



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการลักษณะทางกายภาพและปริมาณของ Goniodiol บรรจุในไลโปโซมที่ถูกดัดแปลง พื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG

โดย

ดร. เพ็ญศรี เจริญสิทธิ์

กรกฎาคม 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการลักษณะทางกายภาพและปริมาณของ Goniodiol บรรจุในไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิว ด้วยโพลิเมอร์ PEG

ผู้วิจัย

ดร. เพ็ญศรี เจริญสิทธิ์

สังกัดภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยนเรศวร

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580038
ชื่อโครงการ : ลักษณะทางกายภาพและปริมาณของ Goniodiol บรรจุในไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG
ชื่อนักวิจัย : ดร.เพ็ญศรี เจริญสิทธิ์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
E-mail Address : pensri_ch@hotmail.com
ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (2 กรกฎาคม 2555 ถึง 1 กรกฎาคม 2557)

โกนิโอไดออลเป็นสารกลุ่ม Styryl-lactone ที่สกัดแยกได้จากพืชสกุลปาหนันช้าง หรือ *Goniothalamus* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าเซลล์มะเร็ง ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสกัดแยกโกนิโอไดออลจากต้นปาหนันแมงวงค์ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ในประเทศไทย ผู้วิจัยใช้ PEG-C₂-DSPE และ PEG-C₆-DSPE ซึ่งได้จากการเชื่อมต่อดัวยเอไมด์ลิงค์เกจที่มีความยาวของลิงค์เกจต่างกัน และใช้ปริมาณ 5, 7 , 10 และ 15 mole% ในการเตรียมไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วย PEG (PEGylated liposomes) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า PEGylated liposomes ที่บรรจุ Goniodiol ที่เตรียมจาก PEG-C₂-DSPE และ PEG-C₆-DSPE มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมที่มีผนังชั้นเดียวและมีขนาดเล็กประมาณ 100 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขนาดเล็กกว่าไลโปโซมทั่วไป (Conventional liposomes) โดยตำรับที่เตรียมจาก PEG-C₆-DSPE 15 mole% ไลโปโซมมีอนุภาคขนาดเท่ากับ 60.9±0.6 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขนาดเล็กกว่าไลโปโซมที่เตรียมได้จากตำรับอื่น ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ PEGylated liposomes ทุกตำรับมีค่า Entrapment Efficiency ในช่วง 80-90 % จากการศึกษาความคงตัวของตำรับ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่เตรียมจาก PEG-C₂-DSPE ภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน ตำรับที่เตรียมจาก PEG-C₆-DSPE มีปริมาณของ Goniodiol รั่วไหลออกจากไลโปโซมน้อยกว่า แต่ภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 และ 30 วัน พบว่าปริมาณของ Goniodiol ที่รั่วไหลออกจากไลโปโซมไม่มีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ Conventional liposomes ปริมาณของ Goniodiol ที่รั่วไหลออกจาก PEGylated liposomes มีปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

คำหลัก: โกนิโอไดออล, ไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเอทิลีนไกลคอล, โรคมะเร็ง, ลิงค์เกจ, การตั้งตำรับ

Abstract

Project Code : MRG5580038
Project Title : Physical properties and encapsulate percentage of PEG-coated liposomes encapsulated goniodiol
Investigator : Dr.Pensri Charoensit
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University
E-mail Address : pensri_ch@hotmail.com
Project Period : 2 years (July 2, 2012 – July 1, 2014)

Goniodiol, a natural occurring styryl-lactone isolated from *Goniothalamus* species, has been demonstrated to possess anti-cancer activities on various types of cancer cells but less toxicity to normal cells. In this study, goniodiol was isolated from *Goniothalamus maewongensis* or Panan maewong, the new specie in Thailand. Two polyethylene glycol-distearoyl phosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) conjugates were synthesized via acetamide (C₂) and hexamide (C₆) linkages and used to prepare goniodiol-loaded PEGylated liposomes. Transmission electron microscope showed small unilamellar vesicle of goniodiol-loaded PEGylated liposomes. Goniodiol-loaded PEGylated liposomal formulations consist of 5, 7 and 10 mole % of PEG-C₂-DSPE or PEG-C₆-DSPE showed the particle size of about 100 nm that smaller than the particle size of goniodiol-loaded conventional liposomal formulation. Meanwhile 15 mole % of PEG-C₆-DSPE provided a significant decrease of particle size as 60.9±0.6 nm. The entrapment efficiency of goniodiol-loaded PEGylated liposomal formulations was about 80 - 90%. PEG-C₆-DSPE liposomal formulations provided a lower leakage amount of goniodiol after 1 day storage but an equivalent leakage amount of goniodiol was detected after 7 and 30 days storage compared with PEG-C₂-DSPE liposomal formulations. However, the leakage amount of goniodiol from PEGylated liposomal formulations was significantly lower than that from conventional liposomal formulation.

Keywords: Goniodiol, PEGylated liposomes, Cancer, Linkage, Formulation

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศรีสกุล สังทองจีน นักวิจัยที่ปรึกษาในโครงการวิจัยนี้ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำ ในการทำวิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่เพื่อการทำวิจัย และขอขอบคุณครอบครัว และเพื่อนร่วมงานทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนและกำลังใจจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญ	4
เนื้อหางานวิจัย	5
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)	8
วัตถุประสงค์ของโครงการ	12
วิธีการทดลอง	12
ผลการทดลอง	17
1. การพิสูจน์โครงสร้างของ Goniodiol	17
2. การพิสูจน์ผลการเชื่อมต่อระหว่างลิปิดและโพลีเอทิลีนไกลคอล	22
3. ผลความคงตัวของ Goniodiol ในซีรัม	23
4. ลักษณะรูปร่างของอนุภาคไลโปโซม	25
5. ผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อขนาดอนุภาคและประจุบนผิวอนุภาคของไลโปโซม	27
6. ผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อความสามารถในการกักเก็บสาร Goniodiol ของไลโปโซม	30
7. ผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อความคงตัวของไลโปโซมที่บรรจุสาร Goniodiol (Goniodiol-loaded PEGylated liposomes)	31
บทวิจารณ์	37
เอกสารอ้างอิง	39
Output จากโครงการวิจัย	43

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมะเร็งเป็นปัญหาที่สำคัญทางระบบสาธารณสุขที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย และเป็นสาเหตุการตายของผู้ป่วยทั่วโลก โดยรายงานจากสถิติมะเร็งทั่วโลกพบว่าในปี พ.ศ. 2551 มีจำนวนผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งประมาณกว่า 7,600,000 คน นอกจากนี้โรคมะเร็งยังคงเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆ ของผู้ป่วยในประเทศไทยอีกเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าในปัจจุบันวิธีในการรักษามะเร็งมีหลายวิธี เช่น การใช้เคมีบำบัด แต่อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดและก่อให้เกิดผลข้างเคียงในการรักษา ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยผลยาใหม่หรือใช้ระบบนำส่งยาที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และลดผลข้างเคียงของการรักษามะเร็งอย่างต่อเนื่อง

การแพทย์ทางเลือกด้วยการใช้สมุนไพรสำหรับรักษาโรคต่าง ๆ ได้รับการยอมรับมากขึ้น โดยเฉพาะสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งซึ่งประชาชนกำลังให้ความสำคัญอยู่ในขณะนี้ ที่ผ่านมามีการศึกษาคุณสมบัติในการรักษาโรคมะเร็งจากพืชหลากหลายชนิดอย่างจริงจังและต่อเนื่อง ทั้งในแง่ประสิทธิผล กลไกการรักษา และผลข้างเคียง จนกระทั่งมีการค้นพบและพัฒนาสารสำคัญออกมาเป็นยาแผนปัจจุบันที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายรายการด้วยกัน เมื่อเร็ว ๆ นี้ สารสำคัญที่สกัดจากใบและกิ่งของ *Goniotalamus maewongensis* (ปาดินันแมวกัง พันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของโลก ที่เพิ่งถูกค้นพบในประเทศไทยที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าแมวกัง จังหวัดกำแพงเพชร) ที่มีชื่อว่า Goniodiol แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงของคนในระดับหลอดทดลอง (*In vitro*) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่แสดงผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงของคนของ Goniodiol ที่สกัดจาก *Goniotalamus griffithii* และ *Goniotalamus giganteus* ดังนั้น Goniodiol อาจนำมาพัฒนาใช้เป็นยามะเร็งได้

โดยทั่วไประบบการกระจายของยาภายในร่างกายและการกำจัดออกของยาออกจากร่างกาย จะทำให้ปริมาณของยาไปสู่อวัยวะที่ต้องการทำการรักษามีปริมาณจำกัด แม้ว่าจะมีการศึกษาที่แสดงว่า Goniodiol เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ แต่อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวทดลองเฉพาะเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของปอดเท่านั้น Goniodiol อาจก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ปกติที่อวัยวะอื่น ซึ่งถ้านำ Goniodiol มาใช้ในการรักษามะเร็งด้วยวิธีการให้ยาทางหลอดเลือดดำ Goniodiol น่าจะกระจายตัวไปยังอวัยวะต่าง ๆ ถูกทำลายและถูกกำจัดออกจากร่างกายด้วยกระบวนการดังกล่าวข้างต้นได้ ทำให้ต้องใช้ปริมาณยาสูงในการ

รักษาและอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงได้ ระบบนำส่งยา (Drug Delivery System) เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยลดปัญหานี้ ด้วยการป้องกันตัวยาถูกทำลาย และนำส่งยาไปยังอวัยวะหรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ จึงอาจเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาของ Goniodiol ได้ เนื่องจากโครงสร้างของ Goniodiol ประกอบด้วยโมเลกุลที่ชอบน้ำและโมเลกุลที่ชอบน้ำมัน ระบบนำส่งยาที่เหมาะสมที่จะบรรจุ Goniodiol น่าจะเป็นระบบนำส่งยาที่สามารถกักเก็บสารได้ทั้งสารที่ชอบน้ำและสารที่ชอบไขมัน ระบบนำส่งยาประเภทไลโปโซม (Liposomes) มีลักษณะเป็นอนุภาคหรือถุงทรงกลมขนาดเล็กในระดับนาโน ผนังของไลโปโซมเป็นสารประกอบประเภทไขมันจำพวกฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดมีลักษณะเป็นสารชอบน้ำและไขมันเรียงตัวต่อกันเป็นผนังสองชั้น โดยหันส่วนหัวที่ชอบน้ำออก ซึ่งผนังสองชั้นนี้จะโอบล้อมเป็นถุงทรงกลมล้อมรอบส่วนของสารละลายที่ชอบน้ำไว้ภายใน และหันส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากันซึ่งเป็นบริเวณที่เก็บสารละลายที่ชอบไขมัน จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ไลโปโซมสามารถกักเก็บสารได้ทั้งสารที่ชอบน้ำและสารที่ชอบไขมันได้ ดังนั้นไลโปโซมน่าจะสามารถกักเก็บ Goniodiol ได้ดี นอกจากนี้การดัดแปลงพื้นผิวของไลโปโซมด้วยโพลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol หรือ PEG) จะทำให้เพิ่มอายุในการหมุนเวียนของไลโปโซมในร่างกาย ไม่ให้ถูกกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และเนื่องจากพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดที่เปลี่ยนไปบริเวณอวัยวะที่เป็นมะเร็งทำให้ไลโปโซมนี้เข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ดี ขณะที่ลักษณะปกติของหลอดเลือดที่บริเวณอวัยวะปกติจะจำกัดการเข้าเซลล์ปกติของไลโปโซม ทำให้ไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วย PEG มีความจำเพาะเจาะจงต่อการเข้าสู่บริเวณที่เป็นมะเร็ง จากเหตุผลดังกล่าวไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วย PEG น่าจะกักเก็บและนำส่ง Goniodiol ไปสู่บริเวณที่เป็นมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับด้านความคงตัวของไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วย PEG ชนิดของลิงค์เกจ (Linkage) ที่เชื่อมระหว่างสายไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon chain) และสายโพลิเอทิลีนไกลคอลมีผลต่อความสามารถในการรั่วไหลของสารที่ถูกบรรจุในอนุภาคของไลโปโซม โดยเอไมด์ลิงค์เกจสามารถลดการรั่วไหลของสารได้ดีกว่าลิงค์เกจอื่น ได้แก่ อีเทอร์ และเอสเทอร์ลิงค์เกจ³³

