

การเตรียมนีโอโซมเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เพื่อใช้ในเครื่องสำอาง
PREPARATION OF ACETYL HEXAPEPTIDE LOADED NIOSOME
FOR COSMETIC UTILIZATION

ฐิติเชษฐ มั่งเกียรติสกุล

อีเมลล์: thitiched.m@gmail.com

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. ภัทวดี ไชยกุล

อีเมลล์: puxvadee@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาตำรับนีโอโซมเปล่าที่มีความคงตัวทางกายภาพ และนำมาเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ เพื่อใช้ประโยชน์ในเครื่องสำอาง ตลอดจนศึกษาความคงตัวของตำรับทางกายภาพ และความคงตัวทางเคมีของอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ที่เก็บกักในตำรับ โดยตำรับนีโอโซมเปล่าที่มีความคงตัวทางกายภาพดี ประกอบด้วยบริทแอล 4 คอเลสเตรอล และซีติลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ ในอัตราส่วนโมลาร์ 1.025 ต่อ 1.025 ต่อ 0.05 ตามลำดับ สามารถเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในน้ำความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรร้อยละ 5 มีขนาดอนุภาคอนุภาคนีโอโซม 763.80 ± 131.19 นาโนเมตร และค่าศักย์ซีต้า 66.80 ± 4.03 มิลลิโวลต์ เมื่อนำตำรับนีโอโซมเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์มาประเมินความคงตัวในสภาวะทดสอบ 4 สภาวะ คือ อุณหภูมิห้อง 4 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และสภาวะร้อนสลับเย็น จำนวน 7 รอบ พบว่า ลักษณะทางกายภาพของตำรับ ทั้งขนาดอนุภาค คำนีการกระจายตัวของอนุภาค และศักย์ซีต้า มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 30 แต่ค่าความเป็นกรดต่างมีการเปลี่ยนแปลงร้อยละ 21-30 ในสภาวะทดสอบที่อุณหภูมิห้อง 45 องศาเซลเซียส และสภาวะร้อนสลับเย็น ส่วนความคงตัวทางเคมีของตำรับ ประเมินด้วยวิธี Bradford assay เพื่อหาปริมาณโปรตีนคงเหลือ พบว่า ตำรับนีโอโซมเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ มีปริมาณโปรตีนคงเหลือสูงกว่าสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์อย่างมีนัยสำคัญในสภาวะการทดสอบที่ 45 องศาเซลเซียส (p -value = 0.01) และสภาวะร้อนสลับเย็น จำนวน 7 รอบ (p -value = 0.01) การศึกษานี้มี

ประโยชน์ในการเพิ่มความคงตัวของอะซีทิลเฮกซะเปปไทด์ด้วยการกักกั้นในนีโอโซม สำหรับการ
ใช้ประโยชน์ในเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ: นีโอโซม/อะซีทิลเฮกซะเปปไทด์/การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ/การทดสอบความ
คงตัวทางเคมี

Abstract

The aims of this study were to develop the blank niosomal formulation with good physical stability and prepare the niosomes loaded with acetyl hexapeptide for cosmetic utilization. In addition, the physicochemical characteristics of niosomes loaded with acetyl hexapeptide were performed. The blank niosomal formulation, which was consisted of Brij[®] L4/cholesterol/cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) in the molar ratio of 1.025:1.025:0.05, was loaded with 0.5 mg/ml acetyl hexapeptide solution at 5%. The average vesicular size of niosomes loaded with acetyl hexapeptide was 763.80±131.19 nanometers, whereas the zeta potential value was 66.80±4.03 millivolt. After keep the niosomes loaded with acetyl hexapeptide at 4 storage conditions, including room temperature, 4 and 45°C, and 7 cycles of heating-cooling cycle, all formulations were shown the changed physical characteristics, including particle size, polydispersity index and zeta potential, less than 30% in compared to at initial. However, pH values of all formulations were changed in the range of 21-30% in compared to at initial. For chemical stability evaluated by Bradford dye assay, acetyl hexapeptide loaded in niosomes was shown the remaining protein content greater that acetyl hexapeptide solution, particularly in the storage condition at 45°C (*p*-value = 0.01) and 7 cycles of heating-cooling cycle (*p*-value = 0.01). The advantage of study is to prepare the acetyl hexapeptide loaded in niosomal preparation in order to increase the compound stability in the cosmetic products.

