

การศึกษาคุณสมบัติของไลโปโซมสำหรับระบบนำส่งยาผ่านทางผิวหนัง

CHARACTERIZATION OF LIPOSOMES FOR TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEM

วรนนท์ รังสิมาวงศ์ และ ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์*

กลุ่มวิจัยและพัฒนานวัตกรรมสีเขียวทางเภสัชศาสตร์

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

*ติดต่อผู้พิมพ์: ngawhirunpat_t@su.ac.th

WORRANAN RANGSIMAWONG AND TANASAIT NGAWHIRUNPAT

Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG),

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University,

Sanamchandra Palace, Nakhon Pathom

*Corresponding Author: ngawhirunpat_t@su.ac.th

บทคัดย่อ

ไลโปโซมได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยา ในหลายการศึกษามีการใช้ไลโปโซมเป็นตัวพาสำหรับระบบนำส่งยาผ่านทางผิวหนัง โดยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไลโปโซม เช่น จำนวนชั้นของผนัง ความยืดหยุ่น ขนาด และประจุ เป็นสิ่งสำคัญสำหรับประเมินคุณสมบัติในการนำส่งยาทางผิวหนัง ในบทนิพนธ์นี้เราได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับ การศึกษาคุณสมบัติของโครงสร้างของไลโปโซม โดยใช้เทคนิคการกระเจิงแสงเพื่อวัดขนาดอนุภาคและประจุผิว การใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเพื่อศึกษาสภาพแวดล้อมของผนังสองชั้นไลโปโซม และการศึกษาคุณสมบัติของการซึมผ่านผิวหนังทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ ซึ่งจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งและช่องทางการซึมผ่านผิวหนังของสารเรืองแสงในผิวหนัง

คำสำคัญ : ไลโปโซม, ระบบนำส่งยาผ่านทางผิวหนัง, เทคนิคการกระเจิงแสง, เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี, กล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์

Abstract

Liposomes have received a lot of attention to be used as pharmaceutical carriers. Many studies have been used liposomes as carriers for transdermal drug delivery systems. The physicochemical characteristics of the liposomes such as the lamellarity, elasticity, size and charge are important determinants for their dermal drug delivery properties. This review is focused on brief regarding characterization of structure of liposomes by using light scattering technique for measuring particle size and surface charge and using spectroscopic techniques for measuring microenvironment of membrane bilayers. In addition, characterization of skin

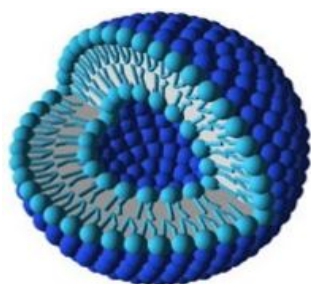
penetration using confocal laser scanning microscopy (CLSM) can provide information about the localization and the permeation pathway of a fluorescent compound in the skin.

Keywords: Liposomes, Transdermal drug delivery systems, Light scattering technique, Spectroscopic techniques, Confocal laser scanning microscopy

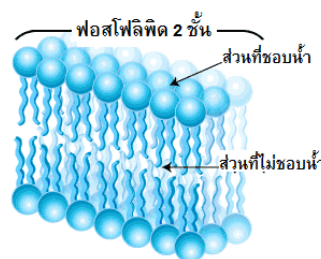
บทนำ

ไลโปโซม (liposomes) คือ อนุภาคขนาดเล็กหรือถุงขนาดเล็กที่เกิดจากการเรียงตัวของสารไขมันประเภทฟอสโฟลิพิด (phospholipid) คล้ายคลึงกับผนังเซลล์ แต่ผนังของไลโปโซมอาจมีผนังสองชั้น (bilayer) ของไขมันได้มากกว่าหนึ่งชั้น ในขณะที่ผนังเซลล์มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (Large Multilamellar Vesicles, LMV) มีขนาดอนุภาค 0.05-10 ไมครอน เมื่อนำไลโปโซมนี้ไปผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง จะได้ไลโปโซมขนาดเล็กที่มี

ผนังสองชั้นชั้นเดียว (Small Unilamellar Vesicles, SUV) ซึ่งมีขนาดอนุภาค 0.025-0.05 ไมครอน ปัจจุบันมีการนำไลโปโซมมาใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัย เนื่องจากไลโปโซมสามารถเก็บกักยาได้ทั้งชนิดที่ชอบน้ำ (hydrophilic drugs) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic drugs) ในส่วนที่เป็นวัตถุดิบน้ำภายในอนุภาค หรือส่วนที่อยู่ระหว่างผนังสองชั้นของไลโปโซมตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1 (ก และ ข) อีกทั้งยังสามารถป้องกันตัวยาจากการถูกทำลายโดยสภาวะภายนอก เช่น แสง ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และเอนไซม์ (enzymes)¹



(ก)



(ข)

ภาพที่ 1 แบบจำลองของอนุภาคไลโปโซม (ก) และผนังสองชั้นของไลโปโซม (ข)^{2,3}

การนำส่งยาทางผิวหนังหมายถึงการนำส่งยาไปยังชั้นต่าง ๆ ของผิวหนัง รุขุมขน ต่อมต่าง ๆ ที่อยู่ในผิวหนัง รวมถึงการเข้าสู่กระแสเลือดด้วย สามารถแบ่งการนำส่งได้เป็น 3 วิธีทางหลัก คือ 1) ผ่านท่อเหงื่อ (sweat ducts) 2) ผ่านรูขุมขน (hair follicles) และต่อมไขมัน (sebaceous glands) และ 3) ผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม ซึ่งในส่วนของ การนำส่งสารผ่านชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum)

สามารถแบ่งวิธีทางในการนำส่งสารได้อีกเป็น 2 วิธีทาง คือ ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular pathway) เป็นการนำส่งที่ต่อเนื่อง แต่มีเส้นทางที่คดเคี้ยวในการนำส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของไขมันในผิวหนัง ส่วนอีกวิธีทางหนึ่งคือ การนำส่งผ่านเซลล์ (trans-cellular pathway) ทั้งที่เป็นเซลล์เคอราทิโนไซต์ (keratinocytes) และผ่านไขมันที่อยู่ระหว่างเซลล์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไขมันที่อยู่ระหว่างเซลล์มี

บทบาทสำคัญต่อการเป็นผนังกันตามธรรมชาติของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม

