



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเตรียมและการประเมินอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์ที่ละลายน้ำไม่ดี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ

(Preparation and characterization of polymeric micelles loaded with poorly soluble drugs (curcumin & andrographolide) for enhance activity on liver carcinoma cell)

โดย

นสภ. นัฐธิกา	สำลีพันธ์	55210055
นสภ. บุญยดา	คณานันท์	55210103

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเตรียมและการประเมินอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์ที่ละลายน้ำไม่ดี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ

(Preparation and characterization of polymeric micelles loaded with poorly soluble drugs (curcumin & andrographolide) for enhance activity on liver carcinoma cell)

โดย

นสภ.นัฐธิกา	สำลีพันธ์	55210055
นสภ.บุญยดา	คณานันท์	55210103

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต

ปีการศึกษา 2559

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ในปัจจุบันนี้โรคมะเร็งตับเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย แม้จะมีการพัฒนายาที่นำมารักษามากมาย แต่ยาส่วนใหญ่จะมีปัญหาด้านการละลายน้ำที่ไม่ดี ทำให้นำส่งไปยังอวัยวะเป้าหมายได้น้อย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาระบบนำส่งยาที่ดีเพื่อนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งตับได้ โดยยาต้องมีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรและสามารถเข้ากันกับเนื้อเยื่อในร่างกายได้

คณะผู้วิจัยจึงมีความต้องการที่จะพัฒนาระบบนำส่งยา โดยใช้ Poloxamer407 ในการก่อกอพอลิเมอร์ไมเซลล์ เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่มีราคาถูก สามารถก่อกอไมเซลล์ได้เมื่อใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ปริมาณน้อยก็สามารถก่อกอไมเซลล์ได้ และใช้ยาต้นแบบ 2 ชนิดคือ ยาแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดได้จากฟ้าทะลายโจร และยาเคอร์คูมินที่สกัดได้จากขมิ้นชัน เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่หาได้ง่ายจากธรรมชาติ และมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง อีกทั้งละลายน้ำได้น้อยใกล้เคียงกับคุณสมบัติของยาเคมีบำบัด จึงเหมาะกับการนำมาใช้พัฒนาระบบนำส่งยา โดยทางคณะผู้วิจัยคาดหวังว่าโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์หรือสามารถนำไปพัฒนาระบบนำส่งยาได้ต่อไป

คณะผู้วิจัย

20 พฤศจิกายน 2559

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2559

เรื่อง การเตรียมและการประเมินอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์ที่ละลายน้ำไม่ดี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

นสภ.นัฐธิกา ลำสีพันธ์ รหัส 55210055

นสภ.บุญยดา คณานันท์ รหัส 55210103

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภญ.อ. พุทธิพร คงแก้ว

ภก.อ. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

บทคัดย่อ

ระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์เป็นระบบนำส่งยาที่ใช้ในการแก้ปัญหาที่ละลายน้ำน้อยเพื่อนำส่งไปยังอวัยวะเป้าหมาย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ในการนำส่งเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งเป็นตัวยาดั้งเดิมไปยังเซลล์มะเร็งตับเนื่องจากเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์มีค่าการละลายน้ำน้อยแต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับดี อีกทั้งมีการประเมินอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่เตรียมได้โดยการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

ผลการทดลองพบว่าสูตรตำรับมีขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโน และมีค่า zeta potential ของตำรับเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์อยู่ในช่วง -15.14 mV และ -12.39 mV ตามลำดับ และการประเมินปริมาณกักเก็บตัวยา (%Entrapment Efficiency) พบว่าสูตรที่ 3 ของทั้งสองตัวยา (3A)(3C) ซึ่งประกอบด้วย ยาต้นแบบ 5 mg และ poloxamer 407 200 mg มีปริมาณ %EE มากที่สุด โดยตำรับเคอร์คูมิน(3C) มีค่า %EE = 87.09 ± 4.43 % และตำรับแอนโดรกราโฟไลด์ (3C) มีค่า %EE = 84.33 ± 11.11 % และการทดสอบปริมาณยาเข้าสู่เซลล์ (cellular uptake) โดยใช้เซลล์ HepG2 พบว่าสูตร 3A มีปริมาณ cellular uptake = 2.11 ซึ่งมากกว่าตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีค่าเท่ากับ 1.81 และ สูตร 3C สามารถเพิ่มปริมาณ cellular uptake ได้เมื่อเทียบกับตัวยาเคอร์คูมินเดี่ยวๆ แต่ปริมาณยาที่ถูก uptake มีค่าต่ำกว่า LOQ จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าเคอร์คูมินมีความเหมาะสมที่จะนำมากักเก็บในระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ เนื่องจากค่าการละลายที่ต่ำทำให้ยาถูกกักเก็บในปริมาณที่สูงกว่า งานวิจัยฉบับนี้พบว่าการเพิ่มค่าการละลายด้วย poloxamer 407 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเข้าสู่เซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามผลที่เกิดขึ้นยังไม่สามารถเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจพัฒนาระบบนำส่งเพื่อให้เข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นในอนาคต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2016

: Preparation and characterization of polymeric micelles loaded with poorly soluble drugs (curcumin & andrographolide) for enhance activity on liver carcinoma cell

By

Miss. Natthika Sumleepun ID 55210055

Miss. Bunyada Khananan ID 55210103

Advisor :

