

การพัฒนาศีตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเพื่อรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ธันวาคม 2560

การพัฒนายาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเพื่อรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ธันวาคม 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาศีตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเพื่อรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ธันวาคม 2560

ราชินี วงศ์แสนสุขเจริญ. (2560). การพัฒนายาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเพื่อรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง.

ปริญญาานิพนธ์ วทม.(วิทยาการเภสัชภัณฑ์), กรุงเทพฯ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะกรรมการควบคุม อาจารย์ ดร.ลลนา คงคาเนรมิตร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง,อาจารย์ ดร.พรทิพา เอี่ยมสำอางค์

การรักษาการติดเชื้อราที่ผิวหนังโดยใช้ยาทา มักจะใช้เวลานานในการรักษา การพัฒนาตำรับยาโดยใช้ระบบนำส่งอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาของยาได้มากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาตำรับยาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันและศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของตำรับโดยการเตรียมยาพื้นนาโนอิมัลชันด้วยเทคนิคการใช้พลังงานต่ำ วิถีกลับวัฏภาคโดยสัดส่วน ทดสอบในน้ำมัน 3 ชนิด คือ caprylic/capric triglyceride (CT), isopropyl myristate (IPM) และ sunflower oil (SO) ใช้สารทำอิมัลชันผสม คือ Tween 80 และ Span 80 โดยเตรียม 36 สูตรต่อ น้ำมันหนึ่งชนิดคัดเลือกสูตรที่ให้ขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรและคงสภาพที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน หาค่าการละลายของตัวยาใน CT และ IPM ด้วยการเขย่าตัวยาในน้ำมันที่ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณยาด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเตรียมตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันโดยใช้ปริมาณยา สารทำอิมัลชันผสม และน้ำมัน ในสัดส่วนที่เหมาะสม หาวิธีการสกัดยาจากตำรับนำมาศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมี และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* และ *Trichophyton mentagrophytes* โดยวิธี Agar well diffusion ผลการทดลองพบว่าค่าการละลายของยาใน CT และ IPM คือ 1.62 ± 0.07 และ 0.31 ± 0.04 mg/ml ตามลำดับ การสกัดยาจากตำรับโดยsonicate ใน methanol นาน 45 นาที พบว่าให้ปริมาณยาเท่ากับ $94.92 \pm 0.39\%$ ตำรับยา 0.5% (w/w) ในยาพื้นนาโนอิมัลชันที่ประกอบด้วย CT : สารทำอิมัลชันผสม : น้ำ (40:10:50 w/w/w) มีขนาดอนุภาค 210.6 ± 1.21 nm และศักย์ไฟฟ้าซีต้า -29.65 ± 1.13 mV เมื่อศึกษาความคงสภาพที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน พบว่ายังมีความคงสภาพทางกายภาพ มีปริมาณยาที่เหลืออยู่คือ $97.6 \pm 0.04\%$ และ $97.4 \pm 0.48\%$ ตามลำดับ สำหรับการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* และ *T. mentagrophytes* พบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่ายาครีมในท้องตลาด (2.0%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันที่พัฒนาขึ้นนี้มีแนวโน้มในการต้านเชื้อราที่ผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ

DEVELOPMENT OF KETOCONAZOLE NANOEMULSION FOR SKIN FUNGAL INFECTION

AN ABSTRACT

BY

RATCHANEE WONGSANSUKJAROEN



Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science in Pharmaceutical Product Development

At Srinakharinwirot University

December 2017

Ratchanee Wongsansukjaroen, (2017). **Development of Ketoconazole Nanoemulsion for Skin Fungal Infection**. Master's Thesis, M.S. (Pharmaceutical Product Development), Bangkok, Graduate School, Srinakharinwirot University, Advisor Committee Lalana Kongkaneramt, Ph.D, Asst.Prof.Sarin Tadtong, Ph.D, Porntipa Aiemsum-ang, Ph.D.

Treatment of fungal skin infections using ketoconazole topical preparations often takes a long time. Development of ketoconazole delivery system may increase its treatment effectiveness. This research aims to develop ketoconazole nanoemulsion and to study antifungal efficacy of the formulation. Nanoemulsion bases were prepared using low-energy emulsification method (PIC) in 3 oils, caprylic/capric triglyceride (CT), isopropyl myristate (IPM) and sunflower oil (SO). Mixed emulsifier of Tween 80 and Span 80 in oil phase was used to prepare 36 formulations each oil. A formula with nanoscale internal droplets was selected based on the stability at 30°C and 45°C for 30 days. Solubility of ketoconazole in CT and IPM was studied by shaking ketoconazole in oil at 30°C for 72 hours and the drug analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). Suitable extraction technique was studied and physical and chemical stability of 0.5% ketoconazole nanoemulsion was examined. Then, the developed formulation was tested for antifungal activity against *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes* by agar well diffusion method. The results showed that solubility of the drug in CT and IPM were 1.68 ± 0.18 mg/ml and 0.31 ± 0.04 mg/ml, respectively. Selected extraction method using methanol and sonicating technique for 45 min gave % recovery of $94.92 \pm 0.41\%$. It was found that the 0.5% formulation derived from nanoemulsion base of CT:mixed emulsifier:water (40:10:50 w/w/w) contained droplets with the diameter of 210.6 ± 1.21 nm and the zeta potential of -29.65 ± 1.13 mV. The developed formula was physically stable over 30 days. The drug concentrations (% remaining) after storage at 30°C and 45°C for 30 days were $97.6\% \pm 0.04$ and $97.4\% \pm 0.48$, respectively. Additionally, antifungal activity against *C. albicans* and *T. mentagrophytes* of the formulation was found to be significantly more effective than that of a commercially available cream (2.0%) ($p \leq 0.05$). Finally, it can be concluded that the ketoconazole nanoemulsion is a promising tool in the effective treatment of fungal skin infections.

ปริญญาานิพนธ์
เรื่อง
ยาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเพื่อรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนัง
ของ
รัชณี วงศ์แสนสุขเจริญ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ จัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
วันที่ เดือน พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ คณะกรรมการสอบปากเปล่า
.....ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(อาจารย์ ดร. ลลนา คงคาเนรมิตร) (อาจารย์ ดร.จิราพร เลื่อนผลเจริญชัย)
.....ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง) (อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย)
.....ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.พรทิพา เอี่ยมสำอางค์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากคณาจารย์หลายท่านผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ลลนา คงคาเนรมิตร อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาชี้แนะวิธีการศึกษาวิจัยแนวทางการอภิปรายและสรุปผลเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดรวมถึงแนะนำข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยมาโดยตลอดอย่างใกล้ชิด

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง และ อาจารย์ ดร.พรทิพา เอี่ยมสำอางค์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ให้คำแนะนำและเสนอแนะสิ่งที่มีประโยชน์เพื่อปรับปรุงงานวิจัยให้ดียิ่งขึ้น และขอขอบคุณอาจารย์ ดร.จิราพร เลื่อนผลเจริญชัย ประธานสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณาวรรตน์ คณบดี และคณาจารย์ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ผู้วิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ช่วยสนับสนุนช่วยเหลือเกี่ยวกับงานห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในงานวิจัยด้วยดีมาโดยตลอดขอขอบคุณ คุณ นิศา อุบลทิพย์ นักวิชาการศึกษา ป.โท และคุณ จุฬี เนียมเนตร นักวิชาการพัสดุ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเรียนและงานวิจัยตลอดการศึกษา

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ นางวงเดือน วงศ์แสนสุขเจริญ มารดา ที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาและให้คำแนะนำ รวมทั้งเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

รัชนี วงศ์แสนสุขเจริญ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
คีโตโคนาโซล(Ketoconazole).....	3
ผลิตภัณฑ์ยาคีโตโคนาโซลในปัจจุบัน.....	4
งานวิจัยที่มีการพัฒนายาคีโตโคนาโซล.....	5
นาโนอิมัลชัน.....	6
การซึมผ่านผิวหนัง.....	11
โรคเชื้อราที่ผิวหนังชั้นตื้น.....	13
การประเมินผลิตภัณฑ์.....	16
3 สารเคมี เครื่องมือและวิธีการทดลอง.....	20
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
สารเคมี.....	20
เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ.....	21
วิธีการทดลอง.....	21
ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชัน.....	21
ศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์หาค่าการละลายของยาคีโตโคนาโซล.....	27
การเตรียมคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	28
ศึกษาวิธีการสกัดยาจากตำรับ0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	29
ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	31
ศึกษาความคงสภาพของตำรับ0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	32
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	34
สัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชัน.....	34
การวิเคราะห์ยาคีโตโคนาโซล.....	46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
การเตรียมคีโอโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	51
การสกัดยาจากตำรับ0.5% คีโอโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	55
ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของตำรับคีโอโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	58
ความคงสภาพของตำรับ0.5% คีโอโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	60
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	64
บรรณานุกรม.....	68
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	73

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของยาคีโตโคนาโซล.....	3
2 การเปรียบเทียบลักษณะของอิมัลชันแต่ละชนิด.....	7
3 ปริมาณส่วนประกอบในการเตรียมยาพื้หนาในอิมัลชันด้วย caprylic/capric triglyceride.....	22
4 ปริมาณส่วนประกอบในการเตรียมยาพื้หนาในอิมัลชันด้วย isopropylmyristate.....	23
5 ปริมาณส่วนประกอบในการเตรียมยาพื้หนาในอิมัลชันด้วย sunflower oil.....	25
6 ศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดยาจากตำรับคีโตโคนาโซล.....	30
7 สมบัติทางกายภาพของตำรับเมื่อเตรียมจากCaprylic/capric triglyceride (CT).	34
8 สมบัติทางกายภาพของตำรับเมื่อเตรียมจากIsopropyl myristate(IPM).....	37
9 สมบัติทางกายภาพของตำรับเมื่อเตรียมจากSunflower oil (SO).....	39
10 ขนาดอนุภาคของตำรับอิมัลชันที่เตรียมจาก CT ที่มีความคงสภาพ.....	42
11 Zeta potential จากตำรับอิมัลชันที่เตรียมจาก CT.....	42
12 ขนาดอนุภาคของตำรับอิมัลชันที่เตรียมจากIPMที่มีความคงสภาพ.....	43
13 Zeta potential จากตำรับที่เตรียมจากIPM.....	44
14 ขนาดอนุภาคของตำรับอิมัลชันที่เตรียมจาก SO.....	45
15 Zeta potential จากตำรับที่เตรียมจากSO.....	45
16 ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานคีโตโคนาโซลในเมทานอลด้วยเทคนิค HPLC.....	48
17 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและค่าการละลายของคีโตโคนาโซลในน้ำมัน CT.....	50
18 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและค่าการละลายของคีโตโคนาโซลในน้ำมัน IPM.....	50
19 ลักษณะทางกายภาพของตำรับคีโตโคนาโซลนาในอิมัลชัน ณ จุดเริ่มต้น.....	52

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
20 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ณ จุดเริ่มต้น.....	52
21 ลักษณะทางกายภาพของตำรับKNEที่ 30°C เป็นเวลา 30วัน.....	53
22 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ KNEที่ 45°C เป็นเวลา30 วัน.....	53
23 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับ KNEที่30°C เป็นเวลา 30วัน.....	54
24 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับKNEที่45°C เป็นเวลา 30วัน.....	54
25 เปรียบเทียบ % recovery ของการสกัดจากตัวอย่าง4 กรัมและ 2 กรัม.....	56
26 เปรียบเทียบ % recovery ของเทคนิคการสกัดด้วย sonicator และ water bathshaker.....	56
27 เปรียบเทียบ % recovery ของเทคนิคการสกัดด้วย sonicatorเป็นเวลา 30 นาที และ 45 นาที.....	57
28 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i>	58
29 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ <i>T. mentagrophytes</i>	59
30 บันทึกลักษณะทางกายภาพ การแยกชั้น ความหนืด และ pH ของตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	60
31 ขนาดอนุภาคภายใน และค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซล นาโนอิมัลชัน	61
32 ความคงสภาพทางเคมีของตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	63

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างของ คีโตโคนาโซล.....	3
2 Pseudoternary phase diagram ของตำรับที่ใช้ CT ที่ยังไม่แยกชั้น ● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเนื้อมัน ● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเหลว (a) ตำรับเริ่มต้น (b) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 30°C, 30 วัน (c) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 45°C, 30 วัน.....	36
3 Pseudoternary phase diagram ของตำรับที่ใช้ IPM ที่ยังไม่แยกชั้น ● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเนื้อมัน ● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเหลว (b) ตำรับเริ่มต้น (b) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 30°C, 30 วัน (c) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 45°C, 30 วัน.....	38
4 Pseudoternary phase diagram ของตำรับที่ใช้ SO ที่ยังไม่แยกชั้น ● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเนื้อมัน ● แสดงสูตรที่เกิดอิมัลชันเหลว (a) ตำรับเริ่มต้น (b) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 30°C, 30 วัน (c) ตำรับที่เก็บไว้ที่ 45°C, 30 วัน.....	41
5 UV สเปกตรัมของยาคีโตโคนาโซลในเมทานอล (50 µg/ml) ช่วงความยาวคลื่น 200-400 nm	47
6 โครมาโตแกรม HPLC ของยาคีโตโคนาโซล(50 µg/ml) ที่ความยาวคลื่น 244 nm	47
7 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคีโตโคนาโซลในเมทานอล.....	48
8 โครมาโตแกรม HPLC ของ Caprylic/capric triglyceride ในเมทานอล.....	49
9 โครมาโตแกรม HPLC ของ Isopropyl myristate ในเมทานอล.....	49
10 โครงสร้างทางเคมีของยาคีโตโคนาโซล และน้ำมัน.....	51
11 ตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเมื่อดูด้วยกล้อง Optical microscope (1000x) (a) ตำรับ 0.5% (b) ตำรับ 1.0% ; ลูกศรชี้ตำแหน่งผลึกยา (↓).....	52
12 ลักษณะของอนุภาคภายใต้กล้อง TEM (29000x) (— มุมล่างด้านซ้ายของรูป ขนาด 100 nm), (a) ตำรับยาพื้นนาโนอิมัลชัน (b) ตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน.....	55

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
13 โชนยับยั้งเชื้อ <i>C.albicans</i> (ก) ดำรับยาพื้นนาโนอิมัลชัน (NE Base),(ข) 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน (KNE) (ค) 0.5% diluted Cream TM และ (ง) 2.0% Cream TM	58
14 โชนยับยั้งเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i> (ก) ดำรับยาพื้นนาโนอิมัลชัน (NE Base), (ข) 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน(KNE) (ค) 0.5% diluted Cream TM และ (ง) 2.0% Cream TM	59
15 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ 0.5% KNE (a) ลักษณะเมื่อเตรียมเสร็จ (b) ความคงสภาพเมื่อเก็บที่30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน.....	61
16 ขนาดอนุภาคของตำรับ 0.5% KNE ที่30°C และ 45°C ที่30 วัน.....	62
17 ค่าศักย์ไฟฟ้า (Zeta potential) ของตำรับ 0.5% KNEที่30°C และ 45°C ที่30 วัน.....	62
18 ปริมาณยาที่เหลืออยู่ (% remaining) ของตำรับ 0.5% KNE เป็นเวลา30 วัน....	63

สัญลักษณ์และคำย่อ

CT	=	Caprylic/capric triglyceride
g	=	Gram
HLB	=	Hydrophiliclipophilic balance
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
IPM	=	Isopropyl myristate
KNE	=	Ketoconazole nanoemulsion
NE	=	Nanoemulsion base
nm	=	Nanometer
O/W	=	Oil in water
PDA	=	Potato's dextrose agar
PDB	=	Potato's dextrose broth
PDI	=	Polydispersity index
PIC	=	Phase inversion composition
rpm	=	Rotation per minute
RSD	=	Relative standard deviation
Rt	=	Retention time
SC	=	Stratum corneum
SDA	=	Sabouraud's dextrose agar
SO	=	Sunflower oil
TEM	=	Transmission electron microscopic
r^2	=	Correlation coefficient
$\mu\text{g/ml}$	=	Microgram per milliliter
mV	=	Millivolt
$\log P$	=	Partition coefficient
ϕ	=	Phase volume
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
λ_{max}	=	ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุด
%w/w	=	ร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนัก

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคเชื้อราที่ผิวหนังที่พบบ่อย ได้แก่ กลาก เกื้ออื่น เชื้อราที่เล็บ เชื้อราที่ผม และฮ่องกงฟุต ซึ่งการติดโรคเกิดจากการได้รับเชื้อจากการสัมผัสและมีปัจจัยเรื่องผิวหนังที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ ปกติจะพบเชื้อราได้ตามสิ่งแวดล้อมการติดเชื้อราส่วนใหญ่เกิดขึ้นบริเวณที่อับชื้น⁽¹⁾ในการรักษาโรคเชื้อราที่ผิวหนังจะเริ่มจากการใช้ยาทาในบริเวณที่ติดเชื้อ จนลักษณะของโรคหายไปและทาต่ออีกระยะหนึ่ง ซึ่งข้อดีของการใช้ยาในรูปแบบทา คือลดความเสี่ยงในการเกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยารวมทั้งลดโอกาสในการเกิดอันตรกิริยากับยาอื่นแต่ถ้าเป็นบริเวณกว้างหรือเรื้อรังจะต้องใช้ยารับประทานร่วมกับการใช้ยาทา^(1,2) สำหรับการรักษาด้วยการทายา (Topical treatments) ปัจจุบันมีกลุ่มยาที่นิยมใช้^(2,3) คือ กลุ่ม Allylamine (เช่น Terbinafine), กลุ่ม Benzylamine derivatives (เช่น Butenafine) และ Topical azole derivatives (เช่น Ketoconazole) สำหรับการรักษาด้วยการรับประทานยา (Systemic oral treatments) มีกลุ่มยาที่นิยมใช้คือ Azole derivatives (Fluconazole), Triazole derivatives (เช่น Itraconazole), Allylamine derivative (เช่น Terbinafine) และกลุ่มอื่น ๆ เช่น Griseofulvin

ยาคีโตโคนาโซล (Ketoconazole) เป็นยาในกลุ่ม Azole derivatives (Imidazole) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (Fungistatic) และออกฤทธิ์กว้าง (Broad spectrum) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งเชื้อราและยีสต์ มีจำหน่ายในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาเม็ดครีมหรือเจลในความแรง 2 %, แชมพูในความแรง 1% และ 2% นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาและพัฒนายาคีโตโคนาโซลในรูปแบบต่างๆ เช่น liposomes,⁽⁴⁾ ethosomes,⁽⁵⁾ microemulsion,⁽⁶⁾ solid lipid nanoparticle (SLN) hydrogel⁽⁷⁾ เพื่อเพิ่มการซึมผ่านของยาคีโตโคนาโซลเข้าสู่ผิวหนังให้ดียิ่งขึ้นสำหรับการพัฒนาในรูปแบบนาโนอิมัลชัน (Nanoemulsion) นั้น พบว่ามีเพียงรายงานเดียวจาก Patel และคณะ ในปี 2013⁽⁸⁾ ที่รายงานการเตรียมอิมัลชันด้วยเทคนิคที่ใช้พลังงานต่ำ ซึ่งยังคงได้ขนาดอนุภาคภายในที่ใหญ่ คือ 900.5 nm

ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากนาโนอิมัลชันมากขึ้น เนื่องจากนาโนอิมัลชันมีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับอิมัลชันทั่วไป ได้แก่ ใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในปริมาณต่ำ^(9,10) มีขนาดอนุภาคภายในเล็กจนซึมผ่านเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้ดีมีเสถียรภาพที่ดีเนื่องจากมีขนาดอนุภาคภายในที่เล็กทำให้มีความคงตัวทางจลนศาสตร์สูง (High kinetic stability)^(9,11) และยังเป็นการเพิ่มความสามารถในการนำส่งยาที่ละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายน้ำ⁽¹²⁾

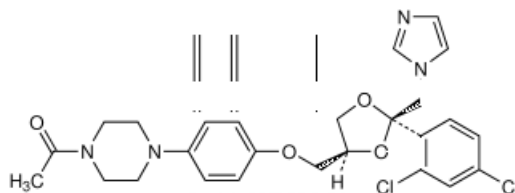
ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายเพื่อศึกษาพัฒนาตำรับยาคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ด้วยวิธีการเตรียมโดยใช้พลังงานต่ำ วิธีกลับวัฏภาคโดยสัดส่วน (Phase Inversion Composition, PIC) เพื่อให้ได้อนุภาคภายในของอิมัลชันขนาดเล็กระดับนาโนเมตร ซึ่งใช้วิธีเตรียมที่ไม่ซับซ้อนเพื่อให้มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้โดยมีต้นทุนที่ไม่สูงนัก แนวทางในการศึกษาเริ่มจากการทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของน้ำมัน สารทำอิมัลชันผสมและน้ำ ซึ่งเตรียมด้วยวิธี PIC และคัดเลือกสูตรอิมัลชันที่คงสภาพและมีอนุภาคภายในขนาดเล็กระดับนาโนเมตร นำมาบรรจุยาหรือการเตรียมโดยให้มียาละลายอยู่ในวัฏภาคน้ำมัน และทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาในตำรับ ตลอดจนศึกษาความคงสภาพของตำรับที่พัฒนาขึ้นมา จากนั้นจึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ครีมในท้องตลาด



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คีโตโคนาโซล(Ketoconazole)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของ คีโตโคนาโซล

2.1.1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์

คีโตโคนาโซล มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ สามารถเข้ากับน้ำมันได้ดี (Lipophilic drug) มีค่า log P เท่ากับ 4.35 สามารถละลายได้ดีในเมทานอล ดังในตาราง 1 คีโตโคนาโซลในรูปสารละลายสามารถเสื่อมสลายทางเคมีได้ง่าย โดยอาจเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยที่ pH1-4 จะเร่งปฏิกิริยาการเสื่อมสลายได้มากและคีโตโคนาโซลเสื่อมสลายได้โดยแสง⁽¹³⁾

ตาราง 1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของยา คีโตโคนาโซล⁽¹⁴⁾

คุณสมบัติ	คีโตโคนาโซล
pKa	Weak base (6.51, 2.94)
Melting point	146°C
Solubility	DMSO (20 mg/ml) Very slightly soluble in water (<1 mg/ml) Ethanol (20mg/ml), Methanol :freely soluble
Lipophilic (log P)	log P = 4.35
Density	1.38 mg/ml

2.1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

คีโตโคนาโซลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (Fungistatic)^(2,3) ครอบคลุมเชื้อกว้าง (Broad spectrum) ใช้ในการรักษาให้ผลทั่วร่างกายและรักษาเฉพาะที่โดยเฉพาะโรค superficial fungal infection และโรคติดเชื้อยีสต์ *Candida albicans*^(2,15,16) ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 14-alpha-demethylase (P-450,14DM) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในการเปลี่ยน lanosterol เป็น ergosterol ทำให้ยามีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง ergosterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราไม่แข็งแรง ส่งผลให้เกิดการรั่วของโปแทสเซียมไอออน (K^+) รวมทั้งสารอื่นๆ ออกจากเซลล์ของเชื้อรา⁽¹⁶⁾

2.2 ผลกระทบต่อยาคีโตโคนาโซลในปัจจุบัน

2.2.1 รูปแบบรับประทาน

ยาเม็ดคีโตโคนาโซลขนาด 200 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 1 ครั้งประมาณ 3-6 วัน ระยะเวลาในการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดและความรุนแรงของโรค⁽¹⁶⁾ เช่น acute vulvovaginitis ที่เกิดจากเชื้อ *C.albicans* ใช้เวลา 5 วัน ส่วน esophageal candidiasis ใช้เวลา 10-14 วัน ส่วน histoplasmosis และ blastomycosis ใช้เวลา 6-12 เดือน เมื่อรับประทานประมาณ 84% ของยาจะจับกับพลาสมาโปรตีน 15% จับกับเม็ดเลือดแดง และประมาณ 1% อยู่ในรูปอิสระ คีโตโคนาโซลจะถูกเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ได้ metabolite ที่ไม่มีฤทธิ์ในการรักษา ซึ่งจะถูกขับออกจากร่างกายทางน้ำดี การเปลี่ยนแปลงยาคีโตโคนาโซลจะเพิ่มขึ้น ถ้าให้ยานี้ร่วมกับยาที่มีฤทธิ์เป็น enzyme inducer เช่น rifampin นอกจากนี้ยังพบว่า คีโตโคนาโซลสามารถยับยั้งการทำงานของ cytochromes P450 (โดยเฉพาะ cytochromes P450 กลุ่ม 3A) ได้ด้วย

อาการข้างเคียงของยาที่พบบ่อยได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ซึ่งพบประมาณ 20% ของผู้ป่วยที่ได้รับยา อาจแก้ไขได้โดยการให้ยาพร้อมอาหาร หรือให้ยาก่อนนอน โดยอาจแบ่งให้หลายๆ ครั้ง นอกจากนี้ยังพบอาการข้างเคียงอื่นเช่น ผื่น (rash) คัน (pruritus) ด้วย มีรายงานว่า คีโตโคนาโซลสามารถทำให้ระดับของ aminotransferase ในพลาสมาเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ยาไประยะหนึ่งระดับของเอนไซม์จะกลับเข้าสู่สภาพปกติ นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดตับอักเสบ (hepatitis)^(2,) ได้ส่วนมากมักพบในช่วง 2-3 วัน ของการรักษา หรือบางครั้งอาจพบหลังจากได้รับการรักษามาเป็นเวลาหลายเดือน อาการแสดงที่สังเกตเห็นช่วงแรก ได้แก่ เบื่ออาหาร ปวดตามตัว คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ซึ่งผลการตรวจการทำงานของตับ (liver function test) จะคล้ายกับ hepatitis A

