เทคโนโลยีนาโน/ไมโครเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากเมล็ดและเปลือกผลไม้ เพื่อบรรเทาผลข้างเคียงจากการรักษาและส่งเสริมคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยมะเร็ง

ธนโชติ ธรรมชาติ
หน่วยวิเคราะห์ วิจัยพฤกษเคมี
ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
โทร 083-6641818
Email thanachod_t@hotmail.com

1. บทนำ

ปัจจุบันประชาชนทั่วโลกหันมานิยมใช้สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อเสริมสุขภาพมากขึ้นทั้งในแง่เป็นยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง ประเทศไทยก็เป็นหนึ่งในประเทศที่นิยมการใช้สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาเป็นเวลายาวนาน ทั้งนี้เนื่องจากมีความเชื่อว่าสิ่งที่มาจากธรรมชาติย่อมมีความปลอดภัย โดยในด้านเครื่องสำอางมีการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้เป็นส่วนผสมกันอย่างแพร่หลาย โดยการประยุกต์ใช้ในรูปแบบสารสกัด เนื่องจากสะดวกต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และยังทำให้ผลิตในรูปแบบที่ทันสมัย สวยงามน่าใช้ ตรงตามความต้องการผู้บริโภคมากที่สุด

สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ อาทิเช่น เปลือกและเมล็ดผลไม้ที่ผ่านการสกัดโดยวิธีการระเหยด้วยตัวทำละลาย หรือใช้เทคนิค super critical fluid ก็ตามส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปสารสกัด ซึ่งมีสารสำคัญในกลุ่มโพลีฟินอล โพลีแซคคาร์ไรด์ แอนโทไซยานิน แคโรทีนอยด์ เทอร์ปีน และโปรตีน เป็นต้น ขั้นตอนต่อมาจึงพัฒนาเป็นสารสำคัญ (active ingredients) ในสูตรตำรับของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรและสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาที่โดดเด่น เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นต้น แต่ในปัจจุบันพบว่าการใช้สารสกัดเพียงอย่างเดียว ยังมีข้อจำกัดหลายประการ อาทิเช่น ความไม่คงตัว (instability) ของสารสกัดจากปัจจัยภายนอก ได้แก่ แสง อุณหภูมิ หรือ ความชื้น ส่งผลให้สารสำคัญเกิดการเสื่อมสลาย (degradation) ไปอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างเช่น สารต้านอนุมูลอิสระ(anti-oxidant) สารกลุ่มรงควัตถุ (pigment) สารต้านการอักเสบ (Anti-inflammation) และสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค (Anti-microbial) เป็นต้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพและอายุของผลิตภัณฑ์ลดต่ำลง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีอัตราการซึมผ่านผิวหนังที่ต่ำ (low skin delivery) ทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งสารสำคัญกลุ่มต่างๆ ได้แก่ โพลีฟินอล โพลีแซคคาร์ไรด์ แอนโทไซยานิน แคโรทีนอยด์ เทอร์ปีน และโปรตีน ไปยังบริเวณเป้าหมายที่ต้องการน้อยลง ตลอดจนไม่สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญได้

คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล (Micro/Nanoparticles), ไมโครเอนแคปซูเลชัน (Microencapsulation), ระบบนำส่งผ่านผิวหนัง (skin delivery system), ความคงตัว (stability)

2. เทคโนโลยีระบบนำส่งสารทางเครื่องสำอาง

เทคโนโลยีระบบนำส่งสารทางเครื่องสำอาง (Cosmetic delivery systems) เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่นิยมใช้ในปัจจุบันสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บและนำส่งผ่านผิวหนังของสารสำคัญจากสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เนื่องจากระบบดังกล่าวอาศัยหลักการไมโคร/นาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ ซึ่งเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีที่กำลังอยู่ในความสนใจของทั่วโลก โดยเทคโนโลยีระบบนำส่งสารทางเครื่องสำอางมีข้อดีหลายประการ ตัวอย่างเช่น สามารถเพิ่มอัตราการดูดซึมของสารสำคัญให้นำส่งสารไปยังบริเวณเป้าหมาย (target) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยปกป้องสารสำคัญ (preventing of active ingredients) ซึ่งอาจถูกทำลายจากเอนไซม์ เพิ่มความปลอดภัยโดยลดความเป็นพิษของสาร และยังสามารถป้องกันการเสื่อมสลายหรือเสียความคงตัวของสารสกัด จากปัจจัยภายนอก ได้แก่ แสงแดด อุณหภูมิ และความชื้น เป็นต้น ตัวอย่างรูปแบบของระบบนำส่งสารทางเครื่องสำอางที่อาศัยหลักการไมโคร/นาโนเทคโนโลยี ได้แก่ไลโปโซม (liposome) ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล (micro/nanoparticles) ไมโคร/นาโนอิมัลชัน (micro/nanoemulsions) อนุภาคไมโคร/นาโนชนิดไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticles) นิโอโซม (Niosomes) ทรานสเฟอร์โซม (transfersomes) เอทโธโซม (ethosomes) นาโนเจล (nanogels) และ นาโนไฟเบอร์ (Nanofibers) เป็นต้น

ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล (micro/nanoparticles) คืออนุภาคของแข็งที่มีขนาดเล็กในระดับไมโครหรือนาโนเมตร ซึ่งเป็นเทคโนโลยีสำหรับการบรรจุหรือห่อหุ้มสารซึ่งอาจมีสถานะเป็นของแข็ง ของเหลวหรือแก๊ส ด้วยสารที่ก่อตัวเป็นผนังได้ สารเหล่านี้อาจเป็นพอลิเมอร์ (ไคโตแซน เพคติน หรือ แอลจิเนต เป็นต้น) ขี้ผึ้ง ไขมัน หรือสารอื่นๆ สำหรับสารที่ถูกบรรจุอาจถูกบรรจุอยู่ภายในอนุภาคหรืออาจถูกดูดซับอยู่บนพื้นผิวอนุภาคได้ โดยทั่วไปมีขนาดอยู่ในช่วง 1 ถึง 1000 นาโนเมตร ซึ่งไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้อาจอยู่ในรูปของระบบคอลลอยด์ (Colloid) มีลักษณะเป็นสารแขวนลอยกระจายในสารละลาย หรือเตรียมอยู่ในรูปอนุภาคของแข็งที่มีอนุภาคทรงกลม ขึ้นอยู่กับเทคนิคและกรรมวิธีการเตรียม ซึ่งเทคโนโลยีนี้เป็นหนึ่งในวิธีการกักเก็บสารสำคัญ หรือที่เรียกว่ากระบวนการไมโคร/นาโนเอ็นแคปซูเลชัน (micro/nanoencapsulation)

