



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาสูตรตำรับและศึกษากลไกการแพร่ผ่านผิวหนังของไมโครอิมัลชันที่มีพีอีจีหก  
คาไพโรลิกคาไพริกกลีเซอไรด์เป็นสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มการนำส่งผ่านผิวหนังของ  
เซเลโคซิบ

Formulation and skin penetration mechanism evaluation of  
microemulsion containing PEG-6 caprylic/capric glycerides as surfactant  
for dermal delivery enhancement of celecoxib

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ถิรพิทย์ สุนงกช

โครงการวิจัยประเภททุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาสูตรตำรับและศึกษากลไกการแพร่ผ่านผิวหนังของไมโครอิมัลชันที่มีพีอีจีหาคา  
โพรลิกคาพริกกลีเซอไรด์เป็นสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มการนำส่งผ่านผิวหนังของเซเลโคซิบ

Formulation and skin penetration mechanism evaluation of microemulsion  
containing PEG-6 caprylic/capric glycerides as surfactant for dermal delivery  
enhancement of celecoxib

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อธิวิทย์ สุนทรภัก

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ คณะเภสัชศาสตร์ เลขที่สัญญา Rx4/2563

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไมโครอิมัลชันชนิดใหม่ที่มี พื้อจีหาคาพริกคาพริกกลีเซอร์ไรด์ เป็น สารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเซเลโคชิบ นอกจากนี้ยังได้มีการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด ด้วยแสงเลเซอร์เพื่อศึกษาเส้นทางในการแพร่ผ่านผิวหนังของไมโครอิมัลชันโดยใช้เทคนิคโคโลคัลไลเซชัน (colocalization) สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ได้รับการประเมินในเรื่องของขนาด ประจุที่พื้นผิว การ กระจายขนาด และชนิดของไมโครอิมัลชัน ไมโครอิมัลชันที่บรรจุเซเลโคชิบมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 48-214 นาโน เมตร มีประจุเป็นกลาง และสามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเซเลโคชิบได้ จากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์พบว่าไมโครอิมัลชันน่าจะสัมผัสกับผิวหนังก่อนจะปลดปล่อยตัวยาเพื่อแพร่ผ่าน ผิวหนัง การแพร่ผ่านทางรูขุมขน (transfollicular pathway) น่าจะเป็นเส้นทางหลักที่ไมโครอิมัลชันแพร่ผ่าน ผิวหนัง ในขณะที่ intercellular และ transcellular pathway น่าจะเป็นเส้นทางรองของการแพร่ผ่านผิวหนัง

**คำสำคัญ** ไมโครอิมัลชัน เซเลโคชิบ พื้อจีหาคาพริกคาพริกกลีเซอร์ไรด์ การแพร่ผ่านผิวหนัง

## Abstract

This study aimed to develop a microemulsion using PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides as a surfactant to enhance the dermal delivery of celecoxib. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) using the colocalization technique was also used to investigate the skin penetration pathway of the microemulsion. The prepared microemulsion formulations were characterized in terms of size, surface charge, size distribution and type. The celecoxib-loaded microemulsion had particle sizes ranging from 48-214 nm with neutral charge and significantly increased the skin penetration of celecoxib. According to the CLSM study, the microemulsion might attach to any part of the skin before releasing the entrapped drug to penetrate the tissue. The transfollicular pathway might be the major skin penetration pathway for the microemulsion, whereas the intercellular and transcellular pathways are minor ones.

**Keywords:** microemulsion, celecoxib, skin penetration pathway, dermal delivery

## สารบัญเรื่อง (Table of contents)

	หน้า
บทนำ	1
สารเคมีและเครื่องมือ	3
วิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	10
สรุปผลการวิจัย	26
เอกสารอ้างอิง	27

## สารบัญตาราง (List of tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าการละลายเฮลโคชิบในวัฏภาคน้ำมัน	10
ตารางที่ 2 ค่าการละลายเฮลโคชิบในสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม	11
ตารางที่ 3 สูตรตำรับ อัตราส่วนของไมโครอิมัลชันและความเข้มข้นของเฮลโคชิบในไมโครอิมัลชัน	17
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายของขนาด ประจุพื้นผิวและค่าการนำไฟฟ้าของไมโครอิมัลชัน	
สูตรต่าง ๆ	19
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณเฮลโคชิบที่แพร่ผ่านผิวหนังของสูตรควบคุมและสูตรไมโครอิมัลชันต่าง ๆ	21

## สารบัญภาพ (List of illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-35 Castor oil อัตราส่วน 1:1	12
รูปที่ 2 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 1:1	13
รูปที่ 3 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 1:1	14
รูปที่ 4 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 2:1	15
รูปที่ 5 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 2:1	15
รูปที่ 6 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 3:1	16
รูปที่ 7 a) โครงสร้างของ rhodamine B base-loaded NBD-PE-labeled microemulsion b) แสดงภาพตัดขวางของผิวหนังหนูกที่ย้อมด้วย DAPI	22



รูปที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ของผิวหนังที่ได้รับการทดสอบด้วย rhodamine B base-loaded NBD-PE labeled microemulsion ที่เวลา 2 ชั่วโมง	24
a การเรืองแสงสีแดงของ rhodamine B Base	
b การเรืองแสงสีเขียวของ NBD-PE-labeled microemulsion c ภาพซ้อนทับของ a และ b	
รูปที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ของผิวหนังในภาคตัดขวางที่ได้รับการทดสอบด้วย rhodamine B base-loaded NBD-PE labeled microemulsion และย้อมด้วย DAPI ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง	25

## บทนำ

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เซเลโคซิบจัดเป็นยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ชนิดหนึ่ง (nonsteroidal anti-inflammatory drugs หรือ NSAIDs) ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส (cyclooxygenase ได้อย่างจำเพาะเจาะจง เซเลโคซิบเป็นยาที่ได้รับการรับรองให้สามารถรักษาอาการปวดของกล้ามเนื้อเฉียบพลันได้ รวมถึงโรคของข้อเช่น โรคข้อเสื่อม โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น [1] อย่างไรก็ตามการรับประทานเซเลโคซิบติดต่อกันเป็นเวลานานสามารถเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ เช่น ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด [2] อาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดได้จากการใช้เซเลโคซิบเช่น การเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute kidney injury ที่เกิดจากการลดการไหลเวียนของเลือดไปเลี้ยงไตลง [3]

การใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์แบบเฉพาะที่ (Topical administration of NSAIDs คือการนำส่งยาผ่านผิวหนังเข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบใต้ผิวหนังโดยตรง เช่น กล้ามเนื้อ เอ็น กระดูกอ่อน และน้ำเลี้ยงข้อ การใช้ยาแบบเฉพาะที่นั้นมีข้อดีเหนือกว่าการให้ยาแบบอื่น ได้แก่ การหลีกเลี่ยงการถูกทำลายที่ตับ (first pass metabolism การลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการดูดซึมยาเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต รวมถึงไม่ทำให้เกิดการเจ็บปวด [4] อย่างไรก็ตามการดูดซึมยาเข้าสู่ผิวหนังนั้นถูกจำกัดโดยผิวหนังชั้นบนสุดคือ stratum corneum ตามทฤษฎีแล้วคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของยาที่สามารถถูกดูดซึมได้ดีผ่านผิวหนังนั้น ควรมีค่า log P อยู่ระหว่าง 1-3 และมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 500 ดาลตัน [5] เซเลโคซิบเป็นยาที่มีค่า log P เท่ากับ 3.53 และมีน้ำหนักโมเลกุล 381.37 ดาลตัน [6] ดังนั้นเซเลโคซิบจึงแพร่ผ่านผิวหนังได้ไม่ดี

ไมโครอิมัลชันจัดเป็นระบบคอลลอยด์ที่มีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตร ประกอบด้วยวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว (surfactant สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant และน้ำ ไมโครอิมัลชันมีข้อดีกว่ายาในรูปแบบอื่น เช่น สามารถเตรียมได้ง่าย สามารถบรรจุยาทั้งชนิดละลายไขมันดีและละลายน้ำดีได้สูง การศึกษานี้จึงได้เลือกไมโครอิมัลชันเป็นระบบเพื่อเพิ่มการดูดซึมเซเลโคซิบผ่านทางผิวหนัง ไมโครอิมัลชันที่ตั้งตำรับขึ้นใหม่นี้ประกอบด้วย PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน แม้ว่าจะมีรายงานการใช้ไมโครอิมัลชันในการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนัง (dermal and transdermal drug delivery จำนวนมาก [7-11] แต่ยังไม่เคยมีรายงานถึงวิธีทางในการแพร่ผ่านผิวหนัง (skin penetration pathway

การศึกษาวิถีทางในการแพร่ผ่านผิวหนังนั้นมีความสำคัญในการวิจัยและพัฒนาระบบนำส่งยาผ่านทางผิวหนัง การศึกษานี้จึงได้ศึกษาเส้นทางในการแพร่ผ่านผิวหนังของอนุภาคไมโครอิมัลชันที่มีการติดสารเรืองแสงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ (confocal laser scanning microscopy หรือ CLSM)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาระบบไมโครอิมัลชันชนิดใหม่ โดยใช้ PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ซึ่งสารนี้ยังไม่เคยมีรายงานการเกิดไมโครอิมัลชันมาก่อน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาถึงวิถีทาง (skin penetration pathway) ของของไมโครอิมัลชันที่ใช้ในการแพร่ผ่านผิวหนังซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อพัฒนาสูตรตำรับไมโครอิมัลชันชนิดใหม่ เพื่อเพิ่มการซึมผ่านเซลล์โคชิบทางผิวหนัง
- 2) เพื่อศึกษาวิถีทางการแพร่ผ่านผิวหนังของไมโครอิมัลชัน