Keywords: Niosome/acetyl hexapeptide/physical stability/chemical stability

1. บทนำ

การศึกษาศาสตร์ของการเกิดริ้วรอยหรือร่องลึกบนใบหน้าในเซลล์ผิวหนัง พบว่าเกี่ยวข้องกับกลุ่มโปรตีนชื่อว่า SNARE Complex (Ruiz, 2006) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนในเซลล์เมมเบรน ได้แก่ synaptobrevin (VAMP), syntaxin และ synaptosomal-associated protein (SNAP-25) โดยเมื่อโปรตีนทั้ง 3 ชนิดจับตัวกันทำให้เกิดการเกร็ง หด ขยาย ของกล้ามเนื้อ เกิดเป็นริ้วรอย

ร่องลึกปรากฏบนผิว อะซีติลเฮกซะเปปไทด์ เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัว มีกลไกการทำงานโดยทำให้ Acetylcholine ไม่สามารถจับกับตัวรับและกระตุ้นให้เกิดสัญญาณประสาท กล้ามเนื้อจึงไม่เกิดการหดตัว และทำให้ไม่เกิดรีวรอยจากการแสดงอารมณ์ แต่เนื่องจากสารมีความคงตัวทางเคมีต่ำและถูกทำลายโดยความร้อนได้ง่าย (Ruiz, 2006) จึงทำให้การออกฤทธิ์ของสารลดลง นิโอโซม คือ เทคนิคการนำส่งสารสำคัญ (อรนุช ธนเขตไพศาล, 2555) มีลักษณะโครงสร้างเป็นผนังสองชั้น (bilayer membrane) ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) ซึ่งนิโอโซมสามารถเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญที่เก็บกักอยู่ภายในและช่วยนำส่งสารเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้ดี

วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้ คือ การพัฒนาตำรับนิโอโซมเปล่าที่มีความคงตัวทางกายภาพ และนำมาเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ ตลอดจนศึกษาความคงตัวของตำรับทางกายภาพ และความคงตัวทางเคมีของอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ที่เก็บกักในตำรับนิโอโซมเปรียบเทียบกับในรูปแบบสารละลาย

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 เตรียมตำรับนิโอโซมเปล่าและตำรับนิโอโซมเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์
- 2.2 ประเมินลักษณะทางกายภาพและความคงตัวทางกายภาพของนิโอโซมเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์
- 2.3 ประเมินความคงตัวทางเคมีของอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ที่เก็บกักในนิโอโซมเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เก็บกัก (free form)

3. ขอบเขตการวิจัย

- 3.1 เตรียมตำรับนิโอโซมเปล่า
- 3.2 ประเมินลักษณะทางกายภาพของนิโอโซมเปล่า
- 3.3 เตรียมตำรับอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เก็บกักในนิโอโซม
- 3.4 ประเมินลักษณะทางกายภาพของนิโอโซมเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์
- 3.5 ประเมินความคงตัวทางเคมีของอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ที่เก็บกักในนิโอโซมเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เก็บกัก

4. การทบทวนวรรณกรรม

นิโอโซม (อรนุช ธนเขตไพศาล, 2555) มีลักษณะเป็นถุงทรงกลมขนาดเล็ก ที่เก็บกักสารต่าง ๆ ไว้ภายในอนุภาคเดียวกัน โดยองค์ประกอบของนิโอโซม (อรนุช ธนเขตไพศาล, 2555)

ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ที่สามารถจัดเรียงตัวรวมกันได้ จนมีลักษณะทรงกลม สารเพิ่มความแข็งแรงของผนังนีโอโซม ได้แก่ คอเลสเทอรอล โดยสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสถานะของผนังอนุภาคนีโอโซม และสารเพิ่มความคงตัว ได้แก่ สารที่ทำให้เกิดประจุของอนุภาค เพื่อให้ผิวอนุภาคมีแรงผลักรันทางประจุไฟฟ้า สามารถเพิ่มความคงตัวให้กับอนุภาคนีโอโซมได้ การเตรียมนีโอโซม (อรัญญา มโนสร้อย, 2550) ด้วยเทคนิค Reverse phase evaporation เตรียมโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม และเอทานอล โดยนำสารละลายดังกล่าวมาผสมกับน้ำที่มีสารสำคัญจะได้อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน แล้วนำอิมัลชันมาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกภายใต้สภาวะสูญญากาศ แล้วเติมน้ำเพิ่ม สารผสมจะเกิดการกลับเฟสจากอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ และได้ นีโอโซม

หนึ่งในสาเหตุสำคัญของการรีวรอย ร่องลึกบนใบหน้าเกิดจากกลุ่มโปรตีนชนิดหนึ่ง มีชื่อว่า SNARE Complex (Ruiz, 2006) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน 3 ชนิด ในเซลล์เมมเบรน (Cell Membrane) ได้แก่ synaptobrevin (VAMP), syntaxin และ synaptosomal-associated protein (SNAP-25) โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิดเมื่อจับตัวกันจะมีฤทธิ์กระตุ้นสารสื่อประสาทที่ชื่อ acetylcholine ซึ่งสารจะจับกับตัวรับ (Receptor) ที่อยู่บน Motor neuron แล้วเกิดสัญญาณประสาทไปที่กล้ามเนื้อ ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ หรือเกิดรีวรอยปรากฏบนผิว สามารถแบ่งระยะของการปล่อยสารสื่อประสาทเป็น 2 ระยะ คือระยะที่ 1 Pre-synaptic เป็นระยะที่สารสื่อประสาทยังไม่ถูกปลดปล่อยจากถุงบรรจุ สารที่สามารถยับยั้งการเกิดรีวรอยในระยะที่ 1 เช่น Botox® โดยการฉีดสารเข้าใต้ผิวหนัง จะทำลายโปรตีน SNARE complex จึงไม่เกิดการปลดปล่อยสารสื่อประสาทออกมาจากถุงบรรจุ ระยะที่ 2 Post-synaptic เป็นระยะที่สารสื่อประสาทถูกปล่อยออกมาแล้ว ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ ผ่านทางตัวรับสารสื่อประสาท (Receptor) ที่จับกับสารสื่อประสาท แล้วส่งสัญญาณประสาท สารที่สามารถยับยั้งการเกิดรีวรอยในระยะที่ 2 เช่น อะซีติลเฮกซะเปปไทด์ โดยสารมีลักษณะคล้ายกับ Acetylcholine ทำให้เกิดการแย่งจับกับตัวรับ เป็นผลให้ Acetylcholine ไม่สามารถจับกับตัวรับได้ จึงไม่เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทำให้การเกิดรีวรอยลดลง

