

การพัฒนาตำรับยาพืชนาสเตอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซม
เพื่อเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขน

ภณิกษา วิชยปรีชา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



**DEVELOPMENT OF FINASTERIDE PRONIOSOMES FOR
TRANSFOLLICULAR DELIVERY ENHANCEMENT**

PANIKCHAR WICHAYAPREECHAR

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCES
MAJOR IN PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
UBON RACHATHANI UNIVERSITY
YEAR 2012
COPYRIGHT OF UBON RACHATHANI UNIVERSITY**



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาตำรับยาฟีนาสเตอร์ไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมเพื่อเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขน

ผู้วิจัย นางสาวภณิกษา วิชขปรีชา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..... รศ. รังสิวิจิตร ประภา อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสิวิจิตรประภา)

..... อ. วิษณุ ติลาอ่อน กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิรัช ติลาอ่อน)

..... อ. น. กรรมการ

(ดร.บัญชา ชิงงาม)

..... อ. น. กรรมการ

(ดร.ณัฐวุฒิ เจริญไทย)

..... อ. น. คณบดี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

..... อ. น.

(รองศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2555

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และความช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์รวมถึงการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จเป็นรูปเล่มได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วริष्ฎา ศิลาอ่อน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.บัญญัติ ยิ่งงาม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และดร.ณัฐภูมิ เจริญไทย จากบริษัทฟาร์มา นูวา จำกัด กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม และให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดีทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณอาจารย์ในคณะเภสัชศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยกรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ในด้านต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเงินทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และบริษัทฟาร์มา นูวา จำกัด ภายใต้งานโครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัยทุน สกว.-อุตสาหกรรม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในส่วนของการใช้ข้อมูลการวิจัย

ขอบคุณพี่ๆนักวิทยาศาสตร์ เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้องๆที่คอยให้ความช่วยเหลือในการวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัววิชัยปรีชา ที่คอยให้กำลังใจ คอยให้คำปรึกษา คอยอยู่เคียงข้างเสมอทั้งในยามสุขและทุกข์ ตลอดทั้งให้การสนับสนุนในด้านต่าง ๆ แก่ผู้วิจัยตลอดมา

(นางสาวภณิกษา วิชัยปรีชา)

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ	ฐ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย	4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการจากการวิจัย	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ผิวหนัง	6
2.2 เส้นทางของสารในการซึมสารผ่านทางผิวหนัง	9
2.3 โครงสร้างของขนหรือผม	10
2.4 การดูดซึมของสารผ่านทางรูขุมขน	12
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านทางรูขุมขน	13
2.6 การกำหนดเป้าหมายในการนำส่งสารเข้าสู่รูขุมขน	14
2.7 ประโยชน์จากการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขน	15
2.8 เทคโนโลยีนาโนสำหรับการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขน	16
2.9 ความสัมพันธ์ของรูขุมขนกับโรคผิวหนัง	17
2.10 ภาวะผมร่วง	19
2.11 โพรนิโอโซมและนีโอโซม	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.12 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเทอไรด์	29
2.13 การตรวจสอบการซึมผ่านทางรูขุมขน	30
2.14 การประเมินประสิทธิภาพของตำรับฟีนาสเทอไรด์	32
2.15 การประเมินการระคายเคืองผิวหนัง	33
2.16 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	34
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	38
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	38
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล	48
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
4.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์	
ด้วยเครื่อง โครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง	49
4.2 การพัฒนาตำรับฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซม	55
4.3 ทดสอบการปลดปล่อยยา การซึมผ่านทางผิวหนังและ	
การซึมผ่านทางรูขุมขนของฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม	69
4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม	
และการทดสอบการระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลอง	72
5 สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	82
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	86
5.3 ข้อเสนอแนะ	98
เอกสารอ้างอิง	99
ภาคผนวก	112
ประวัติผู้วิจัย	114

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	อัตราส่วนในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน	40
3.2	อัตราส่วนในการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมกับสารรบกวน	41
3.3	ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปร	41
3.4	ไขมันทั้งหมดในคำรับ ร้อยละความเข้มข้นของคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป	42
3.5	เกณฑ์การเจริญของเส้นขน	47
3.6	เกณฑ์ในการประเมินการระคายเคืองผิว	48
3.7	ระดับการระคายเคืองผิว (Primary irritation index)	48
4.1	ค่า Resolution Tailing factor และ Number of theoretical plate เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง	52
4.2	%RSD ของ Retention time และ Peak area ที่ความเข้มข้น 50, 150 และ 300 µg/ml	53
4.3	% Recovery ของฟีนาสเทอไรด์นิโอโซมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่กักเก็บในนิโอโซม	54
4.4	Retention time ของฟีนาสเทอไรด์เมื่อเติมสิ่งรบกวน	55
4.5	ร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา และขนาดอนุภาคที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RSM-CCD	56
4.6	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการพหุนามกำลังสองของร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยาและขนาดของอนุภาค	58
4.7	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยาและขนาดของอนุภาค	59
4.8	กำหนดเกณฑ์ของระดับปัจจัยที่มีผลต่อค่าตอบสนองเพื่อวิเคราะห์หาค่าที่เหมาะสม	60
4.9	เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (n=3)	64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.10	ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายขนาดและค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (n=3)	65
4.11	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย การกระจายขนาดของอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิว อนุภาคที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็น ระยะเวลา 4 เดือน (n=4)	66
4.12	จำนวน hair follicle ในผิวหนังหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบกลุ่มต่าง ๆ	80
4.13	ระดับคะแนนการระคายเคืองผิวในกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit	81
4.14	ระดับการระคายเคืองผิว (Primary irritation index)	81

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของชั้นผิวหนัง	8
2.2	ช่องทางการดูดซึมของสารผ่านผิวหนัง	10
2.3	โครงสร้างของขนหรือผม	11
2.4	วงจรชีวิตของเส้นผม	12
2.5	เป้าหมายในการนำส่งสารเข้าสู่รูขุมขน	15
2.6	โครงสร้างของไมนอกซิคิล	21
2.7	โครงสร้างและการกลไกในการออกฤทธิ์ของฟีนาสเทอไรด์	22
4.1	โครมาโตแกรมของฟีนาสเทอไรด์ เมื่อแยกแบบไอโซเครติก (Isocratic) ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำ ในอัตราส่วน 65:35	50
4.2	โครมาโตแกรมของฟีนาสเทอไรด์ เมื่อแยกแบบไอโซเครติก (Isocratic) ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างและอะซิโตรไนไตรท์กับน้ำ ในอัตราส่วน 50:50	50
4.3	โครมาโตแกรมของฟีนาสเทอไรด์ เมื่อแยกแบบไอโซเครติก (Isocratic) ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำ ในอัตราส่วน 70:30	51
4.4	โครมาโตแกรมของฟีนาสเทอไรด์ เมื่อแยกแบบไอโซเครติก (Isocratic) ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างและอะซิโตรไนไตรท์กับน้ำ ในอัตราส่วน 60:40	51
4.5	กราฟมาตรฐานของฟีนาสเทอไรด์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (n=3)	53
4.6	กราฟสามมิติและกราฟโครงร่างแสดงไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ซึ่งมีผลต่อร้อยละการกักเก็บยา	61
4.7	กราฟสามมิติและกราฟโครงร่างแสดงไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ซึ่งมีผลต่อร้อยละการบรรจุยา	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.8 กราฟสามมิติและกราฟโครงร่างแสดงไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ซึ่งมีผลต่อขนาดอนุภาค	63
4.9 ลักษณะทางกายภาพของโปรนิโอโซมอุณหภูมิ (ก) 4 °C (ข) 25 °C 75%RH และ (ค) 40 °C 75% RH (n= 4)	65
4.10 กราฟแสดงร้อยละการกักเก็บยาที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH ระยะเวลา 4 เดือน (n = 4)	67
4.11 กราฟแสดงร้อยละการบรรจุยาที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH ระยะเวลา 4 เดือน (n = 4)	68
4.12 ค่าชี้วัดการละลายของฟีนาสเทอไรด์ในสารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4, 32 °C, 100 rpm, n=3)	69
4.13 การปลดปล่อยฟีนาสเทอไรด์จากตำรับโปรนิโอโซมด้วยเทคนิคไดอะไลซิส (MW cut off 12,000-14,000, 32 °C, 100 rpm, n=5)	70
4.14 ปริมาณฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมที่ซึมผ่านชั้นผิวหนังลูกสุกรแรกเกิด (32 °C, n=3, EtOH:PBS (pH 7.4 (1:1))	71
4.15 การเจริญของเส้นขนหนู	73
4.16 กราฟการเจริญของเส้นขนของหนูถีบจักร เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบและประเมินตามเกณฑ์การเจริญของเส้นขน (n = 5)	76
4.17 ภาพตัดตามขวางผิวหนังหนูถีบจักรเมื่อ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; โปรนิโอโซมเปล่า) (ข) 2% สารละลายไมนอกซิคิล (ค) 0.1% ฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม (ง) 0.5% ฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม (จ) 1% ฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมและ (ฉ) 1% สารละลายฟีนาสเทอไรด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่าในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง	77

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.18	ภาพตัดตามยาวของผิวหนังหนูถีบจักรเมื่อ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; โพรนิโอโซมเปล่า) (ข) 2% สารละลายไมนออกซิซิล (ค) 0.1% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซม (ง) 0.5% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซม (จ) 1% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซมและ(ฉ) 1% สารละลายฟินาสเทอไรด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่าในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง
	78

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

EtOH	เอทิลแอลกอฮอล์
FN	ฟีนาสเทอไรด์
nm	นาโนเมตร
mV	มิลลิโวลต์
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
PBS	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
µg	ไมโครกรัม
µL	ไมโครลิตร
rpm	รอบต่อนาที
°C	องศาเซลเซียส
%RH	ค่าความชื้นสัมพัทธ์ (Relative humidity)

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การพัฒนาตำรับยาฟีนาสเดอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมเพื่อเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขน

โดย : ภณิกษา วิชยปรีชา

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา

ศัพท์สำคัญ : โปรนิโอโซม ฟีนาสเดอไรด์ การตอบสนองพื้นผิว การซึมผ่านทางรูขุมขน การระคายเคืองผิว

ฟีนาสเดอไรด์เป็นยาที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้ใช้รับประทานเพื่อรักษาภาวะผมร่วงในเพศชาย ปัจจุบันเป็นยาเม็ดที่ใช้ในการรับประทานและมีรายงานผลข้างเคียงจากการใช้ยาคือทำให้ความดันโลหิตลดลงและทำให้เสื่อมสมรรถภาพทางเพศ การใช้ยาฟีนาสเดอไรด์ในรูปแบบของโปรนิโอโซม โดยซึมผ่านทางรูขุมขนสามารถช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับฟีนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมเพื่อกระตุ้นการเจริญของเส้นขน การเตรียมตำรับฟีนาสเดอไรด์เตรียมด้วยวิธีโคอะเซอร์เวชันแบบแยกวัตถุดิบ โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวร่วมกับการออกแบบส่วนผสมกลางพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมตำรับคือความเข้มข้นของคอเรสเตอรอลเท่ากับร้อยละ 39.03 ไขมันทั้งหมดในตำรับเท่ากับ 20.26 mM และความเข้มข้นฟีนาสเดอไรด์เท่ากับ 3.39 mM ซึ่งสัดส่วนที่เหมาะสมนี้จะให้ร้อยละการกักเก็บยาเท่ากับ 94.47 ± 1.67 ร้อยละการบรรจุยาเท่ากับ 13.14 ± 0.18 และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 292 ± 0.85 nm เมื่อเก็บตำรับภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH พบว่า ขนาดอนุภาคและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคของระบบไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลา 4 เดือน ร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยาที่อุณหภูมิ 25 °C 75%RH มีค่าเป็น 86.69 ± 1.04 และ 12.70 ± 0.08 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 4 °C และ 40 °C 75% RH การศึกษาการปลดปล่อยฟีนาสเดอไรด์ด้วยเทคนิคโคอะไลซิสพบว่า การปลดปล่อยฟีนาสเดอไรด์ออกจากโปรนิโอโซมเป็นแบบการออกฤทธิ์เน้น การศึกษาการซึมผ่านชั้นผิวหนังของฟีนาสเดอไรด์ด้วยเทคนิค Franz diffusion cell พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตำรับฟีนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมและ

สารละลายฟีนาสเทอไรด์พบว่า ปริมาณฟีนาสเทอไรด์ในสารละลายตัวกลางเท่ากับ $5.26 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และ $2.51 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ การศึกษาการซึมผ่านทางรูขุมขนของฟีนาสเทอไรด์ โพรนิโอโซมเทียบกับสารละลายฟีนาสเทอไรด์พบว่า ปริมาณฟีนาสเทอไรด์ที่ซึมผ่านทางรูขุมขน เท่ากับ $2.43 \pm 0.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และ $0.67 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ตามลำดับ สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพ การเจริญของเส้นขนในหนูสายพันธุ์ C57BL/6Mlac พบว่า ร้อยละ 1 ของฟีนาสเทอไรด์ โพรนิโอโซมมีประสิทธิภาพเทียบเท่าร้อยละ 2 ของสารละลายไมนอกซิดิลและร้อยละ 1 ของ ฟีนาสเทอไรด์ โพรนิโอโซมเพิ่มการเจริญของเส้นขนหนูได้มากกว่าร้อยละ 1 ของสารละลาย ฟีนาสเทอไรด์ การศึกษาเนื้อเยื่อของผิวหนังจะประเมินวงจรชีวิตของเส้นขนหลังจากทาสารทดสอบ พบว่า ฟีนาสเทอไรด์ โพรนิโอโซมและสารละลายไมนอกซิดิลเพิ่มจำนวนและขนาดของรูขุมขนได้ เทียบเท่ากันอย่างมีนัยสำคัญและฟีนาสเทอไรด์ โพรนิโอโซมมีจำนวนรูขุมขนแตกต่างจาก สารละลายฟีนาสเทอไรด์อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาการระคายเคืองผิวในกระต่ายพบว่า มีค่า การระคายเคืองผิวเป็นศูนย์ ดังนั้นการพัฒนาตำรับยาฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบโพรนิโอโซมเพื่อเพิ่ม การซึมผ่านทางรูขุมขนเพื่อใช้ในการรักษาภาวะผมร่วงเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการ รักษาภาวะผมร่วงและสามารถลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาได้

ABSTRACT

TITLE : DEVELOPMENT OF FINASTERIDE PRONIOSOMES FOR
 TRANSFOLLICULAR DELIVERY ENHANCEMENT
 BY : PANIKCHAR WICHAYAPREECHAR
 DEGREE : MASTER OF SCIENCES
 MAJOR : PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
 CHAIR : ASSOC. PROF. DR. WANDEE RUNGSEEVIJITPRAPA
 KEYWORDS : PRONIOSOMES / FINASTERIDE / RESPONSE SURFACE METHODOLOGY /
 TRANSFOLLICULAR / SKIN IRRITATION

Finasteride is medicine approved by the U.S. Food and Drug Administration for the treatment of male pattern hair loss. It is currently available as tablets for oral administration and its most common side-effects reported are decreased libido and impotence. Transfollicular application of finasteride proniosomes could reduce such side effects. The purpose of this study was to develop finasteride proniosomes for hair growth stimulation. Finasteride proniosomes were prepared by coacervation phase separation method. A Central composite design of response surface methodology was used to optimize formulation parameters of finasteride proniosomes. Results showed the optimum formulation was 39.03 % of cholesterol concentration of total lipid concentration, 20.26 mM of total lipid content, and 3.39 mM of finasteride concentration. The experimental values of the optimized formulation exhibited encapsulation efficiency of 94.47 ± 1.67 %, drug loading capacity of 13.14 ± 0.18 % and mean particle size of 292 ± 0.85 nm. Particles size and zeta potential of the system remained stable after 4 months storage at 4 ° C, 25 ° C 75% RH and 40 ° C 75% RH. Percentage of encapsulation efficiency and drug loading capacity at 25 ° C 75% RH was 86.69 ± 1.04 and 12.70 ± 0.08 , respectively which was higher than those kept at 4 ° C and 40 ° C 75% RH. In *vitro* drug release study by dialysis test found that the drug release from proniosomes was in a sustained release manner. Skin penetration of finasteride investigated by Franz diffusion cell from finasteride proniosomes and finasteride solution at 24 hours were 5.26 ± 1.85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 2.51 ± 0.45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. In *vitro* transfollicular of

finasteride proniosomes compared with finasteride solution showed amount of finasteride penetrated through transfollicular was $2.43 \pm 0.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $0.67 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. Investigation of hair growth in C57BL/6Mlac mice of 1% finasteride proniosomes was comparable to 2% minoxidil solution. The one percent finasteride proniosomes enhanced the hair growth stimulation more pronounced than that of finasteride solution of the same finasteride concentration. Histological evaluation of hair cycles after application of treated group showed that finasteride proniosomes and minoxidil solution significantly increased the number and size of hair follicle. Finasteride proniosomes significantly increased the number of hair follicle than finasteride solution. The skin irritation test showed a primary irritation index of zero. Therefore, the development of finasteride proniosomes for enhanced through transfollicular for the treatment of hair loss is one of the most interesting technologies that can reduce the side effects of the drug.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีพื้นที่ผิวมากที่สุดในร่างกายโดยคิดเป็นน้ำหนักประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตของร่างกายออกจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Verma et al., 2003) จึงเป็นช่องทางที่สารสามารถเข้าสู่ร่างกายได้อีกช่องทางหนึ่ง ซึ่งการนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังสามารถนำส่งได้ 3 เส้นทาง คือ (1) การซึมผ่านของสารทางผิวหนัง (transcellular route) คือ ตัวยาหรือสารผ่านเข้าไปในเซลล์บนผิวหนังและถูกดูดซึมต่อไปยังอีกเซลล์หนึ่งไปเรื่อย ๆ เส้นทางนี้เหมาะกับสารที่ละลายได้ดีในน้ำและน้ำมัน (2) การซึมผ่านของสารทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular route) คือ ตัวยาหรือสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) เส้นทางนี้เหมาะกับสารที่ละลายได้ดีในน้ำมันและ (3) การซึมผ่านของสารบนท่อเปิดบนผิวหนัง (transappendageal route) คือ การที่ตัวยาหรือสารซึมผ่านผิวหนังทางช่องหรือท่อของอวัยวะบนผิวหนัง เช่น ท่อต่อมไขมัน (sebaceous duct) ท่อต่อมเหงื่อ (sweat duct) และรูขุมขน (transfollicular) (Ladmann et al., 2008) การนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังเส้นทางที่สารซึมผ่านจะผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ซึ่งเป็นเส้นทางเดียวที่มีความสัมพันธ์กับการซึมผ่านของสาร แต่ในปัจจุบันพบว่า การซึมผ่านทางรูขุมขนเป็นเส้นทางหนึ่งที่มีความน่าสนใจและมีความสำคัญ เพราะภายในรูขุมขนมีส่วนที่เป็นเป้าหมายในการนำส่งสารหรือยาที่ใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง เช่น ผดผื่นและสิว นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นเส้นทางหลักและมีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่โมเลกุลของสารเมื่อใช้ในรูปแบบยาทาภายนอก (Knorr, 2009) ซึ่งความสัมพันธ์ของรูขุมขนกับการนำส่งสารนั้นจะขึ้นกับการกระจายตัวของรูขุมขนบนส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ด้วยเหตุผลนี้ทำให้รูขุมขนไม่เพียงแต่ช่วยในเรื่องการนำส่งสารเท่านั้นแต่ยังเป็นจุดสำคัญสำหรับสารที่ใช้ในรูปแบบทาภายนอก (Vogt, 2005) และยังเป็นเส้นทางที่ยอมรับให้มีการนำส่งสารผ่านทางผิวหนังเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายเพื่อใช้ประโยชน์ด้านเภสัชกรรมและเครื่องสำอางไม่ว่าจะเป็นการใช้เพื่อรักษาโรคผิวหนังซึ่งมีความเหมาะสมเพราะสามารถลดระดับยาที่ใช้ในการออกฤทธิ์และลดความเป็นพิษของตำรับลงได้ (Ylva et al., 2004)

สำหรับเส้นทางการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขนนั้นมีความสัมพันธ์กับโรคผิวหนังไม่ว่าจะเป็นสิว การผลิตไขมันมากเกินไป (seborrhea) และภาวะผมร่วงจากกรรมพันธุ์ (androgenetic alopecia) ล้วนเป็นผลจากการผลิตฮอร์โมนแอนโดรเจนมากเกินไป (Tabbakhian et al., 2006) โดยเฉพาะผมร่วงจากกรรมพันธุ์ที่สามารถเกิดได้ทั้งในผู้หญิงและผู้ชาย (Chen et al., 2010) ซึ่งโรคนี้ก่อให้เกิดภาวะซึมเศร้าในคนได้และมีโอกาสเกิดขึ้นได้ถึงร้อยละ 50 ในช่วงชีวิตของเรา (Darla et al., 2011) ส่วนสาเหตุการเกิดนั้นมีหลายสาเหตุด้วยกันไม่ว่าจะเกิดจากการขาดสารอาหาร ความเครียด การมีฮอร์โมนในร่างกายไม่สมดุล ความเครียด (Hye, 2011) ภาวะโลหิตจางและโรคไทรอยด์ (Darla et al., 2011) เป็นต้น โดยโรคนี้มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตฮอร์โมนแอนโดรเจนซึ่งขึ้นกับยีนของตัวรับแอนโดรเจนที่อยู่ภายในรูขุมขน (Margarita and Vladislav, 2011) ที่มีการสัมผัสกับฮอร์โมนแอนโดรเจน แล้วเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ (Darla et al., 2011) โดยกลไกการเกิดผมร่วงนั้นเกิดจากฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) ถูกเปลี่ยนเป็นฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (dihydrotestosterone; DHT) โดยเอนไซม์ 5 α -Reductase ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ฮอร์โมนชนิดนี้จะส่งผลให้มีระยะการเจริญของเส้นผมที่สั้น ทำให้เส้นผมที่สร้างใหม่มีลักษณะบาง สั้นและมีสีจางลงซึ่งนำไปสู่ภาวะผมร่วง (Hye, 2011) ปัจจุบันนี้มียาเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุมัติให้ใช้ในการรักษาอาการผมร่วงคือ ฟินาสเทอไรด์ (finasteride) และมินอกซิديل (minoxidil) (Prince, 1999) ซึ่งยาทั้ง 2 นี้จะมีข้อจำกัดในการรักษา โดยเฉพาะในเรื่องของผลข้างเคียงและอัตราการรักษาที่ให้ผลค่อนข้างต่ำ (Hye, 2011)

ฟินาสเทอไรด์เป็นยาที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจำเพาะต่อเอนไซม์ 5 α - reductase type II ภายในรูขุมขน (Hugo, 2004) ซึ่งเป็นสารประกอบของ 4-aza-3-oxosteroid มีชื่อทางการค้า Propecia® (Nate, Jared and Jason, 2009) ใช้ในการรักษาอาการผมร่วงที่เกี่ยวข้องกับกรรมพันธุ์ ซึ่งเกิดจากฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในร่างกาย ขนาดยาที่ใช้ในการรักษาคือ 1 มิลลิกรัมต่อวัน ผลข้างเคียงจากการรับประทานยานี้คือ ทำให้หย่อนสมรรถภาพทางเพศ และมีผลกับสตรีมีครรภ์โดยจะส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนที่เป็นเพศชาย (Nicole et al., 2008) และฟินาสเทอไรด์ยังไม่มีจำหน่ายในรูปแบบยาที่ใช้เฉพาะที่ เนื่องจากที่ผิวหนังจะพบเอนไซม์ 5 α - reductase type II จำนวนน้อย แต่มีรายงานการศึกษาว่าเมื่อพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของเอทโรโซม นิโอโซมและไลโปโซม (Rao et al., 2008; Tabbakhian et al., 2006) ซึ่งเป็นการนำส่งระบบหนึ่งอยู่ในรูปแบบของนาโนพาร์ติเคิล จะมีประสิทธิภาพในการนำส่งเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายในการรักษาผมร่วงได้ โดย Rao et al (2008) ได้ศึกษาการซึมผ่านทางผิวหนังและการสะสมของฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบของเอทโรโซมพบว่าการเตรียมตำรับฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบของเอทโรโซมมีประสิทธิภาพในการเก็บกักยาและ

มีความสามารถในการปลดปล่อยยาที่สูงกว่าในรูปแบบของไลโปโซม และยังมีปริมาณยาที่สะสมในชั้นผิวสูงกว่าในรูปแบบของไลโปโซมอีกด้วยและจากการศึกษาของ Tabbakhian et al (2006) ได้ศึกษาการนำส่งพินาสเทอไรด์ในรูปแบบของไลโปโซมและนิโอโซมเพื่อเพิ่มการนำส่งผ่านทางรูขุมขน โดยเปรียบเทียบพินาสเทอไรด์ที่กักเก็บในไลโปโซมและนิโอโซมกับสารละลายแอลกอฮอล์ของพินาสเทอไรด์ จากการศึกษาพบว่า ไลโปโซมและนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นสามารถนำส่งพินาสเทอไรด์เข้าสู่รูขุมขนได้ ซึ่งเป็นการออกฤทธิ์ของยาที่อวัยวะเป้าหมายโดยตรง (Rao et al., 2008) และสามารถลดข้อจำกัดในการละลายน้ำได้ยากของยาเพราะระบบนำส่งเหล่านี้สามารถเก็บกักได้ทั้งสารที่ชอบไขมันและชอบน้ำได้ (อรัญญา มโนสร้อย, 2550)

เนื่องจากพินาสเทอไรด์มีคุณสมบัติละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ แต่ละลายในน้ำยาก นอกจากนี้ยังพบว่าถ้ามีการให้พินาสเทอไรด์ในรูปแบบของยาทาภายนอกและให้ในความเข้มข้นที่เพียงพอจะมีประโยชน์มากกว่าการให้ในรูปแบบของยารับประทาน เพราะสามารถลดผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นได้ (Daneshaouz et al., 2005) และการศึกษาของ Zohreh et al. (2009) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้พินาสเทอไรด์ในรูปแบบยารับประทานและยาทาภายนอกในการรักษาภาวะผมร่วงพบว่า ยาทั้งสองรูปแบบนี้ไม่มีความแตกต่างกันในการรักษาภาวะผมร่วง ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาตำรับพินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมและนำส่งผ่านทางรูขุมขนซึ่งเป็นอวัยวะที่มีความจำเพาะในการรักษาภาวะผมร่วงและประเมินความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีเมื่อเก็บภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40°C 75% RH เป็นระยะเวลา 4 เดือน ทดสอบการปลดปล่อยยา การซึมผ่านทางผิวหนังและการซึมผ่านทางรูขุมขนของตำรับพินาสเทอไรด์และทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเส้นผมและทดสอบการระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลอง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาตำรับพินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมที่มีประสิทธิภาพในการซึมผ่านทางรูขุมขน และศึกษาประสิทธิภาพการเจริญของเส้นผมและการระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลอง

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 คาร์บิฟนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขนได้

1.3.2 คาร์บิฟนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับคาร์บิฟนาสเดอไรด์ไมนอกซิคิล

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของคาร์บิฟนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมออกแบบโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert 8.0.1.0 (Stat Ease, USA)

1.4.2 ทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังและการซึมผ่านทางรูขุมขน ผิวหนังที่ใช้ในการทดสอบคือ ผิวหนังสุกรตายแรกเกิด จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.4.3 ทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเส้นผมและเนื้อเยื่อของผิวหนังใช้หนูสายพันธุ์ C57BL/6Jlac เพศผู้ อายุ 7 สัปดาห์ และมีน้ำหนัก 18-22 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.4.4 ทดสอบการระคายเคืองผิวหนังด้วยเทคนิค Closed patch test สัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบคือ กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit เพศผู้ และมีน้ำหนัก 1.2 – 1.8 กิโลกรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อประเมินอาการแดง (erythema) และอาการบวม (edema) ของผิวหนัง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.5.1 การผลิตฟิโนสเดอไรด์โปรนิโอโซมเพื่อใช้ในการนำส่งผ่านทางรูขุมขนสามารถนำไปใช้แก้ปัญหาภาวะผมร่วงได้

1.5.2 การนำองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นประโยชน์ในการผลิตยาในรูปแบบอื่น ๆ และสามารถใช้ในการนำส่งผ่านทางรูขุมขนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.5.3 การนำคาร์บิฟนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมสามารถนำไปพัฒนาใช้ผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาตำรับฟีนาสเตอไรด์โปรนีโอโซมเพื่อเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขน ผู้วิจัยศึกษา
ตำรา เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งสรุปสาระสำคัญไว้ตามลำดับดังนี้

- 2.1 ผิวหนัง
- 2.2 เส้นทางของสารในการซึมสารผ่านทางผิวหนัง
- 2.3 โครงสร้างของขนหรือผม
- 2.4 การดูดซึมของสารผ่านทางรูขุมขน
- 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านทางรูขุมขน
- 2.6 การกำหนดเป้าหมายในการนำส่งสารเข้าสู่รูขุมขน
- 2.7 ประโยชน์จากการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขน
- 2.8 เทคโนโลยีนาโนสำหรับการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขน
- 2.9 ความสัมพันธ์ของรูขุมขนกับโรคผิวหนัง
- 2.10 ภาวะผมร่วง
- 2.11 โปรนีโอโซมและนิโอโซม
- 2.12 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์
- 2.13 การตรวจสอบการซึมผ่านทางรูขุมขน
- 2.14 การประเมินประสิทธิภาพของตำรับฟีนาสเตอไรด์
- 2.15 การประเมินการระคายเคืองผิวหนัง
- 2.16 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผิวหนัง

ผิวหนังเป็นส่วนของร่างกาย ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตของร่างกายออกจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีพื้นที่ผิวมากที่สุดในร่างกายคิดเป็นประมาณร้อยละ 16 ของน้ำหนักตัว จึงเป็นช่องทางให้ยาหรือสารผ่านได้อีกทางหนึ่ง ผิวหนังทำหน้าที่สำคัญในการป้องกันควบคุมอุณหภูมิและรับรู้สีกในด้านการป้องกันอันตรายจากภายนอกชั้นของผิวหนังส่วนนอกที่เรียกว่า สตราตัมคอร์เนียม ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นที่สำคัญในการซึมผ่านของสาร (วารกรณ์ จรรยาประเสริฐ, 2009) ดังนั้นการทำความเข้าใจถึงโครงสร้างของผิวหนังและการซึมผ่านทางผิวหนังจึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาระบบนำส่ง

2.1.1 โครงสร้างของผิวหนัง

ผิวหนังของมนุษย์แสดงดังภาพที่ 2.1 (Mills and Cross, 2006) ประกอบด้วย 3 ชั้น คือ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (subcutaneous layer หรือ hypodermis) (Verma et al., 2003) สามารถอธิบายได้ดังนี้

2.1.1.1 ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เป็นชั้นผิวหนังที่อยู่บนสุดและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ผิวชั้นหนังกำพร้าเกิดจากเซลล์ชั้นเดียวซึ่งแบ่งตัวหนาขึ้นเกิดเป็นเซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) ประกอบด้วย Epidermal Appendages (adnexal Structures) เช่น เส้นผม ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน เป็นต้น ส่วนประกอบที่สำคัญคือ

1) เซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) หรือ squamous cell เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่สร้างสาร keratin ซึ่งเป็น complex filamentous protein ทำหน้าที่ปกคลุมผิวหน้าของผิวหนัง เป็นเซลล์หนังชั้นนอกที่ไม่มีชีวิต ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารผ่านผิวหนังชั้นนี้ประกอบด้วย เซลล์คอร์นีไฟด์ ซึ่งเป็นเซลล์หกเหลี่ยมมีลักษณะแบนเรียงตัวซ้อนกัน 13-25 เซลล์ มีโครงสร้างแบบอิฐและปูน (brick and mortar model) โดยโครงสร้างของเซลล์เรียงต่อกันเหมือนก้อนอิฐและมีไขมันระหว่างเซลล์ทำหน้าที่เป็นปูนยึดเซลล์ให้ติดกัน แต่ละเซลล์ประกอบด้วยกลุ่มของเคราตินและไขมัน ส่วนของไขมันระหว่างเซลล์ประกอบด้วย คอเรสเตอรอลเซราไมด์ กรดไขมันอิสระ คอเรสเตอรอลเอสเทอร์และคอเรสเตอรอลซัลเฟต ซึ่งสัดส่วนของสารประกอบเหล่านี้มีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับตำแหน่งบนร่างกาย (William, 2003) นอกจากนี้เซลล์ผิวหนัง จะแบ่งตัวจากชั้น basal layer ซึ่งเป็นเซลล์ชั้นเดียวขึ้นไปเรื่อยๆและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างขนาดของเซลล์จนในที่สุดจะเป็นเซลล์ชั้นขี้ไคลและหลุดลอกออกไปในที่สุด

2) Epidermal Appendage (adnexal structures) เป็นอวัยวะที่งอกมาจากเซลล์ชั้นหนังกำพร้าซึ่งอยู่ลึกลงไปใผิพหหนังชั้นหนังแท้ ประกอบด้วย (William, 2003)

หน่วยต่อมเหงื่อ (Sweat Unit) ส่วนใหญ่จะเป็น eccrine (merocrine) gland พบทั่วไปในผิวหนังยกเว้นที่ขอบของริมฝีปาก เยื่อแก้วหู (ear drum) ผิวด้านในของ prepuce และ glands penis พบมากที่ฝ่ามือ ฝ่าเท้าและเป็นต่อมชนิดเดียวที่พบบริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า ต่อมเหงื่อเป็น simple coiled tubular gland ทำหน้าที่ในการสร้างสาร (secretory portion) จะอยู่ในชั้นหนังแท้ ท่อของต่อมจะแทงผ่านชั้นหนังกำพร้าไปเปิดออกภายนอกร่างกาย สารที่สร้างจากต่อมเหงื่อจะมีลักษณะใสเป็นน้ำก็คือเหงื่อนั่นเอง พื้นที่ของต่อมเหงื่อคิดเป็นประมาณร้อยละ 0.1 ของพื้นที่ผิวหนังทั้งหมด

หน่วยต่อมอโปคราย (apocrine Unit) เป็นต่อมที่มีขนาดใหญ่กว่า eccrine ต่อมนี้อจะเริ่มเจริญและทำงานเมื่อเข้าสู่วัยรุ่นแล้วเท่านั้นและการเจริญของต่อมต้องได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนเพศ เมื่อต่อมเจริญเต็มที่ไม่ว่าจำเป็นต้องมีฮอร์โมนมากกระตุ้นก็สามารถทำงานได้ ต่อมนี้อจะผลิตสารที่มีลักษณะเหนียวข้น (viscous milk-to- clear fluid) เปรียบต่อมนี้อเสมือนต่อมให้กลิ่น (odoriferous glands) ในสัตว์จะผลิตสารให้กลิ่น (odoriferous role) เพื่อดึงดูดเพศตรงข้าม (sexual attractants) หรือเพื่อทำเขตแดน (territorial markers)

รากขน (hair Follicle) จะติดอยู่กับต่อมไขมัน

หน่วยต่อมน้ำมันหรือต่อมไขมัน (sebaceous gland unit) พบได้ทั่วไป ยกเว้นบริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า มักจะสัมพันธ์กับรากขน ต่อมนี้อเป็นต่อมชนิด simple branched alveolar gland excretory duct จะมีเส้นผมนขนาดใหญ่และเปิดเข้าสู่ส่วนบนของรูขุมขน สารที่หลั่งออกมาจะมีลักษณะเป็นน้ำมันเรียกว่า ซีบัม (sebum) ที่ประกอบด้วย ไตรเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมันอิสระ และแว็กซ์ สารเหล่านี้ทำหน้าที่ปกป้องและหล่อลื่นผิวหนัง รวมทั้งทำให้ผิวหนังมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงของกรดอ่อนที่มีค่าพีเอชประมาณ 5.5 ถ้ามีการขัดขวางหรือการอุดตันการหลั่งจะทำให้เป็นสิ่วช่องทางนี้เ็นทางลัดที่โมเลกุลของสารเข้าสู่ผิวหนังโดยไม่ผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม

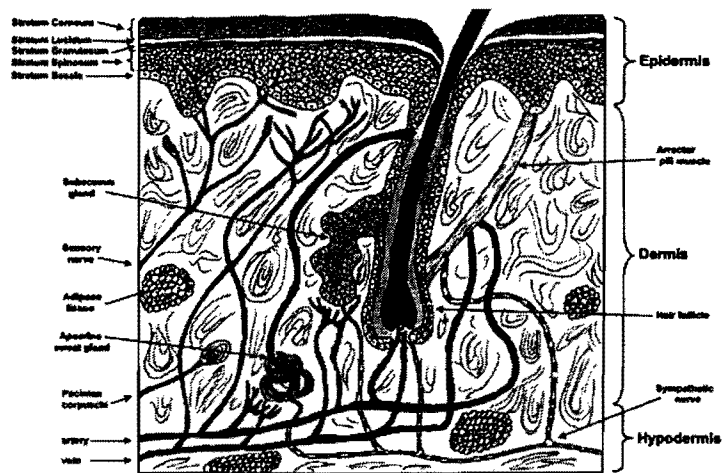
3) เซลล์อื่น ๆ ในผิวหนังชั้นหนังกำพร้าที่สำคัญ เช่น

Melanocyte เป็นเซลล์สร้างเม็ดสีเมลานิน โดยใช้ไทโรซินเป็นสารตั้งต้น เมลานินมี 2 ชนิด ได้แก่ ยูเมลานิน (eumelanin) ซึ่งเป็นเม็ดสีน้ำตาลดำและฟีโอเมลานิน (pheomelanin) เป็นเม็ดสีแดงเหลือง

Langerhans Cell เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ผิวหนัง

2.1.1.2 ชั้นหนังแท้ (dermis) เซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน เส้นใยอีลาสตินและเส้นใยเรติคูลัม ซึ่งมีลักษณะละเอียดและอยู่กันแบบหลวม ๆ โดยชั้นบนที่อยู่ชิดกับชั้นหนังกำพร้า เรียกว่าชั้น papillary dermis ส่วนในชั้นลึกเส้นใยมีลักษณะหยาบกว่าและอยู่กันอย่างหนาแน่น เรียกว่าชั้น reticular dermis เส้นใยดังกล่าวจะวางตัวอยู่ในสารพื้นฐาน (Ground substance) ซึ่งประกอบด้วย acid mucopolysaccharide นอกจากนั้นในชั้นหนังแท้ยังมีเส้นเลือด กล้ามเนื้อ เส้นประสาทและปุ่มประสาทพิเศษที่รับรู้ความรู้สึกต่าง ๆ เช่น รับความรู้สึกสัมผัส ความร้อน ความเย็น และมี Mast cell ซึ่งเป็นเซลล์เกล็ดเลือดบรรจุด้วยสารหลายชนิด เช่น Heparin Histamine Neutrophil chemotactic factor Eosinophil chemotactic factor ของ anaphylaxis และ Kinin เป็นต้น

2.1.1.3 ชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (subcutaneous layer หรือ hypodermis) เป็นชั้นที่ติดลงไปจากชั้นหนังแท้ ซึ่งจะแบ่งโดยผนังกันบาง ๆ ประกอบด้วยเซลล์ไขมัน ไฟโบรบลาสต์ และแมคโครฟาจทำให้ไขมันมีลักษณะเป็นกลุ่ม ๆ (lobules) ชั้นนี้ทำหน้าที่เป็นฉนวนร่างกายทำให้คงรูปร่าง ปกป้องผิวหนังจากแรงกระแทกภายนอก และสะสมพลังงานให้แก่ร่างกาย



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของชั้นผิวหนัง (Mills and Cross, 2006)