## 3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้สูตรตำรับที่เพิ่มการซึมผ่านของเซลล์โคชิบทางผิวหนังโดยใช้ไมโครอิมัลชันที่มี PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิว
- 2) ทราบถึงวิถีทางในการแพร่ผ่านผิวหนัง (skin penetration pathway) ของไมโครอิมัลชัน
- 3) เพื่อให้ผู้ป่วยหายจากอาการปวดได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีผลข้างเคียงจากการใช้ยาน้อยที่สุด

## 4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) ฐานไขมันที่ใช้คือ isopropyl myristate
- 2) สารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ได้แก่ PEG 7 glyceryl cocoate, Kolliphor EL และ PEG 400
- 3) อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1:1, 2:1, 3:1 และ 4:1

## 2. สารเคมีและเครื่องมือ

### 2.1 สารเคมี

- 1) Celecoxib
- 2) PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides
- 3) PEG 400
- 4) PEG-7 Glyceryl Cocoate (Marconol HE
- 5) PEG-35 castor oil (Kolliphor EL
- 6) Methanol
- 7) 50% Ethanol in PBS (v/v
- 8) Isopropyl myristate (IPM
- 9) Isononyl isononanoate
- 10) Octyldodecanol
- 11) Oleic acid
- 12) Absolute ethanol
- 13) Acetonitrile
- 14) Rhodamine B base
- 15) 1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine triethylammonium salt (NBD-PE)
- 16) 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)

## 2.2 เครื่องมือ

- 1) Magnetic stirrer (ST-900EC, Scilution, Bangkok, Thailand)
- 2) Centrifuge (Sorvall™Legend™ X1R Centrifuge, Thermo Scientific™, MA, USA)
- 3) HPLC (Agilent 1260 infinity II LC systems, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)
- 4) C18 reversed-phase column (VertiSep UPS C18, Vertical Chromatography, Nonthaburi, Thailand)
- 5) Sonicator bath (WUC-D22H, DAIHAN Scientific, Gangwon-do, Korea)
- 6) Dynamic light scattering (DLS particle size analyzer (Zetasizer Nano -ZS; Malvern Instrument, Malvern, UK)
- 7) Magnetic stirrer (IKA)
- 8) Tape strip (Scotch 3M Transparent Tape 500, 24 mm x 33 m)
- 9) Digital Caliper (AD-5764A-150, AND, Japan)
- 10) Confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 800, Carl Zeiss, Jena, Germany)

### 3. วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของเซเลโคซิบ

การเตรียมกราฟมาตรฐานทำโดยการชั่งเซเลโคซิบ 25 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งสำหรับงานวิเคราะห์ (Analytical balance) ลงขวดปริมาตร (Volumetric flask) แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางจนได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

#### 3.2 การหาค่าการละลายของเซเลโคซิบ

ศึกษาค่าการละลายของเซเลโคซิบ เพื่อเลือกส่วนประกอบที่จะใช้ในสูตรตำรับไมโครอิมัลชันในตัวกลางชนิดต่าง ๆ ทั้งวัฏภาคน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว โดยปีปเตสารแต่ละชนิดมา 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเซเลโคซิบที่มากเกินไปสำหรับการละลาย จากนั้นคนติดต่อกัน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารแขวนตะกอนที่ได้มาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนบน (Supernatants) มาเจือจางด้วย Methanol จากนั้นมาวัดความเข้มข้นด้วย HPLC

#### 3.3 การเตรียมไมโครอิมัลชัน

##### 3.3.1 การเลือกสารลดแรงตึงผิวร่วม (Co-surfactant) สำหรับการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชัน

เพื่อให้ได้ Pseudo-ternary phase diagram ที่มีพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันที่กว้างที่สุด จึงต้องมีการศึกษาเพื่อหาชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสมที่สุด โดยเลือกจากสารลดแรงตึงผิวที่ให้ค่าการละลายเซเลโคซิบมากที่สุด 4 อันดับแรกจากขั้นตอนที่ 3.2 โดยเลือกวัฏภาคน้ำมันจากน้ำมันที่ให้ค่าการละลายเซเลโคซิบสูงสุด โดยกำหนดอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1:1 โดยสารลดแรงตึงผิวที่ใช้คือ PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides และสารลดแรงตึงผิวร่วม ได้แก่ PEG 400, PEG-7 glyceryl cocoate และ PEG-35 castor oil ส่วนการสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ทำโดยการหยดน้ำที่ละหยดจนได้ไมโครอิมัลชัน

### 3.3.2 การสร้าง Pseudo-ternary phase diagram ของไมโครอิมัลชัน

ซึ่งสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมผสมให้เข้ากัน จะได้ส่วนผสมสารลดแรงตึงผิว (Sm) จากนั้นจึงผสม Sm และวัฏภาคน้ำมันให้เข้ากัน โดยอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมันและ Sm มีค่าตั้งแต่ 1:19 ถึง 9:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) จากนั้นจึงหยดน้ำลงส่วนผสมดังกล่าวโดยคนด้วย Magnetic stirrer จากนั้นสังเกตความใส (Transparency) และบันทึกปริมาณน้ำที่มากที่สุดที่ยังทำให้ส่วนผสมมีลักษณะใส โดยส่วนผสมที่ได้ที่มีลักษณะใสจัดเป็นไมโครอิมัลชัน

### 3.3.3 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วมสำหรับไมโครอิมัลชัน

โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วมเป็น 1:1, 2:1, 3:1 และ 4:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) จากนั้นจึงผสมวัฏภาคน้ำมันและ Sm ให้เข้ากัน โดยอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมันและ Sm มีค่าตั้งแต่ 1:19 ถึง 9:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) จากนั้นจึงหยดน้ำกลั่นลงในส่วนผสมดังกล่าวโดยคนด้วย Magnetic stirrer จากนั้นสังเกตความใส (Transparency) เลือกอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วมที่มีพื้นที่ของไมโครอิมัลชันใน Pseudo-ternary phase diagram มากที่สุดมาใช้

### 3.3.4 การหาค่าการละลายของเซเลโคชิบในไมโครอิมัลชัน

ซึ่งเซเลโคชิบปริมาณมากเกินไปลงในไมโครอิมัลชัน แล้วคนด้วย Magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนตะกอนที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใส (Supernatants) มาเจือจางด้วย Methanol จากนั้นมาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง HPLC สูตรไมโครอิมัลชันที่จะนำไปศึกษาต่อจะต้องสามารถละลายเซเลโคชิบได้อย่างน้อยร้อยละ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w)

### 3.3.5 การเตรียมเซเลโคชิบในไมโครอิมัลชัน

เมื่อได้ Pseudo-ternary phase diagrams ที่แสดงขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันแล้ว จึงเลือกจุดจากเฟสไดอะแกรมเพื่อเตรียมไมโครอิมัลชัน โดยเลือกสูตรที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 20-200 นาโนเมตร และไม่มีสารแยกเฟส การเตรียมไมโครอิมัลชันทำโดยผสมวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมและน้ำ คนให้เข้ากัน จากนั้นผสมเซเลโคชิบลงไป คนต่อจนเกิดการละลายสมบูรณ์

### 3.4 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของไมโครอิมัลชัน

การวัดขนาดอนุภาค (Mean droplet size) ประจุพื้นผิว (Surface charge) การกระจายขนาด (Size distribution) และค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity)

การวัดขนาดของเซลล์โคชิบในไมโครอิมัลชัน ศักย์ซีตา (Zeta potential) การกระจายขนาด ค่าการนำไฟฟ้าของเซลล์โคชิบในไมโครอิมัลชัน โดยใช้ Dynamic Light Scattering (DLS) particle size analyzer ที่มี 4 mW Helium-neon laser ที่มุม 173 องศา ทำการวัดอย่างน้อย 3 ครั้งต่อสูตรไมโครอิมัลชัน

### 3.5 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* skin penetration study)

การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังของสูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่บรรจุเซลล์โคชิบและสูตรควบคุม (สารละลายของเซลล์โคชิบใน PEG 400 ความเข้มข้นร้อยละ 2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ทดสอบโดยใช้ Franz diffusion cell โดยใช้ผิวหนังหมูที่ตายด้วยสาเหตุทางธรรมชาติเป็นเยื่อกั้นการแพร่ผ่าน โดยเอาผิวหนังส่วนท้องมาลอกเอาชั้น subcutaneous ออกจากนั้นใช้ Phosphate buffer pH 7.4 ล้าง นำผิวหนังไปวางในเครื่องบนส่วน receiver compartment โดยหันชั้น stratum corneum ขึ้นไปสู่ donor compartment ของ Franz diffusion cell ควบคุมอุณหภูมิของ Circulating bath ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยส่วนของ donor compartment ใส่ไมโครอิมัลชันที่บรรจุเซลล์โคชิบที่จะทำการทดสอบปริมาณ 2 มิลลิลิตร ส่วน receiver compartment จะบรรจุสารละลาย ร้อยละ 50 ของ Ethanol ใน PBS (v/v) เมื่อครบเวลาที่กำหนด 6 ชั่วโมง จึงดูดสารละลายในชั้น receiver compartment 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายไปวัดปริมาณเซลล์โคชิบด้วย HPLC

