ชื่อโครงการ (ไทย) การพัฒนาผลึกเหลวสังเคราะห์ชนิดใหม่และการประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยา

(อังกฤษ) Development of novel synthetic liquid crystals and applications in drug delivery)

ชื่อหัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. ธีระพล ศรีชนะ Associate Professor Dr. Teerapol Srichana

หน่วยงาน สถานวิจัยระบบนำส่งยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทรศัพท์ 66-74-288842 โทรสาร 66-74-428148 e-mail: teerapol.s@psu.ac.th

ความเชี่ยวชาญ ระบบนำส่งยาสู่ทางเดินหายใจ

วัตถุประสงค์

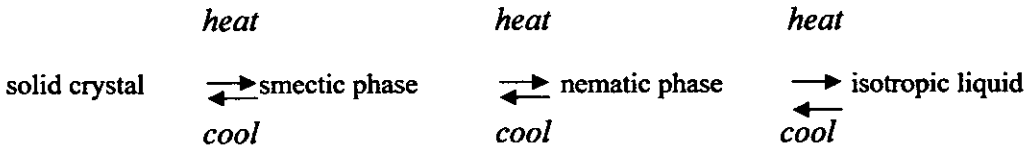
1. เพื่อสังเคราะห์ผลึกเหลวชนิดใหม่ในรูปแบบอนุภาคนาโนเพื่อใช้ในระบบนำส่งยา
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของผลึกเหลวสังเคราะห์
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของผลึกเหลวสังเคราะห์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง
4. เพื่อพัฒนาระบบนาโนรูปแบบผลึกเหลวเป็นระบบนำส่งยา

หลักการและเหตุผล

ผลึกเหลวเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ (thermodynamic stable) และมีจุดหลอมเหลวที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือผลึกเหลวจะมีจุดหลอมเหลว 2 จุด จุดแรกคือจุดที่มีการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งไปเป็นผลึกเหลว และจุดที่ 2 คือจุดที่เปลี่ยนจากผลึกเหลวไปเป็นของเหลว สารประกอบที่เป็นผลึกเหลวจะมีคุณสมบัติที่สามารถยืดหยุ่นได้ ส่วนใหญ่โมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว $\geq$ 1 กลุ่ม และส่วนที่ไม่มีขั้ว โดยปกติโมเลกุลของผลึกเหลวจะมีการจัดเรียงตัวเป็นเส้นขนานหรือรูปแบบอื่น ๆ ซึ่งเกิดจากแรงยึดเกาะ van der Waals แต่เมื่อโมเลกุลของผลึกเหลวอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรืออยู่ในตัวทำละลาย จะทำให้โมเลกุลของผลึกเหลวมีการจัดเรียงตัวใหม่ในรูปแบบต่าง ๆ ที่แตกต่างจากเดิม (Tyle, 1988; Malmsten, 2002)

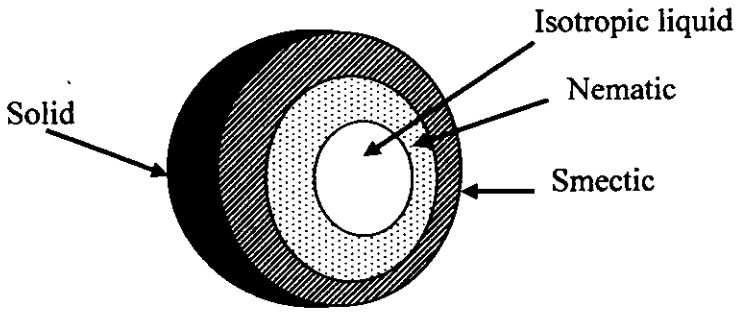
ผลึกเหลวสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

1. ผลึกเหลวชนิด Thermotropic ซึ่งเป็นชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อมีการเปลี่ยนอุณหภูมิ/พลังงานแก่ระบบ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของผลึกเหลวชนิด Thermotropic จาก solid crystal เป็น isotropic liquid

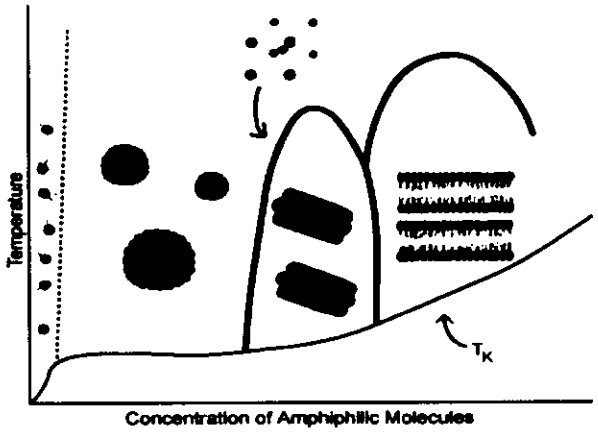
ผลึกเหลวชนิด Thermotropic เมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลวจุดแรกจะอยู่ในรูปแบบของแข็งแต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิแก่ระบบสารประกอบจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสู่สภาวะ smectic phase คือสารประกอบจะเปลี่ยนจากสถานะของแข็งเป็นสารกึ่งแข็งกึ่งเหลว/ผลึกเหลวที่มีลักษณะเป็นมัน (greasy) มีการจัดเรียงตัวเป็นชั้น ๆ (stratification) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกสภาวะ smectic phase จะเปลี่ยนเข้าสู่ nematic phase ซึ่งเป็นสภาวะที่สารมีการจัดเรียงโมเลกุลใหม่เป็นลักษณะเส้นขนาน (parallel) การเปลี่ยนแปลงนี้สามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรส์ และหากยังเพิ่มอุณหภูมิแก่ระบบอีกสารจะเปลี่ยนสถานะจากของกึ่งแข็งกึ่งเหลว/ผลึกเหลวไปเป็นของเหลว (isotropic liquid) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างการจัดเรียงตัวของ Thermotropic liquid crystals

2. ผลึกเหลวชนิด Lyotropic เป็นชนิดที่โมเลกุลของผลึกเหลวจะประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (amphiphilic molecule) เช่น สารลดแรงตึงผิว เมื่อสารเหล่านี้ละลายในตัวทำละลายจะมีแรงยึดเกาะระหว่างสารกับตัวทำละลายทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างดังรูปที่ 3 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในตัวทำละลายที่เป็นน้ำจนถึงจุดวิกฤตที่ทำให้เกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration, CMC) โมเลกุลของสารจะจัดเรียงตัวเป็นไมเซลล์โดยหันส่วนที่มีขั้ว (polar

head) ออกด้านนอกสัมผัสกับน้ำและหันส่วนที่ไม่มีขั้ว (non-polar tail) เข้าด้านใน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและเพิ่มอุณหภูมิของระบบจนสูงกว่า Kraft temperature (T_k) โมเลกุลของสารส่วนที่ไม่มีขั้วจะมีการจัดเรียงตัวใหม่และกักเก็บโมเลกุลของน้ำไว้ภายในระหว่างชั้นที่มีขั้ว การจัดเรียงตัวของโมเลกุลสามารถเกิดขึ้นได้หลายลักษณะ เช่น เป็นทรงสี่เหลี่ยม (cubic) ทรงหกเหลี่ยม (hexagonal) เป็นต้น



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของผลึกเหลวชนิด Lyotropic liquid crystal

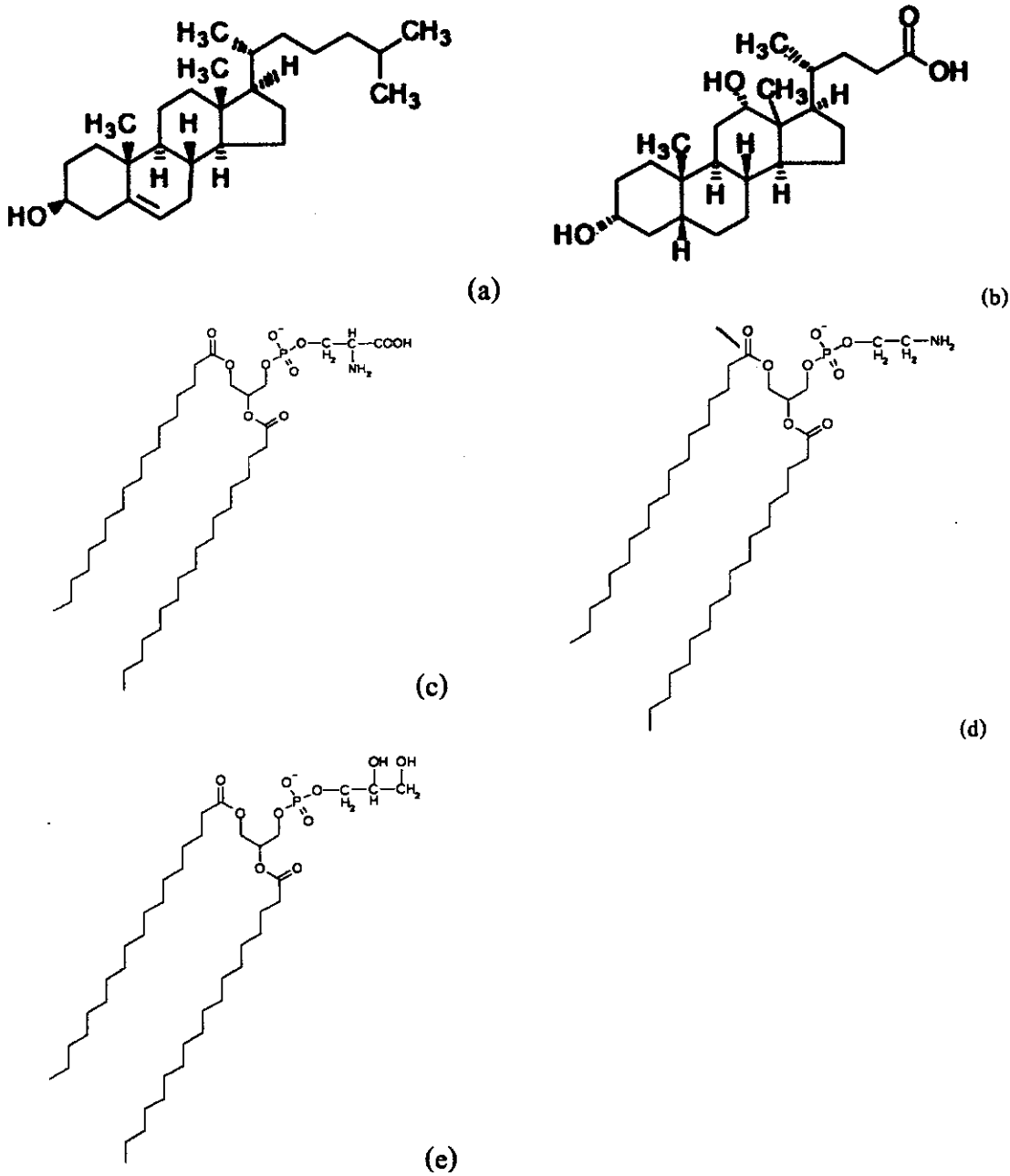
แนวทางการศึกษาวิจัย

ผลึกเหลว (liquid crystal) ได้มีการนำมาพัฒนาเพื่อเป็นระบบนำส่งยาในรูปแบบ colloidal drug carrier ที่ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 – 400 นาโนเมตร ซึ่งเป็นระบบนาโนที่เหมาะสำหรับใช้นำส่งยา และสามารถควบคุมการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ทำให้มียาอยู่ในอวัยวะเป้าหมายนานขึ้น และมีความเป็นพิษต่ำ (Westesen, *et al.*, 2001) โดยในการศึกษานี้สังเคราะห์ผลึกเหลวหลายชนิด ที่แตกต่างกันในส่วนขององค์ประกอบ คือ phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine และ phosphatidyl glycerol (รูปที่ 4) โดยเชื่อมต่อกับ cholesterol และ deoxycholic acid ด้วยพันธะโควาเลนต์ และศึกษาถึงสมบัติของผลึกเหลวแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับ cholesteryl oleyl carbonate ที่มีผลิตภัณฑ์จำหน่าย

Cholesterol, phosphatidyl choline (phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine และ phosphatidyl glycerol) และ deoxycholic เป็นสารที่พบในร่างกายและไม่เป็นอันตรายในระดับปกติ ดังนั้นเมื่อนำมาเตรียมเป็นอนุพันธ์เพื่อใช้บรรจุยาต้านเชื้อราควรจะไม่แสดงผลเสียต่อร่างกายและสารสังเคราะห์ดังกล่าวควรแสดงให้เห็นความสามารถในการเสริมฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา

ในการทดลองจะใช้ยา Amphotericn B เป็นต้นแบบเนื่องจากเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราในกระแสเลือดที่ดีที่สุดในปัจจุบัน แต่ยาสูตรที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน คือ Fungizone มีปัญหาเรื่องผลข้างเคียงที่

รุนแรงต่อไต ส่งผลให้เกิดข้อจำกัดในการใช้ มีผู้ศึกษาวิจัยพบว่า Amphotericin B ออกฤทธิ์ที่เมมเบรนของเชื้อราทำให้เกิดการรั่วไหลของอิออนและโมเลกุลขนาดเล็กของเซลล์ การเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลเกิดที่ ergosterol (Fournier et al, 1998) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนนั่นเอง มีรายงานการวิจัยเปรียบเทียบการใช้ cholesterol และ ergosterol เติมลงไปใน lipid bilayer ของ Dipalmitoyl phosphatidylcholine ที่บรรจุยา Amphotericin B พบว่าการเติมสารดังกล่าวจะเสริมฤทธิ์การฆ่าเชื้อราและช่วยในการลดขนาดยาลง (Vertut-Croquin *et al.*, 1983)



รูปที่ 4 สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ผลึกเหลว (a) cholesterol, (b) deoxycholic acid, (c) phosphatidyl serine, (d) phosphatidyl ethanolamine และ (e) phosphaidyl glycerol

การบรรจุยาอนุภาคนาโนเข้าไปในผลึกเหลวดังกล่าวคาดว่าจะทำให้ยาสามารถแทรกซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อราได้มากขึ้น นอกจากนั้นเมื่อนำรูปแบบผลึกเหลวเตรียมเป็นระบบนำส่งยาคาดว่าจะสามารถลดขนาดยา รวมถึงลดอาการข้างเคียงและอาการไม่พึงประสงค์จากยาได้

ขอบข่ายของงานวิจัย

1. ศึกษาการสังเคราะห์ผลึกเหลว
2. ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ และความเป็นพิษของผลึกเหลวระดับอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้
3. เตรียมอนุภาคนาโนรูปแบบผลึกเหลวที่บรรจุตัวยาสำคัญในรูปแบบผลิตภัณฑ์
4. ศึกษาข้อเด่นของรูปแบบยาผลึกเหลว เช่น ความสามารถในการบรรจุยา การควบคุมการปลดปล่อยในระยะเวลานาน ความคงตัวที่เพิ่มขึ้น
5. พัฒนาเป็นรูปแบบเภสัชภัณฑ์ระบบนำส่งยา

แผนงานวิจัย

1) ทำการสังเคราะห์สาร liquid crystal และศึกษาคุณสมบัติทั้งทางเคมี กายภาพ และทางจุลชีววิทยา โดยใช้เทคนิค TLC, DSC, FT-IR, MS, NMR, และ Microbial assay (Malmsten, 2002; Fung, 2002)

2) ศึกษาคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ คุณสมบัติทางแสงและการเปลี่ยนแปลงวัตภาค (phase transition) โดยใช้ DSC, polarized light microscope และ hot stage microscope (Fournier *et al.*, 1998; Ju *et al.*, 2002; Okoshi, 2004; Moran *et al.*, 2005)

3) ศึกษาขนาดและการจัดเรียงตัวของผลึกเหลวรอบโมเลกุลของยาโดยใช้ PCS, TEM, electron diffraction และ XRD (Dorset, 1985)

4) เตรียมสูตรตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันโดยปรับเปลี่ยนสัดส่วนปริมาณยาที่เหมาะสมเพื่อให้ยาสามารถบรรจุเข้าไปในผลึกเหลวได้สูงสุด

5) ศึกษาความสม่ำเสมอของยาในผลึกเหลว โดยนำผลึกเหลวที่เตรียมได้มาประเมินความสม่ำเสมอและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ amphotericin B โดยใช้ HPLC (adapted from Echevarria *et al*, 1998)

6) การวิเคราะห์หาความแรงของยา amphotericin B โดยวิธีทางจุลชีววิทยา ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบความสามารถของยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างยามาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนแล้วกับยา amphotericin B ในสูตรตำรับที่เตรียม วิธีที่ใช้ทดสอบ คือ วิธี Cylinder-Plate ซึ่งใช้หลักการแพร่ของยาผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลิน-

ทรีย์ ทำให้เกิดโซนใส (inhibition zone หรือ clear zone) เชื้อที่ใช้ทดสอบคือเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 (USP, 2003)

7) ทดสอบความไวของเชื้อรา*Cryptococcus neoformans* ต่อยาที่บรรจุในผลึกเหลว โดยวิธี broth microdilution ในถาดชนิด 96 หลุม (Alves *et al.*, 2002) บันทึกค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

8) พัฒนาเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ยาฉีดที่เป็นคอลลอยด์หรือ nanosuspension หรือยาผงแห้ง

9) ศึกษาการปลดปล่อยยาและความคงตัวของยาในสูตรตำรับ

ผลลัพธ์ที่คาดว่าจะได้

1. สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์อนุภาคนาโนรูปแบบผลึกเหลวได้
2. สามารถเพิ่มความคงตัวของยาแอมโฟเทอริซิน บี
3. สามารถปรับปรุงฤทธิ์การฆ่าเชื้อราโดยอาศัยเทคโนโลยีผลึกเหลว

สถานที่ทำวิจัย

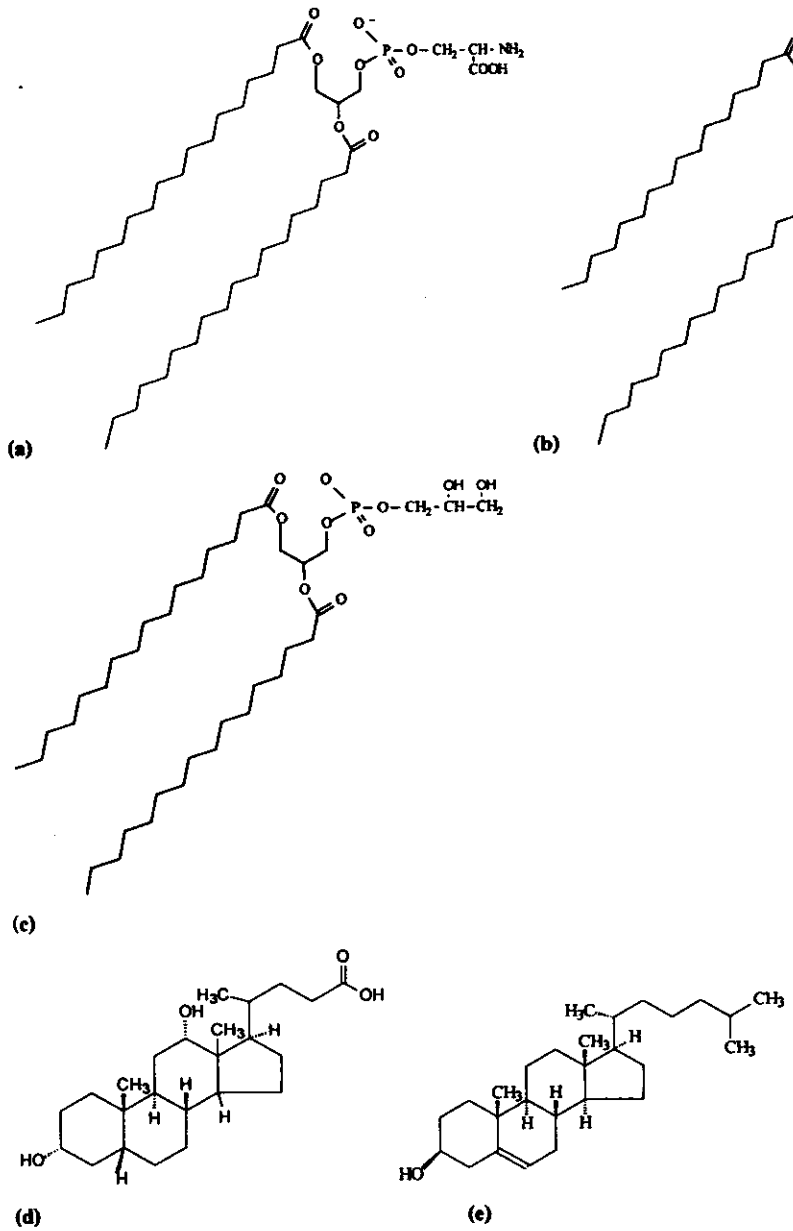
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตารางการปฏิบัติงานในการเพิ่มพูนความรู้ทางวิชาการ

กิจกรรม	เม.ย.-มิ.ย. 50	ก.ค.-ก.ย. 50	ต.ค.-ธ.ค. 50	ม.ค.-มี.ค. 51
1. สังเคราะห์ผลึกเหลวและคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ				
2. ศึกษาคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ คุณสมบัติทางแสงและการเปลี่ยนแปลงวัตภาค				
3. เตรียมสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี ในผลึกเหลวและศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อรา และวิเคราะห์ปริมาณยาด้วย HPLC				
4. ศึกษาการปลดปล่อยตัวยาและความคงตัวของตำรับ				
5. รายงานความก้าวหน้า	สิ้น มิ.ย. 50	สิ้น ก.ย. 50	สิ้น ธ.ค. 50	สิ้น มี.ค. 51

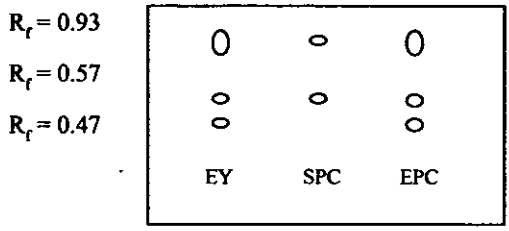
ผลการศึกษาเบื้องต้น

การสังเคราะห์ผลึกเหลวต้องใช้สารตั้งต้นหลักในการสังเคราะห์ 5 ชนิด คือ phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl glycerol, cholesterol และ deoxycholic acid ดังแสดงใน รูปที่ 5 เนื่องจากสารที่ใช้ในการสังเคราะห์กลุ่ม phosphololipids ที่มีความบริสุทธิ์มีราคาแพงมาก (25-100 มิลลิกรัม ราคาประมาณ 50,000 บาท) ขณะที่วัตถุดิบตั้งต้นสามารถซื้อได้ในราคาถูกมาก คือ ไข่แดงและน้ำมันปาล์ม จึงมีแนวคิดที่จะสกัดแยกวัตถุดิบให้บริสุทธิ์แล้วนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น แต่อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่ต้องซื้อสารตั้งต้นบริสุทธิ์มาเป็นตัวเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์สารที่สกัด



รูปที่ 5 สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ผลึกเหลว (a) phosphatidyl serine, (b) phosphatidyl ethanolamine, (c) phosphatidyl glycerol, (d) deoxycholic acid และ (e) cholesterol

จากการแยกไข่แดงออกจากไข่ขาวของไข่ไก่และใช้คลอโรฟอร์มสกัดสารจากไข่แดงเมื่อได้สารสกัดออกมานำไป ระเหยตัวทำละลายออกจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย TLC 3 ระบบ คือ ระบบที่ 1 ประกอบด้วย hexane:ether (80:20 v/v) ระบบที่ 2 ประกอบด้วย hexane:ethyl acetate (60:40 v/v) ระบบที่ 3 ประกอบด้วย hexane:ethyl acetate (40:60 v/v) โดยมี silica gel เป็น stationary phase และอังด้วยไอโอดีนพบว่าระบบที่ 1 และ 2 แยกได้ไม่ดี ระบบที่ 3 ให้ผลดีที่สุดดังนี้



รูปที่ 6 TLC ของ egg yolk (EY), soy phosphatidyl choline (SPC) และ egg phosphatidyl choline (EPC)

จากผลการทดลองสามารถแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบในไข่แดง (EY) หลังการสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มมีองค์ประกอบเหมือนกับ egg phosphatidyl choline (EPC) แต่มีความแตกต่างกับ soy phosphatidyl choline (SPC) ดังนั้นคาดว่าจะสามารถนำเอาไข่แดงมาแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ผลึกเหลวได้ เมื่อตรวจสอบจากเอกสารอ้างอิง Handbook of Pharmaceutical Excipients พบว่า SPC มีองค์ประกอบหลักคือ phosphatidyl choline 21%, phosphatidyl ethanolamine 22%, phosphatidyl inositol 19% ขณะที่ egg phopshatidylcholine มี คือ phosphatidyl choline 69%, phosphatidyl ethanolamine 24% ดังนั้นการจะผลิตสารบริสุทธิ์ออกมาต้องใช้เทคนิค column chromatography ช่วยในการแยก

สารมาตรฐานทั้งสามตัวที่สั่งซื้อจาก Sigma มีดังนี้ คือ L-α- phosphatidyl ethanolamine (dipalmitoyl) [PEA] เป็นสารมีสีขาวดูดความชื้นได้ง่าย L-α- phosphatidyl-DL-glycerol (dipalmitoyl) [PG] เป็นสารสีขาวผงละเอียด ทั้งสองตัวสกัดจากไข่แดง ส่วน L-α-phosphatidyl- L -serine (dipalmitoyl) [PS]ได้จากถั่วเหลืองมีสีขาว การละลายของสารทั้งสามชนิดในระบบ 1, 2, 3 แตกต่างกัน กล่าวคือ PEA ละลายในตัวทำละลายทั้งสามระบบได้ดี แต่ PG ไม่ละลาย เกิดการขุ่น ขณะที่ PS เกิดเจลใสของสาร เมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์บนระบบ TLC พบว่าทั้งสามระบบใช้ได้เฉพาะกับ PEA เท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบแยกสารใหม่ โดยพิจารณาตามระบบที่แนะนำให้ใช้กับ phospholipids ดังนี้ คือ

ระบบที่ 4 chloroform:MeOH:water (65:25:4 v/v/v)

ระบบที่ 5 chloroform:MeOH:water:NH_4OH (65:35:2.5:2.5 v/v/v/v)

