

ส่วนที่ 1 หน้าปก

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี โดยบรรจุในอนุพันธ์ของไขมัน
เพื่อเตรียมเป็นยาผงแห้งสำหรับฉีดและพ่นละอองฝอย

Development of amphotericin B incorporated in lipid derivatives as a
reconstituted powder for injection and nebulization

คณะนักวิจัย

นายเอกวัฒน์ ทวีทอง	หัวหน้าโครงการ
นางวิไลพร บัวทอง	ผู้ร่วมวิจัยโครงการ
นายวิกรม ช่างसान	ผู้ร่วมวิจัยโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ	ผู้ร่วมวิจัยโครงการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ PHA560308S

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย): การพัฒนาสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี โดยบรรจุในอนุพันธ์ของไขมัน เพื่อเตรียมเป็นยาผงแห้งสำหรับฉีดและพ่นละอองฝอย

(ภาษาอังกฤษ): Development of amphotericin B incorporated in lipid derivatives as a reconstituted powder for injection and nebulization.

คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด (คณะ/ภาควิชาหรือหน่วยงาน)

หัวหน้าโครงการ

นายเอกวัฒน์ ทวีทอง

สถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 0-7428-8971, โทรสาร 0-7428-8979

E-mail: ekawat281@gmail.com

ผู้ร่วมวิจัยโครงการ

นางวิไลพร บัวทอง

สถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 0-7428-8971, โทรสาร 0-7428-8979

E-mail: wilaiporn.ko@psu.ac.th

นายวิกรม ช่างसान

สถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 0-7428-8971, โทรสาร 0-7428-8979

E-mail: spider_ban@hotmail.com

รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ

ภาควิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 0-7428-8909, โทรสาร 0-7428-8979

E-mail: teerapol.s@psu.ac.th

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	4
รายการรูป	5
กิตติกรรมประกาศ	7
บทคัดย่อ	8
Abstract	9
บทนำ	10
วัตถุประสงค์	11
การตรวจเอกสาร	11
วิธีการทดลอง	16
ผลการทดลอง	24
สรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง	46
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	48
ภาคผนวก ประกอบด้วย	49
1. นิพนธ์ต้นฉบับที่พร้อมส่งตีพิมพ์ (Manuscript) จำนวน 1 เรื่อง	
2. สิทธิบัตร จำนวน 1 เรื่อง	

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าเคมีคัลชิฟต์ (chemical shift) ของสัญญาณโปรตอนของสารที่ได้จากการสังเคราะห์	27
ตารางที่ 2 ลักษณะของยาแอมโฟเทอริซิน บี และอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ ก่อนและหลังให้ความร้อน โดยใช้ Hot stage polarized light microscope (PLM)	31
ตารางที่ 3 ขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า ของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ	33
ตารางที่ 4 ขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า และปริมาณยาของตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน หลังจากเก็บไว้นาน 6 เดือน	34
ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางแอร์โรโซลของสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น	35
ตารางที่ 6 ความแรงของยา ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MFC) ของตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟตตำรับที่มีใช้ในปัจจุบัน และยามาตรฐาน <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> และ <i>S. cerevisiae</i>	43

รายการรูป

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของยาแอมโอฟเทอริซิน บี	12
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของไขมัน	15
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้น (กรดดีออกซีโคลิค) (1) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไขมัน (เมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์ (Methyl deoxycholate ester) (2), ดีออกซีโคลิคแอลกอฮอล์ (Deoxycholic alcohol) (3) และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (Sodium deoxycholate sulfat) (4))	24
รูปที่ 4 IR spectrum ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต	25
รูปที่ 5 FT-IR spectrum ของยาแอมโอฟเทอริซิน บี (AmB) (A), โคลิคเอซิด (CA) (B), โซเดียมโคเลต (SC) (C), สูตรตำรับยาแอมโอฟเทอริซิน บี กับโซเดียมโคเลต (AmB-SC) (D), โปแทสเซียมโคเลต (KC) (E) และสูตรตำรับยาแอมโอฟเทอริซิน บี กับโปแทสเซียมโคเลต (AmB-KC) (F)	26
รูปที่ 6 FT-IR spectrum ของยาแอมโอฟเทอริซิน บี (AmB) (A), ดีออกซีโคลิคเอซิด (DCA) (B), โปแทสเซียมดีออกซีโคเลต (KDC) (C), สูตรตำรับยาแอมโอฟเทอริซิน บี กับโปแทสเซียมดีออกซีโคเลต (AmB-KDC) (D), โซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC) (E), สูตรตำรับยาแอมโอฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (AmB-SDC) (F), โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) (G) และสูตรตำรับยาแอมโอฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (AmB-SDS) (H)	26
รูปที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 500, 3500 และ 10000 เท่า ของยาแอมโอฟเทอริซิน บี (AmB) (รูปที่ 7 A-C), SDC (รูปที่ 7 D-F), SDC-AmB (รูปที่ 7 G-I) SDS (รูปที่ 7 J-L) และ SDS-AmB (รูปที่ 7 M-O)	28
รูปที่ 8 DSC thermograms ของตำรับยาผงแห้งแอมโอฟเทอริซิน บี SDC-AmB (A) และ SDS-AmB (B) ยาแอมโอฟเทอริซิน บี (C) และอนุพันธ์ของไขมัน SDC (D) และ SDS (E)	30
รูปที่ 9 ขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้าของสูตรตำรับแอมโอฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS-AmB) และสูตรตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโอฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC-AmB)	32
รูปที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงยูวีของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโอฟเทอริซิน บี และอนุพันธ์ของไขมัน (SDC-AmB คือ คอลัมน์ด้านซ้าย และ SDS-AmB คือ คอลัมน์ด้านขวา) ที่ละลายด้วยตัวทำละลายต่างๆ ((A) ละลายด้วย DW (B) ละลายด้วย 5% DEX (C) ละลายด้วย NSS และ (D) ละลายด้วย Diluted NSS)	38

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

- รูปที่ 11** การรอดชีวิตของเซลล์ AMs NR8383 (A), A549 (B), Calu-3 (C) และ 293T/17 (D) หลังจาก บ่มเซลล์กับตัวพาโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC) และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง **39**
- รูปที่ 12** การรอดชีวิตของเซลล์ AMs NR8383 (A), A549 (B), Calu-3 (C) และ 293T/17 (D) หลังจาก บ่มเซลล์กับตำรับยาผงแห้ง SDS-AmB และตำรับ SDC-AmB ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง **40**
- รูปที่ 13** การแตกของเม็ดเลือดแดงของคนในหลอดทดลองเมื่อบ่มกับตัวพาโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC) และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) (A) และเมื่อบ่มกับตำรับยาผงแห้ง SDS-AmB, SDC-AmB และยาแอมโฟเทอริซิน บี เดี่ยวๆ (AmB) (B) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง **41**

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยา ที่ได้อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ รวมทั้งเครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุมัติเงินอุดหนุนการวิจัย ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2556 สัญญาเลขที่ PHA560308S

นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณ คุณกรกมล เพ็ชรยอด ที่ได้ช่วยประสานงานด้านเอกสาร ขอขอบคุณคุณทิพย์พัลย์ นาคเพ็ง คุณกิตติยา ถิ่นพันธ์ และคุณคณาจิราม อาดีคารี (นักศึกษาปริญญาเอก) ที่ได้ให้คำปรึกษาในส่วนของ การศึกษาและทดสอบฤทธิ์การยับยั้งและฆ่าเชื้อรา และความเป็นพิษของสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี

สุดท้ายต้องขอขอบคุณสมาชิกสถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยาทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

คณะนักวิจัย

เอกวัฒน์ ทวีทอง

วิไลพร บัวทอง

วิกรม ช่างसान

ธีระพล ศรีชนะ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของไขมัน คือ โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) โดยใช้กรดดีออกซีโคลิคเป็นสารตั้งต้น พร้อมทั้งนำไปใส่ในสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บีกับอนุพันธ์ของไขมัน เพื่อเตรียมเป็นยาผงแห้งสำหรับฉีดและพ่นละอองฝอย ในอัตราส่วนโมลของยาแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน เท่ากับ 2:1 ซึ่งผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และศึกษาคุณสมบัติของสูตรตำรับโดยใช้เทคนิค fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance (NMR), scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC) และ UV Spectrophotometer (UV) ผลการศึกษาพบว่าทุกสูตรตำรับมีความคงตัวทั้งทางเคมีกายภาพดี มีความคงตัวหลังจากเก็บไว้นาน 6 เดือน และเหมาะกับการนำไปพัฒนาเพื่อใช้เตรียมเป็นยาผงแห้งสำหรับฉีดและพ่นละอองฝอย นอกจากนี้ทุกสูตรตำรับ (SDS-AmB และ SDC-AmB) ได้นำมาศึกษาคุณสมบัติทางแอโรโซลของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน โดยใช้ jet-nebulizer ต่อกับ Andersen cascade impactor (ACI) จากนั้นคำนวณค่า mass median aerodynamic diameter (MMAD) และ fine particle fraction (FPF) มีค่า MMAD ของสูตรตำรับอยู่ในช่วง 1.70-2.05 ไมครอน และมีค่า FPF อยู่ในช่วง 70-80% ผลการทดสอบความเป็นพิษของสูตรตำรับ ในช่วงความเข้มข้น 1-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์มาโครฟาจ เซลล์ปอด และเซลล์ไต มีค่ามากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายาผงแห้งทุกสูตรตำรับไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีค่าการแตกของเม็ดเลือดแดงน้อยกว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี เดียว และมีค่าความแรงของสูตรตำรับกับเชื้อ *C. neoformans*, *C. albicans* และ *S. cerevisiae* พบว่าสูตรตำรับมีความแรงอยู่ในช่วง 100-103 เปอร์เซ็นต์ สูตรตำรับยาผงแห้ง SDS-AmB และ SDC-AmB มีค่าการยับยั้งเชื้อรา และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อราต่อเชื้อ *C. neoformans* เท่ากับ 0.16 และ 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการยับยั้งเชื้อรา และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อราของตำรับ SDC-AmB ต่อเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 0.16 และ 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนตำรับ SDS-AmB มีค่าเท่ากับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่บริสุทธิ์ เท่ากับ 0.32 และ 0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Abstract

Sodium deoxycholate sulfate (SDS) was synthesized from deoxycholic acid in house laboratory for this research work. Amphotericin B incorporated in lipid derivatives as a reconstituted powder for injection and nebulization with mole ratio 2:1 (lipid derivatives : AmB) were prepared by freeze drying. The characterization of these formulations were characterized by using fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance (NMR), scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC) and UV Spectrophotometer (UV). All formulations were stable within the storage period of 6 months and provided a desirable feature for their use in dry powder drug delivery systems. For all formulations (SDS-AmB and SDC-AmB) were evaluated for content uniformity and delivery efficiency to lower airways by jet nebulizer using aerosol sampling apparatus and Andersen cascade impactor (ACI), respectively. The results were calculated as the mass median aerodynamic diameter (MMAD) and fine particle fraction (FPF). MMAD and FPF of all AmB dry powder formulations were obtained between 1.7-2.05 μm and 70-80%, respectively. All AmB-lipid derivative formulations (1-8 $\mu\text{g/ml}$ of concentrations) were not toxic to human red blood cells and respiratory cell lines including small airway epithelial and alveolar macrophage cell lines. AmB-lipid derivative formulations against *C. neoformans*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* gave equivalent potency to that of standard AmB (100%). Minimum inhibitory concentration (MICs) and minimum fungicidal concentration (MFCs) of both SDS-AmB and SDC-AmB against *C. neoformans* was 0.16 and 0.32 $\mu\text{g/ml}$ respectively. SDC-AmB has higher potency than SDS-AmB against *C. albicans* which MICs and MFCs of SDC-AmB was 0.16 and 0.32 $\mu\text{g/ml}$ while MICs and MFCs of SDS-AmB against *C. albicans* was 0.32 and 0.63 $\mu\text{g/ml}$ similar to pure amphotericin B.

บทนำ

ยาแอมโฟเทอริซิน บี เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม polyene ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางมานานกว่า 45 ปี ในการรักษาการติดเชื้อราในร่างกาย (Czub และคณะ, 2009) จัดอยู่ใน Biopharmaceutical classification system (BSC) class IV ถึงแม้ว่าตัวยามีความเป็นพิษต่อร่างกาย แต่ยาแอมโฟเทอริซิน บี เป็นยาที่ถูกเลือกใช้เป็นอันดับแรกในการรักษาการติดเชื้อราชนิดที่แพร่กระจายทั่วร่างกายในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยมะเร็ง (cancer) ผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ (transplants) และผู้ป่วยเอดส์ (AIDS) เป็นต้น เนื่องจากยาแอมโฟเทอริซิน บี มีข้อจำกัดในด้านการละลายและการดูดซึม ส่งผลให้ยามีชีวประสิทธิผล (bioavailability) ในการรับประทานต่ำ (Ibrahim และคณะ, 2012) สูตรตำรับยาที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบอาจมีประโยชน์ในการนำส่งยา โดยช่วยเพิ่มความสามารถในการสะสมของยาที่ปอด และทำให้ยาอยู่ในเนื้อเยื่อปอดได้นานขึ้น นอกจากนี้ระบบนำส่งยาที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบยังสามารถช่วยลดผลข้างเคียงที่เป็นพิษของยาได้ ระบบนำส่งยาดังกล่าวที่รู้จักกันโดยทั่วกัน คือ liposome โดยมีชื่อทางการค้าว่า Ambisome[®] และ phospholipid complex ที่มีชื่อการค้าคือ Abelcet[®] ระบบนำส่งยาสู่อปอดของแอมโฟเทอริซินบีถูกพิจารณานำมาใช้ในการรักษา pulmonary aspergillosis สาเหตุการเกิดโรคเกิดจากการติดเชื้อ *Aspergillus conidia* เข้าไปในร่างกาย ซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิตในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง การนำส่งยาสู่อปอดโดยตรงยังมีประโยชน์ในการลดผลข้างเคียงที่ร้ายแรงทั่วร่างกายอันเนื่องมาจากยา ซึ่งยาจะอยู่ในกระแสเลือดได้ต่ำ ทำให้ผู้ป่วยทนต่อการใช้ยาโดยไม่พบอาการของความเป็นพิษจากยา (Nasr และคณะ, 2012)

รูปแบบยาในอุดมคติควรเป็นยาที่นำส่งโดยตรงสู่อปอด ที่ทำให้อวัยวะเป้าหมายมียาสะสมในระดับความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการรักษา และไม่เป็นพิษต่อร่างกายหรืออวัยวะส่วนอื่น สำหรับการติดเชื้อราในปอด เส้นทางการนำส่งยา คือ การนำส่งยาไปยังปอดโดยผ่านการพ่นแบบละอองฝอย (nebulizer) (Kuiper และ Ruijgrok, 2009) ระบบนำส่งยาสู่อปอดจะทำให้การรักษาเกิดขึ้นบริเวณที่ติดเชื้อ และลดความเป็นพิษต่อไตจากระดับความเข้มข้นของแอมโฟเทอริซินบีที่สูง

เพื่อแก้ไขข้อจำกัดในด้านการละลายน้ำของยาแอมโฟเทอริซิน บี เป้าหมายหลักของงานวิจัยนี้ คือ พัฒนาสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบแบบยาผงชนิดผสมน้ำก่อนใช้สำหรับฉีดและสูดพ่นแบบละอองฝอยที่ละลายน้ำได้ดีและมีความคงตัว โดยใช้กระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) นอกจากนี้ ทำการประเมินความเป็นพิษและฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่กักเก็บในอนุภาคไขมันระดับไมโครเมตร เพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้กับผู้ป่วย

วัตถุประสงค์

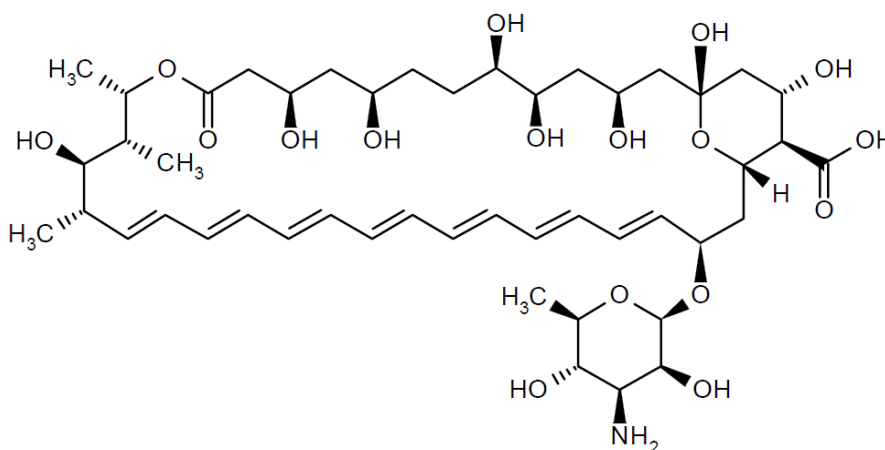
1. เตรียมสูตรตำรับยาแอมโฟเทอรีซิน บี โดยบรรจุในอนุพันธ์ของไขมัน เพื่อเตรียมเป็นยาผงแห้งสำหรับฉีดและพ่นละอองฝอย
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและอันตรกิริยาของยาแอมโฟเทอรีซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งและฆ่าเชื้อรา และความเป็นพิษของสูตรตำรับยาแอมโฟเทอรีซิน บี ที่บรรจุในอนุพันธ์ของไขมัน

