Published Online: 04 Dec 2020

ความคงตัวของคอนจูเกตเมทอกซีพอลิเอทิลีนไกลคอลอิพิเดอร์มอลโกรทแฟคเตอร์

Stability of Conjugated Methoxy Polyethylene Glycol - Epidermal Growth Factor

ชนัญชิดา อุดมวัฒนปัญญา

อีเมล: 6151701280@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิสากร แซ่วัน

อีเมล: nisakorn@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

สาร Epidermal Growth Factor (EGF) ถูกใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลดเลือนริ้วรอยได้ดี แต่เนื่องจากสารสามารถสูญเสียคุณสมบัติทางเคมีได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิมากกว่า 40 °C ซึ่งทำให้สารเกิดการเสียสภาพแบบ Protein Aggregation จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้เพื่อเตรียมสาร Methoxy Polyethylene Glycol - Epidermal Growth Factor (PEG-EGF) โดยใช้ปฏิกิริยา PEGylation เชื่อมต่อระหว่างสาร EGF และสาร Methoxy PEG Propionaldehyde (mPEG-ALD) และศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารในสูตรตำรับเครื่องสำอาง จากการทดลองได้สาร PEG-EGF ในปริมาณ 24.5 mg คิดเป็นผลิตภัณฑ์ร้อยละ 11.60 ซึ่งสาร PEG-EGF ที่ได้มีความบริสุทธิ์ประมาณ 70 % เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEC-HPLC และ RP-HPLC และสารมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 27,446.177 Da จากการนำสาร PEG-EGF ใส่ในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่มพร้อมทั้งทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิของสาร EGF ในรูปแบบ PEG-EGF เปรียบเทียบกับสาร Native EGF เมื่อทดสอบในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่มในอุณหภูมิ 4° C อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 50 °C เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าสาร PEG-EGF มีปริมาณคงเหลือมากกว่าสาร Native EGF ถึง 10.81%, 27.76% และ 21.49% ตามลำดับ เมื่อทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ สรุปได้ว่า PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่มสร้างความพึงพอใจด้านความหนืดของผลิตภัณฑ์และความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์มากกว่า EGF เอสเซนส์เซรั่มซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด แต่ด้อยกว่าในด้านสี กลิ่น และความนุ่มของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าการเตรียมสาร EGF ให้อยู่ในรูปของ PEG-EGF เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความคงตัวของสารต่ออุณหภูมิสูงได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: EGF, PEG-EGF, PEGylation

Published Online: 04 Dec 2020

Abstract

Epidermal Growth Factor (EGF) is used in cosmetic product, which has properties to reduce wrinkles as well nevertheless, it can denature easily in the temperature above 40 ° C. The purpose of this study was to develop of PEG-EGF and investigate the stability of PEG-EGF in essence serum formula under 4° C, room temperature and 50° C. PEG-EGF was modified from EGF to conjugate with mPEG-ALD by PEGylation reaction. After reaction, 24.5 mg of the product was obtained (11.60 % yield) with the purity of 70% based on SEC-HPLC and RP-HPLC analyzed and its molecular weight was 27,446.177 Da. Then, PEG-EGF was incorporated in essence serum formula and submitted to stability testing in comparison to native EGF by storage at 4° C, room temperature and 50° C, for 60 days. The results showed that PEG-EGF remained quantity more than native EGF 10.81%, 27.76% and 21.49%, respectively. For sensory testing, PEG-EGF essence serum provided a higher satisfaction with product viscosity and overall product satisfaction than EGF essence serum, while, it has less acceptance in color, smell and providing softness. In conclusion, the PEG-EGF has a potential to be improve stability of EGF in essence serum formulation.

Keywords: EGF, PEG-EGF, PEGylation

บทนำ/หลักการและเหตุผล

Epidermal Growth Factor (EGF, sh-oligopeptide-1) เป็นสารโพลีเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังแบ่งตัวพร้อมทั้งกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารคอลลาเจนและกรดไฮยาลูรอนิค ซึ่งสาร EGF มีคุณสมบัติช่วยลดเลือนริ้วรอย ช่วยบำรุงผิวโดยเข้ากระตุ้นการสร้างเซลล์ผิว การสร้างคอลลาเจน และให้ผลลัพธ์ของริ้วรอยที่จางลง พร้อมทั้งช่วยเพิ่มความหยืดหยุ่นแก่ผิว (Caroline, Diana & Phillip, 2016) ดังนั้นจึงมีการสังเคราะห์สาร EGF ขึ้นเพื่อใช้เป็นสารองค์ประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอย แต่เนื่องจากสาร EGF สามารถสูญเสียคุณสมบัติทางเคมีได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิมากกว่า 40 °C ซึ่งทำให้เกิดการเสียสภาพของสารแบบ Protein Aggregation (Yang, Wu, Huang & Tsai, 2004) การเตรียม EGF ให้อยู่ในรูปของ PEG-EGF ซึ่งเตรียมสารโดยการดัดแปลงโครงสร้างของ EGF เชื่อมต่อกับโมเลกุลของ mPEG-ALD ด้วยปฏิกิริยา PEGylation ซึ่งเป็นอีกหนึ่งวิธีในการเพิ่มความคงตัวต่ออุณหภูมิของสาร ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเตรียมสาร PEG-EGF และนำสารที่ได้ศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารในสูตรตำรับเครื่องสำอาง