อะซีติลเฮกซะเปปไทด์ เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัว ทำหน้าที่ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทำให้รีวรอยโดยเฉพาะบริเวณหน้าผาก และรอบดวงตา ลดลง โดยอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ (Ruiz, 2006) จะเข้าไปแย่งจับโปรตีนในกลุ่ม SNARE Complex แทนโปรตีน SNAP-25 ที่มีขนาดใหญ่กว่า ทำให้การส่งสัญญาณประสาทลดลง กล้ามเนื้อบนใบหน้าคลายตัว รีวรอยจึงลดลง งานวิจัยโดย Wang, Wang, Xiao, Pan, Li and Huo (2013) ในอาสาสมัครชาวจีน 60 คน ที่ได้รับอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ พบว่า อะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในรูปแบบอิมัลชันสามารถลดรีวรอยได้ร้อยละ 17 หลังทา 15 วัน และช่วยลดรีวรอยได้ร้อยละ 30 หลังทา 30 วัน

5. วิธีดำเนินการวิจัย

5.1 เตรียมตำรับนีโอโซมเปล่า จำนวน 12 ตำรับที่มีอัตราส่วน โมลาร์ต่างกัน เพื่อคัดเลือกตำรับสำหรับเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ ด้วยเทคนิค REV และลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Bath sonicator เป็นเวลา 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิของน้ำใน bath ที่ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$

5.2 ประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับนีโอโซมเปล่า ดังนี้

5.2.1 ประเมินลักษณะภายนอกของตำรับด้วยตาและสังเกตการแยกชั้นของตำรับ

5.2.2 ประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ไม่แยกชั้นด้วยเครื่อง Zetasizer และ pH meter โดยประเมินค่า Zeta potential ขนาดอนุภาค Polydispersity index (PDI) และค่า pH โดยวัดค่าจำนวน 3 ครั้ง ต่อตัวอย่าง และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยตั้งต้น (mean initial)

5.3 เก็บตำรับที่ไม่แยกชั้นทดสอบความคงตัว โดยเก็บตำรับภายใต้สภาวะทดสอบ 4 สภาวะ ดังนี้

5.3.1 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

5.3.2 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

5.3.3 ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

5.3.4 ที่สภาวะheating-cooling จำนวน 7 รอบ คือ เก็บที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบต่อเนื่องจนครบ 7 รอบ

5.4 ประเมินตำรับที่เก็บภายใต้ 4 สภาวะทดสอบ เหมือนที่แสดงในข้อ 5.2.2 และเปรียบเทียบค่าที่ได้ กับค่าเฉลี่ยตั้งต้น เพื่อคัดเลือกตำรับสำหรับเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ โดยมีเงื่อนไขการทดสอบคือ ตำรับไม่เกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอนและ ค่าเฉลี่ยตั้งต้นกับค่าหลังการทดสอบความคงตัวภายใต้ 4 สภาวะ มีความแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 30

5.5 เตรียมตำรับนีโอโซมเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในน้ำ ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ปริมาตรร้อยละ 3-12 และเลือกตำรับนีโอโซมเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ที่มีปริมาณสูงสุด และไม่แยกชั้นหรือตกตะกอนหลังเตรียมตำรับ 1 สัปดาห์ เพื่อประเมินความคงตัวทางกายภาพและเคมีต่อไป

5.6 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนีโอโซมเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ด้วยเครื่อง Zetasizer และ pH meter เช่นเดียวกับข้อ 5.2.2 และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัด เป็น ค่าเฉลี่ยตั้งต้น (mean initial)

5.7 เก็บตำรับนีโอโซมเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ภายใต้สภาวะทดสอบ 4 สภาวะ เหมือนที่แสดงในข้อ 5.3

5.8 ประเมินค่ารับน้ำไอโซมเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ที่เก็บภายใต้สภาวะต่างๆ 4 สภาวะ เหมือนที่แสดงในข้อ 5.6 เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยตั้งต้น

5.9 ประเมินความคงตัวของสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เก็บกักในน้ำรับน้ำไอโซมเปรียบเทียบกับสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ ด้วยวิธีการหาปริมาณ โปรตีน โดย Bradford assay (Walker, 2009) และเปรียบเทียบปริมาณอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ จากกราฟสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin

5.10 เก็บน้ำรับน้ำไอโซมเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ น้ำรับน้ำไอโซมเปล่า และสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ ภายใต้สภาวะทดสอบ 4 สภาวะ เช่นเดียวกับข้อ 5.3

5.11 กำหนดค่าปริมาณ โปรตีนที่เหลืออยู่ในแต่ละสภาวะ และแสดงความสัมพันธ์ของเวลาที่เก็บน้ำรับในแต่ละสภาวะกับปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในรูปกราฟเส้น

5.12 ข้อมูลผลการทดลอง แสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล โดยใช้สถิติ one-way ANOVA และ LSD โดยค่า p -value < 0.05 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

6. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

6.1 ผลการเตรียมน้ำรับเปล่า แสดงในตารางที่ 1 ดังนี้

น้ำรับที่ไม่มีสารเพิ่มประจุ คือ น้ำรับที่ 1-6 หลังวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ เกิดการแยกชั้นทุกน้ำรับ ขณะที่น้ำรับที่ 7-12 ซึ่งเติมสารเพิ่มประจุ CTAB พบว่า ไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อนำน้ำที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ ทั้งนี้ น้ำรับที่ 7 และ 10 ไม่พบการตกตะกอน ส่วนน้ำรับอื่น ๆ เกิดการตกตะกอน และพบว่า ค่า pH ของน้ำรับที่มีสารเพิ่มประจุมีค่า pH ต่ำกว่าน้ำรับที่ไม่มีสารเพิ่มประจุ เนื่องจาก CTAB ซึ่งเป็นสารเพิ่มประจุในการศึกษามีความเป็นกรด การประเมินน้ำรับเบื้องต้นพบว่า น้ำรับที่ 7 และ 10 มีความคงตัวดี ไม่พบการแยกชั้น และตะกอนจึงคัดเลือกน้ำรับไปทำการทดสอบต่อไป ทั้งนี้ รายงานการศึกษา โดย Moghasssemi and Hadjizadeh (2014) ระบุ ค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมน้ำรับน้ำไอโซมควรมีค่าอยู่ในช่วง 3-8 ซึ่งในการศึกษา ใช้สารลดแรงตึงผิว 3 ชนิด คือ Brij[®] L4 Span[®] 60 และ Span[®] 80 มีค่า HLB อยู่ในช่วง 4-9 และสามารถเตรียมน้ำไอโซมได้ในการศึกษาก่อนหน้า ในน้ำรับน้ำไอโซม เติมคอเลสเตอรอลและสารเพิ่มประจุ เพื่อเพิ่มความคงตัวให้ผนังของน้ำรับน้ำไอโซมและเพิ่มความสามารถในการเก็บกักสารสำคัญในน้ำไอโซมได้ นอกจากนี้ วิธีเตรียมน้ำรับน้ำไอโซมด้วยเทคนิค REV เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการเตรียมน้ำต่ำกว่า 60°C ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อความคงตัวของอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ ที่เป็นสารสำคัญที่จะเก็บกักในน้ำรับต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการสังเกตการณ์แยกชั้นนีโอโซมเปล่าหลังจากเตรียมตำรับ 1 สัปดาห์

ตำรับที่	อัตราส่วนโมลาร์					เกิดตะกอน	แยกชั้น	สี	ค่า pH เริ่มต้น
	Brij®L4	Span®60	Span®80	คอเลสเตอรอล	CTAB				
1	1.05	-	-	1.05	-	✓	✓	ขาว	7.73
2	-	1.05	-	1.05	-	✓	✓	ขาว	7.23
3	-	-	1.05	1.05	-	✓	✓	ขาว	5.77
4	7	-	-	4	-	✓	✓	ขาว	6.48
5	-	7	-	4	-	✓	✓	ขาว	6.95
6	-	-	7	4	-	X	X	ขาว	5.99
7	1.025	-	-	1.025	0.05	✓	X	ใส	6.24
8	-	1.025	-	1.025	0.05	✓	✓	ขาว	3.84
9	-	-	1.025	1.025	0.05	X	X	ขาว	4.52
10	7	-	-	3.5	0.5	✓	✓	ขาว	3.59
11	-	7	-	3.5	0.5	✓	✓	ขาว	3.58
12	-	-	7	3.5	0.5	✓	✓	ขาว	8.50