ใช้กระดาษทิชชูซับผิวหนังหมูด้าน stratum corneum 15 ครั้ง แล้วนำผิวหนังไปชั่งน้ำหนักและวัดความหนา จากนั้นนำไปลอก (tape strip method) ชั้น stratum corneum ด้วยเทปกาว (tape strip method) ทั้งหมด 35 ครั้ง จากนั้นนำเทปกาวทั้งหมดใส่ลงในขวดแล้วเติม Methanol 5 มิลลิลิตร ลงไปแล้วนำไปวางใน sonicator baths เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลาย Methanol 1 มิลลิลิตรที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณเซลล์โคชิบด้วย HPLC

นำผิวหนังหมูที่เหลือจากการลอก stratum corneum ออก ซึ่งผิวหนังจะเหลือเพียงชั้น viable epidermis และ dermis นำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วเติม Methanol 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวางใน sonicator



bath เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลาย Methanol 1 มิลลิลิตรที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณเซเลโคชิบด้วย HPLC

หาปริมาณยาใน receiver medium หาได้จากสมการที่ 1

ปริมาณยาในส่วน receiver medium ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) =  $Q_r / P$  (สมการที่ 1)

$Q_r$  = ปริมาณยาในส่วน receiver medium ( $\mu\text{g}$ )

$P$  = พื้นที่ผิวการแพร่ผ่าน ( $\text{cm}^2$ )

หาปริมาณยาใน stratum corneum หาได้จากสมการที่ 2

ปริมาณยาในชั้น stratum corneum ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) =  $Q_s / P$  (สมการที่ 2)

$Q_s$  = ปริมาณยาในชั้น stratum corneum ( $\mu\text{g}$ )

$P$  = พื้นที่ผิวการแพร่ผ่าน ( $\text{cm}^2$ )

จากนั้นเปรียบเทียบสูตรตำรับที่สามารถเพิ่มการแพร่ผ่านของเซเลโคชิบได้มากที่สุด โดยพิจารณาจากปริมาณยาของผิวหนังในชั้น viable epidermis และ dermis ( $Q_{vd}$ ) ต่อพื้นที่ผิวการแพร่ผ่านของผิวหนังหมู

ปริมาณยาใน viable epidermis และ dermis หาได้จากสมการที่ 3

ปริมาณยาใน viable epidermis และ dermis ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) =  $Q_{vd}/P$  (สมการที่ 3)

$Q_{vd}$  = ปริมาณยาในชั้น viable epidermis และ dermis ( $\mu\text{g}$ )

$P$  = พื้นที่ผิวการแพร่ผ่าน ( $\text{cm}^2$ )

### 3.8 การวิเคราะห์โดยใช้สถิติ

ใช้ Analysis of variance (One way ANOVA) ตามด้วย Post hoc test โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ  $p$ -value น้อยกว่า 0.05

### 3.9 การวิเคราะห์ด้วย High performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ปริมาณของเซเลโคซิบด้วย HPLC โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง Acetonitrile:Water เท่ากับ 75:25 ปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ใช้คอลัมน์ C18 โดยกำหนดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยฉีดตัวอย่างครั้งละ 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร

## 4. ผลการวิจัย

### 4.1 การหาค่าการละลายของเซเลโคซิบ

#### 4.1.1 การเลือกวิธภูภาคน้ำมัน

ตารางที่ 1 ค่าการละลายเซเลโคซิบในวิธภูภาคน้ำมัน

วิธภูภาคน้ำมัน	ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg/ml)
Isopropyl myristate	4.87±0.41
Isononyl isononanoate	3.20±0.01
Octyldodecanol	0.99±0.02
Oleic acid	0.74±0.07

Each value represent mean±SD (n=3)

จากตารางจึงเลือก Isopropyl myristate ที่มีค่าการละลายของเซเลโคซิบเท่ากับ 4.87±0.41 mg/ml ซึ่งละลายเซเลโคซิบได้มากที่สุด ในการใช้เป็นวิธภูภาคน้ำมัน

#### 4.1.2 การเลือกสารสารลดแรงตึงผิวร่วม

ตารางที่ 2 ค่าการละลายเซเลโคชิบในสารลดแรงตึงผิว (PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides และสารลดแรงตึงผิวร่วม

สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม	ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg/ml)
PEG 400	410.28±0.52
PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides	330.63±2.89
PEG-35 castor oil	302.47±0.16
PEG-20 glyceryl triisostearate	225.45±1.84
PEG-7 glyceryl cocoate	224.73±0.39
Absolute ethanol	79.15±10.25
Lipophile WL	12.24±0.02
Glycerine	0.42±0.01

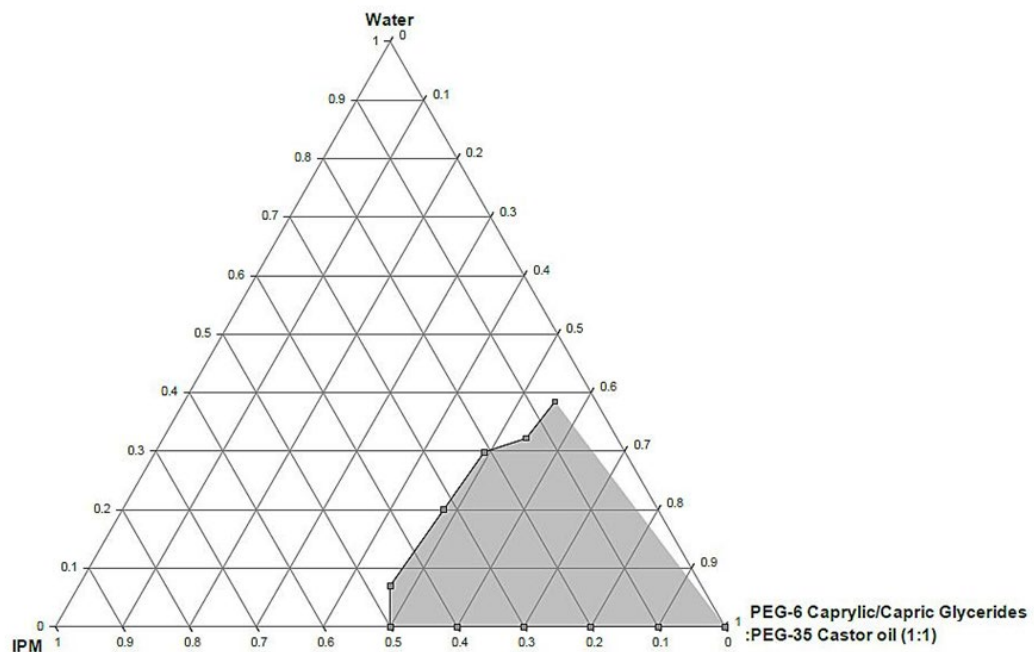
Each value represent mean±SD (n=3)

## 4.2 การเตรียมไมโครอิมัลชัน

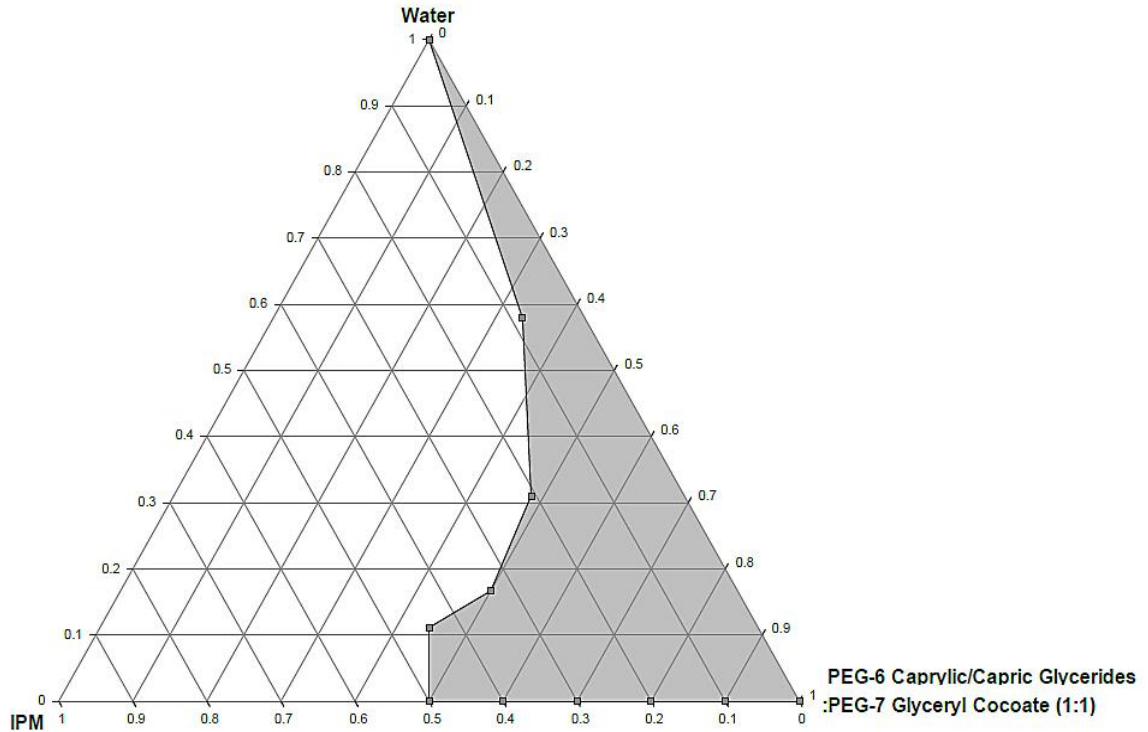
### 4.2.1 การเลือกสารลดแรงตึงผิวร่วม

เพื่อให้ได้ pseudo-ternary phase diagram ของการเกิดไมโครอิมัลชันที่มีพื้นที่มากที่สุด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อเลือกชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสม

สำหรับการเลือกชนิดของสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสมใช้ Isopropyl myristate เป็นวัฏภาคน้ำมัน ใช้ PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยมี PEG 400, PEG-35 castor oil และ PEG-7 glyceryl cocoate เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม



รูปที่ 1 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-35 Castor oil อัตราส่วน 1:1 (พื้นที่สีเทาคือพื้นที่แสดงการเกิดไมโครอิมัลชัน)

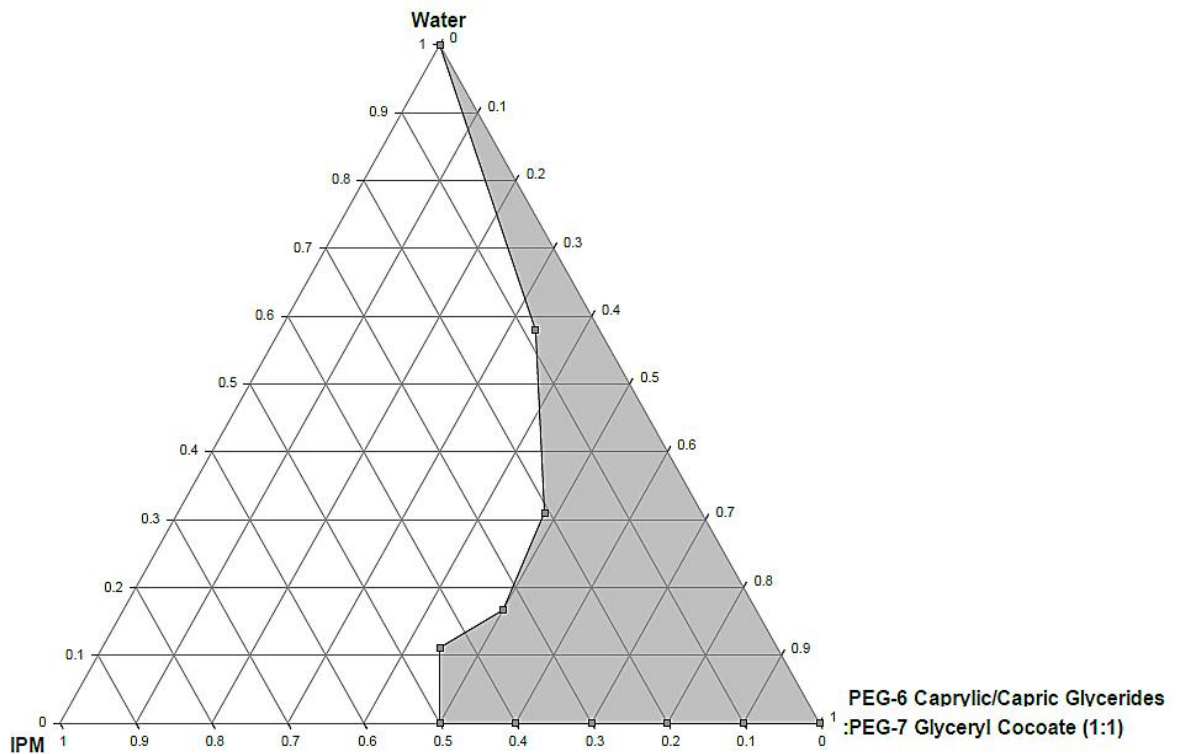


รูปที่ 2 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 1:1 (พื้นที่สีเทาคือพื้นที่แสดงการเกิดไมโครอิมัลชัน)

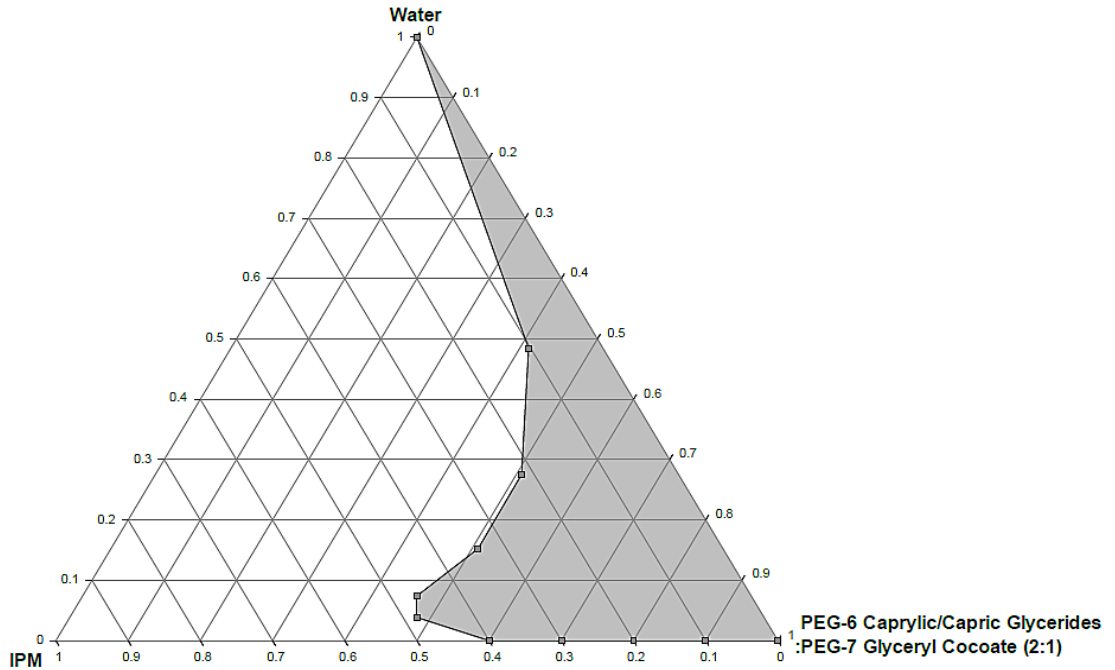
จากการศึกษาการเกิดไมโครอิมัลชันเมื่อใช้ PEG 400 เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ไม่พบการเกิดไมโครอิมัลชัน ส่วน pseudo-ternary phase diagram ของไมโครอิมัลชันซึ่งมี PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิวและมี PEG-35 Castor oil เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมแสดงในรูปที่ 1 ส่วน pseudo-ternary phase diagram ของไมโครอิมัลชันซึ่งมี PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิวและมี PEG-7 glyceryl cocoate เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมแสดงในรูปที่ 2 โดยพบว่าการใช้ PEG-7 glyceryl cocoate เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม มีพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันมากกว่าการใช้ PEG-35 Castor oil จึงเลือกใช้ระบบซึ่งประกอบด้วย Isopropyl myristate เป็นวัฏภาคน้ำมัน PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิว PEG-7 glyceryl cocoate เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมและ water เป็นวัฏภาคน้ำ ในการศึกษาต่อไป