ในการนำส่งยาทางผิวหนัง ไลโปโซมเป็นตัวพายาระบบหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นถุงอนุภาคที่สามารถเพิ่มการนำส่งยาผ่านผิวหนังได้ โดยกลไกในการนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังของไลโปโซมมีหลายกลไก ได้แก่ ไลโปโซมดูดซับบริเวณผิวส่วนนอกสุด แล้วเกิดการแตก และเพิ่มแรงส่งให้ยาเข้าสู่ผิวหนังได้ดีขึ้น หรือไลโปโซมซึมเข้าสู่ผิวหนังชั้นนอกสุดและหลอมรวมกับส่วนของไขมันในผิวหนังชั้นนี้ แล้วค่อย ๆ ปลดปล่อยสารที่กักเก็บไว้ ทำให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของยายาวนานขึ้น ซึ่งผลเพิ่มการนำส่งยาทางผิวหนังอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไลโปโซม เช่น ขนาดอนุภาค (particle size) ประจุผิว (surface charge) จำนวนชั้นของผนังไลโปโซม (lamellarity) และความยืดหยุ่น (elasticity)^{1,4} การศึกษาคุณลักษณะโครงสร้างของไลโปโซม สามารถบอกความแตกต่างของโครงสร้างไลโปโซม อันมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงกระบวนการในการเตรียม และส่วนประกอบในสูตรตำรับได้ ซึ่งความแตกต่างของโครงสร้างนี้ส่งผลต่อพฤติกรรมของอนุภาคทั้งในการทดสอบแบบภายนอกร่างกาย (*in vitro*) เช่น ความคงตัว และการทดสอบแบบภายในร่างกาย (*in vivo*) เช่น การนำส่งยาสู่ตำแหน่งเนื้อเยื่อหรือเซลล์⁵

ในส่วนเทคนิคการประเมินการนำส่งยาทางผิวหนังมีหลายวิธี ซึ่งวิธีที่ให้ข้อมูลทั้งด้านปริมาณและอัตราการซึมผ่าน ต้องอาศัยการนำเทคนิคก้าวหน้ามาใช้ในการวิเคราะห์ชั้นผิวหนัง

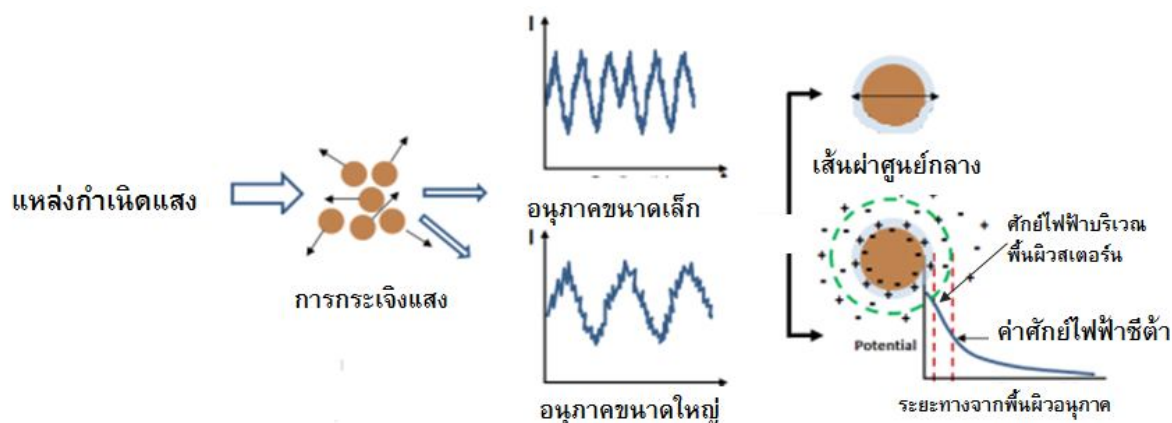
ด้วย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ (confocal laser scanning microscopy, CLSM) เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (infrared (IR) spectrometer) กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (atomic force microscopy, AFM) เป็นต้น⁶ โดยเฉพาะกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ ถือเป็นเครื่องมือที่ดีมากในการวิเคราะห์การกระจายและการแทรกผ่านผิวหนังของสารเรืองแสง (fluorescent compounds) ที่ให้ข้อมูลที่มีความถูกต้องในการระบุตำแหน่งมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังให้ข้อมูลเกี่ยวกับอันตรกิริยาระหว่างตัวพายาระดับนาโน เช่น ไลโปโซม (liposomes) นาโนสเฟียร์ (nanospheres) และไมเซลล์ (micelles) กับเซลล์ต่าง ๆ ในผิวหนัง รวมทั้งให้ข้อมูลการสะสมของยา (accumulation) การแสดงผลภายในเซลล์ (intracellular fate) และกลไกของการแทรกผ่านผิวหนัง (mechanism of penetration)⁷

การศึกษาผลของไลโปโซมต่อการนำส่งยาผ่านทางผิวหนังนั้น จะต้องทำการประเมินทั้งคุณสมบัติของไลโปโซมและสภาพผิวหนังที่ได้รับอนุภาคไลโปโซมด้วยการใช้เทคนิคต่าง ๆ โดยในบทวิพนธ์ปริทัศน์นี้ได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับการใช้เทคนิคการกระเจิงแสง (light scattering technique) เพื่อวัดขนาดอนุภาคและประจุที่ผิวของไลโปโซม เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy technique) เพื่อศึกษาสภาพแวดล้อมของผนังไลโปโซม และเทคนิคกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ (CLSM) เพื่อการประเมินการนำส่งยาทางผิวหนังที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งและช่องทางการซึมผ่านผิวหนังของสารเรืองแสงในผิวหนัง

การศึกษาขนาดอนุภาคและประจุที่ผิวของไลโปโซม ด้วยเทคนิคการกระเจิงแสง (light scattering technique)

เทคนิคการกระเจิงแสง เป็นเทคนิคที่นำมาใช้เพื่อวัดขนาดอนุภาคและประจุที่ผิวของอนุภาคไลโปโซม ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยทั่วไป

จะประยุกต์ใช้เทคนิคนี้กับนาโนพาร์ติเคิล (nanoparticles) คอลลอยด์ (colloids) ยาน้ำแขวนลอย (emulsions) และยาน้ำแขวนตะกอนที่ขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน (submicron suspensions)



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบและหลักการทำงานของเทคนิคการกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์ (dynamic light scattering)⁸

การวัดขนาดอนุภาคโดยใช้เทคนิคการกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์ (dynamic light scattering) เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง (non-invasive) เหมาะกับการวัดขนาดและการกระจายขนาด (size and size distribution) ของอนุภาคที่กระจายในของเหลว ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดในช่วงเล็กกว่าไมครอน คือ ในช่วง 0.6 ถึง 10 ไมครอน โดยหลักการทำงานจะอาศัยการเคลื่อนที่ของอนุภาคแบบบราวเนียน (Brownian motion) ที่แขวนตะกอนอยู่ในสุตรดำรับ โดยอนุภาคเหล่านี้จะเคลื่อนที่เข้าออกบริเวณช่องกันแสงผ่าน เมื่อแสงเลเซอร์ตกกระทบอนุภาคจะเกิดการกระเจิงแสงเลเซอร์ที่ความเข้ม (intensities) แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการกระพือขึ้น-ลงของความเข้มแสงกับเวลา (time-dependent fluctuations) โดยอนุภาค