2.2 เส้นทางของสารในการซึมผ่านทางผิวหนัง

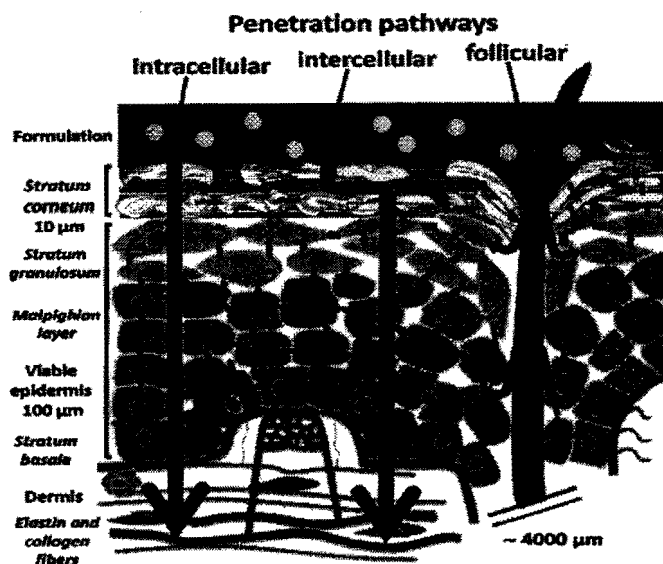
การซึมผ่านทางผิวหนัง หมายถึง การที่โมเลกุลของสารหรือยาเคลื่อนที่เข้าสู่ผิวหนัง โดยโมเลกุลเหล่านี้ต้องละลายอยู่ในกระสายยาที่เป็นของเหลวหรืออาจเป็นโมเลกุลของสารที่สามารถเกิดการไหลได้เอง การถ่ายโอนของมวลสารจะเป็นไปตามกฎการแพร่ของฟิคส์ (Fick's law, 2004) ในการนำส่งสารนั้นสารจะต้องซึมผ่านชั้นต่าง ๆ ของผิวหนังเพื่อออกฤทธิ์ที่ผิวหนังหรือถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมายหรือทั่วร่างกายทั้งนี้สารหรือยาอาจซึมผ่านผิวหนังเข้าร่างกายโดยช่องทางหนึ่งหรือหลายช่องทางร่วมกัน ซึ่งสามารถแบ่งเป็นช่องทางใหญ่ ๆ ได้ 3 ช่องทาง (Lademann et al., 2008; Otberg et al., 2007) (ภาพที่ 2.2) ดังนี้

2.2.1 การซึมผ่านของสารทางผิวหนัง (transcellular route) หมายถึง การที่ตัวยาหรือสารผ่านเข้าไปในเซลล์บนผิวหนังและถูกดูดซึมต่อไปยังอีกเซลล์หนึ่งเรื่อย ๆ ไปโดยผ่านทาง comeocyte สารที่จะผ่านเส้นทางนี้ได้ต้องมีประสิทธิภาพควรเป็นสารที่ละลายได้ดีทั้งในน้ำและน้ำมัน

2.2.2 การซึมผ่านของสารทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular route) หมายถึง การที่ตัวยาหรือสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียมโดยสารที่จะผ่านเส้นทางนี้ได้สมควรเป็นสารที่ชอบละลายในน้ำมัน

2.2.3 การซึมผ่านของสารผ่านท่อเปิดบนผิวหนัง (transappendageal route) หมายถึง การที่ตัวยาหรือสารซึมผ่านผิวหนังทางช่องหรือท่อของอวัยวะบนผิวหนัง เช่น ท่อต่อมไขมัน (sebaceous duct) ท่อต่อมเหงื่อ (sweat duct) และรูขุมขน (transfollicular) โดยทั่วไปการดูดซึมยาหรือสารผ่านช่องหรือท่อของอวัยวะบนผิวหนังเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเทียบกับช่องทางอื่นเนื่องจากมีพื้นที่ประมาณ 1 ใน 1,000 ของพื้นที่ผิวหนังทั้งหมด นอกจากนี้การดูดซึมเข้าไปในช่องทางเหล่านี้จะสวนทางกับสิ่งที่หลั่งออกมาจากต่อมต่าง ๆ และสารที่หลั่งออกมามีสมบัติแตกต่างกัน เช่น ในกรณีของต่อมเหงื่อสารที่หลั่งจะเป็นน้ำและในกรณีของต่อมไขมันสารที่หลั่งจะเป็นน้ำมัน

การซึมผ่านผิวหนังจะผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์เป็นหลักและส่วนใหญ่เป็นแบบ passive diffusion อย่างไรก็ตามช่องทาง transappendageal route ก็เป็นช่องทางหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับสารที่มีคุณสมบัติชอบละลายในน้ำ (hydrophilic) ขนาดใหญ่หรืออนุภาคขนาดเล็กประเภท bilayer vesicles โดยเฉพาะช่องทางการดูดซึมสารหรือยาผ่านรูขุมขนซึ่งมีความสำคัญในการรักษาโรค follicle-related disorder เช่น สิว หรือผดผื่น นอกจากนี้รูขุมขนยังเป็นที่เก็บกักของสารสำหรับการผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนังที่ลึกลงไป



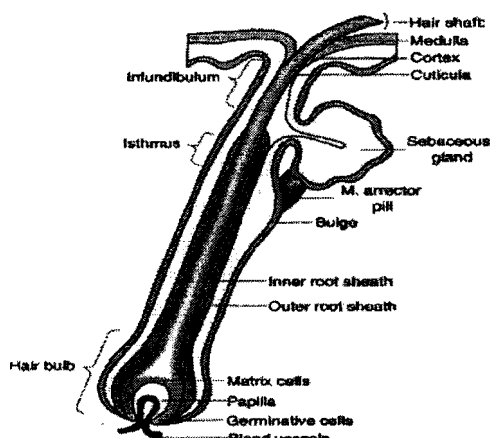
ภาพที่ 2.2 ช่องทางการดูดซึมของสารผ่านผิวหนัง (Marie-Alexandrine et al., 2012)

2.3 โครงสร้างของขนหรือผม

ขนหรือผมเจริญมาจากหนังกำพร้าชั้นหนังแท้และเจริญเกือบทั่วทั้งร่างกายยกเว้นในบางแห่งเท่านั้น เช่น ห้วนม สะดือ ขอบปาก ฝ่ามือ ฝ่าเท้าและด้านหลังของนิ้วปมสุดท้าย ขนมีความยาว ความหนา ความหนาแน่น รูปร่างและสีแตกต่างกันไปในบริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย ลักษณะของขนเหล่านี้แตกต่างกันตามอายุ เพศ และเชื้อชาติด้วย เช่น เชื้อชาติมองโกเลียมีเส้นผมกลมและตรง เชื้อชาตินิโกรมีเส้นผมแบนและหยิก เชื้อชาติคนผิวขาวมีเส้นผมรูปรีและหยักศก ขนหรือผมประกอบด้วยสารที่ไม่นำความร้อน ดังนั้นจึงช่วยป้องกันความร้อนได้ เช่น นำขนสัตว์มาทำเสื้อกันหนาว ขนบางแห่งที่หนาแน่นก็ป้องกันการเสียดสีกระทบกระเทือนได้ สัตว์บางชนิดใช้ขนเป็นอวัยวะรับความรู้สึก เช่น แมวหากินกลางคืน ก็อาศัยหนวดคลำทาง

ขน (ภาพที่ 2.3) เป็นอวัยวะเล็ก ๆ บนร่างกายและมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ประกอบด้วย (1) ตัวเส้นผม (hair shaft) คือส่วนที่โผล่พ้นออกมาจากหนังศีรษะ (2) รากขนเป็นส่วนที่มี hair bulb เป็นกระเปาะอยู่ที่ปลายสุดด้านล่างของรูขุมขน โดยโครงสร้างของ hair bulb จะมีโครงสร้างคล้ายกับหัวหอมและเชื่อมต่อกับเส้นเลือดในชั้นใต้ผิวหนังเรียกว่า dermal papilla หรือบางครั้งเรียก follicular papilla บริเวณนี้จะทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางของรูขุมขนและควบคุมความหนา ความยาวของเส้นผมรวมถึงวงจรชีวิตของเส้นผม (Paus et al., 2006) และ (3) รูขุมขน เป็นส่วนหนึ่งของหนังกำพร้าและหนังแท้ยื่นลึกเข้าไปถึงชั้นไขมันใต้ผิวหนัง ส่วนที่ยื่นลึกลงไปจะประกอบเป็นท่อ

ล้อมรอบรากขน มีท่อของต่อมไขมันซึ่งประกอบด้วย Infundibulum Sebaceous gland Bulge region และ Hair matrix cells ที่เป็นอวัยวะที่มีความสัมพันธ์กับรูขุมขนและเป็นอวัยวะเป้าหมายที่ใช้ในการนำส่งสารเข้าสู่รูขุมขน



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของขนหรือผม (Alexa et al., 2008)

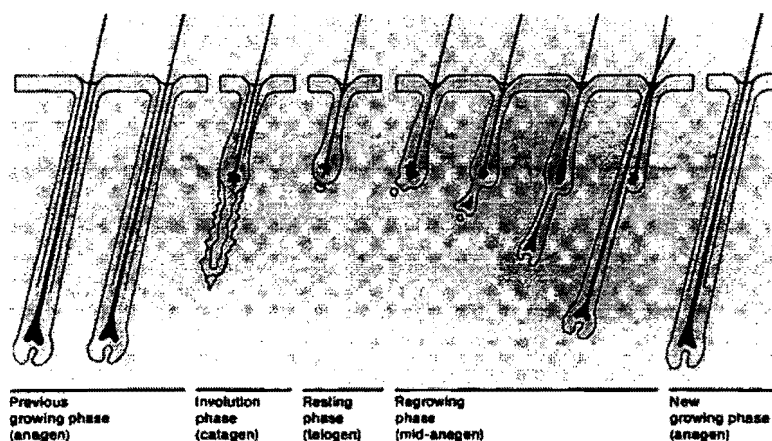
2.3.1 วงจรชีวิตของขนหรือผม

รากผมมีความสัมพันธ์เฉพาะเจาะจงกับวงจรชีวิตการเจริญเติบโตของขนหรือผม ทั้งในช่วงก่อนการเจริญเติบโตและระยะพักของเส้นผม (ภาพที่ 2.4) (Andrea et al., 1995) ซึ่งวงจรชีวิตของขนหรือผมแบ่งเป็น 3 ระยะ (Krause and Foitzik, 2006) ดังนี้

2.3.1.1 ระยะเจริญ (anagen phase) เป็นช่วงของการงอกเต็มที่ (active phase) ของเส้นผม hair matrix cell มีการแบ่งตัวและยาวออกมาเป็นตัวเส้นผม (hair shaft) ระยะเวลาของช่วงนี้เป็นตัวกำหนดความยาวของเส้นผมและเป็นระยะที่เส้นผมมีโครงสร้างสมบูรณ์แบบ ถ้าไม่มีสาเหตุที่ทำให้เส้นผมร่วงก่อนกำหนด เส้นผมบนศีรษะทั้งหมดจะมีเส้นผมที่อยู่ในระยะนี้มากถึง 80-85% และมีอายุนานถึง 3 ปี เมื่อคนเราอายุมากขึ้นระยะเจริญนี้จะสั้นลง

2.3.1.2 ระยะหลุด (catagen phase) เป็นระยะที่เส้นผมหยุดเจริญเติบโตเตรียมพร้อมที่จะหลุด โดยที่รูขุมขนจะเริ่มแยกตัวออกจากปุ่มปลายแหลมแต่ยังมีชีวิตและได้รับอาหารจากเส้นผม ในระยะหลุดนี้มีช่วงอายุสั้นคือ ประมาณ 10-14 วัน เท่านั้น

2.3.1.3 ระยะพัก (telogen phase) เป็นช่วงที่เส้นผมแก่และพร้อมที่จะร่วงได้ง่าย เส้นผมแยกตัวหลุดจากปุ่มปลายแหลมอย่างเด็ดขาด แต่ยังฝังตัวอยู่ในต่อมรูขุมขน โดยค่อย ๆ เคลื่อนขึ้นมาที่ผิวเรื่อย ๆ ขณะเดียวกันปุ่มปลายแหลมก็จะสร้างเส้นผมเส้นใหม่ขึ้นมาแทนที่ ดังนั้น เมื่อเส้นผมแก่ร่วงหลุดไปไม่นานก็จะมีเส้นผมใหม่งอกออกมาแทนที่ คนปกติเส้นผมจะร่วงประมาณวันละ 40-90 เส้นต่อวัน



ภาพที่ 2.4 วงจรชีวิตของเส้นผม (Andrea et al., 1995)

2.4 การดูดซึมของสารผ่านทางรูขุมขน

การดูดซึมของสารผ่านทางรูขุมขน คือ กลไกการนำส่งสารหรือยาผ่านทางรูขุมขน (hair follicle) โดยโมเลกุลของสารหรือยาจะซึมผ่านชั้นต่าง ๆ ของผิวหนังหรือช่องทางเปิดต่าง ๆ บนผิวหนังแล้วอาจซึมผ่านลงไปยังรูขุมขน โดยสารที่ละลายได้ดีในไขมันจะสามารถซึมผ่านลงไปได้มากกว่าสารที่ละลายได้ดีในน้ำ ในรูขุมขนจะมีไขมันจาก sebum ที่มีการขับออกผ่านทางรูขุมขนตลอดเวลา ทำให้สารที่ละลายในไขมันได้ดีสามารถซึมผ่านได้ง่าย แต่ถ้าต้องการนำส่งสารที่ละลายน้ำได้ดีต้องใช้สารช่วยลดแรงตึงผิวหรือสารช่วยเปื่อยกเพื่อให้สามารถซึมลงไปในรูขุมขนหรืออาจเก็บกักสารหรือยาในไลโปโซมเพื่อช่วยให้การซึมผ่านทางรูขุมขนได้ดีขึ้น เมื่อสารซึมผ่านลงไปในรูขุมขนแล้วสารที่เป็นชอบไขมันจะอยู่ในรูขุมขนได้นานกว่าสารที่ชอบน้ำ (อรัญญา มโนสร้อย, 2550)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านทางรูขุมขน

การเตรียมตัวรับหรือผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการนำส่งผ่านทางรูขุมขนต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการซึมผ่านทางรูขุมขน ดังนี้

2.5.1 สมบัติของสาร

2.5.1.1 ขนาดอนุภาค อนุภาคของสารหรือยาต้องมีขนาดเหมาะสม หากมีขนาดที่ใหญ่เกินไปจะค้างอยู่บนผิวหนัง หากมีขนาดเล็กเกินไปจะแทรกผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียมลงไปยังชั้นผิวหนังที่ลึกกว่า ขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมเท่านั้นที่จะอยู่ในบริเวณ hair follicles โดยพบว่าขนาด 320 nm สามารถซึมผ่านเข้าสู่ hair follicular ได้ (Lademann et al., 2007)

2.5.1.2 ประจุของอนุภาค Jung et al. (2006) ได้ศึกษาการนำส่งไลโปโซมที่มีประจุผ่านทางรูขุมขนพบว่า ไลโปโซมที่มีประจุบวก (cationic liposome) หรือมีทั้งประจุลบและประจุบวก (amphoteric liposome) สามารถซึมผ่านลงไปสู่อรูขุมขนได้ดีกว่าไลโปโซมที่มีประจุลบ (anionic liposome)

2.5.1.3 ความสามารถในการละลายในไขมันและน้ำของสาร โดย Ogiso et al. (2002) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการซึมผ่านของยาที่ละลายในน้ำและที่ละลายในไขมันพบว่า ยาที่ละลายในน้ำสามารถซึมผ่านเข้าไปในรูขุมขนโดยผ่านทาง outer root sheath เพื่อลงไปยังชั้นหนังแท้ (dermis) โดยระยะเวลาในการซึมผ่านของยาที่ละลายในน้ำจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อเทียบกับยาที่ละลายในไขมันซึ่งซึมผ่านทาง lipoidal pathway ซึ่งเป็นเส้นทางที่ขั้วไขมันออกมาจากต่อมไขมัน ดังนั้นยาที่ละลายในไขมันจะซึมผ่านทั้ง inner และ outer root sheath

2.5.2 สมบัติและสถานะของรูขุมขน

2.5.2.1 ชนิดของเส้นผมพบว่า เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นผมจะมีผลต่อการส่งผ่านของสารที่มีขนาดประมาณ 10-70 μm หากเส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาดใหญ่จะสามารถเพิ่มการนำส่งสารได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่า ชนิดเส้นผมที่เป็น terminal hair มีอัตราการซึมผ่านของสารมากกว่า vellus hair (Toll et al., 2004)

2.5.2.2 วงจรชีวิตของเส้นผมมีผลต่อการซึมผ่านของสาร Domashenko et al. (2000) พบว่า ระยะการเจริญของเส้นผมที่เหมาะสมในการนำส่ง DNA ไปสู่อรูขุมขนคือระยะเจริญ (anagen phase)

2.5.2.3 รูเปิดของรูขุมขน มี 2 ชนิด คือ รูขุมขนแบบเปิดและแบบปิด โดยรูขุมขนแบบปิดสารจะไม่สามารถซึมผ่านได้ต้องมีการเปิดรูของรูขุมขนก่อนอาจใช้ stripping technique (Lademann et al., 2001)

2.5.2.4 ไขมันที่ผลิตจากต่อมไขมันบริเวณรูขุมขน (sebum) การไหลของ sebum ออกจากบริเวณที่ผลิตไปสู่ผิวหนังอาจขัดขวางการนำส่งสารหรือยาโดยเฉพาะสารที่มีสมบัติ ไฮโดรฟิลิก (hydrophilic drugs) ดังนั้นสารที่นำมาใช้ในการนำส่งจึงควรเป็นสารที่มีสมบัติเป็น โลโปฟิลิก (lipophilic drugs) (Ladmann et al., 2001)

2.5.3 สูตรตำรับ

2.5.3.1 ตัวทำละลายที่อยู่ในตำรับ ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ สามารถละลายไขมัน ที่ผิวหนังได้จึงสามารถเข้าไปในรูขุมขนได้ดี ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง เช่น โพลีติน ไกลคอล และเอทิลแอลกอฮอล์สามารถเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารในรูขุมขนได้ เนื่องจากคุณสมบัติ ของตัวทำละลายจะทำให้ชั้นสตราตัมคอร์เนียมมีการพองตัว ทำให้ยาสามารถ เข้ารูขุมขนได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถละลายไขมันจากซีบัมได้ (Meidan et al., 2005) เช่น การนำส่ง ไมนอกซิซิล เข้ารูขุมขนจะมีมากขึ้นเมื่อใช้เอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย (Toll et al., 2004)

2.5.3.2 สารช่วยเปียกและสารลดแรงตึงผิวสารเหล่านี้ช่วยการซึมผ่านของสาร ที่สามารถละลายน้ำได้แต่ไม่สามารถซึมผ่านหรือซึมผ่านผิวหนังได้น้อยเมื่อมีสารช่วยเปียกหรือ สารลดแรงตึงผิวจะทำให้ น้ำเข้ากับไขมันได้ดีขึ้นจึงทำให้สามารถซึมผ่านผิวหนังเพิ่มมากขึ้น (Umesh and Joel, 1981)

2.5.3.3 การใช้เทคโนโลยีนาโนช่วยในการนำส่งสาร เช่น การใช้ไนโอโซมหรือ โลโปโซมซึ่งสามารถเก็บกักได้ทั้งสารที่ชอบน้ำและชอบน้ำมันสามารถลดความเป็นพิษและ ลดการระคายเคืองของสารหรือยาและสามารถเพิ่มนำส่งสารเข้าสู่ผิวหนังได้ (Mura et al., 2007)

2.6 การกำหนดเป้าหมายในการนำส่งสารเข้าสู่รูขุมขน

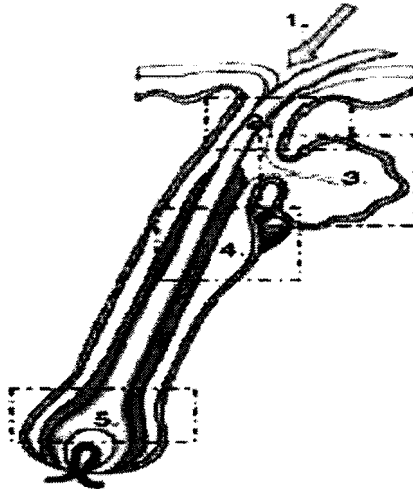
โครงสร้างรูขุมขนประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 4 ส่วนคือ (1) infundibulum (2) sebaceous gland (3) Bulge region และ (4) Hair matrix cells โดยส่วนต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นบริเวณเป้าหมายใน การนำส่งสารเพื่อหวังผลในการรักษาโรคต่าง ๆ (ภาพที่ 2.5) (Alexa et al., 2008) ดังนี้

2.6.1 ส่วนของ infundibulum (หมายเลข 2) บริเวณนี้จะช่วยในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้อง กับระบบภูมิคุ้มกันและเป็นอวัยวะเป้าหมายในการนำส่งยาผ่านทางรูขุมขน

2.6.2 ส่วนของ sebaceous gland (หมายเลข 3) เป็นอวัยวะเป้าหมายในการนำส่งยาเพื่อใช้ ในการรักษาผิวและโรคผมร่วงเป็นหย่อม (androgenetic alopecia)

2.6.3 ส่วนของ bulge region (หมายเลข 4) เป็นอวัยวะเป้าหมายในการนำส่งยาเพื่อใช้ในการ รักษาแผลเป็นหรือรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม

2.6.4 ส่วนของ hair matrix cells (หมายเลข 5) เป็นอวัยวะเป้าหมายในการนำส่งยาที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นผม



ภาพที่ 2.5 เป้าหมายในการนำส่งสารเข้าสู่รูขุมขน (Alexa et al., 2008)

2.7 ประโยชน์จากการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขน

2.7.1 นำส่งสารอย่างจำเพาะเจาะจงไปยังรูขุมขนทำให้สารไม่ต้องผ่านการดูดซึมที่ระบบทางเดินอาหารจึงไม่มีปัญหาการสลายตัวของสารจากความเป็นกรด ค้างในทางเดินอาหารไม่มีผลจากการรบกวนของการดูดซึมจากอาหารและเป็นการหลีกเลี่ยงเมตาบอลิซึมของสารเพราะไม่ต้องผ่านตับ (first-pass effect) รวมทั้งเป็นการเพิ่มระยะเวลาการออกฤทธิ์ของตัวยาที่มีครึ่งชีวิตสั้นได้ (Rao et al., 2008)

2.7.2 สามารถนำส่งยาที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือมีความเป็นพิษสูงได้ดังการศึกษาของ Han et al. (2004) พบว่า adriamycin ซึ่งเป็นยารักษามะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับ hair follicles และประยุกต์ในการถอนขนโดยเหนี่ยวนำให้ผมหรือขนร่วง เมื่อนำส่งยาผ่านช่องทางนี้จะลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นที่ผิวหนัง เช่น ผื่นแดง ผิวหนังอักเสบ และรอยแผลเป็น เป็นต้น

2.7.3 รูขุมขนสามารถใช้เป็น stem cell ได้ ในบริเวณกึ่งกลางของรูขุมขน คือ ส่วนที่เรียกว่า bulge ประกอบด้วย กลุ่มเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและทำหน้าที่เป็นศูนย์ควบคุมการเจริญของเซลล์ต่าง ๆ โดย stem cell ที่รูขุมขนสามารถเจริญแล้วกลายเป็น neuron glial cell และเซลล์อื่นอีกหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบ melanocyte stem cells ในบริเวณนี้อีกด้วย (Hoffman, 2005)

2.7.4 สามารถนำส่งยีนหรือดีเอ็นเอผ่านทางรูขุมขนคั้งการศึกษาของ Hoffman (2006) ที่ได้พัฒนาเทคนิคการเก็บกัก DNA ในไลโปโซม เพื่อนำส่ง DNA ไปยัง hair follicles ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเพื่อเป็น model สำหรับ gene therapy โดยได้ใช้ DNA liposome ในการนำส่ง *lacZ* reporter gene ไปยัง hair follicles ของหนู mice ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการรักษาที่ปลอดภัยและมีความจำเพาะสูง นอกจากนี้ Domashenko et al. (2000) ได้ศึกษาและทดลอง transfect ยีนดังกล่าวใน human follicle cells หลังจากการทำไลโปโซมที่เก็บกัก *lacZ* ในหนู (mice) และใน humans scalp xenograft mouse model พบว่า ส่วนประกอบของไลโปโซมและวงจรการเจริญของ hair follicles มีผลต่อประสิทธิภาพของการ transfection โดยการทำไลโปโซมในช่วง early anagen cycle จะมีความจำเพาะเจาะจงในการ transfection ของ human hair follicles matrix cell มากกว่าใน cycle อื่น

2.8 เทคโนโลยีนาโนสำหรับการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขน

คำว่า “เทคโนโลยีนาโน” มีการนำมาใช้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 1974 โดยนักวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัยโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้เรียกสารที่มีขนาดในช่วงนาโนเมตร นั่นคือ 10^{-9} m ซึ่งขนาดที่เป็นที่สนใจจะอยู่ในช่วงขนาด 100 nm และเล็กลงไปถึงระดับอะตอมในขนาดประมาณ 0.2 nm ในช่วงเวลาที่ผ่านมามีการใช้เทคโนโลยีนาโนในด้านต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นด้านอาหาร ด้านยา และเครื่องสำอาง เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์หรือแม้กระทั่งการทำงานด้านชีวภาพต่างๆ

สำหรับทางเภสัชกรรมมีการนำเทคโนโลยีนาโนมาพัฒนาด้วยในรูปแบบของนาโนพาร์ติเคิลและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานด้านต่าง ๆ ได้มากขึ้น ผลของการพัฒนาระบบนำส่งทำให้มีการนำยาไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและช่วยลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น เช่น ปีค.ศ. 2005 องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้รับรองการใช้นาโนพาร์ติเคิลของอัลบูมินในขนาด 130 nm ที่บรรจุยา paclitaxel ในชื่อการค้า AbraxaneTM ซึ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็งโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ หลังจากนั้นจึงได้มีการพัฒนาระบบนาโนพาร์ติเคิลเพิ่มมากขึ้นไม่ว่าจะเป็น การนำส่งทางผิวหนัง ทางตา รวมทั้งการประยุกต์เทคโนโลยีนาโนในการเตรียมคำรับของสารหรือยาเพื่อใช้ในการนำส่งผ่านทางรากผมด้วย ซึ่งเทคโนโลยีที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ คือ (อรัญญา มโนสร้อย, 2008)

2.8.1 ไลโปโซม (liposomes) เป็นอนุภาคขนาดนาโนที่เกิดจากไขมัน เช่น ฟอสโฟลิพิด จัดเรียงตัวเป็นผนังสองชั้นล้อมรอบน้ำที่อยู่แกนกลาง ผนังไลโปโซมอาจมีผนังสองชั้นเพียงชุดเดียวที่เรียกว่า ยูนิลามเมลลาร์หรือมากกว่าหนึ่งชุดที่เรียกว่า มัลติลามเมลลาร์ ไลโปโซมเป็นตัวพาสารหรือยาที่ดี คือ ไม่เป็นพิษสามารถถูกย่อยสลายในร่างกาย มีขนาดและรูปร่างเหมาะสมสามารถดัดแปลงให้มีความจำเพาะ เช่น การดัดแปลงขนาดและประจุบนผิวเพื่อการนำส่งสารหรือยาผ่านผิวหนัง จาก

การศึกษาผลของระบบนำส่งสารเรืองแสงในรูปแบบของไลโปโซมผ่านผิวหนังของหนู เปรียบเทียบกับสารเรืองแสงที่ไม่ได้เก็บกักในไลโปโซมพบว่า คาร์บที่เก็บกักในไลโปโซมที่ประกอบด้วยสารประเภท amphoteric และ cationic สามารถผ่านเข้ารูขุมขนของหนูได้ถึงประมาณ 70% ของความยาวของรูขุมขน ในขณะที่สารเรืองแสงที่ไม่ได้เก็บกักในไลโปโซมลึกลงไปเพียง 30%

2.8.2 นิโอโซม (niosomes) คือ อนุภาคนาโนเช่นเดียวกับไลโปโซมอาจมีผนังสองชั้นเพียงชุดเดียว (unilamellar vesicle) หรือหลายชุด (multilamellar vesicle) หรือเป็นแท่งทรงกระบอก (tubular size) ผนังนิโอโซมประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactants เช่น ทวินและสแปน) แทนฟอสโฟลิพิดร่วมกับสารไขมัน เช่น คอเรสเตอรอล

2.8.3 ทรานสเฟอร์โซม (transfersomes®) เป็นไลโปโซมที่มีการปรับปรุงส่วนประกอบเพื่อให้ผนังไขมันมีความยืดหยุ่นสูง โดยใช้ฟอสโฟลิพิดและสารที่ทำให้ผนังมีความยืดหยุ่นสูง เช่น สารลดแรงตึงผิวและ bile salt ทำให้สามารถหดตัวและบีบตัวผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่าตัวมันเองได้ในขนาดประมาณ 50 nm ไลโปโซมรูปแบบนี้ใช้นำส่งสารหรือยาที่มีน้ำหนักโมเลกุล 500 dalton ขึ้นไป เช่น พอลิเพปไทด์ เป็นต้น

2.8.4 เอโทโซม (ethosomes) เป็นไลโปโซมที่มีเอทิลแอลกอฮอล์ในปริมาณสูง (20-45% โดยน้ำหนัก) เป็นอนุภาคที่มีลักษณะอ่อนและยืดหยุ่นเป็นระบบนำส่งสารหรือยาผ่านผิวหนังที่สามารถแทรกผ่านผิวหนังลงไปในพื้นที่ลึกได้และอาจนำส่งถึงระบบไหลเวียนโลหิตเพื่อให้ฤทธิ์ทั่วร่างกาย

ซึ่งการนำนาโนเทคโนโลยีเหล่านี้มาใช้จะช่วยเพิ่มการนำส่งสารเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายที่อยู่อยู่ลงไปในพื้นที่ผิวหนังหรือส่วนต่างๆของร่างกายที่หวังผลในการรักษาโรคที่บริเวณนั้น ๆ ได้

2.9 ความสัมพันธ์ของรูขุมขนกับโรคผิวหนัง

โรคผิวหนังหลาย ๆ โรคจะมีความสัมพันธ์กับรูขุมขนเนื่องจากโครงสร้างของรูขุมขนเป็นโครงสร้างที่มีการจัดเรียงตัวที่ซับซ้อนและมีความจำเพาะกับการรักษาโรคผิวหนัง โดยโรคผิวหนังที่มีความสัมพันธ์กับรูขุมขนนั้นสามารถแบ่งได้เป็นการขัดขวางการทำงานของรูขุมขน (กลไกที่สามารถผันกลับได้) และการขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์ในรูขุมขน (กลไกที่ไม่สามารถผันกลับได้) (Alexa et al., 2008)

2.9.1 การขัดขวางการทำงานของชีวิตของรูขุมขน (กลไกที่สามารถผันกลับได้) แบ่งเป็น

2.9.1.1 ความสัมพันธ์ของเอนโดรเจนกับโรคผิวหนัง

เอนโดรเจนมีผลกระทบต่อหน้าที่ของผิวหนังมนุษย์ไม่ว่าจะเป็นการแบ่งตัวของต่อมไขมัน การเจริญเติบโตของเส้นผมและการรักษาแผลเป็นบนผิวหนังซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอนโดรเจนหรือตัวรับของเอนโดรเจนเป็นตัวการสำคัญในการผลิตเอนโดรเจนที่มากเกินไปจนทำให้เกิดความจำเป็น (hydroandrogenism) และมีความสัมพันธ์กับผิวหนังและโรคที่เกี่ยวข้องกับรูขุมขน เช่น สิว และ โรคผมร่วง (androgenetic alopecia) (Makrantonaki and Zouboulis, 2007) และการที่รูขุมขนกว้างก็มีสาเหตุมาจากระดับของเอนโดรเจนในบริเวณนั้น ๆ แต่รูขุมขนที่หนังศีรษะจะมีระยะของการเจริญเติบโตของเส้นผมที่สั้นกว่าบริเวณอื่นเป็นผลให้เกิดผมร่วงหรือศีรษะล้านแบบกรรมพันธุ์ เช่น ในผู้หญิงที่มีศีรษะล้านแบบกรรมพันธุ์มักจะมีสาเหตุมาจากระดับของเอนโดรเจน (Sperling, 2001) นอกจากนี้ต่อมไขมันที่กว้างและการผลิตซีบัม (sebum) ที่มากก็มีสาเหตุมาจากเอนโดรเจน โดยสิ่วที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับกับเอนโดรเจนในเพศหญิงซึ่งอาจจะมีสาเหตุจากการเพิ่มขึ้นของซีบัมอันเนื่องมาจากการผลิตของเอนโดรเจนที่ผิวหนังและความสามารถของหน่วย pilosebaceous (ส่วนของรูขุมขนกับต่อมไขมัน) จะตอบสนองต่อฮอร์โมนเอนโดรเจนในการผลิตซีบัมซึ่งเป็นกลไกที่ชักนำให้เกิดสิ่ว (Stanczyk, 2006)

2.9.1.2 ผมร่วงเป็นหย่อม (alopecia areata) และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบอัตโนมัติ (autoimmune diseases)

ผมร่วงเป็นหย่อมนี้ไม่ได้เกิดจากการเป็นแผลเป็นแต่เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบอัตโนมัติ การอักเสบจากการเกิดผมร่วงทางจุลกายวิภาคศาสตร์จะแสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของระยะหลุด (catagen phase) และระยะพัก (telogen phase) ของเส้นผมหรือรูขุมขน (Wasserman et al., 2007) อาการของโรคจะทำให้ผมร่วงเป็นวง ๆ หรือเป็นกระจุกเกิดเป็นวงขนาดเล็กพบเป็นเพียงหย่อมเดียวหรือหลายหย่อมก็ได้ โรคนี้เกิดจากความแปรปรวนของภูมิคุ้มกันในร่างกายพบว่า ผู้ป่วยโรคผมร่วงเป็นหย่อมจะมีภูมิคุ้มกันต่อต้านร่างกายตนเอง (auto-antibodies) อยู่หลายชนิดและยังพบว่าเซลล์ทางภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (T-suppressor cells) ทำให้เซลล์ภูมิคุ้มกันมีการสร้าง antibodies (B-cells) ต่อร่างกายตนเอง (auto-antibodies) และเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่ตอบสนอง (T- Effector cells) จะไปต่อต้านการสร้างเส้นผมทำให้เกิดผมร่วงตามมา (Amos and Richard, 2006) ลักษณะของหนังศีรษะที่ทำให้เกิดผมร่วงจะไม่มีการอักเสบ บางครั้งอาจมีผมร่วงปริมาณมากในเวลารวดเร็วได้ ปัจจัยที่มีผลกระตุ้นให้เกิดโรคนี้ได้แก่ ความเครียด พันธุกรรม ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อโรคใด ๆ และเป็นโรคที่

ไม่สามารถติดต่อก็ได้ แต่อาจถูกถามมากขึ้นจากวงเล็ก ๆ ขยายเป็นวงใหญ่จนทั่วศีรษะและอาจมีขนคิ้ว ขนตาหรือหนวดเคราร่วงร่วมด้วย ผมร่วงชนิดนี้พบได้ทั้งในผู้หญิงและผู้ชาย (Seema and Andrew, 2009)

2.9.2 การขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์ในรูขุมขน (กลไกที่ไม่สามารถผันกลับได้)

การแบ่งตัวของเซลล์ภายในรูขุมขนเกิดการหยุดแบ่งตัวเนื่องจากผมร่วงที่เกิดร่วมกับการเป็นแผลเป็นหรือในกรณีของเกิดแผลอักเสบและโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันแบบอัตโนมัติ เช่น โรคแพ้ภูมิตัวเอง (chronic discoid หรือ systemic lupus erythematosus; SLE) (Tebbe, 2004) และโรคที่มีการติดเชื้ออาจนำไปสู่ภาวะผมร่วงที่เป็นแผลเป็น เช่น lupus vulgaris (Gisondi et al., 2003) เป็นต้น สำหรับกลไกที่ก่อให้เกิดโรคนี้อาจเกิดจากแผลเป็นที่ส่งผลให้ระยะเจริญหยุดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วทำให้การเจริญของรูขุมขนเกิดการถูกทำลายมากขึ้น ซึ่งโดยปกติแล้วรูขุมขนจะมีการแบ่งตัวและมีการเชื่อมต่อกับ epithelial stem cells หากรูขุมขนถูกทำลายไปจะทำให้การเชื่อมโยงนี้ถูกทำลายไปด้วย ดังนั้นการขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์ภายในรูขุมขนอาจเนื่องมาจาก มีการรบกวนการเชื่อมโยงของ papilla จึงก่อให้เกิดการสูญเสียการทำงานหรือการฟื้นฟูการสร้าง เส้นผม (Hermes et al., 1998)

2.10 ภาวะผมร่วง (Androgenic alopecia)

2.10.1 กลไกการเกิดผมร่วง

การเกิดภาวะผมร่วงมักเกิดจากฮอร์โมนเพศชายซึ่งพบได้ทั้งเพศหญิงและเพศชาย โดยฮอร์โมนนี้ผลิตจากอัณฑะและต่อมหมวกไตแล้วจึงเข้าสู่กระแสเลือดไหลเวียนไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (Rao et al., 2008) และที่บริเวณหนังศีรษะฮอร์โมนเพศชายคือฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (dihydrotestosterone; DHT) โดยเอนไซม์ 5 α -reductase และไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนนี้จะไปจับกับตัวรับคือ androgen receptor ที่ hair follicles และออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเส้นผมปกติคือจะเกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผมให้มีขนาดเล็กและทำให้จำนวนของเส้นผมลดลงในที่สุดเกิดเป็นภาวะผมร่วง (Gormley, 1995)

2.10.2 สาเหตุการเกิดผมร่วง

ภาวะผมร่วงนี้เกิดจากความผิดปกติของวงจรชีวิตของเส้นผม (Paus, 2006) เช่น การรบกวนระยะเจริญของเส้นผมและทำให้ระยะดังกล่าวนี้มีระยะเวลาสั้นลงหรือทำให้ระยะพักมีระยะเวลานานขึ้นจนทำให้เส้นผมที่เกิดขึ้นมาใหม่นั้นเจริญได้ช้า อย่างไรก็ตามสาเหตุของการเกิดภาวะผมร่วงสามารถแบ่งได้ 3 สาเหตุใหญ่ดังนี้

2.10.2.1 ผมร่วงจากพันธุกรรมหรือฮอร์โมนเป็นสาเหตุที่พบมากที่สุด พบในเพศชายถึง 80% ของประชากรชาย และ 50% ของประชากรหญิง ซึ่งในเพศหญิงผมร่วงจากสาเหตุนี้มักเพิ่มขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้น (Chen et al., 2010)

2.10.2.2 ผมร่วงจากเชื้อรา แบคทีเรียที่หนังศีรษะ (Barcaui et al., 2006) เกิดจากการติดเชื้อกลุ่มของ *Malassezia sp.* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ชอบละลายในไขมันและอาศัยอยู่บนหนังศีรษะ จึงทำให้เกิดรังแคที่มีลักษณะเป็นขุย บางรายอาจมีภาวะติดเชื้ออื่น ๆ เช่น *Staphylococcus au.* ทำให้ส่วนหนังศีรษะบวมแดงและอักเสบ (Lopez and Lartchenko, 2006) โรคผมร่วงจากเชื้อราติดต่อกันได้ง่ายในเด็กและต้องรักษาโดยให้กินยาฆ่าเชื้อรา (Caputo, 1986)

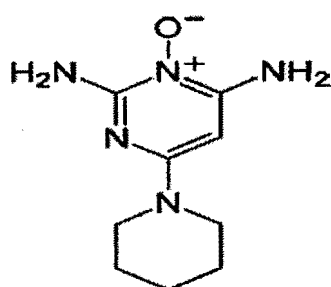
2.10.2.3 สาเหตุอื่น ๆ เช่น โรคของต่อมไทรอยด์เป็นพิษจะทำให้เกิดผมร่วงซึ่งแพทย์จะเจาะเลือดเพื่อการวินิจฉัยและรักษา เมื่อรักษาแล้วผมจะงอกกลับมาเหมือนเดิม (Kasumagic-Halilovic, 2008) ผมร่วงจากยารักษามะเร็งเป็นผลมาจากเคมีบำบัดร่วมกับการใช้ยารักษามะเร็งจะทำให้เซลล์ผมหยุดแบ่งตัว ผมจะบางและแตก ผมอาจจะร่วงได้ถึงร้อยละ 90 แต่เมื่อหยุดยาผมจะกลับขึ้นใหม่เหมือนเดิม (Sophia, 2004)

2.10.3 แนวทางการรักษา

ปัจจุบันมียาเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุมัติให้ใช้ในการรักษาอาการผมร่วง คือ ฟินาสเทอไรด์ (finasteride) และ ไมนออกซิซิล (minoxidil) (Price, 1999) ซึ่งยาทั้ง 2 นี้จะมีข้อจำกัดในการรักษาโดยเฉพาะในเรื่องของผลข้างเคียงและอัตราการรักษาที่ให้ผลค่อนข้างต่ำ (Hye, 2011)

2.10.3.1 ไมนออกซิซิล (minoxidil)