นอกจากนี้ คีโตโคนาโซลยังมีผลลดการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในคนเป็นผลให้มีประจำเดือนผิดปกติ หรือเกิดภาวะ gynecomastia, adrenal cortex suppression และสมรรถภาพทางเพศลดลงในผู้ชาย ไม่ควรให้ยานี้ในหญิงตั้งครรภ์ เพราะจากรายงานในสัตว์ทดลอง คีโตโคนาโซลอาจทำให้เกิดความผิดปกติในตัวอ่อน (teratogenic effect) นอกจากนี้ยายังสามารถขับออกทางน้ำนม ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ในหญิงที่กำลังให้นมบุตรด้วยเช่นกัน⁽²⁾

2.2.2 รูปแบบยาใช้ภายนอก

คีโตโคนาโซลพบในรูปแบบครีมหรือเจล ความแรง 2% ใช้ทาวันละ 1-2 ครั้ง บริเวณที่ติดเชื้อรา เพื่อรักษาการติดเชื้อ dermatophytes ที่ผิวหนังรวมทั้ง candidiasis ที่บริเวณเยื่อหูต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ⁽¹⁶⁾ เช่น โรคเกลื้อน (Tinea versicolor) ใช้เวลา 2-3 สัปดาห์, โรคกลากที่ขาหนีบ (Tinea cruris) ใช้เวลา 2-4 สัปดาห์, โรคกลากลำตัว (Tinea corporis) ใช้เวลา 3-4 สัปดาห์ ส่วนโรคกลากบริเวณเท้า (Tinea pedis) ใช้เวลา 4-6 สัปดาห์ ยาเตรียมในรูปแบบพู่ใช้สระผมป้องกันและรักษา seborrheic dermatitis ของหนังศีรษะ รังแค

2.3 งานวิจัยที่มีการพัฒนาระบบนำส่งยาคีโตโคนาโซล

มีการศึกษาพัฒนารูปแบบการนำส่งยาคีโตโคนาโซลทางผิวหนังโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของยาเข้าสู่ชั้น stratum corneum (SC) ซึ่งเป็นชั้นที่มีเคราติน และเป็นชั้นที่กีดขวางการเข้าออกของสารเข้าสู่ผิวหนัง ปัจจุบันจึงมีการศึกษาและพัฒนารูปแบบ colloidal carrier⁽³⁾ เช่น ไมโครอิมัลชัน นาโนอิมัลชัน เป็นตัวช่วยการซึมผ่านของยา (enhancer) ลงสู่ชั้น SC ได้ด้วยอนุภาคที่เล็กระดับนาโนเมตร⁽⁹⁾ ซึ่งยาคีโตโคนาโซลเป็นยาที่เข้ากับน้ำมันได้ดี จึงมีการเตรียมอิมัลชันในรูปแบบ oil in water (o/w) ด้วยเทคนิคการเตรียมใช้พลังงานสูง โดยใช้เครื่อง high pressure homogenizer ซึ่งมีการใช้ polymeric surfactant⁽¹⁷⁾ ช่วยเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน และมีการเตรียมโดยใช้พลังงานต่ำ วิธีการบัพยภาคโดยสัดส่วน (PIC) ได้อนุภาคภายในขนาด 900.5 นาโนเมตร⁽⁸⁾ ซึ่งยังมีขนาดอนุภาคภายในที่ใหญ่ ในรายงานวิจัยมีผลการประเมินประสิทธิภาพการซึมผ่านของยาเปรียบเทียบกับยาครีมในท้องตลาดพบว่าปริมาณยาที่สามารถซึมผ่านในระยะเวลาเดียวกันสูงกว่าตำรับยาครีมในท้องตลาด

มีการศึกษาพัฒนารูปแบบ vesicular carrier⁽³⁾ เช่น ลิโพโซม (Liposomes) เอทโซโซม (Ethosomes) และ นีโอโซม (Niosomes) ซึ่งเป็นระบบนำส่งที่มีการเก็บยาไว้ในระบบ สามารถนำส่งยาผ่านชั้น SC ได้ด้วยคุณสมบัติที่มีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งช่วยเพิ่มการซึมผ่านของยาคีโตโคนาโซลทางผิวหนังและสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาจากระบบได้⁽⁴⁾ และยังพบว่ามีงานพัฒนายาใน

รูปแบบ solid lipid nanoparticle (SLN) Hydrogel ช่วยเพิ่มความคงตัวของยา คีโตโคนาโซล ที่สามารถเสื่อมสลายได้ง่ายในน้ำ และช่วยเพิ่มการซึมผ่านของยาเข้าสู่ผิวหนังด้วยเช่นกัน⁽⁷⁾

ในปี 2008 Wooster และคณะ⁽¹⁸⁾ ทำการศึกษาผลของชนิดของน้ำมันที่มีต่อการเตรียมและความคงตัวของระบบนาโนอิมัลชัน โดยระบบจะมีความคงสภาพด้วยอนุภาคภายในที่เล็กระดับนาโนเมตร ทำให้สามารถต้านทานการเกิดความไม่คงสภาพทางกายภาพได้ ซึ่งความไม่คงสภาพของระบบนาโนอิมัลชัน (Ostwald ripening) เกิดจากการแพร่ของอนุภาคภายในหยดเล็กๆ ไปที่อนุภาคขนาดใหญ่ มีผลให้ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น หรือเกิดการแยกชั้นในที่สุด โดยส่วนใหญ่การเตรียมโดยใช้เฟสน้ำมันที่มีไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride oil) สามารถให้ขนาดอนุภาคภายในที่เล็กกว่า 120 นาโนเมตร และระบบมีความคงตัวที่ดีขึ้น

ในปี 2011 Debnath และคณะ⁽¹²⁾ ทำการศึกษาพัฒนา ยา ที่มีคุณสมบัติชอบไขมัน (lipophilic drug) ในรูปแบบนาโนอิมัลชัน เพื่อช่วยเพิ่มการละลาย พิจารณาเลือกส่วนประกอบที่สำคัญ เช่น วัสดุภาคน้ำมัน ควรเลือกน้ำมันที่ละลายตัวยาคือดีที่สุดในการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ เพื่อช่วยให้สามารถใส่ยาได้ในปริมาณมากในตำรับ ซึ่งโดยทั่วไปวัสดุภาคน้ำมันจะเลือกใช้กลุ่มไตรกลีเซอไรด์ที่มี fatty acid ที่มีอนุพันธ์สายคาร์บอน ในการเลือกน้ำมันจะเลือกจากความสามารถในการละลายตัวยาคือและความสามารถที่จะทำให้เกิดระบบนาโนอิมัลชัน ตัวอย่างเช่น การผสมระหว่าง fixed oil และ medium chain triglyceride เป็นทางเลือกในการพิจารณาเลือกวัสดุภาคน้ำมัน

ในปี 2013 Patel และคณะ⁽⁸⁾ ทำการศึกษาพัฒนาตำรับยา คีโตโคนาโซล รูปแบบนาโนอิมัลชัน ด้วยเทคนิคการเตรียมนาโนอิมัลชันแบบใช้พลังงานต่ำ (PIC) โดยในวัสดุภาคน้ำมันมีน้ำมันมะพร้าว (coconut oil) ซึ่งเป็นน้ำมันที่ยาสามารถละลายได้มากที่สุด และใช้ ทวิน 80 และ เอทานอล (สัดส่วน 3:1) พบว่าส่วนประกอบที่ดีที่สุดมีสัดส่วนน้ำมันต่อสารลดแรงตึงผิวผสม (2:45) ผสมให้เข้ากันดีแล้ว ค่อยๆ หยดน้ำด้วยอัตราเร็วคงที่ ภายใต้อุณหภูมิคงที่ ขนาดของหยดอนุภาค (globule size) ที่ได้มีขนาดเท่ากับ 900.5 นาโนเมตร ค่า zeta potential เท่ากับ -2.06 mV และทำการศึกษาความคงสภาพของระบบที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 1 เดือน อย่างไรก็ตาม ในรายงานวิจัยไม่พบข้อมูลการประเมินขนาดของอนุภาคโดยพบว่าอนุภาคโดยเริ่มต้นมีขนาดใหญ่ (900.5 นาโนเมตร) ซึ่งโดยทั่วไประบบนาโนอิมัลชัน ควรมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 300 นาโนเมตร⁽⁹⁾

2.4 นาโนอิมัลชัน

2.4.1 อิมัลชัน และการเกิดอิมัลชัน

อิมัลชัน คือระบบที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิดที่ไม่สามารถเข้ากันได้ โดยของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ขนาดหยดใหญ่กว่า 1

ไมโครน โดยมีสารลดแรงตึงผิวหรือสารอื่นที่เติมลงไปเพื่อช่วยเพิ่มเสถียรภาพของอิมัลชัน เนื่องจากอิมัลชันไม่มีเสถียรภาพทางอุณหพลศาสตร์⁽¹⁹⁾ การเกิดอิมัลชันอาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน คือ

ก. การให้พลังงานเข้าไปเพื่อทำให้ของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในแตกกระจายเป็นหยดเล็กๆ ซึ่งอาจใช้พลังงานเชิงกล (mechanical agitation) โดยการคนหรือเขย่า การสั่นสะเทือนโดยคลื่นเสียง (ultrasonic vibration) หรือใช้พลังงานความร้อน เป็นต้น

ข. กลไกการทำงานของตัวทำอิมัลชันที่จะลดแรงตึงระหว่างผิว เป็นการลดพลังงานอิสระที่พื้นผิวและทำให้หยดของวัฏภาคภายในไม่มารวมตัวกันนอกจากนี้การเรียงตัวกันของตัวทำอิมัลชันทำให้เกิดฟิล์มที่แข็งแรงรอบหยดวัฏภาคภายในซึ่งทำหน้าที่เป็นกันชน ป้องกันการสัมผัสกันโดยตรงของวัฏภาคภายในซึ่งกลไกข้อนี้สำคัญที่สุด⁽²⁰⁾

อิมัลชันแบ่งตามขนาดอนุภาค ได้ 3 ประเภท คือ

1. แมคโครอิมัลชัน: มีช่วงขนาดหยดอนุภาค 1-10 ไมโครเมตร^(21,22)
2. ไมโครอิมัลชัน: มีช่วงขนาดหยดอนุภาค 10 -100 นาโนเมตร^(22,23)
3. นาโนอิมัลชัน: มีขนาดหยดอนุภาคเล็กกว่า 300 นาโนเมตร⁽⁹⁾

ตาราง 2 เปรียบเทียบลักษณะของอิมัลชันแต่ละชนิด^(9,21,22)

คุณสมบัติ	แมคโครอิมัลชัน	ไมโครอิมัลชัน	นาโนอิมัลชัน
ลักษณะทั่วไป	ของเหลวขาวทึบแสง	สารละลายโปร่งใส (Transparent)	ของเหลวขาวโปร่งแสง (Translucent)
ขนาดหยดอนุภาค	1-10 ไมโครเมตร	10-100 นาโนเมตร	< 300 นาโนเมตร
ความคงตัว	ไม่มีความคงตัวทางอุณหพลวัต และมีความคงตัวทางจลนศาสตร์ต่ำ	มีความคงตัวทางอุณหพลวัตสูง (Thermodynamically stable)	มีความคงตัวทางจลนศาสตร์สูง(Kinetically stable)
ความหนืด	สูง	ต่ำ	ต่ำ
การเตรียม	เกิดขึ้นเองไม่ได้ ต้องใช้พลังงานอย่างมากในการเตรียม	เกิดขึ้นเองทันทีจากการผสม น้ำ-น้ำมัน-สารทำอิมัลชัน และสารช่วยทำอิมัลชัน ในอัตราส่วนที่เหมาะสม	เกิดขึ้นเองไม่ได้ ต้องใช้พลังงานช่วยในการเตรียมหรือโดยอาศัยเทคนิคพิเศษบางประการ

2.4.2 ลักษณะของนาโนอิมัลชัน

นาโนอิมัลชัน คือ อิมัลชันที่มีขนาดหยด (droplet) เล็กกว่า 300 นาโนเมตร⁽⁹⁾ ประกอบด้วยน้ำมันน้ำ และสารลดแรงตึงผิว สามารถคงรูปอยู่ได้จากผิวฟิล์มของสารลดแรงตึงผิว โดยสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้คือกลุ่มสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactants) และกลุ่มสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและลบ (zwitterionic surfactants) ระบบสามารถนำส่งทั้งตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ หรือไม่ชอบน้ำ⁽¹²⁾ สารลดแรงตึงผิวในตำรับสามารถทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ระหว่างเซลล์ของผิวหนังทำให้สามารถเพิ่มการซึมผ่านของตัวยาหรือสารสำคัญ^(3,22,24)

เสถียรภาพของนาโนอิมัลชันที่มีความคงตัวทางจลนศาสตร์สูง (kinetically stable) เกิดจากหยดอนุภาคภายในที่มีขนาดเล็กมากทำให้มีแรงการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (brownian motion) มากกว่าแรงตรึงตัวกัน (gravitational separation force) ซึ่งการใช้สารก่ออิมัลชันผสมจะทำให้เกิดฟิล์มเชิงซ้อน (complex film) ที่บริเวณผิวประจันระหว่างน้ำกับน้ำมัน โดยจัดเรียงตัวอย่างหนาแน่นที่ผิวประจัน ซึ่งคู่ของสารก่ออิมัลชันผสมระหว่างสารทำอิมัลชันที่ละลายน้ำ และสารทำอิมัลชันที่ละลายในน้ำมันจะให้ผลดีที่สุด⁽¹⁹⁾

Ostwald ripening⁽²⁵⁾ เป็นความไม่คงสภาพของระบบนาโนอิมัลชันที่เกิดจากการเคลื่อนย้ายมวลสารจากอนุภาคขนาดเล็กไปยังอนุภาคขนาดใหญ่ โดยอนุภาคที่มีขนาดเล็กมีความเข้มข้นของสารที่พื้นผิวอนุภาคสูงกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ จึงเกิดการแพร่ของโมเลกุลของสารจากพื้นผิวที่มีความเข้มข้นมากไปยังพื้นผิวที่มีความเข้มข้นน้อยส่งผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีการกระจายของขนาดอนุภาคมากขึ้น (size distribution) การลดการกระจายของขนาดอนุภาค และเพิ่มความหนืดในสูตรตำรับเพื่อกีดขวางการแพร่ของโมเลกุล เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มความคงสภาพให้กับระบบนาโนอิมัลชัน

2.4.3 การเตรียมนาโนอิมัลชัน^(10,11,12,26)

การเตรียมนาโนอิมัลชัน สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีได้แก่

2.4.3.1 วิธีพลังงานสูง (High-energy emulsification methods)

การเตรียมนอิมัลชันให้ได้หยดอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดไมโครเมตร ต้องใช้พลังงานสูง การแตกของหยดอนุภาคจะเกิดขึ้นเมื่อให้พลังงานสูงเพียงพอเท่านั้น หากให้พลังงานสูงไม่เพียงพอจะไม่เกิดการแตกของหยดเป็นขนาดนาโนเมตร แต่พลังงานที่ให้จะสูญเสียไปเป็นความร้อน เช่น เมื่อใช้เครื่องคนสารในภาชนะซึ่งมีพลังงานไม่เพียงพอ จะไม่เกิดการแตกของหยดอนุภาคเป็นนาโนอิมัลชัน แต่พลังงานจะสูญเสียไปในรูปของความร้อนเป็นส่วนใหญ่ วิธีนี้ใช้อุปกรณ์ในการผลิต เช่น เครื่องปั่นความเร็วสูง (High-shear stirring) เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง

(High Pressure Homogenizer, HPH) และเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasound generator) เครื่องที่นิยมใช้เตรียมนาโนอิมัลชัน ได้แก่ เครื่องปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูงที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้แก่ Microfluidic[®], Nanojet[®], Jet homogenizer[®] และ Emulsiflex[®]

2.4.3.2 วิธีพลังงานต่ำ (Low-Energy emulsification methods)^(9,26,27)

การเตรียมด้วยเทคนิคพิเศษ โดยที่ไม่ต้องใช้เครื่องที่ให้พลังงานสูง สามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น วิธี solvent emulsification และวิธี spontaneous emulsification ซึ่งอาจเตรียมได้ด้วยวิธีการกลับวัฏภาคโดยอุณหภูมิ phase inversion temperature (PIT) และวิธีกลับวัฏภาคโดยสัดส่วน phase inversion composition (PIC)

2.4.3.2.1 Solvent emulsification

เป็นการเติมตัวทำละลายลงในวัฏภาคน้ำมัน โดยจะทำให้วัฏภาคน้ำมันเกิดเป็นหยดอนุภาคขนาดเล็ก เนื่องจากความไม่คงตัวของผิวประจันที่เกิดจากตัวทำละลายเกิด การแพร่อย่างรวดเร็วผ่านผิวประจันและลดแรงตึงระหว่างผิวลง⁽²²⁾ วิธีนี้ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีข้อดีคือสามารถทำได้ง่ายในระดับการทดลอง (lab scale) ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงในการเตรียม และตัวรับมีขนาดอนุภาคภายในเล็ก โดยขึ้นกับปัจจัยสำคัญได้แก่ ความหนืดของวัฏภาคน้ำมันค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิวแรงตึงระหว่างผิว รวมทั้งชนิด โครงสร้างทางเคมีและความเข้มข้นของตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายมีผลอย่างมากต่อขนาดหยด อนุภาคและการกระจายของขนาดอนุภาค⁽²²⁾

2.4.3.2.2 Spontaneous emulsification^(8,22,26,27)

เป็นวิธีการเตรียมอิมัลชันที่เกิดขึ้นได้เองโดยใช้หลักการการกลับวัฏภาค (phase inversion) ในการเตรียมอิมัลชันสามารถทำได้ 2 วิธีได้แก่

ก. Transitional inversion เป็นการเหนี่ยวนำโดยการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่มีผลต่อ HLB ของระบบ เช่น อุณหภูมิ (phase inversion temperature, PIT) และ/หรือความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำโดยการเปลี่ยนแปลงค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิว (surfactant affinity difference) โดยใช้สารผสมของสารลดแรงตึงผิว

ข. Catastrophic inversion เป็นการเหนี่ยวนำโดยการเพิ่ม สัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคกระจาย⁽²²⁾ เช่น phase transition method หรือ phase inversion composition (PIC) โดยการค่อยๆ เติมน้ำมันในสารผสมของน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว ที่อุณหภูมิคงที่ จนเกิดการกลับวัฏภาค จุดที่เกิดอิมัลชันเรียกว่า emulsion inversion point การเกิดอิมัลชันคาดว่า เกี่ยวข้องกับการเกิด lamella liquid crystallite และ/หรือ bi-continuous emulsion แต่ยังไม่ มีหลักฐานหรือการศึกษาที่ยืนยันกลไกแน่ชัด

ในการเตรียมอิมัลชันโดยใช้พลังงานต่ำจะเตรียมในสภาวะที่มีแรงตึงระหว่างผิวที่ต่ำมาก ซึ่งจะทำให้เกิดการก่อตัวของหยดอนุภาคที่มีขนาดเล็กมากปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิดอิมัลชัน เช่น สัดส่วนของของเหลวชั้นภายในต่อสารลดแรงตึงผิวโดยเมื่อให้สัดส่วนมวล (mass ratio) ของสารลดแรงตึงผิวต่อของเหลวชั้นภายนอกมีค่าคงที่ เมื่อเพิ่มสัดส่วนปริมาณของของเหลวชั้นภายในมีผลให้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวลดลง จึงทำให้ได้หยดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ในทางกลับกันเมื่อให้สัดส่วนมวลของสารลดแรงตึงผิวต่อของเหลวชั้นภายในมีค่าคงที่จะได้ขนาดอนุภาคที่เล็กลง⁽²²⁾

2.4.4 ปัจจัยที่สำคัญในการเตรียมนานอิมัลชัน^(22,25)

2.4.4.1 โมเลกุลของวัสดุภาควัสดุกระจายต้องไม่ละลายในตัวกลางของวัสดุภาควัสดุภายนอก

2.4.4.2 การเลือกส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิว ที่ไม่ทำให้เกิดการสร้างวัสดุภาควัสดุนานอิมัลชันที่เป็นผลึกของเหลวที่เข้ากับสารละลายได้ง่าย (Lyotropic liquid crystalline nanoemulsion phase)

2.4.4.3 ตัวกลางของวัสดุภาควัสดุภายนอกต้องมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่มากเกินไป ซึ่งจะช่วยให้เคลือบพื้นที่ผิวของหยดของเหลวขนาดเล็กที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างการเตรียม เป็นการช่วยยับยั้งการรวมหยดจากการเหนี่ยวนำของแรงเฉือน

2.4.4.4 แรงเค้นในรูปแบบที่เหมาะสมช่วยในการแตกหยดของเหลวระดับไมโครเมตรให้มีขนาดเล็กลงในระดับนาโนเมตร โดยทั่วไประดับแรงเค้นนี้ต้องมีค่ามากถึงค่าแรงดันลาปลาซ (laplace pressure) ของหยดของเหลวที่มีขนาดระดับนาโนอิมัลชัน

2.4.5 ข้อดีของนาโนอิมัลชัน^(9,10,22,25)

ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากนาโนอิมัลชันมากขึ้น เนื่องจากนาโนอิมัลชันมีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับอิมัลชันทั่วไป ได้แก่

2.4.5.1 ใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในปริมาณต่ำ (3-10%) ก็สามารถให้นานอิมัลชันที่คงตัว แต่ถ้าไม่ใช่อิมัลชันอาจต้องใช้สารลดแรงตึงผิว 20% ขึ้นไป

2.4.5.2 มีขนาดอนุภาคภายในเล็กจนเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้ดี เหมาะสำหรับการใช้เป็นตัวกลางในการนำสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนัง

2.4.5.3 นาโนอิมัลชันเป็นตำรับที่มีเสถียรภาพที่ดีเนื่องจากสมบัติที่มีขนาดอนุภาคเล็กพร้อมกับมีความคงตัวทางจลนศาสตร์ (kinetic stability)

2.4.5.4 เพิ่มความสามารถในการนำส่งยาที่ละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายน้ำ และเพิ่ม bioavailability ของตัวยาสำคัญ ส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพของตัวยาในการรักษาทางคลินิกได้

2.5 การซึมผ่านผิวหนัง

2.5.1 ช่องทางการซึมผ่านผิวหนัง^(22,24,28)

การที่โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ซึมผ่านผิวหนังได้นั้น โมเลกุลของสารต้องละลายอยู่ในกระสายยาที่เป็นของเหลว หรืออาจเป็นโมเลกุลของสารที่สามารถเกิดการไหลได้ด้วยตนเอง การถ่ายโอนของมวลสาร เป็นไปตามกฎการแพร่ของฟิคส์ (Fick's diffusion law) แรงขับที่ใช้เพื่อให้เกิดการแพร่นี้เป็นพลังงานทางเทอร์โมไดนามิกส์ของเกรเดียนต์ความเข้มข้น (concentration gradient) ซึ่งเมื่อสารสัมผัสกับผิวหนัง สารจะถูกดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังโดยการแพร่ได้ 3 ทางคือ

2.5.1.1 ผ่านเซลล์ของผิวหนัง (transcellular, intracellular route) โดยเซลล์ของ SC มีเส้นใยโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีทั้งส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารที่จะแพร่ผ่านได้ดีควรจะละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน

2.5.1.2 ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular route) ซึ่งในระหว่างเซลล์ในชั้น SC ประกอบด้วยของเหลวที่เป็นไขมัน สารที่จะซึมผ่านได้ดีจะต้องละลายได้บ้างในไขมัน แต่ต้องไม่ละลายในไขมันดีจนเกินไป มิฉะนั้นตัวยาจะถูกจับไว้ในชั้นผิวหนัง ไม่ปล่อยให้ยาผ่านไปยังผิวหนังชั้นถัดไป สารที่ผ่านได้ดีควรมีค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งภาค (partition coefficient) ใกล้เคียงหนึ่ง

2.5.1.3 ผ่านทางรูเปิดหรือท่อบนผิวหนัง (transappendageal) ได้แก่ ต่อมไขมัน รูขุมขนและต่อมเหงื่อ ซึ่งจะยอมให้สารที่มีขั้วและโมเลกุลใหญ่ซึมผ่านได้ดี อย่างไรก็ตามพื้นที่ผิวของรูเปิดนับว่าน้อยมาก ประมาณ 0.1 % จึงไม่ช่วยการดูดซึมมากนัก

2.5.2 ระบบนำส่งที่ช่วยในการซึมผ่านของยา^(22,24,28-30)

เส้นทางของสารในการซึมผ่านผิวหนัง (permeation) เป็นปรากฏการณ์ที่โมเลกุลของสารสำคัญเคลื่อนที่เข้าสู่ผิวหนัง ซึ่งมีวิธีการต่าง ๆ ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านของยาทางผิวหนัง ดังนี้

2.5.2.1 การเหนี่ยวนำของสาร (Chemical enhancement)^(22,28) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาผ่านผิวหนังโดยการเติมสารที่สามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผิวหนัง โดยเฉพาะชั้น SC ลงไปในตำรับ เช่น oleic acid, azone, sodium laurylsulfate เป็นต้น ซึ่งในระบบ