สำหรับประโยชน์ของเทคโนโลยีไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลในด้านการพัฒนาเครื่องสำอาง พบว่าถูกนำมาใช้ในการพัฒนารูปแบบการนำส่งสารสำคัญทางเครื่องสำอาง การควบคุมการปลดปล่อยสารทางเครื่องสำอาง ทำให้เพิ่มระยะการออกฤทธิ์ต่อผิวหนัง การกลบกลิ่นของสารสำคัญ การเพิ่มความคงตัวของสารสกัดให้ฤทธิ์ยังคงมีประสิทธิภาพ โดยป้องกันสารสำคัญจากสภาพแวดล้อม เช่น การออกซิเดชัน ความชื้น แสง ความร้อน การลดการระเหยของสารสำคัญ การเปลี่ยนรูปแบบสารสำคัญจากของเหลวเป็นของแข็ง เป็นต้น วิธีการเตรียมไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล ได้แก่ วิธีการที่อาศัยวิธีทางเชิงกล (mechanical process) วิธีการที่อาศัยวิธีทางเคมีกายภาพ (ยhysicochemical process) และวิธีการที่อาศัยวิธีทางเคมี (chemical process) มีรายงานการศึกษาการเตรียมโคโตซาน/อัลจิเนตในรูปไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล เพื่อแก้ปัญหาความไม่คงตัวของสารสำคัญและใช้เป็นระบบนำส่งสารสำคัญอย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้อัลจิเนตเป็นโคโพลิเมอร์และแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารที่ทำให้เกิดการครอสลิงค์ (Cross link) สารประกอบที่เตรียมได้มีคุณสมบัติป้องกันการสลายตัวและสามารถจับสารสำคัญไว้ภายในโมเลกุลของไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล

ทางผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสำคัญและความเป็นไปได้สำหรับการยกระดับคุณภาพและพัฒนานวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการกักเก็บสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกผลไม้รูปแบบไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล(micro/nanoparticles) โดยอาศัยกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation process) เพื่อเพิ่มความคงตัวและนำส่งสารสำคัญจากเมล็ดและเปลือกผลไม้สำหรับผลิตภัณฑ์ผิวหนังและเส้นผมของผู้ป่วยมะเร็ง โดยเริ่มจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไมโคร/นาโนพาร์ทิ

เคิลจากพอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ ไคโตแซน อัลจิเนต เพคติน หรือเซลแล็ก เป็นต้น โดยใช้เครื่องเอนแคปซูเลเตอร์ (encapsulator) เพื่อจำลองเทคนิคการเตรียมในระดับอุตสาหกรรม จากนั้นศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ความคงตัว ความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญ การปลดปล่อยสารสำคัญ ประสิทธิภาพของไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลในการนำส่งผ่านผิวหนัง (skin permeation) ตลอดจนศึกษาความปลอดภัยของไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลทางด้านพิษวิทยาระดับนาโน (nanotoxicology) ความปลอดภัยระดับเซลล์ (การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์) โมเลกุล (ความผิดปกติที่เกิดในระดับสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ) และในสัตว์ทดลอง (การก่อความระคายเคืองและการก่ออาการแพ้ทางผิวหนัง)

อีกทั้งมีการศึกษากลไกเชิงลึกสำหรับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ(biological activity) และเภสัชวิทยา (Pharmacology)ของไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลเปรียบเทียบกับสารสกัดในด้านการเสริมสร้างของเซลล์ผิวหนังและฟื้นฟูเซลล์รากผม จากนั้นนำเทคโนโลยีที่เตรียมได้ไปต่อยอดในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อเสริมสร้างเซลล์ผิวหนังและฟื้นฟูเซลล์รากผมสำหรับผู้ป่วยมะเร็งระยะแรกที่ผ่านการรักษาด้วยเคมีบำบัดและรังสีรักษาในผู้ป่วยต่อไป

โครงการการวิจัยนี้จะดำเนินการภายใต้ขอบเขตของการนำเทคโนโลยีไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลมาประยุกต์ใช้สำหรับกักเก็บสารสำคัญกลุ่มโพลีฟินอล แอนโทไซยานิน โพลีแซคคาร์ไรด์และโปรตีน ตลอดจนศึกษาประสิทธิภาพในการนำส่งผ่านผิวหนังสำหรับสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกผลไม้ โดยนำสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่ผ่านการวิจัยมาแล้ว เพื่อพิสูจน์ฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยา ตลอดจนศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารสำคัญ (phytochemicals) และประเมินผลด้านพิษวิทยา (toxicity) เพื่อคัดเลือกตัวอย่าง (extracts) ที่มีความปลอดภัยโดยใช้การทดสอบระดับเซลล์ ได้แก่ ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ตรวจสอบการก่อความระคายเคืองของสารสกัดต่อผิวหนังกระต่าย (skin irritation test) และการก่ออาการแพ้ทางผิวหนัง (acute dermal toxicity test) ในสัตว์ทดลอง

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบฤทธิ์ข้างต้น มาคัดเลือกสารชีวภาพสำหรับพัฒนาให้อยู่ในรูปไมโคร/นาโนพาร์เคิลด้วยเครื่องเอนแคปซูเลเตอร์ (encapsulor) เพื่อจำลองกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยอาศัยหลักการ ionotropic gelation โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล โดยประเมินผลคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล ได้แก่

- ขนาดอนุภาค(particle size)
- รูปร่าง(morphology)
- ศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว (Zeta potential)
- โครงสร้างทางเคมี (FTIR spectroscopy)
- คุณสมบัติเชิงความร้อน (Thermal analysis)
- ความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญ (Encapsulation efficiency)
- การปลดปล่อยสารสำคัญ (Active ingredient release)
- ประสิทธิภาพของไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลในการนำส่งผ่านผิวหนังด้วยเครื่อง Franz diffusion cell เปรียบเทียบก้ารสกัด