Published Online: 04 Dec 2020

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมสาร PEG-EGF

การเตรียมสาร PEG-EGF ได้อ้างอิงตามวิธีของ Dong et al. (2006) โดยการละลายสาร Methoxy PEG Propionaldehyde (mPEG-ALD) 20 kDA จำนวน 0.48 g (0.024 mMole) ในสาร 20 mM Sodium acetate buffer ที่มีค่า pH เท่ากับ 5.0 จากนั้นเติมสาร Epidermal Growth Factor (EGF) 50.0 mg (0.00806 mMole) และผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นเติมสาร 20 mM Sodium cyanoborohydride และผสมสารอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาและกำจัดสารส่วนเกินด้วยเทคนิค Dialysis โดยใช้ชุด Protein concentrator (MW cut off 10 kDa) และเจือจางด้วยสาร 5 mM Tris HCl ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.0 ร่วมกับการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวทำให้อยู่ในรูปผงแห้งด้วยใช้เครื่อง Lyophilizer และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้วิเคราะห์ปริมาณสาร PEG-EGF และคำนวณร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์

การคำนวณปริมาณผลได้ตามทฤษฎี

น้ำหนักตามทฤษฎีของ PEG-EGF = โมลของ EGF ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา × มวลโมเลกุลของ PEG-EGF

การคำนวณร้อยละผล ได้ของผลิตภัณฑ์

$$\text{ร้อยละผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{ผลได้จากการทดลอง}}{\text{ผลได้ตามทฤษฎี}} \times 100$$

2. การวิเคราะห์สาร PEG-EGF

1) เทคนิค Size-Exclusion Chromatography

การวิเคราะห์ PEG-EGF โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ TSKgel G2000SWXL (7.8 mm. × 30 mm., TosoH, Japan) ซึ่งเป็นคอลัมน์ชนิด Size-Exclusion ใช้สาร 10 mM phosphate buffer, 154 mM Sodium chloride ที่มีค่า pH เท่ากับ 7.4 เป็น Mobile phase buffer และนำสารตัวอย่าง mPEG-ALD, EGF และ PEG-EGF กรองผ่าน Membrane filter รูพรุนขนาด 0.22 mm. จากนั้นฉีดตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้วในปริมาตร 120 µL ในเครื่อง HPLC เพื่อตรวจวิเคราะห์ และใช้อัตราการชะตัวอย่างออกจากคอลัมน์ที่ 1.0 mL/min เป็นระยะเวลา 45 นาที โดยตรวจวัดสารจากการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 280 nm

2) เทคนิค Reversed-phase Chromatography

การวิเคราะห์ PEG-EGF ด้วยเทคนิค RP-HPLC ใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 (C18, 4.6 mm.× 250 mm., GL sciences, Japan) และใช้สารละลายของ 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) ในน้ำ DI

Published Online: 04 Dec 2020

type 1 เป็น Mobile phase A และสารละลาย 0.1% TFA ใน Acetonitrile เป็น Mobile phase B และนำสารตัวอย่าง mPEG-ALD, EGF และ PEG-EGF กรองผ่าน Membrane filter รูพรุนขนาด 0.22 mm. จากนั้นฉีดตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้ว ในปริมาตร 120 µL ในเครื่อง HPLC เพื่อตรวจวิเคราะห์ และใช้อัตราการชะตัวอย่างออกจากคอลัมน์ที่ 1.0 mL/min แบบ Gradient elution ที่ 20 – 40% mobile phase B เป็นระยะเวลา 45 นาที โดยตรวจวัดสารจากการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 280 nm

3) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ PEG-EGF โดยใช้เทคนิค Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

นำตัวอย่างสาร mPEG-ALD, EGF และ PEG-EGF ซึ่งอยู่ในลักษณะผงแห้งตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารด้วยเครื่อง MALDI-TOF-MS (Bruker, รุ่น Autoflex speed TM)

3. การเตรียม PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม

เบสเอสเซนส์เซรั่มประกอบด้วยสารให้ความชุ่มชื้น คือ Propanediol และสาร Chelating agent คือ Disodium EDTA โดยใช้น้ำ DI เป็นตัวทำละลาย ซึ่งในสูตรตำรับ ซึ่งรายละเอียดสูตรตำรับแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่ม