ไมโครอิมัลชัน และ นาโนอิมัลชัน ก็มีส่วนประกอบของสารก่ออิมัลชันที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังได้เช่นกัน^(22,28) และเนื่องจากระบบมีอนุภาคภายในได้ระดับนาโนเมตร ทำให้มีพื้นที่ผิวมาก และเกิดการแพร่ของสารสำคัญลงสู่ผิวหนังอย่างรวดเร็ว รวมทั้งหยดของเหลวที่มีขนาดเล็กนี้สามารถทำให้เกิดการสะสมอย่างสม่ำเสมอบนผิว กระบวนการเปียกบนผิว การกระจายบนผิว และการแทรกซึมเข้าสู่ผิวเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย

2.5.2.2 การดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ (Change of the physical properties of drugs) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาผ่านผิวหนังโดยการเปลี่ยนคุณสมบัติทางกายภาพของยา เช่น prodrug ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลง functional group ในโครงสร้างของตัวยาเพื่อให้ตัวยามีคุณสมบัติเป็น lipophilic มากขึ้น ทำให้สามารถซึมผ่านผิวหนังได้เพิ่มขึ้น แล้ว prodrug ก็จะถูก metabolize โดย enzyme ที่อยู่ในชั้นผิวหนัง เปลี่ยนให้เป็นยาที่สามารถออกฤทธิ์ได้ต่อไป

2.5.2.3 การเหนี่ยวนำทางกายภาพ (Physical enhancement) ได้แก่^(29,30)

2.5.2.3.1 Phonophoresis เป็นการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในการนำส่งยาผ่านชั้นผิวหนังเข้าสู่เนื้อเยื่อภายในร่างกาย เพื่อให้สามารถออกฤทธิ์เฉพาะที่และออกฤทธิ์ทั่วร่างกาย สำหรับกลไกในการนำส่งยายังไม่ชัดเจน มักใช้ในการนำส่งยาที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic

2.5.2.3.2 Iontophoresis เป็นการนำส่งยาที่มีประจุ โดยเฉพาะประจุบวกจะผ่านผิวหนังได้ดี โดยการใช้ low-voltage (<1 volt) constant electric fields เป็นเวลานานหลายนาที่หรือเป็นชั่วโมง ทำให้โมเลกุลเคลื่อนที่เข้าสู่หรือผ่านผิวหนังโดยกระบวนการ electrophoresis และ/หรือ electroosmosis เป็นหลัก ซึ่งเป็นการกระทำต่อยาโดยตรง โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวหนัง ยาจะผ่านผิวหนังทาง shunt เพราะบริเวณนี้ผิวหนังจะมีความต้านทานต่อ permeation ต่ำที่สุด แต่การนำส่งยาผ่าน shunt มีข้อจำกัดคือ ส่วนของ appendages มีเพียง 0.1% ของพื้นที่ผิวทั้งหมดทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งยาดำ

2.5.2.3.3 Skin electroporation เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาผ่านผิวหนัง โดย high-voltage pulsed electric fields ในระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง permeability ของผิวหนังอย่างมากแต่เกิดขึ้นเพียงชั่วขณะ การใช้ skin electroporation เพื่อเป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนังเป็นแนวทางที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากความสามารถในการเพิ่มปริมาณยาผ่านผิวหนังได้อย่างชัดเจน มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์สั้น ใช้กับยาที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันได้หลายชนิด เช่น hormone, DNA, vaccine และ peptide นอกจากนี้ พบว่ายายังคงสามารถผ่านผิวหนังได้อีกเป็นเวลานานหลังการให้ pulse รวมทั้งสามารถควบคุมปริมาณยาที่ผ่านผิวหนังได้โดยควบคุมที่สภาวะการให้กระแสไฟฟ้า

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านผิวหนัง^(10,22,28)

2.5.3.1 คุณสมบัติทางเคมีของสารที่จะผ่าน เช่น solubility, partition coefficient, pKa, molecular size, stability และ binding protein

2.5.3.2 ส่วนประกอบและความหนาของผิวหนัง รวมทั้งจำนวนต่อมเหงื่อและ รูขุมขน

2.5.3.3 ความชื้นของผิวหนัง (hydration) โดยทั่วไป สารจะไม่สามารถผ่านทาง corneocytes ส่วนทาง shunt จะมีความต้านทานต่อการซึมผ่านต่ำที่สุด สารต่างๆ โดยเฉพาะสารที่ละลายน้ำได้จะสามารถผ่านผิวหนังโดยทางนี้ได้เร็วกว่าทางอื่น แต่บริเวณนี้มีเพียง 0.1% ของ พื้นที่ผิวทั้งหมด ดังนั้นการเพิ่มการนำส่งยาผ่านผิวหนัง จึงมักจะผลักดันให้ผ่าน SC ทาง intercellular lipids คือพยายามเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ในการเป็น skin barrier ของ SC โดย เปลี่ยนแปลงที่ intercellular lipid structure ของ SC

2.6 โรคเชื้อราที่ผิวหนังตื้น (Superficial fungal infection)^(15,31,32)

โรคในกลุ่ม superficial fungal infection ประกอบด้วย

2.6.1 โรคเกลื้อน (Pityriasis versicolor, Tinea versicolor)

เป็นโรคเชื้อราที่ผิวหนังบริเวณชั้นนอกสุด (stratum corneum) โดยผู้ป่วยมักไม่ค่อยมีอาการและเป็นเรื้อรัง เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค คือ *Malassezia furfur* โดยมี lipophilic yeast คือ *Pityrosporum ovale* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ในธรรมชาติที่ผิวหนังคนปกติ พบมากบริเวณหน้าอก และที่อื่น ๆ เช่น หลัง ศีรษะ หลัง และหน้า จะแสดงอาการของโรคเมื่อมีเหตุชักนำหรือปัจจัยส่งเสริมทำให้เชื้อที่พบตามธรรมชาติ เปลี่ยนแปลงไปเป็นเชื้อก่อโรคขึ้น ตัวอย่างเช่น ผิวหนังมีเหงื่อออกมาก ใส่เสื้อผ้าอับชื้น ผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตียรอยด์ชนิดรับประทาน ภาวะทุพโภชนาการ เป็นต้น

ลักษณะของโรคเกลื้อนจะเริ่มจากเป็นผื่นราบ (macule) ที่บริเวณรูขุมขนต่อมาจะลามเป็นปื้นขนาดใหญ่ได้ มีรูปร่างเป็นวงกลม หลายวง โดยจะมีขุยละเอียด และมีสีต่างๆ กัน คือสีจางหรือขาว สีดำหรือน้ำตาล สีแดง ผู้ป่วยมักไม่ค่อยมีอาการ แต่จะมาพบแพทย์ด้วยเรื่องสีผิวต่าง ในการรักษาโรคเกลื้อนอาจหายได้เองแม้จะรักษาหรือไม่ก็ตาม ผู้ป่วยมักจะประสบปัญหาด้านความสวยงามและเป็นๆ หายๆ ดังนั้นในการรักษาควรป้องกันไม่ให้เกิดโรคซ้ำ และพยายามกำจัดสาเหตุ หรือปัจจัยส่งเสริมการเกิดโรค ยาที่ใช้รักษานี้รับประทาน ได้แก่ ketoconazole, Itraconazole และยาทาภายนอก ได้แก่ selenium sulfite, keratolytic agent, ยากลุ่ม imidazole derivative

2.6.2 โรคกลาก หรือโรคผิวหนังจากเชื้อรา (Dermatophytosis)

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาขององค์การอนามัยโลก พบว่าเชื้อก่อโรคกลากที่พบบ่อยในคน มี 3 สกุลได้แก่ *Trichophyton*, *Epidermophyton* และ *Microsporum* โรคกลากจัดเป็นกลุ่ม cutaneous mycoses เนื่องจากเชื้อ dermatophytes สามารถก่อพยาธิสภาพได้เฉพาะตำแหน่งที่มีการสร้างเคราติน (keratin) เท่านั้น เช่น ผิวหนังกำพร้าชั้นขี้ไคล (stratum corneum) เส้นผม และเล็บ ลักษณะทางคลินิกของโรคกลากมีความรุนแรงและมีชื่อเรียกจำเพาะที่แตกต่างกัน โดยจะมีคำว่า Tinea เป็นคำเริ่มต้น แล้วตามด้วยคำเฉพาะที่บ่งชี้อวัยวะที่ติดเชื้อรา เช่น โรคกลากที่หนังศีรษะและเส้นผมเรียกว่า Tinea capitis โรคกลากที่ลำตัวเรียกว่า Tinea corporis เป็นต้น คำว่า Tinea เป็นภาษาละตินแปลว่า การเคลื่อนที่ของหนอน (Worm-like movement) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะผื่นของคนไข้ที่จะพบวงขอบนูนแดงเป็นวงกลมหรือรีหรือวงแหวน (Annular lesion) ที่ลามออกได้

2.6.2.1 โรคกลากที่ใบหน้า (Tinea faciei)

ผู้ป่วยโรคกลากที่ใบหน้า ส่วนมากมักมีประวัติเกี่ยวข้องกับการสัมผัสสัตว์เลี้ยงบริเวณใบหน้า เช่น การให้สัตว์เลียใบหน้า หรือการนำสัตว์เลี้ยงมาสัมผัสใบหน้าโดยตรง ลักษณะผื่นจะเป็นวง ขอบยกสีแดง บางครั้งพบขุยสีขาวบริเวณกลางวงของผื่น เชื้อก่อโรคที่พบบ่อยคือ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* และ *Microsporum canis*

2.6.2.2 โรคกลากที่หนวดเครา (Tinea barbae หรือ Barber's itch)

ส่วนมากพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง บางครั้งเชื้อก่อโรคสามารถแทรกตัวลงไปตามรูขุมขน (Hair follicle) ลักษณะผื่นเป็นตุ่มแดงหรือมีหนองตามรูขุมขน มีขุยสีขาว ลักษณะวงผื่นไม่ชัดเจน เชื้อก่อโรคที่พบบ่อยคือ *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* และ *Microsporum canis*

2.6.2.3 โรคกลากบริเวณขาหนีบ (Tinea cruris หรือ Jockitch)

โรคกลากบริเวณขาหนีบ บางครั้งผื่นอาจลุกลามถึงก้น อาการพบได้ทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยลักษณะผื่นที่พบจะเป็นวงสีแดง ขอบยกชัดเจน ตรงกลางผื่นไม่พบรอยแดง (central clearing) ตามขอบของผื่นอาจจะพบตุ่มหนอง (pustules) หรือถุงน้ำเล็กๆ (vesicles) เนื่องจากขาหนีบและก้นเป็นบริเวณที่มีความอับชื้นมาก บางครั้งอาจพบลักษณะผื่นผิวหนังเปื่อยหรือมีรอยคล้ำดำได้ เชื้อก่อโรคที่พบบ่อยคือ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*

2.6.2.4 โรคกลากบริเวณลำตัว (Tinea corporis หรือ Ringworm)

โรคกลากบริเวณลำตัว มักจะรวมถึงแขน ข้อมือ ขา ข้อเท้าคอและหลัง ส่วนมากมักพบในเด็ก หรือผู้ใหญ่ที่ทำงานหนักมีเหงื่อออกปริมาณมาก ลักษณะผื่นมักพบกระจาย มีหลายผื่นในบริเวณที่เกิดพยาธิสภาพ ลักษณะผื่นจะมีสีชมพูจนแดง มีขุยสีขาวขอบยกชัดเจน ตรง

กลางฝ่ามือไม่มีรอยแดง บางครั้งอาจพบตุ่มหนองบริเวณขอบฝ่ามือเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยคือ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* และ *Microsporum canis*

2.6.2.5 โรคกลากบริเวณมือ (*Tinea manuum*)

ส่วนมากมักจะพบฝ่ามือบริเวณมือข้างใดข้างหนึ่งมากกว่าที่จะพบทั้งสองข้าง ลักษณะฝ่ามือจะไม่ชัดเจน ส่วนมากมักจะมีมือแห้งมีขุยปริมาณมาก ถ้าเป็นรุนแรงมีผิวหนังและแดงเป็นแผล เชื้อก่อโรคที่พบบ่อยคือ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* และ *Epidermophyton floccosum*

2.6.2.6 โรคกลากบริเวณเท้า (*Tinea pedis* หรือ Athlete's foot)

พบในกลุ่มนักกีฬา หรือผู้ที่มีเหงื่อออกบริเวณเท้าปริมาณมาก และคนที่ชอบใส่รองเท้าปิดมิดชิดและแน่นกว่าปกติจนไม่มีทางระบายของอากาศและเหงื่อ ลักษณะฝ่ามือจะไม่ชัดเจนมักมีผิวหนังแห้งมาก มีรอยแตกตามบริเวณก้นเท้าที่สัมผัสเท้า บางครั้งพบขุยสีขาวหรือผิวหนังเปื่อยได้ ส่วนมากมักจะมีกลิ่นค่อนข้างรุนแรง เชื้อก่อโรคที่พบบ่อยคือ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* และ *Epidermophyton floccosum*

2.6.3 โรคติดเชื้อราที่เล็บ (*Onychomycosis*)

โรคเชื้อราที่เล็บเกิดจากเชื้อก่อโรคกลุ่ม dermatophytes และ non-dermatophytic molds, ยีสต์ หรือ mixed infection ส่วนใหญ่ร้อยละ 80 ของผู้ป่วยเกิดจากเชื้อก่อโรคกลุ่ม dermatophytes มักเกิดที่เล็บเท้ามากกว่าเล็บมือ โดยเชื้อราจะเกิดพยาธิสภาพที่เนื้อเยื่อใต้เล็บ แล้วลามไปบริเวณด้านล่างของตัวเล็บ มักเกิดจากเชื้อ *Trichophyton rubrum* รองลงมาคือเชื้อ *Trichophyton mentagrophyte* และ *Candida albicans* โดยแสดงอาการ คือ การหนาตัวของเนื้อใต้เล็บ เล็บแยก และเล็บผุ เป็นขุยสีขาว

การรักษา มักต้องใช้ยารับประทานเป็นหลักเนื่องจากมีสาเหตุจากเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด การเลือกยาจำเป็นต้องพิจารณาถึงประสิทธิภาพของยาในการครอบคลุมเชื้อด้วย ยารับประทานได้แก่ Griseofulvin, Ketoconazole, Itraconazole, Terbinafine

2.6.4 โรคติดเชื้อแคนดิดา (*Candidiasis*)

Candidiasis เป็นการติดเชื้อจากเชื้อยีสต์ใน genus *Candida* ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อก่อโรค *Candida albicans* โดยพบตามธรรมชาติในร่างกายได้บ่อยที่ระบบทางเดินอาหาร ช่องปาก ช่องคลอด ผิวหนัง และที่ระบบทางเดินปัสสาวะ โดยเชื้อจะทำให้เกิดโรคได้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงและความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ ภูมิคุ้มกันโรคของผู้ป่วยเอง และปัจจัยร่วมหลายอย่าง ได้แก่ โรคที่ทำให้ภูมิคุ้มกันลดลง ภาวะขาดอาหาร การเกิดแผลและการบาดเจ็บของผิวหนัง สภาพแวดล้อมของอากาศ กลุ่มผู้ป่วยวัยต่าง ๆ เช่น เด็กอ่อน คนอ้วน ผู้สูงอายุ หญิงตั้งครรภ์ เป็นต้น

การติดเชื้อ Candidiasis มักพบบริเวณผิวหนังที่อยู่ซิดกัน มีความอับชื้น เช่น รักแร้ ขาหนีบ ใต้ราวนม ซอกสะโพก ง่ามนิ้ว ลักษณะทางคลินิกของการติดเชื้อ Cutaneous candidosis มีลักษณะผื่นเป็นขอบเขตชัดเจน มีการอักเสบ หนังแดงถลอก ผื่นรอบๆ มีการกระจายออกไป และพบในผู้ที่ทำงานมือแช่น้ำหรือเปียกชื้นอยู่เสมอ จะมีอาการบวมแดงที่ซอกเล็บ กดเจ็บ บางครั้งมีหนองออก จากใต้เล็บ บางครั้งเกิดการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย หากติดเชื้อเรื้อรังจะทำให้เล็บเสียและเปลี่ยนรูปร่าง มีร่องขวางขรุขระที่ตัวเล็บ

2.6.5 แนวทางการรักษาโรคติดเชื้อราที่บริเวณผิวหนัง^(2,3,15,31)

การรักษาผู้ติดเชื้อ dermatophytes และ โรคติดเชื้อ candidiasis นิยมใช้ 2 วิธีคือ การทายา (topical) และการรับประทานยา (systemic) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรคและภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย สำหรับผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ และอาการแสดงไม่รุนแรง รวมถึงพื้นที่ของผื่นที่เกิดขึ้นในร่างกายมีปริมาณไม่มาก นิยมรักษาโดยการทายา (topical antifungal treatments) แต่ในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องจากโรคประจำตัว การใช้ยากกลุ่มสเตียรอยด์ หรือมีความผิดปกติอื่นๆ ที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อ รวมถึงกลุ่มที่ใช้ยาทาแล้วไม่ตอบสนองต่อการรักษานิยมรักษาด้วยวิธีการกินยา (systemic/oral antifungal treatment)

โดยในปัจจุบันกลุ่มยาที่นิยมใช้รักษาแบบยาทา คือกลุ่ม Allylamine เช่น Terbinafine กลุ่ม Benzylamine derivatives เช่น Butenafine กลุ่ม topical azole derivatives เช่น Ketoconazole และกลุ่มอื่นๆ เช่น Ciclopiroxamine, Griseofulvin, Haloprogin, Tolnaftate, Whitfield's ointment และ Undecylenic acid เป็นต้น ส่วนกลุ่มยารับประทานที่นิยมใช้คือ Azole derivatives เช่น Fluconazole กลุ่ม Triazole derivatives เช่น Itraconazole กลุ่ม Allylamines derivative เช่น Terbinafine และกลุ่มอื่นๆ เช่น Griseofulvin เป็นต้น

2.7 การประเมินผลิตภัณฑ์

2.7.1 การวิเคราะห์หาปริมาณยา คีโตโคนาโซล⁽³³⁻³⁷⁾

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) ของยา คีโตโคนาโซล ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ซึ่งในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของยา คีโตโคนาโซล โดยใช้หลักการสเปกโตรโฟโตเมทรีนั้นสามารถทำได้ ด้วยเนื่องจากยา คีโตโคนาโซล สามารถดูดกลืนแสงในช่วงยูวี (200-400 นาโนเมตร) และมีค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่สูง (Molar absorptivity) 5×10^5 M/cm ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.2136 – 1.7088 µg/ml

เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีหลักการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบระหว่าง

เฟส 2 เฟส คือ stationary phase เฟสอยู่กับที่ (column) กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวพาไป ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็วสารนั้นก็จะถูกแยกออกมา ก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วย detector สัญญาณที่บันทึกได้จะมีลักษณะเป็น peak ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรมโดยเทคนิค HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นเทคนิคในการแยกสารออกจากของผสมโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งอาศัยหลักการเลือกตัวทำละลายที่สามารถละลายสารที่ต้องการแยกออกมาให้ได้ปริมาณ % recovery มากที่สุดจะถือว่าเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารนั้น ซึ่งรวมทั้งกลไกและเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดด้วย เช่น การใช้เทคนิคการเขย่า (vortex) การใช้ความร้อน การใช้พลังงานคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) เป็นต้น

ในปี 1999 Low and Wangboonskul⁽³⁴⁾ ทำการศึกษาหาลำดับ HPLC assay for the determination of ketoconazole in common pharmaceutical preparations. พบว่ามีวิธีการเตรียมตัวอย่างในแต่ละรูปแบบก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ด้วยการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งอาศัยหลักการของคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) ในการสกัดตัวยา คือ โทโคนาโซล ออกจากตำรับ และนำ ตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ใช้ HPLC column (250 x 4.6 mm id) flow rate 1.5 ml/min ฉีดตัวอย่างปริมาณ 20 µl วัดที่ความยาวคลื่น 232 nm. โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ สารละลายผสมระหว่าง 60% acetonitrile in 20 mM disodium hydrogen orthophosphate และ 0.2% v/v diethylamine, ที่ pH เท่ากับ 4 จากข้อมูลในรายงานวิจัยพบว่าวิธีการวิเคราะห์ให้ % recovery ของตำรับยาเม็ด แชมพู และครีม เท่ากับ 92.5-107.5%, 103.6% และ 87.9-93.7% ตามลำดับ ซึ่งผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานของเภสัชตำรับ (BP)

ในปี 2006 Rosa and Hackmann⁽³⁵⁾ ทำการศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยา คือ โทโคนาโซลในตำรับยาอิมัลชัน โดยเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ First-derivative ultraviolet spectrophotometric (Method I) และวิธี High performance liquid chromatographic (HPLC) (Method II) ด้วยสภาวะ HPLC condition : Column C18 (150x5 mm.), Mobile phase : triethylamine in methanol (1:500 v/v) และ ammonium acetate solution in water (1:200w/v), 75:25 v/v, Flow rate : 1.0 ml.min⁻¹, UV Detection at 225 nm, Injection volume : 25 µl สำหรับวิธี First-derivative ultraviolet spectrophotometric หาปริมาณยา คือ โทโคนาโซลที่ความ

ยาวคลื่น 257 นาโนเมตร อัตราเร็วในการสแกน 300 nm/min โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5.0-30.0 µg/ml ในเมทานอล จากการทดลองพบว่าค่า correlation coefficient (r^2) ได้ 0.9997, 0.9981 ในวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ตามลำดับ ทั้งสองวิธีให้ผลที่เที่ยงตรง (precision) จากการทดสอบซ้ำ พบว่าค่า relative standard deviation (RSD) ในการทดสอบด้วยวิธีที่ 1 กับสารตัวอย่าง อิมัลชัน และแชมพู เป็น 0.56%, 0.41% และในการทดสอบด้วยวิธีที่ 2 มีค่า RSD 2.13%, 1.25% ดังนั้นการวิเคราะห์ตัวอย่างยา คีโตโคนาโซล สามารถใช้วิธี First-derivative UV spectrophotometric ซึ่งให้ผลที่เที่ยงตรง ค่า RSD อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

ในปี 2008 Wang and Tang⁽³⁶⁾ ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณยา คีโตโคนาโซล โดยใช้ HPLC column (250 x 4.6 mm id) ฉีดตัวอย่างอัตราเร็ว 1.0 ml/min วัดที่ความยาวคลื่น 244 nm. โดยใช้เฟสเคลื่อนที่สารละลายผสม acetonitrile : 0.5% triethylamine in water (60:40 v/v) ปรับให้ค่า pH ประมาณ 7.0 สารละลายมาตรฐาน คีโตโคนาโซล ความเข้มข้นช่วง 10.6-84.8 µg/ml

ในปี 2014 Popovska⁽³⁷⁾ ทำการศึกษาพัฒนาวิธี UV-Vis Spectrophotometry ในการหาปริมาณยา คีโตโคนาโซล ในตำรับเภสัชภัณฑ์ ทั้งรูปแบบยาเม็ด ครีม และแชมพู โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานยา คีโตโคนาโซล ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/ml และทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.005-0.25 mg/ml โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและปรับปริมาตรสุดท้าย เนื่องจากยา คีโตโคนาโซล ละลายในตัวทำละลายนี้ได้ดี และไม่ดูดกลืนแสงในช่วงการดูดกลืนแสงของยา คีโตโคนาโซล ในการทดลองมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation method) ในหัวข้อ linearity and range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) และ robustness ตามมาตรฐานในข้อกำหนดของ ICH Guidelines ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 0.005-0.025 mg/ml มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 244 นาโนเมตร และที่ความเข้มข้น 0.05-0.25 mg/ml ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 296 นาโนเมตร ค่า correlation coefficient (r^2) เท่ากับ 0.9996 ทั้งสองความยาวคลื่น ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว มีความไวในการวิเคราะห์ด้วยเนื่องจากค่า LOD และค่า LOQ ที่ได้ต่ำ ทั้งที่ความยาวคลื่น 244 และ 296 นาโนเมตร

2.7.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial Susceptibility Test, AST) ⁽³⁸⁻⁴²⁾

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

2.7.2.1 Diffusion method

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในงานทดสอบประจำ (routine) สามารถใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้หลายชนิด โดยอาศัยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่สามารถต้านเชื้อราได้ (diameter of inhibition zone) วิธีการทดสอบ สามารถแบ่งได้ดังนี้

2.7.2.2 วิธี Agar disc diffusion เป็นการทดสอบที่ยอมรับใน clinical and laboratory standard institute (CLSI) โดยใช้ filter paper discs ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บรรจุสารที่จะทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ

2.7.2.3 วิธี Agar well diffusion เป็นการทดสอบที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีหลักการคล้ายกับวิธี agar disc diffusion เป็นการเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร และใส่สารที่จะทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อลงไป

2.7.2.4 วิธี Antimicrobial gradient เป็นวิธีการทดสอบที่อาศัยหลักการของวิธี dilution และวิธี diffusion เพื่อที่จะทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

2.7.2.5 Dilution methods

2.7.2.5.1 Micro – dilution (Broth Micro-dilution)

เป็นวิธีทดสอบที่ใช้หาค่าที่แท้จริงของค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่มีค่าใช้จ่ายสูง นิยมใช้สำหรับทดสอบเชื้อ *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. และ *Sterotrophomonas* spp.