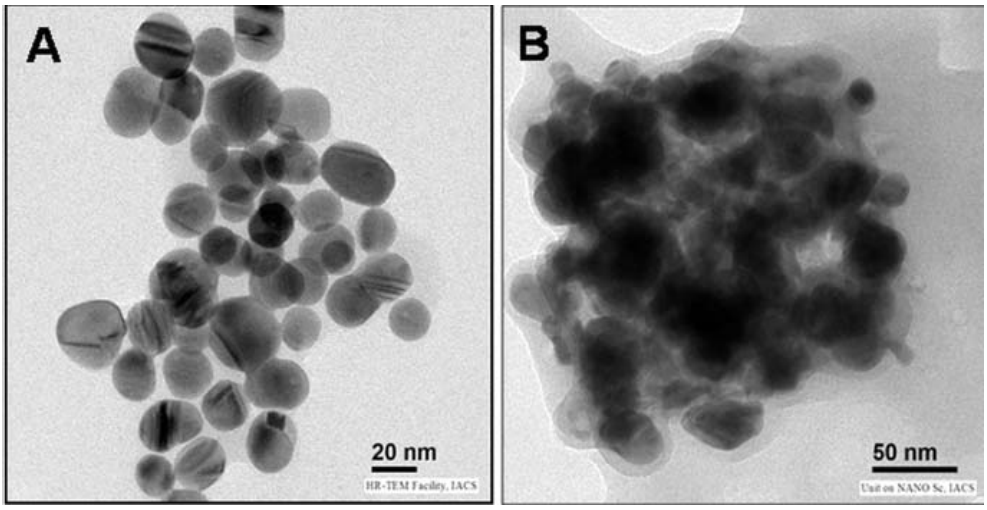
อีกทั้งมีการศึกษากลไกเชิงลึกสำหรับการออกฤทธิ์ทางชีวเคมีและเภสัชวิทยาของไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลเปรียบเทียบกับสารสกัด ในด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ได้แก่

- การเสริมสร้างเซลล์ผิวหนัง(fibroblast proliferation, skin barrier functions, endothelium barrier functions และ anti-inflammation)
- การฟื้นฟูเซลล์รากผม (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ anti-oxidant, cell proliferation by colorimetric assay, วัดการยับยั้ง NF-kB และ anti-apoptotic activity)

ตลอดจนศึกษาความปลอดภัยของไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลโดยการตรวจสอบทางด้านพิษวิทยาระดับนาโน (Nano-toxicology) และความปลอดภัยระดับเซลล์ (การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์) โมเลกุล (ความผิดปกติที่เกิดในระดับสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ) และในสัตว์ทดลอง (การก่อความระคายเคืองและการก่ออาการแพ้ทางผิวหนัง) และศึกษาพยาธิสภาพในสัตว์ทดลองหลังจากได้รับไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล เมื่อได้ข้อมูลทางด้านความปลอดภัยของเทคโนโลยีนี้ จากนั้นนำเทคโนโลยีที่เตรียมได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับเสริมสร้างสุขภาพผิวและผลิตภัณฑ์ฟื้นฟูเซลล์รากผมสำหรับผู้ป่วยมะเร็งระยะเริ่มต้นที่ผ่านการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดและรังสีรักษาใน**ผู้ป่วยต่อไป**

3. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล (Micro/nanoparticles) คืออนุภาคของแข็งที่มีขนาดเล็กในระดับไมโครหรือนาโนเมตร ซึ่งเป็นเทคโนโลยีสำหรับการบรรจุหรือห่อหุ้มสารซึ่งอาจมีสถานะเป็นของแข็ง ของเหลวหรือแก๊ส ด้วยสารที่ก่อตัวเป็นผนังได้ สารเหล่านี้อาจเป็นพอลิเมอร์ (ไคโตแซน เพคติน หรือ อัลจิเนต เป็นต้น) ขี้ผึ้ง ไขมัน หรือสารอื่นๆ สำหรับสารที่ถูกบรรจุอาจถูกบรรจุอยู่ภายในอนุภาคหรืออาจถูกดูดซับอยู่บนพื้นผิวอนุภาคได้ โดยทั่วไปมีขนาดอยู่ในช่วง 1 ถึง 1000 นาโนเมตร ซึ่งไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้อาจอยู่ในรูปของระบบคอลลอยด์ (Colloid) มีลักษณะเป็นสารแขวนลอยกระจายในสารละลาย หรือเตรียมอยู่ในรูปอนุภาคของแข็งที่มีอนุภาคทรงกลม ขึ้นอยู่กับเทคนิคและกรรมวิธีการเตรียม ซึ่งเทคโนโลยีนี้เป็นหนึ่งในวิธีการกักเก็บสารสำคัญ หรือที่เรียกว่ากระบวนการไมโคร/นาโนเอ็นแคปซูเลชัน (Micro/nanoencapsulation) **[1-5]** ลักษณะของนาโนพาร์ทิเคิลดัง **รูปที่ 1**



รูปที่ 1 ลักษณะของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล **[1]**

ชนิดของสารก่อผนัง

1. โพลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ (natural polymer) ได้แก่ สารพวกโปรตีน (albumin, casein, gelatin, gluten) สารพวกโพลีแซคคาร์ไรด์ (agar, acacia, alginate, caragenan, dextran, starch, chitosan) สารพวกไขมัน (beeswax)
2. โพลิเมอร์กึ่งสังเคราะห์ (semi-synthetic polymer) ได้แก่ cellulose esters และ ethers (methyl cellulose, ethyl cellulose, cellulose acetate) และ Fatty acid derivatives (glyceryl mono, di หรือ tri-stearate, stearic acid, aluminum monostearate, glyceryl mono and di-palmitate
3. โพลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) เช่น Vinyl polymers and copolymers (polyvinyl alcohol, polyacrylamide), polyamides และ polyesters (polylysine) เป็นต้น
4. สารอนินทรีย์ (Inorganic materials) ได้แก่ calcium sulfate, clays และ silicates เป็นต้น **[2]**

เทคนิคการเตรียมไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล [3]

วิธีการในการเตรียมไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล อาจแบ่งได้ 3 ประเภท