ส่วนประกอบ	F1 % w/w	F2 % w/w	F3 % w/w
DI water (Aqua)	q.s. 100	q.s. 100	q.s. 100
EDTA (Disodium EDTA)	0.10	0.10	0.10
Zemea propanediol (Propanediol)	4.00	4.00	4.00
PEG-EGF (PEG, sh-oligopeptide-1)	-	0.01	-
EGF (sh-oligopeptide-1)	-	-	0.01

4. การทดสอบความคงตัวของ PEG-EGF ในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่ม

นำเอสเซนส์เซรั่มที่ได้จากการเตรียมบรรจุในขวดแก้วปิดฝาปริมาตร 300 mL จัดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 50 °C ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลารวม 60 วัน และนำตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์ปริมาณสารคงเหลือของ EGF ในวันที่ 0, 9, 14, 28, 35, 60 เพื่อศึกษาลักษณะความคงตัวของ EGF ที่อยู่ในรูปแบบ PEG-EGF และ EGF อิสระ ในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่ม ด้วยเทคนิค RP-HPLC

Published Online: 04 Dec 2020

5. การประเมินความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม

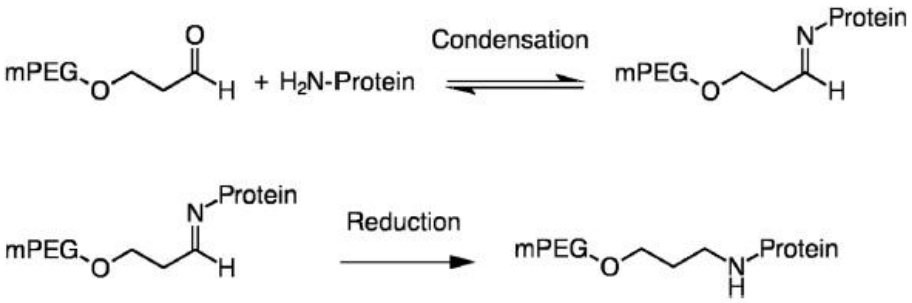
การประเมินความพึงพอใจผลิตภัณฑ์ครั้งนี้มีผู้ร่วมการประเมินรวม 15 คน ซึ่งกำหนดให้อาสาสมัครทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ทาบริเวณท้องแขนและประเมินความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม (F2) เทียบกับ EGF เอสเซนส์เซรั่มซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด (F4) ซึ่งประกอบด้วยสาร EGF, Butylene glycol, Glycerine, Phenoxyethanol และน้ำ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด การประเมินผลโดยการตอบแบบสอบถาม ซึ่งมีหัวข้อการประเมินได้แก่ ความหนืดของผลิตภัณฑ์ สีของผลิตภัณฑ์ กลิ่นของผลิตภัณฑ์ ความนุ่มลื่นของผลิตภัณฑ์ และความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์ และมีเกณฑ์การให้คะแนน 4 ระดับ ได้แก่ พอใจต่อผลิตภัณฑ์น้อยที่สุด มีความรู้สึกเฉยๆต่อผลิตภัณฑ์ มีความรู้สึกพอใจต่อผลิตภัณฑ์ และมีความรู้สึกพอใจมากต่อผลิตภัณฑ์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้คำนวณร้อยละผลรวมความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์

ผลวิจัย

1. การเตรียมสาร PEG-EGF

การเตรียม PEG-EGF เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนา EGF ให้อยู่ในรูปแบบที่มีความคงตัวต่ออุณหภูมิมากยิ่งขึ้นและช่วยรักษาประสิทธิภาพการทำงานให้ยาวนานขึ้น โดยในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคการเตรียม EGF ด้วยปฏิกิริยา PEGylation เพื่อเชื่อมต่อสาร EGF ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 6.2 kDa กับสาร Methoxy polyethyleneglycol propionaldehyde (mPEG-ALD) ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 20 kDa ในโครงสร้างของสาร EGF ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีหมู่เอมีนที่ตำแหน่ง N-terminus, Lys-28 และ Lys-48 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สามารถเกิดเป็นปฏิกิริยาการเชื่อมสาร (PEGylation site) โดยบริเวณตำแหน่งดังกล่าวจะเชื่อมต่อกับหมู่แอลดีไฮด์ของสาร mPEG-ALD ด้วยพันธะโควาเลนซ์ ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมสารใช้อัตราส่วนของสาร mPEG-ALD ต่อสาร EGF เท่ากับ 3:1อ้างอิงตามวิธีของ Dong et al. (2006) อีกทั้งใช้สาร Sodium cyanoborohydride เป็นสาร Reducing agent และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสาร Secondary amine PEG-EGF ดังแสดงในภาพที่ 1 จากการทดลองพบว่า PEG-EGF ที่ได้จากปฏิกิริยามีปริมาณเท่ากับ 24.5 mg และเมื่อเทียบกับผลได้ตามทฤษฎีซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 211.3 mg จึงคิดเป็นร้อยละของผลได้ PEG-EGF เท่ากับร้อยละ 11.60