6.2 ผลประเมินลักษณะทางกายภาพนีโอโซมเปล่าหลังทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับนีโอโซมเปล่า ขนาดอนุภาคของตำรับ 7 มีค่า 496.60 ± 158.21 nm ส่วนตำรับที่ 10 มีขนาดอนุภาค 317.40 ± 49.14 nm ค่า Polydispersity index (PDI) ของตำรับ 7 และ 10 มีค่าน้อยกว่า 1 แสดงถึงการกระจายตัวของอนุภาคสม่ำเสมอและอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ค่าศักย์ซีต้าตำรับ 7 มีค่า 36.90 ± 1.81 mV และตำรับ 10 มีค่า 61.70 ± 1.13 mV ซึ่งค่าศักย์ซีต้าของทั้งสองตำรับมีค่ามากกว่า 30 mV แสดงถึงความคงตัวของตำรับที่เหมาะสม ไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค

ตารางที่ 2 ผลประเมินลักษณะทางกายภาพนีโอโซมเปล่าด้วย Zetasizer หลังทดสอบความคงตัว

ตำรับที่	สถานะการทดสอบ	ระยะเวลา	ค่าเฉลี่ยตั้งต้น				ค่าเฉลี่ยหลังการทดสอบความคงตัว				การเปลี่ยนแปลง (ร้อยละ)			
			ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ค่าศักย์ซีต้า (mV)	ค่า pH	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ค่าศักย์ซีต้า (mV)	ค่า pH	ขนาดอนุภาค	PDI	ค่าศักย์ซีต้า	ค่า pH
7	อุณหภูมิห้อง	4 สัปดาห์	496.60 ± 158.20	0.51 ± 0.11	36.90 ± 1.81	5.99	590.3 ± 41.99	0.53 ± 0.03	33.2 ± 2.87	6.07	18.87	4.31	10.03	1.34
7	4 °C	4 สัปดาห์	496.60 ± 158.20	0.51 ± 0.11	36.90 ± 1.81	5.99	563.70 ± 41.64	0.53 ± 0.03	33.3 ± 0.81	7.14	13.51	8.43	9.76	19.2
7	45 °C	4 สัปดาห์	496.60 ± 158.20	0.51 ± 0.11	36.90 ± 1.81	5.99	615.30 ± 0.60	0.60 ± 0.07	28.9 ± 2.98	4.77	23.9	18.04	21.68	20.3
7	Heating-Cooling	7 รอบ	496.60 ± 158.20	0.51 ± 0.11	36.90 ± 1.81	5.99	606.50 ± 34.89	0.54 ± 0.02	25.6 ± 0.90	5.59	22.13	6.27	30.62	6.68
10	อุณหภูมิห้อง	4 สัปดาห์	317.40 ± 49.14	0.83 ± 0.11	61.70 ± 1.13	4.52	398.90 ± 42.63	0.83 ± 0.09	30.9 ± 0.57	4.1	25.68	0.36	49.92	10.2
10	4 °C	4 สัปดาห์	317.40 ± 49.14	0.83 ± 0.11	61.70 ± 1.13	4.52	369.60 ± 0.98	0.42 ± 0.03	0.66 ± 0.05	4.18	16.45	48.92	98.94	7.5
10	45 °C	4 สัปดาห์	317.40 ± 49.14	0.83 ± 0.11	61.70 ± 1.13	4.52	423.40 ± 43.39	0.42 ± 0.03	44.8 ± 1.89	5.53	33.4	49.52	27.39	22.3
10	Heating-Cooling	7 รอบ	317.40 ± 49.14	0.83 ± 0.11	61.70 ± 1.13	4.52	357.90 ± 49.14	0.42 ± 0.01	56.2 ± 1.45	4.97	12.76	46.65	8.91	10

เมื่อทดสอบตำรับนีโอโซมเปล่าภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน พบว่าขนาดอนุภาคตำรับ 7 มีขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้น โดยที่ 45°C ขนาดอนุภาคของตำรับมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด ทั้งนี้ทุกสภาวะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 30 ขนาดอนุภาคของตำรับ 10 เพิ่มขึ้น โดยตำรับที่ 45°C มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าร้อยละ 30 ขณะที่สภาวะการทดสอบอื่นมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 30 ค่าศักย์ซีต้าของตำรับ 7 มีค่าลดลงหลังการเก็บภายใต้สภาวะทดสอบทุกสภาวะ และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 30 ขณะที่ค่าศักย์ซีต้าของตำรับ 10 มีค่าศักย์ซีต้าลดลงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4°C มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าร้อยละ 30 ค่า pH ของตำรับนีโอโซม 7 และ 10 มีการเปลี่ยนแปลงหลังการทดสอบต่าง ๆ น้อยกว่าร้อยละ 30 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของตำรับ 7 และ 10 พบว่า ตำรับ 7 มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพน้อยกว่าตำรับ 10 ซึ่งแสดงถึงความคงตัวของตำรับที่มากกว่าจึงเลือกตำรับ 7 สำหรับเก็บกักสารสำคัญต่อไป รายงานการศึกษา โดย Mohammad et al. (2015) ระบุถึงการเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลทำให้ผนังของนีโอโซมมีความแข็งแรงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบตำรับ 7 พบว่ามีอัตราส่วนคอเลสเตอรอลต่อสารลดแรงดึงผิวมากกว่าตำรับที่ 10 จึงส่งผลต่อความคงตัวทางกายภาพของตำรับนีโอโซม