การตรวจเอกสาร

การนำส่งยาทางปอดโดยทั่วไปทำได้ 3 วิธี คือ 1) การใช้เครื่องพ่นละอองฝอย (Nebulizer) หรือการสร้างละอองโดยใช้เครื่องอัดอากาศหรือออกซิเจน วิธีนี้มักใช้ในโรงพยาบาล 2) ยาสูดพ่นอัดไอกำหนดขนาด (pressurized metered-dose inhaler; pMDI) ซึ่งได้รับความนิยมเนื่องจากอุปกรณ์มีขนาดเล็ก ต้องอาศัยสารขับเคลื่อน (propellant) ในการทำให้เกิดละออง และพ่นยาผ่านวาล์วที่สามารถกำหนดขนาดยาได้ โดยในการใช้งาน pMDI ผู้ป่วยจะต้องได้รับการฝึกฝนเพื่อให้หายใจเข้าได้สัมพันธ์กับการกดพ่นยา เพื่อให้ได้รับยาครบขนาด และ 3) ยาผงแห้งสูดพ่นสู่ทางเดินหายใจ (Dry powder inhalers; DPI) มีข้อดี คือไม่ต้องอาศัยสารขับเคลื่อนในตำรับ ต่างกับยาสูดพ่นอัดไอกำหนดขนาด (pMDI) และสามารถนำส่งยาได้ในขนาดสูง ผู้ป่วยสามารถบริหารยาเองได้ง่าย และตำรับอยู่ในรูปแบบผงแห้งจึงมีความคงตัวสูง การปลดปล่อยตัวยาอาศัยเพียงกระแสอากาศจากลมหายใจเข้า ทำให้ผงยาเกิดการฟุ้งกระจายและเคลื่อนที่เข้าสู่ทางเดินหายใจ (Misra และคณะ, 2011) ในปัจจุบันมีอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับบริหารยา DPIs มากกว่า 20 ชนิด และกำลังได้รับการพัฒนาอีกหลายชนิด เพื่อให้เหมาะกับการนำส่งยาชนิดต่างๆ (Muttill และคณะ, 2009)

เภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics; PK) ของยาสูดพ่นสู่ทางเดินหายใจ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของอนุภาคยาเป็นหลัก โดยขนาดทางอากาศพลศาสตร์ (aerodynamic diameter) มีความสำคัญมากกว่าขนาดทางกายภาพ ที่จะส่งผลกระทบต่อตำแหน่งที่อนุภาคยาจะไปถึง กล่าวคืออนุภาคยาที่มีขนาดทางอากาศพลศาสตร์เหมาะสมเท่านั้นที่จะไปถึงปอดส่วนล่าง ส่วนอนุภาคยาที่มีขนาดไม่เหมาะสมจะค้างอยู่ในช่องปาก หรือทางเดินหายใจส่วนต้น หรือสูญเสียไปพร้อมกับลมหายใจออก (Misra และคณะ, 2011) โดยขนาดทางอากาศพลศาสตร์ที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 1 – 5 ไมครอน (Pilcer และ Amighi, 2010) และค่า “fine particle fraction” (FPF) ซึ่งบ่งชี้ถึง % ของอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 5 ไมครอน สามารถนำมาทำนายประสิทธิภาพในการนำส่งไปสู่ปอดได้

ยาที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้คือ ยาแอมโฟเทอริซิน บี ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม polyenes ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง และยาวนานกว่า 45 ปี เพื่อใช้ในการรักษาการติดเชื้อรา (Czub และคณะ, 2009) ถึงแม้ว่าตัวยาจะมีความเป็นพิษต่อร่างกาย แต่ยาแอมโฟเทอริซิน บี เป็นยาที่ถูกเลือกใช้เป็นอันดับแรกในการรักษาการติดเชื้อราชนิดที่แพร่กระจายทั่วร่างกายในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ฤทธิ์ในการรักษาและพิษของยามีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของยา (รูปที่ 1) ความสามารถในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยากับตัวยา และระหว่างตัวยากับไขมัน โดยยาแอมโฟเทอริซิน บี ประกอบด้วย macrolide ring ซึ่งมี heptane chromophore หมู่ ester และมี lactone ส่วนที่เป็น hydroxyl hydrophilic ในโมเลกุลยังประกอบด้วยหมู่ carboxyl และ amino sugar ซึ่งต่ออยู่กับ macrolide ring โดยพันธะ glycosidic ความสามารถในการรักษาของยาแอมโฟเทอริซิน บี และยาฆ่าเชื้อราในกลุ่ม polyene ขึ้นอยู่กับความชอบในการจับกับ cholesterol และ ergosterol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม sterol ซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์สัตว์ และเชื้อรา ความจำเพาะเจาะจงของยากับ sterol เหล่านี้ขึ้นอยู่กับรูปแบบในการจับตัวกันของยาแอมโฟเทอริซิน บี monomeric จับกับ sterol ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ในขณะที่ self-associated AmB สามารถสร้างรูในเยื่อหุ้มที่ประกอบด้วย cholesterol ซึ่งนำมาสู่การเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ (Larabi และคณะ, 2004)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของยาแอมโฟเทอริซิน บี

สูตรตำรับยาดั้งเดิมของยาแอมโฟเทอริซิน บี ได้แก่ ฟังจิโซน (Fungizone[®]) ถูกใช้ในการรักษาการติดเชื้อราภายในร่างกายเป็นเวลามากกว่า 40 ปี ซึ่ง Fungizone[®] (ยาแอมโฟเทอริซิน บี สำหรับฉีด) ในแต่ละหลอดของ Fungizone[®] (Bristol-Myers Squibb Company, USA) ประกอบด้วย ยาแอมโฟเทอริซิน บี 50 มิลลิกรัม โดยมีโซเดียม ไดออกซีโคเลท 38.8 มิลลิกรัม และโซเดียมฟอสเฟต 20.2 มิลลิกรัม เป็นสารบัฟเฟอร์ โดยสูตรตำรับนี้ สามารถเกิดผลข้างเคียงได้ เช่น หลอดเลือดดำอักเสบบริเวณที่ฉีด เป็นไข้ หนาวสั่น ภาวะไม่สมดุลของเกลือแร่ และพิษต่อไต ทำให้การใช้ยาในการรักษาโรคในระยะยาวเป็นไปได้ยาก โดยการเกิดพิษแบบฉับพลันของยาเกิดจาก

การที่ยาละลายน้ำได้ยากและตกตะกอนได้ง่าย พืชต่อไตของยาจึงเป็นผลข้างเคียงที่ร้ายแรงที่พบได้มากที่สุด และเป็นตัวกำหนดขนาดยา

ระบบนำส่งยาแอมโฟเทอริซิน บี แบบใหม่ ลดการเกิดการอักเสบของหลอดเลือดและพืชต่อไตได้ เนื่องจากจากอัตราการเกิดพิษที่สูงของยาแอมโฟเทอริซิน บี ยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่กระจายตัวแบบคอลลอยด์ (AmB colloid dispersion; ABCD) จึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อลดความเป็นพิษต่อไต ในการศึกษาเปรียบเทียบยาทั้งสองชนิดนี้ พบว่าอุบัติการณ์ในการเกิดพืชต่อไตเป็น 25% ในยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่กระจายตัวแบบคอลลอยด์ และ 49% ในยาแอมโฟเทอริซิน บี (Bowden และ Chandraseker, 2002) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาหนึ่งพบว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ชนิดลิโปโซม (L-AmB) พบอาการข้างเคียงและหนาวสั่นน้อยกว่ายาในรูปแบบสูตรตำรับที่เป็นไขมัน (AmB lipid complex (ABLC)) อย่างมีนัยสำคัญ (24.5% และ 79.5% ตามลำดับ $P < 0.001$) ความเป็นพิษต่อไต นิยามจาก serum creatinine ที่เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นมากกว่า 3 เท่า โดยเกิดขึ้นกับ L-AmB น้อยกว่าประมาณ 20% เมื่อเทียบกับ ABLC ($P < 0.001$) (Wingard และคณะ, 2000) สูตรตำรับที่เป็นไขมันของยาแอมโฟเทอริซิน บี ลดความเป็นพิษต่อไตได้โดยกลไกที่ไม่ทราบแน่ชัด สูตรตำรับที่เป็นลิโปโซมสามารถลดความเป็นพิษและเพิ่มระยะเวลาที่อยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้นโดยการทำให้ pegylation ซึ่งจะเหนี่ยวนำชั้น hydrodynamic บนพื้นผิวของอนุภาคล้อมรอบลิโปโซม การถูกจับกินโดย phagocyte ลดน้อยลง ทำให้อนุภาคอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น (Torrado และคณะ, 2008) สูตรตำรับที่เป็นไขมันเหล่านี้มีอัตราการกำจัดยาออกที่ต่ำ และขนาดยาที่เพิ่มขึ้นของยาแอมโฟเทอริซิน บี อาจทำให้เกิดการสะสมยาในร่างกาย แม้ว่าสูตรตำรับที่เป็นไขมันถูกรายงานว่ามีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ แต่ค่าใช้จ่ายในการรักษาจะสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ AmB-deoxycholate (Herbrecht และคณะ, 2003)

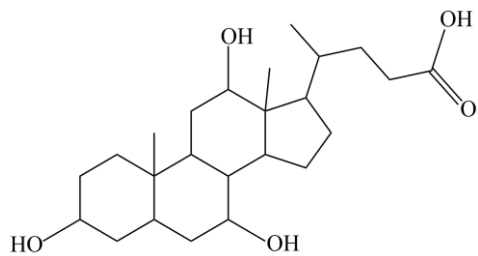
เพื่อแก้ไขข้อด้อยของผลิตภัณฑ์ที่มีการออกจำหน่ายแล้ว ในงานวิจัยจึงได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไขมัน 3 ชนิด คือ sodium deoxycholate sulfate (SDS), potassium cholate (KC), potassium deoxycholate (KDC) และเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของไขมันที่มีการออกจำหน่ายแล้วอีก 2 ชนิด คือ sodium cholate (SC) และ sodium deoxycholate (SDC) โดยโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของไขมัน ได้แสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งทั้งหมดนี้ถูกเลือกให้เป็นสารตัวพาในการตั้งสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี ชนิดผงแห้งสำหรับการรักษาการติดเชื้อราในปอดเป็นรูปแบบยาสูดพ่นชนิด nebulizer และยาฉีด

ผู้วิจัยได้เลือกอนุพันธ์ของไขมัน 5 ชนิดในการศึกษาส่วนประกอบของโครงสร้าง โดยไขมันที่มีหมู่ hydroxyl 2 หมู่ (DCS, KDC, SDC) เปรียบเทียบกับ ไขมันที่มีหมู่ hydroxyl 3 หมู่ (KC, SC) ซึ่งสารเหล่านี้จะสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับแอมโฟเทอริซิน บี แตกต่างกัน SDC ถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุม และ sodium ion ถูกแทนที่ด้วย potassium ion ใน potassium deoxycholate หมู่ carboxylic acid ของ deoxycholic acid ถูก

แทนที่โดยหมู่ sulfonate ใน DCS ซึ่งในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทางเคมีเหล่านี้จะมีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไขมัน

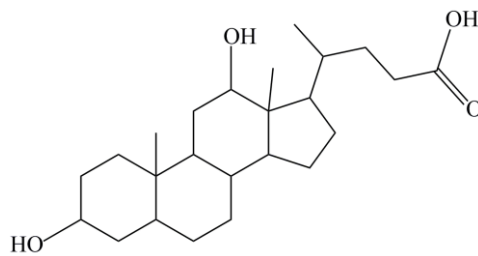
โดยการตั้งสมมติฐานว่า อนุพันธ์ของไขมันในสูตรตำรับแอมโฟเทอรีซิน บี จะเพิ่มประสิทธิภาพและความปลอดภัยของแอมโฟเทอรีซิน บี โดยประสิทธิภาพจะทำการศึกษาโดยการวัด bioactivity ของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี เปรียบเทียบกับยาแอมโฟเทอรีซิน บี เดียว ความปลอดภัยของแอมโฟเทอรีซินบีที่มีอนุพันธ์ของไขมันของยาผงชนิดผสมน้ำก่อนใช้ จะถูกทดสอบเพื่อให้มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์จะไม่เหนียวนำไปเกิดการปลดปล่อยสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบในทางเดินหายใจและจะไม่เหนียวนำไปเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ในทางเดินหายใจที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากข้อจำกัดในการละลายน้ำและความคงตัวของแอมโฟเทอรีซินบี เป้าหมายหลักในงานวิจัย คือ พัฒนาสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบแบบยาผงแห้งชนิดผสมน้ำก่อนใช้ สำหรับฉีดและสูดพ่นแบบละอองฝอย (nebulizer) ที่ละลายน้ำได้ดีและมีความคงตัว ใช้กระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) นอกจากนี้ ทำการประเมินความเป็นพิษและฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของแอมโฟเทอรีซิน บี ที่กักเก็บในอนุภาคไขมันระดับนาโนเมตร ซึ่งถ้าการพัฒนาแอมโฟเทอรีซิน บี ที่กักเก็บในอนุภาคไขมันระดับนาโนเมตรเสร็จสมบูรณ์ จะเป็นประโยชน์ต่อประเทศที่มีสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี ที่มีความปลอดภัยและราคาถูก



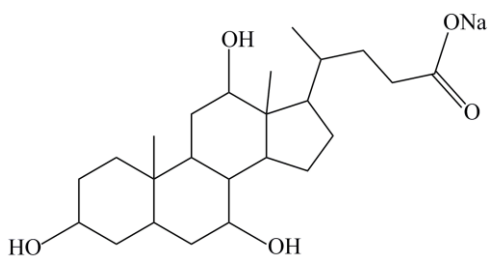
Cholic acid

(A)



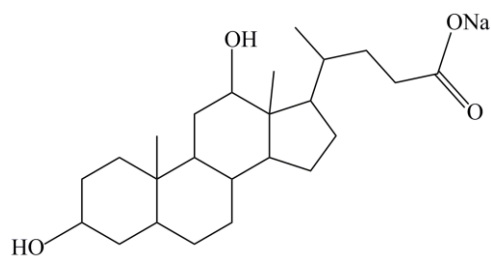
Deoxycholic acid

(B)



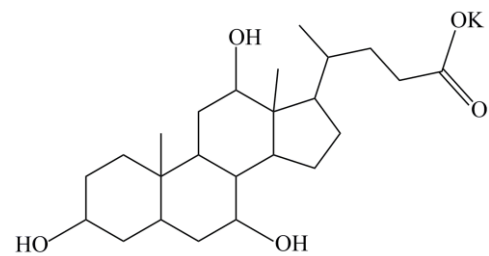
Sodium cholate

(C)



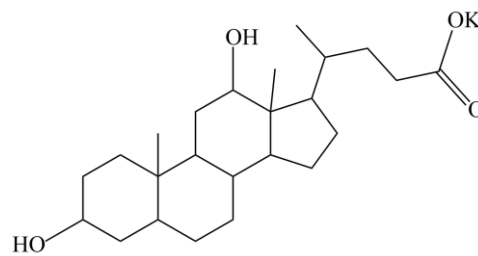
Sodium deoxycholate

(D)



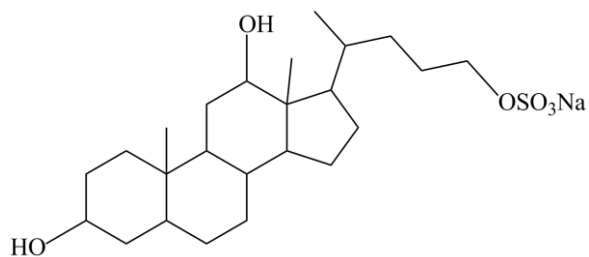
Potassium cholate

(E)



Potassium deoxycholate

(F)



Sodium deoxy cholate sulfate (G)

รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของไขมัน

วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (Sodium deoxycholate sulfate)

