



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาและศึกษากลไกของไมโครอิมัลชันชนิดใหม่เพื่อเพิ่มการดูดซึมยาเซเลคอกซิบ
โดยการรับประทาน

Development and mechanism study of novel microemulsion for
oral absorption enhancement of celecoxib

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ถิรพิทย์ สุนงกช

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256107A1080033

สัญญาเลขที่ ๑๒๗/๒๕๖๑

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาและศึกษากลไกของไมโครอิมัลชันชนิดใหม่เพื่อเพิ่มการดูดซึมยาเซเลคอกซิบโดย
การรับประทาน

Development and mechanism study of novel microemulsion for oral
absorption enhancement of celecoxib

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ถิรพิทย์ สุนงกช

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

๑ ตุลาคม ๒๕๖๐ ถึง ๓๐ กันยายน ๒๕๖๑

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๑๒๗/๒๕๖๑

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไมโครอิมัลชันชนิดใหม่ที่มีดีอัลฟาโทโคฟีรอลโพลีเอทิลีนไกลคอล 1000 ซัคซิเนท (วิตามินอีทีพีจีเอส) เป็นสารลดแรงตึงผิว เพื่อเพิ่มการดูดซึมของเซลล์โคชิบโดยการรับประทานและเพื่อศึกษากลไกการดูดซึมผ่านลำไส้ของไมโครอิมัลชันโดยการวัดค่าทรานส์อิพิเทเลียลอิเลคทริกัลรีซิสแทนซ์ (transepithelial electrical resistance, TEER) การศึกษานี้ยังได้ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคไมโครอิมัลชันและลำไส้ในแง่ของกระบวนการปลดปล่อยและการเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ได้รับการตรวจสอบขนาดอนุภาค ประจุพื้นผิว รูปร่าง การปลดปล่อย การดูดซึมผ่านลำไส้และความเป็นพิษต่อเยื่อบุลำไส้ พบว่าอนุภาคไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้มีรูปร่างกลม มีขนาดไม่เกิน 300 นาโนเมตรและมีประจุเป็นกลาง การปลดปล่อยเซลล์โคชิบจากไมโครอิมัลชันเป็นจลนศาสตร์อันดับศูนย์ ไมโครอิมัลชันนี้สามารถเพิ่มการดูดซึมของเซลล์โคชิบได้อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์สันนิษฐานว่าอนุภาคไมโครอิมัลชันที่มีตัวยากักเก็บสัมผัสกับเยื่อบุลำไส้ก่อนจะมีการปลดปล่อยตัวยาออกมา ค่า TEER ของเยื่อบุลำไส้ที่ได้รับการทดสอบด้วยไมโครอิมัลชันมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับก่อนการทดสอบ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการเพิ่มการแพร่ผ่านตัวยาโดยการขนส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) การประเมินความเป็นพิษต่อเยื่อบุลำไส้ของไมโครอิมัลชันที่มีเซลล์โคชิบพบว่าไม่แตกต่างจากตัวทำละลายที่รับประทานได้ (PEG 400)

Abstract

This study aimed to develop a novel microemulsion that contains D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (vitamin E TPGS) as a surfactant to increase the oral absorption of celecoxib and to investigate the intestinal absorption enhancement mechanism of this microemulsion by measuring transepithelial electrical resistance (TEER) values. This study also evaluated microemulsion particle-intestine interactions in terms of release and attachment processes using confocal laser scanning microscopy (CLSM). The prepared microemulsion was evaluated for its particle size, shape, zeta potential, *in vitro* release, *in vitro* intestinal absorption and intestinal membrane cytotoxicity. The obtained microemulsion particles were spherical in shape with a size of less than 300 nm and a neutral surface charge. The *in vitro* release of the celecoxib-loaded microemulsion was best fit with the zero-order model. This microemulsion significantly improved the intestinal absorption of celecoxib. The CLSM study suggested that microemulsion particles with entrapped drugs might attach to the intestinal epithelium before releasing the entrapped drug into tissues. The TEER value of the intestinal tissues treated with the celecoxib-loaded microemulsion was significantly decreased compared to the value before treatment, indicating an increase in drug transport via the paracellular pathway. The intestinal membrane cytotoxicity of the celecoxib-loaded microemulsion did not differ from that of an edible solvent (PEG 400).

Keywords: microemulsion, celecoxib, oral absorption enhancement mechanism, vitamin E TPGS

สารบัญเรื่อง (Table of contents)

	หน้า
บทนำ	1
สารเคมีและเครื่องมือ	6
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	15
สรุปผลการวิจัย	30
ผลผลิต (output)	31
รายงานสรุปการเงิน	32
เอกสารอ้างอิง	33

สารบัญตาราง (List of tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าการละลายของ celecoxib ในน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดต่างๆ	15
ตารางที่ 2 สูตรตำรับไมโครอิมัลชัน	18
ตารางที่ 3 สูตรตำรับไมโครอิมัลชัน ค่าการละลายของ celecoxib และปริมาณของ celecoxib ในสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน	19
ตารางที่ 4 ขนาดอนุภาค ประจุที่พื้นผิว การกระจายขนาดและค่าการนำไฟฟ้าของไมโครอิมัลชันสูตรต่างๆ	22
ตารางที่ 5 จลนศาสตร์การปลดปล่อยเซเลโคชิบจากสูตร celecoxib in PEG 400 และไมโครอิมัลชัน	23
ตารางที่ 6 ค่า apparent permeability (P_{app}) ของ celecoxib in PEG 400 และไมโครอิมัลชัน	24
ตารางที่ 7 ความเป็นพิษต่อเยื่อบุลำไส้ของแต่ละสูตรตำรับ	25
ตารางที่ 8 Transepithelial electrical resistance (TEER) ของลำไส้หนูก่อนและหลังการทดสอบด้วย PBS, celecoxib in PEG 400 และ celecoxib-loaded ME-4	27

สารบัญภาพ (List of illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1 Pseudo-ternary phase diagram of MCT oil, VitE TPGS:PEG400 (1:1) and water	16
รูปที่ 2 Pseudo-ternary phase diagram of MCT oil, VitE TPGS:ethanol (1:1) and water	16
รูปที่ 3 Pseudo-ternary phase diagram of MCT oil, VitE TPGS:PG (1:1) and water	17
รูปที่ 4 ภาพ CLSM แสดงให้เห็นภาพในแนวระนาบ x-z แบบต่อเนื่องของลำไส้หมู	26

1. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในผู้สูงอายุ นั้น มักมีโรคเรื้อรังที่พบได้บ่อย เช่น โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) โรคเกาต์ (Gout) เป็นต้น โดยโรคเหล่านี้ผู้ป่วยมักมีอาการปวดเป็นอาการสำคัญซึ่งรบกวนการดำเนินกิจวัตรประจำวัน ทำให้เกิดความทุกข์ทรมานและส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยอย่างมาก ยาแก้ปวดและลดอาการอักเสบที่สามารถออกฤทธิ์ได้เร็ว มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ยาวนานและมีผลข้างเคียงน้อยจึงมีความสำคัญต่อผู้ป่วยมาก

เซเลโคซิบ (celecoxib) จัดเป็นยาในกลุ่มยาต้านอาการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ชนิดหนึ่ง ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase 2 อย่างจำเพาะเจาะจง (specific inhibitor) ยานี้มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดและอักเสบ ของโรคที่มักเกิดในผู้สูงอายุ เช่น โรคข้อเสื่อม โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเกาต์ รวมถึงอาการปวดเฉียบพลันอื่นๆ เช่นการปวดจากการถอนฟัน ปวดศีรษะไมเกรน เป็นต้น จากการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase 2 อย่างจำเพาะเจาะจง ยาเซเลโคซิบจึงไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองกระเพาะอาหารดังเช่นยาชนิดอื่นในกลุ่ม NSAIDs

รูปแบบยาชนิดที่นำส่งโดยการรับประทานนั้น (oral drug delivery system) เป็นรูปแบบที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากให้ความสะดวกสบายแก่ผู้ป่วย อย่างไรก็ตามยาที่สามารถถูกดูดซึมโดยทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดไปยังบริเวณที่ออกฤทธิ์ได้นั้นจะต้องสามารถละลายน้ำได้ดี รวมถึงต้องมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีที่เหมาะสมเช่น น้ำหนักโมเลกุลที่น้อยกว่า 500 ดาลตัน รวมถึงถูกทำลายที่ตับ (first pass metabolism) น้อย

เซเลโคซิบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 381 ดาลตัน และมีค่าการละลายน้ำต่ำมาก (~5 µg/ml) [1] ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการดูดซึมยาโดยการรับประทาน จำเป็นต้องมีระบบนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการนำส่งและเพิ่มปริมาณการดูดซึมยาให้ได้ระดับยาในเลือดที่เพียงพอต่อการรักษา

ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) เป็นระบบคอลลอยด์ที่ประกอบด้วย วัฏภาคน้ำมัน (Oil phase) สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) สารลดแรงตึงผิวร่วม (Co-surfactant) และวัฏภาคน้ำ (Water phase) ไมโครอิมัลชัน

มีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร มีลักษณะโปร่งใส มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ สามารถเตรียมได้ง่ายและสามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม ไมโครอิมัลชันจึงได้รับความนิยมในการใช้เพื่อเพิ่มค่าการละลายและนำส่งยาเข้าสู่ร่างกาย ทั้งโดยการรับประทาน [2] การฉีด [3] การให้ผ่านผิวหนัง [4] และการนำส่งผ่านดวงตา [5]

