



การประเมินลักษณะและชีวประสิทธิผลของสูตรตำรับเซล์ฟไมโครอิมัลซิฟายด์
ที่บรรจุเคอควิทินและเรสเวอราทรอล
Characterization and Bioavailability Evaluation of
Self-microemulsifying Formulation Containing
Quercetin and Resveratrol

สุภาพร วรรณ
Subhaphorn Wanna

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
การแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Thai Traditional Medicine
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การประเมินลักษณะและชีวประสิทธิผลของสูตรตำรับเซล์ฟไมโครอิมัลซิฟายด์
ที่บรรจุเคอควิทินและเรสเวอราทรอล
Characterization and Bioavailability Evaluation of
Self-microemulsifying Formulation Containing
Quercetin and Resveratrol

สุภาพร วรรณ
Subhaphorn Wanna

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
การแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Thai Traditional Medicine
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประเมินลักษณะและชีวประสิทธิผลของสูตรตำรับเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ที่
บรรจุเคออสทีนและเรสเวอราทรอล

ผู้เขียน นางสาวสุภาพร วรรณนา

สาขาวิชา การแพทย์แผนไทย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.พัชรพล ใจสมุทร)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ภญ. ดร.วรางคณา วารีน้อยเจริญ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ภญ. ดร.ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี)

.....
(รองศาสตราจารย์ ภญ. ดร.ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ)

.....กรรมการ
(ดร.พัชรพล ใจสมุทร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาการแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ศักดิ์ ฟ้ารุ่งสว่าง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ดร.พัชรพล ใจสมุทร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(รองศาสตราจารย์ ภญ. ดร.ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(นางสาวสุภาพร วรรณ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวสุภาพร วรรณ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประเมินลักษณะและชีวประสิทธิผลของสูตรตำรับเซลฟ์ไมโครอิมัลซิฟายด์ที่บรรจุเคอควิทินและเรสเวอราทรอล

ผู้เขียน นางสาวสุภาพร วรรณภา

สาขาวิชา การแพทย์แผนไทย

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

สูตรตำรับเซลฟ์ไมโครอิมัลซิฟายด์ที่บรรจุเคอควิทินผสมเข้ากับเรสเวอราทรอล (Self-microemulsifying formulation containing quercetin and resveratrol: QR-SME) ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาค่าชีวประสิทธิผลของสารทั้งสองชนิดซึ่งมีค่าการละลายในน้ำต่ำ สูตรตำรับนี้ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor EL และ Labrasol ในอัตราส่วน 10:70:20 โดยน้ำหนัก สามารถบรรจุเคอควิทินและเรสเวอราทรอลได้อย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมสูตรตำรับ เกิดหยดไมโครอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำขนาดเล็กกว่า 20 นาโนเมตร อนุภาคมีลักษณะค่อนข้างกลม กระจายตัวดี ไม่เกิดการเกาะกัน โดยเคอควิทินและเรสเวอราทรอลมีอัตราการปลดปล่อยภายใน 30 นาที มากกว่าร้อยละ 70 และ 80 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเคอควิทินและเรสเวอราทรอลที่ถูกซังผสมในขนาดตัวยาที่เท่ากัน (QR-nonformulated) ทั้งนี้สูตรตำรับไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไมโครอิมัลชัน และขนาดอนุภาคภายใต้การเก็บรักษาในสภาวะปกติและสภาวะเร่งนานอย่างน้อย 12 เดือน สูตรตำรับ QR-SME มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด ด้วยวิธี DPPH และ ABTS (IC_{50} เท่ากับ 1.70 ± 0.04 และ 2.95 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับที่ไม่ได้บรรจุสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิด (Blank-SME) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รวมทั้งมีความสามารถในการรีดิวซ์โลหะทรานซิชัน (5.76 ± 0.23 มิลลิโมลาร์ของเพอร์สัลเฟตต่อมิลลิกรัมของสูตรตำรับ) อีกทั้งสูตรตำรับ QR-SME ยังให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด AGS, HT-29 และ Caco-2 ได้สูงที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 48.21 ± 0.42 , 38.89 ± 1.20 และ 36.17 ± 0.46 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Blank-SME อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และยังพบว่าการให้สูตรตำรับ QR-SME ทางปาก ปริมาณ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในหนูแรท ช่วยเพิ่มระดับของเคอควิทินและเรสเวอราทรอลในพลาสมา ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง (AUC_{0-6h}) คิดเป็น 11.63 และ 3.20 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับยาในพลาสมาของเคอควิทินและเรสเวอราทรอลแขวนลอยในน้ำ

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาระบบนำส่งเซลฟ์ไมโครอิมัลซิฟายด์ที่บรรจุเคอควิทินผสมเข้ากับเรสเวอราทรอล สามารถเพิ่มค่าการละลายและเพิ่มค่าชีวประสิทธิผลของสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิด ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์และยาในรูปแบบอื่นได้ต่อไป

Thesis Characterization and bioavailability evaluation of self- microemulsifying formulation containing quercetin and resveratrol
Author Miss Subhaphorn Wanna
Major Programme Thai Traditional Medicine
Academic Year 2018

ABSTRACT

A self-microemulsifying formulation containing quercetin and resveratrol (QR-SME) was developed to overcome the poor oral bioavailability of both compounds. QR-SME consisted of Capryol 90, Cremophor EL and Labrasol in the ratio of 10:70:20 by weight. The optimal formulation was loaded with 20 mg/g of each poor water-soluble compound and showed oil in water emulsion (o/w) droplet size smaller than 20 nanometers, the spherical shape of the particles with no signs of coalescence. More than 70% and 80% of quercetin and resveratrol, respectively, were released within 30 minutes and significantly different ($p < 0.05$) as compared to QR-nonformulated. There was no significant alters in the self-emulsification properties, and particle size under the intermediate and accelerated condition for 12 months. Furthermore, QR-SME formulation exhibited the highest DPPH and ABTS radical scavenging capacities ($IC_{50} = 1.7 \pm 0.04$ and 2.95 ± 0.04 mg/mL), and presented the ferric reducing antioxidant power activity (5.76 ± 0.23 mM $FeSO_4$ /mg of formulation) significantly different ($p < 0.05$) compared to Blank-SME. Also, QR-SME formulation showed the highest cytotoxicity against AGS, HT-29 and Caco-2 ($IC_{50} = 48.21 \pm 0.42$, 38.89 ± 1.20 and 36.17 ± 0.46 μ M, respectively) significantly different ($p < 0.05$) compared with Blank-SME. In addition, oral administration of QR-SME formulations in rats presented the level of quercetin and resveratrol in plasma with area under the concentration curve time 0 to 6 hours ($AUC_{0-6 h}$) for 11.63 and 3.20-fold, respectively, with significant difference ($p < 0.05$) compared with the QR-suspensions.

In summary, the results of this study found that a self-microemulsifying formulation containing quercetin and resveratrol can be used to enhance the solubility and oral bioavailability of two poorly water-soluble drugs which are chance to improve the product development and other pharmaceuticals.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.พัชรพล ใจสมุทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้โอกาส ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการศึกษาวิจัย ตลอดจนการเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ภญ. ดร.ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา แนะนำในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ภญ. ดร.วรางคณา วารีสน้อยเจริญ ประธานกรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณะการแพทย์แผนไทย ศูนย์บริการปฏิบัติการทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ สถาบันสรีรวิทยาภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำสถานที่ดังกล่าวที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำปฏิบัติการและให้คำแนะนำจนทำให้การศึกษานี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.กนิษฐา แก้วเกริก นักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกท่านที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวที่ให้การสนับสนุน คำแนะนำและเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดในการเรียนมาโดยตลอด และขอขอบคุณทุกๆ ท่านที่ไม่สามารถกล่าวนามได้ทั้งหมดในนี้ สำหรับการมีส่วนร่วมในการศึกษาครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนดำเนินการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ด้วยเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2560 และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีการศึกษา 2561

สุภาพร วรรณภา

สารบัญ

| | หน้า |
|--------------------------------------|------|
| บทคัดย่อ | (5) |
| ABSTRACT | (6) |
| กิตติกรรมประกาศ | (7) |
| สารบัญ | (8) |
| รายการตาราง | (9) |
| รายการรูป | (11) |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| บทนำต้นเรื่อง | 1 |
| บทตรวจเอกสาร | 3 |
| วัตถุประสงค์ | 35 |
| บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง | |
| วัสดุอุปกรณ์ | 36 |
| วิธีการทดลอง | 40 |
| บทที่ 3 ผลการทดลอง | 48 |
| บทที่ 4 บทวิจารณ์ | 79 |
| บทที่ 5 บทสรุป | 86 |
| เอกสารอ้างอิง | 88 |
| ภาคผนวก | 107 |
| ประวัติผู้เขียน | 148 |

รายการตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 1 | Serum levels after oral absorption of quercetin in rats and human | 8 |
| 2 | Serum levels after oral absorption of quercetin in rats, mice, rabbit and human | 17 |
| 3 | Benefits of quercetin in combination with resveratrol and the concentration correlated with their bioactivity | 20 |
| 4 | Comparison of lipid drug delivery systems that have been interested in developing a oral drug delivery system | 22 |
| 5 | Comparison of emulsion drug delivery systems | 24 |
| 6 | HLB values of each excipient in microemulsion formulation | 29 |
| 7 | Visual assessment of efficiency of self-microemulsification | 32 |
| 8 | Group of the cells viability test | 46 |
| 9 | The solubility of quercetin in combination with resveratrol in various Vehicles | 49 |
| 10 | Ratio, particle size and polydispersity index (PDI) of formulation A with in Ternary phase diagrams | 51 |
| 11 | Ratio, particle size and polydispersity index (PDI) of formulation B with in Ternary phase diagrams | 52 |
| 12 | Ratio, particle size and polydispersity index (PDI) of formulation C with in Ternary phase diagrams | 53 |
| 13 | Ratio, particle size and polydispersity index (PDI) of formulation D with in Ternary phase diagrams | 54 |
| 14 | The particle size and polydispersity index (PDI) of the QR-SME formulation diluted by DI water | 59 |
| 15 | Total antioxidant power of QR-SME, Q-SME, R-SME, and Blank-SME in comparison with trolox measured by the DPPH radical scavenging activity assay | 64 |
| 16 | Total antioxidant power of QR-SME, Q-SME, R-SME, and Blank-SME in comparison with trolox measured by the ABTS radical scavenging activity assay | 65 |
| 17 | Total antioxidant power of QR-SME, Q-SME, and R-SME in comparison with Blank-SME measured by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay | 66 |

รายการตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 18 Stability data of the QR-SME at the intermediate (30 ± 2 °C/ $65\pm 5\%$ RH) and accelerated conditions (45 ± 2 °C/ $75\pm 5\%$ RH) | 74 |
| 19 Pharmacokinetics value of QR-SME after oral administration compared to Q-SME plus R-SME and a combined suspension (equivalent to 40 mg/kg of quercetin and resveratrol) | 78 |
| 20 Settings of the HPLC condition for resveratrol | 109 |
| 21 Settings of the HPLC condition for quercetin | 110 |
| 22 The percents cumulative release of quercetin and resveratrol | 114 |
| 23 Cytotoxicity of AGS cells treated with different concentrations of QR-SME, Q-SME, R-SME, Blank-SME | 115 |
| 24 Cytotoxicity of HT-29 cells treated with different concentrations of QR-SME, Q-SME, R-SME, Blank-SME | 115 |
| 25 Cytotoxicity of Caco-2 cells treated with different concentrations of QR-SME, Q-SME, R-SME, Blank-SME | 116 |
| 26 The plasma concentration of quercetin and resveratrol | 117 |
| 27 Biological activities of Boon-Nak cough remedy formula 1 | 124 |
| 28 Drug dispensing statistics and Boon-Nak cough remedy formula 1 of Traditional Thai Medicine hospital, Prince of Songkla University. | 125 |
| 29 Categories of tablets | 130 |
| 30 Ingredients of Boon-Nak cough remedy formula 1 | 134 |
| 31 Flowability with angle of repose | 135 |
| 32 Flowability with Compressibility index and Hausner ratio | 137 |
| 33 USP and BP reference standard for weight variation of tablets | 138 |
| 34 Flowability properties of Boon-Nak cough remedy formula 1 | 141 |
| 35 Physical properties of Boon-Nak cough remedy formula 1 | 142 |

รายการรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1 | Chemical structures of quercetin | 4 |
| 2 | Schematic illustration of the metabolism and absorption of quercetin | 7 |
| 3 | Chemical structures of quercetin and its main derivatives | 9 |
| 4 | Chemical structures of resveratrol | 12 |
| 5 | Schematic illustration of resveratrol absorption | 16 |
| 6 | Illustration of resveratrol metabolism | 18 |
| 7 | A hypothetical ternary phase diagram of microemulsion | 28 |
| 8 | Lipid digestion and lipidic excipients on drug absorption of SEDDS drug delivery system | 31 |
| 9 | Schematic diagram of the mechanisms of intestinal drug transport from SEDDS drug delivery system | 31 |
| 10 | The relationship between the amount of dissolved substances with time in the sink condition and non-sink conditions | 34 |
| 11 | Microemulsion characteristics of formulation A, B, C and D for phase diagram screening | 55 |
| 12 | Ternary phase diagrams composed of various oil, surfactant and co-surfactant of formulation A, B, C and D | 56 |
| 13 | Characteristics of the differential microemulsion of formulation A, B, C and D | 57 |
| 14 | Characteristics of F5A formulation diluted with the different concentration | 57 |
| 15 | Self-Microemulsifying from a quercetin/resveratrol combination (QR-SME) | 58 |
| 16 | The particle size and polydispersity index (PDI) of the QR-SME formulation of the QR-SME formulation with photon correlation spectroscopy (PCS). | 59 |
| 17 | TEM micrographs of the QR-SME formulation ($\times 100,000$) | 60 |
| 18 | The cumulative release of quercetin from a quercetin/resveratrol combination in the SME formulation (QR-SME), individual quercetin in SME (Q-SME), and an unformulated quercetin/resveratrol combination, in simulated gastric fluid | 62 |
| 19 | The cumulative release of resveratrol from a quercetin/resveratrol combination in the SME formulation (QR-SME), individual resveratrol in SME (R-SME), and an unformulated quercetin/resveratrol combination, in simulated gastric fluid | 62 |
| 20 | Chromatogram of quercetin standard at a concentration of 12 $\mu\text{g/mL}$ in the wavelength 256 nanometer | 63 |

รายการรูป (ต่อ)

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 21 | Chromatogram of resveratrol standard at a concentration of 12 µg/mL in the wavelength 307 nanometer | 63 |
| 22 | Cytotoxicity of AGS cells treated with different concentrations of QR-SME (each polyphenol at 5:5, 10:10, 15:15, 25:25, 30:30, 40:40, and 50:50 µM) compared to the Q-SME, R-SME (individual compound at 10, 20, 30, 50, 60, 80, and 100 µM), and blank SME | 68 |
| 23 | Cytotoxicity of HT-29 cells treated with different concentrations of QR-SME (each polyphenol at 5:5, 10:10, 15:15, 25:25, 30:30, 40:40, and 50:50 µM) compared to the Q-SME, R-SME (individual compound at 10, 20, 30, 50, 60, 80, and 100 µM), and blank SME | 70 |
| 24 | Cytotoxicity of Caco-2 cells treated with different concentrations of QR-SME (each polyphenol at 5:5, 10:10, 15:15, 25:25, 30:30, 40:40, and 50:50 µM) compared to the Q-SME, R-SME (individual compound at 10, 20, 30, 50, 60, 80, and 100 µM), and blank SME | 72 |
| 25 | Quercetin plasma concentration vs. time profiles after oral administration of quercetin (40 mg/kg) in combination with resveratrol (40 mg/kg) in the SME formulation, quercetin in combination with resveratrol in aqueous suspension, or a quercetin (40 mg/kg) SME formulation followed by a resveratrol (40 mg/kg) SME formulation | 76 |
| 26 | Resveratrol plasma concentration vs. time profiles after oral administration of quercetin (40 mg/kg) in combination with resveratrol (40 mg/kg) in the SME formulation, quercetin in combination with resveratrol in aqueous suspension, or a quercetin (40 mg/kg) SME formulation followed by a resveratrol (40 mg/kg) SME formulation | 77 |
| 27 | Illustration of peak with trying out HPLC condition of resveratrol. | 111 |
| 28 | Illustration of peak with trying out HPLC condition of quercetin | 112 |
| 29 | Standard curve of quercetin with HPLC analysis | 113 |
| 30 | Standard curve of resveratrol with HPLC analysis | 113 |
| 31 | Mechanism of afferent and efferent pathways that regulate cough, and the pathophysiology of the enhanced cough reflex | 126 |
| 32 | Illustration of physical characteristics of Boon-Nak cough remedy formula 1 | 140 |

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สารประกอบโพลีฟีนอลพบได้ในพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรหลากหลายชนิด ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาใช้ป้องกันและการรักษาโรค สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) จัดเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีความสำคัญมาก และสามารถแบ่งย่อยได้อีกหลายชนิด (Manach *et al.*, 2004) ซึ่งเคอควิทิน (quercetin) จัดเป็นสารประกอบสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบได้ทั่วไปในองุ่น ไวน์แดง หัวหอม ใบหม่อน ย่านางแดง และดอก *Sophora japonica* L. มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Choi *et al.*, 2008) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Lesjak *et al.*, 2018) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Kleemann *et al.*, 2011) ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Eid *et al.*, 2015) ฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด (Edwards *et al.*, 2007) และฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Rattanachaiyaporn and Phumkhachorn, 2010) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเคอควิทินมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อยมาก ถูกเมทาบอลิซึมในลำไส้ ตับและขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นเคอควิทินที่สะสมอยู่ในร่างกายจึงมีปริมาณน้อย อีกทั้งปัญหาทางด้านชีวประสิทธิผลและการกระจายตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อได้น้อย สามารถปรับปรุงได้โดยการใช้ระบบนำส่งยาหลากหลายรูปแบบ เช่น เซลล์นาโนอิมัลชัน (Self-nanoemulsifying) (Tran *et al.*, 2014) โซลิดดิस्पอร์ชัน (Solid dispersions) (Kakran *et al.*, 2011) สารแขวนตะกอนอนุภาคนาโน (Nanosuspensions) (Gao *et al.*, 2011) ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) (Gao *et al.*, 2009) อนุภาคนาโนไขมันแข็ง (Solid lipid nanoparticles) (Li *et al.*, 2009) รวมทั้งไมเซลล์ (Micelles) (Oerlemans *et al.*, 2010) และลิโปโซม (Liposome) (Landi-Librandi *et al.*, 2012) หรือการรวมเคอควิทินเข้ากับสารประกอบอื่นที่อาจเปลี่ยนอัตราการเมทาบอลิซึมได้ โดยสารดังกล่าวคือ เรสเวอราทรอล (resveratrol) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ glucuronidation ในลำไส้และตับ (Patel *et al.*, 2010) ช่วยปรับปรุงการกระจายตัวและเพิ่มชีวประสิทธิผลของการให้ยาทางปากของเคอควิทินได้ โดยเรสเวอราทรอลเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลจัดอยู่ในกลุ่มstilbene พบได้ทั่วไปในองุ่น ไวน์ ถั่วลิสง เบอร์รี่ หม่อน และรากของต้น *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Iacopini *et al.*, 2008) ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Palsamy and Subramanian, 2010) ฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด (Mizutani *et al.*, 2000) และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Trincheri *et al.*, 2007) เป็นต้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ (Self-microemulsifying drug delivery system: SMEDDS) เพื่อปรับปรุงการละลาย อัตราการดูดซึมและเพิ่มชีวประสิทธิผลของการให้ยาทางปากที่ละลายน้ำไม่ได้ (Singh *et al.*, 2010) ระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ ประกอบด้วยส่วนผสมของน้ำมันธรรมชาติหรือ

น้ำมันสังเคราะห์ สารลดแรงตึงผิวที่เป็นของแข็งหรือของเหลว (surfactants) สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactants) มีสารละลายที่ชอบน้ำอย่างน้อยหนึ่งตัว และตัวทำละลายชนิดผสมหรือสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้เกิดเป็นอิมัลชันได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินอาหาร (Pathak *et al.*, 2010) ระบบนำส่งยานี้จึงเหมาะกับการละลายน้ำได้ยาก โดยการพิจารณาหลักในการพัฒนาสูตรตำรับของระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ คือ ขนาดอนุภาคต้องมีขนาดเล็ก ทำให้เกิดพื้นผิวที่มีขนาดใหญ่อยู่ในอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion: o/w) เกิดไมโครอิมัลชันได้เองโดยอาศัยการบีบตัวของลำไส้ในระบบทางเดินอาหาร (Wang and Zhang, 2013) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวกำหนดในการปลดปล่อยของยาจากระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ ให้มีประสิทธิภาพ คือ อนุภาคขนาดเล็กและความเป็นขั้วของหยดน้ำมัน (droplet) ที่เกิดขึ้น (Pouton, 2000)

การศึกษาที่ผ่านมาของสารประกอบโพลีฟีนอลสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพอย่างมาก และสามารถเสริมฤทธิ์กันในการรักษาโรคมะเร็ง เช่น กลุ่มอาการภาวะผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย สามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง (Igura *et al.*, 2001) ลดการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านม (Schlachterman *et al.*, 2008) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งเนื้องอกในสมองชนิด glioma (Zamin *et al.*, 2009) แต่อย่างไรก็ตามสารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติละลายในน้ำได้น้อย ถูกเมตาบอลิซึมอย่างรวดเร็ว ทำให้ร่างกายดูดซึมและนำไปใช้ในปริมาณน้อย จากปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยจึงสนใจนำสารละลายน้ำยากทั้งสองชนิดมารวมกันในระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายและอัตราการดูดซึมของสารละลายน้ำยากทั้งสองชนิด อีกทั้งในขณะนี้ยังไม่มีรายงานการใช้เทคนิคนี้เพื่อรวมสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดไว้ในระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ ซึ่งคาดว่าจะเป็แนวทางที่ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพของยาและอาหารที่ใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคในอนาคตได้

บทตรวจเอกสาร

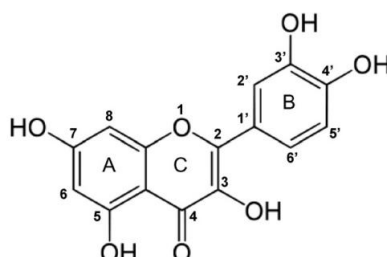
1. เควอซีทิน (quercetin)

1.1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพและพืชสมุนไพรที่พบ

เควอซีทินมีสูตรโมเลกุล คือ 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one สูตรเคมี คือ $C_{15}H_{10}O_7$ ประกอบด้วย 3-hydroxyflavone มีหมู่ไฮดรอกซิล 5 หมู่ ที่เป็นตัวกำหนดกลไกทางชีวภาพของสารประกอบนี้ คือ เป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ มีวงแหวน 2 วง คือ A และ B ดังแสดงในรูปที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 316.5 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุล 302.2357 กรัมต่อโมล ลักษณะเป็นผงสีเหลือง (D'Andrea, 2015) อนุพันธ์ของเควอซีทินมีทั้งที่ไม่มีขั้ว และละลายน้ำได้ขึ้นอยู่กับชนิดของอะตอมที่สามารถมาแทนที่ได้ความคงตัวและกลไกการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบนี้ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย (Rameova *et al.*, 2012) โดย เควอซีทินละลายได้ปานกลางในเอทานอล (4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) (Priprem *et al.*, 2008) และละลายได้ดีใน DMSO (dimethyl sulfoxide) (150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) (Ferry *et al.*, 1996) แต่มีค่าการละลายในน้ำต่ำเพียง 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Gao *et al.*, 2011)

เควอซีทินพบได้ในพืช ผักและผลไม้หลากหลายชนิด พบได้ปริมาณมากในอาหารที่มนุษย์รับประทาน (16-25 มิลลิกรัมต่อวัน) (Hertog *et al.*, 1993) มีรายงานการพบเควอซีทิน ในพืชสมุนไพรไทย จากงานวิจัยของ Katsube และคณะ (2006) พบ Quercetin 3-(6-malonylglucoside) และอนุพันธ์ของเควอซีทิน คือ ไอโซเควอซีทิน (isoquercetin) จากใบหม่อนที่สกัดด้วยเอทานอลในปริมาณ 900 และ 194 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ Junsu และคณะ (2017) ศึกษาใบรางจืดจากสารสกัดน้ำด้วยวิธี LC-MS (Liquid Chromatography Mass spectrometer) พบเควอซีทินและอนุพันธ์ของเควอซีทิน คือ ไอโซเควอซีทิน ในปริมาณ 61.19 และ 114.54 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Wiczowski และคณะ (2008) ได้ศึกษาเควอซีทินจากหอมแดงสด พบปริมาณเควอซีทินกลูโคไซด์ (quercetin glucosides) และเควอซีทินอะไกลโคโคน (quercetin aglycone) ร้อยละ 99 และ 0.8 ตามลำดับ และหอมแดงแห้ง พบเควอซีทินกลูโคไซด์ และเควอซีทินอะไกลโคโคน ร้อยละ 83 และ 16 ตามลำดับ อีกทั้งยังตรวจพบอนุพันธ์ของเควอซีทินทั้งหมด 5 อนุพันธ์ คือ (1) quercetin 3,4'-O-bis-b-glucoside (2) quercetin 3-O-b-glucoside (3) quercetin 4'-O-b-glucoside (4) isorhamnetin 4'-O-b-glucoside และ (5) quercetin aglycone วิลาวรรณ เรือนสิทธิ์ และคณะ (2558) ได้ตรวจหาปริมาณสารเควอซีทินในสารสกัดจากพืชสมุนไพร 2 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC-ELSD (High-Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Detector) พบว่า สารสกัดหยาบจากสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 มีปริมาณเควอซีทินสูงถึง 463.49 มิลลิกรัมต่อกรัม และโกฐน้ำเต้า พบ 14.02 มิลลิกรัมต่อกรัมในตัวทำละลายน้ำกลั่น ส่วนเควอซีทินที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจากส่วนดอกของพืชสมุนไพร *Sophora japonica* L. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae

ในทางการแพทย์แผนจีน ญี่ปุ่นและเกาหลี่ใช้เป็นยารักษาโรคริดสีดวงทวารและอาการอาเจียนเป็นเลือด มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเกล็ดเลือด และฤทธิ์ป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจ (Chen and Hsieh, 2010)



รูปที่ 1 Chemical structures of quercetin (D'Andrea, 2015)

1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของ เควอซิทินและอนุพันธ์ของเควอซิทิน 6 ชนิด เปรียบเทียบกับสารสกัดจากหัวหอมและสารมาตรฐาน BHT (butylated hydroxytoluene) และ aspirin นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power) และ LP (lipid peroxidation) พบว่า อนุพันธ์ของเควอซิทิน 3 ชนิด คือ tamarixetin, isorhamnetin และ quercetin-3-O-glucuronide มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากหัวหอมและ BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Lesjak *et al.*, 2018) จากการศึกษาเควอซิทินที่นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และเพอรอกซีไนไตรท์ (peroxynitrite: ONOO⁻) พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และเพอรอกซีไนไตรท์ แสดงเป็นค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.5±0.1 และ 48.8±0.5 ไมโครโมล ตามลำดับ (Iacopini *et al.*, 2008) เควอซิทินสามารถต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (O₂⁻) ยับยั้ง NADPH oxidases และ iNOS เพิ่มชีวประสิทธิผลของไนตริกออกไซด์ (NO) โดยการควบคุมการเพิ่มขึ้นของ eNOS และรักษาระดับกลูตาไธโอน (glutathione: GSH) ของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ จากศึกษาในหนูไมซ์ที่ได้รับเควอซิทินทางปากปริมาณ 50 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำด้วยลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) (Kukongviriyapan *et al.*, 2012) จากงานวิจัยของ Luangaram และคณะ (2007) ศึกษาในหนู sprague-dawley เพศผู้ที่ได้รับเควอซิทินทางปากปริมาณ 25 หรือ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวติดต่อกัน 6 วัน พบว่า ไนตริกออกไซด์ (NO) ในเลือดลดลง (10.0±0.74 และ 11.0±0.67 ไมโครโมล ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เควอซิทินยังสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้มากถึง 6.2 เท่า เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ ซึ่งเป็นผลมาจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเลือด (Arts *et al.*, 2004)

1.2.2 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

การศึกษาในเซลล์หลายชนิดแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของเคออสิติน ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (HT-29) (Psahoulia *et al.*, 2007) เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-453) (Choi *et al.*, 2008) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) (Vidya Priyadarsini *et al.*, 2010) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (CWR22Rv1) (Hsieh and Wu, 2009) ที่ความเข้มข้น 3-50 มิลลิโมลาร์ของเคออสิตินสามารถต้านการเจริญเติบโตในระดับหลอดทดลองและสามารถป้องกันมะเร็งที่เกิดจากความเครียดออกซิเดชันได้ เนื่องจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการกำจัดการทำงานของโปรตีนไคเนส (protein kinases) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแบ่งตัวและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Gibellini *et al.*, 2011; Baghel *et al.*, 2012) และการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เกี่ยวกับการดูดซึมของเคออสิตินด้วยวิธีการรับประทานเข้าไปในร่างกาย สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Murakami *et al.*, 2008) และเมื่อรับประทานอาหารที่มีเคออสิตินเป็นส่วนประกอบสามารถยับยั้งการเกิด การเจริญเติบโตและ/หรือการแพร่กระจายของเนื้องอก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมา การลุกลามและการแพร่กระจายของเนื้องอกได้ (Caltagirone *et al.*, 2000) Li และคณะ (2016) ยังพบว่าเคออสิตินมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของตัวรับสื่อกลางของเซลล์จากหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งช่องท้องชนิด dalton (dalton's lymphoma ascites cell: DLA) นอกจากนี้ เคออสิตินยังสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนสซี (protein kinase C) ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของมะเร็ง (Maurya and Vinayak, 2015) อีกทั้งเคออสิตินทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และยับยั้งเซลล์มะเร็งในระยะลุกลามได้ จึงทำให้เคออสิตินมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดี (Jeong *et al.*, 2009)

1.2.3 ฤทธิ์ต้านเบาหวาน

จากงานวิจัยของ Jeong และคณะ (2012) ได้ศึกษาสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ในหนูเมซซ์พันธุ์ C57BL/KsJ-db/db จำนวน 18 ตัว ให้อาหารที่มีเคออสิตินปริมาณต่ำและสูงที่ร้อยละ 0.04 และ 0.08 ตามลำดับ เป็นเวลาติดต่อกัน 6 สัปดาห์ ศึกษาระดับน้ำตาลกลูโคส อินซูลิน อะดิโปเนกทิน (adiponectin) และลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ของตับ ผลการศึกษาพบว่า ระดับของกลูโคสในเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ขึ้นอยู่ปริมาณของยา (dose-dependent) ทั้งในกลุ่มที่ได้รับเคออสิตินต่ำและสูง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับอินซูลิน โดยพิจารณาจากการประเมินความต้านทานต่ออินซูลิน (HOMA-IR) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่า ร้อยละ 0.08 ของเคออสิตินที่ให้ยาเพิ่มขึ้นช่วยลดปริมาณไขมันในเลือดและลดระดับไขมันดี (HDL-cholesterol) ลงได้ ส่วนไตรกลีเซอไรด์ในเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งในกลุ่มที่ได้รับเคออสิตินต่ำและสูง นอกจากนี้ทั้งการได้รับเคออสิตินในระดับต่ำและสูงสามารถลดระดับของ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และเพิ่มฤทธิ์ในการทำงานของเอนไซม์จากตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระว่องไวกลุ่มออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase: SOD), คตาเลส (catalase:CAT) และ

กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase: GSH-Px) ดังนั้นเคอวอซิทินอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง และต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Eid และคณะ (2015) เคอวอซิทินได้กระตุ้นการดูดซึมกลูโคสของโรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินที่เกี่ยวข้องกับกลไก adenineine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) ในตับ ซึ่งกระตุ้นกลูโคสที่ขนส่งกลูโคส GLUT4 ไปยังผนังเซลล์ ช่วยลดการผลิตกลูโคส โดยลดตัวรับสัญญาณจากเอนไซม์ gluconeogenesis เช่น phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) และ glucose-6-phosphatase (G6Pase) ได้

1.2.4 ฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด

จากการศึกษาทางคลินิกเกี่ยวกับผลของเคอวอซิทินต่อการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด สำหรับผู้ป่วยความดันโลหิตสูง พบว่า การรับประทานเคอวอซิทิน 730 มิลลิกรัมต่อวัน นาน 4 สัปดาห์ สามารถลดแรงดันโลหิตค่าบน (systolic blood pressure) 7 มิลลิเมตรปรอท แรงดันโลหิตค่าล่าง (diastolic pressure) 5 มิลลิเมตรปรอท และความดันโลหิตเฉลี่ยลดลง 5 มิลลิเมตรปรอท (Edwards *et al.*, 2007) ในการศึกษาที่คล้ายคลึงกันความดันโลหิตค่าบน และ atherogenic LDL ลดลงสำหรับกลุ่มคนอ้วนลงพุง (metabolic syndrome) หลังจากได้รับเคอวอซิทิน 150 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 42 วัน แต่อย่างไรก็ตามการให้อาหารเสริมที่มีส่วนผสมของเคอวอซิทินแทบไม่ส่งผลต่อระดับของ TNF- α และโปรตีน C-reactive แม้ความเข้มข้นของเคอวอซิทินในเลือดจะเพิ่มขึ้นจาก 71 เป็น 269 นาโนโมลต่อลิตร (Egert *et al.*, 2009)

1.3 การศึกษาความเป็นพิษ

รายงานความปลอดภัย พบว่าเคอวอซิทินเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง การทดสอบความเป็นพิษต่อยีน (genotoxicity) และการกลายพันธุ์ (mutagenicity) ในสัตว์หลายสายพันธุ์ ทั้งระยะสั้นและระยะยาว รวมทั้งศึกษาในมนุษย์แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดจากเคอวอซิทินไม่ได้พัฒนาให้เป็นสารก่อมะเร็งในร่างกาย (Harwood *et al.*, 2007) จากการทดลองในสัตว์ที่ได้รับเคอวอซิทินวันละ 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวกิโลกรัม เป็นเวลาติดต่อกันนาน 2 ปี พบว่า ไม่มีความผิดปกติ ส่วนการศึกษาในมนุษย์ที่ได้รับประทานเคอวอซิทินตั้งแต่ 3 ถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ไม่พบผลข้างเคียงของการใช้ยาและไม่ส่งผลเสียต่อค่าทางโลหิตวิทยาหรือปริมาณสารชีวเคมีที่อยู่ในเลือดและปัสสาวะ (Shoskes *et al.*, 1999; Kiesewtter *et al.*, 2000) และสอดคล้องกับความปลอดภัยต่อการได้รับเคอวอซิทินทางหลอดเลือดดำขนาด 1,400 มิลลิกรัม หรือประมาณ 2.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 70 กิโลกรัม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ยังคงมีความปลอดภัย (Ferry *et al.*, 1996) และจากงานวิจัยของ Utesch และคณะ (2008) ศึกษาในหนูที่ได้รับเคอวอซิทินทางปากปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ไม่พบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเม็ดเลือดแดง (micronucleated polychromatic erythrocytes: MN-PCE) และ

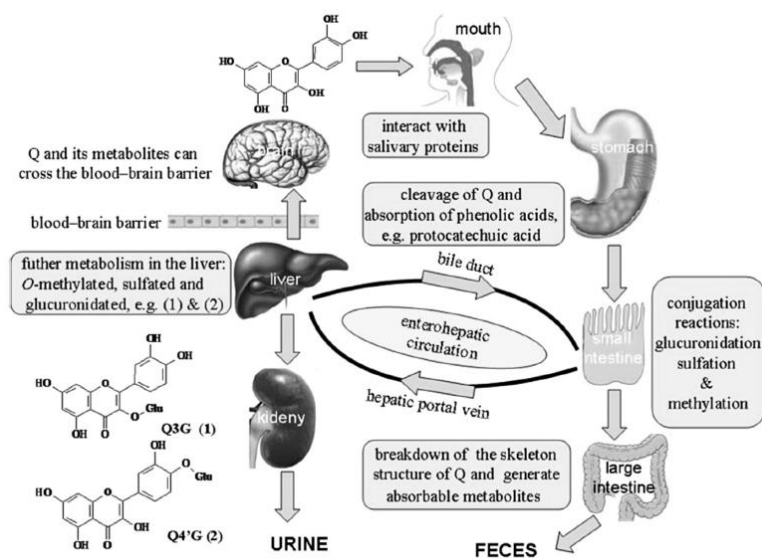
ไม่ก่อให้เกิด unscheduled DNA synthesis (UDS) ใน hepatocytes ของหนูเพศผู้หรือเพศเมียได้ และถูกเมทาบอลิซ์หลังการให้ยานาน 48 ชั่วโมง อีกทั้งยังไม่พบการตกค้างของเคอควิซีนในเลือดและไขกระดูกด้วย

1.4 การศึกษาความคงตัว

ความคงตัวของเคอควิซีนที่อยู่ในอาหารจะมีความแตกต่างกันซึ่งอาจมีผลมาจากค่าความเป็นกรดต่าง ระดับอนุมูลอิสระ ไอออนของโลหะ และสารประกอบอื่น เช่น กลูตาไธโอน (Price *et al.*, 1997; Boots *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2008; Dehghan and Khoshkam, 2012) Buchner และคณะ (2006) และ Moon และคณะ (2008) ศึกษาค่าความเป็นกรดต่าง และอนุมูลอิสระ พบว่า เคอควิซีนไม่มีความคงตัวในสารละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) และน้ำ โดยให้ค่าความเป็นกรดต่าง มากกว่า 7 และอัตราการสลายตัวสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะต่าง ความคงตัวของเคอควิซีนยังมีอิทธิพลจากเวลาในการเก็บรักษา โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มีเป็นเวลา 24 สัปดาห์ ทำให้เคอควิซีนที่พบในหัวหอม (*Allium cepa* L.) สูญเสียโครงสร้างไปได้ถึงร้อยละ 100 (Price *et al.*, 1997)

1.5 เกล็ดขงเภสัชศาสตร์ (Pharmacokinetics) ของเคอควิซีน

Wang และคณะ (2016) ได้กล่าวถึงกระบวนการเผาผลาญและการดูดซึมของเคอควิซีนในการให้ยาทางปาก แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 Schematic illustration of the metabolism and absorption of quercetin. Q is quercetin (Wang *et al.*, 2016)

1.5.1 การดูดซึมของยาเข้าสู่ร่างกาย (absorption)

ระดับความเข้มข้นของเคอควิซิทินในเลือดหลังการให้ยาทางปาก แสดงดังตารางที่ 1 พบว่า การดูดซึมของเคอควิซิทินแทบจะไม่เปลี่ยนแปลงที่บริเวณปาก (Cai and Bennick, 2006) ส่วนในกระเพาะอาหารเคอควิซิทินมีสภาพเป็นกรดแก่และอาจถูกย่อยสลายไปเป็นกรดฟีนอลิก เช่น protocatechuic acid โดยการแบ่งตัวของแบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้โครงสร้างของเคอควิซิทินสลายตัวได้ (Weldin *et al.*, 2003) จากการศึกษาในหลอดทดลองและในหนู พบว่า เคอควิซิทินอะไกลโคไซด์ ถูกดูดซึมจากการแพร่แบบไม่ใช้พลังงานและถูกขนส่งด้วย organic anion transporting polypeptide (OATP) (Nait *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามก่อนที่จะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเคอควิซิทินไกลโคไซด์ (quercetin glycosides) เช่น เคอควิซิทินกาแล็กโทไซด์ (quercetin galactoside) เคอควิซิทินอะราบินอไซด์ (quercetin arabinoside) จะถูก deglycosylated ไปเป็นเคอควิซิทินอะไกลโคไซด์ โดย actase phlorizin hydrolase (LPH) และ β -glucosidase (Wang *et al.*, 2016)

ตารางที่ 1 Serum levels after oral absorption of quercetin in rats and human

| Species | Administered dose | Serum levels | References |
|---------|-------------------|---|-------------------------------------|
| Rat | 40 mg/kg/BW | 50 μ mol/L (24h) | Manach <i>et al.</i> , 1997 |
| Rat | 600 mg/kg/BW | 582 nmol/L (8 day) | Rangel-ordonez <i>et al.</i> , 2010 |
| Human | 10 mg/70 kg/BW | 10.8 25.3 และ 12.7 ng/L (from vegetables, grape juice and white wine, respectively) | Goldberg <i>et al.</i> , 2003 |
| Human | 1095 mg/day | 1430 nmol/L (24h) | Guo <i>et al.</i> , 2014 |
| Human | 22 mg/treatment | 109 nmol/L (24h) | Petersen <i>et al.</i> , 2016 |

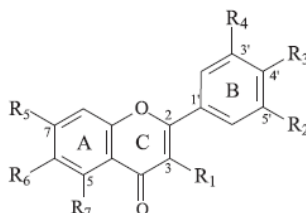
1.5.2 การกระจายตัวของยา (distribution)

จากการศึกษาการกระจายตัวของเคอควิซิทิน de Boer และคณะ (2005) พบว่า ปริมาณร้อยละ 59.1 ของเคอควิซิทินทั้งในรูปเคอควิซิทินอิสระ (free quercetin) และเคอควิซิทินคอนจูเกต (conjugated quercetin) ถูกเมแทบอลิซึมหลังจากการให้ยาทางปาก 10 มิลลิกรัม กิโลกรัมต่อน้ำหนักตัว และศึกษาในระยะยาวโดยการให้เคอควิซิทินทางปาก 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว นาน 11 สัปดาห์ พบว่า เคอควิซิทินและอนุพันธ์ของเคอควิซิทินมีการกระจายตัวไปยังหลายอวัยวะ เช่น ปอด ไต หัวใจ และตับ เป็นต้น โดยพบการสะสมที่บริเวณปอดมากที่สุด พบการสะสมใน

สมองและม้ามน้อยที่สุด ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าการบริโภคเคอควิซินเป็นจำนวนมากเกินไปอาจเกิดการสะสมในร่างกายได้

1.5.3 การเมทาบอลิซึมของยา (metabolism)

เคอควิซินส่วนใหญ่ที่พบในผักและผลไม้ จะอยู่ในรูปไกลโคไซด์ (glycosides) ถูกไฮโดรไลส (hydrolyzed) อย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์ glucosidase ที่เนื้อเยื่อบุผิวผนังลำไส้เล็ก หรือแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้เป็นเคอควิซินอะไกลโคไซด์ขึ้น ทำให้เกิดการดูดซึมได้อย่างรวดเร็วที่ลำไส้ใหญ่ เคอควิซินและอนุพันธ์ของเคอควิซินที่ถูกเมทาบอลิซึม แสดงดังรูปที่ 3 เช่น เคอควิซินกลูโคไซด์ และเคอควิซินกาแล็กโทไซด์ ถูกขนส่งไปที่หลอดเลือดดำพอร์ทัล (portal vein) เข้าสู่ตับและถูกเมทาบอลิซึมด้วยปฏิกิริยา O-methylation sulfation และ glucuronidation อาศัยเอนไซม์ uridine diphosphate glucuronosyltransferases และ catechol-O-methyltransferase ตามลำดับ (Murota and Terao, 2005) นอกจากนี้ catechol-O-methyltransferase ในตับและไตยังมีผลทำให้เกิดการ methylation ของเคอควิซินและอนุพันธ์ของเคอควิซินได้ (De Santi *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามจากการให้ยาทางปากในหนูเพศผู้ (sprague-dawley rats) พบว่าร้อยละ 93 ถูกเมทาบอลิซึมที่ลำไส้เล็กก่อนการดูดซึม และพบเพียงร้อยละ 3.1 ที่ถูกเมทาบอลิซึมในตับ (Chen *et al.*, 2005)



| Systematic name | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Quercetin | OH | OH | OH | H | OH | H | OH |
| Quercetin 3-O-rhamnoside (quercitrin) | O-Rha | OH | OH | H | OH | H | OH |
| Quercetin 3-O-rhamnosyl-(1 → 6)-glucoside (rutin) | O-RG | OH | OH | H | OH | H | OH |
| Quercetin 3-O-glucoside (isoquercitrin) | O-Glu | OH | OH | H | OH | H | OH |
| Quercetin 3-O-galactoside (Hyperoside) | O-Gal | OH | OH | H | OH | H | OH |
| Quercetin 7-O-glucoside | OH | OH | OH | H | OH | H | O-Glu |
| Quercetin 3-O-rhamnoside-7-O-glucoside | O-Rha | OH | OH | O-Glu | OH | H | OH |
| Quercetin 6-C- glucoside | OH | OH | OH | H | OH | Glu | OH |
| Quercetin 3'- methyl ether (isohramnetin) | OH | O-Met | OH | H | OH | H | OH |
| Quercetin 7- methyl ether (rhamnetin) | OH | OH | OH | H | OH | H | O-Met |
| Quercetin 4'- methyl ether (tamarixetin) | OH | OH | O-Met | H | OH | H | OH |

Gal: galactose; Glu: glucose; Rha: rhamnose; RG: rhamnosyl glucose; Met: methyl

รูปที่ 3 Chemical structures of quercetin and its main derivatives (Wang *et al.*, 2016)

1.5.4 การขับถ่ายยาออกจากร่างกาย (excretion)

การขับยาออกไปสู่ลำไส้เล็กของอนุพันธ์เคอเวอซิทีนที่ apical side บริเวณ enterocytes อาจเกี่ยวข้องกับ mediator คือ breast cancer resistance protein 1 (BCRP1) และ multidrug resistance associated-protein 2 (MRP2) (Sesink *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2007) เมื่อถูกเมทาบอลิซ์แล้วขับออกจากร่างกายผ่านทางปัสสาวะ (Nishijima *et al.*, 2015) และถูกขับออกมาในน้ำดี ขจัดออกทางอุจจาระ (Shi and Williamson, 2015) ในกรณีที่เคอเวอซิทีนถูก bacterial ring fission เกิดการสลายตัวเป็นกรดฟีนอลและคาร์บอนไดออกไซด์ จะถูกขับออกทางลมหายใจด้วย (Abrahamse *et al.*, 2005) และจากการศึกษาในมนุษย์ พบว่า เคอเวอซิทีนถูกขับออกทางการหายใจ ปัสสาวะ หรืออุจจาระ คิดเป็นร้อยละ 52.1, 4.6 และ 1.9 ตามลำดับ (Walle, Walle, and Halushka, 2001)

1.6 กระบวนการปรับปรุงชีวประสิทธิผลจากการให้ยาทางปากของเคอเวอซิทีน

จากความสามารถในการละลายน้ำและมีชีวประสิทธิผลต่ำ โครงสร้างทางเคมีที่ไม่คงตัว และค่าครึ่งชีวิตทางชีวภาพสั้น (biological half-life) อาจลดประสิทธิภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอาหารและยาได้ (Cai *et al.*, 2013) อีกทั้งคุณสมบัติการดูดซึมที่ไม่ดีและมีการเมทาบอลิซ์อย่างรวดเร็วในลำไส้เล็กและตับนั้น ทำให้ค่าชีวประสิทธิผลต่ำเช่นกัน (Kakran *et al.*, 2011) คุณสมบัติที่เหมาะสมของระบบนำส่งยาในรูปแบบรับประทาน ควรจะพิจารณาจากค่าการละลาย ขนาดและประจุนุภาค อัตราการดูดซึมและการทำงานของเอนไซม์ทางเภสัชจลนศาสตร์ (Planas *et al.*, 2012) ระบบนำส่งยาหลากหลายรูปแบบ ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงค่าการละลาย อัตราการแตกตัวและชีวประสิทธิผลของเคอเวอซิทีน ประกอบด้วย ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) (Gao *et al.*, 2009) อนุภาคนาโนที่เป็นของแข็ง (Solid lipid nanoparticles) (Li *et al.*, 2009) โซลิดดิสเพอร์ชัน (Solid dispersions) (Kakran *et al.*, 2011) ยาแขวนตะกอนอนุภาคนาโน (Nanosuspensions) (Gao *et al.*, 2011) และลิโปโซม (Liposomes) (Landi-Librandi *et al.*, 2012)

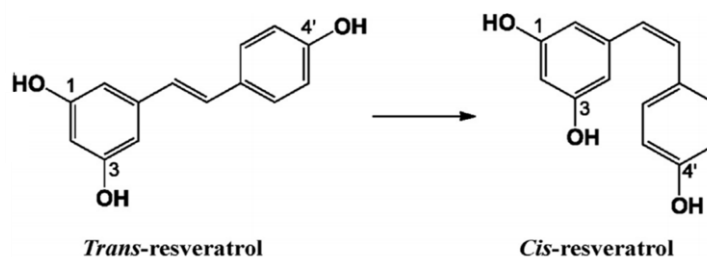
2. เรสเวอราทรอล (resveratrol)