ไมนออกซิซิลเป็นสารอนุพันธ์ในกลุ่ม Pyrimidine (2, 4-diamino-6-piperidinopyrimidine-3-oxide) มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 3-hydroxy-2-imino-6-(1-piperidyl) pyrimidin-4-amine (ภาพที่ 2.6) ใช้เป็นยาทาภายนอกเพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรคผมร่วง (androgenetic alopecia; AGA) ขนาดที่ใช้ 2% และ 5% ของสารละลายไมนออกซิซิล (Price, 1999) กลไกการออกฤทธิ์ในการรักษาแม้จะไม่ทราบกลไกที่แน่นอนแต่มีรายงานการศึกษาของ Han et al. (2004) พบว่าไมนออกซิซิลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผมทำให้ระยะของ anagen phase มีการแบ่งตัวนานขึ้นและต่อต้านการตายของเซลล์ dermal papilla cells (DPCs) ของ hair follicles และพบว่าไมนออกซิซิลมีความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการออกฤทธิ์ของยาในการรักษาการเจริญของเส้นผม

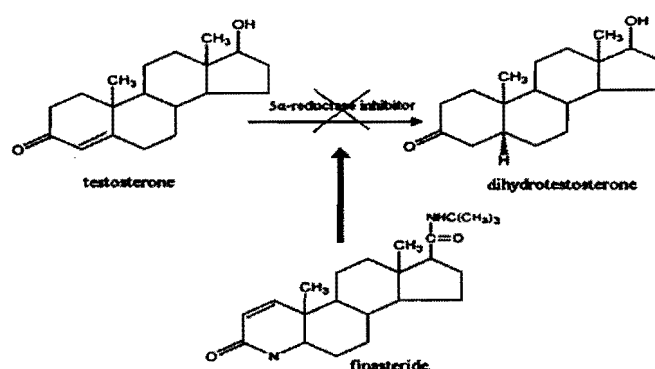


ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของไมนออกซิซิล (Balakrishnan et al., 2009)

2.10.3.2 ฟินาสเทอไรด์ (Finasteride)

ฟินาสเทอไรด์ เป็นองค์ประกอบของสารในกลุ่ม 4-aza-3-oxosteroid ละลายน้ำได้น้อย ซึ่งละลายได้ดีในคลอโรฟอร์มและแอลกอฮอล์ ใช้ในการรักษา benign prostatic hyperplasia (BPH) และ male pattern baldness (MPB) เช่น androgenic alopecia และ alopecia areata ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ 5 α -reductase สำหรับกลไกการรักษาจะทำหน้าที่ยับยั้งการเปลี่ยนฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนไปเป็นฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (Gormley, 1995) โดยเอนไซม์ 5 α -Reductase ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ฮอร์โมนชนิดนี้จะส่งผลให้มีระยะการเจริญของเส้นผมสั้นทำให้เส้นผมที่สร้างใหม่มีลักษณะบาง สั้นและมีสีจางลงซึ่งนำไปสู่ภาวะผมร่วง (Hye, 2011) (ภาพที่ 2.7) นอกจากนี้ฟินาสเทอไรด์ยังมี serum half life 8 ชั่วโมงในชายสูงวัยและ 6 ชั่วโมงในชายวัยกลางคน (Ohtawa, Morikawa and Shimazaki, 1991) และมีผลข้างเคียงทำให้ความต้องการทางเพศและการแข็งตัวของอวัยวะเพศลดน้อยลง ซึ่งพบน้อยกว่า 2% นอกจากนี้ยังพบผลข้างเคียงอื่น ๆ เช่น ปริมาณน้ำอสุจิลดน้อยลง เจ็บบริเวณเต้านมหรือเต้านมอาจโตขึ้นได้ อาการข้างเคียงต่าง ๆ เหล่านี้จะกลับคืนเป็นปกติเมื่อหยุดใช้ยาหรืออาจหายไปเองแม้ว่ายังกินยาอยู่ (Nicole et al., 2008)

ปัจจุบันฟินาสเทอไรด์มีจำหน่ายเฉพาะในรูปแบบยารับประทาน (Rao et al., 2008) มีชื่อทางการค้าว่า “Propecia” ขนาดที่แนะนำให้ใช้คือ 1 mg/day ใช้ได้เฉพาะผู้ชายซึ่งมีภาวะผมร่วงจากกรรมพันธุ์เท่านั้น ยานี้ห้ามใช้ในผู้หญิงเนื่องจากกลไกการเกิดภาวะผมร่วงในเพศหญิงต่างจากเพศชายคือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเป็นฮอร์โมนชนิดอื่นไม่ใช่ฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนจึงทำให้การรักษาด้วยยาฟินาสเทอไรด์ใช้ไม่ได้ผลและอาจเกิดความผิดปกติของอวัยวะเพศของบุตรในครรภ์ได้ หากรับประทานยาในขณะตั้งครรภ์ (Vierhapper, 2003)



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างและการกลไกในการออกฤทธิ์ของฟินาสเทอไรด์ (Gormley, 1995)

แม้ในปัจจุบันยังไม่มีฟินาสเทอไรด์จำหน่ายในรูปแบบของยาทาภายนอก เนื่องจากคุณสมบัติละลายในน้ำได้ยากของยา แต่พบว่าถ้าให้ฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบของยาทาและให้ในความเข้มข้นที่เพียงพอก็จะมีประโยชน์มากกว่าการให้ในรูปแบบของยารับประทาน เพราะสามารถลดผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นได้ (Daneshaouz et al., 2005) ดังการศึกษาของ Amnon et al. (2000) ได้ทำการศึกษาดำรับ antidrogenic ที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของขนหนุบนหนุที่มีลักษณะขนล้าน โดยเตรียมดำรับในรูปแบบของเจล ยาที่ใช้ในการศึกษาคือฟินาสเทอไรด์และฟลูตาไมด์ ซึ่งศึกษาความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางและ โครงสร้างของระยะของการเจริญเติบโตของเส้นขนรวมทั้งศึกษาการแพร่ของดำรับ เจลพบว่า ฟินาสเทอไรด์และฟลูตาไมด์มีผลทำให้เส้นขนของหนุขาวขึ้นในทุกค่าของการวัดในการทดลองมากกว่าเมื่อเทียบกับ placebo จากการศึกษาี้สามารถแนะนำได้ว่าการใช้ฟินาสเทอไรด์และฟลูตาไมด์ในรูปแบบยาทาภายนอกอาจมีประสิทธิภาพในการรักษา male-pattern baldness ได้ และการศึกษาของ Thomas et al. (2000) ได้ทำการศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้ฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบของยาทาภายนอกที่มีผลต่อฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน การศึกษานี้เตรียมดำรับในรูปแบบของสารละลาย (solution) ที่มีความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 % แล้วนำไปทดสอบกับอาสาสมัครผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนจำนวน 9 คน โดยใช้ 1 mL ของสารละลายทาลงไปบนบริเวณระหว่าง umbilicus และ pubic hair ที่โกนขนเป็นบริเวณกว้างให้มีพื้นที่ขนาด 10 × 10 cm จากนั้นถ่ายภาพและเปรียบเทียบภาพที่ได้พร้อมทั้งวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นขนด้วยกล้องจุลทรรศน์และหาระดับเซรัมของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนเทียบกับ baseline ที่ระยะเวลา 3 เดือน และ 6 เดือน จากการศึกษาพบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นขนทั้งหมดนั้น ไม่มีความแตกต่างกันและระดับเซรัมของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่ระยะเวลา 3 เดือนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ baseline ส่วนในระยะเวลา 6 เดือนนั้นไม่มีความแตกต่างกันของระดับฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนเมื่อเวลา

ผ่านไป การศึกษานี้สามารถบอกได้ว่าระดับเซรัมของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเปลี่ยนแปลงไป คิดเป็น 23 % และระดับเซรัมของฮอร์โมนไคโฮโครเทสโทสเตอโรนมีการเปลี่ยนแปลงคิดเป็น 16% ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของระดับเซรัมของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและฮอร์โมนไคโฮโครเทสโทสเตอโรนในรูปแบบของยารับประทาน คิดเป็น 14%–50% และ 11%–76%

2.11 โพรนิโอโซมและนิโอโซม

การพัฒนาระบบนำส่งในรูปแบบโพรนิโอโซมนี้สามารถเตรียมได้ง่ายและมีความคงตัวมากกว่าในรูปแบบอื่น เช่น ไลโปโซมและนิโอโซม เพราะองค์ประกอบในตำรับมีศักภาพของน้ำน้อย นอกจากนี้ตำรับโพรนิโอโซมยังสามารถซึมผ่านผิวและสามารถเกิดเกิดการเรียงตัวให้อยู่ในรูปแบบนิโอโซมได้ง่ายเมื่อรวมตัวกับน้ำที่ผิว ด้วยเหตุผลดังกล่าวการพัฒนาระบบนำส่งในรูปแบบโพรนิโอโซมจึงมีความน่าสนใจในการพัฒนาเป็นระบบนำส่งผ่านทางผิวหนังและรูขุมขน

2.11.1 โพรนิโอโซม (proniosomes)

โพรนิโอโซมเป็นตำรับที่สารลดแรงตึงผิวที่หุ้มตัวพามีลักษณะเป็นผงแห้งซึ่งสามารถเตรียมกลับให้อยู่ในรูปแบบของนิโอโซมได้โดยการเติมน้ำกลับเข้าไปในตำรับของโพรนิโอโซม โดยองค์ประกอบของตำรับโพรนิโอโซมจะประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุคอเรสเตอรอลและฟอสโฟลิปิด (Ammer et al., 2011) ตำรับโพรนิโอโซมนี้จะมีมีความคงตัวทางกายภาพกล่าวคือไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันหรือการรวมตัวกันของอนุภาคและไม่เกิดการเสื่อมสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Almira et al., 2001)

2.11.1.1 การเตรียมตำรับโพรนิโอโซม

การเตรียมตำรับนิโอโซมสามารถเตรียมได้ 3 เทคนิค คือ

1) Spraying

การเตรียมโพรนิโอโซมด้วยเทคนิคนี้สามารถเตรียมได้โดยการสเปรย์สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุในตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปบนผงของ sorbital จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากตำรับ ซึ่งการเตรียมด้วยเทคนิคนี้เหมาะสมกับสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบละลายในน้ำหรือสารที่มีการเสื่อมสลายได้ง่ายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Gupta et al., 2007)

2) Slurry

การเตรียมด้วยเทคนิคนี้สามารถเตรียมได้โดยการเติมผงของ maltodextrin และสารละลายของสารลดแรงตึงผิวลงไปใน round bottom flask ช้าๆ แล้วระเหยสารละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จนกระทั่งได้ผงแห้ง จากนั้นนำโพรนิโอโซมที่เตรียมได้เก็บในภาชนะที่แห้งก่อนนำไปศึกษาต่อ (Solanki et al., 2007)

3) Coacervation phase separation

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเตรียมโปรตีนไอโซมเจล สามารถเตรียมได้โดยการนำส่วนประกอบทั้งหมดในคำรับและแอลกอฮอล์มาผสมกันในขวดแก้ว (glass vial) จากนั้นอุ่นบน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 60°C ถึง 70°C เป็นระยะเวลา 5 นาที จนทำให้ส่วนประกอบทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นเติมน้ำเพื่อให้เกิดเป็นสารละลายใสและทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจะเกิดเป็นโปรตีนไอโซมเจล (Gupta et al., 2007)

2.11.1.2 การเปลี่ยนโปรตีนไอโซมให้เป็นนิโอโซม

การเตรียมนิโอโซมสามารถเตรียมจากนิโอโซมได้เพราะโปรตีนไอโซมเป็นสถานะที่อยู่ระหว่างการจัดเรียงตัวเป็นนิโอโซม ดังนั้นการจะทำให้โปรตีนไอโซมเปลี่ยนเป็นนิโอโซมสามารถทำได้โดยการเติมวัตถุดิบของน้ำกลับเข้าไปในคำรับของโปรตีนไอโซม โดยอุณหภูมิของน้ำต้องสูงกว่าค่ากลางของอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนสถานะของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ (mean transition phase temperature) (Zidan and Mokhter, 2011)

2.11.2 การแยกตัวยาที่ไม่ถูกกักเก็บออกจากคำรับ

แยกตัวยาที่ไม่ถูกกักเก็บออกจากคำรับเพื่อเพิ่มความสำเร็จของคำรับ ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการแยกนั้นมี 3 เทคนิค ดังนี้

2.11.2.1 การแพร่ผ่านถุงเยื่อเบรน (dialysis)

นำนิโอโซมใส่ในถุงเยื่อเบรนเพื่อแยกส่วนที่ไม่ถูกกักเก็บออก จากนั้นเติมสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทิ้งไว้ นิโอโซมจะเกิดการแพร่ออกมาจากถุงเยื่อเบรนออกมาสู่สารละลายตัวกลาง แล้วเก็บตัวอย่างจากสารละลายตัวกลางนำไปปั่นเหวี่ยงและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยา (Ajay et al., 2008) ข้อดีคือเตรียมง่าย สามารถแยกตัวอย่างในปริมาณมากได้ ราคาไม่แพง ข้อเสียคือ ใช้ระยะเวลานานและต้องเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถละลายตัวอย่างได้อย่างเหมาะสม

2.11.2.2 การกรองผ่านเยื่อเบรน (gel filtration)

แยกตัวยาที่ไม่ถูกกักเก็บออกจากคำรับด้วยการกรองผ่านเยื่อเบรน โดยนำนิโอโซมมากรองผ่านคอลัมน์ที่เป็น Sephadex-G-50 และล้างด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสม (Gayatri et al., 2000) ข้อดีและข้อเสียเหมือนกับการแพร่ผ่านถุงเยื่อเบรน

2.11.2.3 การปั่นเหวี่ยง (centrifugation)

นำนิโอโซมมาปั่นเหวี่ยงจะมีส่วนใส (supernatant) ที่แยกออกมา น้ำตะกอนของนิโอโซม (pellet) มาล้างด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อทำให้เกิดการกลับเป็น

นีโอโซมอีกครั้ง จากนั้นนำนีโอโซมที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมต่อไป (Solanki et al., 2007) ข้อดีคือ ใช้ระยะเวลาสั้น สามารถแยกตัวได้ทั้งจากขนาดและความหนาแน่นของอนุภาค

2.11.3 การประเมินด้านคุณลักษณะ

2.11.3.1 การวัดขนาด สามารถวัดได้ 3 เทคนิค ดังนี้

1) กล้องจุลทรรศน์ (Optical microscopy)

เทคนิคนี้เป็นการวัดขนาดของอนุภาคบนแผ่นสไลด์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ร่วมกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งการวัดขนาดนั้นจะเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดอนุภาคทั้งหมด 100 อนุภาค นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังสามารถศึกษารูปร่างของอนุภาคที่เกิดขึ้นได้ (Solanki et al., 2007)

2) โฟตอนคอร์รีเลชันสเปกโตรสโกปี (Photon correlation spectroscopy)

เทคนิคนี้เป็นการวัดขนาดของอนุภาคและค่าการกระจายของอนุภาคโดยใช้หลักการการกระเจิงของแสง เมื่อแสงมีการวิ่งชนอนุภาคซึ่งถูกแขวนลอยอยู่ในสารละลายที่เหมาะสม จากนั้นเครื่องจะคำนวณเป็นค่าความเข้มของแสงที่ถูกปล่อยออกมาแล้วจึงคำนวณกลับเป็นขนาดของอนุภาคโดยใช้สมการ (2.1) ของ Stokes-Einstein

$$r = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2.1)$$

โดย r คือ เส้นผ่าศูนย์กลาง

k คือ ค่าคงที่ของ Boltzmann

T คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (Absolute Temperature)

η คือ ความหนืดของสารละลาย

D คือ สัมประสิทธิ์ของการแพร่ (Diffusion coefficient)

เทคนิคนี้สามารถวัดขนาดได้โดยการเจือสารตัวอย่างด้วยน้ำ จากนั้นให้นำไปวัดด้วยเครื่องโฟตอนคอร์รีเลชันสเปกโตรมิเตอร์ (PCS; Zetasizer 4, Malvern Instruments, UK-Malvern; He-Ne-laser of 633 nm) ที่อุณหภูมิ 25 °C ที่มุม 90 องศา (Hatziantoniou et al., 2007)

3) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy)

เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญเทคนิคหนึ่งที่ใช้ดูลักษณะของอนุภาค พื้นผิวของอนุภาค (ความเรียบ ความขรุขระของพื้นผิวและการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค)

และการกระจายขนาดของอนุภาค เทคนิคนี้เป็นการใช้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ลำแสงอิเล็กตรอนฉายหรือส่องกราดไปบนผิวของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบให้ได้ข้อมูลของลักษณะพื้นผิวปรากฏเป็นภาพขยายที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า วิธีนี้ต้องทำให้สารตัวอย่างแห้งแล้วเคลือบด้วยชั้นที่มีการนำไฟฟ้า เช่น ทอง ก่อนทำการตรวจสอบ ในการตรวจสอบนั้นสารตัวอย่างจะถูกส่งผ่านด้วยลำแสงอิเล็กตรอนและทำการตรวจหาอิเล็กตรอนทุติยภูมิที่จ่ายแสงออกมาจากตัวอย่าง เทคนิคนี้จะได้ภาพสามมิติของตัวอย่าง (Bunjes, 2004) สามารถทำได้โดยการนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบไปหุ้มด้วยทองและระเหิดตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง vacuum evaporator จากนั้นจึงนำสารตัวอย่างไปวางลงบน double side tape และยึดด้วย aluminum stub จากนั้นนำ aluminum stub ไปวางใน vacuum chamber ของเครื่องและเริ่มทำการดูตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (voltage 30kV) (Solanki et al., 2007)

2.11.3.2 ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิว (zeta potential)

การวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวช่วยในการทำนายความคงตัวของทางกายภาพของระบบคอลลอยด์หรือไมโครโซมได้ โดยประจุที่ผิวของอนุภาคจะเกิดขึ้นจากกลุ่มที่แตกตัวที่ผิวหรือการดูดซับไอออนที่ผิวของอนุภาค อย่างไรก็ตามการวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวไม่ใช่ของอนุภาคแต่เป็นการวัดแรงเฉือนทางไฮโดรไดนามิกรอบ ๆ อนุภาคหรือแนวแรงเฉือน (Shear plane) ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวขึ้นกับทั้งโครงสร้างทางเคมีของพื้นผิวอนุภาคและไอออนที่อยู่ในตัวกลาง นอกจากนี้ยังขึ้นกับระยะห่างอีกด้วย เช่น ยิ่งเข้าใกล้ผิวอนุภาคประจุที่ผิวจะมีค่าสูงขึ้น (Mehnert and Mäder, 2001) วิธีการวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวทำได้โดยการเจือจางสารตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นและนำไปใส่ในสนามไฟฟ้าอ่อน ๆ แล้ววัดการเคลื่อนที่ด้วยวิธีเลเซอร์คอปเปอเรอร์อิเล็กโตรโฟเรติกโมบิลิตี (laser doppler electrophoretic mobility) หรือเลเซอร์คอปเปอเรอร์อะนิโมเมทรี (laser Doppler anemometry) (Bunjes, 2004) หรือเครื่องโฟตอนคอร์รีเลชันสเปกโตรมิเตอร์ (photon correlation spectrometer: zetasizer) (Kuntsche, 2010)

2.11.3.3 วิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บยาและปริมาณยาที่บรรจุ

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บด้วยยาสามารถทำได้โดยแยกยาที่ไม่ถูกกักเก็บออกจากตัวอย่างด้วยเทคนิคการแพร่ผ่านถุงเมมเบรน (dialysis) การกรองผ่านเมมเบรน (gel filtration) และการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ก่อน จากนั้นจึงนำตัวอย่างมาละลายด้วย 50% n-propanol หรือ 0.1% Triton X-100 หรือ แอลกอฮอล์ (เมทานอลหรือเอทานอล) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยยา (Sudhamani et al., 2010) และคำนวณหาร้อยละการกักเก็บยา (%entrapment efficiency) และร้อยละการบรรจุยา (%drug loading) (Xiaoyun et al., 2010) ดังสมการ (2.2) และ (2.3)

$$\text{ร้อยละการกักเก็บยา (\%Entrapment efficiency)} = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \quad (2.2)$$

$$\text{ร้อยละการบรรจุยา (\%Drug loading)} = \frac{C_t - C_s}{C_t - C_s + C_l} \times 100 \quad (2.3)$$

โดย C_t คือ ปริมาณตัวยาทั้งหมด
 C_s คือ ปริมาณตัวยาที่อยู่ในไม่ถูกกักเก็บ (Supernatant)
 C_l คือ ปริมาณไขมันทั้งหมด

2.11.4 การประเมินด้านความคงตัว

การประเมินด้านความคงตัวของสารตัวอย่างสามารถประเมินทั้งด้านความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี ดังนี้

2.11.4.1 ความคงตัวทางกายภาพ เป็นการประเมินขนาดและค่าการกระจายของอนุภาค ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวและค่าความเป็นกรดด่างของสารตัวอย่าง สามารถทดสอบได้ 2 แบบ คือ

1) ทดสอบในสภาวะเร่ง (Accelerated stability test) แบ่งย่อยได้

2 เทคนิค คือ

Heating - cooling คือ การเก็บอิมัลชันในตู้เย็นที่ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าตู้อบที่ 45 °C อีก 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 6-8 รอบแล้วนำมาประเมินผล

Freeze-thaw คือ การเก็บอิมัลชันในช่องแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าตู้อบที่ 25 °C อีก 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 6-8 รอบแล้วนำมาประเมินผล

2) ทดสอบในระยะยาว (Long-term stability test)

เป็นการเก็บสารตัวอย่างไว้ในที่อุณหภูมิต่าง ๆ และทิ้งไว้เป็นระยะเวลาเพื่อศึกษาความคงตัว เช่น เก็บสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 °C และ 45 °C เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อศึกษาความคงตัวของขนาดและประสิทธิภาพการกักเก็บตัวยา (Phikunthong et al., 2011)

2.11.4.2 ความคงตัวทางเคมีเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ยังคงอยู่ในตำรับด้วยเทคนิคที่เหมาะสมกับตัวยานั้น ๆ เช่น ไคเตรท โครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง เป็นต้น

2.11.5 ศึกษาการปลดปล่อยตัวยาออกจากตัวรับ

การปลดปล่อยตัวยาออกจากตัวรับสามารถทดสอบได้ 2 วิธี ดังนี้

2.11.5.1 Dialysis tubing

นำนิโอโซมใส่ในถุงเมมเบรน จากนั้นนำถุงเมมเบรนจุ่มในสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเวลาผ่านไปนิโอโซมจะแพร่จากถุงเมมเบรนออกสู่สารละลายตัวกลาง เก็บตัวอย่างจากสารละลายตัวกลางที่เวลาต่าง ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยาโดยสภาวะต้องอยู่ภายใต้ sink condition (Muller et al., 2002)

2.11.5.2 Franz diffusion cell

เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) โดยการนำตัวรับนิโอโซมใส่ใน donor chamber ของเครื่อง Franz diffusion cell พอดีกับ cellophane membrane และนำสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมใส่ใน receptor chamber ของเครื่อง จากนั้นก็เก็บตัวอย่างจากสารละลายตัวกลางที่เวลาต่าง ๆ กัน และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยาโดยสภาวะต้องอยู่ภายใต้ sink condition (Puglia et al., 2004)

2.11.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวรับ

สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวรับโดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวร่วม (Response surface methodology) กับการออกแบบส่วนผสมกลาง (Central composite rotatable design) ซึ่งการออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวร่วมเป็นการนำสมการทางคณิตศาสตร์และการคำนวณทางสถิติมาใช้บนพื้นฐานของสมการพหุนาม (polynomial equation) เพื่อนำไปสู่ข้อมูลที่ใช้ในการทดลองมาอธิบายอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อตัวแปรตามที่สนใจและการออกแบบส่วนผสมกลางเป็นแผนที่ออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและสามารถบ่งบอกถึงการตอบสนองของตัวแปรที่เหมาะสมได้ซึ่งจะครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการศึกษา (Xiaoyun et al., 2010) ซึ่งมีข้อดีที่เหนือกว่าการออกแบบสูตรตัวรับโดยใช้วิธีดั้งเดิมคือสามารถศึกษาอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรได้ในเวลาเดียวกันจึงช่วยลดความผิดพลาดจากการศึกษาที่ละปัจจัยของวิธีดั้งเดิมได้และทำให้ได้สูตรตัวรับที่มีความเหมาะสม

2.12 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์สามารถวิเคราะห์ได้ 2 เทคนิค ดังนี้

2.12.1 สเปกโทรสโคปี (Spectroscopy)

สเปกโทรสโคปี (spectroscopy) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการวัดการดูดกลืน (absorption) หรือการคาย (emission) รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic radiation) ของสาร โดยเฉพาะสารส่วนใหญ่สามารถดูดกลืนคลื่นในช่วงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet UV) และช่วงแสงที่มองเห็นได้ (visible) จากสมบัติดังกล่าวนี้จึงนำมาใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่เรียกว่า ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโคปี (UV-Visible spectroscopy) สามารถใช้ประโยชน์ทั้งในด้านพิสูจน์โครงสร้างและหาปริมาณของสาร ซึ่งอาศัยกฎของเบียร์และแลมเบิร์ตที่กล่าวไว้ว่าเมื่อเราวัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย ปริมาณความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนจะขึ้นอยู่กับทั้งความเข้มข้นของสารละลายและความหนาของสารละลายที่ลำแสงต้องผ่าน แสดงความสัมพันธ์นี้ได้ดังสมการ (2.4) (2.5) และ (2.6)

$$A = \frac{\log I_0}{I} = \epsilon bc$$
 (2.4)

$$\% T = \frac{I_0}{I} \times 100$$
 (2.5)

$$\%A = 100 - \%T$$
 (2.6)

- โดย
- A คือ แสงของสารละลายตัวอย่างที่ถูกดูดกลืน
 - I_0 คือ ความเข้มของแสงเริ่มต้น
 - I คือ ความเข้มของแสงที่ผ่านออกมาจากสารละลายตัวอย่าง
 - ϵ คือ ค่า molar absorptivity หรือ molar extinction coefficient
 - b คือ ความหนาของสารละลาย (cm)
 - c คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ
 - T คือ แสงของสารละลายตัวอย่างที่ส่องผ่านออกมา

เทคนิคนี้สามารถทำได้โดยกรณีที่สารตัวอย่างมีสารที่จะวิเคราะห์เพียงสารเดียว อาจใช้วิธีทำกราฟมาตรฐานโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันนำไปวัดค่า absorbance (A) ที่ λ_{max} โดยเทียบกับ blank นำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นจะได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง เมื่อหาค่า absorbance ของสารตัวอย่างได้ก็จะ

สามารถหาปริมาณของสารที่จะวิเคราะห์ได้โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานและลักษณะของสเปกตรัม

2.12.2 โครมาโตกราฟี (chromatography)

โครมาโตกราฟีเป็นการแยกสารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ วัฏภาคคงที่(stationary phase) กับวัฏภาคเคลื่อนที่(mobile phase) จะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถจะแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับวัฏภาคเคลื่อนที่หรือวัฏภาคคงที่ สารประกอบที่สามารถเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่หรือเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคคงที่จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพิกซึ่งเรียกว่าโครมาโตแกรม

โครมาโตกราฟีแบ่งได้ 4 ชนิดตามอุปกรณ์ คือ (1) โครมาโตกราฟีของเหลวแบบคอลัมน์ (column chromatography) เช่น โครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (high pressure liquid chromatography; HPLC) (2) โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography; TLC) (3) โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) (4) โครมาโตกราฟีแบบแก๊ส (gas chromatography; GC)

เทคนิคนี้สามารถทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วนำไปวิเคราะห์หา peak area ที่ $\lambda_{\max}$ ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง นำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่า peak area กับความเข้มข้นจะได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง เมื่อหาค่า peak area ของสารตัวอย่างได้ก็จะหาปริมาณของสารที่จะวิเคราะห์ได้โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานและลักษณะของโครมาโตแกรม

2.13 การตรวจสอบการซึมผ่านทางรูขุมขน

การตรวจสอบการซึมผ่านของสารทางรูขุมขนในผิวหนังมนุษย์เป็นสิ่งที่มีความสำคัญมากสำหรับการประเมินประสิทธิภาพของระบบการนำส่งยาเพราะเป็นการแสดงถึงการนำส่งของยาเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายที่ต้องการและสามารถออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมายนั้น ๆ ได้ สำหรับการตรวจสอบการซึมผ่านของสารทางรูขุมขนแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนและอวัยวะที่ใช้ในการทดสอบ (Lademann et al., 2010)

2.13.1 เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนมี 4 เทคนิค ดังนี้

2.13.1.1 In vivo laser scanning microscopy

เทคนิคนี้เป็นการวัดแถบรังสีฟลูออเรสเซนส์ที่อยู่ภายในตัวรับหลังจากที่มีการทาบนผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมและมีการซึมผ่านเข้าสู่รูขุมขนเป็นเทคนิคที่ใช้ในการประเมินคุณภาพในการนำส่งสารหรือยาเข้าสู่รูขุมขน (Jung et al., 2006) เครื่องมือที่นิยมใช้ เช่น กล้องประเภท confocal laser scanning microscopy ซึ่งเป็นกล้องที่ใช้ลำแสงส่องวัตถุที่ต้องการศึกษาและอาศัยการสะท้อนกลับของลำแสงโดยตัวรับสัญญาณจะรับภาพที่เกิดจากการสะท้อนภาพที่เกิดสามารถเห็นภาพในแนวลึกได้

2.13.1.2 Differential stripping

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของสารหรือยาที่ผ่านทางรูขุมขน เทคนิคนี้เป็นการใช้ 2 เทคนิคร่วมกันคือเทคนิค tape stripping กับ cyanoacrylate surface biopsies เทคนิคนี้เป็นการลอกเอาชั้นสตราตัมคอร์เนียมออกหลังจากที่มีการทาตัวรับลงไป โดยลอกออกทีละชั้นด้วย tape strip และวิเคราะห์ปริมาณของตัวรับโดยการสกัดสารที่ได้ในแต่ละชั้นของ tape strip มาวิเคราะห์ หลังจากที่ยกชั้นสตราตัมคอร์เนียมออกด้วยกระบวนการ tape stripping แล้วจึงทำ cyanoacrylate surface biopsies ที่บริเวณเดิมเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารหรือยาในบริเวณที่เลือกไว้ (Lademann et al., 2010)

2.13.1.3 Biopsies and in vitro laser scanning microscopy

เทคนิคนี้เป็นการตรวจสอบการซึมผ่านทางรูขุมขน โดยการตัดชิ้นเนื้อของสัตว์ทดลองในบริเวณที่ทำการศึกษาซึ่งมีการทาตัวรับที่มีสารเรืองแสงลงไป จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคเลเซอร์สแกนนิ่งไมโครสโคปี เทคนิคนี้จะมีความเหมาะสมในการตรวจสอบความลึกของการซึมผ่านของตัวรับเข้าสู่รูขุมขน (Lademann et al., 2008)

2.13.1.4 Follicular closing technique

เทคนิคนี้เป็นการศึกษาการซึมผ่านทางรูขุมขน โดยใช้น้ำยาเคลือบเล็บบีรูขุมขนบนผิวหนังหมู โดยสารจะสามารถซึมผ่านทางผิวหนังได้เพียงเส้นทางเดียว จากนั้นศึกษาการซึมผ่านด้วยเทคนิค Franz diffusion cell (Aranya et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Ulrike et al. (2010) ที่ศึกษาการซึมผ่านทางรูขุมขนและการซึมผ่านทางผิวหนังของโพนโมนอกซิดิลที่ใช้ผิวหนังของอาสาสมัครในการทดสอบและวิเคราะห์ปริมาณยาในเลือดโดยใช้เทคนิคนี้เช่นกัน

2.13.2 อวัยวะที่ใช้ในการทดสอบ แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

2.13.2.1 อาสาสมัคร (volunteer)

การใช้อาสาสมัครในการทดสอบนั้นสามารถปฏิบัติได้จริงในการตรวจสอบการซึมผ่าน โดยการตรวจสอบทางเภสัชจลนศาสตร์ด้านผิวหนังของสารเมื่อมีการทาสารลงบนผิวของอาสาสมัคร ซึ่งอาสาสมัครที่ใช้ในการศึกษานั้นต้องเป็นอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี การใช้อาสาสมัครนั้นจึงไม่สามารถใช้ได้กับการศึกษาในทุกกรณีโดยเฉพาะสารที่นำมาศึกษานั้นเป็นสารอันตราย (Lademann et al., 2008)

2.13.2.2 ผิวหนังมนุษย์ (excised human skin)

การนำหนังของมนุษย์มาเป็นแบบจำลองในการศึกษาการซึมผ่านนั้น แม้จะนิยมแต่ก็มีข้อเสียในเรื่องของระยะเวลาที่นำผิวหนังออกมาเพราะจะส่งผลให้ผิวหนังเกิดการหดตัว ซึ่งการหดตัวนี้เป็นผลมาจากการหดตัวของเส้นใยอีลาสติกในผิวหนัง นอกจากนี้ยังมีผลในเรื่องของการยึดของผิวหนังที่นำมาใช้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากระยะเริ่มแรกที่นำมาใช้ เนื่องจากเส้นใยภายในรูขุมขนเกิดการยึดตัวและในขณะที่เส้นใยรอบ ๆ รูขุมขนหยุดการเชื่อมโยงกัน แม้การยึดของผิวจะไม่มีผลต่อการศึกษาแต่การที่รูขุมขนเกิดการหดตัวจะมีข้อจำกัดในการศึกษากระบวนการซึมผ่านทางรูขุมขน (Patzelt et al., 2008)

2.13.2.3 ผิวของหมู (pig ear tissue)

ผิวของหมูเป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมคล้ายผิวหนังของมนุษย์ เพราะมีโครงสร้างของผิวหนังที่คล้ายคลึงกันมาก (Jacobi et al., 2007) โดยเฉพาะมีชั้นผิวหนังที่เป็นตัวขัดขวางอยู่บนผิวด้านนอก นอกจากนี้ผิวหนังยังไม่มีแผลหลังจากที่นำผิวหนังมาใช้ เหมือนกับผิวหนังของมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามรูเปิดของรูขุมขนของหมูก็มีขนาดใหญ่กว่ารูขุมขนของมนุษย์ (Lademann et al., 2010)

2.14 การประเมินประสิทธิภาพของตำรับฟีนาสเทอไรด์

การประเมินประสิทธิภาพของตำรับฟีนาสเทอไรด์ สามารถทำการทดลองได้ 2 วิธี ดังนี้

2.14.1 ทดลองในหลอดทดลอง (in vitro) แบบจำลองที่นิยมใช้นั้นเป็นเซลล์ร่วมระหว่าง dermal papilla กับ epithelial cell เพราะเซลล์ทั้งสองจะเชื่อมโยงกันเมื่อรูขุมขนโตเต็มที่ โดยเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเอนโคเรนโดยตรงคือ dermal papilla เป็นเซลล์ที่มีตัวรับของเอนโคเรนอยู่ภายในจึงทำหน้าที่ในการแบ่งตัวของ outer root sheath (Shigeki and Satoshi, 2011)

การประเมินประสิทธิภาพสามารถประเมินได้จากการแบ่งตัวและการตายของ เซลล์ dermal papilla ด้วยเทคนิค MTT assay และวัดความยาวของรูขุมขนใน organ culture ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ (Ji et al., 2004)

2.14.2 ทดลองในสัตว์ทดลอง (In vivo) สัตว์ทดลองที่นิยมใช้คือหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6 เพราะหนูสายพันธุ์นี้จะมีการสร้างเม็ดสีภายในเมลาโนไซต์ เมื่อเส้นขนมีการเจริญทำให้ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของสีขนได้และการที่เส้นผมมีสีของเมลานินบ่งบอกได้ว่าเส้นผม อยู่ในระยะเจริญของวงจรชีวิตเส้นขน (Slominski and Paus, 1993) และวงจรชีวิตของขนหนูมีการ เจริญเติบโตเป็นระยะคล้ายกับของมนุษย์แตกต่างกันเพียงระยะเวลาที่ใช้ช่วงการเจริญ (Rebecca, 2003)

การประเมินประสิทธิภาพสามารถสังเกตการเจริญของเส้นขนที่เกิดขึ้นหลังจาก การทดสอบกับสารทดสอบและศึกษาเนื้อเยื่อของผิวหนังภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Soojin, Weon and Jinnyoung, 2011)

2.15 การประเมินการระคายเคืองผิว

การประเมินการระคายเคืองผิว เป็นการประเมินสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ที่มีผลกระทบกับ ผิวหนังของมนุษย์ ซึ่งผลกระทบที่เกิดขึ้นนี้อาจส่งผลให้ผิวหนังเกิดการอักเสบ ดังนั้นการอักเสบ ของผิวหนังนี้สามารถประเมินได้จากการทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง (Goh and Soh, 1984) อาการบวม อาการแดง ผิวหนังแห้ง ผิวหนังคันหรือหนามากขึ้น ความเจ็บปวดของผิวหนัง ล้วน เป็นอาการที่แสดงถึงการระคายเคืองผิวและการแพ้ของผิวหนัง (Thomas, David and Klaus, 2004) ส่วนการประเมินการระคายเคืองผิวสามารถทำได้ทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และในสัตว์ทดลอง (in vivo)

ในกรณีทดลองในหลอดทดลอง แบบจำลองของเนื้อเยื่อที่ใช้จะเป็นเซลล์เกราดิโนไซต์ ไฟโบบลาสต์และประเมินความอยู่รอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay (Gay et al., 1992) หรือ ประเมิน membrane integrity โดยศึกษาการปลดปล่อยของ LDH ออกมาจากเซลล์ (Faller and Bracher, 2002)

ในกรณีทดลองในสัตว์ทดลองจะใช้วิธีการ patch test ซึ่งสามารถทำได้ทั้งผิวของ อาสาสมัครและผิวของกระต่าย จากนั้นประเมินอาการบวมและอาการแดงของผิวหนังด้วยการ สังเกตลักษณะของผิวหนังและให้คะแนนตามเกณฑ์ของ Draize score (Draize, Woodard and Calvery, 1944) หรือวัดค่าการแดงของผิวหนัง (erythema value) ด้วยเครื่อง Mexameter[®] นอกจากนี้ การประเมินผิวหนังของอาสาสมัครยังสามารถประเมินการสูญเสียน้ำออกจากผิวหนัง

(Transepidermal water loss; TEWL) ด้วยเครื่อง Tewameter[®] หรือการประเมินด้วยการสังเกตและประเมินการระคายเคืองผิวหนังตามเกณฑ์ Primary Irritation Index (PII) (Narisa et al., 2007)

2.16 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tabbakhian et al. (2006) ศึกษาการเตรียมตำรับฟีนาสเตอไรด์ในรูปแบบของไลโปโซมและนิโอโซมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยาโดยทำการทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังและหูของหนูแฮมสเตอร์พบว่า ตำรับที่เตรียมในรูปแบบทั้งสองสามารถซึมผ่านผิวหนังของหนูแฮมสเตอร์ได้เร็วกว่าเมื่อเทียบกับตำรับที่เตรียมในรูปแบบของสารละลายแอลกอฮอล์และตำรับที่เตรียมโดยใช้ dimyristoyl phosphatidylcholine หรือ Brij97 ต่อ Brij76 (1:1) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีปริมาณของฟีนาสเตอไรด์ที่สะสมในหูของหนูแฮมสเตอร์เป็น 2.1 และ 2.3 % ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับตำรับที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่น

Rao et al. (2008) ศึกษาการซึมผ่านและการสะสมของตำรับฟีนาสเตอไรด์ในรูปแบบของเอทโทโซม (ethosomes) บนผิวหนังว่า การเตรียมฟีนาสเตอไรด์ในรูปแบบเอทโทโซมนี้สามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้มากกว่าการเตรียมตำรับในรูปของสารละลาย (Aqueous solutions) และไลโปโซม (liposomes) และพบปริมาณของฟีนาสเตอไรด์ในชั้นของหนังแท้เป็น $18.2 \pm 1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ซึ่งถ้าเตรียมตำรับในรูปของไลโปโซมจะพบเพียง $2.8 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

Jung et al. (2006) ศึกษากระบวนการนำส่งในรูปแบบของไลโปโซมผ่านทางรากขนของหนู โดยเตรียมตำรับไลโปโซมที่แตกต่างกัน 5 ตำรับ เพื่อใช้ในการศึกษาการซึมผ่านทางรากขนบนหูของหนูด้วยเทคนิค laser scanning microscopy และศึกษาความลึกในการซึมผ่านเข้าสู่รากขนด้วยการตัดขวางชิ้นเนื้อไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เทียบกับตำรับมาตรฐาน จากการศึกษาพบว่า ตำรับมาตรฐานสามารถซึมผ่านเข้าสู่รากขนได้ความลึกประมาณ 30% ของความยาวทั้งหมดในรากขน และตำรับไลโปโซมที่เตรียมด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิด amphoteric และ cationic สามารถซึมผ่านเข้าสู่รากขนได้ลึกถึง 70% ของความยาวทั้งหมดในรากขน

