และ 4 มีสีเหลืองอ่อน ค่อนข้างเหนียวและเกาะรวมกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 6

รูปที่ 6 ภาพแสดงลักษณะทางกายภาพของแกรนูลโปรไลโปโซม (physical appearance). (A) ตำรับที่ 1, (B) ตำรับที่ 2, (C) ตำรับที่ 3 และ(D) ตำรับที่ 4.

1.2. % Compressibility

ตารางที่ 2 แสดง % compressibility และ ค่าความพรุน (% porosity) ของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวียที่เตรียมได้ทั้ง 4 ตำรับ พบว่า ตำรับที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่า % compressibility เท่ากับ 2.22%, 2.22%, 6.67% และ 10.00% ตามลำดับ โดย % compressibility จะแปรผกผันกับ ความสามารถในการไหล (flowability) ดังนั้น ตำรับที่มีการไหลดีที่สุดคือตำรับที่ 1 และ 2 รองลงมาคือ ตำรับที่ 3 และ 4 ตามลำดับ แต่พบว่า % Compressibility ของตำรับที่ 3 และ 4 ก็ยังคงอยู่ในช่วงที่แสดงความสามารถในการไหลที่ดีอยู่ (16) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะพื้นผิวที่ค่อนข้างเหนียวของตำรับที่ 3 และ 4

1.3. **ค่าความพรุนของแกรนูล** (% Porosity)

จากตารางที่ 2 แสดง % compressibility และ ค่าความพรุนของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวีย จะเห็นได้ว่าทั้ง 4 ตำรับมีค่าความพรุนใกล้เคียงกัน โดยตำรับที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าความพรุน เท่ากับ 66.39%, 68.26%, 73.73% และ 62.98% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดง % Compressibility และ ค่าความพรุนของแกรนูลโปไลโปโซมอะซัยโคลเวีย

ตำรับที่	% Compressibility	ค่าความพรุน (%)
1	2.22	66.39
2	2.22	68.26
3	6.67	73.73
4	10.00	62.98

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยมุ่งเน้นศึกษาการเตรียมและการพัฒนายาในรูปแบบไลโปโซม ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบนำส่งยาตรงเป้า (drug targeting) ซึ่งใช้วิธีการผลิตโปรไลโปโซมโดยใช้แกร-นูลของอะซัยโคลเวีย และแมนนิทอล เป็นตัวพา (carrier material) ในอัตราส่วน 1 : 1 และ 1 : 3 ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 และอัตราส่วนของเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 และ 7 : 3 รวมทั้งหมด 4 ตำรับ

สรุปปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของไลโปโซม ดังนี้

1. ปริมาณของโคเลสเตอรอลมีผลต่อขบวนการเกิด lipid film hydration โดย

- หากกระบวนเกิด lipid film hydration เกิดได้อย่างสมบูรณ์แล้ว ความแปรผันของขนาดอนุภาคจะเกิดขึ้นน้อย ดังนั้น ขนาดอนุภาคที่ได้จากการเตรียมไลโปโซมจากแกรนูล หรือ ยาเม็ดจะไม่แตกต่างกัน ในทางตรงกันข้ามหากกระบวนการเกิด lipid film hydration เกิดได้ช้า จะมีความแปรผันของขนาดอนุภาคมาก และขนาดอนุภาคที่ได้จากการเตรียมไลโปโซมจากแกรนูล หรือ ยาเม็ด จะให้ผลแตกต่างกัน

2. อัตราส่วนของอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล ในตัวพามีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาหากขบวนการเกิด lipid film hydration เกิดได้อย่างสมบูรณ์

3. ปริมาณของโคเลสเตอรอลใน lipid bilayers membranes มีผลต่อลักษณะพื้นผิว และการไหลของแกรนูลโปรไลโปโซม ซึ่งอาจมีผลขบวนการในการตอกเม็ด

4. พื้นที่ผิว (surface area) ที่ลดลงของยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม มีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของไลโปโซม

จากการศึกษาอาจกล่าวได้ว่า การพัฒนาตำรับโปรไลโปโซมนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องต่อไปนี้