Miss. Putthiporn Khongkaew

Mr. Watcharaphong Chaemsawang

ABSTRACT

Polymeric micelle is a system for delivery drugs approach for anticancer drugs delivery. This study investigates an effect of active compound on polymeric micelle formulation. The polymeric micelle was prepared from poloxamer 407 by thin-film hydration method. The study used curcumin and andrographolide as a model drug. The formulations were characterized by comparing parameter; physical properties, particle size, zeta potential and entrapment. The result shows that the optimal formulation poloxamer 407 200 mg and model drugs 5 mg had greater value of parameters. Curcumin and andrographolide after prepared micelle have particle size were 321 nm, 520 nm, zeta potential -15.14 mV, -12.39 mV and Entrapment efficiency $87.09 \pm 4.43\%$ and $84.33 \pm 11.11\%$, respectively. Furthermore, the selected formulations were prepared for cellular uptake evaluation in hepatocarcinoma cell line (Hep G2) followed determine quantity by HPLC technique. The result shows that the poloxamer 407 can increase cellular uptake. In conclusion, Curcumin is suitable drug prepared polymeric micelle because it was lipophilicity than andrographolide. Thus, curcumin was entrapped higher than andrographolide. However this study is a preliminary study of an alternative modification to enhance drug solubility and drug targeting.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2559 เรื่อง การเตรียมและการประเมินอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์ที่ละลายน้ำไม่ได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ ในครั้งนี้สามารถประสบความสำเร็จลงได้เนื่องจากการได้รับความอนุเคราะห์จาก ญญ.อ.พุทธิพร คงแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษา ภก.อ. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาตลอดจนถึงความช่วยเหลือในด้านสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย รวมไปถึงคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัยจนโครงการวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางเภสัชกรรมและเจ้าหน้าที่สำนักงานประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านอุปกรณ์และเครื่องมือ คณะกรรมการและอาจารย์ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ทางคณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณอย่างสุดซึ้งมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

17 พฤศจิกายน 2559

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	๗
บทคัดย่อ	๘
กิตติกรรมประกาศ	๑๑
สารบัญ	๑๒
สารบัญตาราง	๑๓
สารบัญภาพ	๑๔
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	3
สมมติฐาน	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
กรอบแนวคิด	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	5
มะเร็ง (Cancer)	5
คุณสมบัติทั่วไปของพอลิเมอริกไมเซลล์	11
คุณสมบัติทั่วไปของเคอร์คูมิน	17
คุณสมบัติทั่วไปของแอนโดรกราโฟไลด์	19
เครื่อง Tensiometer	20
เครื่อง Transmission electron microscopy (TEM)	20
เครื่อง Rotary evaporator	21
เครื่อง เครื่องวัดขนาดอนุภาค ประจุไฟฟ้าบนอนุภาค และน้ำหนักโมเลกุล	22
เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	24

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	27
วัสดุอุปกรณ์	27
สารเคมี	28
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	29
การพัฒนาวิธีวิจัย	29
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์	33
บทที่ 4 ผลการวิจัย	34
การทดสอบการละลายของตัวยา	34
การทดสอบแรงตึงผิวของสูตรตำรับ	36
การพัฒนาสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์	39
การประเมินคุณสมบัติของอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์	41
การหา %Entrapment efficiencyในสูตรตำรับด้วยวิธีวิเคราะห์ HPLC	46
การศึกษาคุณสมบัติ cell uptake	61
การศึกษาคุณสมบัติความคงตัวของสูตรตำรับ	70
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	74
เอกสารอ้างอิง	78
เอกสารอ้างอิงรูปภาพ	83
ภาคผนวก	84

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์กับ ตัวยาเคอร์คูมิน ตำรับที่ 1-7	30
ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์กับ ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ ตำรับที่ 1-7	30
ตารางที่ 3 แสดงการทดสอบแรงตึงผิวของ poloxamer 407	30
ตารางที่ 4 แสดงลักษณะทางกายภาพของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุ ตัวยาเคอร์คูมิน	39
ตารางที่ 5 แสดงลักษณะทางกายภาพของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุ ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	40
ตารางที่ 6 แสดงขนาดของอนุภาคและ zeta potential ของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่ บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	41
ตารางที่ 7 แสดงขนาดของอนุภาคและ zeta potential ของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่ บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	42
ตารางที่ 8 แสดงการหาของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	46
ตารางที่ 9 แสดงผลการคำนวณหาปริมาณ % Entrapment efficiency ของสูตร พอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	49

สารบัญตาราง(ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 10 แสดงการหาของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	50
ตารางที่ 11 ผลการคำนวณหาปริมาณ % Entrapment efficiency ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	53
ตารางที่ 12 แสดงขนาดอนุภาค Zeta potential และ % Entrapment efficiency ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินในแต่ละสูตร	57
ตารางที่ 13 แสดงขนาดอนุภาค Zeta potential และ % Entrapment efficiency ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ในแต่ละสูตร	57
ตารางที่ 14 แสดงการหาของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	61
ตารางที่ 15 แสดงผลการคำนวณหาปริมาณ cell uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	63
ตารางที่ 16 แสดงการหาของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	63
ตารางที่ 17 แสดงผลการคำนวณหาปริมาณ cell uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	65
ตารางที่ 18 แสดงลักษณะทางกายภาพของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	70

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 19 ความคงตัวของขนาดของอนุภาคและ zeta potential ของสูตร พอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	71
ตารางที่ 20 ลักษณะทางกายภาพของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุ ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	72
ตารางที่ 21 ความคงตัวของขนาดของอนุภาคและ zeta potential ของสูตร พอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	73
ตารางที่ 22 ตัวอย่าง Abbreviations	85
ตารางที่ 23 แสดงค่าสถิติ One-way anova ของขนาดอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	86
ตารางที่ 24 แสดงค่าสถิติ Post Hoc(tukey)ของขนาดอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	86
ตารางที่ 25 แสดงค่าสถิติ One-way anova ขนาดอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	88
ตารางที่ 26 แสดง Post Hoc(tukey)ขนาดอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	88
ตารางที่ 27 แสดงสถิติ One-way anova ค่า zeta potential ของอนุภาค สูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	90
ตารางที่ 28 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) ค่า zeta potential ของอนุภาค สูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	91
ตารางที่ 29 แสดงสถิติ One-way anova ค่า zeta potential ของอนุภาค สูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	93
ตารางที่ 30 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) ค่า zeta potential ของอนุภาค สูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	93

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 31 แสดงสถิติ One-way anova ปริมาณ % Entrapment efficiency ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	95
ตารางที่ 32 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) (ปริมาณ %Entrapment efficiency ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	96
ตารางที่ 33 แสดงสถิติ One-way anova ปริมาณ % Entrapment efficiency ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดกราโฟไลด์	98
ตารางที่ 34 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) ปริมาณ %Entrapment efficiency ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดกราโฟไลด์	98
ตารางที่ 35 แสดงสถิติ One-way anova ปริมาณ Cell uptake ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	100
ตารางที่ 36 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) ปริมาณ Cell uptake ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน	101
ตารางที่ 37 แสดงสถิติ One-way anova ปริมาณ Cell uptake ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดกราโฟไลด์	103
ตารางที่ 38 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) (ปริมาณ Cell uptake ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดกราโฟไลด์	104