Daneshamouz et al. (2005) ศึกษาอิทธิพลของฟีนาสเตอไรด์ในรูปแบบไลโปโซมและนิโอโซมในการซึมผ่านทางผิวหนังพบว่า องค์ประกอบที่ใช้ในการเตรียมไลโปโซมและนิโอโซมมีผลต่อการซึมผ่านทางผิวหนังโดยพบว่าเมื่อใช้ span 40 และเลซิธิน ที่อยู่ในสถานะเจลจะทำให้การซึมผ่านทางผิวหนังลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Brij97 Brij 76 : Brij 97 และ dimyristoyl phosphatidylcholine เมื่ออยู่ในสถานะของเหลวและเมื่อเตรียมตำรับในรูปของสารละลายแอลกอฮอล์จะสามารถซึมผ่านผิวหนังได้มากกว่าเมื่อเตรียมในรูปแบบของไลโปโซมและนิโอโซม แต่การซึมผ่านทางผิวหนังก็ยังขึ้นกับขนาดของไลโปโซมและนิโอโซมด้วย

Patzelt et al. (2011) ได้ศึกษาการเลือกบริเวณเป้าหมายภายในรูขุมขนโดยการปรับเปลี่ยนขนาดของอนุภาคพบว่า อนุภาคขนาด 122 nm และ 860 nm พบที่บริเวณ infundibular ขนาด 230 และ 300 nm พบที่บริเวณต่อมไขมันและขนาด 470 nm และ 643 nm พบที่ความลึกที่สุดของรูขุมขนคือบริเวณของ bulge ซึ่งจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าความลึกในการซึมผ่านของอนุภาคจะขึ้นกับประเภทและขนาดของอนุภาค

Alvarez-Roman et al. (2004) ศึกษาการซึมผ่านและการกระจายตัวของสารพอลิเมอร์ขนาดนาโนในชั้นผิวหนังด้วยเทคนิค Confocal laser scanning microscopy พบว่ามีการกระจายตัวของสารเรืองแสงของสารโพลีสไตรีนในผิวหนังของหนู ซึ่งการสะสมของสารโพลีสไตรีนในรูขุมขนที่เปิดและระยะทางการซึมผ่านของสารจะขึ้นกับระยะเวลาและขนาด

Syed and Amshumali (2001) ศึกษาการวิเคราะห์ยาฟีนาสเทอไรด์ (proscar) ด้วยเทคนิค reversed-phase high-performance liquid chromatographic และศึกษาการสลายตัวของยาพบว่า เทคนิคนี้ให้ค่า linearity (r^2 เป็น 0.9997) ในช่วง 20-600 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งในการศึกษานี้ได้ใช้ Shimpak C8 column (5 μm , 15.0 cm x 4.6 mm) เป็นวัสดุภาคคงที่ วัดความยาวคลื่นด้วย UV-detection (210 nm) ที่อุณหภูมิ $25 \pm 10^\circ\text{C}$ และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น acetonitrile ต่อ water (95:05 v/v) อัตราเร็วที่ 0.7 ml/min จากผลการศึกษาพบว่า ฟิกฟีนาสเทอไรด์ที่ได้มี retention time น้อยกว่า 10 นาทีและเทคนิคนี้ถือมีความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ดีและ shelf-life ของฟีนาสเทอไรด์มีความคงตัวมากกว่า 2 ปี ที่อุณหภูมิห้องและภายใต้สภาวะที่เก็บรักษา

Demir, Cucu and Sakarya (2006) ศึกษาการวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์ (Dilaprost®) ในรูปแบบยาเม็ดด้วยเทคนิค liquid chromatography และการประเมินความถูกต้องของเทคนิคในการศึกษานี้ใช้ Nova Pak C18 column เป็นวัสดุภาคคงที่ ศึกษาที่อุณหภูมิ 60°C วัดที่ความยาวคลื่น 210 nm วิเคราะห์ในรูปแบบ isocratic elution โดยใช้ water /acetonitrile/ tetrahydrofuran (80/10/10, v/v/v) เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ อัตราเร็วเป็น 2 mL/min ปริมาตรที่ใช้ คือ 15 μL จากการศึกษาพบว่า retention time ของฟีนาสเทอไรด์ที่ได้เท่ากับ 36 นาที

Basavaiah and Somashekar (2007) ศึกษาการวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบยาเม็ดด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography ในการศึกษานี้ใช้ ODS-C18 reversed phase column เป็นวัสดุภาคคงที่ อุณหภูมิที่ใช้คือ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ และใช้ methanol ต่อ water (80:20) เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ อัตราเร็วที่ใช้คือ 1 mL/min วัดความยาวคลื่นด้วย UV detection ที่ความยาวคลื่น 225 nm พบว่า retention time ของฟีนาสเทอไรด์ที่ได้เท่ากับ 6.1 นาที

Mokhtar et al. (2008) ศึกษาผลกระทบของตัวแปรในการเตรียมตำรับที่มีการกักเก็บ flurbiprofen และมีการศึกษาอัตราการปลดปล่อยยาออกจากนิโอโซมที่เตรียมจากโพรนิโอโซม

และในการศึกษานี้ได้เตรียมตำรับเป็นโปรนิโอโซมเจลด้วยเทคนิค coaservation phase separation โดยสารลดแรงตึงผิวที่ใช้คือ span 20 span 40 span 60 และ span 80 ซึ่งมีองค์ประกอบของคอเรสเตอร์อลและไม่มีคอเรสเตอร์อลผสมอยู่ และการเปลี่ยนจากโปรนิโอโซมเจลเป็นนิโอโซมจะเกิดขึ้นทันทีเมื่อมีการเติมน้ำเข้าไปในตำรับโปรนิโอโซม การศึกษาการกักเก็บยา flurbiprofen ศึกษาด้วยเทคนิค dialysis พบว่า ร้อยละการกักเก็บ flurbiprofen ของ span 60 มากกว่า span 40 มากกว่า span 20 และ span 80 ตามลำดับ สำหรับการเพิ่มหรือลดปริมาณของคอเรสเตอร์อลจะมีผลต่อร้อยละการกักเก็บหรือไม่ขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวและความเข้มข้นที่ใช้ในการเตรียมตำรับ การเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดและปริมาณยาจะเพิ่มอัตราร้อยละการกักเก็บยาในตำรับนิโอโซม

Ammer et al. (2011) ศึกษากระบวนการนำส่งยา tenocicam ทางผิวหนังด้วยระบบนำส่งโปรนิโอโซม โดยศึกษาการเตรียมโปรนิโอโซมที่มีองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวแตกต่างกัน และศึกษาลักษณะ โครงสร้างด้วยเทคนิค light microscopy ประเมินร้อยละการกักเก็บ ความคงตัว การปลดปล่อยด้วยยาและการซึมผ่านของตัวยา จากผลการศึกษาพบว่า โปรนิโอโซมที่เตรียมจาก tween 20 : cholesterol (9:1) มีความคงตัวและมีอัตราร้อยละการกักเก็บและการปลดปล่อยด้วยที่สูง และพบว่าการนำส่งยาทางผิวหนังไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและยังออกฤทธิ์ในการรักษาได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับยารับประทาน

Ei-Laithy et al. (2011) ศึกษากระบวนการนำส่ง vinpocetine ทางผิวหนังในรูปแบบของโปรนิโอโซมที่ใช้ Sugar esters เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยการศึกษาเตรียมโปรนิโอโซมด้วยเทคนิค coaservation phase separation จะใช้สารลดแรงตึงผิวที่ต่างชนิดกันและการใช้ Sugar esters เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุในการศึกษา ในการศึกษานี้ประเมินร้อยละการกักเก็บ ขนาดอนุภาคและรูปร่างการปลดปล่อยด้วยยา การซึมผ่านทางผิวหนัง ความคงตัวและการระคายเคืองผิวหนัง จากผลการศึกษาพบว่า ตำรับที่ได้มีร้อยละการกักเก็บตัวยที่สูง ขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วง 0.63 – 2.52 μm ซึ่งมีประสิทธิภาพในการนำส่งทางผิวหนังมีการปลดปล่อยของตัวยที่สูงหลังจาก 48 ชั่วโมงและการซึมผ่านทางผิวหนังสูงกว่าเมื่อเทียบกับในรูปแบบของยารับประทาน จึงกล่าวได้ว่าการใช้ Sugar esters เป็นสารลดแรงตึงผิวในการเตรียมโปรนิโอโซมนั้นมีความเป็นไปได้ในการนำส่งยา vinpocetine ทางผิวหนัง

Xiaoyun et al. (2010) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของ dihydroartemisinin (DHA) โดยใช้ระบบนำส่งลิปิดขนาดนาโนด้วยเทคนิค Response surface methodology ในการศึกษานี้ได้ใช้ออกแบบการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิวร่วม (Response surface methodology) กับการออกแบบส่วนผสมกลาง (Central composite rotatable design) เป็นแบบจำลองในการออกแบบ

การทดลอง ปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วย (1) ร้อยละการกักเก็บยา (2) ร้อยละการบรรจุด้วยยา และ (3) ขนาดอนุภาค โดยปัจจัยเหล่านี้จะขึ้นกับ (1) ความเข้มข้นของ DHA (X_1) (2) ความเข้มข้นของ ลิปิด (X_2) และ (3) สัดส่วนของลิปิดต่อปริมาณลิปิดทั้งหมด (X_3) จากผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากเทคนิคนี้คือความเข้มข้นของ DHA เป็น 1 g/L ความเข้มข้นของลิปิดเป็น 1% และสัดส่วนของลิปิดต่อปริมาณลิปิดทั้งหมดเป็น 0.1:1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ส่งผลให้ร้อยละการกักเก็บยาเท่ากับ $98.97 \pm 2.3\%$ ร้อยละการบรรจุด้วยยาเท่ากับ $15.61 \pm 1.9\%$ และขนาดอนุภาคเป็น 198 ± 4.7 nm ค่าการกระจายขนาด (PDI) เท่ากับ 0.146 และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเท่ากับ -21.6 ± 1.3 mV

จากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยต้องการพัฒนาคำรับฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบของโพรนิโซม ซึ่งข้อดีของรูปแบบนี้คือสามารถเกิดไฮเครชันเป็นนิโอโซมได้สมบูรณ์และเตรียมได้ง่ายกว่าการเตรียมคำรับเป็นนิโอโซมแบบเดิม (Mokhtar et al., 2008) และหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมคำรับด้วยเทคนิคออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวร่วม (Response surface methodology) กับการออกแบบส่วนผสมกลาง (Central composite design) มีข้อดีคือสามารถศึกษาอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรได้ในเวลาเดียวกันจึงช่วยลดความผิดพลาดจากการศึกษาที่ละปัจจัยของวิธีดั้งเดิมได้และทำให้ได้สูตรคำรับที่มีความเหมาะสม จากนั้นจึงนำคำรับที่เหมาะสมนี้มาศึกษาการปลดปล่อยตัวของตัวยาออกจากคำรับ ศึกษาประสิทธิภาพของระบบนำส่งในการซึมผ่านทางผิวหนังและซึมผ่านทางรูขุมขน ศึกษาประสิทธิภาพของคำรับฟีนาสเทอไรด์ที่พัฒนาขึ้นว่ามีประสิทธิภาพเทียบเท่าสารละลายไมนอกซิลหรือไม และศึกษาการระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลอง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การพัฒนาคำรับฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมเพื่อเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขน
ในครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) แสดงรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

Finasteride (Phama Nueva Co., Ltd.) 95% ethanol (Italmar (Thailand) Co. Ltd., Thailand) acetonitrile (Carlo Erba Reagenti SpA, Italy) span 60 (Sigma-Aldrich, Inc., USA) cholesterol (Carlo Erba Reagenti SpA, Italy) minoxidil (Regaine[®], Johnson & Johnson, Thailand) dialysis tubing (cellu Sep T4[®] MW cut off 12,000-14,000, Membrane Filtratoin Product, Inc., USA) incubator shaker (Kuhner/ISF-I-W, Switzerland) centrifuge (MR 23, Jouan, Germany) high pressure liquid chromatography (HPLC) (Waters, USA) Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) ultracentrifuge (OptimaTM L-100K ultracentrifuge, Beckman, UK) Franz diffusion cell (Crown glass company, Inc., USA) ผิวหนังของลูกสุกรตายแรกเกิด (คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี) หนูสายพันธุ์ C57BL/6J และกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

3.2.1.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์ด้วยเครื่อง HPLC waters breeze (waters 2487 dual absorbance detector, 1525 binary HPLC pump, 717 plus autosampler) โดยใช้ขนาดของอนุภาคและความยาวของคอลัมน์เป็น C18-ODS แยกด้วยวัดภาคเคลื่อนที่ระหว่าง

เมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำและด้วยอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำ โดยทำการแยกสารแบบเกรเดียนต์ (gradient) เวลาที่ใช้ 100 นาที เพื่อศึกษาว่าฟีนาสเทอไรด์ควรมีการแยกแบบใด โดยพิจารณาจากค่า Scouting gradient run ถ้ามีค่าน้อยกว่า 0.4 ควรทำการแยกแบบไอโซเครติก จากนั้นให้คำนวณหาอัตราส่วนที่ใช้ในการแยกสารแบบไอโซเครติก (isocratic) และทำการแยกสารแบบไอโซเครติกด้วยอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำในอัตราส่วนที่คำนวณได้จากสมการ (3.1) และทดลองปรับอัตราส่วนเพื่อหา retention time ของฟีนาสเทอไรด์ที่ถูกแยกออกมา โดยใช้อัตราเร็วในการแยกสารเท่ากับ 1 mL/min และปริมาณสารตัวอย่างเท่ากับ 20 μ L จากนั้นตรวจวัดฟีนาสเทอไรด์ที่ความยาวคลื่น 210 nm เช่นเดียวกับการแยกสารแบบเกรเดียนต์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์เพื่อให้ฟีนาสเทอไรด์แยกออกจากกันให้ดีพอในระยะเวลาที่เหมาะสม โดยฟีนาสเทอไรด์ที่แยกได้จะพิจารณาความเหมาะสมจากค่า resolution ระหว่างพีกทั้งสองค่า tailing factor และค่าจำนวนเพลททางทฤษฎี (number of theoretical plate) ที่สภาวะต่าง ๆ เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้วจึงนำวิธีวิเคราะห์นั้นมาตรวจสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์

$$\% \text{ Isocratic organic composition} = \text{gradient slope} \times (\text{elution time} - \text{Dwell time}) \quad (3.1)$$

3.2.1.2 การตรวจสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์

1) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ 6 ความเข้มข้น คือ 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 μ g/mL โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า peak area กับความเข้มข้นของฟีนาสเทอไรด์พร้อมทั้งคำนวณค่า r^2 และสมการเส้นตรง ($r^2 = 0.98-1.0$)

2) ความเที่ยง (Precision)

วันเดียวกัน (Intra day)

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟีนาสเทอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50, 150 และ 300 μ g/mL โดยทำซ้ำ 6 ครั้ง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเทอไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูงโดยทำการฉีดความเข้มข้นละ 1 ครั้ง และคำนวณค่า %RSD ของ peak area และ retention time

ระหว่างวัน (Inter day)

ทำซ้ำเหมือน Intra day โดยทำการเตรียมสารมาตรฐานใหม่

3) ความแม่นยำ (Accuracy)

ใช้วิธี method validation โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ใน volume metric flask ขนาด 10 mL ทำซ้ำ 3 ครั้ง แสดงดังตารางที่ 3.1 และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตรไนไตร์ วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูงและสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า peak area กับความเข้มข้นของฟีนาสเทอไรด์ คำนวณค่า correlation coefficient (r²) สมการเส้นตรงและ % recovery

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

Concentration (µg/mL)	FNS std (500µ/mL)	Niosomes sample (5µg/mL)
50	1 mL	4 mL
100	2 mL	4 mL
150	3 mL	4 mL
200	4 mL	4 mL
250	5 mL	4 mL
300	6 mL	4 mL

4) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่า LOD และ LOQ จากกราฟมาตรฐานตามสมการ (3.2) และ (3.3)

$$LOD = \frac{3.3 \times SD}{mean}$$

(3.2)

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{mean}$$

(3.3)

5) ความจำเพาะ (Selectivity/specificity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟีนาสเทอไรด์ที่เดิมสารบกวณ คือ คาร์บฟีนาสเทอไรด์นิโอโซม แสดงดังตารางที่ 3.2 เตรียมตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูงและเปรียบเทียบค่า retention time

ตารางที่ 3.2 อัตราส่วนในการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมกับสารรบกวน

Concentration of finasteride (µg/mL)	Niosomes sample (5 µg/mL)
50	4 mL
100	4 mL
150	4 mL
200	4 mL
250	4 mL
300	4 mL

3.2.2 การพัฒนาตำรับฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซม

3.2.2.1 ออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว (Response surface methodology) (Aslan, 2007)

การพัฒนาตำรับฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมนั้นได้ออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวโดยใช้การออกแบบส่วนผสมกลาง เพื่อหาปัจจัยของสูตรตำรับที่เหมาะสมด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert 8.0.1.0 (Trial Version, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) โดยมีปัจจัยของตัวแปรอิสระ 3 ระดับคือ (1) ปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), (2) ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอล (X_2) และ (3) ความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ (X_3) กำหนดค่าของตัวแปรอิสระดังนี้ X_1 มีค่าอยู่ระหว่าง 30-50 % X_2 มีค่าอยู่ระหว่าง 10-30 mM และ X_3 มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5-5 mM ค่าของตัวแปรอิสระเหล่านี้ได้จากการทดสอบเบื้องต้นและประเมินค่าการตอบสนองจาก (1) ขนาดอนุภาคของระบบนำส่ง (2) ร้อยละการบรรจุตัวยา และ (3) ร้อยละการกักเก็บยารายละเอียดการออกแบบการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปร

ตัวแปรอิสระ	ระดับ				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
X_1	23.18	30.00	40.00	50.00	56.82
X_2	3.18	10.00	20.00	30.00	36.82
X_3	0.31	1.50	3.25	5.00	6.19

3.2.2.2 เตรียมโปรนิโอโซม

เตรียมตำรับฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมด้วยวิธีโคอะเซอเวชันแบบแยก
วัฏภาค (coacervation phase separation) (Vora, Khopade and Jain, 1998) โดยเตรียมปริมาณ
100 mL ดังนี้ ชั่งฟีนาสเทอไรด์ สเปน 60 และคอเรสเตอร์อลในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการ
คำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert 8.0.1.0 (Stat Ease, USA) แสดงดังตารางที่ 3.4 ลงใน
ภาชนะแล้วเติมเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาณ 5 mL ปิดฝาและนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที
จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมน้ำปริมาณ 1 mL อุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C ต่อไปอีกเป็นเวลา
5 นาที ปลดทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจะทำให้เกิดการฟอร์มตัวเป็นโปรนิโอโซม หลังจากนั้นเติมน้ำ
ปราศจากไอออนให้ครบ 100 mL นำไปวิเคราะห์หาร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา
ขนาดอนุภาคของระบบนำส่งและทดสอบความคงตัวของตำรับโปรนิโอโซมต่อไป

ตารางที่ 3.4 ไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละความเข้มข้นของคอเรสเตอร์อลและความเข้มข้น
ฟีนาสเทอไรด์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

Formulation	Total lipid (mM)	Cholesterol content (%)	Finasteride concentration (mM)
1	10.00	30.00	1.50
2	20.00	40.00	3.25
3	30.00	30.00	1.50
4	36.82	40.00	3.25
5	20.00	56.82	3.25
6	20.00	40.00	6.19
7	30.00	50.00	5.00
8	20.00	40.00	3.25
9	20.00	40.00	3.25
10	20.00	40.00	3.25
11	30.00	30.00	5.00
12	10.00	50.00	5.00
13	10.00	50.00	1.50
14	20.00	40.00	0.31
15	20.00	23.18	3.25

ตารางที่ 3.4 ไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละความเข้มข้นของคอเรสเตอรอลและความเข้มข้น
ฟินาสเทอไรด์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ต่อ)

Formulation	Total lipid (mM)	Cholesterol content (%)	Finasteride concentration (mM)
16	10.00	30.00	5.00
17	3.18	40.00	3.25
18	30.00	50.00	1.50
19	20.00	40.00	3.25
20	20.00	40.00	3.25

3.2.2.3 วัดขนาดและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค

ขนาดอนุภาคของระบบนำส่งวัดด้วยวิธีการกระเจิงแสงเลเซอร์และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาควัดด้วยวิธีการสะท้อนของประจุที่พื้นผิวของอนุภาค โดยใช้เครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) โดยเจือจางตำรับนิโอโซมด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:1000 จากนั้นนำไปวัดขนาดอนุภาคและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคและแสดงค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยของการวัด 3 ครั้ง

3.2.2.4 วิเคราะห์ปริมาณฟินาสเทอไรด์ที่กักเก็บและบรรจุใน โพรนิโอโซม

นำตำรับฟินาสเทอไรด์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 50,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Optima™ L-100K ultracentrifuge, Beckman, UK) จากนั้นเก็บส่วนใสด้านบนนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 µm แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟินาสเทอไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (Waters, USA) จากนั้นนำค่าปริมาณของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ไปคำนวณหาร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยาดังสมการที่ (3.4) และ (3.5)

$$\text{ร้อยละการกักเก็บยา (\% Entrapment efficiency)} = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \tag{3.4}$$

$$\text{ร้อยละการบรรจุยา (\% Drug loading capacity)} = \frac{C_t - C_s}{C_t - C_s + C_l} \times 100 \tag{3.5}$$

โดย Ct คือ ปริมาณตัวยาทั้งหมด
Cs คือ ปริมาณตัวยาที่ไม่ถูกกักเก็บ
Cl คือ ปริมาณไขมันทั้งหมด

3.2.2.5 ทดสอบความคงตัวของคำรับโปรตีนไอโซม

1) ทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

นำคำรับโปรตีนไอโซมมาเก็บไว้ภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นระยะเวลา 4 เดือน เก็บตัวอย่างของคำรับ ทุกเดือนเพื่อประเมินลักษณะทางกายภาพ เช่น การเปลี่ยนสีของโปรตีนไอโซม การแยกชั้น วัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK)

2) วิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์ในโปรตีนไอโซม

เก็บคำรับโปรตีนไอโซมภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นระยะเวลา 4 เดือน เก็บตัวอย่างของคำรับทุกเดือนเพื่อประเมินร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยา โดยวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (Waters, USA)

3.2.3 ทดสอบการปลดปล่อยยา การซึมผ่านทางผิวหนังและการซึมผ่านทางรูขุมขนของฟีนาสเตอไรด์โปรตีนไอโซม

3.2.3.1 ทดสอบการละลายของฟีนาสเตอไรด์

เติมฟีนาสเตอไรด์ปริมาณมากเกินไป (excessed drug) ลงในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ในอัตราส่วนต่าง ๆ คือ 0:10, 1:9, 3:7 และ 1:1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaker) ที่ 100 rpm อุณหภูมิ 32 °C จนเข้าสู่สภาวะสมดุล จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (MR 23, Jouan, Germany) ที่อัตราเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และเก็บส่วนใสปริมาตร 3 µL เจือจางด้วยอะซิโตนไนด์ร นำไปวิเคราะห์ปริมาณของฟีนาสเตอไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (Waters, USA)

3.2.3.2 ทดสอบการปลดปล่อยตัวยาดด้วยเทคนิคไดอะไลซิส

นำคำรับโปรตีนไอโซมปริมาตร 1 mL และสารละลายฟีนาสเตอไรด์ (ละลายด้วยสารละลายตัวกลาง) ใส่ใน dialysis bag (Cellu Sep T4® MW cut off 12,000-14,000, Membrane Filtration Product, Inc., USA) โดยใช้สารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (1:1, pH 7.4) ปริมาตร 20 mL เป็นสารละลายตัวกลาง เขย่าด้วย

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 32 °C อัตราเร็ว 100 rpm สุ่มเก็บตัวอย่าง ปริมาณ 0.5 mL ที่เวลา 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ ฟีนาสเทอไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (Waters, USA)

3.2.3.3 การทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังและการซึมผ่านทางรูขุมขน

1) การเตรียมผิวหนังสัตว์ทดลอง

ผิวหนังที่ใช้ในการทดสอบคือ ผิวหนังของลูกสุกรตายแรกเกิด จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยนำลูกสุกรตายแรกเกิดมาตัดและลอกผิวหนัง ของลูกสุกรออก เว้นบริเวณรายนมไว้ จากนั้นกำจัดชั้นไขมันที่ผิวออกด้วยไอโซโพรพานอล และ โคนขนด้วยใบมีดโกนแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C หลังจากนั้นเตรียมผิวหนังที่ใช้ใน การทดสอบ โดยการนำผิวหนังของหนูมาตัดให้มีพื้นที่ขนาด 3.5 cm² และนำไปแช่ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) วิธีการทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังด้วยเทคนิค Franz diffusion cell

โดยนำตำรับ โพรนิโอโซมที่เตรียมขึ้นปริมาณ 1 mL ใส่ใน donor cell และใช้ตัวทำละลายที่ได้จากการทดสอบการละลายของยาฟีนาสเทอไรด์ ปริมาตร 13 mL เป็น สารละลายตัวกลางเดิมใส่ใน receiver cell อุณหภูมิที่ใช้ 32 °C สุ่มเก็บตัวอย่างปริมาณ 500 µL และ เติมสารละลายตัวกลางกลับในปริมาณเท่าเดิม เก็บตัวอย่างที่เวลา 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเทอไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (Waters, USA)

3) วิธีการทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขน

นำผิวหนังลูกสุกรแรกเกิดที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมผิวหนังมา ทดสอบการซึมผ่าน โดยใช้เข็มจุ่มน้ำยาเคลือบเล็บแล้วนำมาปิดรูขุมขนที่อยู่บนผิวหนัง ทั้งไว้เป็น เวลา 5 นาที ให้น้ำยาเคลือบเล็บแห้ง จากนั้นนำผิวหนังไปทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนด้วย เทคนิค Franz diffusion cell (Aranya et al., 2012) สภาพะที่ใช้ในการทดสอบเหมือนกับการทดสอบ การซึมผ่านทางผิวหนัง

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของฟีนาสเทอไรด์โพรนิโอโซมและการทดสอบการ ระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลอง

3.2.4.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ คือ หนูถีบจักร (mice) สายพันธุ์ C57BL/6J อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนัก 18-22 กรัม และการทดสอบการระคายเคือง ผิวใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit เพศผู้ น้ำหนัก 1.2 –1.8 กิโลกรัม จาก

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเลี้ยงสัตว์ทดลองทั้งสองไว้ในห้องสัตว์ทดลองของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ซึ่งได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีแล้ว โดยให้สัตว์ทดลองกินอาหารสำเร็จรูปตามมาตรฐานของสำนักสัตว์ทดลองและดื่มน้ำตลอดเวลา เปลี่ยนอาหารและน้ำดื่มทุกวัน เปลี่ยนวัสดุรองนอนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลองนั้นต้องมีอุณหภูมิ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และมีความชื้นสัมพัทธ์ 55-60% สำหรับระยะเวลาที่สัมผัสแสงคือ เปิดไฟ 12 ชั่วโมง และปิดไฟ 12 ชั่วโมง

3.2.4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของพินาสเตอไรด์โปรนิโอโซม

นำหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6MLac อายุ 7 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว และระบุกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (Control: ไม่ทาสารใด, Blank proniosome)
- กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดสอบสารมาตรฐาน (Positive control: 2% minoxidil)
- กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มทดสอบสาร (0.1% finasteride proniosomes)
- กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มทดสอบสาร (0.5% finasteride proniosomes)
- กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มทดสอบสาร (1% finasteride proniosomes)
- กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มทดสอบสาร (1% finasteride solution)

สลับหนูถีบจักรจำนวน 30 ตัว ก่อนด้วย Zoletetil® 100 และ โคนขนบริเวณหลังให้มีพื้นที่กว้างขนาด 2 เซนติเมตร ยาว 4 เซนติเมตร ทาสารทดสอบลงบริเวณหลังหนูประมาณ 0.1 mL โดยใช้ swaps ช่วยในการทำให้ทั่วบริเวณที่ทดสอบ โดยหนูในกลุ่มควบคุมจะแบ่งพื้นที่เป็นซ้ายและขวา โดยข้างซ้ายไม่ทาสารใด ส่วนข้างขวาทาโปรนิโอโซมเปล่า สำหรับกลุ่มทดสอบจะทาเต็มพื้นที่ทดสอบ จากนั้นสังเกตความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 และให้ระดับสเกลการเจริญของเส้นขนตามเกณฑ์การเจริญของเส้นขน (Naphatsorn et al., 2012) ดังตารางที่ 3.5 และในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อทดลองเสร็จสิ้นแล้วให้นำหนูด้วยการรมอีเทอร์ และตัดผิวหนังของหนูให้มีขนาด 5 μm จากนั้นจึงใช้ 10% neutral formalin ทา แล้วตรึงด้วย paraffin wax และทำการย้อมสีด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) จากนั้นนำไป ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อของผิวหนัง (Soojin, Weon and Jinnyoung, 2011)

ตารางที่ 3.5 เกณฑ์การเจริญของเส้นขน

ระดับสเกล	รายละเอียด
0	ไม่มีการเจริญของเส้นขน
1	มีการเจริญของเส้นขนร้อยละ 20 ของพื้นที่ทดสอบ
2	มีการเจริญของเส้นขนร้อยละ 20 - 40 ของพื้นที่ทดสอบ
3	มีการเจริญของเส้นขนร้อยละ 40 – 60 ของพื้นที่ทดสอบ
4	มีการเจริญของเส้นขนร้อยละ 60 – 80 ของพื้นที่ทดสอบ
5	มีการเจริญของเส้นขนมากกว่าร้อยละ 80 จนเต็มพื้นที่ทดสอบ

3.2.4.3 ทดสอบการระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลองด้วยเทคนิค closed patch test

นำกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit เพศผู้ จำนวน 4 ตัว โขนขนบริเวณหลังของกระต่ายให้มีขนาดประมาณ 6 cm² ทำการตัด gauze pad ให้ได้ขนาด 1 × 1 cm กำหนดให้กระต่าย 1 ตัว ทาตัวรับทั้งหมด 6 กลุ่มทดลอง คือ

- กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุม (Control: gauze pad)
- กลุ่ม 2 คือ กลุ่มควบคุม (Negative control: blank proniosomes)
- กลุ่ม 3 คือ กลุ่มควบคุมมาตรฐาน (Positive control: 5% sodium Lauryl sulphate)
- กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มทดสอบสาร (0.1% finasteride proniosomes)
- กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มทดสอบสาร (0.5% finasteride proniosomes)
- กลุ่มที่ 6 คือ กลุ่มทดสอบสาร (1% finasteride proniosome)

นำตัวรับทั้ง 6 กลุ่ม ปริมาณกลุ่มละ 0.1 mL ทาลงบนหลังกระต่าย ปิดทับด้วย guaze pad ที่เตรียมไว้แล้วปิดด้วยแผ่นพลาสติกที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวนำกระต่ายกลับเข้ากรงเหมือนเดิมทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง สังบริเวณผิวกระต่ายด้วยน้ำสะอาด ประเมินอาการแดง (erythema) และ อาการบวม (edema) ด้วยการสังเกต (visual scoring) ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนำ gauze pad ออก (Schmitt et al., 2008) สำหรับเกณฑ์การสังเกต แสดงดังตารางที่ 3.6 เมื่อประเมินอาการแดงและบวมแล้วให้นำผลการทดสอบที่ได้ไปคำนวณและประเมินการระคายเคืองผิวตามเกณฑ์ Primary irritation index แสดงดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.6 เกณฑ์ในการประเมินการระคายเคืองผิว

สเกล	รายละเอียด
0	ไม่เกิดการระคายเคืองผิวหนัง
±1/2	อาจจะเกิดการระคายเคืองผิว
1	มีอาการแดงและบวมเล็กน้อยมาก
2	มีอาการแดงชัดเจนและอาการบวมเล็กน้อย
3	มีอาการแดงระดับปานกลางถึงรุนแรงและอาการบวมปานกลาง ขนาดประมาณ 1 mm
4	มีอาการแดงรุนแรงและมีอาการบวมมากกว่า 1 mm

ตารางที่ 3.7 ระดับการระคายเคืองผิว (Primary irritation index)

ระดับการระคายเคืองผิว	Primary irritation index
ไม่เกิดการระคายเคือง	0.0 – 0.4
เกิดการระคายเคืองเล็กน้อย	0.5 – 1.9
เกิดการระคายเคืองปานกลาง	2.0 – 4.9
เกิดการระคายเคืองรุนแรง	5.0 – 8.0

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสมใช้โปรแกรมสำเร็จรูป คือ Design Expert 8.0.1.0 (Stat Ease, USA) และค่าอคติ (Bias) แสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ค่าความคลาดเคลื่อนจากส่วนกลาง (Standard error of mean; S.E.M.) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มของข้อมูลในทางสถิติด้วย Post Hoc Tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

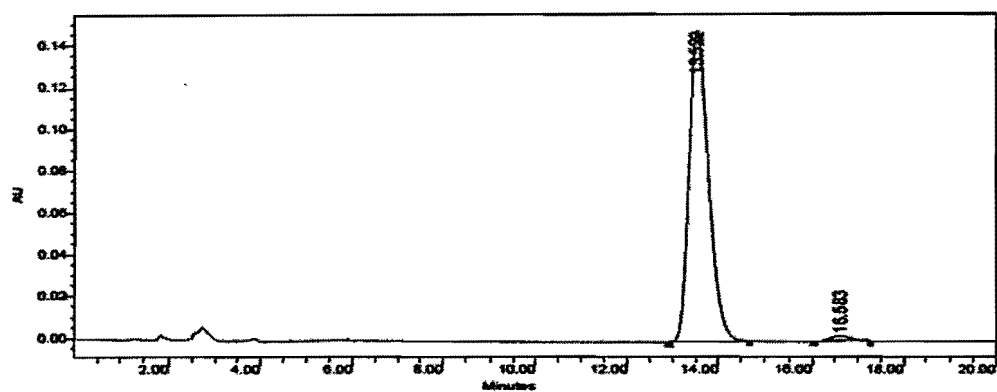
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

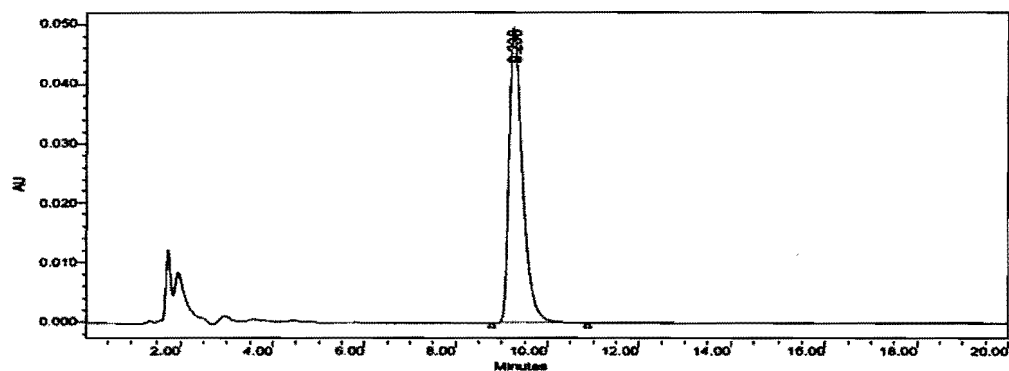
4.1.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) ใช้คอลัมน์ที่มีขนาดอนุภาคและความยาวของคอลัมน์เป็น C18-ODS และใช้ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 20 μ L อัตราเร็ว 1 mL/min วิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์ด้วย uv detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm โดยแยกสารแบบเกรเดียนต์ ซึ่งเป็นการแยกสารเพื่อแยกองค์ประกอบทั้งหมดของสารด้วยอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำ และอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำ จากนั้นให้นำ Scouting gradient run ของอัตราการเคลื่อนที่ทั้งสองไปหาความเหมาะสมในการแยกโครมาโตแกรมของฟีนาสเตอไรด์ว่าควรใช้การแยกแบบใด ซึ่งจากการทดลองพบว่า ค่า Scouting gradient run ที่คำนวณได้จากอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำมีค่าเท่ากับ 0.19 และอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำมีค่าเท่ากับ 0.08 จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้ทั้งสองมีค่าน้อยกว่า 0.40 ดังนั้นการแยกฟีนาสเตอไรด์จึงควรแยกในแบบไอโซครติก

เมื่อคำนวณหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ใช้ในการแยกฟีนาสเตอไรด์โดยคำนวณจากโครมาโตแกรมแบบเกรเดียนต์ พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำ มีอัตราส่วนเป็น 65:35 และอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำ มีอัตราส่วนเป็น 50:50 เมื่อแยกด้วยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราส่วนดังกล่าวพบว่า มีค่า retention time เท่ากับ 13.522 นาที (แสดงดังภาพที่ 4.1) และ 8.795 นาที ตามลำดับ (แสดงดังภาพที่ 4.2)

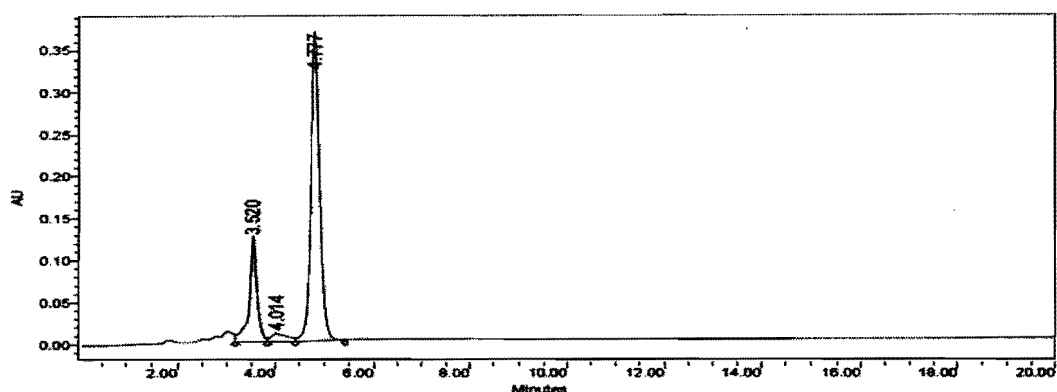


ภาพที่ 4.1 โครมาโตแกรมของฟีนาสเตอไรด์ เมื่อแยกแบบไอโซเครติก (Isocratic) ด้วยอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำ ในอัตราส่วน 65:35

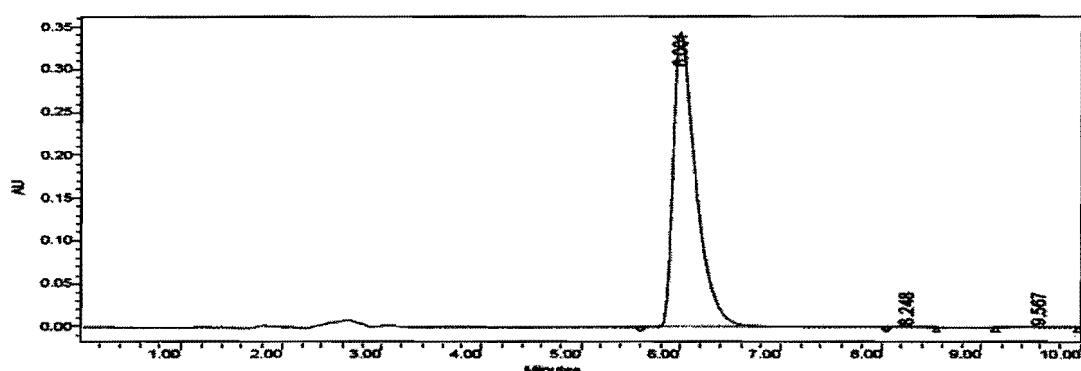


ภาพที่ 4.2 โครมาโตแกรมของฟีนาสเตอไรด์ เมื่อแยกแบบไอโซเครติก (Isocratic) ด้วยอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำ ในอัตราส่วน 50:50

จากนั้นปรับอัตราส่วนที่ได้จากการแยกแบบเกรเดียนต์พบว่า เมื่อแยกฟีนาสเตอไรด์ ด้วยอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำในอัตราส่วน 70:30 มีค่า retention time เท่ากับ 4.777 นาที (แสดงดังภาพที่ 4.3) และแยกฟีนาสเตอไรด์ด้วยอัตราการเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำในอัตราส่วน 60: 40 มีค่า retention time เท่ากับ 6.001 นาที (แสดงดังภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.3 โครมาโตแกรมของฟีนาสเตอไรด์ เมื่อแยกแบบไอโซเครติก (Isocratic) ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำ ในอัตราส่วน 70:30