2.1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพและพืชสมุนไพรที่พบ

เรสเวอราทรอลถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2483 โดย Takaoka ซึ่งสกัดแยกได้ครั้งแรกจากราก *Polygonium cuspidatum* ส่วนทรานส์เรสเวอราทรอล (trans-resveratrol) ถูกค้นพบครั้งแรกจากราก White hellebore (*Veratrum grandiflorum*) ในทางการแพทย์ญี่ปุ่นใช้เป็นยารักษาอาการอักเสบและภาวะไขมันในเลือดสูง มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง โรคที่มีความผิดปกติของระบบประสาทและป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจ (Planas *et*

al., 2012) พบสารประกอบนี้ได้ทั่วไปในในถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) พืชตระกูลบลูเบอร์รี่ (*Vaccinium spp.*) พืชตระกูลแบล็คเบอร์รี่ (*Morus spp.*) (Constant *et al.*, 1997) และพบได้มากในไวน์แดงที่ได้จากองุ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ เมล็ด ผิวหุ้มเมล็ด ก้านใบ และเนื้อไม้ขององุ่น (Gambini *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสมุนไพรไทยที่มีสารประกอบเรสเวราทรอล ได้แก่ หม่อน (*Morus Alba* Linn) (Zhou *et al.*, 2013) ว่านหางจิ้งจอก (*Belamcanda chinensis* L.) (Monthakantirat *et al.*, 2005) ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia*) (Wungsintaweekul *et al.*, 2011) อบเชย (*Cinnamomum verum*) (Muangthai *et al.*, 2014) และมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) (Povichiti *et al.*, 2010) นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 จนถึงปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์หลายอย่างจากฤทธิ์ทางชีวภาพของเรสเวราทรอล เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ป้องกันการโรคหัวใจและหลอดเลือด และฤทธิ์ป้องกันเซลล์ประสาทเสื่อม (Kapetanovic *et al.*, 2011) และยังมีรายงานว่า มีฤทธิ์เหมือนเอสโตรเจน เพราะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิด ไดเอธิลสตีลเบสโตรล (diethylstilbestrol) (Burns *et al.*, 2002)

เรสเวราทรอลมีสูตรโมเลกุล คือ 3,5,4'-trihydroxystilbene เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่จัดอยู่ในกลุ่มสตีลเบิน (stilbene) มีโครงสร้างของวงแหวนอะโรมาติก 2 วง (aromatic rings) เชื่อมต่อกันด้วย ethylene bridge สูตรเคมี คือ $C_{14}H_{12}O_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 228.25 กรัมต่อโมล (O'Neil *et al.*, 2006) มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 253-255 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นผงสีขาว แบ่งออกเป็น 2 isomer คือ ทรานส์เรสเวราทรอล (trans-resveratrol) และซิสเรสเวราทรอล (cis-resveratrol) (Soleas *et al.*, 1997) โดยสารประกอบทั้งสอง isomer นี้มีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร มีประสิทธิภาพของการรักษาคล้ายกัน โดยซิสเรสเวราทรอล มีรายงานว่าไม่มีความคงตัว (Chen *et al.*, 2007) และมีการศึกษาเกี่ยวกับรูปแบบทรานส์เรสเวราทรอลอย่างกว้างขวางมากกว่า รูปแบบซิสเรสเวราทรอล เนื่องจากทรานส์เรสเวราทรอลจะถูกเปลี่ยนเป็นซิสเรสเวราทรอล เมื่อสัมผัสกับความร้อนหรือรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Chun-Fu *et al.*, 2013) โครงสร้างทางเคมีของทั้ง 2 รูปแบบ แสดงดังรูปที่ 4 โดยทรานส์เรสเวราทรอลมีค่า pKa ที่เป็น Mono-, Di- และ Triprotonated ที่ 9.3, 10 และ 10.6 ตามลำดับ สำหรับการวัดด้วยเครื่อง UV-HPLC (High Performance Liquid Chromatography UV/Visible Detectors) ทั้งทรานส์เรสเวราทรอลและซิสเรสเวราทรอล สามารถวัดได้ที่ความยาวคลื่น 288 และ 308 นาโนเมตร ตามลำดับ (Planas *et al.*, 2012) เรสเวราทรอลเป็นสารที่ละลายในไขมัน ละลายในเอทานอลได้ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และละลายใน DMSO ที่ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีค่าการละลายในน้ำต่ำ สามารถละลายได้เพียง 3 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ถึงแม้จะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ไม่ดี แต่เรสเวราทรอลสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้สูง ถือได้ว่าเป็นสารประกอบกลุ่มที่ 2 ตามคุณสมบัติด้านชีวเภสัชกรรม (Biopharmaceutics classification system: BCS) (Amidon *et al.*, 1995)



รูปที่ 4 Chemical structures of resveratrol (Amri *et al.*, 2014)

2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความสามารถของเรสเวราทรอลในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และเพอรอกซีไนไตรท์ (ONOO⁻) พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และเพอรอกซีไนไตรท์ แสดงค่า IC₅₀ เท่ากับ 57.8±0.1 ไมโครโมล และ 74.1±1.0 ไมโครโมล ตามลำดับ (Iacopini *et al.*, 2008) จากการศึกษาของ Gülçin (2010) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเรสเวราทรอล (30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่า มีค่า EC₅₀ ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ DMPD เท่ากับ 17.8, 6.96 และ 9.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระออกซิเจน (oxygen: O₂) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide: H₂O₂) เท่ากับร้อยละ 71.8 และ 19.5 ศึกษาฤทธิ์ Fe²⁺ chelating activities เท่ากับ ร้อยละ 86.3 ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Murias และคณะ (2005) ได้ศึกษาโครงสร้างของเรสเวราทรอล พบว่า จำนวนและตำแหน่งบนวงแหวนฟีนอลของหมู่ไฮดรอกซิลส่งเสริมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเอนไซม์คาตาเลส และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 15.3 และ 34.5 ตามลำดับ และสามารถลดระดับเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide synthase: NOS) และ nitric oxide levels ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน embryonic neural stem cells เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว (Sibel *et al.*, 2013) การแสดงออกของเอนไซม์ NOS หลังการให้เรสเวราทรอลในหนูเมาส์ที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง (hypercholesterolemic) พบว่า สามารถลดการแสดงออกของ NOS ในหัวใจได้ และกลไกการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของทรานส์เรสเวราทรอล มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ linoleate micelle ที่เกิดจากการสร้างไฮดรอกไซด์ไอออน (OH⁻) ที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 100 ไมโครโมล สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ได้ (O₂⁻) (Jia *et al.*, 2008) และสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระเพอรอกซีไนไตรท์ แสดงค่า IC₅₀ ร้อยละ 57 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล และสามารถยับยั้งปฏิกิริยา nitration ของ bovine serum albumin ได้มากกว่า 20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ N-acetyl-L-cysteine และยับยั้งความเป็นพิษของสารอนุมูลอิสระเพอรอกซีไนไตรท์ได้ (Holthoff *et al.*, 2010)

2.2.2 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ผลของการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่าเรสเวอราทรอลมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ทั้ง 3 ระยะ คือ การเริ่มต้น ระยะดำเนินโรค และระยะลุกลามกระจายไปยังอวัยวะอื่น (Jang *et al.*, 1997) จากการศึกษาฤทธิ์ตามโครงสร้างทางเคมี องค์ประกอบของสารประกอบแต่ละชนิดมีฤทธิ์ที่จำเพาะ เช่น ทรานส์เรสเวอราทรอลมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในตำแหน่งที่ 4 และ 40 ของ stilbenic backbone มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ (Fulda, 2010) Kim และคณะ (2013) ศึกษาการตายแบบ apoptosis ในวัฏจักรเซลล์ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากในมนุษย์ พบว่า เรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ระยะ S ถึง G₂ และเพิ่มการทำงานของ caspase ส่วน Trincheri และคณะ (2007) ได้ศึกษาในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด DLD1 และ HT-29 ที่ความเข้มข้นของเรสเวอราทรอลตั้งแต่ 1-100 ไมโครโมล พบว่า สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis โดยยับยั้งผ่านสื่อกลางของ estrogen receptors เพิ่มการแสดงออกของ lysosomal cathepsin D และการทำงานของ caspase อีกทั้งยังสามารถยับยั้งไม่ให้มะเร็งเต้านมเจริญมากขึ้น โดยทำการศึกษาในเซลล์ estrogen-positive (MCF-7) และ estrogen-negative (MDA-MB-231) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล (Su *et al.*, 2007) สำหรับการศึกษาในมนุษย์ของ Patel และคณะ (2010) ได้ศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ จำนวน 20 คน โดยให้รับประทานเรสเวอราทรอลที่ 0.5 หรือ 1 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวติดต่อกันเป็นเวลา 8 วัน พบว่า ทรานส์เรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 674 นาโนโมลต่อกรัม และ resveratrol-3-O-glucuronide ที่ความเข้มข้น 86 นาโนโมลต่อกรัม สามารถสร้างเนื้อเยื่อใหม่ของลำไส้ใหญ่ได้ Brown และคณะ (2010) ศึกษาเรสเวอราทรอลซึ่งเป็น biomarkers ของกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยให้อาสาสมัครสุขภาพดีรับประทานเรสเวอราทรอลในปริมาณ 2.5 กรัมติดต่อกันนาน 29 วัน ผลการศึกษาพบว่าในแต่ละวัน ระดับ insulin-like growth factor-1 และ insulin-like growth factor binding-3 ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งข้อมูลนี้เป็นตัวบ่งชี้ถึงประโยชน์ของเรสเวอราทรอลในการป้องกันการเกิดมะเร็งได้

2.2.3 ฤทธิ์ต้านเบาหวาน

จากการทดลองทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่าเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ต้านเบาหวาน การป้องกันโรคอ้วน เพิ่มการเผาผลาญไขมัน และปรับปรุงความไวของอินซูลินให้ทำงานได้ดีขึ้น (Szkudelski and Szkudelska, 2015) รวมถึงการสะสมไขมันในตับ ไขมันในเลือดสูง ภาวะหลอดเลือดแข็งและโรคเบาหวาน Palsamy และ Subramanian (2010) ได้ศึกษาการให้เรสเวอราทรอลทางปากกับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานในปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวนาน 30 วัน พบว่า ระดับ glycosylated hemoglobin (HbA1C) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาของ Sharma และคณะ (2011) ในหนูไม่ชี้ที่เหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานและได้รับเรสเวอราทรอลทางปากวันละ 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้น 5, 15 และ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว เป็นเวลาติดต่อกัน 4 สัปดาห์ พบว่า สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด

ได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับเรสเวอราทรอล 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนการศึกษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ศึกษาในสัตว์ทดลองที่ให้อาหารที่มีไขมันสูงขนาด 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน พบว่า เรสเวอราทรอลเพิ่มการแสดงออกของ SIRT1 ช่วยเพิ่มความไวของอินซูลิน และลดภาวะที่ดื้อต่ออินซูลินได้ (Sun *et al.*, 2007) และจากงานวิจัยของ Lee และคณะ (2009) พบว่า เรสเวอราทรอลสามารถยับยั้งการทำงานของ cytokine ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ NF-KB ปริมาณของไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS จากการศึกษาของ Ramadori และคณะ (2009) ศึกษาการให้เรสเวอราทรอลในปริมาณต่ำ (79.2 นาโนกรัมต่อวัน) ในหนูไม่ซเพศผู้ที่เหนียวน้ำหนักทำให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง ผลการศึกษาพบว่า ระดับอินซูลินลดลงผ่านทางระบบประสาทส่วนกลาง จากการศึกษาทางคลินิกของ Wong และคณะ (2011) ได้ศึกษาในอาสาสมัครชายที่มีน้ำหนักเกิน จำนวน 14 คน และอาสาสมัครหญิงหมดประจำเดือน จำนวน 5 คนที่มีความเสี่ยงเป็นโรคความดันโลหิตสูง ให้รับประทานเรสเวอราทรอลปริมาณ 30, 90 และ 270 มิลลิกรัมต่อวัน ติดต่อกัน 6 วันและทำการสุ่มแบบปกปิดทั้งสองทาง พบว่า การขยายตัวของหลอดเลือดแดงเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4.1 (กลุ่มยาหลอก) เป็นร้อยละ 7.7 หลังจากได้รับเรสเวอราทรอลปริมาณ 270 มิลลิกรัมต่อวันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

2.2.4 ฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด

จากผลการศึกษาของ Mizutani และคณะ (2000) ได้ศึกษาการให้อาหารที่เสริมด้วยเรสเวอราทรอลทางปากในหนูที่เป็นโรคความดันโลหิตสูง ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว นาน 3 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่เสริมด้วยเรสเวอราทรอลสามารถลดความดันโลหิตคาบ่น (systolic blood pressure) ได้ถึงร้อยละ 15 และการศึกษาทางคลินิกของ Gliemann และคณะ (2013) ในชายอายุ 65 ปีขึ้นไป โดยการรับประทานเรสเวอราทรอล ปริมาณ 250 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ให้ผลดีร่วมกับการออกกำลังกาย สามารถลดความดันโลหิตเฉลี่ย (4.5 มิลลิเมตรปรอท) อัตราการเต้นของหัวใจในขณะพัก (5 มิลลิเมตรปรอท) ค่า low density lipoprotein (LDL) ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลต่อลิตร อัตราส่วนของ High density lipoprotein ต่อ HDL ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลต่อลิตร และระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลต่อลิตร และศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี โดยรับประทานเรสเวอราทรอลแคปซูลขนาด 400 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอาสาสมัครสุขภาพดี มีระดับ interferon gamma (IFN- γ) ลดลง (0.24 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และลดปริมาณอินซูลินในกระเพาะอาหาร (2.9 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) ช่วยเพิ่มกระบวนการเผาผลาญทำให้สามารถป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวได้ (Agarwalet al., 2013)

2.3 การศึกษาความเป็นพิษ

รายงานความปลอดภัยของเรสเวอราทรอล โดย Williams และคณะ (2009) ได้ศึกษาความเป็นพิษทั้งในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่า จากการศึกษาในหนูที่ให้เรสเวอราทรอล ปริมาณ 50, 150 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 28 วัน และให้

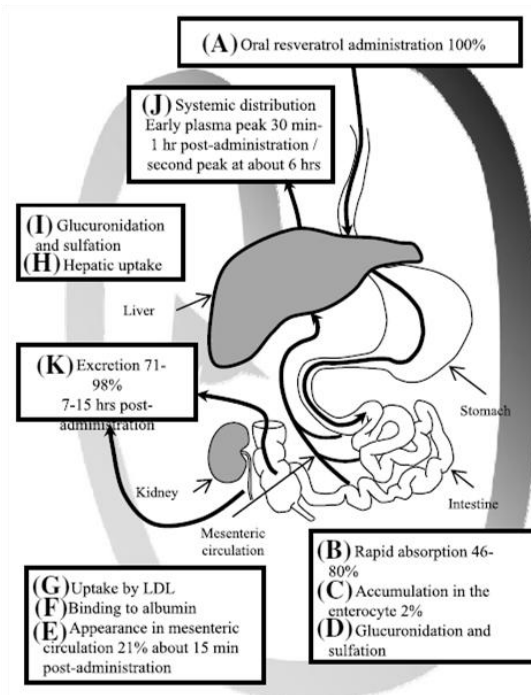
ปริมาณสูงถึง 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน ผลการศึกษาพบว่า ไม่พบความเป็นพิษและไม่มีผลต่อความสามารถในการสืบพันธุ์ของหนูเพศผู้หรือเพศเมีย และไม่มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อน และสอดคล้องกับการศึกษาในหนูและสุนัข โดยให้เรสเวอราทรอล 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน และ 600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ตามลำดับ ไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ ส่วนการศึกษาในมนุษย์โดยการให้อาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 10 คน รับประทานทรานส์เรสเวอราทรอล ในขนาด 5,000 มิลลิกรัม ผลการทดสอบพบว่า ไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรง (Gescher *et al.*, 2013)

2.4 ความคงตัว

เรสเวอราทรอลเป็นสารประกอบที่ไวต่อแสงมาก (Wu *et al.*, 2013) โดย Vian และคณะ (2005) ได้ศึกษาความคงตัวของเรสเวอราทรอล พบว่า ร้อยละ 80-90 ของทรานส์เรสเวอราทรอล ในสารละลายถูกเปลี่ยนเป็นซิสเรสเวอราทรอล เมื่อสัมผัสกับแสงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนงานวิจัยของ Trela และ Waterhouse (1996) พบว่า ทรานส์เรสเวอราทรอลมีความไวต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่เกิดขึ้น เมื่อทรานส์เรสเวอราทรอลบริสุทธิ์ถูกฉายรังสีเป็นเวลา 120 นาทีที่ 366 นาโนเมตร ร้อยละ 90.6 ถูกเปลี่ยนโครงสร้างเป็นซิสเรสเวอราทรอล เมื่อทรานส์เรสเวอราทรอลได้รับการป้องกันจากแสง จะมีความคงตัวอยู่เป็นเวลาอย่างน้อย 42 ชั่วโมง และอย่างน้อย 28 วัน ในสภาพความเป็นกรด (pH 1-7) จากงานวิจัยของ Zupančaić และคณะ (2015) ได้ศึกษาความคงตัวและการละลายของทรานส์เรสเวอราทรอลในน้ำที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกัน พบว่า ทรานส์เรสเวอราทรอลมีความคงตัวดีที่สภาวะความเป็นกรด (pH 1.2) นานถึง 90 วัน และเริ่มเสื่อมสภาพไปเมื่อค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 6.8

2.5 เกล็ดขจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) ของเรสเวอราทรอล

Amri และคณะ (2012) ได้กล่าวถึงกระบวนการเภสัชจลนศาสตร์ของเรสเวอราทรอล ในการให้ยาทางปากของเรสเวอราทรอล แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 Schematic illustration of resveratrol absorption (Amri *et al.*, 2012)

2.5.1 การดูดซึมของยาเข้าสู่ร่างกาย (absorption)

จากการศึกษาที่ผ่านแสดงให้เห็นระดับความเข้มข้นของเรสเวอราทรอลในเลือดหลังการให้ยาทางปาก แสดงดังตารางที่ 2 โดยเรสเวอราทรอลจัดเป็นสารที่สามารถดูดซึมในลำไส้เล็กได้อย่างรวดเร็ว สามารถขนส่งผ่านตัวรับ ATP-dependent binding cassette (ABC) ภายในเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้เล็กได้ (Planas *et al.*, 2012) การดูดซึมและสะสมในลำไส้เล็กที่เพิ่มขึ้น อาจเกิดการเกิด esterification ของหมู่ไฮดรอกซิลกับโมเลกุล aliphatic ใดๆก็ตามเรสเวอราทรอลที่พบในกระแสเลือด พบในรูปแบบเรสเวอราทรอลอิสระ (free resveratrol), เรสเวอราทรอลกลูคูโรนไนด์ (resveratrol glucuronide) และเรสเวอราทรอลซัลเฟต (resveratrol sulfate) โดยเรสเวอราทรอลอิสระจับกับโปรตีนอัลบูมิน (albumin) และลิโปโปรตีน (lipoproteins) เช่น LDL ได้ และแยกตัวออกจากกันหลังจากมีการจับกันที่เยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาของ Urpi-Sarda และคณะ (2005) ทำการแยกและวัดปริมาณเมตาบอไลต์ของเรสเวอราทรอล พบว่า trans-resveratrol-3-O-glucuronide, cis-resveratrol-3-O-glucuronide, cis-resveratrol-3-O-glucoside และทรานส์เรสเวอราทรอลอิสระถูกพบใน LDL ของมนุษย์ และพบว่า ทรานส์เรสเวอราทรอลอิสระสามารถจับกับลิโปโปรตีนในเลือดได้มากกว่าร้อยละ 90 จากการศึกษาการดูดซึมในลำไส้ผ่านเซลล์ Caco-2 ด้วยการแพร่แบบไม่ใช้พลังงานเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณร้อยละ 46 ในหนูที่ควบคุมกระบวนการขนส่งสารอาหารของหลอดเลือดแดงไปยังแขนงหลอดเลือดฝอยในเนื้อเยื่อลำไส้เล็ก ร้อยละ 77-80 ในหนูขาว และอย่างน้อยร้อยละ 70 ในมนุษย์ (Amri *et al.*, 2012) มีการศึกษาเพิ่มเติมที่แสดงให้เห็นว่าเรสเวอราทรอลไม่ได้ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของ Multi-drug resistance associated proteins (MRP) หรือ P-

glycoprotein โดยไม่พบการเมทาบอลิซึมใน phase 1 แต่พบการ conjugate ของ resveratrol-3-sulfate และ resveratrol-3-glucuronide ในกระบวนการเมทาบอลิซึม phase 2 ได้ ถึงแม้ว่า เรสเวอราทรอลจะถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว ในเซลล์ Caco-2 แต่ยังมีเมทาบอลิซึมใน phase 2 ซึ่ง อาจจะช่วยลดชีวประสิทธิผลของยาได้ (Li *et al.*, 2003)

ตารางที่ 2 Serum levels after oral absorption of resveratrol in rats, mice, rabbit and human

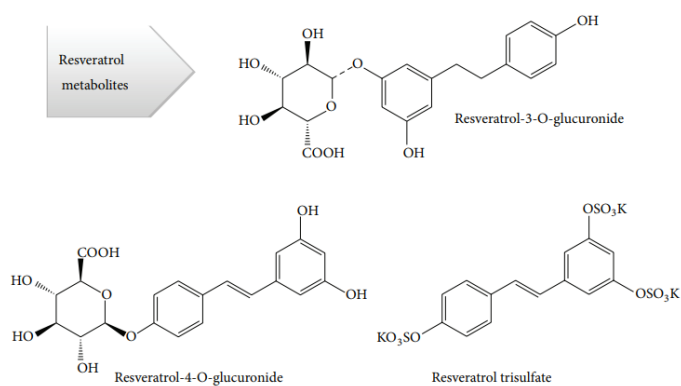
| Species | Administered dose | Serum levels | References |
|---------|-------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Rat | 5 mg/kg/BW | 1.5 μ M (4 h) | Meng <i>et al.</i> , 2004 |
| Mice | 100 mg/kg/BW | 321.2 ng/mL (4 h) | Johnson <i>et al.</i> , 2011 |
| Rabbit | 20 mg/kg/BW | 1.1 \pm 0.8 μ M (2 h) | Asensi <i>et al.</i> , 2002 |
| Human | 25 mg/treatment | 10-40 nmol/L (4 h) | Goldberg <i>et al.</i> , 2003 |
| Human | 25 mg/treatment | 491 \pm 90 ng/mL, 2 μ M (72 h) | Walle <i>et al.</i> , 2004 |
| Human | 150 mg/day | 182.59 \pm 30.33 ng/mL (30 day) | Timmers <i>et al.</i> , 2011 |

2.5.2 การกระจายตัวของยา (distribution)

การกระจายตัวของยาเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการศึกษาชีวประสิทธิผล เนื่องจากเรสเวอราทรอลมีการดูดซึมในลำไส้เล็กได้อย่างรวดเร็วหลังการให้ยาทางปาก (Andres-Lacueva *et al.*, 2012) Sale และคณะ (2004) ได้สนใจที่จะศึกษาการกระจายตัวของเรสเวอราทรอลและอนุพันธ์ของเรสเวอราทรอลในเนื้อเยื่อหลายชนิด โดยให้เรสเวอราทรอลทางปากในหนูไมซ์ ปริมาณ 240 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาในเนื้อเยื่อและเลือด ผลการศึกษาพบว่า เรสเวอราทรอลถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วในเลือดและเนื้อเยื่อหลังจากให้ยาทางปากนาน 1 ชั่วโมง resveratrol-3-sulfate และเรสเวอราทรอล กลูคูโรไนด์ พบที่ไตและตับของหนูไมซ์ พบการกระจายตัวของยาในหนูที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 30 นาที และมีสารเมทาบอลิซึมที่ตรวจพบได้ 3 ชั่วโมงหลังการให้ยาทางปาก และจากการศึกษาในมนุษย์ พบว่าเรสเวอราทรอลอิสระในเลือดและเซรัมน้อยกว่าร้อยละ 2 ของปริมาณเรสเวอราทรอลทั้งหมด พบปริมาณเรสเวอราทรอลทั้งหมด (free resveratrol และ metabolites resveratrol) ในเซรัมสูงสุด ปริมาณ 2 ไมโครโมล หลังให้ยานาน 30 นาทีหรือ 1 ชั่วโมง หรือพบในปริมาณ 1.3 ไมโครโมล หลังให้ยา 6 ชั่วโมง (Amri *et al.*, 2012)

2.5.3 การเมทาบอลิซึมของยา (metabolism)

การเมทาบอลิซึมของยาเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่แตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 2 Phase คือ การเมทาบอลิซึมใน phase 1 พบเอนไซม์ cytochrome P450s (CYPs) และ flavin monooxygenases ส่วนการเมทาบอลิซึมใน phase 2 พบได้จากกระบวนการ conjugation sulfate และ glucuronide ของทรานส์เรสเวราทรอลเป็นสารประกอบหลักที่พบใน enterocytes ของลำไส้เล็กและ hepatocytes ของตับ (Gambini *et al.*, 2015) พบเรสเวราทรอลมีการสะสมอยู่ใน enterocyte ประมาณร้อยละ 2 ถูกดูดซึมเข้าไปในหลอดเลือดดำพอร์ทัลที่ตับร้อยละ 21 หลังได้รับยาทางปาก 15 นาที อีกทั้งยังตรวจพบเรสเวราทรอลในเลือด 2 ไมโครโมลของปริมาณเรสเวราทรอลทั้งหมด (Amri *et al.*, 2012) cis-metabolite ดังแสดงในรูปที่ 6 พบได้ในปัสสาวะของมนุษย์ (cis-resveratrol-4'-sulfate, cis-resveratrol-3-O-glucuronide และ cis-resveratrol-4'-O-glucuronide) ในขณะที่พบปฏิกิริยา glucuronidation ของ trans-resveratrol เกิดขึ้นได้ โดยใช้ UGT1A1, UGT1A9 และ UGT1A10 (Aumont *et al.*, 2001)



รูปที่ 6 Illustration of resveratrol metabolism (Gambini *et al.*, 2015)

2.5.4 การขับถ่ายยาออกจากร่างกาย (excretion)

จากการศึกษาการขับยาออกจากร่างกายของเรสเวราทรอล พบว่า หลังการดูดซึมเข้าสู่ตับแล้วถูกเมทาบอลิซึมที่ enterocyte ด้วยปฏิกิริยา glucuroconjugates และ sulfoconjugates เกิดขึ้นที่ลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม (duodenum) ของมนุษย์ และในเซลล์ Caco-2 จากนั้นถูกขับออกจากร่างกายทั้งในปัสสาวะและอุจจาระหลังการให้ยาทางปากในมนุษย์ ร้อยละ 71 ถึงร้อยละ 98 (Walle *et al.*, 2004) เรสเวราทรอลอิสระที่ไม่ถูกดูดซึมจะถูกขับออกจากร่างกายถึงร้อยละ 40 Liang และคณะ (2014) สนใจที่จะศึกษาการขับยาออกจากร่างกายของเรสเวราทรอลหลังจากการให้ยาทางปากครั้งเดียวในหนูทดลอง ผลการศึกษาพบว่า หลังจากการให้เรสเวราทรอลปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว มีอัตราการขับยาออกจากร่างกาย ($t_{1/2}$) ประมาณ 118 นาที

นอกจากนี้ยังพบกัมมันตภาพรังสี [^{14}C]-trans-resveratrol มีการขับยาออกทางไตหลังจากการให้ยานาน 6 ชั่วโมง

2.6 กระบวนการปรับปรุงชีวประสิทธิผลจากการให้ยาทางปากของ เรสเวอราทรอล

ปัจจัยสำคัญในการปรับปรุงชีวประสิทธิผลของการให้ยาทางปากที่ควรพิจารณา เช่น ค่าการละลาย ขนาดอนุภาค อัตราการดูดซึม การทำงานของเอนไซม์ เกล็ดขจลนศาสตร์ของยา (Planas *et al.*, 2012) ซึ่งการปรับปรุงอัตราการดูดซึมใน enterocytes และกระบวนการ intracellular metabolism เป็นกระบวนการหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพและชีวประสิทธิผลของ เรสเวอราทรอล (Jose *et al.*, 2014) นอกจากนี้การบริโภคเรสเวอราทรอลร่วมกับอาหาร หรือ สารประกอบโพลีฟีนอลอื่น เพื่อเพิ่มชีวประสิทธิผลทางปากที่เรียกว่า “French Paradox” จากการศึกษาที่ผ่านมาเริ่มให้ความสนใจกับการใช้นาโนเทคโนโลยี เพื่อปรับปรุงการละลาย การขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และชีวประสิทธิผลของเรสเวอราทรอลมากขึ้น (Constant, 1997) จากงานวิจัยของ Frozza และคณะ (2010) ได้พัฒนาเรสเวอราทรอลเป็นลิพิดนาโนแคปซูล (lipid nanocapsules) หลังการประเมินลักษณะของนาโนแคปซูลกับหนู พบว่า เรสเวอราทรอลที่พัฒนาเป็นอนุภาคนาโนไขมัน พบปริมาณความเข้มข้นของเรสเวอราทรอลในตับ ไต และสมองของหนูที่สุขภาพดีเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับที่ไม่ได้บรรจุทรานส์เรสเวอราทรอลเป็นอนุภาคนาโนไขมัน Narayanan และคณะ (2009) ศึกษาการบรรจุเรสเวอราทรอลร่วมกับเคอร์คูมินในรูปแบบลิโปโซม (Liposome) ในหนูไมซ์ที่มียีนส์ PTEN บกพร่อง พบว่า การนำสารทั้งสองชนิดนี้มารวมกันในระบบนี้ ทำให้การเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากอาจลดลงได้ โดยสารทั้งสองชนิดนี้ทำให้เกิดการสูญเสียยีน PTEN suppressor tumor และการพัฒนาเรสเวอราทรอลในระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลชันพายด์ พบว่า สามารถบรรจุเรสเวอราทรอลได้ในปริมาณสูง (122.5 มิลลิกรัมต่อกรัมสูตรตำรับ) มีคุณสมบัติของระบบนำส่งยาที่ดี และมีการปลดปล่อยตัวยาได้อย่างรวดเร็ว สามารถซึมผ่านในลำไส้หนูแรทและเซลล์ Caco-2 ได้สูง มีอัตราการขับยาออก (metabolite flux) และการยับยั้งการขนส่ง MRP และ P-gp ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Seljak *et al.*, 2014)

จากการทบทวนวรรณกรรมทั้งในระดับหลอดทดลอง สัตว์ทดลองและระดับคลินิก แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมารวมกันจะมีประสิทธิภาพอย่างมากและสามารถเสริมฤทธิ์กันในการรักษาโรคมะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Benefits of quercetin in combination with resveratrol and the concentration correlated with their bioactivity

| Benefits | Concentrations of each compound | References |
|---|---|------------------------------------|
| กลุ่มอาการภาวะผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการเมทาบอลิซึมของร่างกาย สามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งได้ | 6-100 mM | Igura <i>et al.</i> , 2001 |
| ลดการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมและลดจำนวนของเซลล์ในหนู nude mouse | 0.5-20 μ M | Schlachterman <i>et al.</i> , 2008 |
| กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ยับยั้งการแบ่งตัว เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเสื่อมสภาพ และยับยั้งการเจริญเติบโตของ gliomas cell lines | resveratrol (10 μ M) และ quercetin (25 μ M) | Zamin <i>et al.</i> , 2009 |
| ยับยั้งการเกิดกระบวนการสร้างไขมัน (adipogenesis) และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes | 25 -100 μ M | Yang <i>et al.</i> , 2008 |
| ช่วยเพิ่มการเมทาบอลิซึมของไตรกลีเซอไรด์ เปลี่ยน white adipose tissue ให้เป็น brown adipose tissue และเพิ่มการแสดงออกของ UCP1 protein ภายในเซลล์ของ brown adipose tissue | resveratrol (15 mg/kg/day) และ quercetin (30 mg/kg/day) | Arias <i>et al.</i> , 2017 |

3. ระบบนำส่งยาเซล์ไมโครอิมัลชัน (Self-microemulsifying drug delivery system: SMEDDS)

ระบบนำส่งยา คือรูปแบบการเตรียมยาที่สามารถควบคุมให้มีการปลดปล่อยในอัตราและปริมาณตามที่กำหนดและสามารถนำยาไปยังอวัยวะหรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ (ภาสวีร์ จันทร์สุก และคณะ, 2555) สามารถแบ่งได้หลายระบบตามทางการให้ยา เช่น ระบบนำส่งยาทางปาก (Oral drug delivery system) ระบบนำส่งยาทางตา (Ocular drug delivery system) ระบบนำส่งยาสู่ทางเดินหายใจ (Pulmonary drug delivery system) ระบบนำส่งยาสู่ผิวหนัง (Transdermal drug delivery system) และระบบนำส่งยาทางสมอง (Brain drug delivery system) เป็นต้น โดยการให้ยาดังกล่าววิธีการรับประทาน หรือระบบนำส่งยาทางปาก (Oral drug delivery system) นั้นเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากมีความสะดวก ปลอดภัย ค่าใช้จ่ายน้อยและได้รับการยอมรับจากผู้ป่วย (ฤดีกร วิวัฒน์ปฐม, 2543)

3.1 ระบบนำส่งยาทางปาก (Oral drug delivery system)

ระบบนำส่งยาทางปากส่วนใหญ่มีปัญหาเรื่องการดูดซึม โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาที่ละลายน้ำยาก ทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาและการดูดซึมในระบบทางเดินอาหารลดลง มักมีปัญหาเรื่องชีวประสิทธิผล ซึ่งเกิดได้จากปัจจัยหลายอย่าง ขึ้นอยู่กับตัวบุคคล เช่น อารมณ์ จิตใจ และภาวะโรคของผู้ป่วย อีกทั้งยังมีปัจจัยอื่นด้วยเช่น อาหาร พฤติกรรม สิ่งแวดล้อม เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการให้ความสำคัญในการวิจัยและพัฒนาในระดับนานา เนื่องจากระบบนำส่งยามีขนาดอนุภาคเล็กสามารถนำยาไปยังอวัยวะเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง (ฤดีกร วิวัฒน์ปฐม, 2543) โดยมีวัตถุประสงค์ของการพัฒนาระบบนำส่งยาทางปาก คือ เพิ่มระยะเวลาให้อยู่ในทางเดินอาหารนานขึ้น มีความคงตัว อัตราการปลดปล่อยตัวยาในทางเดินอาหารสูงขึ้น ลดอาการข้างเคียง และยังสามารถนำส่งยาผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เพิ่มอัตราการดูดซึมและระดับยาในเลือดสูงขึ้น (Wang and Zhang, 2013) การพัฒนาระบบนำส่งยาทางปากเพื่อปรับปรุงค่าชีวประสิทธิผลของตัวยา ส่วนใหญ่จะนำส่งในรูปแบบอนุภาคคอลลอยด์ (Colloidal drug delivery system) โดยนำไขมันหรือพอลิเมอร์ที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ (biocompatible) ย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradable) ไม่มีความเป็นพิษ และสามารถกำจัดออกจากร่างกายทางไตหรือทางน้ำดีได้ แสดงดังตารางที่ 4 โดยรูปแบบอิมัลชันได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นอย่างมาก โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของอิมัลชัน แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 Comparison of lipid drug delivery systems that have been interested in developing a oral drug delivery system

| Drug delivery systems | Advantages | Disadvantages | References |
|-----------------------|---|--|---|
| Microemulsion | <ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นระบบที่มีเสถียรภาพดีทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic stable) 2. มีวิธีการเตรียมง่าย สามารถเกิดได้เองโดยไม่ต้องอาศัยแรงมาก หรือความร้อนในการเตรียมและมีความคงตัวได้นาน 3. ทำหน้าที่เป็น supersolvent ของยาช่วยให้ตัวยาออกฤทธิ์ได้เร็ว และสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน เนื่องจากมี microdomains ของความมีขั้วที่ไม่เหมือนกันภายในสารละลายเฟสเดียวกัน 4. มีขนาดของอนุภาคต่ำกว่า 200 นาโนเมตร 5. สามารถปรับปรุงค่าชีวประสิทธิผลของสารละลายที่ไม่ชอบน้ำได้ ปริมาณการใช้ยาลดลงและมีผลข้างเคียงน้อย | <ol style="list-style-type: none"> 1. ความเป็นพิษอาจจะเกิดขึ้นเมื่อใช้สารช่วยลดแรงตึงผิวในปริมาณมาก การระเหยหรือการสูญเสียของสารลดแรงตึงผิวร่วม อาจมีผลต่อความคงตัวในระยะยาว โดยสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เป็นส่วนประกอบหลักควรจะมีการยอมรับในการใช้ทางเภสัชกรรมและมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatible) | Wang and Zhang, 2013 |
| Liposome | <ol style="list-style-type: none"> 1. สามารถนำส่งยาไปที่ฟาโกไซต์ (phagocyte) ของระบบภูมิคุ้มกันได้ 2. ช่วยเพิ่มชีวประสิทธิผลในการรักษาโดยการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบทางเคมีในส่วนที่เป็นชั้นคูลิพิด (bilayer) และลดความเป็นพิษได้ 3. ปรับปรุงการละลายของสารที่ไม่ชอบน้ำได้ และสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน | <ol style="list-style-type: none"> 1. มีค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงทั้งใช้ organic solvents หรือ synthetic surfactants 2. มีความคงตัวต่ำที่มีค่าความเป็นกรด และไม่มี ความคงตัวของประสิทธิผลการห่อหุ้ม 3. วิธีการเตรียมมีความยุ่งยาก ซับซ้อน เช่นวิธี อัลตราซาวด์ (ultrasound) วิธีปั่นผสมเป็น | Gregoriadis, 2006 ; Takahashi et al., 2007; |

ตารางที่ 4 Comparison of lipid drug delivery systems that have been interested in developing a oral drug delivery system (continued)

| Drug delivery system | Advantages | Disadvantages | References |
|--------------------------|---|---|-------------------------------------|
| Liposome | <ol style="list-style-type: none"> 4. ตัวยาสำคัญสามารถป้องกันการย่อยสลายได้จากการห่อหุ้ม (liposomal encapsulation) 5. ขนาดอนุภาค 200-1000 นาโนเมตร | <p>เนื้อเดียวกันด้วยความดันสูง (high-pressure homogenization) วิธีฉีดด้วยตัวทำละลาย (solvent injection method) เป็นต้น</p> | Patel and Velikov, 2011 |
| Solid lipid nanoparticle | <ol style="list-style-type: none"> 1. สามารถป้องกันตัวยาสำคัญไม่ให้เสื่อมสลายได้ง่ายจากปฏิกิริยาทางเคมีอุณหภูมิห้องหรือร่างกาย 2. สามารถปลดปล่อยยาโดยการออกฤทธิ์เนิ่นและสามารถนำส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาได้ 3. ขนาดอนุภาคระหว่าง 10-1000 นาโนเมตร 4. มีความเป็นพิษต่ำ 5. ปรับปรุงการละลายของสารที่ไม่ชอบน้ำได้ | <ol style="list-style-type: none"> 1. วิธีการเตรียมมีความยุ่งยาก ซับซ้อนมีค่าใช้จ่ายสูง เช่น วิธีปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยความดันสูงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำ (hot or cold high-pressure homogenization) วิธีอิมัลชันด้วยตัวทำละลาย การระเหย (solvent emulsification and evaporation) เป็นต้น 2. มีอัตราการปลดปล่อยตัวยาได้ช้า | Patel and Velikov, 2011 |
| Micelles | <ol style="list-style-type: none"> 1. มีขนาดอนุภาคเล็กน้อยกว่า 10 นาโนเมตร 2. เป็นระบบที่มีเสถียรภาพดีทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic stable) เกิดขึ้นได้เองจาก critical micelle concentration (CMC) และมีความคงตัวในระบบคอลลอยด์ | <ol style="list-style-type: none"> 1. สามารถละลายตัวยาได้ในปริมาณที่จำกัด 2. อาจเกิดผลข้างเคียงได้เนื่องจากใช้สารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่สูง | Boyd, 2008; Patel and Velikov, 2011 |

ตารางที่ 5 Comparison of emulsion drug delivery systems. (Wang and Zhang, 2013)

| Drug Delivery Systems | Properties | | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|------------------|--------------|--|--------------|----------------------------------|-----------|
| | Appearance | Optical Isotropy | Droplet size | Stability | Phase | Preparation | Viscosity |
| Microemulsions | transparent or translucent | isotropic | 20-200 nm | thermodynamically stable, long shelf-life | monophasic | mild conditions | low |
| Macroemulsions | cloudy | anisotropic | >500 nm | thermodynamically unstable, will eventually phase separate | biphasic | require a larger input of energy | high |
| Multiple emulsions | cloudy | anisotropic | um | thermodynamically unstable, will eventually phase separate | bi/triphasic | require a larger input of energy | high |
| Nanoemulsions | transparent or translucent | anisotropic | 20-200 nm | thermodynamically unstable, will eventually phase separate | biphasic | require a larger input of energy | low |
| Polymeric micelles | transparent or translucent | isotropic | <100 nm | thermodynamically stable, long shelf-life | monophasic | mild conditions | low |

3.2 ระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลซิฟายด์ (Self-microemulsifying drug delivery system: SMEDDS)

หลักการของไมโครอิมัลชันถูกกล่าวถึงครั้งแรกโดย Hoar และ Schulman (1943) พบว่า แมคโครอิมัลชันที่คงตัว เมื่อสารช่วยลดแรงตึงผิวที่มีประจุจะเปลี่ยนเป็นสีโปร่งแสงหลังจากที่มีการเติม medium chain length alcohol ซึ่งไมโครอิมัลชันมีความแตกต่างจากอิมัลชัน ตาม The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ได้ให้คำนิยามของอิมัลชันว่าเป็นหยดน้ำมันและ/หรือผลึกของเหลวที่กระจายตัวในของเหลว ไม่กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน (Gutiérrez *et al.*, 2008) แต่อย่างไรก็ตามยังมีความแตกต่างระหว่างนิยามของไมโครอิมัลชันกับนาโนอิมัลชัน โดยนาโนอิมัลชันเป็นอิมัลชันที่มีหยดน้ำมันหรือขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 20-200 นาโนเมตร มีลักษณะโปร่งใสหรือโปร่งแสง ซึ่งมีลักษณะคล้ายไมโครอิมัลชัน ซึ่งต่างจากไมโครอิมัลชันที่มีความคงตัวดีทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic stable) และมีวิธีการเตรียมที่ง่ายโดยไม่ใช้แรงมากหรือความร้อนในการเตรียม ส่วนนาโนอิมัลชันจะไม่มี ความคงตัวที่ดีทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic stable) และต้องใช้พลังงานสูงในการเตรียม โดยระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลซิฟายด์ สามารถบรรจุใส่ในแคปซูลได้โดยตรงหรือทำเป็นแกรนูล ยาเม็ดเคลือบหรือยาเม็ดใต้ (Jannin *et al.*, 2008)

3.3 ส่วนประกอบของสูตรตำรับ

ไมโครอิมัลชันอยู่ในรูปแบบของเหลวที่บรรจุอยู่ในแคปซูลเจลาตินชนิดนิ่ม หรือกึ่งแข็งหรือของแข็งบรรจุในแคปซูลเจลาตินชนิดแข็ง ประกอบด้วยส่วนประกอบ 3 ถึง 5 ส่วน ได้แก่ น้ำมัน น้ำ สารลดแรงตึงผิว ตัวทำละลาย และ/หรือสารลดแรงตึงผิวร่วม และตัวยาสำคัญ โดยตัวยาสามารถละลายได้เพิ่มขึ้นในน้ำมันหรือผสมระหว่างน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว ส่วนประกอบที่สำคัญประกอบด้วย (วิรัชญา ศิลาอ่อน, 2558)

3.3.1 น้ำมัน (oil)

การเลือกเฟสน้ำมันเป็นสิ่งสำคัญไม่เพียงมีผลต่อการเลือกส่วนประกอบอื่น แต่ยังมีผลต่อปริมาณของยาที่ไม่ชอบน้ำในการละลายด้วย ส่งผลต่อการขนส่งยาเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองในลำไส้เล็ก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมจากระบบทางเดินอาหาร ควรเลือกน้ำมันที่มีค่าการละลายสูงที่สุดในการเตรียมสูตรตำรับ ช่วยในการนำยาเข้าสู่ระบบไมโครอิมัลชัน เพิ่มการขนส่งสารที่ไม่ชอบน้ำเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองในลำไส้เล็ก โดยน้ำมันที่มี long hydrocarbon chains หรือน้ำมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น น้ำมันถั่วเหลือง จะมีค่าการละลายของสารที่ไม่ชอบน้ำต่ำ ทำให้เกิดไมโครอิมัลชันได้ยาก น้ำมันที่เป็น medium chain triglycerides, fatty acid esters หรือน้ำมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะทำให้เกิดไมโครอิมัลชันได้ง่าย (Wang and Zhang, 2013) ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีคาร์บอน 6-18 คาร์บอน มีสถานะเป็นของเหลว ความหนืดต่ำ ทำให้ละลายยาได้ดี ช่วยเพิ่มการ

ดูดซึมยาผ่านทางระบบน้ำเหลือง ตัวอย่างกรดไขมัน เช่น Caproic acid, Caprylic acid, Capric acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid และ Linolenic acid เป็นต้น นิยมใช้น้ำมันที่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมันข้าวโพด (Corn oil) น้ำมันมะกอก (Olive oil) น้ำมันถั่วลิสง (Peanut oil) น้ำมันงา (Sesame oil) และ medium chain triglycerides (วาริชญา ศิลาอ่อน, 2558)

3.3.2 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

การเลือกสารลดแรงตึงผิวเป็นสิ่งสำคัญมากสำหรับสูตรตำรับของไมโครอิมัลชัน เนื่องจากมีปริมาณร้อยละ 20 หรือมากกว่าส่วนประกอบอื่น ส่วนมากเป็นกรดไขมันจากพืชที่มีการปรับปรุงโครงสร้าง มีความสามารถดูดซับที่ผิว (surfaces หรือ interfaces) และลดแรงตึงผิว (surface tension) ระหว่างวัฏภาคที่แตกต่างกัน และทำให้วัฏภาคสองวัฏภาคที่ไม่สามารถรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันมารวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันได้ โดยใช้สารลดแรงตึงผิวในระบบปริมาณไม่มาก การเลือกสารลดแรงตึงผิวที่มีค่าความชอบน้ำและน้ำมันที่เหมาะสม โดยแบ่งตามชนิดของไมโครอิมัลชัน ชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water: o/w) ค่าเฮชแอลบี (Hydrophilic-lipophilic balance: HLB) อยู่ระหว่าง 8-18 อาจสังเคราะห์มาจากกรดไขมันอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว ส่วนไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil: w/o) ค่าเฮชแอลบีอยู่ระหว่าง 3-8 และไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous) ส่วนมากนิยมใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุเนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ โดยคำนึงถึงความเป็นพิษทั้งในระยะเฉียบพลันและระยะยาว เนื่องจากต้องเก็บรักษาและใช้เป็นยาในระยะเวลาานาน (Wang and Zhang, 2013) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารลดแรงตึงผิวที่ได้มาจากการปรับปรุงโครงสร้างของน้ำมันละหุ่ง (castor oil) กับพอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol: PEG) ที่มีชื่อทางการค้าว่า Cremophor[®] ซึ่งเป็นที่นิยมใช้มาก มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับโมเลกุลของพอลิเอทิลีนไกลคอลในการเข้าทำปฏิกิริยา นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ยังสามารถลดการขับออกของยาโดยผ่านกลไก P-gp ได้ สารลดแรงตึงผิวสามารถแบ่งประเภทได้ตามประจุของส่วนหัว ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท คือ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactant) สารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุลบและประจุบวก (zwitterionic surfactant) และสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (nonionic surfactant) ส่วนใหญ่ระบบนำส่งยาไมโครอิมัลชันจะใช้สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ หรือสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุลบและประจุบวกเนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ

3.3.3 สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant)

สารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสมสำหรับการให้ยาทางปากที่ใช้กับไมโครอิมัลชันที่เกิดได้เอง มักเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล (Ethanol) กลีเซอรอล (Glycerol) ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol) ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ (Isobutyl alcohol) โพรพิลีนไกลคอล (Propylene glycol) พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol) และทรานสคูทอล พี (Transcutol P) จำนวนคาร์บอนใน alcohol chain อาจมีผลต่อความสามารถในการละลาย เมื่อใช้สารลดแรงตึง

ผิวกับสารลดแรงตึงผิวรวมจะเกิดการลดแรงระหว่างพื้นผิวกับประจุขนาดเล็กที่เกิดขึ้นได้ โดยพื้นผิวที่มีประจุลบจะสามารถสร้างไมโครอิมัลชันได้ดีหลังจากการกระจายตัว ซึ่งความสำคัญของสารลดแรงตึงผิวรวมในการเกิดไมโครอิมัลชัน คือทำปฏิกิริยาเป็นตัวเชื่อม พื้นผิวของสารลดแรงตึงผิวต่อ geometric packing ช่วยเพิ่มการไหลระหว่างพื้นผิวโดยการแทงทะลุฟิล์มของสารลดแรงตึงผิวจนทำให้เกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุลของพื้นผิว (Wang and Zhang, 2013)