1. ปริมาณของโคเลสเตอรอลที่เหมาะสมในการตั้งตำรับอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม เพื่อให้ได้ไลโปโซมที่มีคุณภาพ คือ มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสูง และขนาดอนุภาคที่สม่ำเสมอ

2. ควรศึกษาหาปัจจัยที่อาจมีผลทำให้การเตรียมโปรไลโปโซมที่ได้ในแต่ละครั้งไม่คงที่

3. ควรมีการศึกษาถึงความคงตัวของโปรไลโปโซมในสภาวะต่าง ๆ

4. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณสารที่ใช้ละลายเลซิติน และโคเลสเตอรอลที่ตกค้างอยู่ในโปรไลโปโซมซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อร่างกาย และหาวิธีการกำจัดตัวทำละลายดังกล่าวก่อนนำไปใช้จริง

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบบนำส่งยาตรงเป้า (drug targeting) ซึ่งไลโปโซมสามารถทำหน้าที่เป็นระบบนำส่งยาตรงเป้านี้ได้ โดยศึกษาวิธีการผลิตซึ่งเตรียมเป็นโปรไลโปโซม จากการศึกษาพบว่าการใช้ปริมาณของเลซิติน (lecithin) และ โคเลสเตอรอล (cholesterol) ซึ่งต่างเป็นองค์ประกอบของฟอสโฟไลปิดฟิล์ม (phospholipids film) ในอัตราส่วนต่างกัน ปริมาณอะซัยโคลเวีย (acyclovir) และ แมนนิทอล (mannitol) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของแกน (water soluble core) และ การตอกเม็ดล้วนมีผลต่อคุณสมบัติของไลโปโซม

จากการตรวจลักษณะทางกายภาพของโปรไลโปโซมอะซัยโคลเวียแกรนูลที่เตรียมได้มีขนาดใกล้เคียงกันเมื่อมองด้วยตาเปล่า แต่จะแตกต่างกันที่พื้นผิวแกรนูล โดยตำรับที่ 3 และ 4 มีลักษณะค่อนข้างเหนียวเนื่องมาจากผลของโคเลสเตอรอล พบว่า การใช้โคเลสเตอรอลในปริมาณมากจะทำให้พื้นผิวของแกรนูลมีลักษณะแข็ง เนื่องจาก lipid bilayers membrane ที่เตรียมได้จะมี T_m (transition temperature) สูง ซึ่งจะมีผลให้แกรนูลมีการไหลที่ดีกว่า (% compressibility ต่ำ) ดังนั้นองค์ประกอบของ lipid bilayers membrane ที่มีปริมาณโคเลสเตอรอลน้อย จะทำให้พื้นผิวของแกรนูลมีความเป็น fluidity มากกว่า การไหลจึงไม่ดี

เมื่อนำโปรไลโปโซมแกรนูลมาไฮเดรทในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 และนำมาหาศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา (trapping efficiency) และ ขนาดอนุภาคไลโปโซม พบว่า ตำรับที่ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคเฉลี่ยใหญ่ที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 2, 4 และ 3 ตามลำดับ ขณะที่ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาของตำรับที่ 3 มีค่าสูงสุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 1, 2 และ 4 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากในกระบวนการไฮเดรทแกรนูลที่เคลือบด้วยฟอสโฟไลปิดประกอบด้วยกลไก 2 ขั้นตอน คือ

1. การเกิด Lipid film hydration
2. การละลายของ Water soluble core

โดยพบว่าตำรับที่ 1 และ 2 มีอัตราส่วนของเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 5 : 5 จะเกิดผลในการทำให้แข็ง (rigidifying effect) จากโคเลสเตอรอลที่ทำให้การโค้งของ vesicles เกิดได้ยาก โดยโคเลสเตอรอลจะไปแทรกระหว่างชั้นของฟอสโฟไลปิดทำให้ความโค้งของ vesicles น้อย ไลโปโซมที่ได้จึงมีขนาดใหญ่ และการที่ตำรับที่ 1 ขนาดอนุภาคใหญ่กว่าตำรับที่ 2 มาก ทั้ง ๆ ที่มีอัตราส่วนของเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากัน เนื่องมาจาก ปริมาณโคเลสเตอรอลที่มากทำให้กระบวนการเกิด lipid film hydration เกิดยาก และใช้เวลานานกว่าการละลายของแกนแมนนิ-