Published Online: 04 Dec 2020

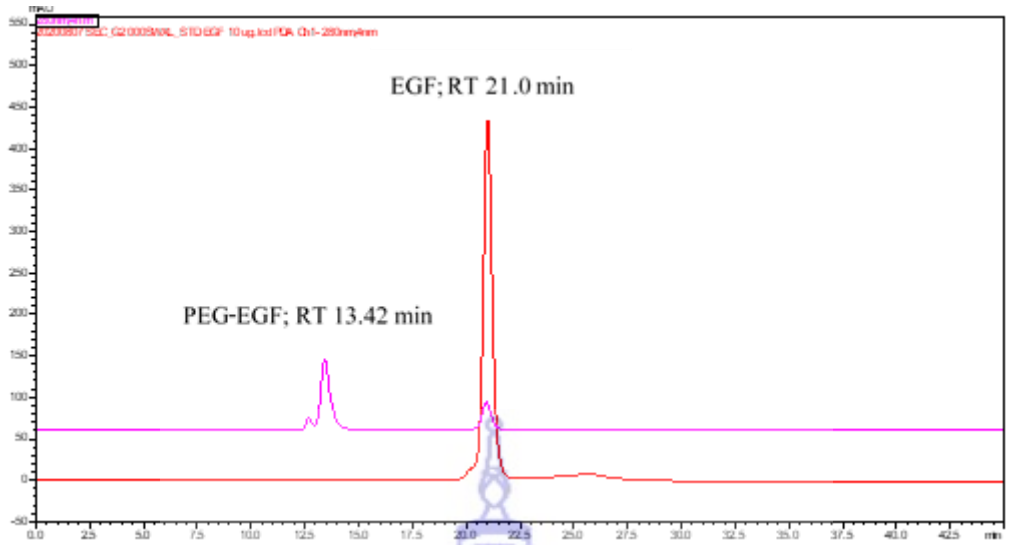


ภาพที่ 1 ปฏิกิริยา PEGylation ระหว่างสาร mPEG-ALD และสาร EGF

2. คุณลักษณะของสาร PEG-EGF

1) เทคนิค Size-Exclusion Chromatography

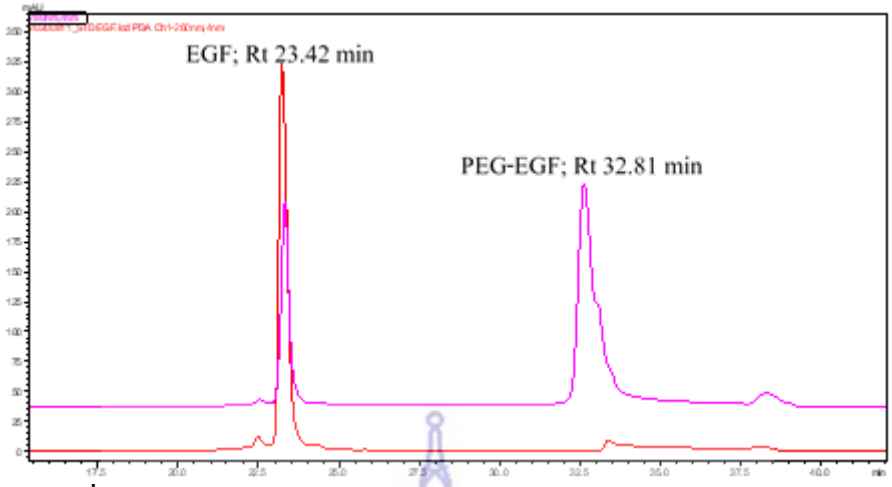
เทคนิค Size-Exclusion HPLC เป็นเทคนิคที่เหมาะในการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน โดยสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าจะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนจึงมีระยะเวลาที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์ (Retention time, Rt) สั้นกว่า ส่วนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าจะมีระยะเวลาที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์มากกว่า ซึ่งสารตั้งต้น EGF มีขนาดโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 6,200 Da และสาร mPEG-ALD มีขนาดโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 20,000 Da ดังนั้นขนาดโมเลกุลของ PEG-EGF ที่ได้จากปฏิกิริยาจะมีขนาดโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 26,200 Da ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วกว่าสาร Native EGF หรือสาร PEG-EGF มีค่า Rt ต่ำกว่าสาร Native EGF ทั้งนี้ผลจากโครมาโตแกรมของสาร Native EGF ปรากฏสัญญาณที่เวลา 21 นาที ในขณะที่โครมาโตแกรมของสารที่ได้หลังการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสัญญาณหลักของ PEG-EGF ที่ 13.42 นาที ซึ่งปริมาณเท่ากับ 75.60% และพีครองของ Free EGF ปรากฏสัญญาณที่เวลา 21 นาที ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 24.39% แสดงดังภาพที่ 2 ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์ได้สาร PEG-EGF ในปริมาณ 75.60% ซึ่งสารมีการเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น และยังมีสารตั้งต้นเหลืออยู่ 24.39%