3.4 กระบวนการเกิดไมโครอิมัลชัน

3.4.1 ทฤษฎีการเกิดไมโครอิมัลชัน

จากการศึกษาของ Wang และ Zhang (2013) ได้อธิบายทฤษฎีการเกิดไมโครอิมัลชัน ได้ 3 ประเภท คือ interfacial/mixed film theory, solubilization theory และ thermodynamic theory ซึ่ง interfacial/mixed film theory และ solubilization theory สามารถอธิบายการเกิดไมโครอิมัลชันในเชิงคุณภาพ ซึ่งยังมีการอภิปรายผลและมีข้อโต้แย้งกันในหลายรายละเอียด ส่วน thermodynamic theory อธิบายการเกิดไมโครอิมัลชันในเชิงปริมาณได้ โดยปัจจัยของ thermodynamic theory เอื้อต่อการเกิดไมโครอิมัลชันได้ดี Ruckenstein และ Chi (1997) ได้อธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าพลังงานอิสระของไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้นได้เองนั้น ประกอบด้วยพลังงานหลายชนิด ดังสมการที่ 1 ดังนี้

$$\Delta G = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 \quad (1)$$

เมื่อ ΔG คือ พลังงานอิสระที่ผิว (gibbs free energy)

ΔG_1 คือ พลังงานอิสระระหว่างพื้นผิวเนื่องจากการเกิดแรงชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกันกับประจุระหว่างพื้นผิวและการเกิดขึ้นของไฟฟ้าสถิต

ΔG_2 คือ แรงจากปฏิกิริยาระหว่างหยดของเหลว ซึ่งจะแสดงค่าเป็นบวก ถ้าแรงเป็นแรงผลักของ repulsive double layer และเป็นค่าลบเมื่อเกิดจากแรง Van der Waals

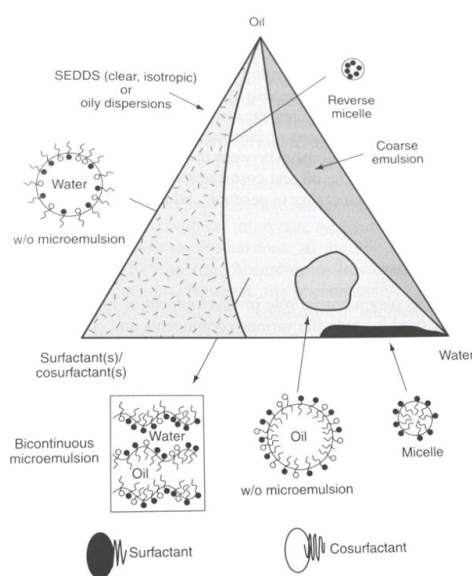
ΔG_3 คือ ค่า enthalpy เนื่องจากการกระจายของหยดของเหลวในวัฏภาคตัวกลาง

การเพิ่มสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมจะช่วยลดปฏิกิริยาเคมีและทำให้พลังงานอิสระมีค่าเป็นลบ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาแบบเกิดได้เอง (spontaneous) ซึ่งการเกิดลักษณะนี้รวมถึงอัตราการเกิดสามารถประเมินได้ด้วยตาเปล่าหรือใช้เครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลง ความขุ่น การสังเกตด้วยตาเปล่าทดลองโดยหยด สูตรตำรับในระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลชันลงในน้ำที่ทราบปริมาตรแน่นอน กวนเล็กน้อย ที่อุณหภูมิห้อง ควรเกิดเป็นอิมัลชันได้เร็ว ขนาดอนุภาคเล็ก สม่ำเสมอ ไม่เกิดการแยกชั้น จึงบันทึกผลว่าเป็นสูตรตำรับที่สามารถเกิดอิมัลชันได้เอง กระบวนการเกิดอิมัลชันแบบเดิม ประกอบด้วยของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (น้ำและน้ำมัน) ถูกผสมและมีความคงตัวด้วยสารก่ออิมัลชัน โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมีส่วนเกี่ยวข้องกับ

การสร้างพื้นผิวของหยดของเหลว นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังสามารถช่วยให้เกิดอิมัลชันได้ง่ายขึ้น โดยไม่ทำให้เกิดการแยกชั้น ลดการเกิดความตึงระหว่างพื้นผิวและพลังงานอิสระ (Gursoy and Benita, 2004) ในขณะที่อิมัลชันที่เกิดได้เองเป็นผลึกของเหลวและมีพลังงานอิสระต่ำมากระหว่างการเกิดอิมัลชันทำให้มีความคงตัวที่ดีทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic) เมื่อเปรียบเทียบกับอิมัลชันปกติ (Craig *et al.*, 1995)

3.4.2 โครงสร้างของไมโครอิมัลซิฟายด์

โครงสร้างของไมโครอิมัลซิฟายด์ แบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water: o/w) ชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil: w/o) และชนิดต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous) ซึ่งเป็นไมโครอิมัลชันที่ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นชนิดใด เนื่องจากมีปริมาณของน้ำและน้ำมันใกล้เคียงกัน ทำให้ฟิล์มของสารลดแรงตึงผิวแผ่กระจายต่อเนื่องกันไป จากแผนภาพไดอะแกรมของไมโครอิมัลซิฟายด์ แสดงดังรูปที่ 7 แสดงบริเวณของไมเซลล์ปกติ (normal micelles) ไมเซลล์หัวกลับ (reverse micelles) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o microemulsion) ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w microemulsion) ไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous) เมื่อปราศจากน้ำส่วนผสมระหว่างน้ำมันกับสารลดแรงตึงผิวอยู่ในรูปสารละลายใสเป็นระบบนำส่งยาชนิดที่เกิดอิมัลชันได้เอง มีการจัดเรียงโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวในรูปผลึกเหลว (liquid crystals) (Wang and Zhang, 2013)



รูปที่ 7 A hypothetical ternary phase diagram of microemulsion (Wang and Zhang, 2013)

3.4.3 แผนภาพเฟสไดอะแกรม (phase diagrams)

การศึกษาแผนภาพเฟสไดอะแกรม เป็นวิธีการศึกษาให้ได้มาซึ่งส่วนประกอบของไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมและส่งผลต่อชนิดของการเกิดไมโครอิมัลชัน ประกอบด้วย แผนภาพ 4 รูปแบบ ได้แก่ แผนภาพวัฏภาค 4 ภาค (quaternary phase diagrams) แผนภาพวัฏภาคไตรภาค (ternary phase diagrams) แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudoternary phase diagrams) และแผนภาพวัฏภาค 2 ภาค (binary phase diagrams) ส่วนใหญ่นิยมใช้แผนภาพวัฏภาคไตรภาค และแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (Wang and Zhang, 2013) โดยแผนภาพวัฏภาคไตรภาค (ternary phase diagrams) จะเป็นแผนภาพที่ประกอบด้วยสัดส่วนของน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมในหลายอัตราส่วน เพื่อศึกษาลักษณะการเกิดไมโครอิมัลชันที่ดี ซึ่งการอ่านผลการศึกษาของพื้นที่ที่เกิดไมโครอิมัลชันในแผนภาพวัฏภาคไตรภาค จะศึกษาจากสัดส่วนของน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เกิดไมโครอิมัลชันที่ใส เกิดได้อย่างรวดเร็ว น้อยกว่า 1 นาที ไม่ตกตะกอนซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของสูตรตำรับ

3.4.4 ค่าเอชแอลบี (Hydrophilic-lipophilic balance: HLB)

ค่าเอชแอลบี คือ ค่าที่แสดงสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน ใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการเลือกสารลดแรงตึงผิวของไมโครอิมัลชันได้ โดยสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (nonionic surfactant) และสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุลบและประจุบวก (zwitterionic surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ถูกนำมาใช้ในไมโครอิมัลชันบ่อยครั้งเนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) ใช้สารก่ออิมัลชัน (emulsifiers) ที่มีค่าเอชแอลบี ระหว่าง 3-8 ส่วนไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) ใช้สารก่ออิมัลชันที่มีค่าเอชแอลบี ระหว่าง 8-18 (Wang and Zhang, 2013; Kalepu *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2014) ตัวเลือกของสารก่ออิมัลชันจะพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของค่าเอชแอลบีในสูตรตำรับ บางกรณีก็นำสารลดแรงตึงผิวมาผสมกันในการเตรียมสูตรตำรับไมโครอิมัลชัน ค่าเอชแอลบีของสารช่วยในสูตรตำรับไมโครอิมัลชันบางชนิดแสดงดังตารางที่ 6 (Haus, 2007; Wang and Zhang, 2013)

ตารางที่ 6 HLB values of each excipient in microemulsion formulation

| Compounds (commercial name) | HLB |
|-----------------------------------|-----|
| Corn oil | 8-9 |
| Olive oil | 7-8 |
| Soybean oil | 6 |
| Labrafac PG (PG dicaprylocaprate) | 2 |
| Labrafac CC (Caprylic/capric TG) | 1 |

ตารางที่ 6 HLB values of each excipient in microemulsion formulation (Continued)

| Compounds (commercial name) | HLB |
|---|------|
| Capryol 90 (PG monolaurate) | 6 |
| Cremophor EL (polyoxyl 35 castor oil) | 13 |
| Cremophor RH 40 (polyoxyl 40 hydrogenated castor oil) | 12.5 |
| Labrasol (polyoxyl glycerides) | 14 |
| PEG 400 (polyethylene glycol 400) | 11 |

3.4.5 กระบวนการเกิดเซลล์ไมโครอิมัลชันในกระบวนทางเดินอาหาร

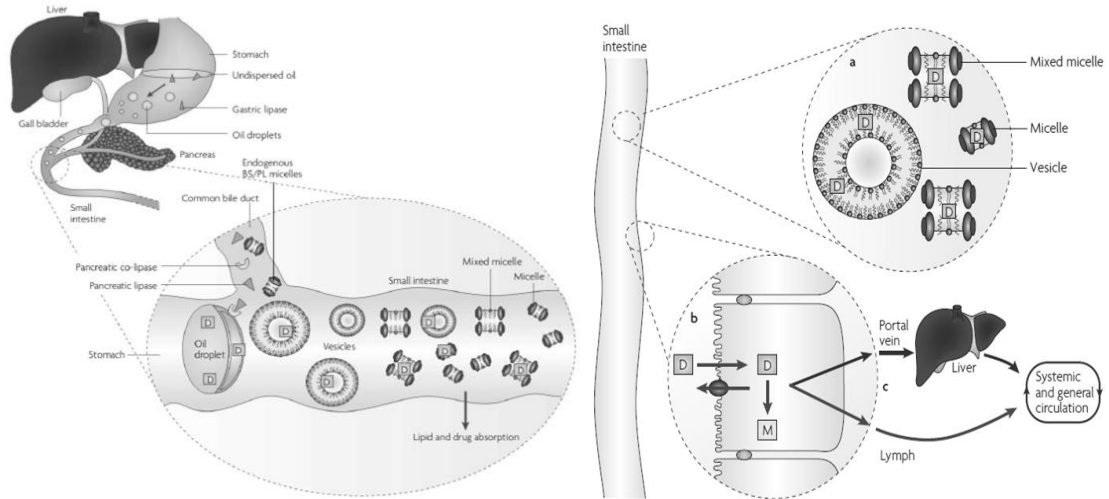
จากรูปที่ 8 แสดงการรับประทานยาสูตรตำรับเซลล์ไมโครอิมัลชันไฟยด์ เริ่มจากภายในปากอาจเกิดการเชื่อมกัน (bridging) หรือการทำลายการจับกลุ่มของหยดน้ำมันอิมัลชันเข้าไปในกระเพาะอาหาร เอนไซม์ไลเปสจะหลั่งออกมาเพื่อย่อยไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ให้เป็นไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และกรดไขมัน (fatty acid) เมื่อไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันเคลื่อนที่สู่ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) เกิดแรงบีบตัวเบา ๆ ของลำไส้เล็ก น้ำดีและของเหลวจากตับอ่อนจะหลั่งออกมาเพื่อย่อยไขมันให้เกิดเป็นอิมัลชันหยาบ โดยตัวยาที่ละลายน้ำยากจะอยู่ในหยดน้ำมันซึ่งเป็นวิภาคภายใน เมื่อมีฟอสโฟไลปิด (phospholipids) และคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) จับอยู่ที่ผิวหน้าของอิมัลชันหยาบ ทำให้อิมัลชันมีขนาดเล็กลงและมีความคงตัวมากขึ้น ด้วยองค์ประกอบของ ระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลชันไฟยด์สามารถเกิดโครงสร้างได้หลากหลายชนิดในระบบทางเดินอาหารได้อีก เช่นถุงขนาดเล็ก (vesicles) มิกซ์ไมเซลล์ (mixed micelles) และไมเซลล์ (micelles) จากนั้นการย่อยไขมันจะเกิดขึ้นเมื่อเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนหลั่งออกมา โดยย่อยไตรกลีเซอไรด์เป็นโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) และกรดไขมัน ซึ่งยาจะถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในรูปอิสระ โดยกลไกการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือดและระบบน้ำเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 9 (วิรัชภา ศิลาอ่อน, 2558) มีดังนี้

1. ผ่านทางอิพิทีเลียม ที่เรียกว่า Transcellular absorption เนื่องจากระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลชันไฟยด์ เป็นระบบที่มีสารลดแรงตึงผิวในปริมาณมาก ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฟอสโฟไลปิด (phospholipids) ประกอบด้วยที่มีคุณสมบัติชอบไขมัน (lipophilic) มีคุณสมบัติเป็นของไหล (fluidity) มากขึ้น โมเลกุลของยามีขนาดเล็กและคุณสมบัติชอบไขมันจะสามารถแพร่ผ่านเซลล์ได้โดยตรง (passive diffusion)

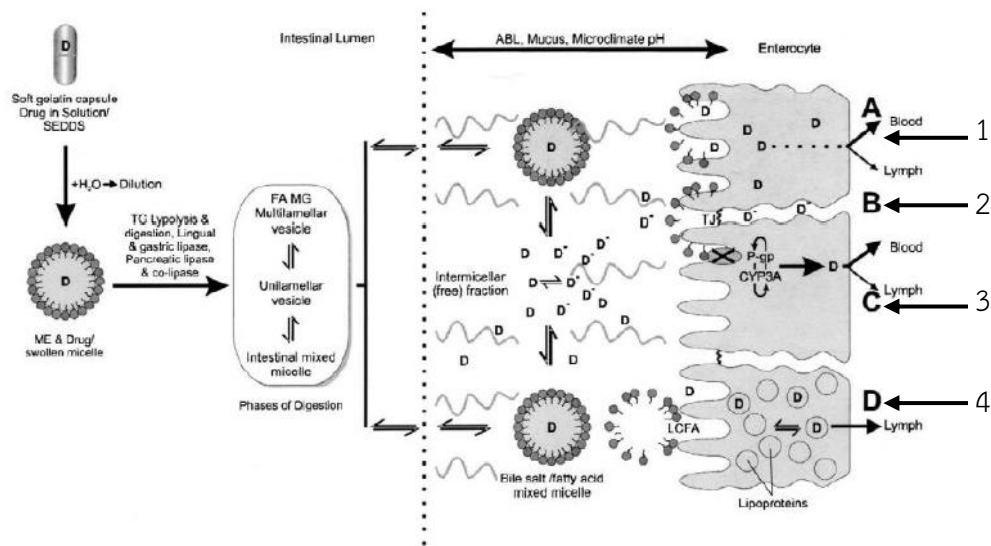
2. ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ ที่เรียกว่า Paracellular transport โดยผ่านทาง tight junction มีการเชื่อมโยงของโปรตีนระหว่างอิพิทีเลียมเซลล์ที่อยู่ติดกัน โดยมีลักษณะเป็นร่างแหหรือช่องว่างขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งยาที่ผ่านทางนี้เป็นยาที่มีประจุหรือเป็น hydrophilic macromolecules

3. ยับยั้งการทำงานของ P-gp และ CYP450 จึงลดการขับยาออกนอกเซลล์ ทำให้ปริมาณยาในเซลล์เพิ่มมากขึ้น

4. กระบวนการสร้างลิโปโปรตีนและโคไลไมครอน ดูดซึมผ่านระบบน้ำเหลือง มีข้อดีคือยาไม่ผ่านกระบวนการ first pass metabolism ที่ตับ เนื่องจากท่อน้ำเหลืองเชื่อมต่อโดยตรงที่ jugular vein จึงทำให้เพิ่มชีวประสิทธิผลของยามากขึ้น



รูปที่ 8 Lipid digestion and lipidic excipients on drug absorption of SEDDS drug delivery system. (Porter *et al.*, 2007)



รูปที่ 9 Schematic diagram of the mechanisms of intestinal drug transport from SEDDS drug delivery system. (O’Driscoll, 2002)

หมายเหตุ: ABL คือ Aqueous boundary layer, D คือ Drug, D⁻ คือ Ionized drug, ME คือ Microemulsion, FA คือ Fatty acid, MG คือ Monoglyceride, LCFA คือ Long chain fatty acid, TG คือ Triglyceride, TJ คือ Tight junction

3.5 การประเมินลักษณะของสูตรตำรับ

3.5.1 ประสิทธิภาพของสูตรตำรับ

ประสิทธิภาพของสูตรตำรับสามารถประเมินได้ด้วยตาเปล่าตามคุณสมบัติที่ได้ อธิบายไว้แบ่งออกได้เป็น 5 ระดับ โดยตำรับที่เกิดลักษณะอิมัลชันตาม grade A และ B สามารถเกิด เป็นอิมัลชันขนาดเล็กได้ในระบบทางเดินอาหาร (Singh *et al.*, 2009) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 Visual assessment of efficiency of self-microemulsification

| Grade | Dispersibility | Time of SMEDDS (min) |
|-------|---|----------------------|
| A | เกิดอิมัลชันอย่างรวดเร็ว มองด้วยตาเปล่ามีลักษณะใส/สีน้ำเงินอ่อน | < 1 |
| B | เกิดอิมัลชันอย่างรวดเร็ว แต่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นลักษณะชัดเจน ใส/สีน้ำเงินขาว | < 2 |
| C | มองเห็นเป็นสีขาวสว่าง คล้ายกับนม | > 3 |
| D | มองเห็นลักษณะหมองคล้ำ ขาวอมเทา มีน้ำมันแยกชั้นเล็กน้อย | > 3 |
| E | เกิดอิมัลชันได้ต่ำที่สุด มีน้ำมันแยกชั้นขนาดใหญ่อยู่บนพื้นผิว | > 3 |

3.6.2 ขนาดของอนุภาค (size) และขนาดของการกระจายตัว (polydispersion index: PDI)

เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการศึกษาประสิทธิภาพของการเกิดอิมัลชันได้เอง เนื่องจากขนาดอนุภาคของยาที่มีผลต่ออัตราการปลดปล่อยตัวยา กล่าวคือยาที่มีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าจะสามารถละลายอยู่ในรูปสารละลายได้เร็วกว่ายาที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ เทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่เทคนิค Photon correlation spectroscopy (PCS) ซึ่งใช้หลักการกระเจิงของแสง (light scattering) ที่ความแรง (intensity) ของแสงที่กระเจิง เพื่อใช้วัดขนาดของอนุภาค ซึ่งสูตรตำรับที่มีประสิทธิภาพควรมีขนาดอนุภาคละเอียดระดับไมโครหรือนาโน เพื่อช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการดูดซึมของยาที่มีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ไม่ดีและดูดซึมได้น้อย

3.6.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยทั่วไปการสังเกตลักษณะของอนุภาคสามารถวัดได้ด้วยเครื่องกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบทรานสมิสชัน (Transmission electron microscopy: TEM) เพื่อศึกษาลักษณะ

ของพื้นที่ผิว การรวมตัวกันของอนุภาค ความกลม เรียบเนียนและขนาดของการกระจายตัวอย่างเห็นได้ชัดเจนขึ้น

3.6.4 ปริมาณยาทั้งหมด

ปริมาณยาทั้งหมดเป็นปัจจัยสำคัญในการประเมินปริมาณยาเมื่อห่อหุ้มลงไปในระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลชันสามารถพิจารณาได้จากความคงตัวของยา การเตรียมสารช่วยในสูตรตำรับ การศึกษาความคงตัวของยาในสภาวะจริงและสภาวะเร่ง โดยคำนวณปริมาณยาทั้งหมดได้จากสมการที่ 2

$$\text{ปริมาณยาทั้งหมด} = \text{ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้} / \text{ปริมาณยาที่ระบุบนฉลาก} * 100 \quad (2)$$

3.6.5 การศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยตัวยาของสูตรตำรับ

กลไกการปลดปล่อยตัวยาจากสูตรตำรับไขมันใช้สารละลายตัวกลางตาม standard pharmacopoeial เช่น น้ำกลั่นหรือ 0.1 N HCl และ USP dissolution apparatus 2 นอกจากนี้ระบบการเกิดอิมัลชันที่ดีของยาที่มีค่าการละลายต่ำ ควรจะมีการแพร่กระจายในสารละลายตัวกลางได้อย่างรวดเร็ว การทดสอบการละลายเป็นวิธีการทดสอบในหลอดทดลอง เพื่อศึกษาผลของยาเมื่อรับประทานเข้าสู่ร่างกายแล้วมีการละลายและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีมาน้อยเพียงใด เป็นวิธีการที่สะดวกและประหยัดกว่าการทดสอบในร่างกายมนุษย์แบบ *in vivo* (การทดสอบภายในร่างกาย) หลักการทดสอบการละลาย คือ นำยาเตรียมไปละลายในของเหลวที่เตรียมขึ้นเพื่อจำลองแบบของเหลวในทางเดินอาหาร (dissolution medium)

โดยมีสมการเชิงอนุพันธ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราในการละลายของยา (dissolution rate) และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการละลายของยา โดยสมการนี้เรียกว่า สมการของ Noyes and Whitney relationship กล่าวว่า การละลายของยาจะเริ่มจากการละลายของอนุภาคที่อยู่ด้านนอก เกิดเป็นชั้นสารละลายอิมัลชันล้อมรอบ เรียกว่า ชั้นหยุดนิ่ง (stagnant layer) หรือชั้นการแพร่ (diffusion layer) จากนั้นโมเลกุลจากชั้นหยุดนิ่งจะแพร่ไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นของยาดำกว่า ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถแสดงดังสมการที่ 3 (มนุพัศ โลหิตนาวิ, 2553)

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DA}{h} \times (C_s - C) \quad (3)$$

โดย $\frac{dC}{dt}$ คือ อัตราเร็วในการละลายของยา (dissolution rate)

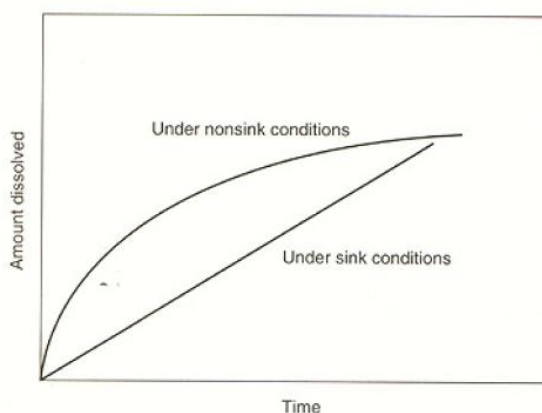
D คือ ค่าคงที่ของการแพร่

A คือ พื้นที่ผิวของอนุภาคยา

h คือ ความหนาของชั้นฟิล์มที่ไม่เคลื่อนที่ (stagnant layer)

C_s คือ ระดับความเข้มข้นของยาหรือเท่ากับความสามารถในการละลายของยา
 C คือ ระดับความเข้มข้นของยาในสารละลายทั้งหมด

ในกรณีที่ความเข้มข้นของสารในสารละลายทั้งหมด (C) ต่ำกว่าค่าการละลายของยา (C_s) มาก เรียกสภาวะเช่นนี้ว่า sink condition เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่ละลายกับเวลา ในสภาวะ sink condition จะได้กราฟเส้นตรง แต่ในสภาวะ non-sink condition จะได้กราฟเส้นโค้งที่มีความชันลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (อัตราเร็วในการละลายลดลง) ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 The relationship between the amounts of dissolved substances with time in the sink condition and non-sink conditions

อัตราการละลายของยาในเครื่องทดสอบการละลาย จัดได้เป็น 3 ระดับ ดังนี้ (มนุพัศ โลहितนารี, 2559)

1. ยาที่ละลายได้เร็วมาก (very rapidly dissolving) คือ ยาในรูปแบบของแข็งชนิดปลดปล่อยทันทีที่ละลายได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 85 หรือมากกว่าภายในเวลา 15 นาที
2. ยาที่ละลายได้เร็ว (rapidly dissolving) คือ ยาในรูปแบบของแข็งชนิดปลดปล่อยทันทีที่ละลายได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 85 หรือมากกว่าภายในเวลา 30 นาที
3. ยาที่ละลายได้ช้า (slowly dissolving) คือ ยาในรูปแบบของแข็งชนิดปลดปล่อยทันทีที่ละลายได้น้อยกว่าร้อยละ 85 หรือมากกว่าภายในเวลา 30 นาที

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาลักษณะและชีวประสิทธิผลของตำรับที่บรรจุเคอเวอซิทินและเรสเวอราทรอล ด้วยระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ เป็นเวลา 24 เดือน

กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

การพัฒนาตำรับตำรับยาที่บรรจุเคอควิทินและเรสเวอราทรอลด้วยระบบนำส่งเซลล์ไมโครอิมัลชันที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่ดีช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายและการดูดซึมของตัวยาที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการละลายของตำรับที่บรรจุเคอควิทินและเรสเวอราทรอลด้วยระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลชัน (Self-microemulsifying formulation containing quercetin and resveratrol: QR-SME)
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสูตรตำรับ QR-SME
3. เพื่อศึกษาผลของสูตรตำรับ QR-SME ต่อเซลล์มะเร็งชนิด AGS (Human adenocarcinoma gastric cells), HT-29 (Human colorectal adenocarcinoma) และ Caco-2 (Human epithelial colorectal adenocarcinoma)
4. เพื่อศึกษาการดูดซึมของสูตรตำรับ QR-SME ในสัตว์ทดลอง

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

เคอซิทิน ได้จากดอกของต้น *Sophora japonica* L. ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98 วิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC) จากบริษัท Shaanxi Guanjie Technology Co.Ltd. ลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลือง

เรสเวอราทรอล ได้จากรากของต้น *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98 วิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากบริษัท Pioneer Herb. ลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วยเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด Human adenocarcinoma gastric (AGS) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงชนิด Human colorectal adenocarcinoma (HT-29) และเซลล์เยื่อบุมะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) จาก American Type Culture Collection (ATCC) (Virginia, USA)

สัตว์ทดลอง ใช้หนูขาวใหญ่ (wistar rat) จากบริษัทสยามโนมูระ จำกัด นำมาเลี้ยงทำการทดสอบที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีระบบการเลี้ยงดูแลสัตว์ทดลองในระบบอนามัยเข้ม (Strict Hygienic Conventional: SHC) อุณหภูมิ 22 ± 3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 55 ± 10 ระยะเวลาให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง สลับกับมืด 12 ชั่วโมง (MOE 0521.11/061)

2. สารเคมี

2.1 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Molecular Probes, Invitrogen)

2.2 ABTS (2,2'-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma-Aldrich)

2.3 Acetic acid (RCI Labscan)

2.4 Acetonitrile HPLC Grade (RCI Labscan)

2.5 Capryol 90 (Gattefosse)

2.6 Corn oil (ร้านขายของชำ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา)

2.7 Cremophor EL (BASF)

2.8 Cremophor RH40 (BASF)

2. สารเคมี (ต่อ)

- 2.9 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Fisher Chemical)
- 2.10 Distilled water
- 2.11 DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) (Sigma-Aldrich)
- 2.12 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
- 2.13 Ethanol (J.T. Baker)
- 2.14 Fetal bovine serum (FBS) (Gibco)
- 2.15 Hydrochloric acid (J.T. Baker)
- 2.16 Iron (III) chloride hexahydrate (ferric chloride) (Chem-Supply)
- 2.17 Iron (II) sulfate heptahydrate (Ajax Finechem)
- 2.18 Labrafac CC (Gattefosse)
- 2.19 Labrafac PG (Gattefosse)
- 2.20 Labrasol (Gattefosse)
- 2.21 Methanol (J.T. Baker)
- 2.22 Methanol HPLC Grade (RCI Labscan)
- 2.23 Minimum Essential Medium
- 2.24 Modified Eagle Medium (MEM) (Gibco)
- 2.25 Palm oil (ร้านขายของชำ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา)
- 2.26 PEG 400 (PC Drug Center Co., Ltd.)
- 2.27 Penicillin(100 IU/mL)-streptomycin(100 mg/mL) (pen-strep) (Gibco)
- 2.28 Phosphate buffer (PBS) (pH 7.4) (Sigma-Aldrich)
- 2.29 Phosphoric acid 85%
- 2.30 Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) (Ajax Finechem)
- 2.31 Sodium acetate (Ajax Finechem)
- 2.32 Sodium bicarbonate (Ajax Finechem)
- 2.33 Sodium lauryl sulfate (Elago enterprises)
- 2.34 Soybean oil (ร้านขายของชำ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา)
- 2.35 TPTZ (2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine) (Fluka)
- 2.36 Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
(Sigma-Aldrich)
- 2.37 Trypsin-EDTA 0.25% (Gibco)

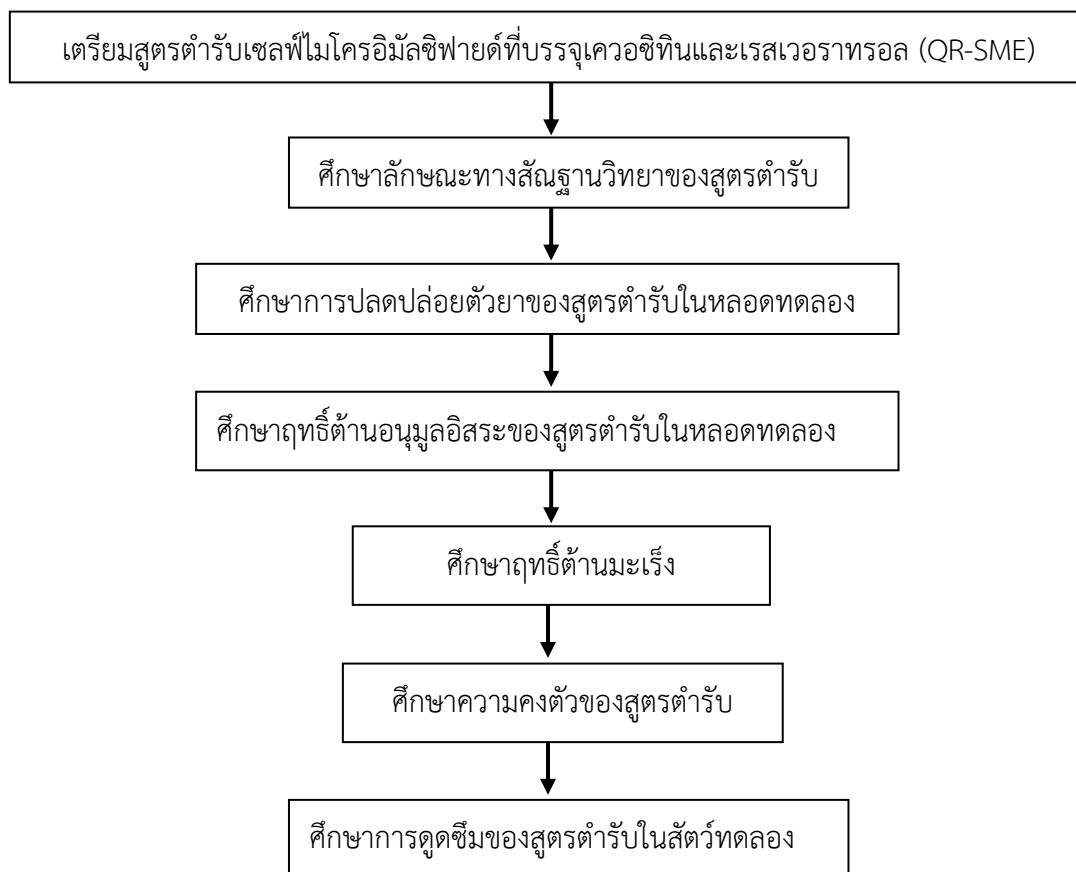
3. อุปกรณ์

- 3.1 กรรไกรผ่าตัดปลายโค้งแหลมมน (operating scissors)
- 3.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (optical microscopes) (Olympus)
- 3.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy: TEM) (JEM-2010)
- 3.4 ขวด Duran 1000 mL (Duran)
- 3.5 ขวดแก้วสีขาปิดสนิท
- 3.6 เครื่อง Biosafety cabinet (Faster)
- 3.7 เครื่องกวนสาร Hotplate stirrer (IKA)
- 3.8 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) (Vortex genie2 g560e)
- 3.9 เครื่องเขย่าสารโดยใช้ความถี่สูง (Sonicator) (Crest)
- 3.10 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) (Jasco)
- 3.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius)
- 3.12 เครื่องทดสอบการละลายของยา (Dissolution) (VK7000)
- 3.13 เครื่องนับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer)
- 3.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) (Kubota)
- 3.15 เครื่องวัดขนาดอนุภาค Zetasizer nano ZS (Malvern)
- 3.16 เครื่องวัดค่า pH (Ohaus)
- 3.17 เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) (BMG)
- 3.18 แคปซูลชนิด Hard gelatin capsules (เบอร์ 00)
- 3.19 แผ่นกริดทองแดง (Grid)
- 3.20 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath shaker) (Heto Lab, Scientific Promotion)
- 3.21 96-well tissue culture plates (SPL lifesciences)
- 3.22 Aluminum foil (Diamond)
- 3.23 Beaker (Duran)
- 3.24 Centrifuge tube แบบนึ่งฆ่าเชื้อ ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 3.25 Culture flask (Corning)
- 3.26 Cuvette DTS0012
- 3.27 Eppendorf pipette 100, 200, 1000 μ L (Eppendorf)
- 3.28 Eppendorf pipette tips (Eppendorf)
- 3.29 Eppendorf tube (Kirgen)
- 3.30 Filter syringe (Minisart)

3. อุปกรณ์ (ต่อ)

- 3.41 Heparin tube (Vacuette)
- 3.42 Magnetic bar
- 3.43 Measuring cylinder (Witeg)
- 3.44 Microplate 96-well (SPL lifesciences)
- 3.45 Needle feeding No. 18
- 3.46 Serological pipette (SPL lifesciences)
- 3.47 Stainless spatula
- 3.48 Syringe (Nipro)
- 3.49 T Flask 25 และ 75 มิลลิลิตร (SPL lifesciences)
- 3.50 Thermometer
- 3.51 Vial 1.5 mL และ 20 mL
- 3.52 Volumetric flask (Duran)
- 3.53 Weighing paper 10x10 (Whatman)

4. ขั้นตอนการวิจัย



5. วิธีการทดลอง

1. การศึกษาความสามารถในการละลาย

ซังสารเคอวอซิทีนและเรสเวอราทรอล (อัตราส่วน 1:1) บรรจุใส่ลงในสารช่วยที่แตกต่างกันในปริมาณ 1 กรัม ซึ่งประกอบด้วย น้ำมัน (Labrafac PG, Labrafac CC, Soybean oil, Corn oil, Palm oil, Capryol 90) สารลดแรงตึงผิว (Cremophor EL และ Cremophor RH40) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (Labrasol และ PEG 400) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) (ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที) ตามลำดับ เก็บสารส่วนที่มีลักษณะใส (supernatants) มากกรองด้วย filter syringe ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC) ด้วยการละลายกับตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ เมทานอล (methanol): อาซิโตไนไตรล์ (acetonitrile): ร้อยละ 0.1 กรดฟอสฟอริกละลายในน้ำ (phosphoric acid) เพื่อคำนวณหาปริมาณของเคอวอซิทีนและเรสเวอราทรอลที่ละลายในสารช่วยต่าง ๆ ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

2. การสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาค (ternary phase diagrams)

ซังสารช่วย ประกอบด้วย น้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ที่ให้ค่าการละลายเคอวอซิทีนและเรสเวอราทรอลสูงที่สุด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร โดยมีอัตราส่วนความเข้มข้นของแต่ละส่วนประกอบ คือ น้ำมันร้อยละ 10-50 สารลดแรงตึงผิวร้อยละ 25-90 และสารลดแรงตึงผิวร่วมร้อยละ 0-25 ให้ได้ในปริมาณ 1 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำ DI (deionized water) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ศึกษาประสิทธิภาพของการเกิดไมโครอิมัลชันด้วยตาเปล่าตามคุณสมบัติที่ได้ โดยตำรับที่เกิดลักษณะอิมัลชันตามเกรด A และ B สามารถเกิดเป็นไมโครอิมัลชันในระบบทางเดินอาหารได้ (Singh *et al.*, 2009) นำไปวัดขนาดอนุภาค (size) และค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค (polydispersion index: Pdl) นำผลการศึกษาที่ได้ไปสร้างแผนภาพไดอะแกรมเพื่อให้ได้สูตรตำรับที่มีคุณสมบัติที่ดีมีส่วนที่เหมาะสมนำไปพัฒนากับระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลชันที่บรรจุเคอวอซิทีนและเรสเวอราทรอลต่อไป ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3. การศึกษาลักษณะการเกิดไมโครอิมัลชันที่ละลายในน้ำ

เลือกใช้อัตราส่วนของสารช่วย ในสูตรตำรับที่เหมาะสม จากการศึกษาการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาค นำมาผสมกับเคอวอซิทีนและเรสเวอราทรอล อย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม สูตรตำรับเซลล์ไมโครอิมัลชันที่พัฒนามาแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องกวนสาร (hotplate stirrer) (ความเร็วใน

การหมุน 250 รอบต่อนาที) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสูตรตำรับมา 1 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ในสัดส่วน 1:20, 1:30, 1:50, 1:100 และ 1:250 ศึกษาประสิทธิภาพการเกิดไมโครอิมัลชัน โดยให้คะแนนจากการประเมินด้วยตาเปล่าจากการทดสอบการสร้างแผนภาพวัฏภาค ไตรภาค โดยตำรับที่เกิดลักษณะอิมัลชันตามเกรด A และ B (Singh *et al.*, 2009) นำไปวัดขนาด และการกระจายตัวของอนุภาค โดยเลือกสูตรตำรับที่มีลักษณะการเกิดไมโครอิมัลชันใส ไม่เกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอน ขนาดอนุภาคที่เล็กและมีการกระจายตัวที่ดี ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

4. การเตรียมสูตรตำรับเซลฟ์ไมโครอิมัลชันที่บรรจุควอซิทินและ เรสเวอราทรอล (QR-SME)

จากการศึกษาการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคของการศึกษาก่อนหน้านี้ทำให้ได้ สูตรตำรับ QR-SME ที่เหมาะสมในการบรรจุควอซิทินและเรสเวอราทรอล ประกอบด้วย Capryol 90; Cremophor EL; Labrasol ในอัตราส่วน 10:70:20 โดยนำสารทั้งสองชนิดเข้าไปในสารช่วยของ สูตรตำรับ QR-SME อย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัม ปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนสาร (ความเร็วในการหมุน 250 รอบต่อนาที) ติดต่อกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ในขวดแก้วสีขาปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำไปทดสอบต่อไป

5. การศึกษาขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของอนุภาค

ซึ่งสูตรตำรับ 1 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยเครื่อง กวนสาร (ความเร็วในการหมุน 250 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วย filter syringe ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำมาวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการ Photon correlation spectroscopy (PCS) ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค Zetasizer Nano ZS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา ในการวัด 1 นาที แต่ละครั้งทำการวัด 10 รอบ ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

6. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสูตรตำรับ

ลักษณะสัณฐานของไมโครอิมัลชันที่เกิดได้เองจากสูตรตำรับ QR-SME โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy: TEM) นำสูตรตำรับ SME มาเจือจางด้วยน้ำ DI ในอัตราส่วน 1 ต่อ 30 นำมาปั่นด้วยเครื่องกวนสาร (ความเร็วในการหมุน 250 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมากรองด้วย filter syringe ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้ว นำตัวอย่างมาหยดลงบนแผ่นกริดทองแดง (grid) ตัวอย่างที่ล้นเกินแผ่นกริดทองแดงจะถูกขับออกด้วย กระดาษกรอง ตั้งแผ่นกริดทองแดงทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

7. การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาของสูตรตำรับ

อ้างอิงจาก United States Pharmacopeia 30 (USP 30) ได้อธิบายถึงวิธีการทดสอบการละลายของยาแบบปลดปล่อยทันที เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ คือ rotating paddle apparatus โดยเตรียมสารละลายตัวกลาง (medium) คือ 0.1 N HCl (simulated gastric fluid: SGF; pH 1.2) ลงในโถแก้วก้นกลม (vessel) ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37.0 ± 0.5 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการหมุนที่ 75 รอบต่อนาที ตัวอย่างที่ศึกษาประกอบด้วย สูตรตำรับ เซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ ที่บรรจุควอซิทีนและเรสเวอราทรอล (QR-SME) สูตรตำรับ เซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ ที่บรรจุควอซิทีน (Q-SME) สูตรตำรับเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ ที่บรรจุเรสเวอราทรอล (R-SME) อย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมสูตรตำรับ บรรจุในแคปซูลชนิดแข็ง (hard gelatin capsule) เบอร์ 0 นำไปซั่งด้วยเครื่องซั่ง 4 ตำแหน่งให้ได้แคปซูลละ 900 มิลลิกรัม ปิดฝาแคปซูลในสนิท และส่วนควอซิทีนและเรสเวอราทรอลที่ถูกซั่งผสมในขนาดตัวยาที่เท่ากัน (QR-nonformulated) บรรจุในแคปซูลชนิดแข็ง (hard gelatin capsule) เบอร์ 0 นำไปซั่งด้วยเครื่องซั่ง 4 ตำแหน่งให้ได้สารประกอบละลายน้ำยากสองชนิด อย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อแคปซูล ปิดฝาแคปซูลในสนิท ดูดสารละลายตัวกลาง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร จากผิวโถแก้วก้นกลม แล้วใส่สารละลายตัวกลางลงไป ปริมาตรเท่าเดิม หลังจากเก็บตัวอย่างออกมาในแต่ละครั้ง เก็บตัวอย่างที่เวลา 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 6 ครั้ง

8. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC)

วิเคราะห์สูตรตำรับ QR-SME ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Jasco, ญี่ปุ่น) โดยใช้คอลัมน์ column C_{18} (CrestPak C_{18} -T-5 column 4.6x 250 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร) ตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ประกอบด้วยเมทานอล (methanol): อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile): ร้อยละ 0.1 กรดฟอสฟอริกละลายน้ำ (phosphoric acid) ในอัตราส่วน 55:10:35 วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่คงที่ คือ ระบบ isocratic elution ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องในปริมาตร 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ 10 นาที และความยาวคลื่นที่ 256 และ 307 นาโนเมตร สำหรับควอซิทีนและเรสเวอราทรอลตามลำดับ

9. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสูตรตำรับ

เนื่องจากอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวที่ไม่เสถียรและสามารถเกิดปฏิกิริยาอว่องไวเข้าจับกับอิเล็กตรอนจากโมเลกุล เป็นผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์เกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งความเสียหายที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระจาก

ปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์ได้และอาจทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน โรคอัลไซเมอร์ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง (Valko *et al.*, 2006; Waris and Ahsan, 2006) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้าถึงการนำสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งสองชนิดนี้มาศึกษาร่วมกันแสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์กันและมีประสิทธิภาพอย่างมากในการต้านมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม (Schlachterman *et al.*, 2008) เนื้องอกในสมองชนิด glioma (Zamin *et al.*, 2009) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ((Trincheri *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2008) โดยถือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถลดผลกระทบที่เกิดจากความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Patel *et al.*, 2010) ซึ่งความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้รับการอธิบายไว้ก่อนหน้านี โดยสารประกอบทั้งสองชนิดมีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพอย่างมากในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะควอซิทินที่มีหมู่ไฮดรอกซิล ตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวน A และตำแหน่งที่ 5 ในวงแหวน heterocyclic กลุ่ม catechol ในวงแหวน B พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ทำให้เกิดการ conjugation กับ 4-oxo ในวงแหวน C (Heijnen *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสูตรตำรับเพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งสองชนิดยังคงมีประสิทธิภาพเมื่อนำมาบรรจุในระบบนำส่งยา เซลล์ไมโครอิมัลชันฟายด์และสามารถเสริมฤทธิ์กันในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการนำสารประกอบชนิดเดียวมาศึกษา โดยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยกันทั้งหมด 3 วิธี ประกอบด้วย

9.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity) (Samarakoon *et al.*, 2011)

นำสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME, R-SME และสูตรตำรับที่ไม่ได้บรรจุควอซิทิน และเรสเวราทรอล (Blank-SME) ละลายใน DMSO เจือจางแบบ 2-fold serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 2.5-0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 12 ความเข้มข้น ใช้สูตรตำรับที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ในเมทานอลที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) โดยใช้ทร็อกซ์ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน รายงานค่าที่วัดได้เป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) อนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการที่ 4 ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH} = \frac{\text{Abs}_{\text{Control}} - (\text{Abs}_{\text{Sample}} - \text{Abs}_{\text{Blank}})}{\text{Abs}_{\text{Control}}} \times 100 \quad (4)$$

เมื่อ $\text{Abs}_{\text{Control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DMSO 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH ในเมทานอล 180 ไมโครลิตร

Abs_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH ในเมทานอล 180 ไมโครลิตร

Abs_{Blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 20 ไมโครลิตร กับเมทานอล 180 ไมโครลิตร

9.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical scavenging activity) (Re *et al.*, 1999)

นำสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME, R-SME และสูตรตำรับ Blank-SME ละลายใน DMSO เจือจางแบบ 2-fold serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 2.5-0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 12 ความเข้มข้น ใช้สูตรตำรับที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ $K_2S_2O_8$ เร่งให้เกิดอนุมูลอิสระ $ABTS^{*+}$ หลังจากนั้นเติมสารละลาย $ABTS^{*+}$ ใน phosphate buffer pH 7.4 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน รายงานค่าที่วัดได้เป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) อนุมูลอิสระ $ABTS^{*+}$ ดังสมการที่ 5 ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ } ABTS^{*+} = \frac{Abs_{Control} - (Abs_{Sample} - Abs_{Blank})}{Abs_{Control}} \times 100 \quad (5)$$

เมื่อ $Abs_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DMSO 20 ไมโครลิตรกับสารละลาย $ABTS^{*+}$ 200 ไมโครลิตร

Abs_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสูตรตำรับ 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย $ABTS^{*+}$ 200 ไมโครลิตร

Abs_{Blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสูตรตำรับ 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

9.3 การประเมินความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน (Ferric reducing antioxidant power: FRAP) (Benzie and Strain, 1996)

นำสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME, R-SME และสูตรตำรับ Blank-SME เจือจางแบบ 2-fold serial dilution ให้ได้จำนวน 12 ความเข้มข้น อยู่ที่ระหว่าง 2.5-0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สูตรตำรับที่เตรียมไว้ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ที่ผสมเตรียมไว้ ปริมาตร 270 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจากเฟอรัสซัลเฟต รายงานผลเป็นค่าความสามารถในการรีดิวซ์โลหะทรานซิชัน (FRAP value) ในรูปแบบมิลลิโมลาร์

ของเฟอร์รัสซัลเฟตที่เกิดขึ้นต่อมิลลิกรัมของสูตรตำรับ (FeSO_4 equivalent: mM FeSO_4 /mg of formulation) โดยคำนวณหาค่ามิลลิโมลาร์ของเฟอร์รัสซัลเฟตที่เกิดขึ้น โดยการแทนค่าการดูดกลืนแสงลงในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน ดังสมการที่ 6 ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

$$y = mx + c \quad (6)$$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสูตรตำรับ คำนวณจาก $\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}$

x คือ ความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิโมลาร์

m และ c คือ ค่าคงที่

10. การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งชนิด AGS, HT-29 และ Caco-2 วัดด้วยวิธี MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME, R-SME และสูตรตำรับ Blank-SME โดยหากเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ สารละลาย MTT จะถูก dehydrogenase ด้วยเอนไซม์ mitochondrial reductase เปลี่ยนเป็นผลึก formazan สีม่วง นำไปวัดด้วยด้วยเครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UC-Vis spectrophotometry) ซึ่งปริมาณของ MTT formazan เป็นสิ่งบ่งบอกโดยตรงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (Stockerta *et al.*, 2012) โดยเซลล์มะเร็งชนิด AGS และ HT-29 เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ผสมร้อยละ 10 ของ fetal bovine serum และร้อยละ 1 ของยาปฏิชีวนะ (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร streptomycin และ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin) ส่วนเซลล์มะเร็งชนิด Caco-2 เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Modified Eagle's Medium (MEM) ที่ผสมร้อยละ 20 ของ fetal bovine serum และ ร้อยละ 1 ของยาปฏิชีวนะ (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร streptomycin และ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin) เซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดถูกนำไปเลี้ยงไว้ใน plastic cell culture flasks ภายใต้สภาวะเดียวกันในตู้บ่มเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก ๆ 2 วัน จนให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นมากกว่าร้อยละ 80 แล้วทำการ trypsinized ด้วยร้อยละ 0.25 w/v สารละลาย trypsin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยย้ายเซลล์มะเร็งชนิด AGS, HT-29 และ Caco-2 มาใส่ใน 96-well tissue culture plates ในปริมาณ 2×10^4 , 8×10^3 และ 5×10^4 cells/well ตามลำดับ เลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ย้ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออก หลังจากนั้นนำสูตรตำรับที่ทำการทดสอบไปเจือจางกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แล้วนำสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรเติมลงในแต่ละ well บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมสารละลาย MTT (ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายใน

สารละลาย PBS) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำเซลล์ไปบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูสูตรตำรับที่ผสม สารละลาย MTT ออกจากเซลล์ จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร กลุ่มควบคุมนำไปบ่ม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด และใช้ร้อยละ 0.1 sodium lauryl sulfate เป็นกลุ่มควบคุมบวก โดยการคำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ จะนำมาคำนวณความสัมพันธ์จากการวัดความยาว คลื่นของกลุ่มควบคุมลบ ซึ่งแสดงถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ร้อยละ 100 ดังแสดงในตารางที่ 8 (Sermkaew *et al.*, 2013) ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 4 ครั้ง

ตารางที่ 8 Group of the cells viability test

| Cells | Formulations | | | | Positive control | Negative control |
|--------|--------------|-------|-------|-----------|----------------------------|---|
| AGS | QR-SME | Q-SME | R-SME | Blank-SME | 0.1% Sodium lauryl sulfate | Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) |
| HT-29 | QR-SME | Q-SME | R-SME | Blank-SME | 0.1% Sodium lauryl sulfate | Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) |
| Caco-2 | QR-SME | Q-SME | R-SME | Blank-SME | 0.1% Sodium lauryl sulfate | Minimum Essential Medium (MEM) |

11. การศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับ

การศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับ อ้างอิงจาก ICH (2003) ในหัวข้อ Q1 A (R2): การศึกษาความคงตัวของสารและผลิตภัณฑ์ใหม่ สูตรตำรับ QR-SME เพื่อประเมินประสิทธิภาพทางกายภาพและเคมีที่ละลายในน้ำ (รูปลักษณะ คุณสมบัติของสูตรตำรับ ขนาดของอนุภาคและขนาดของการกระจายตัว และปริมาณยาทั้งหมด) ตัวอย่างถูกเก็บใน 2 สภาวะ คือ สภาวะปกติ (อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 65 ± 5) และสภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 75 ± 5) ที่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ศึกษาในเดือนที่ 0,

1, 3, 6 และ 12 เดือน โดยตัวอย่างนำไปทดสอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

12. การศึกษาการดูดซึมของสูตรตำรับในสัตว์ทดลอง

ศึกษาในหนูขาวใหญ่ (wistar rat) เพศผู้วัยเจริญพันธุ์ (น้ำหนักตัว 250–300 กรัม) ทดสอบที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ใช้ระบบการเลี้ยงดูแลสัตว์ทดลองในระบบบอนามัยเข้ม (Strict Hygienic Conventional: SHC) ให้หนูขาวใหญ่ อดอาหารข้ามคืนก่อนการศึกษา โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว ให้ยาทางปากเพียงครั้งเดียว คือ สารแขวนลอยละลายน้ำที่ผสมควอดซิทีนกับเรสเวอราทรอล (QR-suspension) สูตรตำรับ QR-SME หรือ สูตรตำรับ Q-SME ที่ป้อนตามด้วยสูตรตำรับ R-SME ในปริมาณ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของสารประกอบแต่ละชนิด เก็บตัวอย่างเลือด ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ด้วยวิธี tail-clip method (Clark *et al.*, 1991) ที่ 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 และ 360 นาที หลังจากให้ยาทางปาก เก็บเลือดใน heparin tube นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงแยกน้ำเลือดที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมาซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ในอัตราส่วน 1:1 ลงไปในตัวอย่างเลือดเพื่อแยกให้โปรตีนตกตะกอน นำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารโดยใช้ความถี่สูง (sonicator) 1 นาที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนเหนือตะกอนมาละลายด้วยตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ ในอัตราส่วน 1:0.5 กรองด้วย filter syringe ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา ได้แก่ ความเข้มข้นของยาสูงสุดในเลือด (C_{max}) เวลาของยาสูงสุดในเลือด (T_{max}) และพื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างระดับยาในเลือดกับเวลา ที่เวลา 0 ถึง 6 ชม. ($AUC_{0-6 h}$)

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

วิเคราะห์ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.) เปรียบเทียบการศึกษาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม วัดโดยใช้สถิติ Mann Whitney test หรือ One-way ANOVA Post Hoc Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

7. สถานที่ทำการวิจัย

คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หน่วยเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาความสามารถในการละลาย

ผลการศึกษาความสามารถในการละลายของเคออสซิทินและเรสเวอราทรอล ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า น้ำมันที่สามารถละลายเคออสซิทินและเรสเวอราทรอลได้ดีที่สุด คือ Capryol 90 สามารถละลายได้ในปริมาณ 152.87 ± 0.67 และ 255.71 ± 9.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ รองลงมา คือ Labrafac PG ละลายเคออสซิทินและเรสเวอราทรอลได้ปริมาณ 11.72 ± 0.08 และ 17.91 ± 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Labrafac CC (13.41 ± 0.44 และ 15.29 ± 0.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), Palm oil (1.52 ± 0.11 และ 3.96 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), Soyabean oil (1.37 ± 0.07 และ 1.84 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Corn oil (1.39 ± 0.04 และ 1.75 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

สารลดแรงตึงผิวที่สามารถละลายเคออสซิทินและเรสเวอราทรอลได้ดีที่สุด คือ Cremophor RH40 สามารถละลายได้ในปริมาณ 1370.79 ± 15.42 และ 1507.74 ± 75.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ Cremophor EL ละลายได้ในปริมาณ 1324.60 ± 40.13 และ 1265.35 ± 30.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารลดแรงตึงผิวร่วมที่สามารถละลายเคออสซิทินและเรสเวอราทรอลได้ดีที่สุด คือ PEG 400 สามารถละลายได้ปริมาณ 1616.65 ± 30.32 และ 1623.32 ± 36.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Labrasol ปริมาณ 1534.02 ± 62.62 และ 1536.69 ± 14.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เคออสซิทินและเรสเวอราทรอลสามารถละลายในน้ำได้น้อย ในปริมาณ 0.98 ± 0.01 และ 0.24 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าสารประกอบทั้งสองชนิดมีความสามารถละลายใน Capryol 90, Cremophor RH40, Cremophor EL, PEG 400 และ Labrasol ได้ดีกว่าน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 9 The solubility of quercetin in combination with resveratrol in various vehicles, Mean±SD. (n=3)

| Vehicles | Quercetin solubility (µg/ml) | Resveratrol solubility (µg/ml) |
|----------------|------------------------------|--------------------------------|
| Corn oil | 1.39±0.04 | 1.75±0.01 |
| Soyabean oil | 1.37±0.07 | 1.84±0.02 |
| Plam oil | 1.52±0.11 | 3.96±0.01 |
| Capryol 90 | 152.87±0.67 [*] | 255.71±9.28 [*] |
| Labrafac PG | 11.72±0.08 | 17.91±0.12 |
| Labrafac CC | 13.41±0.44 | 15.29±0.24 |
| Cremophor EL | 1324.60±40.13 [*] | 1265.35±30.72 [*] |
| Cremophor RH40 | 1370.79±15.42 [*] | 1507.74±75.40 [*] |
| Labrasol | 1534.02±62.62 [*] | 1536.69±14.87 [*] |
| PEG 400 | 1616.65±30.32 [*] | 1623.32±36.16 [*] |
| Water | 0.98±0.01 | 0.24±0.01 |

* $p < 0.05$, compared to water

2. การสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาค

จากการศึกษาความสามารถในการละลายของสารช่วยที่ดีที่สุด ประกอบด้วยน้ำมัน คือ Capryol 90 สารลดแรงตึงผิว คือ Cremophor RH40 รองลงมาคือ Cremophor EL สารลดแรงตึงผิวร่วม คือ PEG 400 รองลงมาคือ Labrasol จึงนำมาศึกษาแผนภาพวัฏภาคไตรภาค โดยแบ่งได้ 4 สูตรตำรับ คือ สูตรที่ 1 ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor EL และ Labrasol สูตรที่ 2 ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor EL และ PEG 400 สูตรที่ 3 ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor RH40 และ Labrasol และสูตรที่ 4 ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor RH40 และ PEG 400 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10-13 ในอัตราส่วนความเข้มข้นของแต่ละส่วนประกอบ คือ น้ำมันร้อยละ 10-15 สารลดแรงตึงผิวร้อยละ 60-90 และสารลดแรงตึงผิวร่วมร้อยละ 0-25 พบว่า สัดส่วนที่เกิดไมโครอิมัลชันเกรด A ดังแสดงในรูปที่ 11 และแสดงพื้นที่สีดำจากสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคดังแสดงในรูปที่ 12

ตารางที่ 10 Ratio, particle size and polydispersity index (PDI) of formulation A with in ternary phase diagrams, Mean±SD. (n=3)

| Formulations | Capryol 90 (%) | Cremophor EL (%) | Labrasol (%) | Grade | Size (nm) | PdI | % Intensity |
|--------------|----------------|------------------|--------------|-------|------------|------------|-------------|
| F1 A | 10 | 90 | 0 | A | 14.93±0.01 | 0.166±0.02 | 98.3±0.02 |
| F2 A | 10 | 85 | 5 | A | 14.69±0.03 | 0.112±0.01 | 100±0.00 |
| F3 A | 10 | 80 | 10 | A | 14.14±0.02 | 0.100±0.01 | 100±0.00 |
| F4 A | 10 | 75 | 15 | A | 14.33±0.04 | 0.103±0.03 | 100±0.00 |
| F5 A | 10 | 70 | 20 | A | 13.97±0.02 | 0.081±0.01 | 100±0.00 |
| F6 A | 10 | 65 | 25 | A | 18.10±0.01 | 0.206±0.04 | 97.6±0.01 |
| F7 A | 15 | 85 | 0 | B | 15.61±0.03 | 0.108±0.01 | 100±0.00 |
| F8 A | 15 | 80 | 5 | A | 16.81±0.03 | 0.166±0.02 | 98.3±0.01 |
| F9 A | 15 | 75 | 10 | A | 15.16±0.01 | 0.082±0.02 | 100±0.00 |
| F10 A | 15 | 70 | 15 | A | 15.12±0.02 | 0.067±0.03 | 100±0.00 |
| F11 A | 15 | 65 | 20 | A | 16.36±0.05 | 0.096±0.01 | 100±0.00 |
| F12 A | 15 | 60 | 25 | A | 16.87±0.01 | 0.107±0.02 | 100±0.00 |

ตารางที่ 11 Ratio, particle size and polydispersity index (PDI) of formulation B with in ternary phase diagrams, Mean±SD. (n=3)

| Formulations | Capryol 90 (%) | Cremophor EL (%) | PEG 400 (%) | Grade | Size (nm) | PDI | % Intensity |
|--------------|----------------|------------------|-------------|-------|------------|------------|-------------|
| F1 B | 10 | 90 | 0 | A | 13.31±0.02 | 0.055±0.01 | 100±0.00 |
| F2 B | 10 | 85 | 5 | A | 15.32±0.01 | 0.143±0.02 | 100±0.00 |
| F3 B | 10 | 80 | 10 | A | 14.95±0.01 | 0.107±0.01 | 100±0.00 |
| F4 B | 10 | 75 | 15 | A | 14.28±0.01 | 0.060±0.01 | 100±0.00 |
| F5 B | 10 | 70 | 20 | A | 15.43±0.03 | 0.104±0.03 | 100±0.00 |
| F6 B | 10 | 65 | 25 | A | 15.74±0.02 | 0.095±0.02 | 100±0.00 |
| F7 B | 15 | 85 | 0 | B | 16.32±0.02 | 0.087±0.01 | 100±0.00 |
| F8 B | 15 | 80 | 5 | B | ND. | ND. | ND. |
| F9 B | 15 | 75 | 10 | B | ND. | ND. | ND. |
| F10 B | 15 | 70 | 15 | B | ND. | ND. | ND. |
| F11 B | 15 | 65 | 20 | B | ND. | ND. | ND. |
| F12 B | 15 | 60 | 25 | B | 19.69±0.02 | 0.217±0.01 | 95.0±0.01 |

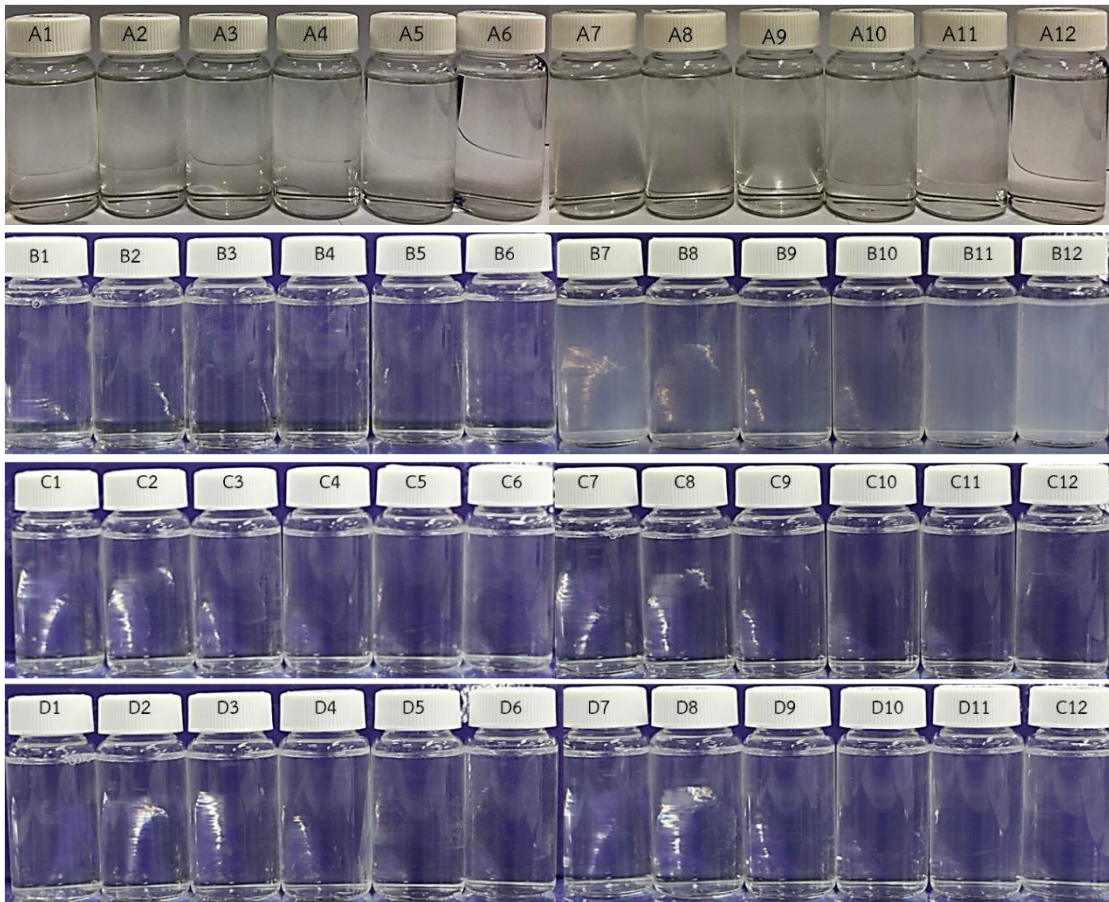
ND.=Not detected.

ตารางที่ 12 Ratio, particle size and polydispersity index (PDI) of formulation C with in ternary phase diagrams, Mean±SD. (n=3)

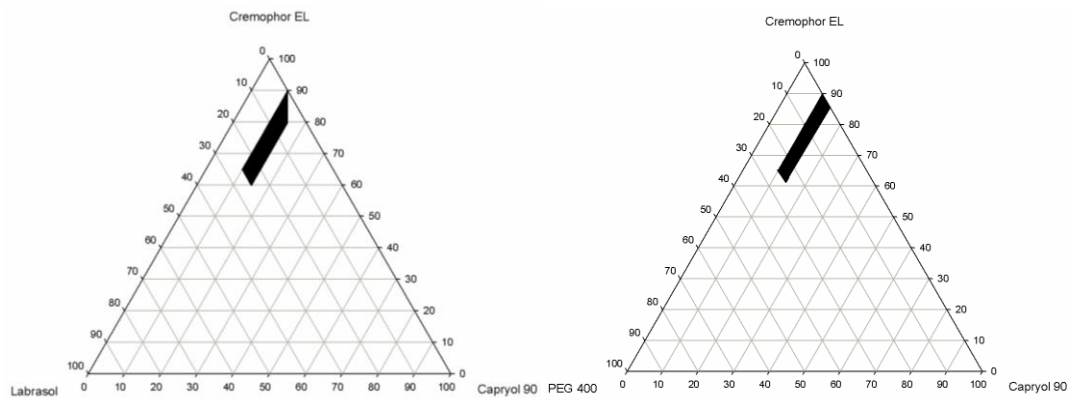
| Formulations | Capryol 90 (%) | Cremophor RH40 (%) | Labrasol (%) | Grade | Size (nm) | PdI | % Intensity |
|--------------|----------------|--------------------|--------------|-------|------------|------------|-------------|
| F1 C | 10 | 90 | 0 | A | 13.83±0.01 | 0.056±0.03 | 100±0.00 |
| F2 C | 10 | 85 | 5 | A | 13.43±0.02 | 0.056±0.02 | 100±0.00 |
| F3 C | 10 | 80 | 10 | A | 13.80±0.02 | 0.087±0.01 | 100±0.00 |
| F4 C | 10 | 75 | 15 | A | 18.44±0.01 | 0.206±0.01 | 98.1±0.01 |
| F5 C | 10 | 70 | 20 | A | 14.43±0.01 | 0.180±0.02 | 97.3±0.02 |
| F6 C | 10 | 65 | 25 | A | 14.50±0.03 | 0.161±0.01 | 98.6±0.01 |
| F7 C | 15 | 85 | 0 | A | 21.03±0.01 | 0.208±0.01 | 98.0±0.03 |
| F8 C | 15 | 80 | 5 | A | 14.81±0.02 | 0.106±0.02 | 100±0.00 |
| F9 C | 15 | 75 | 10 | A | 13.57±0.01 | 0.054±0.01 | 100±0.00 |
| F10 C | 15 | 70 | 15 | A | 13.50±0.02 | 0.063±0.01 | 100±0.00 |
| F11 C | 15 | 65 | 20 | A | 14.03±0.01 | 0.085±0.02 | 100±0.00 |
| F12 C | 15 | 60 | 25 | A | 14.32±0.02 | 0.111±0.01 | 100±0.00 |

ตารางที่ 13 Ratio, particle size and polydispersity index (PDI) of formulation D with in ternary phase diagrams, Mean±SD. (n=3)

| Formulations | Capryol 90 (%) | Cremophor RH40 (%) | PEG 400 (%) | Grade | Size (nm) | PdI | % Intensity |
|--------------|----------------|--------------------|-------------|-------|------------|------------|-------------|
| F1 D | 10 | 90 | 0 | A | 15.74±0.01 | 0.182±0.02 | 97.0±0.02 |
| F2 D | 10 | 85 | 5 | A | 14.63±0.03 | 0.096±0.01 | 100±0.00 |
| F3 D | 10 | 80 | 10 | A | 18.29±0.02 | 0.185±0.02 | 99.0±0.01 |
| F4 D | 10 | 75 | 15 | A | 16.09±0.01 | 0.121±0.01 | 100±0.00 |
| F5 D | 10 | 70 | 20 | A | 15.83±0.01 | 0.112±0.01 | 100±0.00 |
| F6 D | 10 | 65 | 25 | A | 15.47±0.01 | 0.080±0.01 | 100±0.00 |
| F7 D | 15 | 85 | 0 | A | 17.28±0.02 | 0.198±0.03 | 96.4±0.01 |
| F8 D | 15 | 80 | 5 | A | 15.67±0.02 | 0.125±0.02 | 100±0.00 |
| F9 D | 15 | 75 | 10 | A | 15.34±0.03 | 0.107±0.02 | 100±0.00 |
| F10 D | 15 | 70 | 15 | A | 15.57±0.01 | 0.091±0.01 | 100±0.00 |
| F11 D | 15 | 65 | 20 | A | 27.98±0.01 | 0.196±0.01 | 100±0.00 |
| F12 D | 15 | 60 | 25 | A | 17.73±0.02 | 0.175±0.04 | 97.3±0.02 |

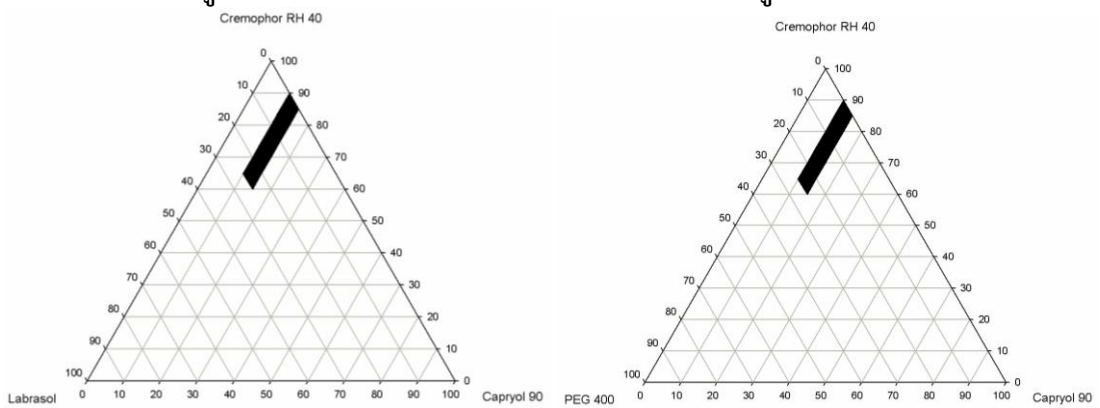


รูปที่ 11 Microemulsion characteristics of formulation A, B, C and D for phase diagram screening (Formulation A included: Capryol 90, Cremophor EL and Labrasol; Formulation B included: Capryol 90, Cremophor EL and PEG 400; Formulation C included: Capryol 90, Cremophor RH40 and Labrasol and Formulation D included: Capryol 90, Cremophor RH40 and PEG 400)



รูปที่ 12A

รูปที่ 12B



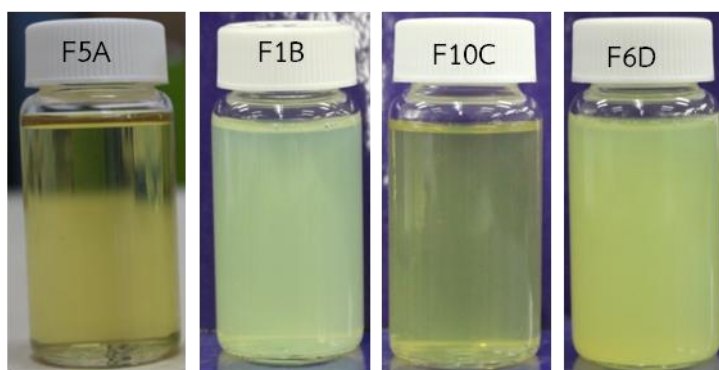
รูปที่ 12C

รูปที่ 12D

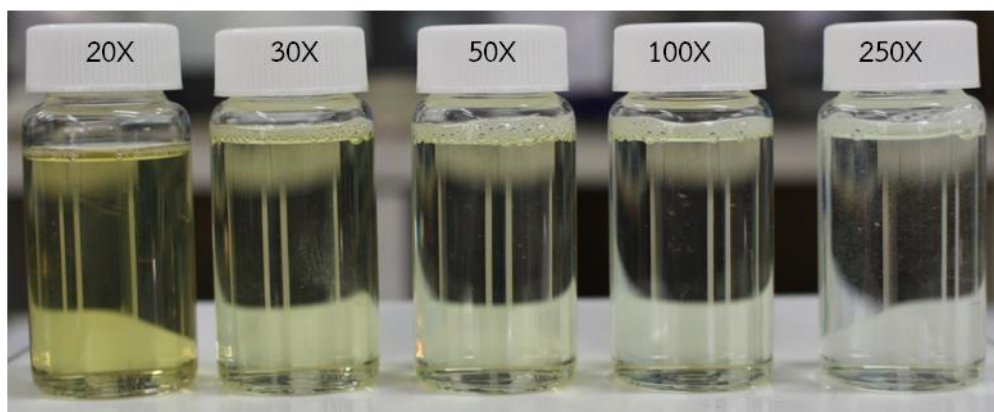
รูปที่ 12 Ternary phase diagrams composed of various oil, surfactant and co-surfactant of formulation A, B, C and D (Formulation A included: Capryol 90, Cremophor EL and Labrasol; Formulation B included: Capryol 90, Cremophor EL and PEG 400; Formulation C included: Capryol 90, Cremophor RH40 and Labrasol and Formulation D included: Capryol 90, Cremophor RH40 and PEG 400)

3. การศึกษาลักษณะการเกิดไมโครอิมัลชัน

จากการศึกษาการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคของสูตรตำรับทั้ง 4 สูตร นำสัดส่วนของแต่ละสูตรตำรับที่เหมาะสมที่สุด โดยพิจารณาจากขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และการประเมินลักษณะการเกิดไมโครอิมัลชันด้วยตาเปล่า ดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่า สูตรตำรับที่เหมาะสมที่สุด คือ F5A สามารถบรรจุสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดคือ เรสเวอราทรอลและ เควอซิทินได้ในปริมาณอย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมสูตรตำรับ ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor EL และ Labrasol ในอัตราส่วน 10:70:20 และนำไปเจือจางด้วยน้ำ DI ในความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 14 โดยสัดส่วนดังกล่าวสามารถเกิดไมโครอิมัลชันอย่างรวดเร็ว ในเวลาน้อยกว่า 1 นาที และมีลักษณะใส ไม่เกิดการตกตะกอน



รูปที่ 13 Characteristics of the differential microemulsion of formulation A, B, C and D



รูปที่ 14 Characteristics of F5A formulation diluted with the different concentration

4. การเตรียมสูตรตำรับเซล์ฟไมโครอิมัลชันฟายด์ที่บรรจุควอซีทินและเรสเวอราทรอล (QR-SME)

จากการศึกษาสามารถสรุปได้สูตรตำรับที่มีคุณสมบัติการเกิดไมโครอิมัลชันที่ดี ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor EL และ Labrasol ในอัตราส่วน 10:70:20 โดยนำมาเตรียมเป็นสูตรตำรับที่บรรจุควอซีทินและเรสเวอราทรอล (QR-SME) พบว่ามีลักษณะของสูตรตำรับเป็นสีน้ำตาลเหลืองเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 15 นำไปเก็บไว้ในขวดแก้วสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำไปทดสอบต่อไป



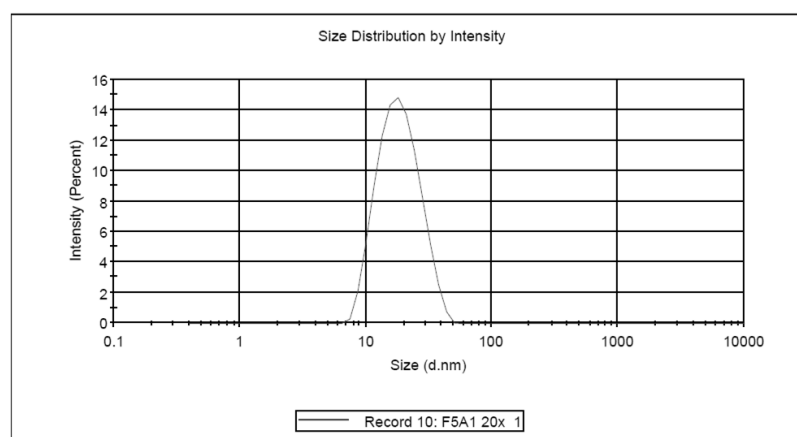
รูปที่ 15 Self-microemulsifying from a quercetin and resveratrol combination (QR-SME)

5. การศึกษาขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค

จากการศึกษาขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค พบว่า ขนาดอนุภาคของสูตรตำรับเท่ากับ 16.91 ± 0.067 นาโนเมตร การกระจายตัวของอนุภาค เท่ากับ 0.145 ± 0.018 ดังแสดงในตารางที่ 14 และร้อยละ intensity เท่ากับ ร้อยละ 100 ดังแสดงในรูปที่ 16

ตารางที่ 14 The particle size and polydispersity index (Pdl) of the QR-SME formulation diluted by DI water (n=3)

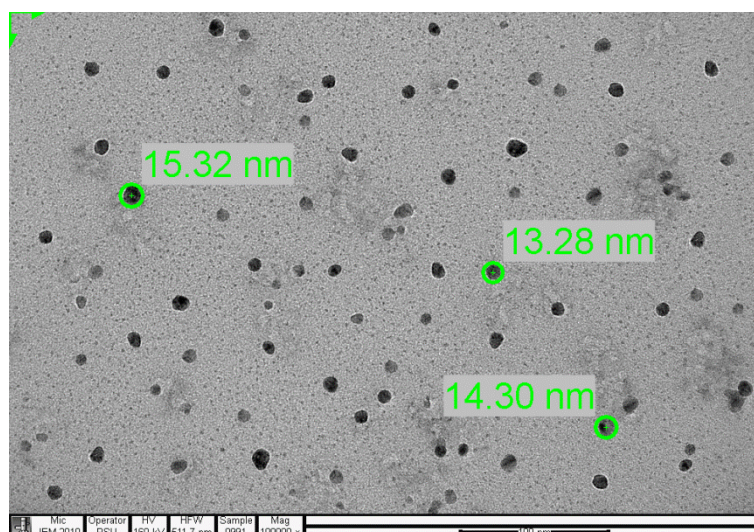
| Formular | Size (nm) | Mean | SD. | Pdl | Mean | SD. | % Intensity |
|------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| F5A 20 (1) | 16.89 | 16.91 | 0.067 | 0.128 | 0.145 | 0.018 | 100 |
| F5A 20 (2) | 16.98 | | | 0.161 | | | 100 |
| F5A 20 (3) | 16.85 | | | 0.134 | | | 100 |



รูปที่ 16 The particle size and polydispersity index (PDI) of the QR-SME formulation of the QR-SME formulation with photon correlation spectroscopy (PCS)

6. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสูตรตำรับ

ลักษณะอนุภาคของสูตรตำรับ QR-SME โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy: TEM) ผลการศึกษาพบว่า อนุภาคมีลักษณะค่อนข้างกลม มีการกระจายตัวที่ดี ไม่เกิดการเกาะกันของอนุภาค และมีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกับการวัดด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค Zetasizer Nano ZS ดังแสดงในรูปที่ 17

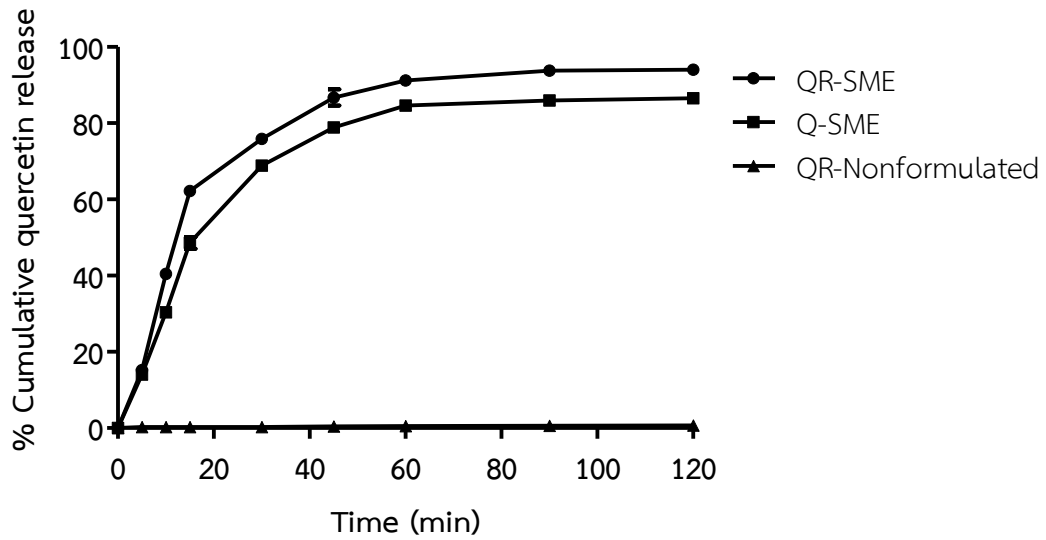


รูปที่ 17 TEM micrographs of the QR-SME formulation ($\times 100000$)

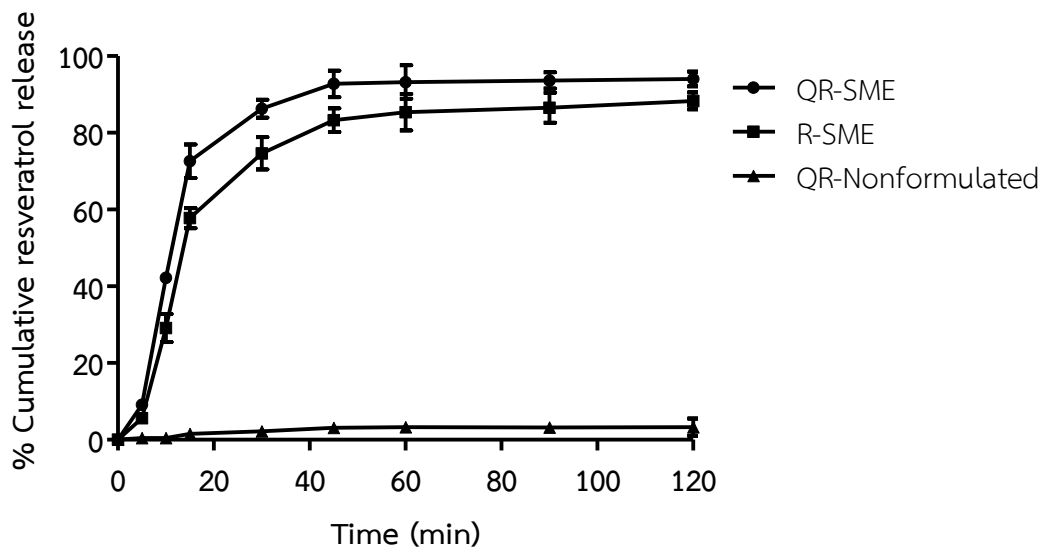
7. การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาของสูตรตำรับ

การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาของสูตรตำรับอ้างอิงจาก United States Pharmacopeia 30 (USP 30) ผลการศึกษาพบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีอัตราการปลดปล่อยเคอซีทินมากกว่าร้อยละ 70 ที่เวลา 30 นาที โดยมีอัตราการปลดปล่อยสะสมสูงสุดร้อยละ 94 ส่วนสูตรตำรับ Q-SME มีการปลดปล่อยเคอซีทินสะสมมากกว่าร้อยละ 70 ที่เวลา 45 นาที มีอัตราการปลดปล่อยสะสมสูงสุดร้อยละ 86 ส่วนเคอซีทินและเรสเวอราทรอลที่ถูกซังผสมในขนาดตัวยาที่เท่ากัน (QR-nonformulated) มีการปลดปล่อยเคอซีทินสะสมได้น้อยกว่าร้อยละ 1 จากเวลาเริ่มต้นจนถึง 120 นาที มีอัตราการปลดปล่อยสะสมสูงสุดร้อยละ 0.71 ดังแสดงในรูปที่ 18 ซึ่งสูตรตำรับ QR-SME และ Q-SME มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ QR-nonformulated และสูตรตำรับ QR-SME ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME

สูตรตำรับ QR-SME มีการปลดปล่อยเรสเวอราทรอลสะสมมากกว่าร้อยละ 80 ที่เวลา 30 นาที โดยมีอัตราการปลดปล่อยสะสมสูงสุดร้อยละ 94 ส่วนสูตรตำรับ R-SME มีการปลดปล่อยเรสเวอราทรอลสะสมมากกว่าร้อยละ 80 ที่เวลา 45 นาที มีอัตราการปลดปล่อยสะสมสูงสุดร้อยละ 88 และสูตรตำรับ QR-nonformulated มีการปลดปล่อยเรสเวอราทรอลสะสมได้น้อยกว่าร้อยละ 3 จากเวลาเริ่มต้น 120 นาที มีอัตราการปลดปล่อยสะสมสูงสุดร้อยละ 2.27 ดังแสดงในรูปที่ 19 ซึ่งสูตรตำรับ QR-SME และ R-SME มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ QR-nonformulated และสูตรตำรับ QR-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ R-SME



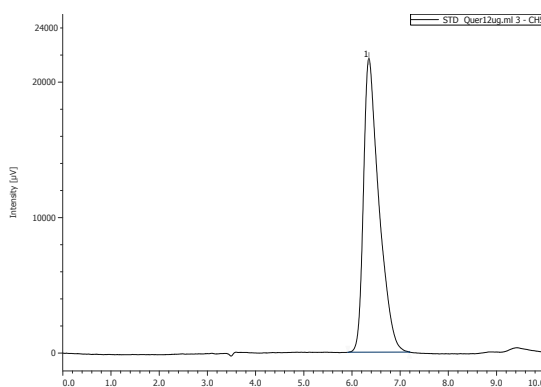
รูปที่ 18 The cumulative release of quercetin from a quercetin/resveratrol combination in the SME formulation (QR-SME), individual quercetin in SME (Q-SME), and an unformulated quercetin/resveratrol combination, in simulated gastric fluid (n=6)



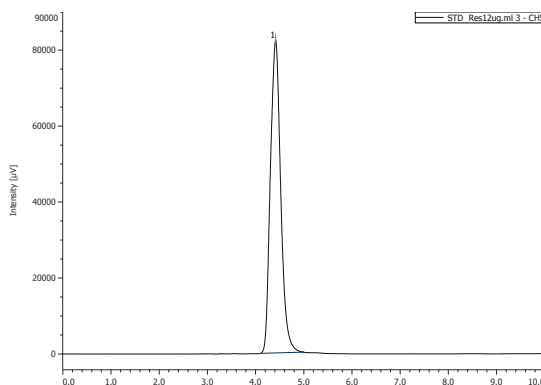
รูปที่ 19 The cumulative release of resveratrol from a quercetin/resveratrol combination in the SME formulation (QR-SME), individual resveratrol in SME (R-SME), and an unformulated quercetin/resveratrol combination, in simulated gastric fluid (n=6)

8. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC)

การศึกษาค้นคว้าหาค่าการละลายของเคอควิซิทินและเรสเวอราทรอล ในสารช่วยกลุ่มน้ำมัน สารลดแรงตึง และสารลดแรงตึงผิวรวม โดยวิเคราะห์หาร้อยละของปริมาณสารทั้งหมดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Jasco, ญี่ปุ่น) โดยใช้ column C₁₈ (CrestPak C₁₈T-5 column 4.6x250 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร) ตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ประกอบด้วย เมทานอล (methanol): อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile): ร้อยละ 0.1 กรดฟอสฟอริก ละลายในน้ำ (phosphoric acid) ในอัตราส่วน 55:10:35 วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยระบบ isocratic elution ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องในปริมาตร 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ 10 นาที และความยาวคลื่นที่ 256 และ 307 นาโนเมตร สำหรับเคอควิซิทินและเรสเวอราทรอลตามลำดับ ให้ผลดังแสดงในรูปที่ 20 และ 21



รูปที่ 20 Chromatogram of quercetin standard at a concentration of 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the wavelength 256 nanometer



รูปที่ 21 Chromatogram of resveratrol standard at a concentration of 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the wavelength 307 nanometer

9. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสูตรตำรับ

9.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)

จากการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ศึกษาที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.002-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสูตรตำรับ รายงานค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ผลการศึกษาพบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด เท่ากับ 1.70±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสูตรตำรับ Q-SME และสูตรตำรับ R-SME มีค่าเท่ากับ 2.50±0.07 และ 6.10±0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยทั้ง 3 สูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสูตรตำรับที่ไม่ได้บรรจุเคอควิซิทินและเรสเวอราทรอล (Blank-SME) มีค่า IC₅₀ มากที่สุด เท่ากับ 56.53 ± 17.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME ค่า IC₅₀ ของสูตรตำรับ QR-SME เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME, R-SME และ Blank-SME คิดเป็น 1.47, 3.59 และ 33.25 เท่าตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามสูตรตำรับทั้ง 4 สูตรตำรับยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่น้อยกว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 Total antioxidant power of QR-SME, Q-SME, R-SME, and Blank-SME in comparison with trolox measured by the DPPH radical scavenging activity assay (n=3)

| Formulations | DPPH radical scavenging properties (IC ₅₀ ; mg/mL) |
|--------------|---|
| Trolox | 0.05±0.00* |
| QR-SME | 1.70±0.04* |
| Q-SME | 2.50±0.07* |
| R-SME | 6.10±0.19* |
| Blank-SME | 56.53±17.02 |

* $p < 0.05$, compared to Blank-SME

9.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical scavenging activity)

จากการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ศึกษาที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.002-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสูตรตำรับ รายงานค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ผลการศึกษาพบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด เท่ากับ 2.95±0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสูตรตำรับ Q-SME และสูตรตำรับ R-SME มีค่าเท่ากับ 4.47±0.01 และ 4.97±0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยทั้ง 3 สูตรตำรับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสูตรตำรับ Blank-SME มีค่า IC₅₀ มากที่สุด เท่ากับ 24.88±4.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME ค่า IC₅₀ ของสูตรตำรับ QR-SME เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME, R-SME และ Blank-SME คิดเป็น 1.52, 1.69 และ 8.43 เท่า ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามสูตรตำรับทั้ง 4 สูตรตำรับยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่น้อยกว่าสารมาตรฐาน Trolox ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 Total antioxidant power of QR-SME, Q-SME, R-SME, and Blank-SME in comparison with trolox measured by the ABTS radical scavenging activity assay (n=3)

| Formulations | ABTS radical scavenging properties (IC ₅₀ ; mg/mL) |
|--------------|---|
| Trolox | 0.72±0.01* |
| QR-SME | 2.95±0.05* |
| Q-SME | 4.47±0.01* |
| R-SME | 4.97±0.06* |
| Blank-SME | 24.88±4.53 |

* $p<0.05$, compared to Blank-SME

9.3 การประเมินความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน (Ferric reducing antioxidant power: FRAP)

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ของสูตรตำรับ QR-SME สูตรตำรับ Q-SME สูตรตำรับ R-SME และสูตรตำรับ Blank-SME โดยรายงานผลเป็นค่าความสามารถในการรีดิวซ์โลหะทรานซิชัน (FRAP value) ในรูปแบบมิลลิโมลาร์ของเฟอร์รัสซัลเฟตที่เกิดขึ้นต่อมิลลิกรัมของสูตรตำรับ (FeSO_4 equivalent: mM FeSO_4 / mg of formulation) ผลการศึกษาพบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกที่ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 5.76 ± 0.23 มิลลิโมลาร์ของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อมิลลิกรัมของสูตรตำรับ อาจเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสารทั้งสองชนิดเมื่อนำมารวมกันในสูตรตำรับ รองลงมาคือสูตรตำรับ Q-SME และสูตรตำรับ R-SME มีค่าเท่ากับ 3.94 ± 0.12 และ 1.34 ± 0.02 มิลลิโมลาร์ของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อมิลลิกรัมของสูตรตำรับ ตามลำดับ ส่วนสูตรตำรับ Blank-SME มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกได้น้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.33 ± 0.02 มิลลิโมลาร์ของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อมิลลิกรัมของสูตรตำรับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปริมาณของเฟอร์รัสซัลเฟตที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสูตรตำรับ 3 สูตร คือ QR-SME, Q-SME และ R-SME ส่วนสูตรตำรับ Blank-SME พบว่า ไม่มีความแปรผันกับความเข้มข้น ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าสารช่วยในสูตรตำรับไม่ส่งผลต่อความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนเฟอร์ริกของสารประกอบทั้ง 2 ชนิด และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ของสูตรตำรับ QR-SME มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกมากกว่าสูตรตำรับ Q-SME, R-SME และ Blank-SME คิดเป็น 1.46, 4.30 และ 17.46 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 Total antioxidant power of QR-SME, Q-SME, and R-SME in comparison with Blank-SME measured by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay (n=3)

| Formulations | FeSO_4 equivalent: mM FeSO_4 / mg of formulation) |
|--------------|---|
| QR-SME | $5.76 \pm 0.23^{* \#}$ |
| Q-SME | $3.94 \pm 0.12^*$ |
| R-SME | $1.34 \pm 0.02^*$ |
| Blank-SME | 0.33 ± 0.02 |

* $p < 0.05$, compared to Blank-SME

$p < 0.05$, compared to Q-SME and R-SME

10. การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด AGS, HT-29 และ Caco-2 หลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง วัดด้วยวิธี MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) ผลการศึกษาพบว่า

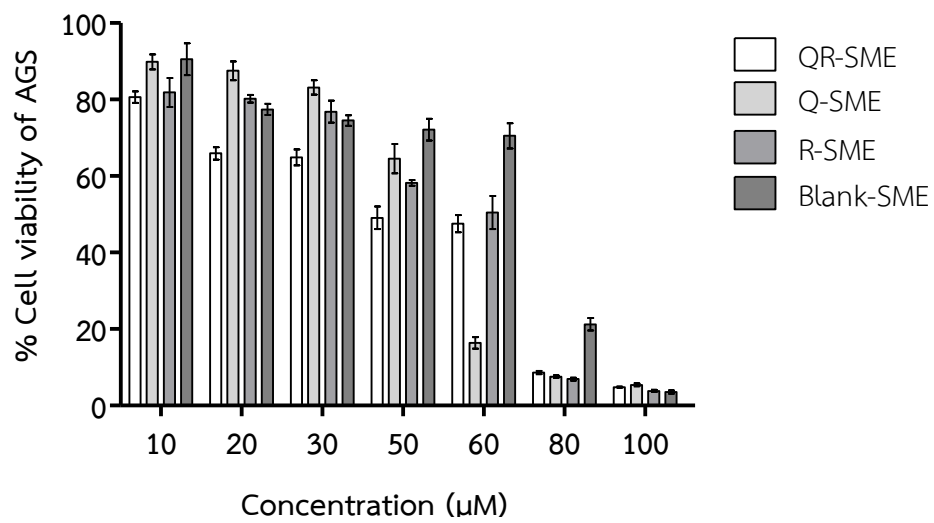
10.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด AGS ดังแสดงในรูปที่ 22 ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ ของสูตรตำรับ QR-SME ในอัตราส่วน 1:1 พบว่า มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 80.65 ± 1.51 , 65.92 ± 1.66 , 64.88 ± 2.08 , 49.07 ± 2.93 , 47.53 ± 2.26 , 8.62 ± 0.38 และ 4.81 ± 0.11 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ Q-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 89.86 ± 1.96 , 87.50 ± 2.46 , 83.15 ± 1.88 , 64.56 ± 3.83 , 16.37 ± 1.53 , 7.56 ± 0.31 และ 5.41 ± 0.35 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ R-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 81.84 ± 3.80 , 80.22 ± 1.01 , 76.83 ± 2.91 , 58.21 ± 0.78 , 50.44 ± 4.34 , 6.92 ± 0.41 และ 43.83 ± 0.29 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ Blank-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 90.53 ± 4.17 , 77.41 ± 1.45 , 74.51 ± 1.36 , 72.13 ± 2.86 , 70.50 ± 3.28 , 21.24 ± 1.64 และ 3.55 ± 0.44 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

ส่วนรายงานค่าความเข้มข้นของสูตรตำรับที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง AGS ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME, R-SME และ Blank-SME คือ 48.21 ± 0.42 , 50.46 ± 2.02 , 59.15 ± 2.37 และ 67.64 ± 1.21 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ สูตรตำรับ QR-SME มีค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุด โดยสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Blank-SME สูตรตำรับ QR-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME และ R-SME สูตรตำรับ Q-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ R-SME



รูปที่ 22 Cytotoxicity of AGS cells treated with different concentrations of QR-SME (each polyphenol at 5:5, 10:10, 15:15, 25:25, 30:30, 40:40, and 50:50 µM) compared to the Q-SME, R-SME (individual compound at 10, 20, 30, 50, 60, 80, and 100 µM), and blank SME; (n=4), duplications.