อย่างไรก็ตามเนื่องจากไมโครอิมัลชันนั้นประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ซึ่งหากได้รับในปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการระคายเคืองทางเดินอาหารได้ ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าควรมีการพัฒนาสูตรไมโครอิมัลชันที่มีความปลอดภัยต่อผู้ป่วย โดยการใช้สารลดแรงตึงผิวที่ร่างกายสามารถย่อยสลาย (biodegradable) และนำไปใช้ได้

ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยา เพื่อเพิ่มค่าการละลายของยาเซเลโคซิบ โดยพัฒนาสูตรไมโครอิมัลชันขึ้นมาใหม่ให้สามารถใช้ในการรับประทานได้อย่างปลอดภัยมากยิ่งขึ้น โดยเลือกใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี (Vitamin E TPGS หรือ d- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate) และจากการทบทวนวรรณกรรมก็ยังไม่พบว่ามีรายงานไมโครอิมัลชันที่มีวิตามินอีที่พีจีเอสซึ่งสามารถเพิ่มการดูดซึมของยาผ่านทางรับประทานได้

วิตามินอีที่พีจีเอสเกิดจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของ Vitamin E succinate และ polyethylene glycol 1000 เมื่อเข้าสู่ร่างกาย Vitamin E TPGS จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ esterase ได้เป็น vitamin E ซึ่งสามารถถูกดูดซึมและนำไปใช้เป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้ต่อไป ทั้งนี้สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) ก็ได้เลือกใช้สารที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เช่น glycerine, propylene glycol และ PEG 400 เป็นต้น ส่วนภูมิภาคน้ำมันก็ได้เลือกใช้ไขมันที่สามารถรับประทานได้ เช่น มีเดียมเชนไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปลา เป็นต้น เพื่อให้สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่ได้มีความปลอดภัยและสามารถรับประทานได้ติดต่อกันเป็นเวลานาน

ในท้องตลาดเซเลโคซิบเป็นผงบรรจุในแคปซูลชนิดแข็ง (hard gelatin capsules) ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อแคปซูล ซึ่งข้อเสียของยาในรูปแบบนี้คือยาจะต้องผ่านขั้นตอนการละลาย (dissolution) ก่อนจึงจะสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ ถ้าหากเตรียมยาเซเลโคซิบในรูปของไมโครอิมัลชันได้ ตัวยาจะมีการละลายที่ติดอยู่แล้วทำให้สามารถถูกดูดซึมได้ทันที จึงทำให้มีระยะเวลาเริ่มออกฤทธิ์ที่เร็วขึ้น (rapid onset)

เนื่องจากผลิตภัณฑ์เซเลโคซิบที่มีจำหน่ายในท้องตลาดนั้นเป็นรูปแบบแคปซูลในขนาด 200 mg การวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาให้ได้สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่สามารถให้ค่าการละลายของยาเซเลโคซิบได้ในความ

เข้มข้นไม่ต่ำกว่า 200 mg/ml ด้วยเช่นกัน เพื่อให้โรงงานผลิตยาสามารถนำไมโครอิมัลชันที่ได้ไปบรรจุในแคปซูลชนิดนิ่ม (soft gelatin capsules) ในปริมาณต่อเม็ดที่ไม่ใหญ่เกินไป เพื่อให้ผู้ป่วยสามารถรับประทานได้โดยสะดวก

ทบทวนวรรณกรรม

เซเลโคซิบ (celecoxib) เป็นยาต้านอาการอักเสบในกลุ่มยาต้านอาการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDS) โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase 2 อย่างจำเพาะเจาะจง ในทางการแพทย์ใช้เป็นยาต้านอาการอักเสบและอาการปวดของโรคข้อเสื่อม โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเก๊าท์ และอาการปวดเฉียบพลัน เช่น อาการปวดจากการผ่าตัด ปวดประจำเดือน เป็นต้น

จากคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีพบว่า เซเลโคซิบมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 381 ดาลตัน และมีค่าการละลายน้ำที่ต่ำมาก (ประมาณ 5 µg/ml) [1] ซึ่งถ้าหากตัวยาละลายน้ำได้น้อย ก็จะไม่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ จึงจำเป็นต้องมีระบบนำส่งยาเพื่อเพิ่มค่าการละลายให้ตัวยาสสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นและถูกดูดซึมได้ดียิ่งขึ้น

ไมโครอิมัลชัน (Microemulsions) จัดเป็นระบบคอลลอยด์ที่มีอนุภาคระดับนาโนเมตร ไมโครอิมัลชันประกอบด้วยวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) และวัฏภาคน้ำ ไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ สามารถเตรียมได้ง่ายและเหมาะต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ไมโครอิมัลชันสามารถเตรียมได้โดยวิธี water titration method โดยการเติมน้ำลงในของผสมระหว่างวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ของผสมที่มีความพอดีกันในสัดส่วนของทั้งสามวัฏภาคจึงเกิดเป็นไมโครอิมัลชันขึ้นได้เอง (spontaneous formation) การเกิดไมโครอิมัลชันโดยของผสมทั้งสามวัฏภาคนี้จะแสดงโดยใช้ pseudoternary phase diagram

วิตามินอีทีพีจีเอส (vitamin E TPGS) หรือ d-alpha-Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) ที่เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี โดยสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของวิตามินอี (vitamin E succinate) และ polyethylene glycol (PEG) โดยสารชนิดนี้จัดเป็นสารที่ร่างกายสามารถย่อยสลายได้ (biodegradable) โดยเอนไซม์เอสเทอร์เรส นอกจากนี้องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) ยังจัดให้สารนี้เป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง (Generally regarded as safe substance) สำหรับการใช้ในตำรับยา [6]

วิตามินอีที่พีจีเอส จึงเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่สามารถละลายน้ำได้ โดยมีค่า HLB เท่ากับ 13.2 ในทางเภสัชกรรมจึงใช้เป็นสารช่วยเพิ่มการละลาย (solubilizer) และสารก่ออิมัลชัน (emulsifier) นอกจากนี้วิตามินอีที่พีจีเอสยังมีฤทธิ์ยับยั้ง P-glycoprotein (P-gp) ทำให้สามารถเพิ่มค่าชีวสมมูลของยาต้านมะเร็งเช่น paclitaxel ได้ [7]

Ke และคณะ [8] ได้ศึกษาพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันของโดยใช้วิตามินอีที่พีจีเอสเป็นสารลดแรงตึงผิว ใช้ C8/C10 triglycerides (Captex 300) เป็นวัฏภาคน้ำมัน และศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดต่างๆ ได้แก่ Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, PEG 400, PEG 600, ethanediol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,3-butanediol, 1,4-butanediol และ glycerin ที่ส่งผลต่อพื้นที่ของการเกิดไมโครอิมัลชันพบว่าในระบบที่ประกอบด้วย vitamin E TPGS/Glycerine อัตราส่วน 1:2 ให้พื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันสูงสุด อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานการใช้ไมโครอิมัลชันที่มีวิตามินอีที่พีจีเอสเพื่อเพิ่มการดูดซึมของยาใดๆ โดยการรับประทาน ในทางคลินิกไมโครอิมัลชันมีศักยภาพในการเพิ่มการดูดซึมยา cyclosporine ได้มากกว่ารูปแบบสารละลาย จากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของผลิตภัณฑ์ยา cyclosporine ในรูปแบบไมโครอิมัลชัน (Sandimmune[®] neoral) ซึ่งมี corn oil เป็นวัฏภาคน้ำมันและมี polyoxyl 40 hydrogenated castor oil เป็นสารลดแรงตึงผิว นั้นสามารถเพิ่มการดูดซึมยา cyclosporine ได้ดีกว่า cyclosporine ในรูปแบบสารละลาย ซึ่งใช้ ethanol และ corn oil เป็นตัวทำละลาย [9, 10]

การ uptake อนุภาคเข้าสู่เซลล์นั้น (endocytosis) แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ phagocytosis และ pinocytosis ปัจจุบัน pinocytosis ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น เป็น 4 ประเภทคือ macropinocytosis, clathrin-dependent endocytosis (CDE), clathrin-independent (CIE) endocytosis หรือที่เรียกว่า Caveolae-mediated endocytosis และ clathrin-, caveolin-independent endocytosis คาดกันว่า CDE เป็น endocytic pathway ที่สำคัญสำหรับอนุภาคที่มีขนาดไม่เกิน 200 nm ซึ่งการศึกษาว่าอนุภาคไมโครอิมัลชันจะเข้าสู่เซลล์โดยกลไกใดนั้น สามารถศึกษาโดยใช้ inhibitors ซึ่งได้แก่ amiloride และ wortmanin ใช้ยับยั้ง macropinocytosis, chlorpromazine ใช้เป็นสารยับยั้ง CDE ส่วน Methyl- β -cyclodextrin (M β CD), indomethacin, Filipin, Nystatin และ genistein ใช้เป็นสารยับยั้ง CIE นอกจากนี้ยังมีสาร quercetin เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้ง caveolae และ clathrin-independent endocytosis [11]