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสาร PEG –EGF และ EGF วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEC-HPLC

2) เทคนิค Reversed-Phase Chromatography

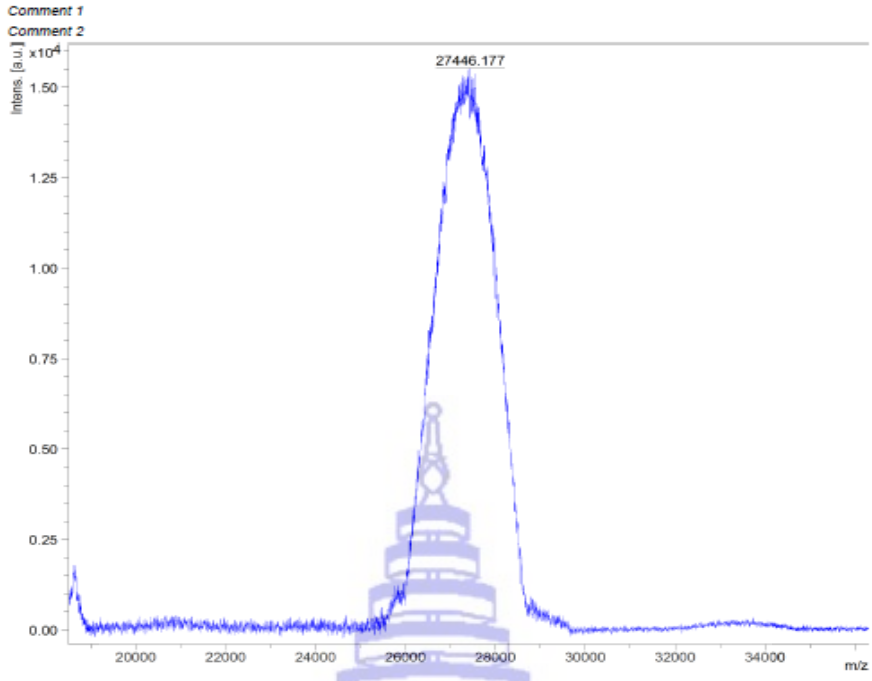
การวิเคราะห์สาร PEG–EGF ด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ซึ่งเป็นคอลัมน์ชนิด Octadecyl มีกลไกการแยกโดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติความมีขั้วของสาร (Hydrophobicity) ซึ่งสารที่ไม่มีขั้วจะถูกหน่วงได้ดีในคอลัมน์และถูกชะออกมาช้ากว่าสารที่มีขั้วหรือสารที่มีขั้วมากจะมีค่า Rt ต่ำกว่าสารที่มีขั้วน้อย ซึ่งสาร Native EGF มีค่า Rt เท่ากับ 23.42 นาทีดังนั้นสาร PEG-EGF ที่ได้จากการสังเคราะห์ คาดว่าจะปรากฏค่า Rt ที่สูงกว่า 23.42 ซึ่งผลจากโครมาโตแกรมของสาร PEG-EGF ปรากฏพีคของสารซึ่งประกอบด้วยพีคหลักของ PEG-EGF ปรากฏ Rt ที่ 32.81 นาที มีปริมาณเท่ากับ 69.70% และพีครองของสาร Free EGF ปรากฏ Rt ที่ 23.42 นาที มีปริมาณเท่ากับ 30.30% แสดงดังภาพที่ 3 และเมื่อคำนวณปริมาณสารจากพื้นที่ใต้กราฟและแทนค่าในสมการของกราฟสารมาตรฐาน ได้ปริมาณ PEG-EGF เท่ากับ 23 mg และ Free EGF เท่ากับ 10 mg ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์ PEG-EGF ได้สารที่มีคุณสมบัติการมีขั้วน้อยลงเมื่อเทียบของสาร Native EGF ซึ่งเป็นสารตั้งต้นและสาร PEG-EGF ที่ได้มีสัดส่วนเท่ากับ 69.70% และในปฏิกิริยายังคงเหลือสารตั้งต้นอยู่ 30.30%



ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของสาร PEG –EGF วิเคราะห์ด้วยเทคนิค RP-HPLC

3) ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ PEG-EGF โดยใช้เทคนิค Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

เทคนิค Mass Spectrometry เป็นเทคนิคที่ถูกใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสาร โดยใช้สารตัวอย่างตรึงกับผลึกของ Matrix ซึ่งช่วยดูดซับพลังงาน เมื่อยิงแสงเลเซอร์ลงบนตัวอย่างจะเกิดการแตกตัวของสารเป็นไอออนพร้อมเคลื่อนที่ไปตามท่อสูญญากาศที่มีสนามไฟฟ้า โดยสารที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมากและตกกระทบกับตัวตรวจจับ (Detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ (Time-of-flight, TOF) ถูกคำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลของสาร ซึ่งผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสาร Native EGF มีค่าเท่ากับ 6,222.2 m/z และน้ำหนักโมเลกุลของสาร mPEG-ALD เท่ากับ 21,431.93 m/z ขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของ PEG-EGF มีค่าเท่ากับ 27,446.177 m/z แสดงดังภาพที่ 4 ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร PEG-EGF เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่างสาร mPEG-ALD ต่อสาร EGF ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการทำปฏิกิริยา



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบน้ำหนักโมเลกุลของสาร PEG-EGF โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS

3. การเตรียม PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม

สูตรตำรับเบสเอสเซนส์เซรั่ม (F1) ประกอบด้วยสาร Propanediol ซึ่งช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิว อีกทั้งใช้น้ำ DI เป็นตัวทำละลายหลักในสูตรตำรับ ซึ่งลักษณะของเอสเซนส์เซรั่มเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และมีความหนืดต่ำ ส่วนในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่ม F2 ประกอบด้วยสาร PEG-EGF ปริมาณ 100 ppm และสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่ม F3 ประกอบด้วยสาร EGF ปริมาณ 100 ppm โดยลักษณะทางกายภาพของเอสเซนส์เซรั่มสูตรตำรับ F2 และสูตรตำรับ F3 มีลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 สูตรเนื่องจากลักษณะของสาร PEG-EGF และสาร Native EGF ซึ่งถูกใช้เป็นส่วนประกอบหลักในสูตรตำรับมีสีและความหนืดของสารเหมือนกันจึงทำให้เมื่อถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับจึงไม่ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพของเนื้อเอสเซนส์เซรั่ม

4. ผลการประเมินความพึงพอใจผลิตภัณฑ์ PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม

การประเมินความพึงพอใจผลิตภัณฑ์มีผู้ร่วมการประเมินรวม 15 คน ซึ่งกลุ่มผู้เข้าร่วมประเมินมีอายุอยู่ในช่วง 21-30 ปี จำนวน 53.33 %, ช่วงอายุ 31 – 40 จำนวน 40.00% และช่วงอายุ 41 – 50 จำนวน 6.67% โดยกลุ่มผู้เข้าร่วมทั้ง 100% เคยมีประสบการณ์ใช้ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเอสเซนส์เซรั่มมาก่อนแล้ว อีกทั้งผู้ทดสอบจำนวน 33.33% มีความถี่ในการใช้ผลิตภัณฑ์จำนวน 1 ครั้งต่อวัน และผู้ทดสอบจำนวน 40% มีความถี่การใช้ 2 ครั้งต่อวัน และผู้ทดสอบจำนวน 26.67% ใช้ผลิตภัณฑ์แบบไม่ความสม่ำเสมอ ในขั้นตอนการประเมินกำหนดให้อาสาสมัครทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ทาบริเวณท้องแขนและประเมินความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม (F2) เทียบกับ EGF เอสเซนส์เซรั่ม

ซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาด (F4) มีเกณฑ์การให้คะแนน 4 ระดับ ได้แก่ พอใจต่อผลิตภัณฑ์น้อยที่สุด, มีความรู้สึกเฉยๆต่อผลิตภัณฑ์, มีความรู้สึกพอใจต่อผลิตภัณฑ์ และมีความรู้สึกพอใจมากต่อผลิตภัณฑ์ ผลการประเมินสรุปได้ว่า PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม มีผู้ร่วมทดสอบจำนวน 80% ความพอใจต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์ และจำนวน 93% พอใจต่อสีผลิตภัณฑ์ และจำนวน 40% พอใจต่อกลิ่นของผลิตภัณฑ์ และจำนวน 73% พอใจต่อความนุ่มของผลิตภัณฑ์ รวมถึงจำนวน 82% มีความพึงพอใจโดยรวมต่อผลิตภัณฑ์ PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม (F2) ขณะที่ EGF เอสเซนส์เซรั่ม (F4) มีมีผู้ร่วมทดสอบจำนวน 60% ความพอใจต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์ และจำนวน 95% พอใจต่อสีผลิตภัณฑ์ และจำนวน 67% พอใจต่อกลิ่นของผลิตภัณฑ์ และจำนวน 80% พอใจต่อความนุ่มของผลิตภัณฑ์ รวมถึงจำนวน 74% มีความพึงพอใจโดยรวมต่อผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่มสร้างความพึงพอใจด้านความหนืดของผลิตภัณฑ์และความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์มากกว่าEGF เอสเซนส์เซรั่ม แต่ผลิตภัณฑ์มีความพึงพอใจด้านสี กลิ่น และความนุ่มน้อยกว่า ซึ่งอาจเนื่องมากจากผลิตภัณฑ์ไม่มีการแต่งสี กลิ่น รวมถึงมีปริมาณสารที่ทำหน้าที่ให้ความนุ่มลื่นในปริมาณน้อย ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสร้างความพึงพอใจยิ่งขึ้น

