

ไมโครอิมัลชันที่มีแรมโนลิปิดเป็นองค์ประกอบสำหรับขามะโหระทึก

นางสาว พัชรภา อ่วมภูมิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RHAMNOLIPID BASED MICROEMULSIONS FOR METHOTREXATE

Miss Patcharapa Uampoom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ไมโครอิมัลชันที่มีแรมโนลิปิดเป็นองค์ประกอบสำหรับยา เมโธเทรกเซต
โดย	นางสาว พัชรภา อ่วมภูมิ
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปรีชานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสรดา กนกพานนท์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม เกียรติบุญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปรีชานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสรดา กนกพานนท์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมนึก จารุดีลกกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรงค์ ปวรอาจารย์)

พัชราภา อ่วมภูมิ : ไมโครอิมัลชันที่มีแรมโนลิปิดเป็นองค์ประกอบสำหรับยามโซเทรกเซด (RHAMNOLIPID BASED MICROEMULSIONS FOR METHOTREXATE)
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. สิริรุ่ง ปริชาพันธ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม :
 ผศ. ดร. โสธดา กนกพานนท์, 98 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด สำหรับการเตรียมระบบไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย แรมโนลิปิด/บิวทานอล/น้ำ/น้ำมัน โดยใช้แรมโนลิปิดที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มดิบ โดยใช้จุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 โดยในงานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็นสามส่วน งานวิจัยส่วนแรกทำการหาความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ของแรมโนลิปิด พบว่ามีค่าเท่ากับ 50 mg/l นอกจากนี้แรมโนลิปิดแสดงความเป็นพิษอย่างรุนแรงต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดเท่ากับ 350 µg/ml และแรมโนลิปิดไม่แสดงความเป็นพิษที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ในการทดลองส่วนที่สอง ทำการหาชนิดของน้ำมันที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่าเดคานอลมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันอีกสามชนิด ได้แก่ ไอโซโพรพิลไมริสเตต เอทิลโอเลเอต และ เฮปเทน เนื่องจากสามารถบรรจุน้ำได้มากที่สุด นอกจากนี้เดคานอลยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast อีกด้วย ในการทดลองส่วนสุดท้ายศึกษาระบบ แรมโนลิปิด/บิวทานอล/เดคานอลกับอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 พบว่าระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมมีองค์ประกอบดังนี้ สารลดแรงตึงผิว 51%, เดคานอล 9% อะซีเตตบัฟเฟอร์ 40% และ สารลดแรงตึงผิว 60%, เดคานอล 10%, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30% ตามลำดับ เมื่อนำระบบที่ใช้อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 มาศึกษาความสามารถในการบรรจุยาและประสิทธิภาพการบรรจุยามโซเทรกเซด พบว่าปริมาณยามโซเทรกเซดที่บรรจุในไมโครอิมัลชันจากอะซีเตตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 603.62 µg/ml คิดเป็นประสิทธิภาพการบรรจุยา 73.61% ส่วนไมโครอิมัลชันจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์สามารถบรรจุยาได้เท่ากับ 329.14 µg/ml คิดเป็นประสิทธิภาพการบรรจุยา 29.52% จึงพบว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 สามารถบรรจุยามโซเทรกเซดได้มากกว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4

ภาควิชา	วิศวกรรมเคมี	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี	ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา	2551	ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4870398121 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: RHAMNOLIPID / MICROEMULSIONS / METHOTREXATE

PATCHARAPA UAMPOOM : RHAMNOLIPID BASED MICROEMULSIONS FOR METHOTREXATE. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASSOC. PROF. SEEROONG PRICHANONT, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SORADA KANOKPANONT, 98 pp.

This study aims at investigating potential applications of rhamnolipid biosurfactant for rhamnolipid/*n*-butanol/water/oil microemulsion system. The rhamnolipid used in this study was produced from crude palm oil by *Pseudomonas aeruginosa* sp.A41. In this study, the experiment were divided into three parts. First, critical micelle concentration of rhamnolipid was determined at 50 mg/l. In addition, rhamnolipid showed severe cytotoxicity against L929 mouse fibroblast cell at minimum concentration of 350 µg/ml, while no cytotoxicity at maximum concentration of 10 µg/ml. In the second part of the experiments, suitable oil types was determined at 37 °C. Decanol was found to be most suitable for formation of W/O microemulsion in comparison to three other solvents which were isopropyl myristate, ethyl oleate, and heptane. Decanol was selected for further study due to its capability to form large area of W/O microemulsion, thus high water loading was achieved. In addition, decanol showed no cytotoxic effect on L929 mouse fibroblast cell. In the last part, the rhamnolipid/*n*-butanol/decanol system was then tested with acetate buffer pH 5.5 and phosphate buffer pH 7.4 . Suitable microemulsion compositions of 51% surfactant, 9% decanol, 40% acetate buffer, and 60% surfactant, 10% decanol, 30 % phosphate buffer, respectively. Using acetate buffer pH 5.5 and phosphate buffer pH 7.4 was tested for methotrexate (MTX) loading and MTX loading efficiency. The amount of MTX which is loaded in acetate buffer microemulsion is 603.62 µg/ml and MTX loading efficiency is 73.61%. Moreover, MTX loading in phosphate buffer microemulsion is 324.14 µg/ml and MTX loading efficiency is 29.52%. It was found that the microemulsion prepared from acetate buffer pH 5.5 was able to encapsulate MTX higher than phosphate buffer pH 7.4.

Department Chemical Engineering	Student's signature.....
Field of study Chemical Engineering	Principal advisor's signature.....
Academic year 2008	Co-advisor's signature.....

กิติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายๆท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ วิธีการทำงานวิจัยตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราภรณ์ ธนียวัน ที่กรุณาอนุเคราะห์เครื่องวัดแรงดึงผิว และ รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ ที่กรุณาอนุเคราะห์เครื่อง HPLC

บริษัทหุมพรอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มจำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อน้ำมันปาล์มดิบเพื่อใช้ในการวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

คุณเลิศลักษณ์ แก้ววิมล (พี่ถักถัก) ที่กรุณาให้คำแนะนำในการผลิตสารลดแรงดึงผิวแรม โนลิปิดทุกขั้นตอน ตลอดจนมาช่วยทำการทดลอง และยังให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ตลอดจนมาถึงแม้จะรบกวนเวลาพักผ่อนก็ตาม

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลงไม่ได้ถ้าขาดบุคคลเหล่านี้ นางสาวจุฑามาศ รุจิสมนภา ที่ให้คำปรึกษา และขอแนะนำในการทำงานวิจัย นางสาววิษุพร สุขสมพงษ์ สำหรับคำแนะนำในการเขียน วิทยานิพนธ์ นายกীরดี อิศระพ่ายพ ที่เอื้อเฟื้อปริ้นท์งานอยู่หลายครั้ง นายนิติศักดิ์ กาญจนโมลสิทธิ์ สำหรับคำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์ ความช่วยเหลือด้านแรงงาน และยังให้กำลังใจในทุกๆ ด้าน นอกจากนี้ยังมีพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการและวิจัยวิศวกรรมชีวเคมีทุกคน ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือ งานงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่สาว และพี่ชาย สำหรับกำลังใจและความ สนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....		จ
กิตติกรรมประกาศ.....		ฉ
สารบัญ.....		ช
สารบัญตาราง.....		ฅ
สารบัญภาพ.....		ฉุ
บทที่ 1	บทนำ.....	1
	1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
	1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2	ทฤษฎี.....	4
	2.1 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ.....	4
	2.2 ระบบ 3 องค์ประกอบ.....	7
	2.3 เมโรเทรกเซต.....	15
	2.4 ระบบนำส่งยาทางผิวหนัง.....	16
บทที่ 3	ตรวจเอกสาร.....	19
	3.1 การศึกษาโครงสร้างและสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด....	19
	3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุ.....	23
	3.3 ไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด.....	28
	3.4 การใช้ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนัง.....	29
	3.5 ระบบนำส่งยาสำหรับยาเมโรเทรกเซต.....	33
บทที่ 4	วิธีการทดลอง.....	36
	4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....	36
	4.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	37
	4.3 วิธีการทดลอง.....	38
บทที่ 5	ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	45
	5.1 สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด.....	45
	5.2 ชนิดของน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับหารเกิดไมโครอิมัลชัน.....	47

	หน้า
5.3 ไมโครอิมัลชันสำหรับบรรจุยาเมโธเทรกเซต.....	55
5.4 ความสามารถในการบรรจุยาเมโธเทรกเซตของไมโครอิมัลชัน.....	60
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	67
6.1 สรุปผลการทดลอง.....	67
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	68
รายการอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก.....	75
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	76
ภาคผนวก ข หลักการการวัดค่าแรงดึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring.....	78
ภาคผนวก ค การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	82
ภาคผนวก ง ผลการทดลองเพื่อวางแผนภาพวิภูภาค.....	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	98

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด.....	22
ตารางที่ 3.2	ตัวอย่างของการใช้ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนัง.....	32
ตารางที่ 4.1	องค์ประกอบของระบบที่ทำการศึกษา.....	40
ตารางที่ 4.2	ปริมาณสารที่ใช้ในระบบที่ 1.....	40
ตารางที่ 4.3	ปริมาณสารที่ใช้ในระบบที่ 2.....	40
ตารางที่ 4.4	ปริมาณสารที่ใช้ในระบบที่ 3.....	41
ตารางที่ 4.5	ปริมาณสารที่ใช้ในระบบที่ 4.....	41
ตารางที่ 4.6	ปริมาณน้ำที่ใช้ในการทดลอง.....	41
ตารางที่ 5.1	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแรมโนลิปิด.....	46
ตารางที่ 5.2	ความเป็นพิษต่อเซลล์ของน้ำมันทั้ง 4 ชนิด.....	55
ตารางที่ 5.3	ระบบ ไมโครอิมัลชันที่คัดเลือกนำมาศึกษา.....	60
ตารางที่ 5.4	ความสามารถในการละลายของยามโรเทรกเซต ที่อุณหภูมิ 37 °C.....	60
ตารางที่ 5.5	ปริมาณยามโรเทรกเซตในไมโครอิมัลชัน.....	61
ตารางที่ 5.6	ปริมาณยามโรเทรกเซตที่บรรจุในไมโครอิมัลชัน.....	65
ตารางที่ 5.7	ปริมาณยามโรเทรกเซตในไมโครอิมัลชันเทียบกับงานวิจัยอื่น.....	66
ตารางที่ ค.1	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	83
ตารางที่ ง.1	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต (S:O = 1:5).....	85
ตารางที่ ง.2	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต (S:O = 1:2).....	86
ตารางที่ ง.3	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต (S:O = 1:1).....	86
ตารางที่ ง.4	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต (S:O = 2:1).....	87
ตารางที่ ง.5	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต (S:O = 5:1).....	87
ตารางที่ ง.6	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือเอทิลโอเลียด (S:O = 1:5).....	88
ตารางที่ ง.7	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือเอทิลโอเลียด (S:O = 1:2).....	88
ตารางที่ ง.8	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือเอทิลโอเลียด (S:O = 1:1).....	89
ตารางที่ ง.9	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือเอทิลโอเลียด (S:O = 2:1).....	89
ตารางที่ ง.10	ลักษณะของระบบเมื่อน้ำมันคือเอทิลโอเลียด (S:O = 5:1).....	90

ตารางที่ ง.11	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 1:5).....	90
ตารางที่ ง.12	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 1:2).....	91
ตารางที่ ง.13	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 1:1).....	91
ตารางที่ ง.14	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 2:1).....	92
ตารางที่ ง.15	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 5:1).....	92
ตารางที่ ง.16	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเฮปเทน (S:O = 1:5).....	93
ตารางที่ ง.17	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเฮปเทน (S:O = 1:2).....	93
ตารางที่ ง.18	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเฮปเทน (S:O = 1:1).....	94
ตารางที่ ง.19	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเฮปเทน (S:O = 2:1).....	94
ตารางที่ ง.20	ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเฮปเทน (S:O = 5:1).....	95

สารบัญญภาพ

		หน้า
รูปที่ 2.1	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว.....	4
รูปที่ 2.2	การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว.....	4
รูปที่ 2.3	การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์.....	5
รูปที่ 2.4	รูปที่ 2.4 ลักษณะโครงสร้างของแรมโนลิปิด 4 ชนิดที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
รูปที่ 2.5	แผนภาพวัฏภาคแสดงส่วนต่างๆในระบบ.....	7
รูปที่ 2.6	ตัวอย่างของพฤติกรรมวัฏภาค.....	8
รูปที่ 2.7	ลักษณะที่แตกต่างระหว่างแอมโครอิมัลชันและไมโครอิมัลชัน.....	10
รูปที่ 2.8	โครงสร้างของไมโครอิมัลชัน.....	11
รูปที่ 2.9	กลไกการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคของสารลดแรงตึงผิว.....	12
รูปที่ 2.10	หลักการทำงานของโพลาริเซอร์.....	14
รูปที่ 2.11	โครงสร้างทางเคมีของเมโรเทรกเซต.....	16
รูปที่ 2.12	โครงสร้างของผิวหนัง.....	17
รูปที่ 3.1	โครมาโตแกรม GC-MS.....	20
รูปที่ 3.2	โครมาโตแกรม HPLC.....	21
รูปที่ 3.3	ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน และน้ำตาล แรมโนส.....	21
รูปที่ 3.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าแรงตึงผิว.....	23
รูปที่ 3.5	การจัดเรียงตัวของโมเลกุลไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน.....	27
รูปที่ 3.6	แผนภาพวัฏภาคของระบบ แรมโนลิปิด / เฮปแทน / บิวทานอล / น้ำ.....	29
รูปที่ 5.1	ค่าแรงตึงผิวของสารละลายแรมโนลิปิด.....	45
รูปที่ 5.2	การจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม.....	48
รูปที่ 5.3	ตัวอย่างของผลึกเหลวเมื่อส่องด้วยแสงโพลาไรซ์.....	49
รูปที่ 5.4	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชัน ของระบบ น้ำ(W)/แรมโนลิปิด/บิวทานอล(S/C)/ไอโซโพรพิลไมริสเตด(O).....	51
รูปที่ 5.5	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชัน ของระบบ น้ำ(W)/แรมโนลิปิด/บิวทานอล(S/C)/เอทิลโอทีเอต(O).....	52

	หน้า	
รูปที่ 5.6	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชัน ของระบบ น้ำ(W)/แรมโนลิปิด/บิวทานอล(S/C)/เดคานอล(O).....	52
รูปที่ 5.7	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชัน ของระบบ น้ำ(W)/แรมโนลิปิด/บิวทานอล(S/C)/เฮปเทน(O).....	53
รูปที่ 5.8	โครงสร้างทางเคมีของน้ำมัน.....	53
รูปที่ 5.9	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชัน ของระบบ ฟอสเฟตบัพเฟอร์(PB)/แรมโนลิปิด/บิวทานอล(S/C)/เฮปเทน(O).....	59
รูปที่ 5.10	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชัน ของระบบ อะซีเตตบัพเฟอร์(AB)/แรมโนลิปิด/บิวทานอล(S/C)/เฮปเทน(O).....	59
รูปที่ 5.11	ตัวอย่างกราฟ HPLC ของเมโทเทรกเซตในฟอสเฟตบัพเฟอร์.....	63
รูปที่ 5.12	ตัวอย่างกราฟ HPLC ของไมโครอิมัลชันที่บรรจุยามเมโทเทรกเซต.....	63
รูปที่ 5.13	กราฟมาตรฐานของยามเมโทเทรกเซตในอะซีเตตบัพเฟอร์ พีเอช 5.5.....	52
รูปที่ 5.14	กราฟมาตรฐานของยามเมโทเทรกเซตในฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4.....	53
รูปที่ ข.1	ขั้นตอนการวัดค่าแรงดึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring.....	78
รูปที่ ข.2	องค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงดึงผิว.....	80
รูปที่ ง.1	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบของระบบ น้ำ(W)/แรมโนลิปิด/ บิวทานอล(S/C)/ไอโซโพรพิลไมริสเตต(O) ที่อุณหภูมิ 37 °C.....	96
รูปที่ ง.2	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบของระบบ น้ำ(W)/แรมโนลิปิด/ บิวทานอล(S/C)/เอทิลโอลีสเตต(O) ที่อุณหภูมิ 37 °C.....	96
รูปที่ ง.3	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบของระบบ น้ำ(W)/แรมโนลิปิด/ บิวทานอล(S/C)/เดคานอล(O) ที่อุณหภูมิ 37 °C.....	97
รูปที่ ง.4	แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบของระบบ น้ำ(W)/แรมโนลิปิด/ บิวทานอล(S/C)/เฮปเทน(O) ที่อุณหภูมิ 37 °C.....	97

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์ โดยโครงสร้างของโมเลกุลประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ทำให้สารลดแรงตึงผิวสามารถกระจายตัวอยู่ระหว่าง 2 ภูมิภาคที่มีขั้วแตกต่างกันได้ (Banat และคณะ, 2000) ปัจจุบันมีการนำสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมาใช้ประโยชน์มากขึ้น เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ สารตั้งต้นหาได้ง่ายราคาถูก และผลิตจากสารตั้งต้นที่สามารถผลิตขึ้นใหม่ได้ (renewable feedstock) (Desai และ Banat, 1997) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเป็นอิมัลซิไฟเออร์และสารทำความสะอาดในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง นอกจากนี้ยังสามารถใช้งานสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพบางชนิดในทางการแพทย์ เช่น ช่วยต่อต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) หรือต่อต้านเชื้อรา (antifungal) เป็นต้น (Singh และ Cameotra, 2004)

ไมโครอิมัลชันประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว น้ำมัน และน้ำ เป็นระบบที่มีความคงตัวทางความร้อน และมีลักษณะใสหรือค่อนข้างใส (Aboofazeli และ Lawrence, 1994) สารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ในการเตรียมไมโครอิมัลชันมีอยู่หลายชนิด แต่การนำไมโครอิมัลชันมาประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมมักพบปัญหาการระคายเคืองและความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวเหล่านั้น ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงได้รับความสนใจมากขึ้น (Shinoda และคณะ, 1991) ซึ่งแรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพชนิดหนึ่ง ที่มีการใช้งานมากที่สุดในกลุ่มไกลโคลิปิด สามารถผลิตได้ทั้งจากแบคทีเรีย และจากการสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งปัจจุบันบริษัท Jencil Biosurfactant มีการผลิตแรมโนลิปิดขายแต่มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้แรมโนลิปิดที่ผลิตขึ้นเอง โดยใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas sp. A41* และใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีราคาถูก และทำการแยกผลิตภัณฑ์ จนได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความบริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งมีสีน้ำตาลไหม้เหนียวหนืด

เมโทเทรกเซต (Methotrexate) เป็นยาเคมีบำบัดชนิดหนึ่ง ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ร่างกาย มักนิยมใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) โดยการรับประทาน แต่การใช้ยาชนิดนี้จะเกิดผลข้างเคียง (side effect) เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะเป็นพิษต่อดับและไต (Van และคณะ, 1994) จึงมีการศึกษาการให้ยาชนิดนี้ผ่านทางผิวหนัง แต่เนื่องจากเมโทเทรกเซตเป็นยาที่มีความชอบน้ำสูงมาก ส่วนผิวหนังชั้นนอกค่อนข้างชอบไขมัน ทำให้เป็นข้อจำกัดในการแพร่ผ่านของยา และเมื่อความเป็นกรดต่างในบริเวณร่างกายต่างกัน ยามักแยกออกจากสารละลายและรวมกันเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการนำส่งยา ดังนั้นจึงมีการศึกษาระบบนำส่งยาเช่น ไมโครอิมัลชัน และ ไฮโดรเจล เป็นต้น เพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาเมโทเทรกเซต

ผ่านทางผิวหนัง (Lu และ Jun, 1998) จากงานวิจัยของ Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez (2001) ศึกษากระบวนการนำส่งยาเมโรทรอกเซตแบบไมโครอิมัลชัน 2 ระบบ โดยระบบแรกประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิวคือ ทวิน 80 : สเปน 80 : 1,2-ออกเทนไดออล (3:1:1.2 v/v/v) และใช้น้ำมันคือ ไอโซโพรพิล ไมริสเตต (isopropyl myristate) ส่วนระบบที่สองใช้สารลดแรงตึงผิวคือ ลาบราซอล (labrasol) : พลูรอล ไอโซสเตียริก (plurol isostearique) (3:1 v/v) และใช้น้ำมันคือเอทิลโอเลต (ethyl oleate) พบว่าไมโครอิมัลชันทั้งสองระบบมีประสิทธิภาพในการนำส่งยามากกว่าการใช้ สารละลายของยาแบบธรรมดา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษากระบวนการนำส่งยาเมโรทรอกเซตแบบ ไมโครอิมัลชัน โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด ซึ่งผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้ระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุยาเมโรทรอกเซต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชันของ น้ำมัน/ แรมโนลิปิด/น้ำ

1.2.2 เพื่อหาแบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุยาเมโรทรอกเซต

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas sp. A41* โดยใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการแยกผลิตภัณฑ์จนได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความบริสุทธิ์บางส่วน

1.3.2 ทดสอบสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดที่ผลิตขึ้น ได้แก่ การหาค่า ความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

1.3.3 เขียนแผนภาพวัฏภาคระหว่าง น้ำ/แรมโนลิปิด/บิวทานอล โดยใช้อัตราส่วนโดยมวล ของแรมโนลิปิดต่อบิวทานอลเท่ากับ 2:1 โดยทดสอบกับน้ำมัน 4 ชนิดคือ ไอโซโพรพิลไมริสเตต, เอทิลโอเลต, เฮปแทน และเดคานอล เพื่อเลือกน้ำมันและอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม ไมโครอิมัลชัน โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37 °C

1.3.4 ทดสอบอิทธิพลของยาเมโรทรอกเซตต่อการเตรียมไมโครอิมัลชันของระบบที่ คัดเลือกได้จากข้อ 1.3.3 โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37 °C

1.3.5 ตรวจสอบสมบัติทางเคมีกายภาพของระบบไมโครอิมัลชัน ได้แก่

- การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า
- การตรวจสอบชนิดของระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้น
- การวิเคราะห์ด้วยแสงโพลาไรซ์ เพื่อทดสอบว่าระบบที่ได้มีสมบัติเป็น ไอโซโทรปิกหรือแอนไอโซโทรปิก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเกิดไมโครอิมัลชันกับสารลดแรงตึงผิวชนิดแอมโฟลิฟิล เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้งานต่อไป

1.4.2 ได้ระบบนำส่งยาที่เหมาะสมสำหรับยามะเร็งโรเทรกเซต เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคผิวหนังต่อไป

1.4.3 เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาระบบนำส่งยาแบบไมโครอิมัลชันสำหรับยามะเร็งโรเทรกเซต

บทที่ 2

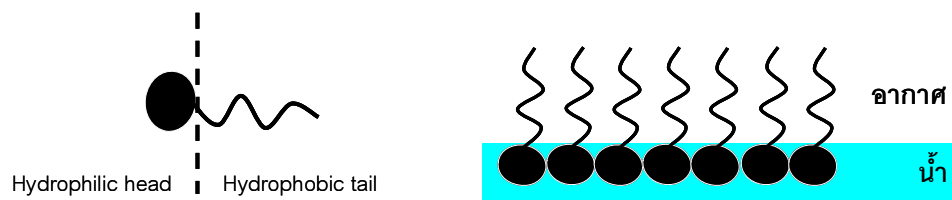
ทฤษฎี

งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดในการผลิตไมโครอิมัลชันเพื่อบรรจุยาเมโรเทรกเซดเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบนำส่งยาทางผิวหนังของตัวยาชนิดนี้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทราบถึงลักษณะโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ ลักษณะโครงสร้างและการจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังแสดงในหัวข้อ 2.1 และยังต้องทราบถึงรายละเอียดของระบบ 3 องค์ประกอบ สมบัติและปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชัน รวมถึงวิธีการทดสอบสมบัติของไมโครอิมัลชัน ดังแสดงในหัวข้อ 2.2 และ 2.3 ตามลำดับ และเนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการบรรจุยาเมโรเทรกเซดลงในไมโครอิมัลชันเพื่อประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนัง จึงต้องทราบรายละเอียดของระบบนำส่งยาทางผิวหนังและรายละเอียดของยาชนิดนี้ด้วย ดังแสดงในหัวข้อ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ

2.1 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant)

2.1.1 ลักษณะโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว

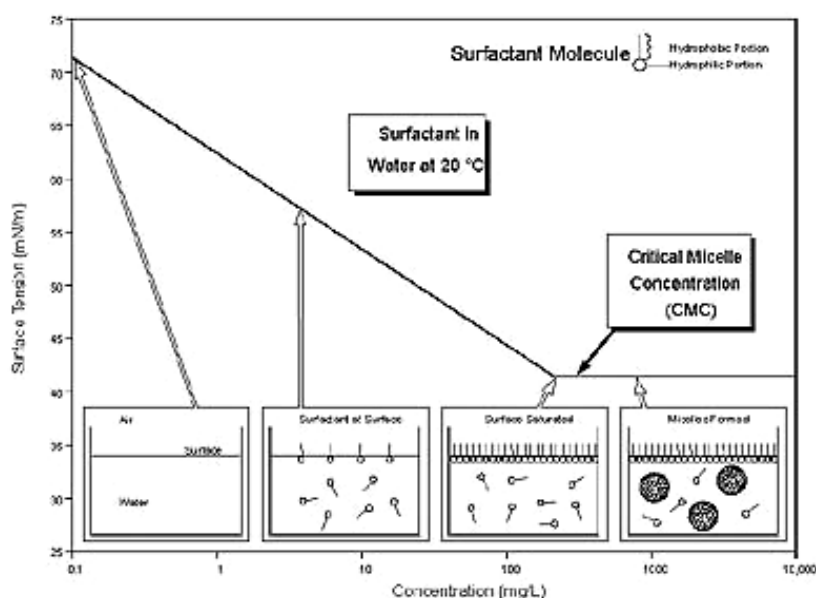
สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งส่วนมากผลิตจากจุลินทรีย์ทั้ง แบคทีเรีย รา ยีสต์ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่มีขั้วสามารถละลายน้ำได้ โดยทั่วไปจะเป็นส่วนหัวของโมเลกุล เรียกว่า ส่วนไฮโดรฟิลิก (hydrophilic group) ได้แก่ สารจำพวก โปรตีน และน้ำตาล ซึ่งจะเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น อีกส่วนหนึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว โดยทั่วไปจะเป็นส่วนหางของโมเลกุล เรียกว่า ส่วนไฮโดรโฟบิก (hydrophobic group) ส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) (Fiechter, 1992) แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว รูปที่ 2.2 การกระจายตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว

คุณสมบัติที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิว คือ สามารถช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคสองวัฏภาค โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะสะสมตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสของทั้งสองวัฏภาค เช่น ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวด้วยกัน ของเหลวกับแก๊ส หรือระหว่างของแข็งกับของเหลว ตัวอย่างของการกระจายตัวของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ การกระจายตัวของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวระหว่างผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับอากาศ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุเข้าหาโมเลกุลของน้ำ และจะหันส่วนไม่มีขั้วไปทางอากาศ โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบนผิวของน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.2

เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในตัวทำละลายเช่น น้ำ สารลดแรงตึงผิวจะมีบทบาทในการลดแรงตึงผิวของน้ำกับอากาศ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นแรงตึงผิวจะมีค่าลดลง เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นสูงจนไม่สามารถแทรกตัวระหว่างผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคได้อีก โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินจะจัดเรียงตัวกันเป็น ไมเซลล์ (micelle) ซึ่งความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการรวมตัวเป็น ไมเซลล์เรียกว่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC) ซึ่งขั้นตอนการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ทำได้โดยการเตรียมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆกัน และทำการวัดค่าแรงตึงผิวที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Gilman, 1993)

โดยจากรูปจะเห็นว่าเมื่อทดลองวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆ จุดที่ความเข้มข้นของสารละลายต่ำที่สุดที่ทำให้สารละลายมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด คือ จุดที่แสดง ความเข้มข้นวิกฤตของ ไมเซลล์

2.1.2 การจำแนกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

การจำแนกสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพตามองค์ประกอบของโครงสร้างภายใน สามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภทได้แก่ (Healy และคณะ, 1996)

2.1.2.1 ไกลโคลิปิด (glycolipids)

โมเลกุลของไกลโคลิปิดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็คโตส กรดกลูโครนิก แรมโนส และ กาแล็คโตสซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น กรดอะลิฟาติก (aliphatic acid) และ ไฮดรอกซีอะลิฟาติก (hydroxyaliphatic)

2.1.2.2 ฟอสโฟลิปิด (phospholipids)

โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยกลีเซอรอลที่แทนที่ด้วยกรดไขมัน 2 ตัว ฟอสเฟต และแอลกอฮอล์ โดยจุลินทรีย์ที่ผลิตฟอสโฟลิปิดได้แก่ *Candida spp.* *Micrococcus spp.*

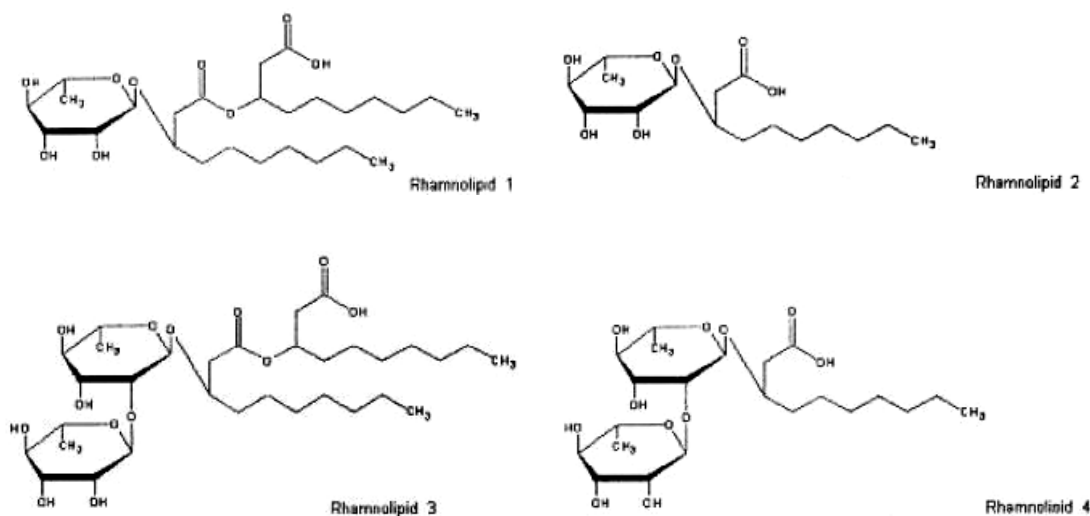
2.1.2.3 ไลโปเพปไทด์และไลโปโปรตีน (lipopeptides and lipoproteins)

โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยไขมันเชื่อมต่อกับสายโซ่ของพอลิเพปไทด์ (polypeptide chain)

2.1.2.4 เซอร์แฟกแทนท์ชนิดพอลิเมอร์ (polymeric surfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โมเลกุลประกอบด้วยหน่วยซ้ำกันของแซคคาไรด์ (saccharide unit) และกรดไขมัน (fatty acid)

เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้สารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด (Rhamnolipid) ในการผลิตไมโครอิมัลชัน โดยแรมโนลิปิดจัดอยู่ในประเภทไกลโคลิปิด ผลิตจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* โครงสร้างโมเลกุลแบ่งออกเป็น 4 ชนิดดังรูปที่ 2.4 โดยประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ 1 หรือ 2 โมเลกุลของกรดปีต้าไฮดรอกซิลเดคาโนอิก (β -hydroxyl decanoic acid)



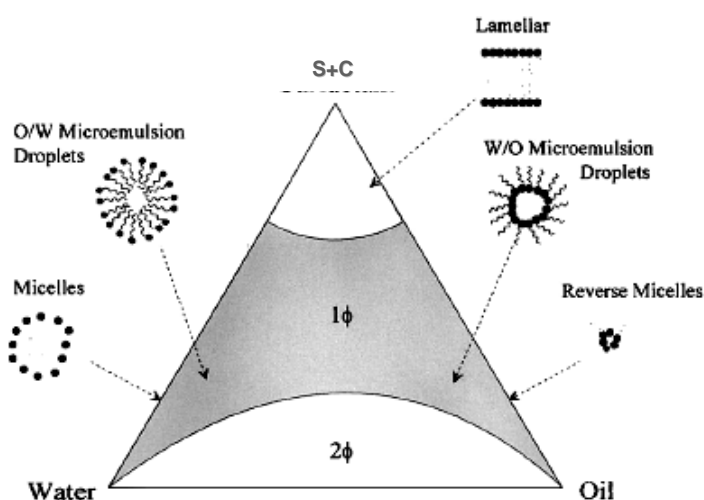
รูปที่ 2.4 ลักษณะ โครงสร้างของแรมโนลิปิด 4 ชนิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa*