กลไกการดูดซึมของสูตรตำรับยาที่ละลายในไขมัน (oily dispersion) นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 1. การเพิ่มความยืดหยุ่น (fluidity) ของเซลล์เมมเบรน ทำให้เพิ่มการดูดซึมแบบ transcellular 2. การเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ (tight junction) เพื่อให้เกิดการดูดซึมแบบ paracellular transport 3. การยับยั้ง P-glycoprotein ซึ่งมีหน้าที่ขับยาออกจากเซลล์ รวมถึงเอนไซม์ CYP 450 บริเวณ gut membrane ที่สามารถ metabolism ยา 4. การเพิ่มการขนส่งทางระบบน้ำเหลือง เมื่อมีการกระตุ้นให้สร้าง lipoprotein/chylomicron [12]

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อเพิ่มค่าการละลายของยาเซเลโคซิบโดยใช้ไมโครอิมัลชัน
- 2) เพื่อพัฒนาสูตรตำรับไมโครอิมัลชันโดยใช้วิตามินอีที่พีจีเอสเป็นสารลดแรงตึงผิว
- 3) เพื่อศึกษาผลของไมโครอิมัลชันที่มีวิตามินอีที่พีจีเอสเป็นสารลดแรงตึงผิวต่อการเพิ่มการซึมผ่านทางเดินอาหารของยาเซเลโคซิบแบบภายนอกร่างกาย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้สูตรตำรับยาเซเลโคซิบซึ่งมีระยะเวลาการออกฤทธิ์ที่เร็วขึ้นและถูกดูดซึมได้มากขึ้น
- 2) ทำให้ผู้ป่วยได้ใช้ยาเซเลโคซิบที่สามารถออกฤทธิ์แก้ปวดได้เร็ว มีการดูดซึมได้ดีขึ้นและปลอดภัย
- 3) เป็นการสนับสนุนอุตสาหกรรมการผลิตยาภายในประเทศให้สามารถผลิตยาเทคโนโลยีนาโนได้เอง
- 4) เพื่อสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการถูกดูดซึมของไมโครอิมัลชันซึ่งเป็นประโยชน์ต่อวงการวิชาการและการปรับปรุงพัฒนาไมโครอิมัลชันให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น
- 5) เป็นการพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์ที่เป็นนักวิจัยรุ่นใหม่

2. สารเคมีและเครื่องมือ

2.1 สารเคมี

1. Celecoxib (China)
2. Medium chain triglycerides or Caprylic/Capric Triglyceride (Lexol GT865, Inolex, Philadelphia, PA, USA)
3. d-alpha-Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (vitamin E TPGS) (Antares Health Products Inc., Illinois, USA)
4. Absolute ethanol
5. Polyethylene glycol 400
6. Propylene glycol
7. Methanol
8. Acetonitrile

2.2 เครื่องมือ

1. Dynamic Light Scattering particle size analyzer (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instrument, Worcestershire, UK)
2. Magnetic stirrer (IKA R0 10, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)
3. Centrifuge (Sorvall[™] Legend[™] XT/XF Centrifuge, Thermo Scientific[™], MA, USA)
4. HPLC (Agilent 1260 infinity II LC systems, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)
5. LDH cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
6. Confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 800, Carl Zeiss, Jena, Germany)
7. Millicell[®] ERS-2 volt-ohm meter (Millipore Corp., Bedford, USA)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การหาค่าการละลายของเซเลโคซิบ

การศึกษาค่าการละลายของ celecoxib ทำเพื่อเลือกส่วนประกอบที่จะใช้ในสูตรตำรับ โดยศึกษาค่าการละลายของ celecoxib ในวัฏภาคน้ำมัน คือ Medium chain triglycerides, oleic acid และ fish oil และสารลดแรงตึงผิวร่วม ได้แก่ PEG 400, ethanol และ propylene glycol การหาค่าการละลายทำโดยเติมยาปริมาณมากลงในสารดังกล่าวปริมาณ 2 ml ที่บรรจุในขวดสีชา จากนั้นจึงคนด้วย magnetic stirrer ที่ 800 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำสารแขวนตะกอนของตัวยาที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 25 °C จากนั้นดูเฉพาะส่วนบน (supernatant) ไปเจือจางด้วย methanol แล้ววิเคราะห์โดยใช้ HPLC

3.2 การเตรียมไมโครอิมัลชัน

3.2.1 การเลือกสารลดแรงตึงผิวร่วม

เพื่อให้ได้ pseudo-ternary phase diagram ที่มีพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันกว้างที่สุด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อหาชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) ที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้วัฏภาคน้ำมันเป็น Medium chain triglycerides และใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น vitamin E TPGS กำหนดให้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1:1 ส่วนการสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ทำโดยใช้ water titration method

3.2.2 การสร้าง pseudo-ternary phase diagram ของไมโครอิมัลชัน

ซึ่ง surfactant และ co-surfactant ผสมให้เข้ากัน จะได้ส่วนผสมที่เรียกว่า surfactant mixture (Sm) จากนั้นจึงผสม oil phase และ Sm ให้เข้ากัน โดยที่อัตราส่วนของ oil phase และ Sm มีค่าตั้งแต่ 9:1 ถึง 1:9 w/w จากนั้นจึงหยดน้ำกลั่นลงในของผสมดังกล่าวที่คนโดย magnetic stirrer จากนั้นจึงสังเกตความใส

(transparency) และบันทึกปริมาณน้ำที่มากที่สุด ที่ยังทำให้ของผสมยังคงมีลักษณะใส โดยของผสมระหว่าง oil phase, Sm และน้ำ ที่ยังมีลักษณะใส จัดเป็นไมโครอิมัลชัน

3.2.3 การหาค่าการละลายของ celecoxib ในไมโครอิมัลชัน

ชั่งยา celecoxib ในปริมาณมาก ลงในไมโครอิมัลชัน แล้วคนโดยใช้ magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารแขวนตะกอนที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 25 °C จากนั้นดูเฉพาะส่วนใส (supernatant) ไปเจือจางด้วย methanol แล้ววิเคราะห์โดยใช้ HPLC

3.2.4 การเตรียม celecoxib loaded microemulsion

เมื่อได้ pseudo-ternary phase diagrams ที่แสดงขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันแล้ว จึงเลือกจุดจากเฟส ไดอะแกรมเพื่อเตรียมไมโครอิมัลชัน โดยเลือกสูตรที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 20-200 nm และไม่มีการแยกเฟส การเตรียมไมโครอิมัลชันทำโดยผสมวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมและน้ำ คนผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer จากนั้นจึงผสม celecoxib ลงไป คนต่อไปจนเกิดการละลายสมบูรณ์

3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของไมโครอิมัลชัน

3.3.1. การวัดขนาดอนุภาค (Mean droplet size) ประจุพื้นผิว (surface charge) การกระจายขนาด (size distribution) และค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity)

วัดขนาดอนุภาคของ celecoxib loaded microemulsion ประจุที่พื้นผิว (zeta potential) การกระจายขนาด ค่าการนำไฟฟ้าของ celecoxib loaded microemulsion โดยใช้ Dynamic Light Scattering (DLS) particle size analyzer ที่มี 4 mW He-Ne laser ที่มุม 173°

3.4 การศึกษาการปลดปล่อยยาแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* drug release)

ศึกษาการปลดปล่อย celecoxib จากไมโครอิมัลชัน ของสูตรตำรับ ME 1 ME 6 และ ME 8 โดยใช้ Dialysis bag ที่มี molecular weight cut off ระหว่าง 6,000-8,000 ดาลตัน โดยนำ celecoxib loaded microemulsion ปริมาณ 6 ml ใส่ลงใน dialysis bag แล้วจึงปิดส่วนบนและล่างโดย clamp จากนั้นใส่ลงในขวด

แก้ว แล้วเติม release medium ซึ่งเป็น 50 % v/v ethanol:PBS ปริมาณ 180 ml แล้วคนด้วย magnetic stirrer ที่ 300 rpm ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเมื่อครบเวลาที่ 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง 8 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง จึงเก็บ release medium ครั้งละ 1 ml แล้วรีบเติม 50 % v/v ethanol:PBS แทนที่ลงไป นำ release medium ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ celecoxib โดย HPLC จากนั้นจึง plot กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและ % cumulative drug release โดยหาจลนศาสตร์การปลดปล่อยจากสมการ

$$C = C_0 - K_0t \text{ for zero-order kinetics}$$

$$\text{Log}C = \text{log}C_0 - K_1t/2.303 \text{ for first-order kinetics}$$

$$C = K_h t^{1/2} \text{ for Higuchi diffusion model}$$

เมื่อ C คือปริมาณยาที่ปลดปล่อย C_0 คือปริมาณยาเริ่มต้น K_0 คือค่าคงที่ของจลนศาสตร์ลำดับศูนย์ K_1 คือค่าคงที่ของจลนศาสตร์ลำดับหนึ่ง K_h คือค่าคงที่ของจลนศาสตร์ฮิกูชิ และ t คือเวลา

3.5 การศึกษาการดูดซึมยาผ่านทางเดินอาหารแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* intestinal absorption study)