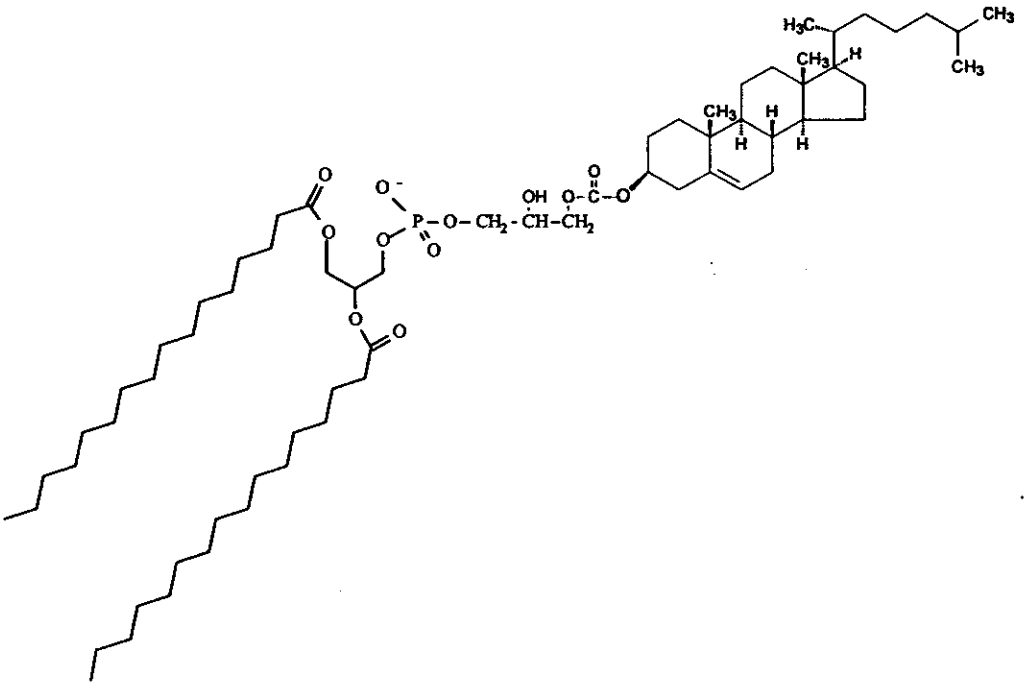
ระบบที่ 6 chloroform:MeOH:CH_3COOH:water (30:40:10:10:5 v/v/v/v)

ระบบที่ 7 hexane:chloroform:MeOH (20:60:20 v/v/v)

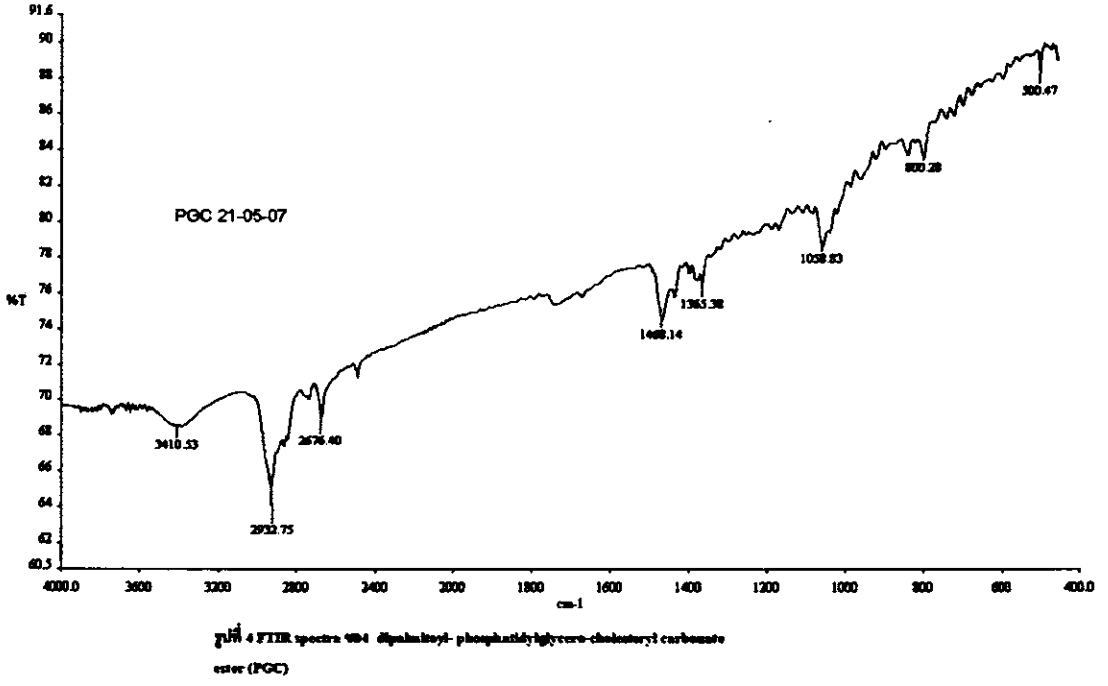
ระบบ 4-6 อ้างอิงจาก New, RRC, Liposome: a practical approach, Oxford University Press, 1990, 109-113.

ผลการตรวจสอบดังนี้ คือ ระบบที่ 4-6 สามารถแยกได้ดีระหว่าง PEA และ PG, PS แต่มีปัญหาตรงที่ PG และ PS เคลื่อนที่พร้อมกับ solvent front และแยกจากกันไม่ได้ ขณะที่ระบบที่ 7 แยกสารได้ทั้งสามตัวโดยเรียงค่า Rf จากมากไปน้อย คือ PEA, PG และ PS ตามลำดับ

การสังเคราะห์ผลึกเหลวจากสารตั้งต้น คือ cholesterol chloroformate กับ 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phospho-(1-rac-)-glycerol โดย cholesterol chloroformate เกิดจากปฏิกริยาระหว่าง cholesterol กับ triphosgene เกิดเป็น chloroformate derivative in situ และทำปฏิกิริยาต่อกับ PG ได้เลยโดยใช้สารสัดส่วน 1:1 molar ratio โดยใช้ PG ประมาณ 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย dichloromethane 5 มิลลิลิตร ใน reaction flask ก้นกลมปริมาตร 50 มิลลิลิตร วางบน ice bath และมี magnetic stirrer คนตลอดเวลา ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 0 เซลเซียส เติม triethylamine ลงไป 200 ไมโครลิตร ขณะเดียวกันเตรียมบิวเรตขนาด 10 มิลลิลิตร โดยบรรจุ cholesterol chloroformate 11.6 มิลลิกรัม ละลายใน dichloromethane 5 มิลลิลิตร ค่อย ๆ หยดสารละลายดังกล่าวลงใน reaction flask ด้วยอัตรา 1 หยดต่อ 5 วินาที จนกระทั่งสารละลาย cholesterol chloroformate หมด คนตลอดเวลาและควบคุมให้อุณหภูมิคงที่ 0°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนเป็นอุณหภูมิห้องและคนต่อประมาณ 24 ชั่วโมง จากปฏิกริยาจะได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็น carbonate ester และมีกรดเกลือเกิดขึ้น ซึ่งถูก triethylamine จับเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้า เกิดเป็นเกลือที่ละลายน้ำและสามารถกำจัดออกโดยการล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง ถ้าหาก amine salt กำจัดออกไม่หมด จะปรากฏหมู่ฟังก์ชันของ amine ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป ถ้าหากการกำจัด amine salt โดยการล้างทำได้ไม่สมบูรณ์จะต้องใช้ dialysis membrane ซึ่งมี molecular weight cut-off 1000 Da ร่วมด้วย จากนั้นกำจัดน้ำออกโดยเทคนิค freeze drying ถ้าหากใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สกัดสารที่สังเคราะห์ได้ ก็ต้องกำจัดน้ำออกด้วย sodium sulfate ก่อนทำให้แห้งด้วย rotary evaporator และนำผลิตภัณฑ์ที่แห้งเก็บใน dessicator ก่อนตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย TLC และ FTIR ต่อไป ซึ่งจากสเปคตรัมที่ได้ของผลิตภัณฑ์จะปรากฏ OH stretching ที่ wave number 3410 cm^{-1} C-H stretching ที่ 2932 cm^{-1} และมี symmetric stretching ของ CH_3 แต่ asymmetric stretching ของ methylene ปรากฏไม่ชัดเจน peak asymmetric vibration ของ P-O_2 ประมาณ 1200 cm^{-1} ไม่ปรากฏชัดเจน carbonyl stretching มีสัญญาณต่ำกว่าของสารตั้งต้น (wave number 1738.98 cm^{-1}) (ดูรูปที่ 7 และ 8 ประกอบ)



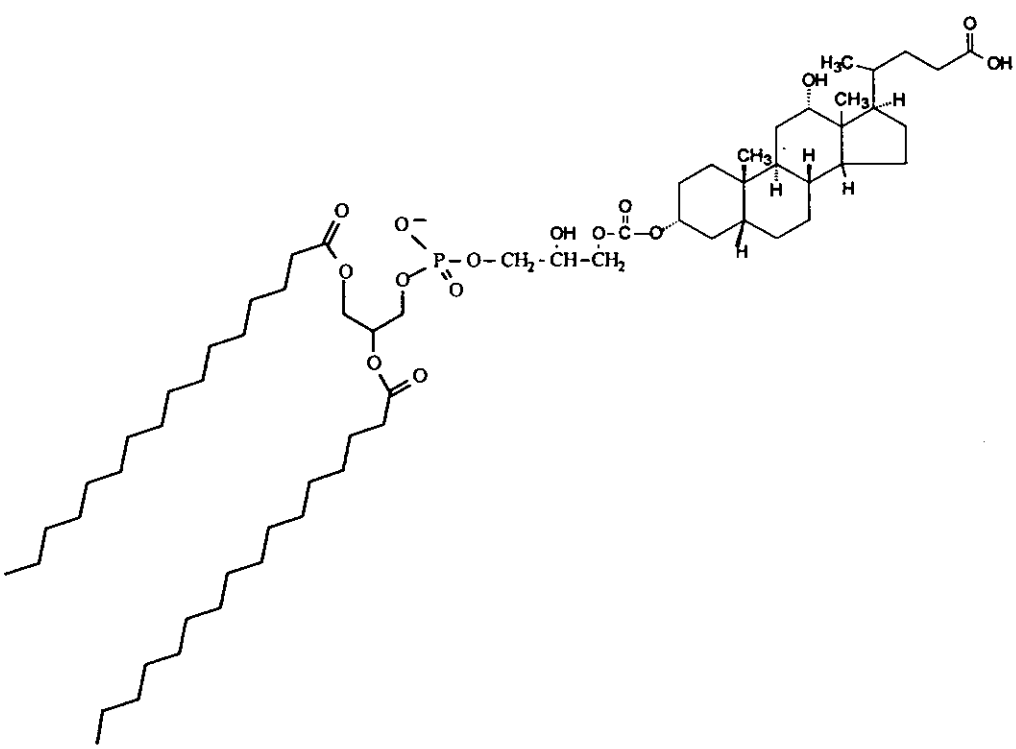
รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์ dipalmitoyl- phosphatidylglycero-cholesteryl carbonate ester (PGC)



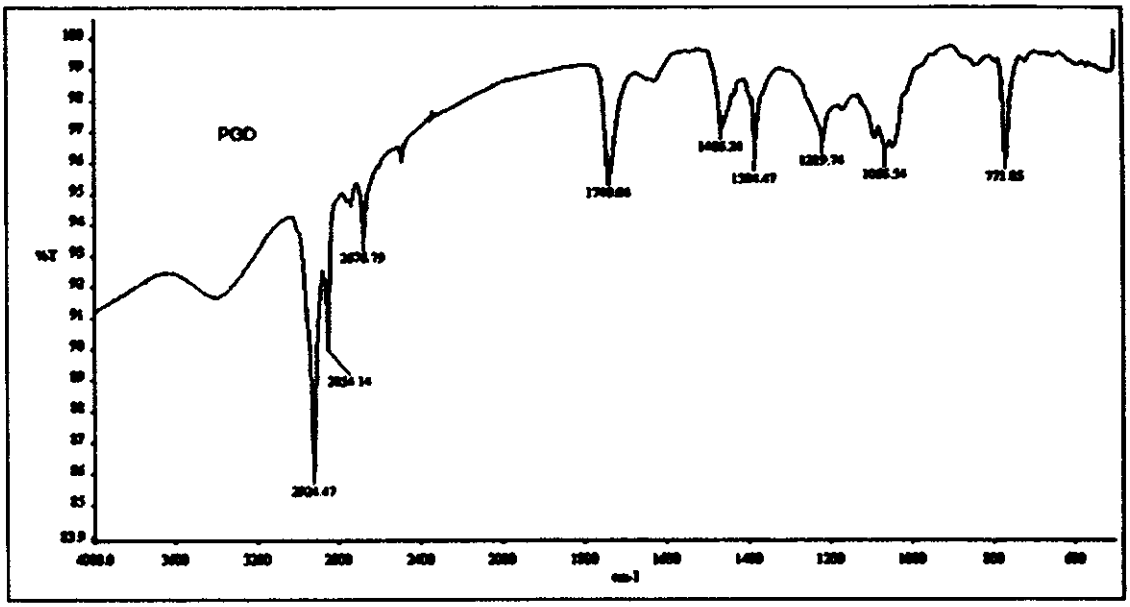
รูปที่ 8 FTIR spectra ของ dipalmitoyl- phosphatidylglycero- cholesteryl carbonate ester (PGC)

อย่างไรก็ตามสารที่สังเคราะห์ได้ยังไม่บริสุทธิ์มากพอที่จะไปตรวจสอบด้วย Proton NMR, ^{13}C-NMR และ MS ทำให้จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์อีกขั้นตอนด้วย column chromatography และตรวจสอบด้วย spectroscopy, mass spectrometry และ elemental analysis ต่อไป

เมื่อต้องการเตรียมสาร deoxycholic acid chloroformate ซึ่งไม่มีจำหน่ายต้องทำการเตรียมเองในห้องปฏิบัติการจาก deoxycholic acid และ triphosgene โดย hydroxyl group ในโมเลกุล deoxycholic acid มี 2 ตำแหน่ง คือ ที่ C_3 และ C_{12} และสารที่สังเคราะห์จะเกิด chloroformate ที่ตำแหน่ง C_3 มากกว่าตำแหน่ง C_{12} จากเหตุผลของ steric hindrance และเมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็เป็นไปตามทฤษฎีที่คาดไว้ จากนั้นนำสารมาใช้เตรียมเป็นผลึกเหลวดังรูปที่ 9 ซึ่งสารดังกล่าวมีสีเหลืองอ่อนลักษณะเหนียวดูดความชื้นได้ง่าย เมื่อพิจารณาผลจากสเปคตรัมของ FTIR พบว่ามีกลุ่มฟังก์ชันหลักดังต่อไปนี้ คือ OH stretching ที่ 3300 cm^{-1} ปรากฏ asymmetric stretching ของ CH_2 และ symmetric stretching ชัดเจนที่ 2924 และ 2854 cm^{-1} ตามลำดับ carbonyl stretching ที่ 1740 cm^{-1} ลดต่ำกว่าเดิมจากของสารตั้งต้น ปรากฏ C-H bending ที่ 1466 cm^{-1} ส่วนที่ 771.8 cm^{-1} คาดว่าอาจเป็น C-Cl ที่กำจัดออกไม่หมดจากปฏิกริยา

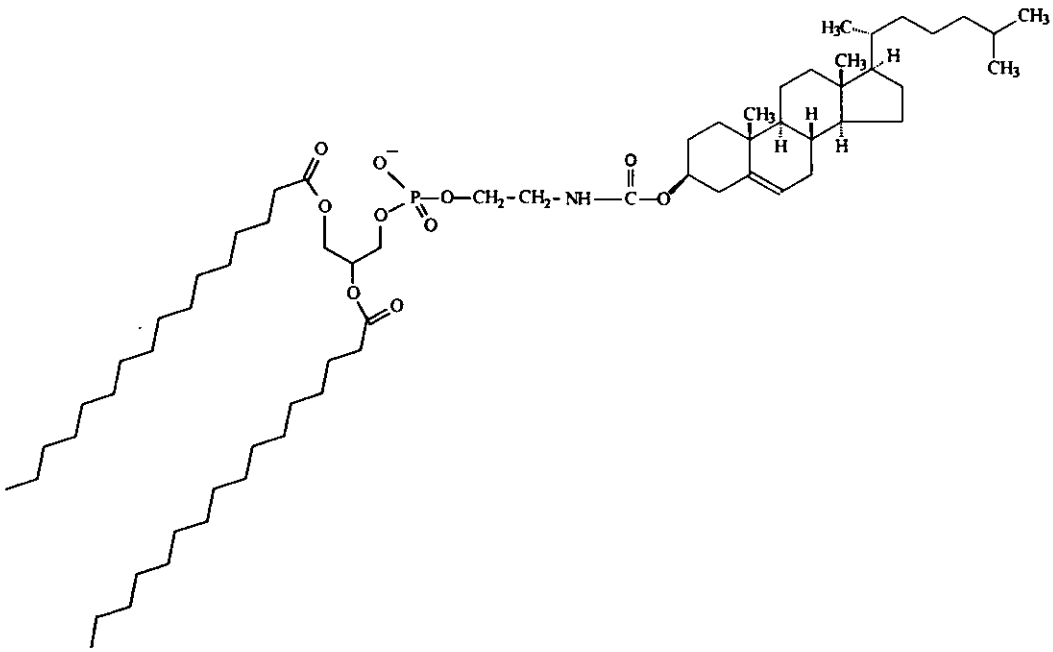


รูปที่ 9 ผลิตภัณฑ์ dipalmitoyl- phosphatidylglycero-deoxycholyl-carbonate ester (PGD)



รูปที่ 10 FTIR ของ dipalmitoyl- phosphatidylglycero- deoxycholyl- carbonate ester

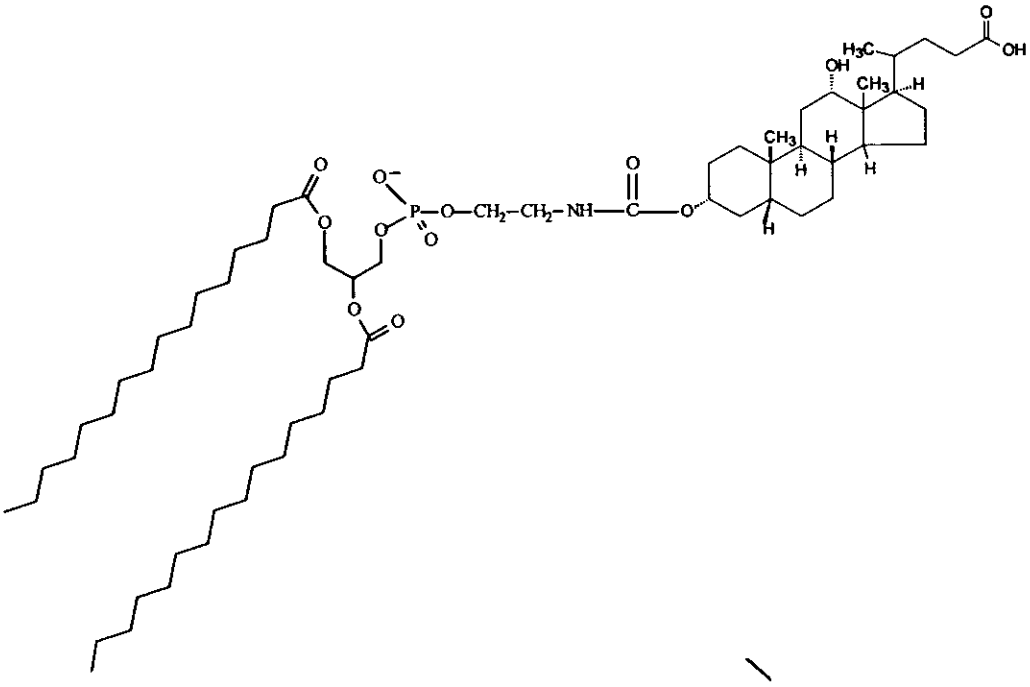
ขณะที่ phosphatidyl ethanolamine เมื่อทำปฏิกิริยากับ cholesterol chloroformate พบว่าสารที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาวฟู เมื่อละลายน้ำจะเกิดฟองได้ง่ายคล้ายสารลดแรงตึงผิวทั่วไป กลุ่มฟังก์ชันหลักที่ต้องพิจารณาคือ N-H stretching, carbamate ester, methyl และ methylene group โดยพิจารณาตามโครงสร้างในรูปที่ 11 โดยไม่ได้แสดง spectra ของ FTIR



รูปที่ 11 ผลิตภัณฑ์ dipalmitoyl-phosphatidyl ethanolamine cholesteryl carbamate ester (PEC)

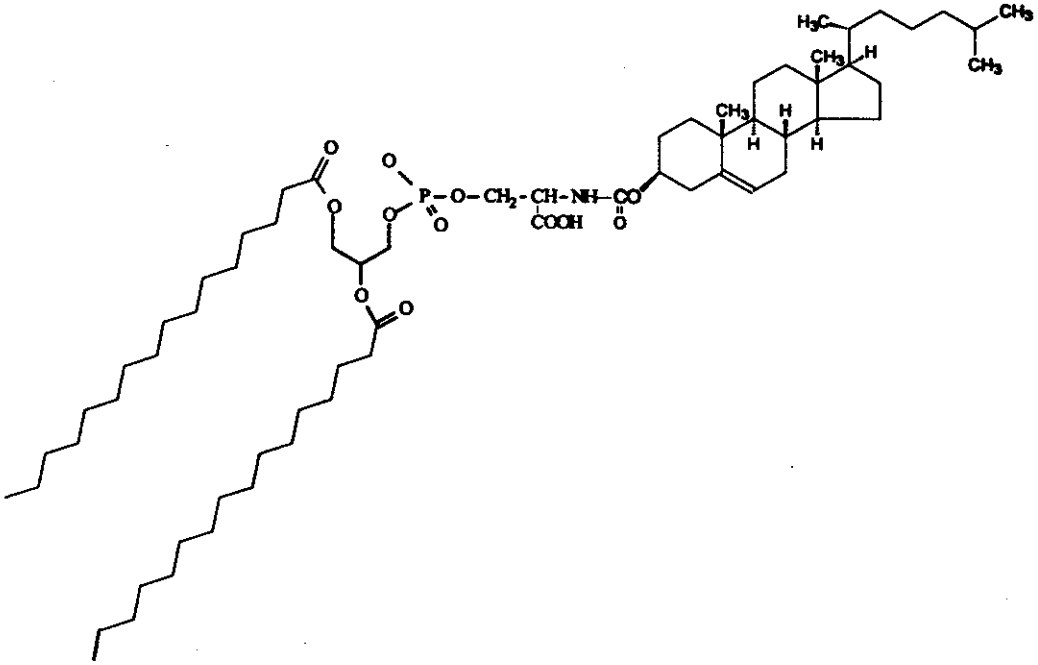
ส่วน phosphatidyl ethanolamine เมื่อทำปฏิกิริยากับ deoxycholic acid chloroformate พบว่าสารที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน เมื่อละลายน้ำจะเกิดฟองได้ง่ายคล้ายสารลดแรงตึงผิว กลุ่มฟังก์ชัน

หลักที่ต้องพิจารณาคือ N-H stretching, carbamate ester, carboxylic acid, methyl และ methylene group โดยพิจารณาตามโครงสร้างในรูปที่12



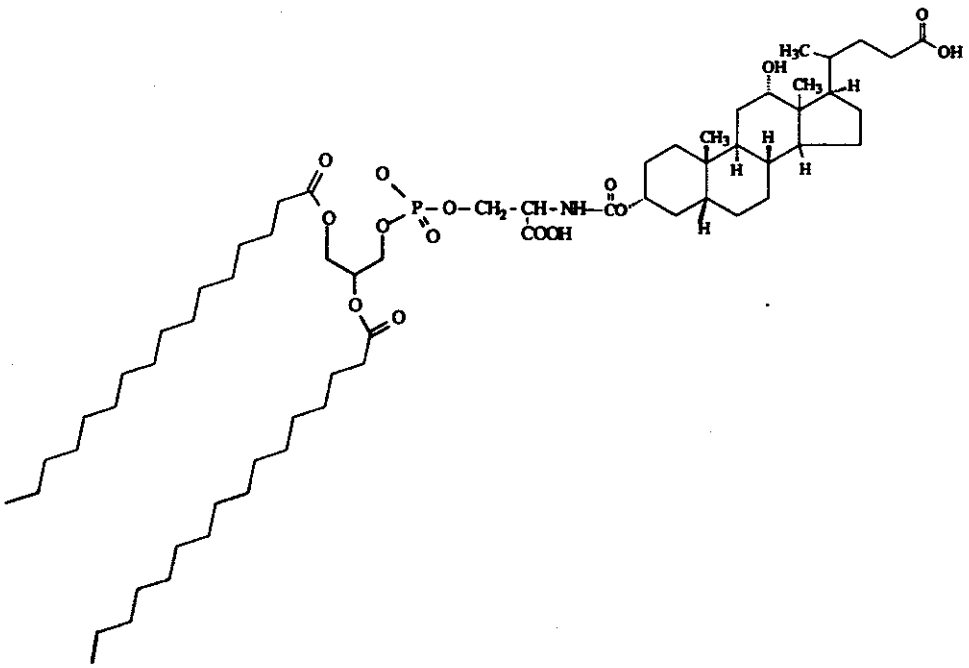
รูปที่ 12 ผลิตภัณฑ์ dipalmitoyl-phosphatidyl ethanolamine deoxycholic acid carbamate ester (PED)

ขณะที่ phosphatidyl serine เมื่อทำปฏิกิริยากับ cholesterol chloroformate พบว่าสารที่ได้ลักษณะเป็นผงสีขาวฟู เมื่อละลายน้ำจะเกิดฟองได้ง่ายคล้ายสารลดแรงตึงผิว กลุ่มฟังก์ชันหลักที่ต้องพิจารณาคือ N-H stretching, carbamate ester, carbonyl stretching, carboxylic acid, methyl และ methylene group โดยพิจารณาตามโครงสร้างในรูปที่ 13



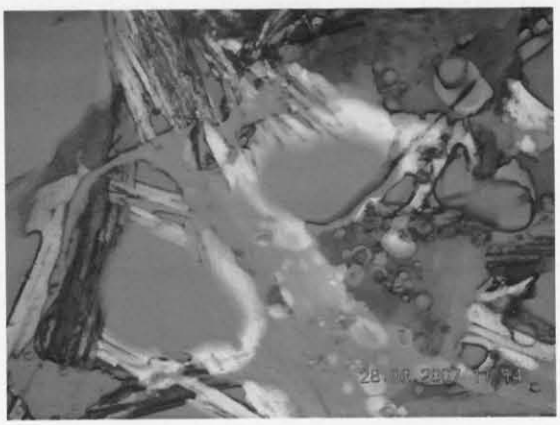
รูปที่ 13 ผลิตภัณฑ์ dipalmitoyl-phosphatidyl serine cholesterol carbamate ester (PSC)