2.7.2.5.2 Agar dilution method

เป็นวิธีทดสอบมาตรฐาน (CLSI, EUCAST, CA-SFM) ที่ใช้สารทดสอบ ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง สามารถหาค่า MIC จากการทดสอบได้

2.7.2.5.3 Semi-automated method

เป็นการทดสอบโดยใช้เครื่องมือทดสอบซึ่งมีอยู่ 3 รุ่น คือ Siemens Microscan[®], Biomerieux Vitek2[®] และ BD Phoenix[®] ใช้เป็นการทดสอบเทียบ (Validation) กับวิธี micro-dilution method

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV1601 ประเทศญี่ปุ่น
- 2) เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1260 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3) เครื่อง Vortex mixer ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น G560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 4) เครื่อง Water bath shaker ยี่ห้อ Heto Lab Equipment รุ่น SB 22 ประเทศเดนมาร์ก
- 5) เครื่อง Centrifuge ยี่ห้อ Tomy รุ่น MX301 ประเทศญี่ปุ่น
- 6) เครื่อง Magnetic stirrer ยี่ห้อ IKA รุ่น C-MAG HS 7 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 7) เครื่อง Sonicator bath ยี่ห้อ Power Sonic รุ่น 410 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 8) เครื่อง Particle size and zeta potential analyzer ยี่ห้อ Malvern รุ่น Nano ZS ประเทศ

อังกฤษ

- 9) เครื่อง Autoclave ยี่ห้อ Tomy รุ่น SX-500 ประเทศญี่ปุ่น
- 10) Laminar hood (Biosafety cabinet class II ยี่ห้อ ESCO Air Stream รุ่น AC2-4E8

ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 11) เครื่อง Incubator ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE600 ประเทศเยอรมนี
- 12) กล้องจุลทรรศน์ (Optical Microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น Bx 53 ประเทศเยอรมนี
- 13) กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ยี่ห้อ TECNAI รุ่น T20G² ประเทศเนเธอร์แลนด์
- 14) ตู้อบ (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น SNB100 ประเทศเยอรมนี

3.2 สารเคมี

- 1) Ketoconazole powder บริษัท CLEO Singapore ประเทศสิงคโปร์
- 2) Polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween[®] 80) บริษัท หน้าเขียน ประเทศไทย
- 3) Sorbitan monooleate (Span[®] 80) บริษัท หน้าเขียน ประเทศไทย
- 4) Caprylic/Capric triglyceride บริษัท หน้าเขียน ประเทศไทย
- 5) Isopropyl myristate บริษัท หน้าเขียน ประเทศไทย
- 6) Sunflower oil บริษัท หน้าเขียน ประเทศไทย
- 7) Methanol analytical grade ยี่ห้อ Labscan บริษัท ทีทีเคชายน ประเทศไทย

- 8) Acetonitrile (HPLC grade) ยี่ห้อ Labscan บริษัท ทีทีเคชายน ประเทศไทย
- 9) Triethylamine ยี่ห้อ Carlo Erba บริษัท ทีทีเคชายน ประเทศไทย
- 10) Propylene glycol บริษัท ที ซี สตาพร กรุ๊ป จำกัด ประเทศไทย
- 11) Phosphoric acid บริษัท ทีทีเคชายน ประเทศไทย
- 12) Agar (usage in Vitro) ยี่ห้อ Merck บริษัท เอส แอล คลอไลต์ซัพพลาย ประเทศไทย
- 13) Sabouraud 's Dextrose agar medium ยี่ห้อ Difco บริษัท เอส แอล คลอไลต์ซัพพลาย ประเทศไทย
- 14) Potato's Dextrose medium ยี่ห้อ Difco บริษัท เอส แอล คลอไลต์ซัพพลาย ประเทศไทย
- 15) Water irrigate บริษัทเยเนอรัล ฮอลปีดัล โบรด์ส์ ประเทศไทย
- 16) Purified water คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒอ้อมกวัช ประเทศไทย
- 17) ครีมคีโตโคนาโซล 2.0% จากร้านขายยา คลอง 3 ปทุมธานี ประเทศไทย

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

- 1) เชื้อยีสต์ *Candida albicans* DMST 5815 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประเทศไทย)
- 2) เชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 (American Type Culture Collection, USA)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบในตำรับ ที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชัน

3.4.1.1 การเตรียม Pseudoternary phase diagram

3.4.1.1.1 เตรียม Pseudoternary phase diagram ของน้ำมัน 3 ชนิด ได้แก่ CT (HLB=11), IPM (HLB=11.5) และ SO (HLB=7) สารลดแรงตึงผิวผสม tween 80 (HLB=15.0) และ span 80 (HLB= 4.3) และ น้ำ

3.4.1.1.2 คำนวณปริมาณของสารลดแรงตึงผิวผสมให้ได้ตาม required HLB โดยประกอบด้วยสัดส่วนน้ำมันร้อยละ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 รวมทั้งหมด 36 สูตร ในน้ำมันแต่ละชนิด สำหรับเตรียมยาพื้นนาโนอิมัลชัน จำนวน 20 กรัม ดังตาราง 3-5 ตามลำดับ

ตาราง 3 ปริมาณส่วนประกอบในการเตรียมนาโนอิมัลชันด้วย CT

สูตร	CT. (g)	Tween 80 (g)	Span 80 (g)	Water (g)	สัดส่วน Oil:Surfactant:Water
1	2	10	6	2	10:80:10
2	2	8.76	5.24	4	10:70:20
3	2	7.5	4.5	6	10:60:30
4	2	6.26	3.74	8	10:50:40
5	2	5.0	3.0	10	10:40:50
6	2	3.76	2.24	12	10:30:60
7	2	2.5	1.5	14	10:20:70
8	2	1.26	0.74	16	10:10:80
9	4	8.72	5.24	2	20:70:10
10	4	7.5	4.5	4	20:60:20
11	4	6.26	3.74	6	20:50:30
12	4	5.0	3.0	8	20:40:40
13	4	3.76	2.24	10	20:30:50
14	4	2.5	1.5	12	20:20:60
15	4	1.26	0.74	14	20:10:70
16	6	7.5	4.5	2	30:60:10
17	6	6.26	3.74	4	30:50:20
18	6	5.0	3.0	6	30:40:30
19	6	3.76	2.24	8	30:30:40
20	6	2.5	1.5	10	30:20:50
21	6	1.26	0.74	12	30:10:60
22	8	6.26	3.74	2	40:50:10
23	8	5.0	3.0	4	40:40:20
24	8	3.76	2.24	6	40:30:30
25	8	2.5	1.5	8	40:20:40

ตาราง 3 (ต่อ)

สูตร	CT. (g)	Tween 80 (g)	Span 80 (g)	Water (g)	สัดส่วน Oil:Surfactant:Water
26	8	1.26	0.74	10	40:10:50
27	10	5.0	3.0	2	50:40:10
28	10	3.76	2.24	4	50:30:20
29	10	2.5	1.5	6	50:20:30
30	10	1.26	0.74	8	50:10:40
31	12	3.76	2.24	2	60:30:10
32	12	2.5	1.5	4	60:20:20
33	12	1.26	0.74	6	60:10:30
34	14	2.5	1.5	2	70:20:10
35	14	1.26	0.74	4	70:10:20
36	16	1.26	0.74	2	80:10:10

ตาราง 4 ปริมาณส่วนประกอบในการเตรียมยาพื้นนาโนอิมัลชันด้วย IPM

สูตร	IPM (g)	Tween 80 (g)	Span 80 (g)	Water (g)	สัดส่วน Oil:Surfactant:Water
1	2	10.72	5.28	2	10:80:10
2	2	9.38	4.62	4	10:70:20
3	2	8.04	3.96	6	10:60:30
4	2	6.70	3.30	8	10:50:40
5	2	5.36	2.64	10	10:40:50
6	2	4.02	1.98	12	10:30:60
7	2	2.68	1.32	14	10:20:70
8	2	1.34	0.66	16	10:10:80
9	4	9.38	4.62	2	20:70:10

ตาราง 4 (ต่อ)

สูตร	IPM (g)	Tween 80 (g)	Span 80 (g)	Water (g)	สัดส่วน Oil:Surfactant:Water
10	4	8.04	3.96	4	20:60:20
11	4	6.70	3.30	6	20:50:30
12	4	5.36	2.64	8	20:40:40
13	4	4.02	1.98	10	20:30:50
14	4	2.68	1.32	12	20:20:60
15	4	1.34	0.66	14	20:10:70
16	6	8.04	3.96	2	30:60:10
17	6	6.70	3.30	4	30:50:20
18	6	5.36	2.64	6	30:40:30
19	6	4.02	1.98	8	30:30:40
20	6	2.68	1.32	10	30:20:50
21	6	1.34	0.66	12	30:10:60
22	8	6.70	3.30	2	40:50:10
23	8	5.36	2.64	4	40:40:20
24	8	4.02	1.98	6	40:30:30
25	8	2.68	1.32	8	40:20:40
26	8	1.34	0.66	10	40:10:50
27	10	5.36	2.64	2	50:40:10
28	10	4.02	1.98	4	50:30:20
29	10	2.68	1.32	6	50:20:30
30	10	1.34	0.66	8	50:10:40
31	12	4.02	1.98	2	60:30:10
32	12	2.68	1.32	4	60:20:20
33	12	1.34	0.66	6	60:10:30
34	14	2.68	1.32	2	70:20:10
35	14	1.34	0.66	4	70:10:20
36	16	1.34	0.66	2	80:10:10

ตาราง 5 ปริมาณส่วนประกอบในการเตรียมนาโนอิมัลชันด้วย SO

สูตร	SO (g)	Tween 80 (g)	Span 80 (g)	Water (g)	สัดส่วน Oil:Surfactant:Water
1	2	4.04	11.96	2	10:80:10
2	2	3.5	10.5	4	10:70:20
3	2	3.0	9.0	6	10:60:30
4	2	2.5	7.5	8	10:50:40
5	2	2.0	6.0	10	10:40:50
6	2	1.5	4.5	12	10:30:60
7	2	1.0	3.0	14	10:20:70
8	2	0.5	1.5	16	10:10:80
10	4	3.0	9.0	4	20:60:20
11	4	2.5	7.5	6	20:50:30
12	4	2.0	6.0	8	20:40:40
13	4	1.5	4.5	10	20:30:50
14	4	1.0	3.0	12	20:20:60
15	4	0.5	1.5	14	20:10:70
16	6	3.0	9.0	2	30:60:10
17	6	2.5	7.5	4	30:50:20
18	6	2.0	6.0	6	30:40:30
19	6	1.5	4.5	8	30:30:40
20	6	1.0	3.0	10	30:20:50
21	6	0.5	1.5	12	30:10:60
22	8	2.5	7.5	2	40:50:10
23	8	2.0	6.0	4	40:40:20
24	8	1.5	4.5	6	40:30:30
25	8	1.0	3.0	8	40:20:40

ตาราง 5 (ต่อ)

สูตร	SO (g)	Tween 80 (g)	Span 80 (g)	Water (g)	สัดส่วน Oil:Surfactant:Water
26	8	0.5	1.5	10	40:10:50
27	10	2.0	6.0	2	50:40:10
28	10	1.5	4.5	4	50:30:20
29	10	1.0	3.0	6	50:20:30
30	10	0.5	1.5	8	50:10:40
31	12	1.5	4.5	2	60:30:10
32	12	1.0	3.0	4	60:20:20
33	12	0.5	1.5	6	60:10:30
34	14	1.0	3.0	2	70:20:10
35	14	0.5	1.5	4	70:10:20
36	16	0.5	1.5	2	80:10:10

3.4.1.2 การเตรียมยาพื้นนาโนอิมัลชันด้วยวิธีกลับวัฏภาคโดยสัดส่วน (PIC)

3.4.1.2.1 ชั่งน้ำมันตามปริมาณที่คำนวณได้จากข้อ 3.4.1.1 ลงใน ปีกเกอร์ขนาด 50 ml ปั่นผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer จากนั้นเติม tween 80 และ span 80 ปั่นผสมนาน 1 นาที

3.4.1.2.2 ชั่งน้ำ ตามปริมาณที่คำนวณได้จากข้อ 3.4.1.1 ค่อย ๆ หยดน้ำลงในวัฏภาคน้ำมันพร้อมกับปั่นผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 2 นาที

3.4.1.2.3 เก็บตัวอย่างยาพื้นนาโนอิมัลชันในหลอดทดลองขนาด 10 ml จำนวน 2 หลอด

3.4.1.3 การศึกษาความคงสภาพทางกายภาพของยาพื้นนาโนอิมัลชัน

3.4.1.3.1 สังเกตการแยกชั้น ความใส ความหนืด โดยใช้สัญลักษณ์ (++++,++++,+++,++,+) แทนระดับความหนืดมากไปน้อยตามลำดับ

3.4.1.3.2 วัด pH ของตัวอย่างที่ 0 วัน โดยแบ่งตัวอย่างมาจำนวน 3 ml ใส่ในปิเกอร์ขนาด 10 ml แล้ววัด pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.4.1.3.3 วัดขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตัวอย่าง ที่ 0 และ 30 วัน ด้วยเครื่อง zeta sizer โดยปิเปตตัวอย่างจำนวน 50 μ l ลงในหลอดทดลอง และเจือจางด้วยน้ำ (water irrigate) จำนวน 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วใช้ syringe ดูดสารตัวอย่างใส่ cell สำหรับทดสอบ ด้วยเครื่อง zeta sizer

3.4.1.3.4 พิจารณาคัดเลือกสูตรที่ไม่แยกชั้นที่ 30 วัน และมีอนุภาค ภายในขนาดเล็กระดับนาโนเมตร รวมทั้งมีปริมาณสัดส่วนวัฏภาคภายในสูงสุด สำหรับพัฒนาตำรับคือ โทโคนาโซลนาโนอิมัลชันต่อไป

3.4.2 การศึกษาสภาวะการวิเคราะห์และหาค่าการละลายของยา คีโตโคนาโซล

3.4.2.1 การหาความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุด ในการวิเคราะห์ ด้วย เทคนิค Spectrophotometry

ละลายยา คีโตโคนาโซล จำนวน 25 มิลลิกรัม ในตัวเมทานอลปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย เมทานอล (ความเข้มข้น 50 μ g/ml) แล้วนำไปสแกนด้วยเทคนิค spectrophotometry ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร เพื่อหาความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})

3.4.2.2 ทดสอบสภาวะในการวิเคราะห์ คีโตโคนาโซล ด้วยเทคนิค HPLC

ในการศึกษาใช้สภาวะการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Wang and Tang (2008)⁽³⁶⁾ โดยใช้ HPLC column C18 ขนาด 150 mm และใช้เฟสเคลื่อนที่ acetonitrile: 0.5% triethylamine in water (pH 7.0) ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริก (60:40 %v/v) อัตราเร็ว 1.0 ml/min และปริมาณตัวอย่างฉีด 10 μ l ทดสอบที่ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร

3.4.2.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานของยา คีโตโคนาโซล

3.4.2.3.1 ชั่งคีโตโคนาโซลจำนวน 10.0 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

3.4.2.3.2 ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.2.3.1 จำนวน 1, 3, 5, 7 และ 9 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จะได้ สารละลาย คีโตโคนาโซล ความเข้มข้น 10, 30, 50, 70, 90 μ g/ml ตามลำดับ

3.4.2.3.3 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 244 nm บันทึกค่า peak area แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน ได้สมการเส้นตรงและค่า r^2 เพื่อใช้สำหรับคำนวณหาปริมาณ ยา คีโตโคนาโซล

3.4.2.4 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Method selectivity)

3.4.2.4.1 ทดสอบน้ำมัน 2 ชนิด คือ CT และ IPM

3.4.2.4.2 เตรียมน้ำมันแต่ละชนิดมาละลายด้วยเมทานอล ในความเข้มข้น 100 µl/ml และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 244 nm

3.4.2.5 ค่าการละลายของยา คีโตโคนาโซล ในน้ำมัน

3.4.2.5.1 ชั่งยา คีโตโคนาโซล จำนวน 100 mg ละลายในน้ำมัน CT และ IPM ปริมาณ 5 ml ใน erlenmeyer flask ขนาด 25 ml ที่มีฝาปิดปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex mixer จนตัวยาระบายทั่วในน้ำมัน โดยเตรียม 3 ตัวอย่างต่อน้ำมันแต่ละชนิด

3.4.2.5.2 เขย่าตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 3.4.2.5.1 ด้วยเครื่อง water bath shaker ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 72 ชั่วโมง

3.4.2.5.3 นำตัวอย่างใส่ใน centrifuge tube และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 15 นาที แล้วแยกเอาเฉพาะส่วนสารละลายใส (supernatant) มากรองผ่าน 0.22 µm membrane filter

3.4.2.5.4 ปิเปตสารละลายจำนวน 1 ml เจือจางและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจำนวน 10 ml ทั้ง 2 ตัวอย่างน้ำมัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณยาด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีข้อ 3.4.2.2

3.4.3 การเตรียมคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน (KNE)

3.4.3.1 หาปริมาณยาที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับ คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

3.4.3.1.1 เตรียมตำรับ 0.5% และ 1.0% w/w KNE ปริมาณ 100 กรัม โดยทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่างด้วยเทคนิคการลดขนาดผงยาและลำดับการละลายผงยา โดยชั่งผงยาจำนวน 0.5 กรัม หรือ 1.0 กรัม ละลายใน CT จำนวน 40 กรัม ผสมนาน 5 นาที และเติมสารลดแรงตึงผิว tween 80 จำนวน 6.3 กรัม และ span 80 จำนวน 3.7 กรัม ผสมต่อ 10 นาที จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำจำนวน 49.5 กรัม หรือ 49.0 กรัม ลงในวัฏภาคน้ำมัน เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปั่นผสมต่ออีก 10 นาที

3.4.3.1.2 บันทึกลักษณะทางกายภาพ และนำตัวอย่างมาส่องดูผลึกยาโดยหยดตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ 1 หยด ปิดแผ่นสไลด์ และหยดด้วยน้ำมันสำหรับส่องเลนส์ใกล้วัตถุ 100x แล้วนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ optical microscope ที่กำลังขยาย 1000x

3.4.3.2 ศึกษาความคงสภาพทางกายภาพ เพื่อคัดกรองตำรับ คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน จากข้อ 3.4.3.1

3.4.3.2.1 เก็บตัวอย่างใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 ml จำนวน 2 หลอด เก็บในตู้เย็น 30°C, 45°C นาน 30 วัน

3.4.3.2.2 บันทึกผลลักษณะทางกายภาพของตำรับ ได้แก่ ความใส การแยกชั้น ความหนืด pH และวัดขนาดอนุภาค ที่จุดเริ่มต้น และ เมื่อครบ 30 วัน (หมายเหตุ ความหนืดใช้การสังเกตโดยความหนืดมากใช้สัญลักษณ์ (+++++) และความหนืดน้อยลงไปตามลำดับ (++++,+++,++,+)

3.4.3.2.3 วัดขนาดอนุภาคภายใน โดยปิเปตตัวอย่างปริมาณ 50µl เจือจางด้วยน้ำ (water irrigate) ปริมาณ 1 ml และนำมาทดสอบด้วยเครื่อง zeta sizer บันทึกผลทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง ทั้งขนาดอนุภาค และค่า zeta potential

3.4.3.3 ศึกษาขนาดและรูปร่างอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

ส่งตัวอย่างยาพื้นนาโนอิมัลชัน และตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ที่คัดเลือกไปตรวจสอบลักษณะอนุภาคด้วยกล้อง TEM โดยใช้วิธีการย้อมแบบ negative stain เริ่มจากนำตัวอย่างมากระจายตัวในของเหลวตัวกลางที่ปราศจากไอออน (DI water) จากนั้นหยดตัวอย่าง 1 หยดบน formvar film grid เป็นแผ่นรองรับแบบเคลือบด้วยฟิล์มพอลิเมอร์ชั้นเดียวชั้นฟิล์มมีความหนาประมาณ 30-70 นาโนเมตรทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที ซับเบาๆ ด้านข้าง จากนั้นคว่ำ grid บน plate ที่มีสาร uranyl acetate นาน 20 วินาที และใช้กระดาษกรองซับเบาๆ อีกครั้ง วางทิ้งไว้ให้แห้งในที่มืด ประมาณ 15 นาที ก่อนนำ grid มาดูด้วยกล้อง TEM (ส่งตัวอย่างดูที่สถาบัน Center of nanoimaging คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.4.4 การศึกษาวิธีการสกัดยาจากตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน (0.5% KNE)

3.4.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดคีโตโคนาโซลจากตำรับ

3.4.4.1.1 ปริมาณตัวอย่างที่ใช้

3.4.4.1.1.1 ชั่งตัวอย่างจำนวน 2.0 กรัม และ 4.0 กรัม ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร กระจายตัวในเมทานอลจำนวน 70 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง sonicator นาน 30 นาที ทำซ้ำ 3 ตัวอย่าง จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

3.4.4.1.1.2 ปิเปตสารละลายจำนวน 5 มิลลิลิตรลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอล

3.4.4.1.1.3 วิเคราะห์หาปริมาณยาที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4.2.2

3.4.4.1.2 การสกัดในตัวทำละลายเมทานอล ด้วยเครื่อง sonicator หรือ water bath shaker ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 30 นาที

3.4.4.1.2.1 ชั่งตัวอย่างจำนวน 2.0 กรัม ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร กระจายตัวในเมทานอลจำนวน 70 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง sonicator หรือ water bath shaker นาน 30 นาที ทำซ้ำ 3 ตัวอย่างปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

3.4.4.1.2.2 ปิเปตสารละลายจำนวน 5 มิลลิลิตรลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอล

3.4.4.1.2.3 วิเคราะห์หาปริมาณยาที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4.2.2

3.4.4.1.3 เวลาที่ใช้ในการสกัดในเมทานอล ด้วยเครื่อง sonicator นาน 30 นาที และ 45 นาที

3.4.4.1.3.1 ชั่งตัวอย่างจำนวน 2.0 กรัม ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร กระจายตัวในเมทานอลจำนวน 70 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง sonicator นาน 30 นาที และ 45 นาที (ทำซ้ำ 3 ตัวอย่าง)ปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอล

3.4.4.1.3.2 ปิเปตสารละลายมาจำนวน 5 มิลลิลิตรลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอล

3.4.4.1.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณยาที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4.2.2

ตาราง 6 ศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดยาจากตำรับคีโตโคนาโซล

ลำดับ	เทคนิคการสกัด	ปริมาณตัวอย่าง		เวลาในการสกัด (นาที)	
		2 กรัม	4 กรัม	30	45
3.4.4.1.1	Sonicator	✓	✓	✓	-
3.4.4.1.2	Water bath shaker	✓	-	✓	-
	Sonicator	✓	-	✓	-
3.4.4.1.3	Sonicator	✓	-	✓	✓

3.4.5 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

3.4.5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.5.1.1 Sabouraud's dextrose agar (SDA)

3.4.5.1.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 100

มิลลิลิตรโดยชั่งผง sabouraud 's dextrose agar medium จำนวน 6.5 กรัมกระจายตัวในน้ำ 100 มิลลิลิตร ในขวดฝาเกลียว

3.4.5.1.1.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไปทำให้

ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.4.5.1.1.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ลงใน sterile petri dish ปริมาณ 20 ml/dish แล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัวเป็น agar plate

3.4.5.1.2 Potato dextrose agar (PDA)

3.4.5.1.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 100 ml

โดยชั่งผง potato 's dextrose medium จำนวน 2.4 กรัมและผง agar จำนวน 1.5 กรัมกระจายตัวในน้ำ 100 มิลลิลิตรในขวดฝาเกลียว

3.4.5.1.2.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไปทำให้

ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.4.5.1.2.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ลงใน sterile petri dish ปริมาณ 20 ml/dish แล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัวเป็น agar plate

3.4.5.2 การกระตุ้นเชื้อทดสอบ

3.4.5.2.1 โดยเชื้อยีสต์ *C. albicans* เพาะเลี้ยงใน sabouraud 's

dextrose broth (SDB) ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเชื้อรา *T. mentagrophytes* เพาะเลี้ยงใน potato dextrose broth (PDB) ที่ 28°C เป็นเวลา 7 วัน

3.4.5.2.2 นำเชื้อราและยีสต์ที่ถูกกระตุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไป

กระจายตัวใน sterile water ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ ความขุ่นของ McFarland No.0.5 ซึ่งมีปริมาณเชื้ออยู่ประมาณ 1×10^8 CFU/ml

3.4.5.3 การทดสอบตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในตู้ปราศจากเชื้อ

3.4.5.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วจากข้อ 3.4.5.1. ใช้ cylinder

cup เจาะช่องหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร จำนวน 4 ช่องสำหรับใส่ (ก) ยาพื้นนาโนอิมัลชัน (ตัวอย่างควบคุม) (ข) ตัวอย่างคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน (ตัวอย่างทดสอบ) (ค) ตัวอย่างในท้องตลาดที่มีการเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับตัวอย่างที่ (ข) (ตัวอย่างทดสอบเชิงบวก) และ (ง)

ตัวอย่าง(2%)ครีมในท้องตลาด (ตัวอย่างทดสอบเชิงบวก) โดยทดสอบตัวอย่างจำนวน 3 plates ต่อเชื้อแต่ละชนิด

3.4.5.3.2 นำไม้พ่นสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อปิ้งข้างหลอดจนหมด แล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของ agar plate

3.4.5.3.3 ใช้ sterile syringe ดูดตัวอย่าง ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม

3.4.5.3.4 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงในตู้ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ เพาะเลี้ยงเชื้อ *C. albicans* และบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ *T. mentagrophytes* ที่ตู้ 28°C เป็นเวลา 10 วัน