6.3 การเตรียมตำรับอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เก็บกักในตำรับนีโอโซม

ตำรับนีโอโซมเปล่าตำรับที่ 7 มาเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในน้ำ ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ร้อยละ 3-12 เพื่อหาปริมาณสูงสุดที่สามารถเก็บกักในนีโอโซมได้ เมื่อวางตำรับที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า ตำรับที่เก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ร้อยละ 3 และ 5 ไม่เกิดการแยกชั้นขณะที่ตำรับอื่นเกิดการแยกชั้นและมีตะกอนเกิดขึ้น จึงสรุปว่า ปริมาณสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์สูงสุดที่สามารถเก็บกักในนีโอโซมคือ ปริมาณร้อยละ 5

6.4 การประเมินลักษณะทางกายภาพของนีโอโซมเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์

ตารางที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของตำรับนีโอโซมเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ อาจเป็นผลจากอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ที่เก็บกักไว้ภายในนีโอโซมเกิดการ leak ออกจากตำรับนีโอโซม และอาจสลายตัวเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ได้ (Keil & Kirchman, 1992) จึงส่งผลให้ค่า pH ของตำรับมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ค่าศักย์ซีต้ามักมีความเป็นบวกลดลง เนื่องจากการสลายตัวของอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ ซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีนมีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ เมื่อเกิดการสลายตัวเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมี จะได้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นกรด และมีประจุลบ จึงอาจเป็นผลให้ค่าศักย์ซีต้าของตำรับมีความเป็นบวกลดลงได้นอกจากนี้ขนาดอนุภาคของนีโอโซมอาจเกิดการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) เนื่องจากประจุที่บริเวณผิวมีค่าลดลง จึงทำให้ขนาดอนุภาคมีค่าเพิ่มขึ้น และมีค่า PDI ที่เพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้สภาวะที่

4°C และอุณหภูมิห้อง มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพน้อยกว่าสถานะที่ 45°C และสถานะ heating-cooling จำนวน 7 รอบ อย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.043)

ตารางที่ 3 ผลประเมินลักษณะทางกายภาพนีโอโซมเก็บกักกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในสารละลาย ร้อยละ 5 หลังจากทดสอบความคงตัว

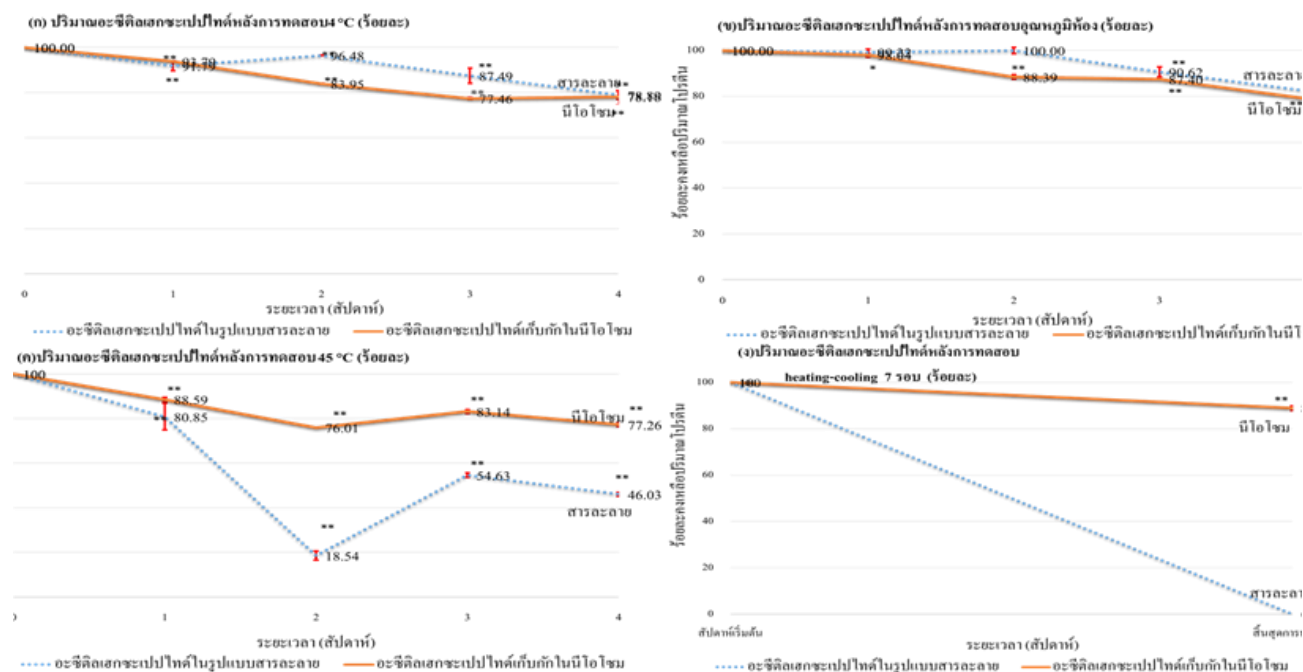
สถานะการทดสอบ	ระยะเวลา	ค่าเฉลี่ยตั้งต้น				ค่าเฉลี่ยหลังการทดสอบความคงตัว				การเปลี่ยนแปลง (ร้อยละ)			
		ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ค่าศักย์ซีต้า (mV)	pH	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI	ค่าศักย์ซีต้า (mV)	pH	ขนาดอนุภาค	PDI	ค่าศักย์ซีต้า	pH
อุณหภูมิห้อง	4 สัปดาห์	763.80±131.19	0.67±0.10	66.80 ±4.03	5.54	768.20 ±11.95	0.70±0.01	55.90±0.45	4.18	1	6	16	25
4 °C	4 สัปดาห์	763.80±131.19	0.67±0.11	66.80±4.03	5.54	900.10±115.80	0.68±0.07	55.40±0.32	5.53	18	2	17	0
45 °C	4 สัปดาห์	763.80±131.19	0.67±0.11	66.80±4.03	5.54	825.50±27.73	0.75±0.02	47.90±0.70	7.2	12	12	28	30
Heating-Cooling	7 รอบ	763.80±131.19	0.67±0.11	66.80±4.03	5.54	935.00±15.95	0.74±0.06	46.70±1.45	4.37	22	22	30	21