1. วิธีการที่อาศัยวิธีเชิงกล (mechanical process) เช่น pan coating, air suspension และ spray drying
2. วิธีการที่อาศัยทางเคมีกายภาพ (physicochemical process) เช่น simple และ complex coacervation
3. วิธีที่อาศัยวิธีทางเคมี (chemical process) เช่น interfacial polymerization, in-situ polymerization

Ionotropic gelation

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการเอนแคปซูเลชันเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ โดยไม่เป็นการทำอันตรายเซลล์ ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล จะถูกออกแบบให้ป้องกันเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก และนิยมใช้เทคนิคนี้ทางอุตสาหกรรมอีกด้วย ตัวอย่างสารก่ออนุภาคในระบบนี้คือ Sodium alginate และ calcium chloride ขั้นตอนการผลิตทำโดยหยดสารละลาย alginate ลงในสารละลาย $CaCl_2$ จะเกิดอนุภาคขึ้นทันที เนื่องจาก Ca จะ crosslink ภายในช่องว่างในโมเลกุล alginate ทำให้เกิดฟิล์มที่แข็งแรงขึ้น จากนั้นมีการ Coated ด้วย chitosan อีกชั้นเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของอนุภาคที่เตรียมขึ้น **[3]**

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล

มานี เหลืองธนะอนันต์และคณะ ศึกษาการเตรียมไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลโดยใช้เทคนิค ionotropic gelation ผลการศึกษาพบว่าชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตแซนมีผลต่อการเกิดอนุภาคไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล สำหรับวิธีการเตรียมทำโดยการครอสลิงค์ไคโตแซนซึ่งมีประจุบวกกับ tripolyphosphate (TPP)ซึ่งมีประจุลบส่งผลให้เกิดอนุภาคขึ้น โดยความเข้มข้นของไคโตแซนและTPP ที่เกิดไมโครพาร์ทิเคิลคือ 0.4% w/v และ 0.1% w/v ตามลำดับ ไมโครพาร์ทิเคิลถูกเตรียมขึ้นโดยการหยด 5 ml ของ 0.1% w/v TPP ในน้ำของ 10 ml ของสารละลาย chitosan glutamate ใน stirring ที่ 1,000 rpm ไมโครพาร์ทิเคิลถูกปั่นเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นบรรจุ BSA ในไมโครพาร์ทิเคิล โดยเติม สารละลาย BSA 1 ml **[4]** นอกจากนี้ มานี เหลืองธนะอนันต์และคณะยังได้ศึกษาการเพิ่มความคงตัวของไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลโดยการเติมสารลดแรงตรึงผิว ซึ่งจากงานวิจัยศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้ PEG 200 โดยทดสอบความคงตัวของไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลที่ 25 ^{0}C คุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ใช้ประเมินผลได้แก่ ขนาดอนุภาค ศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว พี่เอช รูปร่าง การกักเก็บโปรตีน ผลการศึกษาพบว่าการเติม PEG 200 สามารถช่วยเพิ่มความคงตัวจากการตกตะกอนของไคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลได้ **[5]**

ปกรณ์ ไกรสิทธิ์และคณะ ได้ศึกษาการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลจาก 2 พอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ ไคโตแซนและเซลแล็ก ด้วยวิธี polyelectrolyte complex (ระหว่างประจุบวกของไคโตแซนและประจุลบของเซลแล็ก) โดยการบรรจุ BSA ซึ่งการเกิดอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไคโตแซน เซลแล็ก และ BSA การศึกษาความเข้มข้นของ 3 ปัจจัยมีผลให้เกิดนาโนพาร์ทิเคิล การตกตะกอน (Aggregation) และเกิดสารละลาย (solution) **[6]**

Fundueanu และคณะ ศึกษาผลของเทคนิคที่ใช้ในการเตรียมแคลเซียมอัลจิเนตไมโครพาร์ทิเคิลที่มีความพรุนของอนุภาค (porosity) ปริมาตรการซึมผ่าน และการพองตัว ในการศึกษาใช้การเตรียมแคลเซียมอัลจิเนตไมโครพาร์ทิเคิล 2 เทคนิค ได้แก่ การเตรียมโดยหลักการอิมัลซิฟิเคชันเปรียบเทียบการใช้ครอสลิงค์ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ กับ epichlorohydrin และการเตรียมโดยการหยด จากหลักการอิมัลซิฟิเคชัน ได้ไมโครพาร์ทิเคิลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 220 ไมโครเมตร มีลักษณะ ทรงกลม และมีโครงสร้างภายในที่แน่นสำหรับเทคนิคการหยดได้ไมโครพาร์ทิเคิลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.4 มิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1.2 มิลลิเมตร ผลการเตรียมพบว่าขนาดโมเลกุลที่ต่ำของอัลจิเนต และ ขนาดโมเลกุลที่สูงของอัลจิเนต มีปริมาณความเข้มข้นในการเตรียมอยู่ที่ร้อยละ 8 (w/v) และร้อยละ 1 (w/v) และระยะห่างของหยดที่เหมาะสมอยู่ที่ 6 เซนติเมตร ระยะห่างที่น้อยกว่านี้จะทำให้เกิดไมโครพาร์ทิเคิลที่มีหางสั้น **[7]**

Ko และคณะ ศึกษาการเตรียมอนุภาคขนาดไมโครพาร์ทิเคิลของไคโตซานเพื่อใช้ควบคุมการปลดปล่อยยา felodipine ด้วยเทคนิคการครอสลิงค์ด้วยพันธะไอออนิกโดยใช้ไตรพอลิฟอสเฟต (TPP) ในขั้นตอนแรกเป็นการเตรียมไคโตแซนในกรดอะซิติก 1 % (v/v) ที่มี Tween 80 เป็นสารลดแรงตรึงผิว ซึ่งนำไปผสมกับยาที่ละลายในไดคลอโรมีเทน ทำให้ได้อิมัลชันน้ำมันในน้ำ ก่อนนำไปเติมในสารละลาย TPP จากผลการทดลองพบว่ามีขนาดในช่วง 500 -710 ไมโครเมตร สามารถกักเก็บยาไว้ได้ 90% และพบอัตราการปลดปล่อยยาขึ้นกับพีเอชและความเข้มข้นของ TPP **[8]**