(Tahzibi, 2004)

2.2 ระบบ 3 องค์ประกอบ

2.2.1 แผนภาพวัฏภาค

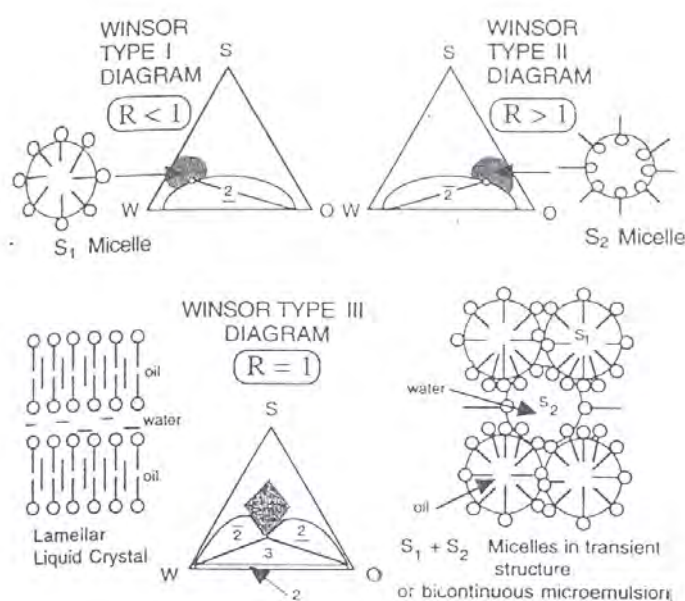
เมื่อผสมน้ำ น้ำมันและสารลดแรงตึงผิวในอัตราส่วนต่างๆ จะเกิดระบบที่ประกอบด้วย อิมัลชัน ไมเซลล์ รีเวอร์สไมเซลล์ ไมโครอิมัลชัน และ mesomorphic phase อันได้แก่ ลามลาร์, เฮกซะโกนอล, เจล และ น้ำมันกระจายตัว (oily dispersion) ทั้งนี้จะได้โครงสร้างชนิดใดขึ้นอยู่กับ ลักษณะทางเคมีและความเข้มข้นของแต่ละส่วนประกอบ รวมทั้งอุณหภูมิและความดัน ซึ่ง การศึกษาลักษณะการเกิดโครงสร้างต่างๆเหล่านี้นิยมแสดงผลการศึกษาด้วยแผนภาพวัฏภาคสาม องค์ประกอบ (ternary phase diagram) ดังรูปที่ 2.5 ซึ่งมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมสองมิติ โดยมีมุมทั้ง สามแสดงแต่ละองค์ประกอบได้แก่น้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว โดยให้อัตราส่วนของสารลด แรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม (cosurfactant) มีค่าคงที่ โดยแผนภาพวัฏภาคจะแสดงส่วนต่างๆ ในระบบ ได้แก่ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและชนิดน้ำมันในน้ำ, ไมเซลล์, รีเวอร์สไมเซลล์ ระบบหลายวัฏภาค (multiphase) และ bicontinuous phase (Swarbrick และ Boylan, 1988)



รูปที่ 2.5 แผนภาพวัฏภาคแสดงส่วนต่างๆในระบบ (Lawrence และ Rees, 2000)

จากรูปที่ 2.5 ส่วนที่แรเงาแสดงส่วนของระบบ 1 วัฏภาค ซึ่งประกอบด้วยไมเซลล์และ รีเวอร์สไมเซลล์หรือ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และไบคอนตินิวอัส ไมโครอิมัลชัน (bicontinuous microemulsion) ส่วนที่ไม่ได้แรเงาที่ติดกับแกนน้ำ-น้ำมัน แสดงส่วนของระบบหลายวัฏภาค ส่วนที่ไม่ได้แรเงาที่อยู่บริเวณที่มีสารลดแรงตึงผิวมาก แสดงส่วนของลามลาร์ (lamellar) หรือผลึกของเหลว (liquid crystalline) หรือวัฏภาคเจล (gel phase)

พฤติกรรมวัฏภาคของระบบที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว น้ำมันและน้ำ พบว่าสามารถแบ่งพฤติกรรมออกเป็น 4 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ตัวอย่างของพฤติกรรมวัฏภาค (Kumar และ Mittal, 1999)

แบบที่ 1 อาจเรียกว่า “Winsor I” เป็นระบบที่ประกอบด้วยไมเซลล์ (หรือไมโครอิมัลชัน ชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งน้ำมันจะละลายอยู่ด้านในแกนกลางของไมเซลล์) ซึ่งไมเซลล์นี้จะอยู่ในลักษณะสมดุลกับวัฏภาคน้ำมัน พฤติกรรมนี้จะอยู่ในบริเวณระบบหลายวัฏภาค (polyphasic) ของแผนภาพวัฏภาค พฤติกรรมวัฏภาคแบบนี้มักจะเขียนแทนด้วย 2 เพื่อแสดงว่าสารมี 2 วัฏภาค โดยวัฏภาคที่มีสารลดแรงตึงผิวมาก (เป็นวัฏภาคของไมโครอิมัลชัน) คือวัฏภาคน้ำ ซึ่งอยู่ชั้นล่าง

แบบที่ 2 หรือ “Winsor II” จะมีพฤติกรรมตรงข้ามกับ “Winsor I” สามารถเขียนแทนด้วย 2 ซึ่งส่วนของระบบหลายวัฏภาคจะประกอบด้วยรีเวอร์สไมเซลล์ซึ่งมีน้ำละลายอยู่ข้างใน อยู่ในลักษณะสมดุลกับวัฏภาคน้ำ โดยวัฏภาคที่เป็นไมโครอิมัลชัน คือวัฏภาคน้ำมัน ซึ่งอยู่ชั้นบน

แบบที่ 3 หรือ “Winsor III” อยู่ในบริเวณระบบหลายวัฏภาคของแผนภาพวัฏภาค จะประกอบด้วย 3 วัฏภาค ซึ่งส่วนที่เป็นไมโครอิมัลชันเป็นจะอยู่ตรงกลางและถูกล้อมรอบด้วยส่วนที่เกินอีก 2 วัฏภาค คือน้ำและน้ำมันอาจ เรียกไมโครอิมัลชันนี้ว่าวัฏภาคกลาง (middle phase) เพราะอยู่ตรงกลางระหว่างวัฏภาคของน้ำและน้ำมัน เนื่องจากความหนาแน่นมีค่าอยู่ระหว่างค่าความหนาแน่นของน้ำมันและน้ำ ทั้งสามวัฏภาคนี้อยู่ในลักษณะสมดุล ทำให้ระบบนี้ไม่สามารถถูกเจือจางได้โดยทั้งน้ำหรือน้ำมัน แต่จะเกิดเป็นไบคอนตินิวอัส ไมโครอิมัลชันแทน

แบบที่ 4 หรือ “Winsor IV” เป็นบริเวณที่เป็น 1 วัฏภาค ซึ่งอาจประกอบด้วยผลึกของเหลว ลามลาร์ หรือโครงสร้างอื่นๆ

ลามลาร์ (lamellar) หรือผลึกของเหลว (liquid crystalline) จะเกิดเมื่อระบบมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสูง โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเรียงแถวกัน 2 ชั้น โดยมีชั้นของน้ำและน้ำมันสลับไปมาดังรูปที่ 2.6

2.2.2 อิมัลชัน

อิมัลชันเป็นระบบที่ประกอบด้วยของเหลว 2 ชนิดที่เข้ากันไม่ได้ โดยมีของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆอยู่ในอีกของเหลวหนึ่ง เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคระหว่าง 0.5 – 100 ไมโครเมตร เป็นระบบที่มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ต่ำ จึงต้องมีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงไปเพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน โดยอิมัลชันแบ่งออกเป็น 4 ชนิดได้แก่ (มณฑนา, 2544)

2.3.2.1 แมโครอิมัลชัน (simple emulsion, macroemulsion)

เป็นอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาค 1 – 10 ไมโครเมตร กระจิงแสง ลักษณะเป็นของเหลวสีขาวขุ่นที่บดล้าขม แบ่งออกเป็น 2 แบบคือ น้ำมัน/น้ำ (O/W) คือ มีน้ำมันกระจายตัวเป็นหยดอยู่ในน้ำ และแบบน้ำ/น้ำมัน (W/O) คือ มีน้ำกระจายตัวอยู่เป็นหยดในน้ำมัน

2.3.2.2 อิมัลชันชนิดซ้อน (multiple emulsion, double emulsion)

เป็นอิมัลชันที่ซ้อนอยู่ภายในอิมัลชันแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ ชนิด น้ำ/น้ำมัน/น้ำ (W/O/W) เป็นหยดน้ำที่กระจายตัวอยู่ในน้ำมันซึ่งเป็นวัฏภาคในของอิมัลชันชนิดน้ำมัน/น้ำ และชนิด น้ำมัน/น้ำ/น้ำมัน (O/W/O) เป็นหยดน้ำมันที่กระจายตัวอยู่ในน้ำซึ่งเป็นวัฏภาคในของอิมัลชันชนิดน้ำ/น้ำมัน

2.3.2.3 ไมโครอิมัลชัน (transparent emulsion, microemulsion)

เป็นอิมัลชันที่มีอนุภาคขนาดเล็ก ไม่กระจิงแสง สารละลายของไมโครอิมัลชันมีลักษณะโปร่งใสหรือโปร่งแสง

2.3.2.4 ไมเซลลาร์อิมัลชัน (micellar emulsion)

หรือสารละลายไมเซลล์ มีลักษณะโปร่งใสคล้ายไมโครอิมัลชัน เกิดจากการที่สารไม่ละลายน้ำเช่นน้ำมัน เข้าไปละลายในส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไมเซลล์ (micelle)

สำหรับงานวิจัยนี้ศึกษาการเตรียมอิมัลชัน โปร่งใสหรือไมโครอิมัลชัน ดังนั้นจึงขอกกล่าวถึงเฉพาะรายละเอียดของไมโครอิมัลชันเท่านั้น

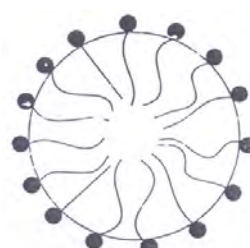
2.2.3 ไมโครอิมัลชัน

2.2.3.1 คุณสมบัติและโครงสร้างของไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชันหมายถึงระบบที่ประกอบด้วย น้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว ซึ่งระบบนี้มีสมบัติไอโซโทรปิก โปร่งแสง และมีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ มีลักษณะใสหรือค่อนข้างใส และระบบมักประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวร่วม ซึ่งมักเป็นแอลกอฮอล์ชนิดสายโซ่สั้น (Aboofazeli และ Lawrence, 1994) ขนาดอนุภาคไมโครอิมัลชันอยู่ระหว่าง 10-140 nm

ข้อแตกต่างระหว่างแมโครอิมัลชันและไมโครอิมัลชัน

แมโครอิมัลชัน	ไมโครอิมัลชัน
1. ไม่เสถียร เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกวัฏภาค	1. มีเสถียรภาพ
2. อนุภาคขนาดใหญ่ (1-10 μ m)	2. อนุภาคขนาดเล็ก (10-140nm)
3. ต้องการสารลดแรงตึงผิวปริมาณปานกลาง	3. ต้องการสารลดแรงตึงผิวปริมาณมาก
4. ความโค้งระหว่างน้ำกับน้ำมันต่ำ	4. ความโค้งระหว่างน้ำกับน้ำมันสูง

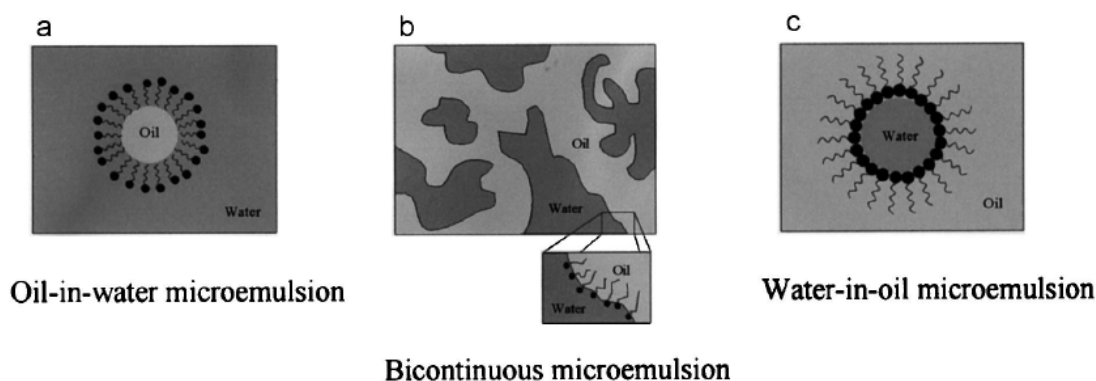


รูปที่ 2.7 ลักษณะที่แตกต่างระหว่างแมโครอิมัลชันและไมโครอิมัลชัน

(Holmberg, 2003)

ไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่ของเหลวชนิดหนึ่งกระจายในของเหลวอีกชนิดหนึ่งอย่างคงตัว ซึ่งของเหลวที่กระจายตัวอยู่จะมีลักษณะเป็นทรงกลมเล็กๆ หรือลักษณะคล้ายโครงสร้างร่างแห โดยมีของเหลวตัวกลางล้อมรอบอยู่ โดยสารลดแรงตึงผิวจะจัดเรียงตัวโดยการหันสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่วัฏภาคน้ำมัน และหันส่วนที่มีขั้วเข้าสู่วัฏภาคน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.8 และจากรูป (ก) และ (ค) แสดงการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวสำหรับไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และชนิดน้ำในน้ำมันตามลำดับ ส่วนไบคอนทินิวอัส ไมโครอิมัลชัน (ข) จะเกิดขึ้นเมื่อวัฏภาคน้ำและน้ำมันมีปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งแรงตึงผิวระหว่างรอยต่อและลักษณะความโค้งจะมีการ

เปลี่ยนแปลงอย่างมาก (Kaisri, 1990) โดยโมเลกุลของไมเซลล์จะมีการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมกับโมเลกุลของรีเวอร์สไมเซลล์



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของไมโครอิมัลชัน (ก) ชนิดน้ำมันในน้ำ (ข) ไบคอนตินิวอัส และ (ค) ชนิดน้ำในน้ำมัน (Lawrence และ Rees, 2000)

2.2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชัน

1. โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว (Kaisri, 1990; Friberg, 1990)

ลักษณะการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวที่รอยต่อและลักษณะการก่อตัวเป็นไมโครอิมัลชัน ขึ้นอยู่กับค่าอัตราส่วนของการรวมตัว (packing ratio) ดังสมการต่อไปนี้

$$P = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (2.2.3-1)$$

เมื่อ P คือ อัตราส่วนของการรวมตัว

v คือ ปริมาตรของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว

a_0 คือ พื้นที่ของส่วนที่มีขั้วของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว

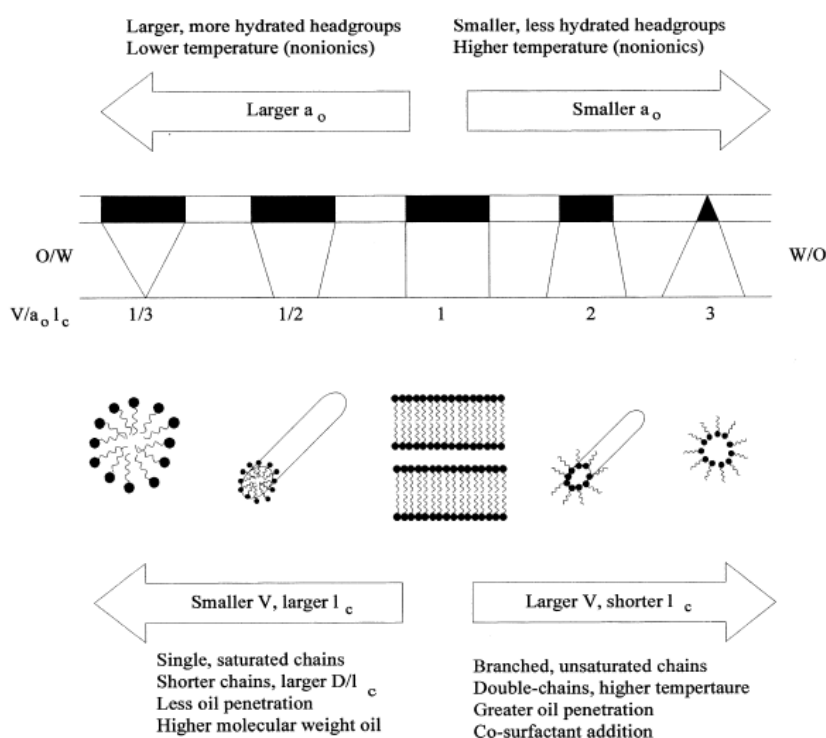
l_c คือ ความยาวของส่วนหางที่มากที่สุดที่อุณหภูมิหนึ่ง

โดยค่า P ที่คำนวณได้สามารถประเมินได้ดังนี้

- ค่า P น้อยกว่า 1/3 โมเลกุลจะก่อตัวเป็นไมเซลล์
- ค่า P ระหว่าง 1/3-1/2 โมเลกุลจะก่อตัวเป็นรูปทรงกระบอก
- ค่า P ระหว่าง 1/2-1 โมเลกุลจะก่อตัวเป็นลามลาร์
- ค่า P มากกว่า 1.0 โมเลกุลจะก่อตัวเป็นรีเวอร์สไมเซลล์

โดยค่าอัตราส่วนของการรวมตัว (P) จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และความแรงของประจุ (ionic strength)

จากงานวิจัยของ (Kaisri, 1990) และ Friberg (1990) ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถพิจารณาการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคของสารลดแรงตึงผิวได้ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 กลไกการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคของสารลดแรงตึงผิว (Lawrence และ Rees, 2000)

2. ชนิดของสารลดแรงตึงผิว

สามารถจำแนกสารลดแรงตึงผิวตามประจุออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่

1. สารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุลบ (anionic surfactant)
2. สารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุบวก (cationic surfactant)
3. สารลดแรงตึงผิวชนิดมีทั้งสองประจุ (zwitterionic surfactant)
4. สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (nonionic surfactant)

โดยปกติสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุก็มีอันตรกิริยากับโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวข้างเคียงทำให้เกิดลักษณะคล้ายชั้นของแข็ง (solid layer) จึงไม่สามารถเกิดเป็นไมโครอิมัลชันได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่จะเกิดเป็นผลึกของเหลว ดังนั้นในการทำให้เกิดไมโครอิมัลชันจึงต้องทำที่อุณหภูมิสูงขึ้น (อาจสูงถึง 50°C) หรืออาจเติมสารลดแรงตึงผิวร่วมลงไป (Kumar และ Mittal, 1999)

สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ควรมีลักษณะดังนี้ (Swarbrick และ Boyland, 1988)

- สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำมาก
- ทำให้เกิดฟิล์มที่ยืดหยุ่นและก่อตัวรอบหยดของเหลว
- มีค่า HLB ที่เหมาะสมที่จะให้เกิดความโค้งระหว่างรอยต่อเพื่อให้เกิดไมโครอิมัลชัน

3. สารลดแรงตึงผิวร่วม

การเติมสารลดแรงตึงผิวร่วม จะเป็นการเพิ่มปริมาตรของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว โดยจะไปแทรกระหว่างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว ทำหน้าที่แยกกลุ่มที่มีประจุออกจากกัน จึงช่วยลดความมีขั้วและเพิ่มความยืดหยุ่นของโมเลกุล (Kumar และ Mittal, 1999)

4. อุณหภูมิ

การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้โมเลกุลมีการเคลื่อนที่มากขึ้นและทำให้โมเลกุลมีความยืดหยุ่นมากขึ้น (Kumar และ Mittal, 1999)

5. ความดัน

6. ความเป็นกรดต่าง

7. สารเติมแต่งที่เติมเข้าไปในระบบ เช่นอีเล็กโตรไลต์ และยา

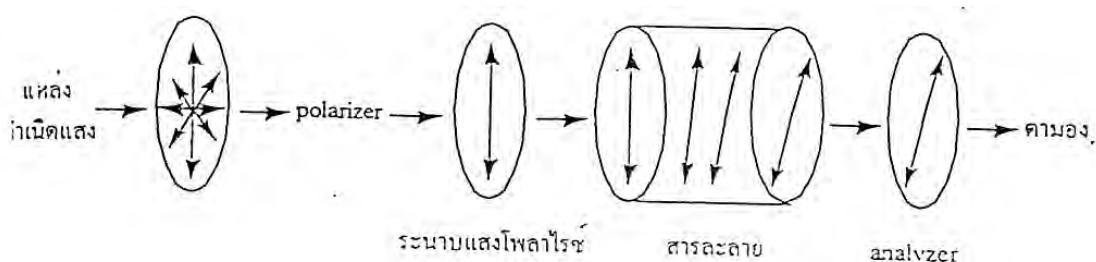
2.2.3.3 การทดสอบสมบัติของไมโครอิมัลชัน

เทคนิคที่ใช้ในการทดสอบสมบัติของไมโครอิมัลชันมีอยู่มากมาย ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นระดับมหภาค (macroscopic) และระดับจุลภาค (microscopic) (Lawrence และ Rees, 2000) โดยวิธีทดสอบในระดับมหภาคมีดังนี้

1. การวิเคราะห์ด้วยแสงโพลาไรซ์

สารไมโครอิมัลชัน มีลักษณะที่โปร่งใสหรือ โปร่งแสง ลักษณะดังกล่าวนี้มีความเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของค่าดัชนีการหักเหแสง (refractive index) ระหว่างวัฏภาคและขนาดของหยดสารที่แตกตัว แต่อย่างไรก็ตามการสังเกตความโปร่งใสไม่ใช่เป็นเกณฑ์ที่ดีในการบอกว่าเป็นสารไมโครอิมัลชันหรือไม่ เนื่องจากสารระบบอื่น ๆ ก็สามารถมีลักษณะโปร่งใสได้ จึงสามารถทดสอบว่าระบบที่ได้มีสมบัติเป็นไอโซโทรปิกหรือแอนไอโซโทรปิกโดยวิเคราะห์ด้วยแสงโพลาไรซ์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ จะทำให้สามารถแบ่งแยกไมโครอิมัลชันที่ไอโซโทรปิกออกจากแลมดาร์หรือเฮกซะโกนอล (hexagonal) ที่มีสมบัติเป็นแอนไอโซโทรปิก เนื่องจากแสงโพลาไรซ์เป็นแสงที่มีความยาวคลื่นเดียว และการสั่นของคลื่นระนาบเดียว เกิดจากการผ่านแสงธรรมดา มีการสั่นของคลื่นหลายระนาบ ไปยังโพลาไรเซอร์ซึ่งมีหน้าที่กรองแสงให้ออกมาเป็นลำแสงที่มีการสั่นในระนาบเดียว (หลักการทำงานของโพลาไรเซอร์ แสดงดังรูปที่ 2.10) โดยตัวอย่างที่เป็นไมโครอิมัลชันจะมีสมบัติไอโซโทรปิก คือมีสมบัติเหมือนกันในทุกทิศทาง เนื่องจากอนุภาคที่กระจายอยู่

ด้านในมีลักษณะเป็นทรงกลม ดังนั้นเมื่อส่องด้วยแสงโพลาไรซ์จึงไม่มีส่วนใดที่หักเหแสง โพลาไรซ์ ทำให้ภาพที่เห็นมีลักษณะมีดสนิท แต่ตัวอย่างที่เป็นแอนไอโซโทรปิก เช่น ผลึกเหลว อนุภาคที่มีลักษณะเหมือนท่อ (rodlike) หรืออนุภาคที่มีลักษณะเหมือนจาน (disklike) เป็นต้น ทำให้เมื่อทำการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ จะพบว่ามีส่วนที่หักเหแสงโพลาไรซ์ (Prince, 1977) และเมื่อแสงโพลาไรซ์ไปกระทบกับผลึกเหลวซึ่งมีสมบัติการหักเหสองแนว (Birefringence) คือ เมื่อแสงมาตกกระทบวัตถุแล้วเกิดการหักเหผ่านวัสดุตัวกลางแล้วรังสีแยกเป็นสองเส้น ประกอบกับแสงมีสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเมื่อเคลื่อนที่ผ่านวัสดุแอนไอโซโทรปิก จะทำให้แสงเกิดแยกออกเป็นสองส่วนซึ่งทำให้แสงโพลาไรซ์เกิดการบิดบนระนาบ ส่งผลให้ภาพที่เห็นมีลักษณะวาวแวว (www.vchakarn.com)



รูปที่ 2.10 หลักการทำงานของโพลาไรเซอร์ (www.vchakarn.com)

2. การวัดความหนืด

เมื่อหยดสารที่กระจายตัวอยู่ในไมโครอิมัลชันมีปริมาตรมากขึ้น ค่าความหนืดที่วัดได้จะมีค่ามากขึ้น และค่าความหนืดเปลี่ยนไปยังแสดงถึงโครงสร้างของไมโครอิมัลชันที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การเพิ่มสัดส่วนโดยปริมาตรของน้ำ จะทำให้ความหนืดของระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันมีค่ามากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มปริมาณน้ำทำให้ขนาดของหยดสารที่กระจายตัวอยู่มีค่าเพิ่มขึ้น

3. การวัดค่าการนำไฟฟ้า

ค่าการนำไฟฟ้าสามารถบอกได้ว่าระบบไมโครอิมัลชันที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีวัฏภาคที่ต่อเนื่องเป็นน้ำหรือน้ำมัน หากวัดได้ค่าการนำไฟฟ้าใกล้เคียงกับน้ำแสดงว่าเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ เนื่องจากน้ำสามารถนำกระแสไฟฟ้าได้ ถ้าไม่มีการนำไฟฟ้าหรือการนำไฟฟ้ามีค่าต่ำแสดงว่าเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน เนื่องจากน้ำมันซึ่งเป็นวัฏภาคคนอกไม่นำกระแสไฟฟ้า (Djordjevic และคณะ, 2004)

4. การทดสอบเสถียรภาพ

สามารถทดสอบเสถียรภาพของไมโครอิมัลชันที่ได้โดยการนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง (centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 60000g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (พรธมนเพ็ญ, 2540) หากระบบไม่มีเสถียรภาพ จะเกิดการแยกชั้น (Djordjevic และคณะ, 2004)

5. การเจือจางด้วยวัฏภาคกระจายตัว

สามารถตรวจสอบชนิดของระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้นว่าเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ หรือน้ำในน้ำมัน โดยการเจือจางด้วยวัฏภาคน้ำและน้ำมัน ปริมาณเท่ากับตัวอย่าง หากเจือจางด้วยน้ำแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจัดเป็นไมโครอิมัลชันเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ ส่วนตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำมันแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจัดเป็นไมโครอิมัลชันเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน

ส่วนวิธีทดสอบในระดับจุลภาคมีดังนี้

1. Dynamic light-scattering (DLS)

เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจวัดขนาดของอนุภาค สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้วิเคราะห์ขนาดของหยดสารที่กระจายตัวอยู่ในไมโครอิมัลชัน อนุภาคที่อยู่ในสารแขวนลอยจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารทำให้เกิดการเคลื่อนที่แบบสุ่ม โดยปริมาณการเคลื่อนที่ของอนุภาคถูกคำนวณด้วยความหนืดและอุณหภูมิของสารแขวนลอย และขนาดของอนุภาค ดังนั้นจึงสามารถทราบค่าของขนาดได้เมื่อทราบค่าความหนืดและอุณหภูมิของสารแขวนลอย (พรรณทิพย์, 2006)

2. Small-Angle Neutron Scattering (SANS)

หรือเทคนิคการกระเจิงนิวตรอนแบบมุมแคบ ให้ข้อมูลเกี่ยวข้องกับขนาด รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลโดยเฉลี่ย ใช้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของไมโครอิมัลชัน โดยอาศัยการวิเคราะห์สัดส่วนโดยปริมาตร (volume fraction) ของสารลดแรงตึงผิวต่อปริมาตรทั้งหมด เช่น การศึกษาอิทธิพลของความดันและอุณหภูมิที่มีผลต่อลักษณะโครงสร้างของไมโครอิมัลชัน (Nagao และคณะ, 1998)

3. Freeze-fracture transmission electron microscope (FFTE)

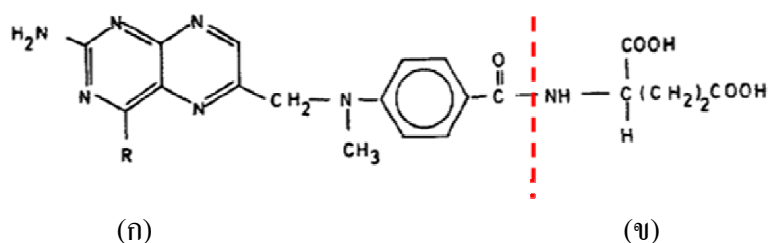
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน ใช้หลักการให้ลำแสงอิเล็กตรอนส่งทะลุผ่านตัวอย่างที่มีความหนาประมาณ 70 นาโนเมตร ทำให้สามารถมองเห็นรายละเอียดต่างๆ ภายในชิ้นงานตัวอย่างได้ชัดเจน สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้ศึกษาลักษณะภาคตัดขวางของชิ้นงานตัวอย่าง และศึกษาขนาดและลักษณะของหยดสารที่กระจายตัวอยู่ในไมโครอิมัลชันอย่างคร่าวๆ (Xie และคณะ, 2006)

2.3 เมโทเทรกเซต (Methotrexate)

เมโทเทรกเซต (Methotrexate) เป็นยาเคมีบำบัดชนิดหนึ่ง ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ร่างกาย มักนิยมใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) โรคเอดส์ และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) เป็นต้น โดยเซลล์ที่แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว จะไวต่อยานี้เป็นพิเศษ ได้แก่ เซลล์มะเร็ง เซลล์ไขกระดูก เซลล์ผิวหนัง เซลล์เยื่อในปาก เซลล์เยื่อบุลำไส้ และเซลล์เยื่อ

กระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น (โกวิท, 2543) การใช้ยาชนิดนี้รักษาโรคอื่นที่ไม่ใช่มะเร็ง ต้องใช้ในกรณีที่ใช้ยาอื่นรักษาแล้วไม่ได้ผลเท่านั้น (พิสิฐ, 2546) การให้ยามักใช้วิธีการรับประทาน แต่ยาชนิดนี้ที่มีผลข้างเคียงอย่างมากเช่น ทำให้รู้สึกปวดศีรษะและเหนื่อยง่าย สามารถกระตุ้นให้เกิดโรคปอดทำลายเซลล์บางชนิดเช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว และยังเป็นพิษต่อดับและไตอย่างรุนแรง ดังนั้นในการใช้ยาชนิดนี้เพื่อรักษาอาการเจ็บป่วยทางผิวหนังควรให้ยาที่ผิวหนังโดยตรงเพื่อลดผลข้างเคียงของยา (Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez, 2001)

เมโรเทรกเซตมีชื่อทางเคมีคือ N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridiny)methyl]methyl amino]benzoyl]-l-glutamic acid โดยมีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.9 และมีสูตรทางเคมีคือ $C_{20}H_{22}N_8O_5$ เมโรเทรกเซตมีชื่อทางการค้ามากมายเช่น amethopterin, antifolan, emtexate, ledertrexate, metatrexan, rheumatrex methylaminopterin, mexate เป็นต้น



รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของเมโรเทรกเซต โดย R=NH₂

(ก) ส่วน pteric acid และ (ข) ส่วน glutamic acid (Kreilgard และคณะ, 1982)

สมบัติบางประการของเมโรเทรกเซต (www.chemicaland21.com)