#### 4.2.2 การสร้าง pseudo-ternary phase diagram

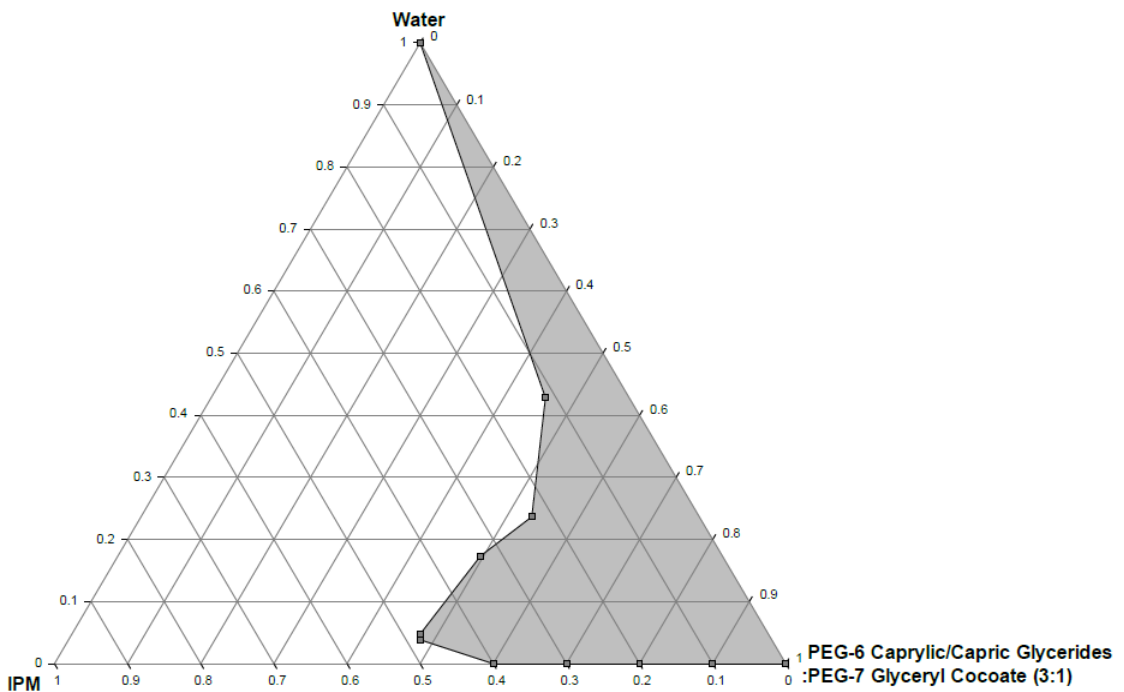
ในการศึกษานี้ pseudo-ternary phase diagram ประกอบด้วย Isopropyl myristate เป็นวัฏภาคน้ำมัน PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิว PEG-7 Glyceryl Cocoate เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม และ water เป็นวัฏภาคน้ำ โดยกำหนดอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 1:1, 2:1, 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ ซึ่ง water ถูกหยดลงในของผสมระหว่างวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม พื้นที่ที่เกิดไมโครอิมัลชันแสดงดังรูปที่ 3-6



รูปที่ 3 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 1:1 (พื้นที่สีเทาคือพื้นที่แสดงการเกิดไมโครอิมัลชัน)

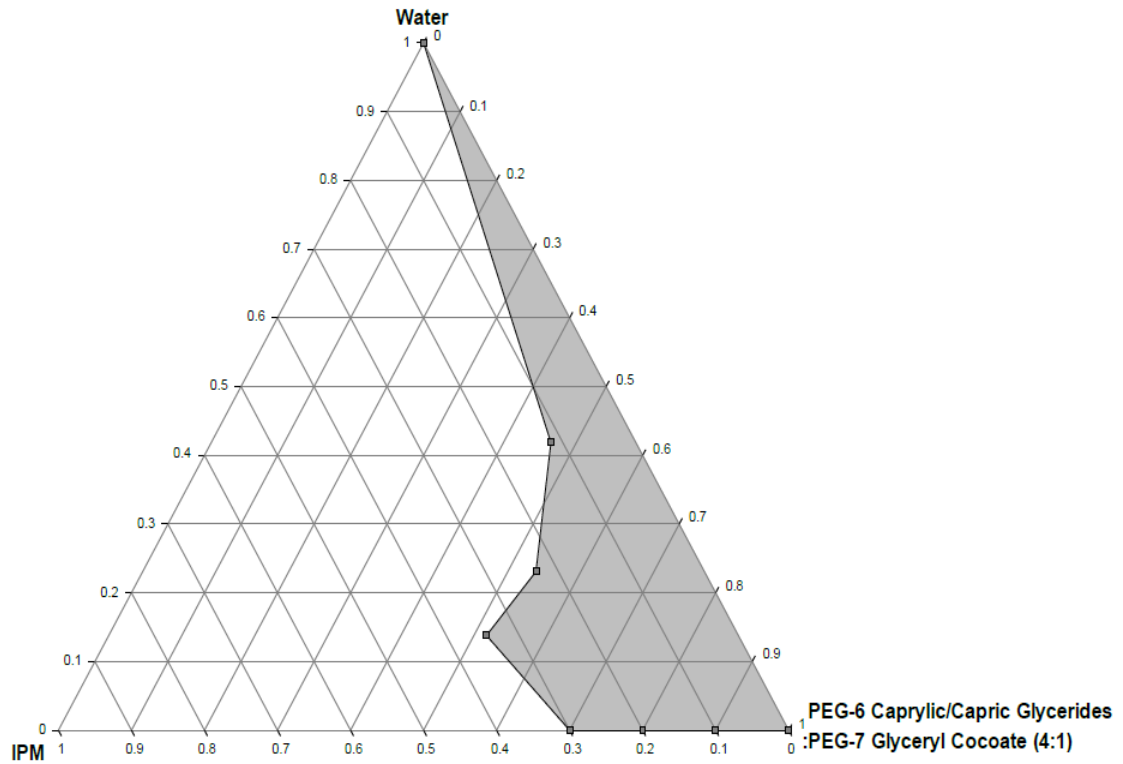


รูปที่ 4 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 2:1 (พื้นที่สีเทาคือพื้นที่แสดงการเกิดไมโครอิมัลชัน)



รูปที่ 5 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 3:1 (พื้นที่สีเทาคือพื้นที่แสดงการเกิดไมโครอิมัลชัน)





รูปที่ 6 แสดง pseudo-ternary phase diagram ของสารลดแรงตึงผิว PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides : PEG-7 Glyceryl Cocoate อัตราส่วน 4:1 (พื้นที่สีเทาคือพื้นที่แสดงการเกิดไมโครอิมัลชัน

การเพิ่มอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมจาก 1:1 เป็น 2:1 3:1 และ 4:1 ดังแสดงในรูปที่ 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับนั้น ไม่สามารถเพิ่มพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชันได้ โดยพบว่าอัตราส่วนระหว่าง PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides:PEG-7 glyceryl cocoate เท่ากับ 1:1 ให้พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันมากที่สุด

ดังนั้นไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย Isopropyl myristate เป็นวัฏภาคน้ำมัน PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิว PEG-7 glyceryl cocoate เป็นสารลดแรงตึงผิวรวม (อัตราส่วน PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides:PEG-7 glyceryl cocoate เท่ากับ 1:1 และ water เป็นวัฏภาคน้ำจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป โดยจะเลือกอัตราส่วนซึ่งให้ไมโครอิมัลชันที่มีขนาดไม่เกิน 200 นาโนเมตรและมีความคงตัวดี ซึ่งอัตราส่วนที่เลือกใช้เพื่อศึกษาต่อแสดงในตารางที่ 3 จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของเซลล์ไขมัน

แบบภายในร่างกาย [7, 8] พบว่า 2 % w/w celecoxib microemulsion สามารถต้านอาการอักเสบได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นการศึกษานี้จึงเตรียมเซเลโคซิบไมโครอิมัลชันที่ความเข้มข้นร้อยละ 2

ตารางที่ 3 สูตรตำรับ อัตราส่วนของไมโครอิมัลชันและความเข้มข้นของเซเลโคซิบในไมโครอิมัลชัน

Formulations	Ratio			Celecoxib loaded microemulsion (% w/w)
	IPM	Mixture of surfactants	Water	
MC 1	0.1	0.8	0.1	2
MC 2	0.1	0.6	0.3	2
MC 3	0.1	0.5	0.4	2
MC 4	0.2	0.7	0.1	2
MC 5	0.3	0.6	0.1	2

#### 4.3 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของไมโครอิมัลชัน

การศึกษาคูณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของไมโครอิมัลชันจะศึกษาทั้งไมโครอิมัลชันที่ไม่บรรจุเซเลโคซิบ (Blank microemulsion) และไมโครอิมัลชันที่บรรจุเซเลโคซิบ (Celecoxib loaded microemulsion)

##### 4.3.1. ผลการศึกษาการวัดขนาด ศักย์ซีตา และชนิดของอนุภาค

จากการศึกษาขนาดโดยใช้เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า blank microemulsion มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 40.01-571.68 นาโนเมตร ในขณะที่ celecoxib loaded microemulsion มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 47.9-213.65 นาโนเมตร ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของ celecoxib loaded MC1, celecoxib loaded MC2 และ celecoxib loaded MC3 มีความแตกต่างจาก blank microemulsion อย่างมีนัยสำคัญ มีเพียงแค่ PDI ของ celecoxib loaded MC3 ที่แตกต่างจาก blank MC3

ค่าศักย์ซีตาของ blank MC1 จนถึง blank MC5 อยู่ในช่วง -0.094 ถึง 0.25 mV ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง ค่าศักย์ซีตาของ blank MC และ celecoxib loaded MC ด้วยเหตุนี้

ทั้ง blank microemulsion และ celecoxib loaded microemulsion มีประจุเป็นกลาง องค์ประกอบของไมโครอิมัลชันได้แก่ isopropyl myristate, PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides และ PEG-7 glyceryl cocoate เป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุ blank MC จึงมีประจุเป็นกลาง แม้ว่า celecoxib มีหมู่ sulfonamide ในโครงสร้าง ในสถานะของไมโครอิมัลชันที่เป็นกลาง การเติม celecoxib ลงใน microemulsion จึงไม่มีผลต่อประจุของอนุภาค