การศึกษานี้ต้องการพัฒนาตำรับของ Goniodiol ที่บรรจุในไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG ด้วยการใส่ PEG ที่เชื่อมต่อกับฟอสโฟลิปิด (PEG-Lipid conjugates) เป็นองค์ประกอบในส่วนผนังของไลโปโซม โดยไฮโดรไลติกลิงค์เกจในการเชื่อมต่อ PEG และฟอสโฟลิปิด และแต่ละตำรับจะมีการปรับเปลี่ยนปริมาณของ PEG-Lipid conjugates ซึ่งอาจมีผลต่อการกักเก็บ Goniodiol ของอนุภาคไลโปโซม ความคงตัวของตำรับ และคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่

ขนาดอนุภาค การกระจายของขนาด และประจุบนผิวอนุภาคของไลโปโซม ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการเข้าเซลล์ของอนุภาคไลโปโซม

ตำรับที่ถูกพัฒนาทั้งหมดในการศึกษานี้จะให้ข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกตำรับสำหรับนำไปศึกษาวิจัยต่อในระดับหลอดทดลองและระดับสัตว์ทดลองต่อไป

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

มะเร็งเป็นโรคชนิดหนึ่งซึ่งมีลักษณะของการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ และเซลล์เหล่านี้มีความสามารถที่จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่น ๆ โดยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง เช่น การเจริญเติบโตเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียงโดยตรง (Invasion) หรือการอพยพเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังตำแหน่งอื่น (Metastasis)¹ ในปัจจุบันเชื่อว่าโรคมะเร็งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การสัมผัสกับสารก่อมะเร็ง (Carcinogen)² การสูบบุหรี่³ การดื่มสุรา⁴ การเปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรม⁵ การติดเชื้อ Human Papilloma Virus⁶ และการสัมผัสรังสีเอกซเรย์⁷ เป็นต้น เมื่อกระบวนการแบ่งเซลล์เกิดความผิดปกติและไม่สามารถควบคุมได้ เซลล์เหล่านี้ก็จะพัฒนาต่อไปจนกลายเป็นมะเร็ง โดยขณะนี้มะเร็งที่พบในร่างกายมนุษย์มีมากกว่า 100 ชนิด และแต่ละชนิดมีการดำเนินของโรคที่แตกต่างกัน

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ของประชากรโลก จากสถิติปี พ.ศ. 2551 ประชากรทั่วโลกมีผู้เป็นมะเร็งประมาณ 12.7 ล้านคน⁸ และเสียชีวิตประมาณ 7.6 ล้านคนหรือประมาณ 13% ของสาเหตุการตายทั้งหมด^{8,9} ซึ่งคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งมากกว่า 13.1 ล้านคน⁹ สำหรับสถิติการเสียชีวิตของคนไทยล่าสุดปี พ.ศ. 2554 พบว่ามีจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 61,082 คน คิดเป็นอัตราเสียชีวิต 95.2 คนต่อแสนประชากร¹⁰ จะเห็นได้ว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่ทำให้เกิดอัตราการตายสูงทั้งในระดับโลกและระดับประเทศ และมีแนวโน้มว่าจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ นอกจากนี้โรคมะเร็งยังมีอัตราการดื้อยาสูงมาก เนื่องจากเป็นโรคที่มีกลไกการดื้อยาหลายชนิด เช่น P-glycoprotein, การกลายพันธุ์ของตัวพาพา (Mutation of drug transporter)¹¹ เป็นต้น ทำให้การใช้ยาเคมีบำบัดสูตรเก่าได้ผลลดลง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องค้นหายาตัวใหม่ที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้ โดยการค้นหายาใหม่จะทำได้หลายวิธีหนึ่งในวิธีที่นิยมคือการค้นหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง

สารที่ได้จากธรรมชาติหลายชนิดมีฤทธิ์ในการรักษามะเร็ง เช่น ยา Vinblastine และยา Vincristine ที่แยกได้จากต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) ยา Taxol ที่สกัดได้จากเปลือกของต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia*)¹² เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารที่ได้จากพืชอีกหลายชนิดที่พบฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง เช่น บัวทอง (*Hypericum hookerianum*)^{13,14} พะวา (*Garcinia speciosa* Wall)¹⁴ และพืชในตระกูล Goniiothalamus¹⁵ สำหรับพืชในสกุลพาหนะช้าง หรือ *Goniiothalamus* จัดอยู่ในวงศ์ Annonaceae พบกระจายในป่าเขตร้อน สารหลักที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชในตระกูลนี้เป็นสารในกลุ่ม Acetogenins และ Styryl lactones เช่น Annonacin,

Altholactone, Goniothalamine และ Goniodiol¹⁵ ซึ่งมีรายงานว่า สาร Goniothalamine และ Goniodiol มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งตับที่ดื้อต่อยา Doxorubicin (HepG2-R) โดยค่า Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) ของสารทั้ง 2 ชนิด ต่อ HepG2 และ HepG2-R ไม่แตกต่างกันทางสถิติ¹⁶ สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ของสาร Goniodiol ต่อเซลล์มะเร็งปอดที่พบว่า ค่า IC₅₀ ของสาร Goniodiol ต่อเซลล์มะเร็งปอด (GLC4) และเซลล์มะเร็งปอดที่ดื้อต่อยา (GLC4/Adr) ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าสาร Goniodiol ไม่ถูกจดจำโดย Multidrug resistant proteins จึงมีผลฆ่าเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาสำหรับรักษาโรคมะเร็งที่ดื้อยาต่อไป¹⁷ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร Goniodiol มีพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่า โดยค่า IC₅₀ ต่อเซลล์ปกติของหนู Mice สูงกว่าเซลล์ตับที่เป็นมะเร็งประมาณ 3 เท่า¹⁶ สาร Goniodiol มีโครงสร้างหลักเป็น Lactone และ Styrene ซึ่งมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในโครงสร้าง¹⁶ และมีค่าการละลายน้ำต่ำ¹⁸ ทำให้เตรียมในรูปสารละลายฉีดเข้าหลอดเลือดดำโดยตรงได้ยาก อีกทั้งโครงสร้างในส่วน Lactone ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์¹⁹ อาจถูกทำลายโดยเอนไซม์ Esterase ในกระแสเลือดได้ จึงจำเป็นต้องพัฒนาการตั้งตำรับ เพื่อนำส่งสารผ่านทางกระแสเลือด ลดการถูกทำลายของสารโดยเอนไซม์ และเพิ่มการสะสมของสารในบริเวณที่เกิดมะเร็ง

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยา (Drug Delivery Systems) ในรูปแบบต่าง ๆ มากขึ้น ระบบนำส่งยานี้ คือ การเตรียมยาในรูปแบบต่าง ๆ ที่สามารถควบคุมให้ปลดปล่อยยาในอัตราและปริมาณที่กำหนด และสามารถนำไปยังอวัยวะหรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ เพื่อให้เกิดผลสูงสุดในการรักษาและลดผลข้างเคียงจากการใช้ยา²⁰ โดยไลโปโซม (Liposomes) เป็นระบบนำส่งยารูปแบบหนึ่งที่สามารถให้เข้าสู่ร่างกายโดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำได้²¹ อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน (Submicron) มีลักษณะเป็นถุงกลม ๆ ของสารไขมัน โดยสารไขมันเหล่านี้เป็นสารชนิดแอมฟิพาติก (Amphipathic) กล่าวคือมีทั้งกลุ่มมีขั้ว (Polar) ชอบน้ำ (Hydrophilic) และกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุล (Hydrophobic) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไขมันประเภทฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ทั้งจากธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น เช่น Phosphatidyl-choline (Lecithin), Phosphatidyl-ethanolamine, Phosphatidyl-glycerol และ Phosphatidyl-inositol เป็นต้น เมื่อผสมลงในสารละลายน้ำ โมเลกุลของสารไขมันประเภทฟอสโฟลิปิดสามารถจัดเรียงตัวเป็นชั้นสลับกับชั้นโมเลกุลของน้ำในสารละลายน้ำได้ เพราะโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่ มีขั้ว เมื่ออยู่ในน้ำจะจัดเรียงตัวโดยนำส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุหันออกหาโมเลกุลน้ำ ในขณะที่เดียวกัน จะเอาส่วนที่ไม่มีขั้วหันเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วของโมเลกุลพวกเดียวกัน โดยจะอยู่ในลักษณะของการเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลไขมันซ้อนกันเป็นผนังสองชั้น (Lipid bilayer) หากไลโปโซมมี Lipid

bilayer เพียงชั้นเดียว จะจัดเป็นไลโปโซมประเภท Unilamellar bilayer vesicles (ULVs) หากไลโปโซมมี Lipid bilayer มากกว่าหนึ่งชั้น (โดยมีชั้นของสารละลายน้ำกั้นอยู่ระหว่างผนังสองชั้น) จะจัดเป็นไลโปโซมประเภท Multilamellar bilayer vesicles (MLVs) ตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบน้ำจะกักเก็บอยู่ในส่วนของชั้นที่มีขั้ว ส่วนตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะแทรกอยู่ใน Lipid bilayer ทำให้ไลโปโซมสามารถในการกักเก็บสารที่มีคุณสมบัติทั้งที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำไว้ภายใน²² ช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับสารที่ถูกกักเก็บไว้ด้วยการป้องกันการถูกทำลายจากเอนไซม์ในกระแสเลือดได้²¹ นอกจากนี้จากความผิดปกติของหลอดเลือดบริเวณมะเร็งที่มีช่องว่างระหว่าง Endothelial cells กว้างกว่าปกติร่วมกับการมีความบกพร่องในการระบายของระบบน้ำเหลือง ส่งผลให้บริเวณที่เป็นมะเร็งสามารถเกิดการสะสมของไลโปโซมได้มากกว่าปกติ²³ ในทางยามีการใช้ไลโปโซมเพื่อนำส่งยาต้านมะเร็งซึ่งให้ทางหลอดเลือดดำ ได้แก่ แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) ดาวนอร์บูซิน (Daunorubicin) และดอกโซรูบิซิน (Doxorubicin) ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยการทำให้ยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้เป็นอย่างดี ทั้งยังช่วยลดอันตรายจากอาการข้างเคียงของยาอันตรายเหล่านี้²⁴

ปัจจุบันมีการพัฒนาไลโปโซมในหลากหลายรูปแบบ เช่น ไลโปโซมชนิดที่มีประจุ ไลโปโซมที่ติดส่วนของลิแกนด์ (Ligands) ไลโปโซมที่มีการดัดแปลงคุณสมบัติและโครงสร้าง (Sterically stabilized หรือ Stealth liposomes) เป็นต้น ไลโปโซมทั่วไปที่ยังไม่มีการพัฒนาหรือดัดแปลง (Conventional liposomes) มีข้อเสียคือจะถูกทำลายโดย Reticuloendothelial system (RES)^{25,26} ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอม เช่น Monocyte, Macrophage โดยจะใช้ Opsonin protein จับสารแปลกปลอมในกระแสเลือดก่อน แล้วจึงเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการจับกิน (Phagocytosis) ซึ่งสิ่งแปลกปลอมที่ Opsonin protein ชอบจับจะมีลักษณะของพื้นผิวที่มีความไม่ชอบน้ำ²⁷ (Hydrophobic particle surface) และอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ด้วยเหตุผลนี้จึงได้มีการดัดแปลงคุณสมบัติและโครงสร้างของไลโปโซมโดยการหุ้มด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol, PEG) ซึ่งเป็น Hydrophilic polymer ที่มีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีกับร่างกาย (Biocompatibility)²⁸ การหุ้มไลโปโซมด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอลนี้จะช่วยป้องกันไม่ให้ไลโปโซมถูกทำลายโดย RES ผ่านกลไกเพิ่มความชอบน้ำบนพื้นผิวอนุภาคของไลโปโซม^{28,29,30} และการเพิ่ม Steric effect จากการกีดขวางการเกาะของ Opsonin protein บนพื้นผิวอนุภาคของไลโปโซม^{29,31,32} ดังนั้นไลโปโซมที่หุ้มด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล จึงสามารถไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น ทำให้ตัวยามีโอกาสไปสะสมยังบริเวณที่เป็นมะเร็งมากขึ้น จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้นกว่าเดิม นอกจากนี้รายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าไลโปโซมที่หุ้มด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล

มีผลลดการรั่วไหลของสารที่บรรจุในอนุภาคไลโปโซม และชนิดของลิงค์เกจ (Linkage) ที่เชื่อมระหว่างสายไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon chain) และสายโพลีเอธิลีนไกลคอล มีผลต่อความสามารถในการลดการรั่วไหลของสาร โดยเอไมด์ลิงค์เกจ (Amide linkage) สามารถลดการรั่วไหลของสารได้มากกว่าอีเทอร์ลิงค์เกจ (Ether linkage) และเอสเทอร์ลิงค์เกจ (Ester linkage)³³

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาความคงตัวของ Goniodiol ในซีรัม
2. เพื่อเชื่อมต่อฟอสโฟลิปิดกับโพลีเอธิลีนไกลคอลด้วยเอไมด์ลิงค์เกจ
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ และความสามารถในการกักเก็บ Goniodiol ของไลโปโซม ที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลีเอธิลีนไกลคอล
4. เพื่อศึกษาความคงตัวของตำรับไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลีเอธิลีนไกลคอล

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE, Avanti Polar Lipid Inc., USA)
2. 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC, Avanti Polar Lipid Inc., USA)
3. 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (PEG-DSPE, Avanti Polar Lipid Inc., USA)
4. Methoxy PEG succinimidyl carboxymethyl ester 2000 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Japan)
5. Succinimidyl valeric acid PEG (MPEG-SVA, Nanocs Inc, USA)
6. Chloroform (RCI Labscan Ltd., Thailand)
7. Chloroform-D1 (Merck KGaA, Germany)
8. Methanol (RCI Labscan Ltd., Thailand)
9. Ethanol (RCI Labscan Ltd., Thailand)
10. Ethyl acetate (RCI Labscan Ltd., Thailand)
11. Hexane (RCI Labscan Ltd., Thailand)
12. Silica gel 60 (Merck KGaA, Germany)
13. Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Germany)
14. Dimethyl sulfoxide (DMSO, RCI Labscan Ltd., Thailand)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Rotary evaporator (BÜCHI Labortechnik AG)
2. Zeta potential analyzer (BrookHaven ZetaPal)
3. UV Spectrophotometer (SHIMADZU) (Bara Scientific Co., Ltd.)
4. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker /Avance 400)
5. Fourier Transform Infrared Spectrometer (Perkin Elmer)
6. Transmission electron microscope (Technai12, Phillips, The Netherlands)
7. Agilent 6540 Q-TOF-MS spectrometer (Agilent Technologies, Singapore)
8. Agilent 1260 infinity Series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany)
9. Mini-extruder (Avanti Polar Lipid Inc., USA)
10. Small microplate vortexer (Biosan) (Gibthail Co., Ltd.)
11. Water bath shaker (GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH)
12. Thin-layer chromatography (TLC) sheet (Silica gel G60, E. Merck, Germany)

3. การสกัดและแยกสารสำคัญจากปาหนันแมงก

การเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บกิ่งและใบของปาหนันแมงก ๓ จังหวัดกำแพงเพชร นำส่วนกิ่งและใบสดของปาหนันแมงกมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เทส่วนที่หั่นเป็นชิ้นแล้วลงในภาชนะแล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 วัน (หรือจนกว่าพืชจะแห้ง) จากนั้นบดพืชที่อบแห้งแล้วด้วย Blender เก็บผงพืชที่ได้ในถุงพลาสติกที่ปิดปากจนแน่น ซึ่งน้ำหนักและบันทึกผล

การสกัดด้วยตัวทำละลาย

แช่ผงพืชในโหลด้วยเฮกเซนปริมาตร 6 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แช่ทั้งหมด 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะต้องกรองเอาสารสกัดออก แล้วกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นนำผงพืชมาแช่ต่อด้วยเอทิลเอซีเตต 3 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน แช่ทั้งหมด 9 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะต้องกรองเอาสารสกัดออก แล้วกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

การแยกสารสำคัญจากสกัด

นำสารสกัดชั้นเอทิลเอซีเตตมาแยกแบบหยาดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับจำนวน 650 กรัม และใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ (Eluent) จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของเอทิลเอซีเตตจนกระทั่งใช้ตัวทำละลายเอทิลเอซีเตต 100 % เพื่อให้ตัวชะคอลัมน์มีขั้ว

มากขึ้นจึงผสมเมทานอลลงไปในตัวทำละลายเอทิลเอซีเตตจนกระทั่งใช้เมทานอลความเข้มข้น 100 % ขณะดำเนินการแยกคอลัมน์ เก็บรับสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ครั้งละ 500 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนแยก (Fraction) ที่ได้ไปตรวจค่าอัตราการไหลด้วยแผ่น TLC อลูมิเนียม นำส่วนแยกแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน แล้วทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งอุณหภูมิต่ำ จะได้ส่วนแยก F1-4 นำส่วนแยก F2 มาแยกต่อโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับจำนวน 250 กรัม และใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ แล้วเพิ่มขั้วด้วยเอทิลเอซีเตต ตามลำดับได้ส่วนแยก A1-A3 นำส่วนแยก A2 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ชะด้วยเอทิลเอซีเตต 30 % แล้วนำมาตกผลึกด้วยเอทานอล นำสารสำคัญที่แยกได้ไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ อินฟราเรด อัลตราไวโอเลต และ แมสสเปกโทรเมตรี

4. การเชื่อมต้อลิปิดและโพลีเอธิลีนไกลคอล

ละลาย 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE) และ Methoxy-PEG succinimidyl carboxy methyl ester ((A) กรณีสั่งเคราะห์ PEG-C₂-DSPE) หรือ Succinimidyl valeric acid PEG ((B) กรณีสั่งเคราะห์ PEG-C₆-DSPE) ลงในส่วนผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล (CHCl₃/MeOH = 65 : 35 v/v) แล้วจึงเติม Triethylamine (Et₃N) ให้ได้อัตราส่วนโดยโมลของ สาร A หรือ B : DSPE : Et₃N เท่ากับ 1 : 1 : 4 และทำปฏิกิริยาข้ามคั่นที่อุณหภูมิห้อง ใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีตรวจสอบกลุ่มอะมิโนของ DSPE ที่ถูกเปลี่ยนภายหลังการเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ เติมกรดไฮโดรคลอริกลงในส่วนผสม แล้วล้างออกด้วยน้ำ และน้ำเกลือตามลำดับ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี วิเคราะห์โครงสร้างและพันธะที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และ อินฟราเรด

5. การทดสอบความคงตัวของสาร Goniodiol ในซีรัม

เตรียมตัวอย่างโดยละลาย Goniodiol ใน DMSO ที่ความเข้มข้น 100 มก/มล จากนั้นนำไปผสมกับ Fetal bovine serum (FBS), Mouse serum และ Human serum ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก/มล ตามลำดับ นำสารละลาย Goniodiol ในซีรัมประเภทต่าง ๆ มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างภายหลังการบ่มเป็นเวลา 15, 30 นาที และ 2, 8, 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารตัวอย่างมาตรวจสอบด้วยวิธี Thin-layer chromatography ด้วยการนำสารตัวอย่างมาจุดบนแผ่น TLC อลูมิเนียม ใช้สารผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล

(CHCl₃/MeOH = 98 : 2 v/v) เป็น Mobile phase ตรวจสอบตำแหน่งและปริมาณของ Gonidiol ด้วย Alcoholic vanillin sulfuric acid reagent

4. การเตรียม Gonidiol บรรจุในไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG

การศึกษานี้เตรียมไลโปโซมด้วยวิธี Thin film hydration โดยละลายส่วนประกอบทั้งหมดของตำรับ ได้แก่ DSPC, PEG-Lipid conjugate (PEG-DSPE หรือ PEG-C₂-DSPE หรือ PEG-C₆-DSPE) และสาร Gonidiol ในสารละลายคลอโรฟอร์มตามอัตราส่วนต่าง ๆ ใน Round bottom flask แล้วนำสารผสมนี้ไประเหยคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง Rotor evaporator ทำให้เกิดฟิล์มที่ด้านล่างของ Round bottom flask และนำไประเหยคลอโรฟอร์มให้หมด โดยตั้งทิ้งไว้ใน Fume hood เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นทำการไฮเดรตด้วยน้ำ เขย่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไลโปโซมที่ได้แต่ละตำรับไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Mini-extruder ผ่านแผ่นเมมเบรน ขนาด 400 และ 100 นาโนเมตร ตามลำดับ

6. การวัดคุณสมบัติทางกายภาพของไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG

เตรียมสารตัวอย่างโดยเจือจางตำรับไลโปโซมด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของ PEGylated liposomes เท่ากับ 0.1 มก/มล แล้วนำไปวัดขนาดอนุภาค (Mean particle size) ค่าดัชนีการกระจายตัว (Polydispersity index) ค่าศักย์ซีต้า (Zeta potential) ด้วย Zeta potential analyzer (Zeta PALS)

7. การศึกษารูปร่างของไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG

เตรียมสารตัวอย่างโดยเจือจางตำรับด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปหยดลงบน Carbon-coated copper grid ใช้กระดาษกรองซับปริมาณที่เกินของสารตัวอย่างออก แล้วจึงหยดสารละลายของ 2% (w/v) Uranyl acetate จากนั้นทำให้ตัวอย่างแห้ง ด้วยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน สังเกตรูปร่างของ PEGylated liposomes ด้วย Transmission electron microscope (TEM)

8. การประเมินความสามารถในการบรรจุสาร Gonidiol ของไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG

ทำการวัดปริมาณสาร Gonidiol ที่บรรจุในไลโปโซมด้วยเทคนิค Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (LCMS) ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณสารในสถานะของเหลว โดยใช้ตัวตรวจวัดเป็น

แบบเครื่องวิเคราะห์มวลสาร (Mass Spectrometer) เตรียมตัวอย่างด้วยการนำไลโปโซมที่เตรียมได้ไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 18000 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอน (Sediment) ไปผสมกับเอทานอลเพื่อทำการแตกไลโปโซมออกและละลายสาร Goniodiol ให้อยู่ในรูปสารละลายใส แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร Goniodiol ที่บรรจุในไลโปโซม โดยคำนวณค่า Entrapment Efficiency (EE) % ดังต่อไปนี้

$$\text{Entrapment Efficiency (\%)} = \frac{\text{ปริมาณสาร Goniodiol ส่วนตะกอน} \times 100\%}{\text{ปริมาณสาร Goniodiol ที่ใส่ในตำรับ}}$$

สำหรับการทดลองหาปริมาณรั่วไหลของสาร Goniodil ออกจากไลโปโซม เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกัน แต่นำทั้งส่วนตะกอนและส่วนใส (Supernatant) ไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร Goniodiol โดยคำนวณหาปริมาณรั่วไหลของสาร Goniodiol (Leakage amount of goniodiol (%)) ดังต่อไปนี้

$$\text{Leakage amount of goniodiol (\%)} = \frac{\text{ปริมาณ Goniodiol ส่วนใส} \times 100\%}{\text{ปริมาณ Goniodiol ส่วนตะกอนและใส}}$$