ขนาดใหญ่มีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient) ต่ำ จะเคลื่อนที่ช้ากว่าอนุภาคขนาดเล็ก ทำให้ความถี่ในการกระพือขึ้น-ลงของแสงที่กระเจิงต่ำ ส่วนอนุภาคขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าจึงมีความถี่ในการกระพือขึ้น-ลงของแสงที่กระเจิงสูงกว่า ซึ่งความถี่ในการกระพือขึ้น-ลงของความเข้มแสงจะถูกส่งไปยังตัวรับสัญญาณ เพื่อนำไปคำนวณหาขนาดอนุภาค (R) โดยใช้สมการ Stokes-Einstein^{8,9}

การวัดประจุที่ผิวอนุภาคโดยใช้เทคนิคการกระเจิงแสงแบบการเคลื่อนที่ของไอออน (Electrophoretic light scattering technique) โดยค่าความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวสเตอร์น (stern potential) กับศักย์ไฟฟ้าในสารละลาย เรียกว่า ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ภาพที่ 2) สามารถนำมาใช้

ประโยชน์ในการทำความเข้าใจและทำนายอันตรกิริยาต่าง ๆ เช่น การเกิดแรงผลัก (repulsion) และแรงดึงดูด (attraction) ของประจุระหว่างอนุภาค และเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้บอกถึงความคงตัวของตำรับได้ เนื่องจากอนุภาคที่มีประจุเป็นลบหรือเป็นบวกมาก ๆ จะเกิดการผลักรัน ทำให้สูตรตำรับมีความคงตัว ซึ่งค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วงสูงกว่า ± 30 mV โดยหลักการวัดจะอาศัยการเคลื่อนตัวของประจุอนุภาค (electrophoretic mobility) ที่กระจายอยู่ในของเหลวในสนามไฟฟ้า การทำงานจะเริ่มจากการบรรจุอนุภาคที่กระจายในของเหลวลงในเซลล์ที่ประกอบด้วยอิเล็กโทรด (electrodes) 2 ตัว คือ ขั้วบวกและขั้วลบที่สามารถสร้างสนามไฟฟ้าได้ และมีตัวให้แสงเลเซอร์ 2 ตัวคือลำแสงกระเจิง (scattering beam) ที่ผ่านอนุภาค และลำแสงอ้างอิง (reference beam) ที่ผ่านตัวอย่างหรือรอบ ๆ เซลล์ โดยอนุภาคจะถูกทำให้สว่างด้วยแสงเลเซอร์และเกิดการกระเจิงแสง (F1) ซึ่งความถี่ของแสงที่กระเจิงจะเป็นสิ่งที่บอกถึงความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาค (particle velocity) เป็นความถี่ของการเคลื่อนย้าย (frequency shift) ถ้าอนุภาคไม่มีการเคลื่อนที่ (stationary or zero velocity) ความถี่ที่ได้จะเหมือนกับความถี่ของแสงเลเซอร์ แต่ถ้าอนุภาคมีการเคลื่อนที่ จะให้ความถี่ที่มากกว่าความถี่จากแสงเลเซอร์ (F2) ซึ่งค่าความเข้มของความถี่ที่ต่างกัน สามารถบอกได้ถึงค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาคได้^{9,10} นอกจากนี้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคในสนามไฟฟ้าที่บอกถึงการเคลื่อนตัวของประจุอนุภาค สามารถนำมาคำนวณค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางทฤษฎีตามสมการของเฮนรี (สมการที่ 1)

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} \cdot f(Ka) \quad (1)$$

เมื่อ U_E คือ การเคลื่อนตัวของประจุอนุภาค

ζ คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า

ε คือ ค่าคงที่ทางไดอิเล็กทริก (dielectric constant)

η คือ ค่าความหนืด (viscosity) ของของเหลวที่อนุภาคนั้นแขวนลอย

$f(Ka)$ คือ Henry's function เท่ากับ 1.5 (กรณีสารละลายเป็นน้ำ) หรือ 1.0 (กรณีสารละลายไม่ใช่ น้ำ)¹¹

ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคการกระเจิงแสง มาใช้ศึกษาขนาดอนุภาคและประจุที่ผิวของอนุภาคไลโปโซม โดย Knudsen และคณะ (2012)⁴ ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไลโปโซมที่เคลือบด้วยโพลีเอธิลีนไกลคอล (PEGylated liposomes) ในด้านคุณลักษณะทางโครงสร้าง โดยวัดขนาดอนุภาคและประจุที่ผิวของอนุภาคไลโปโซมด้วยเทคนิคการกระเจิงแสง ซึ่งตำรับไลโปโซมประกอบด้วย 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC), sodium cholate และไลโปพอลิเมอร์ (lipopolymer) ของ poly(ethylene glycol)-distearoylphosphoethanolamine (PEG2000-DSPE) ในอัตราส่วนที่ต่างกัน (0%, 0.5%, 1% และ 5%) โดยใช้ calcipotriol เป็นตัวยาค้นแบบในการศึกษา โดยแทรกเข้าไปในผนังของไลโปโซมที่ติดด้วยสารกัมมันตรังสี (^{14}C) ซึ่งวัตถุประสงค์ของการทดลองคือ ศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของไลโปโซมและผลของไลโปโซมต่อการนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนัง ผลการศึกษา พบว่า ในทุกสูตรตำรับมีค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 93.1–95.4 นาโนเมตร

และมีการกระจายขนาดที่ดี ค่าการกระจายขนาด (polydispersity index; PDI) น้อยกว่า 0.1 ในวันที่เริ่มต้นเตรียมตำรับ ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของ PEG-DSPE ไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta-potential) แสดงการเพิ่มขึ้นของประจุลบเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PEG-DSPE อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่มี PEG-DSPE ($p < 0.01$) (ตารางที่ 1) โดยค่าที่ได้มีประจุลบมากขึ้น เนื่องจาก PEG-DSPE ทำให้เกิดโครงข่ายประจุลบที่มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคที่มีเฉพาะโมเลกุลของ DSPC ที่ส่วนหัวแสดงประจุทั้งประจุบวกและประจุลบ (zwitterionic head group) ซึ่งความ

เข้มข้นของประจุที่สูงกว่าบนผิวของอนุภาคเป็นสาเหตุให้มีแรงผลัก (repulsive forces) ระหว่างอนุภาคสูง ทำให้ลดการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) ของอนุภาค และเพิ่มความคงตัวของอนุภาคแขวนลอย (colloidal stability) สำหรับการศึกษาการซึมผ่านผิวหนัง พบว่าขนาดอนุภาคของไลโปโซมมีผลต่อการซึมผ่านของตัวยา calcipotriol และ ^{14}C -DSPC เข้าสู่ชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) มากที่สุด (ภาพที่ 3 (ก และ ข)) ซึ่งปริมาณของ Calcipotriol ของไลโปโซมขนาดเล็ก (SUVs) สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังได้มากกว่าไลโปโซมขนาดใหญ่ (LMVs) อย่างมีนัยสำคัญ