6.5 การประเมินความคงตัวทางเคมีของอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เก็บกักในนีโอโซมด้วยวิธี

Bradford assay

การเปรียบเทียบความคงตัวทางเคมีสามารถหาปริมาณ ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford assay ซึ่งอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนจึงสามารถหาปริมาณโดยวิธีนี้ได้ เมื่อเก็บอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในรูปแบบสารละลาย และที่เก็บกักในนีโอโซม ภายใต้สภาวะทดสอบ 4 สถานะ พบว่าปริมาณโปรตีนในอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในรูปแบบสารละลายและที่เก็บกักในนีโอโซมลดลงจากค่าเริ่มต้น ภาพที่ 1 แสดงร้อยละคงเหลือปริมาณโปรตีนในอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในรูปแบบสารละลายและที่เก็บกักในนีโอโซม ภายใต้สภาวะทดสอบต่าง ๆ โดยที่อุณหภูมิ 45°C มีร้อยละคงเหลือของปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บในสถานะทดสอบอื่น ร้อยละคงเหลือของปริมาณโปรตีนในตำรับภายใต้การเก็บในแต่ละสถานะทดสอบ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณโปรตีนคงเหลือในตำรับอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เก็บกักในนีโอโซมในทุกสถานะทดสอบ มีปริมาณโปรตีนคงเหลือมากกว่าในตำรับอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในรูปแบบสารละลาย โดยเฉพาะในสถานะทดสอบที่ 45°C และสถานะ heating-cooling จำนวน 7 รอบ ทั้งนี้เนื่องจากอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ เป็นสารที่สลายตัวง่ายด้วยความร้อน จึงทำให้ตำรับที่เก็บในสถานะที่มีอุณหภูมิสูง และสถานะการทดสอบ heating-cooling ที่มีอุณหภูมิสูง (45°C) สลับต่ำ (4°C) มีการสลายตัวของสารสำคัญในตำรับมากขณะที่นีโอโซมเป็นผนังที่หุ้มสารสำคัญอยู่ภายใน

จะช่วยปกป้องสารจากสภาวะต่าง ๆ ได้ จึงทำให้มีปริมาณโปรตีนคงเหลือในตำรับมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ ระบุถึง ประโยชน์ของตำรับนีโอโซมในการปกป้องสารสำคัญที่เก็บกักภายในจากการสลายสารสำคัญด้วยเอนไซม์และกรดต่าง ๆ และเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญด้วย (Rajera, Nagpal, Singh & Mishra, 2011)



ภาพที่ 1 ร้อยละคงเหลือของปริมาณโปรตีนในอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในรูปแบบสารละลายและที่เก็บกักในนีโอโซม ภายใต้สภาวะทดสอบต่าง ๆ

หมายเหตุ. * แสดงค่า p -value < 0.05 และ ** แสดงค่า p -value < 0.01

7. สรุปผลการวิจัย

7.1 การเตรียมนีโอโซมเปล่าจำนวน 12 คำรับ พบว่า คำรับ 7 และ 10 มีความคงตัวทางกายภาพดี ภายหลังจากวางคำรับไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเมื่อประเมินความคงตัวทางกายภาพของคำรับ 7 และ 10 ภายใต้อุณหภูมิทดสอบ 4 สภาวะ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า คำรับ 7 มีความคงตัวดีที่สุดใน โดยมีขนาดอนุภาค $496.60 \pm 158.21 \text{ nm}$ และมีค่าศักย์ซีต้า $36.90 \pm 1.81 \text{ mV}$