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LCMS ระบบ HPLC ใช้ 0.1% Formic acid in water และ 0.1% Formic acid in acetonitrile เป็น Mobile phase และใช้ Luna C18, 4.6 mm x 150 mm, 5 µm (Phenomenex, USA) column เป็นตัวแยกสาร สำหรับการตรวจวัดด้วย Mass Spectrometer น้ำหนักโมเลกุลที่ใช้ในการวัดอยู่ในช่วง m/z 100-500 with a 250 ms/spectrum ข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ด้วย Agilent LC-MS-QTOF MassHunter Data Acquisition Software version B.05.01 และ Agilent MassHunter Quantitative Analysis Software B 05.02 (Agilent Technologies)

9. การทดสอบความคงตัวของไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG

ทดสอบความคงตัวของไลโปโซม โดยนำตำรับไลโปโซมที่เตรียมได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดขนาดอนุภาคของไลโปโซมด้วยเครื่อง Zeta potential analyzer สังเกตรูปร่างของไลโปโซมด้วย TEM ภายหลังการเก็บเป็นเวลา 1, 4 และ 8 สัปดาห์ และวิเคราะห์หาปริมาณ Goniodiol ที่รั่วไหลออกมาจากไลโปโซม ภายหลังการเก็บเป็นเวลา 1, 7 และ 30 วัน

ผลการทดลอง

1. การพิสูจน์โครงสร้างของสาร Goniodiol

ดำเนินการพิสูจน์โครงสร้างสาร Goniodiol โดยอาศัยพื้นฐานเครื่องมือทางสเปกโทรสโกปี และข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ชนิด ^1H and ^{13}C -NMR สามารถใช้เป็นสิ่งยืนยันได้เป็นอย่างดี ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1. 400 MHz ^1H -NMR spectral data of Goniodiol (in CDCl_3)

ตำแหน่ง	δ_{H} , ppm, mult, J(Hz)
1	-
2	-
3	6.07 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.82)
4	6.94(<i>ddd</i> , <i>J</i> =9.82,5.40,3.72)
5	2.58(<i>m</i>)
6	4.46(<i>d</i> (<i>t</i>), <i>J</i> =15.14,5.41)
7	3.27(<i>dd</i> , <i>J</i> =5.41,1.96)
8	3.89(<i>d</i> , <i>J</i> =1.96)
9	-
10	7.25-7.39 (<i>m</i>)
11	7.25-7.39 (<i>m</i>)
12	7.25-7.39 (<i>m</i>)
13	7.25-7.39 (<i>m</i>)
14	7.25-7.39 (<i>m</i>)

ตารางที่ 2. 100 MHz ^{13}C -NMR spectral data of Goniodiol (in CDCl_3)

ตำแหน่ง	δ_{C} , ppm
2	162.73 (C)
3	121.07 (CH)
4	144.29 (CH)
5	25.78 (CH_2)
6	76.67 (CH)
7	61.40 (CH)
8	57.15 (CH)
9	135.61 (C)
10	125.87 (CH)
11	128.59 (CH)
12	128.59 (CH)
13	128.59 (CH)
14	125.87 (CH)

ค่าเคมีคัลชิฟต์ของ ^1H and ^{13}C - NMR spectra ที่ปรากฏในตารางที่ 1 และ 2 นั้นยืนยันได้จากเทคนิค 2D ของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ชนิด COSY, HMQC and HMBC spectra ดังแสดงในตารางที่ 3, 4 และ 5

ตารางที่ 3. Observed correlations in the COSY (H-H) spectrum of Goniodiol (in CDCl_3)

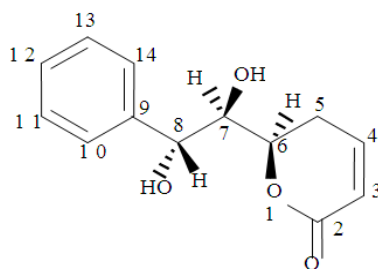
δ_{H} (position)	COSY (coupled hydrogen)
6.07 (H-3)	6.94 (H-4)
6.94 (H-4)	6.07 (H-3)
2.58 (H-5)	4.46 (H-6)
4.46 (H-6)	2.58 (H-5), 3.27 (H-7)
3.27 (H-7)	4.46 (H-6), 3.89 (H-8)
3.89 (H-8)	3.27 (H-7)

ตารางที่ 4. HMQC spectrum of Goniodiol (in CDCl₃)

δ_H (position)	δ_C (position)-attached
2.58 (H-5)	25.78 (C-5)
3.27 (H-7)	61.40 (C-7)
3.89 (H-8)	57.15 (C-8)
4.46 (H-6)	76.67 (C-6)
6.07 (H-3)	121.07 (C-3)
6.94 (H-4)	144.29 (C-4)
7.25-7.39 (H-10)	125.87 (C-10)
7.25-7.39 (H-11)	128.59 (C-11)
7.25-7.39 (H-12)	128.59 (C-12)
7.25-7.39 (H-13)	128.59 (C-13)
7.25-7.39 (H-14)	125.87 (C-14)

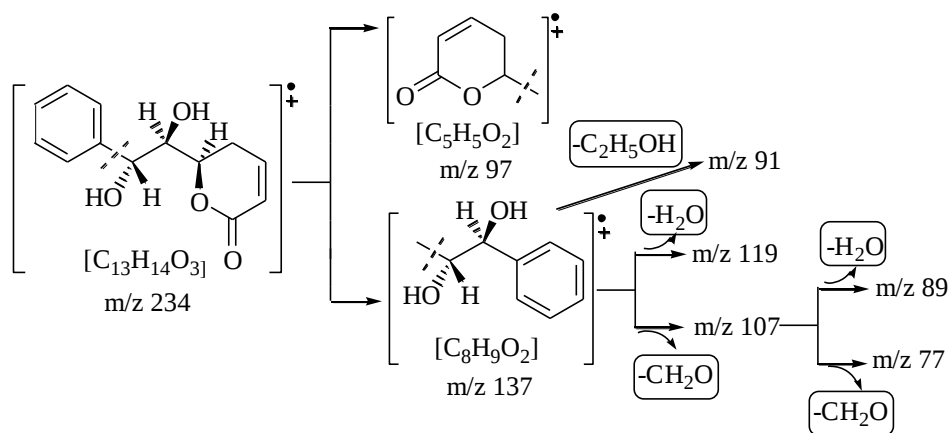
ตารางที่ 5. HMBC spectrum of Goniodio (in CDCl₃)

ตำแหน่ง C	Proton correlated with δ_C (ppm)
2	2.58 (H-5) / 4.46(H-6) / 6.07(H-3) / 6.94(H-4)
3	2.58 (H-5)
4	2.58 (H-5) / 4.46(H-6)
5	3.27(H-7) / 4.46(H-6) / 6.07(H-3) / 6.94(H-4)
6	2.58(H-5) / 3.27(H-7) / 3.89(H-8) / 6.94(H-4)
7	2.58(H-5) / 3.89(H-8) / 4.46(H-6)
8	3.27(H-7) / 4.46(H-6)
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-



Goniodiol มีลักษณะเป็นผลึกเข็มไม่มีสี โดยข้อมูลจาก IR spectrum พบแถบการดูดกลืนของหมู่ hydroxyl (3410 cm^{-1}) และ carbonyl ของ δ -lactone สังเกตที่ 1720 cm^{-1} นอกจากนั้นแถบการยืด C-O พบที่ 1245 cm^{-1} ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเป็นแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ ในส่วนของ UV spectrum พบค่าการดูดกลืนสูงสุดที่ 187 และ 266 nm ซึ่งแสดงแทรนสิชันของอิเล็กตรอนวงนอกแบบ $\pi \rightarrow \pi^*$ ของวงแอโรแมติกและพันธะคู่ในโมเลกุลรวมทั้ง $n \rightarrow \pi^*$ เป็นของหมู่คาร์บอนิล

จากการตรวจวัดด้วยเทคนิค ESIMS พบพิกัดที่ $m/z\ 234\ [M]^+$ แสดงให้เห็นว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุล $C_{13}H_{14}O_4$. สำหรับหมู่ hydroxyl 2 หมู่ ยืนยันได้จากพิกัด $m/z\ 91(100)$ เนื่องจากการหลุดเอทานอลออกไป 46 a.m.u. จากไอออน $C_8H_9O_2^+$, $[M\text{-phenyl}]^+$ ไปเป็น $[M\text{-phenyl-EtOH}]^+$ นอกจากนั้นไอออนแตกที่ $m/z\ 89\ (99.29)$ เป็นของ formaldehyde จาก $C_8H_9O_2^+$ และตามด้วยการแตกน้ำออกไปดังแสดง



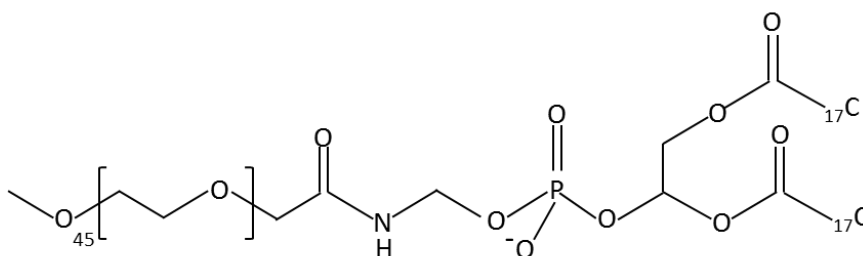
สัญญาณโปรตอน 5 สัญญาณในช่วง $\delta\ 7.25\text{-}7.39$ ของ ^1H NMR spectrum ชี้ให้เห็นว่าวงเบนซีนมีหมู่แทนที่เพียงหมู่เดียว นอกจากนั้นยังมีสัญญาณโปรตอนชนิดเมทินที่สนามแม่เหล็กอ่อน 3 สัญญาณได้แก่ $\delta\ 4.46\ (d(t), J=15.14, 5.41)$, $3.27\ (dd, J=5.41, 1.96)$ และ $3.89\ (d, J=1.96)$ ซึ่งเป็นของตติยภูมิแอลกอฮอล์ กรณีของพันธะคู่พบสัญญาณของเมทินโปรตอน $\delta\ 6.07\ (d, J=9.82)$ และ $\delta\ 6.94\ (ddd, J=9.82, 5.40, 3.72)$ นอกจากนั้นสัญญาณเรโซแนนซ์ของ ^{13}C NMR spectrum ของวง δ -lactone ที่เป็นหมู่คาร์บอนิลที่ $\delta\ 162.73$ และ oxymethine carbon ที่ $\delta\ 76.67$ นอกจากจะใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีดังกล่าวข้างต้นแล้วยังมีเทคนิค 2D NMR ชนิด HMBC เข้าร่วม

ยืนยันโครงสร้างด้วยกล่าวคือ สัญญาณโปรตอนที่ δ 6.07 (H-3), 6.94 (H-4), 2.58 (H-5) และ 4.46 (H-6) สัมพันธ์กับคาร์บอนที่ δ 162.73 (C-2) ส่วนสัญญาณคาร์บอนที่ δ 61.40 และ 57.15 เป็นของ methine carbons เทคนิค HMBC spectrum ยังแสดงความสัมพันธ์ของโปรตอนที่ δ 3.89 (H-8) และ 125.87 ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าคาร์บอนที่ตำแหน่ง C-10 และ C-14 อยู่บนวงแอโรแมติก ดังนั้นสัญญาณคาร์บอน 3 สัญญาณซึ่งมีค่า δ 128.59 จึงเป็นของ C-11, C-12 และ C-13 สำหรับการระบุโปรตอนที่อยู่ติดกันหรือแบบแอลลิกลิกโปรตอนจะใช้เทคนิค sequence of ^1H - ^1H spin-spin coupling connectivities หรือ COSY โดยเริ่ม C-3 ไปที่ C-8 กรณีความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนที่ทำมุมสองหน้าที่คาร์บอนตำแหน่ง 6-7-8 โดยพิจารณาจากค่าคงที่การคู่ควบแบบ vicinal coupling constant 3J ภายใต้ทฤษฎีของ Karplus equation; $^3J_{ab} = J^0 \cos^2 f - 0.28 (0^\circ < f < 90^\circ)$ and $^3J_{ab} = J^{180} \cos^2 f - 0.28 (90^\circ < f < 180^\circ)$ ดังนั้นโครงแบบสัมพัทธ์ (relative configuration) ที่ H-7 และ H-8 พิจารณาจากค่าคงที่คู่ควบ $^3J_{7,8}$, H-C-C-H (1.96 Hz) ซึ่งทำมุมกันเท่ากับ 119.05°