ตามทฤษฎีแล้ว ไมโครอิมัลชันแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ขึ้นกับอัตราส่วนของน้ำมันและน้ำ ได้แก่ oil-in water microemulsion, water-in oil microemulsions และ bicontinuous microemulsions [14-16] oil-in water microemulsion เกิดขึ้นเมื่ออัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมีมากกว่าวัฏภาคน้ำมัน ในขณะที่ water-in oil microemulsions เกิดขึ้นเมื่ออัตราส่วนของวัฏภาคน้ำมันมากกว่าน้ำ ส่วน bicontinuous microemulsions เกิดขึ้นเมื่ออัตราส่วนของวัฏภาคน้ำเท่ากับวัฏภาคน้ำมัน การวัดค่าการนำไฟฟ้าจัดเป็นเทคนิคที่ใช้ประเมินชนิดของไมโครอิมัลชัน อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานค่าที่แน่นอนในการประเมินชนิดของไมโครอิมัลชัน Krauel และคณะ [17] ได้เตรียมไมโครอิมัลชัน 3 ชนิด คือ oil-in water microemulsion, water-in oil microemulsions และ bicontinuous microemulsions โดยไมโครอิมัลชันที่มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำกว่า  $1 \mu\text{S}/\text{cm}$  จัดเป็น water-in oil microemulsions ในขณะที่ระบบที่มีค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง  $1-10 \mu\text{S}/\text{cm}$  จัดเป็น bicontinuous microemulsions ส่วนไมโครอิมัลชันที่มีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า  $10 \mu\text{S}/\text{cm}$  ได้จัดเป็น oil-in water microemulsion

Blank microemulsion มีค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง  $3.68-133.33 \mu\text{S}/\text{cm}$  ขณะที่ celecoxib loaded microemulsion มีค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง  $8.99-117.83 \mu\text{S}/\text{cm}$  จากเกณฑ์ที่ได้กล่าวไปด้านบน จึงสันนิษฐานว่า blank MC 1 และ blank MC 4 จัดเป็น bicontinuous microemulsion ขณะที่ blank MC2, blank MC3 และ blank MC5 จัดเป็น oil-in water microemulsion ส่วน celecoxib loaded MC 1 จัดเป็น bicontinuous microemulsion ในขณะที่ celecoxib loaded MC

2, celecoxib loaded MC3, celecoxib loaded MC4 และ celecoxib loaded MC 5 จัดเป็น oil-in water microemulsion

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาค การกระจายของขนาด ประจุพื้นผิวและค่าการนำไฟฟ้าของไมโครอิมัลชัน สูตรต่างๆ

Formulations	Particle size (nm)		Polydispersity index (PDI)		Zeta potential (mV)		Electrical conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	
	Blank MC	Celecoxib-loaded MC	Blank MC	Celecoxib-loaded MC	Blank MC	Celecoxib-loaded MC	Blank MC	Celecoxib-loaded MC
MC 1	571.68 $\pm 199.97$	178.68 $\pm 83.76^*$	0.57 $\pm 0.14$	0.66 $\pm$ 0.299	0.086 $\pm 0.595$	0.064 $\pm$ 0.135	3.68 $\pm 30.05$	8.99 $\pm 6.82$
MC 2	115.32 $\pm 14.32$	77.88 $\pm 10.73^*$	0.37 $\pm 0.16$	0.55 $\pm 0.061$	-0.094 $\pm 0.224$	0.099 $\pm 0.362$	71.08 $\pm 2.47$	63.85 $\pm 2.74^*$
MC 3	40.01 $\pm 4.02$	47.90 $\pm 2.95^*$	0.95 $\pm 0.07$	0.64 $\pm 0.146^*$	-0.014 $\pm 0.217$	-0.003 $\pm 0.209$	133.33 $\pm 2.25$	117.83 $\pm 1.94^*$
MC 4	245.97 $\pm 121.93$	213.65 $\pm$ 18.03	0.42 $\pm 0.11$	0.43 $\pm$ 0.158	-0.001 $\pm 0.260$	0.033 $\pm 0.209$	7.00 $\pm 1.22$	18.63 $\pm 5.42^*$
MC 5	120.20 $\pm 25.10$	109.87 $\pm$ 11.03	0.48 $\pm 0.15$	0.47 $\pm$ 0.061	-0.017 $\pm 0.272$	0.25 $\pm 0.46$	19.58 $\pm 6.18$	11.21 $\pm 2.59^*$

Each value represent mean $\pm$ SD (n=3 ,

\* คือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับก่อนบรรจุเซเลโคซิบ ( $p\text{-value}<0.05$ )

#### 4.5 การศึกษาการแพร่ผ่านผิวหนังแบบภายนอกร่างกาย (*In vitro* skin penetration study)

การศึกษานี้ได้วัดปริมาณของเซเลโคซิบในแต่ละชั้นของผิวหนังโดยใช้ tape stripping technique ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการนำ stratum corneum ออกจากผิว [18, 19]

ปริมาณของเซเลโคซิบที่แพร่ผ่านแต่ละชั้นของผิวหนัง ได้แก่ stratum corneum, viable epidermis and dermis ของไมโครอิมัลชันที่มีเซเลโคซิบ สูตร MC 1, MC 2, MC 3, MC 4, MC 5 และสูตรควบคุม (celecoxib in PEG 400 แสดงในตารางที่ 5

MC2 เป็นเพียงไมโครอิมัลชันเพียงสูตรเดียวที่มีปริมาณของเซเลโคซิบในผิวชั้น viable epidermis and dermis มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงได้เลือกสูตร MC2 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

กลไกของสารเพิ่มการซึม (penetration enhancers ที่สามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้นั้นเกิดจากการทำให้โปรตีนเคราตินภายในเซลล์คอร์นีโอไซต์เกิดการเสียสภาพ (denaturation การสลายตัวของคอร์นีโอเดสโมโซม และการทำลายการจัดเรียงตัวของ intercellular lipid ภายใน stratum corneum [20] สารลดแรงตึงผิว (surfactants จัดเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังชนิดหนึ่งซึ่งใช้กันอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนังเพื่อเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังได้โดยการทำให้โปรตีนเคราตินภายในเซลล์คอร์นีโอไซต์เกิดการเสียสภาพและโดยการทำให้อการจัดเรียงตัวของ intercellular lipids ของ stratum corneum ไม่เป็นระเบียบ [21] เนื่องจากไมโครอิมัลชันมีองค์ประกอบเป็นสารลดแรงตึงผิวในปริมาณมาก ดังนั้นไมโครอิมัลชันจึงน่าจะเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังได้จากกลไกดังกล่าว

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณเซลล์โคชิบที่แพร่ผ่านผิวหนังของสูตรควบคุมและสูตรไมโครอิมัลชันต่าง ๆ

Formulations	Stratum corneum ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Viable epidermis and dermis ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Receiver medium ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Enhancement ratio
Control	50.45±28.10	18.13±10.80	ND	-
MC 1	36.73±15.92	24.54±24.54	2.13±1.17	1.35
MC 2	97.58±51.24*	160.44±33.32*	1,954.24±3,272.39	8.85
MC 3	16.60±7.56	20.62±5.65	0.72±0.44	1.14
MC 4	40.48±18.19	15.28±5.28	0.27±1.46	0.84
MC 5	65.59±17.61	21.06±12.73	ND	1.16

Each value represent mean±SD (n=3)

\* คือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p\text{-value}<0.05$ )

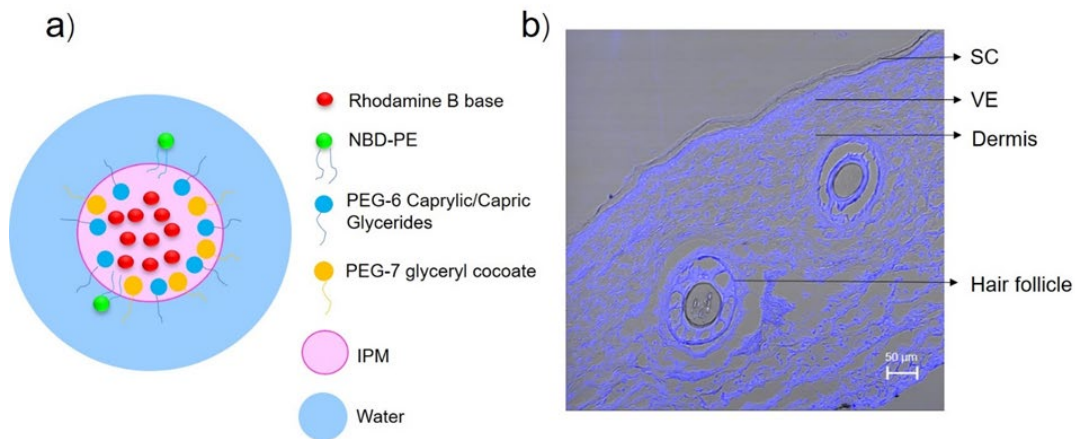
ND คือ ไม่สามารถวัดปริมาณสารได้ (non-detect)

#### 4.6 การศึกษาเส้นทางการแพร่ผ่านผิวหนังของไมโครอิมัลชัน (skin penetration pathways)

Stratum corneum ซึ่งเป็น rate limiting step ของการแพร่ผ่านผิวหนังนั้น ประกอบด้วยคอร์นีโอไซต์ (keratin-filled cells ฝังตัวใน intercellular lipid lamellae แบบ brick and mortar