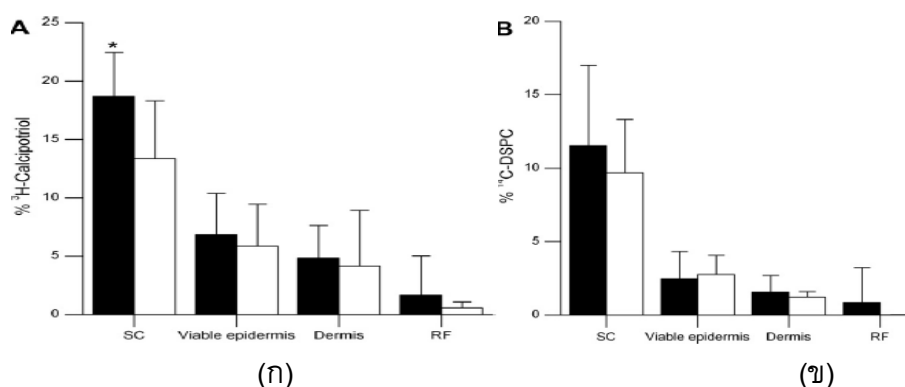
ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของสูตรตำรับต่อลักษณะทางเคมีกายภาพ⁴

Formulation	Particle size (nm)	PDI	Tm (°C) ^a	Zeta potential (mV)
PEG-DSPE 0%	93.1 ± 0.4	0.046 ± 0.009	54.0	-4.1 ± 0.1
PEG-DSPE 0.5%	93.1 ± 0.7	0.050 ± 0.009	54.1	-7.0 ± 0.6 ^{**}
PEG-DSPE 1%	93.5 ± 1.8	0.044 ± 0.005	54.1	-8.4 ± 0.2 ^{**}
PEG-DSPE 5%	95.4 ± 1.5	0.054 ± 0.010	53.9	-14.4 ± 0.5 ^{**}

a

Phase transition temperature (Tm)

^{**} $p < 0.01$.

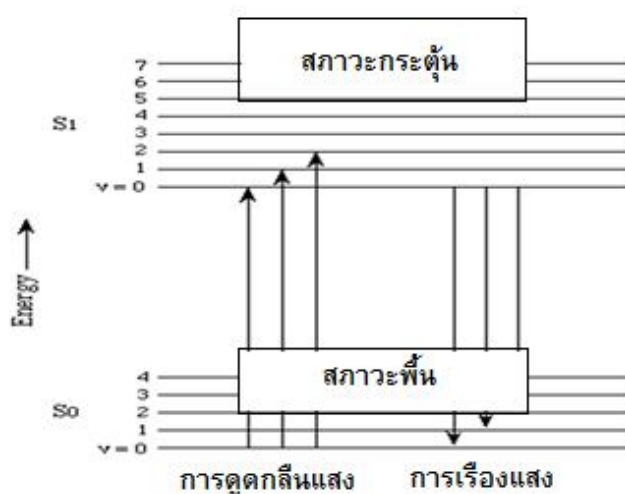


ภาพที่ 3 ปริมาณของ ^3H -calcipotriol (ก) และ ^{14}C -DSPC (ข) ในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม (SC) ชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต (Viable epidermis) ชั้นหนังแท้ (Dermis) และชั้นของของเหลวรองรับ (RF) จากอนุภาคไลโปโซมขนาดเล็ก (SUVs; ■) และขนาดใหญ่ (LMVs; □) ของ 1 mol% PEG-DSPE (mean ± SD (n = 10))⁴

การศึกษาสภาพแวดล้อมของผนังไลโปโซม ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopic technique)

หลักการศึกษาทางสเปกโทรสโกปี เป็นการใช้พลังงานรังสีในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV-Vis) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การดูดกลืน (absorbance) และการเรืองแสง (fluorescence) ในส่วนของสเปกโทรสโกปีของ

การเรืองแสง (fluorescence spectroscopy) จะเป็นการเปลี่ยนระดับพลังงานจากสภาวะกระตุ้น (excited state) เป็นสภาวะพื้น (ground state) ในขณะที่สเปกโทรสโกปีของการดูดกลืนแสง (absorption spectroscopy) เป็นการเปลี่ยนระดับพลังงานจากสภาวะพื้น เป็นสภาวะกระตุ้น ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ระดับพลังงานไฟฟ้า (electronic energy level) และการเปลี่ยนระดับพลังงาน (transition) ของสเปกโทรสโกปีที่ใช้หลักการดูดกลืนแสง (absorption) และการเรืองแสง (fluorescence)¹¹

การใช้สเปกโทรสโกปีในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV-Vis) จะใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าความยาวคลื่นในช่วงประมาณ 200 ถึง 700 นาโนเมตร เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะทางที่แสงส่องผ่าน (path length, b) และความเข้มข้น (concentration, c) ของสารที่ดูดกลืนแสง ซึ่งสัมพันธ์กันตามกฎของเบียร์ (Beer's law) เนื่องจากโมเลกุลที่แตกต่างกันจะดูดกลืนรังสีที่มีความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน ดังนั้นสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงจะแสดงจำนวนของแถบการดูดกลืนแสง (absorption bands) ที่สอดคล้องกับหมู่โครงสร้างภายในโมเลกุล

ส่วนการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีของการเรืองแสง (fluorescence spectroscopy) เป็นวิธีการที่มีความไว (sensitive) สูงกว่าสเปกโทรสโกปีของการดูดกลืนแสง (absorption spectroscopy) โดยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจะถูกปล่อย (emitted) ออกมาจากสารที่ถูกวิเคราะห์เพื่อให้เกิดการปล่อยพลังงานจากระดับสภาวะกระตุ้นกลับสู่สภาวะพื้น ซึ่งสารที่ถูกวิเคราะห์จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงโดยการดูดกลืนรังสีในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV-Vis range) และกระบวนการกระตุ้นและคลายการกระตุ้น ซึ่งจะพบในระหว่างการวัดการเรืองแสง ดังนั้นเครื่องมือวัดจะประกอบด้วยตัวรับความยาวคลื่น

2 ชนิดคือ excitation beam และ emission beam¹²

ในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของไลโปโซม เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สามารถใช้ศึกษาสภาพแวดล้อมของผนังสองชั้นไลโปโซม (microenvironment of liposome bilayer) ได้จากรายงานการวิจัยของ Rao และคณะ (2012)¹³ ซึ่งทำการการศึกษาทางสเปกโทรสโกปีของอันตรกิริยาระหว่างคอเลสเตอรอลที่ต่อกับพอลิเอทิลีนไกลคอล (Chol-PEG-Chol) และไลโปโซม โดยทำการเตรียมตำรับไลโปโซมจาก dimyristoyl