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดง วงจรชีวิตของเซลล์	6
รูปที่ 2 แสดงอวัยวะต่างๆภายในร่างกาย	7
รูปที่ 3 แสดงการเข้าเซลล์แบบ paracellular pathway และ transcellular pathway	10
รูปที่ 4 แสดงการเข้าเซลล์แบบต่างๆ	10
รูปที่ 5 แสดงการก่อกอพอลิเมอร์ไมเซลล์	11
รูปที่ 6 แสดงการก่อกอไมเซลล์ในรูปแบบต่างๆ	12
รูปที่ 7 แสดงกลไกการเกิดเป็นไมเซลล์ของ Poloxamer	14
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของเคอร์คูมิน	17
รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์	17
รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของสารแอนโดรกราโฟไลด์	19
รูปที่ 11 เครื่อง Tensiometer	20
รูปที่ 12 เครื่อง Transmission electron microscopy	21
รูปที่ 13 หลักการทำงานของเครื่อง Zetazizer	23
รูปที่ 14 เครื่อง HPLC	24
รูปที่ 15 ระบบการทำงานของเครื่อง HPLC	25
รูปที่ 16 แสดงค่าการละลายตัวของเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ	34
รูปที่ 17 แสดงค่าการละลายตัวของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	35
รูปที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแรงตึงผิวและความเข้มข้นของ poloxamer407	37
รูปที่ 19 กราฟแสดงขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมิน	41
รูปที่ 20 กราฟแสดงค่า Zeta potential ของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมิน	42

สารบัญภาพ(ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 21 กราฟแสดงขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ที่ไม่เซลล์ที่บรรจุ ด้วยยาแอนโดรกราโฟไลด์	43
รูปที่ 22 กราฟแสดงค่า Zeta potential ของพอลิเมอร์ที่ไม่เซลล์ที่บรรจุ ด้วยยาแอนโดรกราโฟไลด์	43
รูปที่ 23 แสดงลักษณะอนุภาคพอลิเมอร์ที่ไม่เซลล์ที่ได้จากการเตรียม ภายใต้เครื่อง TEM	45
รูปที่ 24 ลักษณะอนุภาคพอลิเมอร์ที่ไม่เซลล์ที่ได้จากการเตรียม ภายใต้เครื่อง Polarized light microscope	46
รูปที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของ ตัวยาเคอร์คูมิน	47
รูปที่ 26 กราฟแสดงปริมาณของยาเคอร์คูมินที่ถูกบรรจุอยู่ในพอลิเมอร์ที่ไม่เซลล์	50
รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของ ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	51
รูปที่ 28 กราฟแสดงปริมาณของยาแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกบรรจุอยู่ใน พอลิเมอร์ที่ไม่เซลล์	54
รูปที่ 29 Chromatogram ของตัวยาเคอร์คูมิน	58
รูปที่ 30 Chromatogram แสดง % Entrapment efficiency ของยาเคอร์คูมินที่บรรจุอยู่ ในพอลิเมอร์ที่ไม่เซลล์	59
รูปที่ 31 Chromatogram ของตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	60
รูปที่ 32 Chromatogram แสดง % Entrapment efficiency ของยา แอนโดรกราโฟไลด์ที่บรรจุอยู่ในพอลิเมอร์ที่ไม่เซลล์	60

สารบัญภาพ(ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 33 เซลล์มะเร็งตับ(HepG2)	61
รูปที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของ ตัวยาเคอร์คูมิน	62
รูปที่ 35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของ ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	64
รูปที่ 36 Chromatogram แสดงปริมาณ % uptake ของตัวยาเคอร์คูมินใน เซลล์มะเร็งตับ(HepG2)	66
รูปที่ 37 Chromatogram แสดง ปริมาณ % uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับ ตัวยาเคอร์คูมินในเซลล์มะเร็งตับ(HepG2)	67
รูปที่ 38 Chromatogram แสดงปริมาณ % uptake ของตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ ในเซลล์มะเร็งตับ(HepG2)	68
รูปที่ 39 Chromatogram แสดงปริมาณ % uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับ ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ในเซลล์มะเร็งตับ(HepG2))	68
รูปที่ 40 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยาที่ถูก uptake และเวลาต่างๆ	69

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันนี้อัตราการตายเกิดจากหลายปัจจัยด้วยกัน ซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือโรคมะเร็ง โดยพบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆของประเทศไทย ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจในการพัฒนายามะเร็ง โดยมะเร็งที่เราสนใจก็คือ มะเร็งตับ เพราะโรคมะเร็งตับเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในประเทศไทย จากข้อมูลทางสถิติของกระทรวงสาธารณสุขปี พ.ศ. 2557 พบว่าโรคมะเร็งตับเป็นสาเหตุการเจ็บป่วยเรื้อรังจนเป็นสาเหตุการตายก่อนวัยอันควร สูงเป็นอันดับ 1 ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคมะเร็ง จำแนกตามกลุ่มโรคมะเร็ง ต่อประชากร 100,000 คน ในประเทศไทย พ.ศ. 2553-2557 (1) และจะมีแนวโน้มของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยแนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งในปัจจุบันมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การผ่าตัด รังสีรักษา และการใช้ยาเคมีบำบัดในการต้านเซลล์มะเร็ง (2) แต่ปัญหาของยาเคมีบำบัดคืออาการข้างเคียงของยา

ปัจจุบันจึงมีการศึกษาพัฒนาตัวยาจากสารสกัดจากธรรมชาติแทนยาเคมีบำบัด เพื่อใช้รักษามะเร็งเป็นจำนวนมาก พบว่ายามีหลายชนิด มีปัญหาต่างๆ เช่น ปัญหาด้านการละลาย เนื่องจากการละลายส่งผลต่อค่า Bioavailability ของยารูปแบบรับประทาน (3) และการที่ยามีค่าการละลายที่ต่ำ ทำให้การเตรียมยาให้อยู่ในรูปสารละลายความเข้มข้นสูงๆทำไม่ได้ และการเตรียมยาในความแรงต่ำๆ ก็จะมีผลให้ยาไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะต้องใช้ตัวทำละลาย ที่เหมาะสมในการละลายตัวยาเพื่อดูดซึมเข้าสู่เซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามการใช้ตัวทำละลายยังก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายอีกด้วย (4, 5, 6)