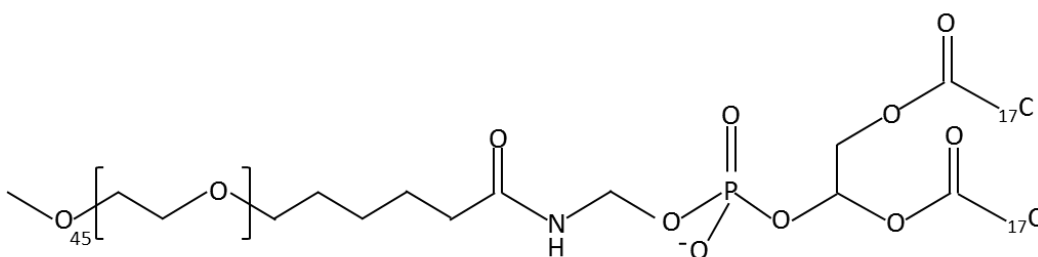
2. การพิสูจน์ผลการเชื่อมต่อระหว่างลิพิดและโพลีเอธิลีนไกลคอล

PEG-DSPE acetamide linkage ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว (yield = 88%, R_f = 0.6 (15% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) ผลของ NMR (^1H NMR (400 MHz)) แสดงสัญญาณ δ_H : 5.26-5.25 (1H, NH), 3.82-3.80 (2H, NHCH₂CH₂O), 3.70-3.64 ($\approx$ 180H, OCH₂(PEG)), 3.37 (3H, OCH₃), 2.32-2.28 (4H, OOCCH₂), 1.6-1.59 (4H, CH₃CH₂), 1.27-1.25 (52H, CH₂(stearyl)) และ 0.89-0.85 (6H, CH₂CH₃) และ ผลของ IR spectrum พบการดูดกลืนหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ที่ 1660.07 cm⁻¹ แสดงการเชื่อมต่อระหว่าง 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine และ methoxy PEG succinimidyl carboxymethyl ester 2000 (แสดงดังรูปที่ 1)

PEG-DSPE hexamide linkage ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว (yield = 83%, R_f = 0.63 (15% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) ผลของ NMR (^1H NMR (400 MHz)) แสดงสัญญาณ δ_H : 5.26-5.25 (1H, NH), 3.69-3.64 ($\approx$ 180H, OCH₂(PEG)), 3.37 (3H, OCH₃), 2.31-2.26 (4H, OOCCH₂), 1.42-1.41 (4H, CH₃CH₂), 1.29-1.25 (52H, CH₂(stearyl)) และ 0.89-0.86 (6H, CH₂CH₃) และ ผลของ IR spectrum พบการดูดกลืนหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ที่ 1660.07 cm⁻¹ แสดงการเชื่อมต่อระหว่าง 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine และ Succinimidyl valeric acid PEG (แสดงดังรูปที่ 2)

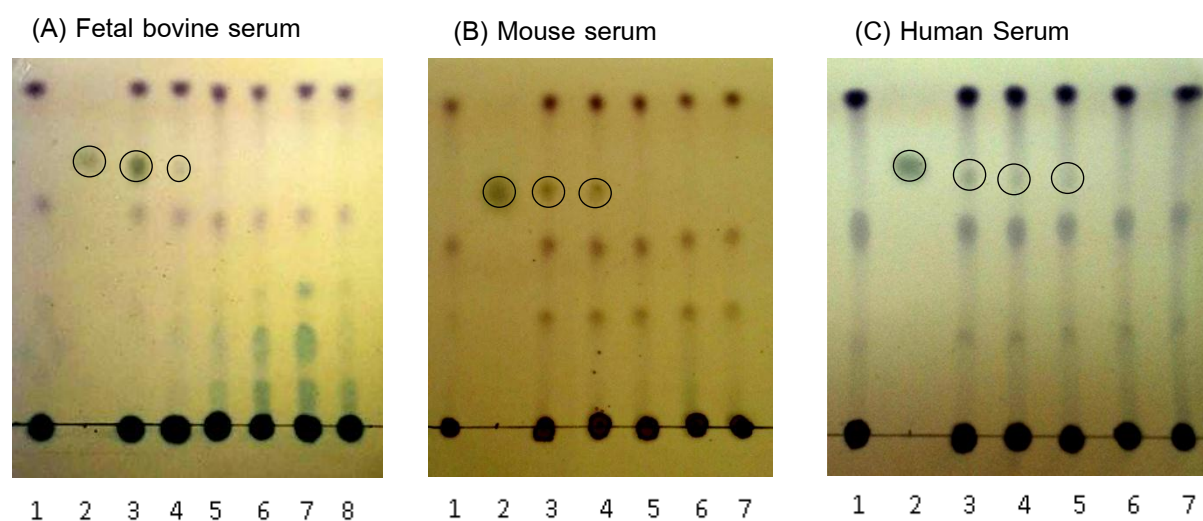


รูปที่ 1 PEG-DSPE acetamide linkage (PEG-C₂-DSPE)



รูปที่ 2 PEG-DSPE hexamide linkage (PEG-C₆-DSPE)

3. ผลความคงตัวของสาร Goniodiol ในซีรัม



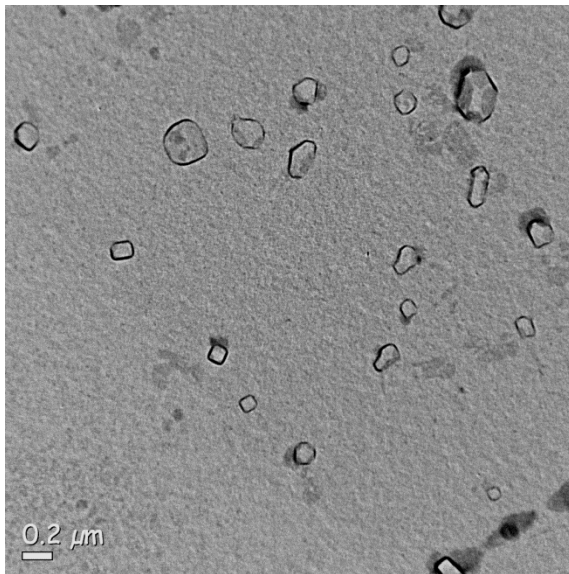
รูปที่ 3 Thin-layer chromatography แสดงผลของสาร Goniodiol ภายหลังการบ่มใน Fetal bovine serum (FBS) (A), Mouse serum (B) และ Human serum (C) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่เวลาการบ่มต่าง ๆ จุดที่ 1 Control serum (FBS, Mouse serum หรือ Human serum), จุดที่ 2 สารละลายของสาร Goniodiol (Control goniodiol) จุดที่ 3 สารตัวอย่างก่อนการบ่ม, จุดที่ 4 สารตัวอย่างภายหลังการบ่มเป็นเวลา 15 นาที, จุดที่ 5 สารตัวอย่างภายหลังการบ่มเป็นเวลา 30 นาที, จุดที่ 6 สารตัวอย่างภายหลังการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง, จุดที่ 7 สารตัวอย่างภายหลังการบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง, จุดที่ 8 สารตัวอย่างภายหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตรของสารตัวอย่างแต่ละจุดเท่ากับ 1.25 ไมโครลิตร

จากรูปที่ 3 แสดงผลภายหลังการตรวจวัดด้วย Alcoholic vanillin sulfuric acid reagent โดยจุดที่ 1A, 1B และ 1C พบว่าส่วนประกอบในซีรัมให้สีม่วงเข้ม จุดที่ 2A, 2B และ 2C พบว่าสารละลายของสาร Goniodiol ให้จุดเดี่ยว (Single spot) สีเขียว จุดที่ 3A, 3B และ 3C เป็นสารตัวอย่างซึ่งเป็นส่วนผสมของสารละลายของสาร Goniodiol และซีรัมชนิดต่าง ๆ ที่สภาวะก่อนการบ่ม พบจุดสีเขียวที่ตำแหน่งเดียวกับ Control goniodiol จุดที่ 4A เป็นสภาวะภายหลังการบ่มสาร Goniodiol ใน FBS เป็นเวลา 15 นาที พบจุดเดี่ยวสีเขียวที่ตำแหน่งเดียวกับ Control goniodiol และสารตัวอย่างก่อนการบ่ม และมีสีที่จางกว่าเมื่อเทียบกับสารตัวอย่างก่อนการบ่ม แสดงถึงปริมาณที่น้อยลงของสาร Goniodiol ใน FBS ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 15 นาที แต่พบว่าจุดที่ 5A-8A ซึ่งเป็นสภาวะภายหลังการบ่มเป็นเวลา 30 นาที ถึง 24 ชั่วโมง ไม่สามารถมองเห็นจุดเดี่ยวสีเขียวที่

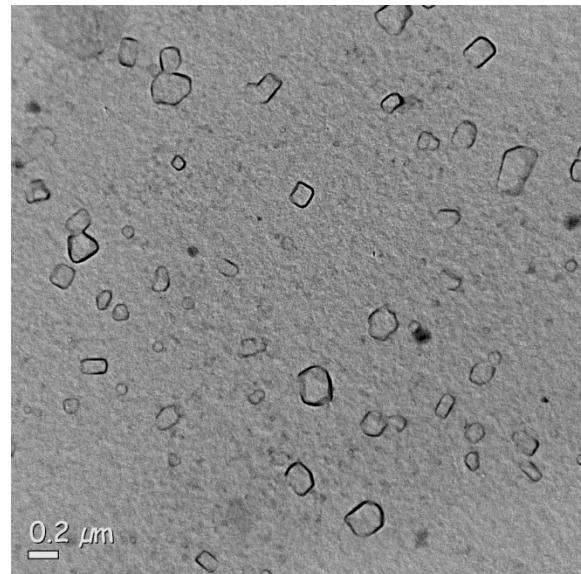
ตำแหน่ง Control goniodiol ได้ด้วยตาเปล่า และพบจุดสีเขียวที่ตำแหน่งอื่น ๆ เกิดขึ้นแทน เช่นเดียวกับจุดที่ 4B ซึ่งเป็นสภาวะภายหลังการบ่มสาร Goniodiol ใน Mouse serum พบปริมาณที่น้อยลงของสาร Goniodiol ใน Mouse serum ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 15 นาที ขณะที่จุดที่ 5B-7B เป็นสภาวะภายหลังการบ่มเป็นเวลา 30 นาทีขึ้นไป ไม่สามารถมองเห็นจุดสีเขียวที่ตำแหน่งเดียวกับ Control goniodiol ได้ด้วยตาเปล่า และตำแหน่งของสารตัวอย่างก่อนการบ่ม สำหรับผลการทดลองภายหลังการบ่มสาร Goniodiol ใน Human serum จุดที่ 4C และ 5C แสดงปริมาณที่น้อยลงของสาร Goniodiol ใน Human serum ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 15 และ 30 นาที และที่จุด 6C และ 7C ไม่สามารถมองเห็นจุดสีเขียวที่ตำแหน่งเดียวกับ Control goniodiol ได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นสภาวะภายหลังการบ่มเป็นเวลา 2 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