3.4.5.3.5 บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ(mm) เปรียบเทียบผลของตัวอย่างทดสอบกับตัวอย่างควบคุม และ ตัวอย่างครีมในท้องตลาด โดยใช้สถิติ Student T-test โปรแกรม Origin Pro 9.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ โดยกำหนดให้ค่า $p < 0.05$ จึงจะยอมรับว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

3.4.6 การศึกษาความคงสภาพของตำรับ 0.5% KNE

3.4.6.1 การเตรียมตัวอย่างตำรับ 0.5% KNE(สูตรCT,40:10:50 w/w/w)

3.4.6.1.1 เตรียมตำรับ จำนวน 100 กรัมด้วยเทคนิคการลดขนาดผง ยาและลำดับการละลายผงยา โดยชั่งผงยาจำนวน 0.5 กรัมละลายใน CT จำนวน 40 กรัม ผสมนาน 5 นาที และเติมสารลดแรงตึงผิว tween 80 จำนวน 6.3 กรัม และ span 80 จำนวน 3.7 กรัม ผสมต่อ 10 นาที จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำ จำนวน 49.5 กรัม หรือ 49.0 กรัมลงในภาคน้ำมัน เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปั่นผสมต่ออีก 10 นาที

3.4.6.1.2 แบ่งตัวอย่างใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด แบ่งเก็บที่ตู้เย็น 30°C และ 45°C อย่างละ 5 หลอด เป็นเวลา 30 วันเพื่อใช้ในการ วิเคราะห์ปริมาณยาที่คงเหลือที่เวลา 7,14,21,30 วัน อย่างละ 1 หลอด (ดึงมาวิเคราะห์ในเวลานั้นๆ แล้วทิ้งส่วนที่เหลือ) ส่วนหลอดที่ 5 ใช้ในการสังเกตลักษณะทางกายภาพ ณ เวลาต่าง ๆ

3.4.6.2 การประเมินผลความคงสภาพของตำรับ

3.4.6.2.1 สมบัติทางกายภาพ

3.4.6.2.1.1 บันทึกผลลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ดู การแยกชั้น ความใส ความหนืด และวัดค่า pH ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้า ที่จุดเริ่มต้น และเมื่อครบ 7,14, 21, 30 วัน

3.4.6.2.1.2 วัด pH ที่เวลาเริ่มต้นด้วยเครื่อง pH meter โดยแบ่งตัวอย่างมาจำนวน 3 มิลลิลิตรใส่ในปิเปตอร์ขนาด 10 มิลลิลิตรและนำหัวอิเล็กโทรดจุ่มจนกระทั่งค่าที่ได้คงที่

3.4.6.2.1.3 วัดขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตัวอย่าง ด้วยเครื่อง zeta sizer โดยปิเปตตัวอย่างจำนวน 50 ไมโครลิตรในหลอดทดลอง และเจือจางด้วยน้ำ(water irrigate)จำนวน 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน และใช้ syringe ดูดสารตัวอย่างใส่เซลล์นำมาทดสอบในเครื่อง zeta sizer

3.4.6.2.2 วิเคราะห์ปริมาณยาในตำรับที่คงเหลือ (Remaining)

3.4.6.2.2.1 นำตัวอย่างที่จะทดสอบ โดยชั่งมาจำนวน 2.0 กรัมสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จำนวน 70 มิลลิลิตรใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร บนเครื่อง sonicator เป็นเวลานาน 45 นาที ปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอล

3.4.6.2.2.2 ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ

3.4.6.2.2.1 จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรให้ครบด้วยเมทานอล

3.4.6.2.2.3 ดูดตัวอย่างที่เตรียมด้วย syringe จำนวน 1.0 มิลลิลิตรกรองผ่าน nylon membrane syringe filter ขนาด 0.22 mm บรรจุลงใน vial ก่อนนำมาวิเคราะห์หาปริมาณยาโคโคโคนาโซลด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ HPLC Column C18 ขนาด 150 mm และใช้เฟสเคลื่อนที่ acetonitrile (60%v/v) : 0.5% triethylamine in water (40%v/v) (pH7.0) ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริก อัตราเร็ว 1.0 ml/min และปริมาณตัวอย่างฉีด 10 μ l ทดสอบที่ความยาวคลื่น 244 nm

3.4.6.2.2.4 นำผลที่ได้มาคำนวณหา % remaining ที่เวลา 0,7,14,21 และ 30 วัน

3.4.6.2.2.5 เปรียบเทียบปริมาณยาที่คงเหลือโดยใช้สถิติ Student T-test โปรแกรม Origin Pro 9.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของ % remaining ของจุดเริ่มต้นและ % remaining ในแต่ละช่วงเวลา โดยกำหนดให้ค่า $p < 0.05$ จึงจะยอมรับว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 สัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบในตำรับที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชัน

4.1.1 สมบัติทางกายภาพของตำรับ

4.1.1.1 อิมัลชันที่เตรียมจาก caprylic/capric triglyceride(CT)

ในการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบที่เหมาะสมในตำรับที่เตรียมจากน้ำมันCT (HLB 11.0)ทั้งหมด 36 สูตร พบว่าสูตรที่เตรียมได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.23 – 6.79 และสูตรที่ไม่เกิดอิมัลชัน ได้แก่ 1, 2, 9, 16, 22, 27, 34 และ 36 สูตรที่เกิดอิมัลชัน และมีความกึ่งแข็ง (ครีม) ได้แก่ 3, 4, 5, 6, 10-13, 17-19, 23, 24, 28, 29, 30-33 และ 35 สูตรที่เกิดอิมัลชันและมีความหนืดต่ำ (เหลว) ได้แก่ 7, 8, 14, 15, 20, 21, 25 และ 26 เนื่องจากต้องการพัฒนานาโนอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ เมื่อติดตามผลความคงสภาพที่ 30°C และ 45°C มีสูตรที่ไม่เกิดการแยกชั้นที่ 30 วัน ได้แก่ 8, 14, 15, 20, 21, 25, 26 ผลดังตาราง 7 และจากpseudoternary phase diagram ดังภาพประกอบ 2เกิดอิมัลชันเหลวเมื่อใช้น้ำมันสัดส่วน 10-40% และสารลดแรงตึงผิวผสมสัดส่วน 10-20%

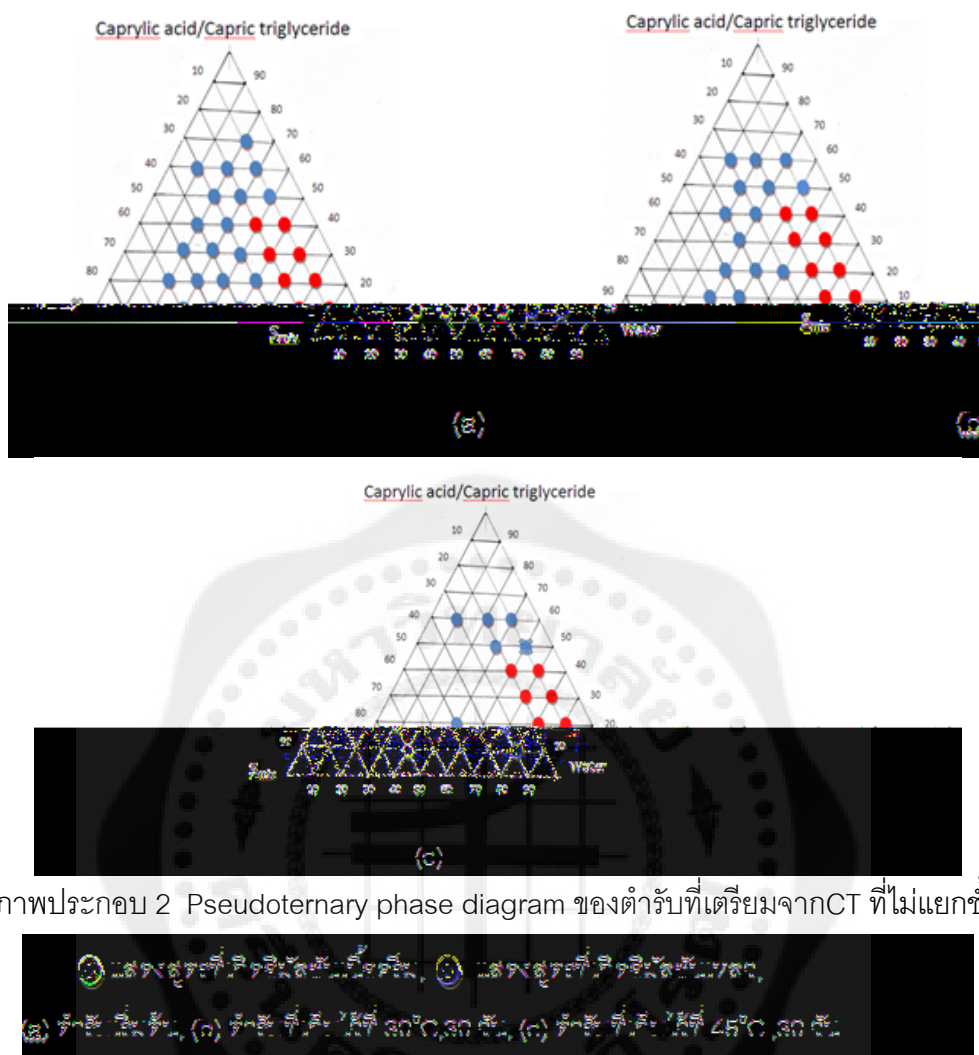
ตาราง 7 สมบัติทางกายภาพของตำรับที่เตรียมจาก caprylic/capric triglyceride (CT)

สูตร CT	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓) , แยกชั้น(X)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30 °C				45 °C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
1	เหลืองใส	+++	5.75	-	X	X	X	X	X	X	X	X
2	เหลือง	+++	5.97	+	X	X	X	X	X	X	X	X
3	ขาวครีม	++++	5.61	+	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X
4	ขาวครีม	++++	6.79	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	ขาวครีม	++++	6.57	+	✓	✓	X	X	✓	X	X	X
6	ขาวครีม	+++	5.63	+	X	X	X	X	X	X	X	X
7	ขาว	++	5.45	+	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X
8	ขาว	++	5.78	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	เหลืองใส	+++	5.42	-	X	X	X	X	X	X	X	X

ตาราง 7 (ต่อ)

สูตร CT	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓) , แยกชั้น(X)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30 °C				45 °C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
10	ขาวครีม	++++	5.60	+	X	X	X	X	X	X	X	X
11	ขาวครีม	++++	5.89	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12	ขาวครีม	++++	6.12	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
13	ขาวครีม	++++	6.24	+	X	X	X	X	X	X	X	X
14	ขาว	++	5.89	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	ขาว	++	5.74	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	เหลืองใส	+++	5.23	-	X	X	X	X	X	X	X	X
17	ขาวครีม	++++	5.46	+	✓	✓	X	X	X	X	X	X
18	ขาวครีม	++++	5.82	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
19	ขาวครีม	+++	6.36	+	✓	✓	X	X	✓	X	X	X
20	ขาว	++	5.93	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21	ขาว	++	5.81	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22	เหลืองใส	+++	5.46	-	X	X	X	X	X	X	X	X
23	ขาวครีม	++++	5.93	+	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X
24	ขาวครีม	+++++	5.23	+	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X
25	ขาว	++	5.68	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
26	ขาว	++	5.79	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27	เหลือง	+++	5.93	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
28	ขาวครีม	++++	5.46	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
29	ขาวครีม	++++	5.67	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
30	ขาวครีม	+++	6.08	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
31	ขาวครีม	+++	6.43	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
32	ขาวครีม	+++	5.85	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
33	ขาวครีม	+++	6.49	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
34	แยกชั้น	+++	5.28	แยกชั้น	X	X	X	X	X	X	X	X
35	ขาวครีม	+++	5.34	+	X	X	X	X	X	X	X	X
36	แยกชั้น	+++	5.66	แยกชั้น	X	X	X	X	X	X	X	X

หมายเหตุ ความหนืดใช้การสังเกตโดยความหนืดมากใช้สัญลักษณ์ (+++++) และความหนืดน้อยลงไปตามลำดับ (++++, +++, ++, +) อิมัลชันคงสภาพ (✓) , แยกชั้น(X)



ภาพประกอบ 2 Pseudoternary phase diagram ของตำรับที่เตรียมจาก CT ที่ไม่แยกชั้น

4.1.1.2 อิมัลชันที่เตรียมจาก Isopropyl myristate (IPM)

Isopropyl myristate มีค่า HLB 11.5 เมื่อนำมาเตรียมอิมัลชันทั้งหมด 36 สูตร พบว่าสูตรที่เตรียมได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.3 – 6.6 และสูตรที่ไม่เกิดอิมัลชัน ได้แก่ 1, 2, 9, 16, 22, 27, 34 และ 36 สูตรที่เกิดอิมัลชันและมีความแข็งแรง ได้แก่ 3-6, 10-13, 17-19, 23-25, 28, 29, 31, 32 และ 35 สูตรที่เกิดอิมัลชันและมีความหนืดต่ำ ได้แก่ 7, 8, 14, 15, 20, 21, 26, 30, 33 และเมื่อติดตามผลความคงสภาพอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ พบว่าที่ 30°C และ 45°C มีสูตรที่ 8, 14, 15, 20, 21, 26, 30 และ 33 ที่อิมัลชันไม่เกิดการแยกชั้นภายใน 30 วัน ผลดังตาราง 8 ซึ่งสังเกตจาก pseudo-ternary phase diagram และภาพประกอบ 3 จะเห็นเกิดอิมัลชันเหลวเมื่อใช้สัดส่วนน้ำมัน 10 - 60% และสารลดแรงตึงผิวผสม 10-20%

ตาราง 8 สมบัติทางกายภาพของตำรับที่เตรียมจากIsopropyl myristate (IPM)

สูตร IPM.	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓) , แยกชั้น (X)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30 °C				45 °C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
1	เหลืองใส	+++	5.54	-	X	X	X	X	X	X	X	X
2	เหลืองขุ่น	+++	5.67	+	X	X	X	X	X	X	X	X
3	ขาวครีม	++++	5.61	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
4	ขาวครีม	++++	6.19	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	ขาวครีม	++++	6.57	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	ขาวครีม	+++	6.63	+	X	X	X	X	X	X	X	X
7	ขาวเหลือง	+++	5.35	+	✓	X	X	X	✓	X	X	X
8	ขาวเหลือง	++	5.98	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	เหลืองใส	+++	5.42	-	X	X	X	X	X	X	X	X
10	เหลืองขุ่น	++++	5.30	+	X	X	X	X	X	X	X	X
11	เหลืองขุ่น	++++	5.72	+	✓	X	X	X	✓	X	X	X
12	ขาวครีม	++++	6.52	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	ขาวครีม	++++	6.34	+	X	X	X	X	X	X	X	X
14	ขาวเหลือง	++	5.69	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	ขาวเหลือง	++	5.74	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	เหลืองใส	+++	5.53	-	X	X	X	X	X	X	X	X
17	เหลืองขุ่น	++++	5.86	+	X	X	X	X	X	X	X	X
18	ขาวครีม	++++	5.82	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	ขาวครีม	+++	6.36	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	ขาวเหลือง	++	5.83	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21	ขาวเหลือง	++	5.84	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22	เหลืองใส	+++	5.56	-	X	X	X	X	X	X	X	X
23	เหลืองขุ่น	++++	5.93	+	X	X	X	X	X	X	X	X
24	ขาวครีม	+++++	5.83	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
25	ขาวครีม	+++	5.68	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
26	ขาวเหลือง	++	5.67	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27	เหลืองใส	+++	5.93	-	X	X	X	X	X	X	X	X
28	ขาวครีม	++++	5.46	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

4.1.1.3 อิมัลชันที่เตรียมจาก Sunflower oil (SO)

Sunflower oil ซึ่งมีค่า HLB 7.0 ทำการเตรียมอิมัลชันในจำนวนทั้งหมด 36 สูตร พบว่าสูตรที่ได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.2 – 6.8 มีสูตรที่ไม่เกิดอิมัลชัน ได้แก่ 1, 2, 9, 16, 22, 27, 34 และ 36 สูตรที่เกิดอิมัลชันและมีความกึ่งแข็ง ได้แก่ 3-6, 10-13, 17-19, 23, 24, 28-33 และ 35 สูตรที่เกิดอิมัลชันและมีความหนืดต่ำ ได้แก่ 7, 8, 14, 15, 20, 21, 25, 26 และ 30 เมื่อติดตามความคงสภาพของอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำพบว่า ที่ 30°C และ 45°C ไม่มีสูตรใดคงสภาพได้ถึง 30 วัน ผลดังตาราง 9 และจากรูป pseudoternary phase diagram ดังภาพประกอบ 4 เกิดอิมัลชันเหลวเมื่อใช้สัดส่วนน้ำมัน 10-40% และสารลดแรงตึงผิวผสม 10-20%

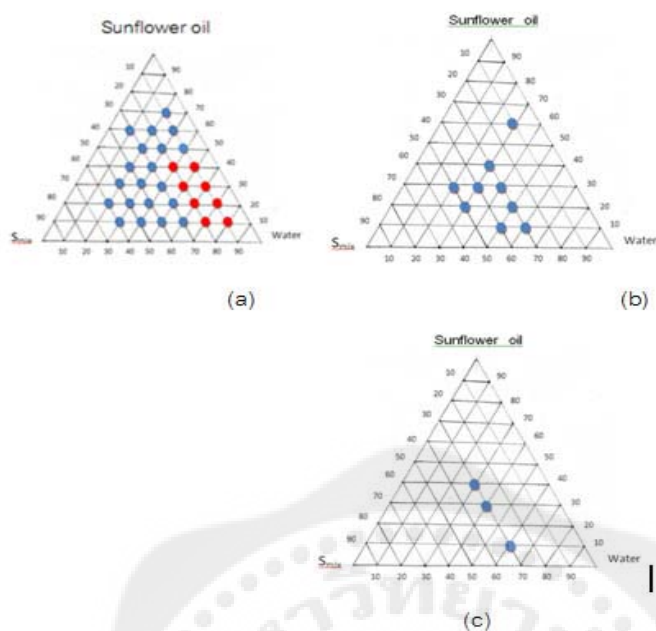
ตาราง 9 สมบัติทางกายภาพของตำรับที่เตรียมจาก Sunflower oil

สูตร SO	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓) , แยกชั้น(X)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30 °C				45 °C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
1	เหลืองใส	+++	5.42	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	เหลืองใส	+++	5.77	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	ขาวครีม	++++	5.81	+	✓	X	X	X	✓	X	X	X
4	ขาวครีม	++++	5.79	+	✓	X	X	X	✓	X	X	X
5	ขาวครีม	++++	5.57	+	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X
6	ขาวครีม	+++	5.63	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	ขาวเหลว	+++	5.45	+	✓	X	X	X	✓	X	X	X
8	ขาวเหลว	++	5.78	+	X	X	X	X	X	X	X	X
9	เหลืองใส	+++	5.42	-	X	X	X	X	X	X	X	X
10	เหลืองขุ่น	++++	5.60	+	X	X	X	X	X	X	X	X
11	ขาวครีม	++++	5.89	+	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X
12	ขาวครีม	++++	5.22	+	✓	✓	X	X	✓	✓	X	X
13	ขาวครีม	++++	5.24	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
14	ขาวเหลว	++	5.89	+	✓	✓	X	X	✓	X	X	X
15	ขาวเหลว	++	5.74	+	X	X	X	X	X	X	X	X
16	เหลืองใส	+++	5.53	-	X	X	X	X	X	X	X	X
17	ขาวครีม	++++	5.56	+	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X

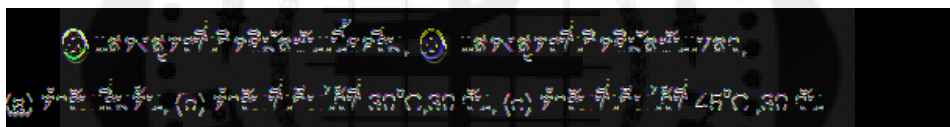
ตาราง 9 (ต่อ)

สูตร SO	ลักษณะทางกายภาพ (เริ่มต้น)				อิมัลชันคงสภาพ (✓) , แยกชั้น(X)							
	สี/ความใส	ความหนืด	pH	การเกิด emulsion	30 °C				45 °C			
					7	14	21	30	7	14	21	30
18	ขาวครีม	++++	5.74	+	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X
19	ขาวครีม	+++	5.36	+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	ขาวเหลือง	++	5.63	+	✓	✓	X	X	✓	X	X	X
21	ขาวเหลือง	++	5.74	+	X	X	X	X	X	X	X	X
22	เหลืองใส	+++	5.46	-	X	X	X	X	X	X	X	X
23	ขาวครีม	++++	5.63	+	✓	✓	X	X	✓	✓	X	X
24	ขาวครีม	++++	5.73	+	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X
25	ขาวเหลือง	++	5.68	+	X	X	X	X	X	X	X	X
26	ขาวเหลือง	++	5.74	+	X	X	X	X	X	X	X	X
27	เหลืองใส	+++	5.93	-	X	X	X	X	X	X	X	X
28	ขาวครีม	++++	5.46	+	X	X	X	X	X	X	X	X
29	ขาวครีม	++++	5.67	+	✓	X	X	X	✓	X	X	X
30	ขาวครีม	+++	6.32	+	X	X	X	X	X	X	X	X
31	ขาวครีม	+++	6.23	+	X	X	X	X	X	X	X	X
32	ขาวครีม	+++	5.85	+	X	X	X	X	X	X	X	X
33	ขาวครีม	+++	6.48	+	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X
34	แยกชั้น	+++	5.58	แยกชั้น	X	X	X	X	X	X	X	X
35	ขาวครีม	+++	5.91	+	X	X	X	X	X	X	X	X
36	แยกชั้น	+++	5.78	แยกชั้น	X	X	X	X	X	X	X	X

หมายเหตุ ความหนืดใช้การสังเกตโดยความหนืดมากใช้สัญลักษณ์ (+++++) และความหนืดน้อยลงไปตามลำดับ (++++,+++,++,+) อิมัลชันคงสภาพ (✓) , แยกชั้น(X)



ภาพประกอบ 4 Pseudoternary phase diagram ของตำรับที่เตรียมจากSunflower oil ที่ไม่แยกชั้น



ดังนั้นสรุปได้ว่าการเตรียมระบบนาโนอิมัลชันด้วยเทคนิคการใช้พลังงานต่ำที่มีวัฏภาคน้ำมันเป็นCTหรือIPMสามารถทำให้ได้อิมัลชันที่ไม่แยกชั้นเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 30 วัน ที่ 30°C และ 45°C ในขณะที่อิมัลชันที่เตรียมจาก SO จะได้อิมัลชันที่มีตำรับส่วนใหญ่เกิดการแยกชั้น

4.1.2 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (Zeta potential)

4.1.2.1 อิมัลชันที่เตรียมจาก CT

เมื่อทดสอบตัวอย่างด้วยเครื่อง zeta sizer พบว่าขนาดอนุภาคเริ่มต้นของอิมัลชันความหนืดต่ำ (เหลว) และมีความคงสภาพที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน อยู่ในช่วง 108.9 – 247.7 นาโนเมตร และเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่ามีช่วงขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 130.0 – 295.1 นาโนเมตร ผลดังตาราง 10 ส่วนค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเริ่มต้นอยู่ในช่วง -9.25 mV ถึง -42.7 mV และเมื่อเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 30 วัน ที่ 30°C และ 45°C มีค่าอยู่ในช่วง -8.78 mV ถึง -38.7 mV และมีค่าอยู่ในช่วง -8.19 mV ถึง -38.2 mV ตามลำดับ ผลดังตาราง 11

ตาราง 10 ขนาดอนุภาคของตำรับอิมัลชันที่เตรียมจาก CT ที่มีความคงสภาพ

สูตร CT.	Initial		Stability 30 Days (30°C)		Stability 30 Days (45°C)	
	Size(nm)	PDI	Size(nm)	PDI	Size(nm)	PDI
	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)
CT8	108.9±3.1	0.22±0.06	130.0±2.0	0.25±0.01	145.5±2.2	0.15±0.01
CT14	127.8±0.8	0.23±0.00	181.7±3.4	0.19±0.01	295.1±1.9	0.18±0.01
CT15	140.9±1.4	0.15±0.00	166.4±0.9	0.20±0.01	169.7±3.3	0.18±0.02
CT20	135.4±0.7	0.18±0.00	156.6±3.8	0.22±0.02	198.5±3.1	0.23±0.02
CT21	182.0±1.7	0.18±0.05	236.1±3.3	0.25±0.01	231.5±3.1	0.22±0.02
CT25	143.4±3.1	0.25±0.00	156.0±2.4	0.25±0.00	208.0±3.0	0.24±0.03
CT26	247.7±6.1	0.27±0.07	256.8±1.8	0.27±0.02	278.0±3.0	0.23±0.03

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

ตาราง 11 Zeta potential ของตำรับอิมัลชันที่เตรียมจาก CT

สูตร CT	Zeta potential (mean±sd)		
	Initial	Stability 30 Days (30°C)	Stability 30 Days (45°C)
CT8	-36.1±1.8	-21.4±2.2	-20.3±1.6
CT14	-29.9±0.7	-23.5±1.2	-20.5±1.3
CT15	-26.7±2.1	-18.4±1.3	-19.2±1.5
CT20	-42.7±1.6	-19.0±1.9	-21.3±2.1
CT21	-32.1±1.9	-14.7±2.3	-14.2±2.4
CT25	-9.3±2.4	-8.8±2.1	-8.2±2.2
CT26	-34.6±1.1	-38.7±1.8	-38.2±1.3