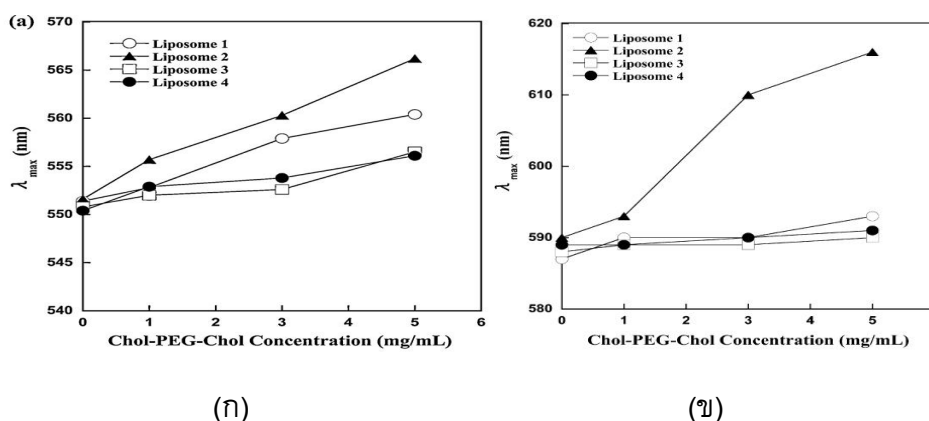
Phosphatidylcholine (DMPC) และ dimethyl dioctadecylammonium bromide (DODAB) แล้วศึกษาผลของการแทรกตัวของคอเลสเตอรอลเข้าไปในผนังสองชั้นไลโปโซมทั้ง 4 สูตรตำรับที่มีสัดส่วนของ DMPC: DODAB: cholesterol แตกต่างกัน คือ Liposome 1 (DMPC:DODAB molar ratio = 99:11), liposome 2 (DMPC:DODAB molar ratio = 1:1), liposome 3 (DMPC: DODAB:cholesterol molar ratio = 8:1:1) และ liposome 4 (DMPC: DODAB: cholesterol molar ratio = 6:1:3) จากนั้นทำการติดสีโมเลกุล (molecular probes) ด้วยสี 2 ชนิดคือ nile red ซึ่งจะแทรกเข้าไปในผนังสองชั้นของไลโปโซม และ Pinacyanol chloride (PIN) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่อยู่ในชั้นน้ำข้างนอก (outer aqueous phase)

คุณสมบัติของ nile red เป็นสีที่ไม่มีประจุ (uncharged dye) และมีความเป็นสารไม่ชอบน้ำสูง ดังนั้นจึงใช้เป็นสารเรืองแสงที่ใช้ติดโมเลกุลของไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular lipids) และใช้เป็นตัวตรวจรับคุณสมบัติของความมีขั้ว (polarity sensor) ของโครงสร้างสารที่สามารถตรวจวัดได้ ทั้งอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลและฟลู

ออเรสเซนต์สเปกตรัม (UV-visible and fluorescence spectrum) โดยที่ค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่ง nile red ในสารละลายไลโปโซม จะได้ลักษณะสเปกตรัม ที่คล้ายกับ nile red ในตัวทำละลายอินทรีย์ เพราะสภาพแวดล้อมภายในผนังสองชั้นของไลโปโซมเป็นแบบไม่มีขั้ว (apolar microenvironment) ดังนั้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Chol-PEG-Chol ลงในตำรับไลโปโซม จะทำให้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดทั้งจากอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกตรัม (ภาพที่ 5 (ก)) และฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัม (ภาพที่ 5 (ข)) แสดงการเคลื่อนที่ไปสู่ความยาวคลื่นที่สูงขึ้น (red shift) ซึ่งคาดเดาได้ว่าสภาพแวดล้อมของผนังสองชั้นไลโปโซม เริ่มที่จะมีความเป็นขั้วมากขึ้นเมื่อเติม Chol-PEG-Chol โดยเฉพาะในสูตรตำรับที่ 2 ที่ซึ่งมีสัดส่วนของ DODAB ในปริมาณที่สูง เนื่องจาก DODAB เป็นไขมันที่มีประจุบวก (cationic lipid) เมื่อจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างผนังสองชั้นของไลโปโซมจึงเกิดแรงผลักระหว่างประจุ (electrostatic repulsion) ของประจุบวก ทำให้เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ จึงง่ายต่อการที่ Chol-PEG-Chol จะแทรกเข้าไปในโครงสร้างของผนังสองชั้นไลโปโซม และยังทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถแทรกเข้าไปข้างในอนุภาคไลโปโซมได้ง่ายขึ้นด้วย เป็นผลให้สภาพแวดล้อม nile red มีขั้วเพิ่มขึ้น ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของ Chol-PEG-Chol ลงในไลโปโซมสูตรตำรับที่ 3 และ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ 1 และ 2 พบว่าไม่มีผลเพิ่มค่าความยาวคลื่นสูงสุดมากนัก เนื่องจากการมีคอเลสเตอรอลแทรกอยู่ในผนังสองชั้นของไลโปโซมสูตรตำรับที่ 3 และ 4 ทำให้ผนังสองชั้นมีความแข็งแรง ส่งผลให้ Chol-PEG-Chol สามารถแทรกเข้าไปในโครงสร้างของผนัง

สองชั้นได้เล็กน้อย จึงไม่มีผลเปลี่ยนแปลง

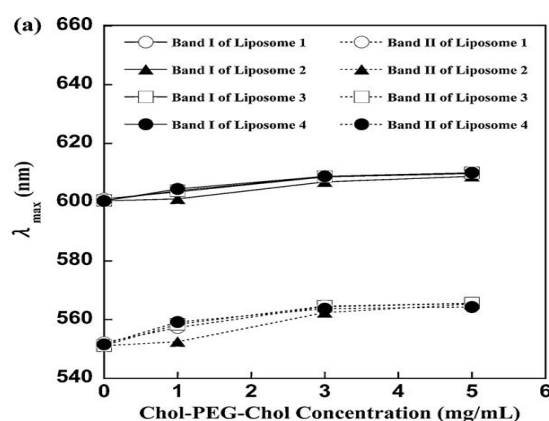
สภาพแวดล้อมของ Nile Red มากนัก



ภาพที่ 5 ผลของความเข้มข้นของ Chol-PEG-Chol ต่อค่าความยาวคลื่นสูงสุดของ Nile Red ที่อยู่ในไลโปโซม: Liposome 1 (DMPC:DODAB molar ratio = 9:1); liposome 2 (DMPC:DODAB molar ratio = 1:1); liposome 3 (DMPC:DODAB:cholesterol molar ratio = 8:1:1); liposome 4 (DMPC:DODAB:cholesterol molar ratio = 6:1:3) ทั้งจากอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกตรัม (ก) และฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัม (ข)¹³