4. ลักษณะรูปร่างของอนุภาคของไลโปโซม

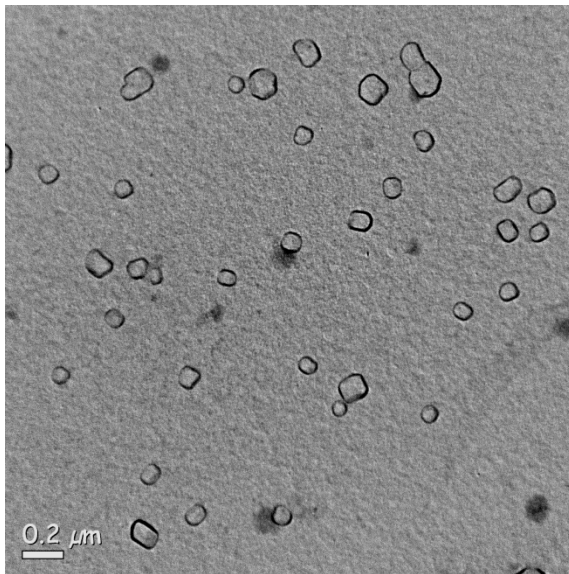
(A) Conventional liposomes



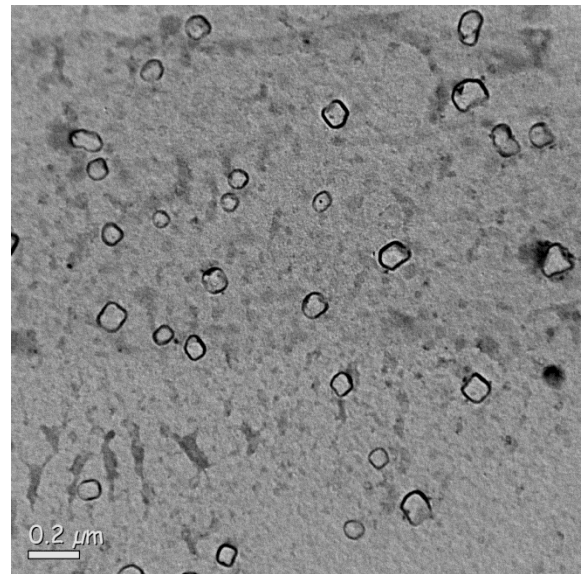
(B) PEG-DSPE



(C) PEG-C₂-DSPE



(D) PEG-C₆-PE



รูปที่ 4 แสดงอนุภาคของ Goniodiol-loaded liposomes ดำรับต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ไลโปโซมที่เตรียมจาก DSPC 100 mole% หรือ Conventional liposomes (A), ไลโปโซมที่เตรียมจาก DSPC : PEG-DSPE 95 : 5 mole ratio (B), ไลโปโซมที่เตรียมจาก DSPC : PEG-C₂-DSPE 95 : 5 mole ratio (C) และไลโปโซมที่เตรียมจาก DSPC : PEG-C₆-DSPE 95 : 5 mole ratio (D)

เมื่อนำไลโปโซมตำรับต่าง ๆ ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า Gonioliol-loaded liposomes ที่เตรียมจาก DSPC 100 mole% (รูปที่ 4A), DSPC : PEG-DSPE 95 : 5 mole ratio (B) , DSPC : PEG-C₂-DSPE 95 : 5 mole ratio (รูปที่ 4C) และ DSPC : PEG-C₆-DSPE 95 : 5 mole ratio (รูปที่ 4D) มีลักษณะเป็นอนุภาคขนาดเล็กที่มีผนังชั้นเดียว (Small unilamellar vesicles) และมีขนาดอนุภาคในช่วง 100 - 200 นาโนเมตร แต่อย่างไรก็ตามตำรับที่เตรียมจาก DSPC 100 mole% หรือไลโปโซมทั่วไป (Conventional liposomes) (รูปที่ 4A) อนุภาคส่วนใหญ่มีขนาดที่ใหญ่กว่าตำรับที่มี PEG-lipid conjugates เป็นส่วนประกอบ (PEGylated liposomes (รูปที่ 4B, 4C และ 4D)

5. ผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อขนาดอนุภาคและประจุบนผิวอนุภาคของไลโปโซม

ตารางที่ 6 แสดงผลของปริมาณโพลีเอทิลีนไกลคอลในตำรับต่อขนาดและประจุของอนุภาคไลโปโซม

ตำรับ	Liposome Formulations (mole %)		Diameter	Zeta Potential	PDI
	DSPC	PEG-DSPE	Size (nm)	(mV)	
1	100	-	102.5±1.0	-11.58±0.61	0.098
2	95	5	100.7±1.1	-18.15±1.37	0.057
3	93	7	98.1±1.2	-23.89±2.07	0.115
4	90	10	100.7±0.8	-23.37±2.30	0.113
5	85	15	88.1±0.7	-32.49±4.03	0.184

จากตารางที่ 6 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของไลโปโซมตำรับที่ 1 ซึ่งเป็นไลโปโซมทั่วไปที่ไม่ถูกหุ้มด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล (Conventional liposomes) มีค่าเท่ากับ 102.5 ± 1.0 นาโนเมตร และ -11.58 ± 0.61 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบตำรับ Conventional liposomes กับตำรับ PEGylated liposomes ที่มี PEG-DSPE ในปริมาณ 5, 7, 10 และ 15 mole% ในตำรับ พบว่า PEGylated liposomes ที่เตรียมจากตำรับที่มีปริมาณ PEG-DSPE 5, 7 และ 10 mole% มีขนาดอนุภาคไม่แตกต่างจาก Conventional liposomes แต่ PEGylated liposomes ที่เตรียมจากตำรับที่มีปริมาณ PEG-DSPE 15 mole% ขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่ได้มีขนาดลดลงโดยมีขนาด 88.1 ± 0.7 นาโนเมตร ในส่วนของค่าศักย์ซีต้าของไลโปโซมพบว่าปริมาณ PEG-DSPE ที่เพิ่มขึ้นในตำรับส่งผลให้ค่าศักย์ซีต้ามีค่าติดลบเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 7 แสดงผลของปริมาณโพลีเอทิลีนไกลคอลในตำรับต่อขนาดอนุภาคและประจุของไลโปโซมที่บรรจุ Goniodiol (Goniodiol-loaded PEGylated liposomes)

ตำรับ	Liposome Formulations (mole %)					Diameter Size (nm)	Zeta Potential (mV)	PDI
	DSPC	PEG-DSPE	PEG-C ₂ -DSPE	PEG-C ₆ -DSPE	Goniodiol			
1	100	-	-	-	2.5	141.8±1.9	-6.06±1.07	0.149
2	95	5	-	-	2.5	104.2±0.9	-21.63±2.29	0.044
3	93	7	-	-	2.5	94.3±1.1	-23.32±1.15	0.089
4	90	10	-	-	2.5	93.8±0.5	-24.68±1.27	0.113
5	85	15	-	-	2.5	86.6±0.3	-29.18±1.13	0.196
6	95	-	5	-	2.5	102.3±1.3	-20.44±0.84	0.044
7	93	-	7	-	2.5	97.6±1.1	-27.04±1.12	0.106
8	90	-	10	-	2.5	94.3±0.8	-27.08±2.48	0.134
9	85	-	15	-	2.5	82.8±0.9	-29.26±3.24	0.168
10	95	-	-	5	2.5	108.1±1.2	-21.67±0.95	0.043
11	93	-	-	7	2.5	103.3±1.3	-23.99±1.49	0.064
12	90	-	-	10	2.5	101.0±0.9	-23.80±1.69	0.108
13	85	-	-	15	2.5	60.9±0.6	-29.56±2.27	0.194

จากตารางที่ 7 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของ Conventional liposomes (ตำรับ 1) มีค่าเท่ากับ 141.8 ± 1.9 นาโนเมตร และ -6.06 ± 1.07 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ Conventional liposomes กับ PEGylated liposomes ที่มีการใส่โพลีเอทิลีนไกลคอล PEG-DSPE (ตำรับ 2-5) หรือ PEG-C₂-DSPE (ตำรับ 6-9) หรือ PEG-C₆-DSPE (ตำรับ 10-13) ปริมาณ 5, 7, 10 หรือ 15 mole% ในตำรับ พบว่าตำรับที่มีปริมาณ PEG-lipid conjugates 5, 7 และ 10 mole% โลโปโซมที่ได้มีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกันประมาณ 100 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า Conventional liposomes นอกจากนี้ตำรับที่มี PEG-lipid conjugates สูงที่สุดในการศึกษานี้คือ 15 mole% โลโปโซมที่ได้มีขนาดอนุภาคลดลงมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะตำรับที่มี PEG-C₆-DS ปริมาณ 15 mole% โลโปโซมที่ได้มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 60.9 ± 0.6 นาโนเมตร สำหรับค่าศักย์ซีต้าของโโลโปโซม พบว่าปริมาณ PEG-lipid conjugates ในตำรับที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าศักย์ซีตามีค่าติดลบเพิ่มขึ้น

6. ผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อความสามารถในการกักเก็บ Goniodiol ของไลโปโซม

ตารางที่ 8 แสดงผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลในตำรับต่อ % Entrapment efficiency ของไลโปโซม

ตำรับ	Liposome Formulations (mole %)					Entrapment Efficiency (EE) (%)
	DSPC	PEG-DSPE	PEG-C ₂ -DSPE	PEG-C ₆ -DSPE	Goniodiol	
1	100	-	-	-	2.5	89.6
2	95	5	-	-	2.5	90.4
3	90	10	-	-	2.5	86.9
4	85	15	-	-	2.5	90.8
5	95	-	5	-	2.5	88.0
6	90	-	10	-	2.5	90.3
7	85	-	15	-	2.5	90.2
8	95	-	-	5	2.5	93.3
9	90	-	-	10	2.5	91.5
10	85	-	-	15	2.5	95.6

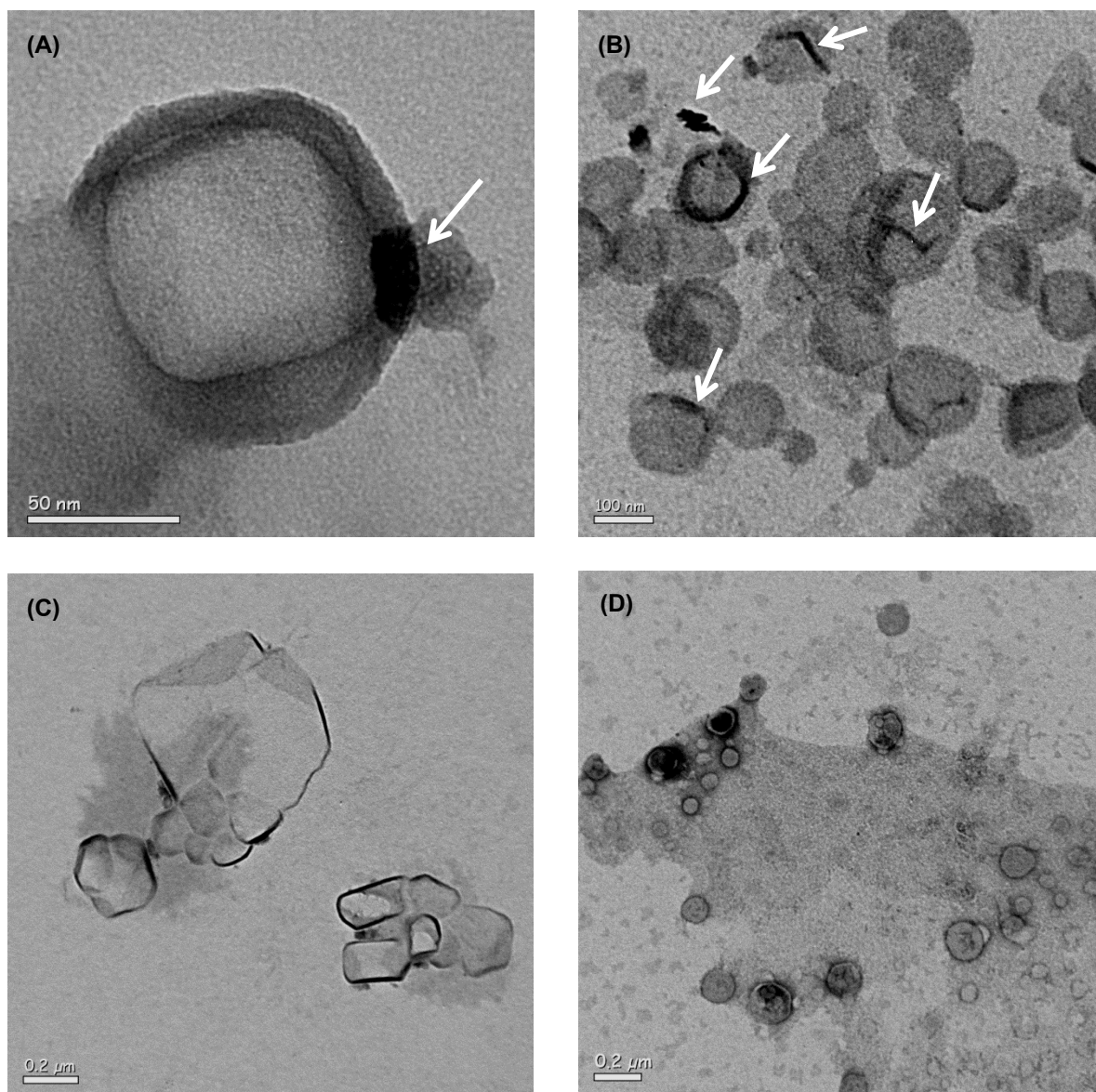
ความสามารถในการกักเก็บสาร Goniodiol ของไลโปโซมในการศึกษานี้แสดงเป็นค่า Entrapment Efficiency (EE) (%) จากตารางที่ 8 พบว่า Conventional liposomes (ตำรับ 1) และ PEGylated liposomes ที่เตรียมจาก PEG-DSPE (ตำรับ 2-4), PEG-C₂-DSPE (ตำรับ 5-7) หรือ PEG-C₆-DSPE (ตำรับ 8-10) ในปริมาณ 5, 10 หรือ 15 mole% มีความสามารถในการกักเก็บสาร Goniodiol ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า EE อยู่ในช่วง 80-90 %

7. ผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อความคงตัวของไลโปโซมที่บรรจุสาร Goniodiol
(Goniodiol-loaded PEGylated liposomes)

ตารางที่ 9 แสดงผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลในตำรับต่อขนาดอนุภาคและประจุของไลโปโซมที่บรรจุสาร Goniodiol ภายหลังการเก็บรักษา

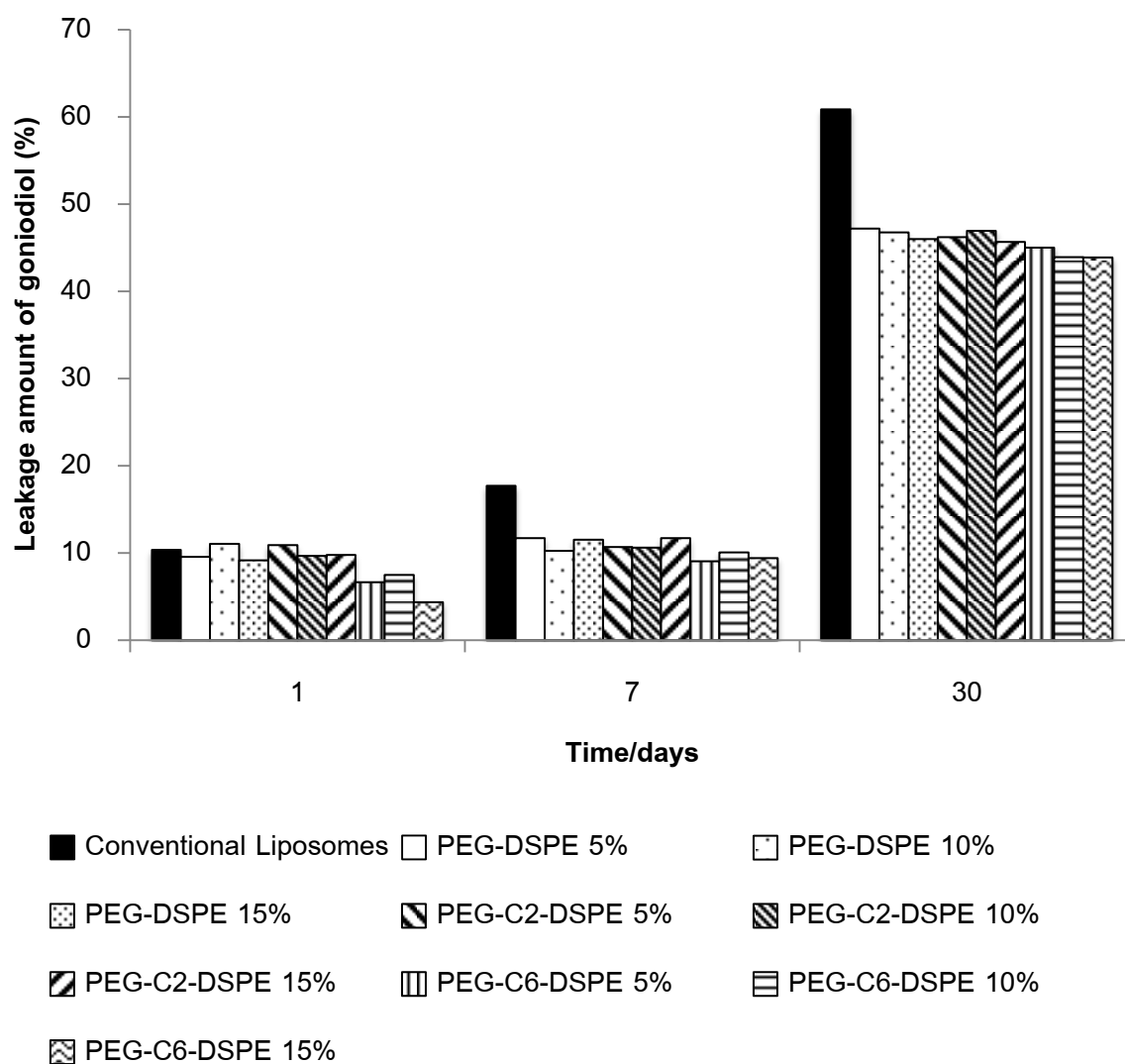
ตำรับ	Liposome Formulations (mole %)					Diameter Size (nm)			
	DSPC	PEG-DSPE	PEG-C ₂ -DSPE	PEG-C ₆ -DSPE	Goniodiol	Before Storage	After Storage		
							1 week	4 week	8 week
1	100	-	-	-	2.5	141.8±1.9	466.5±7.2	807.7±13.2	1079.4±33.9
2	95	5	-	-	2.5	104.2±0.9	104.3±1.0	115.8±0.5	119.1±0.8
3	90	10	-	-	2.5	93.8±0.5	93.5±1.1	95.1±0.8	95.9±0.6
4	85	15	-	-	2.5	86.6±0.3	86.1±0.8	93.3±0.6	95.4±0.8
5	95	-	5	-	2.5	102.3±1.3	99.6±1.1	104.0±0.8	102.0±1.1
6	90	-	10	-	2.5	94.3±0.8	91.3±1.0	90.6±1.0	92.3±0.7
7	85	-	15	-	2.5	82.8±0.9	87.7±0.8	100±4.0	108.5±0.9
8	95	-	-	5	2.5	108.1±1.2	105.4±1.4	108.1±1.1	109.4±1.2
9	90	-	-	10	2.5	101.0±0.9	102.0±1.2	100.2±1.7	101.9±1.2
10	85	-	-	15	2.5	60.9±0.6	65.0±1.0	67.2±0.6	67.7±0.5

การศึกษาความคงตัวของตำรับ Goniodiol-loaded pegylated liposomes โดยเก็บรักษาตำรับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และวัดขนาดอนุภาคของไลโปโซมภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1, 4, และ 8 อาทิตย์ ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค Zeta potential analyzer จากตารางที่ 9 พบว่าตำรับ Conventional liposomes (ตำรับ 1) อนุภาคไลโปโซมมีขนาดใหญ่ขึ้นภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 อาทิตย์ เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคไลโปโซมก่อนการเก็บรักษา และอนุภาคมีขนาดใหญ่ยิ่งขึ้นภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลานานยิ่งขึ้น ขณะที่ตำรับ PEGylated liposomes ที่เตรียมจาก PEG-DSPE (ตำรับ 2-4), PEG-C₂-DSPE (ตำรับ 5-7) หรือ PEG-C₆-DSPE (ตำรับ 8-10) ซึ่งมีปริมาณ 5, 10 หรือ 15 mole% ในตำรับ พบว่าขนาดอนุภาคของไลโปโซมมีค่าไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1, 4, และ 8 อาทิตย์ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคของไลโปโซมก่อนการเก็บรักษา



รูปที่ 5 แสดงผลอนุภาคของ Gonioliol-loaded PEGylated liposomes ที่เตรียมจากตำรับ DSPC : PEG-C₆-DSPE 95 : 5 mole ratio ภายหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน ภายใต้อุณหภูมิแช่เย็น (-80 °C) อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การศึกษาความคงตัวของตำรับไลโปโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า Goniodiol-loaded PEGylated liposomes ที่เตรียมจาก DSPC: PEG-C₆-DSPE 95:5 mole ratio ภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน อนุภาคไลโปโซมส่วนใหญ่ยังคงมีขนาดอนุภาคเล็กประมาณ 100 นาโนเมตร และมีผนังชั้นเดียว แต่พบอนุภาคอื่นที่มีลักษณะที่บดบังมากขึ้นบริเวณผนังของไลโปโซมและนอกอนุภาคไลโปโซม (ลูกศรสีขาว) (รูปที่ 5A และ 5B) และมีอนุภาคไลโปโซมบางส่วนมีขนาดใหญ่ขึ้น (รูปที่ 5C) นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคมีการเกาะกลุ่มและมีคราบของไขมันมากยิ่งขึ้น (รูปที่ 5C และ 5D)



รูปที่ 6 แสดงผลของโพลีเอทิลีนไกลคอลในตำรับต่อความสามารถในการกักเก็บสาร Goniodiol ของไลโปโซม ภายหลังการเก็บรักษา

ภายหลังการเก็บรักษาไลโปโซมตำรับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1, 7 และ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน ปริมาณของสาร Goniodiol ที่รั่วไหลออกจาก Conventional liposomes และ PEGylated liposomes ที่เตรียมจาก PEG-C₂-DSPE และ PEG-DSPE 5, 10 และ 15 mole% มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 10% ขณะที่ตำรับ PEGylated liposomes ที่เตรียมจาก PEG-C₆-DSPE 5, 10 และ 15 mole% มีปริมาณของ Goniodiol ที่รั่วไหลออกมาน้อยกว่า โดยเฉพาะตำรับที่มี PEG-C₆-DSPE 15 mole% มีปริมาณรั่วไหลของ Goniodiol น้อยที่สุดประมาณ 4% และเมื่อเก็บรักษาไลโปโซมเป็นเวลานานขึ้นเป็น 7 และ 30 วัน พบว่า ปริมาณของ Goniodiol ที่รั่วไหลออกจาก Conventional liposomes มีค่ามากขึ้นเป็น 17.71 และ 60.88 % ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณของ Goniodiol ที่รั่วไหลออกจาก PEGylated liposomes ทุกตำรับในการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 10% และ 45% ภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 และ 30 วัน ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณที่น้อยกว่า Conventional liposomes

บทวิจารณ์

สาร Goniodiol เป็นสารที่พบในพืชสกุลปาหนันช้าง หรือ *Goniothalamus* ซึ่งมีรายงานว่า สาร Goniodiol มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ดีและสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาได้^{16,17} เนื่องจาก โครงสร้างหลักส่วน Lactone ของสาร Goniodiol เป็นส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์¹⁹ อาจถูกทำลาย โดยเอนไซม์ Esterase ในกระแสเลือดได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบความคงตัวของสาร Goniodiol ใน ซีรัม โดยได้ทำการทดลองในซีรัม 3 ชนิด ได้แก่ Fetal bovine serum, Mouse serum และ Human serum เนื่องจากซีรัมแต่ละชนิดมีชนิดและปริมาณของเอนไซม์ Esterase แตกต่างกัน³⁴ ผลการ ทดลองพบว่า สาร Goniodiol สลายตัวได้ในซีรัมทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน เวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 3) ดังนั้นในการตั้งตำรับยานี้จึงจำเป็นต้องมีการป้องกันการสลายตัวของ สาร Goniodiol ในกระแสเลือด