Kimberly และ Maryam ศึกษาการเตรียมโคโตซาน-อัลจิเนตในรูปไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล โดยวิธี ionic gelation เพื่อแก้ปัญหาความไม่คงตัวของยาและใช้เป็นระบบนำส่งตัวยาอย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้อัลจิเนตเป็นโคโพลิเมอร์และแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารทำให้เกิดครอสลิงค์ (Cross-link agent) โดยสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมได้ดังกล่าวได้เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ของอัลจิเนตและหมู่เอมีนของไคโตซาน สารประกอบเชิงซ้อนที่ได้มีคุณสมบัติ คือป้องกันการสลายตัวทางกายภาพของตัวยาหรือสารสำคัญที่ถูกจับไว้ ในสารประกอบเชิงซ้อน สามารถเข้ากันได้ดีกับสิ่งมีชีวิต สลายตัวได้โดยกระบวนการทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิต และมีการปลดปล่อยตัวยาหรือสารสำคัญที่ถูกจับไว้ในสารประกอบเชิงซ้อนดีกว่าการใช้ไคโตซานหรืออัลจิเนตเพียงอย่างเดียว **[9]**

Chan และคณะศึกษาการเตรียมแคลเซียมอัลจิเนตไมโครพาร์ทิเคิลโดยวิธีการก่ออิมัลชันและใช้วิธีก่อ เจลของ alginate ด้วยวิธี gelation ภายนอก ผลการศึกษาพบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงไปในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการไมโครเอ็นแคปซูเลชัน (microencapsulation) จะทำให้เกิดการแตกหักหรือความเสียหายต่ออนุภาคในขณะที่มีการปั่นและส่งผลให้เกิดการจับกลุ่มเป็นก้อนของอนุภาค ดังนั้นจึงได้ศึกษาวิธีการเตรียมด้วยวิธี gelation ภายในคือการผสมสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตในปริมาณต่างๆ ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต โดยพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของ อัลจิเนต ที่ 2% w/w จากนั้นนำสารผสมเติมด้วย กรดอะซิติก ทำให้อนุภาคแห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 45 ^{0}C หรือทำให้แห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบเย็นผลจากการศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมทั้ง 2 วิธีพบว่าการใช้ครอสลิงค์เป็นแคลเซียมคาร์บอเนต **[10]**

ณัฐกรณ์ ใบแสง ศึกษาการเตรียมไคโตแซน-อัลจิเนต ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีสารสกัดบัวบกและที่มีสารสกัดบัวบกเทคนิคการเตรียมไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลสามารถทำโดยการทำปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกของไคโตแซนและประจุลบของอัลจิเนต และพบว่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซนและอัลจิเนต มีผลต่อขนาดอนุภาคและการเกิดไคโตแซน-อัลจิเนต ไมโครพาร์ทิเคิล จากผลการศึกษาพบว่าวิธีที่สามารถเตรียมไคโตแซน-อัลจิเนต ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีสารสกัดใบบัวบกขนาดอนุภาคเล็กที่สุดเท่ากับ331.40 nm สามารถเตรียมได้โดยการหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 18 mM ปริมาตร 0.3 ml ลงในสารละลายอัลจิเนต 0.03 % w/v และตามด้วยหยดสารละลายไคโตแซน 0.05% w/v และเมื่อศึกษาการกักเก็บ (encapsulation) และการปลดปล่อย (release) สารสกัดใบบัวบก โดยผลการศึกษาพบว่าไคโตแซนไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล สามารถเก็บกักสารสกัดบัวบกได้ 19.64 % และพบว่าอนุภาคดังกล่าวสามารถปลดปล่อยสารสกัดบัวบกที่ 4 ชั่วโมง เมื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง พบว่าอนุภาคที่เตรียมได้มีลักษณะทรงกลม จากการศึกษาความคงตัวของไคโตแซนอัลจิเนต ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลที่มีสารสกัดบัวบกเปรียบเทียบกับสารสกัดบัวบกที่ไม่ถูกเก็บในไคโตแซน-อัลจิเนตไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลมีความคงตัวทางกายภาพมากกว่าสารสกัดที่ไม่ถูกกักเก็บในไคโตแซน-อัลจิเนตไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล **[11]**

Tang และคณะ ศึกษาการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลโดยวิธี polyelectrolyte complex ระหว่างไคโตแซนและโพลีเปปไทด์ เช่น poly(g-glutamic acid) (g-PGA) สาร catechins เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการกักเก็บสารสำคัญนี้ในนาโนพาร์ทิเคิล ซึ่งความสามารถในการกักเก็บขึ้นอยู่กับพีเอช การปลดปล่อยสารต้านอนุมูลอิสระจากสารกลุ่ม catechins ในนาโนพาร์ทิเคิลเป็นแบบค่อยๆปลดปล่อย (Sustain release) นอกจากนี้ยังพบว่าการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลโดยวิธี polyelectrolyte complex ระหว่างไคโตแซนและโพลีเปปไทด์ เช่น poly(g-glutamic acid) (g-PGA) ที่บรรจุ catechins ยังสามารถเปิด tight junctions ของ Caco-2 cells และเพิ่มการซึมผ่านแบบ paracellular transport **[12]**

ข้อดีของการประยุกต์ใช้ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิล

เทคโนโลยีไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลในด้านการพัฒนาเครื่องสำอาง พบว่าถูกนำมาใช้ในพัฒนารูปแบบการนำส่งสารสำคัญทางเครื่องสำอาง การควบคุมการปลดปล่อยสารทางเครื่องสำอาง ทำให้เพิ่มระยะการออกฤทธิ์ต่อผิวหนัง การกลบกลิ่นของสารสำคัญ การเพิ่มความคงตัวของสารสกัดให้ฤทธิ์ยังคงมีประสิทธิภาพ โดยป้องกันสารสำคัญจากสภาพแวดล้อม เช่น การออกซิเดชัน ความชื้น แสง ความร้อน การลดการระเหยของสารสำคัญ การเปลี่ยนรูปแบบสารสำคัญจากของเหลวเป็นของแข็ง เป็นต้น **[3]**