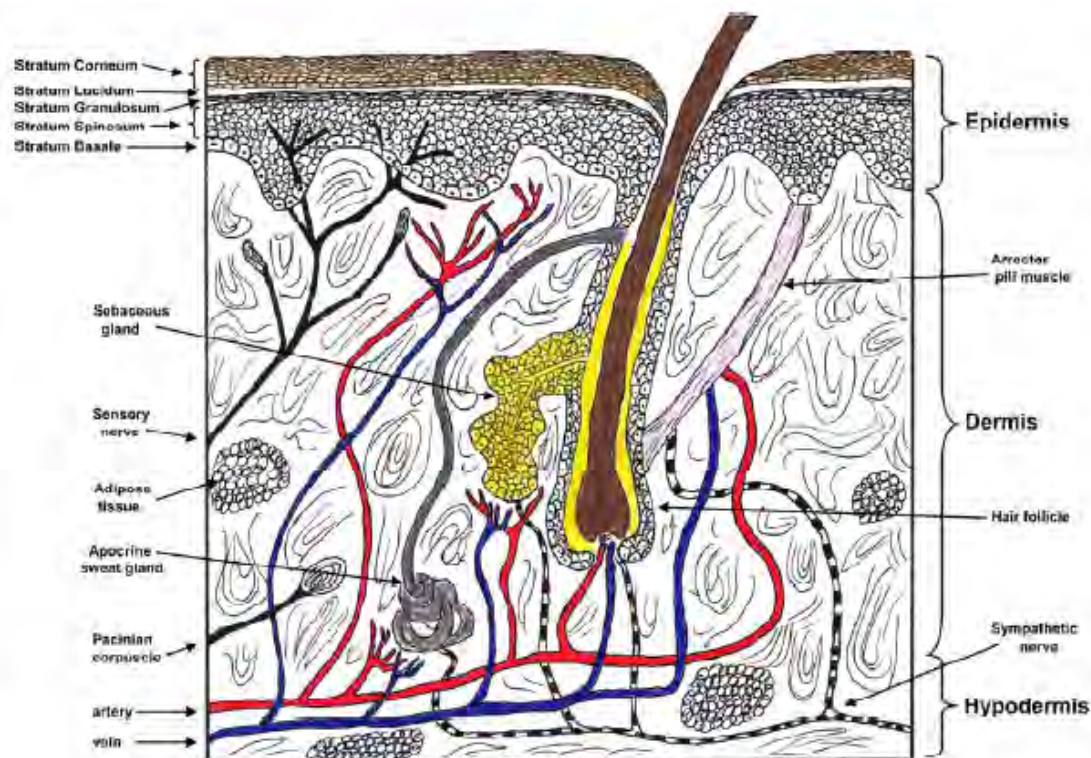
ลักษณะ	เป็นผงสีเหลือง
น้ำหนักโมเลกุล	454.44 g/mol
จุดหลอมเหลว	195 °C
ความสามารถในการละลายน้ำ	2600 mg/L
ความมีเสถียรภาพ	มีเสถียรภาพภายใต้สภาวะปกติ แต่ไวต่อแสง
ผลข้างเคียงของยา	มีผลข้างเคียงรุนแรงต่อไขกระดูก ดับ และไต

2.4 ระบบนำส่งยาทางผิวหนัง (Transdermal Drug Delivery Systems)

ผิวหนังแบ่งออกเป็น 3 ชั้น โดยชั้นแรกคือ epidermis ประกอบด้วยส่วนต่างๆ เช่น stratum corneum ซึ่งค่อนข้างชอบไขมัน ชั้นถัดมาคือ dermis ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งแทรกตัวกับระบบประสาท หลอดเลือดและระบบน้ำเหลือง นอกจากนี้ยังประกอบด้วยรูขุมขน (hair follicle) ต่อมเหงื่อ (sweat gland) และต่อมไขมัน (sebaceous gland) ซึ่งเป็นทางที่ยาสามารถถูกขน

ส่งผ่านได้ ผิวหนังชั้นในสุดคือ hypodermis ซึ่งเป็นชั้นของไขมันใต้ผิวหนัง (subcutaneous fat) (Nitti และคณะ, 2005) โครงสร้างของผิวหนังแสดงดังรูปที่ 2.10

ระบบนำส่งยาทางผิวหนังที่มีการใช้กันอยู่คือในรูปสารละลาย เจล ขี้ผึ้ง ครีม โลชัน มียาหลายชนิดที่นำส่งด้วยวิธีนี้ เช่น ยาดทาการปวดอักเสบ ยารักษาความดันโลหิตสูง ยาเลิกบุหรี่ เป็นต้น ในการแบ่งประเภทของระบบนำส่งยาทางผิวหนัง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของผิวหนัง (Mills และ Cross, 2006)

1. ระบบที่ควบคุมการปลดปล่อยยาด้วยเมมเบรน ระบบนี้จะมีส่วนที่เป็นแหล่งเก็บตัวยายู่ภายใน ซึ่งตัวยาดังกล่าวจะแพร่ผ่านเมมเบรน ซึ่งควบคุมอัตราการแพร่ของตัวยากจากภายในไปยังบริเวณผิวหนังที่จะมีการดูดซึมตัวยา ข้อดีของระบบนี้คือสามารถควบคุมให้อัตราการปลดปล่อยตัวยาค่อนข้างคงที่ แต่มีข้อเสียที่สำคัญคือหากเมมเบรนที่ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยตัวยามีขนาดตัวยจะถูกปลดปล่อยออกมาเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งอาจทำให้เกิดพิษของยาขึ้นได้

2. ระบบที่ควบคุมการปลดปล่อยยาด้วยเมทริกซ์ ระบบนี้ตัวยาละลายหรือกระจายตัวอยู่ในพอลิเมอร์เมทริกซ์ โดยการปลดปล่อยตัวยากจากเมทริกซ์จะมีลักษณะคงที่ ถ้าความเข้มข้นของตัวยาทึ่ละลายในพอลิเมอร์เมทริกซ์ยังคงอิ่มตัวตลอดเวลา

ส่วนระบบนำส่งยาทางผิวหนังอื่นๆ มีหลักการคล้ายกับ 2 หลักการดังกล่าวข้างต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านผิวหนัง (Chein,1982; Govil, 1988)

1. ความเข้มข้นของยา เป็นปัจจัยสำคัญที่สุด โดยปริมาณของยาที่ถูกดูดซึมผ่านผิวหนังต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ต่อหนึ่งหน่วยเวลาจะเพิ่มขึ้น ถ้าความเข้มข้นของยาเพิ่มขึ้น
2. ความกว้างของบริเวณที่ทายา
3. คุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของยา
4. เวลาในการทายา หากถุนานๆ ยาก็จะมีการดูดซึมดี
5. บริเวณที่มีชั้น stratum corneum บาง เช่น ผิวหนังบริเวณหลังหู จะถูกดูดซึมได้มากกว่า บริเวณที่มีชั้น stratum corneum หนา

ข้อดีของการนำส่งยาทางผิวหนัง ได้แก่ (Gale, 1999; Guy, 1996; Delgado-Charro และ Guy, 2001)

1. สามารถหลีกเลี่ยงการทำลายยาจากเอนไซม์หรือกรดต่างในทางเดินอาหาร
2. ลดความแปรปรวนของระดับยาในกระแสโลหิต
3. ทำให้ระดับยาคงที่ในระดับที่ให้การรักษา และลดอาการข้างเคียงของยา
4. ทำให้ยาออกฤทธิ์นานจึงลดจำนวนครั้งของการทายา ซึ่งช่วยเพิ่มความสะดวกในการใช้ยาหรือหยุดยาของผู้ป่วย และช่วยลดต้นทุนในการใช้ยา

ข้อจำกัดของการนำส่งยาทางผิวหนัง ได้แก่ (Delgado-Charro และ Guy, 2001)

1. ใช้ได้กับยาที่มีฤทธิ์แรงและควรมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีที่เหมาะสม เช่นมีการละลายที่เพียงพอทั้งในสิ่งแวดล้อมที่เป็นไขมันและน้ำ เพื่อให้สามารถละลายและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายเพื่อเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตได้ โดยสามารถผ่านส่วน stratum corneum ซึ่งมีคุณสมบัติค่อนข้างชอบไขมัน และผ่านส่วนที่มีความชอบน้ำสูงคือ viable epidermis และ upper dermis
2. ไม่เหมาะสำหรับยาที่สามารถระคายเคืองผิวหนังหรือก่ออาการแพ้ได้

บทที่ 3 ตรวจเอกสาร

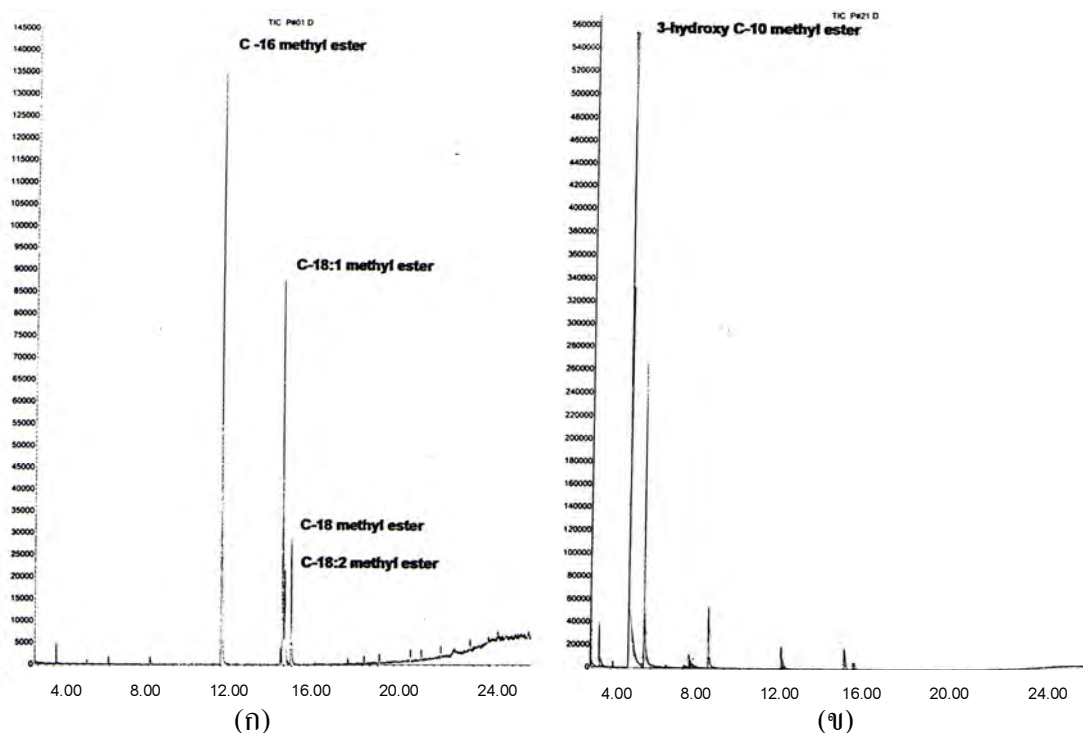
งานวิจัยนี้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* โดยใช้ไขมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน และขั้นตอนการผลิต เช่นเดียวกับ จิราภรณ์และคณะ (2004) ซึ่งได้ศึกษาโครงสร้างและสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ ดังหัวข้อ 3.1 และเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวมีทั้งชนิดมีประจุและชนิดไม่มีประจุ ซึ่งมีสมบัติที่แตกต่างกัน สารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิดจึงมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชันแตกต่างกัน และเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุ ผู้เขียนจึงขอกว่าถึงการตรวจเอกสารเรื่องปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุเท่านั้น ดังแสดงในหัวข้อ 3.2 และยังมีการศึกษางานวิจัยที่ใช้แรมโนลิปิดเป็นส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน การใช้ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนัง และระบบนำส่งยาสำหรับขามโรคเรื้อรัง ดังแสดงในหัวข้อ 3.3, 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

3.1 การศึกษาโครงสร้างและสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด

3.1.1 การศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด

จากงานวิจัยของจิราภรณ์และคณะ (2004) ได้ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas sp.A41* โดยใช้ไขมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดแยกโดยทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแยกส่วนที่ละลายในน้ำและส่วนที่ละลายในไขมันออกจากกัน แล้วแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็นสองส่วน ได้แก่

ส่วนแรกคือการวิเคราะห์ส่วนที่ละลายในไขมัน โดยนำมาเตรียมให้เป็นอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ซึ่งเมื่อเริ่มต้นการทดลองจะได้โครมาโตแกรมดังรูป 3.1 (ก) ซึ่งแสดงพีคของกรดไขมันที่อยู่ในน้ำมันปาล์ม เมื่อเวลาในการเลี้ยงเชื้อผ่านไป กรดไขมันต่างๆ จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ในรูป 3-hydroxyl C10 methyl ester (3OH-C10:0) มากขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลองจะได้โครมาโตแกรมดังรูป 3.1 (ข) นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบสาร 3-hydroxy octanoic acid (3OH-C8:0), 3-hydroxydodecenoic acid (3OH-C12:1), 3-hydroxydodecanoic acid (3OH-C12:0) ร่วมด้วย เป็นการยืนยันการเกิดสารไกลโคลิปิดได้อย่างชัดเจน



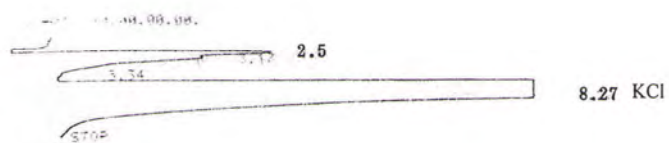
รูปที่ 3.1 โครมาโตแกรม GC-MS (ก) ที่เวลาเริ่มต้น (ข) ที่เวลา 72 ชั่วโมง
(จิราภรณ์และคณะ, 2004)

ส่วนที่สองคือการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลแรมโนสด้วยวิธี HPLC ซึ่งเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน มาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าไม่สามารถตรวจพบพีคของน้ำตาลแรมโนสได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในโครมาโตแกรมในรูปที่ 3.2 (ข) ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากการทำไฮโดรไลซิสด้วยกรด ทำให้น้ำตาลบางส่วนเปลี่ยนโครงสร้างไป ทำให้ไม่สามารถตรวจพบพีคของน้ำตาลแรมโนส ซึ่งเกิดในทำนองเดียวกับโครมาโตแกรมของน้ำตาลแรมโนสมาตรฐานที่ผ่านการไฮโดรไลซิส ดังรูป 3.2 (ค)

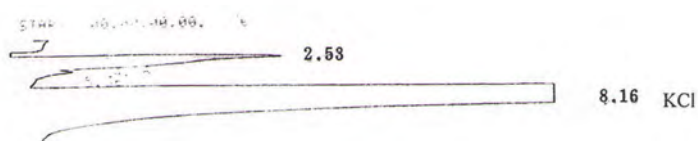
จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ไม่สามารถบ่งบอกได้อย่างชัดเจนว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นแรมโนลิปิด จึงต้องทำการวิเคราะห์หาน้ำตาลแรมโนสซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของแรมโนลิปิด โดยการเปรียบเทียบยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตได้ กับสเปกตรัมของน้ำตาลแรมโนส ดังรูปที่ 3.3 จะเห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 398.12 nm ส่วนน้ำตาลแรมโนสดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 399.81 nm แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีน้ำตาลแรมโนสเป็นองค์ประกอบ



(ก)

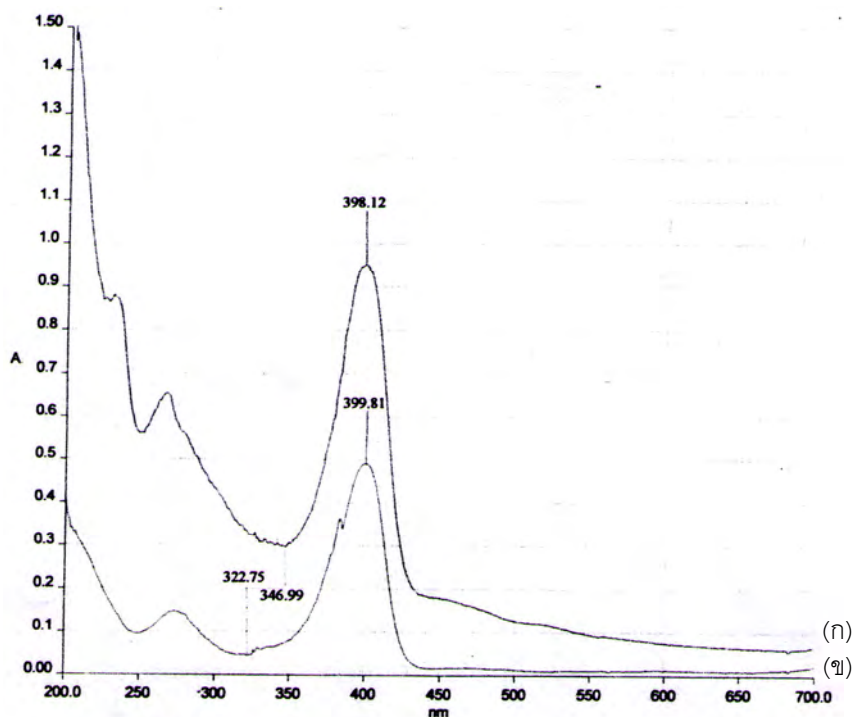


(ข)



(ค)

รูปที่ 3.2 โครมาโตแกรม HPLC (ก) น้ำตาลแรมโนสมมาตรฐาน (ข) น้ำตาลแรมโนสมมาตรฐานที่ผ่านการไฮโดรไลซิส (ค) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน ที่ผ่านการไฮโดรไลซิส (จิรากรณ์และคณะ, 2004)



รูปที่ 3.3 ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัม (ก) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน และ (ข) น้ำตาลแรมโนส (จิรากรณ์และคณะ, 2004)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Pornsunthorntaweec และคณะ (2007) ผลิตสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดจาก จุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa strain SP4* โดยใช้ไขมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการศึกษาโครงสร้างของแรมโนลิปิดที่ผลิตขึ้น โดยเริ่มจากการใช้เครื่อง HPLC-ELSD (evaporative light scattering detector) เพื่อแยกองค์ประกอบต่างๆของแรมโนลิปิดออกมา พบว่ามีองค์ประกอบหลักอยู่ 6 ส่วน จากนั้นใช้เทคนิค ATR-FTIR (attenuated total reflectance - fourier transform infrared spectroscopy) ร่วมกับ ^1H NMR (nuclear magnetic resonance analysis) และ mass spectrometry เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างขององค์ประกอบทั้ง 6 ส่วนที่ได้ ซึ่งองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด

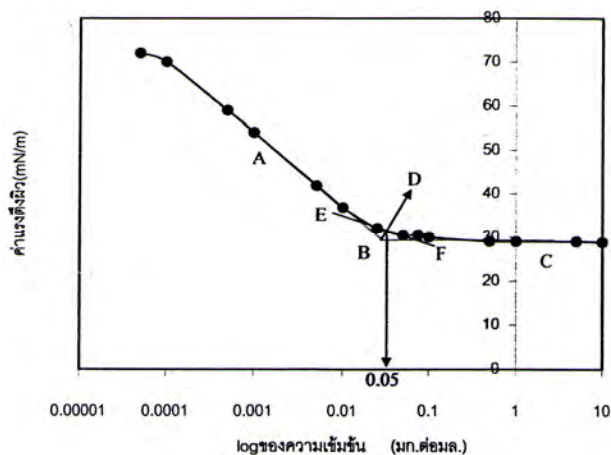
Fraction	Retention time (min)	Peak area (%)	Chemical structure	MW
A	4.68	0.68	Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀ Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	622
B	14.58	1.54	Rha-C ₈ -C ₁₀ Rha-C ₁₀ -C ₈	476
C	19.38	73.48	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	504
D	22.25	9.55	Rha-C ₁₀ -C _{12:1} Rha-C _{12:1} -C ₁₀	530
E	25.12	13.55	Rha-C ₁₀ -C ₁₂ Rha-C ₁₂ -C ₁₀	532
F	29.62	1.39	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{14:1} Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₂	604

จากตารางที่ 3.1 จะเห็นว่าองค์ประกอบหลักของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดที่ผลิตได้คือ Rha-C₁₀-C₁₀ ซึ่งมีปริมาณ 73.48 % ขององค์ประกอบทั้งหมด

จากทั้งสองงานวิจัยที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งใช้จุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกับที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จะพบว่าโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วคือน้ำตาลแรมโนส 1 โมเลกุล เชื่อมต่อกับส่วนที่ไม่มีขั้ว คือ 3-hydroxyl C10 methyl ester (3OH-C10:0) 2 โมเลกุล

3.1.2 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด

สามารถศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ โดยวัดค่าแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้ววาดกราฟระหว่างความเข้มข้นและค่าแรงตึงผิว เพื่อหาความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ ได้กราฟดังรูปที่ 3.4 จะเห็นว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้มีค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์เท่ากับ 50 mg/l



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าแรงตึงผิว (จิราภรณ์และคณะ, 2004)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Zhang และ Miller (1992) ทำการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ของสารละลายแรมโนลิปิดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 พบว่ามีค่าเท่ากับ 40 mg/l ส่วน Clifford และคณะ (2007) ทำการทดสอบโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกัน พบว่ามีค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์เท่ากับ 30 mg/l ส่วน Nitschke และ Costa (2005) ได้เตรียมสารละลายแรมโนลิปิดในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่ามีค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์อยู่ระหว่าง 10-230 mg/l

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไมโครอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุ

3.2.1 อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิว

การใช้สารลดแรงตึงผิวมากกว่า 1 ชนิดผสมกัน อาจทำให้ได้ประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวเพียงชนิดเดียว โดยอาจผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุบวกกับสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุลบ หรืออาจผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุกับสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ เช่น การเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุปริมาณเล็กน้อยลงไปในไมโครอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ จะช่วยเพิ่มปริมาณของน้ำที่ละลายอยู่ในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันได้ แต่จะไม่ค่อยมีผลต่อปริมาณของน้ำมันที่ละลายอยู่ในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ แต่การเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุจะทำให้ได้ของเหลวที่มีความหนืดมากขึ้น และเมื่อมี

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุสูงจะไม่เกิดไมโครอิมัลชัน แต่จะมีโครงสร้างเป็นผลึกของเหลว ซึ่งการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุลงไปทำให้ต้องใช้สารลดแรงตึงผิวรวมปริมาณมากขึ้นเพื่อปรับปรุงค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วของโมเลกุล สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$HLB_{AB} = \frac{(HLB_A * W_A + HLB_B * W_B)}{(W_A + W_B)} \quad (3.2.1-1)$$

โดย W_A คือ ปริมาณของสารลดแรงตึงผิว A

W_B คือ ปริมาณของสารลดแรงตึงผิว B (Rodriguez และคณะ, 2003)

จากงานวิจัยที่ศึกษาในระบบไมโครอิมัลชันที่ผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกและประจุลบ พบว่ามี 2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการละลายและพฤติกรรมวิทยาภาคได้แก่ อัตราส่วนในการผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกและประจุลบ และการเติมสารลดแรงตึงผิวร่วม ซึ่งจากการผสมสารลดแรงตึงผิวโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulphate, SDS) และ โดเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (dodecyltrimethylammonium bromide, DTAB) ในระบบที่ประกอบด้วย โดเดเคน (dodecane) / สารละลายโซเดียมโบรไมด์ (NaBr aqueous) / เฮกซะนอล (hexanol) พบว่ามีปริมาณการละลายของน้ำมันและน้ำในไมโครอิมัลชันมากขึ้น (Li และ Kunieda, 2003)

3.2.2 อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวร่วม

Li และ Kunieda (2003) ศึกษาพบว่าระบบที่ไม่มีสารลดแรงตึงผิวร่วม จะมีปริมาณการละลายของน้ำมันและน้ำในไมโครอิมัลชัน ต่ำกว่าระบบที่เติมสารลดแรงตึงผิวร่วมลงไป ซึ่งการเติมแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่สั้นลงไปจะช่วยปรับความโค้งระหว่างผิวสัมผัสและช่วยปรับปรุงค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิว และจากงานวิจัยของ Binks และคณะ (2003) ศึกษาพฤติกรรมวิทยาภาคของระบบที่ประกอบด้วย ไดเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (dimethyl ammoniumchloride, 2HT) / สควอลีน (squaline, 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane) / 0.4 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ โดยเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวร่วมได้แก่ โพรพานอล บิวทานอล และไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ พบว่าแอลกอฮอล์สายโซ่ตรงคือ โพรพานอล และ บิวทานอล มีประสิทธิภาพต่ำกว่าแอลกอฮอล์สายโซ่กิ่งคือไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ โดยบิวทานอลมีประสิทธิภาพต่ำที่สุดเนื่องจากมีขั้วไม่เพียงพอที่จะช่วยให้ระบบเกิดเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ

เมื่อต้องการเพิ่มปริมาณการละลายของน้ำมันในไมโครอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ สามารถทำได้โดยการเติมแอลกอฮอล์สายโซ่ยาว ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความชอบไขมันของระบบ (Szekeres และคณะ, 2006)

3.2.3 อิทธิพลของน้ำมัน

น้ำมันมีผลต่อพฤติกรรมวิทยาของระบบ ซึ่งจากการศึกษาที่ประกอบด้วย โดเดซิลแอมโมเนียมคลอไรด์ / ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ / โซเดียมคลอไรด์ โดยใช้ไขมันชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกซะเดเคน, โดเดเคน และสควอลีน พบว่าเมื่อลดความยาวสายโซ่ของน้ำมัน จะต้องใช้แอลกอฮอล์ปริมาณมากขึ้นในการทำให้ระบบเกิดเป็นไมโครอิมัลชัน (Binks และคณะ, 2003) สามารถเพิ่มปริมาณการละลายของน้ำมันที่ไม่มีขั้วในไมโครอิมัลชันได้โดยการเติมแอลกอฮอล์สายโซ่ยาวลงไป เช่นระบบของ ลิโมนิน (limonene) / โซเดียมไดเฮกซิลซัลโฟซักซิเนต (Sodium dihexyl sulfosuccinate) / น้ำเกลือ (salinity) ซึ่งลิโมนินเป็นน้ำมันที่ไม่มีขั้ว เมื่อเติมโดเดคานอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์สายโซ่ยาวลงไป พบว่ามีปริมาณลิโมนินที่ละลายในไมโครอิมัลชันมากขึ้น แต่หากความเข้มข้นของโดเดคานอลสูงเกินไป (อัตราส่วนโดยปริมาตรมากกว่า 0.2) จะลดปริมาณการละลายของลิโมนิน (Szekeres และคณะ, 2005)

และเนื่องจากมีงานวิจัยที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุในการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันต่อการเกิดไมโครอิมัลชันไม่มากนัก จึงขอกำหนดงานวิจัยที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุในการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันต่อการเกิดไมโครอิมัลชัน ดังนี้

Garti และคณะ (1995) พบว่าลักษณะโครงสร้างและความยาวสายโซ่ของน้ำมัน มีผลต่อขนาดของหยดอนุภาคที่อยู่ในไมโครอิมัลชัน โดยจากการศึกษาเปรียบเทียบน้ำมันระหว่าง เดเคน, โดเดเคน, เตตระเดเคน และเฮกซะเดเคน ในระบบของ Brij 76 (polyoxyethylene 10 stearyl ether) / บิวทานอล / น้ำ / น้ำมัน พบว่าการเพิ่มความยาวสายโซ่ของน้ำมัน จะทำให้มีปริมาณน้ำที่ละลายอยู่ในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันมากขึ้น แสดงว่าหยดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ Bayrak และ Iscan (2005) ศึกษาอิทธิพลของความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนต่อความจุของการเกิดอิมัลชัน โดยใช้ระบบที่ประกอบด้วย Triton X-100 (Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether) / บิวทานอล / น้ำ / น้ำมัน พบว่าการเพิ่มความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (เฮกเซน, เฮปเทน, ออกเทน และเดเคน) จะทำให้ความจุของการเกิดอิมัลชัน (emulsion capacity) ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยการใช้เฮกเซนจะทำให้ได้พื้นที่เกิดหนึ่งวัฏภาคมากที่สุด และเนื่องจาก Triton X-100 ละลายได้ดีในไฮโดรคาร์บอนที่มีสายโซ่สั้น ดังนั้นการเพิ่มความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนจะทำให้ความเข้มข้นของ Triton X-100 ในวัฏภาคน้ำมันลดลง

Warisnoicharoen และคณะ (2000) ศึกษาระบบไมโครอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ ได้แก่ polyoxyethylene-10-dodecyl ether, polyoxyethylene-10-oleyl ether, *N,N*-dimethyldodecylamine-*N*-oxide และ *N,N*-dimethyloleyleamine-*N*-oxide กับน้ำมันที่ใช้ทางเภสัชกรรมหลากหลายชนิดซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท โดยประเภทแรกคือเอทิลเอสเทอร์ ได้แก่ เอทิลบิวทีเรต (ethyl butyrate), เอทิลคาพริเลต (ethyl caprylate), เอทิลโอเลอเตต (ethyl oleate) และน้ำมันประเภทที่สองคือไตรกลีเซอไรด์ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง, Miglyol 812 และ tributyrin พบว่าน้ำมันที่มีสายโซ่เดียว (เอทิลเอสเทอร์) สามารถละลายได้ดีกว่าน้ำมันที่มีสามสายโซ่ (ไตรกลีเซอไรด์) และในน้ำมันที่อยู่ในประเภทเดียวกันนั้น น้ำมันที่มีสายโซ่สั้นจะสามารถละลายได้ดีกว่าน้ำมันที่มีสายโซ่ยาว

3.2.4 อิทธิพลของสภาวะที่ใช้ในการเกิดไมโครอิมัลชัน

3.2.4.1 อิทธิพลของอุณหภูมิ

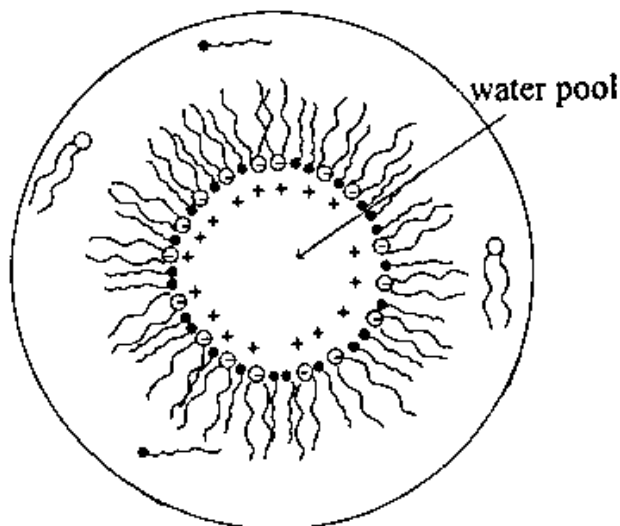
อุณหภูมิมีผลต่อค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุจะได้รับอิทธิพลจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ดังนั้นการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุปริมาณเล็กน้อยลงไปไมโครอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุจะช่วยลดความว่องไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ (Rodriguez และคณะ, 2003)



3.2.5 อิทธิพลของสารเติมแต่ง

การเติมสารเติมแต่งเช่น บัฟเฟอร์ อีเล็กโตรไลต์ และยา เป็นต้น มีผลต่อโครงสร้างและเสถียรภาพของไมโครอิมัลชัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุจะได้รับผลจากสารเติมแต่งมากกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Kreilgaard, 2002) การเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงไปจะช่วยให้มีปริมาณของน้ำและน้ำมันที่ละลายอยู่ในไมโครอิมัลชันมากขึ้น และสารลดแรงตึงผิวมีการยึดเกาะอยู่ที่บริเวณพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันมากขึ้น (Li และ Kunieda, 2003)

Khoshkbarchi และ Vera (1995) ศึกษาอิทธิพลของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ (anionic surfactant) 3 ชนิด ได้แก่ bis (2,4,4-trimethylpentyl) sodium phosphinate (NaPOO), bis (2,4,4-trimethylpentyl) sodium monothiophosphinate (NaPSO), และ bis (2,4,4-trimethylpentyl) sodium dithiophosphinate (NaPSS) โดยใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมคือเพนทานอล น้ำมันที่ใช้คือไอโซออกเทน และใช้ส่วนน้ำคือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-300 มิลลิโมลาร์ ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3.5 พบว่าปริมาณน้ำในไมโครอิมัลชันลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากการเพิ่มความแรงของประจุ (ionic strength) ในไมโครอิมัลชัน และเกิดการผลักกันระหว่าง