ศึกษาการดูดซึมของสูตรควบคุม คือเซเลโคซิบละลายใน PEG 400 และสูตรเซเลโคซิบไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้จากขั้นตอน 3.2.4 โดยทดสอบการซึมผ่านโดยใช้ Franz diffusion cells ซึ่งใช้ลำไส้หมู (pig intestine) ส่วน ileum เป็นเยื่อกั้นการซึมผ่าน ซึ่งมีรายงานการวิจัยว่าสามารถใช้ทำนายการดูดซึมผ่านลำไส้ของมนุษย์ได้ [13] ในส่วน donor จะใส่สูตรที่ต้องการทดสอบปริมาณ 2 ml โดยส่วน receiver นั้น จะใส่สารละลาย ethanol in PBS ในความเข้มข้น 50 % v/v ไว้ [14] และคนด้วย magnetic stirrer พร้อมกับควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ไว้ตลอดการทดลอง โดยใช้ water circulating bath ส่วนใน donor part ก็ใส่สารที่ต้องการทดสอบไว้ เมื่อถึงเวลาที่กำหนดคือ 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง 8 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง จึงดูด receiver medium ออกมาเพื่อวัดปริมาณเซเลโคซิบโดย HPLC พร้อมกับใส่ receiver medium ใหม่ แทนลงไป ปริมาณเท่ากับที่ดูดออกมา คำนวณหาค่า P_{app} (apparent permeability) ซึ่งค่าที่มากกว่าจะแสดงให้เห็นว่าสูตรนั้นช่วยให้เซเลโคซิบสามารถดูดซึมได้ดี โดยคำนวณจากสมการ

$$P_{app} = dQ/dt \times [1/(A \times C_0)]$$

เมื่อ dQ/dt คือความชันของกราฟที่เป็นเส้นตรงระหว่างเวลาและปริมาณยา

A คือพื้นที่ผิวในการดูดซึมของ Franz cell

C_0 คือความเข้มข้นของเซเลโคซิบใน donor part

3.6 การประเมินความเป็นพิษต่อเยื่อลำไส้ (Evaluation of intestinal membrane cytotoxicity)

เพื่อประเมินความปลอดภัยของสูตรตำรับไมโครอิมัลชันสำหรับการนำส่งโดยการรับประทาน จึงทดสอบความเสียหายต่อเยื่อลำไส้โดยใช้ Lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay โดยสูตรที่ใช้ศึกษาได้แก่สูตรไมโครอิมัลชันที่สามารถเพิ่มการซึมผ่านของ celecoxib ได้มากที่สุด จากขั้นตอนที่ 3.5, celecoxib in PEG 400, blank microemulsion และ blank PEG 400 โดยมี PBS เป็น negative control และ 3% w/w Triton X-100 เป็น positive control การทดสอบนี้ทำโดยใช้ Franz diffusion cells ซึ่งใช้ลำไส้หมู (pig intestine) ส่วน ileum เป็นเยื่อรับการซึมผ่านแต่ไม่มี receiver medium โดยใส่สูตรที่ต้องการทดสอบในส่วน donor part ปริมาณ 2 ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงดูดเอาสูตรตำรับออกแล้วล้างเยื่อโดยการเติม PBS ปริมาณ 2 ml ลงใน donor part แล้วนำ PBS นี้มาปั่นเหวี่ยงที่ 1,000× g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วน supernatant นี้จะนำไปวิเคราะห์ LDH activity โดยใช้ชุดทดสอบ LDH cytotoxicity detection kit แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm และคำนวณค่า percent cytotoxicity จากสมการ

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [(\text{tested formulation} - \text{negative control}) / (\text{positive control} - \text{negative control})] \times$$

100

3.7 การศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ (Confocal laser scanning microscopy study, CLSM)

3.7.1 การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคและลำไส้ (Particle-intestinal tissue interaction)

เป็นการศึกษาหลักการดูซึมของอนุภาคไมโครอิมัลชันกับเนื้อเยื่อลำไส้โดยใช้ colocalization technique โดยเป็นเทคนิคที่ใช้ความแตกต่างระหว่างสีเรืองแสงของตัวยาที่ถูกกักเก็บและอนุภาคไมโครอิมัลชัน โดยใช้ Nile red ซึ่งเป็นสารเรืองแสงสีแดง เป็นตัวแทนของยาละลายไขมันดีที่ถูกกักเก็บในอนุภาค ส่วน NBD-PE เป็นสารลดแรงตึงผิวที่เรืองแสงได้โดยมีโครงสร้างเป็น phosphatidyl ethanolamine ต่อกับ NBD ซึ่งเรืองแสงสีเขียว โดย NBD-PE เป็นสารลดแรงตึงผิวที่สามารถเรืองแสงสีเขียวได้และเป็นตัวแทนของอนุภาคไมโครอิมัลชัน การเตรียม Nile red-loaded NBD-PE-labeled microemulsion particles ทำโดยการชั่ง Nile red และ NBD-PE ปริมาณ 1 และ 5.4 mg ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 2 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยไมโครอิมัลชันที่ให้ค่า P_{app} มากที่สุดจากการทดลองที่ 3.5

3.7.2 การศึกษาการดูดซึมผ่านลำไส้แบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* intestinal absorption study)

ศึกษาการซึมผ่านโดยใช้ Franz diffusion cells ดังที่อธิบายในขั้นตอนที่ 3.5 โดยไม่ใส่ release medium ในส่วนของ donor compartment บรรจุ Nile red-loaded NBD-PE-labeled microemulsion particles ปริมาณ 500 μ l และทดสอบเป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดล้างลำไส้ด้วย PBS ก่อนนำไปศึกษาโดย CLSM

3.7.3 การเตรียมเนื้อเยื่อลำไส้ (Intestine histology preparation)

นำลำไส้ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 3.7.2 มาตัดแบบตัดขวาง (cross-sections) โดยใช้ cryomicrotome (Leica 1850, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) โดยนำชิ้นส่วนลำไส้มาวางบน metal sample holder ภายใน cryomicrotome จากนั้นจึงใส่ cryo-embedding medium (Neg 50, MICROM International, Waldorf, Germany) แล้วตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 10 μm ก่อนวางลงบนสไลด์ (MENZEL-GLÄSER[®], SuperFrost[™] Plus, Braunschweig, Germany) ทำการย้อมนิวเคลียสโดยใช้ 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำ แล้วนำไปศึกษาโดย CLSM

3.7.4 การศึกษาโดย CLSM

นำชิ้นเนื้อเยื่อจากขั้นตอนที่ 3.7.2 วางลงบน coverslip (MENZEL-GLÄSER[®], Braunschweig, Germany) ขนาด 22x50 mm ส่องดูด้วยเลนส์กำลังขยาย 10x โดย Zeiss LSM 800 inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) ซึ่งต่อกับ diode lasers (excitation wavelength = 405, 488 and 561 nm) เพื่อถ่ายภาพ

3.8 การประเมินค่า Transepithelial electrical resistance (TEER)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบกลไกของไมโครอิมัลชันในการเพิ่มการดูดซึมผ่านลำไส้ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) ซึ่งตรวจสอบโดยการวัดค่า TEER ของเนื้อเยื่อที่ได้รับการทดสอบ โดยศึกษาจากสูตรที่มีค่า P_{app} มากที่สุด จากการทดลองที่ 3.5 โดยมี PBS และ celecoxib in PEG 400 เป็นกลุ่มควบคุม

การวัดทำโดยการวางเนื้อเยื่อลำไส้ลงบน semipermeable membrane ของ 6-well hanging insert plates (well diameter=24 mm, membrane area=4.5 cm²) ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมดและป้องกันการเชื่อมต่อกันของตัวทำละลายระหว่างด้าน apical และ basolateral จากนั้นเติม PBS ปริมาณ 1 ml ลงบนด้าน apical และ basolateral แล้ววัดค่า TEER ก่อนการทดสอบโดยใช้ Millicell[®] ERS-2 volt-ohm meter (Millipore Corp., Bedford, USA) จากนั้นดูดเอา PBS ของด้าน apical ออก แล้วแทนด้วยสูตร microemulsion เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด 3 ชั่วโมง จึงดูดเอา microemulsion ออก แล้วเติม PBS 1 ml ลงไปแทน จากนั้นจึงวัดค่า TEER ของเนื้อเยื่อภายหลังการทดสอบอีกครั้ง ค่า TEER (R) คำนวณได้จากสมการ

$$R = (R_{\text{sample}} - R_{\text{blank}})S_A,$$

เมื่อ R_{sample} คือค่าความต้านทานไฟฟ้าของเนื้อเยื่อที่ได้รับการทดสอบ (Ω),

R_{blank} คือค่าความต้านทานไฟฟ้าของ hanging insert plates (Ω) และ

S_A คือพื้นที่ผิวของ hanging insert plate membrane (cm²).