คุณสมบัติของสารอีกชนิดที่ใช้ในการศึกษา คือ Pinacyanol chloride (PIN) เป็นสารที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกตรัม ซึ่งจะแสดงพีคการดูดกลืนแสงของโมเลกุลเดี่ยว (monomer molecules) ที่ 600 nm (แถบ I) และพีคการดูดกลืนแสงของโมเลกุลคู่ (dimeric form) ที่ 560 nm (แถบ II) ซึ่ง PIN สามารถละลายได้ในสารละลายหลายชนิด เช่น น้ำ และคลอโรฟอร์ม โดยค่าความยาวคลื่นสูงสุดของทั้งแถบ I และ II จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย ดังนั้น เมื่อนำ PIN เติมลงไปในสารละลายไลโปโซม PIN อาจจะอยู่ทั้งในและนอกผนังสองชั้นของไลโปโซม แต่เนื่องจาก PIN เป็นสารสีประจุบวก (cationic dye) จึงเกิดแรงผลักระหว่างประจุของสี PIN และประจุบวก

ของ DODAB ในส่วนประกอบของไลโปโซม ทำให้โมเลกุลของสีผ่านออกมาในวัดภาคน้ำภายนอกอนุภาคไลโปโซม ทำให้ผลของการเติม Chol-PEG-Chol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในตำรับไลโปโซมทั้ง 4 สูตรตำรับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามค่าความยาวคลื่นสูงสุดจากอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกตรัมของทั้งแถบ I และ II ของ PIN จะเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Chol-PEG-Chol เพิ่มขึ้นในตำรับ ดังภาพที่ 6 เนื่องจากโมเลกุลของ PIN จะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของ PEG เมื่อความเข้มข้นของ PEG มากขึ้น คุณสมบัติความเป็นขั้วของสภาพแวดล้อมรอบ ๆ PIN จะเริ่มมีความไม่เป็นขั้วมากขึ้น (more apolar) ทำให้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดของ PIN เพิ่มขึ้น

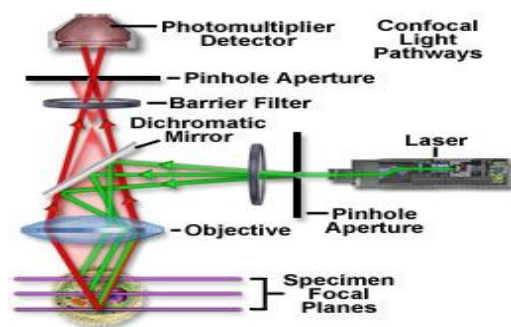


ภาพที่ 6 ผลของความเข้มข้นของ Chol-PEG-Chol ต่อค่าความยาวคลื่นสูงสุดของแถบ I (600 nm) และ II (560 nm) ของ PIN ที่อยู่ในไลโปโซม: 1 (DMPC:DODAB molar ratio = 9:1); liposome 2 (DMPC:DODAB molar ratio = 1:1); liposome 3 (DMPC:DODAB:cholesterol molar ratio = 8:1:1); liposome 4 (DMPC:DODAB:cholesterol molar ratio = 6:1:3) จากอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกตรัม¹³

การประเมินการนำส่งยาทางผิวหนัง ด้วย กล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ (CLSM)

กล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ เป็นเทคนิคที่สามารถให้ภาพของสารเรืองแสงได้ โดยหลักการทำงาน คือการใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็นระบบเลเซอร์ ทำการส่องลำแสงผ่านรูเปิด pinhole ซึ่งอยู่ในระนาบเดียวกับจุดส่องกราดของชิ้นตัวอย่าง ลำแสงเลเซอร์ถูกสะท้อนจากกระจก dichromatic และส่องกราดผ่าน objective lens ไปบนชิ้นตัวอย่างบนระนาบที่ได้โฟกัสไว้ (in-focus) บางจุดบนชิ้นตัวอย่างจะเรืองแสง และสะท้อนแสงกลับไปกระจก dichromatic แล้วถูกรวมแสงที่รูเปิด pinhole ที่ 2 บริเวณด้านหน้าตัวตรวจวัด (detector) ดังภาพที่ 7 โดยรูเปิด pinhole ทำหน้าที่เป็นแหล่ง

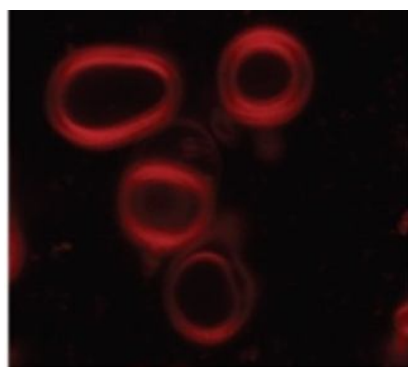
รวมแสงที่มีความสำคัญมากเปรียบเสมือนตัวกรองที่อยู่หน้าตัวตรวจวัด ให้มีการผ่านของแสงในจุดที่โฟกัส (in-focus) เข้าสู่ตัวตรวจวัดอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ และกั้นการผ่านของแสงที่ไม่อยู่ในจุดที่โฟกัส (out-of-focus) ดังนั้นจึงมีเพียงภาพของจุดที่โฟกัสเท่านั้น ทำให้เพิ่มความละเอียดและความคมชัดของภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง สำหรับภาพของตัวอย่างมี 3 แกน คือ x y และ z ในส่วนของ z-series เป็นภาพของลำดับที่ได้จากการดูในแนว xy (sequential xy sections) ซึ่งจะให้ข้อมูลในเชิงสามมิติ และความเข้มของสารเรืองแสง (fluorescence intensities) ส่วน xz-section เป็นภาพที่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลที่ได้จากภาพแบบ xy-plane ก่อน ซึ่งจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับความลึกของสารเรืองแสงจากพื้นผิวที่เฉพาะ⁶



ภาพที่ 7 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ (CLSM)

การศึกษาโครงสร้างของไลโปโซมโดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์เป็นเทคนิคที่สามารถให้ภาพที่มีความละเอียดสูงโดยไม่ทำลายตัวอย่าง ซึ่งสามารถทำได้โดยการใส่สารเรืองแสงเข้าไปในส่วนที่เป็น

ไขมันของผนังสองชั้นไลโปโซม ดังภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างแบบถุงเวสิเคิลที่มีการจัดเรียงตัวของผนังสองชั้นของไขมันซ้อนกันหลายชั้น (multilamellar vesicles) แยกออกจากส่วนที่เป็นน้ำ¹⁴



ภาพที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ แสดงโครงสร้างของไลโปโซมที่มี Rhodamine 123 ภายในโครงสร้างของผนังสองชั้น¹⁴