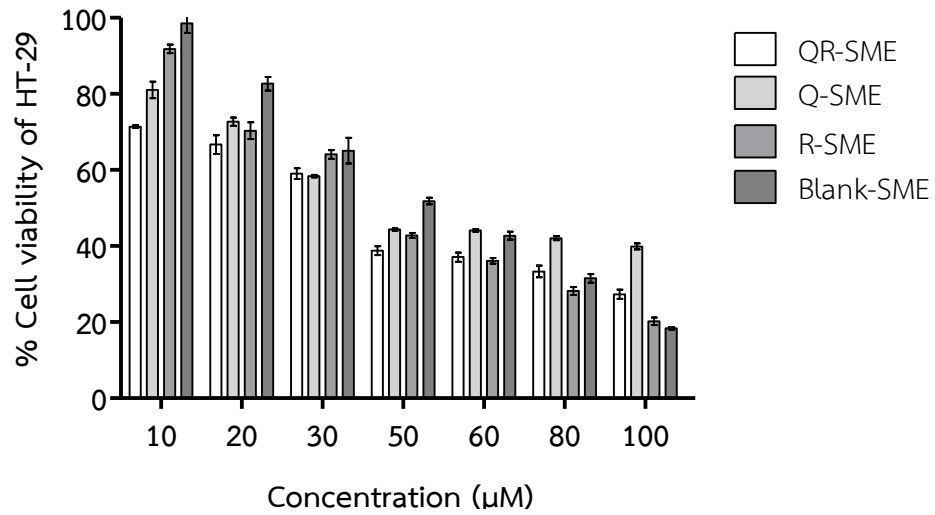
10.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ดังแสดงในรูปที่ 23 ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ ของสูตรตำรับ QR-SME ในอัตราส่วน 1:1 พบว่า มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 71.40 ± 10.36 , 66.67 ± 2.46 , 59.03 ± 1.42 , 38.82 ± 1.16 , 37.10 ± 1.22 , 33.33 ± 1.53 และ 27.31 ± 1.22 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ Q-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 81.01 ± 2.17 , 72.71 ± 1.10 , 58.36 ± 0.35 , 44.34 ± 0.27 , 44.12 ± 0.36 , 42.07 ± 0.54 และ 39.91 ± 0.77 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ R-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 91.83 ± 1.13 , 70.32 ± 2.18 , 64.09 ± 1.15 , 42.80 ± 0.64 , 36.13 ± 0.74 , 28.17 ± 1.03 และ 20.22 ± 1.01 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ Blank-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 98.50 ± 2.50 , 83.01 ± 1.78 , 65.06 ± 3.37 , 51.82 ± 0.88 , 42.74 ± 1.06 , 31.52 ± 1.13 และ 18.38 ± 0.36 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

ส่วนรายงานค่าความเข้มข้นของสูตรตำรับที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HT-29 ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME, R-SME และ Blank-SME คือ 38.89 ± 1.20 , 42.70 ± 0.16 , 43.25 ± 0.61 และ 51.07 ± 0.85 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ สูตรตำรับ QR-SME มีค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุด โดยสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Blank-SME สูตรตำรับ QR-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME และ R-SME สูตรตำรับ Q-SME ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ R-SME



รูปที่ 23 Cytotoxicity of HT-29 cells treated with different concentrations of QR-SME (each polyphenol at 5:5, 10:10, 15:15, 25:25, 30:30, 40:40, and 50:50 µM) compared to the Q-SME, R-SME (individual compound at 10, 20, 30, 50, 60, 80, and 100 µM), and blank SME; (n=4), duplications.

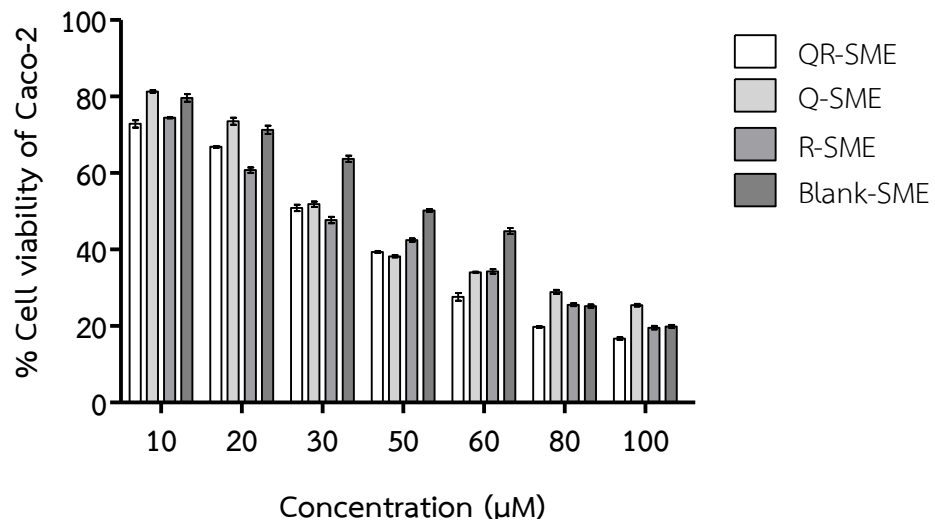
10.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด Caco-2 ดังแสดงในรูปที่ 24 ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ ของสูตรตำรับ QR-SME ในอัตราส่วน 1:1 พบว่า มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 72.85 ± 0.94 , 66.85 ± 0.23 , 50.88 ± 0.82 , 39.34 ± 0.20 , 27.61 ± 1.00 , 19.76 ± 0.20 และ 16.71 ± 0.31 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ Q-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 81.30 ± 0.30 , 73.52 ± 0.90 , 51.85 ± 0.70 , 38.24 ± 0.28 , 34.07 ± 0.14 , 28.89 ± 0.54 และ 25.46 ± 0.30 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ R-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 74.42 ± 0.12 , 60.76 ± 0.71 , 47.74 ± 0.84 , 42.47 ± 0.40 , 34.26 ± 0.58 , 25.58 ± 0.40 และ 19.58 ± 0.47 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

สูตรตำรับ Blank-SME มีค่าเฉลี่ยร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 79.63 ± 1.01 , 71.30 ± 1.06 , 63.70 ± 0.81 , 50.19 ± 0.31 , 44.81 ± 0.81 , 25.19 ± 0.43 และ 19.91 ± 0.34 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

ส่วนรายงานค่าความเข้มข้นของสูตรตำรับที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง Caco-2 ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME R-SME และ Blank-SME คือ 36.17 ± 0.46 , 37.58 ± 0.40 , 34.35 ± 0.98 และ 51.53 ± 0.62 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ สูตรตำรับ R-SME มีค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุด โดยสูตรตำรับ QR-SME Q-SME และ R-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Blank-SME สูตรตำรับ QR-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME และ R-SME สูตรตำรับ Q-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ R-SME



รูปที่ 24 Cytotoxicity of Caco-2 cells treated with different concentrations of QR-SME (each polyphenol at 5:5, 10:10, 15:15, 25:25, 30:30, 40:40, and 50:50 µM) compared to the Q-SME, R-SME (individual compound at 10, 20, 30, 50, 60, 80, and 100 µM), and blank SME; (n=4), duplications.

11. การศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับ

จากการศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับจาก ICH (2003) ในหัวข้อ Q1 A (R2): การศึกษาความคงตัวของสารและผลิตภัณฑ์ใหม่ของสูตรตำรับที่บรรจุแควอซิทีนและเรสเวอราทรอล ในระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลชันไฟยัด 2 สภาวะคือ สภาวะปกติ (30 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 65 ± 5) และสภาวะเร่ง (45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 75 ± 5) ทำการศึกษาในเดือนที่ 0, 1, 3, 6 และ 12 เดือน ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่า ความคงตัวทางกายภาพ มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง คุณสมบัติของสูตรตำรับในเกรด A สามารถเกิดอิมัลชันอย่างรวดเร็วในเวลาน้อยกว่า 1 นาที มองด้วยตาเปล่า มีลักษณะใส เมื่อเก็บทั้ง 2 สภาวะ เป็นระยะเวลา 12 เดือน ศึกษาขนาดอนุภาคและการกระจายตัว พบว่า มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 20 นาโนเมตร การกระจายตัวของอนุภาค น้อยกว่า 0.2 ส่วนความคงตั้งทางเคมี คือ ศึกษาปริมาณยาทั้งหมด พบว่า ที่ 0 เดือน มีปริมาณเรสเวอราทรอลและแควอซิทีนคิดเป็นร้อยละของปริมาณยาทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 104.48 ± 0.40 และ 105.22 ± 0.15 ตามลำดับ เมื่อเก็บสูตรตำรับเป็นเวลาผ่านไป 12 เดือน ทั้งในสภาวะจริงมีปริมาณเรสเวอราทรอลและแควอซิทีนคิดเป็นร้อยละของปริมาณยาทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 103.79 ± 0.21 และ 96.90 ± 0.37 ตามลำดับ และสภาวะเร่งมีปริมาณเรสเวอราทรอลและแควอซิทีนคิดเป็นร้อยละของปริมาณยาทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 99.42 ± 0.90 และ 94.63 ± 0.75 ตามลำดับ ซึ่งทั้งในสภาวะปกติและสภาวะเร่งมีความคงตัวนานถึง 12 เดือน

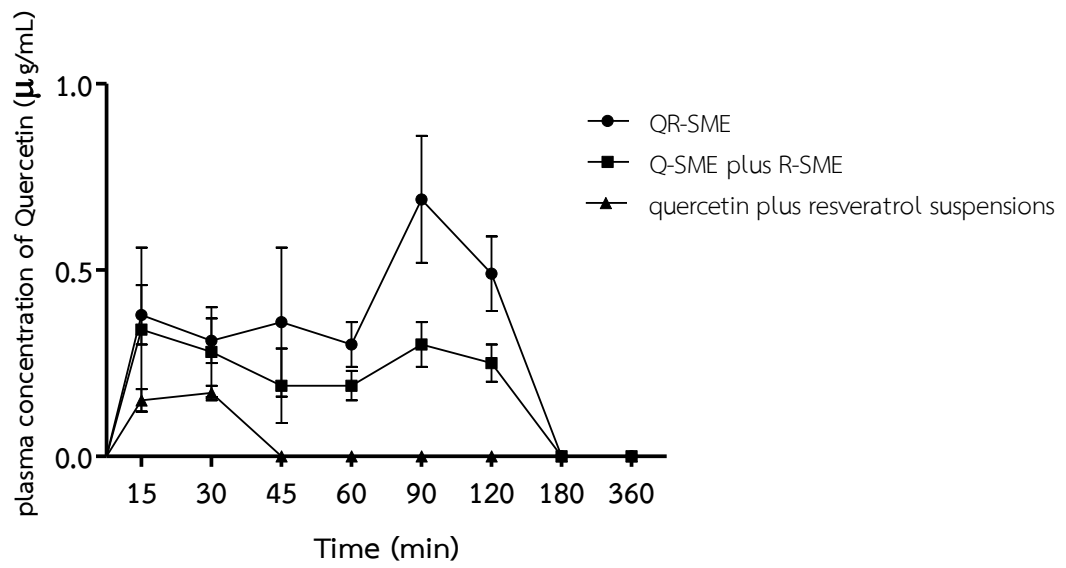
ตารางที่ 18 Stability data of the QR-SME at the intermediate ($30\pm 2^{\circ}\text{C}/65\pm 5\% \text{RH}$) and accelerated conditions ($45\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\% \text{RH}$), Mean \pm SD. (n=3)

| Sampling time | Appearance | Visual grading | Particle size (nm) | Pdl | % Drug content | | ICH guideline ($\pm 5\%$) | |
|---------------------------|---------------------|----------------|--------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-----------|
| | | | | | Resveratrol | Quercetin | Resveratrol | Quercetin |
| 0 month | Clear yellow liquid | A | 16.76 \pm 0.02 | 0.13 \pm 0.01 | 104.48 \pm 0.40 | 105.22 \pm 0.15 | 100 | 100 |
| A) 30 $^{\circ}$ C/65% RH | | | | | | | | |
| 1 month | Clear yellow liquid | A | 16.66 \pm 0.26 | 0.14 \pm 0.02 | 101.20 \pm 0.30 | 102.80 \pm 0.21 | -3.14 | -7.94 |
| 3 months | Clear yellow liquid | A | 17.08 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.02 | 101.28 \pm 0.74 | 101.46 \pm 0.16 | -3.06 | -7.88 |
| 6 months | Clear yellow liquid | A | 16.73 \pm 0.55 | 0.12 \pm 0.01 | 104.09 \pm 0.32 | 101.39 \pm 0.15 | -0.37 | -5.31 |
| 12 months | Clear yellow liquid | A | 16.90 \pm 0.26 | 0.15 \pm 0.02 | 103.79 \pm 0.21 | 96.90 \pm 0.37 | -0.66 | -5.59 |
| B) 45 $^{\circ}$ C/75% RH | | | | | | | | |
| 1 month | Clear yellow liquid | A | 17.15 \pm 0.23 | 0.14 \pm 0.02 | 98.33 \pm 0.60 | 97.08 \pm 0.23 | -5.89 | -10.56 |
| 3 months | Clear yellow liquid | A | 17.27 \pm 0.13 | 0.13 \pm 0.01 | 101.09 \pm 0.30 | 97.76 \pm 0.69 | -3.24 | -8.04 |
| 6 months | Clear yellow liquid | A | 16.30 \pm 0.20 | 0.15 \pm 0.02 | 99.12 \pm 0.18 | 94.11 \pm 0.20 | -5.13 | -9.84 |
| 12 months | Clear yellow liquid | A | 17.63 \pm 0.15 | 0.18 \pm 0.01 | 99.42 \pm 0.90 | 94.63 \pm 0.75 | -4.84 | -9.56 |

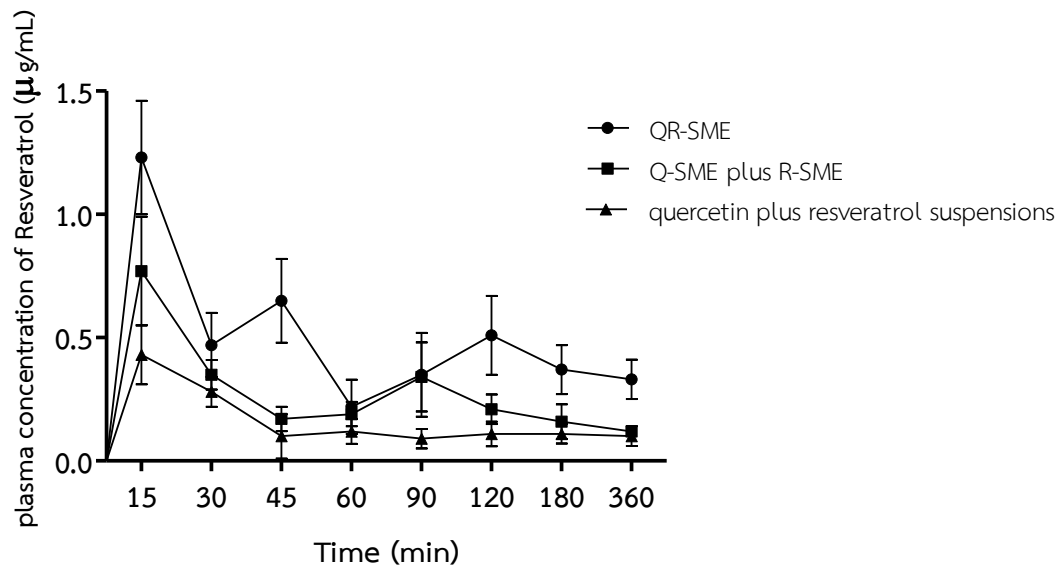
12. การศึกษาการดูดซึมของสูตรตำรับในสัตว์ทดลอง

จากการศึกษาการดูดซึมของสูตรตำรับในสัตว์ทดลองจากการให้ยาทางปากเพียงครั้งเดียว แล้วนำตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ไปวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสูตรตำรับ QR-SME หรือสูตรตำรับ Q-SME ที่ป้อนตามด้วยสูตรตำรับ R-SME และควอซิทินกับเรสเวอราทรอลที่เตรียมในลักษณะสารแขวนลอยในน้ำ (quercetin plus resveratrol suspension) ดังแสดงในรูปที่ 25, 26 และตารางที่ 19 ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของควอซิทินสูงสุดในเลือด (C_{max}) มีค่าเท่ากับ 0.69 ± 0.17 , 0.34 ± 0.22 และ 0.17 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เวลาที่มีระดับควอซิทินสูงสุดในเลือด (T_{max}) เท่ากับ 90, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ และพื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างระดับควอซิทินในเลือดกับเวลาที่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง (AUC_{0-6h}) มีค่าเท่ากับ 462.65 ± 141.44 , 271.27 ± 80.26 และ 51.09 ± 16.36 ไมโครกรัม ชั่วโมงต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูตรตำรับ QR-SME และสูตรตำรับ Q-SME ที่ป้อนตามด้วย สูตรตำรับ R-SME มีค่า AUC_{0-6h} มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และคิดเป็น 11.63 และ 6.61 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารแขวนลอยละลายน้ำที่ผสมควอซิทินกับเรสเวอราทรอล

ความเข้มข้นของเรสเวอราทรอลสูงสุดในเลือด (C_{max}) ของสูตรตำรับ QR-SME หรือสูตรตำรับ Q-SME ที่ป้อนตามด้วยสูตรตำรับ R-SME และสูตรตำรับ quercetin plus resveratrol suspension มีค่าเท่ากับ 1.23 ± 0.23 , 0.77 ± 0.22 และ 0.43 ± 0.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เวลาที่มีระดับเรสเวอราทรอลสูงสุดในเลือด (T_{max}) เท่ากับ 15 นาที ทั้ง 3 สูตรตำรับ และพื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างระดับเรสเวอราทรอลในเลือดกับเวลาที่ 0 ถึง 6 ชม. (AUC_{0-6h}) มีค่าเท่ากับ 1214.31 ± 368.55 , 587.78 ± 173.38 และ 380.00 ± 115.52 ไมโครกรัม ชั่วโมงต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูตรตำรับ QR-SME มีค่า AUC_{0-6h} มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และคิดเป็น 3.20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารแขวนลอยละลายน้ำที่ผสมควอซิทินกับเรสเวอราทรอล



รูปที่ 25 Quercetin plasma concentration vs. time profiles after oral administration of quercetin (40 mg/kg) in combination with resveratrol (40 mg/kg) in the SME formulation; quercetin in combination with resveratrol in aqueous suspension, or a quercetin (40 mg/kg) SME formulation followed by a resveratrol (40 mg/kg) SME formulation. All values reported are Mean \pm SD. (n=6)



รูปที่ 26 Resveratrol plasma concentration vs. time profiles after oral administration of quercetin (40 mg/kg) in combination with resveratrol (40 mg/kg) in the SME formulation; quercetin in combination with resveratrol in aqueous suspension, or a quercetin (40 mg/kg) SME formulation followed by a resveratrol (40 mg/kg) SME formulation. All values reported are mean values \pm SD. (n=6)

ตารางที่ 19 Pharmacokinetics value of QR-SME after oral administration compared to Q-SME plus R-SME and a combined suspension (equivalent to 40 mg/kg of quercetin and resveratrol), Mean±SD. (n=6)

| Formulations | C _{max} (µg/mL) | | T _{max} (min) | | AUC _{0-6 h} (µg h/mL) | |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------|------------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | Quercetin | Resveratrol | Quercetin | Resveratrol | Quercetin | Resveratrol |
| QR-SME | 0.69±0.17 | 1.23±0.23 | 90 | 15 | 462.65±141.44 [*] | 1214.31±368.55 ^{*,#} |
| Q-SME plus R-SME | 0.34±0.22 | 0.77±0.22 | 15 | 15 | 271.27±80.26 [*] | 587.78±173.38 [*] |
| Quercetin plus Resveratrol suspension | 0.17±0.02 | 0.43±0.12 | 30 | 15 | 51.09±16.36 | 380.00±115.52 |

^{*} $p < 0.05$, compared to quercetin plus resveratrol suspension

[#] $p < 0.05$, compared to Q-SME plus R-SME

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาความสามารถในการละลายของสารเคอควิซิทินและเรสเวอราทรอล ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นของการพัฒนาสูตรตำรับที่บรรจุเคอควิซิทินและเรสเวอราทรอลในระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลชันฟายด์ (Self-microemulsifying formulation containing quercetin and resveratrol: QR-SME) พบว่า เมื่อเจือจางสูตรตำรับ QR-SME ด้วยน้ำ มีคุณสมบัติที่ดีตามลักษณะของระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลชันฟายด์ มีลักษณะโปร่งใส ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 20 นาโนเมตร อนุภาคมีลักษณะค่อนข้างกลม และมีการกระจายตัวที่ดี ไม่เกิดการเกาะกัน (Wang and Zhang, 2013) จัดเป็นไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water: o/w) ซึ่งน้ำมัน สารช่วยลดแรงตึงผิว และสารช่วยลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้ ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor EL และ Labrasol ตามลำดับ มีค่าแอสแอลบี (Hydrophilic-lipophilic balance: HLB) อยู่ระหว่าง 8-18 ซึ่งสารช่วยทั้ง 3 ชนิด จัดเป็นสารช่วยชนิดไม่มีประจุ มีความเป็นพิษต่ำทั้งในระยะเฉียบพลันและระยะยาว (Wang and Zhang, 2013) ในอัตราส่วน 10:70:20 (w/w) ซึ่งอัตราส่วนที่ใช้ในสูตรตำรับนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Jaisamut และคณะ (2016) พบว่า มีคุณสมบัติและลักษณะของการเกิดเซลฟ์ไมโครอิมัลชันฟายด์ที่ดี

จากการศึกษาการปลดปล่อยสารประกอบเคอควิซิทินและเรสเวอราทรอล พบว่า อัตราการปลดปล่อยสารประกอบทั้งสองชนิดในสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ QR-nonformulated ซึ่งการปลดปล่อยเคอควิซิทินและเรสเวอราทรอลจากระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลชันฟายด์ มีการปลดปล่อยทันทีที่ละลายได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70 และ 80 ภายในเวลา 30 นาที โดยระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลชันฟายด์ ที่บรรจุสารประกอบสองชนิดนี้หรือสารประกอบอื่น มีอัตราการปลดปล่อยตัวยาค่อนข้างเร็วและมีความคงตัวที่ดีกว่ารูปแบบเดิมในสภาวะ sink condition (Choo *et al.*, 2013; Hanh *et al.*, 2013; Seljak *et al.*, 2014; Jaisamut *et al.*, 2016; Gu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018) และสอดคล้องกับการนำสารประกอบต่าง ๆ มาพัฒนาในระบบนำส่งยานี้มีอัตราการปลดปล่อยตัวยาค่อนข้างเร็วกว่ารูปแบบเดิม (Choo *et al.*, 2013; Seljak *et al.*, 2014; Jaisamut *et al.*, 2016) ซึ่งจากผลการศึกษาการนำสารประกอบชนิดเดียวมาบรรจุในสูตรตำรับ พบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ R-SME แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME อาจเกิดจากคุณสมบัติของเรสเวอราทรอลที่แม้จะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ไม่ดี แต่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้สูง อาจช่วยเสริมฤทธิ์กันให้เคอควิซิทินที่บรรจุในสูตรตำรับ QR-SME สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้มากกว่าการศึกษาเพียงสารประกอบเดียว (Amidon *et al.*, 1995)

จากการศึกษาความคงตัวของสูตรตำรับ QR-SME พบว่า ในสภาวะปกติมีปริมาณเรสเวอราทรอลและเคอควิซิทินคิดเป็นปริมาณยาทั้งหมดมากกว่าร้อยละ 96 และในสภาวะเร่งมี

ปริมาณเรสเวอราทรอลและเคอซิทินคิดเป็นปริมาณยาทั้งหมดมากกว่าร้อยละ 94 ซึ่งจากการศึกษาความคงตัวของสารประกอบสองชนิดนี้ในสถานะที่อุณหภูมิสูงขึ้นอาจเกิดการ degradation ได้อย่างรวดเร็ว (Casagrande *et al.*, 2009; Guoqing *et al.*, 2014; Francioso *et al.*, 2014) หรืออาจถ่ายเทออกซิเจนบนวงแหวนอะโรมาติก ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อสัมผัสกับอากาศ อาจส่งผลให้ปริมาณเคอซิทินในสถานะแรงลดลงมากกว่าสถานะปกติได้ (Sokolova *et al.*, 2012) ซึ่งตาม ICH guideline (2003) ต้องมีปริมาณยาทั้งหมดคงเหลือตามเกณฑ์ที่กำหนดไม่น้อยกว่าร้อยละ ± 5 ของปริมาณยาเริ่มต้น แต่อย่างไรก็ตามปริมาณยาที่พบของสารประกอบทั้งสองชนิดยังคงมีค่ามากกว่าร้อยละ 90 ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งในสถานะปกติและสถานะแรงจึงมีความคงตัวนานอย่างน้อยถึง 12 เดือน

จากการวิเคราะห์ผลการศึกษาในครั้งนี้ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารผสมที่อยู่ในสถานะของเหลว สามารถแยกและวิเคราะห์สารที่มีความแม่นยำ ประสิทธิภาพสูง โดยใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย และสามารถตรวจวัดปริมาณสารที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้ดี (ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์., 2544) ในการศึกษานี้ใช้ตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ เมทานอล (methanol): อาซิโตไนไตรล์ (acetonitrile): ร้อยละ 0.1 กรดฟอสโพลิกละลายน้ำ (phosphoric acid) ในอัตราส่วน 55:10:35 วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยระบบ isocratic elution ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องในปริมาตร 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ 10 นาที และความยาวคลื่นที่ 256 และ 307 นาโนเมตร สำหรับเคอซิทินและเรสเวอราทรอลตามลำดับ ซึ่งได้ปรับปรุงมาจากการศึกษาของ Kumar และคณะ (2016) ซึ่งได้ศึกษาความแม่นยำของการทดสอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยการนำเคอซิทินและเรสเวอราทรอลผสมกันในระบบนำส่งยาอนุภาคนาโน โดยใช้ตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล: อาซิโตไนไตรล์: ร้อยละ 0.1 กรดฟอสโพลิกละลายน้ำ ในอัตราส่วน 60:10:30 วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยระบบ isocratic elution ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องในปริมาตร 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ 10 นาที และความยาวคลื่นที่ 255 และ 306 นาโนเมตร สำหรับเคอซิทินและเรสเวอราทรอลตามลำดับ พบว่า มีความเที่ยงตรงและแม่นยำของวิธีการทดสอบสูง

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสูตรตำรับด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีค่า IC_{50} มากกว่าสูตรตำรับ Q-SME R-SME และ Blank-SME ด้วยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสูตรตำรับด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า สูตรตำรับ QR-SME ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME และ R-SME อาจสอดคล้องกับลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิด คือ เคอซิทินเป็นสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic rings) 2 วง มีหมู่ไฮดรอกซิล 5 หมู่ (D'Andrea, 2015) ส่วนเรสเวอราทรอลจัดอยู่ในกลุ่มสติลเบิน (stilbene) มีวงแหวนอะโรมาติก 2 วง มีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ (Amri *et al.*, 2014) โดยการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS จัดอยู่ในรูปแบบ mix-mode

กล่าวคือ สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนและไฮโดรเจนอะตอมให้กับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} (สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระ, 2555) จึงอาจส่งผลให้การนำสารประกอบทั้งสองชนิดนี้มารวมกัน ไม่ส่งผลให้เกิดการเสริมฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิดนี้มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพอย่างมากในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะเคอควิทิน ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวน A และตำแหน่งที่ 5 ในวงแหวน heterocyclic กลุ่ม catechol ในวงแหวน B พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ทำให้เกิดการ conjugation กับตำแหน่ง 4-oxo ในวงแหวน C (Heijnen *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002) จากความสามารถในการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอมที่อยู่บนวงแหวนอะโรเมติกให้แก่อนุมูลอิสระส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เพิ่มขึ้นอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาเพียงสารประกอบชนิดเดียว (สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระ, 2555) จึงส่งผลให้สูตรตำรับ QR-SME สามารถเสริมฤทธิ์กันในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เมื่อเปรียบเทียบกับการนำสารเดี่ยวมาบรรจุในสูตรตำรับ Q-SME หรือ R-SME อีกทั้งมีการศึกษาถึงการนำสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้มารวมกัน พบว่า สามารถเสริมฤทธิ์กันในการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (reactive oxygen species: ROS) มากถึง 2.25 เท่า และเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ORAC ได้ถึง 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 แบบ dose-dependent (Del Follo-Martinez *et al.*, 2013) นอกจากนี้ในการศึกษายังพบว่าสารช่วยในสูตรตำรับ Blank-SME ที่ไม่ได้บรรจุสารประกอบในสูตรตำรับ ไม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี อาจจะกล่าวได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในการศึกษาครั้งนี้เกิดจากความสามารถของสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้ในการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง และสอดคล้องกับการศึกษาถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเคอควิทินและเรสเวอราทรอลทั้งในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง (Murias *et al.*, 2005; Gülçin, 2010; Kukongviriyapan *et al.*, 2012; Sibel *et al.*, 2013; Lesjak *et al.*, 2018)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า ผลของสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME ต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารและเซลล์มะเร็งลำไส้ทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Blank-SME (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และ นวลอนงค์ จิรกาญจนากิจ, 2550) ซึ่งสถิติจากทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2560 พบว่า สถิติผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 มะเร็งลำไส้และไส้ตรงพบเป็นลำดับที่ 3 รองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งตับและท่อน้ำดี ส่วนมะเร็งกระเพาะอาหารพบเป็นลำดับที่ 11 ถือเป็นโรคมะเร็งที่มีอุบัติการณ์การเกิดโรครุนแรงทั้งเพศหญิงและเพศชาย ส่วนมากจะตรวจพบอาการในระยะที่ 3 และ 4 มีการรักษาด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การผ่าตัด การรักษาด้วยเคมีบำบัด การฉายรังสีบำบัด เป็นต้น (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2561) แต่ยังมีข้อจำกัดหลายประการ สารประกอบจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำมารักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง สอดคล้องกับการศึกษาถึงสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้ คือ เคอควิทิน พบว่า มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดี (Jeong *et al.*, 2009; Chirumbolo, 2013) โดยมีการศึกษาในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารทั้งในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่า เมื่อให้เคอควิทินร่วมกับยาแผนปัจจุบันในการต้านมะเร็งระยะลุกลาม (irinotecan หรือ SN-38) ที่ความเข้มข้นของเคอควิทิน 12.5 ไมโครโมลาร์ ต่อยา irinotecan 2.5

ไมโครโมลาร์ สามารถลดการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับทำให้เคอซิทินหรือยารักษาเพียงอย่างเดียว (Lei *et al.*, 2018) การศึกษา มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง พบว่า เคอซิทินสามารถทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ทั้ง 2 ชนิดนี้ กระตุ้น ให้ caspases ตอบสนองต่อการตายแบบ apoptosis ผ่าน TRAIL-mediated apoptosis (Psahoulia *et al.*, 2007) และลดการแสดงออกโปรตีน ErbB2 และ ErbB3 ซึ่งสามารถยับยั้งการ เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ที่มีความเข้มข้น 25-100 ไมโครโมลาร์ (Kim *et al.*, 2005) ส่วนเรสเวอราทรอลมีรายงานการศึกษาถึงประสิทธิผลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งมากมาย โดย Aquilano และคณะ (2009) พบว่า เรสเวอราทรอลที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร ผ่านตัวกลาง MEK1/2-ERK1/2-c-Jun และ เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ผ่านกลไก ROS-dependent mitochondria ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ได้ (Juan *et al.*, 2008) รวมทั้งยังพบว่า การศึกษา ความมีชีวิตรอดของเซลล์ จากการนำสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้มารวมกัน สามารถเสริม ฤทธิ์กันในการต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และระงับการแปลรหัส oncogene microRNA-27a ได้ (Del Follo-Martinez *et al.*, 2013) ซึ่งอาจจะส่งผลให้การพัฒนาสารประกอบละลายน้ำยากสอง ชนิดนี้ในระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลชันพายด์ มีฤทธิ์ต้านมะเร็งกระเพาะอาหาร ลำไส้ใหญ่และ ไส้ตรงได้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งยังมีการศึกษาถึงการเสริมฤทธิ์กันในการต้านมะเร็งได้หลากหลายชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง โดยสามารถลดปริมาณและจำนวนเนื้อเยื่ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อ เปรียบเทียบกับสารประกอบเดี่ยว ยับยั้งการแสดงออกของกลุ่มโปรตีนไคเนส MAPKs (Phosphorylated mitogen-activated) และ p53 (George *et al.*, 2011) จากการนำ สารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้มารวมกันสามารถควบคุมการเจริญเติบโตผ่านกลไกของโปรตีน ไคเนส AMPK (AMP-activated protein kinase) และเพิ่มการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง เต้านมชนิด MCF-7 ได้ (Park *et al.*, 2009) จากการศึกษาเคอซิทิน เรสเวอราทรอล และคาเทชิน มารวมกันที่ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 20 ไมโครโมลาร์ สามารถช่วยเสริมฤทธิ์กันในการลดการ เจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (human breast cancer cells) และลด จำนวนของเซลล์ในหนู nude mouse ที่ระยะ G₂/M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Schlachterman *et al.*, 2008) ส่วนผลการศึกษาของสารช่วยในสูตร ตำรับ (Blank-SME) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เมื่อใช้ในความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าสารช่วยในสูตรตำรับสามารถเสริมฤทธิ์กันของสูตรตำรับ QR-SME ในการต้าน เซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Saah และคณะ (2018) ศึกษาสารช่วยที่ใช้ใน ระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลชันพายด์ ถึงความเป็นพิษของเซลล์ปกติกระเพาะอาหาร (CRL-1790) และเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด (AGS, Caco-2 และ HT-29) ด้วยวิธี MTT assay พบว่า Cremophor EL มีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ปกติกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งชนิด AGS, Caco-2 และ HT-29 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.72 ± 0.01 , 0.64 ± 0.01 , 0.88 ± 0.01 และ 0.55 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Labrasol มีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ปกติกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งชนิด AGS, Caco-2 และ HT-29 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.07 ± 0.02 , 0.92 ± 0.004 , 0.93 ± 0.01 และ 0.88 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน Capryol 90 มีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ปกติกระเพาะอาหาร

เซลล์มะเร็งชนิด AGS, Caco-2 และ HT-29 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.49 ± 0.02 , 1.48 ± 0.01 , 1.34 ± 0.02 และ 1.13 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีการศึกษาการนำน้ำมันและสารลดแรงตึงผิว ในอัตราส่วนที่ต่างกันมาศึกษาความเป็นพิษของเซลล์ พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของน้ำมันมากยิ่งขึ้นส่งผลให้ความมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งชนิด AGS, Caco-2 และ HT-29 น้อยลง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าน้ำมันเสริมฤทธิ์กันกับสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมในการต้านเซลล์มะเร็งชนิด AGS, HT-29 และ Caco-2 ได้ อีกทั้งเมื่อบรรจุสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้อาจส่งผลให้สูตรตำรับ QR-SME มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีกว่าการบรรจุเพียงสารเดี่ยวหรือสารช่วยเพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตามควรคำนึงถึงอัตราส่วนของสารช่วยที่ใช้ในสูตรตำรับที่บรรจุในระบบนำส่งยาเซลล์ไฟไมโครอิมัลชันพายด์ อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองหรือความเป็นพิษต่อกระเพาะอาหารได้ ซึ่งควรมีการศึกษาถึงความเป็นพิษของสูตรตำรับ QR-SME ต่อเซลล์ปกติทั้งในระยะเฉียบพลัน กึ่งเรื้อรัง และเรื้อรัง เพื่อความปลอดภัยและเป็นแนวทางในการบริหารยาต่อไปในอนาคต ด้านการศึกษาถึงความไว (sensitivity) ของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด พิจารณาจากค่า IC_{50} พบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีความไวในการทดสอบต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด AGS มากกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2 และ HT-29 สอดคล้องกับการศึกษาถึงสารช่วยที่ใช้ในสูตรตำรับ QR-SME พบว่า มีความไวต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด AGS โดยแสดงค่า IC_{50} ต่ำกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 และ Caco-2 (Saah *et al.*, 2018) และจากการศึกษาของเคอซิทินถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิด HT-29 และ Caco-2 พบว่า เคอซิทินมีความไวที่จำกัดในเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 ต่อตัวกลางของการตายแบบ apoptosis (TRAIL-mediated apoptosis) (Psahoulia *et al.*, 2007)

จากการศึกษาการดูดซึมของสูตรตำรับ QR-SME ในหนูแรท พบว่า ระดับยาในพลาสมาเทียบกับเวลาที่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง (AUC_{0-6h}) ของเคอซิทินและเรสเวอราทรอลในสูตรตำรับ QR-SME คิดเป็น 11.63 และ 3.20 เท่า ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับยาในพลาสมาของเคอซิทินและเรสเวอราทรอลแขวนลอยในน้ำ สอดคล้องกับการศึกษาระบบนำส่งยาเซลล์ไฟไมโครอิมัลชันพายด์ที่สามารถปรับปรุงค่าชีวประสิทธิผลของตัวยาหรือสารประกอบหลากหลายชนิดได้ดีกว่ารูปแบบที่ไม่ได้พัฒนาเป็นระบบนำส่งยา (Choo *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2014; Hintzen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Jaisamut *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017) โดยระบบนำส่งยาเซลล์ไฟไมโครอิมัลชันพายด์ มีขนาดอนุภาคเป็นไมโครอิมัลชันขนาดเล็กมาก (น้อยกว่า 50 ไมโครเมตร) อาจสามารถกระจายและช่วยเพิ่มการซึมผ่านเนื้อเยื่อ (membrane) ของเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก (intestinal epithelium cells) ผ่านทาง Transcellular transport ได้โดยตรง (Wu *et al.*, 2015) อีกทั้งยังมีการศึกษาระบบนำส่งยาเซลล์ไฟไมโครอิมัลชันพายด์ที่บรรจุเรสเวอราทรอล 867 ไมโครโมลาร์ ในหนูขาวใหญ่ และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2) ที่นำมาเลี้ยงในสภาวะและเวลาที่เหมาะสมจนเซลล์ปรับสภาพให้มีคุณสมบัติเปรียบเสมือนเซลล์เยื่อบุในลำไส้เล็ก พบว่า สามารถซึมผ่านลำไส้ได้สูงถึง 28.9×10^{-6} และ 20.4×10^{-6} เซนติเมตรต่อวินาที มีอัตราการไหลผ่านของกระบวนการเมทาบอลิซึม และการยับยั้งกระบวนการขับยาออกนอกเซลล์ของ Multidrug resistance-associated protein (MRPs) และ P-glycoprotein (P-gp) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Seljak *et al.*, 2014) และระบบนำส่งยานี้ อาจกระตุ้นการสร้างลิโปโปรตีน (lipoprotein) และโคไลไมครอน (chylomicron) ดูดซึมผ่าน

lymphatic transport ซึ่งตัวยามีไม่ผ่านระบบ first pass metabolism ที่ตับ จึงอาจทำให้เพิ่มชีวประสิทธิผลของยามากขึ้น (Yañez *et al.*, 2011) จากการพัฒนาระบบนำส่งยาไลโปโซม (Liposome) ที่บรรจุควอซิทีนและเรสเวราทรอล พบว่า การนำสารทั้งสองชนิดนี้มารวมกันทำให้เกิดขนาดอนุภาคเล็กกว่าการบรรจุสารชนิดเดียว (Caddeo *et al.*, 2016) ซึ่งสอดคล้องกับสูตรตำรับ QR-SME ที่ศึกษาในครั้งนี้ และจากการศึกษาการซึมผ่านทาง tight junction พบว่า อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 20 นาโนเมตร สามารถซึมผ่านได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ (Adamson *et al.*, 2004) อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาถึงสารช่วยที่ใช้ในระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลซิฟายด์สามารถนำส่งยาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จากการศึกษาของ Shono และคณะ (2004) ได้ศึกษา Cremophor EL พบว่า สามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมเข้าสู่เซลล์และยับยั้งการทำงานของ P-gp (rhodamine123) ซึ่งสามารถลดการขับยาออกจาก enterocyte ไปสู่ intestinal lumen และมีการศึกษาของ Labrasol ผ่านปฏิกิริยาของ F-actin และ actin-anchoring protein (ZO-1) ที่เชื่อมต่อกับโปรตีนระหว่างเซลล์ (transmembrane protein) ทำให้เกิดการหดคลายตัวของ perijunctional actomyosin ring สามารถช่วยเปิด tight junctions ผ่านทาง Paracellular transport ส่งผลให้ขนาดอนุภาคที่เล็กของระบบเซลฟ์ไมโครอิมัลซิฟายด์ สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้เพิ่มมากยิ่งขึ้น (Fernandez *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าควอซิทีนสามารถยับยั้ง organic anion transporting polypeptides 1A2 และ 2B1-mediated uptake (OATP1A2 และ OATP2B1) และสามารถยับยั้งการทำงานของ CYP450 ได้หลากหลาย isoforms ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yang *et al.*, 2014) ส่วนผลการศึกษาในครั้งนี้ระดับยาที่พบในพลาสมามีลักษณะเป็น multiple peak ซึ่งจากการศึกษาของ Yen และคณะ (2017) พบว่า เรสเวราทรอลที่บรรจุในระบบนำส่งยาเซลฟ์นาโนอิมัลซิฟายด์ (Self-nanoemulsifying drug delivery system) ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เมื่อให้ยาทางปากนาน 6 ชั่วโมง มีปริมาณเรสเวราทรอลในพลาสมามากกว่ารูปแบบสารละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีลักษณะเป็น multi-peak รวมถึงควอซิทีนที่บรรจุในระบบนำส่งยาเซลฟ์นาโนอิมัลซิฟายด์ ปริมาณ 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เมื่อให้ยาทางปากนาน 24 ชั่วโมง มีปริมาณควอซิทีนในพลาสมามากกว่ารูปแบบสารละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีลักษณะเป็น multi-peak (Tran *et al.*, 2014) ใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ โดยจากการศึกษาของ Marier และคณะ (2002) ศึกษาเรสเวราทรอลในหนูแรทที่ให้ทางปาก ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว พบว่า ทรานส์เรสเวราทรอล อะไกลโคโคน (trans-resveratrol aglycone) พบปริมาณยาในพลาสมาน้อยกว่าทรานส์เรสเวราทรอล กลูคูโรไนด์ (trans-resveratrol glucuronide) ถึง 46 เท่า โดยทรานส์เรสเวราทรอล อะไกลโคโคน และทรานส์เรสเวราทรอล กลูคูโรไนด์ ถูกเมทาบอลิซึมแล้วดูดซึมกลับเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดอีกครั้ง (enterohepatic circulation) ที่ร้อยละ 24.7 และ 24.0 ตามลำดับ ซึ่งเรสเวราทรอลถูกเมทาบอลิซึมที่ตับด้วยกระบวนการ first-pass metabolism ขับออกทางน้ำดีด้วย bile acid transporter ASBT (SLC10A2) (Chothe and Swaan, 2014) ส่วนควอซิทีนถูกเมทาบอลิซึมที่ตับ ด้วยกระบวนการ passive diffusion ผ่านทาง organic anion transporters (OAT) และ/หรือ anion transporting polypeptide (OATP)-mediated transporters ขับออกทางน้ำดี (Wong *et al.*, 2012) ซึ่งสารประกอบละลายน้ำยากทั้งสองชนิดนี้ถูกขับออกจากตับผ่าน

transporter ที่แตกต่างกัน จึงอาจไม่ส่งผลให้เกิดการขัดขวางกันในการขับยาจากตับออกไปทางท่อน้ำดี และอาจบ่งบอกถึงระบบการไหลเวียนของสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้เป็นแบบ enterohepatic circulation จึงอาจส่งผลให้ระดับยาที่มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่พบในร่างกาย (Gao *et al.*, 2014) อาจเกิดจากระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ มีลักษณะเป็น lipid-based formulation สามารถดูดซึมผ่าน lymphatic transport ซึ่งอัตราการดูดซึมผ่าน lymphatic transport เกิดขึ้นได้ช้ากว่าการดูดซึมผ่านระบบไหลเวียนเลือดถึง 500 เท่า อาจทำให้ระดับยาที่พบในพลาสมาเป็นลักษณะ multiple peak ได้ (O'Driscoll, 2002) อีกทั้งลักษณะของสูตรตำรับ QR-SME คล้ายคลึงกับสูตรตำรับ QR-suspension ที่ไม่ได้บรรจุสารประกอบในระบบนำส่งยา อาจเกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้ในการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้ม sinusoidal plasma และ canniculae และการเปลี่ยนรูปร่าง (biotransformation) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับยา (Roberts *et al.*, 2002) แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาการดูดกลับของยาจากท่อน้ำดีเข้าสู่ลำไส้เล็ก และส่งต่อไปยังระบบไหลเวียนเลือดต่อไป

จากข้อจำกัดของสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้ด้านขีดความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย ส่งผลให้มีค่าชีวประสิทธิผลต่ำ เมื่อนำมาบรรจุในระบบนำส่งยาเซลล์ไมโครอิมัลซิฟายด์ พบว่า สามารถเพิ่มค่าการละลายของสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดเพิ่มมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจช่วยเพิ่มโอกาสในการนำสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้พัฒนาเป็นยารักษาหรือป้องกันโรคต่อไปในอนาคต เนื่องจากมีการศึกษาถึงการนำสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดนี้มารวมกันสามารถเสริมฤทธิ์กันในการรักษา เช่น ช่วยเพิ่มการเมทาบอลิซึมของไตรกลีเซอไรด์ในร่างกาย (Arias *et al.*, 2017) ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง (Igura *et al.*, 2001) ลดการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งเต้านม (Schlachterman *et al.*, 2008) กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ยับยั้งการแบ่งตัว เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเสื่อมสภาพ และยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งชนิด gliomas ได้ (Zamin *et al.*, 2009)

บทที่ 5

สรุป

1. จากผลศึกษาการละลายของตำรับยาที่บรรจุเคอวอซิทีนและเรสเวอราทรอลด้วยระบบนำส่งยาเซลฟ์ไมโครอิมัลชัน (QR-SME) สรุปผลจากการศึกษาความสามารถในการละลาย การสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาค ลักษณะการเกิดไมโครอิมัลชัน พบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีคุณสมบัติที่ดี ประกอบด้วย Capryol 90, Cremophor EL และ Labrasol ในอัตราส่วน 10:70:20 (w/w) สามารถบรรจุเคอวอซิทีนและเรสเวอราทรอลอย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมสูตรตำรับ มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 20 นาโนเมตร อนุภาคมีลักษณะค่อนข้างกลม การกระจายตัวที่ดี ไม่เกิดการเกาะกัน มีอัตราการปลดปล่อยของเคอวอซิทีนและเรสเวอราทรอลในสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร QR-nonformulated สูตรตำรับเมื่อเก็บใน 2 สภาวะ คือ สภาวะปกติ (30 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 65 ± 5) และสภาวะเร่ง (45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 75 ± 5) มีความคงตัวที่ดีทางกายภาพ นาน 12 เดือน ส่วนความคงตัวทางเคมี พบว่าในสภาวะปกติและสภาวะเร่งมีความคงตัวนานอย่างน้อย 12 เดือน

2. จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สรุปผลพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสูตรตำรับ QR-SME มีค่า IC_{50} มากกว่าสูตรตำรับ Q-SME, R-SME และ Blank-SME คิดเป็น 1.47, 3.59 และ 33.25 เท่า ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี ABTS คือ สูตรตำรับ QR-SME มีค่า IC_{50} มากกว่าสูตรตำรับ Q-SME, R-SME และ Blank-SME คิดเป็น 1.52, 1.69 และ 8.43 เท่า ตามลำดับ และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสูตรตำรับ QR-SME มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกมากกว่าสูตรตำรับ Q-SME, R-SME และ Blank-SME คิดเป็น 1.46, 4.30 และ 17.46 เท่า ตามลำดับ อีกทั้งเมื่อนำไปคำนวณทางสถิติ พบว่าสูตรตำรับ QR-SME, Q-SME และ R-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Blank-SME โดยสูตรตำรับ QR-SME เสริมฤทธิ์กันในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP แต่ไม่เสริมฤทธิ์กันในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

3. จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสูตรตำรับ QR-SME ต่อเซลล์มะเร็งชนิด AGS, HT-29 และ Caco-2 สรุปผลพบว่า สูตรตำรับ QR-SME Q-SME และ R-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Blank-SME ต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสูตรตำรับ QR-SME มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ AGS และ Caco-2 แต่ใน HT-29 cell ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับ Q-SME และ R-SME ส่วนรายงานค่า IC_{50} พบว่า สูตรตำรับ QR-SME มีค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุด ต่อเซลล์มะเร็งชนิด AGS และ HT-29 ส่วนสูตรตำรับ R-SME มีค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดต่อ

เซลล์มะเร็งชนิด Caco-2 ส่วนความไว (sensitivity) ของสูตรตำรับ QR-SME ในการทดสอบต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด AGS มากกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2 และ HT-29 ตามลำดับ

4. จากผลการศึกษาการดูดซึมของสูตรตำรับ QR-SME ในหนูแรท สรุปผลพบว่าสูตรตำรับ QR-SME มีค่าความเข้มข้นของเคออสทีนสูงสุดในพลาสมา (C_{max}) เท่ากับ 0.69 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาของเคออสทีนสูงสุดในพลาสมา (T_{max}) เท่ากับ 90 นาที และพื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างระดับเคออสทีนในพลาสมา กับเวลาที่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง (AUC_{0-6h}) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คิดเป็น 11.63 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับระดับยาในพลาสมาของเคออสทีนและเรสเวอราทรอลแขวนลอยในน้ำ ส่วนค่าความเข้มข้นของเรสเวอราทรอลสูงสุดในพลาสมา (C_{max}) เท่ากับ 1.23 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาของเรสเวอราทรอลสูงสุดในพลาสมา (T_{max}) เท่ากับ 15 นาที และพื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างระดับเรสเวอราทรอลในพลาสมา กับเวลาที่เวลา 0 ถึง 6 ชั่วโมง (AUC_{0-6h}) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คิดเป็น 3.20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับระดับยาในพลาสมาของเคออสทีนและเรสเวอราทรอลแขวนลอยในน้ำ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน กิ่งเรื้อรัง และเรื้อรังของสูตรตำรับ QR-SME ในระดับสัตว์ทดลอง
2. ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสูตรตำรับ QR-SME
3. ควรมีการศึกษาในระดับคลินิก เพื่อการนำไปใช้ป้องกันหรือรักษาโรคต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และ นวลอนงค์ จิรกาญจนากิจ. ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์, 2550.
- ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. เครื่องมือวิทยาศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น : หจก.โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, 2544.
- ภาสวีย์ จันทร์สุก วิริยาพร ศิริกุล และชุติมน หมั่นแก้ว. รูปแบบนวัตกรรมของการนำส่งยาสมุนไพร. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์. 2555; 12 (1): 37-47.
- มนุพัศ โลहितนาวิ. ชีวเภสัชการและเภสัชจลนศาสตร์ เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ดิจิทัลออฟเซต เอเชียแปซิฟิก, 2553.
- มนุพัศ โลहितนาวิ. ชีวเภสัชการและเภสัชจลนศาสตร์ เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. พิษณุโลก: พิมพ์ถูก. 2559.
- ฤดีกร วิวัฒน์ปฐมพี. เอกสารประกอบการสอน ระบบนำส่งยาทางปาก (Drug Delivery System). คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2543: 1-13.
- วริษฐา ศิลอ่อน. ระบบนำส่งยาที่เกิดอิมัลชัน/ไมโครอิมัลชันเองของยาค่าการละลายน้ำต่ำสำหรับการให้ทางปาก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2558; 17 (1): 60-83.
- วิลาวรรณ เรือนสิทธิ์, รุ่งทิพย์ กาวารี, เรือนแก้ว ประพฤติ และวศิน เจริญต้นธนกุล. การตรวจหาสารเคออสตินในสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค HPLC-ELSD. รายงานประชุมวิชาการประจำปี 2558. 2558: 146-52.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2560. กรุงเทพฯ: บริษัทพรทรัพย์การพิมพ์ จำกัด, 2561.
- สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระ. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. เชียงใหม่: สมาร์ท โคตรตั้งแอนด์ เซอร์วิส, 2555.
- Abrahamse S.L., Kloots W.J. and Amelsvoort J.M.M.V. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. Nutrition Research. 2005; 25: 305-317.
- Adamson R.H., Lenz J.F., Zhang X., Adamson G.N., Weinbaum S., and Curry F.E. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. Journal of Physiology. 2004; 557 (3): 889–907.
- Agarwal B., Campen M.J., Channell M.M., Wherry S.J., Varamini B., Davis J.G., Smoliga J.M. Resveratrol for primary prevention of atherosclerosis: clinical trial evidence for improved gene expression in vascular endothelium. International Journal of Cardiology . 2013; 166: 246-248.
- Amidon G.L., Lennernäs H., Shah V.P., Crison J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product

- dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 1995; 12: 413-420.
- Amri A., Le C.S., Thron P., Bonnefont-Rousselot D., Borderie D., Lai-Kuen R., Chaumeil J.C., Sfar S., Charrueau C. Resveratrol self-emulsifying system increases the uptake by endothelial cells and improves protection against oxidative stress-mediated death. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014; 86 (3): 418-426.
- Amri A., Chaumeil J.C., Sfar S., Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*. 2012; 158 (2): 182-193.
- Andres-Lacueva C., Macarulla M.T., Rotches-Ribalta M., Boto-Ordonez M., UrpiSarda M., Rodriguez V.M., Portillo M P. Distribution of resveratrol metabolites in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in rats fed different doses of this polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012; 60 (19): 4833-4840.
- Aquilano K., Baldelli S., Rotilio G., Ciriolo M.R. Trans-resveratrol inhibits H₂O₂-induced adenocarcinoma gastric cells proliferation via inactivation of MEK1/2-ERK1/2-c-Jun signalling axis. *Biochemical pharmacology*. 2009; 77 (3): 337-347.
- Arias N., Pico C., Teresa Macarulla M., Oliver P., Miranda J., Palou A., Portillo M.P. A combination of resveratrol and quercetin induces browning in white adipose tissue of rats fed an obesogenic diet. *Obesity*. 2017 ;25 (1): 111-121.
- Arts I.C., Sesink A.L., Faassen-Peters M., Hollman P.C. The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *British Journal of Nutrition*. 2004; 91: 841-847.
- Asensi M., Medina I., Ortega A., Carretero J., Bano M.C., Obrador E., Estrela J.M. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 33: 387-398.
- Aumont V., Krisa S., Battaglia E., Netter P., Richard T., Merillon J.M., Magdalou J., Sabolovic N. Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001; 393 (2): 281-219.
- Baghel S.S., Shrivastava N., Baghel R.S., Agrawal P., Rajput S. A review of quercetin: Antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012; 1: 146-160.