ส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวที่พื้นที่ผิวสัมผัสของน้ำและน้ำมัน ทำให้ส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวรวมตัวกันได้ลดลง ไมโครอิมัลชันจึงมีขนาดเล็กกลง ส่งผลให้ปริมาณน้ำไมโครอิมัลชันที่บรรจุได้ลดลง



รูปที่ 3.5 การจัดเรียงตัวของโมเลกุลในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน โดย  คือ โมเลกุลสารลดแรงตึงผิว และ  คือ โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวร่วม (Khoshkbarchi และ Vera, 1995)

Mitra และ Paul (2005) ศึกษาปริมาณน้ำที่ละลายในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ของระบบที่ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุลบ คือ sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) และสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ได้แก่ Brij-30, Brij-35, Brij-52, Brij-56, Brij-58, Brij-76, Tween-20, Tween-40, Span-20, Span-40, Span-60, Span-80 โดยใช้ส่วนน้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต พบว่าปริมาณน้ำที่ละลายได้ในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ขึ้นอยู่กับสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ขนาดโมเลกุล และอัตราส่วนของการผสมกันของสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุและไม่มีประจุ ซึ่งจะส่งผลต่อส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว และยังพบว่าการเติมอีเล็กโตรไลต์ (สารละลายโซเดียมคลอไรด์) ลงในระบบเป็นการช่วยเพิ่มความจุของน้ำที่ละลายได้ในไมโครอิมัลชัน แต่หากเติมปริมาณมากเกินไป จะทำให้ปริมาณน้ำที่ละลายในไมโครอิมัลชันลดลง ซึ่งปริมาณสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิด และนอกจากนี้การเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ยังช่วยเพิ่มเสถียรภาพทางความร้อนของระบบนี้อีกด้วย

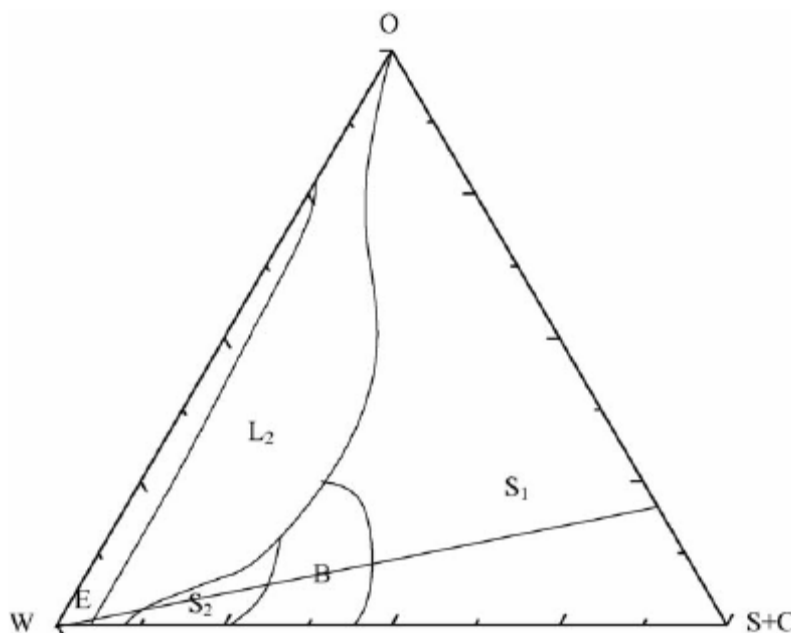
นอกจากนี้ Polizelli และคณะ (2008) ศึกษาาระบบที่ประกอบด้วย น้ำมันถั่วเหลือง/AOT/น้ำกลั่น พบว่าไม่สามารถเกิดไมโครอิมัลชัน และการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ สามารถทำให้เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันในแผนภาพวัฏภาคได้ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-11% โดยน้ำหนัก จะทำให้ได้บริเวณของไมโครอิมัลชันมากขึ้น เพราะการเพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นสารที่แตกตัวได้ จะส่งผลต่อค่าความแรงของประจุภายในไมโครอิมัลชันเพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ค่า a_0 (พื้นที่ของส่วนหัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว) ในสมการอัตราส่วนการรวมตัวมีค่าลดลง (สมการที่ 2.2.3-1) แสดงว่าสารลดแรงตึงผิว AOT มีการรวมตัวกันได้ดีขึ้น จึงเกิดเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันมากขึ้น เช่นเดียวกับระบบของ α -olefin sulfonate/โตนาคานอล/น้ำ การเพิ่มความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-2.0 % จะช่วยให้ได้บริเวณของไมโครอิมัลชัน 1 วัฏภาคในแผนภาพวัฏภาคมากขึ้น (Nedjhioui และคณะ, 2007)

3.3 ไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด

จากการที่มีความสนใจใช้งานไมโครอิมัลชันที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในงานด้านต่างๆ มากมาย เช่น การทำความสะอาด อุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมยา เป็นต้น แต่ยังมีการศึกษาพฤติกรรมวัฏภาคของระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่มากนัก จากการศึกษาพบว่ามีเพียง 2 งานวิจัยที่ศึกษาาระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด โดย Xie และคณะ (2004) ศึกษาพฤติกรรมวัฏภาคของระบบที่ประกอบด้วยแรมโนลิปิด / แอลกอฮอล์ / เฮปแทน / น้ำ โดยเปรียบเทียบแอลกอฮอล์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม 6 ชนิด ได้แก่ โพรพานอล บิวทานอล เพนทานอล เฮกซะนอล เฮปทานอล และออกทานอล โดยสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ต่างกันจะมีผลต่อค่า HLB ของสารผสม โดยควบคุมอัตราส่วนโดยมวลของแอลกอฮอล์ต่อแรมโนลิปิดคงที่เท่ากับ 2/1 และเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำและน้ำมันที่เติมลงไป เพื่อให้สารตัวอย่างผสมกันอย่างสมบูรณ์ แล้วตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเข้าสู่สมดุลโดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้น พบว่าสารลดแรงตึงผิวร่วมทั้ง 6 ชนิดสามารถทำให้เกิดไมโครอิมัลชันชนิด 1 วัฏภาคและ 2 วัฏภาคได้ โดยบิวทานอลสามารถทำให้เกิดไมโครอิมัลชันชนิด 1 วัฏภาคเป็นบริเวณกว้างที่สุด และมีค่า HLB ของระบบที่เหมาะสมเท่ากับ 12.0-12.7 และยังพบว่ามีแอลกอฮอล์ 4 ชนิดที่ทำให้เกิดผลึกของเหลว (liquid crystal) คือ เพนทานอล เฮกซะนอล เฮปทานอล และออกทานอล ส่วนการใช้โพรพานอลไม่เกิดผลึกเหลว เนื่องจากมีสายโซ่สั้น จึงมีความต้านทานน้อย

Xie และคณะ (2006) ศึกษาาระบบไมโครอิมัลชันซึ่งประกอบด้วย แรมโนลิปิด / บิวทานอล / น้ำ / เฮปแทน โดยควบคุมอัตราส่วนโดยมวลของบิวทานอลต่อแรมโนลิปิดเท่ากับ 2/1 และทดสอบสมบัติต่างๆ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายแรมโนลิปิดที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ (Critical micelle concentration, CMC) และยังมี การวัดค่าการนำไฟฟ้า

ของระบบไมโครอิมัลชันที่ปริมาณน้ำต่างๆกัน ซึ่งแผนภาพวัฏภาคที่ได้ แสดงดังรูปที่ 3.5 โดย S_1 คือไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน, B คือ ไบคอนทินิวอัสไมโครอิมัลชัน, S_2 คือ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ, L_2 คือ ไมโครอิมัลชันสองวัฏภาค, E คือ อิมัลชัน ทำให้สามารถอธิบายพฤติกรรมของวัฏภาคได้ดังนี้ เมื่อมีน้ำปริมาณน้อยสารลดแรงตึงผิวจะฟอร์มตัวเป็นรีเวอร์สไมเซลล์คือเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ซึ่งค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้จะใกล้เคียงกับวัฏภาคน้ำมัน เมื่อมีน้ำปริมาณมากขึ้นจะวัดค่าการนำไฟฟ้าได้มากขึ้นอย่างรวดเร็ว จนเมื่อมีน้ำประมาณ 50%โดยน้ำหนักค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้จะเปลี่ยนเป็นเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ซึ่งถือว่าเป็น bicontinuous microemulsion จากนั้นน้ำจะมีปริมาณมากทำให้สารลดแรงตึงผิวฟอร์มตัวเป็นไมเซลล์ปกติ คือเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้จะใกล้เคียงกับวัฏภาคน้ำ นอกจากนี้สามารถหาขนาดของอนุภาคได้โดยด้วยเทคนิคการกระเจิงแสง (dynamic light scattering) พบว่าไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันมีขนาดเล็กและเป็นระเบียบมากกว่าไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และจากวิธี freeze fracture electron microscope (FFEM) โดยจากรูปที่ได้ทำให้สามารถยืนยันผลที่ได้จากเทคนิคการกระเจิงแสง



รูปที่ 3.6 แผนภาพวัฏภาคของระบบ แรมโนลิปิด/บิวทานอล/น้ำ/เฮปแทน (Xie และคณะ, 2006)

3.4 การใช้ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนัง

การใช้ระบบนำส่งยาได้รับความสนใจมาเป็นเวลานานเนื่องจากสามารถนำไปสู่ภาวะเป้าหมายที่ต้องการ ช่วยให้อตัวยาไม่เสื่อมสภาพและยังช่วยลดผลข้างเคียงของยา แต่ประมาณ 40% ของยาในปัจจุบันจะเป็นสารประกอบของไขมัน ซึ่งสามารถละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นจึงมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาหาวิธีการแก้ไขปัญหาค่าการละลายน้ำของยาเหล่านี้ เช่น การทำให้ยามีประจุลบ

เพื่อให้เกิดเป็นเกลื้อที่สามารถละลายน้ำได้ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้กับยาที่ไม่สามารถเกิดเกลื้อได้ การทำให้อนุภาคของยามีขนาดเล็กก็เป็นอีกวิธีที่สามารถทำให้ยาละลายน้ำได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาการใช้พาหะเพื่อบรรจุยาและขนส่งไปสู่อวัยวะเป้าหมาย เช่น โดโซโซม อิมัลชัน และไมโครอิมัลชัน เป็นต้น ซึ่งไมโครอิมัลชันเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับการสนใจมากเนื่องจากมีเสถียรภาพ สามารถเกิดได้ง่าย มีความหนืดต่ำ และมีอนุภาคขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ได้หลายวิธีทั้งการรับประทาน การใช้ผ่านผิวหนัง และการพ่นเป็นละอองของเหลวเพื่อเข้าสู่ปอดโดยตรง (Kogan และ Garti, 2006) นอกจากนี้ไมโครอิมัลชันยังเป็นพาหะในการส่งสารที่มีประสิทธิภาพในตัวอย่างเฉพาะเจาะจงและช่วยให้ตัวยาไม่เสื่อมสภาพ ทั้งยังทำให้การปล่อยยายืดเวลายาวนานขึ้นและป้องกันการระคายเคืองเนื่องจากผลของยา

การใช้ไมโครอิมัลชันเพื่อนำส่งยาทางผิวหนังมีข้อดีคือสามารถบรรจุยาได้มาก และสามารถเคลื่อนที่ผ่านผิวหนังได้มากขึ้นเนื่องจากผิวหนังชั้นนอก(คือชั้น stratum corneum) มีความชอบไขมัน นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวในไมโครอิมัลชันยังช่วยลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นตัวขัดขวางการแพร่ผ่านของยา (Delgado-Charro และ Iglesias-Vias, 1997) การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาที่บรรจุเข้าไปกับไมโครอิมัลชันที่ต่างกันมีผลทำให้ปริมาณยาที่บรรจุและการซึมผ่านผิวหนังของยาในปริมาณต่างกัน จึงต้องมีการเลือกองค์ประกอบต่างๆที่เหมาะสมสำหรับการเกิดไมโครอิมัลชัน โดยองค์ประกอบของไมโครอิมัลชันสำหรับการนำส่งยาทางผิวหนังจะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย สามารถแบ่งองค์ประกอบของไมโครอิมัลชันสำหรับการนำส่งยาทางผิวหนังออกเป็น 4 ส่วนดังนี้ (Williams และ Barry, 2004)

3.4.1 ส่วนน้ำมัน

มักใช้กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว เนื่องจากชั้น stratum corneum มีความชอบไขมัน จึงทำให้ยาสามารถเคลื่อนที่ผ่านชั้นนี้ได้มากขึ้น ซึ่งกรดไขมันที่นิยมใช้มากที่สุดคือกรดโอเลอิก จากการศึกษาพบว่าสามารถทำให้ตัวยาคือกรดซาลิซิลิก (salicylic acid) และฟลูออราซิล (5-fluorouracil) เคลื่อนที่ผ่านผิวหนังของคนได้มากขึ้น 28 และ 56 เท่าตามลำดับ (Goodman และ Barry, 1989) นอกจากนี้ยังมีน้ำมันชนิดอื่นที่มักใช้ในการนำส่งยาผ่านผิวหนังได้แก่ ไอโซโพรพิลไมริสเตต (isopropyl myristate, IPM) (Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez, 2001), ไอโซโพรพิลพาล์มิเตต (isopropyl palmitate) (Gallarate และคณะ, 1999) และไตรอะซีติน (triacetin) (Rhee และคณะ, 2001) เป็นต้น จากงานวิจัยที่ศึกษาไมโครอิมัลชันเพื่อบรรจุยาเมโทเทรกเซตพบว่ามีการใช้ส่วนน้ำมันดังนี้ เดคานอล (Trotta, 1996), เอทิลโอเลอेट (Alvarez-Figueroa, 2001), ไอโซโพรพิลไมริสเตต (Muller, 2004) โดยรายละเอียดแสดงในหัวข้อ 3.5

3.4.2 สารลดแรงตึงผิว

ส่วนมากมักใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุหรือสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีทั้งสองประจุ (zwitterionic surfactant) เช่น พอลิซอร์เบต ทวิน 80 และทวิน 20 เป็นต้น เนื่องจากมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุ จากการศึกษาค้นคว้าการใช้ทวิน 80 สามารถช่วยให้ยา ลิโดเคน (lidocaine) และ ไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone) มีการแพร่ผ่านผิวหนังได้เร็วขึ้น (Sarpotdar และ Zatz, 1986) ส่วนทวิน 20 สามารถช่วยให้ยา 5-fluorouracil แพร่ผ่านผิวหนังของหนูได้เร็วขึ้น (Rigg และ Barry, 1990) และยังมีสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่นที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันมีอีกมากมาย เช่น caprylocaproyl macrogolglyceride, ไดออกทิล โซเดียมซัลโฟซัคซิเนต (dioctyl sodiumsulphosuccinate) (Osborne และคณะ, 1991), พลูรอล ไอโซสเตอริก (Plurol Isostearique) (Kreilgaard และคณะ, 2000) และ พลูรอล โอเลอิก (Plurol Oleique) (Spiclin และคณะ, 2003) เป็นต้น ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในงานวิจัยศึกษาไมโครอิมัลชันเพื่อบรรจุยาเมโทรทเรกเซตมีดังนี้ เลซิธิน (lecithin) (Trotta, 1996), ลาบราซอล (Labrasol) (Alvarez-Figueroa, 2001), ทวิน 80 (Tween 80) และสแปน 80 (Span 80) (Muller, 2004)

3.4.3 สารลดแรงตึงผิวร่วม

มักมีการใช้แอลกอฮอล์สายโซ่สั้นเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม เพื่อช่วยปรับปรุงความสามารถในการแพร่ผ่านผิวหนังของยา โดยเอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่มีการใช้มากที่สุดเนื่องจากสามารถใช้ได้กับยาหลายชนิด เช่น เลโวโนเจสเทรล (Levonorgestrel) (Friend และคณะ, 1988) เอสตราไดออล (estradiol) (Liu และคณะ, 1991) และไดโคลฟีแนค (diclofenac) (Obata และคณะ, 1993) โดยเอทานอลจะช่วยทำให้ยาละลายในพาหนะนำส่งยาได้มากขึ้นหรืออาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมมเบรนจึงช่วยให้ยามีการแพร่ผ่านได้มากขึ้น และมีการรายงานว่ายานอลสามารถแยกไขมันบางชนิดออกจากชั้น stratum corneum จึงช่วยให้ยาสามารถแพร่ผ่านผิวหนังชั้นนี้ได้มากขึ้น (Williams และ Barry, 2004) นอกจากนี้ยังมีการใช้แอลกอฮอล์ที่มีความยาวสายโซ่ปานกลางและสายโซ่ยาวช่วยในการนำส่งยา เช่น โพรพานอล, เดคานอล (Friend และคณะ, 1988) และโพรพิลีนไกลคอล (Williams และ Barry, 2004) เป็นต้น ซึ่งสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ในงานวิจัยศึกษาไมโครอิมัลชันเพื่อบรรจุยาเมโทรทเรกเซตมีดังนี้ เบนซิลแอลกอฮอล์ (Trotta, 1996), พลูรอลโอเลอิก (Alvarez-Figueroa, 2001), ออกเทนไดออล (Muller, 2004)

3.4.5 ส่วนน้ำ

ในการศึกษาส่วนมากมักใช้น้ำ แต่ในบางครั้งอาจใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 (Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez, 2001) หรือ aerosil 200 หรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.5 สำหรับงานวิจัยที่ศึกษาไมโครอิมัลชันเพื่อบรรจุยา

เมโทเทรกเซตมีการใช้ส่วนน้ำได้แก่ น้ำ (Trotta, 1996; Muller, 2004), สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 154 mM ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 (Alvarez-Figueroa, 2001)

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างของการใช้ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาทางผิวหนัง

Drug	Microemulsion			Reference
	Oil phase	Surfactants/cosurfactants	Aqueous phase	
5-Fluorouracil	isopropyl myristate	AOT	water	Gupta, 2005
8-Methoxsalen	isopropyl myristate	Tween 80, Span 80, 1,2-octanediol	water	Baroli, 2000
Ascorbic acid	isopropyl myristate, cetearyl octanoate	dodecylglucoside cocoamide propylbetaine, phosphatidyl choline/2-ethyl-1,3-hexanediol	water	Gallarate, 1999
Diclofenac	isopropyl myristate	Lecithin	water	Dreher, 1997
Diclofenac	Diclofenac diethylamine	Lecithin	water	Kriwet, 1995
Diclofenac	isopropyl myristate	Labrasol/Plurol Oleique	water	Djordjevic, 2004
Lidocaine	isostearic isostearate	Labrasol/Plurol Oleique	water	Kreilgaard, 2000
Piroxicam	isopropyl myristate	hexadecyltrimethylammonium bromide	Aqueous buffer (pH 5.5)	Dalmora, 2001
Retinoic acid	isopropyl myristate	Epikuron 200, Oramix NS10/ethanol, 1,2 hexanediol	phosphate buffer	Trotta, 2003
Methotrexate	decanol	lecithin, benzyl alcohol	water, PG	Trotta, 1996
Methotrexate	ethyl oleate	Labrasol/Plurol Oleique	Aq. 154 mM NaCl (pH 7.4)	Alvarez-Figueroa, 2001
Methotrexate	isopropyl myristate	Tween 80, Span 80, 1,2-octanediol	water	Muller, 2004

3.5 ระบบนำส่งยาสำหรับยามะโรเทรกเซต

การใช้ยามะโรเทรกเซตเพื่อรักษาอาการเจ็บป่วยทางผิวหนัง เช่น โรคสะเก็ดเงิน โดยปกติแล้วแพทย์จะให้ยาโดยการรับประทานและในการรักษาจะต้องใช้ยาในระยะเวลาาน แต่เนื่องจากยาชนิดนี้ที่มีผลข้างเคียงอย่างมากเช่น ทำให้รู้สึกปวดศีรษะและเหนื่อยง่าย ทำลายเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังเป็นพิษต่อดับและไต ดังนั้นในการใช้ยาชนิดนี้เพื่อรักษาอาการทางผิวหนัง จึงควรให้ยาที่ผิวหนังโดยตรงเพื่อลดผลข้างเคียงของยา เช่น การทำเป็นครีมหรือเจลเพื่อทาภายนอก ซึ่งในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการผลิตยามะโรเทรกเซตเพื่อใช้ทาภายนอกในร่างกายในทางการค้า เนื่องจากยามะโรเทรกเซตมีความชอบน้ำและมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำให้มีข้อจำกัดในเรื่องการแพร่ผ่านผิวหนังของยา (Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez, 2001) จึงมีผู้ศึกษาระบบนำส่งยาสำหรับยามะโรเทรกเซตหลายวิธี เช่น การใช้ไมโครอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้สารลดแรงตึงผิว ฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine) และคลอเรสเตอรอล โอลีเอต (cholesteryl oleate) ในอัตราส่วน 2:1 พบว่าสามารถบรรจุยามะโรเทรกเซตได้ แต่เมื่อทดสอบใน serum-free media พบว่ายามีฤทธิ์ต่อเซลล์ L1210 murine leukemia น้อยกว่าการใช้ยามะโรเทรกเซตในรูปอิสระประมาณ 500 เท่า (Halbert และคณะ, 1984) มีการศึกษาการนำส่งยามะโรเทรกเซตโดยอาศัยการให้สนามไฟฟ้าไปที่ผิวหนัง เพื่อช่วยให้โมเลกุลที่มีประจุหรือมีขั้วสามารถแพร่ผ่านไปได้มากขึ้น พบว่ายามะโรเทรกเซตมีการแพร่ผ่านผิวหนังได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การแพร่จากสารละลายของยามะโรเทรกเซตโดยไม่มีการกระตุ้น โดยจากการใช้สารละลายของยาระหว่าง 2.0-3.0 mg/ml ตรวจพบว่าการแพร่ของยาผ่านผิวหนังที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.8 mg/ml ขึ้นไป และการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไม่ค่อยมีผลต่อความสามารถในการแพร่ผ่านผิวหนังของยา แต่จะส่งผลให้มีปริมาณของยาคั่งค้างที่ผิวหนังมากขึ้น ส่วนการกระตุ้นโดยใช้สนามไฟฟ้าพบว่าความสามารถในการแพร่ผ่านผิวหนังของยาไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายยาเช่นกัน แต่จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกระแสไฟฟ้าและความแรงของประจุ (ionic strength) โดยการเพิ่มความเข้มข้นของกระแสไฟฟ้าจะทำให้มีการแพร่ผ่านของยามากขึ้น (Alvarez-Figueroa และคณะ, 2001)

จากการศึกษาระบบนำส่งยามะโรเทรกเซตที่เหมาะสมสำหรับการแพร่ผ่านผิวหนัง ระหว่างการใช้ไฮโดรเจลที่เตรียมจากโมโนเมอร์ของกรดอะคริลิก และไฮโดรเจลที่เตรียมจากโมโนเมอร์ของกรดอะคริลิก อะคริลาไมด์ (acrylamide) อัตราส่วน 1:1 โดยในขั้นตอนการทดสอบการแพร่ผ่านผิวหนังมีการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าที่ผิวหนังด้วย เปรียบเทียบกับการใช้ไมโครอิมัลชันสองระบบซึ่งมีองค์ประกอบของระบบดังนี้

ระบบที่ 1 ใช้สารลดแรงตึงผิวคือลาบราซอล สารลดแรงตึงผิวร่วมคือฟลูโรลไอโซสเตียริก ส่วนน้ำมันคือเอทิลโอลีเอต และส่วนสารละลายคือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 154 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.4 โดยมีอัตราส่วนโดยปริมาตรของลาบราซอลต่อฟลูโรลไอโซสเตียริก เท่ากับ 3:1

ระบบที่ 2 ใช้สารลดแรงตึงผิวคือ ทวิน 80 และสแปน 80 เท่ากับ สารลดแรงตึงผิวรวมคือ 1,2-ออกเทนไดออล ส่วนน้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต และส่วนสารละลายคือน้ำ มีอัตราส่วนโดยปริมาตรของ ทวิน 80 : สแปน 80 : 1,2-ออกเทนไดออล เท่ากับ 3:1:1.2

ผลการทดสอบพบว่าปริมาณยาที่ใส่เข้าไปในไฮโดรเจลมีผลต่อการแพร่ผ่านผิวหนังเพียงเล็กน้อย และสามารถวิเคราะห์ได้ถึงความเข้มข้นของยาระหว่าง 120 - 200 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้น เพราะที่ความเข้มข้นน้อยกว่านี้เครื่อง HPLC จะไม่สามารถตรวจวัดได้ และที่ความเข้มข้นมากกว่านี้ยาจะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนปริมาณยาที่ตกค้างอยู่ในผิวหนังนั้นไม่ขึ้นอยู่กับทั้งองค์ประกอบของไฮโดรเจลและความเข้มข้นของยา ส่วนจากการใช้ไมโครอิมัลชันพบว่ายาสามารถละลายในระบบที่ 1 ได้มากกว่าระบบที่ 2 เนื่องจากระบบแรกเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ส่วนระบบที่สองเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ซึ่งยานี้สามารถละลายได้ดีในน้ำ เมื่อทดสอบการแพร่ผ่านผิวหนังจำลอง พบว่ามีปริมาณยาที่คงเหลือในไมโครอิมัลชันมากกว่าที่ผิวหนังและสารละลายตัวรับ และความสามารถในการแพร่ผ่านของยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยา ซึ่งจากการทดสอบที่ปริมาณยา 50% และ 80% ของปริมาณยามีตัว พบว่าไมโครอิมัลชันที่มีปริมาณยา 50% มียาที่ตกค้างอยู่ในผิวหนังมากกว่า จากการทดลองทั้งหมดพบว่าการใช้ไมโครอิมัลชันประสิทธิภาพดีกว่าการแพร่ผ่านของยาจากสารละลายของยาที่ไม่มีการปรับปรุงใดๆ แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้วิธีกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez, 2001)

Trotta และคณะ (1996) ศึกษาความสามารถในการซึมผ่านผิวหนังของยามะโรเทรกเซต โดยเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่มีสารลดแรงตึงผิวคือเลซิดิน 12.3% โดยมวล, สารลดแรงตึงผิวรวมคือเบนซิลแอลกอฮอล์ 6.9% โดยมวล, น้ำมันคือเดคานอล 59.4% โดยมวล และส่วนน้ำคือน้ำและโพรพิลีนไกลคอล (70:30) ที่พีเอช 4 และ 5 ปริมาณ 21.4% โดยมวล จากการศึกษาพบว่าปริมาณยามะโรเทรกเซตที่ละลายอยู่ในไมโครอิมัลชันพีเอช 4 และ 5 เท่ากับ 2.5 ± 1 และ 2.8 ± 1 mg/g ตามลำดับ และมีอัตราการแพร่ผ่านผิวหนังเท่ากับ 4 และ 5 $\mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h}$ ตามลำดับ ซึ่งค่ามากกว่าการใช้สารละลายของยามะโรเทรกเซตที่พีเอช 4 และ 5 ที่สามารถผ่านผิวหนังได้เพียง 0.5 ± 0.2 และ 0.8 ± 0.4 $\mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h}$ ตามลำดับ

นอกจากนี้ Karasulu และคณะ (2007) ศึกษาแบบไมโครอิมัลชันเพื่อนำส่งยามะโรเทรกเซต เพื่อรักษาโรคมะเร็ง โดยการรับประทาน ระบบนี้มีส่วนน้ำมันคือน้ำมันถั่วเหลือง สารลดแรงตึงผิวคือ Cremophore EL/ สแปน 80 อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 7:1 และใช้สารลดแรงตึงผิวรวมคือไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมเท่ากับ 2:1 ทำให้ได้ค่า HLB เท่ากับ 5.63 ซึ่งค่า HLB ที่สามารถเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันได้ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 3-6 โดยปรกติแล้วยานี้สามารถละลายได้ดีในสารละลายอัลคาไลน์ไฮดรอก

ไซค์เจือจาง งานวิจัยนี้จึงใช้ส่วนสารละลายคือ 0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณที่ใช้คือ 2500 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งจะนำไปในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมไมโครอิมัลชัน พบว่าการเติมยาเข้าไปนั้นไม่มีผลต่อลักษณะและเสถียรภาพของไมโครอิมัลชัน และอนุภาคไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีขนาด 13.4 ± 0.1 นาโนเมตร และใช้เวลาในการปลดปล่อยยาเท่ากับ 36 ชั่วโมง

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามี การเตรียมไมโครอิมัลชันเพื่อศึกษาการนำส่งยาเมโทเทรกเซตเพียง 4 ระบบเท่านั้น และสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นชนิดไม่มีประจุทั้งสิ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิด ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุลบ ที่สามารถผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ มาศึกษาการเตรียมไมโครอิมัลชันกับน้ำมันที่เคยมีการเตรียมไมโครอิมัลชันกับแรมโนลิปิด (เฮปแทน) และน้ำมันที่เคยมีการเตรียมไมโครอิมัลชันกับยาเมโทเทรกเซต (เอทิลโอเลอเตต ไอโซโพรพิลไมริสเตต และเดคานอล) โดยมีเป้าหมายเพื่อคัดเลือกระบบที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุยาเมโทเทรกเซต

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

4.1.1 อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) บริษัท ISSCO, รุ่น VS-124, ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง บริษัท Kubota Corporation, รุ่น Kubota 5100, ประเทศญี่ปุ่น
3. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) บริษัท Scientific Industries, Inc., รุ่น G-560E, ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, รุ่น HL24ADY, ประเทศญี่ปุ่น
5. ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 10 ลิตร บริษัท B Braun Biotech International, รุ่น Biostat[®] ED, ประเทศเยอรมัน
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter) บริษัท Mettler Toledo, รุ่น MP220, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
7. เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer) บริษัท Kruss, รุ่น K6, ประเทศเยอรมัน
8. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Hot Air Oven) บริษัท Memmert, รุ่น ULM 500, ประเทศเยอรมัน

4.1.2 เคมีภัณฑ์

1. น้ำมันปาล์มดิบ บริษัทชุมชนพรอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มจำกัด, ประเทศไทย
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท E.Merck, Darmstadt, ประเทศเยอรมัน¹
3. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, ประเทศเยอรมัน¹
4. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท J.T.Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
5. โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) บริษัท E.Merck, Darmstadt, ประเทศเยอรมัน¹
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท J.T.Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท J.T.Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
8. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ¹
9. โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ¹
10. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท J.T.Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
11. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ¹

12. คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ¹
13. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ¹
14. แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) บริษัท J.T.Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
15. ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท J.T.Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
16. เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, ประเทศเยอรมัน¹
17. โคบอลตคลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, ประเทศเยอรมัน¹
18. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ¹
19. กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) บริษัท BDH laboratory supplies, ประเทศอังกฤษ¹
20. กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท E.Merck, Darmstadt, ประเทศเยอรมัน¹
21. อีดีทีเอ (EDTA) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
22. แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium-Pantothenate) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
23. ไบโอติน (Biotin) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
24. กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (*p*-aminobenzoic acid) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
25. ไพริดอกซีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
26. ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
27. ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, ประเทศสหรัฐอเมริกา¹
28. ไอโซโพรพิลไมริสเตต (Isopropyl myristate) บริษัท Fluka, Switzerland
29. เฮปเทน (Heptane) บริษัท Fisher Scientific, ประเทศอังกฤษ¹
30. เดคานอล (1-Decanol) บริษัท Acros, ประเทศสหรัฐอเมริกา
31. เอทิลโอเลต (Ethyl oleate) บริษัท Fluka, ประเทศสวีเดน
32. บิวทานอล (n-Butanol) บริษัท Fisher Scientific, ประเทศอังกฤษ¹

หมายเหตุ ¹ สารเคมีมีความบริสุทธิ์ในระดับ ห้องปฏิบัติการ

4.2 เชื้อจุลินทรีย์

ในการทดลองใช้จุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ที่ได้จากการคัดแยกในงานวิจัยของอารีย์ (2542) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 วิธีการทดลอง

4.3.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ (ณรงค์, 2543)

นำจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในหลอดอาหารเลี้ยงที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บเป็นหัวเชื้อสำหรับการใช้ในการทดลอง เมื่อต้องการทดลอง ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงดังกล่าวลงในหลอดอาหารเลี้ยงอีกครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ควบคุมความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ที่ได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.7-0.8 จากนั้นปีเปตสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารกำหนดสูตรในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4.3.1.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ณรงค์, 2543)

- การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่า

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.2.1.1 ปริมาณ 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารกำหนดสูตร โดยให้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำมันปาล์มดิบ ในปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

- การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (ณรงค์, 2543)

ถ่ายเชื้อตั้งต้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว 5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างที่ 7.5 และควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ความเร็วรอบใบพัดกวน 600 รอบต่อนาที

- การสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำน้ำหมักตัวอย่างปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำน้ำหมักส่วนใสมาตกตะกอนด้วย 6 N HCl จนมีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 2 ซึ่งโปรตีนอื่นๆที่ปนอยู่จะตกตะกอนแยกชั้นออกมา ซึ่งควรตั้งทิ้งข้ามคืนที่ 4 °C เพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตะกอนที่ได้ล้างในน้ำกลั่นที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 2 แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °C ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำตะกอนมาละลายใน

ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 จนตะกอนละลายหมดพอดี (จิราภรณ์ และคณะ, 2547)

จากนั้นนำมาสกัดโดยใช้กรวยแยกด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตต เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้นจะเป็นได้ว่าชั้นล่างจะเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ไขชั้นล่างเก็บไว้ ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัดได้มากำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำจนกว่าจะเห็นตะกอนสีขาว (น้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์หมด) กรองแยกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ปราศจากน้ำมาแยกออกด้วยเครื่องระเหย (Evaporator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C จะได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งมีสีน้ำตาลไหม้ เหนียวหนืด (Wei และคณะ, 2005)

4.3.2 การทดสอบสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้น

4.3.2.1 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากข้อ 4.2.1.2 มา 100 มิลลิกรัม ละลายในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้นเป็นด่างเท่ากับ 8 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำมาเจือจางตั้งแต่ 0.00001 - 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring (หลักการและอุปกรณ์ที่ใช้วัด แสดงดังภาคผนวก ข) จากนั้นเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นและค่าแรงตึงผิว เพื่อหาจุดความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์

4.3.3 การทดลองเพื่อวาดแผนภาพวัฏภาค

ทำการทดลองเพื่อหาอัตราส่วนของสารในระบบได้แก่ น้ำ น้ำมันสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ที่สามารถเกิดเป็นเป็นไมโครอิมัลชันได้ โดยเปรียบเทียบน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ ไอโซโพรพิลไมริสเตต เอทิลโอเลอเตต เดคานอล และเฮปแทน ซึ่งระบบที่ทำการศึกษาแบ่งเป็น 4 ระบบ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.1 โดยใช้อัตราส่วนโดยมวลระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมเท่ากับ 0.5 ซึ่งสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดที่ใช้จะต้องมีการปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 9 เพื่อให้หมู่คาร์บอกซิลิกในโครงสร้างเปลี่ยนเป็นเกลือของกรดคาร์บอกซิลิก (RCOO)₂HNa โดยปริมาณสารลดแรงตึงผิวและน้ำมันที่ใช้ในแต่ละระบบแสดงในตารางที่ 4.2-4.5 และปริมาณน้ำที่ใช้แสดงดังตารางที่ 4.6 ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C จนกว่าระบบจะเข้าสู่สมดุล (ระบบไม่มีการเปลี่ยนแปลง) สังเกตลักษณะที่เกิดขึ้นของระบบต่าง ๆ แล้วบันทึกผลการสังเกตลงในแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของระบบที่ทำการศึกษา

ระบบ	น้ำมัน	สารลดแรงตึงผิว	สารลดแรงตึงผิวร่วม	น้ำ
1	ไอโซโพรพิลไมริสเตต	แรมโนลิปิด	บิวทานอล	น้ำกลั่นสองครั้ง
2	เอทิลโอเลเอต	แรมโนลิปิด	บิวทานอล	น้ำกลั่นสองครั้ง
3	เดคานอล	แรมโนลิปิด	บิวทานอล	น้ำกลั่นสองครั้ง
4	เฮปเทน	แรมโนลิปิด	บิวทานอล	น้ำกลั่นสองครั้ง

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารที่ใช้ในระบบที่ 1

S:O	ปริมาณ แรมโนลิปิด (ml)	ปริมาณ บิวทานอล (ml)	ปริมาณ สารลดแรงตึงผิว (ml)	ปริมาณ IPM (ml)
5:1	0.1500	0.3459	0.4959	0.1196
2:1	0.1200	0.2767	0.3967	0.2393
1:1	0.0900	0.2076	0.2976	0.3589
1:2	0.0600	0.1384	0.1984	0.4786
1:5	0.0300	0.0692	0.0992	0.5982

หมายเหตุ S คือ สารลดแรงตึงผิว
O คือ น้ำมัน
IPM คือ ไอโซโพรพิลไมริสเตต

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารที่ใช้ในระบบที่ 2

S:O	ปริมาณ แรมโนลิปิด (ml)	ปริมาณ บิวทานอล (ml)	ปริมาณ สารลดแรงตึงผิว (ml)	ปริมาณ EO (ml)
5:1	0.1500	0.3459	0.4959	0.1169
2:1	0.1200	0.2767	0.3967	0.2338
1:1	0.0900	0.2076	0.2976	0.3507
1:2	0.0600	0.1384	0.1984	0.4676
1:5	0.0300	0.0692	0.0992	0.5845

หมายเหตุ EO คือ เอทิลโอเลเอต

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารที่ใช้ในระบบที่ 3

S:O	ปริมาตร แรมโนลิปิด (ml)	ปริมาตร บิวทานอล (ml)	ปริมาตร สารลดแรงตึงผิว (ml)	ปริมาตร เดคานอล (ml)
5:1	0.1500	0.3459	0.4959	0.1226
2:1	0.1200	0.2767	0.3967	0.2451
1:1	0.0900	0.2076	0.2976	0.3677
1:2	0.0600	0.1384	0.1984	0.4903
1:5	0.0300	0.0692	0.0992	0.6129

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารที่ใช้ในระบบที่ 4

S:O	ปริมาตร แรมโนลิปิด (ml)	ปริมาตร บิวทานอล (ml)	ปริมาตร สารลดแรงตึงผิว (ml)	ปริมาตร เฮปเทน (ml)
5:1	0.1500	0.3459	0.4959	0.1498
2:1	0.1200	0.2767	0.3967	0.2996
1:1	0.0900	0.2076	0.2976	0.4493
1:2	0.0600	0.1384	0.1984	0.5991
1:5	0.0300	0.0692	0.0992	0.7489

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำที่ใช้ในการทดลอง

% น้ำ	10	20	30	40	50	60	70	80	90
ปริมาตร(ml)	0.0678	0.1526	0.2615	0.4068	0.6102	0.9153	1.4238	2.4408	5.4918

4.3.4 การทดสอบสมบัติของระบบไมโครอิมัลชัน

4.3.4.1 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า (พรรณเพ็ญ, 2540)

จากการทดลองในหัวข้อ 4.3.3 สามารถแบ่งแยกระบบที่ผลิตได้ เบื้องต้นด้วยการสังเกตลักษณะทั่วไปด้วยตาเปล่า หากสารที่ได้มีลักษณะโปร่งแสง และเหลว จัดเป็นไมโครอิมัลชัน สารที่ได้มีลักษณะทึบแสง จัดเป็นอิมัลชัน และสารที่ได้มีลักษณะ โปร่งแสงแต่ไหลไม่ได้ จัดเป็นผลึกเหลวหรือเจล

4.3.4.2 การตรวจสอบชนิดของระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้น (พรรณเพ็ญ, 2540)

สามารถตรวจสอบชนิดของระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้นว่าเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ หรือน้ำในน้ำมัน โดยการเจือจางด้วยวัฏภาคน้ำและน้ำมัน ปริมาณเท่ากับตัวอย่าง หากเจือจางด้วยน้ำแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจัดเป็นไมโครอิมัลชันเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ ส่วนตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำมันแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจัดเป็นไมโครอิมัลชันเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน

4.3.4.3 การวิเคราะห์ด้วยแสงโพลาไรซ์ (Xie และคณะ, 2006)

สามารถทดสอบว่าระบบที่ได้มีสมบัติเป็นไอโซโทรปิกหรือแอนไอโซโทรปิกได้โดยการหยดตัวอย่างลงบนกระจกสไลด์ แล้วปิดทับด้วยกระจกสไลด์ จากนั้นวิเคราะห์ด้วยแสงโพลาไรซ์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 20 เท่าเพื่อแบ่งแยกไมโครอิมัลชันที่มีสมบัติไอโซโทรปิกออกจากแลมellar ที่มีสมบัติเป็นแอนไอโซโทรปิก โดยตัวอย่างที่เป็นไมโครอิมัลชันเมื่อส่องด้วยแสงโพลาไรซ์จะไม่มีส่วนใดที่กระเจิงแสงโพลาไรซ์ ทำให้ภาพที่เห็นมีลักษณะมืดสนิท แต่ตัวอย่างที่เป็นไอโซโทรปิก เมื่อทำการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ จะพบว่ามีส่วนที่กระเจิงแสงโพลาไรซ์ (Prince, 1977)

4.3.5 การคัดเลือกไมโครอิมัลชันสำหรับบรรจุยาเมโรเทรกเซต

จากการทดลองในหัวข้อ 4.3.3 และ 4.3.4 ทำให้สามารถเลือกน้ำมันชนิดที่เหมาะสมสำหรับการเกิดไมโครอิมัลชันกับแรมโนลิปิด บิวทานอล และน้ำ จากนั้นนำน้ำมันที่คัดเลือกได้มาทดลองหาแผนภาพวัฏภาคกับฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4 เพื่อให้มีสภาวะคล้ายกับผิวหนัง และอะซีเตตบัพเฟอร์ พีเอช 5.5 เพื่อให้มีสภาวะคล้ายกับเลือด โดยทำการทดลองตามหัวข้อ 4.3.3 และ 4.3.4 แล้วคัดเลือกไมโครอิมัลชันที่มีอัตราส่วนที่สามารถบรรจุยาได้มากที่สุดของทั้งสองพีเอช เพื่อนำไปบรรจุยาเมโรเทรกเซตต่อไป

4.3.6 การบรรจุยาเมโรเทรกเซตลงในไมโครอิมัลชัน

เนื่องจากนำไมโครอิมัลชันทั้ง 2 ระบบ ที่คัดเลือกได้จากการทดลองในหัวข้อ 4.3.5 นั้น ใช้สารละลายบัพเฟอร์เป็นวัฏภาคน้ำ ดังนั้นก่อนการนำมาบรรจุยาเมโรเทรกเซต ต้องทดลองหาค่าความสามารถในการละลายของยาเมโรเทรกเซตในสารละลายบัพเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด วิธีการทดลองดังหัวข้อ 4.3.6.1

4.3.6.1 หาความสามารถในการละลายของยามะโรเทรกเซตในสารละลายบัฟเฟอร์

เติมยาปริมาณมากเกินไปลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในความมืด และปั่นจนไวต์ตลอดเวลา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมากรองโดยใช้กระดาษกรองพอลิไวนิลฟลูออไรด์ ขนาด 0.45 μm เพื่อกำจัดยาที่มากเกินไป แล้วเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาณที่เหมาะสม จากนั้นนำไปหาปริมาณยาที่ละลายในไมโครอิมัลชันโดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 303 nm (Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez, 2001)

4.3.6.2 เตรียมไมโครอิมัลชันที่บรรจุยามะโรเทรกเซต

เตรียมสารละลายของยามะโรเทรกเซตในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความสามารถในการละลายสูงที่สุด จากนั้นเตรียมไมโครอิมัลชันตามอัตราส่วนที่คัดเลือกได้ในหัวข้อ 4.3.5 แต่เปลี่ยนวัสดุภาคน้ำจากการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ มาเป็นใช้สารละลายของยามะโรเทรกเซตในบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 100% และ 80% ของความสามารถในการละลายสูงที่สุด ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดและอุณหภูมิเท่ากับ 37 °C จนกว่าระบบจะเข้าสู่สมดุล

4.3.6.3 หาความสามารถในการละลายของยามะโรเทรกเซตในไมโครอิมัลชัน

นำไมโครอิมัลชันที่บรรจุยามะโรเทรกเซตที่เตรียมได้จากหัวข้อ 4.3.6.2 มาหาความสามารถในการละลายของยามะโรเทรกเซตในไมโครอิมัลชันที่แท้จริง โดยด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ column ascentis-C18 (150 x 4.6 มิลลิเมตร.), อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที, เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ เมทานอล : สารละลายบัฟเฟอร์ (10:90), UV-detector วัดที่ความยาวคลื่น 303 nm, ปริมาตรที่ฉีด (injection volume) คือ 20 μl และเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของยาที่วิเคราะห์ได้ กับสารละลายมาตรฐานของยามะโรเทรกเซตในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ จากนั้นคำนวณหาความสามารถในการบรรจุและประสิทธิภาพการบรรจุยาของไมโครอิมัลชัน

บทที่ 5

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การศึกษาระบบนำส่งยาเมโรเทรกเซตแบบไมโครอิมัลชัน โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด สามารถแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน โดยในส่วนแรกศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้น ได้แก่ การหาค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นในส่วนที่สองศึกษาแผนภาพวัฏภาคระหว่างแรมโนลิปิด/น้ำ/น้ำมัน โดยใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมคือบิวทานอล ทำการทดสอบกับน้ำมัน 4 ชนิดคือ ไอโซโพรพิลไมริสเตต เอทิลโอเลียด เฮปแทน และเดคานอล เพื่อเลือกน้ำมันและอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชัน โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37 °C โดยระบบที่คัดเลือกได้นี้จะนำไปศึกษาต่อในส่วนที่สาม คืออิทธิพลของยาเมโรเทรกเซตต่อระบบไมโครอิมัลชัน ได้แก่ความสามารถในการบรรจุยา

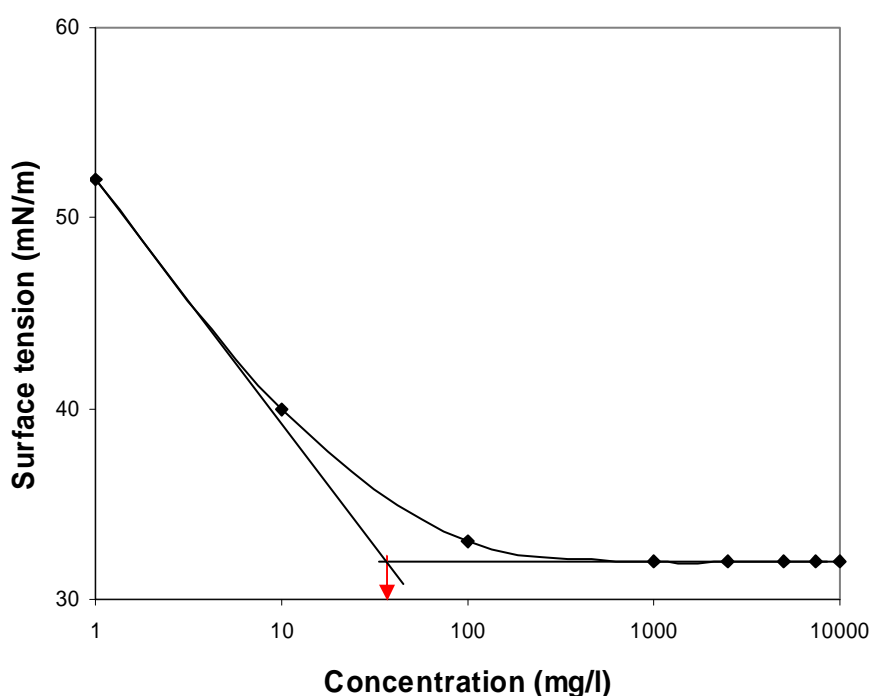
5.1 สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด

5.1.1 ค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์

การหาค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ ทำได้โดยการเตรียมสารละลายแรมโนลิปิดในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 8 ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวและอากาศที่ลดลง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 5.1 จากรูปจะพบว่าค่าแรงตึงผิวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง โดยในช่วงแรกค่าแรงตึงผิวจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแรมโนลิปิด แรงตึงผิวจะมีค่าลดลง เนื่องจากโมเลกุลของแรมโนลิปิดกระจายตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสของน้ำและอากาศ โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุเข้าหาโมเลกุลของน้ำ และจะหันส่วนไม่มีขั้วไปทางอากาศ การเพิ่มความเข้มข้นของแรมโนลิปิดส่งผลให้เกิดการสะสมตัวของโมเลกุลของแรมโนลิปิดเพิ่มมากขึ้นบริเวณผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาค เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแรมโนลิปิดถึงประมาณ 500 mg/l แรงตึงผิวจะมีค่าค่อนข้างคงที่ (ไม่ขึ้นกับความเข้มข้น) เนื่องจากบริเวณผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคอิ่มตัวไปด้วยโมเลกุลของแรมโนลิปิดแล้ว ดังนั้นการเพิ่มปริมาณของแรมโนลิปิดจึงไม่สามารถลดแรงตึงผิวได้อีก โมเลกุลของแรมโนลิปิดที่ไม่สามารถแทรกตัวระหว่างผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคได้ จะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์เรียกว่าค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ จากการทดลองพบว่าแรมโนลิปิดมีค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์เท่ากับ 50 mg/l ซึ่งค่านี้ได้จากจุดตัดระหว่างเส้นสัมผัสของกราฟที่ขึ้นกับความเข้มข้น (เส้นที่ 1) และเส้นสัมผัสของกราฟที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้น (เส้นที่ 2) ซึ่งความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์เป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิว นอกจากนี้ค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ ยังสามารถบอกได้

ว่าพร้อมที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เช่น ไมเซลล์ (micelle) ไบเลเยอร์ (bilayer) และ เวสทิเคิล (vesicles) ซึ่งการเกิดการรวมตัวกันของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นโครงสร้างต่างๆ จะขึ้นอยู่กับความสมดุลของส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโมเลกุลของสารและแรงดึงดูดหรือแรงผลักรวมตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำและชอบน้ำของโมเลกุลนั้น

เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ที่ได้กับคณะผู้วิจัยท่านอื่นพบว่ามีความเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยจากการศึกษาของจิราภรณ์และคณะ (2004) ซึ่งใช้จุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน และตัวทำละลายชนิดเดียวกัน พบว่าค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์มีค่าเท่ากับ 50 mg/l นอกจากนี้งานวิจัยของ Zhang และ Miller (1992) พบว่ามีค่าเท่ากับ 40 mg/l ส่วน Clifford และคณะ (2007) พบว่ามีค่าเท่ากับ 30 mg/l ซึ่งทั้ง 2 งานวิจัยนี้เตรียมสารละลายแรมโนลิปิดโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 นอกจากนี้ Nitschke และ Costa (2005) ได้เตรียมสารละลายแรมโนลิปิดในน้ำกลั่น พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 10-230 mg/l จากการเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ถึงแม้ว่าจะมีการเตรียมสารละลายแรมโนลิปิดโดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน แต่พบว่าค่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน



รูปที่ 5.1 ค่าแรงตึงผิวของสารละลายแรมโนลิปิด

5.1.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์

แรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ควรจะมีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ก่อนการนำไปใช้ ซึ่งจากผลการทดสอบของหน่วยปฏิบัติการทดสอบทางชีวภาพสำหรับวัสดุทางการแพทย์ งานห้องปฏิบัติการเครื่องมือทดสอบทั่วไป ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ โดยใช้เทคนิค agar overlay คือการนำตัวอย่างทดสอบมาวางไว้บนผิวของเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่เลี้ยงในอาหารวุ้นแข็ง (agar medium) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมสีด้วย 0.01% neutral red แล้วประเมินผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อพิจารณาความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์ การตายและวง (reactivity zone) ที่เกิดขึ้น พบว่าแรมโนลิปิดเข้มข้นมีความเป็นพิษระดับ 4 คือระดับความเป็นพิษที่รุนแรงที่สุด ดังนั้นการที่จะนำแรมโนลิปิดมาใช้งาน จะต้องทำการเจือจางจนกระทั่งไม่เป็นพิษ หรือเจือจางจนถึงระดับความเป็นพิษที่ยอมรับได้ ซึ่งสามารถทดสอบหาความเข้มข้นของแรมโนลิปิดที่ไม่เป็นพิษได้โดยวิธีการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10093-5: 1999(E) โดยวิธีการทดสอบ ดังแสดงในภาคผนวก ค โดยได้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของสารละลายแรมโนลิปิด 10, 50, 150, 300, 350 และ 400 µg/ml ซึ่งมีการเปรียบเทียบผลการทดสอบกับชุดควบคุมที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (negative control) คือ Thermanox coverslips¹ และชุดควบคุมที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (positive control) คือ Portex positive control² โดยสามารถแสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ชุดทดสอบ	ความเข้มข้น (µg/ml)	% การรอดชีวิตของเซลล์ ³
positive control	-	3.65
negative control	-	97.65
สารละลายแรมโนลิปิด	10	95.82
	50	89.86
	150	82.90
	300	4.57
	350	1.30
	400	3.65

¹ วัสดุซึ่ง, เมื่อผ่านการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10093-5: 1999(E), ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษทาง cytotoxic response

² วัสดุซึ่ง, เมื่อผ่านการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10093-5: 1999(E), ก่อให้เกิดความเป็นพิษทาง cytotoxic response

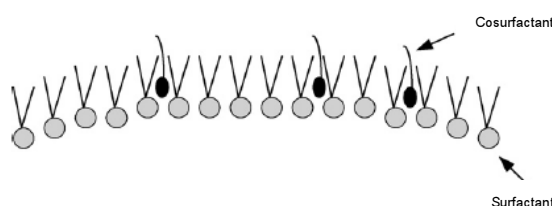
จากตารางที่ 5.1 จะเห็นว่าผลการทดสอบของ positive control และ negative control มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 3.65 และ 97.65 ตามลำดับ ซึ่งที่จริงแล้ว positive control ควรมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100 เนื่องจากเป็นวัสดุที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ตามมาตรฐาน ISO 10093-5: 1999(E) ส่วนการใช้ negative control ซึ่งเป็นวัสดุที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ตามมาตรฐาน ISO 10093-5: 1999(E) ไม่ควรมีเซลล์ที่รอดชีวิต ซึ่งค่าที่แตกต่างกันนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องมือมีความผิดพลาดประมาณ 3.65% เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบของสารละลายแรมโนลิปิด จะพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายแรมโนลิปิดต่ำกว่า $10 \mu\text{g/ml}$ จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และที่ความเข้มข้นของสารละลายแรมโนลิปิดสูงกว่า $300 \mu\text{g/ml}$ จะทำให้เซลล์ตายทั้งหมด ดังนั้นการเลือกใช้งานแรมโนลิปิดที่ความเข้มข้นเท่าไรนั้น จะต้องคำนึงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สามารถยอมรับได้ของแต่ละการใช้งาน

5.2 ชนิดของน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับการเกิดไมโครอิมัลชัน

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชันกับ น้ำ แรมโนลิปิดและบิวทานอล (โดยอัตราส่วนโดยมวลของแรมโนลิปิดและบิวทานอลเท่ากับ 1:2) ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นจะนำน้ำมันที่คัดเลือกได้มาศึกษาการเตรียมไมโครอิมัลชันกับสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 และ 7.4 ซึ่งเป็นค่าพีเอชของกับผิวหนังและเลือดตามลำดับ เพื่อเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับนำไปบรรจุยาเมโทรทริกเซดต่อไป

โดยส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวที่ชอบน้ำจะเหมาะสำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ส่วนสารลดแรงตึงผิวที่ชอบไขมันจะเหมาะสำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Garti และ Aserin, 1996) ซึ่งแรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ชอบไขมัน สังเกตได้จากการที่แรมโนลิปิดละลายได้ดีในน้ำมัน แต่ละลายได้น้อยในน้ำ และเนื่องจากแรมโนลิปิดมีส่วนหางจาก β -hydroxyl decanoic acid ที่ค่อนข้างยาว (โครงสร้างแรมโนลิปิดแสดงในรูปที่ 2.4) ทำให้มีข้อจำกัดในการละลายน้ำ จากงานวิจัยของ Xie และคณะ (2005) ได้ทำการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของแรมโนลิปิดโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป เพื่อเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลิก (RCOOH) ให้กลายเป็น แอนไอออนของกรดคาร์บอกซิลิก $(\text{RCOO})_2^{-}$ และรวมตัวกับ Na^+ เกิดเป็น $(\text{RCOO})_2\text{HNa}$ ทั้งหมด โดยจะได้ค่า HLB ของแรมโนลิปิดที่เหมาะสมสำหรับการละลายน้ำคือ 22-24 แต่ค่า HLB เท่านั้นจะเกิดไมโครอิมัลชันได้น้อยมาก จึงมีการเติมสารลดแรงตึงผิวร่วมคือบิวทานอลเพื่อปรับปรุงค่า HLB โดยการใช้อัตราส่วนโดยมวลแรมโนลิปิดต่อบิวทานอลเท่ากับ 2:1 จะได้ค่า HLB เท่ากับ 12.0-12.7 ซึ่งจะสามารถเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันได้ และยังมีพื้นที่ในแผนภาพวัฏภาคบริเวณกว้างเมื่อเทียบกับการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมชนิดอื่น

โดยบิวทานอลจะแทรกอยู่บริเวณส่วนหางของแรม โนลิปิด คืออยู่ที่ผิวของวัฏภาคน้ำมัน ดังรูปที่ 5.2 ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นและเสถียรภาพของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เกิดขึ้น (Garti และ Aserin, 2006) สอดคล้องกับการศึกษาของ Clint (1992) ซึ่งศึกษาการรวมตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สายเดี่ยว และส่วนชอบน้ำมีขนาดใหญ่ มักจะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ ส่วนสารลดแรงตึงผิวที่มีส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่อิมิตัวและส่วนชอบน้ำมีขนาดเล็ก เมื่อรวมตัวกันมักจะเกิดเป็นรีเวอร์สไมเซลล์ ดังนั้นแรม โนลิปิดจึงเกิดเป็นรีเวอร์สไมเซลล์ หรือไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันได้ดี



รูปที่ 5.2 การจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าระบบที่ประกอบด้วย น้ำ/แรม โนลิปิด และน้ำมันทั้ง 4 ชนิด เมื่อไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว ไม่สามารถเกิดไมโครอิมัลชันได้ เป็นผลจากค่า HLB ของแรม โนลิปิดที่สูงเกินไปจึงไม่สามารถรวมตัวกันเป็นไมโครอิมัลชันได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Xie และคณะ (2005) ดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นงานวิจัยนี้เลือกใช้บิวทานอลเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยมีอัตราส่วนโดยมวลต่อสารลดแรงตึงผิวแรม โนลิปิดเท่ากับ 2:1 ในการศึกษาแผนภาพวัฏภาคน้ำมันทั้ง 4 ชนิด โดยผลการศึกษาในแต่ละแผนภาพวัฏภาค ได้จากการทำการทดลองจำนวน 45 จุด โดยในการทดลองเริ่มจากการเตรียมสารลดแรงตึงผิวและน้ำมัน ที่อัตราส่วนโดยมวลแตกต่างกัน 5 ค่า และทำการเพิ่มปริมาณน้ำครั้งละ 10% โดยมวล แล้วสังเกตพฤติกรรมวัฏภาคที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ที่สามารถบรรจุน้ำได้ปริมาณสูงที่สุดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานต่อไป

เพื่อให้มั่นใจว่าระบบที่กำลังศึกษามีลักษณะเป็นไมโครอิมัลชันอย่างแท้จริง จึงมีวิธีการทดสอบด้วยกัน 2 วิธี ได้แก่การสังเกตความโปร่งแสงหรือโปร่งใสของสารละลายด้วยตาเปล่า และการทดสอบการกระเจิงแสงโพลาไรซ์ของสารละลาย

โดยในส่วนวิธีแรกคือการสังเกตลักษณะของไมโครอิมัลชันนั้น ทำได้โดยการสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้นของระบบต่าง ๆ ที่สมดุล ด้วยตาเปล่า โดยหากสารที่ได้มี 1 วัฏภาค มีความหนืดต่ำ และมีลักษณะโปร่งแสงหรือโปร่งใส เนื่องจากอนุภาคมีขนาดเล็กกว่าความยาวคลื่นของแสงที่ตามองเห็น (400-700 nm) เมื่อแสงส่องมาตกกระทบจะไม่เกิดการกระเจิงแสงจะจัดว่าเป็นไมโครอิมัลชัน หากสารที่ได้มีลักษณะนอกเหนือจากนี้จะไม่จัดเป็นไมโครอิมัลชัน (พรรณเพ็ญ, 2540) ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาคผนวก ง จากนั้นนำตัวอย่างที่คาดว่าเป็นไมโครอิมัลชันมาทำการวิเคราะห์ต่อในส่วนที่สองคือการตรวจสอบการกระเจิงแสงโพลาไรซ์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยตัวอย่างที่เป็นไมโครอิมัลชันจะมีสมบัติไอโซโทรปิก คือมีสมบัติเหมือนกันในทุกทิศทาง เนื่องจากอนุภาคที่กระจายอยู่ด้านในมีลักษณะเป็นทรงกลม ดังนั้นเมื่อส่องด้วยแสงโพลาไรซ์จึงไม่มีส่วนใดที่หักเหแสงโพลาไรซ์ ทำให้ภาพที่เห็นมีลักษณะมืดสนิท แต่ตัวอย่างที่เป็นไอโซโทรปิก เช่น ผลึกเหลว อนุภาคที่มีลักษณะเหมือนท่อ (rodlike) หรืออนุภาคที่มีลักษณะเหมือนจาน (dislike) เป็นต้น ทำให้เมื่อทำการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ จะพบว่ามีส่วนที่หักเหแสงโพลาไรซ์ ส่งผลให้ภาพที่เห็นมีลักษณะวาวแสง (Prince, 1977) จากการทดลองมีตัวอย่างที่เกิดลักษณะวาวแสงเป็นจำนวนมาก จึงขอตัวอย่างของผลึกเหลวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยแสงโพลาไรซ์แสดงดังรูปที่ 5.3 (ก) และ (ข) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เตรียมจากเปอร์เซ็นต์โดยมวลของน้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว เท่ากับ (60, 7, 33) และ (90, 8, 2) ตามลำดับ จากรูปจะพบว่าตัวอย่างทั้งสองระบบไม่มีสมบัติไอโซโทรปิก เนื่องจากมีบางส่วนที่เกิดการกระเจิงแสงโพลาไรซ์



(ก)



(ข)

รูปที่ 5.3 ตัวอย่างของผลึกเหลวเมื่อส่องด้วยแสงโพลาไรซ์ กำลังขยาย 20 เท่า (ก) 60% น้ำ 33% สารลดแรงตึงผิว 7% เดคานอล และ (ข) 90% น้ำ 8% สารลดแรงตึงผิว 2% เดคานอล

เมื่อทำการยืนยันว่าตัวอย่างที่ได้เป็นไมโครอิมัลชันแล้ว จากนั้นได้ทำการตรวจสอบชนิดของระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้น โดยการเจือจางด้วยวัฏภาคน้ำและน้ำมัน ปริมาณเท่ากับตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจัดเป็นไมโครอิมัลชันเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ

ส่วนตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำมันแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจัดเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมัน (พรณเพ็ญ, 2540)