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

4.1.2.2 อิมัลชันที่เตรียมจาก Isopropyl myristate (IPM)

เมื่อทดสอบตัวอย่างด้วยเครื่อง Zeta sizer พบว่าขนาดอนุภาคเริ่มต้นของอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ (เหลว) และมีความคงสภาพที่ 30°C และ 45°C นาน 30 วัน อยู่ในช่วง 108.7 - 269.6 นาโนเมตร และเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 109.4 - 266.5 นาโนเมตร ผลดังตาราง 12 ส่วนค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า ณ จุดเริ่มต้น อยู่ในช่วง -26.7 mV ถึง -40.8 mV ที่ 30°C นาน 30 วัน ตั้งแต่ -14.7 mV ถึง -33.7 mV และที่ 45°C นาน 30 วัน ตั้งแต่ -14.2 mV ถึง -31.2 mV ผลดังในตาราง 13

ตาราง 12 ขนาดอนุภาคของตำรับอิมัลชันที่เตรียมจาก IPM ที่มีความคงสภาพ

สูตร IPM.	Initial		Stability 30 Days (30°C)		Stability 30 Days (45°C)	
	Size(nm) (Mean±SD)	PDI (Mean±SD)	Size(nm) (Mean±SD)	PDI (Mean±SD)	Size(nm) (Mean±SD)	PDI (Mean±SD)
IPM 8	108.7±3.1	0.21±0.06	109.4±1.0	0.32±0.05	114.7±0.2	0.17±0.00
IPM14	127.8±0.8	0.28±0.00	115.1±2.4	0.27±0.00	130.5±0.8	0.15±0.01
IPM15	140.9±1.4	0.15±0.00	140.1±3.3	0.17±0.03	139.2±1.7	0.12±0.01
IPM20	135.4±0.7	0.18±0.00	128.4±0.4	0.19±0.03	134.4±1.4	0.15±0.03
IPM21	182.0±1.7	0.18±0.05	178.5±3.3	0.17±0.00	174.3±1.8	0.16±0.03
IPM26	247.7±6.1	0.27±0.07	223.9±5.0	0.20±0.00	223.9±2.4	0.20±0.01
IPM30	269.6±3.3	0.25±0.01	255.1±1.7	0.21±0.03	266.5±1.6	0.22±0.02
IPM33	211.2±4.9	0.27±0.01	219.2±2.6	0.25±0.01	217.7±1.8	0.20±0.01

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

ตาราง 13 Zeta potential จากตำรับที่เตรียมจากIPM

สูตร IPM	Zeta potential (Mean±SD)		
	Initial	Stability 30 Days (30°C)	Stability 30 Days (45°C)
IPM 8	-36.8±1.8	-31.4±2.2	-24.3±1.6
IPM 14	-28.9±0.7	-23.5±1.2	-20.5±1.3
IPM 15	-26.7±2.1	-18.4±1.3	-19.2±1.5
IPM 20	-42.7±1.6	-19.0±1.9	-21.3±2.1
IPM 21	-32.1±1.9	-14.7±2.3	-14.2±2.4
IPM 26	-36.3±2.4	-33.7±2.1	-31.2±2.2
IPM 30	-28.6±1.1	-20.7±1.8	-18.2±1.3
IPM 33	-24.6±1.1	-22.7±1.8	-20.2±1.3

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

4.1.2.3 ขนาดอนุภาคภายในของตำรับอิมัลชันที่เตรียมจาก SO

พบว่าสูตรที่เกิดอิมัลชัน และมีความหนืดต่ำ เมื่อนำมาทดสอบวัดขนาดอนุภาค ด้วยเครื่อง zeta sizer ณ จุดเริ่มต้น พบว่ามีช่วงขนาดอนุภาคตั้งแต่ 0.353 – 1.479 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าตำรับที่เตรียมจาก CT และ IPM เมื่อนำตัวอย่างอิมัลชันที่เตรียมได้มาเก็บที่สภาวะอุณหภูมิ 30°C, 45°C เมื่อครบ 7 วัน พบว่าอิมัลชันไม่คงสภาพ แยกชั้น ผลดังตาราง 14 และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า ณ จุดเริ่มต้น ตั้งแต่ -2.1 mV ถึง -9.7 mV ผลดังตาราง 15 ดังนั้นใช้น้ำมัน sunflower oil อาจไม่เหมาะสมสำหรับการเตรียมนานอิมัลชันด้วยเทคนิคใช้พลังงานต่ำ อย่างไรก็ตามหากทำการเตรียมโดยเทคนิคใช้พลังงานสูง ในสัดส่วนที่เกิดอิมัลชันนี้ อาจจะทำให้ได้อิมัลชันที่เตรียมได้มีขนาดอนุภาคภายในเล็ก และมีความคงสภาพมากขึ้น

ตาราง 14 ขนาดอนุภาคของตำรับอิมัลชันที่เตรียมจากSO

สูตร SO	Initial		Stability 30 Days (30°C)		Stability 30 Days (45°C)	
	Size(nm)	PDI	Size(nm)	PDI	Size(nm)	PDI
	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)
SO 8	1479.9±3.1	0.34±0.1	-	-	-	-
SO	489.9±1.4	0.32±0.4	-	-	-	-
SO	353.5±1.7	0.35±0.7	-	-	-	-
SO	579.7±2.1	0.21±0.1	-	-	-	-
SO	1199.6±1.3	0.35±0.3	-	-	-	-

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง(-) product มีการแยกชั้น ไม่ได้ทำการวัด

ตาราง 15 Zeta potential จากตำรับที่เตรียมจากSO

สูตร SO	Zeta potential (Mean±SD)		
	Initial	Stability 30 Days (30°C)	Stability 30 Days (45°C)
SO 8	-5.8±1.8	-	-
SO 15	-8.9±0.7	-	-
SO 21	-9.7±2.1	-	-
SO 26	-2.7±1.6	-	-
SO 30	-2.1±1.9	-	-

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง (-) product มีการแยกชั้น ไม่ได้ทำการวัด

จากผลการศึกษาเตรียมอิมัลชันจากน้ำมันทั้ง 3 ชนิด ด้วยเทคนิคการใช้พลังงานต่ำ (PIC) พบว่าอิมัลชันมีความหนืดต่ำที่เตรียมจาก CT และ IPM มีสัดส่วนของน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และน้ำที่พอเหมาะ ที่จะเกิดอิมัลชันที่มีอนุภาคภายในที่ต่ำกว่า 300 นาโนเมตร และคงสภาพที่สภาวะอุณหภูมิ 30°C และ 45°C นาน 30 วัน ส่วนอิมัลชันที่เตรียมจาก SO นั้น พบว่าอิมัลชันที่

เกิดขึ้นมีอนุภาคภายในที่ใหญ่กว่าน้ำมันทั้ง 2 ชนิดข้างต้น และไม่คงสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Debnath และคณะ⁽¹²⁾ ที่ทำการพัฒนายาเป็น lipophilic drugs ในรูปแบบนาโนอิมัลชัน ด้วยเทคนิคการใช้พลังงานต่ำ (PIC) พบว่าวัฏภาคน้ำมันกลุ่มไตรกลีเซอไรด์ สามารถทำให้เกิดระบบนาโนอิมัลชันได้ และสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Wooster และคณะ⁽¹⁸⁾ ซึ่งทำการศึกษากลไกของชนิดน้ำมันที่มีต่อการเกิดระบบนาโนอิมัลชัน พบว่าการเตรียมจากน้ำมันที่มีความหนืดสูงจะให้หยดอนุภาคนาโนที่ใหญ่กว่าการเตรียมจากน้ำมันที่มีความหนืดต่ำ ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่า น้ำมัน CT เป็น medium chain triglyceride สามารถเตรียมนาโนอิมัลชันได้ ส่วนน้ำมัน SO ที่เป็น long chain triglyceride ไม่สามารถเตรียมได้ด้วยเทคนิคการใช้พลังงานต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่เตรียมด้วยน้ำมัน SO มีความหนืดสูงจึงทำให้ได้อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าอิมัลชันที่เตรียมจากน้ำมันอีก 2 ชนิดที่มีความหนืดต่ำกว่า

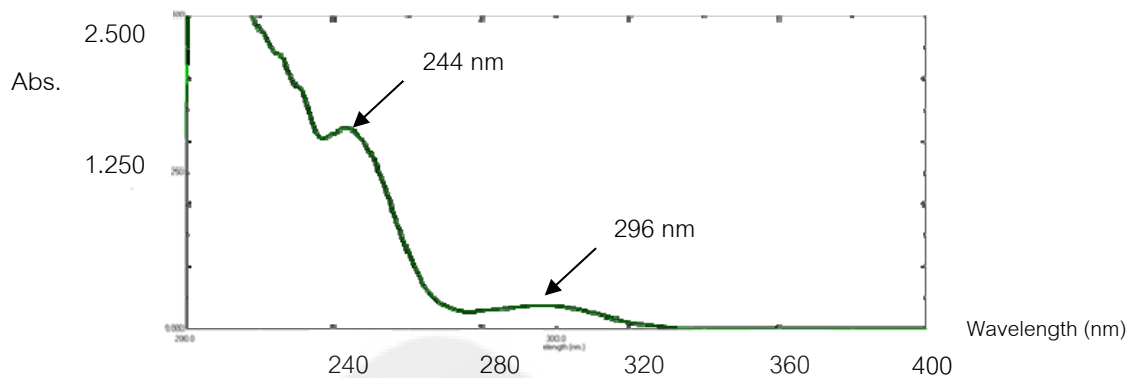
จากการศึกษาเตรียมนาโนอิมัลชันรูปแบบ O/W โดยใช้พลังงานต่ำ ด้วยเทคนิคการกลับวัฏภาคโดยสัดส่วน (PIC) ซึ่งมีการใส่สารลดแรงตึงผิวทั้งหมดในวัฏภาคน้ำมัน และค่อย ๆ เติมวัฏภาคน้ำลงไป โดยเมื่อสัดส่วนปริมาตรของน้ำเพิ่มมากขึ้นจนถึงจุดใกล้กลับวัฏภาค พบว่าอิมัลชันมีความหนืดสูงสุด และเมื่อเกิดการกลับวัฏภาคแล้วพบว่าอิมัลชันมีความหนืดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับหลักการกลับวัฏภาค ที่ว่าเมื่อมีการเติมวัฏภาคภายนอกลงไปค่า phase volume (ϕ) หรือสัดส่วนโดยปริมาตรของวัฏภาคภายใน จะพบว่าเมื่อ ϕ เพิ่มขึ้น ความหนืดของอิมัลชันจะเพิ่มมากขึ้นจนถึงค่าหนึ่ง จะเกิดการกลับวัฏภาค และทำให้ความหนืดของอิมัลชันลดลงทันทีทันใด⁽¹⁹⁾ โดยแรงตึงระหว่างผิวประจันสูง ทำให้สารลดแรงตึงผิวห่อหุ้มรอบหยด เกิดเป็นอนุภาคภายในที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตรได้

4.2 การวิเคราะห์ยา คีโตโคนาโซล

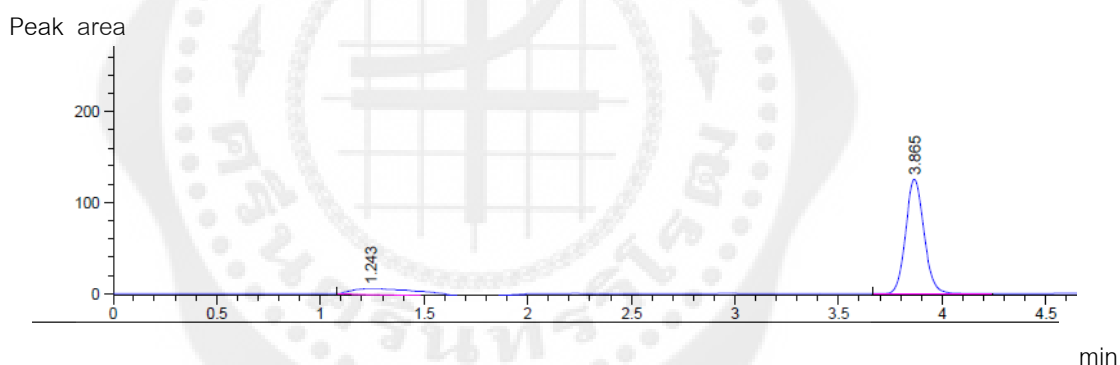
4.2.1 สภาวะในการวิเคราะห์ยา คีโตโคนาโซล

จากการศึกษาการดูดกลืนแสงของยา คีโตโคนาโซล ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-400 nm ด้วยเทคนิค spectrophotometry โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน คีโตโคนาโซล ในเมทานอลที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า คีโตโคนาโซล มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 244 nm และ 296 nm ซึ่งในการวิเคราะห์เลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 244 nm เนื่องจากที่ความยาวคลื่นนี้ มีความไว (sensitivity) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Popovska และคณะ⁽³³⁾ สเปกตรัมแสดงดังภาพประกอบ 5 และจากการวิเคราะห์ คีโตโคนาโซล ด้วยเทคนิค HPLC Column C18 ขนาด 150 mm และใช้เฟสเคลื่อนที่ acetonitrile (60% v/v) : 0.5% triethylamine in water (40% v/v) (pH 7.0) ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอ

ริก อัตราเร็ว 1.0 ml/min ปริมาณตัวอย่างฉีด 10 μ l ทดสอบที่ความยาวคลื่น 244 nm พบว่าคีโตโคนาโซลมี retention time (Rt) เท่ากับ 3.8 min โครมาโตแกรมแสดงดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 5 UV สเปกตรัมของยาคีโตโคนาโซลในเมทานอล (50 μ g/ml) ช่วงความยาวคลื่น 200-400 nm



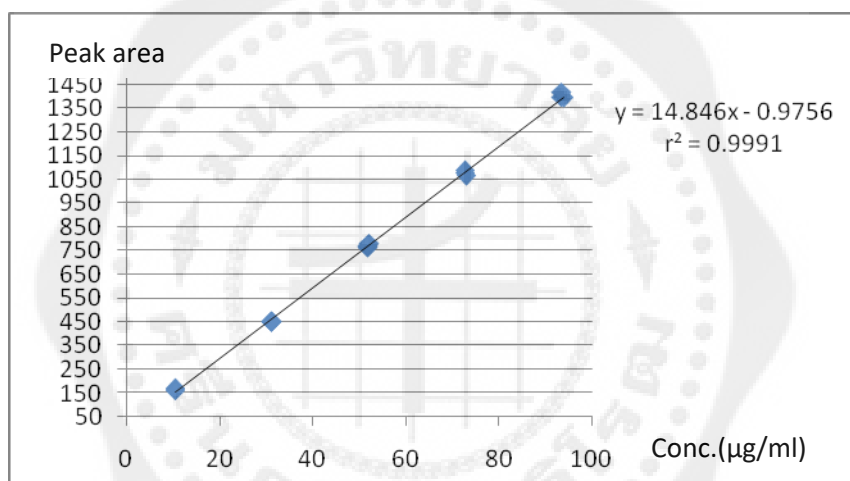
ภาพประกอบ 6 โครมาโตแกรม HPLC ของยาคีโตโคนาโซล (50 μ g/ml) ที่ความยาวคลื่น 244 nm

4.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

ในการศึกษามีการเตรียมสารละลายมาตรฐานซ้ำ 3 ชุดและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้ผลการวิเคราะห์ แสดงในตาราง 16 เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างกราฟมาตรฐานได้สมการเส้นตรง คือ $Y = 14.846X - 0.9756$, $r^2 = 0.9991$ แสดงดังภาพประกอบ 7

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานคิโตโคนาโซลในเมทานอลด้วยเทคนิค HPLC

Conc. (µg/ml)	Conc. ที่เตรียมได้ (µg/ml)			Peak area		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
10	10.40	10.44	10.39	170.91	166.19	162.28
30	31.20	31.32	31.17	448.83	451.22	451.39
50	52.00	52.20	51.95	761.93	781.62	769.53
70	72.80	73.08	72.73	1074.74	1065.70	1087.94
90	93.60	93.96	93.51	1397.54	1392.93	1417.56

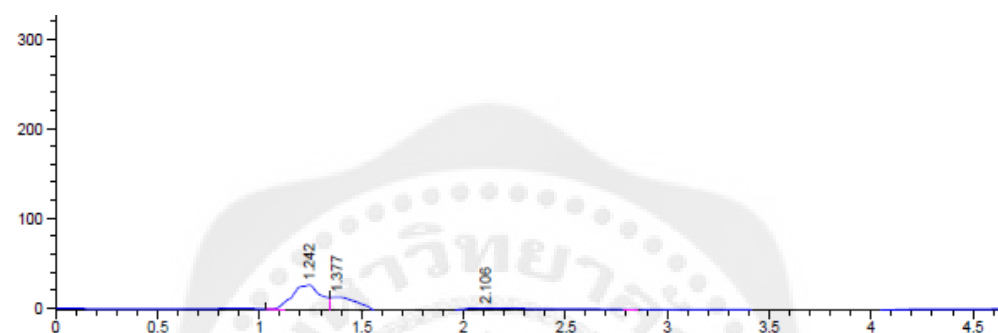


ภาพประกอบ 7 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคิโตโคนาโซลในเมทานอล

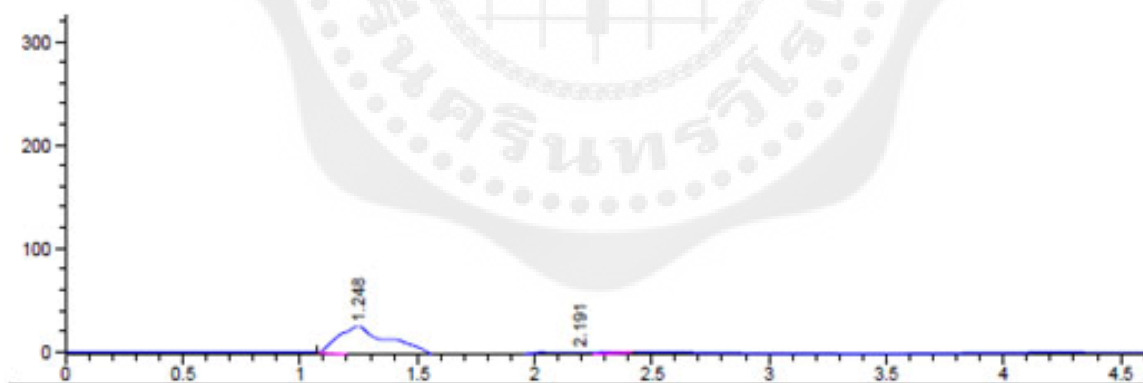
จากข้อกำหนดในเภสัชตำรับ (BP 2015)⁽¹⁴⁾ มีเกณฑ์การประเมินวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อ linearity โดยค่า r ควรมีค่ามากกว่า 0.99 เพื่อแสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของค่า peak area (แกน y) และค่าความเข้มข้นของยา คิโตโคนาโซล (แกน x) ซึ่งจากการเตรียมกราฟมาตรฐาน พบว่า ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่มี $r = 0.9995$ ซึ่งมากกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นจึงสามารถนำสมการนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคิโตโคนาโซลในตัวอย่างได้

4.2.3 การทดสอบความเฉพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Method selectivity)

การศึกษามลการรบกวนของน้ำมันต่อการวิเคราะห์ยาตีโตโคนาโซลโดยเทคนิค HPLC พบว่า CT และ IPM ไม่มี peak ปรากฏที่ retention time เดียวกันหรือใกล้เคียงกับของยาตีโตโคนาโซล ($R_t = 3.8$ min) โครมาโตแกรมของน้ำมันทั้ง 2 ชนิด แสดงดังภาพประกอบ 8 และ 9 ตามลำดับ ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณยาตีโตโคนาโซลจะไม่ถูกรบกวนจากน้ำมันที่อยู่ในตำรับ จึงสามารถวิเคราะห์ปริมาณยาด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีในข้อ 3.4.2.2 ได้



ภาพประกอบ 8 โครมาโตแกรม HPLC ของ Caprylic/Capric triglyceride ในเมทานอล



ภาพประกอบ 9 โครมาโตแกรม HPLC ของ Isopropyl myristate ในเมทานอล

4.2.4 ค่าการละลายของยาตีโตโคนาโซลในน้ำมัน

4.2.4.1 น้ำมัน caprylic/capric triglyceride (CT)

จากการวิเคราะห์ พบว่าค่าการละลายของยาตีโตโคนาโซลในน้ำมัน CT มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.62 ± 0.07 mg/ml ดังแสดงในตาราง 17

ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและค่าการละลายของคีโตโคนาโซลในน้ำมัน CT

Flask No.	Peak area			Peak area Mean $\pm$ SD	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Solubility (mg/ml)
	Sample 1	Sample 2	Sample 3			
1	1109.16	1074.08	1242.71	1141.98 $\pm$ 8.89	76.99	1.54
2	1249.72	1444.62	1484.47	1392.93 $\pm$ 12.56	93.89	1.88
3	1106.30	1241.71	1273.51	1207.17 $\pm$ 8.80	81.38	1.63
Mean $\pm$ SD						1.62 $\pm$ 0.07

4.2.4.2 น้ำมัน Isopropyl myristate (IPM)

จากการวิเคราะห์ พบว่าค่าการละลายของยาคีโตโคนาโซลในน้ำมัน IPM มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.31 ± 0.04 mg/ml ดังแสดงในตาราง 18

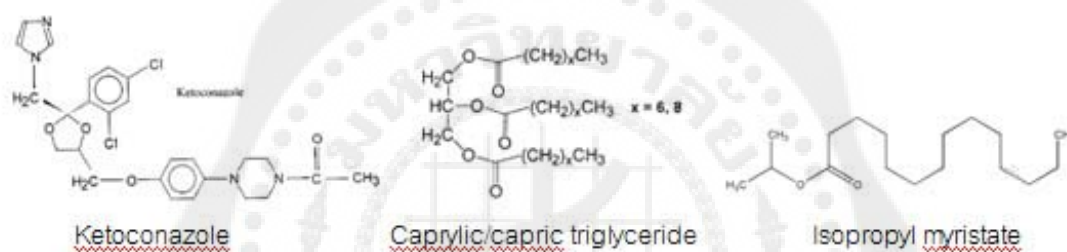
ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและค่าการละลายของคีโตโคนาโซลในน้ำมัน IPM

Flask No.	Peak area			Peak area Mean $\pm$ SD	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Solubility (mg/ml)
	Sample 1	Sample 2	Sample 3			
1	456.48	479.02	453.58	463.02 $\pm$ 13.93	31.25	0.31
2	462.73	445.98	450.64	453.11 $\pm$ 8.64	30.59	0.31
3	470.38	446.83	447.67	454.96 $\pm$ 13.36	30.71	0.31
Mean $\pm$ SD						0.31 $\pm$ 0.04

วิธีการทดลองตามข้อ 3.4.2.5 ที่ใช้ในการศึกษานี้ดัดแปลงจากวิธีของ Chunhan และคณะ.(2013)⁽⁴³⁾ ที่ทำการทดลองหาค่าการละลายของคีโตโคนาโซลในน้ำมัน IPM ที่ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ค่าการละลาย เท่ากับ 6 mg/ml แต่ในงานวิจัยนี้ทำการหาค่าการละลายของยาคีโตโคนาโซล ที่ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ายามีค่าการละลายต่ำกว่ามาก เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการละลายของสารได้ อย่างไรก็ตามการเตรียมอิมัลชันในงานวิจัยนี้ไม่มีการใช้ความร้อนเหมือนการเตรียมอิมัลชันทั่วไป ดังนั้นจึงทดสอบค่าการละลายที่ 30°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิห้อง เพื่อให้ข้อมูลที่ได้

ใกล้เคียงกับความเป็นจริงสำหรับการเตรียมตำรับ ทั้งนี้ไม่พบรายงานการทดลองหาค่าการละลายของยาคีโตโคนาโซลในน้ำมัน CT

จากผลการทดลองพบว่าคีโตโคนาโซลมีค่าการละลายในน้ำมัน CT มากกว่าในน้ำมัน IPM ซึ่งสอดคล้องกับค่า partition coefficient(log P) ที่เป็นค่าแสดงความชอบไขมันของสาร เนื่องจากยาคีโตโคนาโซลซึ่งมีค่า log P เท่ากับ 4.35 มีทั้ง functional group ที่มีขั้วและไม่มีขั้วในโครงสร้างทางเคมี และ CT เป็น medium chain triglyceride มีค่า log P เท่ากับ 3.96 ส่วน IPM เป็น long chain fatty acid ester มีค่า log P เท่ากับ 7.17 ดังแสดงในภาพประกอบ 10^(34,44,45.) จะเห็นว่าคีโตโคนาโซลและน้ำมัน CT มีค่า Log P ใกล้เคียงกันมากกว่านั้นคือมีความชอบไขมันใกล้เคียงกันมากกว่า จึงทำให้ยาคีโตโคนาโซลสามารถละลายในน้ำมัน CT ได้มากกว่าในน้ำมัน IPM



ภาพประกอบ 10 โครงสร้างทางเคมีของยาคีโตโคนาโซล และน้ำมัน

4.3 การเตรียมคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

จากผลการศึกษาความคงสภาพของนาโนอิมัลชัน และค่าการละลายของยาคีโตโคนาโซลในน้ำมันรวมทั้งสัดส่วนของน้ำมันที่สูงและใช้สารลดแรงตึงผิวในปริมาณน้อย จึงทำให้สูตร 26 ของน้ำมัน CT ซึ่งมีสัดส่วนของ oil:surfactant:water เป็น 40:10:50 ถูกเลือกมาใช้ในการพัฒนาตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