ทอล ดังนั้น ตำรับที่ 1 ซึ่งมีปริมาณอะซัยโคลเวียมากกว่า อะซัยโคลเวียบางส่วนอาจเคลื่อนที่ไปอยู่ในส่วนของ non-polar chain ของ Phospholipid มากกว่าตำรับที่ 2 จึงมีผลให้ความโค้งของ vesicles น้อยกว่าเดิม เป็นผลให้ ไลโปโซมที่ได้จากตำรับที่ 1 จะมีขนาดใหญ่กว่าตำรับที่ 2 แต่ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา ของตำรับทั้งสองกลับไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจาก ผลของขั้นตอนการละลายแกนแมนนิทอลที่เร็วกว่าขั้นตอนการเกิด lipid film hydration ทำให้ปริมาณยาที่ถูกกักเก็บไม่แตกต่างกัน

ในส่วนของตำรับที่ 3 และ 4 ซึ่งมีอัตราส่วนเลซิติน ต่อ โคเลสเตอรอล เท่ากับ 7:3 เนื่องจากมีโคเลสเตอรอลน้อย จึงทำให้กระบวนการเกิด lipid film hydration เป็นไปอย่างสมบูรณ์ก่อนที่แกนของแมนนิทอลจะละลายหมด ดังนั้น จึงไม่มีผลต่อขนาดไลโปโซม แต่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา เนื่องจากอัตราส่วนของอะซัยโคลเวีย ต่อ แมนนิทอล ในตำรับที่ 3 มากกว่า ตำรับที่ 4 จึงทำให้ตำรับที่ 3 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บดีกว่าตำรับที่ 4

เมื่อเปรียบเทียบความแปรผันของขนาดอนุภาค (particle size variation) พบว่า ตำรับที่ 1 และ 2 มีความแปรผันของขนาดอนุภาคมากกว่าตำรับที่ 3 และ 4 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณโคเลสเตอรอลที่มากทำให้การโค้งเป็น vesicles ยาก จึงทำให้มีความแปรผันมาก เมื่อเทียบกับตำรับที่ 3 และ 4 ที่มีปริมาณโคเลสเตอรอลน้อย ความแปรผันจึงน้อยเนื่องจากสามารถโค้งเป็น vesicles ได้ง่ายกว่า

ในส่วนของตำรับยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม ในขั้นแรกใช้สูตรในการตอกเม็ด คือ

- อะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม (มีปริมาณอะซัยโคลเวีย 200 mg)
- Explotab 5%
- Magnesium stearate 1%

พบว่ายาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมใช้เวลามากกว่า 4 ชั่วโมงจึงแตกตัวและ hydrate ได้หมด จึงปรับปรุงสูตร โดยเพิ่ม Explotab เป็น 10% และ Avicle PH 101 15% เพื่อช่วยในการแตกตัวและเมื่อนำไปทดสอบหาเวลาในการแตกตัว (disintegration time) พบว่า ใช้เวลาเฉลี่ย 76.46 นาที (%RSD = 69.92) แต่มีบางเม็ดใช้เวลาในการแตกตัวของยาเม็ดภายใน 30 นาที จากผลดังกล่าวอาจสรุปได้ว่า ความแปรผันของเวลาในการแตกตัวอาจเกิดจากการผสมที่ไม่สม่ำเสมอ (uniformity) ของผงยาก่อนตอกเม็ด เนื่องจากปริมาณที่เตรียมน้อยมาก

เมื่อนำยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซมไปเตรียมเป็นไลโปโซม พบว่า ขนาดของไลโปโซมที่ได้จากยาเม็ดอะซัยโคลเวียโปรไลโปโซม และแกรนูลโปรไลโปโซม มีขนาดใกล้เคียงกัน เนื่องจากขั้นตอนการเกิด lipid film hydration เกิดได้เร็วและสมบูรณ์กว่าการละลายของแกนแมนนิทอล ทำ