ภาพที่ 4.4 โครมาโตแกรมของฟีนาสเตอไรด์ เมื่อแยกแบบไอโซเครติก (Isocratic) ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำ ในอัตราส่วน 60:40

จากนั้นวิเคราะห์ความเหมาะสมในการแยกฟีนาสเตอไรด์จากค่า resolution ระหว่างพีกทั้งสอง ($R_s > 1.5$) ค่า Tailing factor ($0.9 \leq \text{Tailing factor} \leq 1.5$) และค่าจำนวนเพลททางทฤษฎี (number of theoretical plate) ควรมีค่าสูง ที่สภาวะต่าง ๆ พบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำในอัตราส่วน 60:40 มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีค่า resolution ระหว่างพีกเท่ากับ 3.07 ค่า Tailing factor เท่ากับ 1.13 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และค่าจำนวนเพลททางทฤษฎีเท่ากับ 5,323.94 แสดงผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่า Resolution Tailing factor และ Number of theoretical plate เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

Mobile phase	Ratio	Resolution	Tailing factor	Number of theoretical plate
		210 nm	210 nm	210 nm
เมทิลแอลกอฮอล์:น้ำ	70: 30	1.57	1.13	3,555.44
	65: 35*	3.03	1.30	5,274.98
อะซิโตน:ไตรคลอโรเอทิลีน	60:40	3.07	1.13	5,323.94
	50:50*	4.04	1.25	5,362.17

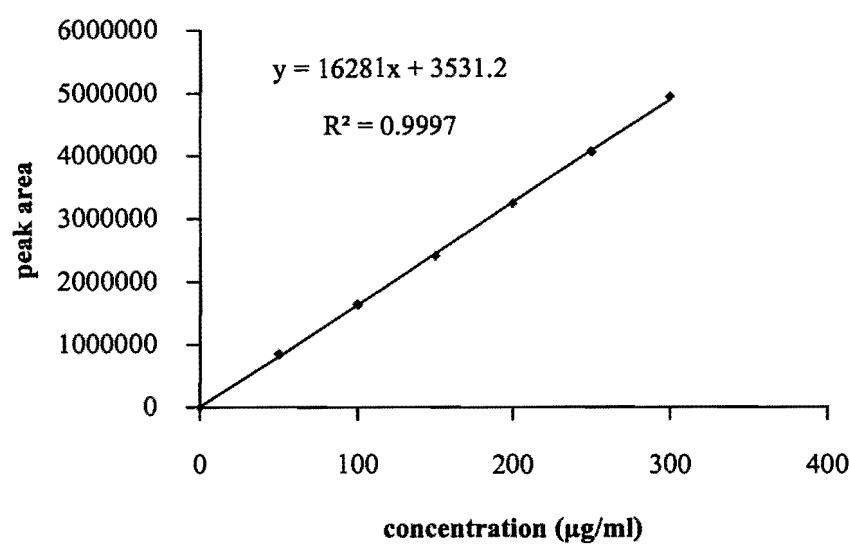
* คืออัตราส่วนที่ได้จากการคำนวณจากการแยกแบบเกรเดียนต์

4.1.2 การตรวจสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์

เมื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์ได้ในสถานะที่เหมาะสมแล้ว จึงตรวจสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์โดยพิจารณาจาก

4.1.2.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity; n = 3)

ผลการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของฟีนาสเทอไรด์กับ peak area พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 50-300 µg/mL และมีค่า r² เป็น 0.9995 แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 กราฟมาตรฐานของฟีนาสเทอไรด์เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลว
สมรรถนะสูง (n=3)

4.1.2.2 ความเที่ยง (Precision; n = 6)

การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานฟีนาสเทอไรด์ ที่ความเข้มข้น 50, 150 และ 300 µg/mL และตรวจสอบค่า %RSD ของ retention time และ %RSD ของ peak area ของสารมาตรฐานฟีนาสเทอไรด์พบว่า ค่า %RSD ของ retention time อยู่ในช่วง 0.005-0.012 และ ค่า %RSD ของ peak area อยู่ในช่วง 0.01-0.05 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (%RSD < 2) แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 %RSD ของ Retention time และ Peak area ที่ความเข้มข้น 50, 150 และ 300 µg/mL

Concentration (µg/mL)	%RSD (retention time)	%RSD (peak area)
50	0.012	0.05
150	0.006	0.01
300	0.005	0.03

4.1.2.3 ความแม่นยำ (Accuracy; n=3)

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์นั้นจะเป็นการเติมสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงในสารตัวอย่างนิโอโซมแล้วคำนวณกลับมาเป็นค่าการได้กลับคืน (% recovery) จากผลการทดลองพบว่า มี % recovery อยู่ในช่วงระหว่าง 92.42- 102.69 แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 % Recovery ของฟีนาสเทอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่กักเก็บในนิโอโซม

Standard concentration (µg/mL)	% Recovery
50	102.69
100	93.32
150	92.42
200	94.75
250	95.25
300	96.61

4.1.2.4 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัดได้นั้น ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้โดยไม่มีสัญญาณรบกวน แล้วนำมาคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของฟีนาสเทอไรด์ พบว่า ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีสัญญาณรบกวนเท่ากับ 0.006 µg/mL และขีดจำกัดของการวัดปริมาณฟีนาสเทอไรด์ในตัวอย่างนิโอโซมที่วิเคราะห์ได้โดยมีความแม่นยำและความเที่ยงที่ยอมรับได้ภายใต้สภาวะการทดลองเท่ากับ 0.02 µg/mL

4.1.2.5 ความจำเพาะ (Selectivity; n=3)

การทดสอบความจำเพาะของวิธีทดสอบ สามารถวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์ที่เดิมสิ่งรบกวน คือ ดำรับนิโอโซมได้ โดยประเมินจากค่า retention time (RT) ของพีกเพื่อตรวจสอบว่าสิ่งรบกวนมีผลกระทบต่อค่า retention time ของพีกฟีนาสเทอไรด์ ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูงหรือไม่พบว่า มีค่า retention time เท่ากับ 5.998 นาที และมี %RSD เป็น 0.37 จากผลการทดลองนี้พบว่า สภาวะที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะกับฟีนาสเทอไรด์แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 Retention time ของฟินาสเทอไรด์เมื่อเติมสิ่งรบกวน

Finasteride concentration (µg/mL)	Retention time (min)
50	5.934
100	5.953
150	5.960
200	5.974
250	5.979
300	5.998
Average	5.966
SD	0.022
%RSD	0.373

4.2 การพัฒนาตำรับฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซม

4.2.1 ออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิว (Response surface methodology)

การพัฒนาตำรับฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมนั้นได้ออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวโดยใช้การออกแบบส่วนผสมกลาง (Response surface methodology with Central composite design; RSM - CCD) เพื่อหาปัจจัยของการพัฒนาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการผลิตโปรนิโอโซม การออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลโดยมีปัจจัยของตัวแปรอิสระ 3 ระดับ คือ (1) ปริมาณไขมันทั้งหมด (X_1), (2) ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอล (X_2) และ (3) ความเข้มข้นฟินาสเทอไรด์ (X_3) กำหนดค่าของตัวแปรอิสระดังนี้ X_1 มีค่าอยู่ระหว่าง 30-50 % X_2 มีค่าอยู่ระหว่าง 10-30 mM และ X_3 มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5-5 mM ค่าของตัวแปรเหล่านี้ได้จากการทดสอบเบื้องต้นและประเมินค่าการตอบสนองจาก (1) ขนาดอนุภาคของระบบนำส่ง (2) ร้อยละการบรรจุด้วยยา และ (3) ร้อยละการกักเก็บยา จากผลการทดลองพบว่า สภาวะการผลิตโปรนิโอโซมที่ได้มีทั้งหมด 20 ตำรับ โดยมีร้อยละของการกักเก็บยาอยู่ในช่วง 71.95-95.44 ร้อยละของการบรรจุยาอยู่ในช่วง 1.20 - 43.05 และระบบนำส่งขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 219-346 nm ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา และขนาดอนุภาคที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RSM-CCD

Run	Total lipid (mM)	Cholesterol content (%)	Finasteride concentration (mM)	%EE	%DL	Particles size (nm)
1	10.00	30.00	1.50	89.45	11.83	261.6
2	20.00	40.00	3.25	92.47	13.06	291.2
3	30.00	30.00	1.50	92.00	4.39	335.6
4	36.82	40.00	3.25	91.61	7.48	329.4
5	20.00	56.82	3.25	91.26	12.91	285.6
6	20.00	40.00	6.19	90.31	21.85	255.8
7	30.00	50.00	5.00	94.73	13.63	300.2
8	20.00	40.00	3.25	93.68	13.21	290.6
9	20.00	40.00	3.25	94.57	13.32	292.2
10	20.00	40.00	3.25	94.05	13.25	295.0
11	30.00	30.00	5.00	83.24	12.18	332.4
12	10.00	50.00	5.00	89.36	30.88	223.0
13	10.00	50.00	1.50	72.57	9.81	220.2
14	20.00	40.00	0.31	79.77	1.20	258.2
15	20.00	23.18	3.25	95.44	13.42	346.0
16	10.00	30.00	5.00	84.77	29.77	261.2
17	3.18	40.00	3.25	71.95	43.05	242.8
18	30.00	50.00	1.50	88.21	4.22	263.4
19	20.00	40.00	3.25	93.35	13.17	293.0
20	20.00	40.00	3.25	93.60	13.20	292.6

จากผลการทดลองข้างต้นสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของตัวแปรอิสระคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในคาร์ป ร้อยละของคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์กับค่าการตอบสนองเป็นสมการพหุนามกำลังสองคือ ร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยาและขนาดของอนุภาคและมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9522, 0.9517, และ 0.9607 ตามลำดับ ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละการกักเก็บยา} = & 93.62 + 3.78 X_1 - 0.85 X_2 + 2.02 X_3 + 2.50 X_1 X_2 - 1.79 X_1 X_3 + 4.59 X_2 X_3 - 3.79 X_1^2 - \\ & 0.068 X_2^2 - 3.01 X_3^2 \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละการบรรจุยา} = & 13.28 - 7.88 X_1 - 0.036 X_2 + 6.66 X_3 + 0.27 X_1 X_2 - 2.73 X_1 X_3 + 0.59 X_2 X_3 + 3.79 X_1^2 - \\ & 0.49 X_2^2 - 1.07 X_3^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

$$\begin{aligned} \text{ขนาดอนุภาค} = & 292.80 + 30.11 X_1 - 20.91 X_2 + 2.34 X_3 - 3.10 X_1 X_2 + 3.90 X_1 X_3 + 5.40 X_2 X_3 - 4.61 X_1^2 + \\ & 5.89 X_2^2 - 14.90 X_3^2 \end{aligned} \quad (4.3)$$

สมการพหุนามกำลังสอง (quadratic) ที่แสดงดังกล่าวข้างต้น เป็นแบบจำลองของสมการทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมที่สุด สามารถพิจารณาได้จากค่า R^2 ค่า R^2_{adj} ค่า P -value ของ Lack of fit แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการพหุนามกำลังสองของร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา และขนาดของอนุภาค

Source	SS	df	MS	F-value	Prob> F
<u>Entrapment efficiency</u>					
Model	817.82	9	90.87	22.12	<0.0001
Residual	41.09	10	4.11		
Lack of fit	78.51	5	15.70	4.99	0.0513
Pure error	2.49	5	0.50		
Cor total	858.90	19			
$R^2 = 0.9522$	$R^2_{adj} = 0.9091$				
<u>Drug loading capacity</u>					
Model	1723.18	9	191.52	21.10	<0.0001
Residual	90.16	10	9.08		
Lack of fit	74.61	5	14.92	4.62	0.0592
Pure error	16.15	5	3.23		
Cor total	1814.43	19			
$R^2 = 0.9517$	$R^2_{adj} = 0.9082$				
<u>Particles size</u>					
Model	22709.67	9	2523.30	22.14	<0.0001
Residual	1139.93	10	113.99		
Lack of fit	946.46	5	189.29	4.89	0.0531
Pure error	11.87	5	2.37		
Cor total	23849.60	19			
$R^2 = 0.9607$	$R^2_{adj} = 0.9254$				

ตารางที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้ว (R^2_{adj}) ในทุกค่าการตอบสนองที่ได้จากร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา และขนาดของอนุภาคมีค่าสูงและเข้าใกล้ 1 ซึ่งเป็นค่าที่น่าพอใจ แสดงว่าตัวแปรอิสระมีผลต่อค่าการตอบสนอง เมื่อพิจารณาค่า P -value ของ Lack of fit พบว่า ค่าที่ได้ไม่นั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) บ่งบอกได้ว่าตัวแปรในสมการมีความพอเพียงในการอธิบายอันตรกิริยา

ระหว่างตัวแปร เมื่อพิจารณาค่า *F*-value ของค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร (regression coefficient) ที่ได้จากการข้างต้น แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ regression coefficient ของร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา และขนาดของอนุภาค

Variables	Entrapment efficiency		Drug loading capacity		Particles size	
	Regression	<i>F</i> -value	Regression	<i>F</i> -value	Regression	<i>F</i> -value
	coefficient		coefficient		coefficient	
Intercept	93.63	-	13.28	-	292.80	-
Linear						
X_1	3.78	47.49	-7.88	94.89	30.11	131.43
X_2	-0.85	2.42	-0.036	1.926E-003	-20.91	63.38
X_3	2.02	13.56	6.66	67.65	2.34	0.79
Quadratic						
X_1^2	2.50	12.16	0.27	0.066	-3.10	0.82
X_2^2	-1.79	6.27	-2.73	6.64	3.90	1.29
X_3^2	4.59	41.07	0.59	0.32	5.40	2.48
Interaction						
X_1X_2	-3.79	50.47	3.79	23.08	-4.61	3.25
X_1X_3	-0.068	0.016	-0.49	0.39	5.89	5.31
X_2X_3	-3.01	31.74	-1.07	1.85	-14.90	33.94

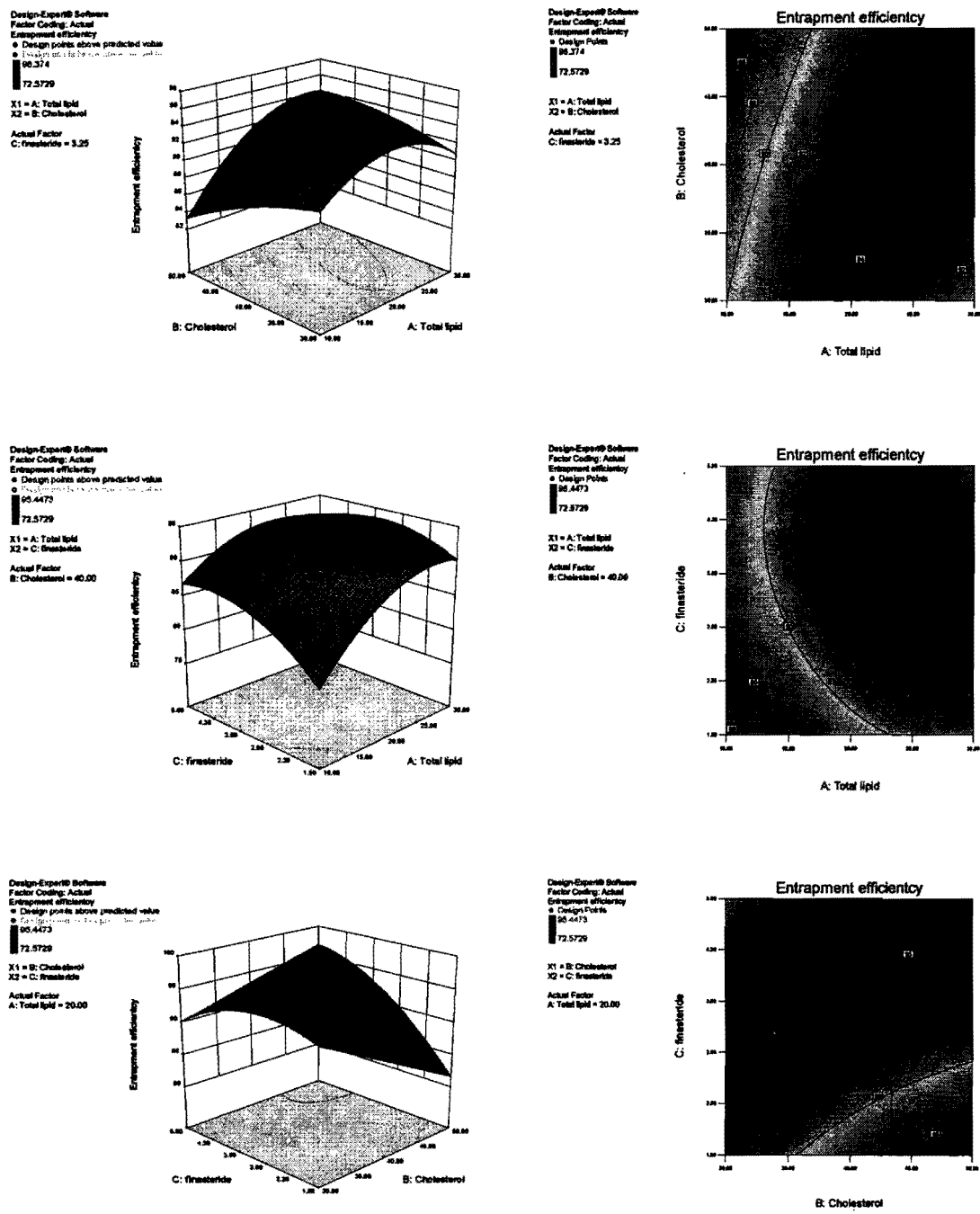
ตารางที่ 4.7 เมื่อพิจารณา *F*-value ของค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรพบว่า ปัจจัยของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยามากที่สุดคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับ (X_1) และความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ (X_3) ส่วนร้อยละของคอเรสเตอรอล (X_2) ไม่มีผลต่อค่าตอบสนองทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อขนาดอนุภาคมากที่สุดคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับ (X_1) และร้อยละของคอเรสเตอรอล (X_2) ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ (X_3) ไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำสมการถดถอยมาหาอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุด ภายใต้การกำหนดเงื่อนไข แสดงดังตารางที่ 4.8

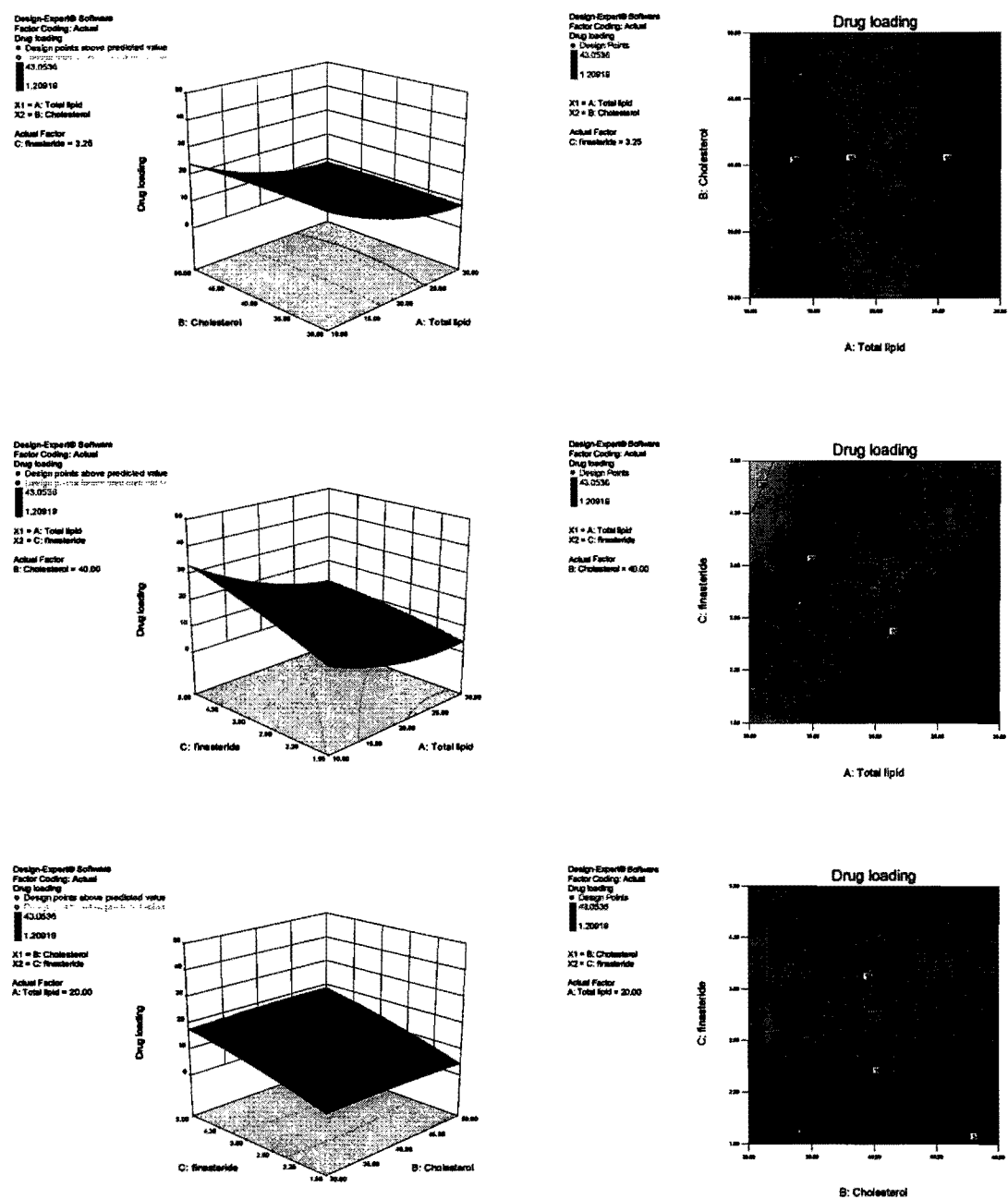
ตารางที่ 4.8 กำหนดเกณฑ์ของระดับปัจจัยที่มีผลต่อค่าตอบสนองเพื่อวิเคราะห์หาค่าที่เหมาะสม

Factor	Target	Min	Max
<u>Independent variables</u>			
Cholesterol content	Range	30.00	50.00
Total lipid (mM)	Range	10.00	30.00
Finasteride concentration (mM)	Range	1.50	5.00
<u>Depndent variables</u>			
Entrapment efficiency	Max	72.57	95.44
Drug loading capacity	Max	1.20	43.05
Particles size	Max	219.00	346.00

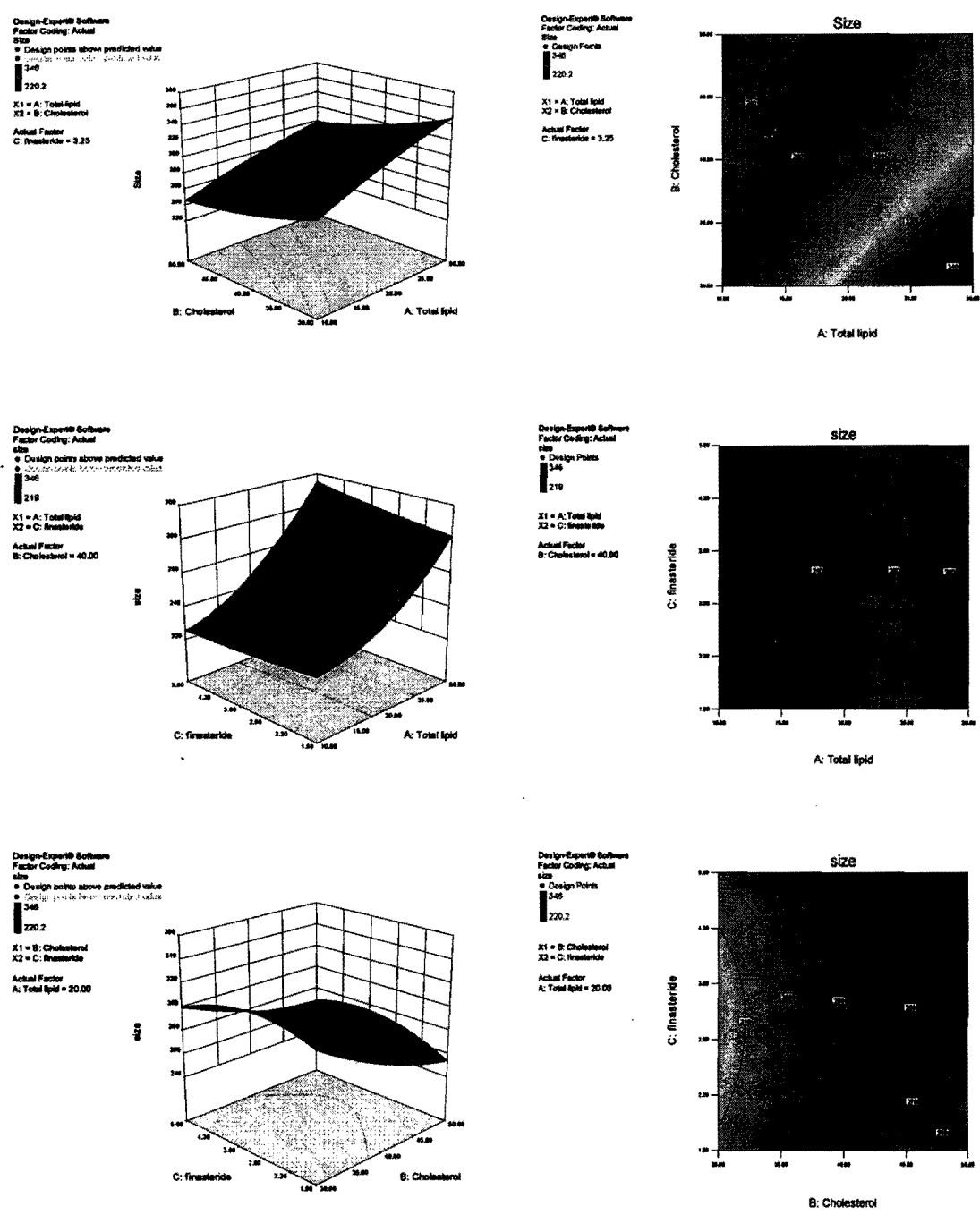
เมื่อพิจารณาสมการถดถอยตามเงื่อนไขดังกล่าวสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรนีโอโซมให้มีปริมาณร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยาสูงที่สุด และมีขนาดอยู่ในช่วง 300 - 400 nm คือ ความเข้มข้นของคอเรสเตอร์อลเท่ากับ 39.03 % ไขมันทั้งหมดในตำรับเท่ากับ 20.26 mM และความเข้มข้นของฟีนาสเทอไรด์เท่ากับ 3.39 mM ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมนี้สามารถแสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของตัวแปรอิสระกับค่าตอบสนองเป็นกราฟสามมิติ และกราฟโครงร่าง (contour) แสดงดังภาพที่ 4.6 - 4.8



ภาพที่ 4.6 กราฟสามมิติและกราฟโครงร่างแสดงไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟินาสเตอไรด์ซึ่งมีผลต่อร้อยละการกักเก็บยา



ภาพที่ 4.7 กราฟสามมิติและกราฟโครงร่างแสดงไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟินาสเทอไรด์ซึ่งมีผลต่อร้อยละการบรรจุยา



ภาพที่ 4.8 กราฟสามมิติและกราฟโครงร่างแสดงไขมันทั้งหมดในคำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟินาสเทอไรด์ซึ่งมีผลต่อขนาดอนุภาค

ภาพที่ 4.6 แสดงไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ซึ่งมีผลต่อร้อยละการกักเก็บยาพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์จะทำให้ร้อยละการกักเก็บยามีค่าเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มปริมาณของคอเรสเตอรอลจะทำให้ค่าร้อยละการกักเก็บยานั้นมีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในสมการและผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน โดยจุดที่แสดงในกราฟสามมิติและกราฟโครงร่างจะแสดงสถานะที่เหมาะสมของตำรับฟีนาสเทอไรด์

ภาพที่ 4.7 แสดงไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ซึ่งมีผลต่อร้อยละการบรรจุยาพบว่า เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของฟีนาสเทอไรด์จะทำให้ค่าร้อยละการบรรจุยาเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับจะทำให้ร้อยละการบรรจุยาลดลง และปริมาณของคอเรสเตอรอลไม่ส่งผลให้ร้อยละของการบรรจุยาเปลี่ยนแปลง ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในสมการและผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

ภาพที่ 4.8 แสดงไขมันทั้งหมดในตำรับ ร้อยละของปริมาณคอเรสเตอรอลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ซึ่งมีผลต่อขนาดอนุภาคพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์จะทำให้ขนาดของอนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของคอเรสเตอรอลจะทำให้ขนาดของอนุภาคลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในสมการและผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

จากนั้นจึงนำสถานะที่เหมาะสมนี้ไปทดลองซ้ำและเปรียบเทียบค่าที่ได้จริงกับค่าที่ได้จากการทำนาย ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.9 จากผลการทดลองพบว่า ค่าร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา และขนาดอนุภาคที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกันและเมื่อพิจารณาค่าอคติ (Bias) พบว่า มีค่าเป็น 0.15 % 0.68 % และ 0.11 % ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายภายใต้สถานะที่เหมาะสม (n=3)

คำตอบสนองปัจจัย	ค่าที่ได้จากการทดลอง	ค่าที่ได้จากการทำนาย	ค่าอคติ (Bias)*
ร้อยละการกักเก็บยา	94.47 ± 1.67	94.62 ± 0.93	0.150
ร้อยละการบรรจุยา	13.14 ± 0.18	13.23 ± 1.12	0.676
ขนาดอนุภาค	292 ± 0.85	293 ± 0.79	0.106

*Bias คำนวณจาก [(ค่าที่ได้จากการทำนาย – ค่าที่ได้จากการทดลอง)/ค่าที่ได้จากการทำนาย] × 100

เมื่อนำตำรับนิโอโซมไปวัดขนาดอนุภาค ค่าการกระจายขนาดและค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค เพื่อเปรียบเทียบระหว่างนิโอโซมเปล่ากับนิโอโซมที่กักเก็บด้วยยาพบว่า ขนาดอนุภาคที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันและมีค่าการกระจายขนาดที่แคบ นอกจากนี้ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคที่วัดได้แสดงถึงตำรับโปรนิโอโซมที่เตรียมได้นั้นมีความคงตัวดี แสดงผลดังตารางที่ 4.10

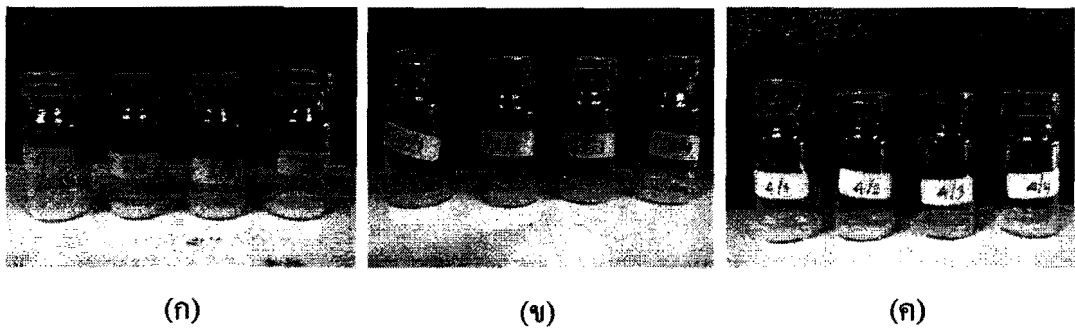
ตารางที่ 4.10 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายขนาดและค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (n=3)

สูตรตำรับ	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าการกระจายขนาด	ค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค(mV)
นิโอโซมเปล่า	287.00 ± 3.05	0.24 ± 0.059	-33.40 ± 0.98
นิโอโซมที่กักเก็บยา	292.00 ± 0.85	0.33 ± 0.010	-31.60 ± 1.08

4.2.2 ทดสอบความคงตัวของฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม

4.2.2.1 ทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม เมื่อเก็บภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นเวลา 4 เดือน เพื่อประเมินลักษณะทางกายภาพของโปรนิโอโซม จากการทดลองนี้จะทำให้ทราบได้ว่าอุณหภูมิและความชื้นมีผลต่อความคงตัวของฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมที่เตรียมขึ้นหรือไม่ แสดงผลดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 ลักษณะทางกายภาพของโปรนิโอโซมที่อุณหภูมิ (ก) 4 °C (ข) 25 °C 75%RH และ (ค) 40 °C 75% RH (n= 4)

จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิและความชื้นไม่มีผลต่อความคงตัวทางกายภาพของตำรับที่พัฒนาขึ้น โดยสีของโปรตีนไฮโซมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง มีลักษณะเป็นเจลขุ่นสีขาว (White creamy gel) และไม่เกิดการแยกชั้นของเอทิลแอลกอฮอล์ออกมาจากตำรับตลอดระยะเวลา 4 เดือนที่ทำการทดลอง

เมื่อนำตำรับไปวัดขนาด การกระจายขนาดของอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค แสดงผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ขนาดอนุภาคเฉลี่ย การกระจายขนาดของอนุภาค และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นระยะเวลา 4 เดือน (n = 4)

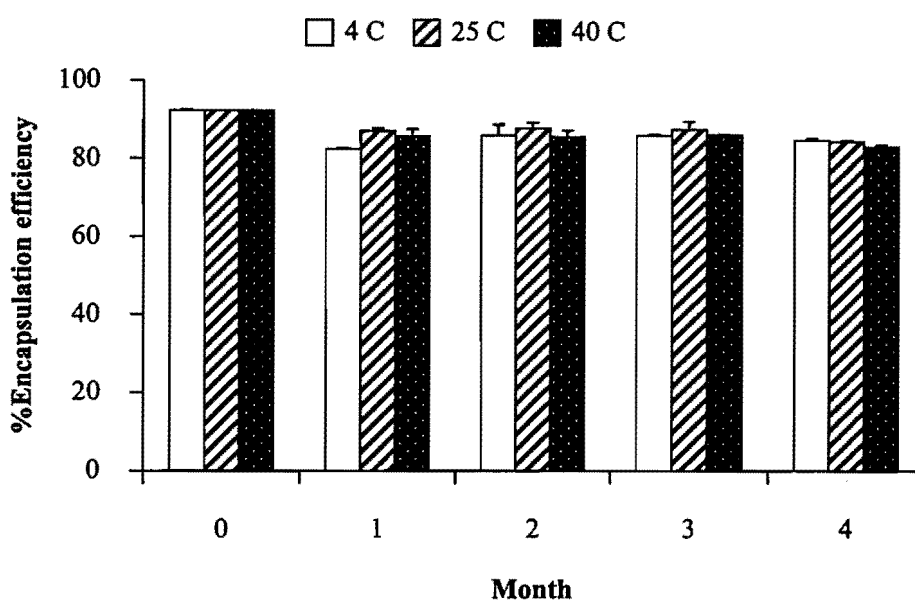
เดือน	ความคงตัว	อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์		
		4 °C	25 °C 75%RH	40 °C 75% RH
0	Size (nm)	312±5.97	325±4.70	335±5.44
	PDI	0.40±0.04	0.46±0.03	0.45±0.02
	Zeta potential (mV)	-31.43±0.97	-32.38±1.33	-32.23±1.32
1	Size (nm)	316±3.87*	321±2.50*	327±4.22*
	PDI	0.42±0.05*	0.38±0.03*	0.44±0.04*
	Zeta potential (mV)	-34.30±3.92*	-32.85±1.91*	-36.53±1.78*
2	Size (nm)	308±4.99*	315±3.54*	329±4.38*
	PDI	0.45±0.02*	0.43±0.02*	0.43±0.08*
	Zeta potential (mV)	-26.00±3.12*	-34.25±1.40*	-32.30±1.53*
3	Size (nm)	316±2.05*	323±2.52*	331±0.25*
	PDI	0.41±0.05*	0.43±0.07*	0.45±0.03*
	Zeta potential (mV)	-31.55±1.82*	-30.48±0.75*	-30.45±1.48*
4	Size (nm)	319±5.45*	327±3.87*	336±3.22*
	PDI	0.45±0.03*	0.46±0.04*	0.43±0.07*
	Zeta potential (mV)	-30.70±0.75*	-30.78±0.90*	-30.63±0.42*

แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n = 4)
*ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (เดือนที่ 0)

จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิทุกอุณหภูมิมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 300- 340 nm มีค่าการกระจายขนาดอนุภาคเฉลี่ย 0.437 ± 0.041 และเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับ โพรนิโอโซมที่เตรียมในวันแรกพบว่า ขนาดอนุภาคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) นอกจากนี้เมื่อวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเฉลี่ยตลอดเวลา 4 เดือนที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH พบว่า มีค่าเท่ากับ -30.80 ± 2.12 mV -32.15 ± 1.26 mV และ -32.42 ± 1.31 mV ตามลำดับ

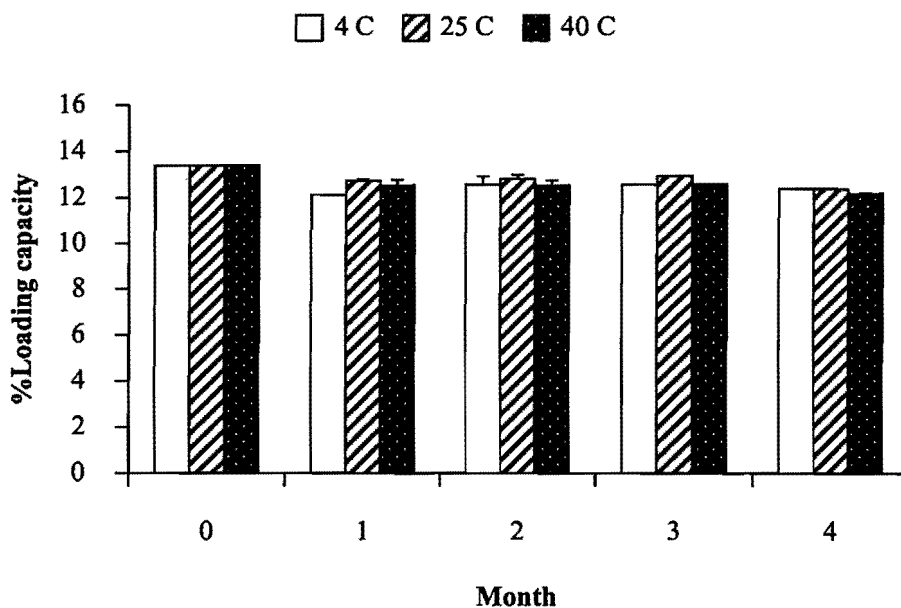
4.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์ในโพรนิโอโซม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์ในโพรนิโอโซม เป็นการประเมินความสามารถของระบบนำส่งในการกักเก็บยา และการบรรจุฟีนาสเตอไรด์ในตำรับโพรนิโอโซม เมื่อเก็บภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นเวลา 4 เดือน แสดงผลดังภาพที่ 4.10 และภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงร้อยละการกักเก็บตัวยาที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH ระยะเวลา 4 เดือน (n = 4)

ภาพที่ 4.10 แสดงร้อยละการกักเก็บฟีนาสเตอไรด์ใน โพรนิโอโซมเมื่อเก็บภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นเวลา 4 เดือนเปรียบเทียบกับตำรับที่เตรียมในวันแรก ซึ่งมีร้อยละการกักเก็บยาเฉลี่ยเท่ากับ $92.34 \pm 0.13\%$ พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH มีร้อยละการกักเก็บยาเฉลี่ยเท่ากับ $84.69 \pm 0.88\%$, $86.69 \pm 1.04\%$ และ $85.13 \pm 1.00\%$ ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 25 °C 75%RH มีร้อยละการกักเก็บยาสูงที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 40 °C 75% RH และที่อุณหภูมิ 4 °C ตามลำดับ