4.3.1 ปริมาณยาที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

เมื่อเตรียมตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน โดยใช้สูตรที่ 26 ของ CT ตามวิธี 3.4.3.1.1 โดยให้มีตัวยา 0.5% และ 1.0% w/w พบว่าอิมัลชันมีสีขาวขุ่น ความหนืดต่ำ มีค่า pH ประมาณ 6 มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 200 nm และมีค่า zeta potential อยู่ในช่วง -25 mV ถึง -29 mV ผลดังในตาราง 19 - 20 แต่จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (1000x) พบว่าปรากฏผลึกยาที่ละลายไม่หมดอย่างชัดเจนในตำรับ 1.0 % ในขณะที่ไม่ปรากฏผลึกยาดังกล่าวในตำรับ 0.5% ดังภาพประกอบ 11

ตาราง 19 ลักษณะทางกายภาพของตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ณ จุดเริ่มต้น

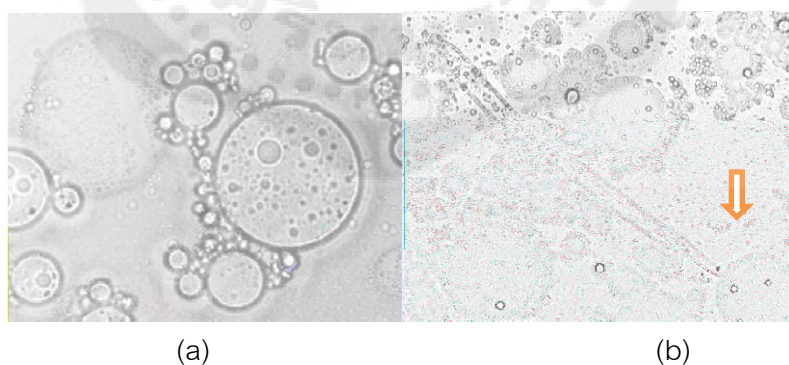
ตำรับ	ลักษณะทางกายภาพ			
	สี / ความใส	ความหนืด	pH	การเกิดอิมัลชัน
0.5%	สีขาวขุ่น	++	5.94	+
1.0%	สีขาวขุ่น	++	5.99	+

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

ตาราง 20 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ณ จุดเริ่มต้น

ตำรับยา	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
0.5%	185.2 $\pm$ 8.1	0.34 $\pm$ 0.1	-27.5 $\pm$ 4.4
1.0%	191.4 $\pm$ 7.3	0.33 $\pm$ 0.0	-28.9 $\pm$ 6.1

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง



ภาพประกอบ 11 ตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันเมื่อดูด้วยกล้อง Optical Microscope (1000x)

(a) ตำรับ 0.5% (b) ตำรับ 1.0% ; ลูกศรชี้ตำแหน่งผลึกยา (↓)

จากผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับคิโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน 0.5% และ 1.0% w/w ที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าตำรับ 0.5% ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีและอนุภาคภายในมีขนาดเล็กกว่า 300 nm ส่วนในตำรับ 1.0 % มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวอมชมพูอ่อน ที่ 30°C มีสีขาวอมชมพูชัดเจนที่ 45°C พบตะกอนที่ก้นหลอด เกิด creaming บนผิวหน้าของอิมัลชันและมีขนาดอนุภาคภายในใหญ่ขึ้น ผลดังในตาราง 21-22

ตาราง 21 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ KNE ที่ 30°C เป็นเวลา 30 วัน

ตำรับยา	ลักษณะทางกายภาพ				ตะกอน
	สี / ความใส	ความหนืด	pH	การเกิดอิมัลชัน	ก้นหลอด
0.5%	ขาวขุ่น	++	5.94	+	ไม่มี
1.0%	ขาวอมชมพูอ่อน	++	5.99	+	มี

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

ตาราง 22 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ KNE ที่ 45°C เป็นเวลา 30 วัน

ตำรับยา	ลักษณะทางกายภาพ				ตะกอน
	สี / ความใส	ความหนืด	pH	การเกิดอิมัลชัน	ก้นหลอด
0.5%	สีขาวขุ่น	++	5.91	+	ไม่มี
1.0%	ขาวอมชมพูอ่อน	++	5.96	+	มี

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

ส่วนการศึกษาความคงสภาพของอนุภาคภายใน ของตำรับ 0.5% และ 1.0% ที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอิมัลชันที่เตรียมอ้างอิงวิธีข้อ 3.4.3.1.1 มีอนุภาคภายในขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย แต่ยังมีขนาดเล็กกว่า 300 nm มีค่า PDI อยู่ในช่วง 0.32-0.36 ส่วนค่า zeta potential อยู่ในช่วง -22.5 mV ถึง -24.6 mV ผลดังในตาราง 23 – 24

ตาราง 23 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับ KNE ที่ 30°C เป็นเวลา 30 วัน

ตำรับยา	Size (nm) Mean $\pm$ SD	PDI Mean $\pm$ SD	Zeta potential (mV) Mean $\pm$ SD
0.5%	215.2 $\pm$ 8.1	0.32 $\pm$ 0.05	-24.6 $\pm$ 2.4
1.0%	231.4 $\pm$ 7.3	0.35 $\pm$ 0.01	-22.9 $\pm$ 1.1

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

ตาราง 24 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับ KNE ที่ 45°C เป็นเวลา 30 วัน

ตำรับยา	Size (nm) Mean $\pm$ SD	PDI Mean $\pm$ SD	Zeta potential (mV) Mean $\pm$ SD
0.5%	220.0 $\pm$ 4.0	0.33 $\pm$ 0.02	-23.4 $\pm$ 1.7
1.0%	245.3 $\pm$ 5.2	0.38 $\pm$ 0.04	-22.5 $\pm$ 1.1

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง

จากผลงานวิจัยของ Skiba และคณะ (2000)⁽¹³⁾ ที่ทำการประเมินความคงสภาพของยา คีโตโคนาโซล ใน aqueous formulations พบว่ายาเสื่อมสลายโดยปฏิกิริยา hydrolysis ใน aqueous solution ที่ pH 1-4 และ pH มากกว่า 6 และจากงานวิจัยของ Rajendra and Shirish (2011)⁽⁴⁶⁾ พบว่า คีโตโคนาโซล สามารถเสื่อมสลายโดยปฏิกิริยา oxidation และ hydrolysis ทำให้ยา มีโครงสร้างทางเคมีเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งตำรับ 1.0% ไม่คงสภาพเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวอมชมพู ที่ 30 วัน อาจเนื่องจากการเกิดการเสื่อมสลายโดยปฏิกิริยา hydrolysis ในสภาวะ aqueous solution

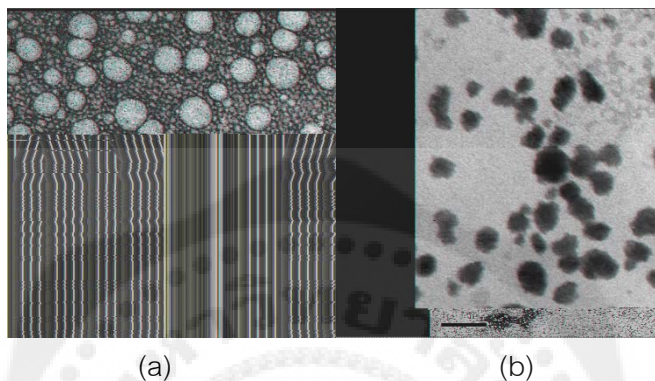
จากผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับ 0.5% KNE สามารถเตรียมได้ด้วยวิธี PIC ที่ให้อิมัลชันที่มีอนุภาคภายในขนาดเล็กกว่า 300 nm และอิมัลชันคงสภาพทางกายภาพไม่น้อยกว่า 30 วัน ที่ 30°C และ 45°C แต่ตำรับ 1.0% KNE พบผลึกยาที่ละลายไม่หมด เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเมื่อเก็บไว้ 30 วัน ที่ 30°C และ 45°C มีขนาดอนุภาคภายในใหญ่ขึ้น มีสีชมพูเข้มขึ้น ดังนั้นตำรับ 0.5% w/w จึงมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาต่อไป

4.3.2 การประเมินลักษณะของอนุภาค

จากการตรวจสอบลักษณะของอนุภาคภายใต้กล้อง Transmission Electron Microscopic (TEM) พบว่าในตัวอย่างยาพื้นนาโนอิมัลชัน (NE) มีอนุภาครูปวงกลม สีขาว

ขนาดเล็กกว่า 200 nm ดังภาพประกอบ 12 (a) และมีการกระจายของขนาดอนุภาคภายในที่แคบ ส่วนในตัวอย่างตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน(KNE)มีอนุภาคภายในรูปร่างกลมมีสีดำ ขนาดเล็กกว่า 200 nm ดังภาพประกอบ 12 (b)

ขนาดอนุภาคที่ได้จาก TEM และการวัดด้วยหลักการ dynamic light scattering มีความใกล้เคียงกันจึงเชื่อมั่นได้ว่าตำรับ 0.5% KNE มีขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร



ภาพประกอบ 12 ลักษณะของอนุภาคภายใต้กล้อง TEM (29000x)

(— มุมล่างด้านซ้ายของรูป ขนาด 100 nm)

(a) ตำรับยาพืชนาโนอิมัลชัน (b) ตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

ในการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการ และการศึกษาความคงสภาพทางเคมีของตำรับจะเป็นการศึกษาตำรับ 0.5% KNE ต่อไป

4.4 การสกัดยาจากตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

4.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดคีโตโคนาโซลจากตำรับ 0.5%KNE

4.4.1.1 ผลของปริมาณตัวอย่างที่สกัด

เมื่อนำตัวอย่างตำรับ 0.5% KNE จำนวน 4 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอลเป็นเวลานาน 30 นาที ด้วยเครื่อง sonicator อ้างอิงวิธีจากงานวิจัยของ Low and Wangboonskul (1999)⁽³⁴⁾ โดยใช้จำนวนตัวอย่าง 2 กรัม และ 4 กรัมแล้ววิเคราะห์ปริมาณยาที่สกัดได้โดยเทคนิค HPLC พบว่าการสกัดจากตัวอย่าง 4 กรัมมีค่า% recovery น้อยกว่าการสกัดจากตัวอย่าง 2 กรัม โดย % recovery เฉลี่ยของการสกัดจากตัวอย่าง 4 กรัม และ 2 กรัม เท่ากับ $59.76\% \pm 1.58$ และ $75.89\% \pm 5.34$ ตามลำดับผลดังในตาราง 25

ตาราง 25 เปรียบเทียบ % recovery ของการสกัดจากตัวอย่าง 4 กรัมและ 2 กรัม

No. Flask	ตัวอย่าง 4 กรัม		ตัวอย่าง 2 กรัม	
	(mg/100g)	% Recovery	(mg/100g)	% Recovery
1	291.75	58.35	369.65	73.93
2	307.35	61.47	409.70	81.94
3	297.40	59.48	359.10	71.82
Mean $\pm$ SD	59.76 $\pm$ 1.58		75.89 $\pm$ 5.34	

จากการศึกษาผลของปริมาณตัวอย่างที่ใช้สกัดพบว่าการลดปริมาณตัวอย่างจาก 4 กรัม เป็น 2 กรัม ทำให้ % recovery สูงขึ้น อาจเนื่องจากปริมาณตัวอย่างที่ลดลง เป็นผลให้ตัวทำละลายสกัดยาออกมาได้ดี ทำให้ยาสามารถละลายออกมาจากตำรับได้มากขึ้น ดังนั้นจึงได้ใช้ในการศึกษาผลของเทคนิคการสกัดต่อไป

4.4.1.2 ผลของเทคนิคการสกัด

เมื่อนำตัวอย่างตำรับ 0.5% KNE จำนวน 2 กรัม มาสกัดโดยใช้เมทานอล เป็นเวลานาน 30 นาที ด้วยเครื่อง sonicator เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยเครื่อง water bath shaker ตามวิธีในข้อ 3.4.4.1.2 และวิเคราะห์ปริมาณยาโคโคไนโซลโดยเทคนิค HPLC พบว่า % recoveryเฉลี่ยของเทคนิคที่สกัดด้วยเครื่อง sonicator และเครื่อง water bath shaker มีค่าเท่ากับ 75.89% $\pm$ 5.34 และ 71.44% $\pm$ 5.76 ตามลำดับผลดังในตาราง 26

ตาราง 26 เปรียบเทียบ % recovery ของเทคนิคการสกัดด้วย sonicator และ water bathshaker

No. Flask	Sonicator		Water bathshaker	
	(mg/100g)	% Recovery	(mg/100g)	% Recovery
1	369.65	73.93	323.90	64.80
2	409.70	81.94	375.85	75.17
3	359.10	71.82	371.70	74.34
Mean $\pm$ SD	75.89 $\pm$ 5.34		71.44 $\pm$ 5.76	

จากการศึกษาผลของเทคนิคการสกัดพบว่าเทคนิคการสกัดด้วยsonicator ให้ % recovery ของยาเคีโตโคนาโซลสูงกว่าเทคนิคที่สกัดด้วย water bath shaker อาจเนื่องจากการสกัดด้วย sonicator ใช้หลักการคลื่นเสียงความถี่สูง ซึ่งให้พลังงานสูงกว่า และสามารถทำให้เกิดการเคลื่อนที่ชนกันของสารได้ดีกว่าการสกัดด้วย water bath shaker ที่ใช้หลักการเขย่าด้วยแรงกลเท่านั้น ดังนั้นจึงทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดด้วย sonicator ดีกว่าการสกัดด้วย water bath shaker

4.4.1.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัด

เมื่อสกัดตัวอย่างตำรับ 0.5% KNE โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ด้วยเครื่อง sonicator ตามวิธีดังข้อ 3.4.4.1.3 พบว่าการสกัดเป็นเวลา 45 นาที ให้ค่าเฉลี่ยของ % recovery เท่ากับ $94.92\% \pm 0.39$ ส่วนการสกัดเป็นเวลา 30 นาที ให้ค่าเฉลี่ยของ % recovery เท่ากับ $75.89\% \pm 5.34$ ผลดังในตาราง 27

ตาราง 27 เปรียบเทียบ % recovery ของเทคนิคการสกัด sonicator เป็นเวลา 30 นาที และ 45 นาที

No. Flask	เวลา 30 นาที		เวลา 45 นาที	
	(mg/100g)	% Recovery	(mg/100g)	% Recovery
1	369.65	73.93	472.40	94.48
2	409.70	81.94	476.15	95.23
3	359.10	71.82	475.25	95.05
Mean $\pm$ SD	75.89 $\pm$ 5.34		94.92 $\pm$ 0.39	

จากการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด พบว่าการสกัดเป็นเวลา 45 นาที (ตามวิธีในข้อ 3.4.4.1.3) ให้ % recovery ของยาสูงกว่าการสกัดเป็นเวลา 30 นาที ซึ่งเป็นวิธีของ Low and Wongboonskul (1999)⁽³⁴⁾ อาจเนื่องจากยาเคีโตโคนาโซลสามารถละลายในเมทานอลได้ดี ดังนั้นการเพิ่มเวลาในการสกัด จึงให้ผลการสกัดดีขึ้นอย่างชัดเจน

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสกัดยาจากตำรับ สรุปได้ว่าวิธีที่ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษา คือการสกัดจากตัวอย่าง 2 กรัม โดยใช้เมทานอล ด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลา 45 นาที เนื่องจากให้ค่า % recovery ของยาเคีโตโคนาโซลมากที่สุด และใช้วิธีนี้ในการศึกษาต่อไป

4.5 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อราของคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

4.5.1 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *C. albicans*

จากการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านเชื้อของตัวอย่าง 0.5% w/w KNE และ ผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด 2.0% Cream™ พบว่าคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันทำให้เกิดโซนยับยั้งเชื้อ กว้างกว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดโดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 22.5 ± 0.5 mm ผลดังในตาราง 28 และภาพประกอบ 13 จากผลการทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *C. albicans* พบว่า NE ไม่เกิดโซนยับยั้งเชื้อ ส่วนตัวอย่างทดสอบ 0.5% KNE, 0.5% diluted Cream™ และ 2.0% Cream™ พบโซนยับยั้งเชื้อมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 22.5 ± 0.5 mm, 14.0 ± 0.5 mm และ 10.5 ± 0.5 mm ตามลำดับ และเมื่อทดสอบข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อด้วยสถิติ T-test พบว่าตำรับ 0.5% KNE สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ได้ดีกว่าตำรับ 2% Cream™ และ ตำรับครีมที่เจอจางให้มีความเข้มข้น 0.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตาราง 28 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ *C. albicans*

Inhibition zone diameter (mm)				
Plate No.	Nanoemulsion Base	0.5% KNE	0.5% (diluted cream™)	2.0% cream™
1	0	22.5	14.0	11.0
2	0	23.0	13.5	10.5
3	0	22.0	14.5	10.0
Mean.± SD	0 ± 0.0	22.5 ± 0.5	14.0 ± 0.5	10.5 ± 0.5



ภาพประกอบ 13 โซนยับยั้งเชื้อ *C. albicans*

(ก) ตำรับยาพื้นนาโนอิมัลชัน (NE Base), (ข) 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน (KNE),

(ค) 0.5% diluted Cream™ และ (ง) 2.0% Cream™

4.5.2 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *T. mentagrophytes*

จากการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของตัวอย่าง 0.5% KNE และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด 2.0% CreamTM พบว่าคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันทำให้เกิดโซนยับยั้งเชื้อ ที่มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเชื้อมากกว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด ผลดังในตาราง 29 และภาพประกอบ 14 ผลการทดสอบตัวอย่าง ยาพื้นนาโนอิมัลชัน, 0.5% KNE, 0.5% diluted CreamTM และ 2.0% CreamTM พบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อราในตำรับ เท่ากับ 11.5 ± 1.0 mm, 42.66 ± 1.61 mm, 28.66 ± 0.29 mm และ 29.0 ± 0.5 mm ตามลำดับ และเมื่อทดสอบข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อด้วยโปรแกรมสถิติ T-test พบว่าตำรับยา 0.5% KNE ยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* ได้ดีกว่า 2.0% ครีมในท้องตลาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าในตัวอย่างยาพื้นนาโนอิมัลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าตำรับ 0.5% KNE สามารถยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* ได้ดีกว่าตำรับ 2% CreamTM ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 0.5 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตาราง 29 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ *T. mentagrophytes*

Plate no.	Inhibition zone diameter (mm)			
	Nanoemulsion Base	0.5% KNE	0.5% (Diluted) cream	2.0% Cream TM
1	12.5	42.0	28.5	29.0
2	11.5	41.5	29.0	29.5
3	10.5	44.5	28.5	28.5
Ave. $\pm$ SD	11.5 ± 1.00	42.66 ± 1.61	28.66 ± 0.29	29.0 ± 0.50



ภาพประกอบ 14 โซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes*

(ก) ตำรับยาพื้นนาโนอิมัลชัน (NE), (ข) 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน (KNE),

(ค) 0.5% diluted CreamTM และ (ง) 2.0% CreamTM

Carolina และคณะ (2011)⁽⁴⁷⁾ พบว่าสารประเภทfatty acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Trichophyton sp.* ได้ ซึ่งในตัวอย่างยาพื้นนาโนอิมัลชันมีส่วนประกอบของน้ำมัน caprylic/capric triglyceride ที่มีfatty acid จึงทำให้พบโซนการยับยั้งเชื้อ *T. mentagrophytes* ได้

จากผลการทดสอบที่แสดงว่าตัวอย่าง 0.5% KNE มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C.albicans* และ *T. mentagrophytes* มากกว่าตัวอย่าง 0.5% diluted creamTM และ 2.0% creamTM อาจเนื่องมาจากตัวอย่างทดสอบเป็นอิมัลชันที่มีลักษณะทางกายภาพเป็นโลชั่น มียาละลายอยู่ในหยดน้ำมันที่มีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรที่กระจายตัวอยู่ในวัฏภาคน้ำ มีความหนืดต่ำ และแผ่กระจายได้ดี อาจทำให้สัมผัสกับผนังเซลล์ของเชื้อได้ดี จึงทำให้มีการปลดปล่อยตัวยาออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

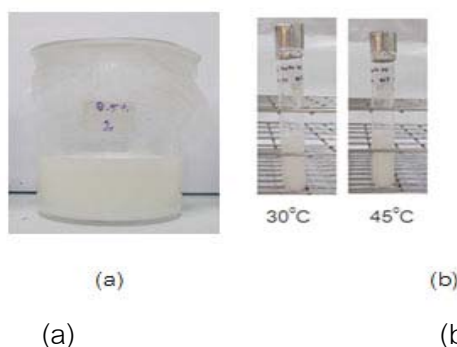
4.6 ความคงสภาพของตำรับคีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

4.6.1 ความคงสภาพทางกายภาพ

ตำรับ 0.5% KNE ที่เตรียมขึ้น มีลักษณะเป็นอิมัลชันเหลว สีขาวขุ่น มีค่า pH ประมาณ 6.2 และเมื่อเก็บตัวอย่างที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าตำรับมีความคงสภาพ โดยพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพ ความหนืด สี และ pH ผลดังในตาราง 30 และภาพประกอบ 15

ตาราง 30 บันทึกลักษณะทางกายภาพ การแยกชั้น ความหนืด และ pH ของตำรับ 0.5% KNE

ลักษณะ	เริ่มต้น (0 วัน)	30°C				45°C			
		7วัน	14วัน	21วัน	30วัน	7วัน	14วัน	21วัน	30วัน
สี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น
ความหนืด	++	++	++	++	++	++	++	++	++
อิมัลชัน	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH	6.24	6.21	6.23	6.27	6.28	6.30	6.23	6.27	6.20



ภาพประกอบ 15 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ 0.5% KNE

(a) ลักษณะเมื่อเตรียมเสร็จ (b) ความคงสภาพเมื่อเก็บที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน

4.6.2 ความคงสภาพขนาดอนุภาคภายใน และค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับ

ขนาดอนุภาคของตัวอย่างที่จุดเริ่มต้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 210.6 ± 1.2 nm และ เมื่อเก็บที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าขนาดอนุภาคมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 214.8 ± 1.1 nm และ 228.2 ± 1.2 nm ตามลำดับ ซึ่งขนาดอนุภาคเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ส่วนค่า PDI ณ จุดเริ่มต้นมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.23 และยังพบว่าอนุภาคภายในมีการกระจายตัวของขนาดไม่เปลี่ยนแปลง ผลดังภาพประกอบ 16 ส่วนค่า zeta potential เมื่อเก็บไว้นาน 30 วัน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง -21 mV ถึง -29 mV ซึ่งศักย์ไฟฟ้ายังปรากฏค่าที่ใกล้เคียง -30 mV ที่แสดงถึงค่าศักย์ไฟฟ้าที่จะส่งผลให้อิมัลชันมีความคงสภาพ ผลดังในตาราง 31 และภาพประกอบ 17

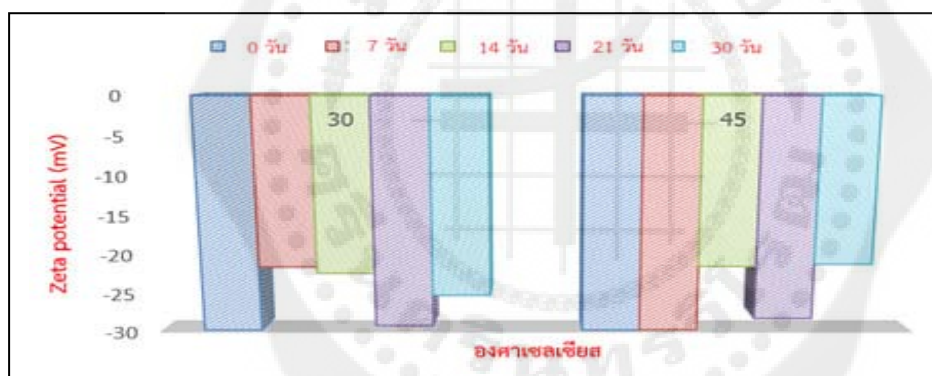
ตาราง 31 ขนาดอนุภาคภายใน และค่าศักย์ไฟฟ้าของตำรับ 0.5% KNE

Parameter	เริ่มต้น	7 วัน		14 วัน		21 วัน		30 วัน	
	(0 วัน)	30°C	45°C	30°C	45°C	30°C	45°C	30°C	45°C
Size (nm)	210.6	208.9	210.2	211.2	222.3	217.2	221.4	214.8	228.2
(Mean $\pm$ SD)	± 1.2	± 1.2	± 1.1	± 1.1	± 1.2	± 1.2	± 1.9	± 1.1	± 1.2
PDI	0.23	0.26	0.21	0.28	0.20	0.29	0.22	0.21	0.22
(Mean $\pm$ SD)	± 0.03	± 0.02	± 0.01	± 0.00	± 0.01	± 0.03	± 0.02	± 0.00	± 0.01
Zeta potential	-29.6	-21.4	-29.6	-22.2	-21.4	-29.1	-28.1	-25.1	-21.1
	± 1.1	± 1.1	± 1.1	± 1.5	± 1.4	± 1.0	± 1.7	± 1.4	± 1.6

หมายเหตุ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ตัวอย่าง



ภาพประกอบ 16 ขนาดอนุภาคของตำรับ 0.5% KNE
ที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน

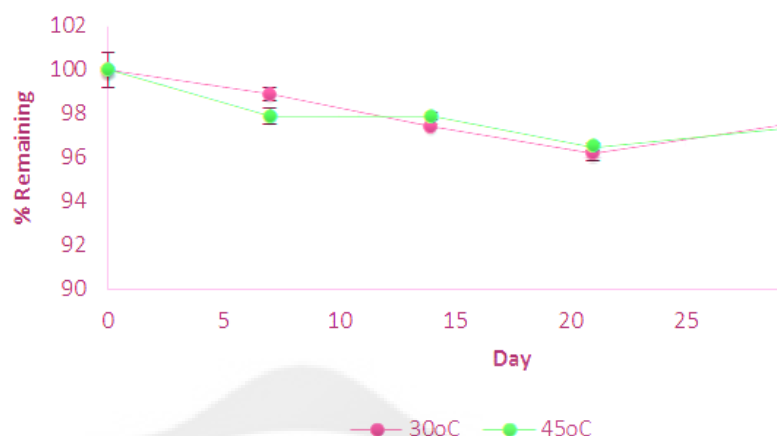


ภาพประกอบ 17 ค่าศักย์ไฟฟ้า (Zeta potential)
ของตำรับ 0.5% KNE ที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน

4.6.3 ความคงสภาพทางเคมี

ผลการศึกษาความคงสภาพทางเคมีของตำรับ 0.5% KNE พบว่าที่สภาวะ 30°C ที่เวลา 7, 14, 21, 30 วัน ตำรับมี % remaining คือ 98.9%, 97.4%, 96.2%, 97.6% ตามลำดับ และที่ 45°C มี % remaining เมื่อครบ 7, 14, 21, 30 วัน คือ 97.9%, 97.9%, 96.5%, 97.4% ตามลำดับ ผลดังภาพประกอบ 18 และในตาราง 32 ตำรับ 0.5% KNE มีความคงสภาพทางเคมีไม่น้อยกว่า 30 วัน พบว่าคิโตโคนาโซลในตำรับมี % remaining ที่มากกว่า 90% ทั้ง 2 สภาวะ คือ 30°C และ 45°C

ความคงสภาพทางเคมีของตำรับ 0.5 KNE



ภาพประกอบ 18 ปริมาณยาที่เหลืออยู่ (% remaining) ของตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ที่ 30 วัน ที่ 30°C และ 45°C

ตาราง 32 ความคงสภาพทางเคมีของตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน เป็นเวลา 30 วัน

ปริมาณยา	เริ่มต้น (0 วัน)	30°C				45°C			
		7	14	21	30	7	14	21	30
(mg/100g)	473.7	468.5	461.4	455.5	462.3	463.9	463.6	457.3	461.4
mean $\pm$ SD	± 0.8	± 0.3	± 0.1	± 0.4	± 0.1	± 0.4	± 0.2	± 0.2	± 0.5
% remaining	100	98.9	97.4	96.2	97.6	97.9	97.9	96.5	97.4
mean $\pm$ SD	± 0.8	± 0.3	± 0.1	± 0.3	± 0.0	± 0.4	± 0.1	± 0.1	± 0.5

เมื่อนำข้อมูล % remaining ของตำรับ 0.5% KNE ทดสอบโดยใช้สถิติ T-test พบว่าปริมาณยาคงเหลือที่ 30°C ที่ 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณยาเริ่มต้น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.096$) ส่วนที่ 45°C ที่ 7 วัน ปริมาณยาที่เหลืออยู่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.018$) และเมื่อเก็บตำรับที่ 14, 21, 30 วัน พบว่าปริมาณยาที่เหลืออยู่ที่ 30°C และ 45°C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบในตำรับที่ทำให้เกิดนาโนอิมัลชัน

จากการศึกษาน้ำมันทั้ง 3 ชนิด คือ CT, IPM และ SO พบว่าน้ำมัน CT, IPM สามารถเกิดอิมัลชันที่มีลักษณะเป็นอิมัลชันสีขาว เหลว มีขนาดอนุภาคที่ต่ำกว่า 300 นาโนเมตร และมีความคงสภาพได้นานกว่า 30 วัน โดยในน้ำมัน CT ใช้สัดส่วนของ oil phase 10-40% และ mixed emulsifiers 10-20% ส่วน IPM ใช้สัดส่วนของ oil phase 10-60% และ mixed emulsifiers 10-20% แต่ในขณะที่เตรียมโดยใช้น้ำมัน SO พบว่าเกิดอิมัลชันสีขาว เหลว มีขนาดอนุภาคตั้งแต่ 0.353 – 1.479 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าตำรับที่เตรียมจาก CT และ IPM และมีความคงสภาพน้อยกว่า 30 วัน

ในการศึกษาการเตรียมนาโนอิมัลชันโดยวิธีใช้พลังงานต่ำเทคนิคการกลับวัฏภาคโดยสัดส่วน (PIC) โดยใช้น้ำมัน CT หรือ IPM สามารถเกิดอิมัลชันที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร และมีความคงสภาพ ส่วนน้ำมัน SO หากมีการเตรียมนาโนอิมัลชันด้วยวิธีการใช้พลังงานสูงอาจจะทำให้ได้อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคภายในที่เล็กระดับนาโนเมตรและมีความคงสภาพมากขึ้นได้

5.2 การวิเคราะห์ยาเคีโตโคนาโซล

จากการศึกษาสภาวะการวิเคราะห์ยาเคีโตโคนาโซล ด้วยเทคนิค spectrophotometry พบว่ายาเคีโตโคนาโซลมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 244 nm และ 296 nm โดยความเข้มข้นของยาเคีโตโคนาโซลที่ 50 µg/ml มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 244nm สูงกว่าที่ 296 nm ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความไว (sensitivity) ในการดูดกลืนแสงที่ 244nm

ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณยาเคีโตโคนาโซลด้วยเทคนิค HPLC ใช้ HPLC column C 18 (150 mmx 4.6 mm) เฟสเคลื่อนที่สารละลายระหว่าง acetonitrile (60%v/v) : 0.5% triethylamine in water (40%v/v) (pH7.0) ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริก อัตราเร็ว 1.0 ml/min และปริมาณตัวอย่างฉีด 10 µl ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 244 nm พบว่าโครมาโตแกรมของยาเคีโตโคนาโซล มี Rt ที่ 3.8 นาที สามารถนำสภาวะนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาเคีโตโคนาโซลในตัวอย่างได้

ในการศึกษาความสามารถในการละลายของยาเคีโตโคนาโซลในน้ำมัน CT และ IPM ด้วยสภาวะการวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่าค่าการละลายของยาเคีโตโคนาโซลในน้ำมัน CT และ IPM คือ 1.62 ± 0.07 mg/ml และ 0.31 ± 0.04 mg/ml ตามลำดับ ดังนั้นจากผลของค่าการละลายและความสามารถในการเตรียมนาโนอิมัลชัน จึงพิจารณาเลือกน้ำมัน CT สูตรที่ 26 ซึ่งมีน้ำมันมากเพื่อให้

ยาละลายได้ มีสารลดแรงตึงผิวปริมาณน้อยเพื่อลดโอกาสของความเป็นพิษ ในสัดส่วนของ oil:surfactant:water คือ 40:10:50 ในการศึกษาการเตรียมตำรับ KNE

5.3 การเตรียมคิโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

การศึกษาค้นหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเตรียมได้ทำการทดลองเตรียมตำรับ KNE ที่ความเข้มข้น 0.5%, 1.0% ด้วยวิธีการลดขนาดผงยา คิโตโคนาโซล บั่นผสมในน้ำมัน CT นาน 5 นาที และใส่ Tween 80 และ Span 80 ผสมนาน 10 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำ นาน 3 นาที และบั่นผสมต่อ 10 นาที พบว่าอิมัลชันมีสีขาวขุ่น ความหนืดต่ำ ค่า pH ประมาณ 6 และมีขนาดอนุภาคขนาดต่ำกว่า 200 nm ค่า zeta potential อยู่ในช่วง -25 mV ถึง -29 mV เมื่อนำตัวอย่างส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 1000x เพื่อตรวจหาผลึกที่ละลายไม่หมด พบว่าตำรับที่ปริมาณยา 1.0% เห็นผลึกยาได้ชัดเจน ส่วนตำรับ 0.5% ไม่พบผลึกยา

จากผลการศึกษาคงสภาพของตำรับ 0.5% คิโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ที่ให้อิมัลชันที่มีอนุภาคภายในขนาดเล็กกว่า 300 nm และอิมัลชันคงสภาพไม่น้อยกว่า 30 วัน ส่วนในตำรับ 1.0% เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอิมัลชันไม่คงสภาพ สีเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวอมชมพูอ่อน และมีตะกอนที่ก้นหลอดทุกหลอด

ผลจากการวัดขนาดอนุภาคของตัวอย่าง 0.5% คิโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ด้วยเครื่อง zeta sizer พบขนาดอนุภาคภายในที่ใกล้เคียงกันเล็กกว่า 300 nm และเมื่อนำตัวอย่างดูลักษณะของอนุภาคเพื่อยืนยันผลด้วยเครื่อง TEM ปรากฏภาพอนุภาคภายในที่ขนาดเล็กกว่า 200 nm และไม่พบผลึกยาเช่นกัน

ดังนั้น 0.5% คิโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน ที่เตรียมได้มีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรส่งผลให้อิมัลชันมีความคงสภาพ ตัวยาละลายได้หมดในตำรับ และตำรับนี้เป็นนาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันกระจายในน้ำ (O/W)

5.4 การศึกษาวิธีการสกัดยาจากตำรับ 0.5% คิโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

ผลการศึกษาปัจจัยจากปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด พบว่าการใช้ตัวอย่างที่ปริมาณ 2 กรัมจะให้ค่า % recovery มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 75.89 ± 5.34 ซึ่งมากกว่าการใช้ปริมาณตัวอย่าง 4 กรัม ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 59.76 ± 1.58 ด้วยวิธีการสกัดเดียวกันคือ ใช้ตัวทำละลายเมทานอลและสกัดด้วยเครื่อง sonicator นาน 30 นาที

เปรียบเทียบเทคนิคการสกัดด้วย sonicator กับ water bath shaker ใช้ปริมาณตัวอย่าง 2 กรัม ด้วยเมทานอล พบว่าเทคนิคการสกัดด้วย sonicator ให้ % recovery ของยา คีโตโคนาโซล มากกว่าเทคนิคการสกัดด้วย water bath shaker อาจเนื่องจากการสกัดด้วยเครื่อง sonicator จะให้พลังงานที่เกิดขึ้นสูง สามารถทำให้เกิดการเคลื่อนที่ชนกันของสารได้ดีกว่าการสกัดด้วยเครื่อง water bath shaker ที่ใช้หลักการเขย่าด้วยแรงกลเท่านั้น

ผลการศึกษาปัจจัยจากเวลาในการสกัดด้วยเครื่อง sonicator ด้วยเมทานอล เป็นเวลา 30 นาที และ 45 นาที พบว่า % recovery ของยา คีโตโคนาโซล ที่สกัดได้ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 75.89 ± 5.34 และ 94.92 ± 0.39 ตามลำดับ ซึ่งพบว่า การเพิ่มเวลาในการสกัดทำให้สามารถสกัดยาออกจากตำรับได้มากขึ้น เทคนิคการสกัดด้วยเมทานอล บนเครื่อง sonicator เป็นเวลา 45 นาที ให้ค่า % recovery มากที่สุด ดังนั้นวิธีนี้จะใช้สำหรับการศึกษาดำรับ คีโตโคนาโซล ในอิมัลชันต่อไป

5.5 การศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อราของยา คีโตโคนาโซล ในอิมัลชัน

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในเชื้อ *C. albicans* นั้น พบว่า NE ไม่ปรากฏโซนยับยั้งเชื้อ ส่วนตัวอย่างทดสอบ 0.5% KNE, 0.5% diluted CreamTM และ 2.0% CreamTM พบโซนยับยั้งเชื้อ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 22.5 ± 0.5 mm, 14.0 ± 0.5 mm และ 10.5 ± 0.5 mm ตามลำดับ ซึ่งโซนยับยั้งเชื้อในตัวอย่าง 0.5% KNE กว้างกว่าในตัวอย่างครีมในท้องตลาดที่ 2.0% และครีมที่มีการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 0.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ส่วนผลการทดสอบประสิทธิภาพในเชื้อ *T. mentagrophytes* พบว่า NE, 0.5% KNE, 0.5% diluted CreamTM และ 2.0% CreamTM พบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อราในตำรับ เท่ากับ 11.5 ± 1.0 mm, 42.66 ± 1.61 mm, 28.66 ± 0.29 mm และ 29.0 ± 0.5 mm ตามลำดับ ซึ่ง จะพบว่าโซนยับยั้งเชื้อในตัวอย่าง 0.5% KNE กว้างกว่าในตัวอย่างครีมในท้องตลาดที่ 2.0% และครีมที่มีการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 0.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วน NE ปรากฏผลการยับยั้งเชื้อราได้ เนื่องจากมี caprylic/capric triglyceride ที่มีโครงสร้าง fatty acid ที่มีงานวิจัย Carolina และคณะ⁽⁴⁷⁾ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Trichophyton* sp. ได้แต่น้อยกว่าในตัวอย่าง 0.5% KNE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 2 เชื้อ พบว่าตัวอย่าง 0.5% คีโตโคนาโซล ในอิมัลชัน ปรากฏโซนยับยั้งเชื้อได้กว้างกว่าในตัวอย่างครีม 2% คีโตโคนาโซล ในท้องตลาด และครีมที่มีการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 0.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อาจเนื่องมาจากในตำรับที่พัฒนาขึ้นเป็นอิมัลชันชนิด oil in water ที่มีอนุภาคหยดน้ำมันที่มียาอยู่ขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร สามารถแผ่กระจายได้ดีกว่ารูปแบบอิมัลชันทั่วไป ที่มีขนาดอนุภาค

ภายในที่ใหญ่ จึงทำให้ตำรับที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้ง 2 เชื้อได้ดีกว่ารูปแบบครีมในท้องตลาด

5.6 การศึกษาความคงสภาพของตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน

จากผลการศึกษาความคงสภาพของตัวอย่างตำรับที่พัฒนาขึ้น ที่ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าตำรับมีความคงสภาพลักษณะทางกายภาพ ความหนืด สี pH ไม่เปลี่ยนแปลงส่วนความคงสภาพของขนาดอนุภาคภายในตัวอย่างที่สภาวะ 30°C พบว่ามีขนาดอนุภาคภายในเฉลี่ย ณ จุดเริ่มต้น และที่ 30 วัน เท่ากับ 210.6 ± 1.2 nm และ 214.8 ± 1.1 nm ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่ 45°C พบว่ามีขนาดอนุภาคภายในเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเก็บ เป็นเวลา 30 วัน โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 228.2 ± 1.2 nm

ส่วนผลการศึกษาความคงสภาพทางเคมีของตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าตำรับที่สภาวะ 30°C ณ เวลา 7, 14, 21, 30 วัน มี % remaining คือ 98.9%, 97.4%, 96.2%, 97.6% ตามลำดับ และที่สภาวะ 45°C มี % remaining ณ เวลา 7, 14, 21, 30 วัน คือ 97.9%, 97.9, 96.5%, 97.4% ตามลำดับ ดังนั้นตำรับ 0.5% คีโตโคนาโซลนาโนอิมัลชันจึงมีความคงสภาพทางเคมีไม่น้อยกว่า 30 วัน ในทั้งสองอุณหภูมิ เนื่องจากยังมีตัวยาปริมาณมากกว่า 90%

จากการศึกษาได้พัฒนาตำรับ 0.5% KNE ขึ้นด้วยเทคนิคการกลับวัฏภาคโดยสัดส่วน (PIC) อิมัลชันที่เตรียมได้มีขนาดอนุภาคภายในเล็กระดับนาโนเมตร และมีความคงสภาพทั้งทางกายภาพและทางเคมี นานกว่า 30 วัน ทั้งที่ 30°C และ 45°C รวมทั้งยังเป็นตำรับที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* และ *T. mentagrophytes*

ข้อเสนอแนะในการพัฒนาตำรับต่อไป ควรจะทำการทดสอบความคงสภาพในระยะเวลาที่นานขึ้น และทดสอบที่สภาวะอุณหภูมิ อ้างอิงใน ICH guideline รวมทั้งทำการทดสอบการปลดปล่อยยาจากตำรับ ทั้งในตำรับที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับตำรับ 2.0% CreamTM ในท้องตลาดเพื่อใช้เป็นผลเพิ่มเติมในการยืนยันถึงประสิทธิภาพที่เกิดขึ้น

การศึกษานี้มีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในแง่ของการใช้ปริมาณยาที่ลดลง ทำให้ต้นทุนต่ำลง ขั้นตอนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน อย่างไรก็ตามก็ตามความคงสภาพในระยะยาวและประสิทธิภาพในการใช้ในมนุษย์ยังต้องการศึกษาเพิ่มเติม

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

1. เมระนี เทียนประสิทธิ์.โรคเชื้อราที่ผิวหนัง.โครงการตำรา-ศิริราชคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 2527; 90-97.
2. รศ. ดร. วิจิตรา ทศนียกุล, ยารักษาโรคติดเชื้อรา (ANTIFUNGAL AGENTS)
E:\publication\v1-TEXTยารักษาโรคติดเชื้อรา.doc,2009; 1-12.
3. Gingor S, Erdal MS, Aksu B. New formulation strategies in topical antifungal therapy. Journal of Cosmetics Dermatological Sciences and Applications. 2013;3: 56-65.
4. Patel R, Patel H, Baria AH. Formulation and evaluation of liposomes of ketoconazole.International Journal of Drug Delivery Technology,2009;1:16-23.
5. Saratchandarn C, Shirwaikar A, Devi.AS, VipinkV. Comparative evaluation of sonicated and un-sonicated ethosomes containing ketoconazole. International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry.2012; 1:15-20.
6. Patel RR, Patel ZK, Patel KR, Patel DR. Formulation and evaluation of micro-emulsion based gel of ketoconazole. International Journal of Universal Pharmacy and Biology Science. 2014;3(2):93-111.
7. Paolicelli P. The system SLN-dextran hydrogel: an application for the topical delivery of ketoconazole. Journal Chemistry Pharmacy Research.2013;4: 410-421.
8. Patel HC, Parmar G, Seth AK, Patel JD, Patel SR. Formulation and evaluation of o/w nanoemulsion of ketoconazole. Pharma Science Monitor. 2013; 4: 338-351.
9. Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. Pharmacy Research. 2011; 28: 978–985.
10. ขวัญจิต อึ้งโพธิ์, อิมัลชันทางเภสัชกรรม, ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 2544; 12-26.
11. Sadurni N, Solans C, Azemar N, Garcia MJ. Studies on the formation of o/w nanoemulsions by low-energy emulsification methods suitable for pharmaceutical applications. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005; 26: 438-445.

12. Debnath S, Satayanarayana A, Kumar GV. Nanoemulsion: method to improve the solubility of lipophilic drugs. *International Journal of Advances In Pharmaceutical Sciences*. 2011; 2: 72-82.
13. Skiba M, Lahiani MS, Marchais H, Duclos R, Arnaud P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000; 198: 1-6.
14. British Pharmacopoeia, The Stationary Office, London. 2015; Volume IV: 1866-1867.
15. Luplertlop N, Suwanmanee S. Dermatophytosis: from bench to bedside. *Journal Tropical Medicine*. 2013; 36: 75-87.
16. Martin AG, Kobayashi GS. Superficial fungal infection: Dermatophytosis, Tineaungium, piedra. In: Freeberg IM, Eisen AZ, Fitzpatrick's dermatology in general medicine, New York, McGraw-Hill; 1999; 2: 2337-2357.
17. Tebaidi DC. Development of ketoconazole-based nanoemulsions stabilized by polymeric surfactant. XIV.SLAP/XII CIP, October 12-16th, 2014; 1-3.
18. Wooster J, Golding M, Sanguansri P. Impact of oil type on nanoemulsion formulation and ostwald ripening stability. *Langmuir* 2008; 24: 12758-12765.
19. ผศ.ดร.เกษร จันทรศิริ, อิมัลชันทางเภสัชกรรม, คณะเภสัชศาสตร์ โรงเรียนพณิชยการวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม. ปี 2549; 64-102.
20. พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ. อิมัลชันทางเครื่องสำอาง. โครงการตำรา งานส่งเสริมการวิจัยและตำรากองบริการการศึกษา สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2536; 32-98.
21. รศ.พรทิพย์ นิมมานนิตย์, Emulsion, เอกสารประกอบการสอนเภสัชผลิตภัณฑ์ 3 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2540; 71-87.
22. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. นานาเทคโนโลยี: การนำส่งยาและเครื่องสำอางทางผิวหนัง. กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด. 2552; 22-112.
23. Surti N, Upadhyay, Jaswandi U, Patel MA, Formulation and evaluation of micro-emulsion based hydrogel for topical delivery of ketoconazole, *Journal of Advance Pharmaceutical Research and Bioscience*. 2014; 2(2):16-29.
24. Mark R, Elias PM, Thomas J. Franz. skin barrier and transdermal drug delivery. *Medical Therapy Chapter*, 2012; 124: 2065-2070.

25. วรนันท์ รังสิมาวงศ์ และ ธนะเศรษฐ์ ง้าวหิรัญพัฒน์. นาโนอิมัลชันในระบบนำส่งยาผ่านทางผิวหนัง, TBPS 9(2): 2014; 46-61.
26. Eun-HeeKim, Wan-Goo Cho. Candelilla wax nanoemulsions prepared by phase inversion composition (PIC) method. Journal of Korean Chemists 2014; 31: 203-209.
27. Eun-HeeKim, Wan-Goo Cho. Stable liquid paraffin in water nanoemulsions prepared by phase inversion composition method. Journal of Korean Chemists, 2015; 40(2): 133-139.
28. Songkro S. An overview of skin penetration enhancers: penetration enhancing activity skin irritation potential and mechanism of action. Songklanakarin Journal Science Technology, 2009; 31(3): 299-321.
29. Pliquett U. Mechanistic studies of molecular transdermal transport due to skin electroporation. Advanced Drug Delivery Reviews. 1999; 35: 41-60.
30. Haberkamp MB. Skin permeation enhancement reversibility. in: drug permeation enhancement theory and applications. Edited by Dean S.H. New York: Marcel Dekker, 1994; 43-58.
31. วิบูลย์ ใจจนวณิช, ตำรับโรคผิวหนังในเวชปฏิบัติปัจจุบัน DERMATOLOGY 2010. กรุงเทพฯ. ไอลิสติก พับลิชชิง. 2548; 44-55.
32. อาจารย์ อัมพร เทียงตรงดี. เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา (Microbiology and Parasitology) บทที่ 3 เชื้อราที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพ (Pathogenic fungus) วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนีสู่พรรณบุรี, 2547; 1-18.
33. Rane SS, Padmaja P. Spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on amplification reactions. Journal of Pharmaceutical Analytical, 2012; 2(1): 43-47.
34. Low AS, Wangboonskul.J. An HPLC assay for the determination of ketoconazole in common pharmaceutical preparations. Analyst, 1999; 1589-1593.
35. Erika R, Kedor-Hackmann M. First-derivative ultraviolet spectrophotometric and High performance liquid chromatographic determination of ketoconazole in pharmaceutical emulsions. Revista brasileira de ciencias farmaceuticas brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006; 42(1): 91-98.

36. Wang L, Tang X, Novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: design in vitro and 'in vivo' evaluation, International Journal Pharmacy, 2008, 3(1): 181-187.
37. Popovska O, Kavrovski Z, Rafajlovska V. Development and validation of UV spectroscopic method for determination of ketoconazole in pharmaceutical formulations. International Journal of Pharmacy 2014; 4(4): 95-101.
38. Santos DA, Hamdan JS, Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. Journal of Clinical Microbiology. 2005;1917-1920.
39. Lorian MD, Antibiotics in laboratory medicine, Fifth edition, 2013; 2: 116-124.
40. Petranyl G, Meingassner JG, Mieth H, Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine In vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1987; 31: 1365-1368.
41. บงกชวรรณ สุตะพาหะ, บรรยง คันธวะ. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบผักขำ,วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่, 2554; 44: 31-37.
42. Balouiri M, Sadki M, Ibnsouda K., Method for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016; 6: 71-79.
43. Chauhan SP, Seth PA, Shah NV, Aundhia CJ, Javia. AR, Ketoconazole loaded solid self emulsifying drug delivery system: Formulation and in vitro characterization. Pharma Science Monitor, 2013; 4: 425-441.
44. Strickley RG, Solubilizing excipients in oral and injectable formulations , Pharmaceutical Research, 2004; 21: 201-229.
45. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Handbook of pharmaceutical excipients, sixth editions, Pharmaceutical and American Pharmacists association. 2009; 2: 26-29.
46. Rajendra A, Shirish S. Identification of major degradation products of ketoconazole. science pharmaceutical, 2011; 79: 817-836.
47. Carolina H. Johan P, Kock L, Vuyisile S, Antifungal free fatty acids: A Review. science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. 2011; 61-71.

ประวัติย่อผู้วิจัย



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	ราชินี วงศ์แสนสุขเจริญ
วันเดือนปีเกิด	7 กันยายน 2518
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลยาวรักษ์ เขต จอมทอง กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	37/1424 หมู่ 4 ต. คลองสาม อ. คลองหลวง จ.ปทุมธานี
ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน	อาจารย์ประจำ สาขา เทคโนโลยีสารสนเทศ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย 200 หมู่ 1 ถ.รังสิต นครนายก ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2542	เภสัชศาสตรบัณฑิต (ภบ.) จาก มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2560	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วทม.) สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