3.9 การวิเคราะห์ปริมาณของเซเลโคซิบโดยใช้ High performance liquid chromatography (HPLC)

3.9.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของเซเลโคซิบ (celecoxib standard curve)

ชั่งสารมาตรฐานของเซเลโคซิบปริมาณ 25 mg ลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 ml จะได้เซเลโคซิบความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นนำไปเจือจางจนได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 µg/ml จนถึง 500 µg/ml และนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.9.2 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

ใช้ C18 reversed phase column (Symmetry[®], VertiSep[™], Vertical, Nonthaburi, Thailand) โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 µm ขนาด 4.6 x 250 mm ส่วน mobile phase ประกอบด้วย acetonitrile:water

ในอัตราส่วน 75:25 % (v/v) ใช้ UV detector ที่ 250 nm ฉีดตัวอย่างครั้งละ 20 μ l อัตราการไหลของ mobile phase คือ 1 ml/min

3.10 การวิเคราะห์โดยใช้สถิติ

ใช้ paired t-test และ Analysis of variance (one way ANOVA) ตามด้วย post hoc test (LSD) โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p -value น้อยกว่า 0.05

4. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การหาค่าการละลายของ celecoxib

ค่าการละลายของ celecoxib ในวัฏภาคน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวร่วมแสดงในตารางที่ 1 สำหรับน้ำมันนั้น celecoxib สามารถละลายได้ใน Medium chain triglycerides มากที่สุด จึงได้เลือก Medium chain triglycerides เป็นวัฏภาคน้ำมันสำหรับการตั้งตำรับไมโครอิมัลชันต่อไป

ตารางที่ 1 ค่าการละลายของ celecoxib ในน้ำมันและสารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดต่างๆ

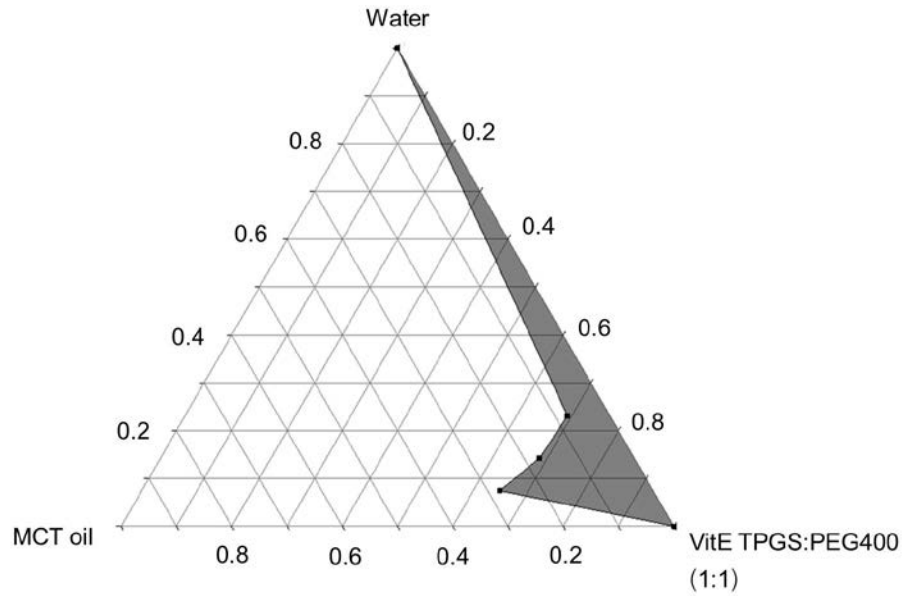
Oils/co-surfactants	Solubility (mg/ml)
Medium chain triglycerides	11.62±3.08
Fish oil	3.25±0.16
Oleic acid	0.73±0.06
PEG 400	433.26±31.66
Ethanol	79.15±10.25
Propylene glycol (PG)	24.25±0.99
Glycerine	0.42±0.01

Each value represents the mean±standard deviation (n=3).

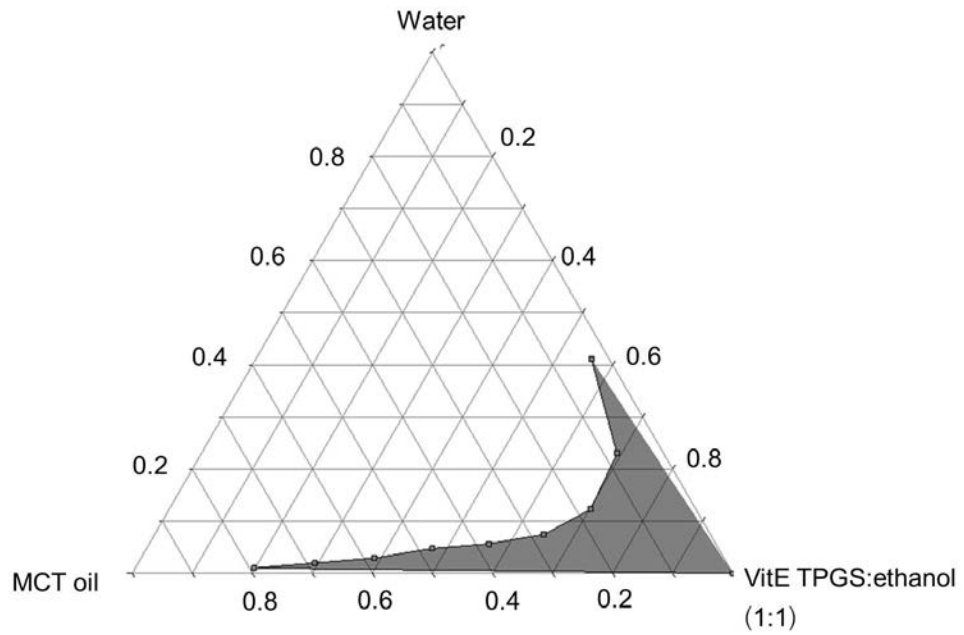
4.2 การเตรียมไมโครอิมัลชัน

4.2.1 การเลือกสารลดแรงตึงผิวร่วม

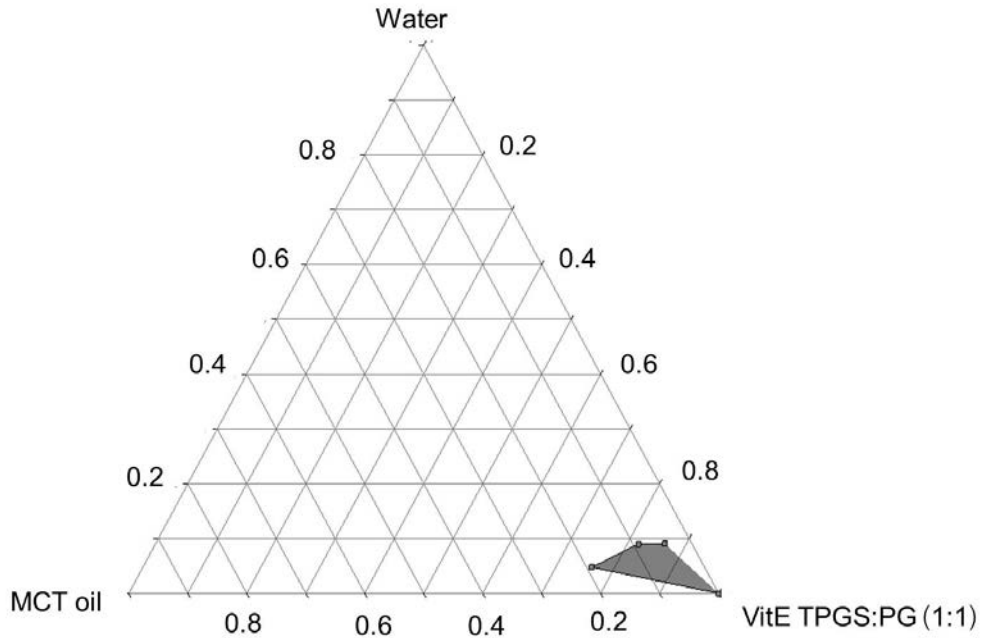
เพื่อให้ได้ pseudoternary phase diagrams ที่มีขนาดมากที่สุด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อเลือกชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสม สำหรับการเลือกชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสม จะใช้ Medium chain triglycerides เป็นวัฏภาคน้ำมัน ใช้ PEG 400, ethanol, propylene glycol และ glycerine เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมและน้ำ RO เป็นวัฏภาคน้ำ โดยกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1:1 ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 1-3 บริเวณสีเทา (shed area) คือบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชัน



รูปที่ 1 Pseudo-ternary phase diagram of MCT oil, VitE TPGS:PEG400 (1:1) and water



รูปที่ 2 Pseudo-ternary phase diagram of MCT oil, VitE TPGS:ethanol (1:1) and water



รูปที่ 3 Pseudo-ternary phase diagram of MCT oil, VitE TPGS:PG (1:1) and water

โดยพบว่าพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุด เมื่อใช้ VitE TPGS และ ethanol เป็นสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม รองลงมาคือ VitE TPGS และ PEG 400 และ VitE TPGS และ PG ตามลำดับ ส่วน VitE TPGS และ glycerine นั้น ไม่สามารถเกิดไมโครอิมัลชันได้

จึงได้เลือกใช้ VitE TPGS และ ethanol อัตราส่วน 1:1 เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ตามลำดับในการศึกษาต่อไป โดยจะเลือกอัตราส่วนซึ่งให้ไมโครอิมัลชันที่มีขนาดไม่เกิน 300 nm และมีความคงตัวดี ซึ่งอัตราส่วนที่เลือกใช้เพื่อศึกษาต่อ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สูตรตำรับไมโครอิมัลชัน

สูตรตำรับ	สัดส่วน		
	Oil	Mixture of surfactant	Water
ME-1	10	80	10
ME-2	10	75	15
ME-3	10	85	5
ME-4	15	75	10
ME-5	15	80	5

4.2.2 การศึกษาค่าการละลายของเซเลโคซิบในไมโครอิมัลชัน

ค่าการละลายของ celecoxib ในไมโครอิมัลชัน อยู่ระหว่าง 131.4 ถึง 201.1 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 3 การพัฒนาสูตรตำรับเซเลโคซิบไมโครอิมัลชันนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมเป็นรูปแบบ soft gelatin capsules เพื่อให้สามารถกลืนได้สะดวก แคปซูลจึงควรมีขนาดเล็ก ดังนั้นจึงได้เตรียม celecoxib loaded microemulsion โดยให้มีความเข้มข้นของเซเลโคซิบที่ร้อยละ 95 ของค่าการละลาย โดยความเข้มข้นของเซเลโคซิบในไมโครอิมัลชันแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สูตรตำรับไมโครอิมัลชัน ค่าการละลายของ celecoxib และปริมาณของ celecoxib ในสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน

Formulation	Ratio			Solubility of celecoxib (mg/ml)*	celecoxib loaded in microemulsion (mg/ml)
	Oil	Surfactant mixture	Water		
ME-1	10	75	15	196.4±18.8	187
ME-2	10	80	10	131.4±10.7	125
ME-3	10	85	5	201.1±14.7	191
ME-4	5	80	15	153.4±0.7	146
ME-5	15	80	5	191.1±1.3	181

*Each value represents the mean±standard deviation (n=3).