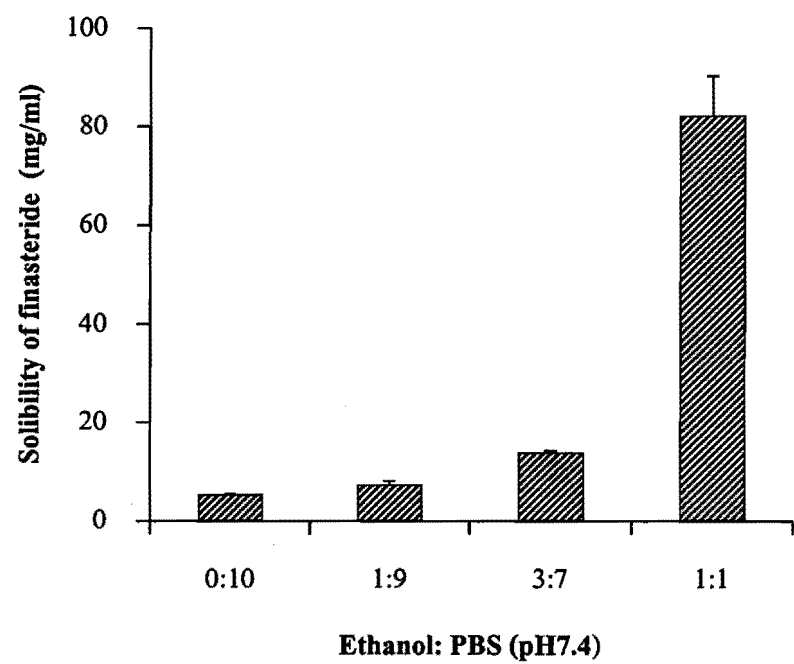
ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงร้อยละการบรรจุยาที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH ระยะเวลา 4 เดือน (n = 4)

ภาพที่ 4.11 แสดงร้อยละการบรรจุยาในตำรับ โพรนิโอโซม เมื่อเก็บภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นเวลา 4 เดือนเปรียบเทียบกับตำรับที่เตรียมในวันแรก ซึ่งมีร้อยละการบรรจุยาเฉลี่ยเท่ากับ $13.38 \pm 0.02\%$ พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH มีร้อยละการบรรจุยาเฉลี่ยเท่ากับ $12.40 \pm 0.11\%$, $12.70 \pm 0.08\%$ และ 12.46 ± 0.12 ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 25 °C 75%RH มีร้อยละการบรรจุยามากที่สุด รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 40 °C 75% RH และที่อุณหภูมิ 4 °C ตามลำดับ

4.3 ทดสอบการปลดปล่อยยา การซึมผ่านทางผิวหนังและการซึมผ่านทางรูขุมขนของฟินาสเทอไรด์
โปรนิโอโซม

4.3.1 ทดสอบการละลายของฟินาสเทอไรด์

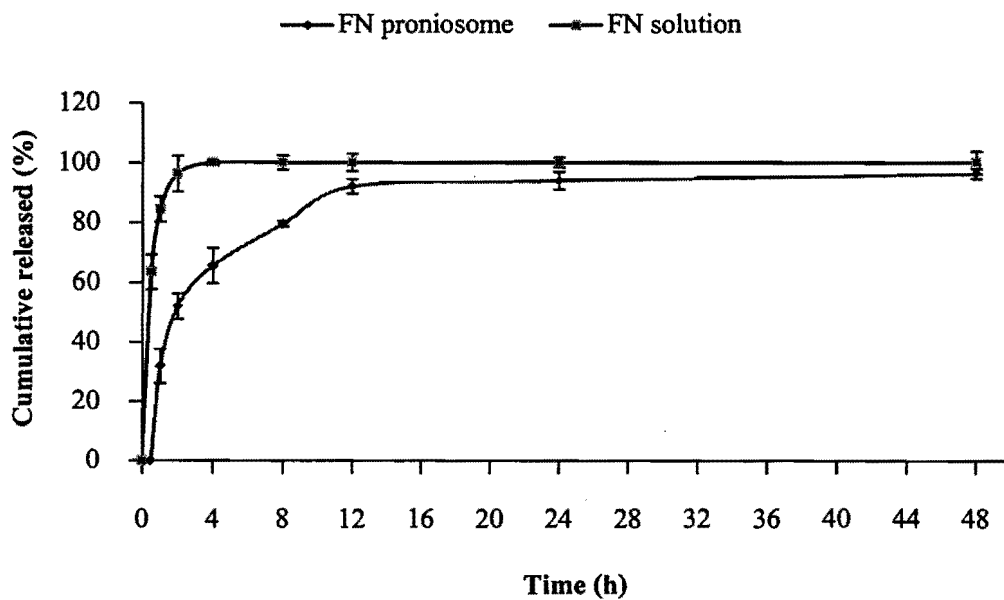
ฟินาสเทอไรด์เป็นยาที่มีการละลายในน้ำได้ต่ำ จำเป็นต้องหาตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมในการเพิ่มค่าชี้วัดการละลายของตัวยา เพื่อให้การปลดปล่อยตัวยาเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ จากการทดลองพบว่า ฟินาสเทอไรด์สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ จึงได้เลือกใช้ตัวทำละลายชนิดนี้โดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) จากการทดลองการละลายของฟินาสเทอไรด์ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยปริมาตรพบว่า อัตราส่วน 0:10, 1:9, 3:7 และ 5:5 มีค่าชี้วัดการละลายของฟินาสเทอไรด์เท่ากับ 5.27 ± 0.20 mg/mL, 7.25 ± 0.89 mg/mL, 13.80 ± 0.45 mg/mL และ 82.18 ± 4.10 mg/mL ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.12 ค่าชี้วัดการละลายของฟินาสเทอไรด์ในสารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4, 32 °C, 100 rpm, n =3)

4.3.2 ทดสอบการปลดปล่อยด้วยเทคนิคไดอะไลซิส

การทดสอบการปลดปล่อยเพื่อให้ทราบถึงอัตราเร็วในการปลดปล่อยยาออกจากโปรนิโอโซมและต่อเนื่องไปจนถึงการละลายของตัวยาในสารละลายตัวกลาง จากการทดลองการปลดปล่อยฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมเทียบกับการปลดปล่อยยาฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบสารละลายโดยใช้สารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (1:1, pH 7.4) ปริมาตร 20 mL เป็นสารละลายตัวกลาง เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ อัตราเร็ว 100 rpm ผลการทดลองดังภาพที่ 4.13



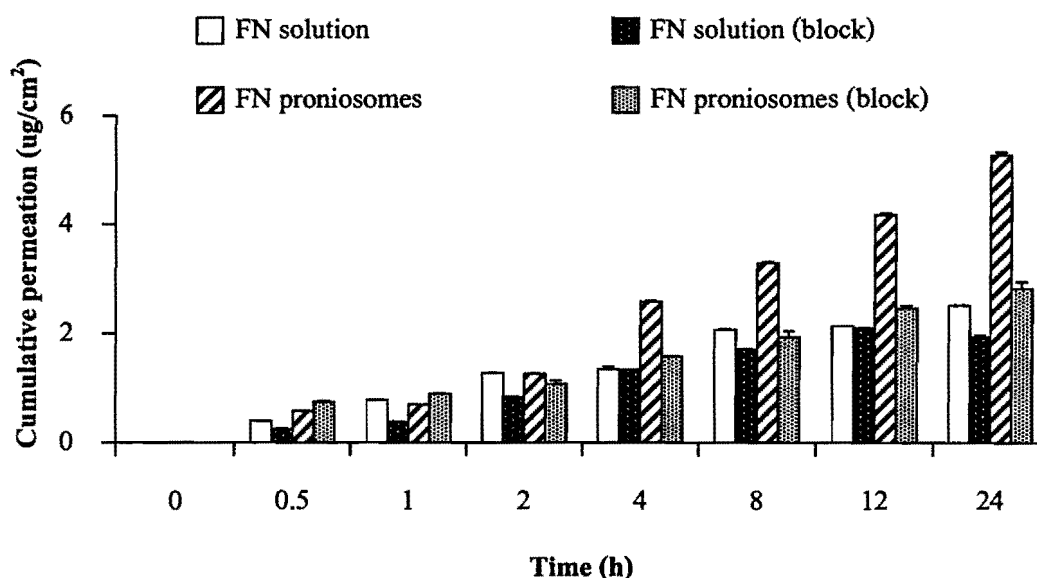
ภาพที่ 4.13 การปลดปล่อยฟีนาสเทอไรด์จากคำรับโปรนิโอโซมด้วยเทคนิคไดอะไลซิส (MW cut off 12,000-14,000, 32°C , 100 rpm, $n=5$)

ภาพที่ 4.13 พบว่า การปลดปล่อยฟีนาสเทอไรด์ออกจากคำรับโปรนิโอโซมในช่วงครึ่งชั่วโมงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 4 จะมีการปลดปล่อยตัวยาออกมาอย่างรวดเร็ว โดยปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมามีประมาณร้อยละ 30 – 80 ของปริมาณยาทั้งหมด และเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 8 และในชั่วโมงที่ 48 มีการปลดปล่อยตัวยาประมาณร้อยละ 98 ของปริมาณยาทั้งหมด เมื่อเทียบกับฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบสารละลายพบว่า ในเวลาเพียง 2 ชั่วโมงมีการปลดปล่อยฟีนาสเทอไรด์ออกมาอย่างรวดเร็วเกือบร้อยละ 100

4.3.3 ทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังและการซึมผ่านทางรูขุมขนด้วยเทคนิค Franz

diffusion cell

การทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังของลูกสุกรตายแรกเกิด เป็นการประเมินความสามารถในการซึมผ่านชั้นผิวหนังของคาร์บิโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้น โดยคาร์บิโปรนิโอโซมมีความเข้มข้นของฟีนาสเทอไรด์เท่ากับ 3.39 mM และเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Franz diffusion cell ที่อุณหภูมิ $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และสุ่มเก็บตัวอย่างในระยะเวลา 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.14



ภาพที่ 4.14 ปริมาณฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมที่ซึมผ่านชั้นผิวหนังลูกสุกรแรกเกิด (32°C , $n=3$, EtOH:PBS (pH 7.4 (1:1)))

จากผลการทดลองพบว่า การซึมผ่านของฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ดีกว่าในรูปแบบของสารละลาย และเมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณฟีนาสเทอไรด์ในสารละลายตัวกลางเท่ากับ $5.26 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ แต่สารละลายฟีนาสเทอไรด์พบเพียง $2.51 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

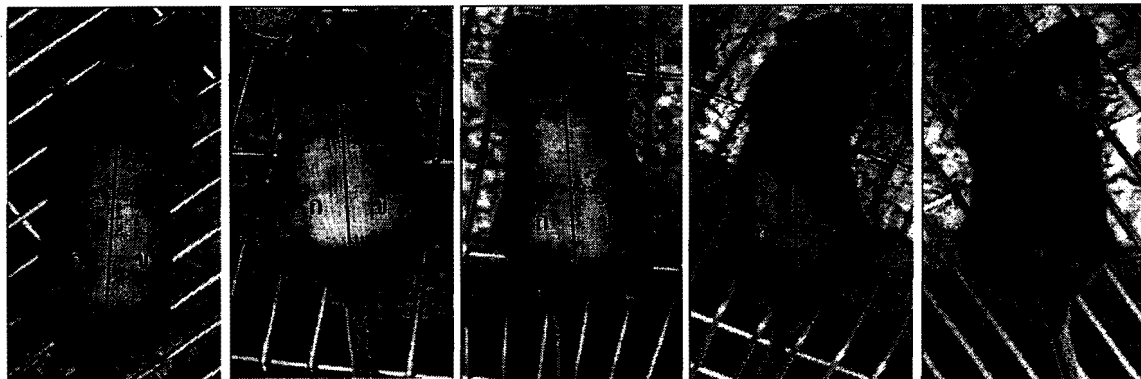
การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของคาร์บิฟนาสเดอไรด์ เป็นการประเมินประสิทธิภาพในการซึมผ่านทางรูขุมขนโดยมีการใช้น้ำยาเคลือบเล็บปิดช่องทางการซึมผ่านทางรูขุมขน ซึ่งสารสามารถซึมผ่านช่องทางทางผิวหนังได้เพียงเส้นทางเดียว จึงสามารถเปรียบเทียบการซึมผ่านทางรูขุมขนของคาร์บิฟนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมเทียบกับสารละลายฟิโนสเดอไรด์ได้ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อมีการปิดรูขุมขนปริมาณฟิโนสเดอไรด์ที่พบในสารละลายตัวกลางจะลดลง โดยในช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมงที่ คาร์บิฟนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมพบปริมาณฟิโนสเดอไรด์ในสารละลายตัวกลางเท่ากับ $2.83 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ สำหรับคาร์บิฟนาสเดอไรด์พบปริมาณฟิโนสเดอไรด์เท่ากับ $1.94 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟิโนสเดอไรด์ที่สามารถซึมผ่านทางรูขุมขนพบว่า คาร์บิฟนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมมีปริมาณฟิโนสเดอไรด์ที่ซึมผ่านทางรูขุมขนเท่ากับ $2.43 \pm 0.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และคาร์บิฟนาสเดอไรด์มีปริมาณฟิโนสเดอไรด์ที่ซึมผ่านทางรูขุมขนเท่ากับ $0.67 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ซึ่งการเตรียมคาร์บิฟนาสเดอไรด์ให้อยู่ในรูปแบบของโปรนิโอโซมสามารถเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขนได้

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของฟิโนสเดอไรด์โปรนิโอโซมและการทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง

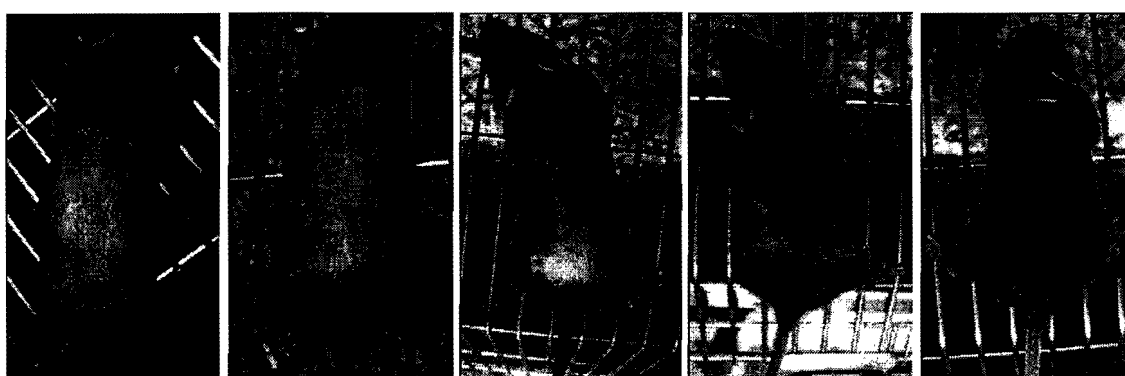
4.4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของฟิโนสเดอไรด์โปรนิโอโซม

การทดสอบประสิทธิภาพของคาร์บิฟนาสเดอไรด์โปรนิโอโซมนั้นได้ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1% ของฟิโนสเดอไรด์และ 1% สารละลายฟิโนสเดอไรด์เทียบกับกลุ่มควบคุม (positive control) คือ 2% สารละลายไมนอกซิดิล (Regaine[®]) และกลุ่มควบคุมผลลบจะแบ่งพื้นที่เป็นซ้ายและขวาโดยข้างซ้ายไม่มีการทาสารใด ส่วนข้างขวาทาโปรนิโอโซมเปล่า เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของคาร์บิฟนาสเดอไรด์ที่ส่งผลต่อการเจริญของเส้นขน โดยสังเกตจากความเข้มของสีขนที่เกิดขึ้นใหม่และศึกษาเนื้อเยื่อของผิวหนังหนุ เพื่อประเมินระยะการเจริญของเส้นขน (hair cycle) และจำนวนของ hair follicle ที่พบในผิวหนัง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากผลการทดลองสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 4.15 และภาพที่ 4.16

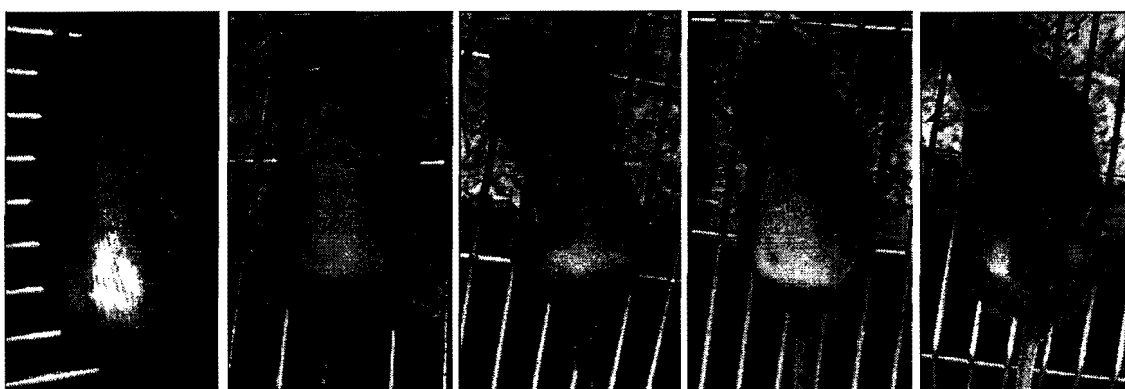
(ก) กลุ่มควบคุม (ก: ไม่ทาสารใด, ข: โพรนิโอโซมเปล่า)



(ข) 2% สารละลายไมนอกซิดิล



(ค) 0.1% ฟีนาสโตรอยด์โพรนิโอโซม



สัปดาห์ที่ 0

สัปดาห์ที่ 1

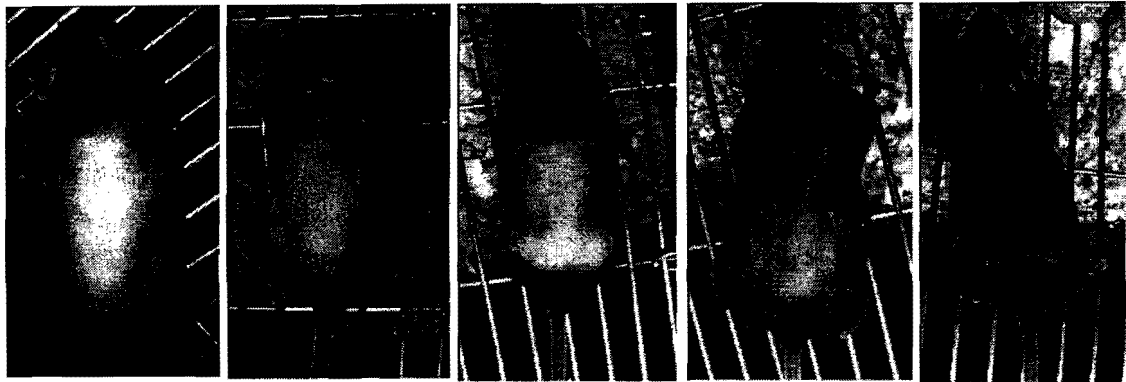
สัปดาห์ที่ 2

สัปดาห์ที่ 3

สัปดาห์ที่ 4

ภาพที่ 4.15 การเจริญของเส้นขนหนู

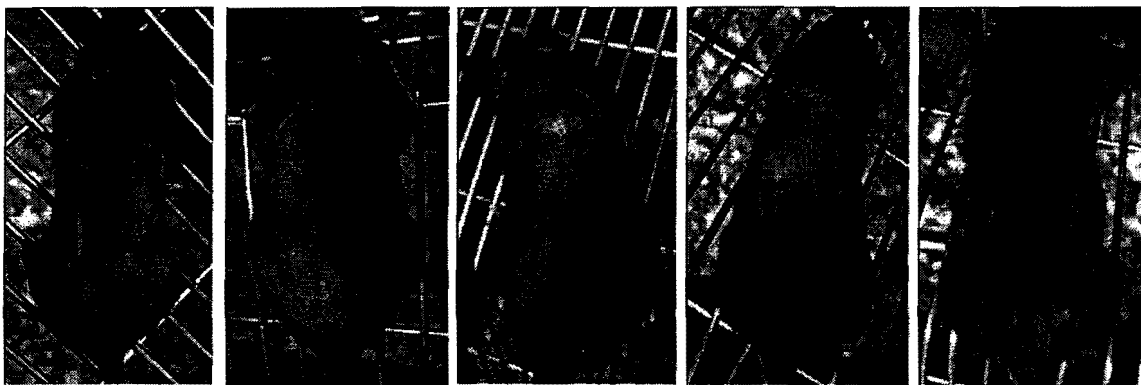
(ง) 0.5% ฟีนาสเทอโรลโปรนิโอโซม



(จ) 1% ฟีนาสเทอโรลโปรนิโอโซม



(ฉ) 1% สารละลายฟีนาสเทอโรล



สัปดาห์ที่ 0

สัปดาห์ที่ 1

สัปดาห์ที่ 2

สัปดาห์ที่ 3

สัปดาห์ที่ 4

ภาพที่ 4.15 การเจริญของเส้นขนหนู (ต่อ)

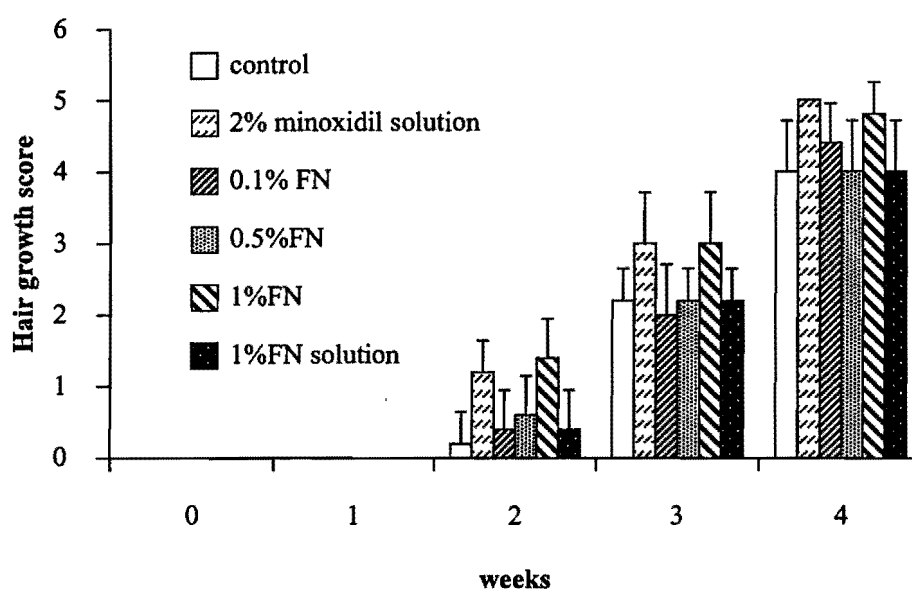
จากผลการทดลองประสิทธิภาพของฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมพบว่า ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 1 หลังจากโกนขนหนูถีบจักรยังไม่มีอาการเจริญของเส้นขนในทุกกลุ่มการทดลอง

ในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า หนูถีบจักรในกลุ่มที่ทาครีม 2% สารละลายไมนอกซิดิล 1% ฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซม และ 1% สารละลายฟีนาสเตอไรด์ เริ่มมีอาการเจริญของเส้นขน คิดเป็นร้อยละ 20 ของพื้นที่ทดสอบ โดยจะมีขนสีดำเกิดขึ้น สำหรับกลุ่มควบคุมทั้งสองข้าง (ก และ ข) 0.1% และ 0.5% ของฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมยังไม่มีอาการเจริญของเส้นขน

ในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า หนูถีบจักรในกลุ่มควบคุม (ก และ ข) กลุ่มที่ทาครีม 0.1% 0.5% ฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซม และ 1% สารละลายฟีนาสเตอไรด์ เริ่มสังเกตเห็นการเจริญของเส้นขนคิดเป็นร้อยละ 20 - 40 ของพื้นที่ทดสอบ ในกลุ่มที่ทาครีม 2% สารละลายไมนอกซิดิล และ 1% ฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซม สังเกตเห็นการเจริญของเส้นขนอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยมีอาการเจริญของเส้นขนคิดเป็นร้อยละ 40 - 60 ของพื้นที่ทดสอบ และเส้นขนที่ขึ้นใหม่มีสีดำเข้ม

ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า หนูถีบจักรในกลุ่มควบคุม (ก และ ข) เกิดขนสีดำเข้มเล็กน้อย สังเกตเห็นการเจริญของเส้นขนเป็นร้อยละ 40 - 60 ของพื้นที่ทดสอบ กลุ่มที่ทาครีมทดสอบ 0.1%, 0.5% ฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมและ 1% สารละลายฟีนาสเตอไรด์ มีอาการเจริญของเส้นขนคิดเป็นร้อยละ 60 - 80 ของพื้นที่ทดสอบ สำหรับกลุ่มที่ทา 2% สารละลายไมนอกซิดิลและ 1 % ฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซม มีอาการเจริญของเส้นขนเต็มพื้นที่ทดสอบ ขนมีสีดำเข้มมีอาการเจริญของเส้นขนมากกว่าร้อยละ 80 ของพื้นที่ทดสอบ

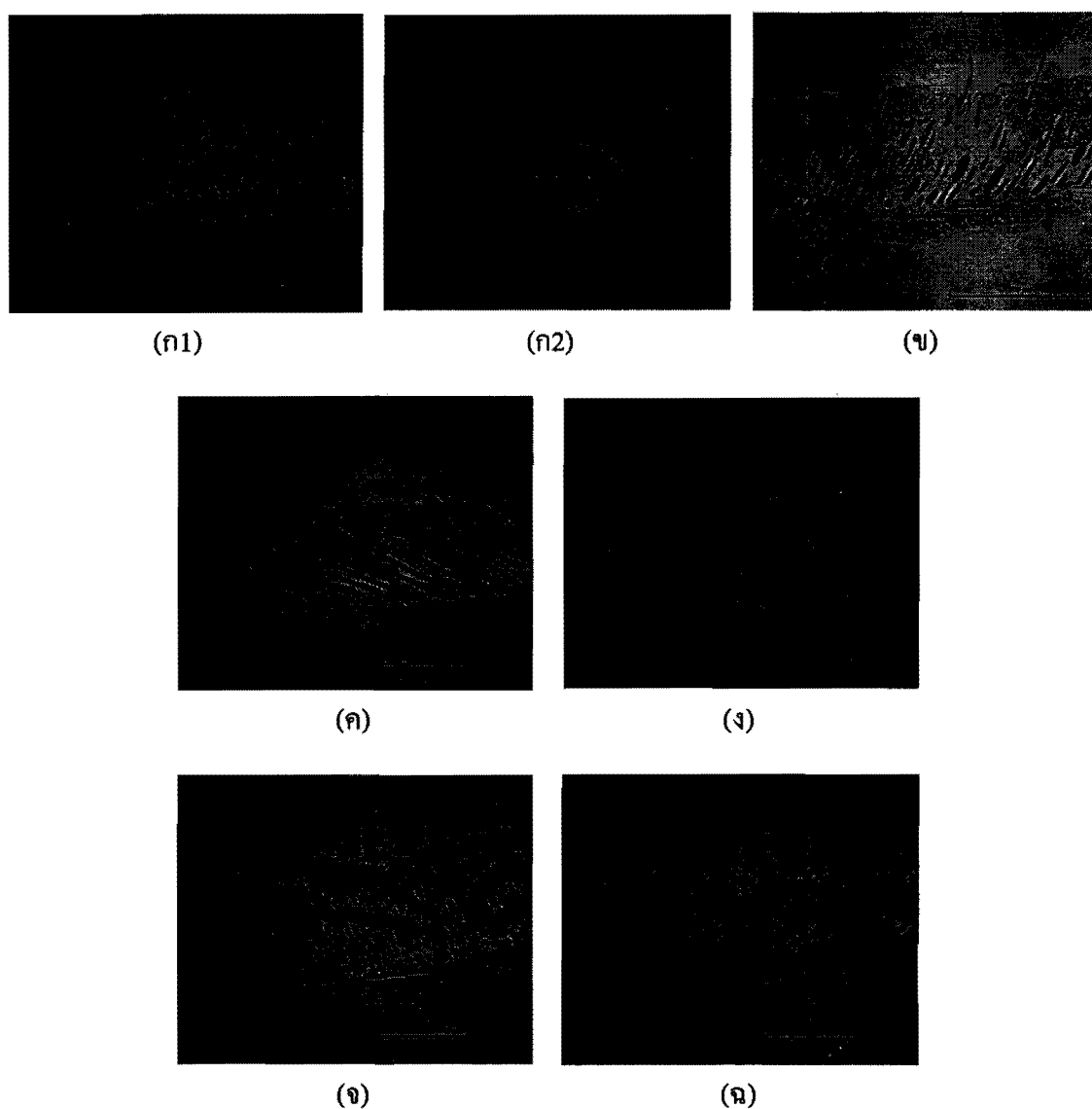
จากการสังเกตการเจริญของเส้นขนของหนูถีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac อายุ 7 สัปดาห์ เมื่อนำมาประเมินตามเกณฑ์การเจริญของเส้นขน แสดงได้ดังภาพที่ 4.17



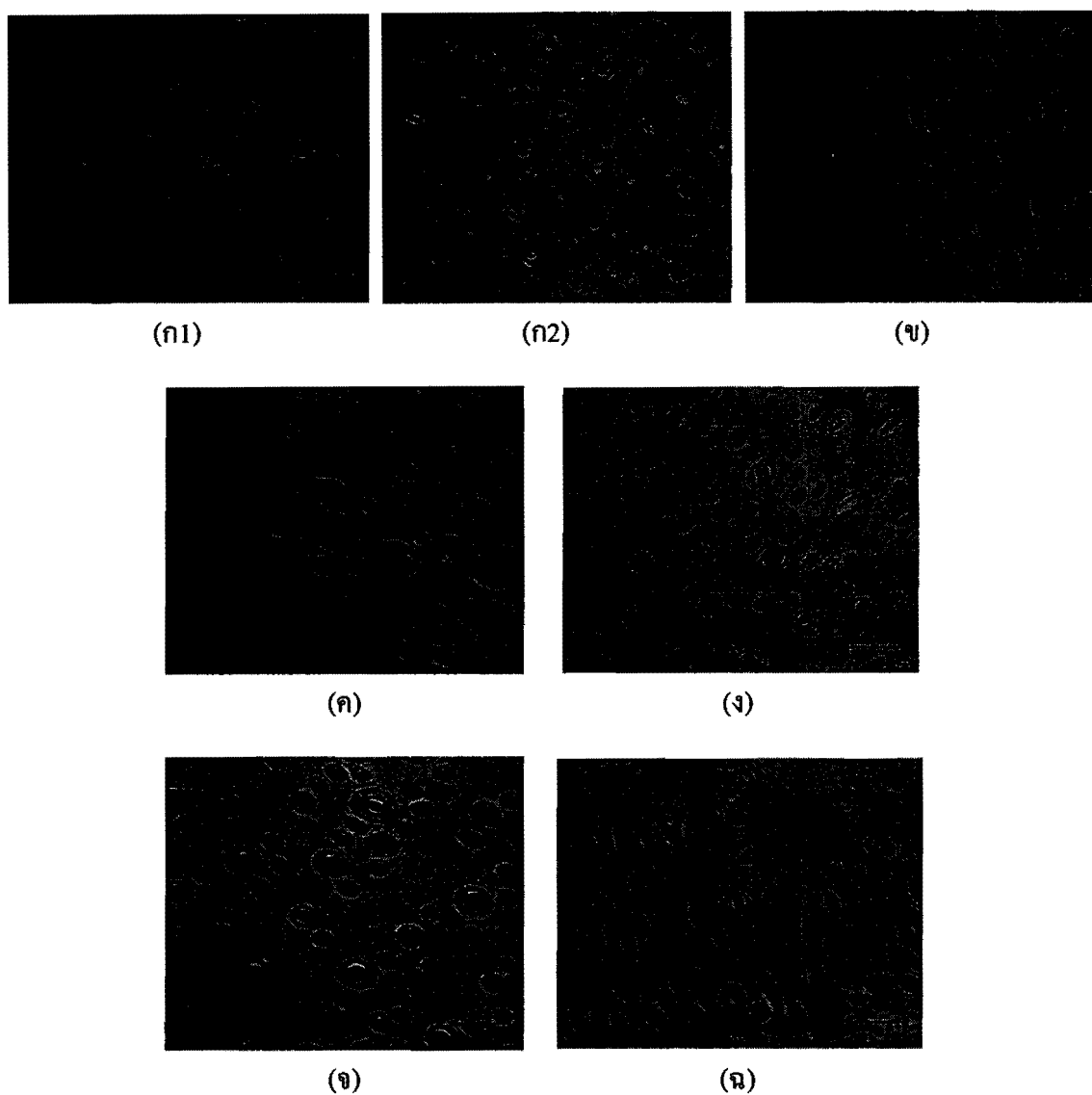
ภาพที่ 4.16 กราฟการเจริญของเส้นขนของหนูถีบจักร เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบและประเมินตามเกณฑ์การเจริญของเส้นขน (n = 5)

กราฟแสดงการเจริญของเส้นขนของหนูถีบจักรหลังจากโกนขนและทาสารทดสอบกลุ่มต่าง ๆ ทั้งหมด 6 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มควบคุม (2) 2% สารละลายไมนออกซิดิล (3) 0.1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม (4) 0.5% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม (5) 1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม และ (6) 1% สารละลายฟินาสเทอไรด์ พบว่า ในสัปดาห์แรกและสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลอง หนูถีบจักรทุกกลุ่มการทดลองไม่พบการเจริญของเส้นขน (สเกล 0) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 เริ่มมีการเจริญของเส้นขนโดยสารทดสอบกลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ 5 และกลุ่มที่ 6 มีการเจริญของเส้นขนร้อยละ 20 ของพื้นที่ทดสอบ (สเกล 1) อีก 3 กลุ่มการทดลองไม่พบการเจริญของเส้นขน ในสัปดาห์ที่ 3 สารทดสอบกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 5 มีการเจริญของเส้นผมเป็นร้อยละ 40 - 60 ของพื้นที่ทดสอบ (สเกล 3) อีก 4 กลุ่มการทดลองที่เหลือมีการเจริญของเส้นขนร้อยละ 20 - 40 ของพื้นที่ทดสอบ (สเกล 2) และในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลองพบว่า สารทดสอบกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 5 มีการเจริญของเส้นขนมากกว่าร้อยละ 80 จนเต็มพื้นที่ทดสอบ (สเกล 5) ส่วนอีก 4 กลุ่มการทดลองมีการเจริญของเส้นขนร้อยละ 60 - 80 ของพื้นที่ทดสอบ (สเกล 4) แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม มีประสิทธิภาพในการทำให้ขนของหนูถีบจักรเจริญได้ดีเทียบเท่ากับ 2% สารละลายไมนออกซิดิล (Regaine®) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่ารับฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมกับสารละลายฟินาสเทอไรด์พบว่า ฟินาสเทอไรด์เมื่อเตรียมให้อยู่

ในรูปแบบของโปรนิโอโซมสามารถเร่งการเจริญของเส้นขนหนูได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับรูปแบบของสารละลาย และโครงสร้างเนื้อเยื่อของผิวหนัง ดังภาพที่ 4.18 - 4.19



ภาพที่ 4.17 ภาพตัดตามขวางผิวหนังหนูถีบจักรเมื่อ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; โปรนิโอโซมเปล่า) (ข) 2% สารละลายไมนอกซิดิล (ค) 0.1% ฟินาสเทอไรด์ โปรนิโอโซม (ง) 0.5% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม (จ) 1% ฟินาสเทอไรด์ โปรนิโอโซมและ (ฉ) 1% สารละลายฟินาสเทอไรด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่าในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง



ภาพที่ 4.18 ภาพตัดตามยาวของผิวหนังหนือบจักร เมื่อ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ก; โพรนิโอโซมเปล่า) (ข) 2% สารละลายไมนอกซิดิล (ค) 0.1% ฟีนาสเตอไรด์ โพรนิโอโซม (ง) 0.5% ฟีนาสเตอไรด์ โพรนิโอโซม (จ) 1% ฟีนาสเตอไรด์ โพรนิโอโซม และ (ฉ) 1% สารละลายฟีนาสเตอไรด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง

ภาพที่ 4.18 และภาพที่ 4.19 เป็นภาพตัดตามขวางและตามยาวของผิวหนังของหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เพื่อศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อของผิวหนังเมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบ 6 กลุ่ม คือ (ก) กลุ่มควบคุม (1ก; ไม่ทาสารใด 2ข; โพรนิโอโซมเปลา) (ข) 2% สารละลายไมนอกซิดิล (ค) 0.1% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซม (ง) 0.5% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซม (จ) 1% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซม และ (ฉ) 1% สารละลายฟินาสเทอไรด์ โดยจากภาพตัดตามขวางของผิวหนังสามารถบอกระยะการเจริญของเส้นขนได้ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ส่วนในภาพตัดตามยาวจะสามารถบอกจำนวนของ hair follicle ที่พบได้ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งจากภาพทั้งสองพบว่า hair follicle ในกลุ่มที่ทดสอบด้วย 2% สารละลายไมนอกซิดิลจะพบมากที่สุด รองลงมาคือ 1% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซม 0.5% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซม 1% สารละลายฟินาสเทอไรด์ และ 0.1% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซม ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ทุกกลุ่มมีจำนวน hair follicle แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทดสอบด้วย 2% สารละลายไมนอกซิดิลกับ 1% ฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซมพบว่าทั้งสองกลุ่มมีจำนวน hair follicle ในผิวหนังหนูถีบจักรเพศผู้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบในการเตรียมตัวรับระหว่างฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซมกับสารละลายฟินาสเทอไรด์พบว่า จำนวนของ hair follicle ในตัวรับที่ทาฟินาสเทอไรด์โพรนิโอโซมมีจำนวนของ hair follicle แตกต่างจากรูปแบบของสารละลายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 จำนวน hair follicle ในผิวหนังหนูกีบจักรเพศผู้ สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบกลุ่มต่าง ๆ

สารทดสอบ	จำนวน Hair follicle
กลุ่มควบคุม	
ไม่ทาสารใด	39.0±1.41
โปรนิโอโซมเพล่า	36.0±4.69
2% สารละลายไมนอกซิคิล (Regaine [®])	67.6±2.70 ^a
0.1% ฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม	58.5±3.53 ^a
0.5% ฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม	63.8±3.63 ^a
1% ฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม	66.8±6.22 ^{a,b}
1% สารละลายฟีนาสเทอไรด์	60.2±4.17 ^b

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ (n=5)
a; ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$ (n=5)
b; แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ (n=5)

4.4.2 ทดสอบการระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลองด้วยเทคนิค closed patch test

ตำรับโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นมีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวและสารเคมีในตำรับ ซึ่งอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวจากการนำไปใช้ จึงต้องมีการทดสอบการระคายเคืองผิวโดยสัตว์ทดลองที่ใช้ในการประเมินการระคายเคือง คือ กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit เนื่องจากผิวของกระต่ายมีความบอบบางและความไวต่อการสัมผัสกับสารเคมีได้ดีกว่าผิวของคนจากการทดสอบการระคายเคืองผิวพบว่า ตำรับฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.1%, 0.5% และ 1 % ไม่เกิดอาการบวมและอาการแดงที่ผิวกระต่าย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมผลลบและผลบวก (5% sodium lauryl sulphate) ตลอดเวลาระยะ 72 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ระดับคะแนนการระคายเคืองผิวในกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit

กลุ่มทดสอบ	1 ชั่วโมง		24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	อาการ	อาการ	อาการ	อาการ	อาการ	อาการ	อาการ	อาการ
	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม	แดง	บวม
Gauze pad	0	0	0	0	0	0	0	0
5% SLS solution	1.5	0	1.5	0	1.25	0	1	0
Blank proniosomes	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1%Finasteride Proniosomes	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5%Finasteride Proniosomes	0	0	0	0	0	0	0	0
1% Finasteride Proniosomes	0	0	0	0	0	0	0	0

ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (n = 4)

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้จากการประเมินอาการแดงและบวมมาคำนวณหาระดับการระคายเคืองผิว (primary irritation index) พบว่า ค่ารับโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นนั้นในทุกความเข้มข้น ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมผลลบและผลบวกตลอดเวลาระยะ 72 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ระดับการระคายเคืองผิว (primary irritation index)

กลุ่มทดสอบ	Primary irritation index	ระดับการระคายเคือง
Gauze pad	0	ไม่เกิดการระคายเคือง
5% SLS solution	0.65	เกิดการระคายเคืองเล็กน้อย
Blank proniosomes	0	ไม่เกิดการระคายเคือง
0.1%Finasteride Proniosomes	0	ไม่เกิดการระคายเคือง
0.5%Finasteride Proniosomes	0	ไม่เกิดการระคายเคือง
1% Finasteride Proniosomes	0	ไม่เกิดการระคายเคือง

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

การพัฒนารับฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมเพื่อเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขน ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง เพื่อให้สถานะที่ใช้มีความเหมาะสมกับการวิเคราะห์พบว่า สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความเชื่อถือ คือ การแยกฟีนาสเตอไรด์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำ ในอัตราส่วน 60: 40 ปริมาณสารตัวอย่างเท่ากับ 20 μL อัตราเร็ว 1 mL/min และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 nm ยางจะแยกที่เวลา 6.0 นาที โดยสถานะที่ได้นี้มีค่า resolution ระหว่างพีกเท่ากับ 3.07 ค่า tailing factor เท่ากับ 1.13 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และค่าจำนวนเพลททางทฤษฎีเท่ากับ 5,324