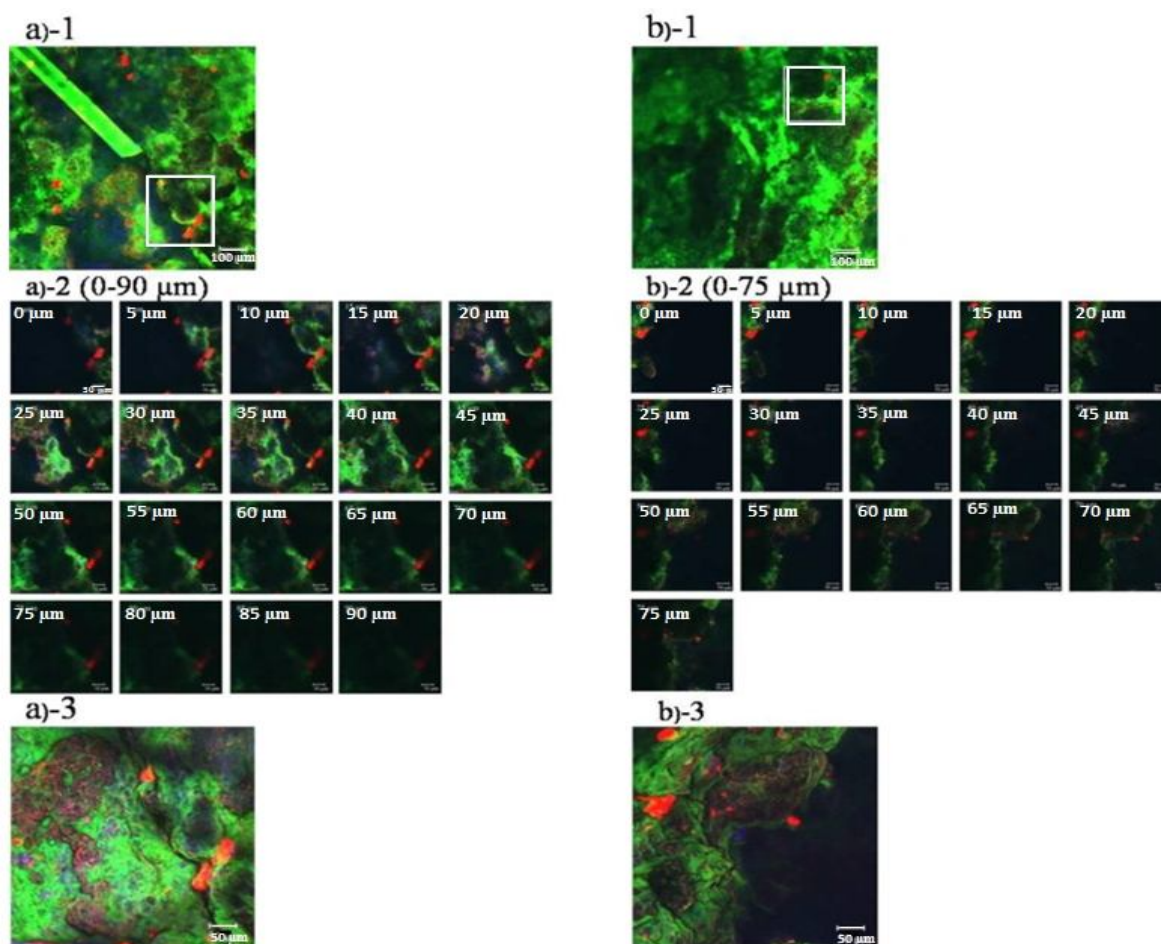
Subongkot และคณะ (2013)¹⁵ ทำการศึกษาวิธีการซึมผ่านผิวหนัง (penetration pathways) ของอัลตราดีฟอร์มมาเบิลไลโปโซมที่มีเทอร์ปีน (ultradeformable liposomes with terpene; ULs) โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์โซเดียม (NaFI) เก็บกักอยู่ในถุงของไลโปโซม ซึ่งแสดงออกเป็นสารเรืองแสงสีเขียว และใช้ Rhodamine (Rh-PE) เป็นสารเรืองแสงที่ติดกับถุงฟอสโฟลิปิด (phospholipid vesicles) ซึ่งแสดงออกเป็นสารเรืองแสงสีแดง จากนั้นนำมารับไปทำการศึกษการซึมผ่านผิวหนังหนูด้วยการใช้

Franz diffusion cells เพื่อศึกษาการกระจายของไลโปโซมบนผิวหนังภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ อีกทั้งการใช้ร่วมกับการตัดชิ้นส่วนของผิวหนัง (skin cross-section) ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ จะทำให้ได้ภาพที่ชัดเจนและมีความละเอียดสูง

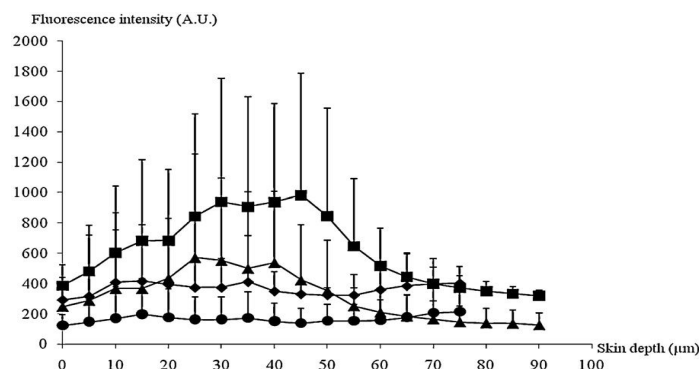
การมองภาพจากด้านบน (xy-plane) แบบต่อเนื่องของบริเวณรูขุมขนและบริเวณผิวหนังที่ไม่ใช่รูขุมขนจากเนื้อเยื่อผิวหนังเดียวกันที่เวลา 4 ชั่วโมง ดังภาพที่ 9 a)-1 และ

b)-1 ตามลำดับ บริเวณที่มีการเรืองแสงอย่างชัดเจนจะบอกถึงความลึกที่มากที่สุดในการแทรกผ่านผิวหนัง และบอกถึงความเข้มข้นของสารเรืองแสงทั้ง NaFI และ Rh-PE ที่ติดอยู่กับผนังสองชั้นของ ULs ส่วนการมองภาพแบบ x-z จะให้ภาพของผิวหนังที่ระดับความลึกต่าง ๆ ทั้งในรูขุมขนและบริเวณที่ไม่ใช่รูขุมขน ดังภาพที่ 9 a)-2 และ b)-2 ตามลำดับ โดยที่บริเวณรูขุมขน NaFI และ Rh-PE ที่ติดอยู่กับผนังสองชั้นของ ULs สามารถแทรกผ่านผิวหนังไปได้ลึกถึง 90 μm ในขณะที่บริเวณที่ไม่ใช่รูขุมขน NaFI และ Rh-PE ที่ติดอยู่กับผนังสองชั้นของ ULs