จากปัญหายามีค่าการละลายต่ำ ผู้วิจัยจึงพัฒนาระบบนำส่งพอลิเมอร์ไมเซลล์ซึ่งเป็นระบบนำส่งยารูปแบบอนุภาคระดับนาโนชนิดหนึ่งที่มีความสนใจมากขึ้น มีงานวิจัยของ MaLing Gou และคณะ ปี 2011 มีการพัฒนาระบบนำส่งไมเซลล์ ในการนำส่งเคอร์คูมินไปยังเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (7) เพื่อแก้ปัญหายาที่ละลายได้น้อยโดยใช้ระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ ในการขนส่ง เพราะมีข้อดีคือ ขนาดเล็ก พอลิเมอร์บรรจุยาได้มาก เตรียมได้อย่างสะดวก พอลิเมอร์ที่บรรจุ

ยาสามารถละลายน้ำได้ดีและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งระบบนำส่งนี้ได้รับความสนใจในการนำมาพัฒนามาใช้ในการนำส่งตัวยาที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อย เพื่อเพิ่มค่าการละลายให้ยาถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น หรืออาจส่งผลทำให้ยาอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้นด้วย ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (8)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการพัฒนาระบบนำส่งยาโดยเลือกใช้ยาต้นแบบ 2 ชนิดคือ เคอร์คูมิน และ แอนโดรกราโฟไลด์ โดยเกณฑ์การคัดเลือกยาต้นแบบคือ สารนั้นจะต้องมีคุณสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็งและมีค่าการละลายที่ต่ำ โดยเคอร์คูมินเป็นสารกลุ่ม โพลีฟีนอล (polyphenol) สกัดได้จากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L) มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดปวด ยับยั้งการอักเสบฆ่าเชื้อ และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และเซลล์มะเร็งปอดชนิด Non Small Cell Carcinoma (10) เช่นเดียวกับ สารสกัดแอนโดรกราโฟไลด์เป็นสารกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์แลกโตน (diterpenoid lactone) สกัดได้จากฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Burm.f. Wall ex Nees.) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งเต้านม (9) ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิด เป็นสารคนละกลุ่มกัน แต่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำและผ่านเข้าเซลล์ได้น้อยเหมือนกัน (9, 10) ทางผู้วิจัยจึงนำสารสองกลุ่มมาพัฒนาเป็นระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์เพื่อศึกษาผลในด้านการบรรจุสารลงในอนุภาคแตกต่างกันมาน้อยอย่างไร โดยงานวิจัยในครั้งนี้ออกใช้ Poloxamer 407 เป็นสารก่อไมเซลล์ เพื่อเตรียมเป็นพอลิเมอร์ไมเซลล์ ในการนำส่งยาไปสู่มะเร็งตับ เนื่องจาก Poloxamer 407 มีข้อดีคือ ไม่มีประจุมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (Biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (Biodegradability) และมีความเป็นพิษต่อร่างกายต่ำ (Low toxicity) โดยทีมงานวิจัยที่พัฒนา Poloxamer 407 มาใช้ในการนำส่งยาและสารต่างๆหลายชนิด (11) เช่น ช่วยเพิ่มค่าการละลายของตัวยาที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ ได้แก่ Indomethacin, Insulin, Piroxicam, Nifedipine เป็นต้น (12) อีกทั้งทีมงานวิจัยของ Dian และคณะ ปี 2014 ได้นำ Poloxamer 407 มาใช้ในการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Oral bioavailability) ของยา Quercetin ในการรักษามะเร็ง โดยนำไปทดสอบกับสุนัขพันธุ์ Beagle พบว่าสามารถเพิ่มระดับความเข้มข้นของยาในเลือดเมื่อเทียบกับยาเดี่ยวๆ (13) นอกจากนี้มีการนำใช้ในการนำส่งยาต้านมะเร็ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งที่ต่อต่อยา (14) รวมถึงสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในหนูทดลองได้ (15)

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์ไปยังเซลล์มะเร็งตับ โดยใช้ระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์

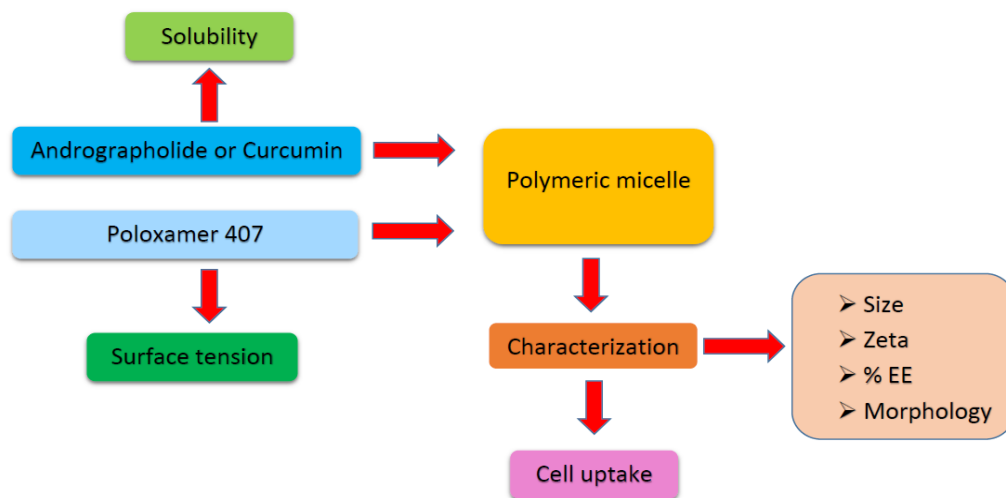
สมมติฐาน

ระบบพอลิเมอร์ไมเซลล์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับความรู้ในการเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์
2. ได้รับความรู้ในการทดลองและการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