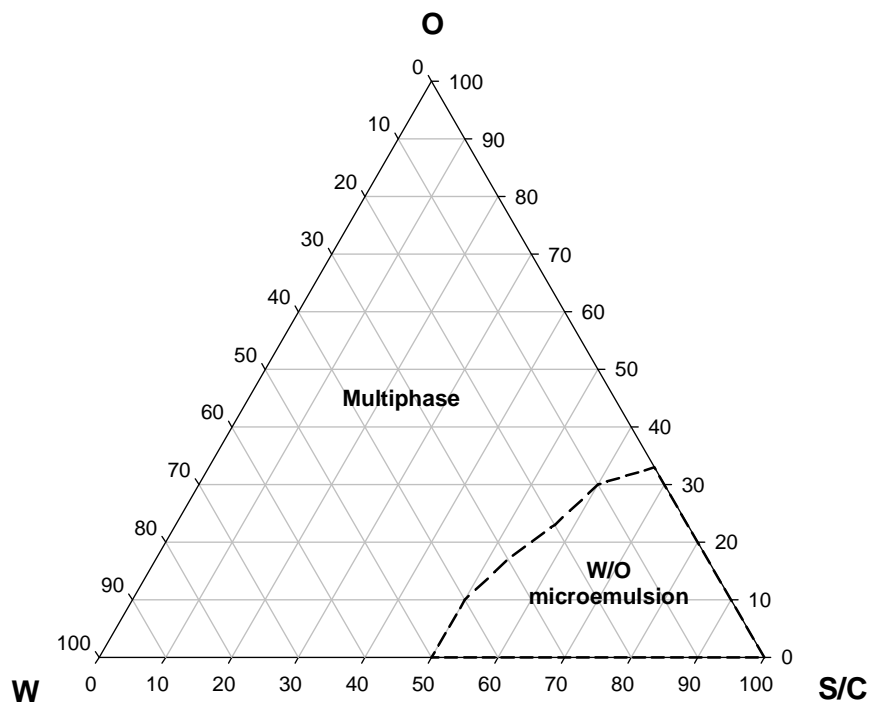
ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อลักษณะการรวมตัวของโมเลกุลเพื่อเกิดเป็นไมโครอิมัลชัน คือ ขนาดโมเลกุลของน้ำมัน โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น ไตรกลีเซอไรด์ จะมีประสิทธิภาพของการจัดเรียงตัวต่ำ ส่งผลให้การเข้าไปจัดเรียงตัวอยู่บริเวณส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวเป็นไปได้ยาก ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นได้จากบริเวณที่มีสมบัติไอโซโทรปิกในแผนภาพวัฏภาคที่ลดลง (Garti และ Aserin, 2006) ซึ่งลักษณะการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวที่รอยต่อของวัฏภาคและลักษณะการก่อตัวเป็นไมโครอิมัลชัน ขึ้นอยู่กับค่าอัตราส่วนของการรวมตัว ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 2.2.3.2 โดยโมเลกุลน้ำมันที่เติมเข้าไปนั้น จะแทรกตัวอยู่บริเวณส่วนหางของสารลดแรงตึงผิว และเมื่อพิจารณาสมการที่ 2.2.3-1 จะพบว่ากรณีที่โมเลกุลของน้ำมันเข้าไปแทรกตัวอยู่บริเวณส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวนั้น จะทำให้ปริมาตรของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว (v) มีค่าเพิ่มขึ้น และเป็นผลให้ค่าอัตราส่วนของการรวมตัว (P) เพิ่มขึ้น กล่าวคือสามารถเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันน้ำมันได้มากขึ้น (Lagevin, 1992) และเมื่อพิจารณากลไกการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคของสารลดแรงตึงผิว ดังรูปที่ 2.9 จะพบว่า การเพิ่มค่า v จากการที่น้ำมันแทรกตัวได้ดีนั้น ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวกันเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันน้ำมันได้มากขึ้น (Lawrence และ Rees, 2000)

สำหรับการศึกษาพฤติกรรมวัฏภาคของการเตรียมไมโครอิมัลชันนั้น น้ำมัน คือ วัฏภาคของสารอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ซึ่งไม่เป็นเนื้อเดียวกับน้ำ ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอน อัลเคนสายโซ่ตรง โมโนเอสเทอร์ที่มีขั้ว (polar monoester) แอลกอฮอล์สายโซ่ยาว ไตรกลีเซอไรด์ และพอลิไซคลิกคลอเรสเตอรอล (polycyclic cholesterol) ซึ่งส่วนน้ำมันที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 4 ชนิด แต่สามารถจัดอยู่ใน 3 ประเภท ได้แก่

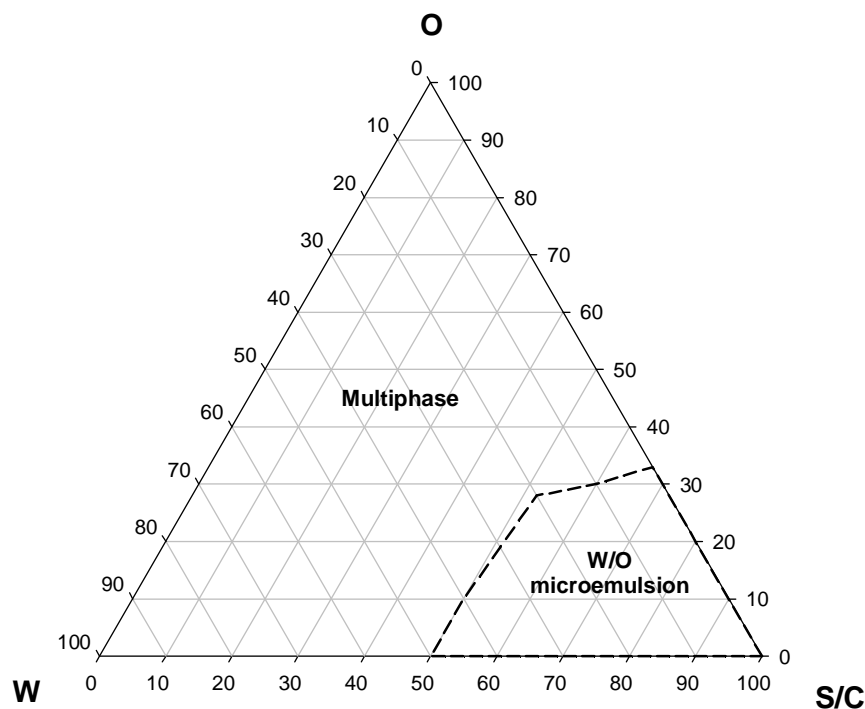
- เฮปแทน (อัลเคนสายโซ่ตรง)
- เอทิลโอเลียด และ ไอโซโพรพิลไมริสเตด (โมโนเอสเทอร์ที่มีขั้ว)
- เดคานอล (แอลกอฮอล์สายโซ่ยาว)

จากการทดลองพบว่า การใช้แรมโนลิปิดและบิวทานอล ในอัตราส่วนโดยมวล 1:2 สามารถเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันน้ำมันได้กับน้ำมันทั้ง 4 ชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (Clint, 1992; Xie และคณะ, 2005; Garti และ Aserin, 2006) ซึ่งแผนภาพวัฏภาคที่ได้จากการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.4-5.7 โดยเส้นประแสดงบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันน้ำมัน เส้นจุดแสดงบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ บริเวณนอกเหนือจากนี้จะเป็นระบบที่มีหลายวัฏภาค ได้แก่ ไมโครอิมัลชันที่มี 2 วัฏภาค (มีวัฏภาคส่วนเกิน), อิมัลชัน และตามลาร์ (ผลึก

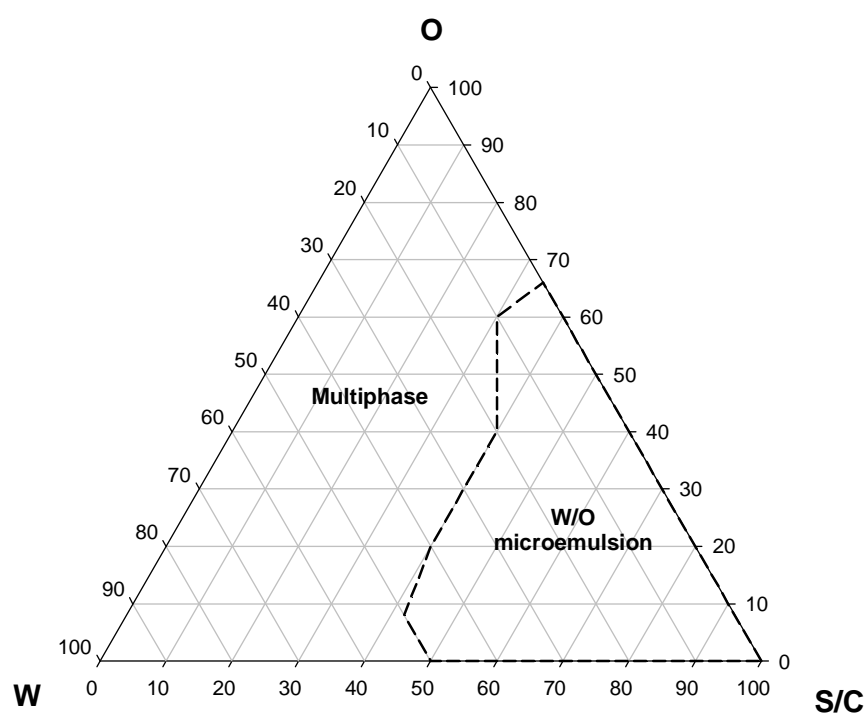
เหลว) และจากแผนภาพวัฏภาคจะพบว่าการใช้ไขมันแต่ละชนิดจะได้ลักษณะของแผนภาพวัฏภาคที่แตกต่างกัน เป็นผลจากขนาดโมเลกุลของน้ำมัน ดังที่กล่าวมาแล้ว (Kaisri, 1990; Lagevin, 1992; Lawrence และ Rees, 2000; Garti และ Aserin, 2006) ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 5.8



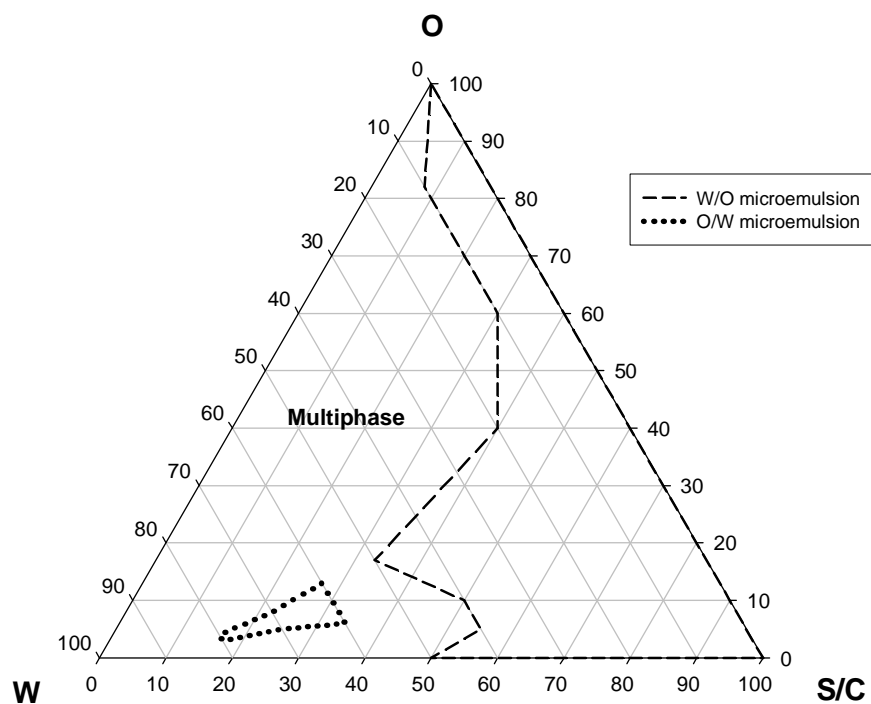
รูปที่ 5.4 แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชันของระบบ น้ำ (W) / แรมโนลิปิด / บิวทานอล (S/C) / ไอโซโพรพิลไมริสเตด (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C



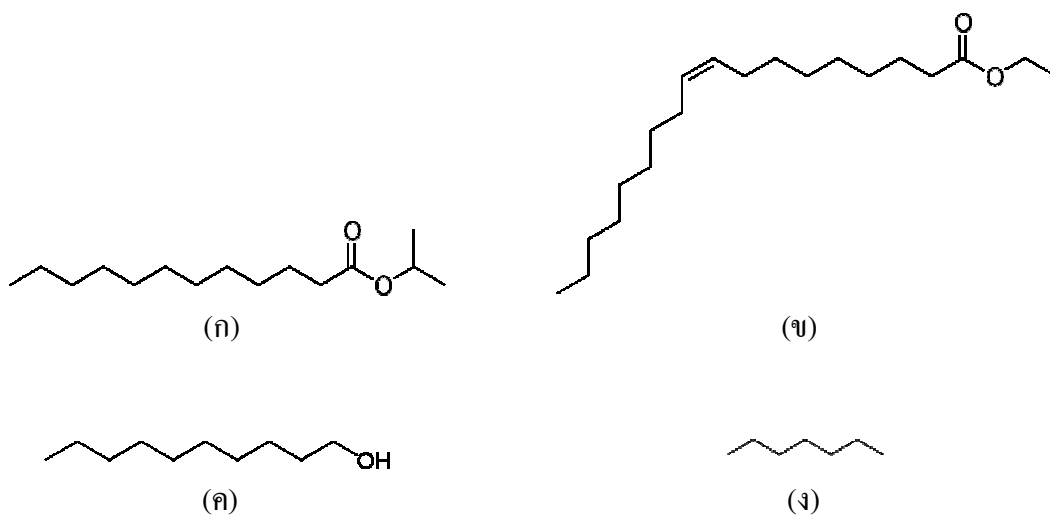
รูปที่ 5.5 แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชันของระบบ น้ำ (W) / แรมโนลิปิด / บิวทานอล (S/C) / เอทิลโอเลียด (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C



รูปที่ 5.6 แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชันของระบบ น้ำ (W) / แรมโนลิปิด / บิวทานอล (S/C) / เดคานอล (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C



รูปที่ 5.7 แผนภาพวิภูภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชันของระบบ น้ำ (W) / แรมโนลิปิด / บิวทานอล (S/C) / เฮปเทน (O) ที่อุณหภูมิ 37°C



รูปที่ 5.8 โครงสร้างทางเคมีของน้ำมัน (ก) ไอโซพรีทิลไมริสเตด (ข) เอทิลโอลีเอต (ค) เดคานอล และ (ง) เฮปเทน

เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของน้ำมันทั้ง 4 ชนิด จะพบว่า ไอโซโพรพิลไมริสเตตและเอทิลโอเลอเตตเป็นสารประกอบเอสเทอร์ ไม่ละลายเข้ากับน้ำ (www.ilo.org) จากโครงสร้างทางเคมีในรูปที่ 5.8 (ก) และ (ข) จะเห็นว่าถึงแม้จะมีหมู่ที่มีขั้วสูงคือหมู่คาร์บอกซิล แต่เนื่องจากโมเลกุลมีขนาดใหญ่มาก (น้ำหนักโมเลกุล 270.45 และ 310.51 กรัมต่อโมล ตามลำดับ) เป็นผลให้เกิดความกะกะของโมเลกุลขัดขวางการเข้าไปจัดเรียงตัวบริเวณส่วนหางของสารลดแรงตึงผิว จึงทำให้มีบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันอีก 2 ชนิด ส่วนเดคานอลเป็นแอลกอฮอล์สายโซ่ตรง มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่มีความชอบน้ำ สามารถละลายน้ำได้เล็กน้อย (ค่าการละลายในน้ำเท่ากับ 0.37g/100ml) มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 10 อะตอม (น้ำหนักโมเลกุล 158.28 กรัมต่อโมล) จัดเป็นแอลกอฮอล์สายโซ่ยาว แต่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า ไอโซโพรพิลไมริสเตตและเอทิลโอเลอเตตเป็นอย่างมาก จึงมีประสิทธิภาพในการจัดเรียงตัวบริเวณส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าน้ำมัน 2 ชนิดข้างต้น จึงสามารถแทรกอยู่บริเวณส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวได้มากขึ้น จึงมีบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันมากขึ้น

ส่วนน้ำมันชนิดสุดท้ายคือเฮปเทนเป็นไฮโดรคาร์บอนสายโซ่ตรง มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สุดจากที่เลือกนำมาศึกษา (เท่ากับ 100.21 กรัมต่อโมล) มีบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันกว้างที่สุดเป็นผลจากการที่เฮปเทนเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีสายโซ่สั้นที่สุดในการทดลอง ซึ่งความสามารถในการเกิดอิมัลชันจะลดลงเมื่อเพิ่มความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน โดยจากงานวิจัยของ Bayrak และ Iscan (2005) ศึกษาอิทธิพลของความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนต่อความจุของการเกิดอิมัลชัน โดยใช้ระบบที่ประกอบด้วย Triton X-100/ บิวทานอล / น้ำ / น้ำมัน (เฮกเซน, เฮปเทน, ออกเทน และเดคเคน) พบว่าการเพิ่มความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน จะทำให้ความสามารถในการเกิดอิมัลชันลดลงอย่างรวดเร็ว โดยการใช้เฮกเซนจะทำให้ได้พื้นที่เกิดหนึ่งภูมิภาคมากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Warisnoicharoen และคณะ (2000) ที่พบว่าน้ำมันที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง และ เอทิล โอเลอเตต สามารถละลายในไมโครอิมัลชันได้ในปริมาณน้อยกว่า น้ำมันที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น ethyl butyrate และ ethyl caprylate โดยน้ำมันที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะมีพฤติกรรมเหมือนสารลดแรงตึงผิวร่วม

นอกจากนี้ระบบที่ใช้เฮปเทนเป็นส่วนน้ำมันยังมีบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชัน 2 บริเวณ คือ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และชนิดน้ำมันในน้ำ ต่างจากระบบอื่นๆที่มีเฉพาะไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการผลิตไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่สามารถใช้บรรจุยาที่ละลายน้ำได้ ดังนั้นในการคัดเลือกระบบที่จะนำไปศึกษาต่อ จะเลือกที่ปริมาณน้ำในไมโครอิมัลชันซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณยาที่ถูกบรรจุไว้ในไมโครอิมัลชัน โดยระบบที่ใช้ น้ำมันคือ

เฮปแทนและเดคานอลสามารถบรรจุน้ำได้มากที่สุด คือประมาณ 50 % โดยมวล ส่วนระบบที่ใช้ น้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต และเอทิลโอลีเอตสามารถบรรจุน้ำได้ประมาณ 40 % โดยมวล

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการเตรียมไมโครอิมัลชันเพื่อประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม จึงควรทราบความเป็นพิษต่อเซลล์ขององค์ประกอบต่างๆที่ใช้ ค่าความเป็นพิษของแรมโนลิปิดได้แสดงให้เห็นแล้วในหัวข้อ 5.1.2 ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของน้ำมันทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 5.2 ซึ่งเป็นผลจากการทดสอบของหน่วยปฏิบัติการทดสอบทางชีวภาพสำหรับวัสดุทางการแพทย์ งานห้องปฏิบัติการเครื่องมือทดสอบทั่วไป ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

ตารางที่ 5.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของน้ำมันทั้ง 4 ชนิด

สาร	ระดับความเป็นพิษ	หมายเหตุ
ไอโซโพรพิลไมริสเตต	4	รุนแรง
เอทิลโอลีเอต	0	-
เดคานอล	0	-
เฮปแทน	2	ปานกลาง

จากตารางที่ 5.5 จะเห็นว่าเฮปแทนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับ 2 ส่วนเดคานอลมีความปลอดภัยต่อเซลล์ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเดคานอลมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาเตรียมไมโครอิมัลชันเพื่อประยุกต์ใช้ในการบรรจุยาเมโทรเทรกเซตต่อไป

5.3 ไมโครอิมัลชันสำหรับบรรจุยาเมโทรเทรกเซต

ผิวหนังมีค่าความเป็นกรดต่าง 7.35-7.45 (Kung, 1980) ส่วนเลือดมีค่าความเป็นกรดต่าง 5.00-6.00 (Waugh, 2007) จึงนำน้ำมันที่สามารถคัดเลือกได้แล้ว คือเดคานอล มาทำการศึกษาการเตรียมไมโครอิมัลชันกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เพื่อให้มีสถานะคล้ายกับผิวหนัง และอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 เพื่อให้มีสถานะคล้ายกับเลือด ซึ่งการใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนการใช้น้ำกลั่นนั้นเปรียบเสมือนการเติมสารเติมแต่งลงในระบบ จึงอาจมีผลต่อโครงสร้างและเสถียรภาพของไมโครอิมัลชัน โดยสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุจะได้รับผลจากสารเติมแต่งมากกว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Kreilgaard, 2002) และเนื่องจากบัฟเฟอร์เป็นสารละลายที่มีองค์ประกอบสอง

อย่างอยู่ด้วยกันคือ กรดอ่อนกับเกลือของกรดอ่อน หรือเบสอ่อนกับเกลือของเบสอ่อน ซึ่งกรดอ่อนหรือเบสอ่อนเมื่อละลายน้ำจะแตกตัวเป็นเกลือได้ไม่สมบูรณ์ ดังสมการที่ 5.3-1



จากสมการจะเห็นว่าในขณะที่กรดอ่อนแตกตัวให้เกลือของกรดอ่อนอยู่นั้น เกลือของกรดอ่อนก็สามารถรวมตัวกับโปรตรอน กลับมาเป็นกรดอ่อนได้ ในภาวะสมดุลหนึ่ง ๆ จะพบเกลือของกรดอ่อนและกรดอ่อนในสัดส่วนที่คงที่ ค่าคงที่การแตกตัวของกรดอ่อน (K_a) นั้น เขียนได้ดังสมการ Henderson-Hasselbalch ดังนี้

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \quad (5.3-2)$$

และ $pK_a = -\log K_a \quad (5.3-3)$

โดย HA = กรด
 A^- = คอนจูเกตเบส ของ HA
 K_a = ค่าคงที่ในการแตกตัวของกรด (สุริยา, 2551)

pK_a เป็นการแปลงค่าคงที่การแตกตัวของกรด ถ้าสารมีค่า pK_a น้อย คือ สารนั้นแตกตัวให้โปรตรอนได้ดี ในทางกลับกันถ้าสารมีค่า pK_a มาก คือสารนั้นแตกตัวให้โปรตรอนได้ไม่ดี โดยค่า pK_a ของอะซีเตตบัฟเฟอร์มีค่าเท่ากับ 4.76 และมีการแตกตัวดังสมการที่ (5.3-4) ส่วนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มี pK_a 3 ค่าได้แก่ 2.15 7.21 และ 12.33 เนื่องจากสามารถแตกตัวได้ 3 ครั้ง ดังสมการที่ (5.3-5)- (5.3-7) ตามลำดับ (Thompson, 2004) ซึ่งจากสมการการแตกตัว และค่า pK_a จะเห็นว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีการแตกตัวมากกว่าและซับซ้อนกว่าอะซีเตตบัฟเฟอร์



(www.nextnano.de)

ประจุของไอออนที่ได้จากการแตกตัว และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้จะส่งผลต่อค่าความแรงประจุ (ionic strength) ของระบบ โดยในการทดลองใช้อะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 mol/dm³ ส่วนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 mol/dm³ เมื่อนำมาคำนวณค่าความแรงประจุของ

บัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดดังสมการที่ (5.3-8) พบว่าอะซีเตตบัฟเฟอร์และฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าความแรงประจุเท่ากับ 0.1 และ 1.7 ตามลำดับ

$$I = \frac{1}{2} \sum_{B=1}^n c_B z_B^2 \quad (5.3-8)$$

โดย c_B คือ ความเข้มข้นของไอออน B (mol/dm³)

z_B คือ ประจุของไอออน B

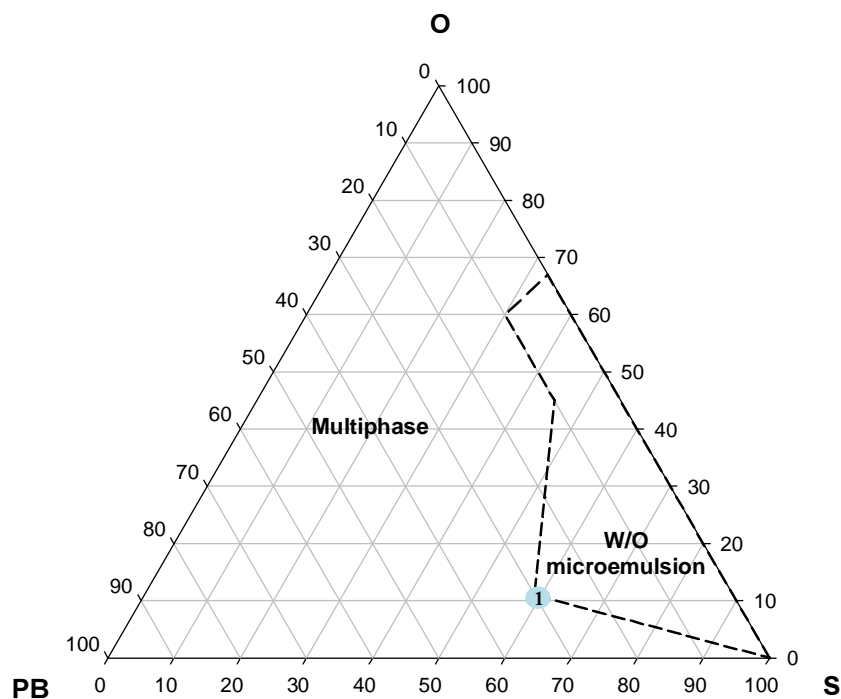
ในการอธิบายผลการที่แตกต่างกันจากการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดเป็นส่วนน้ำของไมโครอิมัลชันนั้น สามารถอธิบายได้โดยหลักการเกี่ยวกับการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นวัฏภาคน้ำในไมโครอิมัลชัน เนื่องจากการเติมสารที่มีประจุลงในไมโครอิมัลชันเหมือนกัน ส่งผลให้การความแรงของประจุเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกัน จึงขอยกตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาผลของการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อปริมาณน้ำในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุลบเช่นเดียวกับแรมโนลิปิด จำนวน 4 งานวิจัย ดังนี้

Khoshkbarchi และ Vera (1995) ศึกษาอิทธิพลของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ (anionic surfactant) 3 ชนิด ได้แก่ bis (2,4,4-trimethylpentyl) sodium phosphinate (NaPOO), bis (2,4,4-trimethylpentyl) sodium monothiophosphinate (NaPSO), และ bis (2,4,4-trimethylpentyl) sodium dithiophosphinate (NaPSS) โดยใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมคือเพนทานอล น้ำมันที่ใช้คือ ไอโซออกเทน และใช้ส่วนน้ำคือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-300 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณน้ำในไมโครอิมัลชันลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากการเพิ่มความแรงของประจุ (ionic strength) ในไมโครอิมัลชัน และเกิดแรงผลักระหว่างส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวที่พื้นที่ผิวสัมผัสของน้ำและน้ำมัน ทำให้ส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวเข้าใกล้กันมากขึ้น ไมโครอิมัลชันจึงมีขนาดลดลง และปริมาณน้ำไมโครอิมัลชันที่บรรจุได้จึงลดลง ซึ่งผลการทดลองนี้กับสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mitra และ Paul (2005) ศึกษาปริมาณน้ำที่ละลายในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันของระบบที่ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุลบ คือ AOT และสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุหลากหลายชนิด โดยใช้ส่วนน้ำมันคือไอโซโพรพิลโมริสเตต พบว่าปริมาณน้ำที่ละลายได้ในรีเวอร์สไมเซลล์ ขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว และอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุและไม่มีประจุ และยังพบว่า การเติมอิเล็กโทรไลต์ (สารละลายโซเดียมคลอไรด์) ลงในระบบเป็นการช่วยเพิ่มความจุของน้ำที่ละลายได้ในไมโครอิมัลชัน แต่หากเติมปริมาณมากเกินไป จะทำให้ปริมาณน้ำที่ละลายในไมโครอิมัลชันลดลง ซึ่ง

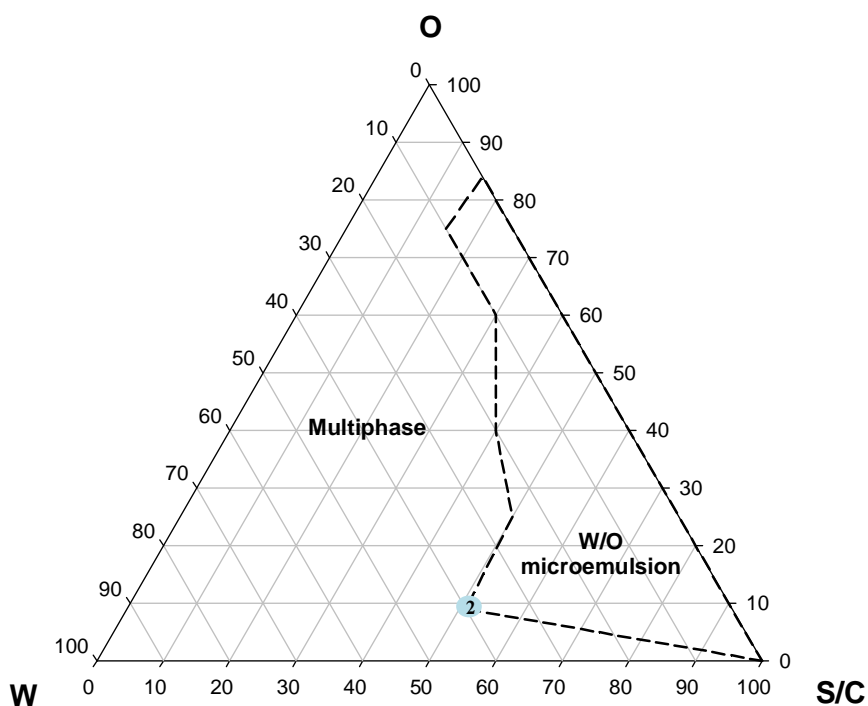
ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำที่ละลายในไมโครอิมัลชันมากที่สุด ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิด

จากผลการทดลองใช้บัพเฟอร์ทั้งสองชนิดเป็นวัฏภาคน้ำ สามารถแสดงผลการศึกษาเป็นแผนภาพวัฏภาคสามองค์ประกอบ ดังรูปที่ 5.10 และ 5.11 ตามลำดับ จากรูปจะพบว่าการใช้อะซีเตตบัพเฟอร์ พีเอช 5.5 จะได้รับบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันกว้างกว่า และสามารถบรรจุสารละลายบัพเฟอร์ในไมโครอิมัลชันได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4 แต่เมื่อเทียบกับระบบที่ใช้น้ำกลั่นสองครั้งเป็นวัฏภาคน้ำ (รูปที่ 5.7) พบว่าไมโครอิมัลชันที่ได้จากการใช้ใช้น้ำกลั่น 2 ครั้ง สามารถบรรจุน้ำได้มากที่สุด คือ ประมาณ 50% โดยมวล รองลงมาคือ ฟอสเฟตบัพเฟอร์และอะซีเตตบัพเฟอร์ซึ่งสามารถบรรจุน้ำได้ ประมาณ 40% และ 30% โดยมวล ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารละลายบัพเฟอร์ที่ใช้ ไม่ได้มีส่วนช่วยให้ไมโครอิมัลชันบรรจุน้ำได้มากขึ้น ทั้งที่จริงๆแล้วจากการเติมบัพเฟอร์ซึ่งเป็นสารที่สามารถแตกตัวได้นั้น ควรจะส่งผลให้ความแรงของประจุภายในไมโครอิมัลชันมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลให้พื้นที่ของส่วนหัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวลดลง และค่าอัตราส่วนการรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น (Nedjhioui และคณะ, 2007; Polizelli และคณะ, 2008) อาจเป็นเพราะว่าฟอสเฟตบัพเฟอร์มีการแตกตัวที่มากกว่า และซับซ้อนกว่าอะซีเตตบัพเฟอร์ จึงส่งผลให้ภายในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่เกิดขึ้นนั้น มีความแรงของประจุที่สูงเกินไป ส่งผลให้เกิดการผลักกันของส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวบริเวณระหว่างวัฏภาคของน้ำและน้ำมัน เป็นผลให้พื้นที่ของส่วนหัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น ทำให้เกิดการรวมตัวกันไม่ดี อัตราส่วนการรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวจึงมีค่าต่ำ อีกทั้งความเข้มข้นของสารละลายบัพเฟอร์ที่ใช้อาจมากเกินไป (ฟอสเฟตบัพเฟอร์ 200 มิลลิโมลาร์ และอะซีเตตบัพเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์) ทำให้ภายในไมโครอิมัลชันมีความแรงของประจุมากเกินไป จึงส่งผลให้บรรจุน้ำได้น้อย ดังเหตุผลที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (Khoshkbarchi และ Vera, 1995; Mitra และ Paul, 2005) และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 2.9 จะพบว่า การเพิ่มพื้นที่ของส่วนหัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิว ทำให้เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันได้น้อยลง เป็นผลให้ไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสเฟตบัพเฟอร์ ต้องใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่มากกว่า และสามารถบรรจุน้ำได้น้อยกว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากอะซีเตตบัพเฟอร์

จากผลการทดลองทำให้สามารถคัดเลือกระบบไมโครอิมัลชันเพื่อนำมาศึกษาอิทธิพลของขามโศเทรกเขตต่อแผนภาพวัฏภาคและอิทธิพลของขามโศเทรกเขตต่อความสามารถในการบรรจุยา ดังตารางที่ 5.3 และแสดงสัญลักษณ์ (●) ไว้ในแผนภาพวัฏภาค