สามารถซึมผ่านผิวหนังไปได้ลึก 70 μm ส่วนภาพที่ 9 a)-3 และ b)-3 เป็นภาพที่มีความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่มากที่สุดของ a)-2 และ b)-2 ที่ z-axis ตามลำดับ นอกจากนี้เทคนิคนี้สามารถแสดงข้อมูลของความเข้มข้นของสารเรืองแสง ทั้ง NaFI และ Rh-PE ที่ติดอยู่กับผนังสองชั้นของ ULs ที่ระดับความลึกแตกต่างกัน (ภาพที่ 10) ซึ่งพบว่า ULs มีช่องทางหลักที่จะปลดปล่อยตัวยาที่กักเก็บผ่านรูขุมขน มากกว่าช่องทางแทรกผ่านเซลล์ (transcellular) และช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular) ในบริเวณที่ไม่ใช่รูขุมขน



ภาพที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ของผิวหนังหนูที่ทดสอบด้วย NaFI-loaded Rh-PE-labeled ULs ที่เวลา 4 ชั่วโมง แสดง 1. x-y plane a)-1 บริเวณรูขุมขน และ b)-1 บริเวณที่ไม่ใช่รูขุมขน 2. แสดง serial x-z plane ที่ระดับความลึกแตกต่างกัน a)-2 บริเวณรูขุมขน และ b)-2 บริเวณที่ไม่ใช่รูขุมขน และ 3. แสดง a)-3 และ b)-3 ความเข้มข้นของ z-axis ที่มากที่สุดจาก a)-2 และ b)-2 ตามลำดับ¹⁵



ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบความเข้มของการเรืองแสงของ NaFI และ Rh-PE ที่ระดับความลึกต่างๆ ของผิวหนังที่ได้จากภาพที่ 9 a)-2 (■=NaFI, ▲=Rh-PE) และ b)-2 (◆=NaFI, ●= Rh-PE)¹⁵

สรุป

การศึกษาคุณสมบัติของไลโปโซมในปัจจุบัน สามารถทำได้ในหลายวิธีด้วยการใช้เทคนิคที่แตกต่างกันไป ซึ่งเทคนิคการกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์และอิเล็กโตรโฟเรติก (Dynamic and electrophoretic light scattering technique) และเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการทดลองเพื่อประเมินลักษณะของรูปร่าง (morphology) โครงสร้างภายใน (internal structure) และสภาพแวดล้อมในระดับไมโคร (microenvironment) รวมไปถึงตัวแปรทางเคมีกายภาพ (physicochemical parameters) อื่น ๆ ของไลโปโซมที่อยู่ในสภาวะการทดลองที่ต่างกันไป นอกจากนี้ในการนำไลโปโซมมาใช้เป็นตัวพาเพื่อนำส่งยาทางผิวหนังจะต้องมีการศึกษาคุณสมบัติของการซึมผ่านผิวหนัง ซึ่งสามารถนำกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์มาประยุกต์ใช้เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งและช่องทางการซึมผ่านผิวหนังของสารเรืองแสงในผิวหนัง อีกทั้งไลโปโซมเป็นหนึ่งในตัวพาในระบบนำส่งยาขนาดนาโน (advanced drug delivery nano system)

ดังนั้นเทคนิคเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประยุกต์กับการศึกษาคุณลักษณะโครงสร้างของระบบนำส่งยาที่เป็นรูปแบบนาโน (nanoassemblies) ชนิดอื่นได้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. อรัญญา มโนสร้อย และ จีระเดช มโนสร้อย. ไลโปโซมสำหรับยาผ่านทางผิวหนังและเครื่องสำอาง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์; 2550.
2. Case M. Liposome. In: The Chemistry Behind Moisturizers. 2003 Dec 4 [cited 2013 July 16];5(5). Available from: <https://illumin.usc.edu/174/the-chemistry-behind-moisturizers/>.
3. Learn Biochemistry Blog. Introduction: Common Macromolecules-Lipids and Biomembranes [Internet]. 2011 Aug 10 [cited 2013 July 16]. Available from: <https://learnbiochemistry.wordpress.com/category/phospholipid/>.
4. Knudsen NØ, Rønholt S, Salte RD, Jorgensen L, Thormann T, Basse LH, et al. Calcipotriol delivery into the skin

- with PEGylated liposomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81(3):532–9.
5. Pharma Tips Blog. Stealth Liposomes [Internet]. 2010 Jun 17 [cited 2013 July 15]. Available from: <http://pharmatips.doyouknow.in/Articles/Stealth-Liposomes.aspx>.
 6. พนิดา อัครพิชญนต์. เทคนิคก้าวหน้าในการประเมินการนำส่งทางผิวหนัง. ใน: ปรานีต โอปณะโสภิต ,บรรณาธิการ. Technology diversity for pharmaceutical products development. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม: โรงพิมพ์เพชรเกษมการพิมพ์; 2554. น. 211-33.
 7. Smith EW, Maibach HI. Percutaneous penetration enhancer. 2nd ed. Boca Raton: Taylor and Francis; 2005.
 8. Grassian VH. Light Scattering Measurements of Particles in Solution [cited 2013 July 15]. Available from: <http://chem.uiowa.edu/grassian-research-group/light-scattering-measurements-particles-solution>.
 9. Pippa N, Psarommati F, Pispas S, Demetzos C. The shape/morphology balance: A study of stealth liposomes via fractal analysis and drug encapsulation. *Pharm Res.* 2013; 30(9):2385-95.
 10. Malvern Instruments Ltd. Zetasizer Nano technical note: Measuring Zeta Potential - Laser Doppler Electrophoresis. [cited 2013 July 16]. Available from: <http://www.pct.hu/zetalde.pdf>.
 11. Malvern Instruments Ltd. Zetasizer Nano series technical note: Zeta Potential - An Introduction in 30 Minutes. [cited 2014 Nov 18]. Available from: <http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/zeta.pdf>.
 12. Fluorescence [cited 2013 July 15]. Available from: <http://chemistry.rutgers.edu/grad/chem585/lecture2.html>.
 13. Penner MH. Ultraviolet, Visible, and Fluorescence Spectroscopy. In: Nielsen SS, Editor. Food Analysis, Food Science Texts Series, c2010 [cited 2013 July 16]; pp 387-405. Available from: http://www.link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4419-1478-1_22.
 14. Rao Z, Taguchi T. Spectroscopic studies on interactions between cholesterol-end capped polyethylene glycol and liposome. *Colloids Surf B.* 2012;97:248-53.
 15. Ruozzi B, Belletti D, Tombesi A, Tosi G, Bondioli L, Forni F, et al. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:557-63.
 16. Subongkot T, Wonglertnirant N, Songprakhon P, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Visualization of ultradeformable liposomes penetration pathways and their skin interaction by confocal laser scanning microscopy. *Int J Pharm.* 2013;441(1-2):151-61.