ให้ไม่ว่าจะอยู่ในรูปแบบแกรนูลหรือเม็ด ขนาดอนุภาคของไลโปโซมก็ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการแกรนูลโปรไลโปโซมมาตอกเม็ดไม่มีผลต่อขนาดของไลโปโซมที่ได้ ในขณะที่ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาที่ได้น้อยลง อาจเนื่องมาจากยาเม็ดมีพื้นที่ผิว (surface area) น้อยกว่าแกรนูลและต้องผ่านขั้นตอนการแตกตัวก่อนเกิด lipid film hydration ปริมาณยาที่ละลายออกมาจึงน้อยกว่า ทำให้เมื่อเกิดการ form vesicles เป็นไลโปโซม อาจไม่ได้กักเก็บตัวยาที่ออกมามากเท่ากับปริมาณที่ละลายออกมาจากแกรนูลโปรไลโปโซม

เอกสารอ้างอิง

1. ประเสริฐ ทองเจริญ. อะซัยคลอเวียร์: ยารักษาโรคติดเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัส. อักษรสมัย. 2528.
2. McEvoy GK, editor. AHFS Drug Information 2005. Betheda, MD: American Society of Health-System Pharmacists, Inc., 2005.
3. Mayer LD, Baly MB. Hope KJ, Cullis PR. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. Chem Phys 1986; Lipids 40: 333-45.
4. Payne NI, Timmis P, Ambrose CV, Warel MD. Proliposomes: a novel solution to an old problem. J Pharm Sci 1986; 75(4): 325-9.
5. Juliano RL, Layton D. Liposomes as a drug delivery system. In: Juliano RL ed. Drug delivery systems: Characteristic and biomedical. New York: Oxford University Press, 1980: 189-236.
6. ณรงค์ สาริสุต. การเตรียมยาออกฤทธิ์นาน : การใช้ไลโปโซม. ใน: ณัฐนันท์ สินชัยพานิช, พจวรรณ สาวัณย์ประเสริฐ บรรณาธิการ. Advance in industrial Pharmaceutical Technology II. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, เฟื่องฟ้าพริ้นติ้ง, 2540: 159-194.
7. Gregoriadis G. Liposome technology, volume I, preparation of liposomes, Boca Raton: CRC Press, 1984.
8. Gregoriadis G. Overview of Liposomes. J. Antimicrob Chemother 1991; 28, suppl B: 39-48.
9. Juliano RL. Micropartialate drug carriers : Liposomes, microspheres, and cells. In: Robinson JR, Lee VHL, editors. Controlled drug delivery, fundamentals and applications. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1987: 555-80.
10. Stricker H. Liposomae carriers of drug and genetic materiae. Drug of Today 1987; 23(4): 223-9.
11. Payne NI, Browning I, Hynes CA. Characterization of proliposomes. J Pharm Sci 1986; 75(4): 330-3.
12. Song KH, Chung SJ, Shim CK. Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin. J. Controlled Release 2002; 84:27-37.

13. Yan-yu X, Yun-mei S, Zhi-peng C, Qi-neng P. Preparation of silymarin proliposome: a new way to increase oral bioavailability of silymarin in beagle dogs. Int. J. Pharm. 2006: 1-7.
14. บงกช มหาคีตะ,บุญญรัตน์ ต.วัฒนผล. การพัฒนาสูตรตำรับยาน้ำใช้ภายนอกอะซัยคลอเวียร์ไลโปโซมในการรักษาโรคติดเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัส. [โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต]. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล: 2545 .
15. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ, editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 4th ed. London: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, 2003.
16. ยุพิน รุ่งเวชวุฒิวิทยา. การไหลของผงยาและแกรนูล. ใน : ฤดี เสาวคนธ์, สุทิน ศิริไพรวัน, บรรณาธิการ. เภสัชอุตสาหกรรม 1. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด ก. การพิมพ์, 2525: 341-6.
17. Martin A, Bustamante P, Chun A.H.C., editors. Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993: 442-6.