4.3 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของไมโครอิมัลชัน

4.3.1 การวัดขนาดอนุภาค (Mean droplet size) ประจุพื้นผิว (surface charge) การกระจายขนาด (size distribution) และค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity)

การศึกษาคูณสมบัติของไมโครอิมัลชันนี้จะศึกษาทั้งไมโครอิมัลชันที่ไม่มี celecoxib (Blank microemulsion) และไมโครอิมัลชันที่บรรจุยา celecoxib (celecoxib loaded microemulsion) ดังแสดงในตารางที่ 4

4.3.1.1 ขนาดของอนุภาค

จากการศึกษาขนาดโดยใช้เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) พบว่าอนุภาคไมโครอิมัลชันที่ไม่มี celecoxib มีขนาดอยู่ในช่วง 162.03-229.07 nm ในขณะที่ไมโครอิมัลชันที่มี celecoxib มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 106.12-268.57 nm

4.3.1.2 ประจุที่พื้นผิว

ค่าศักย์ซีตาของอนุภาคไมโครอิมัลชันที่ไม่มี celecoxib มีค่าอยู่ในช่วง -0.108 – 0.004 mV ส่วนค่าศักย์ซีตาของอนุภาคไมโครอิมัลชันที่มี celecoxib มีค่าอยู่ในช่วง -0.1085 – 0.0743 mV

สูตรตำรับไมโครอิมัลชันประกอบด้วยวัฏภาคน้ำมันคือ MCT oil ซึ่งไม่มีประจุ ส่วนสารลดแรงตึงผิวคือ vitamin E TPGS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ และสารลดแรงตึงผิวร่วมคือ PEG 400 ก็เป็นสารที่ไม่มีประจุ ในส่วนยาที่ถูกบรรจุคือ celecoxib ก็เป็นยาที่ไม่มีประจุเช่นกัน ดังนั้น celecoxib loaded microemulsion จึงมีค่าศักย์ซีตาที่เป็นกลาง

4.3.1.3 การกระจายขนาด

อนุภาคของไมโครอิมัลชันที่ไม่มี celecoxib มีการกระจายขนาด (PDI) อยู่ระหว่าง 0.329-0.765 ส่วนอนุภาคของไมโครอิมัลชันที่มี celecoxib มีการกระจายขนาด (PDI) อยู่ระหว่าง 0.261-0.444 แสดงว่าไมโครอิมัลชันที่มี celecoxib มีการกระจายขนาดที่แคบกว่าไมโครอิมัลชันที่ไม่มี celecoxib

4.3.1.4 ค่าการนำไฟฟ้า

ค่าการนำไฟฟ้าเป็นสิ่งที่สามารถนำมาใช้บอกถึงชนิดของไมโครอิมัลชันได้ (oil in water หรือ water in oil microemulsion)

จากรายงานการวิจัยของ Subongkot และคณะ [15] ได้สันนิษฐานเกี่ยวกับชนิดของไมโครอิมัลชันจากการนำไฟฟ้าไว้ว่า ถ้าอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมันมากกว่าน้ำ จะเป็นชนิด water-in-oil microemulsion ถ้า

อัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมากกว่าวัฏภาคน้ำมัน โดยที่มีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า 52.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ จะเป็นชนิด oil-in-water microemulsion และเป็นไมโครอิมัลชันชนิด bicontinuous microemulsion เมื่ออัตราส่วนของวัฏภาคน้ำเท่ากับวัฏภาคน้ำมันหรือมีอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมากกว่าวัฏภาคน้ำมัน โดยที่มีค่าการนำไฟฟ้าไม่เกินกว่า 52.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$

ดังนั้น blank ME-3 และ blank ME-5 จึงเป็น water-in-oil microemulsion ส่วน blank ME-1, blank ME-2 และ blank ME-4 เป็น bicontinuous microemulsion

Celecoxib load ME-3 และ celecoxib load ME-5 จึงเป็น water-in-oil microemulsion ส่วน celecoxib loaded ME-1 และ celecoxib loaded ME-4 แม้ว่าจะมีวัฏภาคน้ำมากกว่าน้ำมันแต่มีค่าการนำไฟฟ้าไม่เกิน 52.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ จึงน่าจะเป็น water-in-oil microemulsion ในส่วนของ celecoxib loaded ME-2 แม้ว่าจะมีอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำเท่ากับน้ำมัน แต่จากการมองดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามือนูภาคเป็นรูปทรงกลม ดังนั้นน่าจะเป็น water-in-oil microemulsion เช่นกัน

ตารางที่ 4 ขนาดอนุภาค ประจุที่พื้นผิว การกระจายขนาดและค่าการนำไฟฟ้าของไมโครอิมัลชันสูตร

ต่างๆ

Formulation number	Particle size (nm)		Zeta potential (mV)		Polydispersity index (PDI)		Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
	Blank ME	Celecox ib loaded ME	Blank ME	Celecox ib loaded ME	Blank ME	Celecox ib loaded ME	Blank ME	Celecox ib loaded ME
ME-1	216.73±68.15	186.7-57.8	0.004±0.066	-0.0562±0.0314	0.729±0.079	0.403±0.068	10.8±15.1	5.66±3.94
ME-2	178.47±42.21	268.57-154.92	-0.108±0.313	-0.0587±0.0222	0.329±0.098	0.443±0.176	8.09±0.24	6.59±0.62
ME-3	162.03±71.42	184.22-123.37	-0.042±0.073	-0.0706±0.0503	0.706±0.153	0.394±0.088	6.17±1.24	8.83±10.19
ME-4	229.07±83.45	106.12-10.39	-0.103±0.117	0.0743±0.5522	0.594±0.057	0.261±0.023	7.38±1.14	12.28±9.98
ME-5	191.23±45.75	257.47-75.47	-0.038±0.083	-0.1085±0.0453	0.765±0.049	0.444±0.059	14.88±12.66	2.76±0.61

Each value represents the mean±standard deviation (n=3).

4.4 การศึกษาการปลดปล่อยยาแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* drug release)

จลนศาสตร์การปลดปล่อยเซเลโคซิบจากสูตรควบคุม (celecoxib in PEG 400) และเซเลโคซิบจากไมโครอิมัลชัน (ME-1 – ME-5) แสดงในตารางที่ 5 พบว่าในรูปแบบสารละลาย (celecoxib in PEG 400) เซเลโคซิบมีการปลดปล่อยแบบจลนศาสตร์อันดับศูนย์ ส่วนเซเลโคซิบในไมโครอิมัลชันทั้ง ME 1- ME 5 มีการปลดปล่อยแบบจลนศาสตร์อันดับศูนย์เช่นกัน

โดยพบว่า ME-1, ME-3, ME-4 และ ME-5 มีอัตราการปลดปล่อยน้อยกว่าสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน ME-2 มีอัตราการปลดปล่อยที่ไม่แตกต่างกับสูตรควบคุม

ตารางที่ 5 จลนศาสตร์การปลดปล่อยเซเลโคซิบจากสูตร celecoxib in PEG 400 และไมโครอิมัลชัน (ME1-ME5)

Release kinetics	PEG 400	ME-1	ME-2	ME-3	ME-4	ME-5
Zero order R^2	0.9665±0.0171	0.9952±0.0053	0.985±0.0219	0.9927±0.0032	0.9965±0.0037	0.9946±0.0016
First order R^2	0.6279±0.0304	0.7721±0.0197	0.7752±0.0737	0.7882±0.0154	0.9225±0.0207	0.7397±0.0371
Higushi R^2	0.9519±0.0045	0.9164±0.0275	0.8911±0.0615	0.9055±0.0107	0.7602±0.0371	0.9389±0.0302
Zero order release rate (h^{-1})	1.0127±0.0724	0.5602±0.1805	0.9925±0.5461	0.4482±0.0081	0.5584±0.1592	0.4088±0.1036

Each value represents the mean±standard deviation (n=3).

4.5 การศึกษาการดูดซึมยาผ่านทางเดินอาหารแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* intestinal absorption study)

ค่า P_{app} ของสูตรควบคุม (PEG 400) และเซเลโคซิบไมโครอิมัลชัน (ME-1 ถึง ME-5) แสดงในตารางที่ 6 จากการทดสอบพบว่าสูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านของเซเลโคซิบได้มากที่สุดคือ ME-4 โดยสามารถเพิ่มการดูดซึมได้มากกว่าสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 6 ค่า apparent permeability (P_{app}) ของแต่ละสูตรตำรับ

Formulations (Celecoxib concentration, mg/ml)	P_{app} ($\times 10^{-7}$ cm/s)
PEG 400 (200)	3.32±0.74
ME-1(187)	2.51±0.26
ME-2 (125)	4.13±0.81
ME-3 (191)	2.78±0.78
ME-4 (146)	4.46±0.67
ME-5 (181)	2.68±0.61

Each value represents the mean±standard deviation (n=3).