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก phosphatidyl serine เมื่อทำปฏิกิริยากับ deoxycholic acid chloroformate พบว่าสารที่ได้ลักษณะเป็นผงสีเหลือง ละลายน้ำได้ยาก กลุ่มฟังก์ชันหลักที่ต้องพิจารณาคือ N-H stretching, carbamate ester, carbonyl stretching, carboxylic acid, methyl และ methylene group โดยพิจารณาตามโครงสร้างในรูปที่ 14



รูปที่ 14 ผลิตภัณฑ์ dipalmitoyl-phosphatidyl serine deoxycholic acid carbamate ester (PSD)

เมื่อพิจารณาผลึกที่สังเคราะห์ได้ภายใต้ polarized light microscope พบว่าจะมีรูปผลึกที่มีการหักเหแสงสีสันสวยงาม เมื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงวัตภาคเกิดเป็น nematic phase แต่เมื่อวางทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องสารจะกลับมาตกผลึกในรูปแบบเดิม (reversible process) (รูปที่ 15)



ก)

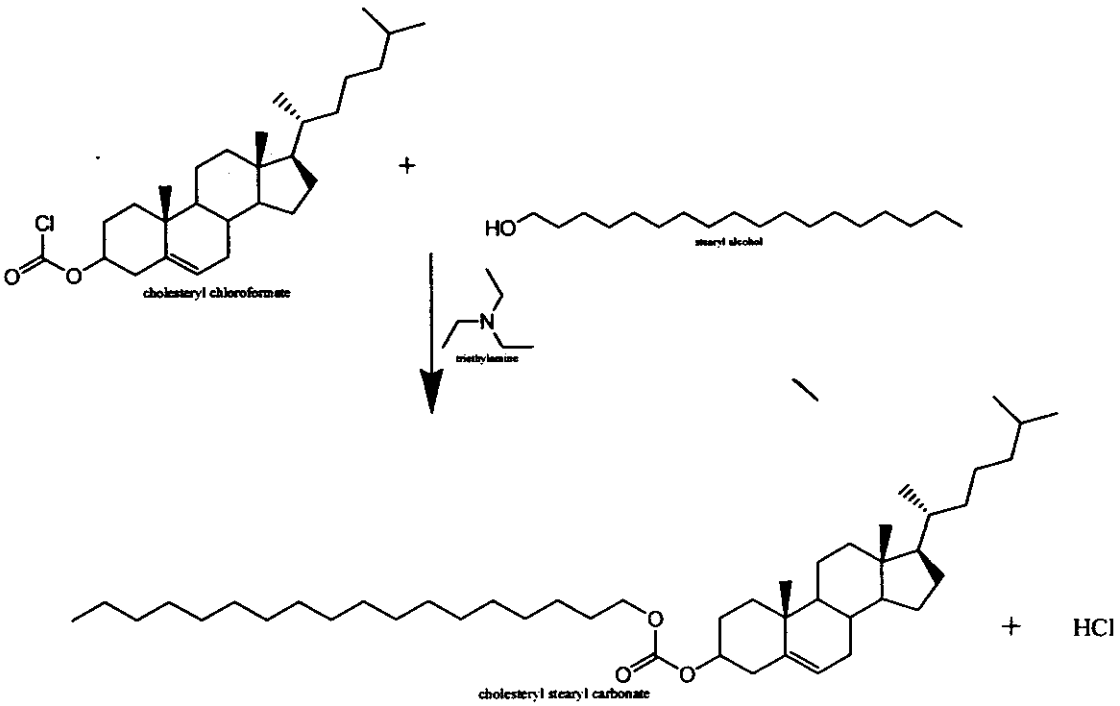
ข)

รูปที่ 15 ผลึกของ dipalmitoyl-phosphatidyl serine deoxycholic acid carbamate ester ภายใต้ polarized light Microscope ก่อน (ก) และหลังการตกผลึกหลังการหลอมเหลว (ข)

เมื่อนำผลึกเหลวสังเคราะห์ที่ได้ 6 ชนิด (dipalmitoyl- phosphatidylglycero-cholesteryl carbonate ester (PGC), dipalmitoyl- phosphatidylglycero-deoxycholyl-carbonate ester (PGD), dipalmitoyl-phosphatidyl ethanolamine cholesteryl carbamate ester (PEC), dipalmitoyl-phosphatidyl ethanolamine deoxycholic acid carbamate ester (PED), dipalmitoyl-phosphatidyl serine cholesterol carbamate ester (PSC), dipalmitoyl-phosphatidyl serine deoxycholic acid carbamate ester (PSD) มาศึกษาสมบัติทางกายภาพ พบว่าสารทั้ง 6 ชนิดมีลักษณะเป็นสารของแข็งที่อุณหภูมิห้อง มีความไวต่อความชื้นมาก สารที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณน้อย เมื่อทำการตกผลึกให้บริสุทธิ์ สารที่ได้มีปริมาณไม่มากเพียงพอที่ใช้ศึกษาวิเคราะห์โครงสร้างอย่างละเอียดและหาน้ำหนักโมเลกุล

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

รวมถึงคุณสมบัติของผลึกที่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและการเปลี่ยนแปลงวัตภาค ประกอบกับสมบัติทางกายภาพไม่เหมาะสมที่จะนำผลึกเหลวเหล่านี้มาใช้ในระบบนำส่งยา ทำให้ต้องสังเคราะห์สารเพิ่มอีก 6 ชนิด ซึ่งยังเป็นอนุพันธ์ของ cholesterol แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ การนำไป conjugate กับ hydrocarbon มี 2 ชนิด (stearyl และ oleyl group) และการนำไปเชื่อมกับกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ glycine, alanine, valine และ leucine โดยปฏิกิริยา condensation ดังแสดงในรูปที่ 16

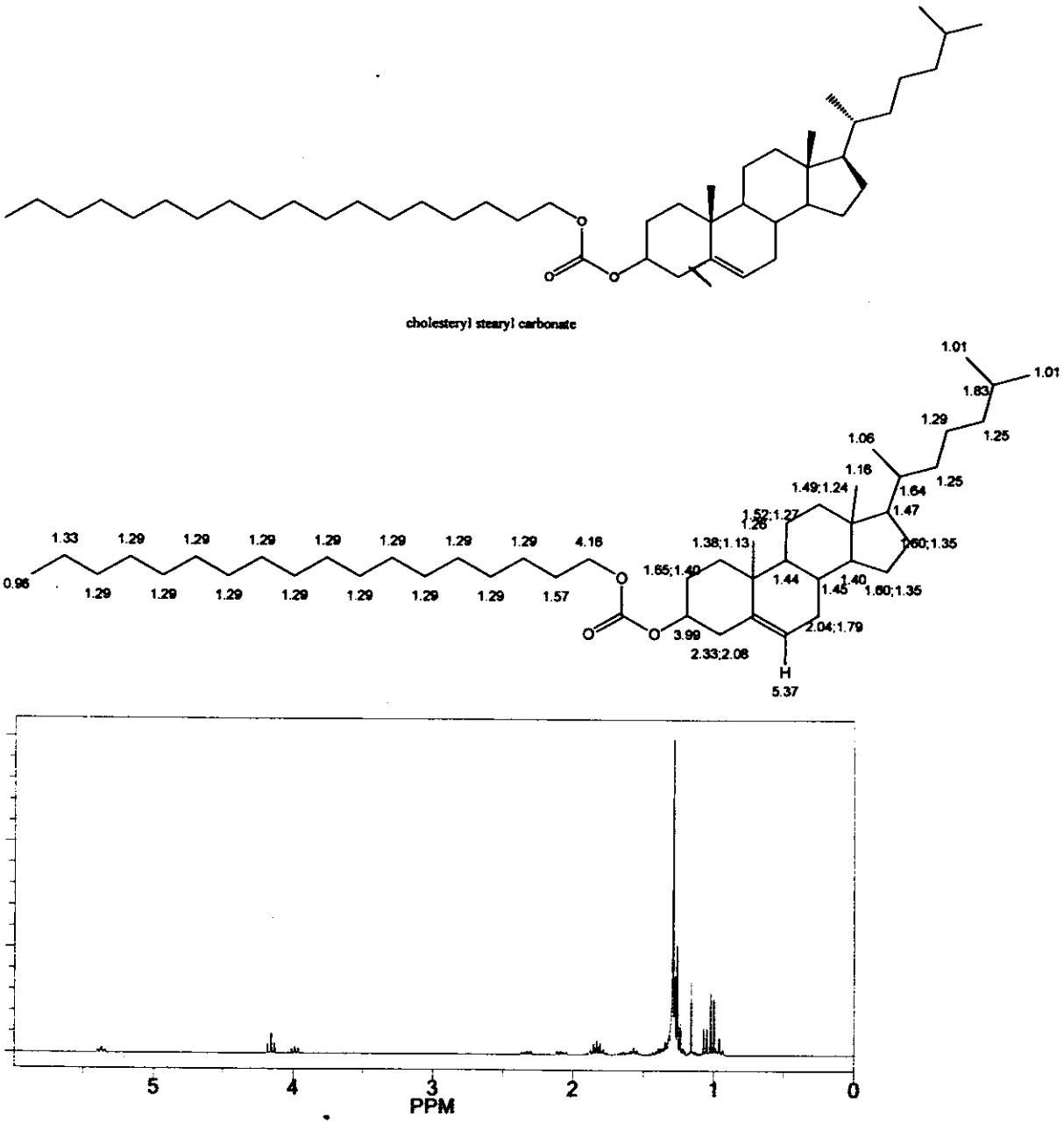


รูปที่ 16 ปฏิกิริยาจากการสังเคราะห์ cholesteryl stearyl carbonate

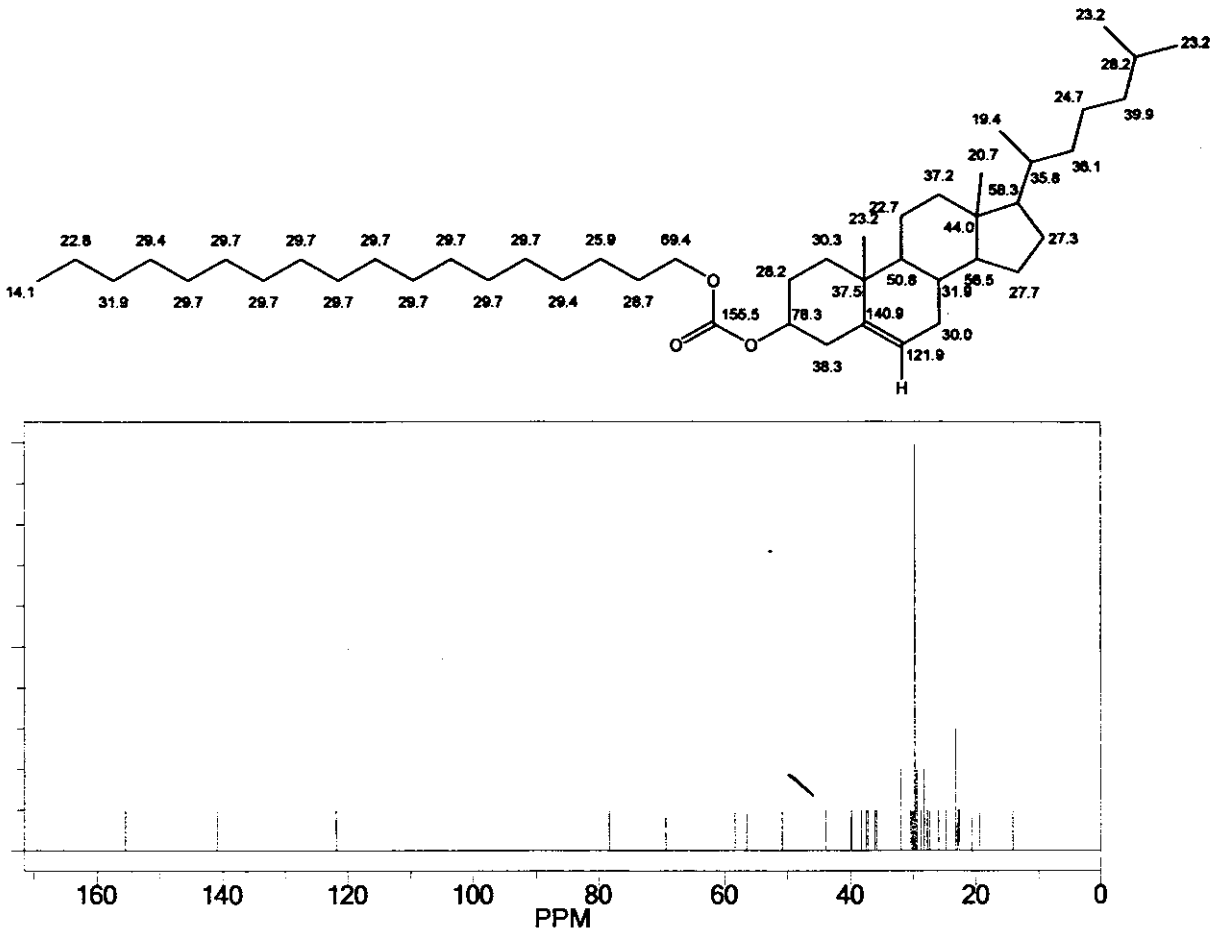
การทำปฏิกิริยาของ cholesteryl chloroformate กับ alcohol หรือกรดอะมิโนต้องทำที่อุณหภูมิต่ำและมี triethyl amine เป็นตัวดึงกรด HCl ออกจากปฏิกริยาทำให้ปฏิกริยาเกิดไปข้างหน้าได้อย่างสมบูรณ์ สารที่สังเคราะห์ได้ คือ cholesteryl stearyl carbonate และ cholesteryl oleyl carbonate มีลักษณะเป็นสารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อทำให้บริสุทธิ์สารมีปริมาณมากพอที่จะทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพได้อย่างครบถ้วน ขณะที่สารอีกสี่ชนิด คือ glycyl cholesteryl carbamate, alanyl cholesteryl carbamate, valyl cholesteryl carbamate และ leucyl cholesteryl carbamate มีลักษณะเป็นของแข็ง มีความหนาแน่นต่ำ มีความฟูสูงและมีปริมาณมากพอที่จะนำมาศึกษาในขั้นต่อไปได้ คุณสมบัติดังกล่าวเหมาะกับการนำไปใช้เป็น carrier ของยาผงแห้งที่ใช้ในทางเดินหายใจ จากการนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารด้วย FTIR พบว่าสารที่สังเคราะห์ได้มีหมู่ฟังก์ชันสำคัญอยู่ในโมเลกุล เช่น การมีหมู่ carbonyl carbonate ester หรือ

การมี amide bond ที่เป็น carbamate group จากนั้นตัวอย่างทั้ง 6 ชนิด ก็นำไป ตรวจสอบด้วย ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR รวมทั้ง DSC และ polarized light microscope

โดยมีผลการทดลองพอสรุปได้ดังนี้ proton NMR ของ cholesteryl stearyl carbonate แสดงดังรูปที่ 17 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในโมเลกุลของสารมีโปรตอนที่อยู่กับ carbon ตัวที่ 1 ใน hydrocarbon chain มีค่า chemical shift ประมาณ 4.1 ppm และ proton ที่ตำแหน่ง C_3 บน steroid ring มีค่า chemical shift ที่ประมาณ 3.99 ppm ประกอบกับ ^{13}C-NMR ในรูปที่ 18 แสดงให้เห็นค่า chemical shift ที่ 155 ppm ของคาร์บอนที่ carbonyl carbonate ester

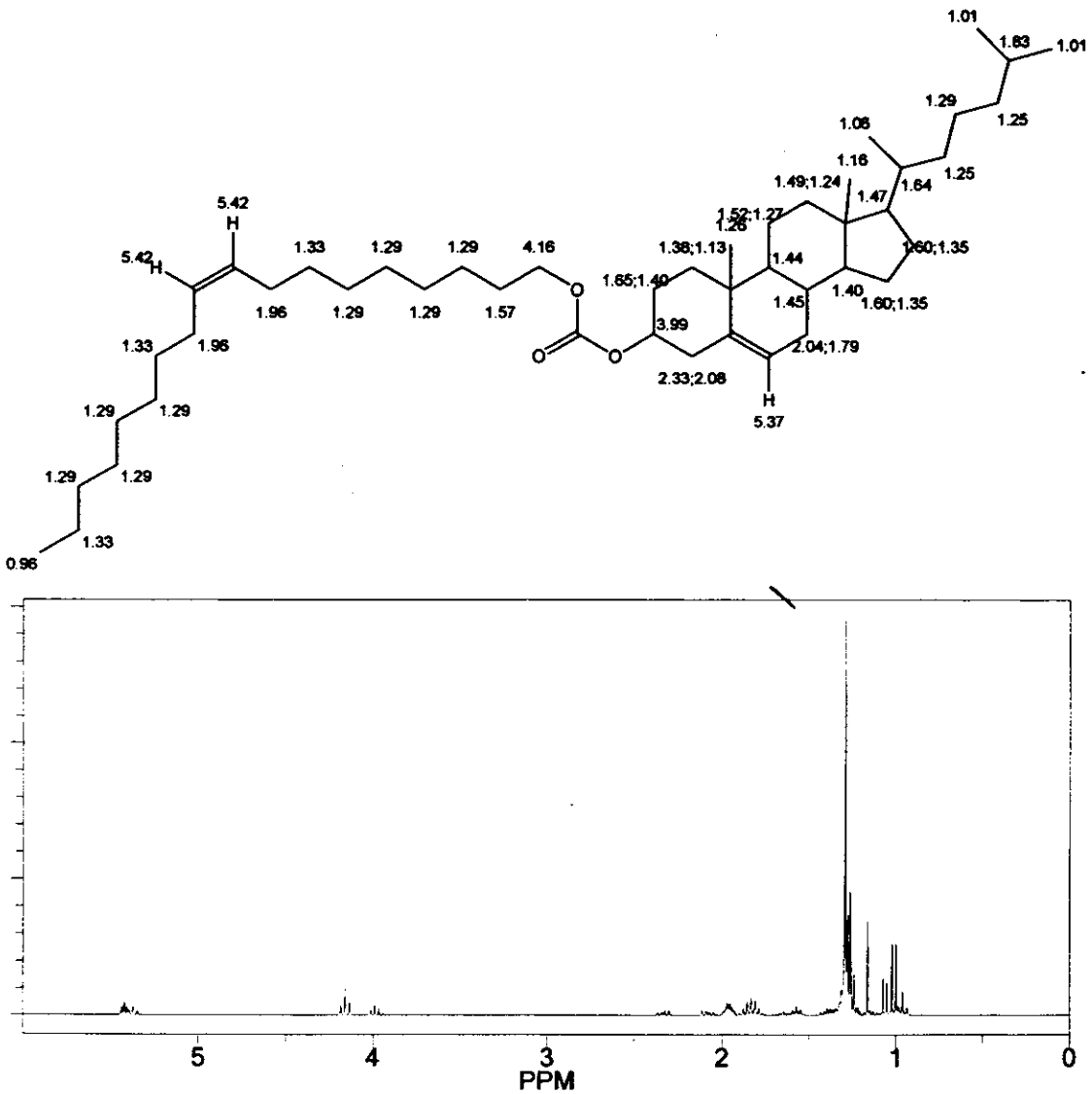


รูปที่ 17 โครงสร้าง ค่า Chemical shift และ ^{1}H-NMR ของ Cholesteryl stearyl carbonate

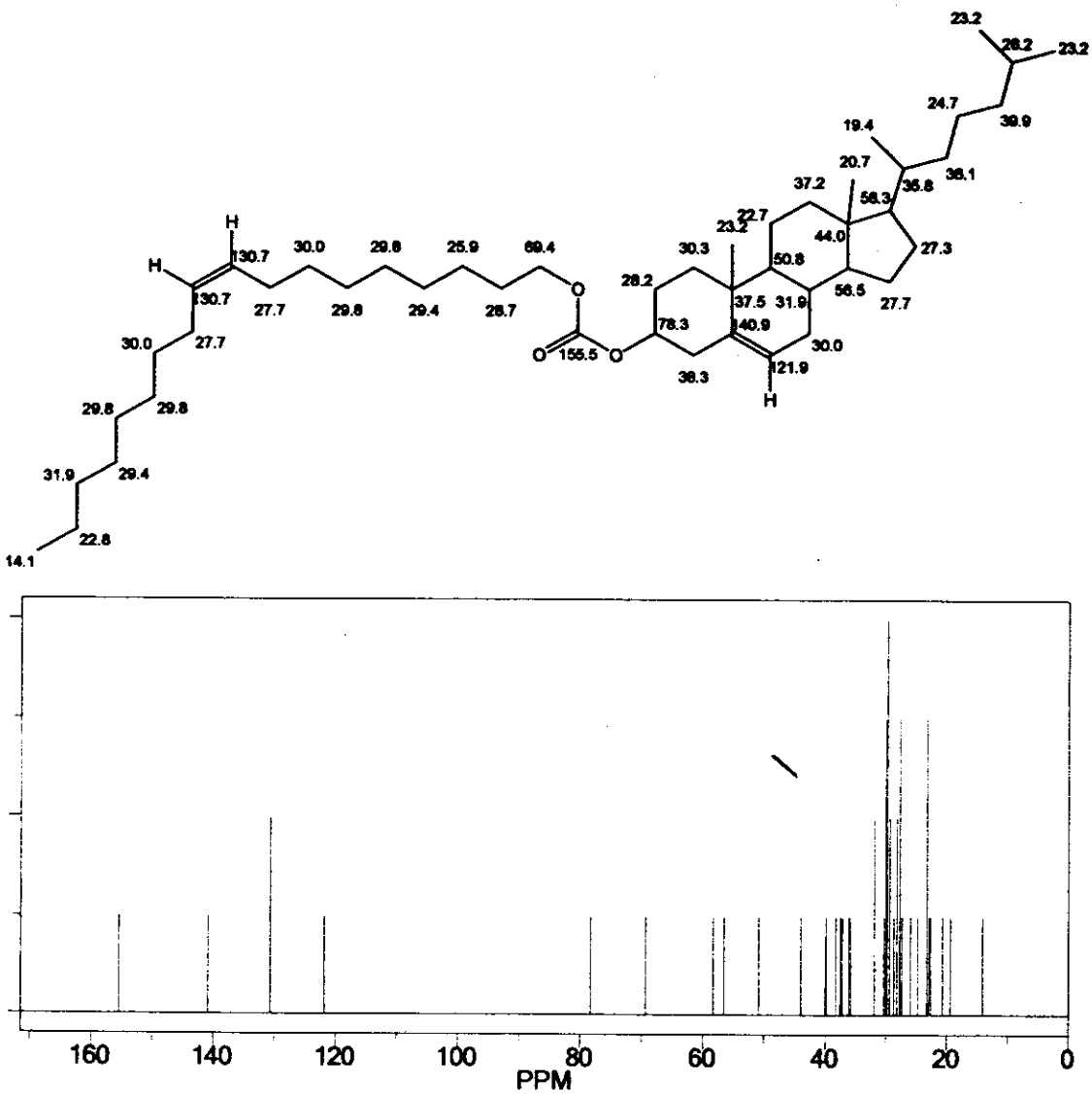


รูปที่ 18 Chemical shift ของ carbon บนโครงสร้างของ cholesteryl stearyl carbonate และ ^{13}C-NMR

และเมื่อเปรียบเทียบกับ cholesteryl oleyl carbonate พบว่าจุดที่แตกต่างกันชัดเจน คือ proton ที่เกาะอยู่บน double bond ใน hydrocarbon chain ซึ่งมีค่า chemical shift ที่ 5.4 ppm ดังรูปที่ 19 ซึ่งแตกต่างกันออกไปอย่างชัดเจนจาก methylene proton บน saturated hydrocarbon chain ของ stearyl ซึ่งมีค่าประมาณ 1.29 ppm ในรูปที่ 18 นอกจากนั้นมีจุดแตกต่างที่สำคัญ คือ ค่า chemical shift ของ carbon พันธะคู่ที่อยู่บนสาย unsaturated hydrocarbon ซึ่งมีค่า chemical shift 130.7 ppm (รูปที่ 20) แตกต่างจากคาร์บอนที่เป็น saturated atom ทั่วไปซึ่งมีค่าเพียง 29.7 ppm ส่วนตำแหน่งอื่นในโครงสร้างก็ปรากฏที่ chemical shift ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 18 และ 20) จากโครงสร้างทางเคมีของสารสองชนิดที่สังเคราะห์ได้ เมื่อพิจารณาในแง่ความคงตัว อาจจะพอทำนายจากโครงสร้างได้ว่า cholesteryl oleyl carbonate คงตัวน้อยกว่า cholesteryl stearyl carbonate เนื่องจาก double bond บน hydrocarbon chain จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ในแง่การละลายอาจจะไม่แตกต่างกันมากนัก คือสารจะละลายน้ำได้น้อย ชอบละลายในไขมัน ซึ่งในขั้นต่อไปเป็นการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

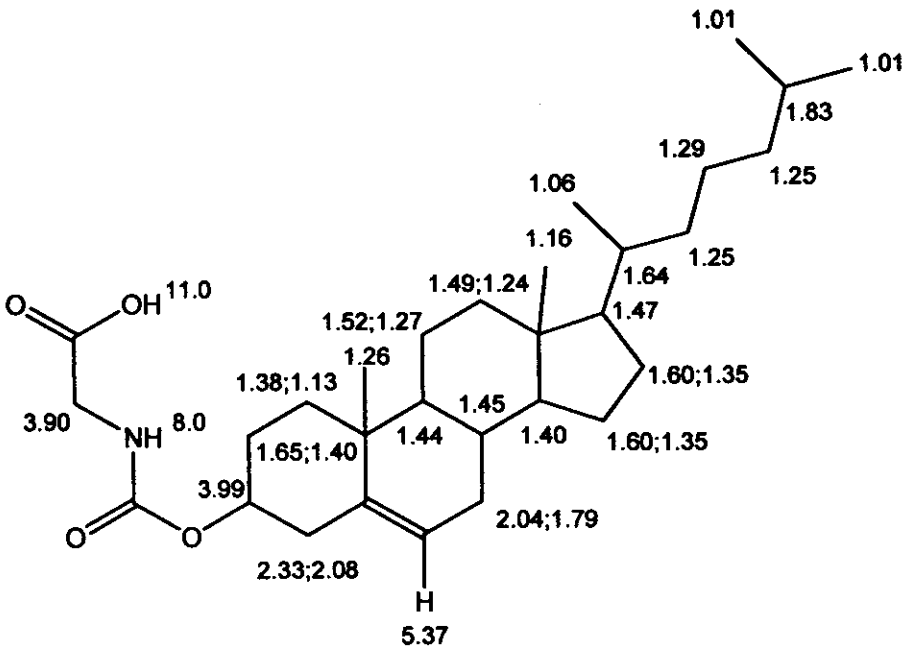


รูปที่ 19 โครงสร้าง ค่า Chemical shift และ ^{1}H-NMR ของ Cholesteryl oleyl carbonate