รูปที่ 5.9 แผนภาพวิภูภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชันของระบบ ฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4 (PB) / แรมโนลิปิด/บิวทานอล (S/C) / เดคานอล (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C



รูปที่ 5.10 แผนภาพวิภูภาคของระบบสามองค์ประกอบแสดงส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชันของระบบ อะซีเตตบัพเฟอร์ พีเอช 5.5 (AB) / แรมโนลิปิด/บิวทานอล (S/C) / เดคานอล (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C

ตารางที่ 5.3 ระบบไมโครอิมัลชันที่คัดเลือกนำมาศึกษา

ระบบที่	ชื่อระบบ	S/C (%)	O (%)	W (%)
1	ME-PB	60	10	30
2	ME-AB	51	9	40

หมายเหตุ ME-PB คือ ไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ME-AB คือ ไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากอะซีเตตบัฟเฟอร์

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในไมโครอิมัลชันระบบที่คัดเลือกมาจากตารางที่ 5.3 พบว่าระบบที่ 1 มีความเข้มข้นของแรมโนลิปิดประมาณ 200 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนระบบที่ 2 มีความเข้มข้นของแรมโนลิปิดประมาณ 170 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับตารางที่ 5.1 จะพบว่าการใช้ระบบทั้งสอง มีความเข้มข้นของแรมโนลิปิดอยู่ระหว่าง 150-300 $\mu\text{g/ml}$ จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ระหว่าง 4.57-82.90

5.4 ความสามารถในการบรรจุยาเมโททรกเซตของไมโครอิมัลชัน

การบรรจุยาลงไปไมโครอิมัลชันสามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายยาเมโททรกเซตในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นใช้สารละลายนี้แทนน้ำในการเตรียมไมโครอิมัลชัน โดยใช้อัตราส่วนของสารตามที่คัดเลือกไว้ในตารางที่ 5.3 ในการทดลองได้ทำการหาค่าความสามารถในการละลายของยาเมโททรกเซตในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 5.4 และในการเตรียมไมโครอิมัลชันนั้นจะใช้สารละลายยาที่มีความเข้มข้นมากที่สุด และที่ 80 % ของความเข้มข้นมากที่สุด เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของยาที่บรรจุลงไป เพราะยาเมโททรกเซตมีความชอบน้ำสูง เมื่อนำสารละลายยาที่มีความเข้มข้นอิมิตัวมาใช้งาน เมื่ออยู่ในระบบที่มีสารชนิดอื่นคือ เดคานอล แรมโนลิปิดและบิวทานอล ซึ่งมีความชอบน้ำต่ำกว่า อาจทำให้ยาละลายได้ลดลง และอาจแขวนลอยหรือตกตะกอนอยู่ในสารละลาย ส่งผลให้ไม่สามารถบรรจุอยู่ในไมโครอิมัลชันได้ ปริมาณของยาที่ใส่ลงไปในการเตรียมไมโครอิมัลชันสามารถคำนวณได้ดังตารางที่ 5.5

ตารางที่ 5.4 ความสามารถในการละลายของยาเมโททรกเซต ที่อุณหภูมิ 37 °C

ระบบ	ค่าการละลาย ($\mu\text{g/ml}$)
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4	3400.00
อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5	2050.00

ตารางที่ 5.5 ปริมาณยามะโรเทรกเซตในไมโครอิมัลชัน

ระบบ	ปริมาณ MTX ($\mu\text{g/ml}$)	หมายเหตุ
100 ME-PB	1009.08	100% MTX in PB
80 ME-PB	807.26	80% MTX in PB
100 ME-AB	820.00	100% MTX in AB
80 ME-AB	656.00	80% MTX in AB

หมายเหตุ PB คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

AB คือ อะซีเตตบัฟเฟอร์

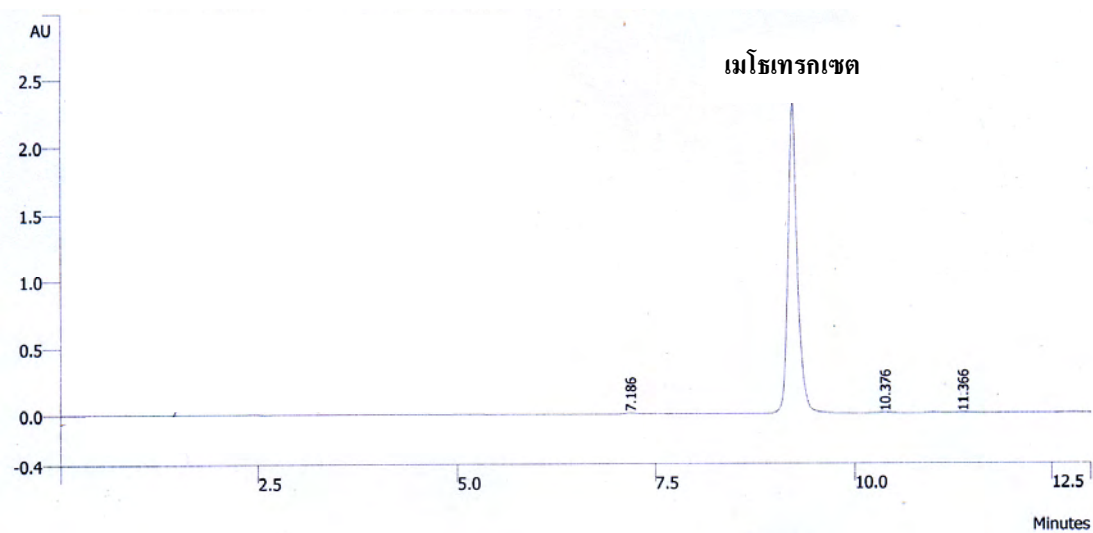
การเติมสารเติมแต่งเช่น บัฟเฟอร์ อิเล็กโตรไลต์ และยา เป็นต้น มีผลต่อโครงสร้างและเสถียรภาพของไมโครอิมัลชัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุจะได้รับผลจากสารเติมแต่งมากกว่า สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Kreilgaard, 2002) ซึ่งจากงานวิจัยของ Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez (2001) ศึกษาการบรรจุยามะโรเทรกเซตลงในไมโครอิมัลชัน 2 ระบบ ระบบแรกเตรียมจากสารลดแรงตึงผิวคือ Labrasol และ Plurol Isostearique, น้ำมันคือเอทิลอะซีเตต, ส่วนน้ำคือ 154 mM NaCl pH 7.4 ส่วนระบบที่สองเตรียมจากสารลดแรงตึงผิวคือ Tween80 Span 80 และ 1,2-octanediol น้ำมันคือ ไอโซโพรพิล ไมริสเตต, ส่วนน้ำคือน้ำกลั่นสองครั้ง พบว่าเมื่อเติมยามะโรเทรกเซตลงแล้ว ไมโครอิมัลชันยังคงมีลักษณะโปร่งแสง ไม่มีสีขาวขุ่น เป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่ายามะโรเทรกเซตไม่มีผลต่อเสถียรภาพของไมโครอิมัลชัน

จากการทดลองพบว่าการบรรจุยามะโรเทรกเซตลงในไมโครอิมัลชันจากที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด ทั้งที่บรรจุและไม่บรรจุยามะโรเทรกเซต มีลักษณะโปร่งแสงเหมือนกัน และเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าไมโครอิมัลชันยังคงมีเสถียรภาพดั้งเดิม ดังนั้นการเติมยามะโรเทรกเซตลงไปเป็นสารเติมแต่งของไมโครอิมัลชันที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้ ไม่มีผลต่อเสถียรภาพของไมโครอิมัลชัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Alvarez-Figueroa และ Blanco-Mendez (2001) แต่จากทฤษฎีแล้วการเติมยามะโรเทรกเซตลงไปไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุ น่าจะมีผลต่อโครงสร้างและเสถียรภาพของไมโครอิมัลชัน เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของยามะโรเทรกเซตแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วน pteric acid เชื่อมต่อกับส่วน glutamic acid ด้วยพันธะเอไมด์ ยามะโรเทรกเซตจึงทำหน้าที่เสมือนเป็นกรดอ่อน (จาก COOH ของส่วน glutamic acid) และเป็นเบสอ่อน (จากส่วน pteric acid) (ดังรูปที่ 2.9) เมื่อละลายน้ำจะแตกตัวได้บางส่วน ทำให้ในสารละลายมีไอออนของโมเลกุลที่แตกตัว ดังนั้นจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงของความสามารถของประจุในไมโครอิมัลชัน แต่การเปลี่ยนแปลงนี้อาจมีค่าไม่มากเพียงพอที่จะมีผลต่อโครงสร้างและเสถียรภาพของไมโครอิมัลชัน

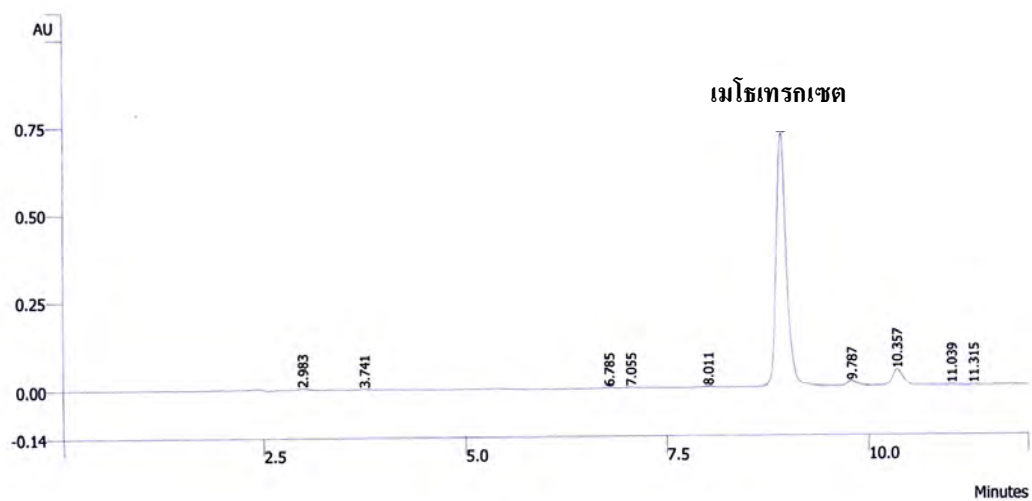
5.4.1 อิทธิพลของยามะโรเทรกเซตต่อความสามารถในการบรรจุยา

ความสามารถในการละลายของยาในไมโครอิมัลชัน ขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัย โดยปัจจัยแรกคือ องค์ประกอบของไมโครอิมัลชัน ส่วนปัจจัยที่สองคือน้ำหนักโมเลกุลของยา โดยยาที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะมีข้อจำกัดในการละลายมากกว่ายาที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Kumar และ Mittal, 1999) ซึ่งเมโรเทรกเซตจัดว่าเป็นยาที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงชนิดหนึ่ง (354.4 g/mol) จึงอาจมีข้อจำกัดในการละลายในไมโครอิมัลชัน

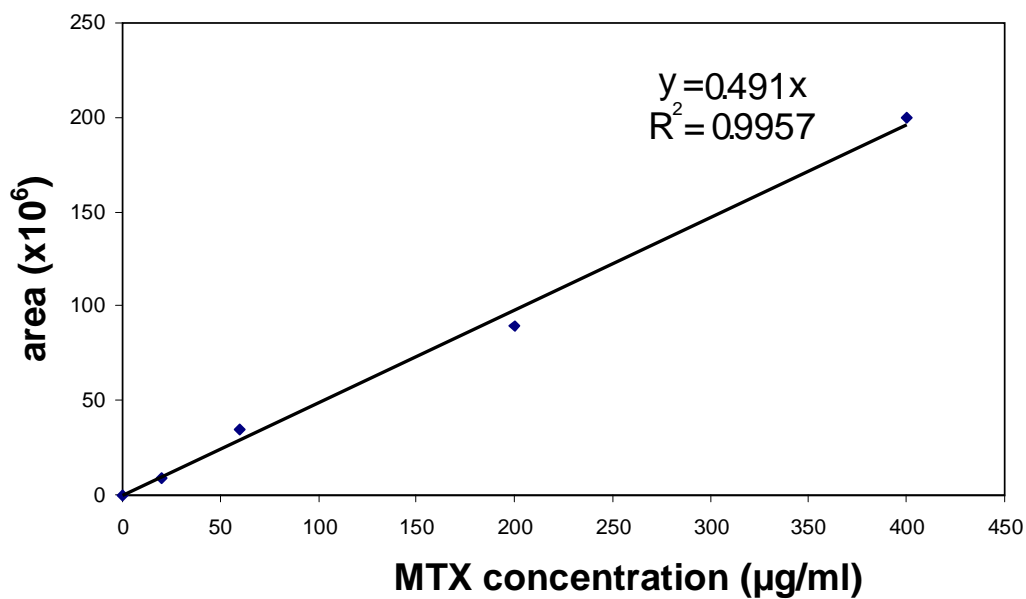
การวิเคราะห์หาปริมาณยามะโรเทรกเซตที่บรรจุในไมโครอิมัลชันโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในเบื้องต้นได้สร้างกราฟมาตรฐานของยามะโรเทรกเซตจากสารละลายมาตรฐานยามะโรเทรกเซตในอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสร้างกราฟมาตรฐานของยามะโรเทรกเซตจากสารละลายมาตรฐานยามะโรเทรกเซตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ column ชนิด C18 (150 x 4.6 มิลลิเมตร.), อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตร/นาที, เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ เมทานอล : สารละลายบัฟเฟอร์ (10:90), UV-detector วัดที่ความยาวคลื่น 303 nm, ปริมาตรที่ฉีด (injection volume) คือ 20 μ l ผลที่ได้ปรากฏพีคของยามะโรเทรกเซตที่ retention time ประมาณ 9 นาที ดังรูปที่ 5.11 และ 5.12 ซึ่งเป็นพีคจากของยาสารละลายมาตรฐานและจากไมโครอิมัลชันตามลำดับ เมื่อวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานยามะโรเทรกเซตกับพื้นที่ใต้กราฟ จะได้กราฟมาตรฐานของยามะโรเทรกเซตในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ดังรูปที่ 5.13 และกราฟมาตรฐานของยามะโรเทรกเซตในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ดังรูปที่ 5.14



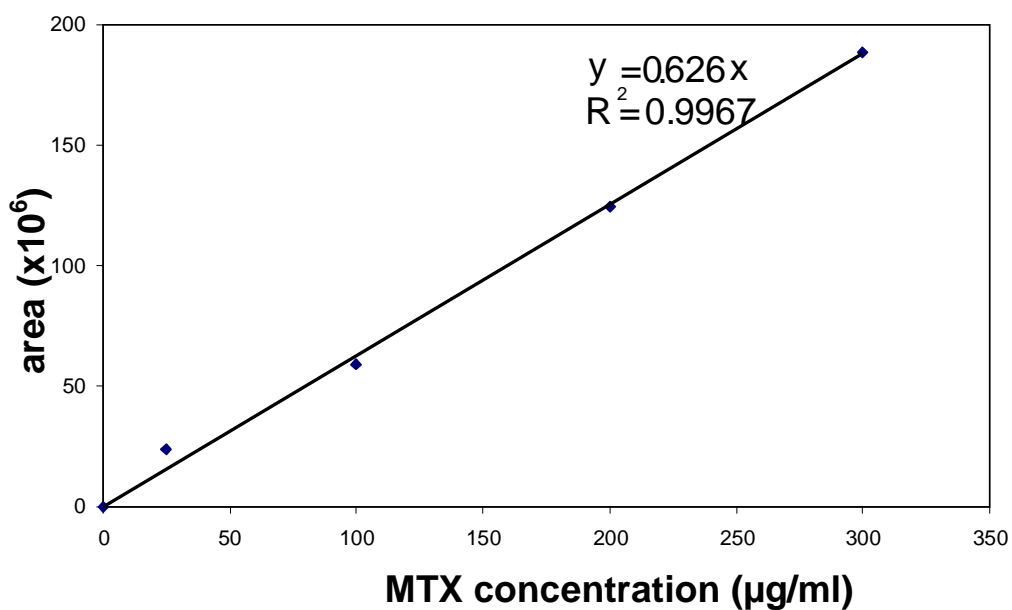
รูปที่ 5.11 ตัวอย่างกราฟ HPLC ของเมโรเทรกเซตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์



รูปที่ 5.12 ตัวอย่างกราฟ HPLC ของไมโครอิมัลชันที่บรรจุยาเมโรเทรกเซต



รูปที่ 5.13 กราฟมาตรฐานของยามเมโทเทรกเซตในอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช5.5 จากสารละลายมาตรฐานยามเมโทเทรกเซตความเข้มข้น 20, 60, 200 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 5.14 กราฟมาตรฐานของยามเมโทเทรกเซตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 จากสารละลายมาตรฐานยามเมโทเทรกเซตความเข้มข้น 25, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของยามะโรเทรกเซตที่บรรจุในไมโครอิมัลชัน กับกราฟมาตรฐาน สามารถสรุปปริมาณยาที่บรรจุได้ดังตารางที่ 5.6 ซึ่งปริมาณยาที่บรรจุและประสิทธิภาพการบรรจุยา สามารถคำนวณ ได้ดังสมการที่ 5.4.1-1 และ 5.4.1-2 ตามลำดับ

$$\text{ปริมาณยาที่บรรจุ} = \frac{\text{ปริมาณยาที่วัดได้จาก HPLC}}{\text{ปริมาณสารทั้งหมด}} \quad (5.4.1-1)$$

$$\text{ประสิทธิภาพการบรรจุยา} = \frac{\text{ปริมาณยาที่บรรจุได้}}{\text{ปริมาณยาเริ่มต้น}} \times 100 \quad (5.4.1-2)$$

ตารางที่ 5.6 ปริมาณยามะโรเทรกเซตที่บรรจุในไมโครอิมัลชัน (เตรียมที่อุณหภูมิ 37°C)

ระบบ	พีเอช	ปริมาณยาเริ่มต้น (µg/ml)	ปริมาณยาที่บรรจุ (µg/ml)	ประสิทธิภาพ การบรรจุยา (%)
100 ME-PB	7.4	1009.08	301.09	29.52
80 ME-PB	7.4	807.26	329.14	40.34
100 ME-AB	5.5	820.00	603.62	73.61
80 ME-AB	5.5	656.00	656.00	100.00

จากตารางที่ 5.6 จะพบว่าไมโครอิมัลชันทั้งสองระบบบัฟเฟอร์ ที่เตรียมจากสารละลายความเข้มข้น 80 % ของยามะโรเทรกเซตอิมัลชัน สามารถบรรจุยาได้ดีกว่าการใช้สารละลายยาอิมัลชัน เนื่องจากยามีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เมื่ออยู่ในระบบไมโครอิมัลชันที่มีความขุ่นน้ำต่ำกว่า สารละลายบัฟเฟอร์ จึงไม่สามารถบรรจุอยู่ในไมโครอิมัลชันได้ และจากตารางที่ 5.6 ยังแสดงให้เห็นว่ายามะโรเทรกเซตสามารถละลายในไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากอะซีเตตบัฟเฟอร์ได้ดี มีประสิทธิภาพการบรรจุยา 73.61-100.00% เมื่อเทียบกับไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งมีประสิทธิภาพการบรรจุยาก่อนข้างต่ำ คือ 29.52-40.34% ซึ่งเป็นผลจากความสามารถในการแตกตัวของบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.3 และเนื่องจากยามะโรเทรกเซตเป็นยาที่มีขั้ว มีค่า pKa 2 ค่า คือเท่ากับ 4.8 และ 5.5 คือสามารถแตกตัวได้สองครั้ง ดังนั้นเมื่อมีการแตกตัวจะเป็นการเพิ่มความแรงของประจุในไมโครอิมัลชัน ส่งผลให้สารลดแรงตึงผิวมีการรวมตัวกัน ได้ลดลง อีกทั้งยามะโรเทรกเซตมักถูกไอออไนซ์ (ionize) ที่พีเอช 7.4 (www.wikipedia.org) ดังนั้นเมื่ออยู่ในไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ซึ่งมีความแรงของประจุมากกว่า จึงอาจทำให้ยาถูกไอออไนซ์ หรือเสื่อมสภาพกลายเป็นสารประกอบชนิดอื่น และอาจรวมตัวกัน

เป็นกลุ่มก้อนแขวนลอยอยู่ในไมโครอิมัลชัน แล้วถูกกำจัดออกไปในระหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนเข้าสู่เครื่อง HPLC ส่งผลให้ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อยกว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ดังนั้นยามโทรเทรกเซตจึงเหมาะสมที่บรรจุอยู่ในไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 มากกว่า เนื่องจากมีค่าความแรงของประจุที่ต่ำกว่า อีกทั้งยังมีพีเอชใกล้เคียงกับค่า pKa ของยา ทำให้ยาที่ใส่ลงไปมีเสถียรภาพดีกว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณยามโทรเทรกเซตที่บรรจุในไมโครอิมัลชันจากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่น ดังตารางที่ 5.7 พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Alvarez-Figueroa และคณะ (2001) ระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน แต่มีค่าน้อยกว่าปริมาณที่บรรจุในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ เนื่องจากยานี้นี้สามารถละลายได้ดีในน้ำ เนื่องจากการที่มีน้ำเป็นวัฏภาคต่อเนื่องจึงมีปริมาณยาที่ละลายอยู่มาก แต่ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำไม่เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในการซึมผ่านผิวหนัง ส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Trotta และคณะ (1996) พบว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากงานวิจัยนี้สามารถบรรจุยาได้สูงกว่ามาก แต่เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Karasulu และคณะ (2007) พบว่ามีปริมาณยาต่ำกว่า แต่ปริมาณยาของงานวิจัยนี้เป็นปริมาณยาเริ่มต้นที่ใส่ในไมโครอิมัลชันทั้งหมด จึงอาจไม่ใช่ปริมาณที่แท้จริงที่ถูกบรรจุอยู่ในไมโครอิมัลชัน

ตารางที่ 5.7 ปริมาณยามโทรเทรกเซตในไมโครอิมัลชันเทียบกับงานวิจัยอื่น

องค์ประกอบ			ชนิด	ปริมาณยาที่บรรจุ ($\mu\text{g/ml}$)	อ้างอิง
น้ำมัน	สารลดแรงตึงผิว/ สารลดแรงตึงผิวร่วม	น้ำ			
Decanol	Lecithin/ benzyl alcohol	water, PG	w/o	2.5-2.8	Trotta, 1996
Ethyl oleate	Labrasol/ Plurol Oleique	Aq. 154 mM NaCl (pH 7.4)	o/w	977-1358	Alvarez- Figueroa, 2001
Isopropyl myristate	Tween 80, Span 80/ 1,2-octanediol	water	w/o	596-670	
Soybean oil	Cremophore EL, Span 80/ Isopropyl alcohol	0.2M NaOH	w/o	2500	Karasulu, 2007
Decanol	Rhamnolipid/ Butanol	0.1M AB	w/o	603-656	งานวิจัยนี้
		0.2M PB	w/o	301-329	

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิด

1. แรมโนลิปิดที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มดิบ โดยใช้จุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ได้ถึง 32 mN/m และความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์มีค่าประมาณ 50 mg/l
2. แรมโนลิปิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ระดับ 4 ดังนั้นการนำมาใช้งานจะต้องทำการเจือจางจนกระทั่งถึงระดับความเป็นพิษที่ยอมรับได้ โดยความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษของสารละลายแรมโนลิปิดเท่ากับ 10 $\mu\text{g/ml}$ และที่ความเข้มข้นมากกว่า 350 $\mu\text{g/ml}$ จะมีความเป็นพิษระดับสูงที่สุด

6.1.2 น้ำมันที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชัน

1. น้ำมันที่มีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาเตรียมไมโครอิมัลชันกับ น้ำ แรมโนลิปิดและบิวทานอล (อัตราส่วนโดยมวลของแรมโนลิปิดและบิวทานอล เท่ากับ 1:2) ที่อุณหภูมิ 37 °C เพื่อประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมคือ เดคานอล

6.1.3 ไมโครอิมัลชันสำหรับบรรจุยาเมโทเทรกเซต

1. การใช้อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 จะได้บริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันกว้างกว่า และสามารถบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ในไมโครอิมัลชันได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4
2. ระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุยาเมโทเทรกเซต ดังนี้
 - สารลดแรงตึงผิว 60%, เดคานอล 10% และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30%
 - สารลดแรงตึงผิว 51%, เดคานอล 9% และอะซีเตตบัฟเฟอร์ 40%

6.1.4 อิทธิพลของยาเมโทเทรกเซตต่อการเตรียมไมโครอิมัลชัน

1. เมื่อนำสารละลายยาเมโทเทรกเซตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวมาใช้งาน เมื่ออยู่ในระบบที่มีสารชนิดอื่นที่มีความชอบน้ำต่ำกว่า ทำให้ยารวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน ส่งผลให้ไม่สามารถบรรจุอยู่ในไมโครอิมัลชันได้ และกลายเป็นสารแขวนลอยอยู่ในไมโครอิมัลชัน
2. ปริมาณยาเมโทเทรกเซตที่บรรจุในไมโครอิมัลชันจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 329.14 $\mu\text{g/ml}$ คิดเป็นประสิทธิภาพการบรรจุยา 29.52%
3. ปริมาณยาเมโทเทรกเซตที่บรรจุในไมโครอิมัลชันจากอะซีเตตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 603.62 $\mu\text{g/ml}$ คิดเป็นประสิทธิภาพการบรรจุยา 73.61%

4. ไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 สามารถบรรจุแอมโธเทรกเซตได้มากกว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองพบว่าการสกัดแยกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพนั้นมีขั้นตอนที่ยุงยาก อีกทั้งยังใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย จึงน่าจะมีการศึกษาวิธีการสกัดแยกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยใช้สารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายและสามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดได้ โดยคุณสมบัติของสารไม่เปลี่ยนแปลง
2. เนื่องจากไมโครอิมัลชันที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้ มีเป้าหมายเพื่อนำส่งยาผ่านผิวหนัง จึงควรมีการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังของแรมโนลิปิดและไมโครอิมัลชัน ก่อนการนำไปใช้งานจริง
3. ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบกับสารลดแรงดึงผิวชนิดอื่น ที่มีการใช้งานทางเภสัชกรรม
4. ในการเปรียบเทียบคุณภาพของระบบไมโครอิมัลชันนั้น ควรใช้ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เท่ากัน เพื่อสามารถเปรียบเทียบความแรงประจุที่เกิดในไมโครอิมัลชันได้ โดยปราศจากผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จิราภรณ์ ธนีย์วัน, ณัฐชนันท์ สีพิพัฒนไพบุลย์ และนพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ. การติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย Pseudomonas sp. A41 ในอาหารที่มีน้ำมันและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน. รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.
- ณรงค์ ลักษณาภิรมย์. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย Pseudomonas sp. A41 ในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.
- พรรณเพ็ญ วัฒนาอาษากิจ. การศึกษาการเตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำใส. โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2540.
- มณฑนา ภาณุมาภรณ์. อิมัลชันและยาเหน็บ. ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ, 2544.
- หน่วยปฏิบัติการทดสอบทางชีวภาพสำหรับวัสดุทางการแพทย์. รายงานผลการทดสอบเลขที่ HT 0285/51. งานห้องปฏิบัติการทดสอบทั่วไป, ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2551.

ภาษาอังกฤษ

- Aboofazeli, R. and Lawrence, M.J. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. II. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and alcohol: influence of purity of lecithin. Inter. J. Pharm. 106(1994): 51-61
- Alvarez-Figueroa, M.J. and Blanco-Mendez, J. Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. Inter. J. Pharm. 215(2001): 57-65.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol. 53(2000): 495-508.
- Bayrak, Y. and Iscan, M. Studies on the phase behavior of the system non-ionic surfactant/alcohol/alkane/H₂O. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 268(31) 99-103.

- Binks, B. P., Espert, A., Fletcher, D. I. and Soubiran, L. Phase behaviour of microemulsions stabilised by double chain cationic surfactants and alcohol co-surfactants. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 212(2003) 135-145.
- Clifford, J.S., Ioannidis, M.A., Legge, P.L. Enhanced aqueous solubilization of tetrachloroethylene by a rhamnolipid biosurfactant. Journal of Colloid and Interface Science. 305 (2007):361–365.
- Clint, J.H. Micelle formation. Surfactant aggregation, pp. 82-129. New York : Chapman and Hall, 1992.
- Delgado-Charro, M.B. and Iglesias-Vias, G. Delivery of hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. European Journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics. 43(1997): 32-42.
- Delgado-Charro, M.B. and Guy, R.H. Transdermal drug delivery. London: Taylor & Francis. 2001: 421-441.
- Desai, J.D. and Banat, I.M. Microbial production of surfactant and their commercial potential. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 61(1997):47-64.
- Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M. and Krajisnik, D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. International Journal of Pharmaceutics. 271(2004): 11-19.
- Fiechter, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends. Biotechnol. 10(1992): 208-217.
- Friberg, S. E., Sun, W. M., Yang, Y. and Ward, J. I. Molecular interactions in a nonaqueous cationic system. Journal of Colloid and Interface Science. 139(1990): 160-168.
- Feiend, D., Catz, P., Heller, J. Reid, J., Baker, R. Transdermal delivery of levonorgestrel. I: Alkanols as permeation enhancers in vitro. Journal of controlled release. 7(1988): 243-250.
- Gallarate, M., Carlotti, M.E., Trotta, M. and Bovo, S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. Int J Pharm. 188(1999): 233-241

- Garti, N., Aserin, A., Ezrahi, S. and Wachtel, E. Water Solubilization and Chain Length Compatibility in Nonionic Microemulsions. Journal of Colloid and Interface Science. 169(1995): 428-436.
- Goodman, M. and Barry, B.W. Lipid-protein-partitioning (LPP) theory of skin enhancer activity: finite dose technique. International journal of pharmaceutics. 57(1989): 29-40
- Guy, R.H. Current status and future prospects of transdermal drug delivery. Pharm. Res. 13(1996): 1765-1769
- Halbert, G.W., Stuart, J.F.B., Florence, A. The incorporation of lipid-soluble antineoplastic agents into microemulsions-protein-free analogues of low density lipoprotein. International journal of pharmaceutics. 21 (1984): 219-232.
- Healy, M.G., Devine, C.M. and Murphy, R. Microbial production of biosurfactants. Resources, Conservation and Recycling. 18(1996): 41-57
- Holmberg, K. Surfactants and polymers in aqueous solution. John Wiley & Sons. England. 2(2003): 139.
- Kaisri, U. Microemulsions. J. Pharm. Sci. 15(1990): 43-54.
- Karasulu, H.Y., Karabulut, B.; Goker, E., Guneri, T., Gabor, F. Controlled Release of Methotrexate from W/O Microemulsion and Its In Vitro Antitumor Activity. Drug delivery. 14(2007): 225–233.
- Khoshkbarchi, M.K. and Vera, J.H. Formation of Water in Oil Microemulsions with Three Dialkyl Sodium Phosphinates in Alcohol/Isooctane Mixtures. Journal of Colloid And Interface Science. 170(1995): 562-568.
- Kogan, A. and Garti, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. Advances in Colloid and Interface Science. 123–126(2006) 369–385.
- Kreilgaard, M., Pedersen, E.J. and Jaroszewski, J.W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. Journal of Controlled Release., 69(2000): 421-433.
- Kumar, P. and Mittal, K.L. Handbook of microemulsion science and technology. New York : Marcel Dekker. (1999). 247-253 Lawrence and Rees, 2000
- Kung, H.F. and Blau, M. Regional Intracellular pH Shift: A Proposed New Mechanism for Radiopharmaceutical Uptake in Brain and Other Tissues J Nucl. Med. 21(1980):147-152.