- Benzie I.F.F. and Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. 1996; 239: 70-76.
- Boots A.W., Balk J.M., Bast A. and Haenen G.R. The reversibility of the glutathionyl-*quercetin* adduct spreads oxidized *quercetin*-induced toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 338: 923-929.
- Boyd B.J. Past and future evolution in colloidal drug delivery systems. Expert opinion on drug delivery (This is an excellent review covering the evolution of colloidal delivery systems from initial concept to current state of the art technologies). 2008; 5: 69-85.
- Brown V.A., Patel K.R., Viskaduraki M., Crowell J.A., Perloff M., Booth T.D., Vasilinin G., Sen A., Schinas A.M., Piccirilli G., Brown K., Steward W.P., Gescher A.J., Brenner D.E. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer research*. 2010; 70 (22): 9003-9011.
- Buchner N., Krumbein A., Rohn S. and Kroh L.W. Effect of thermal processing on the flavonols *rutin* and *quercetin*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006; 20: 3229-3235.
- Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M.E.J. and Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50 (11): 3337-3340.
- Caddeo C., Nacher A., Vassallo A., Armentano M.F., Pons R., Fernández-Busquets X., Carbone C., Valenti D., Fadda A.M., Manconi M. Effect of *quercetin* and resveratrol co-incorporated in liposomes against inflammatory/oxidative response associated with skin cancer. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016; 513 (1-2): 153-163.
- Cai K. and Bennick A. Effect of salivary proteins on the transport of tannin and *quercetin* across intestinal epithelial cells in culture. *Biochemical Pharmacology*. 2006; 72: 974-980.
- Cai X., Fang Z., Dou J., Yu A. and Zhai G. Bioavailability of *quercetin*: problems and promises. *Current Medicinal Chemistry*. 2013; 20: 2572-2582.
- Caltagirone S., Rossi C., Poggi A., Ranelletti F.O., Natali P.G., Brunetti M., Aiello F.B., Piantelli M. Flavonoids apigenin and *quercetin* inhibit melanoma growth and metastatic potential. *International Journal of Cancer*. 2000; 87 (4): 595-600.
- Casagrandel R., Baracatl M.M., Georgettil S.R., Verri Jr W.A., Vicentini F.T.M.C., Rafael J.A., Jabor J.R., Fonseca M.J.V. Method validation and stability study of *quercetin* in topical emulsions. *Quim. Nova*. 2009; 32 (7): 1939-1942.

- Chen H.N., Hsieh C.L. Effects of *Sophora japonica* flowers (Huaihua) on cerebral infarction. Chinese medicine. 2010; 27: 5-34.
- Chen X., He H., Wang G., Yang B., Ren W., Ma L., Yu Q. Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. Biomedical Chromatography. 2007; 21: 257-265.
- Chen X., Yin O.Q., Zuo Z., and Chow M.S. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. Pharmaceutical Research. 2005; 22: 892-901.
- Chirumbolo S. Quercetin in cancer prevention and therapy. Integrative cancer therapies. 2013; 12 (2): 97-102.
- Choi E.J., Bae S.M., Ahn W.S. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. Archives of pharmacal research. 2008; 31 (10): 1281-1285.
- Choo G.H., Park S.J., Hwang S.J., Kim M.S. Formulation and *in vivo* evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system of dutasteride. Drug Research (Stuttgart). 2013; 63 (4): 203-209.
- Chothe P.P. and Swaan P.W. Resveratrol promotes degradation of the human bile acid transporter ASBT (SLC10A2). Biochemical Journal. 2014; 459 (2): 301-312.
- Chun-Fu W., Jing-Yu Y., Fang W., Xiao-Xiao W. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. Chinese Journal of Natural Medicines. 2013; 11 (1): 1-15.
- Constant J. Alcohol, ischemic heart disease and the French paradox. Coronary Artery Disease. 1997; 8: 645-649.
- Craig D.Q., Barker S.A., Banning D., Booth S.W. An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy. International Journal of Pharmacy. 1995; 114: 103-110.
- D'Andrea G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? Fitoterapia. 2015; 106: 256-271.
- de Boer V.C., Dihal A.A., van der Woude H., Arts I.C., Wolffram S. and Alink G.M. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. The Journal of nutrition. 2005; 135: 1718-1725.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F. and Pacifici, G.M. Methylation of quercetin and fisetin, flavonoids widely distributed in edible vegetables, fruits and wine, by human liver. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2002; 40: 207-212.
- Dehghan G. and Khoshkam Z. Tin (II) quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. Food Chemistry. 2012; 131: 422-426.

- Del Follo-Martinez A., Banerjee N., Li X., Safe S., Mertens-Talcott S. Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a. *Nutrition and Cancer*. 2013; 65 (3): 494-504.
- Edwards R.L., Lyon T., Litwin S.E., Rabovsky A., Symons J.D. and Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137; 2405-2411.
- Egert S., Bosy-Westphal A., Seiberl J., Kurbitz C., Settler U., Plachta-Danielzik S., Wagner A.E., Frank J., Schrezenmeir J., Rimbach G., Wolffram S., Müller M.J. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidized low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition*. 2009; 102: 1065-1074.
- Eid H.M., Nachar A., Thong F., Sweeney G., Haddad P.S. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. *Pharmacognosy magazine*. 2015; 11 (41): 74-81.
- Fernandez S., Jannin V., Chevrier S., Chavant Y., Demarne F., Carriere F. *In vitro* digestion of the self-emulsifying lipid excipient Labrasol by gastrointestinal lipases and influence of its colloidal structure on lipolysis rate. *Pharmaceutical Research*. 2013; 30 (12): 3077–3087.
- Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D.W., Anderson D., Baker J., Kerr D.J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: Pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clinical Cancer Research*. 1996; 2: 659-668.
- Francioso A., Mastromarino P., Restignoli R., Boffi A., d'Erme M., Mosca L. Improved stability of trans-resveratrol in aqueous solutions by carboxymethylated (1,3/1,6)- β -D-glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62 (7): 1520-1525.
- Frozza R.L., Bernardi A., Paese K., Hoppe J.B., da Silva T., Battastini A.M., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Salbego C. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2010; 6 (6): 694-703.
- Fulda S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discovery Today*. 2010; 15 (17-18): 757-765.
- Gambini J., Ingles M., Olaso G., Lopez-Grueso R., Bonet-Costa V., Gimeno-Mallench L., Mas-Bargues C., Abdelaziz K.M., Gomez-Cabrera M.C., Vina J., Borrás C. Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism,

- bioavailability and biological effects in animal models and humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015; 2015: 1-13.
- Gao L., Liu G., Wang X., Liu F., Xu Y. and Ma J. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011; 404: 231-237.
- Gao Y., Shao J., Jiang Z., Chen J., Gu S., Yu S., Zheng K., Jia L. Drug enterohepatic circulation and disposition: constituents of systems pharmacokinetics. *Drug Discovery Today*. 2014; 19 (3): 326-340.
- Gao Y., Wang Y., Ma Y., Yu A., Cai F., Shao W., Zhai G. Formulation optimization and *in situ* absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009; 71: 306-314.
- George J., Singh M., Srivastava A.K., Bhui K., Roy P., Chaturvedi P.K., Shukla Y. Resveratrol and black tea polyphenol combination synergistically suppress mouse skin tumors growth by inhibition of activated MAPKs and p53. *Plos One*. 2011; 6 (8): 1-12.
- Gescher A., Steward W.P., Brown K. Resveratrol in the management of human cancer: how strong is the clinical evidence? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013; 1290: 12-20.
- Gibellini L., Pinti M., Nasi M., Montagna J.P., De Biasi S., Roat E., Bertocelli L., Cooper E.L., Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011: 1-15.
- Gliemann L., Schmidt J.F., Olesen J., Bienso R.S., Peronard S.L., Grandjean S.U., Hellsten Y. Resveratrol blunts the positive effects of exercise training on cardiovascular health in aged men. *The Journal of Physiology*. 2013; 591: 5047-5059.
- Goldberg D.M., Yan J., and Soleas G.J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*. 2003; 36: 79-87.
- Gregoriadis G. *Liposome technology*. London, UK: Informa Healthcare. 2006.
- Gu Z., Shi X., Omari-Siaw E., Zhu Y., Li H., Guo M., Yang X., Yu J.N., Xu X. Self-microemulsifying sustained-release pellet of *Ginkgo biloba* extract: Preparation, *in vitro* drug release and pharmacokinetics study in beagle dogs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017; 37: 184-193.
- Gülçin I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010; 11 (1): 210-218.

- Guo Y., Mah E. and Bruno R.S. Quercetin bioavailability is associated with inadequate plasma vitamin C status and greater plasma endotoxin in adults. *Nutrition*. 2014; 30: 1279-1286.
- Guoqing L., Huafeng Z., Jing Z., Zemin Y., Mingxing D., Yingfang L., Qiang X. Preparation and characterisation of a soy lecithin-based self-microemulsifying drug delivery system of resveratrol. *Micro and Nano Letters*. 2014, 9 (9): 561–565.
- Gursoy R.N. and Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2004; 58 (3): 173–182.
- Gutiérrez J.M., González C., Maestro A., Solè I., Pey C.M. Nolla J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2008; 13 (4): 245–251.
- Hanh D.N., Mitrevej A., Sathirakul K., Peungvicha P., Sinchaipanid N. Development of phyllanthin-loaded self-microemulsifying drug delivery system for oral bioavailability enhancement. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015; 41 (2): 207-217.
- Harwood M., Danielewska-Nikiel B., Borzelleca J.F., Flamm G.W., Williams G.M., Lines T.C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 2179-2205.
- Hauss D.J. Oral Lipid-based formulation enhancing the bioavailability of poorly water soluble drugs. New Jersey: Bristol-Myers Squibb Company Princeton. USA, 2007.
- Heijnen C.G, Haenen G.R., Minou Oostveen R., Stalpers E.M. and Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: The structure activity relationship revisited. *Free Radical Research*. 2002; 36: 575-581.
- Hertog M.G., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands, *Nutrition Cancer*. 1993; 20 (1): 21-29.
- Hintzen F., Perera G., Hauptstein S., Muller C., Laffleur F., Bernkop-Schnurch A. *In vivo* evaluation of an oral self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for leuprorelin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014; 472 (1-2): 20-26.
- Hoar T.P. and Schulman J.H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. *Nature*. 1943; 152: 102-103.

- Holthoff J.H., Woodling K.A., Doerge D.R., Burns S.T., Hinson J.A., Mayeux P.R. Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 80: 1260-1265.
- Hsieh T.Z.E.-C. and Wu J.M. Targeting CWR22Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals EGCG, Genistein and Quercetin. 2009; 29: 4025-4032.
- Iacopini P., Baldi M., Storchi P. and Sebastiani L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008; 21: 589-598.
- Igura K., Ohta T., Kuroda Y., Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. *Cancer Letters*. 2001; 171: 11-16.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Stability ICH Harmonised tripartite guideline: Testing of New Drug Substances and Products. 2003; 1-17.
- Jaisamut P., Wiwattanawongsa K., Wiwattanapatapee R. A novel self-microemulsifying system for the simultaneous delivery and enhanced oral absorption of curcumin and resveratrol. *Planta Medica*. 2017; 83 (5): 461-467.
- Jang M. Cancer Chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997; 275 (5297): 218-220.
- Jannin V., Musakhanian J., Marchaud D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60: 734-746.
- Jeong S.M., Kang M.J., Choi H.N., Kim J.H., Kim J.I. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutrition Research and Practice*. 2012; 6: 201-207.
- Jeong, J.H., An, J.Y., Kwon, Y.T., Rhee, J.G., & Lee, Y.J. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009; 106: 73-82.
- Jia Z., Zhu H., Misra B.R., Mahaney J.E., Li Y., Misra H.P. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2008; 313: 187-194.
- Johnson J.J., Nihal M., Siddiqui I.A., Scarlett C.O., Bailey H.H., Mukhtar H., and Ahmad N. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Molecular nutrition & food research*. 2011; 55 (8): 1169-1176.
- Jose S., Anju S.S., Cinu T.A., Aleykutty N.A., Thomas S., Souto E.B. *In vivo* pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid

- nanoparticles for brain delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2014; 474 (1-2): 6-13.
- Juan M.E., Wenzel U., Daniel H., Planas JM. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56 (12): 4813-4818.
- Junsi M., Siripongvutikorn S., Yupanqui C.T. and Usawakesmanee W. Phenolic and flavonoid compounds in aqueous extracts of *Thunbergia laurifolia* leaves and their effect on the toxicity of the carbamate insecticide methomyl to murine macrophage cells. *Functional Foods in Health and Disease*. 2017; 7 (7): 529-544.
- Kakran M., Sahoo N.G., Li L. Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011; 8: 121-171.
- Kalepu S., Manthina M., Padavala V. Oral lipid-based drug delivery systems—an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2013; 3 (6): 361-372.
- Kapetanovic I.M., Muzzio M., Huang Z., Thompson T.N., McCormick D.L. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 68 (3): 593-601.
- Katsube T., Imawaka N., Kawano Y., Yamazaki Y., Shiwaku K., Yamane Y. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2006; 97: 25-31.
- Kiesewtter H., Koscielny J., Kalus U., Vix J-M., Peil H., Petrini O., van Toor B.S.J., de Mey C. Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia *Vitis viniferae*) in chronic venous insufficiency (Stages I-II). *Arzneimittelforschung*. 2000; 50 (2): 109-117.
- Kim H., Seo E.M., Sharma A.R., Ganbold B., Park J., Sharma G., Kang Y.H., Song D.K., Lee S.S., Nam J.S. Regulation of Wnt signaling activity for growth suppression induced by quercetin in 4T1 murine mammary cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2013; 43: 1319-1325.
- Kim W.K., Bang M.H., Kim E.S., Kang N.E., Jung K.C., Cho H.J., Park J.H. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005; 16: 155–162.
- Kleemann R., Verschuren L., Morrison M., Zadelaar S., van Erk M.J., Wielinga P.Y., Kooistra T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects

- of quercetin in human *in vitro* and *in vivo* models. *Atherosclerosis*. 2011; 218 (1): 44-52.
- Kukongviriyapan U., Sompamit K., Pannangpetch P., Kukongviriyapan V. and Donpunha W. Preventive and therapeutic effects of quercetin on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and vascular dysfunction in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2012; 90: 1345-1353.
- Kumar S., Lather V., Pandita D. Stability indicating simplified HPLC method for simultaneous analysis of resveratrol and quercetin in nanoparticles and human plasma. *Food Chemistry*. 2016; 197 (Pt A): 959-964.
- Landi-Librandi A.P., Chrysostomo T.N., Caleiro Seixas Azzolini A.E., Marzocchi-Machado C.M., de Oliveira C.A. and Lucisano-Valim Y.M. Study of quercetin-loaded liposomes as potential drug carriers: *In vitro* evaluation of human complement activation. *Journal of Liposome Research*. 2012; 22: 89-99.
- Lee J.H., Song M.Y., Song E.K., Kim E.K., Moon W.S., Han M.K., Park J.W., Kwon K.B., Park B.H. Overexpression of SIRT1 protects pancreatic β -cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor- κ B signaling pathway. *Journal of Diabetes*. 2009; 58 (2): 344-351.
- Lei C.S., Hou Y.C., Pai M.H., Lin M.T., Yeh S.L. Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: *in vitro* and *in vivo* studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018; 51: 105-113.
- Lesjak M., Beara I., Simin N., Pintać D., Majkić T., Bekvalac K., Orčić D., Mimica-Dukić N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*. 2018; 40: 68-75.
- Li C., Wang T., Zhang C., Xuan J., Su C. and Wang Y. Quercetin attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Gene*. 2016; 577 (2): 275-280.
- Li H., Zhao X., Ma Y., Zhai G., Li L., Lou H. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2009; 133: 238-244.
- Li Y., Shin Y.G., Chongwoo Yu.C., Jerome W., Kosmeder J.W., Hirschelman W.H., John M. Pezzuto J.M. and van Breemen R.B. Increasing the throughput and productivity of Caco-2 cell permeability assays using liquid Chromatography-Mass Spectrometry: application to resveratrol absorption and metabolism. 2003; 6: 757-767.

- Liang J., Tian S., Han J., Xiong P. Resveratrol as a therapeutic agent for renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Renal Failure*. 2014; 36 (2): 285-291.
- Luangaram S., Kukongviriyapan U., Pakdeechote P., Kukongviriyapan V. and Pannangpetch P. Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 448-455.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79: 727-747.
- Manach C., Morand C., Demigné C., Texier O., Régéat F., Rémésy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters*. 1997; 409 (1): 12-16.
- Marier J.F., Vachon P., Gritsas A., Zhang J., Moreau J.P., Ducharme M.P. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002; 302 (1): 369-373.
- Maurya A.K. and Vinayak M. Modulation of PKC signaling and induction of apoptosis through suppression of reactive oxygen species and tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1): Key role of quercetin in cancer prevention. *Tumor Biology*. 2015; 36: 8913-8924.
- Meng X., Maliakal P., Lu H., Lee M.J., Yang C.S. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 935-942.
- Mizutani K., Ikeda K., Kawai Y., Yamori Y. Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*. 2000; 46:78-83.
- Monthakantirat O., De-Eknamkul W., Umehara K., Yoshinaga Y., Miyase T., Warashina T., and Noguchi H. Phenolic constituents of the rhizomes of the Thai medicinal plant *belamcanda chinensis* with proliferative activity for two breast cancer cell lines. *Journal of Natural Products*. 2005; 68 (3): 361-364.
- Moon Y.J., Wang L., Cenzo D.R., Morris M.E. Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 2008; 29: 205-217.
- Muangthai P., Jaruwat Daengchat J. and Congcharoen J. Evaluation on total phenolic compound content and resveratrol content in Thai YaDong. *Journal of Applied Chemistry*. 2014; 7 (6): 43-49.

- Murakami A., Ashida H., Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*. 2008; 269 (2): 315–325.
- Murias M., Jager W., Handler N., Erker T., Horvath Z., Szekeres T., et al. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochemical pharmacology*. 2005; 69 (6): 903-912.
- Murota K. and Terao J. Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Letters*. 2005; 579: 5343-5346.
- Nait C.M., Al A.A., Peluso J., Muller C.D., Ubeaud G. Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009; 61: 1473-1483.
- Narayanan N.K., Nargi D., Randolph C., Narayanan B.A. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. *International journal of cancer*. 2009; 125 (1): 1-8.
- Nishijima, T., Takida, Y., Saito, Y., Ikeda T., Iwai K. Simultaneous ingestion of high-methoxy pectin from apple can enhance absorption of quercetin in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 2015; 11: 1531-1538.
- O'Driscoll C.M. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002; 15: 405 –415.
- O'Neil M.J., Heckelman P.E., Koch, C.B., Roman, K.J., Kenny, C.M., and D'Arecca, M.R. (Eds.). *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 14th ed. Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station NJ, 2006.
- Oerlemans C., Bult W., Bos M., Storm G., Nijssen J.F., Hennink W.E. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical Research*. 2010; 27 (12): 2569-2589.
- Palsamy P., Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Journal of Cellular Physiology*. 2010; 224: 423-432.
- Park S.Y., Lee Yun-Kyung, Park Ock-Jin., Kim Yong-Min. The synergistic effect of combined treatment of resveratrol and quercetin on AMPK activity in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer prevention research*. 2009; 14: 218-224.
- Patel A.R., Velikov K.P. Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *LWT-Food Science and Technology*. 2011; 44 (9): 1958-1964.

- Patel K., Brown V.A., Jones D.J., Britton R.G., Hemingway D., Miller A.S., West K.P., Booth T.D., Perloff M., Crowell J.A., Brenner D.E., Steward W.P., Gescher A.J., Brown K. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Journal of Cancer Research*. 2010; 70 (19): 7392-7399.
- Patel V.B., Misra S., Patel B.B., Majumdar A.P. Colorectal cancer: chemopreventive role of curcumin and resveratrol. *Nutrition and Cancer*. 2010; 62 (7): 958-967.
- Pathak A., Jain V., Nagariya A.K., Singh R., Nayak S., Bansal P., Gupta V., Kumar S., Singh H. Recent advances in self emulsifying drug delivery system-A review. *Drug Invention Today*. 2010; 2 (2): 123-129.
- Petersen B., Egert S., Bosy-Westphal A., Muller M.J., Wolffram S., Hubbermann E.M., Rimbach G., Schwarz K. Bioavailability of quercetin in humans and the influence of food matrix comparing quercetin capsules and different apple sources. *Food research international*. 2016; 88: 159-165.
- Planas J.M., Alfaras I., Colom H., Juan M.E. The bioavailability and distribution of transresveratrol are constrained by ABC transporters. *Arch Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 527 (2): 67-73.
- Porter C.J., Trevaskis N.L., Charman W.N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007; 6 (3): 231-248.
- Pouton C.W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 11 Suppl. 2: 93 -98.
- Povichit N., Phrutivorapongkul A., Suttajit M., and Leelapornpisid P. Antglycation and antioxidant activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 2010; 4 (3): 454-461.
- Price K.R., Bacon J.R. and Rhodes M.J. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 45: 938-942.
- Priprem A., Watanatorn J., Sutthiparinyanont S., Phachonpai W. and Muchimapura S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2008; 4 (1): 70-78.
- Psahoulia F.H., Drosopoulos K.G., Doubravska L., Andera L., Pintzas A. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the

- accumulation of death receptors in lipid rafts. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007; 6 9: 2591–2599.
- Ramadori G., Gautron L., Fujikawa T., Vianna C.R., Elmquist J.K., Coppari R. Central administration of resveratrol improves diet-induced diabetes. *Endocrinology*. 2009; 150 (12): 5326-5333.
- Rameova S., Sokolova R., Degano I., Bulickova J., Zabka J., Gal M. On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012; 402 (2): 975-982.
- Rangel-Ordóñez L., Noldner M., Schubert-Zsilavec M. and Wurglics M. Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Planta Medica*. 2010; 76: 1683-1690.
- Rattanachaiyunsopon P., Phumkhachorn P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2010; 110 (5): 614-619.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 26: 1231-1237.
- Roberts M.S., Magnusson B.M., Burczynski F.J., Weiss M. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41 (10): 751-790.
- Ruckenstein E. and Chi J.C. Stability of microemulsion. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*. 1997; 71: 1690-1707.
- Saah S., Kaewkroek K. and Wiwattanapatapee R. Cytotoxic effect of surfactants used in self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) on normal and cancer gastrointestinal cell lines. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2018; 37 (11): 2244-2253
- Sale S., Verschoyle R.D., Boocock D., Jones D.J., Wilsher N., Ruparelia K.C., Potter G.A., Farmer P.B., Steward W.P., Gescher A.J. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *British journal of cancer*. 2004; 90 (3): 736-744.
- Samarakoon S.M., Chandola H.M., Shukla V.J. Evaluation of antioxidant potential of Amalakayas Rasayana: A polyherbal Ayurvedic formulation. *International Journal of Ayurveda Research*. 2011; 2: 23-28.

- Schlachterman A., Valle F., Wall K.M., Azios N.G., Castillo L., Morell L., Washington A.V., Cubano L.A. and Dharmawardhane S.F. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Translational oncology*. 2008; 1 (1): 19-27.
- Seljak K.B., Berginc K., Trontelj J., Zvonar A., Kristl A., Gasperlin M. A self-microemulsifying drug delivery system to overcome intestinal resveratrol toxicity and presystemic metabolism. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2014; 103 (11): 3491-3500.
- Sermkaew N., Ketjinda W., Boonme P., Phadoongsombut N., Wiwattanapatapee R. Liquid and solid self-microemulsifying drug delivery systems for improving the oral bioavailability of andrographolide from a crude extract of *Andrographis paniculata*. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2013; 50 (3-4): 459-466.
- Sesink A.L., Arts I.C., de Boer V.C., Breedveld P., Schellens J.H., Hollman P.C., Russel F.G. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Molecular Pharmacology*. 2005; 67: 1999-2006.
- Sharma S., Misra C.S., Arumugam S., Roy S., Shah V., Davis J.A., Shirumalla R.K., Ray A. Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type 2 diabetes. *Phytotherapy Research*. 2011, 25 (1): 67-73.
- Shi Y. and Williamson G. Comparison of the urinary excretion of quercetin glycosides from red onion and aglycone from dietary supplements in healthy subjects: A randomized, single-blinded, cross-over study. *Food and Function*. 2015; 6: 1443-1448.
- Shono Y., Nishihara H., Matsuda Y., Furukawa S., Okada N., Fujita T., Yamamoto A. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by Cremophor EL and other surfactants by an *in vitro* diffusion chamber method using the isolated rat Intestinal Membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004; 93 (4): 877-885.
- Shoskes D.A., Zeitlin S.I., Shahed A., Rajfer J. Quercetin in men with category III chronic prostatitis: A preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. *Urology* . 1999; 54 (6): 960-963.
- Sibel K., Guliz A., Ayfer Y., Cigdem A., Taner D. Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cell. *Neural Regeneration Research*. 2013; 8 (6): 485-495.

- Silva M.M., Santos M.R., Caroo G., Rocha R., Justino G. and Mira L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radical Research*, 2002; 36: 1219-1227.
- Singh A.K., Chaurasiya A., Awasthi A., Mishra G., Asati D., Khar R.K., Mukherjee R. Oral bioavailability enhancement of exemestane from self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2009; 10 (3): 906-916.
- Singh S.K., Verma P.R., Razdan B. Glibenclamide-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system: development and characterization. *Drug development and industrial pharmacy*. 2010; 36 (8): 933-945.
- Sokolová R., Ramešová Š., Degano I., Hromadová M., Gál M., Žabka J. The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chemical Communications*. 2012; 48 (28): 3433-3435.
- Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. *Clinical Biochemistry*. 1997; 30 (2): 91-113.
- Stockert J.C., Blazquez-Castro A., Canete M., Horobin R.W., Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*. 2012; 114 (8): 785-796.
- Su J.L., Yang C.Y., Zhao M., Kuo M.L., Yen M.L. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282 (27): 19385-19398.
- Sun C., Zhang F., Ge X., Yan T., Chen X., Shi X., Zhai Q. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metabolism*. 2007; 6: 307-319.
- Szkudelski T., Szkudelska K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochimica et biophysica acta*. 2015; 1852 (6): 1145-1154.
- Takahashi M., Inafuku K., Miyagi T., Oku H., Wada K., Imura T., Kitamoto D. Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *Journal of Oleo Science*. 2007; 56; 35-42.
- Timmers S., Konings E., Bilet L., Houtkooper R.H., van de Weijer T., Goossens G.H., Hoeks J., van der Krieken S., Ryu D., Kersten S., Moonen-Kornips E., Hesselink M.K., Kunz I., Schrauwen-Hinderling V.B., Blaak E.E., Auwerx J., Schrauwen P. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism*. 2011; 14: 612-622.

- Tran T.H., Guo Y., Song D., Bruno R.S., Lu X. Quercetin-containing self-nanoemulsifying drug delivery system for improving oral bioavailability. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2014; 103 (3): 840-852.
- Trela B.C. and Waterhouse A.L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996; 44: 1253-1257.
- Trincheri N.F., Nicotra G., Follo C., Castino R. and Isidoro C. Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D *Journal of Carcinogenesis*. 2007; 28 (5): 922-931.
- United States Pharmacopeia (USP), U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. 2003.
- Urpi-Sarda M., Jauregui O., Lamuela-Raventos R.M., Jaeger W., Miksits M., Maria-Isabel Covas Maria-Isabel and Andres-Lacueva. Uptake of diet resveratrol into the human lowdensity lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2005; 77: 3149-3155.
- Utesch D., Feige K., Dasenbrock J., Broschard T.H., Harwood M., Danielewska-Nikiel B., Lines T.C. Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin. *Mutation Research*. 2008; 654 (1): 38-44.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M.M. and Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006; 160: 1-40.
- Vian M.A., Tomao V., Gallet S., Coulomb P.O., Lacombe J.M. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns, *Journal of Chromatography A*. 2005; 1085: 224-229.
- Vidya Priyadarsini R., Senthil Murugan R., Maitreyi S., Ramalingam K., Karunagaran D., Nagini S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-kappaB inhibition. *European journal of pharmacology*. 2010; 649 (1-3): 84-91.
- Walle T., Hsieh F., DeLegge M.H., Oatis J.E.Jr., Walle U.K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004; 32: 1377-1382.
- Walle T., Walle U.K. and Halushka P.V. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *The Journal of Nutrition*. 2001; 131: 2648-2652.

- Wang W., Sun C., Mao L., Ma P., Liu F., Yang J., Gao Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016; 56: 21-38.
- Wang X.Q. and Zhang Q. Microemulsion for Drug Solubilization and drug Delivery: Editors Douroumis D. and Fahr A. 2013; 287-319.
- Waris, G., and Ahsan, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis*. 2006; 5: 14.
- Weldin J., Jack R., Dugaw K. and Kapur R.P. Quercetin, an over-the-counter supplement, causes neuroblastoma-like elevation of plasma homovanillic acid *Pediatric and Developmental Pathology*. 2003; 6: 547-551.
- Wiczkowski W., Romaszko J., Bucinski A., Szawara-Nowak D., Honke J., Zielinski H. and Piskula M.K. Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable Than Its Glucosides. *The Journal of Nutrition*. 2008; 138: 885-888.
- Williams L.D., Burdock G.A., Edwards J.A., Beck M., Bausch J. Safety studies conducted on high-purity transresveratrol in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47: 2170-2182.
- Williamson G., Aeberli I., Miguet L., Zhang Z., Sanchez M.B., Crespy V., Barron D., Needs P., Kroon P.A., Glavinas H., Krajcsi P., Grigorov M. Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2). *Drug Metabolism & Disposition*. 2007; 35: 1262-1268.
- Wong C.C., Akiyama Y., Abe T., Lippiat J.D., Orfila C., Williamson G. Carrier-mediated transport of quercetin conjugates: involvement of organic anion transporters and organic anion transporting polypeptides. *Biochemical Pharmacology*. 2012; 84 (4): 564-570.
- Wong R.H., Howe P.R., Buckley J.D., Coates A.M., Kunz I., Berry N.M. Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2011; 21 (11): 851-856.
- Wu C-F., Yang J-Y., Wang F., Wang X-X. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chinese journal of natural medicines*. 2013; 11 (1): 1-15.
- Wu L., Qiao Y., Wang L., Guo J., Wang G., He W., Yin L., Zhao J. A self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for a novel medicative compound against depression: a preparation and bioavailability study in rats. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2015; 16 (5): 1051-1058.

- Wungsintaweekul B., Umehara K., Miyase T. and Noguchi H. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (Smilacaceae). *Phytochemistry*. 2011; 72: 495-502.
- Xu W.K., Jiang H., Yang K., Wang Y.Q., Zhang Q., Zuo J. Development and *in vivo* evaluation of self-microemulsion as delivery system for alpha-mangostin. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2017; 33 (3): 116-123.
- Yáñez J.A., Wang S.W.J., Knemeyer I.W., Wirth M.A., Alton K.B. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011; 63 (10–11): 923–942.
- Yang F.F., Zhou J., Hu X., Cong Z.Q., Liu C.Y., Pan R.L., Chang Q., Liu X.M., Liao Y.H. Improving oral bioavailability of resveratrol by a UDP-glucuronosyltransferase inhibitory excipient-based self-microemulsion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 114: 303-309.
- Yang J.Y., Della-Fera M.A., Rayalam S., Ambati S., Hartzell D.L., Park H.J., Baile C.A. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life sciences*. 2008; 82(19-20): 1032-1039.
- Yang Y., Zhang Z., Li S., Ye X., Li X., He K. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*. 2014; 92:133-147.
- Yen C.C., Chang C.W., Hsu M.C., Wu Y.T. Self-nanoemulsifying drug delivery system for resveratrol: enhanced oral bioavailability and reduced physical fatigue in rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18: 1853-1866.
- Zamin L.L., Filippi-Chiela E.C., Dillenburg-Pilla P., Horn F., Salbego C., Lenz G. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer science*. 2009; 100 (9): 1655-1662.
- Zhou J., Li S.X., Wang W., Guo X.Y., Lu X.Y., Yan X.P., Huang D., Wei B.Y., and Cao L. Variation in the levels of mulberroside A, oxyresveratrol and resveratrol in mulberries in different seasons and during growth. *The Scientific World Journal*. 2013; 19: 1-7.
- Zupančič. Š., Lavrič Z., Kristl J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015; 93: 196-204.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ผลการศึกษาเพิ่มเติม

ตารางที่ 20 Settings of the HPLC condition for resveratrol

| No. | Condition HPLC | | | | | | Retention time of resveratrol (min) | Categories |
|-----|------------------|-----|---------|-----------------------|--------------------|---------------|---|--|
| | Mobile phase (%) | | | Flow rate (mL/min) | Wavelength (nm) | Time (min) | | |
| | MeOH | ACN | 0.1% PA | | | | | |
| 1 | 60 | 10 | 30 | 0.8 | 306 | 10 | 4.0 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 2 | 60 | 10 | 30 | 0.8 | 307 | 10 | 4.2 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 3 | 50 | 10 | 40 | 0.8 | 307 | 10 | 5.5 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 4 | 40 | 10 | 50 | 0.8 | 307 | 10 | 8.6 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 5 | 65 | 10 | 25 | 0.8 | 307 | 10 | 3.8 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 6 | 55 | 10 | 35 | 1.0 | 307 | 10 | 3.8 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 7 | 55 | 10 | 35 | 0.8 | 307 | 10 | 4.5 | Peak มีลักษณะเดี่ยว ไม่มี peak อื่นปน |
| 8 | 55 | 15 | 30 | 0.8 | 307 | 10 | 4.6 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 9 | 55 | 5 | 40 | 0.8 | 307 | 10 | 5.4 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 10 | 50 | 15 | 35 | 0.8 | 307 | 10 | 4.0 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |

ACN=Acetonitrile

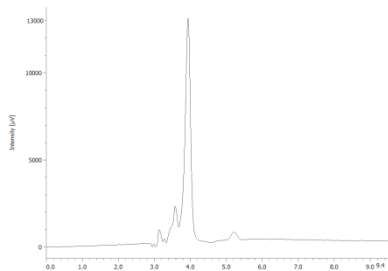
PA=Phosphoric acid

ตารางที่ 21 Settings of the HPLC condition for quercetin

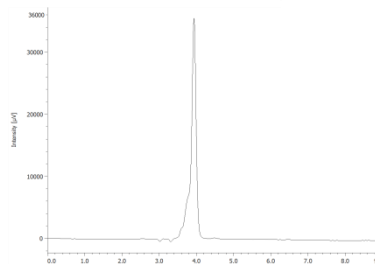
| No. | Condition HPLC | | | | Wavelength (nm) | Time (min) | Retention time of quercetin (min) | Categories |
|-----|------------------|-----|---------|-----------------------|--------------------|---------------|---|--|
| | Mobile phase (%) | | | Flow rate (mL/min) | | | | |
| | MeOH | ACN | 0.1% PA | | | | | |
| 1 | 60 | 10 | 30 | 0.8 | 255 | 10 | 5.0 | peak มีลักษณะเป็นเชื่อมติดกันกับ noise ที่เกิดขึ้น |
| 2 | 55 | 10 | 35 | 0.8 | 256 | 10 | 6.5 | Peak มีลักษณะเดี่ยว ไม่มี peak อื่นปน |

ACN=Acetonitrile

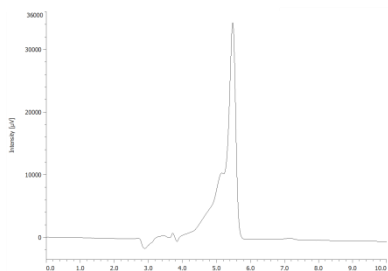
PA=Phosphoric acid



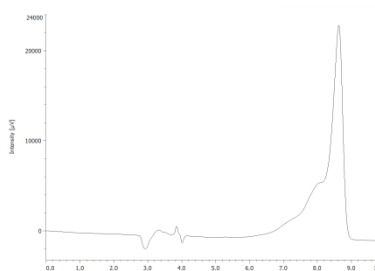
Condition No. 1



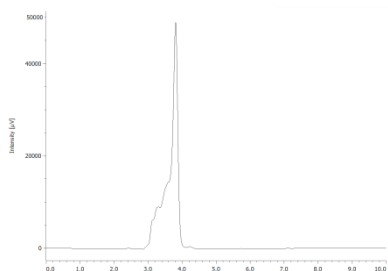
Condition No. 2



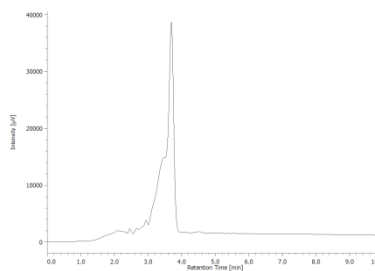
Condition No. 3



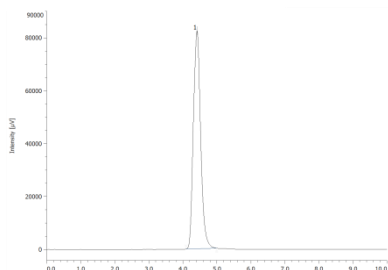
Condition No. 4



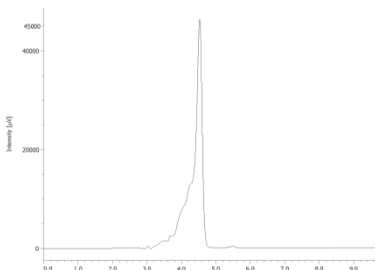
Condition No. 5



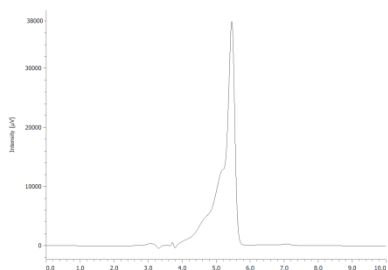
Condition No. 6



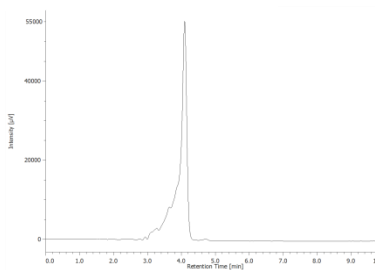
Condition No. 7



Condition No. 8

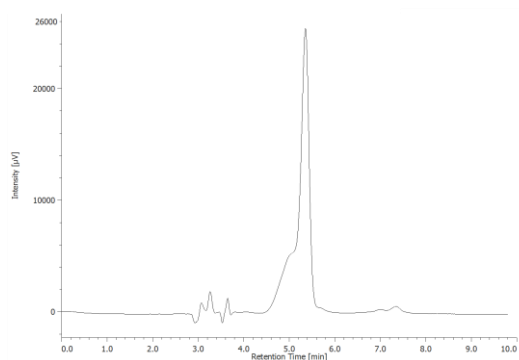


Condition No. 9

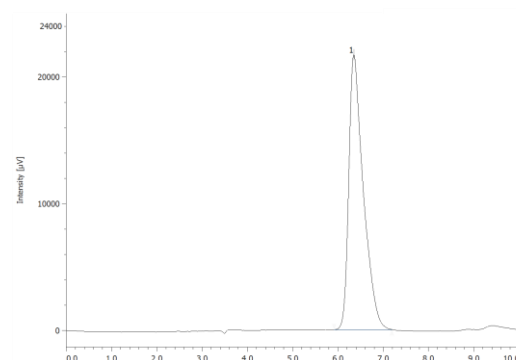


Condition No. 10

รูปที่ 27 Illustration of peak with trying out HPLC condition of resveratrol

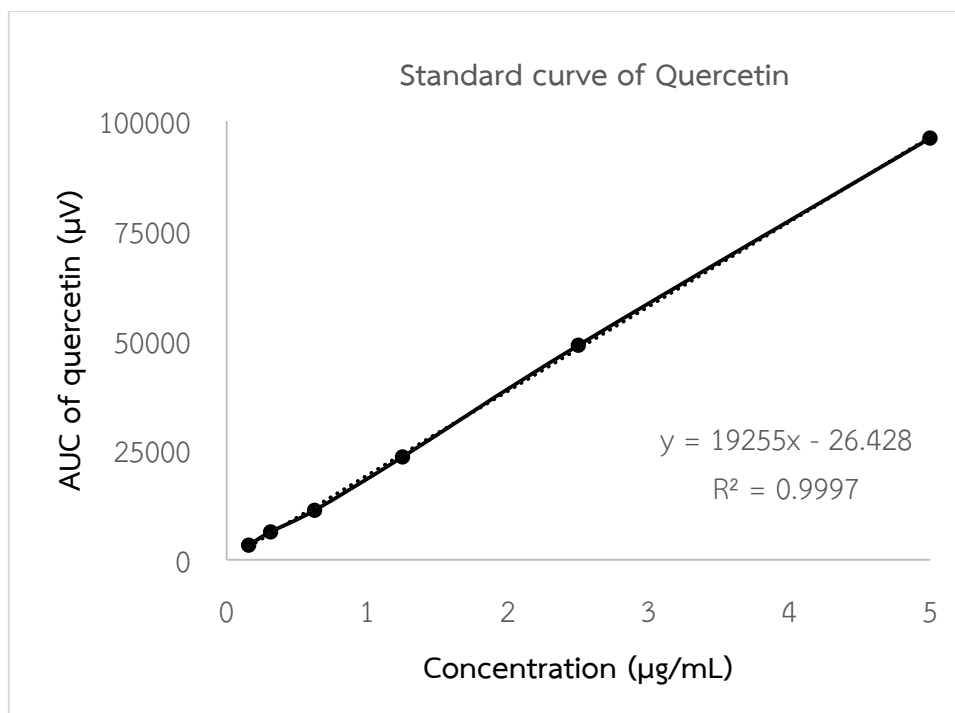


Condition No. 1

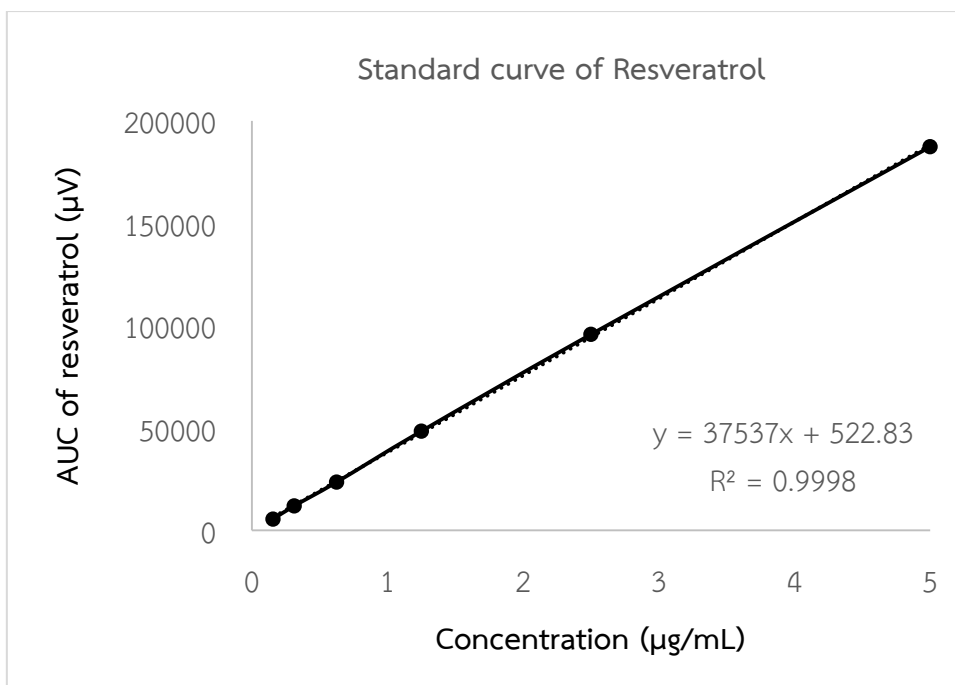


Condition No. 2

รูปที่ 28 Illustration of peak with trying out HPLC condition of quercetin



รูปที่ 29 Standard curve of quercetin with HPLC analysis



รูปที่ 30 Standard curve of resveratrol with HPLC analysis

ตารางที่ 22 The percents cumulative release of quercetin and resveratrol, Mean±SD. (n=6)

| Time (min) | % cumulative release of quercetin | | | % cumulative release of resveratrol | | |
|------------|-----------------------------------|------------|------------------|-------------------------------------|------------|------------------|
| | QR-SME | Q-SME | QR-Nonformulated | QR-SME | R-SME | QR-Nonformulated |
| 5 | 15.19±0.04 | 14.03±0.60 | 0.00±0.00 | 9.16±0.36 | 5.58±0.57 | 0.43±0.01 |
| 10 | 40.50±0.51 | 30.35±0.55 | 0.00±0.00 | 42.20±1.05 | 29.13±3.69 | 0.50±0.11 |
| 15 | 62.23±0.24 | 48.59±1.51 | 0.00±0.00 | 72.61±4.36 | 57.77±2.60 | 1.55±0.52 |
| 30 | 75.88±1.44 | 68.91±1.37 | 0.28±0.01 | 86.32±2.32 | 74.64±4.22 | 2.19±0.81 |
| 45 | 86.75±2.16 | 78.85±0.19 | 0.44±0.01 | 92.76±3.49 | 83.27±3.08 | 3.16±0.53 |
| 60 | 91.21±1.23 | 84.59±1.08 | 0.53±0.01 | 93.23±4.38 | 85.36±4.76 | 3.31±0.28 |
| 90 | 93.80±0.44 | 85.94±1.12 | 0.66±0.01 | 93.65±2.15 | 86.54±3.95 | 3.18±1.18 |
| 120 | 94.04±0.86 | 86.55±1.13 | 0.71±0.01 | 94.05±1.92 | 88.32±2.23 | 3.27±2.27 |