กรอบแนวคิด



นิยามศัพท์เฉพาะ

Polymeric micelle

คือ ระบบนำส่งยาในรูปแบบหนึ่ง ซึ่งเหมาะกับยาที่ละลายน้ำน้อย สามารถก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้ด้วยตัวเอง เช่นเดียวกับไมเซลล์ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิว โดยสามารถกักเก็บสารหรือตัวยาที่ละลายน้ำได้น้อยไว้ในส่วนแกนกลางภายในอนุภาค

Cellular uptake

คือ การขนส่งสารเข้าสู่เซลล์โดยวิธีต่างๆ เช่น Paracellular pathway และ Transcellular pathway โดยวิธีขนส่งจะขึ้นอยู่กับขนาดของสาร ความชอบน้ำ และความชอบไขมัน เป็นต้น

Entrapment efficiency

คือ ประสิทธิภาพในการกักเก็บยาของพอลิเมอร์ไมเซลล์

Zeta potential

คือ ค่าประจุบนพื้นผิวของอนุภาค ซึ่งเกี่ยวข้องกับแรงผลักระหว่างอนุภาค

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1. มะเร็ง(Cancer)

1.1 อุบัติการณ์การเกิดมะเร็ง (1)

ในปัจจุบันนี้มะเร็งยังเป็นสาเหตุหลักของการตายของประชากร จากข้อมูลอัตราการตายจากมะเร็งทุกชนิดอยู่ที่ 91.2 ในปี พ.ศ. 2553 และ 107.9 ในปี พ.ศ. 2557 จำแนกตามสาเหตุการตายที่สำคัญ ต่อประชากร 100,000 คน ประเทศไทย พ.ศ.2553 และ พ.ศ. 2557 และโรคมะเร็งตับเป็นสาเหตุหลักของการตายในประชากร เนื่องจากตับถือเป็นอวัยวะหลักในการทำหน้าที่สังเคราะห์สาร เก็บรักษา ขจัดสารพิษ สะสมพลังงาน ซึ่งถือว่าเป็นหัวใจหลักของร่างกายก็ว่าได้ ถ้าตับเสียหาย ระบบการทำงานของร่างกายก็จะเสียหายไปด้วย มะเร็งตับจึงเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากที่สุดในกลุ่มของโรคมะเร็งอื่น จากข้อมูลอัตราการตาย จำแนกตามกลุ่มโรคมะเร็ง ต่อประชากร 100,000 คน ประเทศไทย พ.ศ. 2553-2557 และมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นเรื่อยๆ

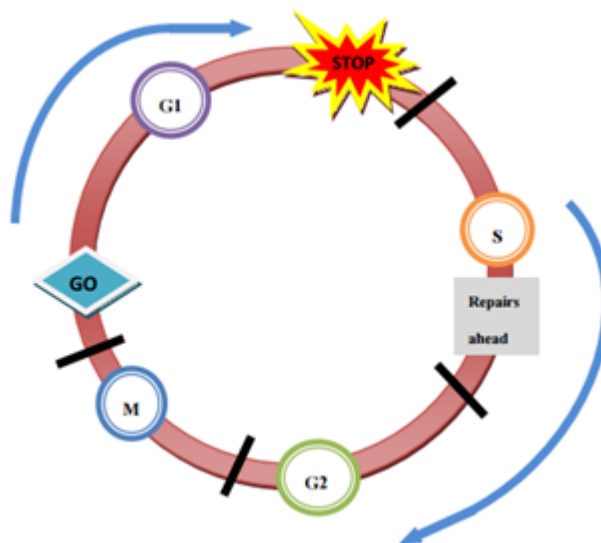
1.2 มะเร็ง(16, 17, 18)

มะเร็งเริ่มต้นจากเมื่อเซลล์ปกติเกิดการเปลี่ยนแปลงและเจริญเติบโตจนไม่สามารถควบคุมได้ โดยปกติแล้วเซลล์ร่างกายส่วนใหญ่จะมีการสร้างหรือผลิตตัวเองขึ้นมาใหม่ โดยจะเป็นในแบบเดียวกัน ทำให้เซลล์จะเริ่มแก่และตายไปในที่สุด และเซลล์ตัวใหม่ก็จะเริ่มผลิตเซลล์ขึ้นมาแทนที่ ซึ่งในการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตของเซลล์ จะมีการควบคุมการแบ่งเซลล์ไปตามลำดับขั้นตอน แต่ในกรณีที่การแบ่งตัวของเซลล์ไม่สามารถที่จะควบคุมการแบ่งตัวได้ จะทำให้เกิดก้อนเนื้อที่เรียกว่าเนื้องอก (Tumor) ซึ่งเนื้องอกที่เกิดขึ้น สามารถพัฒนาเป็นเนื้องอกชนิดร้ายหรือเรียกว่ามะเร็ง (Cancerous) และเนื้องอกที่ไม่อันตราย (Benign) ได้ มะเร็งหรือเนื้องอกชนิดร้ายหมายถึงเซลล์จะสามารถเจริญเติบโตและแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ส่วนเนื้องอกที่ไม่อันตรายหมายถึงเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้แต่ไม่แพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ โดยความสามารถในการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกาย สามารถทำได้โดยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง เช่น เจริญเติบโตได้โดยตรงในเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือการย้ายเซลล์ไปยังตำแหน่งที่ไกลๆ ซึ่งเนื้องอกที่เกิดขึ้นสามารถที่จะเจริญเติบโตและรบกวนการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย เช่น

ระบบย่อยอาหาร ระบบประสาท ระบบไหลเวียนเลือด และนอกจากนี้ เองก็ยังสามารถปล่อยฮอร์โมนที่เปลี่ยนแปลงการทำงานของร่างกาย ทำให้เกิดอันตรายแก่ร่างกายได้

กลไกการเกิดมะเร็งคือการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จากเซลล์ที่ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง ในการเปลี่ยนแปลงเซลล์นี้ จะมีสาเหตุหลายประการคือ การผ่าเหล่า (Random mutation) หรือการจัดเรียงตัวใหม่ของยีน (Gene rearrangement) การถูกกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำโดยสารเคมี เช่น โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbon) และอะโรมาติกเอมีน (Aromatic amine) เป็นต้น จากปัจจัยกายภาพ เช่น รังสีจากการติดเชื้อไวรัสโดยเฉพาะฮิวมนิไวรัส (Oncogenic viruses) ซึ่งแบ่งเป็นดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ไวรัส