โครงสร้างและหน้าที่ของผิวหนัง

โครงสร้างและหน้าที่ของผิวหนัง แบ่งเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis หรือ Cuticle) ชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นรองผิวหนัง (subcutaneous tissue) โดยชั้นที่มีความสำคัญสำหรับระบบนำส่งผิวหนังคือชั้นหนังกำพร้า ประกอบด้วยส่วนประกอบ 5 ชั้นย่อยคือ 1) Stratum corneum หรือ horny layerเป็นเซลล์แบนๆ ไม่มีสี เรียงเป็นแถวขนานกับผิวแบบหลังคาบ้าน อยู่ชั้นนอกสุดมีความหนาประมาณ 10-20 μm 2) Stratum lucidum พบเฉพาะตามฝ่ามือ ฝ่าเท้า เซลล์มีลักษณะแบน3) Stratum granulosum ภายในเซลล์เกิดเป็นแกรนูล แล้วถูกขับออกมานอกเซลล์กลายเป็นสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ในชั้นบนสุด ส่วนเซลล์จะกลายเป็น SC 4) Stratum spinosum เป็นเซลล์ที่มีลักษณะกลม หรือหลายเหลี่ยมแล้วค่อยๆ เปลี่ยน เป็นเซลล์แบน นิวเคลียสจะหดตัว เซลล์เชื่อมต่อกัน มีการสร้างโปรตีน keratohyalinและ 5) Stratum germinativum (Basal layer) เป็นเซลล์รูปไข่เรียงตัวเป็นแถวชั้นเดียว ซึ่งบริเวณที่สำคัญสำหรับการนำส่งสารทางเครื่องสำอางคือบริเวณ Stratum corneum **[13-14]**

การนำส่งไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลผ่านระบบผิวหนัง (Skin delivery)

การนำส่งไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลของสำคัญในเครื่องสำอางสามารถนำส่งไปยังบริเวณชั้นหนังกำพร้าในส่วน Stratum corneum หรือ horny layer ได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลักษณะเป็นเซลล์บางๆ เรียงเป็นแถวขนานกับผิวแบบแนวหลังคาบ้าน โดยเรียงตัวอยู่ชั้นนอกสุดของผิวหนังชั้นหนังกำพร้ามีความหนาประมาณ 10-20 μm เป็นเป็นชั้นที่มี ความสำคัญที่สุดสำหรับกีดกันการนำส่งสารสำคัญทางเครื่องสำอางผ่านผิวหนัง เนื่องจากประกอบด้วยกลุ่มของ keratinized cells รูปร่างแบนที่ไม่มีชีวิต เรียกว่า corneocytes มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 μm หนาประมาณ 1-2 μm เมื่อชั้น Stratum

corneum เกิดการเปียกน้ำ corneocytes จะเกิดการดูดซับน้ำได้ถึง 60 -70 % โดยน้ำหนัก ของ stratum corneum ส่วน keratinized cells เหล่านี้จะถูกแทนที่ตลอดเวลาจากการแบ่งเซลล์ของ viable epidermis ท้ายที่ที่สุดจะได้เซลล์เรียงตัวมีลักษณะแบนๆ ที่ซ้อนทับกัน ประกอบด้วย fibrous keratin ซึ่ง เส้นใยเหล่านี้มีประจุเป็นลบ เมื่อ pH ของสภาวะทางสรีรวิทยาเท่ากับ 7.4 และ keratohyalin ล้อมรอบด้วยextracellular lipid matrix โครงสร้างลักษณะนี้อาจเรียกว่าเป็น protein bricks เรียงตัวซ้อนอยู่ใน lipid mortar

โครงสร้างของ epidermal intercellular lipid matrix ค่อนข้างซับซ้อนประกอบด้วยส่วน ที่เป็น hydrophobic และ hydrophillic สลับกัน ส่วนใหญ่มักเรียงตัวเป็น bilayers ส่วนของ hydrophobic ใน Stratum corneum ประกอบด้วย hydrocarbon chain ของ lipid ซึ่งเป็นบริเวณที่สารต่างๆ รวมทั้งน้ำผ่านได้ยาก lipid ในชั้น epidermis จะประกอบด้วย ceramide type III 33%, ceramide type IV 22%, cholesterol 25%, cholesterol sulfate 5%, และ several fatty acids 15% อาจแตกต่างกันตามความลึกของชั้นผิวหนังที่บริเวณผิวหนังจะมี pH ประมาณ 5 ซึ่ง pKa ของ SC lipid เท่ากับ 8 นั่นคือ headgroups ของ lipid จะแตกตัว (ionized) ได้เล็กน้อย ในชั้น SC ที่ลึกลงไป pH จะเพิ่มขึ้นเป็น 7.4 ซึ่งทำให้ head groups ของ lipid แสดงประจุลบ การแตกตัวของ head groups นี้จะเพิ่มขึ้นจาก 10% ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ส่วนนอกของ Stratum corneumเป็น 90% (ส่วนด้านในของ Stratum corneum) ความต้านทานของ Stratum corneum จะเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายโซ่ ของสปิงโกลิปิดที่อุณหภูมิห้อง lipid เหล่านี้จะเป็น quasi-crystalline phase จึงมีผลทำให้เยื่อเลือกผ่านแข็ง **[13-14]**

กลไกการดูดซึมผ่านผิวหนัง (Mechanism of skin permeation)

ไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลสารสามารถดูดซึมผ่านผิวหนังได้ 3 ช่องทาง คือผ่านเซลล์ของผิวหนัง (transcellular route) ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (intracellular route) และ ผ่านช่องหรือท่อเปิดบริเวณผิวหนัง (appendageal route) ดังรูปที่ 2 เมื่อสารสัมผัสกับผิวหนัง สารจะถูกดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังโดยการแพร่ได้ 3 ทาง คือ