ตารางที่ 23 Cytotoxicity of AGS cells treated with different concentrations of QR-SME, Q-SME, R-SME, Blank-SME Mean±SD. (n=4)

| Formulations | % cell viability (μM) | | | | | | | IC ₅₀ (μM) |
|--------------|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------------------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 50 | 60 | 80 | 100 | |
| QR-SME | 80.65±1.51 | 65.92±1.66 | 64.88±2.08 | 49.07±2.93 | 47.53±2.26 | 8.62±0.38 | 4.81±0.11 | 48.21±0.42 |
| Q-SME | 89.86±1.96 | 87.50±2.46 | 83.15±1.88 | 64.56±3.83 | 16.37±1.53 | 7.56±0.31 | 5.41±0.35 | 50.46±2.02 |
| R-SME | 81.84±3.80 | 80.22±1.01 | 76.83±2.91 | 58.21±0.78 | 50.44±4.34 | 6.92±0.41 | 3.83±0.29 | 59.15±2.37 |
| Blank-SME | 90.53±4.17 | 77.41±1.45 | 74.51±1.36 | 72.13±2.86 | 70.50±3.28 | 21.24±1.64 | 3.55±0.44 | 67.64±1.21 |

ตารางที่ 24 Cytotoxicity of HT-29 cells treated with different concentrations of QR-SME, Q-SME, R-SME, Blank-SME Mean±SD. (n=4)

| Formulations | % cell viability (μM) | | | | | | | IC ₅₀ (μM) |
|--------------|------------------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 50 | 60 | 80 | 100 | |
| QR-SME | 71.40±0.36 | 66.67±2.46 | 59.03±1.42 | 38.82±1.16 | 37.10±1.22 | 33.33±1.53 | 27.31±1.22 | 38.89±1.20 |
| Q-SME | 81.01±2.17 | 72.71±1.10 | 58.36±0.35 | 44.34±0.27 | 44.12±0.36 | 42.07±0.54 | 39.91±0.77 | 42.70±0.16 |
| R-SME | 91.83±1.13 | 70.32±2.18 | 64.09±1.15 | 42.80±0.64 | 36.13±0.74 | 28.17±1.03 | 20.22±1.01 | 43.25±0.61 |
| Blank-SME | 98.50±2.50 | 83.01±1.78, | 65.06±3.37 | 51.82±0.88 | 42.74±1.06 | 31.52±1.13 | 18.38±0.36 | 51.07±0.85 |

ตารางที่ 25 Cytotoxicity of Caco-2 cells treated with different concentrations of QR-SME, Q-SME, R-SME, Blank-SME Mean±SD. (n=4)

| Formulations | % cell viability (µM) | | | | | | | IC ₅₀ (µM) |
|--------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 50 | 60 | 80 | 100 | |
| QR-SME | 72.85±0.94 | 66.85±0.23 | 50.88±0.82 | 39.34±0.20 | 27.61±1.00 | 19.76±0.20 | 16.71±0.31 | 36.17±0.46 |
| Q-SME | 81.30±0.30 | 73.52±0.90 | 51.85±0.70 | 38.24±0.28 | 34.07±0.14 | 28.89±0.54 | 25.46±0.30 | 37.58±0.40 |
| R-SME | 74.42±0.12 | 60.76±0.71 | 47.74±0.84 | 42.47±0.40 | 34.26±0.58 | 25.58±0.40 | 19.58±0.47 | 34.35±0.98 |
| Blank-SME | 79.63±1.01 | 71.30±1.06 | 63.70±0.81 | 50.19±0.31 | 44.81±0.81 | 25.19±0.43 | 19.91±0.34 | 51.53±0.62 |

ตารางที่ 26 The plasma concentration of quercetin and resveratrol, Mean±SD. (n=6)

| Time (min) | Plasma concentration of quercetin ($\mu\text{g h /mL}$) | | | Plasma concentration of resveratrol ($\mu\text{g h /mL}$) | | |
|------------|---|------------------|----------------|---|------------------|----------------|
| | QR-SME | Q-SME plus R-SME | QR- suspension | QR-SME | Q-SME plus R-SME | QR- suspension |
| 15 | 0.38±0.08 | 0.34±0.22 | 0.15±0.03 | 1.23±0.23 | 0.77±0.22 | 0.43±0.012 |
| 30 | 0.31±0.06 | 0.28±0.12 | 0.17±0.02 | 0.47±0.13 | 0.35±0.06 | 0.28±0.05 |
| 45 | 0.36±0.20 | 0.19±0.10 | - | 0.65±0.17 | 0.17±0.05 | 0.10±0.09 |
| 60 | 0.30±0.06 | 0.19±0.04 | - | 0.22±0.11 | 0.19±0.05 | 0.12±0.05 |
| 90 | 0.69±0.17 | 0.30±0.06 | - | 0.35±0.17 | 0.34±0.14 | 0.09±0.04 |
| 120 | 0.49±0.10 | 0.25±0.05 | - | 0.51±0.16 | 0.21±0.06 | 0.11±0.05 |
| 180 | - | - | - | 0.37±0.10 | 0.16±0.07 | 0.11±0.04 |
| 360 | - | - | - | 0.33±0.08 | 0.12±0.02 | 0.10±0.04 |

ภาคผนวก ข
การศึกษาเพิ่มเติม (Additional study)

| | |
|------------|---|
| ชื่อเรื่อง | การตั้งสูตรตำรับและการประเมินยาเม็ดเคี้ยวของตำรับยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 ด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง (Formulation and Evaluation of Chewable Tablets of Boon-Nak Cough Remedy Formula 1 using Dry Granulation Method) |
| ผู้เขียน | นางสาวสุภาพร วรรณ |
| สาขาวิชา | การแพทย์แผนไทย |
| ปีการศึกษา | 2561 |

บทคัดย่อ

อาการไอเป็นกลไกในการตอบสนองของร่างกายเพื่อกำจัดเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมในระบบทางเดินหายใจ ผู้ป่วยที่มีอาการไอรุนแรงต้องเผชิญกับการรบกวนของอาการในชีวิตประจำวัน และอาการนี้มักจะนำผู้ป่วยไปพบแพทย์ได้บ่อย โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

- 1) เปรียบเทียบคุณสมบัติการไหลของผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งจากวิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน
- 2) พัฒนาตำรับยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 จากรูปแบบยาน้ำเป็นรูปแบบยาเม็ดเคี้ยวที่เตรียมด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง และ
- 3) ควบคุมคุณภาพยาเม็ดที่พัฒนาจากตำรับยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 โดยประเมินคุณสมบัติการไหลของผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งด้วย 5 พารามิเตอร์ ได้แก่ Angle of repose, Bulk density, Tapped density, Compressibility index และ Hausner ratio ยาเม็ดเคี้ยวเตรียมด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง ซึ่งนำผงยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 ไปทำให้แห้งด้วยเทคนิคทำแห้งแบบพ่นฝอยและผสมเข้ากับสารช่วยต่าง ๆ แล้วเตรียมให้เป็นแกรนูลด้วยการเติมสารเพิ่มปริมาณ (แล็กโทสและเตรคัลโทส) สารช่วยหล่อลื่น (แมกนีเซียม สเตียเรต) สารช่วยแตกตัว (อะวีเซล พีเอช 102) และสารป้องกันการติด (ทัลคัม) จากนั้นนำไปตอกเป็นยาเม็ด ผลการศึกษาพบว่า ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาดของตำรับยาแก้ไอบุนนาค สูตร 1 ที่ได้จากขั้นตอนการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยด้วยวิธีการต้ม 3 เออา 1 เท่ากับร้อยละ 11.61 โดยผงยาจากสารสกัดที่ได้จากการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยมีคุณสมบัติการไหลที่ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับผงยาจากสารสกัดที่เตรียมเป็นแกรนูลแบบแห้ง สูตรตำรับที่พัฒนาขึ้นมีทั้งสิ้น 3 สูตรตำรับ (F1-F3) ที่มีปริมาณผงยาและสารช่วยแตกต่างกัน ซึ่งภายใต้การเตรียมยาเม็ดในลักษณะนี้ สูตรตำรับ F3 เป็นสูตรที่สามารถบรรจุตัวยาล์มากที่สุดต่อเม็ด การศึกษาการควบคุมคุณภาพของยาเม็ดเคี้ยว พบว่า F3 มีลักษณะทั่วไปของยาเม็ดที่ดี คือมีน้ำหนักเม็ดยาเท่ากับ 459 ± 0.01 มิลลิกรัม (ความผันแปรของน้ำหนักอยู่ในเกณฑ์ \pm ร้อยละ 5) ความกร่อนร้อยละ 0.04 ± 0.04 ความหนา 2.54 ± 0.02 มิลลิเมตร ความแข็ง 4.4 ± 0.52 กิโลกรัม และเวลาการแตกตัวของเม็ดยา 17.14 ± 0.04 นาที ทุกสูตรตำรับผ่านเกณฑ์มาตรฐานการควบคุมคุณภาพทางกายภาพของเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกา (The United States Pharmacopeia: USP) และเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร (The British Pharmacopoeia: BP) ซึ่งการปรับเปลี่ยนจากรูปแบบยาดั้งเดิมให้ทันสมัยและใช้งานง่ายขึ้นเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้มีความเหมาะสมกับแนวโน้มของรูปแบบการใช้ยาสมุนไพรในปัจจุบัน

คำสำคัญ: อาการไอ ยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 ยาเม็ดเคี้ยว สมุนไพร

ABSTRACT

A cough is the body's defense mechanism response to eliminate the pathogen or foreign body of the respiratory system. Patients who experience intense cough encounter interference of symptom in everyday lives and this symptom frequently bring them to see a physician. The objectives of this study were to: 1) compare the flow properties of crude drug powder and dry granules manufactured using different methods 2) develop Boon-Nak cough remedy formula 1 from traditional cough mixture to chewable tablet by dry granulation method 3) evaluate quality control of chewable tablets of Boon-Nak cough remedy formula 1. Five parameters of the flowability study were investigated: Angle of repose, Bulk density, Tapped density, Compressibility index and Hausner ratio of crude drug powder and dry granules. Chewable tablets were prepared by dry granulation method. Here, Boon-Nak cough remedy formula 1 powder was prepared initially using lyophilizer and it was mixed with excipients. Granules were prepared from this mixture by adding diluents (Lactose and Dextrose), lubricant (Magnesium stearate), disintegrants (Avicel PH 102), anti-adherent (Talcum) and finally compressed in to tablets. The obtained percent yield of Boon-Nak cough remedy formula 1 prepared by spray dried method with decoction 3 parts to get 1 part is 11.61 percent. Crude extract from Spray dried method has fair flowability when compared to dry granules. By choosing different amount of crude extract and excipients, three formulas (F1-F3) were prepared. Under these conditions, F3 contained the highest amount of drug loaded per tablet. Quality control study for chewable tablet was carried out and found satisfactory with general characteristics of F3: weight of tablets 459 ± 0.01 mg (weight variation within given limit ± 5 %), friability 0.04 ± 0.04 %, Thickness 2.54 ± 0.02 mm, hardness 4.4 ± 0.52 kg and disintegration time 17.14 ± 0.04 min. The physical properties of the tablets were found to be passed the standards of The United States Pharmacopeia (USP) and The British Pharmacopoeia (BP) for all formulations. The modification of modernization approaches to convert the traditional formulation and easy to use is essential to make them proper for the current trends of herbal delivery dosage forms.

Keywords: Cough, Boon-Nak Cough Remedy Formula 1, Chewable tablets, Herbals

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

จากการพัฒนาสารประกอบละลายน้ำยากสองชนิดดังกล่าวในรูปแบบของเหลวนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจเพิ่มเติมที่จะพัฒนายาสมุนไพรไทยจากการใช้แบบดั้งเดิม เช่น ยาลูกกลอน ยาฝน ยาพอก โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา น้ำ ซึ่งเป็นรูปแบบการใช้ที่นิยมมากที่สุดในอดีต แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดหลายอย่างของการใช้ยาแบบนี้ อาทิเช่น ปริมาณตัวยาสำคัญหรือขนาดที่รับประทานในแต่ละครั้งอาจไม่มีความสม่ำเสมอ ระยะเวลาการเก็บรักษาสั้น ส่งผลให้มีความคงตัวที่ไม่ดี รวมไปถึงประสิทธิภาพของการรักษาที่อาจลดน้อยลงได้ (อัจฉรา อุทิศวรรณกุล, 2536) ทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาตำรับยาจากรูปแบบยา น้ำ ให้มีรูปแบบที่ทันสมัยมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันสมุนไพรไทยได้รับความนิยมนำมาดูแล ป้องกัน รักษาและส่งเสริมสุขภาพของประชาชน ซึ่งสอดคล้องกับปัจจุบันที่ภาครัฐมีการส่งเสริมให้มีการใช้ยาสมุนไพรเพิ่มมากยิ่งขึ้น (เขาวลิต มณฑล, 2557) โดยการเจ็บป่วยหนึ่งที่พบได้บ่อยคืออาการไอ สาเหตุของอาการไออาจเกิดจากสิ่งแวดล้อม พฤติกรรม อาจส่งผลเกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคไปยังบุคคลอื่นได้ง่ายจึงทำให้เป็นปัญหาทั้งในด้านร่างกาย จิตใจ และสังคมต่อตัวผู้ป่วยเอง หากสามารถช่วยบรรเทาหรือรักษาอาการดังกล่าวได้จะช่วยลดปัญหาต่อตัวผู้ป่วยและการแพร่กระจายเชื้อโรคในสังคมได้ ซึ่งกลไกการเกิดอาการไอเริ่มจากได้รับสิ่งกระตุ้นหรือมีสารระคายเคืองในบริเวณระบบทางเดินหายใจ เช่น ฝุ่น ควัน ฝุ่นละออง เป็นต้น ไปสู่ตัวรับสัญญาณการไอที่เส้นประสาทสมองคู่ที่ 10 (vagus nerve) ไปยังศูนย์ควบคุมการไอ (cough center) ในสมองบริเวณเมดูลลา (medulla) ไปยังกล้ามเนื้อและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ เกิดการตีบแคบของหลอดลม จึงทำให้เกิดการไอขึ้น (ปารยะ อาศนะเสน, 2554: 438; Widdicombe, 2003: 17-23) ในกรณีที่ผู้ป่วยสูงอายุ การไอตื้อต่อกันอย่างต่อเนื่องอาจทำให้กระดูกอ่อนซี่โครงหักได้ หรือทำให้ถุงลมหรือเส้นเลือดฝอยในปอดแตกออกสู่อากาศเยื่อหุ้มปอด เกิดอาการหอบเหนื่อยและอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ ดังนั้นยาแก้ไอจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้ป่วยนึกถึงเมื่อมีอาการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาแก้ไอสมุนไพรที่ได้รับความนิยมมาเป็นเวลานาน ดังนั้นทางโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยแพทย์แผนไทยธีรวัฒน์ สุดขาว ซึ่งเล็งเห็นความสำคัญนี้ จึงได้คิดค้นสูตรยาแก้ไอขึ้นมาใหม่ (สิทธิบัตร ประเภททรัพย์สินทางปัญญา ลงวันที่ 10 เมษายน พ.ศ. 2558 เลขที่คำขอ 1503000578) ซึ่งใช้สมุนไพรตามบัญชียาหลักแห่งชาติที่มีสรรพคุณบรรเทาอาการไอ และยังคัดเลือกสมุนไพรอีกหลายชนิดตามหลักการแพทย์แผนไทยมาเป็นส่วนประกอบในตำรับเพื่อให้ได้รส กลิ่น และสรรพคุณที่ดี ซึ่งสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาแก้ไอนี้ ได้แก่ มะขามป้อม ชะเอมเทศ มะแว้งเครือ น้ำตาลกรวด น้ำมะนาว น้ำขิง เกลือ และเมนทอล โดยมีการเพิ่มโสมเทศซึ่งเป็นสมุนไพรที่ยังไม่พบการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาบรรเทาอาการไอร่วมกับสมุนไพรอื่นมาก่อน แต่เนื่องจากโสมเทศเป็นสมุนไพรผสม มีสรรพคุณช่วยรักษาทอนซิล

อักเสบ หอบหืด แก้วเจ็บคอ และรักษาอาการไอเรื้อรัง ในตำรายาดั้งเดิมมีการใช้โง้งเตงตำละเอียดสุรา หรือน้ำส้มสายชูชุบสำลีอมกลืนน้ำ แก้วต่อมทอนซิลอักเสบ แก้วฝิในคอได้ดีมาก หรือต้มใส่น้ำตาลทรายแดงและเกลือเล็กน้อยอมแก้วเจ็บคอ ซึ่งตามหลักการแพทย์แผนไทยแล้วการผสมโง้งเตงซึ่งมีรสขมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาของยาแก้วไอได้ดี (กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, ม.ม.ป. 97) อีกทั้งมีการเติมน้ำมะนาวสดในตำรับยา แทนการใช้น้ำมะนาว แทรกเกลือเป็นกระสายร่วมกับผงยา เพื่อเพิ่มสรรพคุณของการขับเสมหะ และง่ายต่อการรับประทาน และใช้น้ำขิงสดผสมในตอนท้ายของการต้ม แทนการใช้ขิงแห้งบดผง เพื่อรสชาติที่กลมกล่อมขึ้น และได้ตั้งชื่อตำรับว่า “ยาแก้วไอบุนนาค สูตร 1” ในรูปแบบยาน้ำ ซึ่งจากการจ่ายยานี้ให้กับคนไข้พบว่า บรรเทาอาการไอได้ดี คนไข้พึงพอใจในการใช้ยา (ธีรวัตร สุดขาว, 2558) แต่รูปแบบยานี้ก็มีข้อจำกัดคือ อายุเก็บรักษาของยาสั้น อาจจะทำให้เชื้อราหรือเชื้อจุลินทรีย์ได้ ผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของยาแก้วไอสูตรนี้ จึงมีการวางแผนเพื่อพัฒนารูปแบบให้เป็นยาเม็ด เนื่องจากยาเม็ดเป็นที่ยอมรับของผู้ป่วย สะดวก รับประทานง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ ผลิตได้จำนวนมากมีอายุการใช้งานนาน เพราะอยู่ในสภาพแห้ง มีการสลายตัวของยาน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบยาน้ำ (ทิฆัมพร ไทยนันท์, 2554)

บทตรวจเอกสาร

1. ตำรับยาแก้วไอบุนนาค สูตร 1

1.1 ความเป็นมาของสูตรตำรับ

อาการไอเป็นกลไกหนึ่งในการตอบสนองของร่างกายเพื่อกำจัดเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมในทางเดินหายใจ และเป็นอาการหนึ่งที่น่าผู้ป่วยมาพบแพทย์ได้บ่อยที่สุด ดังนั้นยาแก้วไอจึงมีความสำคัญอย่างมากในการช่วยลดปัญหาที่ตามมาของอาการดังกล่าว และยังเป็นทางเลือกแรกที่ผู้ป่วยนึกถึงเมื่อมีอาการ โดยเฉพาะยาแก้วไอสมุนไพรที่ได้รับความนิยมมาเป็นเวลานานและในแพร่หลายในสังคมไทย สังเกตได้จากในปัจจุบันมีห้างร้าน รวมถึงร้านสะดวกซื้อที่มีการวางจำหน่ายยาแก้วไอหลากหลายยี่ห้อ ดังนั้นทางโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยแพทย์แผนไทยธีรวัตร สุดขาว ซึ่ง ได้คิดค้นสูตรยาแก้วไอขึ้นมาใหม่ (สิทธิบัตร ประเภททรัพย์สินทางปัญญา ลงวันที่ 10 เมษายน พ.ศ. 2558 เลขที่คำขอ 1503000578) ซึ่งใช้สมุนไพรตามบัญชียาหลักแห่งชาติที่มีสรรพคุณบรรเทาอาการไอ และยังคงเลือกสมุนไพรอีกหลายชนิดตามหลักการแพทย์แผนไทยมาเป็นส่วนประกอบในตำรับ เพื่อให้ได้รส กลิ่น และสรรพคุณที่ดี ซึ่งสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาแก้วไอนี้ ได้แก่ มะขามป้อม ชะเอมเทศ มะแว้งเครือ น้ำตาลกรวด น้ำมะนาว น้ำขิง เกลือ และเมนทอล โดยมีการเพิ่มโง้งเตงซึ่งเป็นสมุนไพรที่ยังไม่พบการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาบรรเทาอาการไอร่วมกับสมุนไพรอื่น ๆ มาก่อน แต่เนื่องจากโง้งเตงเป็นสมุนไพรรสขม มีสรรพคุณช่วยรักษาทอนซิลอักเสบ หอบหืด แก้วเจ็บคอ และรักษาอาการไอเรื้อรัง ในตำรายาดั้งเดิมมีการใช้โง้งเตงตำละเอียดสุรา หรือน้ำส้มสายชูชุบสำลีอมกลืนน้ำ แก้วต่อมทอนซิลอักเสบ แก้วฝิในคอได้ดีมาก หรือต้มใส่น้ำตาลทรายแดงและเกลือเล็กน้อยอมแก้วเจ็บคอ ซึ่งตามหลักการแพทย์แผนไทยแล้วการ

ผสมโทงเทงซึ่งมีรสขม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาของยาแก้ไอได้ดี อีกทั้งทางโรงพยาบาลมีการเติมน้ำมะนาวสดในตำรับยา แทนการใช้น้ำมะนาวแทรกเกลือเป็นกระสายร่วมกับผงยา เพื่อเพิ่มสรรพคุณของการขับเสมหะ และง่ายต่อการรับประทาน และใช้น้ำขิงสดผสมในตอนท้ายของการต้ม แทนการใช้ขิงแห้งบดผง เพื่อรสชาติที่กลมกล่อมขึ้น และได้ตั้งชื่อตำรับว่า “ยาแก้ไอ บุนนาค สูตร 1” โดยผลิตเป็นยาในรูปแบบน้ำ ซึ่งจากการที่แพทย์แผนไทยจ่ายยาสูตรนี้ให้แก่ผู้ป่วย พบว่าใช้บรรเทาอาการไอได้ดี ผู้ป่วยพึงพอใจในผลการใช้ยา (ธีรวัตร สุดขาว, 2558: 1)

สรรพคุณของตำรับ คือ บรรเทาอาการไอ ระคายคอ มีเสมหะ (เสมหะสำหรับผู้ที่มีมืออาการไอ ระคายคอ)

ข้อห้ามใช้/ข้อควรระวัง คือ ควรระวังในผู้ที่มีอาการท้องเสีย

คำแนะนำ คือ ควรเขย่าขวดก่อนใช้ยา

ส่วนประกอบของสมุนไพรในตำรับ ประกอบด้วย มะขามป้อม ชะเอมเทศ โทงเทง มะแว้ง ขิง มะนาว เกลือ และเมนทอล

1.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในสูตรตำรับยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 ดังแสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 Biological activities of Boon-Nak cough remedy formula 1

| Scientific name (Family) | Thai name | Part used | Biological activities | References |
|--|---------------|----------------|--|--|
| <i>Phyllanthus emblica</i> L. (Euphorbiaceae) | Ma-kham-pom | Fruit | - Antitussive activity - Antioxidant activity - Antibacterial | Nosál'ová <i>et al.</i> , 2003 Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 2000 Asimuddin <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (Fabaceae) | Cha-am-tad | root | - Antitussive activity - Antitussive and expectorant activities | Nosalova <i>et al.</i> , 2013 Kuang <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Physalis angulata</i> L. (Solanaceae) | Tong-tang | whole plant | - Antimycobacterial activities - Anti-inflammatory | Pietro <i>et al.</i> , 2000 Sun <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Solanum trilobatum</i> L. (Solanaceae) | Ma-wang-kheua | Fruit | - Antibacterial - Antipyretic | Vanaja <i>et al.</i> , 2014 Govindarajan and Chinnachamy., 2014 |
| <i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae) | Khing | Rhizome | - Cough suppressing activity - Antitussive and antioxidant activities | Bera <i>et al.</i> , 2016 Chaitanya <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Citrus aurantifolia</i> (Rutaceae) | Ma-now | Fruit | - Anti-inflammatory and antioxidant activity - Antimicrobial | Ben <i>et al.</i> , 2019 Pathan <i>et al.</i> , 2012 |
| Sodium chloride | Keua | - | - Antimicrobial activity | Wijnker <i>et al.</i> , 2006 |
| Menthol Crystal | Menthol | - | - | - |

1.3 สถิติการจ่ายยาและจำหน่ายยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 ของโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ข้อมูล ณ เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561 ดังแสดงใน **ตารางที่ 28** จัดอยู่ในยาที่มีสถิติมากที่สุด 20 ลำดับแรกของตำรับยาที่จ่ายและจำหน่ายในโรงพยาบาล (โรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย, 2562)

ตารางที่ 28 Drug dispensing statistics and Boon-Nak cough remedy formula 1 of Traditional Thai Medicine Hospital, Prince of Songkla University

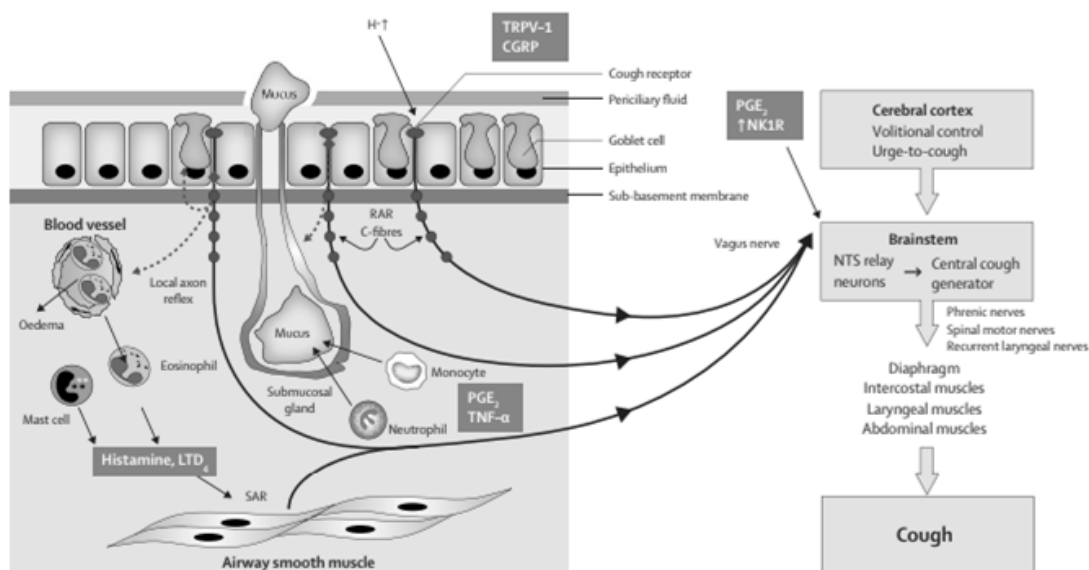
| Year | Dispensation | Total Income (35 Bath/price) |
|--------------|--------------|------------------------------|
| 2015 | 88 | 805 |
| 2016 | 325 | 11,375 |
| 2017 | 293 | 10,255 |
| 2018 | 155 | 5,425 |
| Total | 861 | 30,135 |

2. อาการไอ

ปกติมนุษย์จะไม่ค่อยไอ เนื่องจากร่างกายมีระบบ mucociliary clearance ที่เป็นกลไกในการกำจัดสารคัดหลั่งต่าง ๆ ในร่างกายที่มีปกติในระบบทางเดินหายใจ อาการไอจึงถือเป็นอาการผิดปกติ ซึ่งสาเหตุมีทั้งที่เกิดจากไม่รุนแรง เป็นชั่วคราว เช่น เป็นหวัด หลอดลมอักเสบเฉียบพลัน ได้รับมลภาวะ ไปจนถึงเรื้อรังหรือเป็นโรคร้ายแรง เช่น มะเร็งปอด หรือมะเร็งหลอดลมได้ (กาญจนา จันทร์สูง และประณีติ หงสประภาส, 2558)

2.1 กลไกการไอ

การไอเป็นกลไกที่อยู่นอกเหนืออำนาจจิตใจ ถือเป็น defensive reflex เริ่มจากได้รับสิ่งกระตุ้นหรือมีสารระคายเคืองในบริเวณระบบทางเดินหายใจ เช่น เนื้อเยื่อบุผิวของระบบทางเดินหายใจตั้งแต่โพรงจมูก เยื่อบุไซนัสลงไปถึงหลอดลม หูชั้นนอก เยื่อหุ้มปอดชั้นนอก เป็นต้น ซึ่งมีปลายประสาทรับความรู้สึก (afferent receptor) รับสัญญาณไปตามเส้นประสาทนำความรู้สึก (afferent pathway) สู่ตัวรับสัญญาณการไอที่เส้นประสาทสมองคู่ที่ 10 (vagus nerve) ไปยังศูนย์ควบคุมการไอ (modularly cough center) ในสมองบริเวณเมดูลลา (medulla) ไปยังกล้ามเนื้อและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ (efferent pathway) เกิดการตีบแคบของหลอดลม จึงทำให้เกิดการไอขึ้น ดังแสดงใน **รูปที่ 31** (ปารยะ อาศนะเสน, 2554; กาญจนา จันทร์สูง และประณีติ หงสประภาส, 2558; Widdicombe, 2003)



รูปที่ 31 Mechanism of afferent and efferent pathways that regulate cough, and the pathophysiology of the enhanced cough reflex (Widdicombe, 2003)

2.2 สาเหตุของการไอ

สาเหตุของอาการไอที่เกิดขึ้นได้หลากหลายสาเหตุ เช่น จากการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจหรือปอด การติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนต้นจากไวรัส ไข้หวัด หลอดลมอักเสบเฉียบพลัน ภูมิแพ้ การติดเชื้อในไซนัส กรดไหลย้อน สูดสารระคายเคืองจากสิ่งแวดล้อม และการสูบบุหรี่ เป็นต้น ในกรณีที่ผู้ป่วยสูงอายุ การไอติดต่อกันอย่างต่อเนื่องอาจทำให้กระดูกอ่อนซี่โครงหักได้ หรือทำให้ถุงลมหรือเส้นเลือดฝอยในปอดแตกออกสู่อากาศหรือเยื่อหุ้มปอด เกิดอาการหอบเหนื่อยและอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ (ปารยะ อาศนะเสน, 2554; Widdicombe, 2003)

2.3 ระยะของการไอ

แบ่งออกได้ เป็น 3 ระยะ (กาญจนา จันทร์สูง และประณิธิ หงสประภาส, 2558) ได้แก่

1. อาการไอเฉียบพลัน (acute cough) ระยะที่ไอเป็นมาน้อยกว่า 3 สัปดาห์ สาเหตุส่วนมากจะเกิดจากการติดเชื้อของทางเดินหายใจส่วนบนจากเชื้อหวัด หรือมีน้ำมูก ทำให้เกิดการอักเสบของหลอดลม

2. อาการไอกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute cough) ไอระหว่าง 3-8 สัปดาห์ สาเหตุอาจเกิดจาก น้ำมูกหยดหลังโพรงจมูกจากภูมิแพ้ หรือการติดเชื้อในโพรงจมูกและไซนัส หลอดลมอักเสบจากหอบหืด หรืออาจเกิดจากสาเหตุของการไอเรื้อรัง

3. อาการไอเรื้อรัง (chronic cough) ไอไม่มากกว่า 8 สัปดาห์ ส่วนใหญ่มักเกิดจากการระคายเคืองเรื้อรัง เช่น สูบบุหรี่ ฝุ่นละออง โรคหอบหืด การอักเสบจากการติดเชื้อไวรัสบางชนิด การอักเสบติดเชื้อเรื้อรังของปอดและเยื่อหุ้มปอด เช่น วัณโรค มะเร็งหลอดลม มะเร็งปอด

2.4 แนวทางการรักษา

อาจจะแบ่งประเภทของยาได้ ดังนี้ (กาญจนา จันท์สูง สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ และ วัชรา บุญสวัสดิ์, 2542)

1. ยาระงับไอหรือยากดไอ (antitussives) ยากลุ่มนี้แบ่งตามการออกฤทธิ์ได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่ม central acting ออกฤทธิ์ที่ศูนย์ควบคุมการไอในสมองส่วนเมดูลลา (medullary cough center) เช่น codeine เป็นยากดอาการไอ ลดปวดทำให้ง่วงนอน ทำให้เสมหะคั่ง จึงห้ามใช้ในผู้ป่วยที่ไม่มีเสมหะ และห้ามใช้นานเพราะยานี้เป็นสารเสพติดและทำให้ต้องการยาในขนาดที่สูงขึ้น กับอีกชนิดที่นิยมใช้คือ dextromethorphan ให้ฤทธิ์ดีเทียบเท่ายา codeine แต่ผลข้างเคียงน้อยมาก

2. ยาขับเสมหะ (expectorants) เช่น glyceryl guaiacolate (robatussin) จะกระตุ้นการทำงานของเยื่อปอดในระบบทางเดินหายใจให้กำจัดเสมหะ เพิ่มหลั่งสารคัดหลั่ง ช่วยขับเสมหะเพิ่มมากยิ่งขึ้น ทำให้ไอเอาเสมหะออกมาได้ง่ายขึ้น

3. ยาละลายเสมหะ (mucolytics) เช่น bromhexine และ N-acetylcysteine เหมาะสำหรับอาการไอที่มีเสมหะร่วมด้วย ทำให้ความหนืดของเสมหะลดลง

4. การแพทย์ทางเลือก (alternative medicine) เช่น กลิ่นบำบัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สมุนไพรการรักษา ซึ่งในปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้รักษาอาการไอหลากหลายรูปแบบ เช่น ยาน้ำ ยาลูกกลอน ยาอม ยาเม็ด เป็นต้น

5. ยาอื่น ๆ เช่น decongestants antihistamine ในอาการหวัด คัดจมูก น้ำมูกไหล จะช่วยรักษาอาการไอร่วมด้วย

3. รูปแบบยาเม็ด

รูปแบบยาสามารถแบ่งได้หลากหลายรูปแบบทั้งที่ใช้เป็นยาภายในและภายนอก แบ่งเป็นประเภทใหญ่ ๆ ตามลักษณะ ได้ 4 ประเภท คือ (1) ยาเตรียมประเภทของเหลว (liquid dosage forms) (2) ยาเตรียมประเภทของแข็ง (solid dosage forms) (3) ยาเตรียมประเภทกึ่งของแข็ง (semisolid dosage forms) (4) ยาเตรียมประเภทอื่น ๆ (miscellaneous dosage forms) โดยยาเม็ดเป็นหนึ่งในยาในรูปแบบของแข็ง (solid dosage form) ประกอบด้วยตัวยาหนึ่งหรือหลายชนิดรวมกัน อาจมีสารเจือจางและสารปรุงแต่งอื่น ๆ ผสม แล้วนำมาเตรียมด้วยการตอกอัดหรือแบบพิมพ์ ซึ่งยาเม็ดเป็นรูปแบบที่นิยมใช้กันมากที่สุดกว่ารูปแบบอื่น

3.1 ประเภทของยาเม็ด สามารถแบ่งได้หลายชนิดขึ้นกับหลักเกณฑ์ในการจัดประเภท หากจำแนกตามความสามารถในการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาเม็ด (สถาพร นิมกุลรัตน์, 2548) อาจจะแบ่งได้ ดังนี้

1. Disintegrating tablets คือ ยาเม็ดทั่วไปที่เมื่อรับประทานแล้วตัวยาคจะปลดปล่อยออกมาในเวลาไม่นานหลังจากที่เม็ดยาแตกตัวและละลาย
2. Chewable tablets คือ เม็ดยาที่ต้องการให้มีการเคี้ยวก่อนกลืน จึงมีการแตกตัวในปาก เพื่อให้ตัวยาออกฤทธิ์ได้เร็ว ไม่ต้องอาศัยน้ำช่วยในการกลืนยา ใช้รักษาโรคในปากและช่องคอ
3. Effervescent tablets คือ ยาเม็ดฟู ซึ่งเมื่อหย่อนลงน้ำจะเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น ซึ่งจะทำให้เม็ดยาแตกตัวและตัวยาละลายออกมา มักใช้กับตัวยาที่ต้องการให้ออกฤทธิ์เร็ว
4. Lozenges คือ ยาเม็ดชนิดอม เพื่อให้ตัวยาละลายออกมาช้า ๆ ในช่องปากเพื่อให้ออกฤทธิ์ในปากหรือช่องคอ มักแต่งกลิ่นและสี อีกทั้งยังตอกอัดสูงเพื่อให้ได้เม็ดยาที่แข็งและละลายอย่างช้า ๆ ในปาก
5. Sublingual and Buccal tablets คือ ยาเม็ดที่ใช้อ้อมใต้ลิ้นและกระพุ้งแก้ม มักมีขนาดเล็กและแตกตัวได้เร็วเพื่อดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ทันทีโดยไม่ผ่านตับ ซึ่งอาจทำให้ตัวยาโดนทำลายได้
6. Extended-release tablets คือ ยาเม็ดที่ปลดปล่อยตัวยาออกมาอย่างช้า ๆ ยาในกลุ่มนี้สามารถแบ่งได้อีกหลากหลายรูปแบบ

3.2 ข้อดีและข้อจำกัดของยาเม็ด

ข้อดีของยาเม็ด คือ เป็นรูปแบบยาที่มีขนาดรับประทานที่แน่นอน แม่นยำ มีต้นทุนในการผลิตต่ำสุดเมื่อเทียบกับยารูปแบบรับประทานอื่น ๆ ผลิตได้ในปริมาณที่สูงต่อครั้ง สะดวกต่อการพกพา น้ำหนักเบากว่าเมื่อเทียบกับยาน้ำ ทำให้ลดค่าขนส่งและปัญหาการแตกหักระหว่างขนส่งได้ มีความคงตัวที่ดี ออกแบบรูปแบบยาให้มีการปลดปล่อยได้ตามต้องการ ส่วนข้อจำกัดของยาเม็ดคือ ตัวยาคที่ละลายน้ำต่ำ ดูดซึมไม่ดีอาจไม่เหมาะสมกับรูปแบบยาเม็ด การผลิตไม่สามารถทำได้ทุกกรณี ฝงยาบางชนิดไม่สามารถนำมาตอกเป็นเม็ดได้ หรือตัวยาคที่ขมมากหรือมีกลิ่นไม่ดี หรือไวต่อความชื้นอาจต้องเพิ่มกระบวนการผลิต เช่นเคลือบเม็ดยา หรือห่อหุ้มฝงยาตอกเป็นเม็ด (สถาพร นิมกุลรัตน์, 2548)

3.3 กระบวนการผลิตยาเม็ด

เตรียมได้ 2 วิธี คือ 1) ยาเม็ดแบบอัดพิมพ์ (molded tablets) ใช้แรงอัดต่ำ (low pressure) อัดลงในแบบพิมพ์ (mold) เม็ดยาที่เตรียมมีรูปร่างกลม ผิวเรียบ แต่เม็ดยาจะแตกสลายง่ายกว่าแบบยาเม็ดตอกอัด และ 2) ยาเม็ดแบบตอกอัด (compressed) จะใช้แรงตอกสูง (high pressure) อาศัยสากและเบ้าในการตอก (punches and dies) ยาเม็ดที่เตรียมจึงมีรูปร่าง ขนาด น้ำหนัก และพื้นผิวหน้าแตกต่างกันมาก อาจเตรียมได้ 3 วิธีหลัก ๆ (อัจฉรา อุทิศวรรณกุล, 2536; สถาพร นิมกุลรัตน์, 2548; วิบูล วงศ์ภูวรักษ์ และคณะ, 2560) คือ

1. การตอกตรง (direct compression) เป็นอีกวิธีที่นิยมใช้ โดยนำส่วนผสมของตัวยามาตอกเม็ด โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำแกรนูล แต่ผงยาต้องมีคุณสมบัติคือความสามารถในการไหลและความสามารถในการตอกเป็นเม็ดที่ดี สามารถผสมกับสารอื่นๆที่นิยมนำมาใช้คือ direct compression vehicles ที่เหมาะสมจะมีคุณสมบัติทั้งเป็นสารเพิ่มปริมาณ สารยึดเกาะ และสารช่วยแตกกระจายตัวในเวลาเดียวกัน เช่น spray-dried lactose microcrystalline cellulose: avicel เป็นต้น

2. การทำแกรนูลเปียก (wet granulation) นิยมใช้กันมากในการผลิตยาเม็ด มีขั้นตอนค่อนข้างมาก เริ่มตั้งแต่ การชั่งและผสมผงยา (weighing and Mixing) การเติมสารยึดเกาะพร้อมกับการนวด (kneading หรือ wet-massing) เรียกผงยาในสภาพนี้ว่า damp mass แล้วนำไปผ่านร่อนแบบเปียก (wet screening) การอบแห้ง (drying) การผ่านร่อนแบบแห้ง (sieving/dry screening) การเติมสารหล่อลื่นและสารช่วยแตกตัวภายนอก (lubrication and extragranular disintegrant) และการตอกเม็ด (compression) ส่งผลให้การ scale up ทำได้ค่อนข้างยาก ต้องอาศัยความชำนาญของผู้เตรียมหากไม่มีเครื่องมือมาอำนวยความสะดวกในทุกกระบวนการ

3. การทำแกรนูลแห้ง (dry granulation) นิยมใช้น้อยกว่าวิธีอื่น ใช้เมื่อตัวยานั้นไม่สามารถนำมาตอกเม็ดโดยตรงได้ หรือตัวยานั้นไวต่อความร้อน ตัวยาสีล่อนง่ายหรือมีความชื้นไม่สามารถเตรียมโดยวิธีการทำแกรนูลแบบเปียกได้ มีขั้นตอนการเตรียมที่น้อยกว่าแกรนูลแบบเปียก เริ่มตั้งแต่ การชั่งและผสมผงยา (weighing and mixing) การเตรียม slug (slugging) การอบแห้ง (drying) การผ่านร่อนแบบแห้ง (sieving) การเติมสารหล่อลื่นและสารช่วยแตกตัวภายนอก (lubrication and extragranular disintegrant) และการตอกเม็ด (compression)

3.4 องค์ประกอบของยาเม็ด

ประกอบด้วย ส่วนสำคัญหลัก ๆ ประกอบด้วย 7 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 29 (อัจฉรา อุทิศวรรณกุล, 2536) คือ

1. ตัวยาสสำคัญ ส่วนใหญ่แล้วมักเป็นตัวยานิตเดียวหรือหลายชนิดรวมกันแล้วทำให้แห้ง ส่วนใหญ่ตัวยาสสำคัญที่นำมาพัฒนาในรูปแบบยาเม็ดมักทำให้แห้งด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (spray dried) ซึ่งจะทำให้ผงยามีลักษณะเป็นผงขนาดเล็ก (powder) อาจมีอนุภาคอยู่ในรูปผลึก (crystalline) หรือ อสัณฐาน (amorphous)

2. สารเจือจางหรือสารเพิ่มปริมาณ (diluent or filler) มีหน้าที่เพิ่มปริมาณเม็ดยาให้เหมาะสมในกรณีตัวยามีปริมาณต่ำจนไม่สามารถให้เม็ดยาที่มีขนาดใหญ่พอเพื่อเตรียมเป็นยาเม็ด จำนวนสารเจือจางมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดเม็ดยาและจำนวนตัวยาสสำคัญในยาเม็ด โดยสารเจือจางหรือสารเพิ่มปริมาณที่ดีควรมีคุณสมบัติ เช่น มีความเฉื่อยทางเคมี ไม่ดูดความชื้น เข้ากับร่างกายได้ ไม่มีความเป็นพิษ มีคุณสมบัติที่ดีทางชีวเภสัชกรรม เช่น มีความชอบน้ำหรือละลายน้ำได้ดี มีคุณสมบัติการอัดแน่นที่ดี (compatibility) มีรสชาติดี และราคาถูก ที่นิยมใช้มากที่สุด ได้แก่ แล็กโทส เพราะเป็นสารที่ไม่มีปฏิกิริยากับตัวยาสสำคัญ สามารถตอกอัดดี รสชาติดี ละลายน้ำ ไม่ดูดความชื้น มี

การปลดปล่อยตัวยาที่ดีที่สุดตามคุณสมบัติของสารเจือจางหรือสารเพิ่มปริมาณ ส่วนเดครกซ์โทรสมิทั้งที่อยู่ในรูป anhydrous และ hydrate ใช้แทนแล็กโทสในบางกรณี โดยให้ความหวานมากกว่า

3. สารช่วยแตกตัว (disintegrant) มีหน้าที่ทำให้เม็ดยาแตกสลายได้ง่ายภายหลังจากการรับประทานยา เมื่อสัมผัสกับน้ำ โดยการพองตัวและดันให้เม็ดยาแตก ที่นิยมใช้ เช่น แป้ง explotab ที่ตัดแปลงโครงสร้างจากแป้ง หรือในสารกลุ่มเซลลูโลส (cellulose) เช่น microcrystalline cellulose หรืออะวีเซล พีเอช 102 (avicel PH 102) เป็นตัวหนึ่งที่ดีมากมีประสิทธิภาพในการแตกตัวสูงเช่นกัน โดยสารช่วยแตกตัวสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือสารช่วยแตกตัวที่อยู่ภายในแกรนูล (intragranular disintegrants) และสารช่วยแตกตัวภายนอกแกรนูลก่อนการตอกเม็ด (extragranular disintegrants)

4. สารยึดเกาะ (binder or adhesive) มีหน้าที่ช่วยให้ผงยาเกาะจับกันเป็นแกรนูล และแกรนูลจับกันเป็นยาเม็ด สารที่นิยมใช้ คือ แป้ง อะคาเซีย (acacia) และพอลิเมอร์จากธรรมชาติ เป็นต้น

5. สารหล่อลื่น (lubricant) มีหน้าที่ช่วยลดแรงเสียดสีระหว่างเม็ดยากับเข้าลดลง ทำให้การส่งเม็ดยาออกนอกเข้าได้สะดวก สารที่นิยมใช้ คือแมกนีเซียม สเตียเรต (magnesium stearate) โดยปกตินิยมใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าร้อยละ 2

6. สารช่วยไหล (glidant) มีหน้าที่ช่วยให้การไหลของผงยาหรือแกรนูลดีขึ้น ช่วยให้แกรนูลไหลเข้าเครื่องตอกยาเม็ดอย่างสม่ำเสมอ ทำให้เม็ดยาที่เตรียมได้มีน้ำหนักเท่ากัน เช่น ทัลคัม (talcum) แอร์โรซิล (aerosil) เป็นต้น

7. สารช่วยอื่นๆที่เหมาะสมเช่น สารป้องกันการติดของสากและเข้า (antiadherent) สารแต่งกลิ่น (flavour) สารแต่งสี (colourant) เป็นต้น