4.6 การประเมินความเป็นพิษต่อเยื่อบุลำไส้

ความเป็นพิษของแต่ละสูตรตำรับแสดงในตารางที่ 7 โดยพบว่า Celecoxib loaded ME-4 มีความเป็นพิษไม่ต่างกับ Blank ME-4 แสดงว่าเซเลโคซิบไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเยื่อบุลำไส้ Celecoxib loaded ME-4 มีความเป็นพิษไม่แตกต่างจาก Blank PEG 400 และ celecoxib in PEG 400 แสดงว่า Celecoxib loaded ME-4 มีความปลอดภัยเมื่อให้โดยการรับประทานเนื่องจากมีความเป็นพิษไม่แตกต่างจาก PEG 400 ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้กันเป็นปกติในตำรับยาน้ำสำหรับรับประทาน

ตารางที่ 7 ความเป็นพิษต่อเยื่อลำไส้ของแต่ละสูตรตำรับ

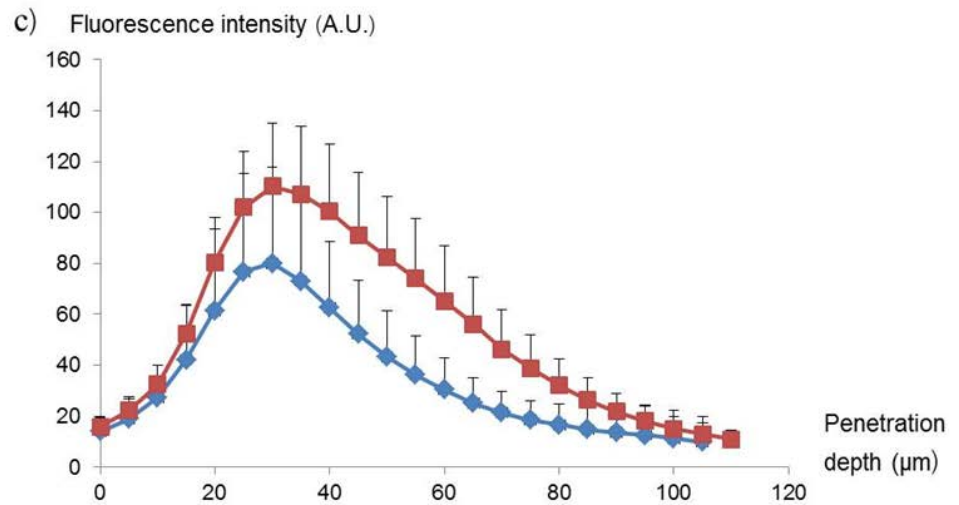
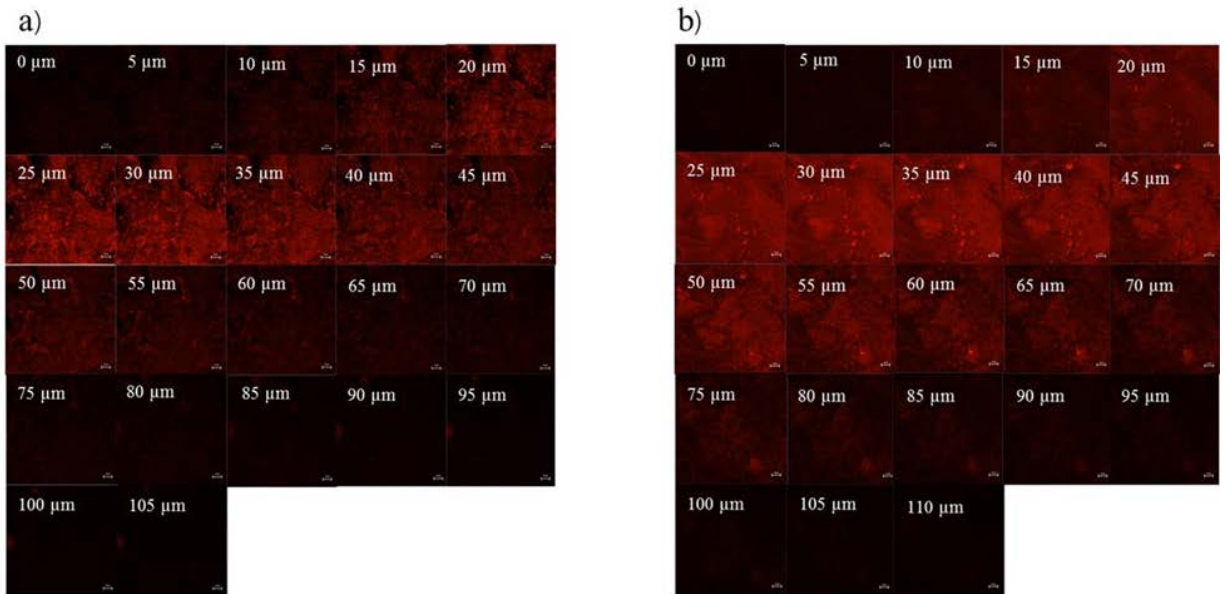
Formulations	% cytotoxicity
Blank ME-4	14.97±8.95
Celecoxib loaded ME-4	9.88±12.06
Blank PEG 400	5.06±2.35
Celecoxib in PEG 400	9.12±1.88

Each value represents the mean± standard deviation (n=3).

4.7 การศึกษาโดย CLSM

จากผลการทดลองในข้อที่ 4.5 พบว่า ME-4 มีค่า P_{app} ที่สูงที่สุด เพื่อเป็นการยืนยันผลของการทดสอบการดูดซึมผ่านลำไส้ จึงได้เลือก ME-4 เพื่อบรรจุ Nile red โดยเปรียบเทียบ the penetration depths และ fluorescent intensities กับ Nile red in PEG 400 ซึ่งใช้เป็นสูตรควบคุม

ภาพต่อเนื่องในแนวระนาบ x-z ที่ความลึกระดับต่างๆ ของลำไส้ที่ได้รับการทดสอบด้วย Nile red in PEG 400 และ Nile red-loaded ME-4 แสดงในรูปที่ 5 a) และ b) ตามลำดับ โดยพบว่าการเรืองแสงสีแดงของ Nile red in PEG 400 อยู่ในช่วง 15 μm ถึง 70 μm ขณะที่ ME-4 มีค่าชัดเจนในช่วง 15 μm ถึง 95 μm กราฟแสดง fluorescent intensity ของ Nile red ที่ระดับความลึกต่างๆ สำหรับ PEG 400 ซึ่งเป็นสูตรควบคุม และสูตร ME-4 แสดงในรูป 5 c) โดย ME-4 ยังแสดงให้เห็นค่า fluorescent intensity ของ Nile red มากกว่า PEG 400 การวิเคราะห์โดย CLSM โดยใช้ Nile red นี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาการดูดซึมผ่านลำไส้ในขั้นตอนที่ 3.4



รูปที่ 4 ภาพ CLSM แสดงให้เห็นภาพในแนวระนาบ x-z แบบต่อเนื่องของลำไส้หนูซึ่งได้รับการทดสอบด้วย

a) Nile red in PEG 400 และ b) Nile red-loaded ME-4 ภายหลังจากเวลา 3 ชั่วโมง (Scale bar มีขนาด 50 μm)

c) การเปรียบเทียบ fluorescence intensity profiles ของ Nile red ที่ความลึกต่างๆ ของลำไส้ในรูปที่ 4 a) (◆)

และ รูปที่ 4 b) (■). All data represent the mean±standard deviation. A.U. is defined as arbitrary units.

4.8 การประเมินค่า Transepithelial electrical resistance (TEER)

ค่า TEER ของลำไส้หนูก่อนและหลังการทดสอบด้วย PBS, celecoxib in PEG 400 และ celecoxib loaded ME-4 แสดงในตารางที่ 8 โดยพบว่าค่า TEER ของเนื้อเยื่อหลังจากทดสอบด้วย PBS หรือ celecoxib in PEG 400 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับก่อนการทดสอบ ขณะที่ค่า TEER ของเนื้อเยื่อที่ได้รับการทดสอบด้วย celecoxib-loaded ME-4 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับก่อนการทดสอบ แสดงให้เห็นว่า celecoxib-loaded ME-4 สามารถลด tight junction integrity ได้ ในขณะที่ celecoxib in PEG 400 ไม่สามารถลดได้

ตารางที่ 8 Transepithelial electrical resistance (TEER) ของลำไส้หนูก่อนและหลังการทดสอบด้วย PBS, celecoxib in PEG 400 และ celecoxib-loaded ME-4

Formulations	TEER (Ωcm^2)	
	Before	After
PBS	407.5±55.6	294.00±173.14
Celecoxib in PEG 400	909.99±252.93	746.49±178.34
Celecoxib loaded ME-4	1425.00±241.55	678.48±30.74

Each value represents the mean±standard deviation (n=3).