การตั้งตำรับสำหรับสาร Goniodiol ในการศึกษานี้ผู้วิจัยเลือกไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิว ด้วย PEG (PEGylated liposomes) มาบรรจุ Goniodiol โดยใช้ PEG-Lipid conjugates ที่เชื่อมกัน ด้วยลิ้งค์เกอร์ที่ต่างกัน ได้แก่ เอไมด์ลิ้งค์เกอร์ ซึ่งมีความยาวลิ้งค์เกอร์เป็นคาร์บอน 2 และ 6 อะตอม (PEG-C₂-DSPE และ PEG-C₆-DSPE) (รูปที่ 2) และคาร์บาเมตลิ้งค์เกอร์ (PEG-DSPE) เนื่องจาก ขนาดอนุภาคมีผลต่อการถูกกำจัดออกจากร่างกายโดย RES ซึ่ง Li SD & Huang L³⁵ และ He C. และคณะ³⁶ รายงานว่าขนาดของอนุภาคที่ไม่ถูกกำจัดโดย RES ควรน้อยกว่า 150 นาโนเมตร การศึกษานี้พบว่า Goniodiol ในตำรับมีผลเพิ่มขนาดอนุภาคของไลโปโซมทั่วไป (Conventional liposomes) แต่ไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคของ PEGylated liposomes ที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 100 นาโนเมตร (ตารางที่ 6 และ 7) โดยชนิดของลิ้งค์เกอร์และปริมาณของ PEG-Lipid conjugates ที่ 5, 7 และ 10 mole% ขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ตำรับที่มีปริมาณ PEG-Lipid conjugates 15 mole% ขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่ได้มีขนาดลดลง (ตารางที่ 7) ซึ่ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Sheng Y และคณะ³⁷ ที่รายงานว่า Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) 20 mole% ในตำรับ มีผลทำให้ขนาดอนุภาคลดลงจากตำรับที่มี PLA-PEG 0, 5 และ 10 mole% ในส่วนของค่าศักย์ซีต้าของไลโปโซมพบว่าปริมาณ PEG ในตำรับที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ ค่าศักย์ซีต้ามียค่าติดลบเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากประจุลบของหมู่ฟอสเฟต DSPE³⁸

ผู้วิจัยศึกษาผลของชนิดและความยาวของลิ้งค์เกอร์ต่อความสามารถในการกักเก็บสาร Goniodiol ของไลโปโซม พบว่าไลโปโซมที่เตรียมจาก PEG-Lipid conjugates ที่เชื่อมด้วยคาร์

บาเมตและเอไมด์ลิงค์เกจมีค่า Entrapment efficiency (EE) ไม่ต่างกัน และความยาวที่ต่างกันของ เอไมด์ลิงค์เกจในการศึกษานี้ก็ไม่มีผลต่อความสามารถในการกักเก็บสาร Goniodiol ของไลโปโซม เช่นกัน นอกจากนี้ความสามารถในการกักเก็บสาร Goniodiol ของ PEGylated liposomes และ Conventional มีค่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 8)

จากการศึกษาความคงตัวของตำรับพบว่าขนาดอนุภาคของ PEGylated liposomes มีค่าไม่ ค่อยเปลี่ยนแปลงในระยะเวลาที่เก็บนานที่สุด 2 เดือน ขณะที่อนุภาคของ Conventional liposomes มีขนาดเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) แม้ว่าผลจากเครื่องวัดขนาดอนุภาค Zeta potential analyzer จะแสดงว่าขนาดอนุภาคของ PEGylated liposomes ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง แต่ผลจาก TEM แสดงให้เห็นว่าอนุภาคของ PEGylated liposomes มีการเกาะกลุ่มกันและอนุภาค บางส่วนมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคก่อนการเก็บรักษา (รูปที่ 4 และ 5C) นอกจากนี้ แม้ว่าไม่พบความแตกต่างของขนาด PEGylated liposomes แต่จากค่า EE ของแต่ละตำรับภายหลัง การเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน แสดงให้เห็นว่าตำรับที่เตรียมจาก PEG-C₆-DSPE ป้องกันการรั่วไหล ของสาร Goniodiol ได้ดีกว่าตำรับที่เตรียมจาก PEG-C₂-DSPE ซึ่งลิงค์เกจมีสายคาร์บอนที่สั้นกว่า และดีกว่าตำรับที่เตรียมจาก PEG-DSPE ซึ่งเป็นคาร์บาเมตลิงค์เกจ (รูปที่ 6) ผลการทดลองนี้อาจ อธิบายได้จากงานวิจัยที่แสดงว่าโมเลกุลที่อยู่บริเวณขอบของเมมเบรนมีผลต่อการสร้างช่องหรือ รูในชั้นเมมเบรนของไลโปโซม³⁹ ซึ่งผลการรั่วไหลของสาร Goniodiol และความไม่คงตัวของ PEGylated liposomes สอดคล้องกับภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (รูปที่ 5) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณการรั่วไหลของสาร Goniodiol ที่น้อยกว่า และขนาดอนุภาคส่วนใหญ่ที่ไม่ ค่อยเปลี่ยนแปลงของตำรับ PEGylated liposomes เมื่อเทียบกับตำรับ Conventional liposomes (ตารางที่ 9 และ รูปที่ 6) แสดงให้เห็นถึงความคงตัวที่มากกว่าของตำรับ PEGylated liposomes

เอกสารอ้างอิง

1. กรรณูดา อิศระกุลฤทธา. มะเร็งคืออะไร [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: โรงพยาบาลศูนย์วิจัยศึกษาและบำบัดโรคมะเร็ง; **2554** [วันที่อ้างถึง 7 สิงหาคม 2556]. ที่มา:
<http://www.cccthai.org/l-th/index.php/2009-06-13-08-46-51.html>
2. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 1990;50(23):7415-21.
3. Tredaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997;72(4):565-73.
4. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006;7(2):149-56.
5. Pan KF, Liu WG, Zhang L, You WC, Lu YY. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2008;14(10):1570-4.
6. Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, Man S, Jasani B, Navabi H, et al. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. *Vaccine.* 2001;19(17-19):2549-56.
7. Berrington de Gonzalez A, Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *Lancet.* 2004;363(9406):345-51.
8. Cancer worldwide [Internet]. London: **Cancer Research UK**; c2013 [updated unknown; cited 2013 Aug 7]. Available from:
http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/Product/CS_CS_WORLD.pdf
9. Cancer [Internet]. Geneva: World Health Organization; c2013 [updated 2013 Jan; cited 2013 Aug 7]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
10. สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. สถิติสาธารณสุขสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2553 [อินเทอร์เน็ต]. นนทบุรี: สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; **2555** [วันที่อ้างถึง 15 สิงหาคม 2556]. ที่มา:
http://bps.moph.go.th/sites/default/files/moph_stat_54_2.3.6.pdf
11. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002;53:615-27.
12. Itokawa H, Morris-Natschke SL, Akiyama T, Lee KH. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *J Nat Med.* 2008;62(3):263-80.

13. Wilairat R, Manosroi J, Manosroi A, Kijjoa A, Nascimento MS, Pinto M, et al. Cytotoxicities of xanthenes and cinnamate esters from *Hypericum hookerianum*. *Planta Med.* 2005;71(7):680-2.
14. Manosroi J, Wilairat R, Manosroi A. Anti-proliferative activity of extracts from Thai plants in Guttiferae and Schisandraceae families on human cancer cell lines. *Pharm Biol.* 2007;45(3):255-8.
15. Wiart C. *Goniothalamus* species: a source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections?. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2007;4(3):299-311.
16. Tian Z, Chen S, Zhang Y, Huang M, Shi L, Huang F, et al. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine.* 2006;13(3):181-6.
17. Pradupsri P, Loetchutinat C, Nuntasaeen N, Meepowpan P, Tuntiwechapikul W, Pompimon W. Anticancer activities of styrylpyrone from the leaves and twigs of *Goniothalamus maewongensis* via cell cycle arrest. *American Journal of Applied Sciences.* 2009;6(12):2018-23.
18. Goniodiol [Internet]. Cambridge: Royal Society of Chemistry; c2013 [updated unknown; cited 2013 Aug 5]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.157243.html>
19. Dumitrescu L, Mai Huong DT, Van Hung N, Crousse B, Bonnet-Delpon D. Synthesis and cytotoxic activity of fluorinated analogues of *Goniothalamus* lactones. Impact of fluorine on oxidative processes. *Eur J Med Chem.* 2010;45(7):3213-8.
20. กฤษณา ศิริเลิศมุกกุล. พอลิเมอร์กับระบบนำส่งยา [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2552 [วันที่อ้างถึง 11 สิงหาคม 2556]. ที่มา: <http://www.material.chula.ac.th/RADIO45/February/radio2-4.htm>
21. จีระเดช มโนสร้อย, อรัญญา มโนสร้อย. ไลโปโซมทางยาและเครื่องสำอาง. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์; 2545.
22. อัมพล ไมตรีเวช, ณรงค์ สาริสุต, ดวงมณี มณีโรจน์ภักดี, วสุ วิฑูรย์สฤกษ์ศิลป์, โกศล แซ่ตั้ง. การพัฒนานาโนภาคนาโนและระบบนำส่ง ตอนที่ 1 [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล; 2556 [วันที่อ้างถึง 16 สิงหาคม 2556]. ที่มา: <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/thai/knowledgeinfo.php?id=112>

23. Butle SR, Baheti PR. Role of gold nanoparticles in the detection and treatment of cancer. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2011;10(1):54-9.
24. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. นาโนเทคโนโลยี: การนำส่งยาและเครื่องสำอางทางผิวหนัง. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2546.
25. Banerjee R. Liposomes: applications in medicine. *J Biomater Appl*. 2001;16(3):3-21.
26. Koudelka S, Turanek J. Liposomal paclitaxel formulations. *J Control Release*. 2012;163(3):322-34.
27. Owens DE 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;307(1):93-102.
28. Milla P, Dosio F, Cattell L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Curr Drug Metab*. 2012;13(1):105-19.
29. Umezaki S, Maruyama K, Ishida O, Sugiyama A, Hosoda JI, Iwatsuru M. Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long-circulating liposomes containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Int J Pharm*. 1995;126(1-2):41-8.
30. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res*. 1994;54(4):987-92.
31. Gabizon A, Shmeida H, Grenader T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(4):388-98.
32. Papisov MI. Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes: molecular mechanics and chemistry of liposome interactions. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32(1-2):119-38.
33. Silvander M, Bergstrand N, Edwards K. Linkage identity is a major factor in determining the effect of PEG-ylated surfactants on permeability of phosphatidylcholine liposomes. *Chem. Phys. Lipids*. 2003; 126(1):77-83.

34. Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, et al. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70(11):1673-84.
35. Li SD, Huang L. Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: role of the supported bilayer. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1788(10):2259-66.
36. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 2010; 31(13):3657-66.
37. Sheng Y, Yuan Y, Liu C, Tao X, Shan X, Xu F. In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content. *J Mater Sci Mater Med.* 2009; 20(9):1881-91
38. Woodle MC¹, Collins LR, Sponsler E, Kossovsky N, Papahadjopoulos D, Martin FJ. Sterically stabilized liposomes. Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophys J.* 1992; 61(4):902-10.
39. Silvander M¹, Johnsson M, Edwards K. Effects of PEG-lipids on permeability of phosphatidylcholine/cholesterol liposomes in buffer and in human serum. *Chem Phys Lipids.* 1998; 97(1):15-26.

Output จากโครงการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้จากการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง ลักษณะทางกายภาพและปริมาณของ Goniodiol บรรจุในไลโปโซมที่ถูกดัดแปลงพื้นผิวด้วยโพลิเมอร์ PEG นี้ ผู้วิจัยกำลังเตรียม manuscript สำหรับเผยแพร่ผลงานวิจัยสู่วงการวิจัย ดังนี้

Charoensit P, Sungthongjeen S. Goniodiol-loaded PEGylated liposomes: Preparation, Physicochemical properties and Stability. (Manuscript in preparation)