ละลายกรดดีออกซีโคลิค 3 กรัม ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น (0.6 มิลลิลิตร) ที่ละลายอยู่ในเมทานอล (50 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นทำการรีฟลักซ์ (reflux) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ นำสารตัวอย่างไปล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่า pH เท่ากับ 7 และทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต จากนั้นนำชั้นของเอทิลอะซิเตตที่มีสารตัวอย่างผสมอยู่มาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous) และกรองด้วยสำลี แล้วกำจัดเอทิลอะซิเตตออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์ (methyl deoxycholate ester) เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองใส นำเมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์ไปทำปฏิกิริยาต่อในขั้นต่อไป โดยเริ่มจากละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 1.2 กรัม ในเตตระไฮโดรฟูแรน 10 มิลลิลิตร พร้อมทั้งกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นค่อยๆ หยดเมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์ 2.5 กรัม ที่ละลายอยู่ในเตตระไฮโดรฟูแรน 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที และรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิประมาณ 65°C เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน จากนั้นปล่อยให้ปฏิกิริยาเย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องก่อนหยด เมทานอล 30 มิลลิลิตร ลงไปในปฏิกิริยาอย่างช้าๆ และทำการรีฟลักซ์ต่อที่อุณหภูมิประมาณ 65°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 2N HCl ปริมาณ 5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ลงไปเพื่อช่วยในการกำจัดน้ำและความชื้นที่เหลือ นำสารตัวอย่างไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารผสมดีออกซีโคลิคแอลกอฮอล์ (deoxycholic alcohol) เป็นของแข็งสีขาวนวล นำสารผสมดีออกซีโคลิคแอลกอฮอล์ไปทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไป (ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้าย) โดยนำสารผสมดีออกซีโคลิคแอลกอฮอล์ 0.68 กรัม ไปละลายในสารละลายผสมไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (DMF) 4 มิลลิลิตร และไดคลอโรมีเทน (DCM) 2 มิลลิลิตร พร้อมทั้งกวนที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นค่อยๆ เติมซัลเฟอร์ไตรออกไซด์ไพริดีนคอมเพล็กซ์ (sulfur trioxide pyridine complex) 0.42 กรัม ทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลาอีก 1 ชั่วโมง หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ให้เติมโซเดียมโบคาร์บอเนตอิ่มตัว 15 มิลลิลิตร ลงในปฏิกิริยา และทำการรีฟลักซ์ต่อ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟตเป็นของแข็งสีขาวนวล

2. การสังเคราะห์โพแทสเซียมโคเลต (Potassium cholate)

ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นพร้อมทั้งกวนจนได้สารละลายใส ค่อยๆ ใส่กรดโคลิคลงไป พร้อมทั้งกวนอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ นำไปใส่กรวยแยกเพื่อนำส่วนที่เป็นสารละลายใสไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 10 นาที แบ่งใส่หลอดพลาสติกเพื่อนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบด้วยเทคนิค FT-IR, NMR, DSC และ MS

3. การสังเคราะห์โพแทสเซียมดีออกซีโคเลต (Potassium deoxycholate)

ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นพร้อมทั้งกวนจนได้สารละลายใส ค่อยๆ ใส่กรดดีออกซีโคเลตลงไปพร้อมทั้งกวนอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ นำไปใส่กรวยแยกเพื่อนำส่วนที่เป็นสารละลายใสไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แบ่งใส่หลอดพลาสติกเพื่อนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบด้วยเทคนิค FT-IR, NMR, DSC และ MS

4. การเตรียมตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS - AmB dry powder)

ชั่งน้ำหนักโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) และผงยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmB) อย่างถูกต้องแม่นยำในอัตราส่วนโมล 2:1 โดยละลายโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟตในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.2 โมลาร์) ผสมอยู่ 2.7 มิลลิลิตร เมื่อโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟตละลายอย่างสมบูรณ์ จึงค่อยๆ โปรยยาแอมโฟเทอริซิน บี ลงไปอย่างช้าๆ และคนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสารละลายจนได้สารละลายใส จึงปรับความเป็นกรด เบส เท่ากับ 7.4 ด้วยกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขั้นตอนสุดท้าย และแบ่งใส่ภาชนะเพื่อใช้สำหรับการทำสารให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) จะได้ตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS - AmB) ส่วนตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC - AmB) นั้นก็เตรียมเช่นเดียวกันในอัตราส่วนเท่ากันกับสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต

5. การประเมินลักษณะของยาผงแห้งของตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน

5.1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาแอมโฟเทอริซิน บี อนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ และสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ ที่ได้จากการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) เตรียมตัวอย่างโดยบดตัวอย่างปริมาณเล็กน้อย (0.5-1.0 mg) ให้ละเอียด ผสมกับ KBr ประมาณ 100 mg ในโถรงบดสาร และบดสารให้ละเอียดโดยให้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ใส่ตัวอย่างที่บดแล้วลงในแม่พิมพ์ และนำไปอัดด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิกความดันประมาณ 10 ตัน นาน 30 วินาที จะได้ตัวอย่างเป็นแผ่นวงกลมใส นำตัวอย่างเข้าเครื่อง FT-IR วัดอินฟราเรดสเปกตรัมในช่วงความถี่ $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$

5.2 Nuclear magnetic resonance (NMR)

ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ เมทิลดีออกซีโคเลสเตเอสเทอร์, ดีออกซีโคลิค แอลกอฮอล์ และโซเดียมดีออกซีโคเลสเตซัลเฟต เตรียมตัวอย่างโดยละลายสารตัวอย่างด้วย deuterated Dimethyl sulfoxide (Dimethyl sulfoxide-D6) ดูดสารตัวอย่างใส่ในหลอด NMR ที่สะอาด ประมาณ 0.7 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วพันด้วยพาราฟิน 2 รอบ

5.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

ศึกษาลักษณะพื้นผิวอนุภาคของยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmB) โซเดียมดีออกซีโคเลสเต (SDC) สูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลสเต (SDC - AmB) โซเดียมดีออกซีโคเลสเตซัลเฟต (SDS) และสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลสเตซัลเฟต (SDS - AmB) ที่เตรียมได้ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM), Quanta 400, FEI, Czech Republic โดยโปรยตัวอย่างให้แผ่บาง ๆ เป็นชั้นเดียวบน stub ทองเหลืองซึ่งปิดด้วยเทปกาวสองหน้า แล้วเคลือบผิวอนุภาคด้วยทองคำ หนาประมาณ 15-20 nm ก่อนทำการส่องดูขนาดและการจัดเรียงตัวของอนุภาคที่กำลังขยาย 300, 1,000 และ 10,000 เท่า

5.4 ศึกษาคุณสมบัติทางความร้อน ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC)

ศึกษาคุณสมบัติทางความร้อน (thermal behavior) ของผงยา และตำรับยาสูตรต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักผงยาประมาณ 2 มิลลิกรัม บรรจุใน aluminium pan พร้อมทั้งปิดฝาให้สนิท วัดการเปลี่ยนแปลงพลังงานความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 25 °C – 250 °C ใช้ Heating rate 10°C/min ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC)

5.5. ศึกษาคุณสมบัติทางแอโรโซลของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน

ละลายสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน (SDS-AmB และ SDC-AmB) 50 มิลลิกรัม (มีตัวยาแอมโฟเทอริซิน บี 25 มิลลิกรัม) ด้วยน้ำกลั่น (ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน) 6 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของยาแอมโฟเทอริซิน บี เท่ากับ 4 mg/mL เพื่อนำไปใช้ในการทำเนบิวไลเซอร์ (Nebulization) โดยนำสารละลายที่ได้ 6 มิลลิลิตร ใส่ลงใน jet-nebulizer (Westmed Inc., Arizona, USA) ที่ต่ออยู่กับถังแก๊สไนโตรเจน พร้อมทั้งปล่อยแก๊สไนโตรเจนด้วยอัตราการไหล 8 ลิตร/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ jet-nebulizer ไปต่อกับ Andersen Cascade Impactor (ACI), (Atlanta, GA, USA) (ในการทดลองนี้ได้ใช้ ACI ทั้งหมด 8 ชั้น คือ stage -0, stage 1, stage 2, stage 3, stage 4, stage 5, stage 6 และ stage 7) โดยความเร็วลมที่ใช้ในการวัด เท่ากับ 28.3 ลิตร/นาที เป็นเวลา 2 นาที คำนวณขนาดอนุภาคที่วัดได้ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นอากาศ (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD) (แต่ละสูตร

ตำรับได้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) ซะผงยาที่ค้ำบนแต่ละส่วนของ ACI ด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:9 ปริมาตร/ปริมาตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนครบ กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ขวด vial จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาโดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสมของระบบ ดังนี้

1. HPLC column : microbondapak C18 column (Phenomenex[®], USA) (150 x 4.6 mm i.d., 5 μ m)
2. Mobile phase : Acetate buffer (20 mM, pH 7.2) : Acetonitrile ในอัตราส่วน 60:40 v/v
3. Flow rate : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
4. UV wavelength : 405 nm
5. Injection volume : 50 ไมโครลิตร

6. การศึกษาความคงตัวทางกายภาพ (Physical stability)

6.1 ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของยาผงแห้งสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน ที่ระยะเวลาต่างๆ (เก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน)

เตรียมยาผงแห้งสูตรตำรับต่างๆ คือ SC-AmB, SDC-AmB, KC-AmB, KDC-AmB และ SDS - AmB นำไปวัดขนาดอนุภาค (Particle size) และค่าศักย์ซีต้า (Zeta potential) ที่ระยะเวลาในการเก็บ 1, 3, 5 และ 7 วัน

6.2 ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของยาผงแห้งสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน หลังเก็บไว้เป็นเวลา 6 เดือน

เตรียมยาผงแห้งสูตรตำรับต่างๆ คือ SDS - AmB, SDC - AmB และ KDC - AmB อย่างละ 3 ชุด โดยชุดที่ 1 วางไว้ในโถดูดความชื้น ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 30 ± 3 °C เป็นเวลา 6 เดือน ชุดที่ 2 วางไว้ในตู้เย็น ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 2-4 °C เป็นเวลา 6 เดือนเช่นกัน และเตรียมชุดที่ 3 เพื่อนำไปวัดขนาดอนุภาค (Particle size) และค่าศักย์ซีต้า (Zeta potential) พร้อมทั้งคำนวณปริมาณยา (Drug content, %) เปรียบเทียบกับชุดที่ 1 และ 2

7. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

- 1) Alveolar macrophage NR8383 cell line, Rat (NR8383)

เพาะเลี้ยงเซลล์ Alveolar macrophage NR8383 cell line, Rat (NR8383) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Ham's F12K medium ซึ่ง supplement ด้วย 2 mM L-glutamine, 20% fetal bovine serum (FBS),

สารละลายยาเพนนิซิลลิน 50 units/mL และสเตอโรอิดมัซซิง 50 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ และ ความชื้น 95% humidity incubator

2) Human lung adenocarcinoma cell line (A549)

เพาะเลี้ยงเซลล์ Human lung adenocarcinoma cell line (ATCC CCL-185) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ F12K ซึ่ง supplement ด้วย 4 mM L - glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), สารละลายยาเพนนิซิลลิน 50 units/mL และสเตอโรอิดมัซซิง 50 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ และ ความชื้น 95% humidity incubator

3) Human bronchial epithelial cells line (Calu-3)

เพาะเลี้ยงเซลล์ Human lung adenocarcinoma cell line (bronchial epithelial cells) (ATCC HTB-55) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum essential medium (Eagle) ซึ่ง supplement ด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) และสารละลายยาเพนนิซิลลิน 50 units/mL และสเตอโรอิดมัซซิง 50 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ และ ความชื้น 95% humidity incubator

4) Human Embryonic Kidney 293 cells line (293T/17)

เพาะเลี้ยงเซลล์ Human Embryonic Kidney 293 cells line (ATCC CCL-185) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ซึ่ง supplement ด้วย 4 mM L - glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), สารละลายยาเพนนิซิลลิน 50 units/mL และสเตอโรอิดมัซซิง 50 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ และ ความชื้น 95% humidity incubator

7.2 การเตรียมความเข้มข้นของยาและตำรับ

เตรียมยา ตำรับ และตัวพา (อนุพันธ์ของไขมัน) โดยการละลายยากับ DMSO ตำรับและตัวพากับ น้ำที่ปราศจากเชื้อ แล้วกรองด้วยตัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.25 ไมครอน จากนั้นทำการเจือจางยา ตำรับ และตัวพา ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยความเข้มข้นของตัวยาและตำรับที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 1-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนตัวพาความเข้มข้นในการทดสอบอยู่ในช่วง 1-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.3 ทดสอบความเป็นพิษของสูตรตำรับต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยวิธี MTT assay

1) เพาะเลี้ยงเซลล์ NR8383, A549, Calu-3 และ 293T/17 ให้มีความหนาแน่น 1×10^5 Cell/mL ปริมาตรหลุมละ 100 µL ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ และ ความชื้น 95% humidity incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) จำนวนหนึ่งครั้ง จากนั้นเติมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปหลุมละ 100 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ ไว้ 24 ชั่วโมง

3) ดูดสารละลายในสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) จำนวนหนึ่งครั้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปหลุมละ 100 μ L แล้วเติมสารละลาย MTT ปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 5 mg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ ไว้ 4 ชั่วโมง

4) ล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเติม DMSO ลงไปหลุมละ 100 μ L นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ภายใน 1 ชั่วโมง หลังจากเติม DMSO

5) นำค่า OD ที่ได้ คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (%Viability) เทียบกับ untreated control

8. การทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis)

8.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง

1) นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้มาจากมนุษย์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่ pH 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3) จากนั้นดูส่วนใสทิ้งแล้วทำซ้ำตามข้อที่ 1) และ 2) อีก 2 ครั้ง

8.2 การศึกษาการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง

1) นำสารละลายยาแอมโฟเทอริซิน บี และสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีอนุพันธ์ของไขมัน (SDC-AmB และ SDS-AmB) ที่ความเข้มข้น 1, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงปริมาตร 100 ไมโครลิตร

2) นำตัวอย่างจากการทดลองข้อที่ 1 บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้สารละลาย PBS ที่ pH 7.4 เป็น negative control และใช้ 1% Triton X-100 เป็น positive control ซึ่งจะเกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง 100 เปอร์เซ็นต์

3) ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4) คำนวณ %Hemolysis ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังแสดงในสมการด้านล่าง

$$\%Hemolysis = (A_{\text{sample}} - A_{\text{negative control}}) / (A_{\text{positive control}} - A_{\text{negative control}})$$

9. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อราโดยวิธี Broth dilution method

9.1 เลี้ยงเชื้อรา *C. neoformans* ATCC 90113 และ *C. albicans* ATCC 90028 ในอาหารเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

9.2 นำเชื้อราที่ได้จากข้อที่ 9.1 มาปรับความขุ่นของเชื้อให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^6 CFU/ml ด้วยสารละลาย PBS

9.3 เติมสารละลายยาแอมโฟเทอริซิน บี และสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี (SDC-AmB และ SDS-AmB) ที่ความเข้มข้น 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 และ 0.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม

9.4 เติมเชื้อที่เตรียมได้จากข้อที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ในข้อที่ 9.3 จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวบ่มเพาะที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

9.5 หาค่า MIC (Minimum Inhibition Concentration) ของสารละลายยาแอมโฟเทอริซิน บี และสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี (SDC-AmB และ SDS-AmB)

9.6 หาค่า MFC (Minimum Fungicidal Concentration) ของสารละลายยาแอมโฟเทอริซิน บี และสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี (SDC-AmB และ SDS-AmB) โดยเทียบเชื้อที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่างมีค่า MIC ลงไป streak ลงบนอาหารแข็ง Sabouraud Dextrose Broth (SDA) จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวบ่มเพาะที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มเพาะความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้เป็นค่า MFC

10. การศึกษาหาค่าความแรงของยาแอมโฟเทอริซิน บี และสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน (SDC-AmB และ SDS-AmB)

10.1 วิธีการเตรียมเชื้อรา

1) เลี้ยงเชื้อรา *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, ATCC 9763) ในอาหารเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ในข้อ 1 ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Difco, USA) ซึ่งได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml จากนั้นดูดเชื้อ 1

เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว (10 มิลลิลิตร) ผสมกับอาหารแข็ง antibiotic medium (100 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3) ดูดเชื้อที่ผสมกับอาหารคิดเป็นปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^7 CFU/ml ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง SDA เตรียมไว้

10.2 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานของยาแอมโฟเทอริซิน บี และสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน (SDC-AmB และ SDS-AmB)

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานของยาแอมโฟเทอริซิน บี ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DMSO แล้วนำไปเจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้น 12.8, 16, 20, 25 และ 31.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย DMSO จากนั้นเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.64, 0.8, 1, 1.25 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 0.2 M Phosphate buffer pH 10.5

2) เตรียมสูตรตำรับของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย 0.2 M Phosphate buffer pH 10.5

3) การวิเคราะห์

1. แบ่งจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ออกเป็น 5 ชุดๆ ละ 3 จาน แล้ววาง cylinder cup บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 6 อัน