5. ผลการทดสอบความคงตัวของสาร PEG-EGF ในตำรับเอสเซนส์เซรั่ม

การศึกษาประสิทธิภาพของสาร PEG-EGF ในแง่ความคงตัวของสารในสูตรตำรับเครื่องสำอางโดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตรตำรับ ได้แก่ สูตรตำรับเบสเอสเซนส์เซรั่ม (F1) และสูตรตำรับ PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่ม (F2) รวมถึงสูตรตำรับ EGF เอสเซนส์เซรั่ม (F3) ทำการทดสอบโดยบรรจุเอสเซนส์เซรั่มในขวดแก้วปิดฝาและจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง รวมถึงอุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลารวม 60 วัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบความคงตัวของสาร ซึ่งจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของเอสเซนส์เซรั่มทั้ง 3 สูตรตำรับ เนื้อของผลิตภัณฑ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมทั้งความหนืด กลิ่น และสี ตลอดระยะเวลาการทดสอบทั้ง 60 วัน อีกทั้งจากผลการทดสอบความคงตัวของ PEG-EGF ด้วยวิธี RP-HPLC เพื่อศึกษาความเปลี่ยนแปลงของปริมาณ EGF ในสูตรตำรับ (F2) โดยเปรียบเทียบระหว่างปริมาณของ EGF กับระยะเวลาในการทดสอบ พบว่า EGF ที่อยู่ในรูปแบบ PEG-EGF ในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่มที่ทำการทดสอบในอุณหภูมิ 4° C, อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 50 °C โดยเทียบปริมาณสารคงเหลือในวันที่ 60 กับปริมาณสารเริ่มต้นในวันที่ 0 ซึ่งสารคงเหลือเท่ากับ 65.59%, 87.16% และ 54.20% ตามลำดับ ขณะที่สารปริมาณ EGF ในสูตรตำรับ (F3) มีปริมาณสารคงเหลือเท่ากับ 54.78%, 59.40% และ 32.71% แสดงดังตาราง 2 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสาร PEG-EGF มีความคงตัวต่ออุณหภูมิมากกว่าสาร Native EGF เมื่อทดสอบในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่มในอุณหภูมิ 4° C, อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 50 °C ซึ่งมีปริมาณสาร PEG-EGF คงเหลือมากกว่าสาร Native EGF ถึง 10.81%, 27.76% และ 21.49% ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าเนื่องจาก

EGF เมื่อผ่านการดัดแปลงโมเลกุลเชื่อมต่อเข้ากับ Polymer chain ของ mPEG-ALD ซึ่งมีขนาดใหญ่ถึง 20 kDa ทำให้โครงสร้างของ mPEG-ALD ช่วยห่อหุ้มโครงสร้างของ EGF และช่วยลดการเกิด Aggregation ในโครงสร้างของ EGF เมื่อถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยความร้อน ซึ่งผลจากความร้อนทำให้พื้นผิวของหน่วยย่อยในโครงสร้าง EGF บิดม้วนโดยหันด้านของ Hydrophobic side chain เข้าจับกันเองระหว่างโมเลกุล ทำให้ EGF สลายตัวได้ง่าย (Hee Na., et al) ดังนั้นการเตรียม EGF ให้อยู่ในรูปของ PEG-EGF จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความคงตัวของสารต่ออุณหภูมิได้ดียิ่งขึ้น

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของ PEG-EGF ในตำรับเอสเซนส์เซรั่ม

อุณหภูมิ	ตัวอย่างสาร	RP-HPLC (% พื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรม)					
		ระยะเวลา (วัน)					
		0	9	14	28	35	60
RT	PEG-EGF	100	85.52	85.14	82.65	80.24	65.59
	EGF	100	83.14	81.87	80.55	78.63	54.78
4°C	PEG-EGF	100	94.45	93.42	91.13	89.32	87.16
	EGF	100	84.47	83.03	80.85	80.45	59.40
50°C	PEG-EGF	100	71.75	71.38	68.51	67.05	54.20
	EGF	100	83.15	71.24	60.35	59.79	32.71