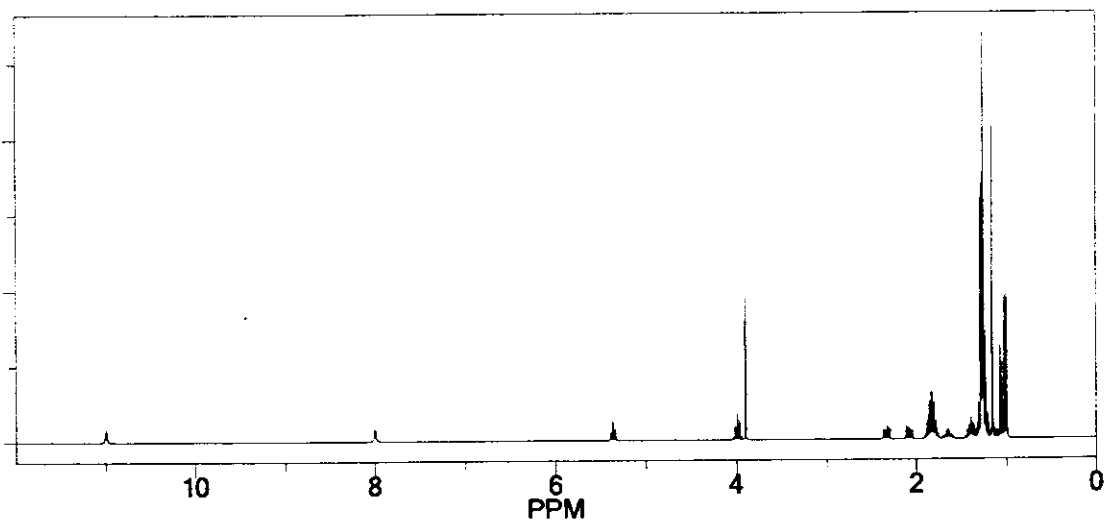
รูปที่ 20 Chemical shift ของ carbon บนโครงสร้างของ cholesteryl oleyl carbonate

เมื่อพิจารณา ^{1}H-NMR ของ cholesterol ที่ conjugate กับกรดอะมิโนทั้งสี่ชนิดจะมีลักษณะที่คล้ายกันเว้นแต่หมู่ฟังก์ชันที่เกิดจากกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 4 ชนิดที่มีความยาวของสายโซ่คาร์บอนที่ยาวขึ้นตามลำดับจาก glycine alanine, valine ถึง leucine โดยในที่นี้จะพิจารณาอย่างละเอียดเฉพาะ glycyl cholesteryl carbamate ดังนี้ คือ สารจะมีน้ำหนักโมเลกุล 487 และมีโครงสร้างดังรูปที่ 21



$C_{30}H_{49}NO_4$
Exact Mass: 487.37
Mol. Wt.: 487.71
m/e: 487.37 (100.0%), 488.37 (33.2%), 489.37 (6.1%)
C, 73.88; H, 10.13; N, 2.87; O, 13.12

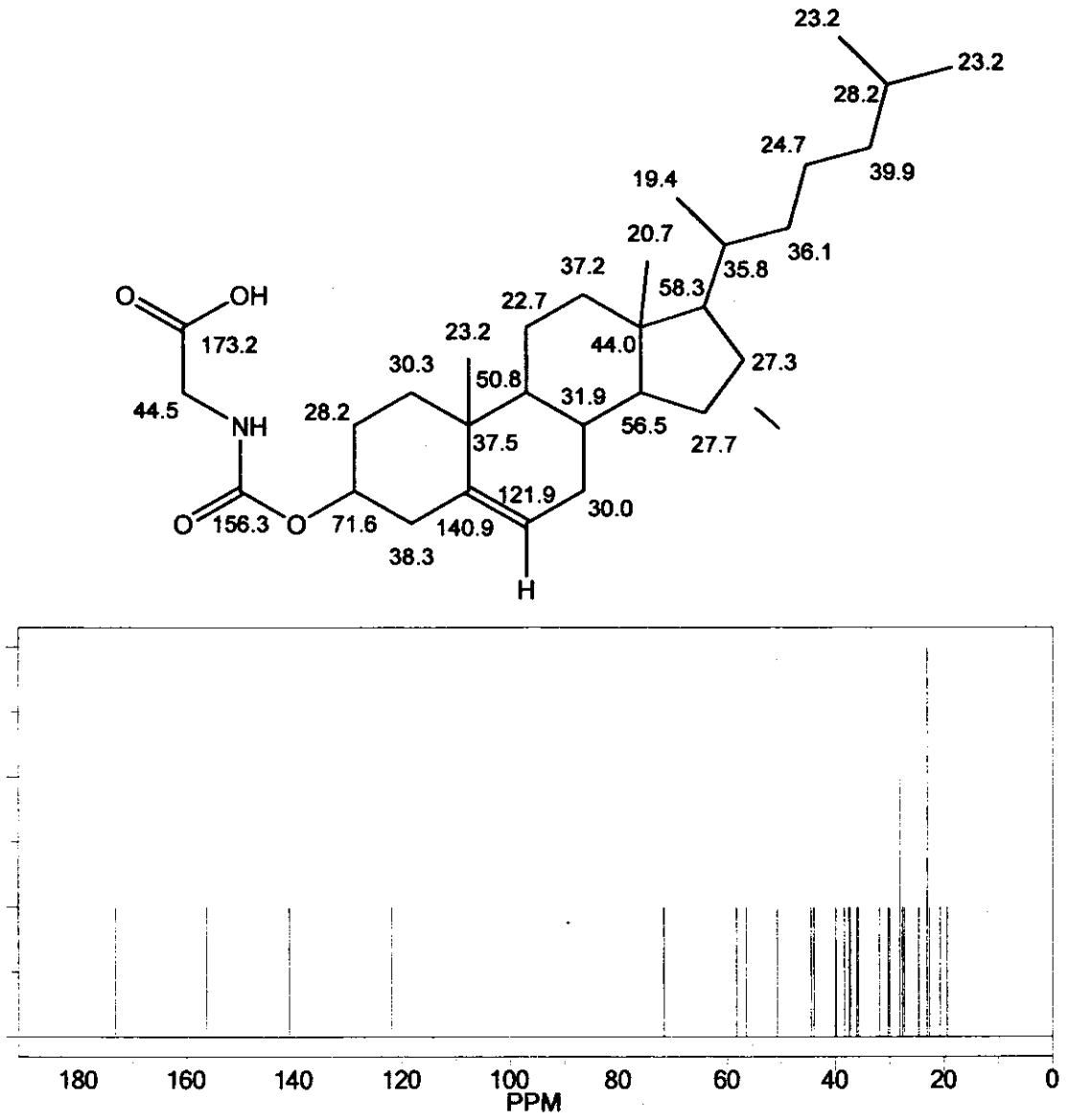
รูปที่ 21 โครงสร้าง ค่า chemical shift ของโปรตอนในโมเลกุล glycyl cholesteryl carbamate



รูปที่ 22 ^{1}H-NMR ของ glycyl cholesteryl carbamate

จากโครงสร้างในรูปที่ 21 และ ^{1}H-NMR รูปที่ 22 พบ proton ของ hydroxyl group ที่ chemical shift ประมาณ 11.0 ppm ขณะที่ secondary amide proton พบที่ chemical shift 8.0 และ methine (-CH-) proton ที่ตำแหน่ง C_3 จะปรากฏสัญญาณที่ chemical shift 3.99 ppm และ methylene proton ของ

ส่วน glycine ปรากฏที่ chemical shift 3.9 ppm เมื่อพิจารณา ^{13}C-NMR พบว่า carbonyl carboxylic acid มีค่า chemical shift สูงสุดประมาณ 173 ppm และ carbonyl ที่ carbamate ปรากฏสัญญาณที่ 156 ppm (รูปที่ 23) จุดที่สำคัญอีกจุด คือ carbon ที่ ตำแหน่ง C_3 และ carbon-carbon double bond จะเป็นตัวยืนยันว่าเกิดสารใหม่ขึ้นและโครงสร้างด้าน cholesterol ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง ลักษณะ spectrum ของสารอีก 3 ชนิด จะไม่ลงรายละเอียด



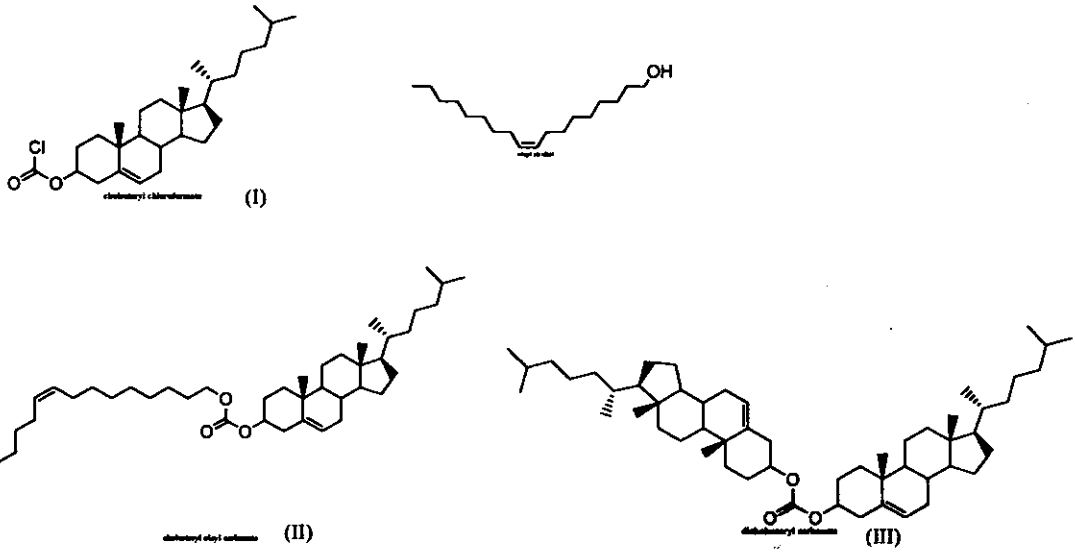
รูปที่ 23โครงสร้าง chemical shift และ ^{13}C-NMR spectrum ของคาร์บอนบนโมเลกุล glycyl cholesteryl carbamate

มีข้อน่าสังเกตจากการวิจัยดังนี้ คือ สารที่มีองค์ประกอบของ cholesterol เมื่อสังเคราะห์ให้เป็นอนุพันธ์ที่มีสมบัติเป็นผลึกเหลว สารที่ได้มีลักษณะเป็น cholesteric mesophase เมื่อมีการลด

อุณหภูมิลง isotropic phase จะเกิดการเปลี่ยนแปลง birefringent phase ขึ้น สังเกตได้จาก polarized light microscope นอกจากนี้ในการสังเคราะห์ cholesteryl alkyl carbonate พบว่าในปฏิกิริยาของ cholesteryl chloroformate (I) กับ alkanol โดยใช้ triethylamine เป็นด่างในการจับกรด HCl จะให้ผลิตภัณฑ์ cholesteryl alkyl carbonate (II) และมีสารอื่นปนอยู่ด้วยคือ dicholesteryl carbonate (III) ในปริมาณสูง ดังแสดงในรูปที่ 24 คาดว่าจะเกิดจากการที่ free cholesterol ทำปฏิกิริยากับ cholesteryl chloroformate แต่ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขโดยการใช้ pyridine แทน triethylamine ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น cholesteryl alkyl carbonate ปริมาณสูง (yield 80%) ดังตารางที่ 1 อีกกรณี คือ ต้องเตรียมโดยใช้ alkyl chloroformate ที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการจาก triphosgene กับ alkanol จนได้ alkyl chloroformate ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากับ cholesterol บริสุทธิ์

ตารางที่ 1 Cholesteryl alkyl carbonates สังเคราะห์

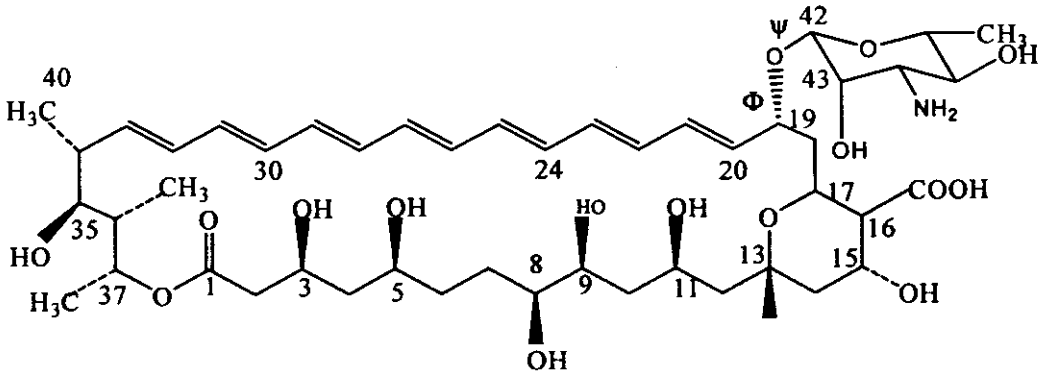
R	Yield (%)	Formula	MW	%C	%H	%O
Stearyl	80	$C_{46}H_{82}O_3$	683.1	80.6	12.0	7.4
Oleyl	79	$C_{46}H_{80}O_3$	681.1	81.1	11.2	7.2



รูปที่ 24 สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของ cholesteryl oleyl carbonate

การนำสังเคราะห์สารที่ได้ 6 ชนิด คือ cholesteryl stearyl carbonate, cholesteryl oleyl carbonate, glycyl cholesteryl carbamate, alanyl cholesteryl carbamate, valyl cholesteryl carbamate และ leucyl cholesteryl carbamate มาศึกษาสมบัติทางกายภาพก่อนที่จะนำไปเตรียมเป็นสูตรผสมกับตัวยาแอมโฟเทอริซิน บี วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญและศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อราของยาที่บริสุทธิ์และสูตรยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีการเติมผลึกเหลวสังเคราะห์ลงไป พบว่า cholesteryl stearyl carbonate (CSC) และ cholesteryl oleyl carbonate (COC) สามารถนำไปละลายในตัวทำละลายได้หลายชนิดและสามารถเตรียมเป็นสูตรตำรับกับยาแอมโฟเทอริซิน บี ได้ ขณะที่อนุพันธ์คอเลสเตอรอลที่เป็นคาร์บาเมตทั้ง 4 ชนิด พบว่าไม่สามารถละลายน้ำและไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีในห้อง ปฏิบัติการ (dichloromethane, chloroform, hexane, methanol, ethyl acetate, dimethyl sulfoxide) สารทั้ง 4 ชนิดมีลักษณะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง มีจุดหลอมเหลวที่สูง (> 200 °C) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าสารชนิดใดก็ตามเมื่อไม่สามารถหาตัวทำละลายที่เหมาะสมได้ ก็จะเป็นอุปสรรคในการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรมและเป็นปัญหาในการนำมาเตรียมเป็นรูปแบบยาที่เหมาะสมได้ โดยเฉพาะความมุ่งหมายที่จะทำให้เกิดอันตรกริยาระหว่างตัวยาแอมโฟเทอริซิน บี กับผลึกเหลวสังเคราะห์ย่อมเกิดขึ้นได้ยาก ทำให้การรายงานในรอบนี้ให้ความสนใจไปเฉพาะ cholesteryl alkyl carbonate และได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ deoxycholic acid ซึ่งมีสมบัติแตกต่างไปจากอนุพันธ์ของ cholesterol

ยาต้นแบบที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ แอมโฟเทอริซิน บี ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาต้านเชื้อรา ซึ่งออกฤทธิ์โดยการจับกับ ergsterol ซึ่งเป็นผนังเซลล์เมมเบรนของเชื้อรา ทำให้ผนังเซลล์สูญเสียคุณสมบัติ เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ทำให้เซลล์เชื้อราตาย แอมโฟเทอริซิน บี ละลายน้ำได้น้อยมาก จะละลายได้ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ตัวยาจะไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 10 °C สลายตัวเมื่อโดนแสง และตกตะกอนได้ง่ายเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย



รูปที่ 25 โครงสร้างของยา amphotericin B

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของยาแอมโฟเทอริซิน บี จากรูปที่ 25 พบว่าโครงสร้างของวงแหวนมีส่วนของ hydrophilic group อยู่ด้านตรงข้ามกับส่วน conjugate double bond ในโมเลกุล หมู่ amino sugar mycosamine เชื่อมกับวงแหวน macrolide โดยพันธะ glycoside ดังนั้น macrolide ใน แอมโฟเทอริซิน บี จึงแสดงคุณสมบัติเป็น amphiphile และ มีความเป็น hydrophilic จากหมู่ carboxyl และหมู่ amino group ค่า pK_a ที่พบมี 2 ค่า คือ 5.7 กับ 10.0 ทำให้ แอมโฟเทอริซิน บี แสดงประจุจากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้โมเลกุลแอมโฟเทอริซิน บี สามารถรวมตัวกันเอง จนทำให้ค่าการละลายลดลง (Gruszecki and Herec, 2003)

การศึกษาเรื่องการรวมตัวของแอมโฟเทอริซิน บี ในระดับโมเลกุลพบว่า แอมโฟเทอริซิน บี ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ มักจะแสดงการเกิดการสั่นภายในโมเลกุลจากส่วน chromophores เช่นเดียวกับ *cis* parinaric acid และ retinoic acid (Gruszecki and Herec, 2003) Mazerski และ Borowski (1996) ได้เสนอสมมุติฐานเพิ่มเติมเกี่ยวกับการรวมตัวของแอมโฟเทอริซิน บี ว่า ในสารละลายต่างๆ แอมโฟเทอริซิน บี สามารถเปลี่ยนจาก monomer เป็น dimer จนกระทั่งรวมตัวกันเป็น polymer โดยที่โมเลกุลของ monomer แอมโฟเทอริซิน บี มีแนวโน้มที่จะเกิดการรวมตัวกันเองเมื่อสัมผัสกับน้ำในระยะเวลาที่นานพอ จากการศึกษาด้วย UV พบว่า monomer แอมโฟเทอริซิน บี เกิดการเปลี่ยนแปลง มีการรวมกันเองเมื่อความเข้มข้นมากขึ้นซึ่งสามารถเห็น band ได้ที่ 340 nm ซึ่งเป็นภาวะ ground state ที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของ chromophores จนกระทั่งเมื่อเกิดการรวมตัวกันเอง ค่า band จะเลื่อนออกไปจากเดิมเป็น hypsochromic shift ซึ่งทำให้การเปลี่ยนแปลงจาก peak หลัก 340 nm ไปอยู่ที่ 329 nm ซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของคุณสมบัติความไม่มีขั้วของแอมโฟเทอริซิน บี เอง การเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำของแอมโฟเทอริซิน บี จนระดับความเข้มข้นของแอมโฟเทอริซิน บี เพิ่มขึ้นถึงจุดหนึ่ง แอมโฟเทอริซิน บี จะเกิดการรวมตัวกันจนเหนือ critical micellar concentration ซึ่งทำให้เกิดการรวมตัวในรูปของ polymer

มีรายงานเพิ่มเติมถึงการเกิดการรวมตัวกันเองว่ามักจะเกิดที่ตำแหน่งของ 35-OH และ amino sugar oxygen ที่ตำแหน่ง O-42 และการเกิด hydrogen bond ของ carboxylic group กับตำแหน่ง 15-OH ส่งผลให้เกิดการรวมตัวมากขึ้นและมีค่าการละลายได้น้อยลง จากคุณสมบัติทั้งหมดของยาแอมโฟเทอริซิน บี และผลึกเหลว COC และ CSC จึงนำมาสู่วิธีการทดลองเพื่อตอบโจทย์ปัญหา 3 ประเด็น คือ เมื่อเตรียมยาแอมโฟเทอริซิน บี ผสมกับ COC หรือ CSC แล้ว ผลึกเหลวทั้งสองชนิด ทำให้แอมโฟเทอริซิน บี คงตัวเพิ่มขึ้นหรือไม่ หมายรวมถึงการเกิด dimerization ลดลงด้วย ประเด็นที่สอง คือ แอมโฟเทอริซิน บี ที่ผลึกเหลวสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบในรูปยาผงแห้ง เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ความคงตัวของแอมโฟเทอริซิน บี เป็นอย่างไร ประเด็นที่สามฤทธิ์การต้านเชื้อราของ

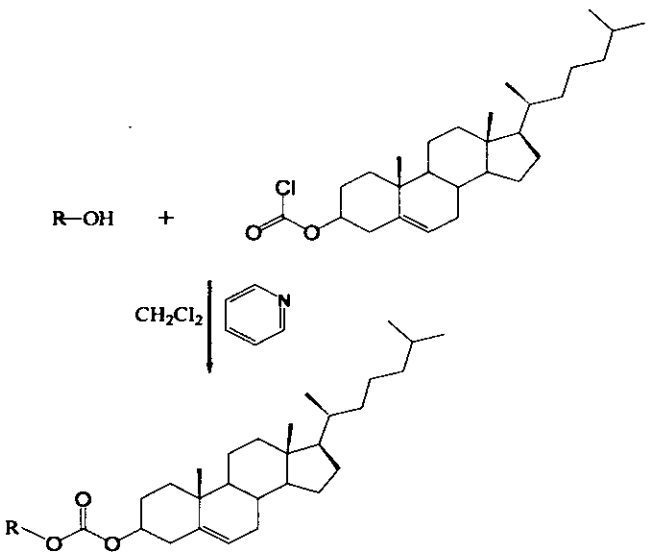
ยาแอมโฟเทอริซิน บี มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรเมื่อมีผลึกเหลวอยู่ร่วมด้วยผลึกเหลวมีส่วนในการเสริมฤทธิ์หรือต้านฤทธิ์ยาหรือไม่

วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์และประเมินคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของผลึกเหลว

ผลึกเหลวที่สังเคราะห์ได้มีทั้งหมด 5 ตัว สาร 4 ตัวแรกเป็นสารประกอบในกลุ่ม cholesteryl carbonate esters ส่วนอีก 1 ชนิด เป็นอนุพันธ์ ether ของ deoxycholate

1) สารกลุ่ม alkyl cholesteryl carbonate : สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ผลึกเหลวได้แก่ สารในกลุ่ม fatty alcohol ที่มีความยาวของ alkyl chain ตั้งแต่ 1-18 ตัว ที่ยกตัวอย่างมามี 2 ตัวคือ cetyl alcohol และ stearyl alcohol ทำปฏิกิริยากับสาร cholesteryl chloroformate (อัตราส่วน 1 : 1 mole) โดยละลายสารตั้งต้นใน dichloromethane และใช้ด่าง pyridine เป็น catalyst การทำปฏิกิริยาจะทำในสภาวะที่แห้งปราศจากน้ำ หลังจากนั้น reflux ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วกำจัด dichloromethane ออกโดยใช้ rotary evaporator ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวนวล ปริมาณผลิตภัณฑ์คิดเป็น 50% รูปที่ 26 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ alkyl cholesteryl carbonate



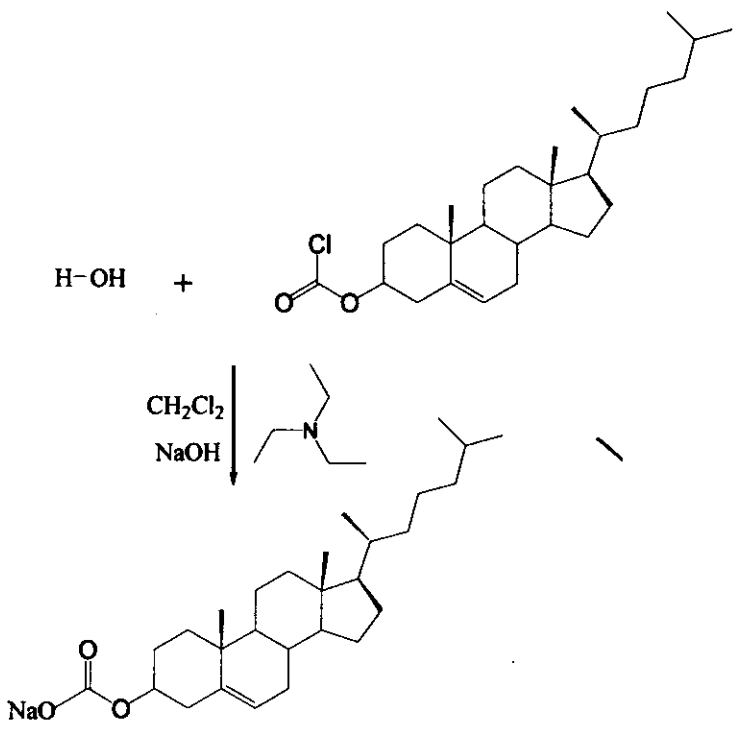
Cholesteryl cetyl carbonate, R = $CH_3(CH_2)_{15}$

Cholesteryl stearyl carbonate, R = $CH_3(CH_2)_{17}$

รูปที่ 26 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารกลุ่ม alkyl cholesteryl carbonate

2) Sodium cholesteryl carbonate: สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ได้แก่ cholesteryl chloroformate และ น้ำ (อัตราส่วน 1 : 1 mole) โดยละลายสารตั้งต้นใน dichloromethane และใช้ด่าง triethylamine เป็น catalyst การทำปฏิกิริยาจะทำในอุณหภูมิต่ำ 0-5 ^{o}C ใน ice bath ทิ้งไว้ที่