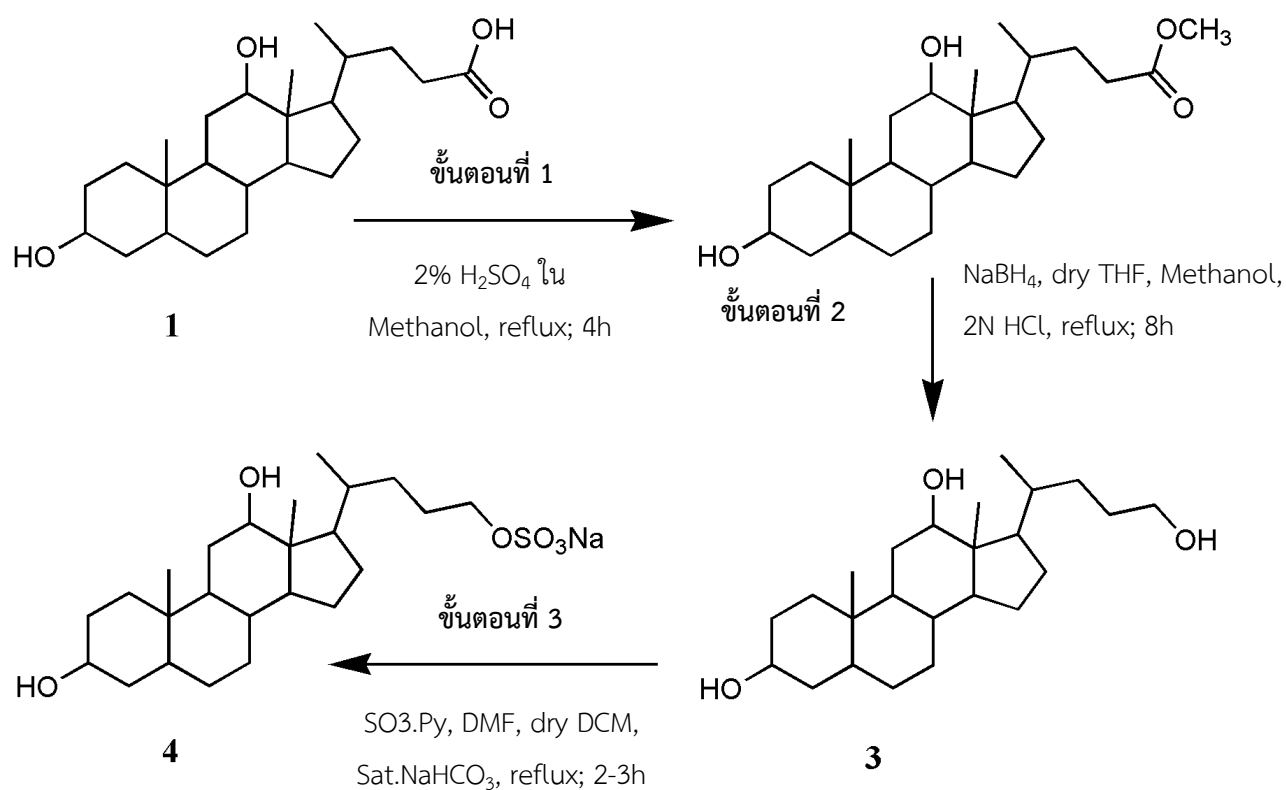
2. ใส่สารละลายมาตรฐานของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่เตรียมไว้ลงใน cylinder cup หลุมละ 300 ไมโครลิตร โดยจานเพาะเลี้ยงเชื้อชุดที่ 1 ใส่สารละลายมาตรฐานของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (S3) สลับกับสารละลายมาตรฐานของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 0.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (S1) จานเพาะเชื้อชุดที่ 2, 3, 4 และ 5 ใส่สารละลายมาตรฐานของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (S3) สลับกับสารละลายมาตรฐานของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 0.8 (S2), 1.25 (S3), 1.56 (S4) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายสูตรตำรับของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (U) จำนวน 3 จาน

3. จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของโซนใส จากนั้นคำนวณหาค่าขนาดของโซนใสที่แท้จริงและคำนวณความเข้มข้นของยาจากกราฟมาตรฐาน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของไขมัน (โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (Sodium deoxycholate sulfate, SDS))

หลังจากทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไขมันโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต โดยใช้สารตั้งต้นคือ กรดดีออกซีโคลิค (1) จะมีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 3 ชนิด ได้แก่ เมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์ (Methyl deoxycholate ester) (2), ดีออกซีโคลิคแอลกอฮอล์ (Deoxycholic alcohol) (3) และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (Sodium deoxycholate sulfate) (4) ตามลำดับ ซึ่งได้แสดงลักษณะโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 3

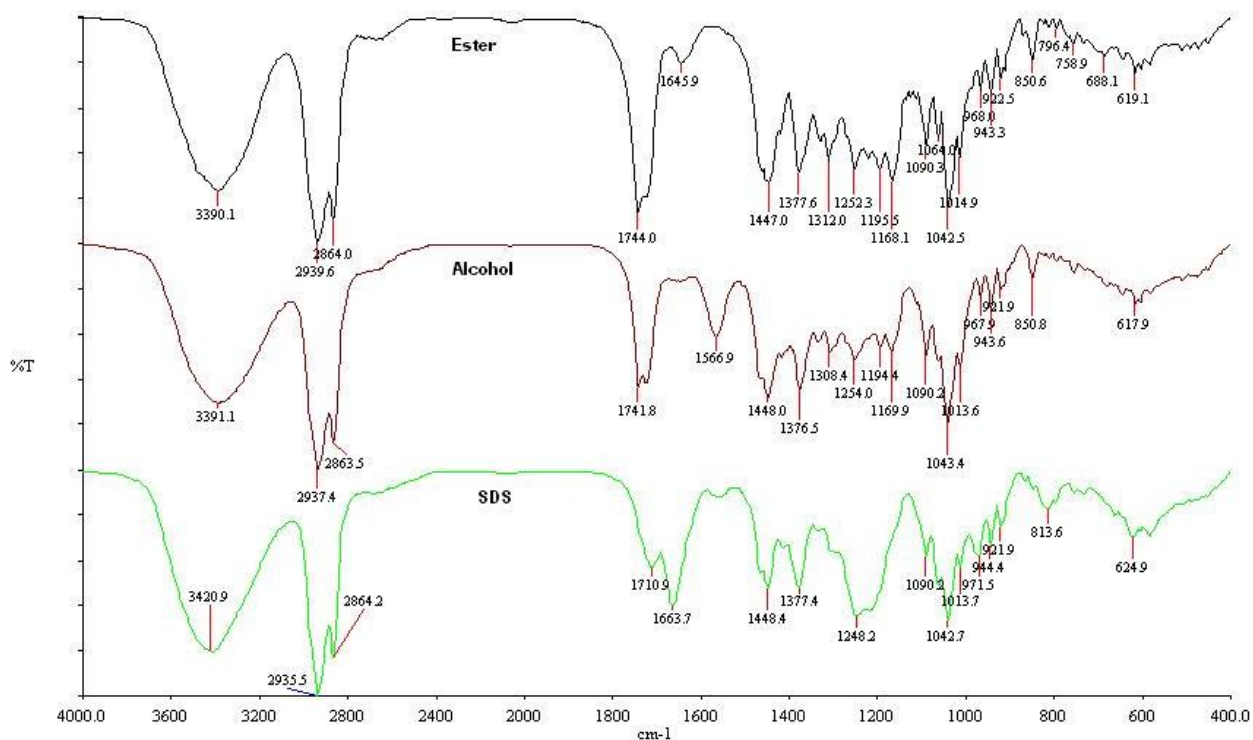


รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้น (กรดดีออกซีโคลิค) (1) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไขมัน (เมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์ (Methyl deoxycholate ester) (2), ดีออกซีโคลิคแอลกอฮอล์ (Deoxycholic alcohol) (3) และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (Sodium deoxycholate sulfate) (4))

2. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี และอนุพันธ์ของไขมัน

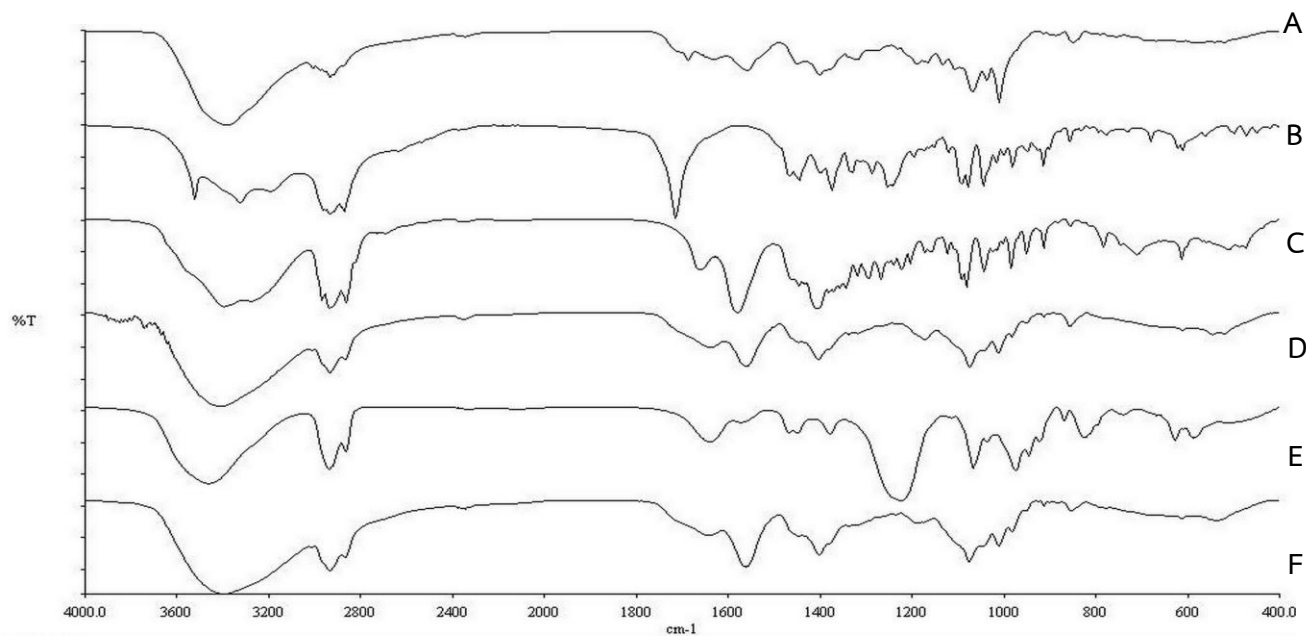
2.1 ผลการศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR)

จากการศึกษาอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (FT-IR) ของสารตัวอย่างที่ได้จากการสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (Sodium deoxycholate sulfate, SDS) ที่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 3 ตัว ได้แก่ เมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์ ดีออกซีโคลิคแอลกอฮอล์ และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต ตามลำดับ ที่ความถี่ (wave number) ตั้งแต่ $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ได้แสดง IR spectrum ดังรูปที่ 4

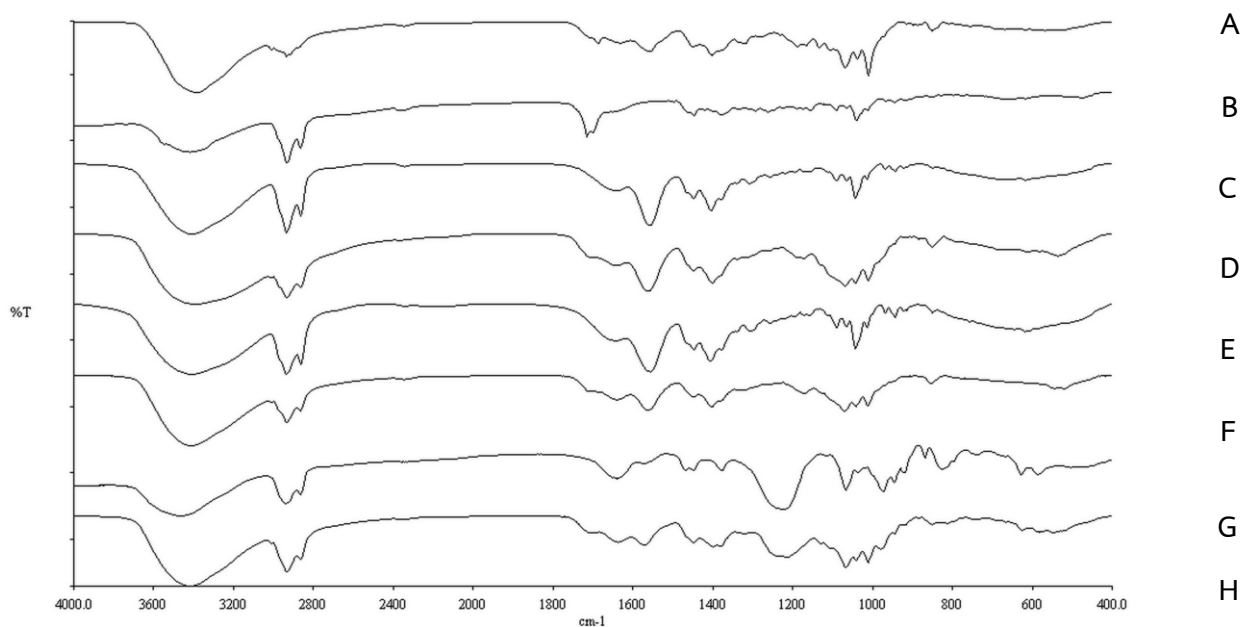


รูปที่ 4 IR spectrum ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต

จากการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (เอสเทอร์ แอลกอฮอล์ และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต) พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ตัว ได้ปรากฏการดูดกลืนของ O-H stretching, C=O stretching และ C-O stretching ที่ตำแหน่งเลขคลื่นในช่วง $3420-3390 \text{ cm}^{-1}$, $1744-1710 \text{ cm}^{-1}$ และในช่วง $1043-1042 \text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่คาร์บอนิล ที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ 1700 cm^{-1} มีการดูดกลืนลดลง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสังเคราะห์ในขั้นที่ 1 (ขั้นตอนการสังเคราะห์ให้เป็นเอสเทอร์)



รูปที่ 5 FT-IR spectrum ของยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmB) (A), โคลิเคอซิด (CA) (B), โซเดียมโคเลต (SC) (C), สูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมโคเลต (AmB-SC) (D), โพแทสเซียมโคเลต (KC) (E) และสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กับโพแทสเซียมโคเลต (AmB-KC) (F)



รูปที่ 6 FT-IR spectrum ของยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmB) (A), ด็อกซีโคลิเคอซิด (DCA) (B), โพแทสเซียมด็อกซีโคเลต (KDC) (C), สูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กับโพแทสเซียมด็อกซีโคเลต (AmB-KDC) (D), โซเดียมด็อกซีโคเลต (SDC) (E), สูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมด็อกซีโคเลต (AmB-SDC) (F), โซเดียมด็อกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) (G) และสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมด็อกซีโคเลตซัลเฟต (AmB-SDS) (H)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmB) เดี่ยวๆ กับอนุพันธ์ของไขมัน ด้วยเทคนิค FT-IR ดังรูปที่ 5 และ 6 พบว่า FT-IR spectrum ของยาแอมโฟเทอริซิน บี อนุพันธ์ของไขมัน และสูตรตำรับ มีเลขคลื่นตรงกัน ในทุกตำแหน่ง ทุกตำรับ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์ของไขมัน (SDC และ SDS) ที่นำมาใช้ในสูตรตำรับ ไม่ส่งผลให้ไม่เกิดการเปลี่ยนโครงสร้าง รูปร่าง หรือเกิดหมู่แทนที่ในตำแหน่งต่างๆ ของยา ส่งผลให้ยาสามารถออกฤทธิ์ได้เหมือนเดิม

2.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) โดยใช้เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

หลังจากศึกษาเพื่อยืนยันผลด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) ว่าสารสังเคราะห์ที่ได้มี functional group ถูกต้องแล้ว จึงนำสารไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) เพื่อหาจำนวนโปรตอน (H) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าเคมีคัลชิฟต์ (chemical shift) ของสัญญาณโปรตอนของสารที่ได้จากการสังเคราะห์