เมื่อนำสถานะดังกล่าวไปทดสอบความเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์โดยพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้ (1) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงพบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 50-300 $\mu\text{g/mL}$ ได้สมการเส้นตรง $y = 16266x + 6592$ และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9995 (2) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากค่า %RSD ของ retention time และค่า %RSD ของ peak area พบว่าค่า %RSD ของ retention time อยู่ในช่วง 0.005-0.012 และค่า %RSD ของ peak area อยู่ในช่วง 0.01-0.05 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (%RSD < 2) (3) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากค่า % recovery พบว่า มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 92.42- 102.69 (4) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) พบว่า ค่า LOD เท่ากับ 0.006 $\mu\text{g/mL}$ และค่า LOQ เท่ากับ 0.02 $\mu\text{g/mL}$ (5) ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ประเมินจากค่า retention time (RT) ของพีกเมื่อเติมสิ่งรบกวนพบว่า ยางจะแยกที่เวลา 6.0 นาที และมี %RSD เป็น 0.37 จึงสรุปได้ว่า สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์มีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือได้

5.1.2 การพัฒนาตำรับฟีนาสเตอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซม

การพัฒนาตำรับฟีนาสเตอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมนั้นได้ออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวโดยใช้การออกแบบส่วนผสมกลางพบว่า สภาพที่เหมาะสมในการผลิตโปรนิโอโซมให้มีร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยาสูงที่สุด และมีระบบนำส่งขนาดที่เหมาะสมคือ ไขมันทั้งหมดในตำรับเท่ากับ 20.26 mM ร้อยละปริมาณของคอเรสเตอรอลเท่ากับ 39.03 % ของปริมาณไขมันโดยรวมและความเข้มข้นฟีนาสเตอไรด์เท่ากับ 3.39 mM โดยมีร้อยละการกักเก็บยาเท่ากับ $94.47 \pm 1.67\%$ ร้อยละการบรรจุยาเท่ากับ $13.14 \pm 0.18\%$ และมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 292 ± 0.85 nm ซึ่งปัจจัยของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยามากที่สุดคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับและความเข้มข้นฟีนาสเตอไรด์ ส่วนร้อยละของคอเรสเตอรอลไม่มีผลต่อค่าตอบสนองทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อขนาดอนุภาคมากที่สุดคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับและร้อยละของคอเรสเตอรอล ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นฟีนาสเตอไรด์ไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำสภาพที่เหมาะสมนี้ไปทดลองซ้ำและเปรียบเทียบค่าที่ได้จริงกับค่าที่ได้จากการทำนายพบว่า ร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา และขนาดของอนุภาคที่ได้จากการทดลองเทียบกับค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาค่าอคติ (Bias) พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.15 %, 0.68 % และ 0.11% ตามลำดับ ค่าที่ได้นี้แสดงว่าการออกแบบการทดลองด้วยวิธีตอบสนองพื้นผิวโดยใช้การออกแบบส่วนผสมกลางเพื่อหาปัจจัยสูตรตำรับสำหรับเตรียมตำรับฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมมีความน่าเชื่อถือ เมื่อนำตำรับโปรนิโอโซมไปวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวพบว่า มีค่าเท่ากับ -31.60 ± 1.08 mV จากนั้นทดสอบความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีเป็นระยะเวลา 4 เดือนของตำรับโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH ผลการทดสอบความคงตัวพบว่า ฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมมีลักษณะเป็นเจลขุ่นสีขาว (White creamy gel) และเมื่อเก็บตำรับภายใต้สภาวะควบคุมพบว่า อุณหภูมิและความชื้นไม่มีผลต่อความคงตัวทางกายภาพของโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้น ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 300 - 340 nm มีค่าการกระจายขนาดอนุภาคเฉลี่ย 0.437 ± 0.041 และเมื่อเทียบกับตำรับโปรนิโอโซมที่เตรียมวันแรก (day 0) พบว่า ขนาดอนุภาคไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH มีค่าเท่ากับ -30.80 ± 2.12 mV, -32.15 ± 1.26 mV และ -32.42 ± 1.31 mV ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเตอไรด์ในโปรนิโอโซมภายใต้สภาวะควบคุมเป็นระยะเวลา 4 เดือนพบว่า การเก็บตำรับที่อุณหภูมิ 25 °C 75%RH มีร้อยละการกักเก็บยาสูงที่สุด รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 40 °C 75% RH และที่อุณหภูมิ 4 °C ตามลำดับ ซึ่งมีค่าร้อยละการกักเก็บยาเฉลี่ยเท่ากับ $86.69 \pm 1.04\%$, $85.13 \pm 1.00\%$ และ $84.69 \pm 0.88\%$ ตามลำดับ และ

อุณหภูมิที่มีร้อยละการบรรจุยาสูงที่สุดคือ 25 °C 65%RH รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 40 °C 75% RH และ 4 °C ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.70 ± 0.08 , 12.46 ± 0.12 และ 12.40 ± 0.11 ตามลำดับ

5.1.3 ทดสอบการปลดปล่อยยา การซึมผ่านทางผิวหนังและการซึมผ่านทางรูขุมขนของ ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม

การทดสอบการปลดปล่อยฟินาสเทอไรด์จากตำรับโปรนิโอโซม ทดสอบโดยใช้ สารละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (1:1) (pH 7.4) เป็น สารละลายตัวกลางพบว่า การปลดปล่อยฟินาสเทอไรด์ออกจากตำรับโปรนิโอโซมในช่วงครึ่ง ชั่วโมงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 4 มีการปลดปล่อยตัวยาวออกมาอย่างรวดเร็วประมาณร้อยละ 30–80 ของ ปริมาณยาทั้งหมด และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 8 และในชั่วโมงที่ 48 จะมีการปลดปล่อยด้วยาประมาณ ร้อยละ 98 ของปริมาณยาทั้งหมด เมื่อเทียบกับฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบสารละลายพบว่า มีการ ปลดปล่อยฟินาสเทอไรด์ออกมาอย่างรวดเร็ว ในเวลาเพียง 2 ชั่วโมงมีการปลดปล่อยยาประมาณ ร้อยละ 100

การทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังของลูกสุกรด้วยเทคนิค Franz diffusion cell ที่อุณหภูมิ 32 ± 2 °C พบว่า การซึมผ่านของฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนัง ได้ดีกว่าในรูปแบบของสารละลาย และเมื่อครบ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณฟินาสเทอไรด์ใน สารละลายตัวกลางเท่ากับ $5.26 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ แต่สารละลายฟินาสเทอไรด์พบเพียง $2.51 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของตำรับฟินาสเทอไรด์พบว่า เมื่อมีการปิด รูขุมขนปริมาณของฟินาสเทอไรด์ที่พบในสารละลายตัวกลางนั้นจะลดลง โดยในชั่วโมงที่ 24 ตำรับ ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมพบปริมาณฟินาสเทอไรด์ในสารละลายตัวกลางเท่ากับ $2.83 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ สำหรับตำรับสารละลายฟินาสเทอไรด์พบปริมาณฟินาสเทอไรด์เท่ากับ $1.94 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟินาสเทอไรด์ที่สามารถซึมผ่านทางรูขุมขนพบว่า ตำรับฟินาสเทอไรด์ โปรนิโอโซมมีปริมาณฟินาสเทอไรด์ที่ซึมผ่านทางรูขุมขนเท่ากับ $2.43 \pm 0.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และตำรับ สารละลายฟินาสเทอไรด์มีปริมาณฟินาสเทอไรด์ที่ซึมผ่านทางรูขุมขนเท่ากับ $0.67 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ซึ่ง การเตรียมตำรับฟินาสเทอไรด์ให้อยู่ในรูปแบบโปรนิโอโซมสามารถเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขนได้

5.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมและการทดสอบ การระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมนั้นได้ใช้สัตว์ทดลอง เป็นหนูถีบจักรเพศผู้ ที่มีสายพันธุ์ C57BL/6Mlac อายุ 7 สัปดาห์ หลังจากนั้นโกนขนและทาสาร ทดสอบทั้งหมด 6 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มควบคุม (2) 2% สารละลายไมนอกซิดิล (3) 0.1% ฟินาสเทอไรด์

โปรนิโอโซม (4) 0.5% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม (5) 1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมและ (6) 1% สารละลายฟินาสเทอไรด์พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลองหนูถีบจักรที่หาสารทดสอบกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 5 มีการเจริญของเส้นขนมากกว่าร้อยละ 80 จนเต็มพื้นที่ทดสอบ อีก 4 กลุ่มที่เหลือมีการเจริญของเส้นขนร้อยละ 60 – 80 ของพื้นที่ทดสอบ แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม มีประสิทธิภาพในการทำให้ขนของหนูถีบจักรเจริญได้ดีเทียบเท่ากับ 2% สารละลายไมนออกซิคิด (Regaine[®]) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า และเมื่อเปรียบเทียบค่ารับฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมกับสารละลายฟินาสเทอไรด์พบว่า เมื่อเตรียมค่ารับในรูปแบบของโปรนิโอโซมสามารถเร่งการเจริญของเส้นขนได้มากกว่าในรูปแบบของสารละลาย นอกจากนี้เมื่อศึกษาภาพตัดตามขวางและตามยาวของผิวหนังของหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Jlac และศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อพบว่า จำนวน hair follicle ในกลุ่มที่ทาด้วย 2% สารละลายไมนออกซิคิดจะพบมากที่สุด รองลงมาคือ 1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม 0.5% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม 1% สารละลายฟินาสเทอไรด์และ 0.1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่า ทุกกลุ่มมีจำนวน hair follicle แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อเทียบค่ารับระหว่างสารละลายไมนออกซิคิดกับ 1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมพบว่า การกระตุ้นการเจริญของเส้นขนหนูไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และค่ารับของฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมสามารถเร่งการเจริญของเส้นขนได้เร็วกว่าในรูปแบบสารละลาย

ทดสอบการระคายเคืองผิวในกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit ด้วยวิธี closed patch พบว่า ค่ารับโปรนิโอโซมที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.5% และ 1% ฟินาสเทอไรด์ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผลบวก (5% sodium lauryl sulphate) ตลอดเวลาระยะ 72 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า การพัฒนาค่ารับฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมมีประสิทธิภาพในการซึมผ่านทางรูขุมขนและสามารถเร่งการเจริญของเส้นขนของหนูถีบจักรเพศผู้สายพันธุ์ C57BL/6Jlac ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ไมนออกซิคิด นอกจากนี้ ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมยังสามารถเร่งการเจริญของเส้นขนได้ดีกว่าในรูปแบบของสารละลายและไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวเมื่อทำการทดสอบในกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white rabbit

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

5.2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง

ฟีนาสเทอไรด์เป็นสารกลุ่ม 4-aza-3-oxosteroid ที่ใช้ในการรักษาภาวะผมร่วงในเพศชาย ที่มีสาเหตุมาจากพันธุกรรมหรือฮอร์โมนเพศซึ่งเป็นสาเหตุที่พบบมากที่สุด (Chen et al., 2010) เนื่องจากฟีนาสเทอไรด์มีสเปกตรัมการดูดกลืนแสงค่อนข้างต่ำจึงไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีได้ หรือหากจะต้องวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จำเป็นต้องนำฟีนาสเทอไรด์มาทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนเพื่อเพิ่มสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสาร แม้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารจะใช้เวลาสั้นแต่ค่อนข้างยุ่งยากและเสียเวลามากหากตัวอย่างที่ต้องวิเคราะห์มีจำนวนมาก นอกจากนี้ยังไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้จำเป็นต้องวัดทันที เพราะหากทิ้งไว้นานอาจมีการระเหยของตัวทำละลายที่ใช้ จึงต้องมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฟีนาสเทอไรด์เพื่อให้มีความเหมาะสมกับการวิเคราะห์ปริมาณฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นและตรวจสอบความเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ จากการศึกษาได้มีการแยกฟีนาสเทอไรด์แบบเกรเดียนต์ (gradient) ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำและวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำพบว่าฟีนาสเทอไรด์ละลายในน้ำได้ต่ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าเมทิลแอลกอฮอล์กับอะซิโตรไนไตรสามารถละลายฟีนาสเทอไรด์ได้ จึงเลือกใช้ตัวทำละลายชนิดนี้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับการพิจารณาการแยกฟีนาสเทอไรด์ว่าควรแยกแบบใดนั้นพิจารณาจากค่า Scouting gradient run ถ้ามีค่าน้อยกว่า 0.4 ควรแยกในแบบไอโซเครติก แต่ถ้ามีค่ามากกว่า 0.4 ควรแยกแบบเกรเดียนต์ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อแยกด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำมีค่าเท่ากับ 0.19 และเมื่อแยกด้วยอะซิโตรไนไตรกับน้ำจะมีค่าเท่ากับ 0.08 ซึ่งค่าที่ได้ทั้งสองมีค่าน้อยกว่า 0.40 ดังนั้น การแยกฟีนาสเทอไรด์ควรแยกแบบไอโซเครติก สำหรับการแยกแบบเกรเดียนต์นี้สามารถคำนวณการแยกแบบไอโซเครติกได้ โดยสามารถคำนวณจากโครมาโตแกรมแบบเกรเดียนต์ จากผลการทดลองพบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำคำนวณได้อัตราส่วนเท่ากับ 65:35 และวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำ คำนวณได้อัตราส่วนเท่ากับ 50:50 เมื่อทำการแยกด้วยอัตราส่วนดังกล่าวพบว่า ยาจะแยกที่เวลาเท่ากับ 13.5 นาที และ 8.8 นาที ตามลำดับ จึงปรับอัตราส่วนระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้งสอง เพราะมีระยะเวลาที่ใช้ในการแยกฟีนาสเทอไรด์มาก โดยเริ่มปรับจากตัวทำละลายอินทรีย์ก่อน เนื่องจากฟีนาสเทอไรด์ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยแยกฟีนาสเทอไรด์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์กับน้ำในอัตราส่วน 70:30 พบว่า ยาจะแยกที่เวลาเท่ากับ 4.8 นาที และเมื่อแยกฟีนาสเทอไรด์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนไตรกับน้ำในอัตราส่วน 60: 40 ยาจะแยกที่เวลาเท่ากับ 6.0 นาที ซึ่งฟีนาสเทอไรด์ถูกแยกออกเร็วขึ้นแสดงว่า ฟีนาสเทอไรด์สามารถเข้า

กันได้ดีกับวัสดุเคลื่อนที่ซึ่งถูกแยกออกมาก่อน เมื่อพิจารณาความสามารถในการแยกออกจากกันให้อยู่ในระยะเวลาที่เหมาะสม โดยพิจารณาความเหมาะสมจากค่า resolution ระหว่างพีคทั้งสอง ค่า tailing factor และค่าจำนวนเพลททางทฤษฎี (number of theoretical plate) พบว่า เมื่อแยกด้วย วัสดุเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตรไนโตรกับน้ำในอัตราส่วน 60:40 มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจาก มีค่า resolution ระหว่างพีคเท่ากับ 3.07 ค่า Tailing factor เท่ากับ 1.13 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และ ค่าจำนวนเพลททางทฤษฎีเท่ากับ 5,324 จากนั้นจึงตรวจสอบความเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ที่ พัฒนาขึ้น โดยพิจารณาจาก (1) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงพบว่า อยู่ในช่วงความเข้มข้น 50-300 $\mu\text{g/mL}$ และมีค่า r^2 เป็น 0.9995 (2) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โดยวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กัน 6 ครั้ง พบว่า มีค่า %RSD ของ retention time อยู่ในช่วง 0.005-0.012 และค่า %RSD ของ peak area อยู่ในช่วง 0.01-0.05 ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ (%RSD < 2) (3) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยเทียบ ค่าที่วัดได้กับค่าที่แท้จริง ค่าทั้งสองควรมีค่าใกล้เคียงกันจึงแสดงว่าการวิเคราะห์มีความถูกต้องสูง ซึ่งประเมินจากค่า % recovery จากการศึกษพบว่า มี % recovery อยู่ในช่วง 92.42- 102.69 (4) ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวัดปริมาณ เท่ากับ 0.006 $\mu\text{g/mL}$ และ 0.02 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (5) ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์พบว่า เมื่อเติมสิ่งรบกวนลงในระบบจะไม่มีผลกระทบต่อ การวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์เพราะค่า retention time เท่ากับ 6.0 นาทีและมี %RSD เป็น 0.38

จากการทดสอบความน่าเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่า สภาพะที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์มีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือ นอกจากนี้สภาพะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังใช้ปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อยและระยะเวลาที่ใช้ในการแยกยา สั้น ทำให้สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างในปริมาณมากได้ในระยะเวลาที่สั้น และยังมี ความเหมาะสมกับการวิเคราะห์ในงานประจำได้ (routine) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Demir, Cucu และ Sakarya (2006) ที่วิเคราะห์ฟีนาสเตอไรด์ (Dilaprost[®]) ในรูปแบบยาเม็ดด้วยเทคนิค liquid chromatography โดยใช้ Nova Pak C18 column เป็นวัสดุคงที่ ศึกษาที่อุณหภูมิ 60 °C วัดที่ ความยาวคลื่น 210 nm วิเคราะห์ในรูปแบบไอโซครติกโดยใช้ water /acetonitrile/ tetrahydrofuran (80/10/10, v/v/v) เป็นวัสดุเคลื่อนที่ อัตราเร็วเป็น 2 mL/ min ปริมาตรที่ใช้ คือ 15 μL พบว่า ยา แยกที่เวลาเท่ากับ 36 นาที ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีระยะเวลาที่ใช้สั้นกว่า

5.2.2 การพัฒนาคำรับฟีนาสเตอไรด์ในรูปแบบโปรนิโอโซม

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการเตรียมคำรับฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซม ซึ่งเป็น เทคโนโลยีระดับนาโนประเภทหนึ่งที่สามารถนำส่งผ่านทางรูขุมขนได้ (อรัญญา มโนสร้อย, 2008) การเตรียมคำรับให้อยู่ในรูปแบบโปรนิโอโซมมีข้อดีคือ คำรับที่เตรียมจะมีความคงตัวทางกายภาพ ไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันหรือการรวมตัวกันของอนุภาคและยาไม่เกิดการสลายตัวทางเคมีด้วย

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Almira et al., 2001) และสามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ง่ายเพราะมีองค์ประกอบของแอลกอฮอล์ในตำรับ (Bharti, Loona and Khan, 2012) สำหรับการเตรียมตำรับฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมจะเตรียมด้วยวิธีโคอะเซอเวชันแบบแยกตัวภาคเพราะเป็นเทคนิคที่สามารถเตรียมขึ้นได้ง่าย ใช้เวลาน้อย เหมาะกับตำรับที่ใช้สำหรับทาภายนอกและการในใช้ตำรับโปรนิโอโซมเป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนังนั้น ไม่ต้องรอเวลาในการเกิด hydration ก็สามารถนำไปกระจายในยาพื้น เช่น อิมัลชัน เจลและขี้ผึ้ง โดยตัวยาพื้นสามารถช่วยให้เป็นตำรับที่ใช้กับผิวหนังและเป็นตัวช่วยเนื่องจากตัวสารสำคัญได้

การพัฒนาตำรับฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมให้ซึมผ่านทางรูขุมขนอย่างเหมาะสมจะพิจารณาจาก (1) ขนาดอนุภาค โดยจะต้องมีขนาดอนุภาคในช่วงนาโนเมตร อยู่ในช่วงระหว่าง 300 – 600 nm เพราะขนาดในช่วงนี้สามารถที่จะซึมผ่านทางรูขุมขนได้ (Tarl et al., 2011) และสามารถเข้าถึงอวัยวะเป้าหมายที่ความลึกประมาณ 600 – 1200 μm (Wing et al., 2011) ซึ่งเป็นส่วนของต่อมไขมัน (sebaceous gland) กล่าวคือเป็นอวัยวะเป้าหมายในการนำส่งยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคผมร่วงเป็นหย่อม (androgenetic alopecia) มีสาเหตุมาจากพันธุกรรมหรือฮอร์โมนเพศ (Alex et al., 2008) (2) ตำรับที่เตรียมควรมีค่าร้อยละการบรรจุและ (3) ร้อยละการกักเก็บยาที่สูง จากการทดลองพบว่า สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุในกลุ่มอนุพันธุ์ของซอปีแทนจะให้ค่าร้อยละการกักเก็บยาที่สูงเพราะมีค่า phase transition temperature ที่สูงและมีค่า hydrophilic lipophilic balance (HLB) ต่ำ สารลดแรงตึงผิวควรมีสายโซ่ของหมู่ alkyl ที่ยาวจึงจะสามารถกักเก็บยาได้สูง (Yoshioka, Sternberg and Florence., 1994) จึงเลือกใช้สเปน 60 (C_{18}) เป็นสารลดแรงตึงผิว สำหรับปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาค ร้อยละการบรรจุและร้อยละการกักเก็บยาในการเตรียมตำรับคือ ปริมาณไขมันทั้งหมด ร้อยละปริมาณของคอเรสเตอรอลในตำรับและความเข้มข้นฟีนาสเตอไรด์ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีตอบสนองพื้นผิว (response surface methodology, RSM) ร่วมกับการออกแบบส่วนผสมกลาง (central composite design, CCD) ซึ่งวิธีนี้เป็นการนำสมการทางคณิตศาสตร์และการคำนวณทางสถิติมาใช้นบนพื้นฐานของสมการพหุนาม (polynomial equation) เพื่อนำไปสู่ข้อมูลที่ใช้ในการทดลอง โดยข้อมูลนี้สามารถอธิบายอันตรกิริยาของตัวแปรอิสระหลาย ตัวแปรที่ส่งผลต่อตัวแปรตามได้ ซึ่งมีข้อดีที่เหนือกว่าการออกแบบสูตรตำรับโดยใช้วิธีดั้งเดิมคือ สามารถศึกษาอันตรกิริยาของตัวแปรอิสระหลายตัวแปรได้ในเวลาเดียวกันจึงช่วยลดความผิดพลาดจากการศึกษาที่ละปัจจัยของวิธีดั้งเดิมได้ และทำให้ได้สูตรตำรับที่มีความเหมาะสมมากขึ้น (Xiaoyun et al., 2010) นอกจากนี้ยังช่วยประหยัดเวลาและสารเคมี (Xiulian, Quinghong and Zhonghai, J. 2011)

จากผลการทดลองพบว่า คำรับฟีนาสเทอไรด์โพรนิโอโซมมีร้อยละการกักเก็บยาอยู่ในช่วง 71.95-95.44 ร้อยละการบรรจุตัวยาอยู่ในช่วง 1.20 - 43.05 และขนาดของระบบนำส่งอนุภาคอยู่ในช่วง 219-346 nm จากข้อมูลนี้สามารถหาความสัมพันธ์ของปัจจัยของตัวแปรอิสระคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในคำรับ ร้อยละปริมาณของคอเรสเตอร์อลและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์กับ ค่าการตอบสนอง (ร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยา และขนาดของอนุภาค) ด้วยวิธีการตอบสนองพื้นผิว (RSM) และแสดงเป็นสมการพหุนามกำลังสองได้ จากสมการสามารถตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองได้ โดยพิจารณาจากค่า (1) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) (2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่า (R^2_{adj}) ซึ่งค่าทั้งสองควรมีค่าเข้าใกล้ 1 จึงแสดงได้ว่า ตัวแปรอิสระมีผลต่อค่าการตอบสนองและ (3) ค่า P -value ของ Lack of fit ควรมีค่ามากกว่า 0.05 จึงจะแสดงถึงความเหมาะสมของสมการพหุนาม จากผลการทดลองพบว่า สมการร้อยละการกักเก็บยา ร้อยละการบรรจุยาและขนาดของอนุภาคมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าเข้าใกล้ 1 และค่า P -value ของ Lack of fit มีค่ามากกว่า 0.05 จะเห็นได้ว่าตัวแปรอิสระมีผลต่อค่าการตอบสนองและสมการมีความเหมาะสมในการอธิบายอันตรกิริยาระหว่างตัวแปรอิสระ โดยปัจจัยของตัวแปรอิสระที่มีผลต่อค่าร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยามากที่สุดคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในคำรับและความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ ส่วนร้อยละปริมาณของคอเรสเตอร์อลไม่มีผลต่อค่าการตอบสนองทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อขนาดอนุภาคมากที่สุดคือ ปริมาณไขมันทั้งหมดในคำรับและร้อยละปริมาณของคอเรสเตอร์อล ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นฟีนาสเทอไรด์ไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำสมการพหุนามกำลังสองมาคำนวณหาสภาวะเหมาะสมพบว่า คำรับฟีนาสเทอไรด์โพรนิโอโซมอยู่ในเกณฑ์ที่ต้องการ สำหรับการนำส่งสารผ่านทางรูขุมขนมีค่าร้อยละการกักเก็บยาเท่ากับ $94.47 \pm 1.67\%$ ร้อยละการบรรจุยาเท่ากับ $13.14 \pm 0.18\%$ และมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 292 - 340 nm เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมนี้มาแสดงความสัมพันธ์เป็นกราฟสามมิติและกราฟโครงร่างพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดในคำรับจะทำให้ร้อยละการกักเก็บยามีค่าเพิ่มขึ้น แต่ร้อยละการบรรจุตัวยาลดลงและเมื่อเพิ่มปริมาณของคอเรสเตอร์อลจะให้ค่าร้อยละการกักเก็บยาลดลง และร้อยละการบรรจุยามีค่าคงที่ แม้ว่าการเพิ่มปริมาณของคอเรสเตอร์อลจะช่วยเพิ่มร้อยละการบรรจุตัวยา (Mokhtar et al., 2008) แต่ปริมาณของคอเรสเตอร์อลที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณที่ต่ำ ซึ่งการเพิ่มปริมาณของคอเรสเตอร์อลจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของร้อยละการบรรจุตัวยา เมื่อเพิ่มปริมาณของคอเรสเตอร์อลมากกว่า 20 mol% (Mohammed and Perrie, 2005) และการเพิ่มปริมาณของคอเรสเตอร์อลจะมีผลต่อความคงตัวของระบบนิโอโซมและการซึมผ่านผิวหนัง (Rogerson, Cummings and Florence, 1987) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟีนาสเทอไรด์จะทำให้มีค่าร้อยละ

การกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยาเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Xiaoyun et al (2010) ที่ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของ dihydroartemisinin ด้วยระบบนำส่งไขมันโดยใช้วิธีตอบสนองพื้นผิว จากการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาจะทำให้ค่าร้อยละการบรรจุยาเพิ่มขึ้นและเมื่อเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมดในตำรับจะทำให้ร้อยละการกักเก็บยามีค่าเพิ่มขึ้นและได้ขนาดอนุภาคที่ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของไขมันจะทำให้ร้อยละการกักเก็บยามีค่าเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากมีช่องว่างของไขมันเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้พินาสเตอไรด์ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติชอบละลายในไขมันสามารถแทรกอยู่บริเวณช่องว่างของไขมันนี้ได้ การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าไขมันมีผลต่อร้อยละการกักเก็บตัวยาและขนาดของอนุภาค นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Mahmoud et al (2008) ที่ศึกษาปัจจัยในตำรับที่มีผลกระทบต่อการกักเก็บ flurbiprofen และอัตราเร็วในการปลดปล่อยยาของตำรับโปรนิโอโซม จากการศึกษาพบว่าการเพิ่มไขมันในตำรับและความเข้มข้นของยาจะมีผลทำให้ร้อยละการกักเก็บยาเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณของยาที่บรรจุภายในจะลดลงเมื่อเทียบกับไขมันทั้งหมด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นยาต่อไขมันจะทำให้ร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยาเพิ่มขึ้น

เมื่อทดสอบความคงตัวทางกายภาพของตำรับพินาสเตอไรด์โปรนิโอโซมภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าโปรนิโอโซมมีลักษณะเป็นเจลขุ่นสีขาว (White creamy gel) โดยสีของโปรนิโอโซมจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงและไม่เกิดการแยกชั้นของเอทิลแอลกอฮอล์ออกมาจากตำรับ บ่งบอกว่าอุณหภูมิและความชื้นไม่มีผลต่อความคงตัวทางกายภาพของโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้น เมื่อนำตำรับไปวัดขนาดและค่าการกระจายขนาดของอนุภาค เพื่อเป็นการทำนายความคงตัวทางกายภาพของตำรับโปรนิโอโซมระหว่างการเก็บ โดยขนาดอนุภาควัดด้วยวิธีการกระเจิงแสงแบบพลวัต ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่ขึ้นลงของความเข้มของแสงที่กระเจิง และเกิดจากการเคลื่อนที่ของอนุภาค (Zhang et al., 2010) โดยขนาดของอนุภาคควรมีขนาดที่ใกล้เคียงกันเพื่อป้องกันการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค และส่งผลให้เกิดการตกตะกอน ค่าการกระจายขนาดของอนุภาคจะบ่งบอกถึงขนาดของอนุภาคในตำรับว่ามีค่าใกล้เคียงกันมากน้อยเพียงใด ค่านี้ควรมีค่าที่แคบ และค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความคงตัวของตำรับโปรนิโอโซม ค่านี้จะวัดปริมาณของอิเล็กตรอนที่ผิวบริเวณ shear plane ถ้าค่านี้มีค่ามากกว่า 30 mV แสดงว่าระบบมีความคงตัวดีและถ้าค่านี้มีค่าสูงถึง 60 mV แสดงว่าระบบมีความคงตัวที่ดีมาก (Mehnert and Mäder, 2001) จากผลการทดสอบพบว่าทุกอุณหภูมิมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 300- 340 nm และมีค่าการกระจายขนาดอนุภาคเฉลี่ย 0.437 ± 0.041 ซึ่งอยู่ในช่วงที่แคบ เมื่อเทียบกับตำรับโปรนิโอโซมที่เตรียมวันแรกพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และเมื่อวัดค่าประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเฉลี่ยตลอดระยะเวลา 4 เดือน

พบว่า ทุกอุณหภูมิมีค่ามากกว่า -30 mV แสดงว่า ระบบโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นมีความคงตัวดี และจะเห็นได้ว่าค่ารับฟิโนสเทอไรด์โปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นแสดงประจุลบที่ผิวอนุภาคทั้งที่เตรียมจากซอปีแทนซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวไม่มีประจุ เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะซอปีแทนเกิดการฟอร์มตัวเป็นเวสซิเคิลโดยมีคอเรสเตอรอลแทรกอยู่ระหว่างผนังของเวสซิเคิลเพื่อช่วยในการเพิ่มความแข็งแรง โดยได้เชื่อมพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่งคีโตนของคอเรสเตอรอลกับตำแหน่ง β -OH ของซอปีแทน (Behrooz, 2005) และการแทรกตัวของคอเรสเตอรอลนี้จะทำให้ไอออนประจุตรงกันข้าม (counter ion) ในระบบเกิดการดูดซับที่ผิวของอนุภาค จึงทำให้แสดงประจุลบที่ผิวอนุภากระบบนำส่ง (Varaporn, Veerawut and Tasaneeya, 2008) สำหรับกลไกการเพิ่มความแข็งแรงของผนังระบบนำส่งด้วยคอเรสเตอรอลนี้เป็นแบบ steric stabilization (Behrooz, 2005)

สำหรับการทดสอบความคงตัวทางเคมีนั้นจะประเมินประสิทธิภาพในการกักเก็บยาและการบรรจุยาในตำรับโปรนิโอโซมที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C 75%RH และ 40 °C 75% RH เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า โปรนิโอโซมทุกตำรับมีร้อยละการกักเก็บยาคิดเป็นร้อยละ 86 และมีร้อยละการบรรจุยาคิดเป็นร้อยละ 12 ทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลองโดยอุณหภูมิที่ทำให้ค่าทั้งสองมีค่ามากที่สุดคือที่อุณหภูมิ 25 °C 75%RH แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่เตรียมวันแรกพบว่า ร้อยละการกักเก็บยาและร้อยละการบรรจุยาไม่แตกต่างจากวันแรกอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) การที่มีค่าการกักเก็บยาที่สูงนั้นจะบ่งบอกถึงความเสถียรของระบบนำส่งและการมีชีวิตประสิทธิผลที่ดี (Lee et al., 2002)

5.2.3 ทดสอบการปลดปล่อยยา การซึมผ่านทางผิวหนังและการซึมผ่านทางรูขุมขนของฟิโนสเทอไรด์โปรนิโอโซม

จากผลการทดสอบการปลดปล่อยฟิโนสเทอไรด์ออกจากตำรับโปรนิโอโซมพบว่า การปลดปล่อยยาออกจากตำรับโปรนิโอโซมจะแบ่งการปลดปล่อยยาเป็น 2 ช่วง คือ ปลดปล่อยฟิโนสเทอไรด์ออกมาอย่างรวดเร็วในช่วงครึ่งชั่วโมงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 4 ช่วงนี้เรียกว่า initial burst release เกิดจากยาที่อยู่ในรูปอิสระที่ไม่ได้กักเก็บในโปรนิโอโซมและยาที่กักเก็บอยู่บริเวณผิวของโปรนิโอโซมจะปลดปล่อยออกมาก่อน ซึ่งจะมีฤทธิ์ในการรักษาทันทีและเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 8 และในชั่วโมงที่ 48 จะมีการปลดปล่อยฟิโนสเทอไรด์ประมาณร้อยละ 98 ของปริมาณยาทั้งหมด ช่วงนี้ความเข้มข้นของยาที่อยู่ภายในถุงเมมเบรนกับสารละลายตัวกลางจะมีความเข้มข้นที่เท่ากัน จึงเรียกช่วงนี้ว่า steady state release เมื่อเทียบกับฟิโนสเทอไรด์ในรูปแบบสารละลายซึ่งมีการปลดปล่อยเป็น 2 ช่วงเช่นกันแต่จะพบว่าเพียง 2 ชั่วโมงแรกมีการปลดปล่อยฟิโนสเทอไรด์ออกมาอย่างรวดเร็วเกือบสมบูรณ์ และเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป การที่ฟิโนสเทอไรด์ถูกปลดปล่อยออกมาเกือบร้อยละ 100 ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่ง

ซ้ำกว่าในรูปแบบของสารละลายเป็นผลมาจากมีการกักเก็บฟีนาสเทอไรด์ไว้ภายในอนุภาคของโพรนิโอโซม โดยฟีนาสเทอไรด์ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันสามารถแทรกอยู่บริเวณช่องว่างของไขมันได้ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการปลดปล่อยของยาจะเป็นผลมาจากชนิดของโพรนิโอโซมและองค์ประกอบของไขมันในตำรับ โดยเฉพาะสัดส่วนของคอเรสเตอรอลจะมีผลในการลดอัตราการปลดปล่อยยาในช่วงเริ่มต้นหากมีสัดส่วนที่สูง (Mohamed, Labiba and Nawal, 2005) ดังนั้นโพรนิโอโซมที่เตรียมขึ้นจึงมีรูปแบบการปลดปล่อยยาแบบ sustained release เนื่องจากยาที่ถูกเก็บกักไว้ภายในจะค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยออกจากผนังระบบนำส่งออกสู่ตัวกลางภายนอก (Pillai and Salim, 1999) ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา (Lu, Zhang and Yang, 2003)

ในการทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังใช้ผิวหนังบริเวณหน้าท้องของลูกสุกรแรกเกิดเป็นผิวหนังจำลอง เพราะมีโครงสร้างของผิวหนังและความสามารถในการซึมผ่านผิวคล้ายกับผิวหนังของมนุษย์ (Michniak-Kohn et al., 2005) โดยความสามารถในการซึมผ่านทางผิวหนังจะขึ้นกับ (1) ความเข้มข้นของยาที่ใช้ ยาที่มีความเข้มข้นสูงจะมีการซึมผ่านชั้นผิวหนังได้มากที่สุด (2) ความหนาของผิวหนัง ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการซึมผ่านผิว ถ้าชั้นผิวหนังมีความหนามากจะส่งผลให้สารซึมผ่านได้น้อย และ (3) สารละลายตัวกลาง (Victoria et al., 2012) ซึ่งปกติการทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังนั้นทาง OECD guideline แนะนำให้ใช้ isotonic buffer สำหรับการทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังด้วยเทคนิค Franz diffusion cell สารละลายตัวกลางจะละลายสารทดสอบได้และไม่มีผลต่อการดูดซึม (Gillet, Evrard and Piel, 2011) จากการทดสอบครั้งนี้พบว่า ฟีนาสเทอไรด์โพรนิโอโซมมีการซึมผ่านชั้นผิวหนัง โดยที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณของฟีนาสเทอไรด์ในสารละลายตัวกลางเท่ากับ $5.26 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ แต่สารละลายฟีนาสเทอไรด์พบเพียง $2.51 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Joana et al. (2012) ที่เปรียบเทียบการซึมผ่านของ triamcinolone acetonide ในรูปแบบสารละลายเทียบกับระบบนำส่งอนุภาคไขมันระดับนาโน (Nanostructured lipid carriers: NLC) พบว่าเมื่อเตรียมในรูปแบบของ NLC มีการซึมผ่านผิวหนัง ได้ดีกว่าในรูปแบบของสารละลาย ทั้งนี้เป็นผลมาจากความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของไขมันและยาที่อยู่ในตำรับที่ช่วยเพิ่มการนำส่งสารเข้าสู่ผิว

การทดสอบการซึมผ่านทางรูขุมขนของตำรับฟีนาสเทอไรด์เป็นการประเมินประสิทธิภาพในการซึมผ่านทางรูขุมขน โดยมีการใช้น้ำยาเคลือบเล็บปิดช่องทางการซึมผ่านทางรูขุมขน จึงทำให้สารสามารถซึมผ่านช่องทางของผิวหนังได้เพียงเส้นทางเดียว (Aranya et al., 2012) เป็นผลให้สามารถเปรียบเทียบการซึมผ่านทางรูขุมขนของตำรับฟีนาสเทอไรด์โพรนิโอโซมเทียบกับสารละลายฟีนาสเทอไรด์ได้ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อไม่มีการปิดรูขุมขน ตำรับฟีนาสเทอไรด์โพรนิโอโซมสามารถซึมผ่านผิวหนังได้เท่ากับ $5.26 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และสารละลายฟีนาสเทอไรด์

สามารถซึมผ่านทางผิวหนังได้เท่ากับ $2.51 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ เมื่อเปรียบเทียบกับผิวหนังที่มีการปิดรูขุมขนพบว่า ปริมาณฟีนาสเทอไรด์ที่ซึมผ่านรูขุมขนลงมาในสารละลายตัวกลางจะลดลง เพราะฟีนาสเทอไรด์จะสามารถซึมผ่านทางผิวหนังได้ช่องทางเดียว โดยช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมงที่ 24 คาร์บิฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมพบปริมาณฟีนาสเทอไรด์ในสารละลายตัวกลางเท่ากับ $2.83 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ สำหรับสารละลายฟีนาสเทอไรด์พบปริมาณฟีนาสเทอไรด์เท่ากับ $1.94 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ดังนั้น คาร์บิฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมสามารถซึมผ่านทางรูขุมขนได้เท่ากับ $2.43 \pm 0.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ และสารละลายฟีนาสเทอไรด์มีปริมาณฟีนาสเทอไรด์ที่สามารถซึมผ่านทางรูขุมขนเท่ากับ $0.67 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ สรุปได้ว่า การเตรียมคาร์บิฟีนาสเทอไรด์ให้อยู่ในรูปแบบของโปรนิโอโซมสามารถเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขนได้มากกว่าในรูปแบบของสารละลาย การที่คาร์บิฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมสามารถซึมผ่านทางรูขุมขนได้นั้นเป็นผลมาจากภายในรูขุมขนมีการผลิตไขมันจากต่อมไขมัน ซึ่งไขมันมีคุณสมบัติชอบละลายในน้ำมันจึงเป็นเส้นทางที่เหมาะสมกับยาหรือสารที่ชอบละลายในน้ำมัน แต่จะเป็นปัจจัยที่ขัดขวางการนำส่งสารที่มีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ดีและโปรนิโอโซมเป็นตัวพาที่มีคุณสมบัติชอบละลายในน้ำมันจึงมีการหลอมรวมกับไขมันและซึมผ่านเข้าสู่รูขุมขนนี้ได้