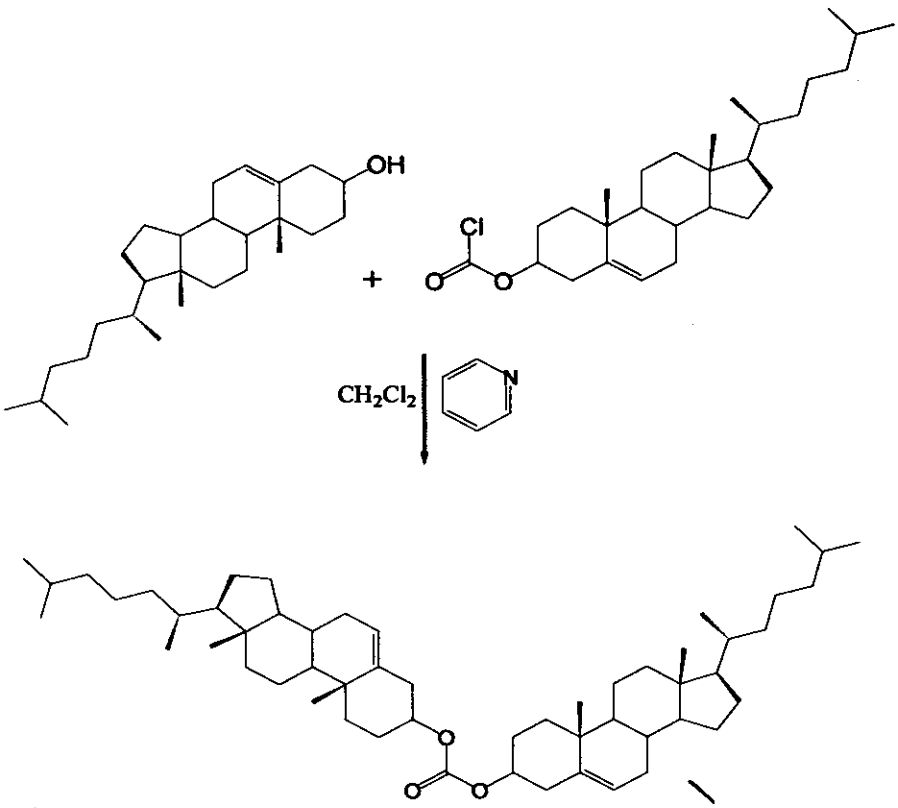
อุณหภูมิห้อง โดยใช้การคนด้วย magnetic stirrer อย่างน้อย 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ แล้วล้างทำความสะอาดด้วยวิธี liquid-liquid extract ด้วยน้ำ 3-5 ครั้งแล้วกำจัดน้ำออกโดยใช้ Na_2SO_4 จากนั้นกำจัด dichloromethane ออกโดยใช้ rotary evaporator ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวนวล ปริมาณผลิตภัณฑ์คิดเป็น 40% รูปที่ 27 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ sodium cholesteryl carbonate



Sodium cholesteryl carbonate

รูปที่ 27 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร sodium cholesteryl carbonate

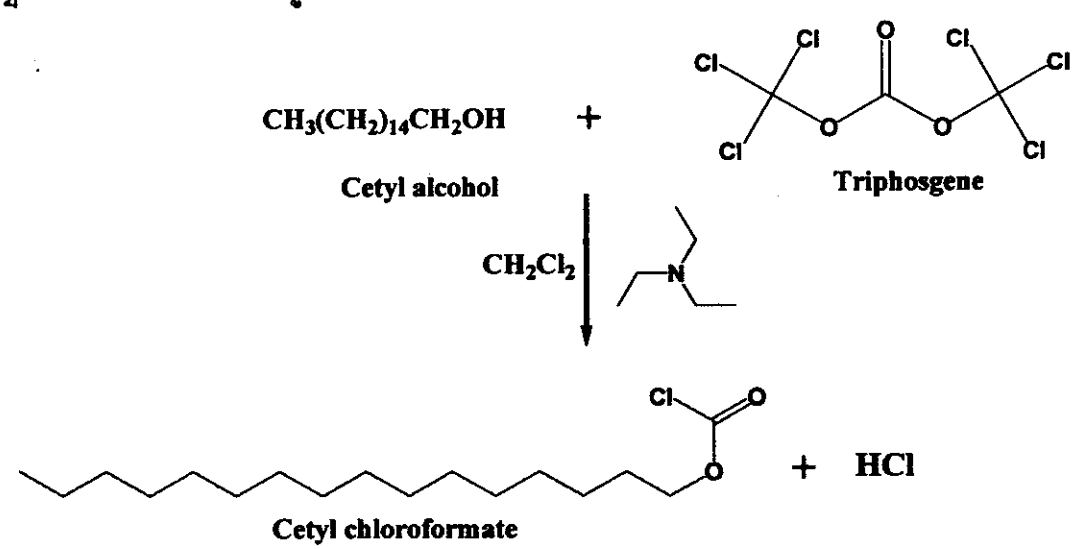
3) สาร dicholesteryl carbonate สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ผลึกเหลวคือcholesterol ทำปฏิกิริยากับสาร cholesteryl chloroformate (อัตราส่วน 1 : 1 mole) โดยละลายสารตั้งต้นใน dichloromethane และใช้ด่าง pyridine เป็น catalyst การทำปฏิกิริยาจะทำในสภาวะที่แห้งปราศจากน้ำ หลังจากนั้น reflux ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วกำจัด dichloromethane ออกโดยใช้ rotary evaporator ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวนวล ปริมาณผลิตภัณฑ์คิดเป็น 50% รูปที่ 28 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ dicholesteryl carbonate



รูปที่ 28 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร dicholesteryl carbonate

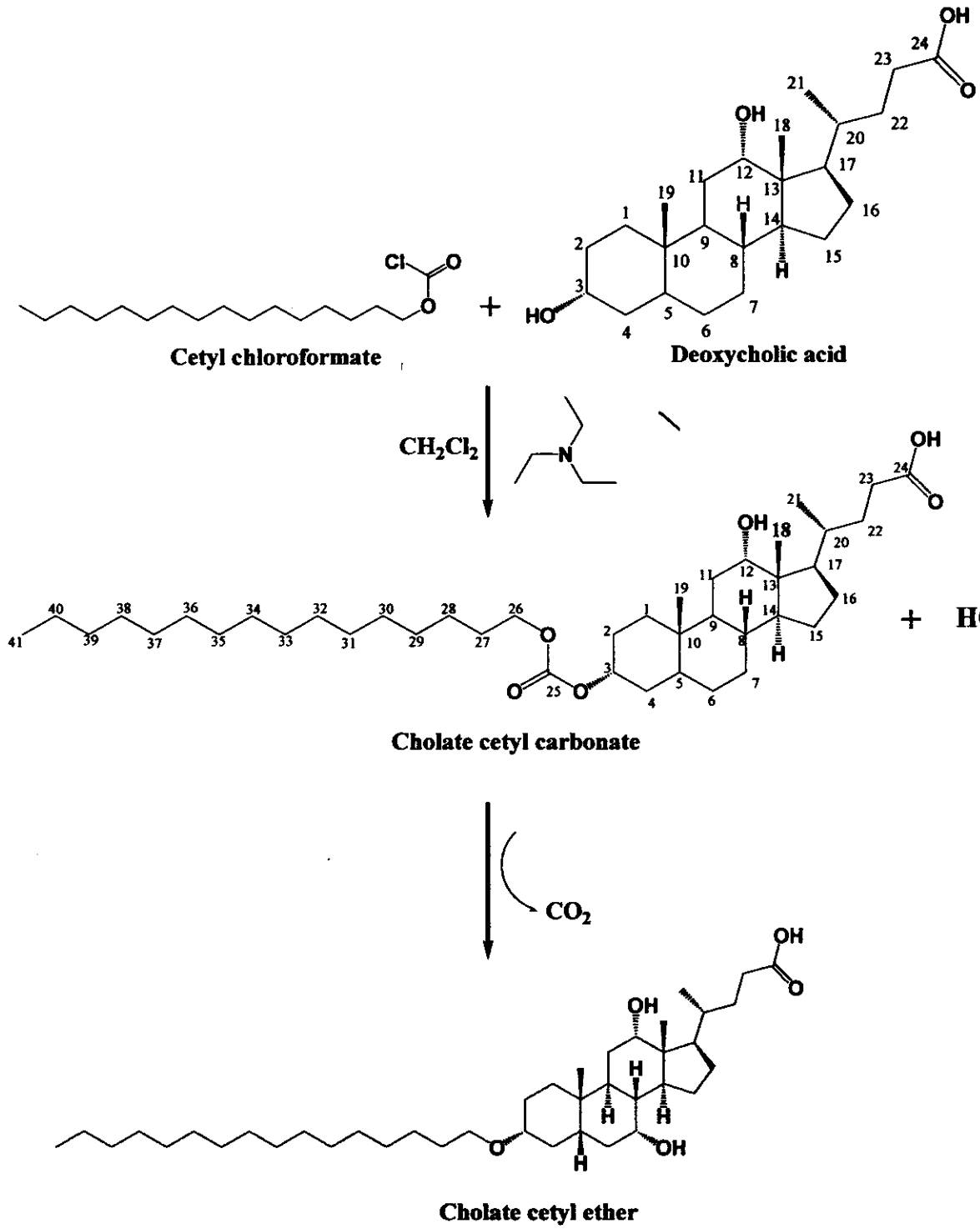
4) อนุพันธ์ ether ของ deoxycholic : ปฏิกริยามีทั้งหมด 2 ขั้นตอน

4.1 สังเคราะห์ cetyl chloroformate จาก cetyl alcohol กับ triphosgene โดยใช้อัตราส่วนโมลเป็น 3 ต่อ 1 ความเข้มข้นประมาณ 0.5 M ใน dichloromethane เป็นตัวทำละลาย 25 มล. และเติม triethylamine ลงไปในปฏิกิริยาจำนวน 1 มล. เพื่อกำจัดกรดเกลือที่เกิดขึ้น ใช้เวลาการทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมงและควบคุมอุณหภูมิการเกิดปฏิกิริยาโดยการหล่อภาชนะด้วยน้ำแข็งตลอดเวลาปฏิกิริยาเกิดดังแผนภาพในรูปที่ 29



รูปที่ 29 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cetyl chloroformate

4.2 นำ Cetyl chloroformate จากข้อที่ 1 มาทำปฏิกิริยากับ deoxycholic acid 0.1 M ที่ละลายด้วย Dichloromethane 25 มล. ใช้เวลาการทำปฏิกิริยาอย่างน้อย 12 ชั่วโมงและเติม Triethylamine ลงไปในปฏิกิริยาจำนวน 1 ml ปฏิกิริยาแสดงรูปที่ 30 ซึ่งสารตัวกลางที่ได้จะเป็น cholate cetyl carbonate แต่เนื่องจากสารไม่คงตัวทำให้มีการจัดเรียงตัวของสารใหม่โดยมีการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ทำให้เกิดเป็นสารในกลุ่ม ether คือ cholate cetyl ether



รูปที่ 30 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cholate cetyl carbonate และการเกิด cholate cetyl ether

2. การเตรียมสูตรตำรับของยาแอมโฟเทอริซินที่มีผลึกเหลวเป็นองค์ประกอบ

1) การเตรียมสารผสมแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีผลึกเหลวเป็นองค์ประกอบในสารละลาย

การเตรียมสูตรตำรับแอมโฟเทอริซิน บี บรรจุในผลึกเหลว 2 ชนิดที่สังเคราะห์ (COC และ CSC) เทียบกับตัวยาแอมโฟเทอริซิน B เดี่ยว โดยมีการเตรียมดังนี้ ชั่งแอมโฟเทอริซิน บี 50 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO และปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม COC และ CSC stock solution โดยการชั่งตัวอย่างละ 10 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสาร 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางแอมโฟเทอริซิน บี ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จากนั้นเตรียมสารละลายผสมของแอมโฟเทอริซิน บี และ COC หรือ CSC ที่มีความเข้มข้นตัวยา 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขณะที่ COC หรือ CSC มีความเข้มข้นประมาณ 7.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมจาก stock solution และเจือจางด้วยน้ำ

2) การเตรียมสารผสมแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีผลึกเหลว DCE เป็นองค์ประกอบ

เตรียมแอมโฟเทอริซิน บี บริสุทธิ์ ที่มีความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากแอมโฟเทอริซิน บี stock solution ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปรับความเป็นกรดด่างด้วยบัฟเฟอร์ pH 7.4 ส่วนการเตรียมแอมโฟเทอริซิน บีผสมกับผลึกเหลว DCE อัตราส่วนโมลเป็นหนึ่งต่อหนึ่ง โดยตัวยาสำคัญมีความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการใช้ phosphate buffer pH 7.4 ความเข้มข้น 100 mM เป็นสารเจือจาง ก่อนนำสูตรตำรับไปทดสอบความคงตัวทางเคมีกายภาพ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการทดสอบความเป็นพิษในเม็ดเลือดแดงและเซลล์เพาะเลี้ยง

3) การเตรียมสารผสมแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีผลึกเหลวเป็นองค์ประกอบรูปแบบผงแห้ง

การเตรียมสูตรตำรับผงแห้งของยาแอมโฟเทอริซิน บี โดยการละลายตัวยาสำคัญและผลึกเหลว ในสารละลายผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร โดยสัดส่วนของตัวยาสำคัญต่อผลึกเหลวคิดเป็นโมล คือ 1:1 mole ratio โดยให้มีตัวยาสำคัญประมาณ 13.5 มิลลิกรัม และมี COC หรือ CSC 10 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายผสมข้างต้น 50 มิลลิลิตร เมื่อได้สารละลายใสทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ผงแห้งที่ได้นำมาทำให้แห้งสนิทใน vacuum drying ก่อนเก็บใน desiccator ที่ควบคุมความชื้นต่ำกว่า 50%RH และป้องกันแสง

โดยการเก็บในขวดสีชา ตรวจสอบความคงตัวด้วย HPLC ตอนเตรียมเสร็จใหม่ ๆ และวางทิ้งไว้ 1, 2 และ 3 เดือนตามลำดับ

4) การเตรียมยาแอมโฟเทอริซิน บี รูปแบบผงแห้งที่มีสารผสมผลึกเหลวเป็นองค์ประกอบ

ของผสมที่ได้จากการสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย cetyl alcohol , cholesterol, cholesteryl cetyl carbonate และ sodium cholesteryl carbonate ในอัตราส่วน 20:30:25:25 %,w/w ซึ่งรวมเรียกว่า cholesteryl cetyl carbonate mixture (CCCM) มาใช้ในการนำส่งยาต้านเชื้อรา amphotericin B ซึ่งการเตรียมตำรับยาใช้วิธีการหลอม (melted method) ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

1) หลอมของผสมผลึกเหลวที่อุณหภูมิ 80 ^{o}C จนของผสมหลอมสมบูรณ์หมด
2) ค่อย ๆเติมผงยา amphotericin B ผสมลงไปและคนจนกระทั่งเข้ากันดี
3) ตำรับยาเตรียมที่ได้จะมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว จากนั้นนำของผสมที่ได้ไปผสมกับสารตัวกลาง (carrier) ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ lactose และ mannitol
4) นำตำรับยาเตรียมที่ได้มาผ่านแร่งขนาด 20 ไมครอน เพื่อควบคุมให้ผงยามีขนาดเล็กลงและสม่ำเสมอ

5) วิธีวิเคราะห์แอมโฟเทอริซิน บี ด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณยาแอมโฟเทอริซิน บี โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ คอลัมน์ที่ใช้เป็น C_{18} reverse phase ขนาด 250 x 4 mm i.d. ขนาดอนุภาคภายใน 10 ไมครอน ใช้ตัวตรวจจับเป็น UV detector ที่ความยาวคลื่น 383 nm เฟสที่เคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น acetonitrile:water (40:60 v/v) โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แอมโฟเทอริซินตรวจพบได้ที่เวลาประมาณ 14 นาที ระบบดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้เป็น stability indicating assay ของยาแอมโฟเทอริซิน บี ได้ (ปรับปรุงจาก Echevarria *et al.*, 1998)

3. การทดสอบความแรงและความไวของยา แอมโฟเทอริซิน บี เมื่อผสมกับผลึกเหลว

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของยาแอมโฟเทอริซิน บี เดี่ยวและที่ผสมกับผลึกเหลวที่อัตราส่วนยาต่อ COC หรือ CSC ที่ 1.35 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ คือ

3.1 การทดสอบความแรงของยาแอมโฟเทอริซิน บี

มีขั้นตอนการทดสอบเป็นดังนี้

1. การเตรียม *S. cerevisiae* (ATCC 9763) บน slant antibiotic medium 19 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และชะตัวเชื้อเพื่อเป็น stock suspension ด้วยน้ำเกลือบริสุทธิ์ และปรับความเข้มข้นของ suspension ให้ได้ 25% transmittance ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตรด้วยน้ำเกลือบริสุทธิ์

2. เติมเชื้อ *S. cerevisiae* ข้างต้นที่ได้ 1 มิลลิลิตรลงใน antibiotic medium ที่ผ่านการทำไร้เชื้อ 8 มิลลิลิตร ขณะอุณภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลง plate และวางทิ้งไว้ให้แข็งตัว กำจัดไอน้ำที่ผิวหน้าออกโดยอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วาง assay cylinder 6 อัน ในแต่ละ plate

3. เตรียมสารมาตรฐานยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 0.64, 08, 1.0, 1.25, 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. เตรียมสารตัวอย่างแอมโฟเทอริซิน บี ที่ผสมกับผลึกเหลวโดยตัวยาสำคัญมีความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อเจือจางด้วยบัฟเฟอร์เป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.วิเคราะห์ความแรงของยาแอมโฟเทอริซิน บี ในสูตรต่าง ๆ ตามรายละเอียดที่ระบุไว้ใน USP 26

3.2 การทดสอบความไวของยาแอมโฟเทอริซิน บี โดยวิธี Agar diffusion

มีขั้นตอนการทดสอบเป็นดังนี้

1. เตรียม Agar แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3.6 มิลลิลิตรนำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 50°C

2. เตรียม Antibiotic medium 3 broth ลงในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารละลายตัวอย่างให้เป็น 2-Fold serial dilution จนครบ 10 ความเข้มข้น

3. เติม แอมโฟเทอริซิน บี ที่ทำ 2-Fold serial dilution จำนวน 50 µl แล้วลงใน agar ที่มีอุณหภูมิ 40 °C ดังนั้น ยาจะทำให้ถูกเจือจางลงไปอีก 10 เท่า ซึ่งความเข้มข้นของยาแต่ละหลุมตามลำดับเป็นดังนี้ 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15, 0.07, 0.03, 0.01, 0.009 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมผลึกเหลวสังเคราะห์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วงระหว่าง 100–200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเมื่อรวมส่วนของยา แอมโฟเทอริซิน บี กับผลึกเหลวสังเคราะห์แล้วจะต้องมีปริมาตรเท่ากับ 0.4 มิลลิลิตร

4. เท Agar ที่ผสมยาลงใน 12 well–plate รอจน agar แข็งตัว

5. เตรียมเชื้อ *C. neoformans* ให้มีความเข้มข้น 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร เตรียมหยอดใส่ในหลุมที่ 1-11 โดยหยอดลงบนหน้า Agar ให้ได้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร จำนวน 3 วง (หลุมที่ 11 ไม่มียามีเฉพาะเชื้อใช้สำหรับเป็น positive control เพื่อดูการเจริญเติบโตของเชื้อ และในหลุมที่ 12 ไม่มีทั้งยาและเชื้อใช้เป็น negative control สำหรับตรวจเช็คความปราศจากเชื้อในหลุม)

6. นำ 12 well–plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านค่า MIC ที่ได้จากหลุมที่มีค่าน้อยที่สุดที่ไม่ปรากฏ Colony ของเชื้อ

7. ทดสอบหาค่า MIC ของยา แอมโฟเทอริซิน บี เทียบกับ แอมโฟเทอริซิน บี ผสมกับผลึกเหลวสังเคราะห์

4. การทดสอบความเป็นพิษของยาแอมโฟเทอริซิน บี เมื่อผสมกับผลึกเหลวสังเคราะห์

4.1 การแตกของเม็ดเลือดแดง

เม็ดเลือดแดงที่ใช้เป็นของคนปกติและผ่านการล้างด้วย phosphate buffer saline pH 7.4 ทั้งหมด 3 ครั้งก่อนนำมาเจือจางด้วย PBS 50 เท่า และทดสอบกับยาแอมโฟเทอริซิน บี และยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ผสมผลึกเหลว ที่ ความเข้มข้นสุดท้าย 1, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสุ่มตัวอย่างมาทดสอบเมื่อครบเวลา 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง เม็ดเลือดแดงที่แตกถูกแยกออกจากสารละลายโดยการปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำฮีโมโกลบินที่ละลายในสารละลายใสส่วนบนมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยสามารถคำนวณการแตกของเม็ดเลือดแดงได้จากสูตร % hemolysis = $100*(Ab_S-Ab_{S0})/(Ab_{S100}-Ab_{S0})$ การแตกของเม็ดเลือดแดง 100% (Ab_{S100}) เตรียมได้โดยการเจือจางเม็ดเลือดแดงด้วย 1% Triton X และค่า Ab_{S0} เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเจือจางเม็ดเลือดแดงด้วย PBS ค่า Ab_S คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเจือจางเม็ดเลือดแดงด้วยสารละลายตัวอย่าง

4.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์

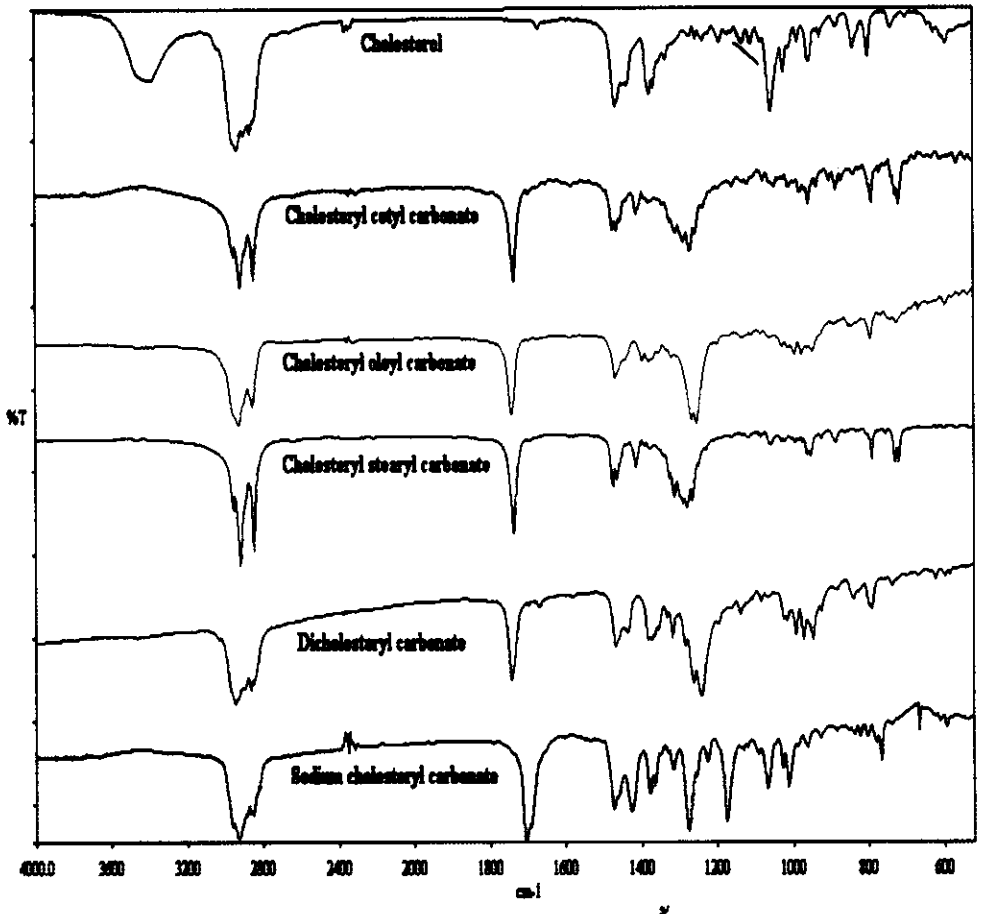
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทำในเซลล์ 2 ชนิด คือ rat alveolar macrophage (NR 8383, ATCC) และ mouse monocyte (J774.2) โดยเลี้ยงใน modified Kaighn's modification Ham F-12K ที่เติม 15% FBS และ DMEM ที่เติม 2 mM L-glutamine และ 10% FBS ตามลำดับ ภายใน 5%CO_2 incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้เป็น $5*10^5$ cells/ml และปิเปตเซลล์ซัสเพนชัน 100 ไมโครลิตร ลงใน well บ่มไว้ค้างคืนก่อนเติมตัวอย่างที่ทำการทดสอบลงไป 100 ไมโครลิตร ซึ่งผลึกเหลวแต่ละชนิดจะทำการทดสอบที่ 5 ระดับความเข้มข้น ขณะที่ตัวยาสำคัญมีความเข้มข้น 3 ระดับ (100, 50 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีสารผสมระหว่างตัวยาแอมโฟเทอริซิน บี และผลึกเหลวทั้งสามชนิดด้วย และบ่มเซลล์กับสารต่าง ๆ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารตัวกลางทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยอาหารใหม่ 3 ครั้ง ๆ ละ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 50 ไมโครลิตรของ MTT solution ลงไป และเติมอาหารใหม่ลงไปเจือจาง 150 ไมโครลิตรและบ่มเซลล์อีก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นกำจัดสารละลายส่วนใสออกจะเหลือเฉพาะผลึกของ formazan salt ซึ่งสามารถละลายด้วย DMSO 200 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณได้จาก %Celll viability = Abs (sample)/Abs (control)*100 โดยค่าการดูดกลืนแสงของ control ได้จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าผสม DMSO เจือจางที่มีปริมาณเท่ากับการใช้เจือจางสารตัวอย่าง

ผลการทดลอง

1. คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของผลึกเหลว

ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค flash column chromatography โดยใช้ silica gel G60 เป็น stationary phase และใช้ $CHCl_3$: hexane (1:4, v/v) เป็น eluent แล้วนำสารสังเคราะห์ไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเปรียบเทียบกับ cholesteryl oleyl carbonate ซึ่งเป็นผลึกเหลวที่มีผลิตโดยบริษัท Sigma chemicals และเป็น unsaturated alkyl chain ของ cholesteryl carbonate

รูปที่ 31 เป็นการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของผลึกเหลวชนิดต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าสารในกลุ่ม alkyl cholesteryl carbonate ซึ่งได้แก่ cholesteryl cetyl carbonate (CCC), cholesteryl stearyl carbonate (CSC), cholesteryl oleyl carbonate (COC) และ dicholesteryl carbonate (DCC) พบ carbonyl peak (C=O) ซึ่งเป็น carbonate ester ที่ wave number 1736-1743 cm^{-1} และพบ O-C-O stretch ที่ 1260-1270 cm^{-1} ส่วนในเกลืออนินทรีย์ของ cholesteryl carbonate (sodium cholesteryl carbonate, SCC) พบ carbonyl peak (C=O) ของ carboxylate ที่ wave number 1705 cm^{-1} และ พบ O-C-O stretch ที่ 1276 cm^{-1} ดังตารางที่ 2