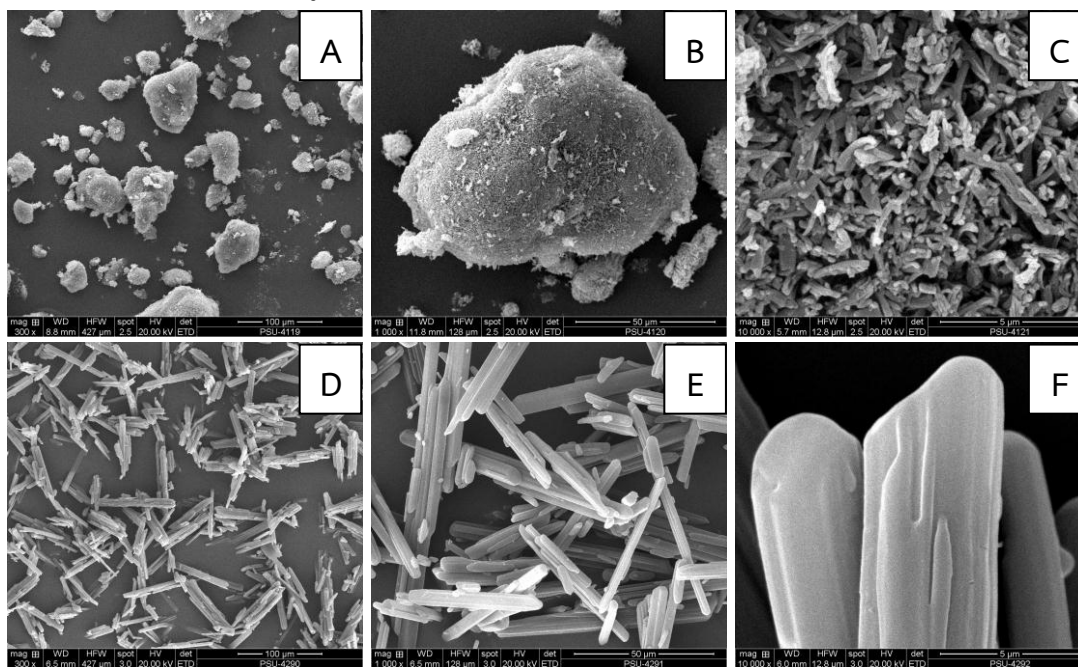
ตำแหน่ง	เมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์		ดีออกซีโคลิค แอลกอฮอล์		โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต	
	ค่าเคมีคัลชิฟต์ (δ, ppm)	ประเภทของโปรตอน	ค่าเคมีคัลชิฟต์ (δ, ppm)	ประเภทของโปรตอน	ค่าเคมีคัลชิฟต์ (δ, ppm)	ประเภทของโปรตอน
18	0.75	3H(s), -CH ₃	0.63	3H(s), -CH ₃	0.60	3H(s), -CH ₃
19	0.90	3H(s), -CH ₃	0.85	3H(s), -CH ₃	0.85	3H(s), -CH ₃
21	0.95	3H(d), -CH ₃	0.95	3H(d), -CH ₃	0.95	3H(d), -CH ₃
-	1.0-2.0	24H (m)	1.0-2.0	26H (m)	1.0-1.9	24H(m)
-	2.40	2H(t), -CO-CH ₂ -	2.50	Br(s), -OH	3.6-3.75	1H(m)
-	3.59-3.65	1H(m), -OCH-	3.2-3.4	1H(m)	3.8	2H(t)
-	3.67-3.7	3H, -OCH ₃	4.25	1H(t)	4.25	2H(t)
-	3.95-4.0	1H(d), -12-OCH-	4.35	2H(t)		

จาก ¹H-NMR สเปกตรัมแสดงค่าเคมีคัลชิฟต์ของโปรตอนที่อยู่ ณ ตำแหน่งต่างๆ บนโครงสร้างของเมทิลดีออกซีโคเลตเอสเทอร์ ดีออกซีโคลิค แอลกอฮอล์ และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต ซึ่งค่า chemical shift

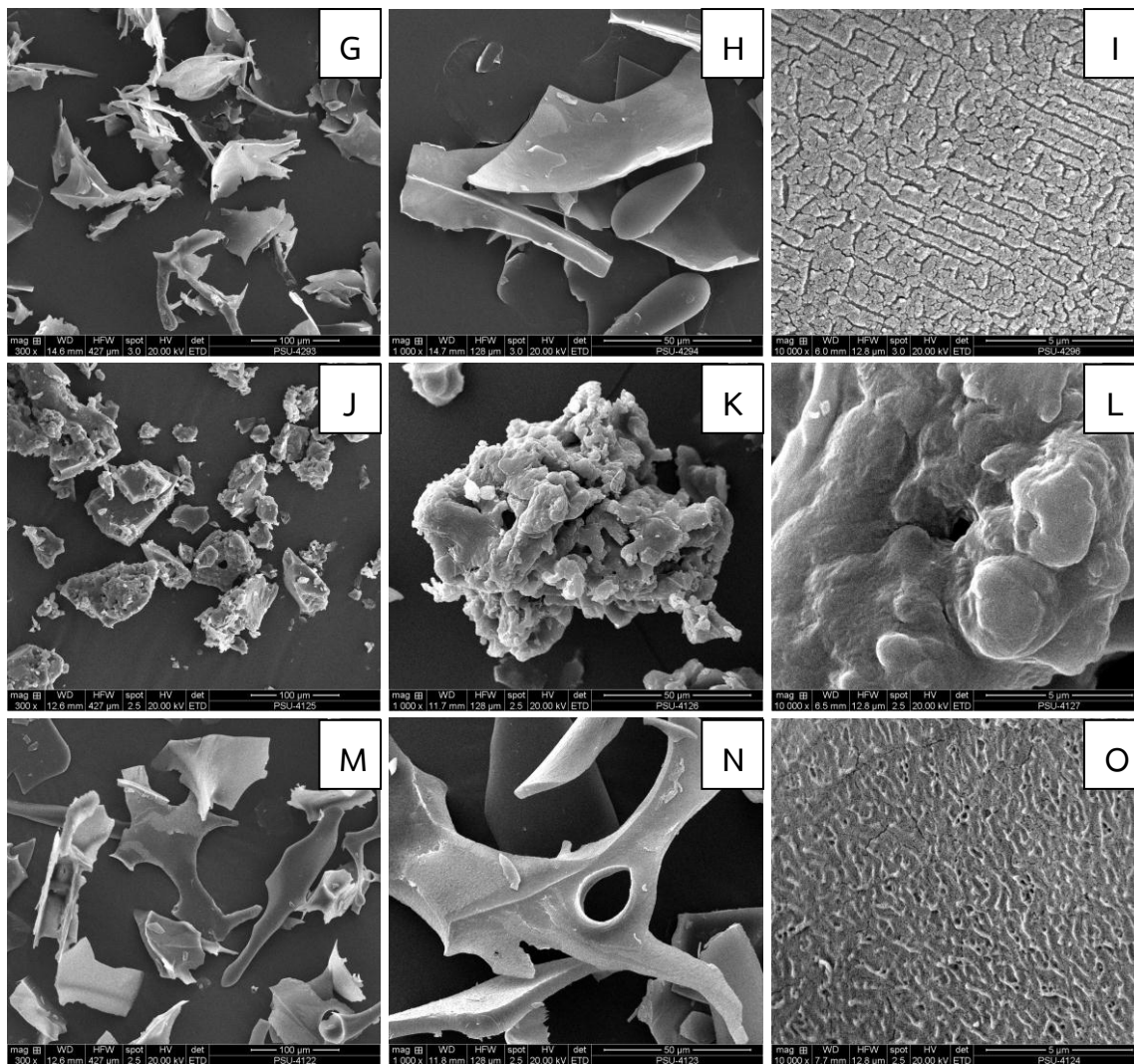
ดังกล่าวจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของโปรตอนชนิดนั้นๆ โดยตำแหน่งที่ 18 มีค่าเคมีคัลซิฟต์ของเมทิลดีออกซีโคเลสเตเอสเทอร์, ดีออกซีโคลิค แอลกอฮอล์ และโซเดียมดีออกซีโคเลสเตซัลเฟต เท่ากับ 0.75, 0.63 และ 0.60 ตามลำดับ ตำแหน่งที่ 19 มีค่าเคมีคัลซิฟต์ของเมทิลดีออกซีโคเลสเตเอสเทอร์ ดีออกซีโคลิค แอลกอฮอล์ และโซเดียมดีออกซีโคเลสเตซัลเฟต เท่ากับ 0.90, 0.85 และ 0.85 ตามลำดับ และที่ตำแหน่งที่ 21 มีค่าเคมีคัลซิฟต์ของเมทิลดีออกซีโคเลสเตเอสเทอร์ ดีออกซีโคลิค แอลกอฮอล์ และโซเดียมดีออกซีโคเลสเตซัลเฟต เท่ากัน ซึ่งเท่ากับ 0.95 เนื่องจากมีสภาวะแวดล้อมเช่นเดียวกัน

2.3 ศึกษาลักษณะพื้นผิวและการกระจายอนุภาคของยาแอมโฟเทอรีซิน บี และตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวอนุภาคของยาแอมโฟเทอรีซิน บี และตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมันที่เตรียมได้ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM), Quanta 400, FEI, Czech Republic เพื่อดูขนาดและการจัดเรียงตัวของอนุภาคที่กำลังขยาย 500, 3500 และ 10000 เท่า พบว่ามีการกระจายตัวที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 7



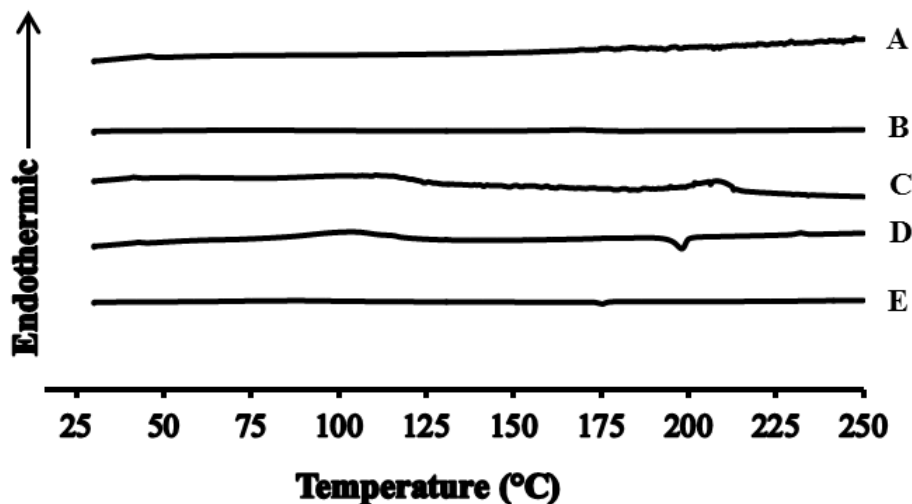
รูปที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 500, 3500 และ 10000 เท่าของยาแอมโฟเทอรีซิน บี (AmB) (รูปที่ 7 A-C), SDC (รูปที่ 7 D-F), SDC-AmB (รูปที่ 7 G-I) SDS (รูปที่ 7 J-L) และ SDS-AmB (รูปที่ 7 M-O)



รูปที่ 7 (ต่อ) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 500, 3500 และ 10000 เท่า ของยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmB) (รูปที่ 7 A-C), SDC (รูปที่ 7 D-F), SDC-AmB (รูปที่ 7 G-I) SDS (รูปที่ 7 J-L) และ SDS-AmB (รูปที่ 7 M-O)

2.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลต ซัลเฟต (SDS) และตำรับยาผงแห้ง ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางความร้อน (thermal behavior) ของผงยา อนุพันธ์ของไขมัน และตำรับยา วัดการเปลี่ยนแปลงพลังงานความร้อนที่อุณหภูมิ ในช่วง 25 °C – 250 °C ใช้ Heating rate 10°C/min ได้ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 DSC thermograms ของตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี SDC-AmB (A) และ SDS-AmB (B) ยาแอมโฟเทอริซิน บี (C) และอนุพันธ์ของไขมัน SDC (D) และ SDS (E)

จาก DSC thermograms ของตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี 2 ตำรับ คือ SDC-AmB และ SDS-AmB ยาแอมโฟเทอริซิน บี เดียว และอนุพันธ์ของไขมัน 2 ชนิด ได้แก่ SDC และ SDS ดังแสดงในรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 25-250 °C ด้วยอัตรา 10 °C/min ยาแอมโฟเทอริซิน บี มีการดูดพลังงานความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 203 °C โดยมีค่า enthalpy ประมาณ 47.13 J/g (รูปที่ 8C) ในขณะที่ SDC เกิดการคายพลังงานที่อุณหภูมิประมาณ 194 °C และมีค่า enthalpy ประมาณ 35.27 J/g (รูปที่ 8D) เมื่อนำอนุพันธ์ของไขมันไปใส่ในสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กลับพบว่าไม่เกิดการดูดหรือการคายพลังงาน (รูปที่ 8A-8B) แสดงให้เห็นว่าหลังจาก SDC และ SDS เกิดปฏิกิริยากับยาแอมโฟเทอริซิน บี แล้ว อาจเกิดเป็นสารใหม่ที่น่าสนใจ

2.5 ผลการศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไขมันที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยใช้ Hot stage polarized light microscope (PLM)

จากการศึกษาคุณสมบัติการกระเจิงแสงของสาร โดยใช้ hot stage polarized light microscope พบว่าการเปลี่ยนแปลงสภาพของผลึกเหลวจะให้รูปร่าง/ลักษณะการกระเจิงแสงที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของสารก่อนและหลังการให้ความร้อน โดยก่อนการให้ความร้อนจะมีลักษณะเป็นผงสีขาวและสีเหลือง เมื่อนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Polarized light Microscope (PLM) พบว่าผลึกมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน มีสีเหลือง สีขาว ที่แตกต่างกันไป และเมื่อมีการให้ความร้อนจนกระทั่งผลึกหลอมละลายจะได้สารละลายที่มีลักษณะเป็นสีต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของสารนั้น และเมื่อปล่อยให้สารละลายตกผลึกกลับมา พบว่าผลึกจะมีการจัดเรียงตัวใหม่ที่เป็นระเบียบมากยิ่งขึ้น ทำให้สามารถเห็นลักษณะผลึกได้ชัดเจนยิ่งขึ้น มีสีสันแตกต่างกันออกไป

แต่ผลึกของสารบางตัว เช่น ยาแอมโฟเทอริซิน บี และสูตรตำรับต่างๆ เป็นต้น ที่เกิดการสลายตัว (decompose) ไม่สามารถตกผลึกกลับมาได้อีกครั้ง ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะของยาแอมโฟเทอริซิน บี และอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ ก่อนและหลังให้ความร้อน โดยใช้ Hot stage polarized light microscope (PLM)

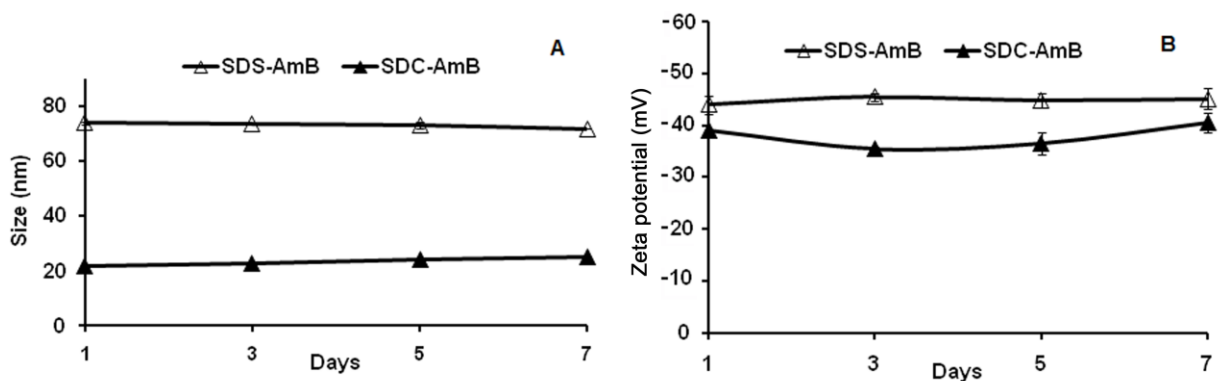
สารตัวอย่าง/สูตรตำรับ	ลักษณะก่อนให้ความร้อน (อุณหภูมิห้อง, 30°C)	ลักษณะหลังจากให้ความร้อน
(A) ยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmB)	ผงสีน้ำตาลอมส้ม	เกิด Decompose ที่อุณหภูมิ 173-175°C
(B) โซเดียมโคเลต (SC)	ผงสีขาว	เกิดผลึกหลังจากปล่อยให้เย็นตัว ที่อุณหภูมิห้อง 30°C
(C) โซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC)	ผงสีขาว	เริ่มเกิดผลึกที่อุณหภูมิ 185°C
(D) โพแทสเซียมโคเลต(KC)	ผงสีขาว	เกิด Decompose ที่อุณหภูมิมากกว่า 350°C
(E) โพแทสเซียมดีออกซีโคเลต (KDC)	ผงสีขาว	เกิด Decompose ที่อุณหภูมิ 340-350°C
(F) โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS)	ผงสีขาว	เกิดการหลอมที่อุณหภูมิ 173.5-174.8°C
(G) สูตรตำรับ AmB-SC	ผงสีเหลืองส้ม	เกิด Decompose ที่อุณหภูมิ 185°C
(H) สูตรตำรับ AmB-SDC	ผงสีเหลืองส้ม	เกิด Decompose บางส่วน ที่อุณหภูมิ 152.5°C
(I) สูตรตำรับ AmB-KC	ผงสีเหลืองส้ม	เกิด Decompose ที่อุณหภูมิ 200°C
(J) สูตรตำรับ AmB-KDC	ผงสีเหลืองส้ม	เกิด Decompose ที่อุณหภูมิ 175.6°C
(K) สูตรตำรับ AmB-SDS	ผงสีเหลืองส้ม	เกิด Decompose บางส่วน ที่อุณหภูมิ 180°C
(L) สูตรตำรับ Fungizone® (AmB-KDC ทางการค้า)	ผงสีเหลืองส้ม	เกิด Decompose ที่อุณหภูมิมากกว่า 300°C

3. ความคงตัวของกายภาพ (Physical stability)

ตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง น้ำหนักเบา มาก สามารถไหลได้อย่างอิสระ สามารถละลายน้ำได้สูงและเมื่อละลายแล้วจะได้สารละลายสีเหลืองใส (Gharib และคณะ, 2011)

3.1 ผลการศึกษาขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า ในเบื้องต้น

เมื่อนำสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ ไปวิเคราะห์หาขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้า พร้อมทั้งศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับในระหว่างการเก็บ โดยวัดที่ระยะเวลาเก็บ 1, 3, 5 และ 7 วัน ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS โดยใช้เทคนิคการกระเจิงของแสงแบบพลวัต (ความเข้มข้นของยาแอมโฟเทอรีซิน บี 10 mg/mL) แสดงได้ดังตารางที่ 3 และได้เปรียบเทียบขนาดอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าของสูตรตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโฟเทอรีซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS-AmB) และสูตรตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโฟเทอรีซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC-AmB) ดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าขนาดของอนุภาคมีลักษณะที่เหมือนกันและมีความคงตัวที่ดี สำหรับค่าของศักย์ซีต้า เป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าในระบบคอลลอยด์มีความคงตัวมากน้อยเพียงใด ซึ่งจากสูตรตำรับของ SDS-AmB ที่กระจายตัวอยู่ในน้ำ มีค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -45.53 มิลลิโวลต์ อย่างไรก็ตาม ถ้าค่าศักย์ซีต้ามีน้อยหรือมีค่าต่ำ จะแสดงให้เห็นว่าจะไม่มีแรงในการทำให้อนุภาคเกิดการจับตัวกัน และค่าศักย์ซีต้ายังแสดงให้เห็นว่าอนุภาคทั้งหมดได้กระจายอย่างสม่ำเสมอและเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย อาจเป็นเพราะอนุพันธ์ของไขมัน ในสูตรตำรับ SDS-AmB มีประจุลบสูง (Legend และคณะ, 1992) (-45.537 มิลลิโวลต์) สูตรตำรับที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 59 mM และมีค่า pH อยู่ในช่วง 7.4-7.8



รูปที่ 9 ขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า ของสูตรตำรับแอมโฟเทอรีซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS-AmB) และสูตรตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโฟเทอรีซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC-AmB)

ตารางที่ 3 ขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า ของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน ชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ

วัน	ตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ									
	ขนาดอนุภาค (Particle size) (nm)					ค่าศักย์ซีต้า (Zeta potential) (-mV)				
	SC- AmB	SDC- AmB	KC- AmB	KDC- AmB	SDS- AmB	SC- AmB	SDC- AmB	KC- AmB	KDC- AmB	SDS- AmB
1	28.78 ±0.99	21.76 ±0.57	51.87 ±0.06	17.21 ±0.25	73.85 ±0.49	-32.73 ±1.88	-39.17 ±0.06	-33.77 ±1.17	-38.73 ±1.85	-43.97 ±1.76
3	30.17 ±0.59	22.87 ±0.16	47.54 ±1.00	20.61 ±0.71	73.40 ±0.34	-29.97 ±0.90	-35.43 ±0.45	-32.67 ±1.97	-38.57 ±2.06	-45.53 ±0.70
5	31.47 ±0.15	23.96 ±0.31	46.49 ±0.64	23.75 ±0.51	72.97 ±0.97	-32.83 ±1.53	-36.60 ±2.17	-33.50 ±1.82	-40.13 ±1.08	-44.83 ±1.38
7	33.87 ±0.13	25.09 ±0.24	47.01 ±0.10	21.17 ±0.23	71.77 ±0.03	-29.17 ±0.81	-40.63 ±1.89	-33.73 ±1.02	-41.70 ±1.32	-45.17 ±2.06

นอกจากนี้ยังพบว่าสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับโพแทสเซียมดีออกซีโคเลต (KDC-AmB) มีขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุด ประมาณ 17.21 ± 0.25 ถึง 23.75 ± 0.51 นาโนเมตร สำหรับสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC-AmB), สูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมโคเลต (SC-AmB) สูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับโพแทสเซียมโคเลต (KC-AmB) และสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS-AmB) มีขนาดอนุภาคใหญ่เพิ่มขึ้น ตามลำดับ โดยที่สูตรตำรับ SDS-AmB มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ที่สุดกว่าสูตรอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด (ประมาณ 71.77 ± 0.03 ถึง 73.85 ± 0.49 นาโนเมตร) เมื่อพิจารณาถึงความคงตัวของแต่ละสูตร พบว่าทั้ง 5 สูตร มีขนาดอนุภาคที่ใกล้เคียงกัน เมื่อวางทิ้งไว้ 3, 5 และ 7 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสูตรตำรับในแต่ละสูตรไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคที่จะส่งผลให้สูตรตำรับเกิดการตกตะกอน สำหรับค่าศักย์ซีต้าที่ผิวอนุภาคมีค่าเป็นลบและมีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 5 สูตร

3.2 ผลการศึกษาขนาดอนุภาค (Particle size) ค่าศักย์ซีต้า (Zeta potential) และปริมาณยา (Drug content, %) ของตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน หลังจากเก็บไว้นาน 6 เดือน

ผลจากการนำสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่บรรจุในอนุพันธ์ของไขมัน มาศึกษาความคงตัวโดยการวัดขนาดอนุภาค วัดค่าศักย์ซีต้า และคำนวณปริมาณของยา ก่อนนำสูตรตำรับไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 2-8°C และวางไว้ในโถควบคุมความชื้น (desicator) ที่อุณหภูมิห้อง (30±3°C) เป็นเวลา 6 เดือน เพื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับเริ่มต้นก่อนทำการทดลอง ซึ่งได้แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า และปริมาณยา ของตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน หลังจากเก็บไว้นาน 6 เดือน

Characteristics	Formulations mole ratio (2:1)								
	SDS-AmB			SDC-AmB			KDC-AmB		
	Initial	6 months		Initial	6 months		Initial	6 months	
	2-8°C	2-8°C	30 ± 3°C	2-8°C	2-8°C	30 ± 3°C	2-8°C	2-8°C	30 ± 3°C
Particle size (nm)	75.2 ± 0.6	81.5 ± 1.8	89.3 ± 1.3	23.3 ± 1.1	30.8 ± 2.5	34.7 ± 1.5	24.7 ± 0.8	28.0 ± 0.9	35.1 ± 0.7
Zeta potential (-mV)	-47.7 ± 1.0	-45.2 ± 0.8	-41.3 ± 1.1	-38.8 ± 0.7	-35.1 ± 0.4	-33.7 ± 0.9	-39.8 ± 0.5	-37.5 ± 0.6	-34.7 ± 1.2
Drug content (%)	98.5 ± 3.8	97.4 ± 4.2	71.3 ± 3.2	96.8 ± 4.0	89.6 ± 5.4	43.4 ± 4.2	94.3 ± 3.0	90.0 ± 3.1	63.4 ± 6.3

หมายเหตุ : control temperature ในตู้เย็น (2-8°C) และ room temperature (30±3°C)

หลังจากเก็บสูตรตำรับยาผงแห้งไว้นาน 6 เดือน ในที่ที่มีอุณหภูมิต่างกัน ขนาดของอนุภาคมีแนวโน้มใหญ่ขึ้น และเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคทุกสูตรตำรับ ทั้งที่เก็บไว้ในโถควบคุมความชื้น (อุณหภูมิห้อง) และเก็บไว้ในตู้เย็น ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับค่าขนาดของอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 เมื่อพิจารณาปริมาณยา (drug content) ในสูตรตำรับ พบว่ายาเกิดการเสื่อมสลายอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเก็บไว้ในโถควบคุมความชื้น (อุณหภูมิห้อง) แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาสูตรตำรับยาต้องเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 2-8 °C และป้องกันให้พ้นจากแสงอีกด้วย

4. คุณสมบัติทางแอโรโซลของสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน

การพัฒนาเป็นยาผงแห้งชนิดนำส่งสู่ทางเดินหายใจในรูปแบบแอโรโซล เพื่อนำส่งไปสู่อวัยวะเป้าหมาย สูตรตำรับต้องมีความคงตัวทางกายภาพ และมีขนาดอนุภาคที่เหมาะสม ต้องมีการประเมินสูตรตำรับด้วยเครื่องมือ Andersen Cascade Impactor (ACI) และ jet nebulizer ซึ่งได้แสดงคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสูตรตำรับ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางแอโรโซลของสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมัน ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น

Materials	Mole ratios	%Content	MMAD (μm)	% FPF ($<4.7\mu\text{m}$)
SDC:AmB	2:1	100.8 \pm 1.8	1.70 \pm 0.3	70 \pm 3.9
SDS:AmB	2:1	101.9 \pm 3.4	1.74 \pm 0.4	80 \pm 2.3
KDC:AmB	2:1	100.4 \pm 0.3	1.81 \pm 0.3	71 \pm 4.9
KC:AmB	2:1	100.2 \pm 0.5	1.89 \pm 0.4	72 \pm 4.2
SC:AmB	2:1	99.5 \pm 0.4	2.05 \pm 0.3	74 \pm 3.3

ผลการประเมินสูตรตำรับเพื่อใช้เป็นยาผงแห้ง โดยใช้เครื่องมือ Andersen Cascade Impactor (ACI) และ jet nebulizer กำหนดความเร็วลมที่ใช้ในการวัด 28.3 ลิตร/นาที พบว่าขนาดอนุภาคที่วัดได้ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นอากาศ (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD) ของสูตรตำรับ SDC-AmB, SDS-AmB, KDC:AmB, KC:AmB และ SC:AmB ในอัตราส่วนโมล 2:1 มีปริมาณตัวยาสำคัญอยู่ในช่วง 99-102 เปอร์เซ็นต์ มีค่า MMAD อยู่ในช่วง 1.70 - 2.05 ไมครอน สำหรับขนาดอนุภาคของยาที่เตรียมได้ควรมีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 5 ไมครอน เพื่อให้ยาสามารถลงไปถึงทางเดินหายใจส่วนล่างได้ ซึ่งจากตารางที่ 5 ได้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคยาในสูตรตำรับมีขนาดอยู่ในช่วง 70-80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากอนุภาคของยาเกิดการเกาะกลุ่มกันน้อย จึงส่งผลให้ % Fine Particle Fraction (%FPF) มีค่าค่อนข้างสูง

6. ความคงตัวทางเคมี (Chemical stability)

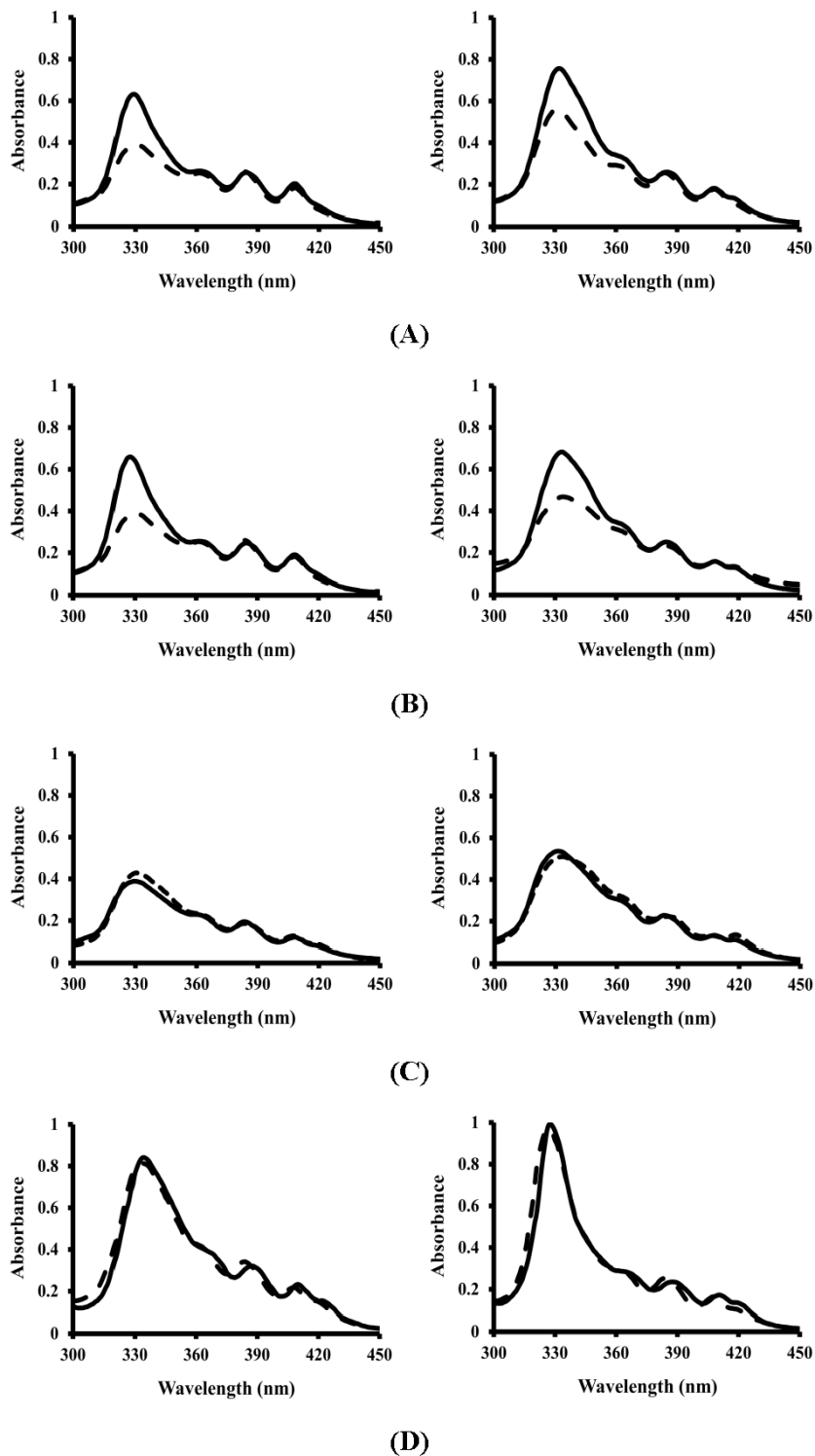
การเกาะตัวกันของยาแอมโฟเทอริซิน บี ขึ้นอยู่กับสูตรตำรับ โดยมีปัจจัยที่สำคัญ คือ ค่า pH และองค์ประกอบของสูตรตำรับ เช่น สารลดแรงตึงผิว ตัวทำละลายร่วม (Nishi และคณะ, 2007) โมเลกุลของยาแอมโฟเทอริซิน บี อาจเกิดการรวมตัวกันเอง เมื่อละลายอยู่ในน้ำ ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของยา ได้แก่ ความเข้มข้น ค่า pH อุณหภูมิ ค่าการแตกตัวของไอออนในน้ำ และองค์ประกอบที่ใช้ในสูตรตำรับ ตัวยาแอมโฟ

เทอริซิน บี ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่สามารถละลายได้ด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Barwicz และคณะ, 1992; Mazerski และ Borowski, 1996) ยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่อยู่ในรูปแบบ monomeric มีความเป็นพิษน้อยกว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ที่อยู่ในรูปแบบ dimeric (Mehta และคณะ, 1984) อย่างไรก็ตาม จะดูเหมือนว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ที่อยู่ในรูปแบบ dimeric จะมีความคงตัวในน้ำได้มากกว่ารูปแบบ monomeric ค่าการดูดกลืนแสงของ UV ของสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS-AmB) ในรูปแบบอนุภาคนาโน มีลักษณะที่เหมือนกันกับสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC-AmB) การเกาะกลุ่มกันของยาแอมโฟเทอริซิน บี จะส่งผลโดยตรงทำให้ยาเกิดความเป็นพิษได้ สามารถศึกษาการเกาะกลุ่มกันของสูตรตำรับได้โดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry แสดงได้ดังรูปที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ละลายอยู่ในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 7.39-7.4 (รูป 10A) บางโมเลกุลของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่อยู่ในรูปของ dimeric ได้ปรากฏพีคขึ้นในช่วง 328-331 nm สำหรับพีคเล็กๆ ที่เกิดขึ้น จะอยู่ในรูปของ monomeric มีหลายตำแหน่ง เช่น ที่ตำแหน่ง 360-363, 383-385 และ 408-410 nm ถึงแม้ว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี จะเกิดการเกาะกลุ่มกันบางส่วน แต่ลักษณะของสเปกตรัมที่ได้จากการทดสอบการดูดกลืนแสงของวันที่ 1 และวันที่ 7 ยังคงเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง และสเปกตรัมเกิดการเลื่อน (shift) เล็กน้อย ไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อเก็บสูตรตำรับนาน 7 วัน ยาแอมโฟเทอริซิน บี เกิดการเสื่อมสลาย และจากผลการทดลองที่ได้อาจจะนำไปใช้ในการทำนายความคงตัวของสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี หลังจากการละลายได้ โดยพบว่าสูตรตำรับที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (สูตรตำรับ SDS-AmB และ SDC-AmB) ไม่มีความคงตัว เมื่อเปรียบเทียบความคงตัวในวันที่ 7 ของสูตรตำรับดังกล่าวทั้ง 2 สูตร พบว่าสูตรตำรับ SDS-AmB มีค่าการดูดกลืนลดลงน้อยกว่าสูตรตำรับ SDC-AmB ทุกชนิดของตัวทำละลาย