สำหรับกลไกในการซึมผ่านทางผิวหนังของโปรนิโอโซมพบว่า เมื่อทาคาร์บิฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมลงบนผิวหนัง น้ำที่อยู่บนผิวจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนจากโปรนิโอโซมให้อยู่ในรูปแบบของนิโอโซม (Sudhamani, Priyadarisini and Radhakrishnan, 2010) จากนั้นจึงเกิดการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนัง โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังทางรูขุมขนนั้นขึ้นกับ (1) คุณสมบัติของสาร เช่น ขนาดอนุภาค พบว่า ขนาดอนุภาคของคาร์บิฟีนาสเทอไรด์ที่เตรียมได้นั้นจะมีขนาดอยู่ในช่วง $300 - 340 \text{ nm}$ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถซึมผ่านทางผิวหนังเข้าสู่รูขุมขนได้ เพราะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูขุมขนอยู่ในช่วง $10-70 \mu\text{M}$ (Andrea et al., 1995) นอกจากนี้ยังขึ้นกับความสามารถในการละลายในไขมันและน้ำ ซึ่งฟีนาสเทอไรด์มีค่าความสามารถในการละลายในไขมันและน้ำเท่ากับ 3.53 จัดเป็นสารกลุ่มที่มีคุณสมบัติละลายน้ำมันได้ดี ซึ่งสารในกลุ่มนี้สามารถซึมผ่านเข้าสู่รูขุมขนที่เปิดได้มากกว่าสารในกลุ่มที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี (Yakov et al., 2007) (2) สูตรตำรับ เช่น ตัวทำละลายที่อยู่ในตำรับพบว่า ในการเตรียมคาร์บิฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมมีการใช้สารละลายเอทานอล ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของแอลกอฮอล์ที่ช่วยเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนังและเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขนได้ (Yadav, Saroha and Sharma, 2011) เพราะคุณสมบัติของตัวทำละลายจะทำให้ชั้นสตราตัมคอร์เนียมีการพองตัว ทำให้ยาสามารถเข้าสู่รูขุมขนได้มากขึ้น (Meidan et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Toll et al. (2004) ที่ศึกษาการนำส่งไมนอกซิดิลเข้าสู่รูขุมขนพบว่า เมื่อใช้เอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายจะพบปริมาณไมนอกซิดิลภายในรูขุมขนมากขึ้นและ (3) การเตรียมตำรับโดยใช้เทคโนโลยีนาโนช่วยในการนำส่งสาร ดังการศึกษาของ Rao et al. (2008)

ศึกษาการซึมผ่านและการสะสมของคำรับฟินาสเทอไรด์เอทโทโซม (ethosomes) บนผิวหนัง พบว่าการเตรียมฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบเอทโทโซมสามารถเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังได้มากกว่าการเตรียมคำรับในรูปแบบของสารละลาย

การเตรียมคำรับในรูปแบบของโปรนิโอโซมที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงนาโนเมตร กลไกในการซึมผ่านทางผิวหนังของโปรนิโอโซมนั้น ถ้ายาฟินาสเทอไรด์อยู่ในรูปแบบของยาอิสระ ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่มีคุณสมบัติละลายน้ำมัน ได้ดี ยาจะซึมผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ในชั้นสตราตัมคอร์เนียมเข้าสู่ชั้นผิวหนังที่ลึกลงไป ถ้าฟินาสเทอไรด์กักเก็บไว้ในคำรับโปรนิโอโซม จะมีการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังในรูปแบบของเวสิเคิล โดยสามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้ 2 รูปแบบ คือ (1) มีการหลอมรวมกับชั้นสตราตัมคอร์เนียมและปลดปล่อยยาฟินาสเทอไรด์ในรูปยาอิสระเข้าสู่ชั้นผิวหนัง (2) มีการซึมผ่านเข้าสู่รูขุมขนโดยตรง โดยคำรับที่ผ่านเส้นทางนี้ได้จะต้องมีขนาดที่เหมาะสมและมีปริมาณน้ำในผิวหนังมากจึงจะช่วยให้อิมัลชันสตราตัมคอร์เนียมมีการพองตัวทำให้สามารถผ่านเส้นทางนี้ได้ (Maghraby, Barry and Williams, 2008) จากผลการทดลองพบว่า คำรับโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นนั้นมีขนาดที่เหมาะสมและมีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ซึ่งช่วยให้ชั้นสตราตัมคอร์เนียมมีการพองตัวจึงสามารถซึมผ่านเข้าสู่รูขุมขนได้

การซึมผ่านของฟินาสเทอไรด์ผ่านทางรูขุมขนนั้นมีข้อดีเหนือกว่าการซึมผ่านทางผิวหนังกล่าวคือ ยาไม่ต้องผ่านผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมที่เป็นตัวขัดขวางการซึมผ่านทางผิวหนัง และภายในรูขุมขนมีอวัยวะที่สำคัญคือ มีขนของตัวรับแอนโดรเจนซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคผมร่วง ที่เกิดจากการรบกวนของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (androgenetic alopecia) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคผมร่วงในเพศชาย (Alexa et al., 2008)

5.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมและการทดสอบการระคายเคืองผิวในสัตว์ทดลอง

ปัจจุบันมียาเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้รักษาอาการผมร่วงคือ ไมนออกซิดิล (minoxidil) และฟินาสเทอไรด์ (finasteride) (Prince, 1999) ซึ่งยาทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีข้อจำกัดในการรักษา โดยเฉพาะในเรื่องของผลข้างเคียงและอัตราการรักษาที่ให้ผลค่อนข้างต่ำ (Hye, 2011) โดยไมนออกซิดิลเป็นยารับประทานที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง แต่ผลข้างเคียงจากการใช้ยาพบว่า สามารถทำให้เพิ่มจำนวนของเส้นผมได้ จึงมีการนำมาใช้ในการรักษาภาวะผมร่วง ถ้าใช้ในรูปแบบของยารับประทานจะมีผลกระทบต่อความดันโลหิต ทำให้ความดันโลหิตลดลงจนก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้ใช้ยา จึงมีการพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบยาใช้ภายนอก (Nicole et al., 2008) ขนาดที่ใช้เป็นสารละลายไมนออกซิดิลที่มีความเข้มข้น 2% และ 5% (Price, 1999) สำหรับกลไกในการรักษาของยาไมนออกซิดิลนั้นยังไม่ทราบกลไกในการ

รักษาที่แน่นอน แต่อาจเกิดจากกลไกที่มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการไหลเวียนของเลือด (Wester et al., 1984) การแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้นและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Mori and Uno, 1990) นอกจากนี้ยังเป็นผลกระทบจากการยับยั้งฮอร์โมนเอนโดรเจน (Nuck, Fogelson and Lucky, 1987) ถึงแม้ว่าจะมีการใช้ไมนอกซิดิลในรูปแบบยาทาภายนอก แต่ก็มีโอกาสเกิดการเพิ่มจำนวนของเส้นผมในบริเวณที่ไม่ต้องการได้ (Nicole et al., 2008) สำหรับยาฟินาสเทอไรด์นั้น ปัจจุบันนี้มีจำหน่ายเฉพาะในรูปแบบของยารับประทาน และมีกลไกในการรักษาที่แน่นอนกล่าวคือ ทำหน้าที่ยับยั้งในการเปลี่ยนฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนให้เป็นฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (Gormley, 1995) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดผมร่วง ขนาดยาที่แนะนำให้ใช้ในการรักษาคือ 1 มิลลิกรัมต่อวัน ผลข้างเคียงจากการรับประทานยาคือทำให้หย่อนสมรรถภาพทางเพศ และมีผลกับสตรีมีครรภ์โดยจะส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนที่เป็นเพศชาย (Nicole et al., 2008) แต่พบว่าถ้ามีการให้ยาฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบของยาใช้ภายนอกและให้ในความเข้มข้นที่เพียงพอก็จะมีประโยชน์มากกว่าการให้ในรูปแบบของยารับประทาน เพราะสามารถลดผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นได้ (Daneshaouz et al., 2005)

ในปัจจุบันแม้จะมีฟินาสเทอไรด์จำหน่ายในรูปแบบของยารับประทานเท่านั้น แต่ก็มีการศึกษาการรับประทานฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบยาทาภายนอกเป็นจำนวนมาก เช่น การศึกษาของ Thomas et al. (2000) ได้ศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้สารละลายฟินาสเทอไรด์ (solution) ที่ 0.25 และ 0.5 % ที่มีผลต่อฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน จากการศึกษาพบว่า ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเกิดการเปลี่ยนแปลงคิดเป็น 23 % และระดับฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนมีการเปลี่ยนแปลงคิดเป็น 16% ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนในรูปแบบยารับประทานที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนคิดเป็น 14%–50% และ 11%–76% ตามลำดับ และการศึกษาของ Amnon et al. (2000) ได้ศึกษาคำรับ antidroenic ที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของขนหนุที่ถูกโกนขน โดยการเตรียมคำรับยาฟินาสเทอไรด์และฟลูตาไมด์ในรูปแบบเจล แล้วศึกษาความยาว เส้นผ่าศูนย์กลางและโครงสร้างของระยะการเจริญเติบโตของเส้นขน รวมทั้งศึกษาการแพร่ของคำรับเจลพบว่า การใช้ฟินาสเทอไรด์และฟลูตาไมด์ในรูปแบบยาใช้ภายนอกมีประสิทธิภาพในการรักษา male-pattern baldness ได้

การทดสอบประสิทธิภาพของคำรับฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมจึงเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาใช้ภายนอก โดยประเมินการเจริญของเส้นขนระหว่างสารละลายไมนอกซิดิลเทียบกับฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซมต้นแบบของสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาและประเมินการเจริญของเส้นขนที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเป็นหนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6 (Datta et al., 2009) เนื่องจากหนูถีบจักรสายพันธุ์นี้มีวงจรชีวิตการเจริญเติบโตเป็นระยะ

และคล้ายกับของมนุษย์แต่แตกต่างกันเพียงระยะเวลาที่ใช้ในช่วงการเจริญ (Rebecca, 2003) และมี melanocyte ซึ่งสร้างเม็ดสีเมลานินได้ จึงสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีขนที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจนเมื่อมีการเปลี่ยนระยะการเจริญของเส้นขน เพราะการสร้างเม็ดสีนั้นจะมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของเส้นขน โดยการสร้างเม็ดสีจะพบในระยะ anagen phase (ขนสีดำ) เท่านั้น (สัปดาห์ที่ 4-6) เมื่อเข้าสู่ระยะ catagen phase (ขนสีเทา) จะหยุดสร้างเม็ดสี (สัปดาห์ที่ 6-7) จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ telogen phase (ขนร่วงเห็นผิวสีชมพู) (สัปดาห์ 7-11) และเริ่มกลับเข้าสู่ระยะ anagen phase ใหม่ในสัปดาห์ที่ 12 (Muller-Rover et al., 2001) นอกจากการสังเกตความเข้มของสีขนที่เกิดขึ้นใหม่ซึ่งเป็นการดูลักษณะภายนอกแล้ว ยังสามารถศึกษาการเจริญของเส้นขนได้จากการศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อผิวหนังด้วยการตัดชิ้นเนื้อไปย้อมสี และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะของ hair follicle ซึ่งการสังเกตลักษณะของ hair follicle นี้สามารถบอกระยะการเจริญของเส้นขนได้ (Ogawa and Hattori, 1983) โดยถ้าเซลล์ hair follicle มีจำนวนมากและมีขนาดใหญ่และอยู่ลึกลงไปภายในชั้นใต้ผิวหนังแสดงว่าอยู่ในระยะของ anagen phase แต่ถ้าเซลล์นี้มีขนาดเล็กและกระจายตัวอยู่เพียงชั้นหนังแท้แสดงว่าอยู่ในระยะของ telogen phase (Datta et al., 2009)

การวิจัยในครั้งนี้เลือกใช้หนูถีบจักร สายพันธุ์ C57BL/6Mlac เพศผู้ อายุ 7 สัปดาห์ ซึ่งอายุ 7 สัปดาห์นี้มีความเหมาะสมและมีระยะ telogen phase ของการเจริญที่คงที่ (Hye, Nannan and Dong, 2011) จากการทดสอบพบว่า ในสัปดาห์แรกและสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลอง หนูถีบจักรทุกกลุ่มการทดลองไม่พบการเจริญของเส้นขน ซึ่งหนูในสัปดาห์นี้มีอายุ 8 และ 9 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งจะอยู่ในช่วง telogen phase ของระยะการเจริญ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 เริ่มมีการเจริญของเส้นขน โดยกลุ่มที่ทา 2% สารละลายไมนอกซิดิลและกลุ่มที่ทา 1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม มีเส้นขนขึ้นเป็นกระจุกสีดำเล็กน้อย และมีการเจริญของเส้นขนจนเต็มพื้นที่ทดสอบในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดสอบแสดงให้เห็นว่ากลุ่มทดสอบทั้ง 2 กลุ่มนี้สามารถเร่งการเจริญของเส้นขนได้ดี เพราะมีการเจริญของเส้นขนขึ้นใหม่โดยสามารถเร่งให้ระยะของ telogen phase กลับเข้าสู่ระยะ anagen phase เร็วขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Van et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของฟินาสเทอไรด์ที่ใช้ในการเตรียมตำรับนั้นมีผลต่อการเจริญของเส้นขน โดยความเข้มข้นสูงสามารถเร่งการเจริญของเส้นขนได้ดีกว่าความเข้มข้นต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Han et al. (2004) พบว่า ไมนอกซิดิลสามารถชักนำให้เกิดการแบ่งตัวของ dermal papilla cell ได้ในช่วง 0.01 – 1 μ M โดยจะขึ้นกับระยะเวลาและขนาดของยาที่ใช้ และเมื่อศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อผิวหนังของหนูถีบจักรในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลองพบว่า ในกลุ่มที่ทา 2% สารละลายไมนอกซิดิลและกลุ่มที่ทา 1% ฟินาสเทอไรด์โปรนิโอโซม มีจำนวนของ hair follicle จำนวนมากและมีขนาดที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มของสีขนและการเจริญของเส้นขนที่สังเกตได้ ซึ่ง

จากลักษณะโครงสร้างของผิวหนังที่เห็นสามารถบ่งบอกได้ว่าการเจริญของเส้นขนอยู่ในระยะของ anagen phase โดยลักษณะการเจริญของเส้นขนที่เห็นจะอยู่ในระยะของ anagen IV-VI (Muller-Rover et al., 2001) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบตำรับฟีนาสเทอไรด์ในรูปแบบสารละลายกับ โปรนิโอโซมพบว่า สารละลายฟีนาสเทอไรด์สามารถเร่งการเจริญของเส้นขนได้ต่ำกว่า ฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม เพราะรูปแบบของสารละลายนั้นเมื่อตัวทำละลายระเหยไป ฟีนาสเทอไรด์จะเกาะที่ผิวหนัง ทำให้มีค่าขีดการละลายลดลง และฟีนาสเทอไรด์เป็นยาที่ละลายใน น้ำได้ต่ำจึงส่งผลให้การซึมผ่านทางผิวหนังได้น้อย เนื่องจากยาที่จะซึมผ่านผิวหนังได้ดีต้องมี คุณสมบัติชอบละลายในน้ำและน้ำมันใกล้เคียงกัน ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงส่งผลให้การเจริญของ เส้นขนของสารละลายฟีนาสเทอไรด์ต่ำกว่าฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซม

การพัฒนาตำรับฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นนั้นเป็นการนำเทคโนโลยี ระดับนาโนมาใช้ในการพัฒนาการนำส่งสาร ซึ่งมีข้อดีกว่าการศึกษาของ Thomas et al (2000) และ Ammon et al. (2000) เพราะตำรับโปรนิโอโซมจะสามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านทางผิวหนังของ ยาฟีนาสเทอไรด์ได้มากกว่าในรูปแบบของสารละลายและในรูปแบบเจล นอกจากนี้ยังเป็นการนำส่ง ยาฟีนาสเทอไรด์เข้าสู่อวัยวะเป้าหมายที่ใช้ในการรักษาภาวะผมร่วงโดยตรงที่อยู่ภายในรูขุมขน แม้จะมีการศึกษาของ Tabbakhian et al (2006); Rao et al (2008) ในการเตรียมตำรับฟีนาสเทอไรด์ ในรูปแบบของไลโปโซมและเอทโซโซมเพื่อเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขน แต่การศึกษานี้ยังไม่มี การประเมินประสิทธิภาพการเจริญของเส้นผมของตำรับทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ส่งผล ให้การเตรียมตำรับฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมเพื่อเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขนที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความ น่าสนใจและสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาใช้ภายนอกต่อไปได้ และเนื่องจากตำรับโปรนิโอโซม ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการนำส่งผ่านทางรูขุมขนซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของผิวหนังและองค์ประกอบ ในตำรับโปรนิโอโซมประกอบด้วยสารเคมี ไม่ว่าจะเป็นสารลดแรงตึงผิว แอลกอฮอล์ สารเหล่านี้ มักก่อให้เกิดการระคายเคืองและการอักเสบแก่ผิวหนัง แต่ก็ขึ้นกับความถี่ในการสัมผัสกับสาร ความเข้มข้นในการสัมผัส ระยะเวลาในการสัมผัส ตำแหน่งของผิวในการสัมผัส และความเป็นพิษ ของสารนั้น จึงจำเป็นต้องมีการประเมินการระคายเคืองผิวก่อนการนำไปใช้ จากผลการทดลอง พบว่า ตำรับโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้นแม้จะมีสารลดแรงตึงผิวและแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบใน ตำรับ โปรนิโอโซมแต่ก็ไม่ก่อให้เกิดอาการบวมและอาการแดงที่ผิวของกระด้างเมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุมตลอดเวลาระยะ 72 ชั่วโมง

ดังนั้นการเตรียมตำรับฟีนาสเทอไรด์ที่สามารถเพิ่มการซึมผ่านทางรูขุมขนได้ ขึ้นกับขนาดของอนุภาค องค์ประกอบในตำรับ และการนำเทคโนโลยีระดับนาโนมาใช้ในการ พัฒนาตำรับซึ่งพบว่า ตำรับฟีนาสเทอไรด์โปรนิโอโซมนี้สามารถนำส่งผ่านทางรูขุมขนได้

นอกจากนี้ตำรับฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมยังมีประสิทธิภาพกระตุ้นการเจริญของเส้นขนได้ดี เทียบเท่ากับสารละลายไมนออกซิดิล (2% Regaine®) และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารละลาย ฟีนาสเตอไรด์ นอกจากนี้ยังไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวเมื่อนำไปใช้เป็นยาทาภายนอก

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 การศึกษาการปลดปล่อยยาควรเปรียบเทียบความเข้มข้นของยาฟีนาสเตอไรด์ ในตำรับโปรนิโอโซมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับสารละลายไมนออกซิดิล และมีการเปรียบเทียบ การปลดปล่อยยาเมื่อเก็บไว้ภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันเป็นเวลา 4 เดือน

5.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของฟีนาสเตอไรด์โปรนิโอโซมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ใน อาสาสมัครที่เป็นโรคภาวะผมร่วง เพื่อประเมินประสิทธิภาพของตำรับโปรนิโอโซมที่พัฒนาขึ้น

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- วรากรณ์ จรรยาประเสริฐ. (2009). นาโนเทคโนโลยี : การนำส่งยาและเครื่องสำอางทางผิวหนัง. กรุงเทพมหานคร : ประชาชน จำกัด
- อริญญา มโนสร้อย และคณะ. (2008). การประยุกต์เทคโนโลยีนาโนในการนำส่งสารผ่านทางรากผม. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Ajay, S., and et al. (2008). "Preparation, Characterization, optimization, and stability studies of Aceclofenac Proniosomes", Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. 7(4): 237-246.
- Alexa, P., and et al. (2008). "Hair follicles, their disorders and their opportunities", Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. 5(2): 173-180.
- Almira, I., Blazek, W. and Rhodes, D.G. (2001). "Maltodextrin based proniosomes", AAPS PharmSciTech. 3(1): 1-7.
- Alvarez-Roman, R., and et al. (2004). "Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles", Journal of Controlled Release. 99(1): 53-62.
- Amnon, S., and et al. (2000). "New topical antiandrogenic formulations can stimulate hair growth in human bald scalp grafted onto mice", International Journal of Pharmaceutics. 194(1): 125-134.
- Amos, G. and Richard, S.K. (2006). "Alopecia Areata: A tissue specific autoimmune disease of the hair follicle", Autoimmunity Reviews. 5(1): 64-69.
- Ammer, H.O., and et al. (2011). "Proniosome as a carrier system for transdermal delivery of tenoxicam", International Journal of Pharmaceutics. 405(1-2): 142-152.
- Andrea, C.L., and et al. (1995). "Transfollicular drug delivery", Pharmaceutical Research. 12(2): 179-186.
- Aranya, M., and et al. (2012). "Transfollicular enhancement of gel containing cationic niosomes loaded with unsaturated fatty acid in rice (*Oryza sativa*) bran semi-purified fraction", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 81(2): 303-313.
- Aslan, N. (2007). "Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling the influence of some operating variables of a Multi-Gravity Separator for coal cleaning", Fuel. 86(5-6): 769-776.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Balakrishnan, P., and et al. (2009). "Formulation and in vitro assessment of minoxidill niosomes for enhanced skin delivery", International Journal of Pharmaceutics. 377(1-2): 1-8.
- Barcaui, C.B., and et al. (2006). "Stem cell apoptosis in HIV-1 alopecia", Journal of Cutaneous Pathology. 33(10): 667-671.
- Basavaiah, K. and Somashekar, B. C. (2007). "Determination of Finasteride in Tablets by High Permormance Liquid Chromatography", E-Journal of Chemistry. 4(1): 109-116.
- Behrooz, N. (2005). "Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes", International Journal of Pharmaceutics. 300(1-2): 95-101.
- Bharti, N., Loona, S. and Khan, M.M. (2012). "Proniosomes: A recent advancement in nanotechnology as a drug carrier", International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 12(1): 67-75.
- Bunjes, H. (2004). "Charecterization of solid lipid nano- and microparticles", Journal of Phamaceutical Science. 41-66.
- Caputo, R.V. (1986). "Fungal infection in children", Dermatological Clinics. 4(1): 137-149.
- Daneshamouz, S., and et al. (2005). "Influence of liposomes and niosomes on the in vitro permeation and skin retention of finasteride", Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. 1(3): 119-130.
- Darla, A.G., and et al. (2011). "Initial Office Evaluation of Hair Loss in Adult Women", The Journal for Nurse Practitioners. 7(6): 456-462.
- Datta, K., and et al. (2009). "Eclipta alba exterct with potential for hair growth promoting activity", Journal of Ethnopharmacology. 124(3): 450-456.
- Demir, H., Cucu, A. and Sakarya, S. (2006). "Determination of finasteride in the tablet form by liquid chromatography and its analytical method validation", Analytica Chimica Acta. 557(1-2): 252-255.
- Domashenko, A., and et al. (2000). "Efficient delivery of transgenes to human hair follicles progenitor cells using topical lipoplex", Nature Biotechnology. 18(4): 420-423.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. (1944). "Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes", Journal of Pharmacology Experimental Theraphy. 82: 377-390.
- Ei-Laithy, and et al. (2011). "Novel sugar esters proniosomes for transdermal delivery of vinpocetine: Preclinical and clinical studies", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 77(1): 43-55.
- Faller, C. and Bracher, M. (2002). "Reconstructed skin kits: reproducibility of cutaneous irritancy testing", Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology. 15(1): 74-91.
- Gay, R., and et al. (1992). "The living skin equivalent as a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants", Toxicology In Vitro. 6(4): 303-315.
- Gayatri, D.S., and et al. (2000). "Niosomal sumatriptan succinate for nasal administration", International Journal of Pharmaceutics. 62(6): 479-481.
- Gillet, A., Evrard, B. and Piel, G. (2011). "Liposomes and parameters effecting their skin penetration behavior", Journal of Drug Delivery and Sciences Technology. 21: 35-42.
- Gisoni, P., and et al. (2003). "Disseminated lupus vulgaris", European of Journal Dermatology. 13: 500-502.
- Gormley, G. J. (1995). "Finasteride: a clinical review", Biomed and Pharmacother. 49: 319-324.
- Goh, C.L. and Soh, S.D. (1984). "Occupational dermatoses in Singapore", Contact Dermatitis. 5: 288-293.
- Gupta, A., and et al. (2007). "Design and development of proniosome transdermal drug delivery system for captopril", Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 6(2): 687-693.
- Han, I., and et al. (2004). "Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis", Experimental Dermatology. 13(2): 86-92.
- Han, J.H., and et al. (2004). "Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle", Journal of Dermatological Science. 34(2): 91-98.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Hatziantoniou, S., and et al. (2007). "Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticles containing high amounts of ceramides", Micron. 38(8): 819-823.
- Hermes, B., and et al. (1998). "Scar forming alopecia: Comments on classification, differential diagnosis and pathobiology", Hautarzt. 49(6): 462-472.
- Hoffman, R.M. (2005). "Gene and stem cell therapy of the hair follicle", Methods in Molecular Biology. 289: 437-448.
- Hoffman, R.M. (2006). "The hair follicles and its stem cells as drug delivery targets", Expert Opinion on Drug Delivery. 3(3): 437-443.
- Hugo, P. (2004). "Ketocazole as an adjunct to finasteride in the treatment of androgenetic alopecia in men", Medical Hypotheses. 62(1): 112-115.
- Hye, J.P., Nannan, Z. and Dong, K.P. (2011). "Topical application of *Polygonum multiflorum* extract induces hair growth of resting hair follicles through upregulating Shh and β -catenin expression in C57BL/6 mice", Journal of Ethnopharmacology. 135(2): 369-375.
- Jacobi, U., and et al. (2007). "Porcine ear skin: an in vitro model for human skin", Skin Research and Technology. 13(1): 19-24.
- Ji, H.H., and et al. (2004). "Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle", Journal of Dermatological Science. 34(2): 91-98.
- Joana, A., and et al. (2012). "Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): in vitro and ex vivo studies", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 8(6): 1034-1041.
- Jung, S., and et al. (2006). "Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system : penetration into porcine hair follicles", Journal of Investigative Dermatology. 126(8): 1728-1732.
- Kasumagic-Halilovic, E. (2008). "Thyroid autoimmunity in patients with alopecia areata", Acta Dermatovenerologica Croatica. 16(3): 123-125.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kefale, T., and et al. (2008). "Toxicity studies on dermal application of plant extract of *Plumbago zeylanica* used in Ethiopian traditional medicine", Journal of Ethnopharmacology. 117(2): 236-248.
- Knorr, F., and et al. (2009). "Follicular transport route - Research progress and future perspectives", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 71(2): 173-180.
- Krause, K. and Foitzik, K. (2006). "Biology of the hair follicle:the basics", Seminar in Cutaneous Medicine and Surgery. 25(1): 2-10.
- Kuntsche, J. (2010). "Influence of stabilizer systems on the properties and phase behavior of supercooled smectic nanoparticles", Journal of Colloid and Interface Science. 350(1): 229-239.
- Lademann, J., and et al. (2010). "Which skin model is the most appropriate for the investigation of topically applied substance into the hair follicles?", Skin Pharmacology and Physiology. 23: 47-52.
- Lademann, J., and et al. (2008). "Application of optical non-invasive methods in skin physiology", Laser Physic Letter. 5: 335-346.
- Ladmann, J., and et al. (2001). "Investigation of follicular penetration of topically applied substances", Skin Pharmacology. 14(1): 17-22.
- Lademann, J., and et al. (2007). "Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles", European of Journal Pharmaceutic and Biopharmaceutics. 66(2): 159-164.
- Lee, J., and et al. (2002). "Pharmacokinetic comparison of intravenous carbendazim and remote loaded carbendazim liposomes in nude mice", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 28(1): 65-72.
- Lopez, F.A. and Lartchenko, S. (2006). "Skin and soft tissue infections", Infections Disease Clinics of North American. 20(4): 759-774.
- Lu, B., Zhang, J.Q. and Yang, H. (2003). "Nonphospholipid vesicles of carboplatin for lung targeting", Drug Delivery. 10(2): 87-94.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Maghraby-El, G.M., Barry, B.W. and Williams, A.C. (2008). "Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes", European Journal of Pharmaceutical Science. 34(4-5): 203-222.
- Makrantonaki, E. and Zouboulis, C.C. (2007). "The skin as a mirror of the aging process in the human organism - State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2)", Experimental Gerontology. 42(9): 879-886.
- Margarita, G.S. and Vladislav, P.T. (2011). "Trace elements content and hormonal profiles in women with androgenetic alopecia", Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 25(1): s50-s53.
- Marie-Alexandrine, B., and et al. (2012). "Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane", Current Opinion in Colloid & Interface Science. 17(3): 156-165.
- Mehnert, W. and Mäder, K. (2001). "Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications", Advance Drug Delivery. 47(2-3): 165-196.
- Meidan, V.M., and et al. (2005). "Transfollicular drug delivery – is it reality?", International Journal Pharmaceutics. 306(1-2): 1-14.
- Michniak-Kohn, B.B., and et al. (2005). "Skin: physiology and penetration pathway", Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products. William Andrew Inc: New York. 77-100.
- Mill, P.C. and Cross, S.E. (2006). "Transdermal drug delivery: Basic principles for the veterinarian", The Veterinary Journal. 172(2): 218-233.
- Mohamed, M.N., Labiba, K.K. and Nawal, K. (2005). "Release stability of 5-fluorouracil liposomal concentrates, gel and lyophilized powder", Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research. 62(5): 381-391.
- Mokhtar, M., and et al. (2008). "Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes", International Journal of Pharmaceutics. 361(1-2): 104-111.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Mona, M.A., and et al. (2011). "Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 79(1): 36-42.
- Mori, O. and Uno, H. (1990). "The effect of topical minoxidil on hair follicular cycles of rats", Journal of Dermatology. 17(5): 276-281.
- Muller, R.H., and et al. (2002). "Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations", Advanced Drug Delivery Review. 54: 131-155.
- Muller-Rover, S., and et al. (2001). "A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages", Journal of Investigative Dermatology. 117(1): 3-15.
- Mura, S., and et al. (2007). "Liposomes and niosomes as potential carriers for dermal delivery of minoxidil", Journal of Drug Targeting. 15(2): 101-108.
- Naphatson, K., and et al. (2012). "5 α -reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment", Journal of Rethnopharmacology. 139(3): 765-771.
- Narisa, K., and et al. (2007). "The Investigation of the Rabbit and Human Skin Irritation of Herbal Anti-wrinkle Cream", Thai Pharmacy Health Science Journal. 2(1): 20-25.
- Nate, S., Jared, P.S. and Jason, A.H. (2009). "Three isostructural solvates of finasteride and their solid-state characterization", European Journal of Pharmaceutical Sciences. 38(5): 498-503.
- Nicole, E., and et al. (2008). "Medical treatments for male and female pattern hair loss", Continuing Medical Education. 59(4): 547-566.
- Nuck, B.A., Fogelson, S.L. and Lucky, A.W. (1987). "Topical minoxidil does not act as an antiandrogen in the flank organ of the golden Syrian hamster", Archives of dermatology. 123(1): 59-61
- Ogawa, H. and Hattori, M. (1983). "Regulation mechanisms of hair growth", Current Problems in Dermatology. 11: 159-170.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Ogiso, T., and et al. (2002). "Transfollicular Drug Delivery: Penetration of Drugs Through Human Scalp Skin and Comparison of Penetration Between Scalp and Abdominal Skins *In Vitro*", Journal of Drug Targeting. 10(5): 369-378.
- Ohtawa, M., Morikawa, H. and Shimazaki, J. (1991). "Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of N-(2-methyl-2-propyl)-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-ene-17-one-carboxamide, a new type of specific competitive inhibitor of testosterone 5 α -reductase, in volunteers", European Journal of Drug metabolism and Pharmacokinetics. 16: 15-21
- Patzelt, A., and et al. (2008). "Differential stripping demonstrates a significant reduction of hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo", European of Journal Pharmaceutic and Biopharmaceutics. 70(1): 234-238.
- Paus, R. (2006). "Therapeutic strategies for treating hair loss", Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies. 3(1): 101-110.
- Patzelt, A., and et al. (2011). "Selective follicular targeting by modification of the particle sizes", Journal of Controlled Release. 150(1): 45-48.
- Phikunthong, K., and et al. (2011). "Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement", Food Research International. 44: 605-612.
- Pillai, G.K. and Salim, M.L.D. (1999). "Enhanced inhibition of platelet aggregation in vitro by niosome-encapsulated indomethacin", International Journal of Pharmaceutics. 193(1): 123-127.
- Price, V.H. (1999). "Treatment of hair loss", The New England Journal of Medicine. 341: 964 - 973.
- Puglia, C., and et al. (2004). "Evaluation of in vivo topical anti inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles", The Journal of Pharmacy and Pharmacology. 56(10): 1225-1232.
- Rao, Y., and et al. (2008). "In vitro percutaneous permeation and skin accumulation of finasteride using vesicular ethosomal carriers", AAPS PharmSciTech. 9(3): 860-865.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Rebecca, M.P. (2003). "Mouse model for human hair loss disorders", Journal of Anatomical Society of Great Britain and Ireland. 202(1): 125-131.
- Schmitt, D., and et al. (2008). "Toxicologic evaluation of modified gum acacia: Mutagenicity, acute and subchronic toxicity", Food and Chemical Toxicologic. 46(3): 1048-1054.
- Seema, G. and Andrew, G.M. (2009). "Alopecia Areata: Evidence-Based Treatments", Seminar in Cutaneous Medicine and Surgery. 28: 15-18.
- Shigeki, I. and Satoshi, I. (2011). "Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla", Journal of Dermatological Science. 61(1): 1-6.
- Slominski, A. and Paus, R. (1993). "Melanogenesis is coupled to murine anagen: toward new concepts for the role of melanocytes and the regulation of melanogenesis in hair growth", The Journal of Investigative Dermatology. 101(1): 90-97.
- Sperling, L.C. (2001). "Hair and systemic disease", Dermatologic Clinics. 19(4): 711-726.
- Soojin, P., Weon, S.S. and Jinnyoung, H. (2011). "*Fructus panax ginseng* extract promotes hair regeneration in C57BL/6 mice", Journal of Ethnopharmacology. 138(2): 340-344.
- Sophia, R. (2004). "Cancer and stigma: experience of patients with chemotherapy induced alopecia", Patient Education and Counseling. 52(3): 333-339.
- Solanki, A.B., and et al. (2007). "Formulation and optimization of piroxicam proniosomes by 3-factor, 3-level box-behnken design", The American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmscitechnology. 8(4): 43-49.
- Stanczyk, F.Z. (2006). "Diagnosis of hyperandrogenism: Biochemical criteria", Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 20(2): 177-191.
- Sudhamani, T., Priyadarisini, N. and Radhakrishnan, M. (2010). "Proniosomes – A Promising Drug Carriers", International Journal of PharmTech Research. 2(2): 1446-1454.
- Syed, A.A. and Amshumali, M.K. (2001). "LC determination of finasteride and its application to storage stability studies", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 25(5-6): 1015-1019.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Tabbakhian, M., and et al. (2006). "Enhancement. of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes - 1. In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models", International Journal of Pharmaceutics. 323(1-2): 1-10.
- Tarl, W.P., and et al. (2011). "Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery", Advanced Drug Delivery Reviews. 63(6): 470-491.
- Tebbe, B. (2004). "Clinical course and prognosis of cutaneous lupus erythematosus", Clinics of Dermatology. 22(2): 121-124.
- Thomas, M. P., and et al. (2000). "Lack of effect of topical finasteride suggests an endocrine role for dihydrotestosterone", American Society for Reproductive Medicine. 74(2): 414-415.
- Thomas, W., David, A.B. and Klaus, R.S. (2004). "In vitro skin irritation: fact and future, State of art review of mechanisms and model", Toxicology in Vitro. 18(3): 231-243.
- Toll, R., and et al. (2004). "Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles", Journal of Investigative Dermatology. 123(1): 168-176.
- Ulrike, B.P., and et al. (2010). "Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam", European of Journal Pharmmaceutic and Biopharmaceutics. 76(3): 450-453.
- Umesh, G.D. and Joel, L.Z. (1981). "Effect of nonionic surfactants on penetration of dissolve Benzocain through hairless mouse skin", Journal of the Society of Cosmetic Chemists. 32: 87-94.
- Van, N., and et al. (2000). "Finasteride increases anagen hair in men with androgenic alopecia", Journal of Dermatology. 143(4): 804-810.
- Varaporn, B.J., Veerawut, T. and Tasaneeya, S. (2008). "Effect of charged and non-ionic membrane additives on physicochemical properties and stability of niosomes", Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists. 9(3): 851-859.
- Verma, D.D., and et al. (2003). "Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin", International Journal of Pharmaceutics. 258(1-2): 141-151.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Vierhapper, H. (2003). "Production rates of testosterone and dihydrotestosterone in female pattern hair loss", Metabolism. 52(7): 927-929.
- Vora, B., Khopade, A.J. and Jain, N.K. (1998). "Proniosome based transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception", Journal of Controlled. 54(2): 149-165.
- Wasserman, D., and et al. (2007). "Alopecia areata", International Journal of Dermatology. 46(2): 121-131.
- Wester, R.C., and et al. (1984). "Minoxidil stimulates cutaneous blood flow in human blading scalp: Pharmacodynamics measured by laser Doppler velocimetry and photopulse plethysmography", Journal of Investigative Dermatology. 82(5): 515-517.
- Williams, A. (2003). "Physical and technological modulation of topical and transdermal drug delivery", Transdermal and Topical Drug Delivery. 67-123.
- Wing, C.M., and et al. (2011). "Drug delivery into the skin by degradable particles", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 79(1): 23-27.
- Xiaoyun, Z., and et al. (2010). "Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using response surface methodology", Powder Technology. 197: 120-128.
- Xiulian, Y., Quinghong, Y. and Zhonghai, J. (2011). "Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology", Carbohydrate Polymers. 86: 1358-1364.
- Yadav, B., Saroha, K. and Sharma, B. (2011). "Transdermal patch: A discrete dosage form", International Journal of Current Pharmaceutical Research. 3(3): 98-108.
- Yakov, F., and et al. (2007). "The influence of drug partition coefficient on follicular penetration: In vitro human skin studies", European Journal of Pharmaceutical Science. 30(3-4): 280-287.
- Ylva, Y.G., and et al. (2004). "Time and depth resolved visualisation of the diffusion of a lipophilic dye into the hair follicle of fresh unfixed human scalp skin", Journal of Controlled Release. 98(3): 367-378.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Yoshioka, T., Sternberg, B. and Florence, A.T. (1994). "Preparation and properties of vesicle (niosomes) of sorbitan monoesters (span20, 40, 60 and 80) and a sorbitan triester (span 85)", International Journal of Pharmaceutics. 105(1): 1-6.
- Zhang , X., and et al. (2010). "Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using repose surface methodology", Power Technology. 197(1-2): 120-128.
- Zidan, A.S. and Mokhter, M. (2011). "Multivariate optimization of formulation variables influencing flurbiprofen proniosome characteristic", Journal of Pharmaceutical Sciences. 100(6): 2212-2221.
- Zohreh, H., and et al. (2009). "Comparing the therapeutic effects of finasteride gel and tablet in treatment of the androgenetic alopecia", Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology. 75(1): 47-51.

ภาคผนวก

คำนวณการเตรียมตำรับโปรนิโอโซม

เตรียมตำรับ 100 mL โดยใช้ไขมันในตำรับทั้งหมด 10 mM ปริมาณคอเรสเตอรอล 30 %
ความเข้มข้นฟีนาสเคอไรด์ 1.5 mM

ไขมันที่ใช้ 2 ชนิดคือสัดส่วนระหว่างคอเรสเตอรอลกับสเปน 60 อัตราส่วน 3:7 (เตรียม 10 mM)

เตรียมคอเรสเตอรอล 3 mM (MW 386.67)

ในน้ำ 1000 mL มีคอเรสเตอรอล 3 mM

ในน้ำ 100 mL มีคอเรสเตอรอล = $(3 \times 100) / 1000 = 0.3 \text{ mM}$

เพราะฉะนั้นต้องชั่งคอเรสเตอรอล = $0.3 \times 386.67 = 116 \text{ mg}$

เตรียมสเปน 60 7mM (MW 430.62)

ในน้ำ 1000 mL มีสเปน 60 7mM

ในน้ำ 100 mL มีสเปน 60 = $(7 \times 100) / 1000 = 0.7 \text{ mM}$

เพราะฉะนั้นต้องชั่งสเปน 60 = $0.7 \times 430.62 = 301.43 \text{ mg}$

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ

ภณิกขา วิชยปรีชา

วัน เดือน ปี เกิด

18 ธันวาคม 2530

ภูมิลำเนา

จังหวัดบุรีรัมย์

ประวัติการศึกษา

มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนบุรีรัมย์พิทยาคม อำเภอเมือง
จังหวัดบุรีรัมย์

ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชา
วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย
นเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

ประสบการณ์ทำงาน

-

ที่อยู่ปัจจุบัน

51/17 ถนนหน้าสถานี ตำบลในเมือง อำเภอเมืองบุรีรัมย์
จังหวัดบุรีรัมย์