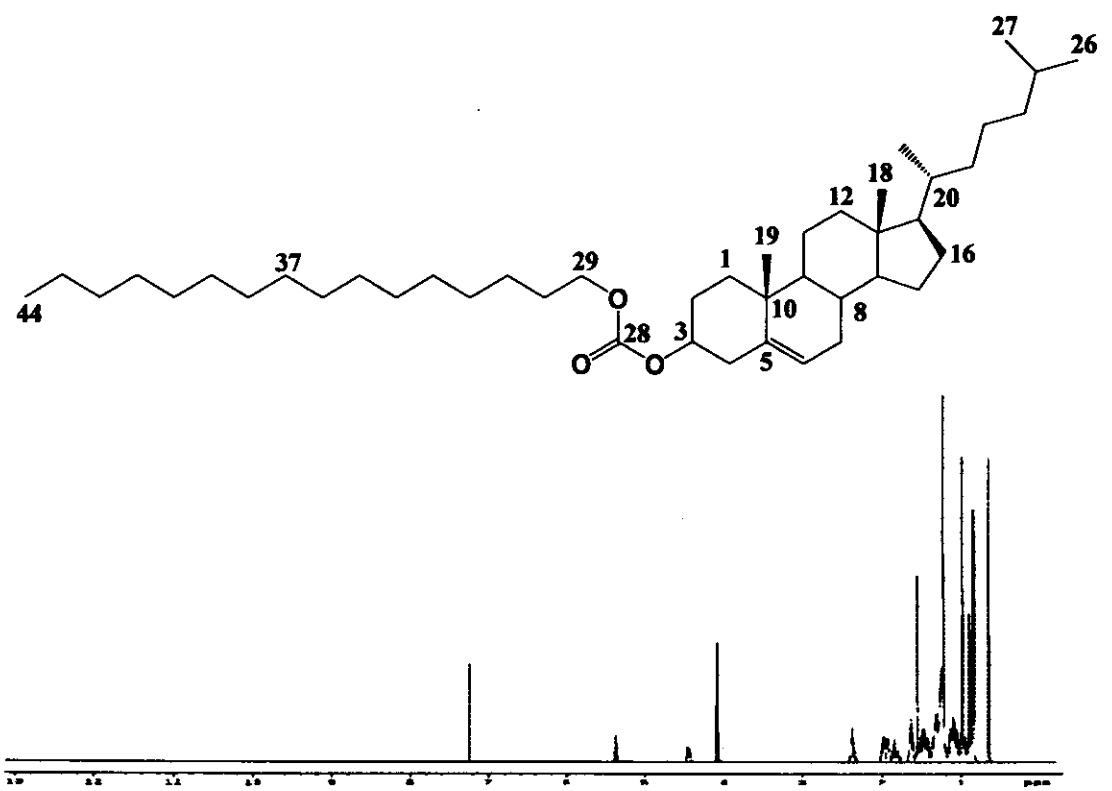


รูปที่ 31 FTIR ของสารสังเคราะห์ผลึกเหลวเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น (cholesterol) และผลึกเหลวที่มีจำหน่าย (cholesteryl oleyl carbonate)

ตารางที่ 2 Peak assignment ของสารสังเคราะห์ผลึกเหลวที่ได้จากเทคนิค FTIR

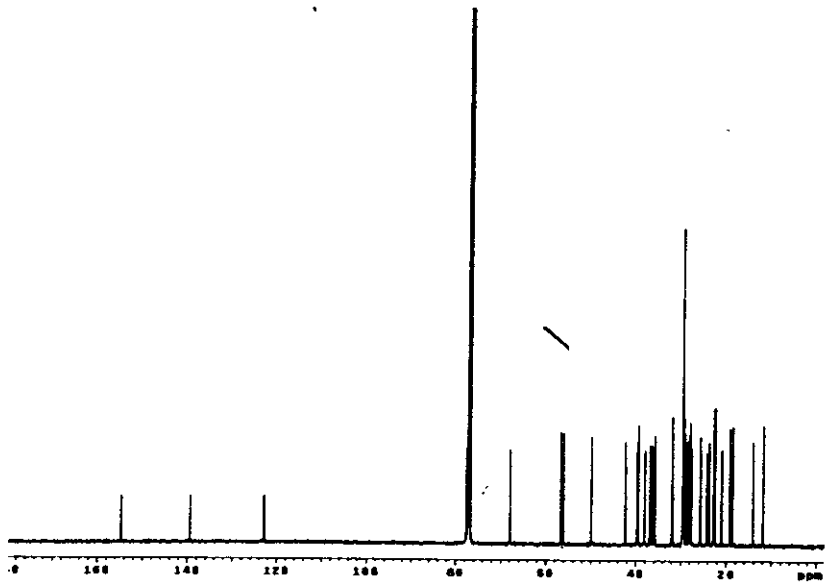
Assignment	Cholesterol	SCC	CPC	CSC	DCC	COC
O-H stretching	3391	-	-	-	-	-
C-H stretching	2934	2932	2919	2919	2948	2928
	2901					
	2866	2856	2850	2849	2865	2853
C=O	-	1705	1736	1737	1743	1742
O-C-O stretching	-	1276	1270	1264	1262	1265

หลังจากศึกษาเพื่อยืนยันผลว่าสารสังเคราะห์ที่ได้มี functional group ถูกต้องแล้วก็นำสารไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) เพื่อหาจำนวนโปรตอน (H), คาร์บอน (C) และโครงสร้างโมเลกุล CCC และ ^{1}H-NMR (รูปที่ 32) และและ ^{13}C-NMR spectrum ของ CCC (รูปที่ 33)



รูปที่ 32 สูตรโครงสร้างและ ^{1}H-NMR สเปกตรัมของผลึกเหลวสังเคราะห์ CCC

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัมแสดงค่า chemical shift ของโปรตอนที่อยู่ ณ ตำแหน่งต่างๆ บนโครงสร้างของผลึกเหลวสังเคราะห์ ซึ่งค่า chemical shift ดังกล่าวจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของโปรตอนนั้นๆ โดยตำแหน่งที่ 6 มีค่า chemical shift = 5.37 ซึ่งเป็นโปรตอนของ methine (CH) ตำแหน่งที่ 3 มีค่า chemical shift = 4.45 ซึ่งเป็นโปรตอนของ methylene (CH_2) ตำแหน่งที่ 29 มีค่า chemical shift = 4.08 ซึ่งเป็นโปรตอนของ methylene (CH_2) ที่ต่อกันเป็น alkyl chain โปรตอนที่อยู่บน alkyl chain ดังกล่าวจะมีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากมีสภาวะแวดล้อมเช่นเดียวกัน

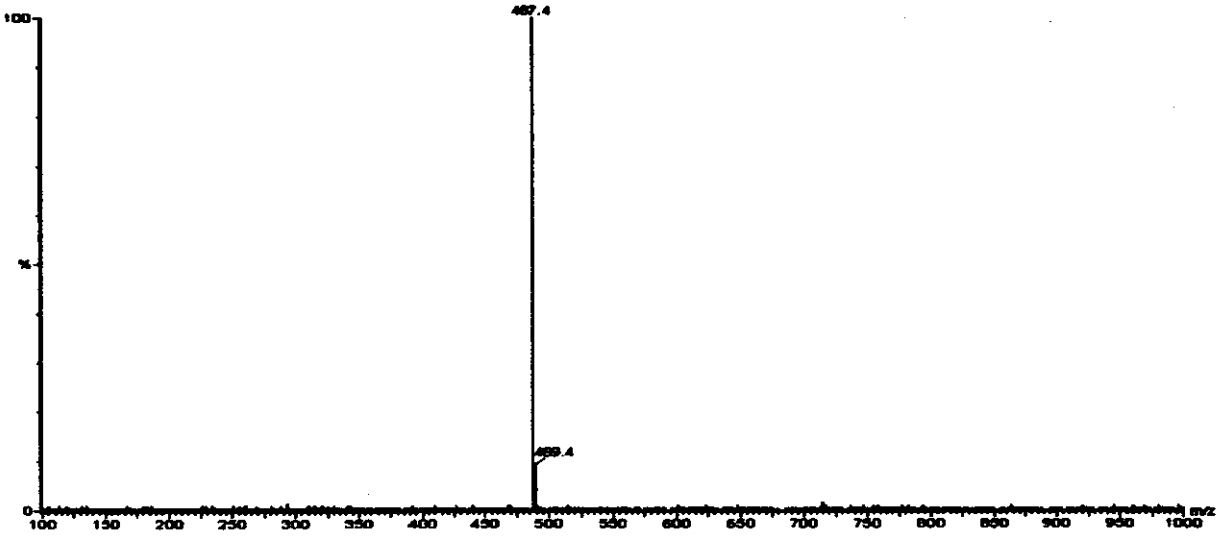


รูปที่ 33 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของผลึกเหลวสังเคราะห์ CCC

จาก ^{13}C-NMR สเปกตรัมแสดงค่า chemical shift ของคาร์บอนที่ตำแหน่งต่างๆ ซึ่งจะมีค่าแตกต่างกันตามสภาวะแวดล้อมของอะตอมนั้นๆ คาร์บอนที่เป็น carbonyl ของคาร์บอเนตเอสเทอร์ มีค่า chemical shift = 154.67 ppm ซึ่งจะมีค่าต่ำกว่าคาร์บอนิลในเอสเทอร์ประมาณ 20 ppm ในตำแหน่งที่ C_5 และ C_6 ซึ่งเป็นคาร์บอนอะตอมที่มีพันธะคู่มีค่า chemical shift = 139.39 ppm และ 122.86 ppm ตามลำดับ และในตำแหน่งที่ 29 มีค่า chemical shift = 29.65 ซึ่งเป็นคาร์บอนอะตอมของ alkyl chain

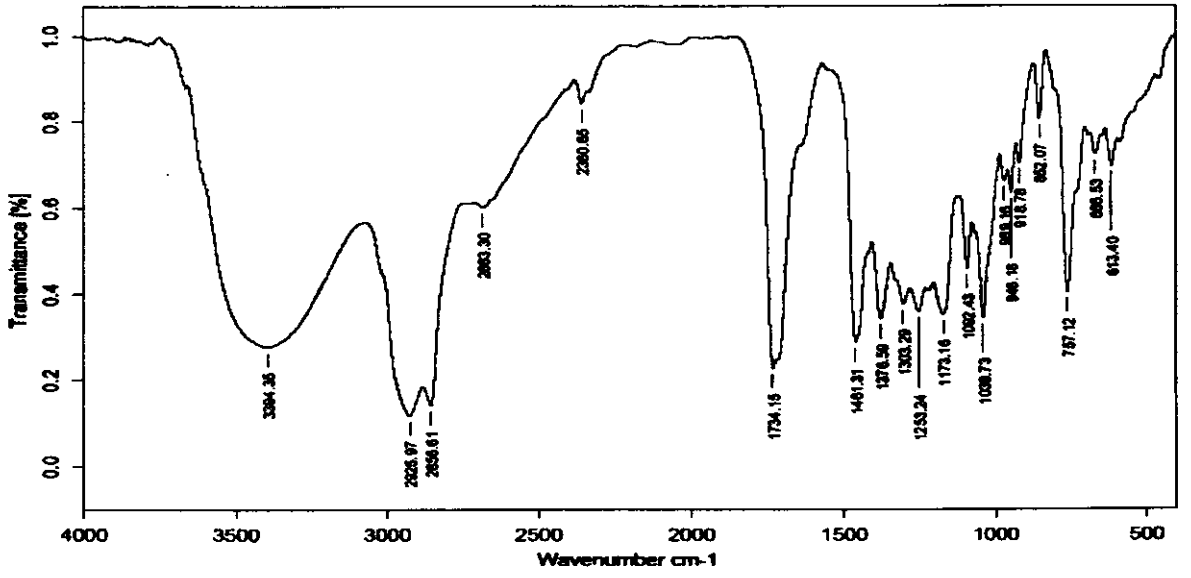
เมื่อทราบส่วนประกอบและโครงสร้างในโมเลกุลของสารแล้ว จึงนำสารที่ได้ไปศึกษายืนยันเพื่อหามวลโมเลกุลของสารด้วยเทคนิค Mass spectrometry (MS) ซึ่งใช้วิธี electron spray ionization (ESI), negative mode เพื่อหามวลโมเลกุล โดยเทคนิคนี้จะนิยมใช้หามวลโมเลกุลของสารในกลุ่มที่มี carbonyl functional group รูปที่ 34 เป็น MS spectrum ของ SCC ซึ่งใช้ $CHCl_3$: Methanol เป็นตัวทำ

ละลาย พบ base peak ที่ 487.4 m/z ซึ่งเป็นมวลโมเลกุลของสาร SCC รวมกับมวลโมเลกุลของคลอไรด์อิออนที่ถูกไอออไนเซชั่นจาก $CHCl_3$ ([M+Cl]$^-$, 452+35.5 = 487.5)



รูปที่ 34 Mass spectrum ของ sodium cholesteryl carbonate (ESI-negative mode, [M+Cl]$^-$)

จากสเปคตรัมในรูปที่ 35 พบ C-H stretching อย่างชัดเจนที่ 2856 และ 2925 cm^{-1} พบ ether linkage ที่ 1253.2 cm^{-1} ซึ่งเชื่อมส่วน C_3 ของสเตียรอยด์กับส่วนของไฮโดรคาร์บอน (C-O-C) ในสเปคตรัม ตรวจพบ carbonyl ของ carboxylate ที่ 1734.15 cm^{-1})ประกอบกับ OH stretching อย่างชัดเจนที่ 3394.35 cm^{-1} ในส่วนโมเลกุลที่เป็นไฮโดรคาร์บอนจะสังเกตพบพีคที่ประมาณ 757.12 cm^{-1}



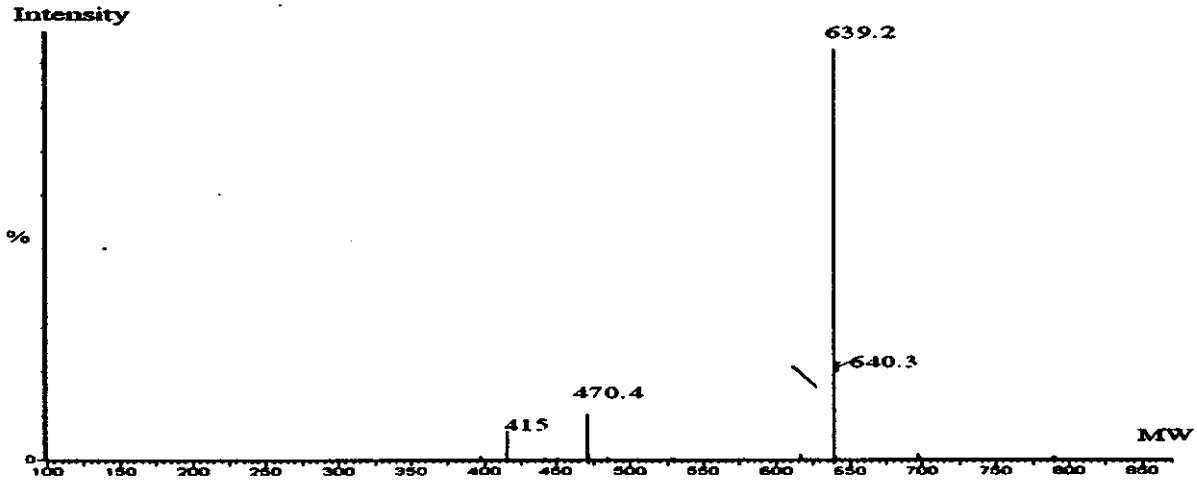
รูปที่ 35 FTIR spectra ของ cholate cetyl ester

เมื่อวิเคราะห์ ^{13}C และ ^{1}H-NMR พบว่าโมเลกุลประกอบด้วยจำนวนคาร์บอนอะตอม 40 ตัวดังแสดงค่า chemical shift ในตาราง และจำนวนโปรตอนที่อยู่บนคาร์บอนแต่ละตัวดังตารางที่ 3

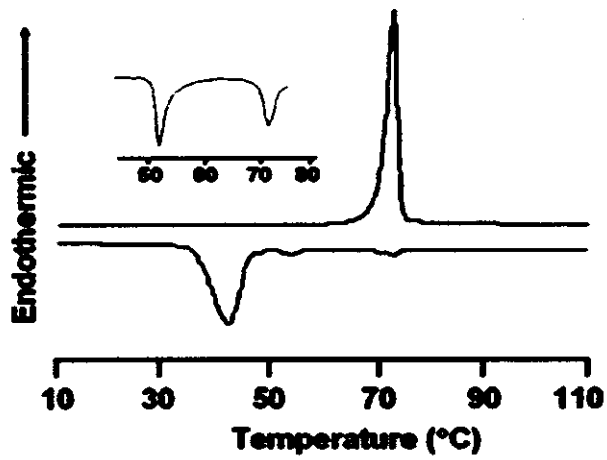
ตารางที่ 3 ค่า chemical shift ของคาร์บอนและโปรตอนในโมเลกุลของ CCE

Position	δ_C ppm	δ_H ppm	Type
1	34.04	0.92 (d;2H)	CH_2
2	30.87	1.71 (dt;2H)	CH_2
3	71. 62	3.55 (dd;H)	CH
4	41.99	1.41 (dd;2H)	CH_2
5	35.14	1.61 (tt;H)	CH
6	36.25	1.71 (dt;2H)	CH_2
7	27.30	1.41 (dt;2H)	CH_2
8	41.99	1.41 (dt;2H)	CH
9	46.39	-	CH
10	35.93	-	C
11	28.58	1.52 (dd;2H)	CH_2
12	76.74	3.99 (t;H)	CH
13	47.19	-	C
14	46.41	-	CH
15	23.62	1.71 (dt;2H)	CH_2
16	26.06	1.12 (dt;2H)	CH_2
17	49.9	-	CH
18	12.64	0.67 (s;3H)	CH_3
19	17.14	0.85 (s;3H)	CH_3
20	35.18	1.41 (dt;2H)	CH
21	22.62	0.92 (s;3H)	CH_3
22	31.85	1.12 (dt;2H)	CH_2
23	31.34	2.29 (t;2H)	CH_2
24	174.37	-	C
25	64.40	3.99 (t;H)	CH_2
26	27.08	1.21 (dd;2H)	CH_2
27	25.88	1.21 (dd;2H)	CH_2
28	27.54	1.21 (dd;2H)	CH_2
29	29.21	1.21 (dd;2H)	CH_2
30	29.30	1.21 (dd;2H)	CH_2
31	29.21	1.21 (dd;2H)	CH_2
32	29.53	1.21 (dd;2H)	CH_2
33	29.59	1.21 (dd;2H)	CH_2
34	29.60	1.21 (dd;2H)	CH_2
35	29.64	1.21 (dd;2H)	CH_2
36	30.24	1.21 (dd;2H)	CH_2
37	28.50	1.21 (dd;2H)	CH_2
38	33.48	1.21 (dd;2H)	CH_2
39	23.05	1.21 (dd;2H)	CH_2
40	14.06	0.83 (t;3H)	CH_3

จาก MS spectrum ในรูปที่ 36 จะไม่ปรากฏ molecular ion ของ cholate cetyl ether (CCE) แต่จะปรากฏ m/z at 639.2 เป็น fragmentation ที่ associate กับ Na^+ นอกจากนั้นมีการแตกหักของโมเลกุลเกิดเป็นมวลขนาด 415 และ 470.4 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ว่าส่วนไฮโดรคาร์บอนของโมเลกุลเกิดการแตกหักสองจุดคือ $C_{16}H_{33}^+$, $C_{12}H_{25}^+$ เกิดมวลส่วนที่ปรากฏชัดเจนหลังจากแตกออกไปแล้วคือ 415 และ 470.4 ตามลำดับ



รูปที่ 36 Mass spectra of cholate cetyl carbonate ester

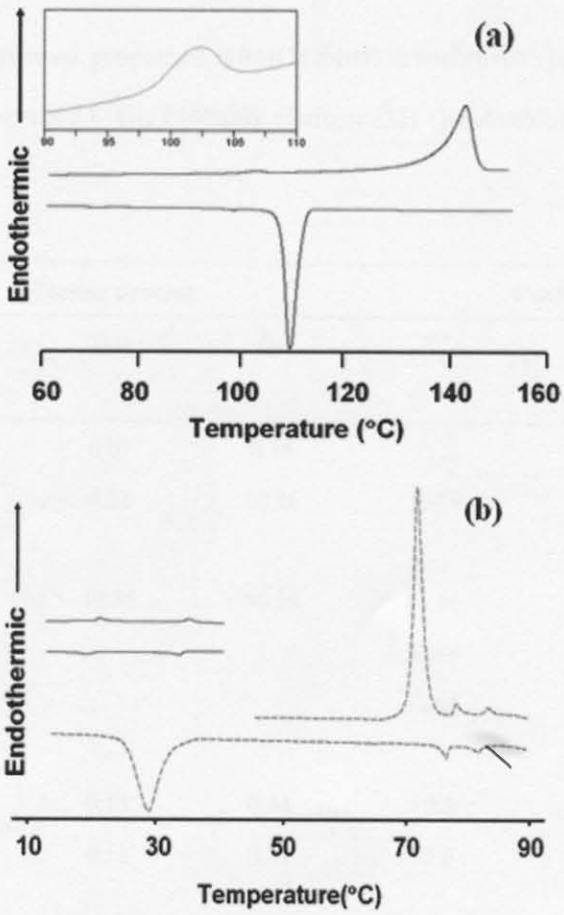


รูปที่ 37 DSC thermogram ของ cholesteryl cetyl carbonate (CCC) เมื่อให้ความร้อนด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก 10 ถึง 110 องศาเซลเซียส และทำให้เย็นลงด้วยอัตราเร็วที่เท่ากัน

จาก DSC thermogram ของ CCC (รูปที่ 37) แสดงให้เห็นว่าผลึกเหลวสังเคราะห์ดูดความร้อน ที่อุณหภูมิ 72.83°C มีค่า enthalpy ประมาณ 12.55 Kcal/mole เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 0-200 °C ด้วยอัตรา 10 °C/min และเกิดการคายความร้อนที่อุณหภูมิสูงสุด 41.96, 53.96 และ 72.96°C โดยมีค่าพลังงานจากการคายความร้อน 9.25, 0.16 และ 0.28 Kcal/mole ตามลำดับ เมื่อลดอุณหภูมิจาก 200-0 °C ด้วยอัตราที่เท่ากัน ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสถานะของผลึกเหลวดังนี้ คือ ไม่ปรากฏ melting peak ที่อุณหภูมิ 41.96 °C แต่เมื่อพิจารณาขณะที่ตัวอย่างเย็นตัวลงกลับปรากฏ 3 peaks ที่เกิดการคายความร้อน เมื่อเปรียบเทียบ enthalpy ที่อุณหภูมิ 72.8°C ระหว่างการคายและดูดความร้อนมีค่าแตกต่างกันสูงมาก แสดงให้เห็นว่าระบบต้องดูดพลังงานเข้าไปปริมาณสูงในการเปลี่ยนแปลงโครงร่างของผลึกเหลวเป็น isotropic phase ที่สมบูรณ์ ขณะที่เมื่อทำให้ของเหลวเย็นตัวลงกลับเป็นผลึกเหลวจะค่อย ๆ คายพลังงานกลับเป็นรูปแบบต่าง ๆ ของผลึกเหลว คือ nematic, smectic phase และเป็นของแข็งสมบูรณ์ โดยการคายพลังงานทั้ง 3 ค่า เมื่อรวมปริมาณทั้งหมดแล้วมีค่าต่ำกว่าพลังงานที่ให้เข้าไปในการดูดความร้อน แสดงว่าระบบมีการคายพลังงานออกมาไม่หมด หรือมีการสูญเสียพลังงานไปในการเปลี่ยนแปลงโครงร่างผลึกใหม่

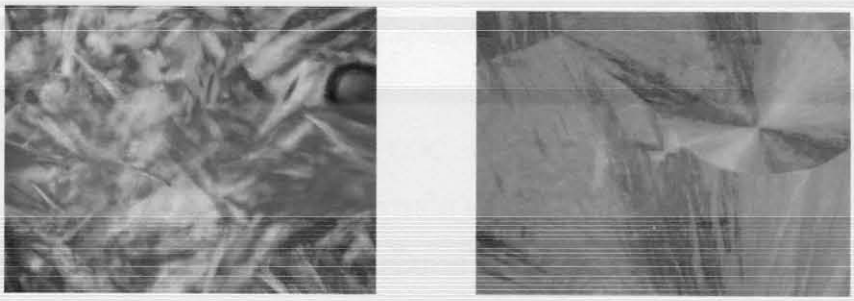
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบคุณสมบัติของ SCC เทียบกับ COC และ CM พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดย SCC จะเกิด melting peak สองอุณหภูมิที่ 102 และ 140 องศาเซลเซียส โดยพีคแรกจะมีขนาดเล็กและผ่านการพิสูจน์แล้วว่าไม่ใช่น้ำซึ่งถูกดูดซับหรือน้ำผลึกในโมเลกุล ขณะที่ COC จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดจุดหลอมเหลว 2 อุณหภูมิและตกผลึกกลับมา 2 อุณหภูมิเช่นกัน จะสังเกตได้ว่าการเปลี่ยนแปลงเฟสใช้พลังงานน้อยมาก ขณะที่ CM ซึ่งเป็นผลึกเหลวเอสเทอร์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเฟสที่ 3 อุณหภูมิทั้งการให้ความร้อนและการคายความร้อนแม้ว่าจุดสุดท้ายจะต้องใช้พลังงานสูงในการหลอมเหลวเป็น isotropic phase (รูปที่ 38)

ส่วน CCE มีคุณสมบัติของผลึกเหลวที่แตกต่างออกไปเนื่องจากสารมีลักษณะเป็นของกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่อุณหภูมิเกิน 30 องศาเซลเซียสสารมีลักษณะเป็นของเหลว เมื่อวิเคราะห์ด้วย XRD พบว่าสารมีลักษณะเป็น amorphous ใกล้ 100% การศึกษาด้วย DSC ก็จะไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงเฟส ดังนั้นสาร CCE คาดว่าไม่มีสมบัติเป็น thermotropic แต่สามารถมีสมบัติเป็น lyotropic liquid crystal ได้ ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิค DSC ของสารสังเคราะห์ผลึกเหลวสรุปไว้ในตารางที่ 4



รูปที่ 38 Thermogram ของค่าพลังงานกับฟังก์ชันของการให้ความร้อน (รูปบน) และการทำให้เย็นตัวลง(รูปล่าง) ของ sodium cholesteryl carbonate (a), (—) cholesteryl oleoyl carbonate and (----) cholesteryl myristate (b) เมื่อให้ความร้อนด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก 10 ถึง 110 องศาเซลเซียส และทำให้เย็นลงด้วยอัตราเร็วที่เท่ากัน (รูปแทรกเป็นการขยายมาตราส่วน)

อีกเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของผลึกเหลวคือคุณสมบัติการกระเจิงแสงของสารโดยใช้ polarized light microscopy ซึ่งการเปลี่ยนแปลงวัตภาคของผลึกเหลวจะให้รูปร่าง/ลักษณะการกระเจิงแสงที่แตกต่างกันออกไป