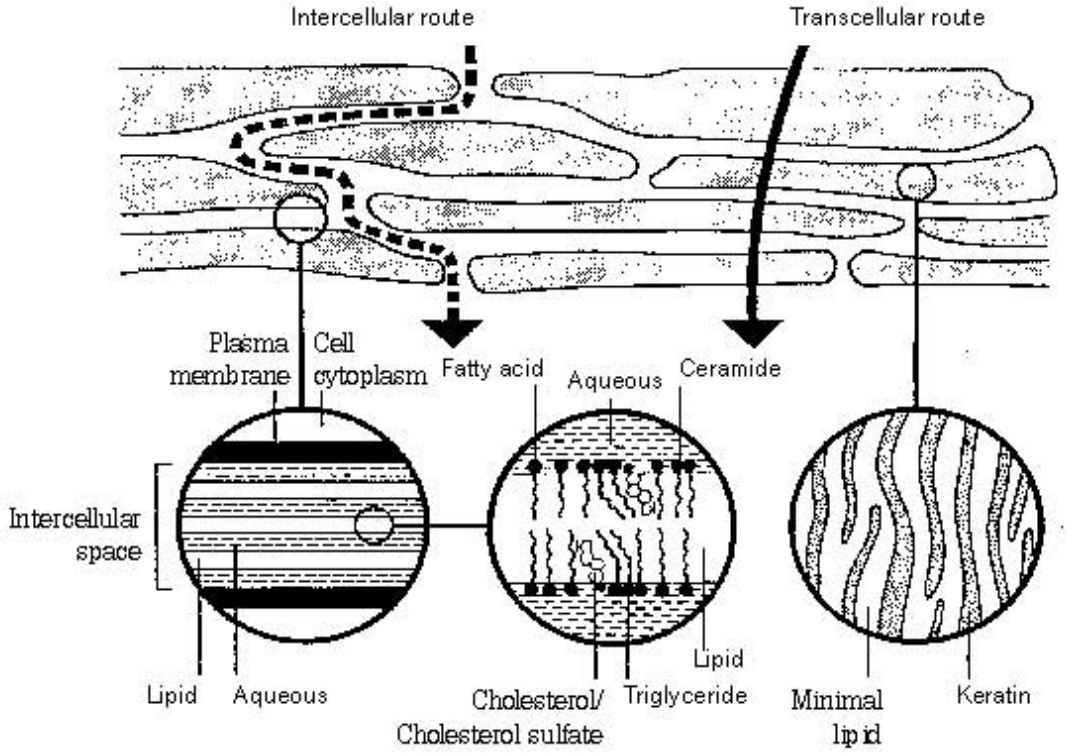
1. ผ่านเซลล์ของผิวหนัง (transcellular, transcorneocytes หรือ intracellular route)

โดยเซลล์ของ Stratum corneum มีส่วนประกอบที่เป็นเส้นใยโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก จึงมีส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นสารที่จะแพร่ผ่านในบริเวณนี้ได้ดีควรจะละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน

2. ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular route)

ซึ่งในระหว่างเซลล์ในชั้น stratum corneum ประกอบด้วยส่วนที่เป็นของเหลวที่เป็นไขมัน ดังนั้นสารที่จะสามารถซึมผ่านได้ดีจะต้องมีคุณสมบัติที่สามารถละลายในไขมันได้บางส่วน แต่ต้องไม่ละลายในไขมันดีจนเกินไป เนื่องจากการละลายในไขมันได้ดีเกินไปมีผลให้ตัวยาหรือสารสำคัญอาจถูกจับไว้ในชั้นของผิวหนังส่งผลให้ไม่เกิดการปลดปล่อยยาหรือสารสำคัญให้ผ่านไปยังผิวหนังชั้นถัดไป สารที่ผ่านได้ดีควรจะมีค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งภาค (partition coefficient) ใกล้เคียงหนึ่ง

3. ผ่านทางรูเปิดหรือท่อบนผิวหนัง (transappendageal) ได้แก่ บริเวณต่อมไขมัน รูขุมขน และต่อมเหงื่อ ซึ่งบริเวณนี้จะจะยอมให้สารที่มีขั้วและโมเลกุลใหญ่ซึมผ่านได้ดี แต่อย่างไรก็ตามพื้นที่ผิวของรูเปิดนับว่าน้อยมาก ประมาณ 0.1% จึงไม่ช่วยการดูดซึมมากนักในบริเวณนี้ **[15 -19]**



รูปที่ 2 กลไกการดูดซึมสารผ่านผิวหนัง **[15]**

ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมผ่านสารผ่านผิวหนัง

การซึมผ่านของสารจะผ่านทางใดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารที่จะผ่าน เช่น การละลาย (solubility), สัมประสิทธิ์การแบ่งภาค (partition coefficient), pKa, ขนาดโมเลกุล (molecular size), ความคงตัว (stability) และ การจับ (binding) ส่วนประกอบและความหนาของของเยื่อเลือกผ่าน (membrane) ตลอดจนจำนวนต่อมเหงื่อและ รูขุมขน นอกจากนี้ยังพบว่าความชื้นของเยื่อเลือกผ่าน โดยทั่วไปสารจะไม่สามารถผ่านทาง corneocytes ส่วนบริเวณ shunt นั้นจะมีความต้านทานต่อการการซึมผ่าน (penetration) ต่ำที่สุด สารต่างๆ โดยเฉพาะสารที่ละลายน้ำได้จะสามารถผ่านผิวหนังโดยทางนี้ได้เร็วกว่าผ่านทางอื่น แต่บริเวณนี้มีเพียง 0.1% ของพื้นที่ผิวทั้งหมด ดังนั้นในการที่จะเพิ่มการนำส่งยาผ่านผิวหนัง จึงมักจะผลักดันให้ผ่านผิวหนังชั้น Stratum corneum ทาง intercellular lipids คือพยายามเปลี่ยนแปลงหน้าที่ในการเป็นการกั้นของผิวหนัง(skin barrier) ของผิวหนังชั้น Stratum corneum โดยเปลี่ยนแปลงที่โครงสร้างภายในของชั้นไขมัน(intercellular lipid structure) ของผิวหนังชั้น Stratum corneum **[15-19]**

Şenyiğit และคณะได้ศึกษาการกักเก็บ clobetasol-17-propionate (CP) ใน lecithin/chitosan นาโนพาร์ทิเคิล เพื่อใช้ในการขนส่งสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนัง (Skin in vitro) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพนาโนพาร์ทิเคิลได้แก่ ขนาดอนุภาค ศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิว ประสิทธิภาพในการบรรจุ สำหรับรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิล ถูกตรวจสออบโดยเครื่อง transmission electron microscopy ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการบรรจุของ clobetasol-17-propionate (CP) ในlecithin/chitosan นาโนพาร์ทิเคิลมีค่าเท่ากับ 92.2% ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับทาผิวหนัง การทดสอบการซึมผ่านของผิวหนังโดยใช้หูหมูเป็นแบบจำลอง ด้วยเครื่อง Franz diffusion cells โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเจลไคโตแซนกับครีมของยา clobetasol-17-propionate ผลการศึกษาพบว่า การ incorporate ยาเข้าไปภายในนาโนพาร์ทิเคิลเป็นการเหนี่ยวนำให้ clobetasol-17-propionate มีผลเพิ่มการซึมผ่านชั้นผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบกับเจลไคโตแซนกับครีมของยา clobetasol-17-propionate **[20]**