1.3 วงจรชีวิตของเซลล์ (19, 20)

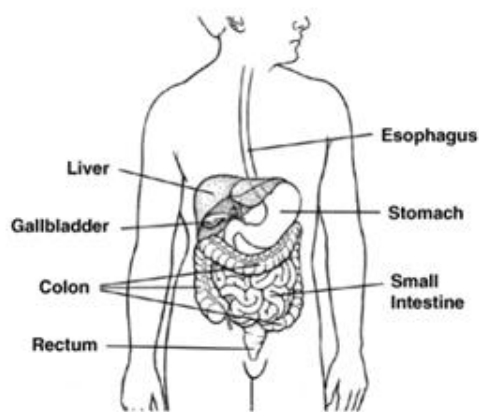


รูปที่ 1 วงจรชีวิตของเซลล์ (1)

วงจรชีวิตของเซลล์ (Cell cycle) คือ ช่วงระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ ซึ่งแต่ละเซลล์จะมีระยะเวลาในการแบ่งตัวที่แตกต่างกัน โดยในวงจรชีวิตของเซลล์ในร่างกายมนุษย์ จะมีระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง โดยระยะ G1 เป็นระยะก่อนสร้าง DNA ซึ่งมีการสังเคราะห์ที่ใช้ในการสร้าง DNA จะใช้ระยะเวลาประมาณ 11 ชั่วโมง ในระยะ S จะเป็นขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) ใช้ระยะเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง และระยะ G2 เป็นขั้นตอนหลังจากสร้าง DNA ซึ่งมีการ

สร้างสารอื่นๆเพิ่มเติม ใช้ระยะเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์จะมีการเจริญเติบโตเต็มที่ และพร้อมที่จะแบ่งนิวเคลียส ส่วนในระยะ M ก็จะมีการแบ่งตัวของเซลล์ต่อไป

1.4 ตับ (21)



รูปที่ 2 อวัยวะต่างๆภายในร่างกาย (21)

ตับเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย ซึ่งอยู่บริเวณใต้ซี่โครงขวา โดยจะอยู่ใต้ปอดด้านขวา ตับมีรูปร่างเหมือนปียramid และแบ่งออกเป็นกลีบขวาและกลีบซ้าย โดยตับได้รับเลือดมาจากสองแหล่ง คือ หลอดเลือด Hepatic artery ในการขนส่งเลือดที่มีออกซิเจนมาเลี้ยงตับ และ หลอดเลือด Portal vein ในการขนส่งสารอาหารจากลำไส้มายังตับ

1.4.1 หน้าที่ของตับคือ

- ช่วยย่อยและดูดซึมสารอาหารที่ได้จากลำไส้
- มีส่วนช่วยในการสร้าง clotting factors ที่จำเป็นเพื่อใช้ในการหยุดเลือดจากการได้รับบาดเจ็บ
- สร้างน้ำดีเพื่อส่งไปยังลำไส้เพื่อใช้ในการดูดซึมสารอาหาร
- ช่วยในการกำจัดสารพิษในเลือดและกำจัดออกจากร่างกาย
- ช่วยในการควบคุมระดับน้ำตาลในร่างกาย

1.5 มะเร็งตับ (21, 22)

หมายถึงมะเร็งที่เจริญเติบโตจากเซลล์ตับจะเรียกว่า Primary liver cancer ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 3 ชนิด โดยชื่อเรียกจะมีที่มาจากชนิดที่เซลล์มะเร็งมีการพัฒนา

- Hepatocellular carcinoma (HCC) : พบว่าเป็นมะเร็งตับชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด ซึ่งเกิดจากเนื้อร้ายในเซลล์ตับ (Hepatocytes) ที่มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันหลากหลายรูปแบบ โดยบางเซลล์จะมีการแพร่กระจายแบบคล้ายๆการยื่นเข้าไปในตับ บางเซลล์จะเริ่มจากเซลล์เดี่ยวแล้วแพร่ไปยังบริเวณต่างๆของตับทำให้เกิดการพัฒนาของโรคเกิดขึ้น
- Bile duct cancer : เกิดจากเซลล์ท่อน้ำดีบริเวณตับ โดยท่อน้ำดีเป็นท่อน้ำที่ซึ่งการเกิดมะเร็งสามารถแพร่กระจายไปยังถุงน้ำดีและส่งต่อไปยังลำไส้เล็กได้อีกด้วย
- Angiosarcomas : เริ่มจากเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดบริเวณตับ ซึ่งจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว

ในส่วนมะเร็งที่เกิดจากบริเวณอื่นแล้วแพร่กระจายเข้าสู่ตับจะเรียกว่า Secondary liver cancer โดยพบได้มากกว่า Primary liver cancer สาเหตุของการเกิด Secondary liver cancer ที่พบได้บ่อยมักจะมาจาก ลำไส้ ทวารหนัก ปอด และเต้านม ซึ่งบริเวณดังกล่าวสามารถเกิดมะเร็งและแพร่กระจายเข้าสู่ตับ โดยลักษณะของเซลล์มะเร็งจะขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของมะเร็งนั้นๆ

ปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งตับคือ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (Chronic hepatitis B virus infection) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีผลทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเซลล์ตับ (Hepatocellular carcinoma) ได้ตั้งแต่ 5 ถึง 98 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อ

ส่วนปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการดำเนินโรค ได้แก่ ผลตรวจอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBeAg), ผลการตรวจหน้าที่การทำงานของตับ (Liver Function Test; ALT), อายุ, เพศ, ประวัติการดื่มแอลกอฮอล์, การรับประทานอาหารที่มีอัลฟลาทอกซิน (Aflatoxin), ประวัติโรคมะเร็งตับในครอบครัว และปริมาณเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกระแสเลือด (HBV DNA) รวมถึงภาวะติดเชื้ออื่นๆที่มักพบร่วมกับไวรัสตับอักเสบบี เช่น ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis C), ไวรัสตับอักเสบดี (Hepatitis D), ไวรัสเชชไอวี (HIV infection) เป็นต้น

1.6.การรักษา (5, 21)