จากรูปที่ 10(B) ได้แสดงค่าการดูดกลืนแสงยูวีของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่ละลายสูตรตำรับ ด้วย 5% สารละลายเด็กซ์โตรส (DEX) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนของทั้ง 2 สูตรตำรับ แล้วพบว่ามีสเปกตรัมของสูตรตำรับ SDS-AmB เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 300-360 nm โดยมีลักษณะกว้าง (broad) กว่าสูตรตำรับ SDC-AmB ทั้ง 1 และ 7 วัน และยังพบว่าการดูดกลืนแสงของวันที่ 7 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 ซึ่งผลจากการเจือจางด้วย 5%เด็กซ์โตรส ได้แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากวันที่ 1 ที่วัดเปรียบเทียบกับวันที่ 7 และค่าความแรงไอออน (ionic strength) ของน้ำเกลือ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 154 และ 176 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งความคงตัวของสารละลายที่แตกต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับความแรงของไอออน ค่าความเป็นกรด-เบส

สำหรับการดูดกลืนแสงยูวีของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่ละลายสูตรตำรับด้วยสารละลาย Normal saline (NSS) และ Diluted Normal saline ดังแสดงในรูปที่ 10(C) และ 10(D) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนของทั้ง 2 สูตรตำรับ แล้วพบว่ามีสเปกตรัมของสูตรตำรับ SDS-AmB เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 300-360 nm เช่นเดียวกัน โดยมีลักษณะฐานกว้าง ทั้ง 1 และ 7 วัน และยังมีค่าการดูดกลืนที่ไม่แตกต่างกันอย่าง

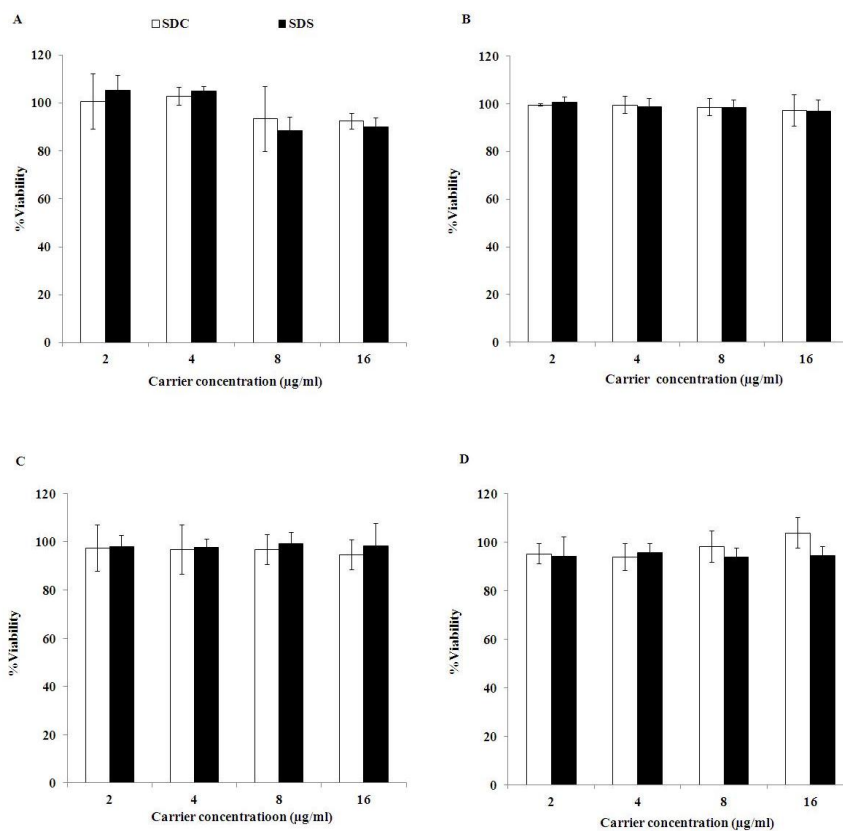
มีนัยสำคัญ อีกทั้งยังพบว่า เมื่อละลายด้วย Diluted Normal saline จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และพีคที่ได้มีลักษณะแหลมกว่าอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ละลายด้วย Normal saline และยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อละลายสูตรตำรับด้วย Diluted Normal saline แล้ว ยามีความคงตัวทางเคมีสูงกว่าการละลายด้วยสารละลายชนิดอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน เนื่องจากพีคที่ได้จากวันที่ 7 มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าสูตรตำรับเหมาะที่จะละลายอยู่ในสารละลายที่เป็นสารละลายเจือจาง



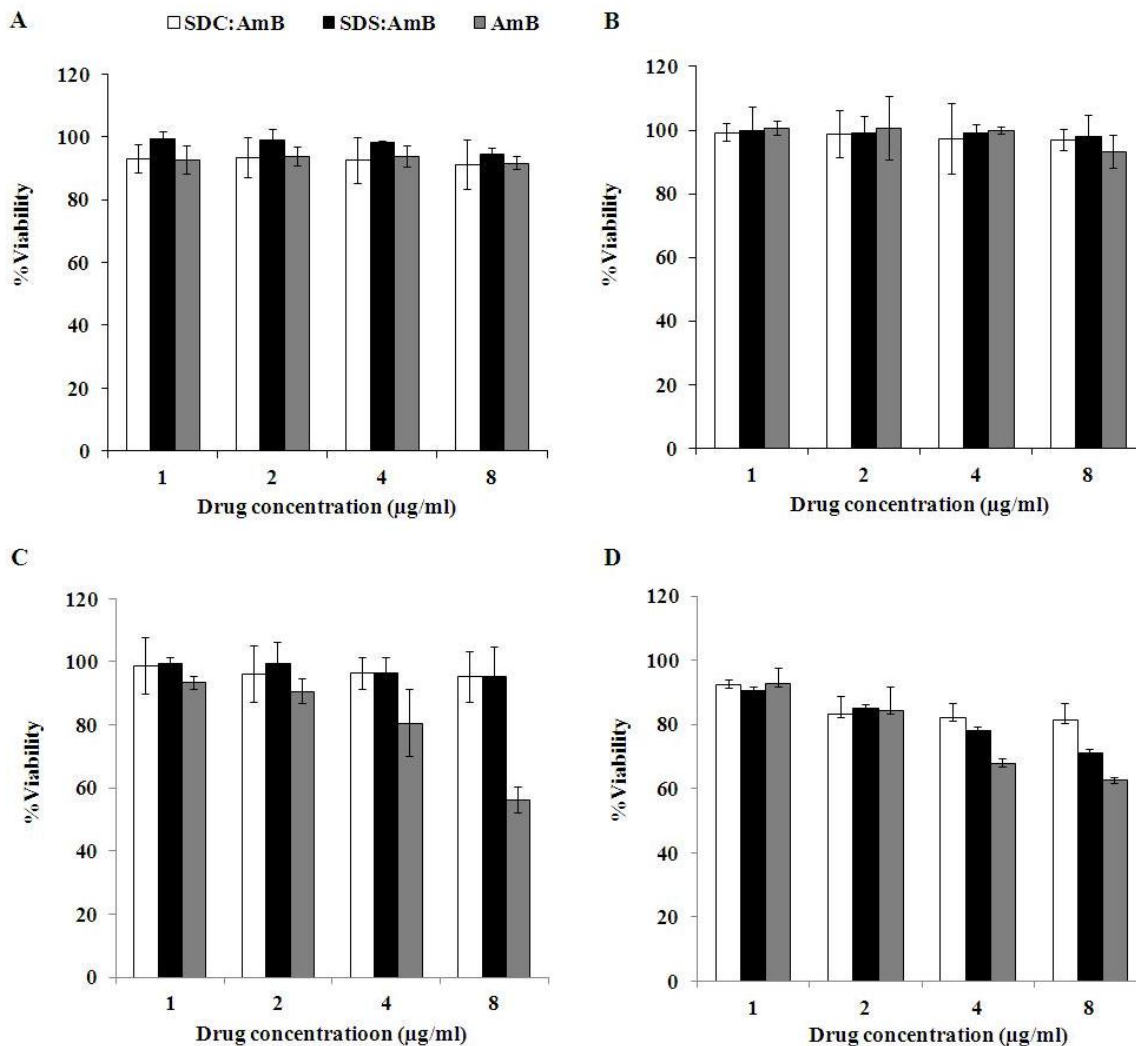
รูปที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงยูวีของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี และอนุพันธ์ของไขมัน (SDC-AmB คือ คอลัมน์ด้านซ้าย และ SDS-AmB คือ คอลัมน์ด้านขวา) ที่ละลายด้วยตัวทำละลายต่างๆ ((A) ละลายด้วย DW (B) ละลายด้วย 5% DEX (C) ละลายด้วย NSS และ (D) ละลายด้วย Diluted NSS)
 (——— คือ วันที่ 1 - - - คือ วันที่ 7)

7. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวพาโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC) และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) สูตรตำรับยาผงแห้ง SDS-AmB สูตรตำรับยาผงแห้ง SDC-AmB และยาแอมโฟเทอริซิน บี เตี้ยๆ ต่อเซลล์ มาโครเฟจ (AMs NR8383) เซลล์ปอด (A549 และ Calu-3) และเซลล์ไต 293T/17 โดยใช้วิธี MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวพา SDC และ SDS ในช่วงความเข้มข้น 2 ถึง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แสดงเปอร์เซ็นต์ความสามารถมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตได้ของเซลล์ (Viability) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 11 เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสูตรตำรับยาผงแห้ง SDS-AmB และตำรับ SDC-AmB (อัตราส่วนโมล 2:1) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) และตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตได้ของเซลล์มาโครเฟจ เซลล์ปอด และเซลล์ไต มีค่ามากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่าสามารถลดความเป็นพิษต่อเซลล์ในระบบทางเดินหายใจ เซลล์ปอด และเซลล์ไตได้ ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 11 การรอดชีวิตของเซลล์ AMs NR8383 (A), A549 (B), Calu-3 (C) และ 293T/17 (D) หลังจากบ่มเซลล์กับตัวพาโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC) และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

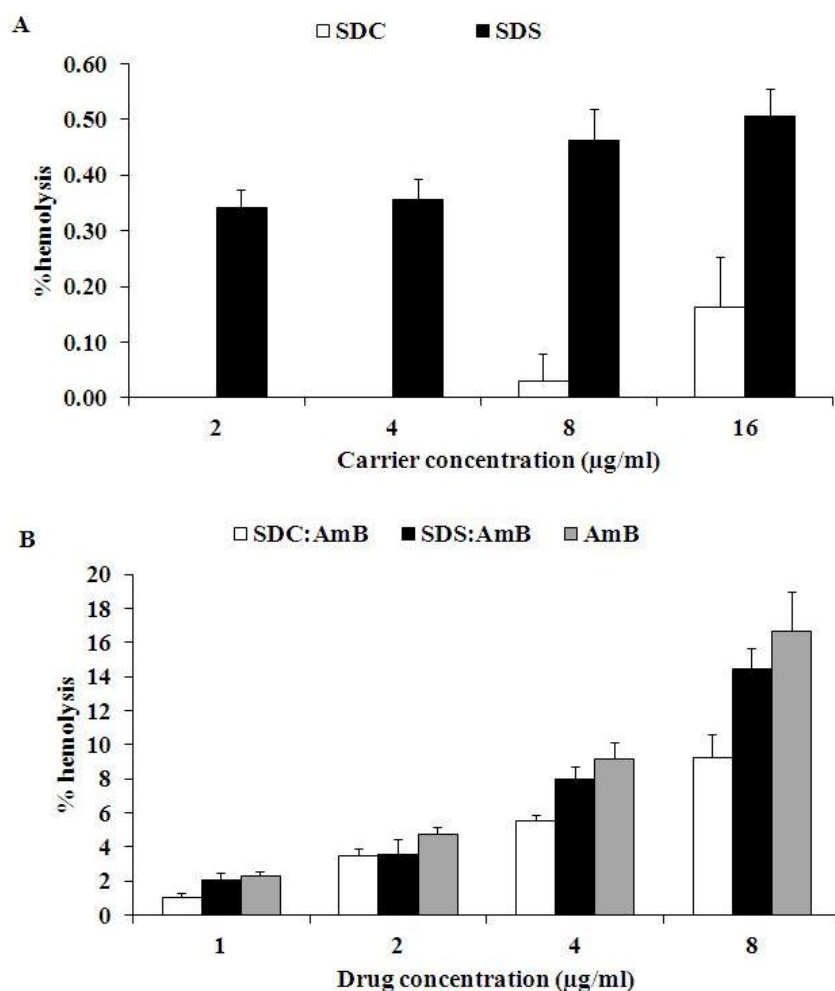


รูปที่ 12 การรอดชีวิตของเซลล์ AMs NR8383 (A), A549 (B), Calu-3 (C) และ 293T/17 (D) หลังจากบ่มเซลล์กับตำรับยาผงแห้ง SDS-AmB และตำรับ SDC-AmB ที่ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8. ผลการทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง

ศึกษาการแตกของเม็ดเลือดแดงของตำรับ SDS-AmB เปรียบเทียบกับตำรับ SDC-AmB และยาแอมโฟเทอรีซิน บี แสดงดังรูปที่ 13 ได้แสดงผลของอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) และอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC) ต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง เมื่อบ่มกับเม็ดเลือดแดงจากคนในช่วงความเข้มข้น 2-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต และอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลต มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 13(A) ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดง และผลของตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอรีซิน บี ที่มีอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงน้อย ในช่วง 1, 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร ดังรูปที่ 13(B) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น ซึ่งตำรับทั้งสองตำรับนี้แสดงค่าการแตกของเม็ดเลือดแดงน้อยกว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ตำรับยาผงแห้งที่มีอนุพันธ์ของไขมันดังกล่าวทำให้ยาแอมโฟเทอริซิน บี คงตัวมากขึ้น และเป็นพิษน้อยลง จากรายงานวิจัยของ Forster และคณะ (Forster และคณะ, 1988) เกี่ยวกับการแตกของเม็ดเลือดแดงพบว่าตำรับเลซิติโนอิมัลชัน และลิโปโซมของยาแอมโฟเทอริซิน บี สามารถทำให้ยามีความคงตัวและลดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งเกิดจากการยึดเกาะกันของยาแอมโฟเทอริซิน บี กับฟอสโฟลิพิดที่แข็งแรง Chuealee และคณะ (Chuealee และคณะ, 2011) ศึกษาการนำอนุพันธ์ คอเรสเตอรอลมาใช้เตรียมตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี และทำให้ยาแอมโฟเทอริซิน บี นั้น มีความคงตัวมากขึ้น และยังป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ด้วย ซึ่งการใช้ตัวพาที่ไม่ละลายน้ำ เช่น กลุ่ม long-chain acyl มาเชื่อมต่อกับคอเรสเตอรอล ทำให้การแตกของเม็ดเลือดแดงแตกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่มีอยู่ก่อนหน้านี้



รูปที่ 13 การแตกของเม็ดเลือดแดงของคนในหลอดทดลองเมื่อบ่มกับตัวพาโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC) และโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) (A) และเมื่อบ่มกับตำรับยาผงแห้ง SDS-AmB, SDC-AmB และยาแอมโฟเทอริซิน บี เดี่ยวๆ (AmB) (B) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งและฆ่าเชื้อราได้เลือกเชื้อรา 3 ชนิดคือ *Cryptococcus neoformans* (CN) *Candida albicans* (CA) และ *Saccharomyces cerevisiae* (SC) เชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้จาก ATCC ทดสอบความแรงของยาในตำรับ เข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ ของตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS-AmB) และ SDC-AmB (Fungizone[®]) มีความแรงของยาในการยับยั้งเชื้อในช่วง 102% และ 103% ตามลำดับ และความแรงของยาแอมโฟเทอริซิน บี เดี่ยวๆ ต่อเชื้อรา มีค่าเท่ากับ 100% จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงว่าอนุพันธ์ไขมันที่ใช้ในตำรับนั้นช่วยให้ยาออกฤทธิ์แรงขึ้น ลักษณะของอนุพันธ์ไขมันไม่ได้มีลักษณะเป็นวงแหวนอย่างเดี่ยวแต่มีลักษณะคล้ายผลึกไขมันซึ่งช่วยให้ยามีความแรงขึ้น และสามารถนำยาแอมโฟเทอริซิน บี ไปสู่เซลล์เชื้อรา และสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อราได้ดีขึ้น และที่สำคัญคือยาสามารถละลายในน้ำได้ดีโดยไม่ใช้สารละลายอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย และมีความคงตัว ค่าการยับยั้งเชื้อรา (MIC) และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อรา (MFC) ของยาแอมโฟเทอริซิน บี ต่อเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 0.32 และ 0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าการยับยั้งเชื้อรา และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อราต่อเชื้อ *C. neoformans* เท่ากับ 0.32 และ 0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตำรับไขมันทั้งตำรับ SDS-AmB และ SDC-AmB นั้นแสดงค่าการยับยั้งเชื้อรา และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อราต่อเชื้อ *C. neoformans* เท่ากับ 0.16 และ 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงค่าที่ต่ำกว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ที่บริสุทธิ์ และค่าการยับยั้งเชื้อรา และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อราของตำรับ SDC-AmB ต่อเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 0.16 และ 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่ำกว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ที่บริสุทธิ์ ส่วนตำรับ SDS-AmB นั้นแสดงค่าที่เท่ากับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่บริสุทธิ์เท่ากับ 0.32 และ 0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6 มีรายงานก่อนหน้านี้ว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ที่บริสุทธิ์มีค่าการยับยั้งเชื้อราต่อเชื้อ *C. albicans* ในช่วง 0.03 ถึง 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Van Eldere และคณะ, 1996) ช่วง 0.015 ถึง 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Park และคณะ, 2006) และในช่วง 0.06 ถึง 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Chuealee และคณะ, 2011) ส่วนค่าการยับยั้งเชื้อรา ต่อเชื้อ *C. neoformans* ในช่วง 0.06 ถึง 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Aller และคณะ, 2000) ช่วง 0.5 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Archibald และคณะ, 2004) ช่วง 0.03 ถึง 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (López-Jodra และคณะ, 2000) ช่วง 0.0625 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Lozano-Chiu และคณะ, 1998) และช่วง 0.08 ถึง 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Chuealee และคณะ, 2011) ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ แสดงถึงความแรงของยาแอมโฟเทอริซิน บี ในตำรับไขมันทั้งตำรับ SDS-AmB และ SDC-AmB สามารถผ่านเข้าไปสู่ผนังเซลล์ของเชื้อรา และออกฤทธิ์ได้ดี (Chuealee และคณะ, 2011)