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาสาร EGF ให้มีความคงตัวมากขึ้นโดยการดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลของ EGF ให้เชื่อมต่อกับโมเลกุลของ mPEG ด้วยปฏิกิริยา PEGylation กับสาร mPEG-ALD ได้สาร PEG-EGF ในปริมาณ 24.5 mg คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 11.60 ซึ่งสาร PEG-EGF ที่ได้มีความบริสุทธิ์ประมาณ 70 % เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEC-HPLC และ RP-HPLC และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบว่าสารมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 27,446.177 m/z จากการนำสาร PEG-EGF เตรียมในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่มและทำการทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิของสาร PEG-EGF เปรียบเทียบกับสาร Native EGF เมื่อทดสอบในสูตรตำรับเอสเซนส์เซรั่มในอุณหภูมิ 4° C, อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 50 °C เป็นระยะเวลา 60 พบว่า EGF ที่ถูกเตรียมในรูปแบบ PEG-EGF มีปริมาณคงเหลือมากกว่าสาร Native EGF ถึง 10.81%, 27.76% และ 21.49% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับ EGF เอสเซนส์เซรั่มที่มีจำหน่ายในท้องตลาด พบว่า PEG-EGF เอสเซนส์เซรั่มสร้างความพึงพอใจด้านความหนืดของผลิตภัณฑ์และความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์มากกว่า EGF เอสเซนส์เซรั่ม แต่ด้อยกว่าในด้านสี กลิ่น และความนุ่มของ

ผลิตภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าการเตรียมสาร EGF ให้อยู่ในรูปของ PEG-EGF เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความคงตัวของสารต่ออุณหภูมิได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาสูตรตำรับเครื่องสำอางแทนการใช้ Native EGF ได้

ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยครั้งนี้มีการแยก PEG-EGF ออกจากสารผสมหลังทำปฏิกิริยาด้วยขั้นตอนอย่างง่าย หากต้องการให้ได้ PEG-EGF ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นอาจทำการทดลองด้วยการเพิ่มขั้นตอน

รายการอ้างอิง

Caroline, A., Diana, N., & Phillip, S. L. (2016). Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factor, cytokines and matrikines: a review of the literature. *Journal of clinical, cosmetic and investigational dermatology, 9*, 411-419

Dong, H. N., Yu, S. Y., In Bok, L., Eun, J. P., . . . Kang, C. L. (2006). Effect of molecular size of PEGylated recombinant human Epidermal Growth Factor on the biological activity and stability in rat wound tissue. *Journal of pharmaceutical development and technology, 11*, 513-519

Fujiko, A., Hiroko, N., Naoto, N., Kenichi, T., & Shunji, S. (1989). Stability of recombinant human Epidermal Growth Factor in various solutions. *Journal of pharmaceutical society of Japan, 37*(2), 404-406

Haeshin, L., Ho, J., Sung, H. R., & Tae, G. P. (2003). N-terminal site-specific mono-PEGylation of Epidermal Growth Factor. *Journal of pharmaceutical research, 20*, 818-825

Janet, S. C., Ira, W. R., & Jerome, G. P. (1997). Aging and Urinary Excretion of Epidermal Growth Factor. *Journal of annals of clinical and laboratory science, 27*(2), 116-122

Mojgan, A., Bagher, L., Monireh, F., Farzaneh, D., . . . Ali-Reza, V. (2005). Efficacy of topical Epidermal Growth Factor in healing diabetic foot ulcers. *Journal of Future drug, 2*(5), 759-765

Nupur, K., Vaibhav, S., Stuart, J. B., & Elena, G.-G. (2019). *Synthetic polymers for skin biomaterials: Biomaterials for Skin Repair and Regeneration* (pp.125). Amsterdam: Elsevier.

Payam, Z., Mohammad, R. S., Seyed, H. J., & Masoud, M. (2020). *Application of compatibilized polymer blends in biomedical fields* (pp. 511-537). Amsterdam: Elsevier.

Peter, L. T., Mary, J. B., Freddy, S., & Inge, A. I. (2016). PEGylation of biopharmaceuticals: A review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs. *Journal of Pharmaceutical sciences, 105*, 460-475.

Yang, C. H., Wu, P. C., Huang, Y. B., & Tsai, Y. H. (2004). A new approach for determining the stability of recombinant human Epidermal Growth Factor by thermal fourier transform infrared (FTIR) Microspectroscopy. *Journal of Biomolecular structure& dynamic, 22,* 101-109.