- Lawrence, M.J. and Rees, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews. 45(2000): 89–121.
- Langevin, D. Micelles and Microemulsions. Annual Reviews in Physical Chemistry. 43(1992):341-369.
- Li, X. and Kunieda, H. Catanionic surfactants: microemulsion formation and solubilization. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 8(2003): 327-336
- Lu, G. and Jun, H.W. Diffusion studies of methotrexate in carbopol and paloxamer gels. Inter. J. Pharm. 160(1994): 1-9
- Mills, P.C. and Cross, S.E. Transdermal drug delivery: Basic principles for the veterinarian. The Veterinary Journal. 172(2006) 218–233
- Mitra, R.B. and Paul, B.K. Effect of temperature and salt on the phase behavior of nonionic and mixed nonionic-ionic microemulsions with fish-tail diagrams. Journal of Colloid and Interface Science. 201(2005):550-559
- Nedjhiouia, M., Canselierb, J.P., Moulai-Mostefaa, N., Bensmailic, A., Skendera, A. Determination of micellar system behavior in the presence of salt and water-soluble polymers using the phase diagram technique. Desalination. 206 (2007): 589–593.
- Nitti, V.W., Sanders, S., Staskin, D.R., Dmochowski, R.R., Sand, P.K., MacDiarmid, S. and Maibach, H.I. Transdermal delivery of drugs for urologic applications: basic principles and applications. Urology. 67(2006): 657–664.
- Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O. Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Biotechnol. Prog. 21(2005): 1562-1566.
- Polizelli, M.A., Santos, A.L., Feitosa, E. The effect of sodium chloride on the formation of W/O microemulsions in soy bean oil/surfactant/water systems and the solubilization of small hydrophilic molecules. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 315 (2008): 130–135

- Rigg, P.C. and Barry, B.W. Shed Snake Skin and Hairless Mouse Skin as Model Membranes for Human Skin During Permeation Studies. Journal of Investigative Dermatology. 94(1990): 235–240.
- Sarpotdar, P.P. and Zatz, J.L. Evaluation of penetration enhancement of lidocaine by nonionic surfactants through hairless mouse skin in vitro. Journal of pharmaceutical sciences. 75(1986):176-181.
- Shinoda, K., Arak, M., Sadaghiani, A., Khan, A. and Lindman, B., Lecithin-based microemulsions; phase behaviour and microstructure. J. Phys. Chem. 95 (1991): 989-993.
- Singh, P. and Cameotra, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends biotechnol. 22(2004): 142-146.
- Spiclin, P., Homar, M., Zupancic-Valant, A., Gasperlin, M. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. International Journal of Pharmaceutics. 256(2003): 65-73
- Szekeres, E., Acosta, E., Sabatini, D.A., Harwell, J.H. Preferential solubilization of dodecanol from dodecanol–limonene binary oil mixture in sodium dihexyl sulfosuccinate microemulsions: Effect on optimum salinity and oil solubilization capacity. Journal of Colloid and Interface Science. 287 (2005): 273–287.
- Szekeres, E., Acosta, E., Sabatini, D.A., Harwell, J.H. Modeling solubilization of oil mixtures in anionic microemulsions II. Mixtures of polar and non-polar oils. Journal of Colloid and Interface Science. 294 (2006): 222–233.
- Swarbrick, J. and Boylan, J.C. Encyclopedia of pharmaceutical technology. 9 (1988): 375-413.
- Szekeres, E., Acosta, E., Sabatini, D.A., Harwell, J.H. Modeling solubilization of oil mixtures in anionic microemulsions II. Mixtures of polar and non-polar oils. Journal of Colloid And Interface Science. 294(2006): 222-233.
- Tahzibi, A., Kamal, F., and Assadi, M.A. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. Iranian Biomedical Journal. 8(2004): 25-31.
- Trotta, M., Pattarino F., Gasco, M. R., Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions. Pharmaceutica Acta Helvetiae. 71(1996): 135-140.

- Van Dooren-Greebe, R.J., Kuijpers, A.L.A., Mulder, J., Deboo, T., Van der Kerkhof, P.C.M. Methotrexate revisited: effects of long term treatment in psoriasis. Br. J. Dermatol. 130(1994): 204-210.
- Warisnoicharoen, W., Lansley, A.B., Lawrence, M.J. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behavior. International Journal of Pharmaceutics. 198 (2000): 7–27.
- Waugh, J.M. Compositions and methods of topical application and transdermal delivery of botulinum toxins without reduced non-toxin proteins. (2007): 1-7.
- Williams, A.C. and Barry, B.W. Penetration enhancers. Adv Drug Deliv Rev. 56(2004):603-618.
- Xie, Y.W., Li, Y. and Ye, R. Effect of alcohol on phase behavior of microemulsions formed by a biosurfactant-rhamnolipid. J. Dispersion Science and Technology. 26(2005): 455-461.
- Xie, W., Ye, R. and Liu, H. Microstructure studies on biosurfactant-rhamnolipid/n-butanol/water/n-heptane microemulsion system. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. (2006)
- Zhang, Y., Miller, R.M. Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a Pseudomonas Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). Applied and environmental microbiology. 58(1992): 3276-3282.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งนิวเทรียนท์ (Nutrient Agar)

เนื้อสกัด (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

2. อาหารเหลวกำหนดสูตร (Define medium)

น้ำมันปาล์ม ¹	20.0	กรัม.
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH ₄) ₂ SO ₄)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.4	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.1	กรัม
กรดฟอสเฟอริก (H ₃ PO ₄)	0.5	มล.
กรดบอริก (H ₃ BO ₃)	1.53	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.284	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต (MnSO ₄ ·H ₂ O)	1.71	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0.7	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	2.9	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	4.3	มิลลิกรัม
โคบอลตคลอไรด์ (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0.1	มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium Pantothenate)	1.176	มิลลิกรัม
ไบโอติน (Biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดโฟลิก (Folic acid)	5.88	ไมโครกรัม
อินโนซิทอล (Inositol)	0.588	ไมโครกรัม

ไนอาซิด (Niacin)	1.176	ไมโครกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (<i>p</i> -Aminobenzoic acid)	0.588	มิลลิกรัม
ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588	มิลลิกรัม
ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	14.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

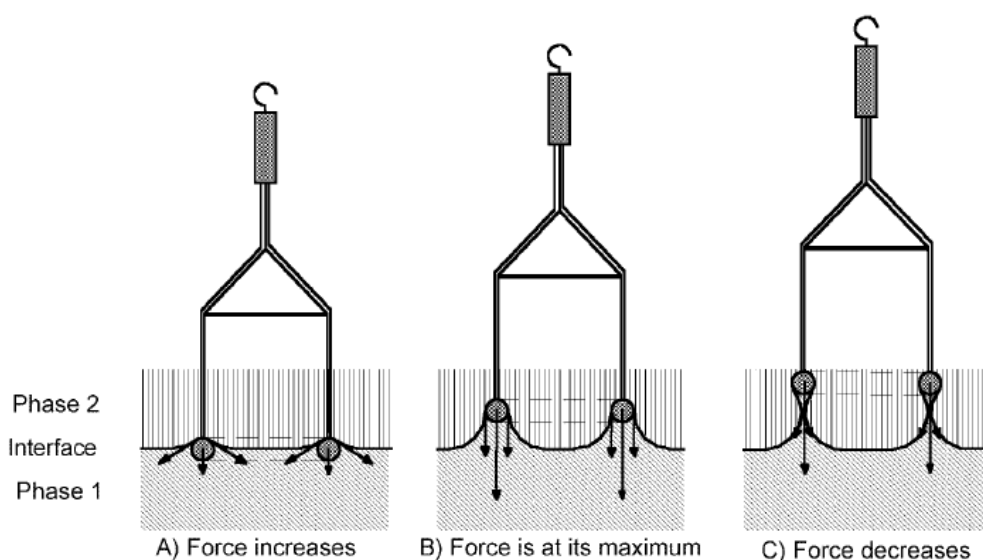
หมายเหตุ ¹ เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส และ น้ำมันปลาหมัก ในปริมาณที่เท่ากัน

ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ 7.0 แล้วนำมาเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน สำหรับสารละลายวิตามิน ได้แก่ แคลเซียม-แพนโททีนต ไบโอดีน กรดโฟลิก อินโนซิทอล ไนอาซิน กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ ไรโบฟลาวิน ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง (จิรากรณ์ และคณะ, 2547)

ภาคผนวก ข

หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี ring method หรือ Du Nouy Ring method ค้นคิดโดย Lecomte Du Nouy ในปี 1919 ซึ่งวิธีนี้จะพิจารณาวงแหวนทองคำขาว (platinum ring) ในแนวระนาบโดยวงแหวนทองคำขาวจะจมในของเหลวและถูกยกขึ้น ซึ่งแรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงวงแหวนทองคำขาวพ้นของเหลวคือค่าแรงตึงผิว (surface tension) คุณสมบัติของวงแหวนทองคำขาวคือความยาวที่ถูกทำให้เปียก (wetted length) รวมทั้งรัศมีด้านในและด้านนอกของวงแหวนทองคำขาวที่ทำให้เปียกโดยของเหลว



รูปที่ ข.1 ขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

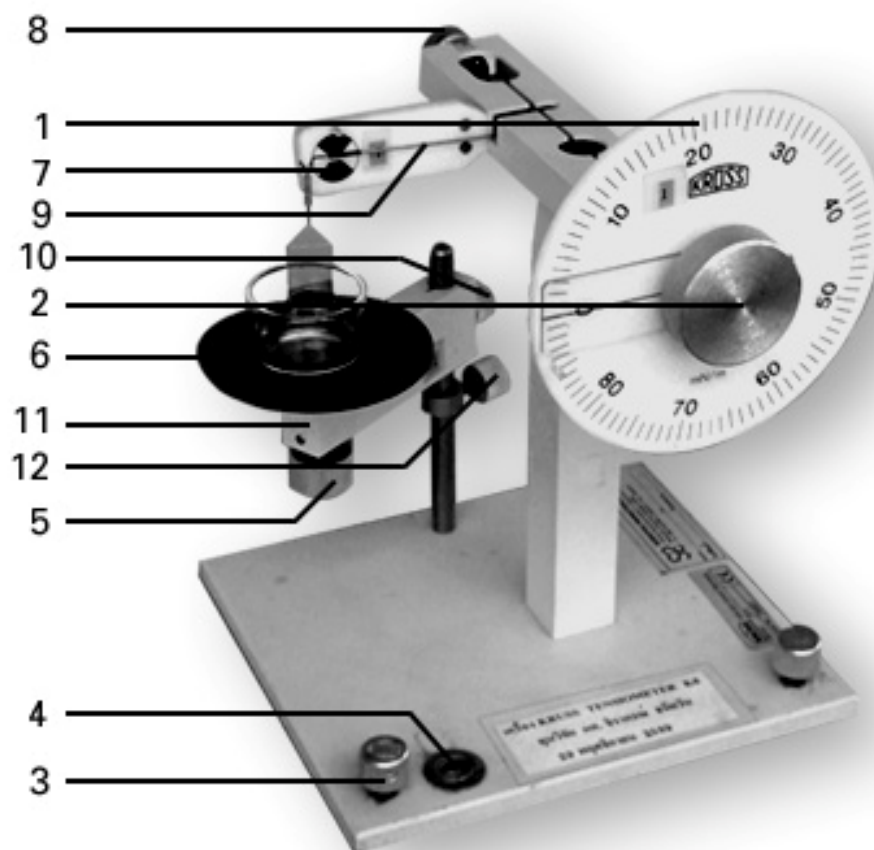
วัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring เป็นวิธีวัดสารละลายที่มีสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นถ้าพื้นผิวใหม่ถูกสร้างขึ้นขณะทำการวัดค่าแรงตึงผิว เช่นเมื่อวงแหวนยกตัวขึ้นทำให้ไม่รู้พื้นผิวอย่างแน่นอน และค่าแรงตึงผิวที่วัดได้ก็เปลี่ยนไป

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน แสดงดังรูปที่ ข.2 โดยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตลอดทำการทดลอง

ขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว มีดังนี้

1. ปรับ handwheel with point (2) ให้สเกลมีค่าศูนย์
2. ปรับ zero adjustment (8) โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลกึ่งกลางของ mark (7)
3. ปรับระดับที่วางสารตัวอย่างโดยหมุน (10) แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ
4. แขนวน ring ลงใน balance beam (9) ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลโดยหมุน zero adjustment (8) ตามเข็มนาฬิกา
5. ใส่สารตัวอย่างในที่ใส่สารตัวอย่างประมาณ 10 – 15 มล. วางลงบน sample table (6) แล้วหมุน micrometer screw (5) ตามเข็มนาฬิกาเพื่อยกที่ใส่สารตั้งอย่างขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 มม.
6. เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance beam (9) ให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้ง โดยหมุน zero adjustment (8) ทวนเข็มนาฬิกา
7. เริ่มวัดค่าแรงตึงผิวโดยหมุน micrometer screw (5) ทวนเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ ในขณะที่เดียวกันก็หมุน pointer (2) ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ โดยรักษาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุล
8. เมื่อ ring หลุดออกจากตัวอย่างอ่านค่าแรงตึงผิวตามสเกล (1) มีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร
9. เมื่อเสร็จการทดลองล้าง ring ด้วยน้ำกลั่นสะอาดให้แห้ง (หรือผ่านเปลวไฟ) เก็บเข้ากล่องไม้ ส่วน vessel ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นซับให้แห้ง
10. การเก็บเครื่องจะต้องปรับ zero adjustment (8) ให้ balance beam(9) ยกขึ้น เพื่อป้องกันการแกว่งของ balance beam ปรับที่วางตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง(13)



รูปที่ ข.2 องค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Scale in mN/m | 7. Mark |
| 2. Handwheel with pointer | 8. Handwheel for zero-adjust |
| 3. Screws for regulation of the level | 9. Balance-beam |
| 4. Box level | 10. Handwheel for fixing the crossbar |
| 5. Micrometer screw | 11. Carrier of sample-table |
| 6. Sample table | 12. Handwheel for fixing the crossbar |

ข้อควรระวัง

1. ห้ามกดปุ่มที่ด้านหลังของ zero adjustment (8) เด็ดขาดเพราะจะทำให้ wire หลุดได้
2. ห้ามหมุน zero adjustment (8) เกิน 1 รอบ
3. การใช้ ring ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังอย่าให้บิดเบี้ยวเพราะถ้า ring เสียรูปจะทำให้การวัดค่าผิดพลาดได้
4. การใช้ vessel ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง

ข้อแนะนำ

1. ขณะวัดค่าแรงตึงผิว ถ้าทำการหมุน micrometer screw (5) และ pointer(2) อย่างช้าๆจะทำให้เกิดความผิดพลาดน้อย
2. ring, vessel มีคุณสมบัติทนไฟ สามารถผ่านเปลวไฟได้ในกรณีจำเป็น
3. ขณะแขวน ring ลงบน balance beam (9) อาจต้องใช้เครื่องมือช่วยเล็กน้อย

ภาคผนวก ก

การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

1. ทำการทดสอบเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยเลือกเอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol)
2. ทำการละลายตัวอย่างในเอทานอลบริสุทธิ์ ที่ระดับความเข้มข้น 1-100 mg/ml เพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่างที่สามารถละลายได้เป็นเนื้อเดียวในสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์ 1 ml โดยใช้ ultrasonic bath เป็นอุปกรณ์ช่วยในการละลาย
3. ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal essential medium (MEM) complete medium (ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, penicillin, streptomycin) แบบการเจือจางครั้งละ 10 เท่า (10-fold dilution) ได้แก่ 1:10, 1:100 และ 1:1000

สถานะในการทดสอบ

นำเซลล์ L929 ที่ความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหารเลี้ยง MEM complete medium เติมลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม จำนวน 200 μ l/หลุม นำไปบ่มเพาะในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C, ความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เซลล์ลักษณะชั้นเดียว จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมสารสกัด (extract) ของชุดควบคุมและสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงไป หลุมละ 100 μ l โดยแบ่งเป็น

- ชุดควบคุม reagent control ได้แก่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมภายใต้สถานะเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ปราศจากตัวอย่างที่ทดสอบ

- ชุดควบคุม negative control material¹ ได้แก่ วัสดุ Thermanox (Nunc) cover slips โดย extraction ratio ที่ใช้ในการทดสอบคือ 6 cm²/ml แห้ใน extraction vehicle

- ชุดควบคุม positive control material² ได้แก่ วัสดุ Portex positive control plastic strip โดย extraction ratio ที่ใช้ในการทดสอบคือ 3 cm²/ml แห้ใน extraction vehicle

นำไปบ่มเพาะในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37±1.0 °C, 5% CO₂, ความชื้นสัมพัทธ์ 95±5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสกัดของชุดควบคุมและสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบออก ล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 1 ครั้ง แล้วเติม MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ความเข้มข้น 0.5% ใน MEM complete medium ลงไปในจานเพาะเลี้ยง หลุมละ 100 μ l จากนั้นนำไปบ่มเพาะในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37±1.0 °C, 5% CO₂, ความชื้น

สัมผัส 95±5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูด MTT ออก แล้วเติม DMSO หลุมละ 100 µl เขย่าเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็น blank

ทำการตรวจสอบการย้อมติดสี MTT ของเซลล์ในทุกชุดทดสอบ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง ชนิด phase contrast เพื่อการยืนยันผล ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ชุดทดสอบ	% การรอดชีวิตของเซลล์ ³
reagent control	100.00
negative control	97.65
positive control	3.65
สารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100	95.82
สารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 5 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100	89.86
สารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 15 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100	82.90
สารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 30 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100	4.57
สารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 35 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100	1.30
สารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 40 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100	3.65

¹ วัสดุซึ่ง, เมื่อผ่านการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10093-5: 1999(E), ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษทาง cytotoxic response

² วัสดุซึ่ง, เมื่อผ่านการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10093-5: 1999(E), ก่อให้เกิดความเป็นพิษทาง cytotoxic response

³ % การรอดชีวิตของเซลล์ = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของ DMSO}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของ DMSO}} \times 100$

เพื่อยืนยันผลที่ได้ทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง ชนิด phase contrast ดังนี้

1. พบเซลล์มีชีวิตย้อมติดสี MTT ทั้งหมด ในชุดทดสอบ reagent control, negative control และ สารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100
2. พบเซลล์ที่ไม่ย้อมติดสี MTT บางส่วน ในชุดทดสอบสารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100
3. พบเซลล์ที่ไม่ย้อมติดสี MTT ทั้งหมด ในชุดทดสอบ positive control, สารละลายแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 30, 35 และ 40 mg/ml ที่ระดับการเจือจาง 1:100

(หน่วยปฏิบัติการทดสอบทางชีวภาพสำหรับวัสดุทางการแพทย์, 2551)

ภาคผนวก ง

ผลการทดลองเพื่อวางแผนภาพวิภูภาค

จากการทดลองผสม น้ำมัน//แรม โนลิปิด/บิวทานอล/น้ำ ในอัตราส่วนต่างๆ ดังหัวข้อ 4.3.3 ลักษณะที่เกิดขึ้นของระบบต่างๆเมื่อเข้าสู่สมดุลแสดงดังตารางที่ ง.1-ง.20

ระบบที่ 1 ไอโซโพรพิลไมริสเตต/แรม โนลิปิด/บิวทานอล/น้ำ

ตารางที่ ง.1 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตต (S:O = 1:5)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:5	10	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ตารางที่ ง.2 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตด (S:O = 1:2)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:2	10	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ตารางที่ ง.3 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตด (S:O = 1:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:1	10	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	90	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ตารางที่ ง.4 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตด (S:O = 2:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
2:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	90	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ตารางที่ ง.5 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือไอโซโพรพิลไมริสเตด (S:O = 5:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
5:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	40	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ระบบที่ 2 เอทิลโอทีเอต/แรมโนลิปิด/บิวทานอล/น้ำ

ตารางที่ ๖.6 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเอทิลโอทีเอต (S:O = 1:5)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:5	10	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	3	ชั้นบนโปร่งแสงสีเหลืองอ่อน ชั้นกลางทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	60	3	ชั้นบนโปร่งแสงสีเหลืองอ่อน ชั้นกลางทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	70	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	80	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ตารางที่ ๖.7 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเอทิลโอทีเอต (S:O = 1:2)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:2	10	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่างทึบแสงสีขาวขุ่น
	50	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	60	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	70	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	80	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ตารางที่ ๘.๘ ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเอทิลโอลิเอต (S:O = 1:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:1	10	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ตารางที่ ๘.๙ ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเอทิลโอลิเอต (S:O = 2:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
2:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างสีขาวขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ตารางที่ ง.10 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเอทิลโอทีเอต (S:O = 5:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
5:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	40	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างสีน้ำตาลขุ่นแสงผ่านได้เล็กน้อย

ระบบที่ 3 เคานอล/แรมโนลิปิด/บิวทานอล/น้ำ

ตารางที่ ง.11 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเคานอล (S:O = 1:5)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:5	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างคล้ายวุ้น โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น
	40	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น
	50	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสงเล็กน้อย
	60	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสงเล็กน้อย
	70	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสง
	80	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสง
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสง

ตารางที่ ๑๒.12 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 1:2)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:2	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างคล้ายวุ้น โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างคล้ายวุ้น โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่างทึบแสงสีขาวขุ่น
	50	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น
	60	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น
	70	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น
	80	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสงเล็กน้อย
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสงเล็กน้อย

ตารางที่ ๑๒.13 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 1:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างคล้ายวุ้น โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น
	90	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น

ตารางที่ ง.14 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 2:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
2:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	40	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น

ตารางที่ ง.15 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเดคานอล (S:O = 5:1)

	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
5:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	40	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	50	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	60	2	ชั้นบนคล้ายขุ่น โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	1	ทึบแสงสีขาวขุ่น

ระบบที่ 4 เสปเทน/แรม โนลิปิด/บิวทานอล/น้ำ

ตารางที่ ง.16 ลักษณะของระบบเมื่อนำน้ำมันคือสปเทน (S:O = 1:5)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:5	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	40	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	50	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	60	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	70	3	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นกลางทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	80	3	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นกลางทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	90	3	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นกลางทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม

ตารางที่ ง.17 ลักษณะของระบบเมื่อนำน้ำมันคือสปเทน (S:O = 1:2)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:2	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	40	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	50	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	60	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	70	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	80	2	ชั้นบน โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่าง โปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน

ตารางที่ ง.18 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเฮปแทน (S:O = 1:1)

S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
1:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	40	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	50	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	60	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน

ตารางที่ ง.19 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเฮปแทน (S:O = 2:1)

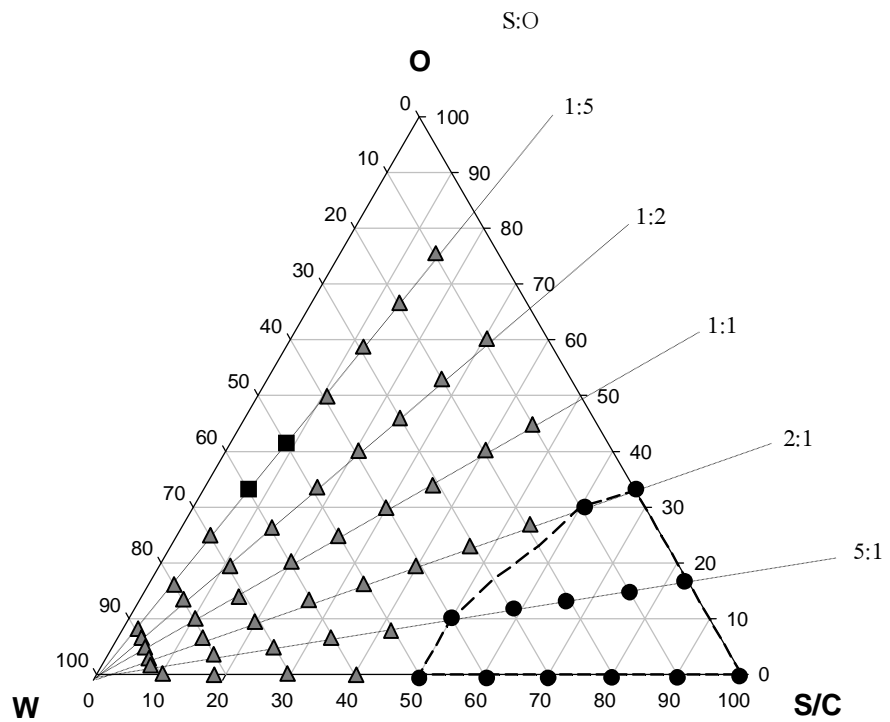
S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
2:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	40	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	50	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	60	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	70	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	80	2	ชั้นบนโปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน
	90	2	ชั้นบนทึบแสงสีขาวขุ่น ชั้นล่างโปร่งแสงสีน้ำตาลอ่อน

ตารางที่ ง.20 ลักษณะของระบบเมื่อใช้น้ำมันคือเฮปแทน (S:O = 5:1)

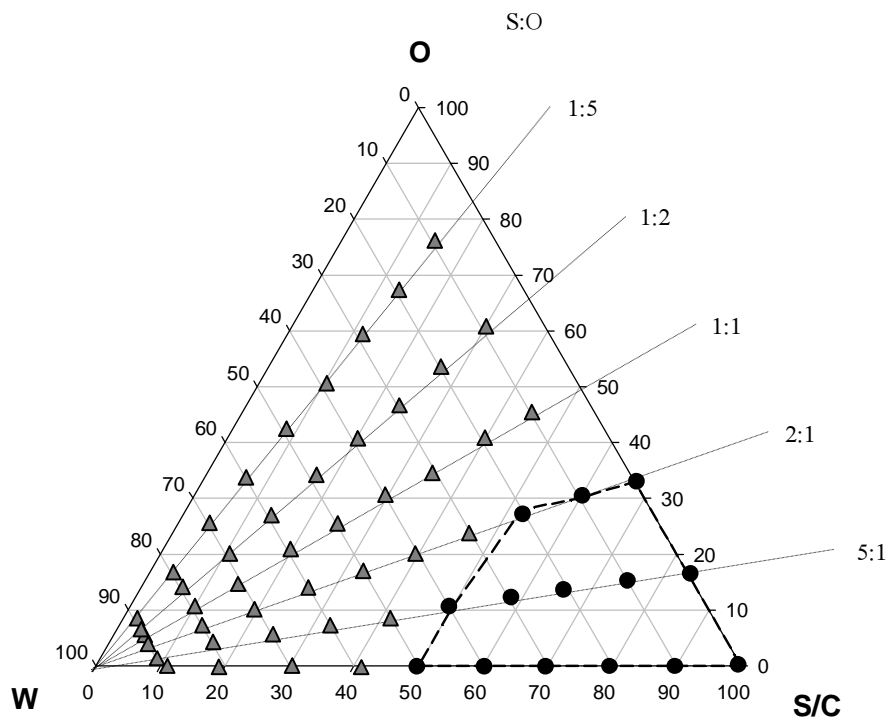
S:O	ปริมาณน้ำ (%)	จำนวนชั้น	ลักษณะ
5:1	10	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	20	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	30	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	40	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	50	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	60	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	70	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	80	1	โปร่งแสงสีน้ำตาลเข้ม
	90	1	ทึบแสงสีน้ำตาลขุ่น

จากนั้นนำตัวอย่างที่คาดว่าเป็นไมโครอิมัลชัน (ลักษณะโปร่งแสง) มาทำการตรวจสอบการกระเจิงแสงโพลาไรซ์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 20 เท่าเพื่อแบ่งแยกไมโครอิมัลชันที่มีสมบัติไอโซโทรปิกออกจากแลมดาร์ที่มีสมบัติเป็นแอนไอโซโทรปิก แล้วทำการตรวจสอบชนิดของระบบไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้นตามวิธีการทดลองในหัวข้อ 4.3.4 ทำให้สามารถบันทึกผลการทดลองจากแต่ละระบบลงในแผนภาพวัฏภาคได้ดังรูปที่ ง.1-ง.4 โดยมีสัญลักษณ์ดังนี้

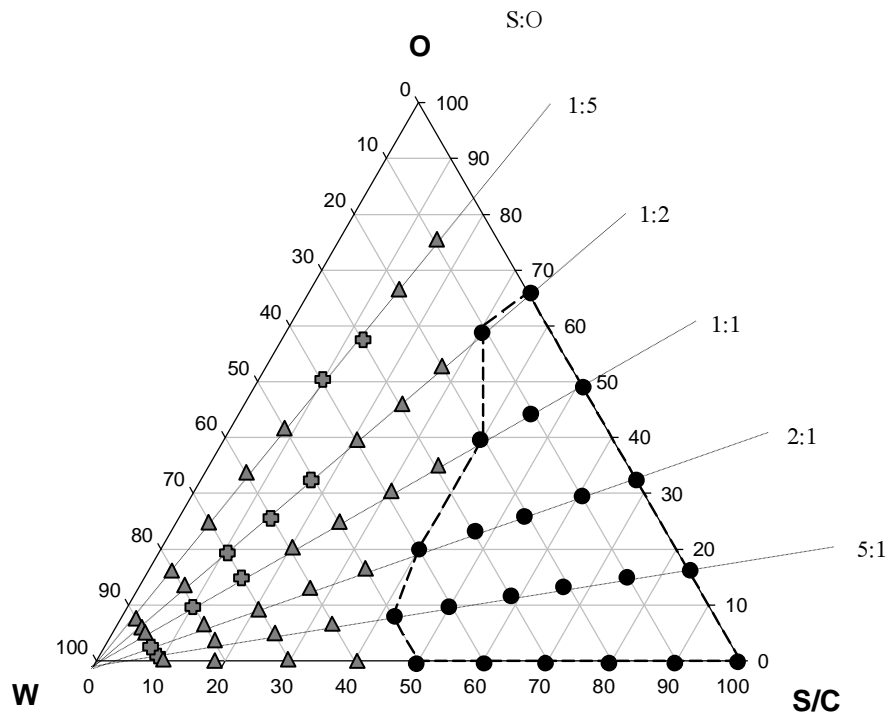
- คือ ไมโครอิมัลชัน
- ⊕ คือ ระบบที่มี 1 วัฏภาค แต่ไม่ใช่ไมโครอิมัลชัน
- ▲ คือ ระบบที่มี 2 วัฏภาค
- คือ ระบบที่มี 3 วัฏภาค



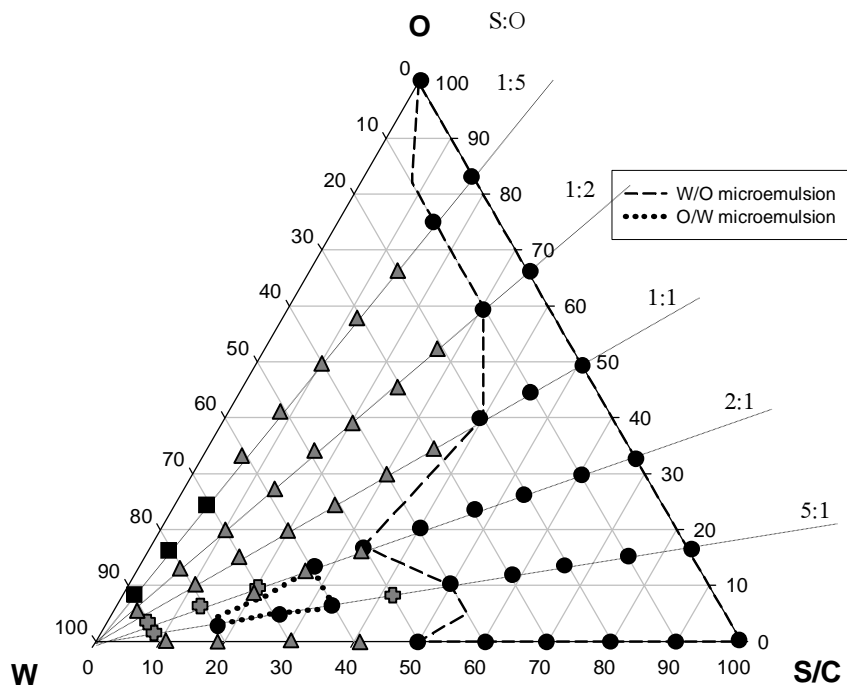
รูปที่ ง.1 แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบของระบบ น้ำ (W) / แรมโนลิปิด / บิวทานอล (S/C) / ไอโซโพรพิลไมริสแตต (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C



รูปที่ ง.2 แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบของระบบ น้ำ (W) / แรมโนลิปิด / บิวทานอล (S/C) / เอทิล โอลีเอต (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C



รูปที่ ง.3 แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบของระบบ
น้ำ (W) / แรมโนลิปิด / บิวทานอล (S/C) / เดคานอล (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C



รูปที่ ง.4 แผนภาพวัฏภาคของระบบสามองค์ประกอบของระบบ
น้ำ (W) / แรมโนลิปิด / บิวทานอล (S/C) / เฮปเทน (O) ที่อุณหภูมิ 37 °C

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพัชราภา อ่วมภูมิ เกิดวันที่ 10 กันยายน พ.ศ. 2526 ที่อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนประจักษ์ศิลปาคม ในปีการศึกษา 2537 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนเบญจมราชานุสรณ์ โดยจบการศึกษาในปีการศึกษา 2543 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2547 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2548