เส้นทางการเป็นไปได้ของสารที่แพร่ผ่านผิวหนัง ผ่าน stratum corneum นั้นได้แก่ intercellular, transcellular และ transfollicular pathways โดย intercellular pathway คือการแพร่ผ่าน intercellular lipids ซึ่งอยู่ระหว่างเซลล์คอร์นีโอไซต์ ส่วน transcellular pathway คือการแพร่ผ่านเซลล์คอร์นีโอไซต์โดยตรง ส่วน transfollicular pathway คือการแพร่ผ่านรูขุมขนซึ่งสามารถแพร่ข้าม stratum corneum ได้

การศึกษานี้ได้ใช้ colocalization technique โดยใช้สารเรืองแสงเกาะติดกับอนุภาคไมโครอิมัลชันเพื่อศึกษาเส้นทางการแพร่ผ่านผิวหนัง โดย rhodamine B base ซึ่งเป็นสารเรืองแสงสีแดงที่มีค่า log P ใกล้เคียงกับเซเลโคชิบได้ถูกใช้เป็นตัวยาที่ถูกกักเก็บในอนุภาค NBD-PE เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดฟอสโฟลิปิด ที่มีการเรืองแสงสีเขียว ได้ถูกใช้เป็นตัวแทนของอนุภาคไมโครอิมัลชัน โดยโครงสร้างของ rhodamine B base-loaded NBD-PE-labeled microemulsion แสดงในรูปที่ 2 a ส่วนรูป 2 b แสดง ภาพตัดขวางของผิวหนังหนูที่ย้อมด้วย DAPI



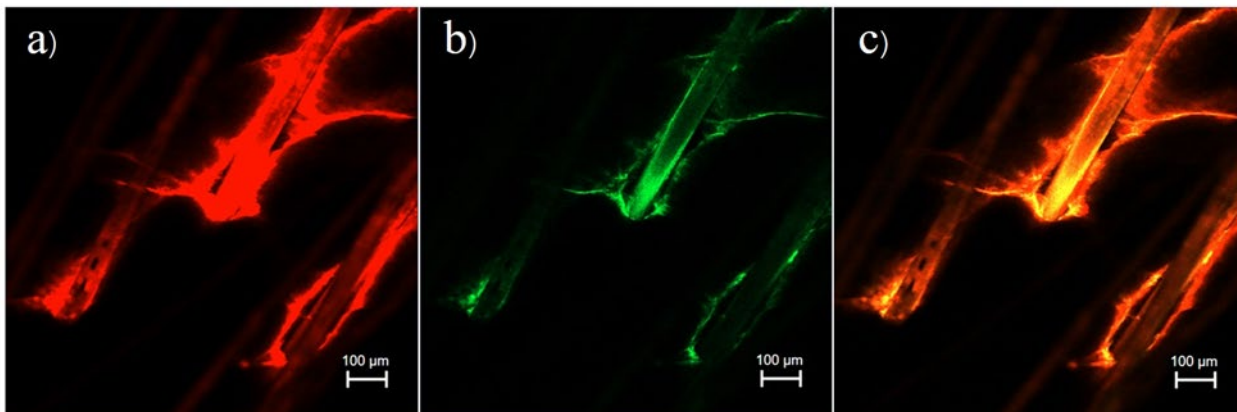
รูปที่ 7 a) โครงสร้างของ rhodamine B base-loaded NBD-PE-labeled microemulsion b) แสดง ภาพตัดขวางของผิวหนังหนูที่ย้อมด้วย DAPI

รูปที่ 8 แสดงผิวหนังหมูซึ่งได้รับการทดสอบด้วย rhodamine B base-loaded NBD-PE labeled microemulsion สีแดงของ rhodamine B base ซึ่งเป็นตัวแทนของยาที่ถูกกักเก็บปรากฏอย่างชัดเจนที่รูขุมขน ดังแสดงในรูปที่ 8 a สีเขียวของ NBD-PE ซึ่งเป็นตัวแทนของอนุภาคไมโครอิมัลชันปรากฏอย่างชัดเจนที่รูขุมขนดังแสดงในรูปที่ 8 b) สันนิษฐานว่าอนุภาคไมโครอิมัลชันแพร่ผ่านผิวหนังผ่านทางรูขุมขนเป็นหลัก

การเรืองแสงสีแดงของ rhodamine B base และการเรืองแสงสีเขียวของ NBD-PE มีรูปแบบการติดในลักษณะเดียวกันบนผิวหนัง จนเกิดเป็นสีใหม่ (สีส้ม ดังแสดงในรูป 8 c การค้นพบนี้สามารถใช้ศึกษาปฏิกริยา ระหว่างอนุภาคและผิวหนังได้

โดยมีการสันนิษฐานถึงกลไกในการทำปฏิกริยาระหว่างอนุภาคและผิวหนังไว้ 2 กลไกคือ อนุภาคที่กักเก็บตัวยาวอาจจะสัมผัสผิวหนังก่อนจะปลดปล่อยตัวยาหรืออนุภาคที่กักเก็บตัวยาวจะปลดปล่อยตัวยาออกก่อนสัมผัสกับผิวหนัง ถ้าอนุภาคที่บรรจุยาปลดปล่อยยา ก่อนสัมผัสและแพร่เข้าสู่ผิวหนัง สีเรืองแสงจะไม่ติดที่บริเวณเดียวกัน อย่างไรก็ตามสีเรืองแสง 2 ชนิดได้ติดที่บริเวณเดียวกัน จนทำให้เกิดสีเรืองแสงสีส้มขึ้นดังแสดงในรูป 8c ดังนั้นการศึกษานี้จึงสันนิษฐานว่าอนุภาคไมโครอิมัลชันที่บรรจุยาน่าจะสัมผัสกับส่วนใดส่วนหนึ่งของผิวหนังก่อนที่จะมีการปลดปล่อยตัวยาเพื่อแพร่ผ่านผิวหนัง การศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกริยาระหว่าง ultradeformable liposomes กับผิวหนัง ตามที่ได้รายงานโดย Subongkot และคณะ [23] ซึ่งลิโปโซมน่าจะสัมผัสกับส่วนใดส่วนหนึ่งของผิวหนังก่อนที่จะมีการปลดปล่อยตัวยาเพื่อแพร่เข้าสู่ผิวหนัง





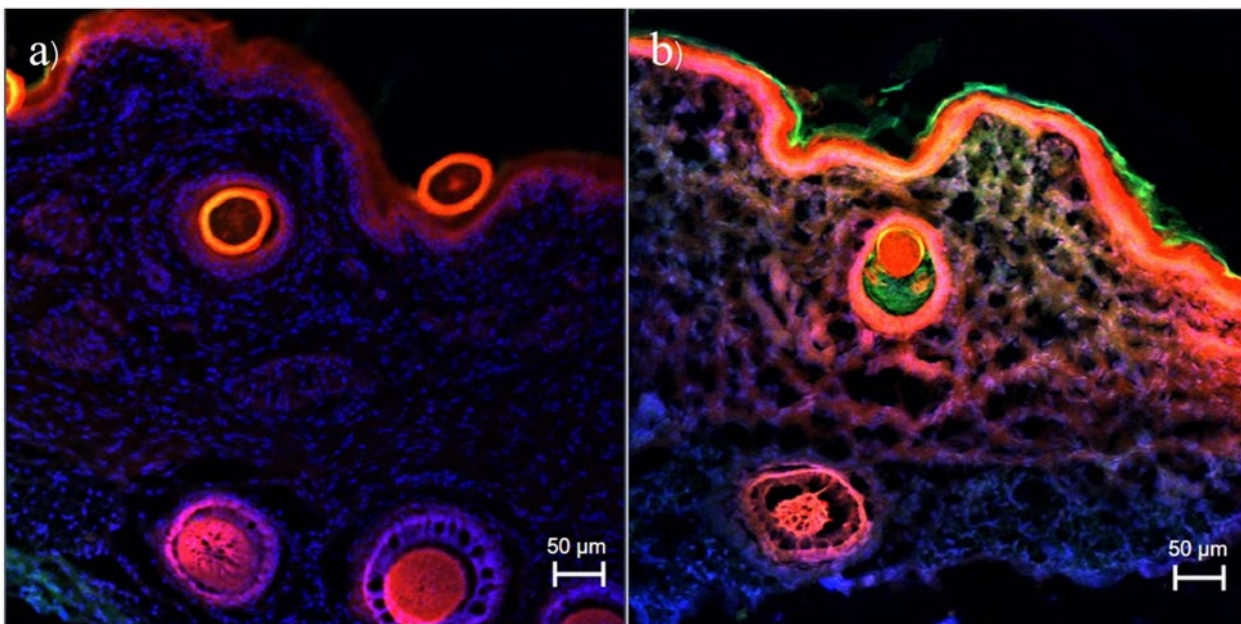
รูปที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ของผิวหนังที่ได้รับการทดสอบด้วย rhodamine B base-loaded NBD-PE labeled microemulsion ที่เวลา 2 ชั่วโมง a การเรืองแสงสีแดงของ rhodamine B Base b การเรืองแสงสีเขียวของ NBD-PE-labeled microemulsion c ภาพซ้อนทับของ a และ b