ตารางที่ 6 ความแรงของยา (Potency) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MFC) ของตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีอนุพันธ์โซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต ตำรับที่มีใช้ในปัจจุบัน และยามาตรฐาน *C. neoformans*, *C. albicans* และ *S. cerevisiae*

Materials	Potency (%)	<i>C. neoformans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
		($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)
Pure AmB*	100	0.32	0.63	0.32	0.63	0.32	0.63
SDS:AmB	103	0.16	0.32	0.32	0.63	0.32	1.28
SDC:AmB**	102	0.16	0.32	0.16	0.32	0.32	1.28

* ยามาตรฐาน

** ตำรับที่ใช้ในปัจจุบัน (Fungizone[®])

10. สรุปผลการทดลอง

1. สูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี กับอนุพันธ์ของไขมันชนิดต่างๆ ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง น้ำหนักเบามาก สามารถไหลได้อย่างอิสระ สามารถละลายน้ำได้สูงและเมื่อละลายแล้วจะได้สารละลายสีเหลืองใส

2. ขนาดอนุภาคของสูตรตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS-AmB) และสูตรตำรับยาผงแห้งสูตรยาแอมโฟเทอริซิน บี กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (SDC-AmB) มีลักษณะที่เหมือนกันและมีความคงตัวที่ดี มีค่าศักย์ซีต้า เท่ากับ -45.53 มิลลิโวลต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจะไม่มีแรงในการทำให้อนุภาคเกิดการจับตัวกัน อนุภาคทั้งหมดได้กระจายอย่างสม่ำเสมอและเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย อาจเป็นเพราะอนุพันธ์ของไขมัน ในสูตรตำรับ SDS-AmB มีประจุลบสูง สูตรตำรับที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 59 mM และมีค่า pH อยู่ในช่วง $7.4-7.8$ หลังวางทิ้งไว้ $3, 5$ และ 7 วัน จะเห็นว่าสูตรตำรับในแต่ละสูตรไม่เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคที่จะส่งผลให้สูตรตำรับเกิดการตกตะกอน สำหรับค่าศักย์ซีต้าที่ผิวอนุภาคมีค่าเป็นลบและมีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 5 สูตร หลังจากเก็บสูตรตำรับยาผงแห้งไว้นาน 6 เดือนในที่ที่มีอุณหภูมิต่างกัน ขนาดของอนุภาคมีแนวโน้มใหญ่ขึ้น และเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคทุกสูตรตำรับ ทั้งที่เก็บไว้ในโถดูดความชื้น (อุณหภูมิห้อง) และเก็บไว้ในตู้เย็น ยาเกิดการเสื่อมสลายอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (อุณหภูมิห้อง) ควรเก็บรักษาสูตรตำรับยาไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ $2-8$ °C และป้องกันให้พ้นจากแสง

3. ผลการประเมินสูตรตำรับเพื่อใช้เป็นยาผงแห้ง โดยใช้เครื่องมือ Andersen Cascade Impactor (ACI) และ jet nebulizer ขนาดอนุภาคที่วัดได้ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นอากาศ (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD) ของสูตรตำรับ SDC-AmB, SDS-AmB, KDC:AmB, KC:AmB และ SC:AmB ในอัตราส่วนโมล 2:1 มีปริมาณตัวยาคัญอยู่ในช่วง 99-102 เปอร์เซ็นต์ มีค่า MMAD อยู่ในช่วง 1.70-2.05 ไมครอน สำหรับขนาดอนุภาคของยาที่เตรียมได้มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 5 ไมครอน มีขนาดอยู่ในช่วง 70-80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากอนุภาคของยาเกิดการเกาะกลุ่มกันน้อย จึงส่งผลให้ % Fine Particle Fraction (%FPF) มีค่าค่อนข้างสูง

4. ศึกษาการเกาะกลุ่มกันของสูตรตำรับได้โดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry

4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ละลายอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 7.39-7.4 ยาแอมโฟเทอริซิน บี จะเกิดการเกาะกลุ่มกันบางส่วน แต่ลักษณะของสเปกตรัมที่ได้จากการทดสอบการดูดกลืนแสงของวันที่ 1 และวันที่ 7 ยังคงเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง และสเปกตรัมเกิดการเลื่อน (shift) เล็กน้อย ไม่ชัดเจน เมื่อเก็บสูตรตำรับนาน 7 วัน ยาแอมโฟเทอริซิน บี เกิดการเสื่อมสลาย และจากผลการทดลองที่ได้ อาจจะนำไปใช้ในการทำนายความคงตัวของสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี หลังจากการละลายได้ โดยพบว่าสูตรตำรับที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (สูตรตำรับ SDS-AmB และ SDC-AmB) ไม่มีความคงตัว เมื่อเปรียบเทียบกับความคงตัวในวันที่ 7 ของสูตรตำรับดังกล่าวทั้ง 2 สูตร พบว่าสูตรตำรับ SDS-AmB มีค่าการดูดกลืนลดลงน้อยกว่าสูตรตำรับ SDC-AmB ทุกชนิดของตัวทำละลาย

4.2 การดูดกลืนแสงยูวีของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่ละลายสูตรตำรับ ด้วย 5% สารละลายเด็กโตรอส (DEX) มีสเปกตรัมของสูตรตำรับ SDS-AmB เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 300-360 nm โดยมีลักษณะกว้าง (broad) กว่าสูตรตำรับ SDC-AmB ทั้ง 1 และ 7 วัน และการดูดกลืนแสงของวันที่ 7 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 ซึ่งผลจากการเจือจางด้วย 5% เด็กซ์โตรอส ได้แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากวันที่ 1 ที่วัดเปรียบเทียบกับวันที่ 7 และค่าความแรงไอออน (ionic strength) ของน้ำเกลือ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 154 และ 176 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

4.3 การดูดกลืนแสงยูวีของสูตรตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่ละลายสูตรตำรับด้วยสารละลาย Normal saline (NSS) และ Diluted Normal saline พบว่ามีสเปกตรัมของสูตรตำรับ SDS-AmB เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 300-360 nm เช่นเดียวกัน โดยมีลักษณะฐานกว้าง ทั้ง 1 และ 7 วัน และยังมีค่าการดูดกลืนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังพบว่า เมื่อละลายด้วย Diluted Normal saline จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และพิกที่ได้มีลักษณะแหลมกว่าอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ละลายด้วย Normal saline และยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อละลายสูตรตำรับด้วย Diluted Normal saline แล้ว ยามีความคงตัวทางเคมีสูง

กว่าการละลายด้วยสารละลายชนิดอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน เนื่องจากพีคที่ได้จากวันที่ 7 มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าสูตรตำรับเหมาะที่จะละลายอยู่ในสารละลายที่เป็นสารละลายเจือจาง

5. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสูตรตำรับยาผงแห้ง เพอร์เซ็นต์ความสามารถมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตได้ของเซลล์มาโครเฟจ เซลล์ปอด และเซลล์ไต มีค่ามากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าสามารถลดความเป็นพิษต่อเซลล์ในระบบทางเดินหายใจ และเซลล์ไตได้

6. การแตกของเม็ดเลือดแดงของตำรับ SDS-AmB เปรียบเทียบกับตำรับ SDC-AmB และยาแอมโฟเทอริซิน บี อนุพันธ์ของไขมันโซเดียมคือออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS) และโซเดียมคือออกซีโคเลต (SDC) มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดง และผลของตำรับยาผงแห้งแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีอนุพันธ์ของไขมันโซเดียมคือออกซีโคเลตซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงน้อย ในช่วง 1, 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น ซึ่งตำรับทั้งสองตำรับนี้แสดงค่าการแตกของเม็ดเลือดแดงน้อยกว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ตำรับยาผงแห้งที่มีอนุพันธ์ของไขมันดังกล่าวทำให้ยาแอมโฟเทอริซิน บี คงตัวมากขึ้น และเป็นพิษน้อยลง

7. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งและฆ่าเชื้อรา 3 ชนิดคือ *Cryptococcus neoformans* (CN), *Candida albicans* (CA) และ *Saccharomyces cerevisiae* (SC) สูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีอนุพันธ์โซเดียมคือออกซีโคเลตซัลเฟต (SDS-AmB) และ SDC-AmB (Fungizone[®]) มีความแรงของยาในการยับยั้งเชื้อในช่วง 102% และ 103% ตามลำดับ และความแรงของยาแอมโฟเทอริซิน บี เดี่ยวๆ ต่อเชื้อรา มีค่าเท่ากับ 100% ค่าการยับยั้งเชื้อรา (MIC) และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อรา (MFC) ของยาแอมโฟเทอริซิน บี ต่อเชื้อ *C. albican* เท่ากับ 0.32 และ 0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าการยับยั้งเชื้อรา และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อราต่อเชื้อ *C. neoformans* เท่ากับ 0.32 และ 0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตำรับไขมันทั้งตำรับ SDS-AmB และ SDC-AmB นั้นแสดงค่าการยับยั้งเชื้อรา และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อราต่อเชื้อ *C. neoformans* เท่ากับ 0.16 และ 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงค่าที่ต่ำกว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ที่บริสุทธิ์ และค่าการยับยั้งเชื้อรา และค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อราของตำรับ SDC-AmB ต่อเชื้อ *C. albican* เท่ากับ 0.16 และ 0.32 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตรต่ำกว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ที่บริสุทธิ์ ส่วนตำรับ SDS-AmB นั้นแสดงค่าที่เท่ากับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่บริสุทธิ์เท่ากับ 0.32 และ 0.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

11. เอกสารอ้างอิง

- Aller, A.I., Martín -Mazuelos, E., Gutiérrez, M.J., Bernal, S., Chávez, M and Recio, F.J. (2000). Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *Antimicrob. Chemother.* 46: 997-1000.
- Archibald, L.K., Tuohy, M.J., Wilson, D.A., Nwanyanwu, O., Kazembe, P.N., Tansuphasawadikul, S., Eampokalap, B., Chaovavanich, A., Reller, L.B., Jarvis, W.R., Halls, G.S and Procop, G.W. (2004). Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans*. *Emerg. Infect. Dis.* 10(1), 143-145.
- Barwicz, J., Christian, S. and Gruda, I. (1992). Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36(10): 2310-2315.
- Bowden, R., Chandrasekar, P., White, M.H., Li, X., Pietrelli, L., Gurwith, M., van Burik, J.A., Laverdiere, M., Safrin, S. and Wingard, J.R. (2002). A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.*, 35(4): 359-366.
- Chuealee, R., Aramwit, P., Noipha, K. and Srichana, T. (2011). Bioactivity and toxicity studies of amphotericin B incorporated in liquid crystals. *Eur. J. Pharm Sci.*, 43: 308-317.
- Czub, J., Neumann, A., Borowski, E. and Baginski, M. (2009). Influence of a lipid bilayer on the conformational behavior of amphotericin B derivatives – A molecular dynamics study. *Biophys Chem.*, 141(1): 105-116.
- Forster, D., Washington, C., and Davis, S.S. (1988). Toxicity of solubilized and colloidal amphotericin B formulations to human erythrocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40(5): 325-328.
- Gharib, A., Faezizadeh, Z. and Mohammad, A.H. (2011). Preparation and antifungal activity of spray-dried amphotericin B-loaded nanospheres. *DARU*,19(5): 351-355.
- Herbrecht, R., Natarajan-Amé, S., Nivoix, Y. and Letscher-Bru, V. (2003). The lipid formulation of amphotericin B. *Expert Opin. Pharmacother.*, 4(8): 1277-1287.

- Ibrahim, F., Gershkovich, P., Sivak, O., Wasan, E.K. and Wasan, K.M. (2012). Assessment of novel oral lipid-based formulations of amphotericin B using an *in vitro* lipolysis model. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 46(5): 323-328.
- Kuiper, L. and Ruijgrok, E.J. (2009). A review on the clinical use of inhaled amphotericin B. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, 22(3): 213-217.
- Larabi, M., Gulik, A., Dedieu, J.P., Legrand, P., Barratt, G. and Cheron, M. (2004). New lipid formulation of amphotericin B: spectral and microscopic analysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1664(2): 172-181.
- Legend, P., Romero, E.A., Cohen, B.E. and Bolard, J. (1992). Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 36(11): 2518-2522.
- López-Jodra, O., Torres- Rodríguez, J.M., Méndez-Vásquez, R., Ribas-Forcadell, E., Morere- López, Y., Baró-Tomás, T. and Alia-Aponte, C. (2000). In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 645-649
- Lozano-Chiu, M., Paetznick, V.L., Ghannoum, M.A. and Rex, J.H. (1998). Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: Performances of three different media assessed by using E-Test and national committee for clinical laboratory standards M27-A methodologies. *J. Clinical Microb.* 36(10): 2817-2822.
- Mazerski, J. and Borowski, E. (1996). Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water. *Biophys. Chem.* 57(2-3): 205-217.
- Mehta, R., Lopez- Berestein, G., Hopper, R., Mills, K. and Juliano, R.L. (1984). Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta.*, 770(2): 230-234.
- Misra, A., Hickey, A. J., Rossi, C., Borchard, G., Terada, H., Makino, K., Fourie, P. B. and Colombo, P. (2011). Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis. *Tuberculosis.* 91: 71-81.
- Muttill, P., Wang, C. and Hickey, A. J. (2009). Inhaled drug delivery for tuberculosis therapy. *Pharmaceutical Research.* 26(11): 2401-2416.
- Nasr, M., Nawaz, S. and Elhissi, A. (2012). Amphotericin B lipid nanoemulsion aerosols for targeting peripheral respiratory airways via nebulization. *Int. J. Pharm.*, 436(1-2): 611-616.

- Nishi, K.K., Antony, M., Mohanan, P.V., Anilkumar, T.V., Loiseau, P.M. and Jayakrishana, A. (2007). Amphotericin B-gum arabic conjugates: Synthesis, toxicity, bioavailability, and activities against leishmania and fungi. *Pharm. Res.*, 24(5): 971-980.
- Park, B.J., Arthington-Skaggs, B.A., Hajjeh, R.A.; Iqbal, N., Ciblak, M.A., Lee-Yang, W., Hairston, M.D., Phelan, M., Plikaytis, B.D., Sofair, A.N., Harrison, L.H., Fridkin, S.K. and Warnock, D.W. (2006). Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(4): 1287-1292.
- Pilcer, G. and Amighi, K. (2010). Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 392: 1-19.
- Torrado, I.J., Espada, R., Ballersteros, M.P. and Santiago-Torrado, S. (2008). Amphotericin B formulation and drug targeting. *J. Pharm. Sci.*, 97(7): 2405-2425.
- Van Eldere, J.; Joosten, L.; Verhaeghe, A.; Surmont, I. (1996) Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution Test. *J. Clin. Microbiol.*, 34 (4): 842-847.
- Wingard, J.R., White, M.H. and Anaissie, E. (2000). A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. *Clin. Infect. Dis.*,31: 1155-1163.

12. ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป
..การทดลองในสัตว์ทดลอง ในแง่ความปลอดภัย.

13. ภาคผนวก ประกอบด้วย

- นิพนธ์ต้นฉบับที่พร้อมส่งตีพิมพ์ (Manuscript) จำนวน 1 เรื่อง
- สิทธิบัตร จำนวน 1 เรื่อง