The American Cancer Society ได้แนะนำวิธีการรักษาไว้ดังนี้

1.6.1 การผ่าตัด (Surgery)

Partial hepatectomy เป็นการตัดบริเวณที่เกิดมะเร็งของเซลล์ตับ ซึ่งสามารถใช้รักษามะเร็งเดี่ยวๆ ที่ไม่มีการแพร่กระจายเข้าสู่เส้นเลือด มักใช้กับผู้ป่วยที่มีการทำงานของตับปกติ

Liver transplant เป็นทางเลือกสำหรับผู้ป่วยที่มีก้อนมะเร็งขนาดเล็ก มักใช้กับผู้ป่วยที่มีการทำงานของตับไม่ปกติ

1.6.2 Other local treatments, such as ablation or embolization

Ablation วิธีการทำลายเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้นำส่วนของมะเร็งออกไป เช่น การให้ความร้อนโดยใช้รังสี, ฉีดแอลกอฮอล์เข้าสู่เซลล์มะเร็ง, ให้ความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ และการแช่แข็ง ซึ่งมักใช้ในผู้ป่วยที่มีเซลล์เนื้องอกขนาดเล็กที่ไม่สามารถทำการผ่าตัดได้

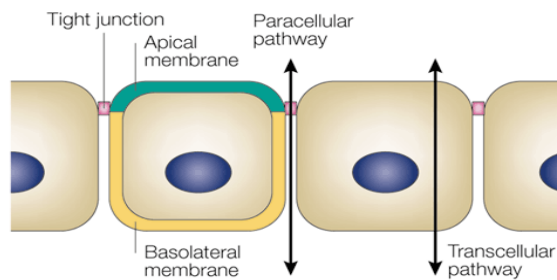
Embolization เป็นการนำสารบางอย่างใส่ลงไปในหลอดเลือดเพื่อส่งไปยังเซลล์มะเร็ง ในการยับยั้งหลอดเลือดที่เลี้ยงเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจใช้ยาหรือรังสีร่วมด้วย เรียกวิธีดังกล่าวว่า Chemoembolization และ Radioembolization ตามลำดับ

Radiation เป็นการรักษาโดยใช้รังสีที่มีพลังงานสูง เพื่อใช้ในการฆ่าเซลล์มะเร็งหรือทำให้เซลล์เล็กลง แต่อย่างไรก็ตามนอกจากรังสีจะสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งแล้ว รังสียังทำลายเซลล์ปกติในร่างกาย จึงมักใช้ในการลดขนาดเซลล์มะเร็ง และลดอาการเจ็บปวด วิธีนี้มีความรวดเร็ว แต่จะต้องใช้ความระมัดระวังในการใช้รังสี

Targeted therapy เป็นการพัฒนายาเคมีบำบัดในการใช้ในการรักษาเซลล์มะเร็งที่ฆ่าเซลล์มะเร็งโดยตรงและลดอาการข้างเคียงจากการทำลายเซลล์ปกติ ซึ่งมีการทำงานแตกต่างจากยาเคมีบำบัดทั่วไป

Chemotherapy เป็นการให้ยาในการฆ่าเซลล์มะเร็ง โดยยาจะอยู่ในกระแสเลือด และแพร่กระจายไปยังเซลล์มะเร็ง ซึ่งการให้ยาเคมีบำบัดมักทำให้เกิดอาการข้างเคียง เนื่องจากการออกฤทธิ์ไม่จำเพาะของยาด้านมะเร็ง ทำให้ยายับยั้งเซลล์ปกติจึงเกิดอาการข้างเคียงต่างๆได้

1.7 การเข้าเซลล์(23, 24)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

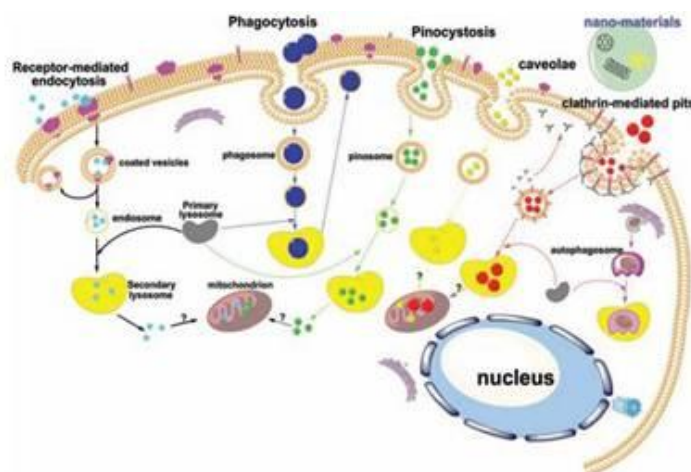
รูปที่ 3 การเข้าเซลล์แบบ Paracellular pathway และ Transcellular pathway

การขนส่งยาผ่านเซลล์ของพอลิเมอร์ไมเซลล์เกิดขึ้นโดย 2 วิธี

1.7.1 Paracellular pathway

เป็นการขนส่งที่ขบ่น้ำผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แต่มีข้อจำกัด คือ พื้นที่ที่ใช้ประโยชน์ในการแพร่ผ่านมีน้อย (น้อยกว่า 1% ของพื้นที่ของเยื่อหุ้มเซลล์) และจำนวนของ tight junction ที่มีอยู่ จะควบคุมการผ่านของตัวถูกละลาย โดยรูของช่องว่างระหว่างเซลล์ จะมีขนาด 3-5 nm ดังนั้นพอลิเมอร์ไมเซลล์ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยวิธี Paracellular pathway ได้ แม้ว่าพิจารณาความยืดหยุ่นของโครงสร้างพอลิเมอร์ไมเซลล์ รวมถึงขนาดและความขบ่น้ำของพื้นผิว จึงมีการใส่ EGTA ไปช่วยให้ tight junction ขยายใหญ่ขึ้น ทำให้สามารถขนส่งพอลิเมอร์ไมเซลล์ขนาด 45 nm ได้ นอกจากนี้บางพอลิเมอร์ เช่น Chitosan มีรายงานว่าสามารถขยาย tight junction ได้อีกด้วย