7.2 คำรับนีโอโซมคำรับ 7 ประกอบด้วย Brij[®] L4 คอเลสเทอรอล และ CTAB ในอัตราส่วนโมลาร์ 1.025:1.025:0.05 สามารถเก็บกักสารละลายอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในน้ำ ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ในปริมาณสูงสุด คือ ร้อยละ 5

7.3 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของคำรับนีโอโซมเก็บกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในสารละลาย ที่สภาวะทดสอบแตกต่างกัน 4 สภาวะ คือ อุณหภูมิห้อง และ 45°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และสภาวะ heating-cooling จำนวน 7 รอบ พบว่า ขนาดอนุภาคมีค่า $763.80 \pm 131.19 \text{ nm}$ PDI มีค่า 0.67 ± 0.11 ค่าศักย์ซีต้า มีค่า $66.80 \pm 4.03 \text{ mV}$ และค่า pH เท่ากับ 5.54 ภายหลังจากทดสอบทั้ง 4 สภาวะ พบว่า ขนาดอนุภาค ค่า PDI และค่า pH ของคำรับ มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 30 ในทุกสภาวะทดสอบ ขณะที่ค่าศักย์ซีต้าของคำรับมีค่าลดลงมากที่สุดที่ 45°C และสภาวะ heating-cooling จำนวน 7 รอบ

7.4 การประเมินความคงตัวทางเคมีของคำรับอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เก็บกักในนีโอโซมเปรียบเทียบกับอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในรูปแบบสารละลาย ที่สภาวะทดสอบแตกต่างกัน 4 สภาวะ ด้วยวิธี Bradford assay พบว่า ปริมาณ โปรตีนคงเหลือของคำรับอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เก็บกักในนีโอโซมมีค่าสูงกว่าในอะซีติลเฮกซะเปปไทด์ในรูปแบบสารละลายอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในสภาวะการทดสอบที่ 45°C และสภาวะ heating-cooling จำนวน 7 รอบ

8. ข้อเสนอแนะ

8.1 การศึกษานี้ ไม่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสำคัญในอาสาสมัคร สำหรับการใส่ประโยชน์ในเครื่องสำอาง จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการศึกษาในอนาคต

8.2 โครงสร้างผนังของนีโอโซมประกอบด้วยเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งอาจเป็นพิษต่อร่างกายจากการดูดซึมเข้ากระแสเลือด จึงควรทดสอบความเป็นพิษในเซลล์และร่างกายก่อนนำไปใช้ในคำรับเครื่องสำอาง

8.3 คำรับนีโอโซมในการศึกษาใช้สารลดแรงตึงผิวจำนวน 3 ชนิด และใช้สารเพิ่มประจุเพียง 1 ชนิด จึงควรเพิ่มสารลดแรงตึงผิวและสารเพิ่มความคงตัวของผนังชนิดอื่น เพื่อพัฒนาคำรับนีโอโซมสำหรับเก็บกักกักอะซีติลเฮกซะเปปไทด์เพิ่มเติมในอนาคต

8.4 ควรทำการศึกษา ปริมาณ การเก็บกักสารสำคัญ (Entrapment efficiency) และการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากรีโอโซมด้วยการใช้ dialysis bag และการวิเคราะห์คุณสมบัติ โครงสร้างของรีโอโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพิ่มเติม

9. รายการอ้างอิง

- พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ. (2536). *อิมัลชันทางเครื่องสำอาง*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ. (2551). *เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- อรนุช ธนเขตไพศาล. (2555). ระบบนำส่งรีโอโซมในทางเภสัชกรรม. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*, 8(2), 12-26.
- อรัญญา มโนสร้อย. (2545). *ไลโปโซมทางยาและเครื่องสำอาง*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- อรัญญา มโนสร้อย. (2550). *ไลโปโซมสำหรับยาผ่านทางผิวหนังและเครื่องสำอาง*. กรุงเทพฯ: โอ.เอส. พรินติ้ง เฮ้าส์.
- Harwood, B. G. (1995). *Interfacial phenomena in drug delivery and targeting*. Switzerland: Academic Publishers.
- Keil, R. G. & Kirchman, D. L. (1992). Bacterial hydrolysis of protein and methylated protein and its implications for studies of protein degradation in aquatic systems. *Appl Environ Microbiol.*, 58(4), 1374-1375.
- Moghassemi, S. & Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *Journal of Controlled Release*, 185(1), 22-36.
- Rajera, R., Nagpal, K., Singh, S. K. & Mishra, D. N. (2011). Niosomes: a controlled and novel drug delivery system. *Biol Pharm Bull*, 34(7), 945-953.
- Ruiz, M. A. (2006). Preparation and stability of cosmetic formulations with an anti-aging peptide. *Journal of Cosmetic Science*, 58(2), 157-171.
- Walker, J. M. (2009). *The Protein Protocols Handbook*. Hatfield: Humana Press.
- Wang, Y., Wang, M., Xiao, S., Pan, P., Li, P. & Huo, J. (2013). The Anti-Wrinkle Efficacy of Argireline, a Synthetic Hexapeptide, in Chinese Subjects. *Am J Clin Dermatol*, 14(2), 147-153.