สำหรับการดูดซึมยาผ่านเยื่อบุลำไส้ชั้น โมเลกุลจะถูกดูดซึมผ่าน enterocyte cells บน intestinal epithelium เข้าสู่ blood circulation โดย passive diffusion ผ่าน cell membranes (transcellular pathway) โดยการแพร่ระหว่างเซลล์ที่ติดกัน (paracellular pathway) และโดย carrier-mediated transport (carrier-mediated transcellular pathway) [16]

การดูดซึมผ่าน paracellular route นั้นมีความสำคัญต่อการแพร่ผ่านของไอออนและการขนส่งของ กลูโคส กรดอะมิโน เพปไทด์ และ small, hydrophilic and ionized drugs โดย Tight junctions ประกอบด้วย transmembrane proteins ซึ่งได้แก่ occludin, claudins, tricellulin และ junctional adhesion molecules ซึ่งทำหน้าที่เป็น semipermeable barriers ต่อการขนส่งผ่านทาง paracellular ของไอออน น้ำ และ ยา [17]

การขนส่งผ่านทาง paracellular หรือ intercellular pathways นั้นถูกจำกัดโดยความสมบูรณ์ของ cellular tight junctions การเพิ่มการแพร่ผ่านโดยทาง paracellular pathway มีสารเคมีหลายชนิดที่มีรายงานว่าช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านได้ (paracellular permeability enhancers) เช่น bile salts, dimethyl β -cyclodextrin, surfactants, medium chain fatty acids, ethanol and chitosan derivatives [16, 18-20]

การวัดค่า TEER เป็นเทคนิคเชิงปริมาณที่ได้รับการยอมรับในการประเมินความสมบูรณ์ของ tight junction dynamics ในเนื้อเยื่อและ cell culture models ของ epithelial monolayers การลดลงของค่า TEER ของเนื้อเยื่อที่ได้รับการทดสอบด้วย celecoxib-loaded ME-4 เกิดขึ้นจากการลดลงของความสมบูรณ์ของ cellular tight junctions โดยสันนิษฐานว่าการลดลงของความสมบูรณ์ของ tight junction เป็นผลมาจาก องค์ประกอบของไมโครอิมัลชันคือ vitamin E TPGS และ ethanol

เนื่องจาก celecoxib จัดเป็น lipophilic molecule เซเลโคซิบจึงสามารถแพร่ผ่านเนื้อเยื่อโดย transcellular pathway ได้ การลดลงของค่า TEER ของเนื้อเยื่อที่ได้รับการทดสอบด้วย celecoxib-loaded ME-4 ชี้ให้เห็นว่านอกเหนือจากการขนส่งผ่าน transcellular pathway อนุภาคไมโครอิมัลชันยังสามารถเพิ่มการดูดซึมผ่านลำไส้ของเซเลโคซิบโดยการเพิ่มการแพร่ผ่านของยาผ่านทาง paracellular pathway ค่า TEER ของ

เนื้อเยื่อที่ได้รับการทดสอบด้วย celecoxib in PEG 400 ไม่แตกต่างจากก่อนการทดสอบบ่งชี้ให้เห็นว่าการแพร่ของเซเลโคซิบจากสารละลายเข้าสู่เนื้อเยื่อเกิดขึ้นโดย transcellular pathway

P-glycoprotein (P-gp) เป็น efflux pump ที่พบได้ใน hepatocytes, epithelial cells ของ blood brain barrier, renal proximal tubular cells และใน intestinal epithelial cells โดยสามารถลดการดูดซึมยาโดยการขับโมเลกุลยากลับเข้าสู่ลำไส้ [21] โดยมีหลักฐานทางวิชาการแสดงให้เห็นว่า vitamin E TPGS สามารถยับยั้ง P-gp ใน Caco-2 cell และเพิ่มการดูดซึมยาในอาสาสมัครสุขภาพดีได้โดยการยับยั้งเอนไซม์ P-gp ATPase [22-23] โดยสรุปแล้วไมโครอิมัลชันที่มี vitamin E TPGS สามารถเพิ่มการดูดซึมผ่านลำไส้ของเซเลโคซิบได้โดยการเพิ่มการขนส่งผ่าน transcellular pathway, paracellular pathway และการยับยั้ง P-gp

8. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถเตรียมสูตรตำรับเซเลโคชิบไมโครอิมัลชันขึ้นมาได้ โดยมี Vit E TPGS และ ethanol อัตราส่วน 1:1 เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมตามลำดับ โดยเซเลโคชิบไมโครอิมัลชันมีขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร มีจลนศาสตร์การปลดปล่อยเป็นแบบอันดับศูนย์ และสามารถเพิ่มการซึมผ่านเยื่อลำไส้ได้มากกว่าสูตรควบคุม นอกจากนี้เซเลโคชิบไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ยังมีความปลอดภัยต่อการนำส่งโดยการรับประทาน

9. ผลผลิต (output)

(ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ)

Subongkot T. Development and mechanistic study of a microemulsion containing vitamin E TPGS for the enhancement of oral absorption of celecoxib. International Journal of Nanomedicine. 2019;14;3087-3102.

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

ชื่อโครงการ การพัฒนาและศึกษากลไกของไมโครอิมัลชันชนิดใหม่เพื่อเพิ่มการดูดซึมยาเซเลคอกซิบโดยการ
รับประทาน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. ถิรพิทย์ สุปงกช

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 21 พฤษภาคม 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน

จำนวนเงินที่ได้รับ 1,672,200 บาท

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้ (บาท)	งบประมาณที่ใช้จริง (บาท)	จำนวนเงินคงเหลือ (บาท)
1. งบบุคคลากร	640,260	640,260	0
2. งบดำเนินการ: ค่าตอบแทน	167,220	167,220	0
งบดำเนินการ: ค่าใช้สอย	105,000	105,000	0
งบดำเนินการ: ค่าวัสดุ	592,500	592,500	0
งบดำเนินการ: ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	167,220	167,220	0
รวม	1,672,200	1,672,200	0

(.....)

ผศ.ดร. ถิรพิทย์ สุปงกช
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- [1] Palamoor M and Jablonski MM. Synthesis, characterization and in vitro studies of celecoxib-loaded poly(ortho ester) nanoparticles targeted for intraocular drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 112 (2013) 474–482.
- [2] Yin YM, Cui FD, Mu CF et al. Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: preparation and in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*. 140 (2009) 86-94.
- [3] Cai W, Deng W, Yang H et al. A propofol microemulsion with low free propofol in the aqueous phase: Formulation, physicochemical characterization, stability and pharmacokinetics. *Int J Pharm*. 436 (2012) 536-544.
- [4] Al Abood RM, Talegaonkar S, Tariq M et al. Microemulsion as a tool for the transdermal delivery of ondansetron for the treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 101 (2013) 143-151.
- [5] Gan L, Gan Y, Zhu C et al. Novel microemulsion in situ electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A: in vitro and in vivo results. *Int J Pharm*. 365 (2009) 143-149.
- [6] Zhang Z, Tan S, Feng S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery. *Biomaterials* 33 (2012) 4889-4906.
- [7] Varma MVS and Panchagnula R. Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS: effect on solubility and permeability in vitro, in situ and in vivo. *Eur J Pharm Sci* 25 (2005) 445-453.
- [8] Ke WT, Lin SY, Ho HO, Sheu MT. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. *J Control Release*. 102 (2005) 489-507.

[9] Available from

<https://www.pharma.us.novartis.com/sites/www.pharma.us.novartis.com/files/neoral.pdf> cited

on 3 August 2016

[10] van Mourik ID, Thomson M., Kelly D.A. Comparison of pharmacokinetics of Neoral and Sandimmune in stable pediatric liver transplant recipients. *Liver Transpl Surg.* 5 (1999) 107-111.

[11] Vercauteren D., Vandenbroucke R.E., Jones, A.T. et al. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther.* 18 (2010) 561-569.

[12] O'Driscoll C.M. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci.* 15 (2002) 405-415.

[13] Westerhout J., van de Steeg E., Grossouw D. A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. *Eur J Pharm Sci.* 63 (2014) 167-177.

[14] Ventura C.A., Tommasini, S., Falcone, A. et al. Influence of modified cyclodextrins on solubility and percutaneous absorption of celecoxib through human skin. *Int J Pharm* 314 (2006) 37-45.

[15] Subongkot T and Ngawhirunpat T. Development of a novel microemulsion for oral absorption enhancement of all-trans retinoic acid. *Int J Nanomedicine.* 12 (2017) 5585-5599.

[16] Ward PD, Tippin TK, Thakker DR. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *PSTT.* 3 (2000) 346-358.

[17] Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1778 (2008) 588-600.

[18] Ates M, Kaynak MS, Sahin S. Effect of permeability enhancers on paracellular permeability of acyclovir. *J Pharm Pharmacol.* 68 (2016) 781-790.

- [19] Yu Q, Wang Z, Li P, Yang Q. The effect of various absorption enhancers on tight junction in the human intestinal Caco-2 cell line. *Drug Dev Ind Pharm.* 39 (2013) 587-592.
- [20] Kowapradit J, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Ruktanonchai U, Sajomsang W. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminocinnamyl) chitosan enhances paracellular permeability across Caco-2 cells. *Drug Deliv.* 17 (2010) 301-312.
- [21] Canaparo R, Finnström N, Serpe L, Nordmark A, Muntoni E, Eandi M, et al. Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34 (2007) 1138-1144.
- [22] Bogman K, Zysset Y, Degen L, Hopfgartner G, Gutmann H, Alsenz J, et al. P-glycoprotein and surfactants: effect on intestinal talinolol absorption. *Clin Pharmacol Ther.* 77 (2005) 24–32.
- [23] Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, Kappl R, Hüttermann J, Hyatt JA, et al. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity. *Mol Pharm.* 4 (2007) 465-474.