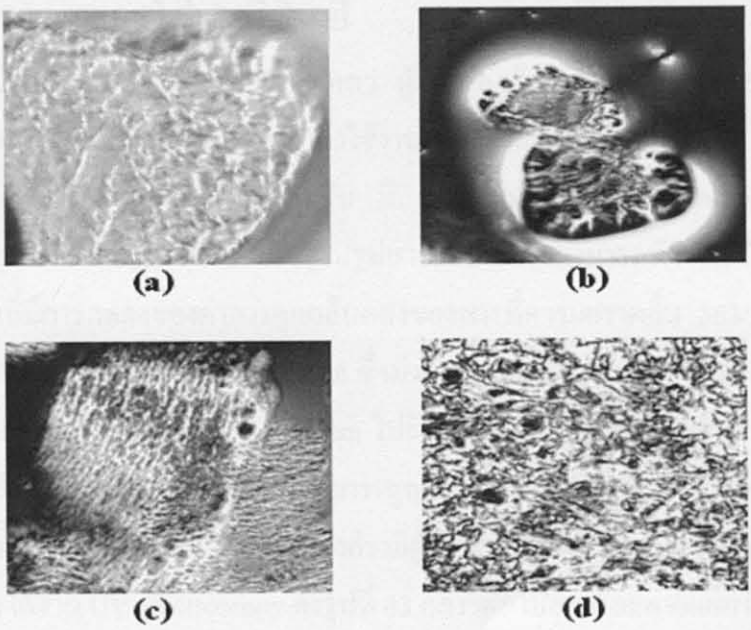
รูปที่ 39 การเกิด birefringence ของ CCC สังเกตภายใต้กล้อง polarized light (x200) รูปซ้าย: สังเกตที่อุณหภูมิห้อง รูปขวาหลังจากหลอมผลึกเหลวแล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 4 ผลการศึกษา thermal properties ของสารสังเคราะห์ผลึกเหลวโดยใช้เทคนิค DSC เมื่อ Tp: phase transition temperature (°C), Enthalpy change: ΔH (Kcal/mole) และ Entropy change: ΔS (cal/mole-K)

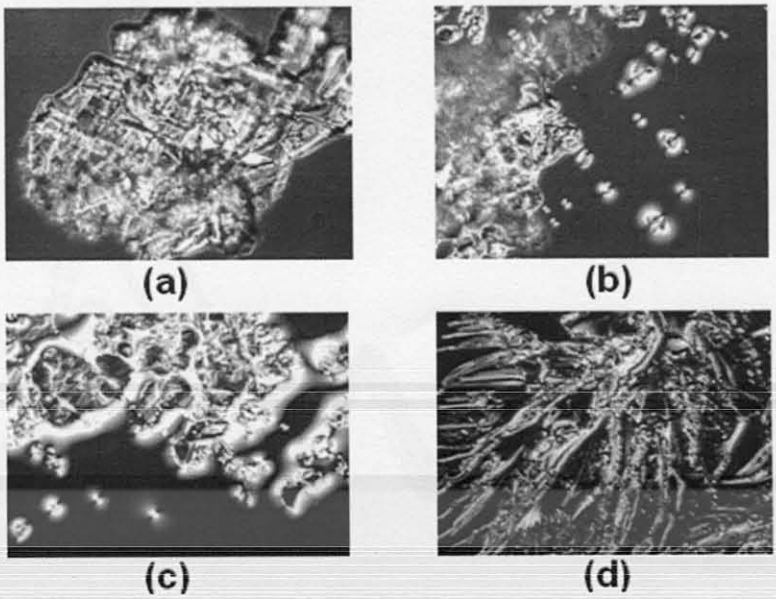
Compound	Heating process			Cooling process		
	T_p	ΔH	ΔS	T_p	ΔH	ΔS
SCC	102.3	0.07	0.18	71.2	0.07	0.18
	142.8	4.22	10.16	108.9	4.45	11.66
CCC	72.83	12.55	36.30	41.96	9.25	26.74
				53.96	0.16	0.50
				72.96	0.28	0.88
COC	20.00	0.13	0.44	19.3	0.11	0.37
	36.00	0.11	0.34	33.6	0.08	0.26
DCC	169.50	3.32	7.05	153.80	5.93	13.90
	175.17	2.02	4.52			

จากรูปที่ 39 แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของผลึกเหลวก่อนและหลังการให้ความร้อน โดยก่อนการให้ความร้อนผลึกเหลวมีลักษณะเป็นผงสีขาว และเมื่อนำมาส่องด้วย polarized light microscope พบว่าผลึกมีลักษณะเป็นแท่งรูปเข็ม จับตัวกันเป็นก้อน มีสีเหลือง สีฟ้าและสีชมพูและเมื่อมีการให้ความร้อนจนกระทั่งผลึกเหลวหลอมละลายจะได้สารละลายที่มีลักษณะใส และเมื่อปล่อยให้สารละลายตกผลึกกลับมา พบว่าผลึกมีการจัดเรียงตัวใหม่ที่เป็นระเบียบมากขึ้นทำให้สามารถเห็นลักษณะผลึกได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เป็น spherulite มีสีสันสวยงาม

รูปที่ 40-41 แสดงลักษณะของผลึกเหลว COC และ SCC เมื่อสังเกตภายใต้กลองจุลทรรศน์ polarized light ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ซึ่งลักษณะการเกิด birefringence ที่สวยงามและการกระเจิงแสงจะลดลงและหายไปในที่สุดเมื่อผลึกเหลวเปลี่ยนวัตภาคไปเป็นของเหลวอย่างสมบูรณ์



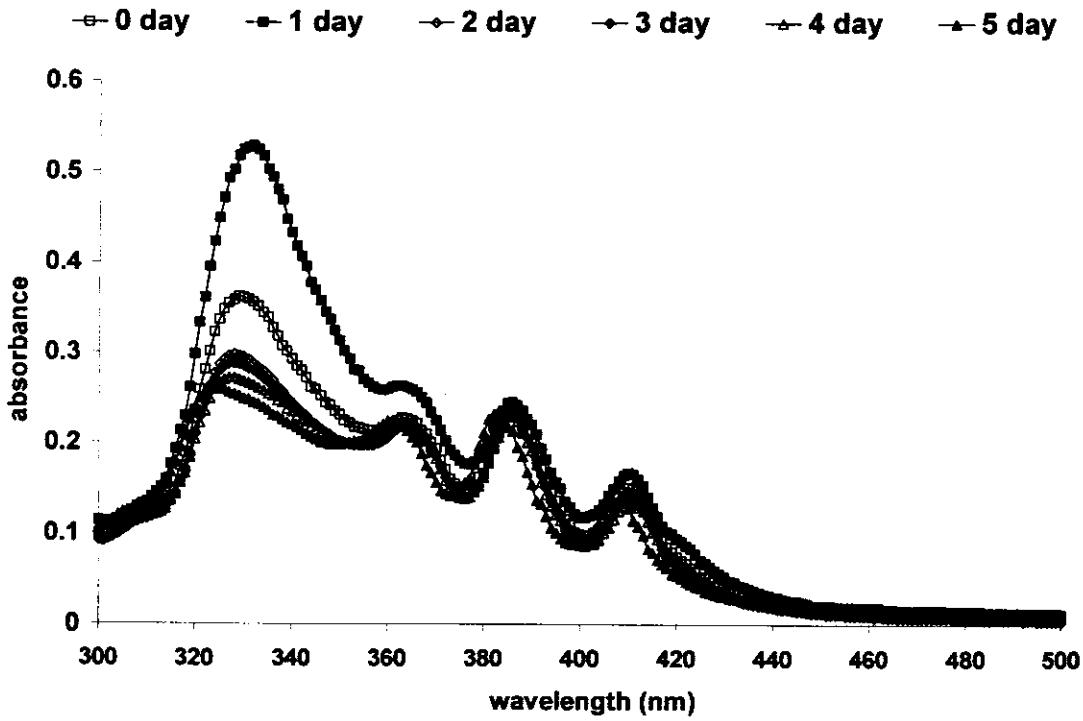
รูปที่ 40 แสดงการเกิด birefringence ของ COC สังเกตภายใต้กล้อง polarized light (x200) รูป (a): สังเกตที่อุณหภูมิ 17 °C , (b) อุณหภูมิ 25 °C, (c) อุณหภูมิ 37 °C และ (d) หลังจากหลอมผลึกเหลวแล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 25 °C



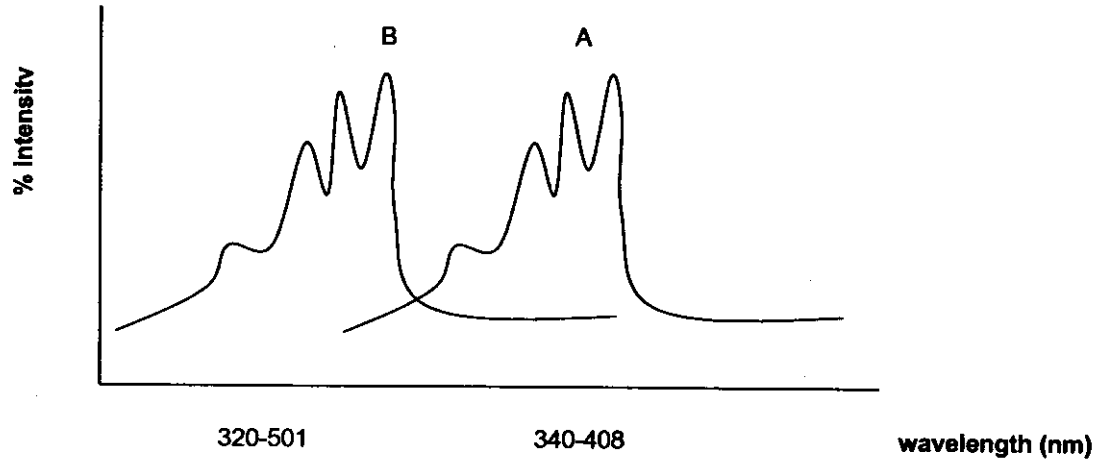
รูปที่ 41 Photograph of sodium cholesteryl carbonate (SCC) crystals using polarizing lenses at temperatures (a) 25, (b) 110, (c) 140, and (d) after cooling to 25°C (200x).

2. สูตรตำรับของยาแอมโฟเทอริซิน บี

ก่อนการพัฒนาเป็นสูตรตำรับในรูปแบบของเหลว ผู้วิจัยต้องมั่นใจว่ายาแอมโฟเทอริซิน บี ในรูปแบบของเหลวมีความคงตัวที่นานพอก่อนนำมาใช้งาน โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วย spectroscopyในที่นี่อาศัย UV spectrum ของแอมโฟเทอริซิน บี ที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาในช่วง 5 วัน หลังจากการเตรียมให้แอมโฟเทอริซิน บี อยู่ในรูปสารละลาย ซึ่งสามารถพิจารณาได้ทั้งในแง่ความคงตัวเชิงปริมาณที่มีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 383 nm ซึ่งสามารถสังเกตได้ ขณะเดียวกันการ shift ของ spectrum ซึ่งบ่งถึงความไม่คงตัวจากการเกิด dimer ก็สามารถเห็นได้ชัดเจนว่าสารมีการขยับจาก peak 338 nm ไปยัง 320 nm อย่างชัดเจน แสดงว่าระบบดังกล่าวของแอมโฟเทอริซิน บี ส่งเสริมให้ตัวยาเกิดการสูญเสียความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมีในเวลาเดียวกัน ดังรูปที่ 42 ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวมีผู้รายงานไว้ดังนี้ คือการเกิด self aggregation สามารถตรวจวัดได้จาก UV spectroscopy ดังรูปที่ 43 กล่าวคือ เมื่อสารละลายแอมโฟเทอริซิน บี อยู่ในรูป monomeric form จะเห็นลักษณะของ spectrum A ซึ่งมี 4 peaks เมื่อสารละลายแอมโฟเทอริซิน บี ถูกวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตัวยาแอมโฟเทอริซิน บี จะเปลี่ยนแปลงเป็น dimeric form ดังรูปของ spectrum B กลไกดังกล่าวจะทำให้โมเลกุลแอมโฟเทอริซิน บี มีขนาดใหญ่ขึ้นและเมื่อให้เข้าสู่ร่างกายตัวยาสามารถสะสมตามอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะที่ไตทำให้เป็นอันตราย (Gruszecski, 2003)



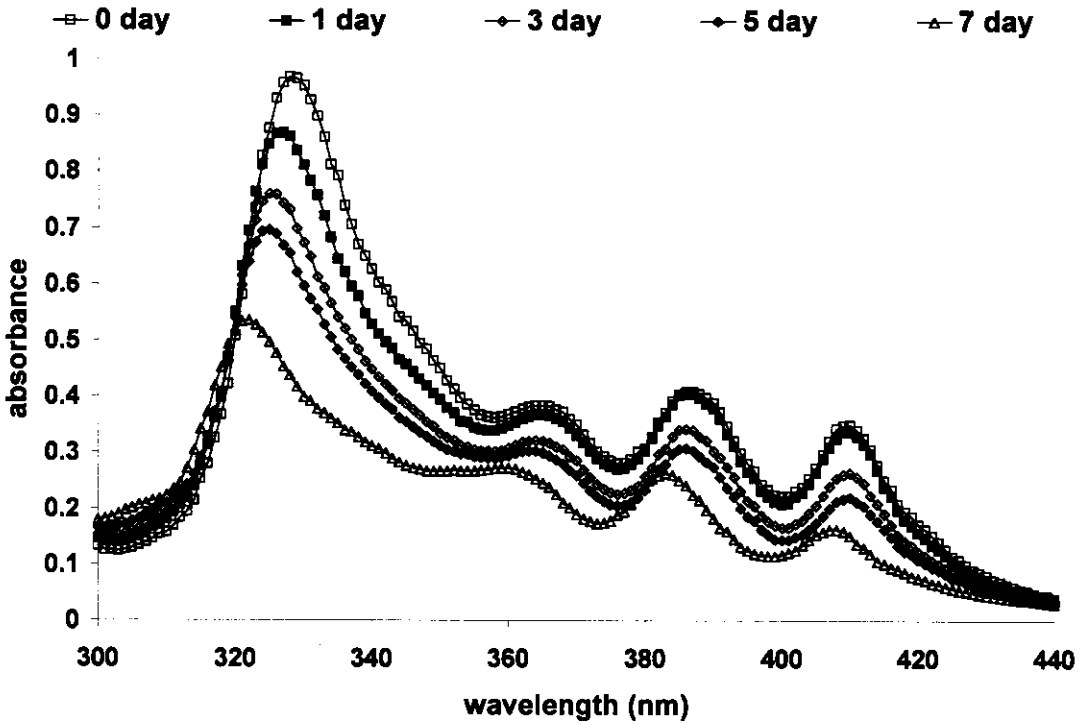
รูปที่ 42 UV spectrum ของสารละลายแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ



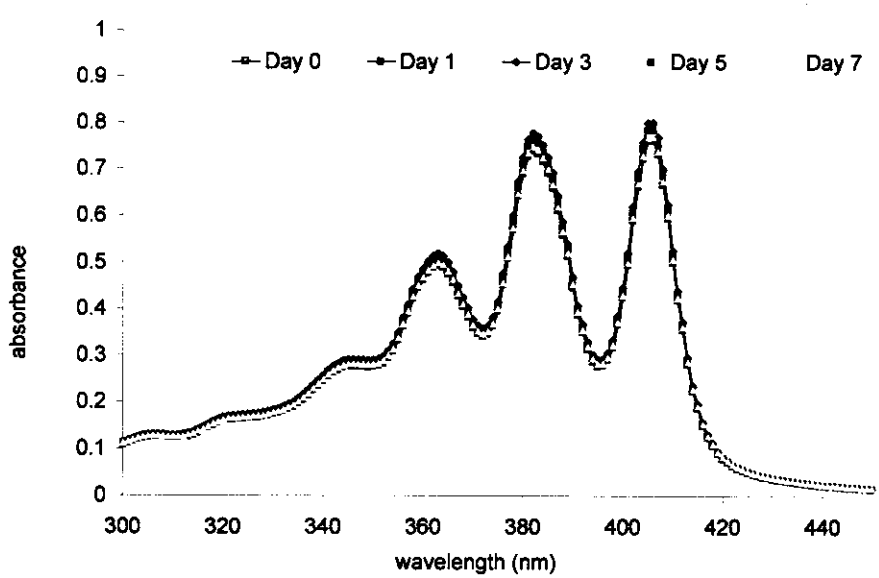
รูปที่ 43 UV band absorption ของแอมโฟทอริซิน บี ในน้ำ (A) monomeric form (B) dimeric form หลังจากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการทดลองแรกตรงที่ไม่ได้มีเฉพาะโมเลกุลของยาที่ละลาย หรือแขวนลอยอยู่ในตัวทำละลายแต่มีโมเลกุลผลึกเหลวสังเคราะห์ COC ในอัตราส่วนของยาต่อผลึกเหลว 1:1 mole ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าผลึกเหลว COC ไม่สามารถเพิ่มความคงตัวให้กับยาแอมโฟเทอริซิน บี และไม่สามารถยับยั้งการเกิด dimeric form แต่อัตราการลดลงของปริมาณตัวยาอยู่ในลักษณะที่ช้ากว่ากรณีอยู่ในน้ำเพียงอย่างเดียว เช่นกันกรณีการขยับของ absorption peak ไปที่ 320 nm ก็เกิดช้าลงกว่ากรณีที่ตัวกลางเป็นน้ำดังรูปที่ 44 ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเป็นผลจากโมเลกุลของ COC ซึ่งอาจมีผลยับยั้งการเกิด hydrophobic interaction ระหว่างโมเลกุลของยาแอมโฟเทอริซิน บี

จากการพิจารณา UV spectrum ของยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ผสมกับ CCE จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นน้อยมากหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ในรูปแบบสารละลายและป้องกันแสง (รูปที่ 45) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าตัวยามีความคงตัวมากกว่ากรณีที่เป็นตัวยาเดี่ยวหรือผสมกับ COC แสดงว่า COC ไม่สามารถปกป้องยาแอมโฟเทอริซิน บี ในรูปแบบของเหลวได้ เมื่อพิจารณาความแตกต่างของโมเลกุลของ COC และ CCE ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน และ alkyl chain ของ COC ยาวกว่า 2 คาร์บอนอะตอม แต่ COC มี พันธะคู่ 1 พันธะ ขณะที่ CCE เป็น saturated hydrocarbon ดังแสดงคุณสมบัติข้างต้นทางกายภาพที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง และมีความเป็นไปได้ว่าการมีพันธะคู่บนสาย hydrocarbon ยิ่งส่งเสริมทำให้โมเลกุลของแอมโฟเทอริซิน บี ไม่คงตัว ซึ่งต้องสืบค้นข้อมูลหรือทำการทดลองในรายละเอียดเพื่อพิสูจน์กลไกต่อไป



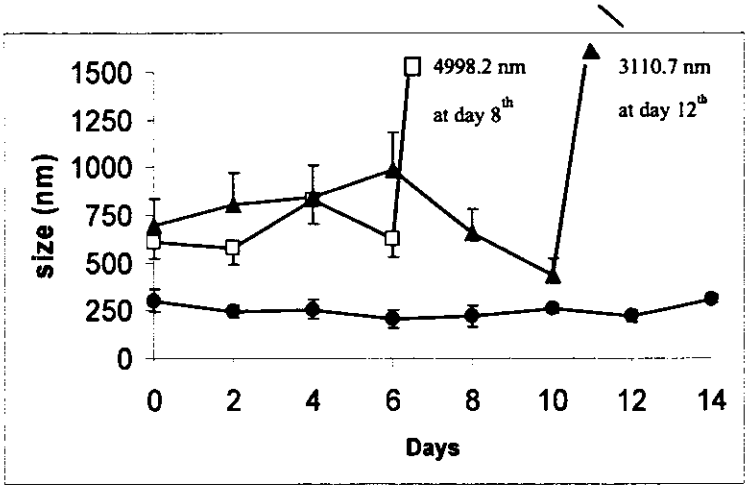
รูปที่ 44 UV spectrum ของสารละลายแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ cholesteryl oleyl carbonate 3.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 45 UV spectrum ของสารละลายแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ cholate ethyl ether 3.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1 การพัฒนาเป็นสูตรตำรับยาฉีด

การพัฒนาเป็นยาฉีดซึ่งต้องมีความปราศจากเชื้อ มีความเป็นกรดด่าง มีค่าโทนิกซิตี้เหมาะสม จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าผลึกเหลวในกลุ่ม cholate cetyl ether อาจจะเหมาะสมในการนำส่งยาฉีด โดยใช้ยาต้านเชื้อรา คือ amphotericin B เป็นต้นแบบและทำการศึกษาที่ pH 7.4 และมีค่า isotonicity เหมาะสมในการบริหารยาในรูปแบบยาฉีด ผลการศึกษาพบว่าผลึกเหลวสามารถเพิ่มความคงตัวของยา amphotericin B แม้ในขณะที่เตรียมให้อยู่ในรูปของสารคอลลอยด์โดยผลึกเหลวไปป้องกันการเกิดไดเมอร์ (dimer) ของโมเลกุลของยา amphotericin B ดังแสดงในรูปที่ 46 โดยพบว่าเมื่อยา amphotericin B เดี่ยว เตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายโมเลกุลของยายังคงขนาด 600-700 nm ได้เพียงระยะเวลา 6 วัน เมื่อถึงวันที่ 8 โมเลกุลของยาจะเกิด aggregate เป็นขนาด 5 μm ซึ่งมีการตกตะกอนของยาที่ชัดเจน ขณะที่สูตรตำรับของ amphotericin B ที่เติม COC พบว่าขนาดคอลลอยด์ของยาผสม COC มีขนาดคงที่อยู่ในช่วง 500-1,000 nm ในช่วงเวลา 10 วัน และสูญเสียความคงตัวในวันที่ 12 ขนาดเพิ่มเป็น ≈ 3 μm ส่วนสูตรตำรับ amphotericin B ผสมกับ CCE ขนาดอนุภาคสามารถคงขนาดที่ 250 nm เป็นเวลาอย่างน้อย 14 วัน



รูปที่ 46 size stability ของ pure amphotericin B (AmB) 100 μg/ml ในน้ำ (□), AmB 100 μg/ml-cholate cetyl ether (1.4: 1w/w) (●) AmB100 μg/ml-cholesteryl oleyl carbonate ester (1:1.4) (▲) ระยะเวลาศึกษา 14 วัน

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณยา AmB ที่ถูกห่อหุ้มโดยผลึกเหลวทั้งสองชนิดพบว่าปริมาณ encapsulated AmB ของสูตรที่มี COC เป็นองค์ประกอบมีค่าประมาณ 83% ขณะที่สูตร AmB-CCE ตรวจปริมาณ free drug พบน้อยมากจนไม่สามารถสิเคราะห์ปริมาณได้ นั่นหมายความว่าปริมาณยาเกือบทั้งหมดถูกห่อหุ้มด้วยโมเลกุลของ CCE โดยการทดลองใช้ untracebtrifugation ที่ 500,000 g นานกว่า 5 ชั่วโมงในการแยก free drug ออกจาก encapsulated AmB

2.2 การพัฒนาเป็นสูตรตำรับผงแห้งเพื่อสูดสู่ทางเดินหายใจ

การพัฒนาเป็นยาผงแห้งชนิดนำส่งสู่ทางเดินหายใจเพื่อนำส่งไปสู่อวัยวะเป้าหมายที่มีการติดเชื้อ โดยตำรับต้องมีความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี ต้องมีขนาดอนุภาคที่เหมาะสมโดยการประเมินค่า mass median aerodynamic diameter (MMAD)

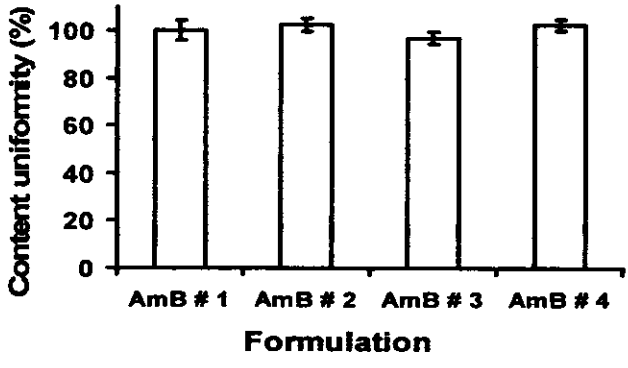
การพัฒนาสูตรตำรับยาเตรียมเป็นผงแห้งและนำมากระจายตัวในของเหลวก่อนใช้ ต้องมั่นใจว่าสูตรตำรับสามารถให้ขนาดอนุภาคของยาเตรียมมีความเหมาะสม ซึ่งเมื่อกระจายผงยาในตัวกลางที่เป็นน้ำกลั่น ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในสูตรตำรับ และขนาดอนุภาคของผงยาที่วัดด้วยวิธี photon correlation spectroscopy (mean±S.D., n=5)

Formulation	Composition	particle size (nm)
AmB # 1	20% AmB in CCCM[a]:L[b] (1:4 w/w)	323.6 ± 65.2
AmB # 2	20% AmB in CCCM:M[c] (1:4 w/w)	331.0 ± 79.1
AmB # 3	30% AmB in CCCM:L (1:3 w/w)	303.9 ± 61.3
AmB # 4	30% AmB in CCCM:L (1:2 w/w)	425.8 ± 121.8

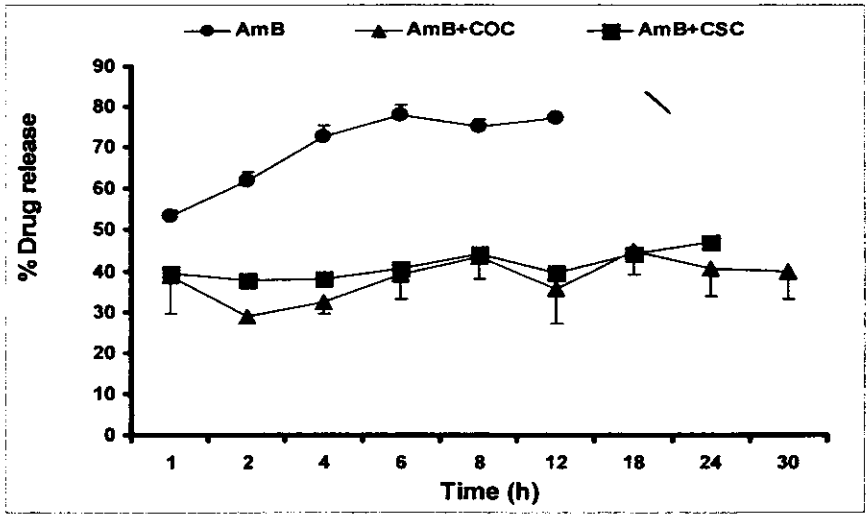
[a] Cholesteryl cetyl carbonate mixture, [b] Lactose and [c] Mannitol.