ภาพตัดขวางของผิวหนังที่ได้รับการทดสอบด้วย rhodamine B base-loaded NBD-PE labeled microemulsion ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง แสดงในรูป 9a และ 9b ตามลำดับ ที่เวลา 1 ชั่วโมง สีแดงของ rhodamine B base และสีเขียวของ NBD-PE ซึ่งสะท้อนยาที่ถูกกักเก็บและอนุภาคไมโครอิมัลชัน ตามลำดับ ถูกพบที่ stratum corneum และรูขุมขน ที่เวลา 2 ชั่วโมง สารเรืองแสงสีแดงและสีเขียวใน stratum corneum, dermis และโดยเฉพาะในรูขุมขนมีสีที่เข้มขึ้นกว่าที่เวลา 1 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 9b สารเรืองแสงสีเขียวยังปรากฏในบริเวณรูขุมขนดังแสดงในรูปที่ 9b) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงกลุ่มของอนุภาคไมโครอิมัลชันเปล่าที่ได้มีการปลดปล่อยตัวยาออกไปแล้ว

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าอนุภาคไมโครอิมัลชันที่บรรจุยาส่วนใหญ่แพร่ผ่านผิวหนังโดยทางรูขุมขนเป็นเส้นทางหลัก ขณะที่อนุภาคบางส่วนแพร่ผ่าน intercellular pathway และ transcellular pathway หลังจากนั้นโมเลกุลของยาจึงถูกปลดปล่อยจากอนุภาคและแพร่เข้าสู่เนื้อเยื่อ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการประเมิน skin penetration pathway ของ ultradeformable liposomes โดยใช้เทคนิค multicolor fluorescent probed vesicle ซึ่งสันนิษฐานว่าเส้นทางหลักที่ใช้แพร่ผ่านผิวหนังของ ultradeformable liposomes ที่มีขนาดอนุภาค

39.45 นาโนเมตร คือ transfollicular pathway ในขณะที่ intercellular pathway และ transcellular pathway เป็นเส้นทางรอง [23]

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่จำกัดการดูดซึมยาจาก stratum corneum อย่างไรก็ตามรูขุมขนจัดเป็นช่องทางธรรมชาติที่ยอมให้ยามีการแพร่ผ่านผิวหนังโดยการหลีกเลี่ยง stratum corneum เข้าไปสู่ผิวชั้น dermis แม้ว่ารูขุมขนจะครอบคลุมพื้นที่โดยส่วนน้อยของผิวหนัง [24] รูขุมขนมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของอนุภาคระดับนาโนเมตรดังเช่นลิโปโซมและไมโครอิมัลชัน การศึกษานี้สันนิษฐานว่าไมโครอิมัลชันเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของยาที่ถูกกักเก็บได้โดยการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านและเป็นอนุภาค ไมโครอิมัลชันสามารถเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังเนื่องมาจากการมีสารลดแรงตึงผิวในปริมาณมาก ส่วนในการเป็น drug carrier นั้นไมโครอิมัลชันเพิ่มการแพร่ผ่านผิวของยาที่ถูกกักเก็บได้โดยการหลีกเลี่ยง stratum corneum โดยการแพร่ผ่านรูขุมขน



รูปที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ของผิวหนังในภาคตัดขวางที่ได้รับการทดสอบด้วย rhodamine B base-loaded NBD-PE labeled microemulsion และย้อมด้วย DAPI ที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง

## 5. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดใหม่ขึ้นมาได้ โดยมี Isopropyl myristate เป็นวัฏภาคน้ำมัน มี PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides เป็นสารลดแรงตึงผิว มี PEG-7 glyceryl cocoate เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม (อัตราส่วน PEG-6 Caprylic/Capric Glycerides:PEG-7 glyceryl cocoate เท่ากับ 1:1) และ water เป็นวัฏภาคน้ำ ไมโครอิมัลชันสามารถเพิ่มการแพร่ผ่านผิวหนังของเซเลโคชิบได้ โดยการแพร่ผ่านทางรูขุมขน จัดเป็นเส้นทางหลักที่อนุภาคใช้แพร่ผ่านผิวหนัง ในขณะที่ intercellular pathway และ transcellular pathway จัดเป็นเส้นทางรองที่อนุภาคใช้แพร่ผ่านผิวหนัง

## เอกสารอ้างอิง

- [1] JE. Frampton, GM. Keating, *Drugs*, 67 (2007) 2433-2472.
- [2] B. Caldwell, S. Aldington, M Weatherall, P Shirtcliffe and R. Beasley, *J R Soc Med*, 99 (2006) 132-140.
- [3] SR. Ahmad, C. Kortepeter, A. Brinker, M. Chen, J. Beitz, *Drug Saf*, 25 (2002) 537-544.
- [4] M. Hagen, M. Baker, *Curr Med Res Opin*, 33 (2017) 1623-1634.
- [5] A. Naik, YN. Kalia and RH. Guy, *Pharm Sci Technolo Today*, 3 (2000) 318-326.
- [6] Available from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00482>. Cited on 28 June 2019.
- [7] N. Subramanian, SK Ghosal and SP Mouluk, *Drug Dev Ind Pharm*, 31 (2005) 405-416.
- [8] SM. Soliman, NS. Abdel Malak, ON. El-Gazayerly and AA. Abdel Rehim, *Drug Discov Ther*, 4 (2010) 459-471.
- [9] CH. Liu and FY. Chang, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 59 (2011) 172-178.
- [10] JH. Zhao, L. Ji, H. Wang, ZQ. Chen, YT. Zhang, Y. Liu and NP. Feng, *Int J Nanomedicine*, 6 (2011) 1611-1619.
- [11] S. Sahoo, NR. Pani and SK. Sahoo, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 120 (2014) 193-199.
- [12] M. Adiraj Iyer and DT. Eddington, *Lab Chip*, 19 (2019) 574-579.
- [13] T. Subongkot, *Int J Nanomedicine*, 14 (2019) 3087-3102.
- [14] MJ. Lawrence and GD. Rees, *Adv Drug Deliv Rev*, 64 (2012) 175-193.
- [15] DP. Acharya and PG. Hartley, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*, 17 (2012) 274-280.
- [16] SP. Callender, JA. Mathews, K. Kobernyk and SD. Wettig, *Int J Pharm*, 526 (2017) 425-442.
- [17] K. Krauel , NM. Davies, S. Hook and T. Rades, *J Control Release*, 106 (2005) 76-87.
- [18] KL. Trebilcock, JR. Heylings and MF. Wilks, *Toxicol In Vitro*, 8 (1994) 665-667.

- [19] V. Klang V, JC. Schwarz, B. Lenobel, M. Nadj, J. Auböck, M. Wolzt and C. Valenta, Eur J Pharm Biopharm, 80 (2012) 604-614.
- [20] AC. Williams and BW. Barry, Adv Drug Deliv Rev, 64 (2012) 128-137.
- [21] I. Som, K. Bhatia and M. Yasir, J Pharm Bioallied Sci, 4 (2012) 2-9.
- [22] BW. Barry, Eur J Pharm Sci, 14 (2001) 101-114.
- [23] T. Subongkot, N. Wonglertnirant, P. Songprakhon, T. Rojanarata, P. Opanasopit and T. Ngawhirunpat, Int J Pharm, 441 (2013) 151-161.
- [24] X. Liu, JE. Grice, J. Lademann, N. Otberg, S. Trauer, A. Patzelt, et al, Br J Clin Pharmacol, 72 (2011) 768-774.

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล: ผศ.ดร. ถิรพิทย์ สุขงกช

สังกัด: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

E-mail: [titanicto@hotmail.com](mailto:titanicto@hotmail.com)

ประวัติการศึกษา:

ปีการศึกษา	วุฒิการศึกษา	มหาวิทยาลัย	ประเทศ
2550	เภสัชศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง)	คณะเภสัชศาสตร์ ม.ศิลปากร	ไทย
2556	เภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีเภสัชกรรม)	คณะเภสัชศาสตร์ ม.ศิลปากร	ไทย

ผลงานวิจัย:

1. T. Subongkot, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat. Effect of limonene and 1,8 cineole on the skin penetration of fluorescein sodium deformable liposomes. *Advanced Materials Research*. 2012: 506; 449-452.
2. T. Subongkot, S. Duangjit, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat. Ultradeformable liposomes with terpenes for delivery of hydrophilic compound. *Journal of liposome research*. 2012: 22(3); 254-262.
3. T. Subongkot, N. Wonglertnirant, P. Songprakhon, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat. Visualization of ultradeformable liposomes penetration pathways and their skin interaction by confocal laser scanning microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013: 441; 151-161.
4. Subongkot, T., Pamornpathomkul, B., Rojanarata, T., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T. Investigation of the mechanism of enhanced skin penetration by ultradeformable liposomes. *International Journal of Nanomedicine* 2014;9; 3539-50.
5. Subongkot T and Ngawhirunpat T. Effect of liposomal fluidity on skin permeation of sodium fluorescein entrapped in liposomes. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;10;4581-4592.

6. Subongkot T and Ngawhirunpat T. Development of a novel microemulsion for oral absorption enhancement of all-trans retinoic acid. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12; 5585-5599.
7. 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.
8. Subongkot T and Sirirak T. Development and skin penetration pathway evaluation of microemulsions for enhancing the dermal delivery of celecoxib. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;193; 111103.

ผลงานการวิจัยเรื่องนี้ได้รับการตีพิมพ์เป็นบทความวิจัยระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่อง Development and skin penetration pathway evaluation of microemulsions  
for enhancing the dermal delivery of celecoxib

ในวารสาร Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

มีลำดับควอไทล์ที่ 1 มีค่า impact factor (ปี 2019 เท่ากับ 4.389