ตารางที่ 29 Categories of Tablets (Rowe *et al.*, 2012)

| Categories | Ingredients | Amount (%) | Lethal Dose of 50 (LD ₅₀) in Rat |
|---------------|----------------------|------------|--|
| Diluents | - Lactose | 2-25 | > 10 g |
| | - Dextrose | 2-25 | > 2.8 g |
| Disintegrants | - Avicel PH 102 | 5-20 | > 5 g |
| Anti-adherent | - Talcum | 1-5 | > 5 g |
| Lubricant | - Magnesium stearate | 1/4-2 | > 10 g |
| | - Talcum | 1-5 | > 5 g |
| Glidant | - Talcum | 5 | > 5 g |
| Sweetener | - Dextrose | - | > 2.8 g |

3.5 การควบคุมคุณภาพของยาเม็ด

ยาเม็ดผลิตขึ้นทุกรุ่นก่อนออกจำหน่ายจะต้องได้รับการประเมินสมบัติในด้านต่าง ๆ ทั้งกายภาพ เคมี รวมทั้งชีวประสิทธิผลของยา ในเบื้องต้นของการผลิตควรได้รับการประเมินการควบคุมคุณภาพทางกายภาพ เนื่องจากเป็นกระบวนการควบคุมคุณภาพเบื้องต้นของการผลิตยาเม็ด หากยาเม็ดที่พัฒนาขึ้นมีการควบคุมคุณภาพทางกายภาพที่ดีแล้วนั้น จึงนำไปทดสอบการควบคุมคุณภาพด้านอื่นและนำไปศึกษาได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีมาตรฐานในกระบวนการต่อไป (สภาพร นิยมกุลรัตน์, 2548; สมบูรณ์ เจตลีลา, มปป) ได้แก่

1. ลักษณะโดยทั่วไป (general appearance) ยาเม็ดที่ผลิตขึ้นควรมีลักษณะสวยงาม เรียบสม่ำเสมอ ไม่มีการแตกบิ่น สีควรสม่ำเสมอ ไม่มีกลิ่นเหม็น หากมีสัญลักษณ์หรือตัวหนังสือบนเม็ดก็ควรอ่านง่ายและคมชัด โดยปกติยาเม็ดมักไม่มีปัญหาเรื่องการกลบรสขมเหมือนกรณียาเม็ด แต่ในกรณียาเม็ดเคี้ยว (chewable tablets) จำเป็นต้องแต่งรสหรือกลบรสขมให้เป็นที่ยอมรับของผู้ป่วยให้ได้

2. ความแข็งและความกร่อน (hardness and friability) โดยทั่วไปเมื่อใช้แรงตอกสูงชั้นยาเม็ดที่ได้จะแข็งแรงขึ้น หากตัวยากที่ต้องการทำให้ละลายช้า จึงต้องทำให้เม็ดยามีความแข็งมาก หากตัวยากที่ต้องการปลดปล่อยตัวยากได้เร็ว อาจจะต้องทำให้มีความแข็งต่ำ เนื่องจากความแข็งมีความสัมพันธ์กับขนาดของเม็ด ซึ่งส่งผลต่อการแตกตัวอย่างมาก ซึ่งหากมีความแข็งพอประมาณจะทำให้ไม่แตกหักระหว่างการพกพาหรือการขนส่งโดยปกติยาเม็ดควรมีความกร่อนต่ำกว่าร้อยละ 1

3. น้ำหนักเม็ดยาและความสม่ำเสมอของน้ำหนัก (weight and uniformity of weight) ต้องเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด โดยส่วนมากจะอาศัยเกณฑ์มาตรฐานจากตำรับเภสัชสหรัฐอเมริกา (The United States Pharmacopeia: USP) และเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร (The British Pharmacopoeia: BP)

4. การแตกตัวและการละลาย (disintegration and dissolution) เมื่อผู้ป่วยรับประทานยาเข้าสู่ร่างกายจะเกิดการแตกตัวของยา ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของยาและสารช่วยต่าง ๆ ที่ใช้ในตำรับ เช่น สารช่วยแตกกระจายตัว สารยึดเกาะ เมื่อยาเม็ดแตกตัวแล้วตัวยากสำคัญจะละลายและถูกดูดซึมได้ จะเห็นได้ว่าทั้งการแตกตัวและการละลายนั้นมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการรักษาระดับหนึ่งของผลิตภัณฑ์ยาเม็ด โดยทั่วไปยาเม็ดไม่เคลือบใช้เวลาในการแตกตัวไม่เกิน 30 นาที

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติการไหลของผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งจากวิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน

2. เพื่อพัฒนาตำรับแก้ไอบุนาคสูตร 1 จากรูปแบบยาน้ำเป็นรูปแบบยาเม็ดเคี้ยวที่เตรียมด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง

3. เพื่อควบคุมคุณภาพยาเม็ดเคี้ยวที่พัฒนาจากตำรับแก้ไอบุนาคสูตร 1

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พัฒนาตำรับยาใหม่ที่มีรูปแบบการใช้แบบดั้งเดิมให้มีรูปแบบที่ทันสมัยมากขึ้น เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายและอัตราการดูดซึม มีความสะดวกในการพกพา รับประทานง่าย ผลิตได้ครั้งละจำนวนมาก รวดเร็ว มีต้นทุนการผลิตต่ำ เก็บรักษาและมีอายุการใช้งานนานขึ้น ซึ่งคาดว่าจะเป็นแนวทางที่ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพของยาและอาหารที่ใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคในอนาคตได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัตถุดิบและสารเคมี

สมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาแก้ไอบุนนาค สูตร 1 ได้แก่ มะขามป้อม ชะเอมเทศ โทงเทง มะแว้งเครือ มีการระบุตัวอย่างพันธุ์ไม้อ้างอิงจากอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านพฤกษศาสตร์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และเมนทอล สั่งซื้อจากร้านมหาคุณโอสโตในจังหวัดพัทลุง โดยสมุนไพรแต่ละชนิดเป็นรูปแบบสมุนไพรแห้ง ชิงและมะนาว ซื้อมาจากบริษัทสยามแมคโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยสมุนไพรเป็นรูปแบบสมุนไพรสด จากนั้นนำมาล้าง อบให้แห้งในตู้อบสมุนไพรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร และนำมาผ่านร่อนขนาด 250 ไมครอน (60-mesh) บรรจุใส่ในถุงซีลสุญญากาศเพื่อร่อนนำไปทดสอบต่อไป

สารเคมี ประกอบด้วย แล็กโตส (lactose) เดกซ์โทรส (dextrose) แมกนีเซียมสเตียเรต (magnesium stearate) อะวิเซล พีเอช 102 (avicel PH 102) และทัลคัม (talcum) ซื้อมาจากบริษัท พี.ซี.ดรักเซ็นเตอร์ จำกัด กรุงเทพมหานคร

2. การเตรียมผงยา

นำผงยาสมุนไพรในตำรับ ประกอบด้วย ผลมะขามป้อม ปริมาณ 100 กรัม รากชะเอมเทศ ปริมาณ 100 กรัม โทงเทง ทั้ง 5 (ลำต้น ราก ใบ ดอก ผล) ปริมาณ 20 กรัม ผลมะแว้งเครือปริมาณ 20 กรัม ที่บดผงแห้งแล้ว ต้มกับน้ำสะอาด ปริมาณ 2 ลิตร โดยวิธีการต้ม 3 เอา 1 ใช้ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำน้ำยาต้มที่ได้ทั้งหมดรวมกันแล้วต้มให้เหลือ 1 ส่วน เติมผงมะนาว ปริมาณ 250 มิลลิกรัม และผงชิงปริมาณ 250 มิลลิกรัม ลงไป คนให้ละลายเข้ากัน ปิดไฟทิ้งให้เย็น 5 นาที แล้วเติมเกลือ ปริมาณ 10 กรัม และเมนทอล ปริมาณ 500 มิลลิกรัม คนให้ละลายอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ผงยาคกตะกอน นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง หลังจากนั้นจึงนำน้ำยาต้มทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (mini spray dryer) (Buchi mini-spray dryer B-290, Switzerland) โดยใช้สภาวะในการอบแห้งดังนี้ อุณหภูมิอากาศร้อนขาเข้า (inlet) 100 องศาเซลเซียส อัตราการไหลเชิงปริมาตรของอากาศร้อนขาเข้า (aspirator) 28.7 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง และอัตราการป้อนน้ำต้มยา (pump) 2.4 มิลลิลิตร/นาที เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการอบแห้งแล้วจึงชั่งน้ำหนักผงยา แล้วเก็บไว้ในภาชนะกันแสงปิดสนิทเพื่อนำไปทดสอบต่อไป โดยคำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดหายาที่ได้ (% yield spray dried extract) ดังสมการที่ 7

$$\text{ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้} = (X / Y) \times 100 \quad (7)$$

X = น้ำหนักของสมุนไพรที่ได้จากการสกัด (กรัม)

Y = น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

3. การเตรียมยาเม็ดเคี้ยวด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง (dry granulation)

นำผงยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 จากขั้นตอนการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย มาร้อนผ่านแรงเบอร์ 60 (250 ไมครอน) ซึ่งผงยาภายหลังผ่านแรง และเจดน้ำหนักไว้ ผสมผงยากับสารเพิ่มปริมาณคือ แล็คโตส และเดกซ์โทรส และสารหล่อลื่น คือ แมกนีเซียม สเตียเรต (ที่ผ่านแรงเบอร์ 60 แล้ว) ตามปริมาณที่คำนวณให้เข้ากันดี หลังจากนั้นนำมาตอกเป็นสลัก (slug) แล้วจึงนำสลักไปผ่านแรงขนาด 250 ไมครอน (14 mesh) เพื่อให้ได้แกรนูล แล้วนำไปอบแห้ง โดยใช้เวลา 30 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแกรนูลแบบแห้งที่ผ่านการอบแล้ว ไปผ่านแรงเบอร์ 60 อีกครั้ง แล้วจึงเจดน้ำหนักของแกรนูลที่ได้ไว้ นำแกรนูลที่เตรียมไว้ไปทดสอบคุณสมบัติการไหลของผงยาต่อไป หลังจากนั้นนำแกรนูลมาคำนวณหาปริมาณสารช่วยแตกตัว คือ อะวีเซล พีเอช 102 และสารช่วยไหลคือ ทาลคัม ผสมสารช่วยที่คำนวณได้เข้ากับผงแกรนูลแบบแห้งให้เข้ากันดี นำไปตอกเม็ด โดยใช้เครื่องตอกยาเม็ดสากลเดี่ยวแบบใช้ไฟฟ้า (single punch tableting machine) ใช้สาก (punch) และเบ้า (die) เรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 เซนติเมตร ให้น้ำหนักต่อเม็ดตามที่คำนวณได้ และมีความแข็งประมาณ 4-6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร นำไปประเมินผลคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดยาต่อไป ซึ่งอัตราส่วนของส่วนประกอบในตำรับยาเม็ด แสดงไว้ดังตารางที่ 30 โดยใช้สูตรตำรับที่ 1-3 แทนด้วยสัญลักษณ์ F1-F3

ตารางที่ 30 Ingredients of Boon-Nak cough remedy formula 1

| Ingredients | Categories | Ingredients of tablets (mg) | | |
|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------|---------------|
| | | F1 | F2 | F3 |
| Boon-Nak extract (Spray dried) | active ingredient | 50.00 | 75.00 | 100.00 |
| Lactose | diluents | 300.00 | 275.00 | 250.00 |
| Dextrose | diluents, sweetener | 50.00 | 50.00 | 50.00 |
| Avicel PH 102 | disintegrants, diluents | 21.25 | 23.63 | 23.50 |
| Talcum | anti-adherent | 21.25 | 23.62 | 23.50 |
| Magnesium stearate | lubricant | 2.50 | 3.75 | 5.00 |
| Total | | 445.00 | 451.00 | 452.00 |

4. การศึกษาคุณสมบัติการไหลของผงยาตามเกณฑ์ตำรับสหรัฐอเมริกาและเกณฑ์ตำรับสหราชอาณาจักร

ถือเป็นปัจจัยสำคัญอย่างมาก เนื่องจากส่งผลต่อความสม่ำเสมอของตัวยาในการเตรียมยาสมุนไพรในรูปแบบของแข็ง (USP 32/NF 27 Volume 1, 2009; USP 33/NF 28, 2009; BP Volume 4, 2009)

4.1 การหาค่า Angle of repose

ค่า Angle of repose เป็นค่าที่มีความเกี่ยวข้องกับแรงเสียดทานระหว่างอนุภาคหรือแรงต้านทานต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาค โดยชั่งผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งปริมาณ 5 กรัม แล้วเทผงยาผ่านกรวย โดยเรียกรวีนี้นี้ว่า fixed funnel method ทำให้เกิดกองผงยารูปกรวย (powder cone) ขึ้น โดยกำหนดให้ส่วนปลายของกรวยอยู่สูงกว่าฐานรองผงยา 4 เซนติเมตร จากนั้นวัดความสูงของผงยา (height: h) และรัศมีของกรวยผงยา (radius: r) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาคำนวณหา Angle of repose ดังสมการที่ 8

$$\tan(\theta) = h / r \quad (8)$$

เมื่อ h = ความสูงของผงยา (เซนติเมตร)

r = รัศมีของกรวยผงยา (เซนติเมตร)

โดยค่า Angle of repose ที่ได้สามารถบ่งบอกการไหลของผงยาได้ดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 Flowability with Angle of repose (เซาวลิต มณฑล, 2557)

| Flow property | Angle of repose (°) |
|---------------------------------|---------------------|
| Excellent | 25-30 |
| Good | 31-35 |
| Fair-aid not needed | 36-40 |
| Passable-may hang up | 41-45 |
| Poor | 46-55 |
| Very poor-must agitate, vibrate | 56-65 |
| Very poor | >66 |

4.2 การหาค่า Compressibility index และ Hausner ratio

4.2.1 การหาค่า Bulk density

ดัดแปลงมาจาก method I ตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกา คือ การใช้กระบอกตวง (graduated cylinder) โดยชั่งผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งปริมาณ 5 กรัม โดยเทผงยาใส่กระบอกตวง ปริมาตร 25 เซนติเมตร ทำการเคาะสูงจากพื้น 3 ± 0.2 มิลลิเมตร จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นอ่านค่า ปริมาตรของผงยาจากขีดบอกปริมาตรของกระบอกตวง ปริมาตรของผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งที่อ่าน ได้ คือ Bulk volume (V_0) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาคำนวณหาค่า Bulk density ดังสมการที่ 9

$$\text{Bulk density} = m / V_0 \quad (9)$$

เมื่อ m = น้ำหนักผงยาหรือแกรนูลแบบแห้ง (กรัม)

V_0 = ปริมาตรของผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งที่อ่านได้หลังการเคาะจำนวน 3 ครั้ง (มิลลิลิตร)

4.2.2 การหาค่า Tapped density

ดัดแปลงมาจาก method II ตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกา โดยนำผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งที่วัดได้จากข้อ 4.2.1 ทำการเคาะสูงจากพื้น 3 ± 0.2 มิลลิเมตร จำนวน 500 ครั้ง หลังจากนั้นอ่านค่าปริมาตรของผงยาจากขีดบอกปริมาตรของกระบอกตวงครั้งที่ 1 (V_{500}) จากนั้นเคาะต่ออีก 750 ครั้ง อ่านปริมาตรครั้งที่ 2 (V_{1250}) หาปริมาตรจากการอ่านค่าทั้งสองครั้งแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 2 ค่าจากการอ่านครั้งที่ 2 (V_{1250}) คือ ค่า Final Tapped volume (V_f) ที่จะนำไปใช้ในการคำนวณ Tapped density ในกรณีที่ค่าปริมาตรจากการอ่านครั้งที่ 1 และ 2 แตกต่างกันมากกว่าร้อยละ 2 จะเคาะต่ออีกรอบละ 1,250 ครั้ง จนกระทั่งค่าปริมาตรที่ได้แตกต่างกันไม่เกิน ร้อยละ 2 ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาคำนวณหาค่า Tapped density ดังสมการที่ 10

$$\text{Tapped density} = m / V_f \quad (10)$$

เมื่อ m = น้ำหนักผงยาหรือแกรนูลแบบแห้ง (กรัม)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายของผงยาจากขีดบอกปริมาตรของกระบอกตวง (มิลลิลิตร)

4.2.3 การหาค่า Compressibility index เป็นการวัดความหนาแน่น ขนาดและรูปร่าง พื้นที่ผิว ความชื้น และการยึดเกาะกันของผงยาในทางอ้อม คำนวณได้จากการหาค่า Bulk density และ Tapped density แล้วนำค่าเหล่านี้มาคำนวณดังสมการที่ 11

$$\text{Compressibility index} = [(V_o - V_f) / V_f] \times 100 \quad (11)$$

4.2.4 การหาค่า Hausner ratio คำนวณได้ดังสมการที่ 12

$$\text{Hausner ratio} = V_o / V_f \quad (12)$$

เมื่อ V_o = ปริมาตรของผงยาหรือแกรนูลแบบแห้งที่อ่านได้หลังการเคาะจำนวน 3 ครั้ง (มิลลิลิตร)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายของผงยาจากขีดบอกปริมาตรของกระบอกตวง (มิลลิลิตร)

โดยค่า Compressibility index และ Hausner ratio ที่ได้สามารถบ่งบอกการไหลของผงยาได้ดังตารางที่ 32

ตารางที่ 32 Flowability with compressibility index and Hausner ratio (เซวาลิต มณฑล, 2557)

| Flow property | Compressibility index | Hausner ratio |
|-----------------|-----------------------|---------------|
| Excellent | ≤ 10 | 1.00-1.11 |
| Good | 11-15 | 1.12-1.18 |
| Fair | 16-20 | 1.19-1.25 |
| Passable | 21-25 | 1.26-1.34 |
| Poor | 26-31 | 1.35-1.45 |
| Very poor | 32-37 | 1.46-1.59 |
| Very, Very poor | > 38 | > 1.60 |

5. การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพของยาเม็ดตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาและเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร

เป็นอีกหนึ่งปัจจัยในการควบคุมคุณภาพยาเม็ดที่สำคัญ เนื่องจากเป็นกระบวนการควบคุมคุณภาพเบื้องต้นของการผลิตยาเม็ด หากยาเม็ดที่พัฒนาขึ้นมีการควบคุมคุณภาพทางกายภาพที่ดีแล้วนั้น จึงนำไปทดสอบการควบคุมคุณภาพด้านอื่นและนำไปศึกษาได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีมาตรฐานในกระบวนการต่อไป (USP 32/NF 27 Volume 1, 2009; USP 33/NF 28, 2009; BP Volume 4, 2009)

5.1 การศึกษาความผันแปรของเม็ดยา (weight variation of tablet)

การศึกษาความผันแปรของเม็ดยา เพื่อควบคุมคุณภาพให้น้ำหนักเม็ดยามีความสม่ำเสมอระหว่างการผลิตแต่ละครั้ง โดยสุ่มเม็ดยามาจำนวน 20 เม็ด ในแต่ละครั้งที่ผลิต (batch) ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (sartorius รุ่น ED224S, เยอรมัน) แต่ละเม็ดอย่างแม่นยำ คำนวณหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของเม็ดยา และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งเกณฑ์กำหนดไว้ว่าน้ำหนักเม็ดยาไม่เกิน 2 เม็ด ที่มีความเบี่ยงเบนมากกว่าจำนวนร้อยละที่กำหนดไว้ และจะต้องไม่มีเม็ดใดเลยที่มีความเบี่ยงเบนมากกว่า 2 เท่าของจำนวนร้อยละที่กำหนดโดยคิดเทียบจากน้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดยา ดังแสดงในตารางที่ 33

ตารางที่ 33 USP and BP reference standard for weight variation of tablets (The United States Pharmacopeia Convention, 2009: 688-691; British Pharmacopoeia Commission, 2009)

| Average weight of tablet according to USP (mg) | % Deviation | Average weight of tablet according to BP (mg) |
|--|-------------|---|
| ≤130 | ±10 | <80 |
| 130-324 | ±7.5 | 80-250 |
| ≥324 | ±5 | >250 |

5.2 การศึกษาความกร่อนของเม็ดยา (tablet friability)

การศึกษาความกร่อนของเม็ดยา เพื่อให้เม็ดยามีความกร่อนต่ำ สามารถต้านทานความเสียหายของเม็ดยาที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตหรือการขนส่งได้ กำหนดให้ยาเม็ดไม่เคลื่อนให้มีความกร่อนได้ไม่เกินร้อยละ 1.0 โดยไม่มีเม็ดใดแตกเสียหาย หากน้ำหนักเม็ดยาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 650 มิลลิกรัม ชั่งมาให้ได้น้ำหนักรวมของเม็ดยาเท่ากับ 6.5 กรัม ทำความสะอาดด้วยแปรงขนนุ่มเพื่อปัดฝุ่นที่เกาะรอบเม็ดยาออก หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (sartorius รุ่น ED224S, เยอรมัน) อย่างแม่นยำ บันทึกค่าที่ได้เป็นน้ำหนักเริ่มต้น นำไปทดสอบความกร่อนด้วยเครื่องทดสอบความกร่อน (friability tester) ใช้เวลาทดสอบ 4 นาที ที่ความเร็ว 25 รอบต่อนาที นำเม็ดยาที่ผ่านเครื่องทดสอบความกร่อนแล้ว มาปัดทำความสะอาดและชั่งน้ำหนักอย่างแม่นยำอีกครั้ง จากนั้นนำมาคำนวณหาร้อยละของความกร่อน ดังสมการที่ 13

$$\text{ความกร่อน} = \frac{[\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}]}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100 \quad (13)$$

5.3 การศึกษาความหนาของเม็ดยา (tablet thickness)

การศึกษาความหนาของเม็ดยา เพื่อควบคุมคุณภาพให้น้ำหนักเม็ดยามีความสม่ำเสมอระหว่างการผลิตแต่ละครั้ง ซึ่งความหนาของเม็ดยาแต่ละเม็ดขึ้นอยู่กับแรงตอกอัดระหว่างการตอกเม็ด ความหนาแน่นของผงยาก่อนการตอกและน้ำหนักของเม็ดยา โดยสุ่มเม็ดยาจำนวน 10 เม็ด มาวัดความหนาด้วยเครื่องวัดความหนา (thickness gauge) ความหนาที่ได้มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร คำนวณหาค่าเฉลี่ยความหนาของเม็ดยา และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5.4 การศึกษาความแข็งของเม็ดยา (tablet hardness)

ในเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาและเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร ไม่มีข้อกำหนดเรื่องความแข็งของเม็ดยา แต่ทั่วไปยาเม็ดควรมีความแข็งประมาณ 4-6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เพื่อป้องกันการแตกหักของเม็ดยาในระหว่างการผลิตหรือการขนส่ง โดยสุ่มเม็ดยาจำนวน 10 เม็ด มาวัดความแข็งด้วยเครื่องวัดความแข็ง (stokes-monsanto hardness tester) ความแข็งที่ได้มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร คำนวณหาค่าเฉลี่ยความแข็งของเม็ดยา และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5.5 การศึกษาเวลาในการแตกตัว (disintegration time)

เมื่อผู้ป่วยรับประทานยาเข้าสู่ร่างกายจะเกิดการแตกตัวของยา ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เร็วหรือช้าขึ้น ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของยาและสารช่วยต่าง ๆ ที่ใช้ในตำรับ เช่น สารช่วยแตกตัว สารยึดเกาะ ทั่วไปยาเม็ดไม่เคลือบใช้เวลาในการแตกตัวไม่เกิน 30 นาที โดยสุ่มเม็ดยาจำนวน 6 เม็ด มาทดสอบเวลาในการแตกตัวด้วยเครื่องทดสอบการแตกตัว (disintegration tester) โดยใช้ น้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นตัวกลางในการแตกตัว (disintegration medium) บันทึกเวลาที่เม็ดยาแตกตัวอย่างสมบูรณ์ เวลาในการแตกตัวมีหน่วยเป็นนาที

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

วิเคราะห์ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.)

7. สถานที่ทำการวิจัย

คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

8. ระยะเวลาการดำเนินงาน

6 เดือน (ระหว่างเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2561 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2562)

บทที่ 3

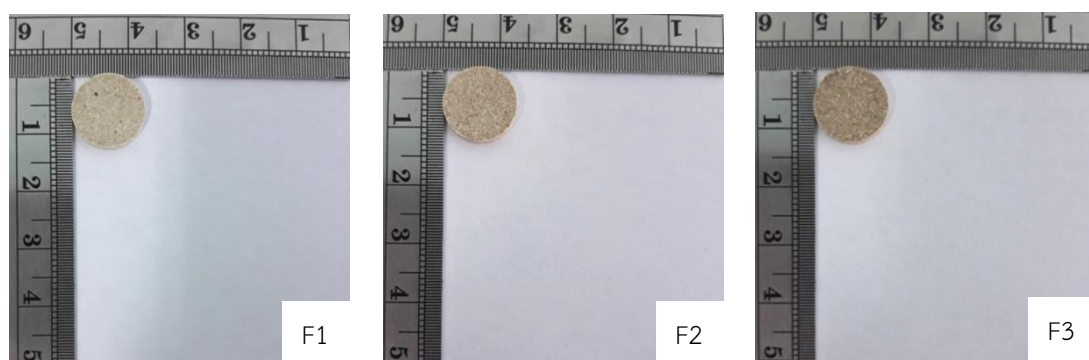
ผลการทดลอง

1. การเตรียมผงยา

จากการศึกษาร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบของตำรับยาแก้ไอบุนนาค สูตร 1 ที่ได้ (% yield spray dried extract) ด้วยวิธีการต้ม 3 เอ 1 และแบบวิธีดั้งเดิม เท่ากับร้อยละ 11.61 และร้อยละ 2.74 ตามลำดับ ซึ่งการต้มด้วยวิธีการต้ม 3 เอ 1 มีร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าการต้มแบบวิธีดั้งเดิมถึง 4 เท่า โดยในกระบวนการต้มของทั้ง 2 วิธี ได้มีการคัดเอาน้ำตาลกรวดออกจากสูตรตำรับ เนื่องจากน้ำตาลกรวดเมื่อละลายในสูตรตำรับทำให้มีลักษณะเหนียว ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย ด้วยเครื่องทำให้แห้งแบบพ่นฝอย ส่งผลให้ผงยาที่ได้มีความชื้นสูง ผงยาจับตัวกัน มีลักษณะเหนียว อีกทั้งในวิธีดั้งเดิมได้เติมน้ำตาลกรวดเพื่อแต่งกลิ่นให้ตำรับในรูปแบบยาน้ำสามารถรับประทานได้ง่ายขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้เพิ่มสารเพิ่มปริมาณ คือ เดกซ์โทรส ในสูตรตำรับที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้มีคุณสมบัติในการให้ความหวานในตำรับยาได้

2. การเตรียมยาเม็ดเคี้ยวด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง

ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะเม็ดยามีสีน้ำตาล ผิวเรียบ หน้าแบนราบ โดย F1, F2 และ F3 มีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม ตามลำดับ ดังรูปที่ 32



รูปที่ 32 Illustration of physical characteristics of Boon-Nak cough remedy formula 1

3. การศึกษาคุณสมบัติการไหลของผงยาตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาและเภสัชตำรับ สหราชอาณาจักร

ผลการศึกษาค่าคุณสมบัติการไหลของผงยาที่ได้จากการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย ดังแสดงในตารางที่ 34 พบว่ามีคุณสมบัติการไหลที่ไม่ดี มีค่า Angle of repose, Bulk density, Tapped density, Compressibility index และ Hausner ratio เท่ากับ 36.50 องศา 0.32 กรัมต่อตารางเซนติเมตร 0.38 กรัมต่อตารางเซนติเมตร และ ร้อยละ 16.13 และ 1.19 ตามลำดับ ส่วนผงยาที่เตรียมด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้งของ F1, F2 และ F3 พบว่ามีคุณสมบัติการไหลที่ดี โดยสูตรตำรับที่มีคุณสมบัติดีที่สุด คือ F1 มีค่า Angle of repose, Bulk density, Tapped density, Compressibility index และ Hausner ratio เท่ากับ 32.60 องศา 0.59 กรัมต่อตารางเซนติเมตร 0.67 กรัมต่อตารางเซนติเมตร และร้อยละ 11.76 และ 1.13 ตามลำดับ

ตารางที่ 34 Flowability properties of Boon-Nak cough remedy formula 1

| Flowability of tablets | Formulations | | | |
|-------------------------------------|---------------|-------|-------|-------|
| | Crude extract | F1 | F2 | F3 |
| Angle of repose (°) | 36.50 | 32.60 | 33.82 | 34.22 |
| Bulk density (g/cm ³) | 0.32 | 0.59 | 0.59 | 0.63 |
| Tapped density (g/cm ³) | 0.38 | 0.67 | 0.67 | 0.71 |
| Compressibility index (%) | 16.13 | 11.76 | 11.76 | 12.50 |
| Hausner ratio | 1.19 | 1.13 | 1.13 | 1.14 |
| Type of flow | Fair | Good | Good | Good |

4. การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพของยาเม็ดตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาและเภสัชตำรับ สหราชอาณาจักร

ผลการศึกษาค่าการควบคุมคุณภาพทางกายภาพของยาเม็ดแก้ไอบุนนาคสูตร 1 ดังแสดงในตารางที่ 35 พบว่า F1, F2 และ F3 มีคุณภาพทางกายภาพของยาเม็ดผ่านทุกการทดสอบตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาและเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร (The United States Pharmacopeia Convention, 2009: 688-691; British Pharmacopoeia Commission, 2009: 448-451) ได้แก่

ความผันแปรของเม็ดยา จากผลการศึกษาพบว่า ทุกสูตรตำรับผ่านเกณฑ์มาตรฐาน มีความผันแปรของเม็ดยาของสูตร F1, F2 และ F3 เท่ากับ 433±0.01 มิลลิกรัม 457±0.01 มิลลิกรัม และ 459±0.01 มิลลิกรัมตามลำดับ

ความกร่อนของเม็ดยา จากผลการศึกษาพบว่า ทุกสูตรตำรับผ่านเกณฑ์มาตรฐาน โดย F1 และ F2 มีความกร่อนน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 0.02 รองลงมาคือ F3 มีความกร่อนร้อยละ 0.04 ตามเกณฑ์มาตรฐานยาเม็ดที่พัฒนาขึ้นจะต้องมีความกร่อนน้อยกว่าร้อยละ 1.0

ความหนาของเม็ดยา จากผลการศึกษาพบว่า ทุกสูตรตำรับมีความหนาใกล้เคียงกัน โดยมีความหนาที่ 2.42-2.54 มิลลิเมตร

ความแข็งของเม็ดยา จากผลการศึกษาพบว่า ทุกสูตรตำรับมีความแข็งใกล้เคียงกัน โดย F3 มีความแข็งมากที่สุด คือ 4.4 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร รองลงมาคือ F2 มีความแข็ง 3.7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และ F1 มีความแข็งน้อยที่สุด คือ 3.4 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยในเภสัชตำรับไม่ได้มีการกำหนดความแข็งของยาเม็ดไว้ โดยทั่วไปยาเม็ดนิยมให้มีความแข็งประมาณ 4-6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

เวลาในการแตกตัว จากผลการศึกษาพบว่า ทุกสูตรตำรับผ่านเกณฑ์มาตรฐาน โดย F1 มีเวลาในการแตกตัวเร็วที่สุด ที่ 11.25 นาที รองลงมาคือ F2 ที่ 14.40 นาที และ F3 มีเวลาในการแตกตัวช้าที่สุด ที่ 17.14 นาที

ตารางที่ 35 Physical properties of Boon-Nak cough remedy formula 1

| Physical properties of tablets | Formulations (Mean±SD.) | | |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| | F1 | F2 | F3 |
| Weight variation (mg) | 433±0.01 [#] | 457±0.01 [#] | 459±0.01 [#] |
| Friability (%) | 0.02±0.01 [*] | 0.02±0.01 [*] | 0.04±0.04 [*] |
| Thickness (mm) | 2.42±0.09 | 2.52±0.02 | 2.54±0.02 |
| Hardness (kg/cm ²) | 3.40±0.52 | 3.70±0.48 | 4.40±0.52 |
| Disintegration time (min) | 11.25±0.03 | 14.40±0.02 | 17.14±0.04 |

[#]=Sample<±5% of weight variation

^{*}=Not found any broken tablets.

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการเตรียมยาเม็ดเคี้ยวด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง พบว่าสารช่วยที่ใช้ในสูตรตำรับไม่เกินที่กำหนดจากงานวิจัยของ Kottke และ Rudnic (2002) ได้แก่ สารช่วยหล่อลื่น (แมกนีเซียม สเตียเรต) ใช้ในสูตรตำรับได้ไม่เกินร้อยละ 2 สารช่วยแตกตัว (อะวีเซล พีเอช 102) ไม่เกินร้อยละ 20 และสารป้องกันการติด (ทัลคัม) ไม่เกินร้อยละ 5

จากผลการศึกษาคุนสมบัติการไหลของผงยาตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาและเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร สอดคล้องกับการศึกษาของ Soares และคณะ (2005) ได้ศึกษาการไหลของผงยาสมุนไพร *Maytenus ilicifolia* ที่เตรียมด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย สมุนไพรที่ผสมสารช่วย และผงยาที่เตรียมด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง พบว่า แกรนูลแบบแห้งมีคุณสมบัติการไหลที่ดีกว่าสมุนไพรที่ผสมสารช่วย และผงยาที่เตรียมด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย มีค่า Bulk density, Tapped density, Compressibility index และ Hausner ratio เท่ากับ 0.66 กรัมต่อตารางเซนติเมตร 0.71 กรัมต่อตารางเซนติเมตร และร้อยละ 6.59 และ 1.07 ตามลำดับ และจากศึกษาของ Kashikar และ Pooja (2011) ได้ศึกษาการเตรียมผงยาสมุนไพรแบบแกรนูล พบว่าแกรนูลที่เตรียมมีคุณสมบัติการไหลที่ดี มีค่า Angle of repose, Bulk density, Tapped density, Compressibility index และ Hausner ratio เท่ากับ 22.00 องศา 0.37 กรัมต่อตารางเซนติเมตร 0.44 กรัมต่อตารางเซนติเมตร และร้อยละ 15.03 และ 1.18 ตามลำดับ ซึ่งการเตรียมผงยาที่ตอกเป็นยาเม็ดด้วยการทำแกรนูลก่อนการตอกเม็ดโดยไม่ผสมสารช่วย จะช่วยลดปัญหาการไหลของผงยาสมุนไพรที่ไม่ดีได้ (Soares *et al.*, 2005) อีกทั้งการศึกษาคุนสมบัติการไหลของผงยาที่นิยมใช้ในงานวิจัยและอุตสาหกรรมเอกชน คือ 1) Angle of repose และ 2) Compressibility index และ Hausner ratio ทางคณะผู้วิจัยจึงได้เลือก 2 วิธีนี้ในการทดสอบคุณสมบัติการไหลของผงยา (เขาวลิตร มณฑล, 2557)

จากผลการตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพของยาเม็ดตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาและเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร หัวข้อความผันแปรของน้ำหนักเม็ดยาตามมาตรฐาน USP และ BP กล่าวคือ มีน้ำหนักเม็ดยาคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน \pm ร้อยละ 5 ตามเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาคำหนดเม็ดยามีน้ำหนักเม็ดยามากกว่า 324 มิลลิกรัมและมากกว่า 250 มิลลิกรัมตามเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร ดังนั้น สูตรตำรับที่พัฒนาขึ้นมีความสม่ำเสมอของน้ำหนักเม็ดยาที่ดี หัวข้อความกร่อนของเม็ดยาตามเกณฑ์มาตรฐานยาเม็ดที่พัฒนาขึ้นจะต้องมีความกร่อนน้อยกว่าร้อยละ 1.0 ในหัวข้อย่อยในการแตกตัวกำหนดยาเม็ดที่ไม่เคลือบ ควรมีเวลาในการแตกตัวภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที และในสูตรตำรับใช้ อะวีเซล พีเอช 102 มีคุณสมบัติเป็นสารช่วยแตกตัวยิ่งยวด (superdisintegrants) จึงช่วยให้สูตรตำรับมีเวลาในการแตกตัวที่ดี (Kottke and Rudnic., 2002) ส่วนความหนาและความแข็งของเม็ดยานั้นในเภสัชตำรับ USP และ BP ไม่ได้มีการกำหนดไว้ โดยจะถือจากข้อมูลการจดทะเบียนตำรับยาครั้งแรกเป็นเกณฑ์กำหนดในการควบคุมการผลิตครั้งต่อไปในแต่ละการผลิต

บทที่ 5

สรุป

1. ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบของตำรับยาแก้ไอบุนนาค สูตร 1 ที่ได้จากขั้นตอนการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (% yield spray dried extract) ด้วยวิธีการต้ม 3 เอา 1 เท่ากับร้อยละ 11.61 ซึ่งการต้มด้วยวิธีนี้มีร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าการต้มแบบวิธีดั้งเดิมถึง 4 เท่า

2. การทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (spray dried extract) มีคุณสมบัติการไหลที่ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับผงยาที่เตรียมเป็นแกรนูลแบบแห้ง

3. สูตรตำรับที่พัฒนาขึ้นมีทั้งสิ้น 3 สูตรตำรับ (F1-F3) ที่มีปริมาณผงยาและสารช่วยแตกต่างกัน ซึ่งภายใต้การเตรียมยาเม็ดในลักษณะนี้ สูตรตำรับ F3 เป็นสูตรตำรับที่สามารถบรรจุตัวยามากที่สุดต่อเม็ด

4. การศึกษาการควบคุมคุณภาพของยาเม็ดเคี้ยว พบว่า F3 มีลักษณะทั่วไปของยาเม็ดที่ดี คือมีน้ำหนักเม็ดยาเท่ากับ 459 ± 0.01 มิลลิกรัม (ความผันแปรของน้ำหนักอยู่ในเกณฑ์ร้อยละ 5) ความกร่อนร้อยละ 0.04 ± 0.04 ความหนา 2.54 ± 0.02 มิลลิเมตร ความแข็ง 4.4 ± 0.52 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และเวลาการแตกตัวของเม็ดยา 17.14 ± 0.04 นาที ทุกสูตรตำรับผ่านเกณฑ์มาตรฐานการควบคุมคุณภาพทางกายภาพของเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกาและเภสัชตำรับสหราชอาณาจักร ซึ่งการปรับเปลี่ยนจากรูปแบบยาดั้งเดิมให้ทันสมัยและใช้งานง่ายขึ้นเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้มีความเหมาะสมกับแนวโน้มของรูปแบบการใช้ยาสมุนไพรในปัจจุบัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาคุณภาพวัตถุดิบของสมุนไพรที่นำมาใช้และความคงตัวของสูตรตำรับยาเม็ดที่พัฒนาขึ้น

2. ควรมีการศึกษาถึงความเป็นพิษในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง

3. ควรมีการศึกษาปริมาณสารสำคัญและกลไกการออกฤทธิ์ของสูตรตำรับที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับสูตรดั้งเดิม เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในมนุษย์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม. มปท, มปป.
- กาญจนา จันท์สูง สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ และวัชรา บุญสวัสดิ์, บรรณาธิการ. อากาโรวิทยาทางอายุรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2542.
- กาญจนา จันท์สูง และประณิธิ หงสประภาส, บรรณาธิการ. อากาโรวิทยาทางอายุรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2558.
- เขาวลิต มณฑล และคณะ. การศึกษาคุณสมบัติการไหลของผงยาสมุนไพรเพื่อการเตรียมยาในรูปแบบของแข็ง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 12, 5 (ฉบับพิเศษ 2557): 743-754.
- เขาวลิต มณฑล. คุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ดจากสมุนไพร (ตำรับจิตรากรมณ์) ที่เตรียมด้วยวิธีแกรนูลเปียก. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 12, 2 (พฤษภาคม-สิงหาคม 2557): 159-166.
- ทิมมพร ไทยนันท์. สารบัญรู้ เรื่องโรคภัยไข้เจ็บ: ทำไมต้องแบบนี้. (ออนไลน์) 2554 (อ้างเมื่อ 12 กุมภาพันธ์ 2562). จาก <https://web.ku.ac.th/saranaroo/chap4a.htm>
- ธีรวัตร สุดขาว. สิทธิบัตรประเภททรัพย์สินทางปัญญา. (ออนไลน์) 2558 (อ้างเมื่อ 12 กุมภาพันธ์ 2562). จาก <https://piti-ipop.psu.ac.th/portfolio/Detail.aspx?id=321>
- ปารยะ อาศนะเสน. อากาโรไอ (Cough). วารสารนานาชาติวารสารคลินิก. 27, 6 (มิถุนายน 2554): 438-440.
- โรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สถิติการจ่ายยาสมุนไพร. (ออนไลน์) 2562 (อ้างเมื่อ 15 กุมภาพันธ์ 2562). จาก <http://192.168.80.6/hosstat/>
- วิบูล วงศ์ภูวรักษ์ นิमित วรกุล วิชาญ เกตุจินดาและดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง. เทคโนโลยีเภสัชกรรมสถานะของแข็ง. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2560.
- สถาพร นิมกุลรัตน์.เอกสารประกอบการสอนยาเม็ด. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2548.
- สมบูรณ์ เจตลีลา. ผลิตภัณฑ์สมุนไพรตอนที่ 2: มาตรฐานทางกายภาพของยาเม็ดสมุนไพร. ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (ออนไลน์) มปป (อ้างเมื่อ 23 กุมภาพันธ์ 2562). จาก <https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/>
- อัจฉรา อุทิศวรรณกุล. รูปแบบเภสัชภัณฑ์. พิมพ์ครั้งที่ 1. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.
- Asimuddin M., Bhumika R., Kaiser J., Chandrakanth R. Estimation of antibacterial activity of plants extracts from *Phyllanthus emblica*, *Terminalia chebula* and *Eucalyptus globules* against oral pathogens. International Journal of Dentistry and Oral Health. 2017; 3 (9): 100-104.

- Bandyopadhyay S.K., Pakrashi S.C., Pakrashi A. The role of antioxidant activity of *Phyllanthus emblica* fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 70: 171-176.
- Ben Hsouna A., Gargouri M., Dhifi W., Ben Saad R., Sayahi N., Mnif W., Saibi W. Potential anti-inflammatory and antioxidant effects of *Citrus aurantium* essential oil against carbon tetrachloride-mediated hepatotoxicity: A biochemical, molecular and histopathological changes in adult rats. *Environmental toxicology*. 2019; 34 (4): 388-400.
- Bera K., Nosalova G., Sivova V., Ray B. Structural elements and cough suppressing activity of polysaccharides from *Zingiber officinale* rhizome. *phytotherapy research : PTR*. 2016; 30 (1): 105-111.
- British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia 2009 volume IV*. London: the Stationery Office, 2009.
- Chaitanya M.V.N.L., Ndagijimana A., Dhanabal S.P. and Kabera J.N. Phytochemical review on ocimum sanctum, *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* and eucalyptus globules for their antitussive and antioxidant activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2016, 8 (5): 243-250.
- Govindarajan P. and Chinnachamy C. Phytochemical and therapeutic evaluation of leaf and *in vitro* derived callus and shoot of *Solanum trilobatum*. *Pak. Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014; 27 (6 Suppl): 2101-2107.
- Kashikar, V.S. and Pooja, P. Formulation and evaluation of taste masked chewable herbal tablet for cough remedy. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. 2011; 2, 3: 830-833.
- Kottke, K.M. and Rudnic, M.E. "Tablet Dosage forms" *Morden pharmaceuticals*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, INC., 2002.
- Kuang Y., Li B., Fan J., Qiao X., Ye M. Antitussive and expectorant activities of licorice and its major compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2018; 26 (1): 278-284.
- Nosalova G., Fleskova D., Jurecek L., Sadlonova V., Ray B. Herbal polysaccharides and cough reflex. *Respiratory physiology and neurobiology*. 2013; 187 (1): 47-51.
- Nosál'ová G., Mokrá J., Hassan K.M. Antitussive activity of the fruit extract of *Embllica officinalis* Gaertn. (Euphorbiaceae). *Phytomedicine*. 2003; 10 (6-7): 583-589.
- Pathan R.K., Gali P.R., Pathan P., Gowtham T., Pasupuleti S. *In vitro* antimicrobial activity of *Citrus aurantifolia* and its phytochemical screening. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2012; 2: 328-331.

- Pietro R.C.L.R., Kashima S., Sato D.N., Januário A.H., Franca S.C. *In vitro* anti-mycobacterial activities of *Physalis angulata* L. *Phytomedicine*. 2000; 7 (4): 335-338.
- Rowe R.C., Sheskey P.J., Cook W.G. and Fenton M.E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 7rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2012.
- Soares, L.A., Ortega G.G., Petrovick P.R. and Schmidt P.C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. *The American Association of Pharmaceutical Scientists*. 6, 3 (14th October 2005): 359-366.
- Sun C.P., Opong M.B., Zhao F., Chen L.X., Qiu F. Unprecedented 22, 26-seco physalins from *Physalis angulata* and their anti-inflammatory potential. *Organic and biomolecular chemistry*. 2017; 15 (41): 8700-8704.
- The United States Pharmacopeia Convention. *USP 32/NF 27 Volume 1*. Maryland: United Book Press, 2009.
- The United States Pharmacopeia Convention. *USP 33/NF 28*. Maryland: United Book Press, 2010.
- Vanaja M., Paulkumar K., Gnanajobitha G., Rajeshkumar S., Malarkodi C., Annadurai G. Herbal plant synthesis of antibacterial silver nanoparticles by *Solanum trilobatum* and its characterization. *International Journal of Metals*. 2014; 2014:1-8.
- Widdicombe, J.G. "A brief overview of the mechanisms of cough" *Cough: Causes, Mechanisms and Therapy*. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd., 2003.
- Wijnker J.J., Koop G., Lipman L.J. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food microbiology*. 2006; 23 (7): 657-662.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุภาพร วรรณ
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 6011420017
 วุฒิการศึกษา
 วุฒิ ชื่อสถาบัน ปีที่สำเร็จการศึกษา
 การแพทย์แผนไทยบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี 2557

ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2561

ทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ด้วยเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2560

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

สุภาพร วรรณ และพัชรวัลย์ ใจสมุทร. การตั้งสูตรตำรับและการประเมินยาเม็ดเคี้ยวของตำรับยาแก้ไอบุนนาคสูตร 1 ด้วยวิธีแกรนูลแบบแห้ง. การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา (Symposium) ครั้งที่ 11 “เสริมพลัง: ต่อยอดงานวิจัยเพื่อประโยชน์ต่อชุมชนสู่ความยั่งยืน” มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 2562.

จริญญา ปันทวังกูร สุภาวดี นนทพจน์ จุฑารัตน์ มาสู่ พิษชานันท์ เขียรทองอินทร์ พรภรณ์ย์ สมชวากัญญารัตน์ เป็งจำเมือง สุภาพร วรรณ และสมพร ธาณี. การพัฒนารูปแบบตำรับยารักษาโรคเบาหวานของหมอยาพื้นบ้าน ตำบลก่อเอ้ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดอุบลราชธานี. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 2559.

Wanna S., Sripanidkulchai B., Junlatat J., Aldila F., Mahardiani A. Antioxidant and antibacterial activities of *Wedelia trilobata* extract. Poster session presented at the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty, Pullman Raja Orchid Hotel. Khon Kaen, Thailand., 2016.

สุภาวดี นนทพจน์ จริญญา ปันทวังกูร มุสิกกร ฤทธิวรรณ พรภรณ์ย์ สมชวากัญญารัตน์ เป็งจำเมือง สุภาพร วรรณ และสมพร ธาณี. การพัฒนารูปแบบการฟื้นฟูองค์ความรู้การแพทย์แผนไทย ตำบลก่อเอ้ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดอุบลราชธานี. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 2558.

สุภาวดี นนทพจน์ และสุภาพร วรรณ. ความสนใจเข้าศึกษาต่อหลักสูตรการแพทย์แผนไทยบัณฑิตของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาชั้นปีที่ 6 คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก

- มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี. คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 2558.
- จรรยา ปั่นทวังกูร มุสิกร ชุศรีวรรณ สุภาวดี นนทพจน์ กรรณิการ์ พุ่มทอง สุภารัตน์ สุขโท จินตนา จุลทัศน์ พิษานันท์ เจริญทองอินทร์ และสุภาพร วรรณ. การศึกษาภูมิปัญญาพื้นบ้าน หมอพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี. กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทย และแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2558.
- Panthawangkoon C., and Wanna S. The study of folk wisdom of Traditional massage: A case study of folk healer Daeng BoonKhan. Oral session presented at the 1st International Symposium, Ubon Ratchathani, Thailand, 2014.
- Panthawangkoon C., and Wanna S. A study wisdom of folk Thai medicine: A case study of use of herbal medicines for diabetes wound and hemorrhoid treatment. Paper session presented at the 1st International Symposium, Ubon Ratchathani, Thailand, 2014.
- สุภาพร วรรณ ขนิษฐา บุญธรรม ศิริินภา คนเย็น สุภาดา ตลสุขและศิริลักษณ์ ทำทอง. ทิศทางการพัฒนาการแพทย์แผนไทยของจังหวัดอุบลราชธานี (ในช่วงปี พ.ศ.2555-2564) โดยใช้เทคนิค EDFR. งานมหกรรมสมุนไพรแห่งชาติ ครั้งที่ 10. กรมการแพทย์แผนไทย และการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2555.