Sonavane และคณะ ได้ศึกษาการซึมผ่านของ gold nanoparticles (NPs) ผ่านทาง isolated rat skin และ intestine นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของขนาดอนุภาคต่อการซึมผ่าน โดยใช้เครื่อง Franz diffusion cells สำหรับประเมินการซึมผ่านของ gold NP จากผิวหนังหนู ในขณะที่ intestinal sac ถูกใช้ในการทดสอบการซึมผ่านระบบลำไส้ ความหนาแน่นของ gold NP ถูกตรวจวัดโดยเครื่อง UV–vis spectroscopy ในขณะที่ gold ที่ซึมผ่านสามารถตรวจวัดโดย ICP mass spectrometry การดูดซึมและการจำเพาะของ gold NP ผ่านทางผิวหนังหนูด้วยเครื่อง TEM การตรวจวัดเชิงคุณภาพของ gold ภายในผิวหนังหนูถูกตรวจวัดโดย energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) Gold NP แสดงประจุลบ การซึมผ่านของผิวหนังของ Gold NP ขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาค ขนาดอนุภาคที่15 nm ของ gold NP แสดงการซึมผ่านที่สูงที่สุด showed higher permeation เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของ gold ที่ 102 nm และ 198 nm เมื่อขนาดของ gold NP เพิ่มขึ้น มีผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านและค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านมีค่าลดลง **[21]**

4. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Mahato, M. Pal, P. Tah, B. Ghosh, M. and Talapatra. G.B. Study of silver nanoparticle–hemoglobin interaction and composite formation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2011, 88, 141– 149.
2. Finch CA. Industrial Microencapsulation : polymer for microcapsule walls. In: Stephenson DR. Encapsulation and controlled release. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1993. P1-11.
3. Mathiowitz E. Microencapsulation. In: Mathiowitz E. Encyclopedia of Kreitz MR Controlled drug delivery, Vol. 2, New York; John Wiley & Sons. Brannon-Peppas L. 1999, p 493 - 523.

4. Luangtana-anan, M. Opanasopit, P. Ngawhirunpat, T. Nunthanid, J. Sriamornsak, P. Limmatvapirat, S. and Lim, L.Y. Effect of chitosan salts and molecular weight on a nanoparticulate carrier for therapeutic protein, Pharmaceutical Development Technology,2005, 10, 189-196.
5. Luangtana-anan, M. Limmatvapirat, S. Nunthanid, J. Chalongsuk, R. and Yamamoto, K. Polyethylene Glycol on Stability of Chitosan Microparticulate Carrier for Protein. AAPS PharmSciTech. 2010, 11, 1376-1382.
6. Kraisit, P. Limmatvapirat, S. Nunthanid, J. Sriamornsak, P. and Luangtana-anan, M. Nanoparticle formation by using shellac and chitosan for a protein delivery system. Pharmaceutical development and Technology. 2013, 18, 686-693.
7. Fundueanu, G. Nastruzzl, G. Carpor, A. Desbrieres, J. and Rinaudo, M. Physicochemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. Biomaterials. 1999, 20, 147-1435.
8. Ko, J.A. Park, H.J. Hwang, S.J. Park, J.B. and Lee, J.S. Preparation and characterization of chitosan microparticels intended for controlled drug delivery. International of Pharmaceutics. 2002, 249, 65-174.
9. Kimberly, L.D. and Maryam, T. Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 2005, 16, 1, 43-56.
10. Chan, L.W. Lee, H.Y. Heng, P.W.S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. International Pharmaceutics. 2002, 242, 259-262.
11. ณัฐกรณ์ ใบแสง. การเตรียมและการศึกษาสมบัติทางกายภาพของไคโตซาน-อัลจิเนตไมโคร/นาโนพาร์ทิเคิลที่มีสารสกัดบัวบก. วิทยานิพนธ์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2550, 86 แผ่น.
12. Tang, D. Yu, S. Ho, Y. Huang, B. Tsai, G. Hsieh, H. Sung, H. and Mi, F. Characterization of tea catechins-loaded nanoparticles prepared from chitosan and an edible polypeptide. Food Hydrocolloids. 2013, 30, 33-41.
13. Hamid, R.M., Adrian, C.W. Brain, W.B. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids.II; Effect of geometry of the stratum corneum on permeation of model drug 5-fluorouracil and oestradiol. Int.J.Pharm. 1996, 131, 117-129.
14. Pliquett U. Mechanistic studies of molecular transdermal transport due to skin electroporation. Advanced Drug Delivery Reviews. 1999; 35: 41-60.
15. Hamid, R.M., Adrian, C.W. and Brain, W.B. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids.II; Effect of geometry of the stratum corneum on permeation of model drug 5-fluorouracil and oestradiol. Int.J.Pharm. 1996, 131, 117-129.
16. Edward, D.A. Prausnitz, M.R. and Langer, R. Analysis of enhanced transdermal transport by skin electroporation. J. Controlled. Release. 1995, 34, 211- 221.

17. Chien Y. Advances in transdermal systemic medication. In: Tradermal controlled systemic medications. Edited by Chien Y. New York: Marcel Dekker, 1987: 1-6.
18. Wang, S. Kara, M. and Krishnan, T.R. Transdermal delivery of cyclosporin-A using electroporation. J. Controlled. Release. 1998, 50, 61-70.
19. Riviere, J.E. and Heit, M.C. Electrically-assisted transdermal drug delivery. Pharm. Res. 1997, 14, 6, 687-697.
20. Şenyiğit, T. Sonvico, F. Barbieri, S. Özer, Ö. Santi, P. and Colombo, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin Journal of Controlled Release. 2010, 142, 368–373.
21. Sonavane, G. Tomoda, K. Sano, A. Ohshima, H. Terada, H. and Makino K. *In vitro* permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2008, 65, 1–10.