จากผลการทดลองเมื่อนำผงยาไปกระจายในตัวกลางที่เป็น distilled water แล้ววัดขนาดอนุภาค พบว่าขนาดอนุภาคของตำรับยาเตรียมมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 300-425 นาโนเมตร ซึ่งถือว่าเป็น nanosuspension และทุกสูตรตำรับมี %label amount ของยา amphotericin B ในช่วง 95 - 110 % ซึ่งอยู่ในช่วงที่กำหนดใน USP ดังแสดงในรูปที่ 47



รูปที่ 47 %content uniformity ของยา amphotericin B (mean±S.D., n=10)

เมื่อใช้ COC และ CSC ในการเตรียมเป็นผงแห้งของยา amphotericin B ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยยาออกจากสูตรตำรับ เปรียบเทียบกับผงยา amphotericin B เดี่ยว พบว่าตัวยาถูกปลดปล่อยออกมาจากสูตรตำรับอย่างช้าๆ และปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาจะมีปริมาณต่ำกว่าผงยา amphotericin B เดี่ยว (40 % release) แต่ระยะเวลาที่ปลดปล่อยยาออกมาจนหมดใช้เวลานานกว่า amphotericin B เดี่ยว ประมาณ 18 ชั่วโมง ทั้งนี้คาดว่าเนื่องจากผลึกเหลวสามารถลดการปลดปล่อยยาและทำให้ยาอยู่ในระบบนานขึ้น (รูปที่ 48) ซึ่งเหมาะสำหรับการพัฒนาในการเตรียมยาในรูปแบบควบคุมการปลดปล่อย การศึกษาปริมาณยาเริ่มต้นที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ที่มีองค์ประกอบของแอมโฟเทอริซิน บี และ COC หรือ CSC ที่อัตราส่วนโมล 1:1 พบว่าปริมาณตัวยาสำคัญจากการสุ่มตัวอย่าง 5 ครั้งคิดเป็น 101.1 $\pm$ 4.2 % และ 102.5 $\pm$ 2.9 % ตามลำดับซึ่งถือว่ายามีปริมาณครบถ้วนตามทฤษฎีที่วางไว้และการกระจายของตัวยาผสมไปกับผลึกเหลวมีความสม่ำเสมอสามารถยอมรับได้



รูปที่ 48 Dissolution profile ของยา amphotericin B ออกจากผงยา amphotericin B และ amphotericin B ที่บรรจุในผลึกเหลว COC และ CSC ที่เวลาต่าง ๆ (mean±S.D., n=4)

ผลการประเมินสูตรตำรับเพื่อใช้เป็นยาผงแห้งสำหรับสูดสู่ทางเดินหายใจ โดยใช้เครื่องมือ Andersen Cascade Impactor (ACI) ความเร็วลมที่ใช้ในการวัด 60 L/min พบว่าขนาดอนุภาคที่วัดได้ในขณะที่อนุภาคเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นอากาศ ค่า MMAD อยู่ในช่วง 4.4-5.8 μm ซึ่งขนาดอนุภาคของยาเตรียมที่สามารถลงไปถึงทางเดินหายใจส่วนล่างควรมีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 5 μm ผลการทดลองที่ได้จากการประเมินตำรับยาเตรียม amphotericin B โดยใช้ CCCM ทุกตำรับพบว่าขนาดอนุภาคยังมีขนาดใหญ่เกินมาตรฐาน (> 5 μm) ซึ่งทำให้ปริมาณยาส่วนใหญ่ยังถูกปลดปล่อยที่ทางเดินหายใจส่วนบน ทั้งนี้เนื่องจากมีการเกาะกลุ่มของผงยา จึงส่งผลให้ % Fine Particle

Fraction (%FPF) มีค่าไม่สูงมากนัก กล่าวคืออยู่ในช่วง 11.3-35.4 % (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตาม ตำรับยาเตรียม amphotericin B ในผลึกเหลวสังเคราะห์ CCCM สามารถปลดปล่อยยาออกจากอุปกรณ์นำส่งยาได้ดี (% Emitted Dose = 95-97 %) ดังนั้นในอนาคตยังต้องมีความจำเป็นต้องพัฒนาสูตรตำรับยาผงแห้งสูดสู่ทางเดินหายใจให้ได้ขนาด MMAD ที่ต่ำกว่านี้และมีค่า %FPF ที่สูงขึ้น

ตารางที่ 6 การประเมินคุณสมบัติของยาเตรียมผงแห้งเพื่อนำส่งสู่ทางเดินหายใจ (mean±S.D., n=5)

สูตรตำรับ	MMAD (μm)	% ED	% FPF	GSD
AmB #1	4.4 ± 0.8	96.7 ± 2.9	35.4 ± 5.1	1.39 ± 1.08
AmB #2	5.3 ± 1.5	95.5 ± 3.5	11.3 ± 2.4	2.22 ± 0.19
AmB #3	5.8 ± 0.6	97.0 ± 1.2	28.0 ± 4.5	2.45 ± 0.31
AmB #4	5.4 ± 0.4	97.4 ± 1.3	31.4 ± 6.0	2.42 ± 0.22

3. ความแรงและฤทธิ์ของยาแอมโฟเทอริซิน บี เมื่อผสมกับผลึกเหลว

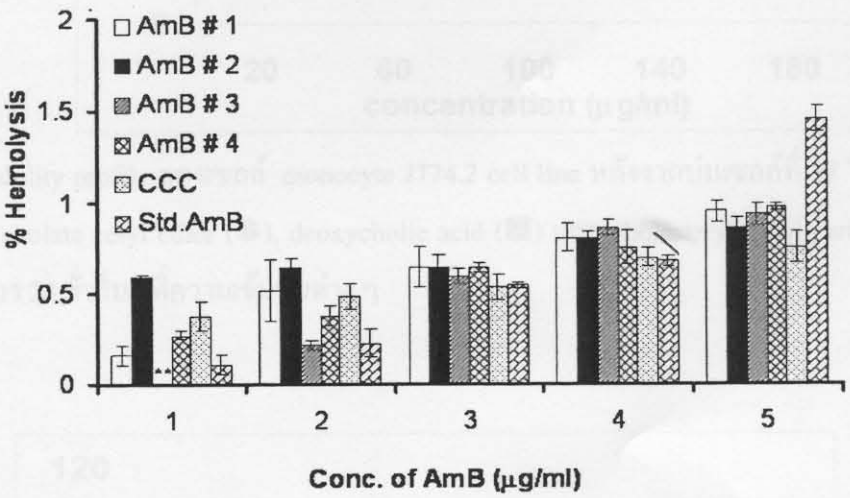
ความแรงของ AmB-COC, AmB-CCE มีค่าเป็น 96 และ 112% แสดงให้เห็นถึงความแรงของยาในสูตรตำรับยังมีอยู่ การทดสอบฤทธิ์ของยาแอมโฟเทอริซิน บี เมื่อผสมกับผลึกเหลวสังเคราะห์เปรียบเทียบกับยาเดี่ยว พบว่าค่า MIC ของยาแอมโฟเทอริซิน บี ต่อเชื้อ *C. neoformans* มีค่า 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีรายงาน (Currie *et al.*, 1995; Manosuthi *et al.*, 2006) ขณะที่ยาแอมโฟเทอริซิน บี ผสม COC ลงไปในอัตราส่วนโมล 1:1 ค่า MIC ที่ได้ก็ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากยาแอมโฟเทอริซิน บี เดี่ยว (0.125 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร) ส่วนยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ผสม CCE พบว่าค่า MIC มีค่าลดลงเป็น 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร นั่นคือฤทธิ์ของยาแอมโฟเทอริซิน บี เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า เหตุผลที่เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวขึ้น ต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

ผลการทดสอบความไวของผลึกเหลวและสารตั้งต้นทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา ขณะที่ยา AmB ในสูตรตำรับ ได้ค่า MIC เป็น 0.0312-0.0625 μg/ml และ 0.25-0.50 μg/ml เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C.neoformans* และเชื้อ *C. albicans* ตามลำดับ เมื่อศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับพบว่าทั้งสูตร

ตำรับที่เก็บในอุณหภูมิ 4 ±0.5 °C และสูตรตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง 25 °C พบว่าตำรับมีความคงตัวทางเคมีดี คือ %label amount $\geq$ 90 เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน

4. ความเป็นพิษของยาแอมโฟเทอริซิน บี เมื่อผสมกับผลึกเหลว

การศึกษาผลการแตกของเม็ดเลือดแดงพบว่าเมื่อบ่มกับเม็ดเลือดแดงของคนกับตำรับยาแอมโฟเทอริซิน บี ในผลึกเหลวสังเคราะห์ CCC เป็นเวลา 12 ชั่วโมงทุกตำรับ ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อยกว่า 1% ในขณะที่ยา amphotericin B ในขนาดความเข้มข้นเท่ากัน (5 μg/ml) ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสูงถึง 1.5 % เมื่อใช้ 1% Triton- X เป็น positive control (รูปที่ 49)

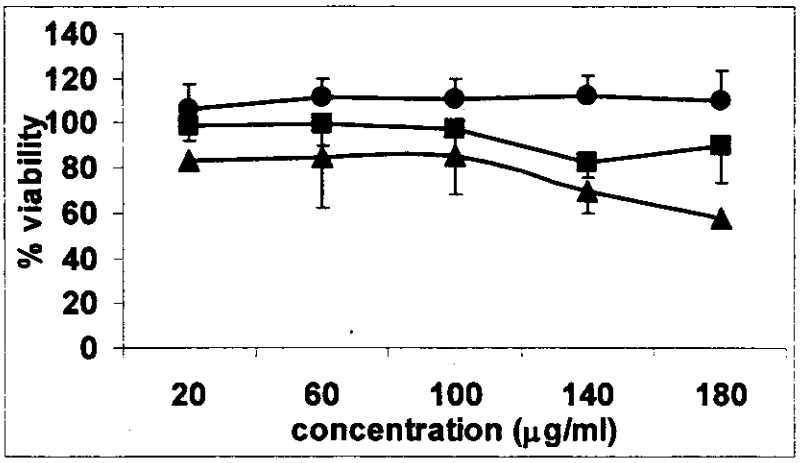


รูปที่ 49 ผลการศึกษาการแตกของเม็ดเลือดแดงของคน (in vitro) เมื่อบ่ม (incubate) กับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

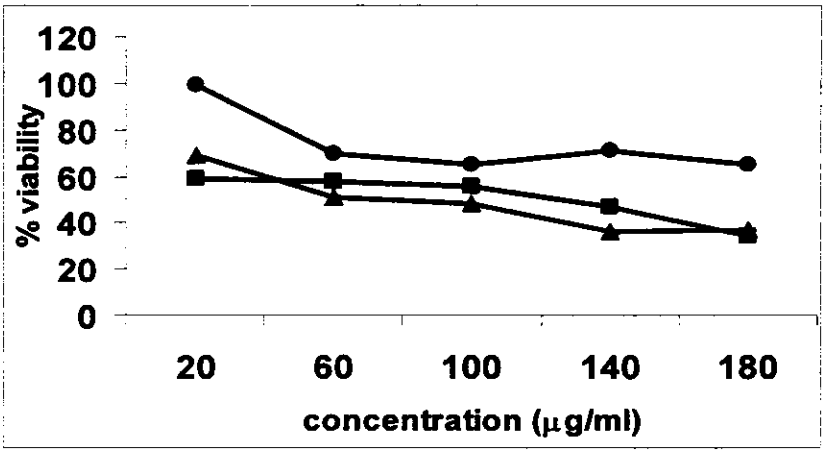
รูปที่ 50 เป็นผลการศึกษา MTT assay สำหรับผลึกเหลว CCE และ COC เปรียบเทียบกับสารตั้งต้น deoxycholic acid โดยศึกษาใน monocyte J774.2 cell line พบว่าในผลึกเหลวสังเคราะห์ CCE ไม่มีพิษต่อเซลล์ monocyte ในขณะที่ deoxycholic acid และ COC มีความเป็นพิษมากกว่า CCE ทั้งนี้อาจเนื่องจากพันธะคู่ใน alkyl chain ของ COC ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามยังถือว่าค่อนข้างมีพิษต่ำทั้ง 3 ชนิด

ส่วนในตำรับที่มียา amphotericin B ผสมกับผลึกเหลวสังเคราะห์ CCE พบว่าที่ความเข้มข้นของยา amphotericin B 10 μg/ml ที่ผสมกับ CCE ที่ความเข้มข้น 20 μg/ml ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ CCE สูงขึ้นที่ระดับ 60, 100 และ 140 μg/ml ความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้น ค่า viability ลดลงเหลือประมาณ 75-80% อย่างไรก็ตามอัตราการอยู่รอดของเซลล์อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ($\approx$ 80%) เมื่อเทียบกับตำรับที่ใช้ deoxycholic acid และ COC เป็นสารนำส่งยา ความเป็นพิษของสารทั้ง

สองชนิด (COC กับ deoxycholic acid)ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) viability ≈ 60% ที่ความเข้มข้น 20 μg/ml และลดลงเหลือแค่ 40% ที่ความเข้มข้น180 μg/ml (รูปที่ 51)

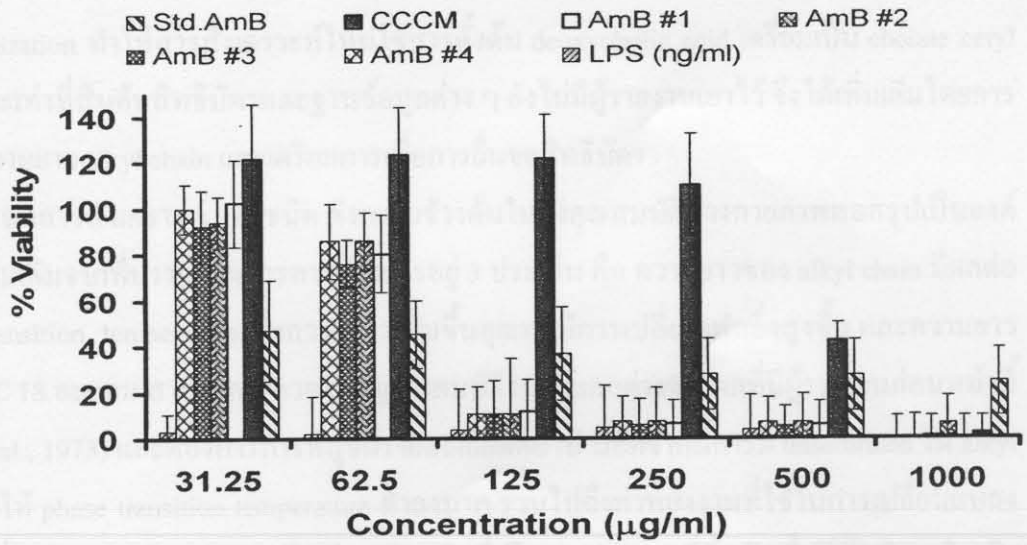


รูปที่ 50 Viability profile ของเซลล์ monocyte J774.2 cell line หลังจากบ่มเซลล์ที่ 37 °C 5% CO_2 กับตัวอย่าง cholate cetyl ether (●), deoxycholic acid (■) และ cholesteryl oleyl carbonate ester (▲)เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 51 Viabilitity profile ของเซลล์ monocyte J774.2 cell line หลังจากบ่มเซลล์ที่ 37 °C 5% CO_2 กับตัวอย่าง AMB 10 μg ผสมกับ cholate cetyl ether (●), deoxycholic acid (■) และ cholesteryl oleyl carbonate ester (▲) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (20-180 μg/ml) ของผลึกเหลว (mean ± SD, n=3, errors bar เล็กกว่า figure legends)

ในสูตรตำรับยาเตรียม amphotericin B ในสารผสมผลึกเหลว cholesteryl cetyl carbonate mixture (CCCM) และใน CCCM เดี่ยวพบว่า CCCM เดี่ยวไม่มีพิษต่อเซลล์ alveolar macrophage ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 250 μg/ml แต่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 500 μg/ml ขึ้นไปพบว่าเกิดพิษต่อเซลล์ อาจเนื่องจากปริมาณสารค่อนข้างสูงและสารสามารถซึมผ่านเซลล์ได้จึงก่อให้เกิดพิษ (รูปที่ 52) ส่วนตำรับยาเตรียม amphotericin B ในสารผสมผลึกเหลวสังเคราะห์พบว่าในตำรับที่ความเข้มข้นของยา amphotericin B ต่ำกว่า 62.5 μg/ml ไม่มีพิษต่อเซลล์ โดยพิจารณาที่ความเข้มข้นของยา amphoterincin B 30 μg/ml ในสูตรตำรับจะไม่มีไม่มีพิษต่อเซลล์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นก็จะพบพิษจากยาต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามตำรับยาเตรียม amphotericin B ในสารผสมผลึกเหลวสังเคราะห์ยังมีพิษน้อยกว่ายา amphotericin B เดี่ยว ทั้งนี้เนื่องจากยา amphotericin B อาจถูกปลดปล่อยจากตำรับอย่างช้า ๆ พิษของยาจึงลดลง (ที่ความเข้มข้น 60 μg/ml สูตรตำรับมีพิษลดลง (viability เพิ่มจาก 40 เป็น 80% เมื่อเทียบกับยาเดี่ยว) LPS ใช้ เป็น positive control พบว่ามีความเป็นพิษสูงมากที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 ng/ml (viability < 5%) เมื่อเทียบกับยาและสูตรตำรับยาเตรียมของ amphotericin B (รูปที่ 49)



รูปที่ 52 Viability profile ของเซลล์ AM cell line หลังจากบ่มเซลล์ที่ 37 °C 5% CO_2 กับตัวอย่าง pure AmB, CCCM, AmB # 1, AmB # 2, AmB # 3 และ AmB # 4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (31-1,000 μg/ml) เทียบกับ untreated cell lineและ LPS ความเข้มข้นหน่วยเป็น ng/ml (mean±S.D., n=3)

ข้อวิจารณ์

จากการวางแผนเริ่มต้นที่จะสังเคราะห์สารที่เป็นผลึกเหลว 4 ชนิด ซึ่งเป็น cholesteryl alkyl carbonate ester ที่มีความยาวของ alkyl chain 12, 14, 16, 18 คาร์บอนอะตอม เมื่อทำการศึกษาวิจัยไประดับหนึ่งและนักวิจัยได้มีโอกาสไปทำการศึกษาวิจัยที่ประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีผู้ได้รายงานผลการศึกษาไว้เรียบร้อยแล้ว (Elser et al., 1973) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการเกิดอันตรกริยากับยา amphotrericn B ยังไม่มีผู้รายงาน ดังนั้นการศึกษาวิจัยจึงยังยึดแนวเดิมที่จะสังเคราะห์สารกลุ่มนี้ออกมาแต่ลดจำนวนลงเหลือเพียงแค่ 2 ชนิด คือ CCC และ CSC เนื่องจากสารดังกล่าวยังไม่มีการผลิตขึ้นจำหน่าย และเพิ่งมีผู้จดสิทธิบัตรสารบางตัวไปเมื่อไม่นานมานี้ นอกจากนั้นยังได้นำสารกลุ่มที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันมาเปรียบเทียบที่เป็น carbonate ester คือ COC และ ester คือ CM และในขั้นการสังเคราะห์ CCC พบว่ามีสารเกิดขึ้นอีกสองชนิดที่มีคุณสมบัติน่าสนใจคือ SCC และ DCC จึงได้ทำการสังเคราะห์สารดังกล่าวโดยตรงเพื่อเพิ่มปริมาณให้สูงขึ้น และทำการศึกษาต่อ และได้เพิ่มเติมการสังเคราะห์ผลึกเหลวที่นำมาใช้เตรียมยาฉีดอีก 1 ชนิด เนื่องจากสารทั้ง 4 ชนิดข้างต้น (CCC, CSC, SCC, DCC) ไม่สามารถเป็น lyotropic liquid crystal ได้ แต่มีคุณสมบัติเป็น thermotropic liquid crystal การที่จะเตรียมเป็นยาฉีดต้องเตรียมเป็น nano-suspension ซึ่งไม่ได้วางไว้ในแผนการวิจัย ประกอบกับทางคณะไม่มีเครื่องมือ high pressure homogenization ทำให้สารสังเคราะห์ใหม่ใช้สารตั้งต้น deoxycholic acid เตรียมเป็น cholate cetyl ether และเท่าที่สืบค้นสิทธิบัตรและฐานข้อมูลต่าง ๆ ยังไม่มีผู้รายงานเอาไว้ จึงได้เพิ่มเติมโดยการเปลี่ยนความยาว alkyl chain และเตรียมการเพื่อการยื่นขอสิทธิบัตร

เมื่อพิจารณาสารสังเคราะห์ 4 ชนิด ดังกล่าวข้างต้นในแง่คุณสมบัติทางกายภาพพอสรุปเป็นองค์ความรู้เพิ่มเติมจากที่ปรากฏในวารสารวิชาการอยู่ 3 ประเด็น คือ ความยาวของ alkyl chain มีผลต่อ phase transition temperature ยิ่งความยาวเพิ่มขึ้นอุณหภูมิการเปลี่ยนเฟสยิ่งสูงขึ้น และความยาวเพียงแค่ C 18 อะตอม สารผลึกเหลวอาจสูญเสียสมบัติไปซึ่งแตกต่างจากผลที่มีผู้รายงานก่อนหน้านี้ (Elser et al., 1973) และต้องการการพิสูจน์รายละเอียดต่อไป นอกจากนี้การมี unsaturated ใน alkyl chain ทำให้ phase transition temperature ต่ำลงมาก รวมไปถึงค่าพลังงานที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงเฟสมีค่าต่ำ (entropy change) เมื่อเทียบกับชนิดที่เป็นสาย alkyl ที่อิ่มตัว ซึ่งการอธิบายในเชิงโครงสร้างและความเสถียรในโมเลกุลที่เป็น unsaturated chain ย่อมมีน้อยกว่า

สารที่สังเคราะห์ทั้งหมดมีทั้งคุณสมบัติที่เป็น monotropic และ enantiotropic liquid crystal ซึ่งต้องวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างในรายละเอียดเพื่อหาข้อสรุปต่อไปว่าการมีคุณสมบัติแบบใดแบบหนึ่งต้องอาศัยปัจจัยในเชิงโครงสร้างบ้าง เมื่อพิจารณา DCC พบว่าโครงสร้างสารเป็นระนาบแบนราบทั้งสองข้างและเป็น molecular symmetry มีค่า phase transition ที่สูง 150 และ 170 $^{\circ}$C คาดว่าเนื่องจากโครงสร้างที่ค่อนข้างเสถียรของโมเลกุลเองและการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอื่นที่นอกเหนือจากด้านเภสัชศาสตร์เป็นสิ่งน่าสนใจ ส่วนโมเลกุลของ SCC ซึ่งมี polar group จาก

carboxylate ester สารดังกล่าวก็มีความน่าสนใจในโมเลกุล ตรงที่อุณหภูมิแรกของการเปลี่ยนแปลงใกล้ 100 °C มากทำให้ผู้วิจัยสงสัยว่าเป็นน้ำ แต่เมื่อพิสูจน์เพิ่มเติมพบว่าข้อสงสัยดังกล่าวไม่เป็นไปตามที่คาดการณ์ รวมไปถึงความสามารถของสารดังกล่าวในการอุ้มน้ำได้สูงมาก ทำให้น่าจะเหมาะกับสูตรตำรับที่เพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิวหนัง เมื่อศึกษาไปอีกขั้นที่เป็นการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลแบนราบจาก cholesterol เป็น deoxycholic acid สารสังเคราะห์ที่ได้เป็นของกึ่งแข็งกึ่งเหลวสามารถเตรียมเป็น lyotropic liquid crystal ได้ โดยสามารถห่อหุ้มโมเลกุลยาได้เกือบทั้งหมด เมื่อใช้ ultracentrifuge เหวี่ยงที่ 500,000 g เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบ free amphotericin B น้อยกว่า 2% นั่นคือโมเลกุลของผลึกเหลวสามารถหุ้มยาไว้ได้ทั้งหมดที่สัดส่วนโมล 1 ต่อ 1 การเกิดอันตรกริยาของผลึกเหลวกับยา amphotericin B ยังไม่ได้ศึกษาในรายงานฉบับนี้ แต่จะเป็นงานในอนาคตต่อไป อย่างไรก็ตามการเตรียมยา amphotericin B ให้อยู่ในรูปผงแห้งสามารถเพิ่มความคงตัวของยา amphotericin B และมีพิษที่ลดลง อาจจะเนื่องจากการปลดปล่อยยาที่ช้าลง

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาโครงสร้างของสารกลุ่ม cholesterol derivatives มีความซับซ้อนมากแม้ว่าสามารถสังเคราะห์สารออกมาได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว การยืนยันโครงสร้างต้องใช้เวลานานและทรัพยากรสูง ดังนั้นงบประมาณในส่วนดังกล่าวต้องตั้งไว้ให้เพียงพอสำหรับการวิจัย การวิเคราะห์ mass spectrum ของสารก็มีความซับซ้อน เนื่องจากโมเลกุลหลายโมเลกุลไม่ได้แตกตัวเป็นอิออนและการแตกมักจะให้ base peak ของคอเลสเตอรอลออกมาทำให้ต้องใช้เวลาและความเชี่ยวชาญในการแปรผล การเตรียมเป็นสูตรตำรับและศึกษาอันตรกริยาระดับโมเลกุลยังต้องอาศัยการทำการทดลองที่ต่างประเทศด้วย small angle x-ray diffraction ควบคู่ไปกับการทำ solid state NMR ซึ่งต้องอาศัยเวลาและงบประมาณในการเดินทางไปต่างประเทศ จึงจะได้ข้อมูลที่สมบูรณ์

การศึกษาทดลองเกี่ยวกับเซลล์หลายชนิดต้องอาศัยการลงทุนที่สูงมากและการทดลองต้องทำอย่างต่อเนื่องและรักษาระดับความสะอาดไว้ได้ แต่ในการวิจัยศึกษาในมหาวิทยาลัยมีนักศึกษาใช้ห้องปฏิบัติการในส่วนนี้สูงทำให้การรักษามาตรฐานห้องปฏิบัติการทำได้ยาก

การศึกษาการเตรียมเป็นยาสูดผงแห้งสู่ทางเดินหายใจและการเตรียมเป็นยาฉีดทำได้เพียงระยะที่ 1 ยังต้องการผลการทดลองสนับสนุนแนวคิดและความรู้พื้นฐานอีกเป็นอันมากจึงสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้

การศึกษาการเตรียมเป็นยาสูดผงแห้งสู่ทางเดินหายใจและการเตรียมเป็นยาฉีดทำได้เพียงระยะที่ 1 ยังต้องการผลการทดลองสนับสนุนแนวคิดและความรู้พื้นฐานอีกเป็นอันมากจึงสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้