1.7.2 Transcellular pathway



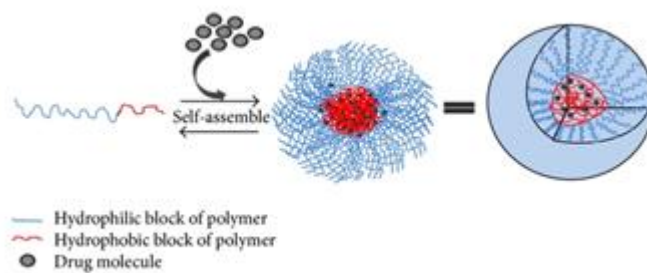
รูปที่ 4 การเข้าเซลล์แบบต่างๆ

สามารถอธิบายได้โดย Clathrin-dependent และ Clathrin-independent โดยวิธีนี้จะเป็นการขนส่งสารที่ไม่ละลายน้ำผ่านทาง Transcellular route สารที่ถูกขนส่งจะจับกับตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์แล้วฟอร์มคอมเพล็กซ์ โดยการที่เยื่อหุ้มเซลล์จะบุ๋มลงไปแล้วยาจะไปอยู่ในหลุมนั้นจนได้เป็น Transcytotic vesicle เพื่อป้องกันการถูกทำลาย จากนั้น Transcytotic vesicle จะถูกขนส่งไปยังเซลล์ที่ต้องการ แล้วก็จะปลดปล่อยยาออกมา

2. คุณสมบัติทั่วไปของพอลิเมอร์ไมเซลล์

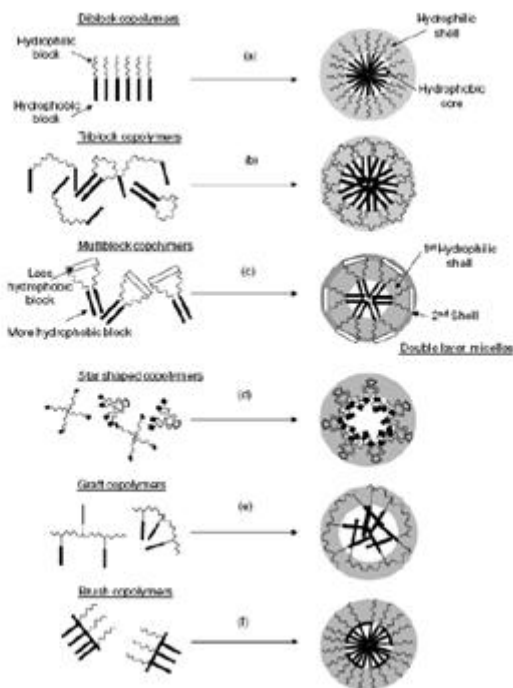
2.1 พอลิเมอร์ไมเซลล์ (25, 26)

2.1.1 พอลิเมอร์ไมเซลล์



รูปที่ 5 การก่อพอลิเมอร์ไมเซลล์

พอลิเมอร์ไมเซลล์ ประกอบไปด้วยสองส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic block) และส่วนที่ชอบไขมัน (Hydrophobic block) โดยทั่วไปเมื่อพอลิเมอร์ไมเซลล์กระจายตัวอยู่ในสารละลายมีขั้วจะมีขนาดของอนุภาคน้อยกว่า 100 นาโนเมตรซึ่งมีการก่อไมเซลล์ได้หลายลักษณะด้วยกัน (ดังรูปที่ 6) ขึ้นกับชนิดของ polymer



รูปที่ 6 การก่อไมเซลล์ในรูปแบบต่างๆ

2.1.2 การเกิดไมเซลล์

เกิดขึ้นในสารละลายเมื่อความเข้มข้นของบล็อกโคพอลิเมอร์ (Block copolymer) เพิ่มขึ้นจนถึงจุดวิกฤต เรียกว่า Critical Aggregation Concentration (CAC) หรือ Critical Micelle Concentration (CMC) โดยจุด CAC หรือจุด CMC ส่วนที่ชอบไขมันของ Block copolymer จะเริ่มรวมตัวกันให้แน่นขึ้นในส่วนที่ต้องสัมผัสกับน้ำ นำไปสู่การรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน หรือ โครงสร้าง Core-shell micellar

จากทฤษฎีการรวมกันของไมเซลล์ จะเกิดขึ้นจากการลดพลังงานอิสระมีการเคลื่อนย้ายของส่วนที่ชอบไขมันจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำ และเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ในน้ำเพื่อลดพลังงานอิสระของระบบแล้วรวมตัวเป็นไมเซลล์ขึ้น

การเตรียมอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์สามารถเตรียมได้หลายวิธี ดังนี้

- Dialysis method
- Oil-in-water emulsion solvent evaporation method
- Solid dispersion method

2.1.7 คุณสมบัติของโครงสร้างพอลิเมอร์ไมเซลล์

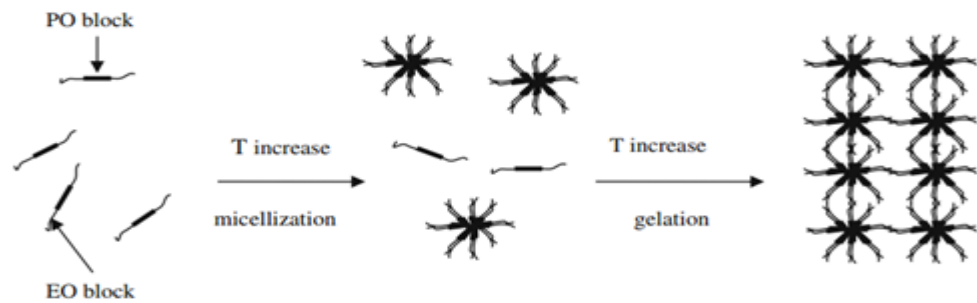
ลักษณะโครงสร้างไมเซลล์จะแสดงให้เห็นถึง ขนาด ขนาดของการกระจาย Microstructure ขนาดของแกนกลาง จำนวนการรวมตัวกันของไมเซลล์ ความหนาแน่นของไมเซลล์ และขนาดของการกระจายตัวของพอลิเมอร์ไมเซลล์ วัดได้โดย Static และ Dynamic light scattering (DLS) และ Microscopic techniques

2.2 Poloxamer (11, 12, 27, 28, 29)

Poloxamer เป็น non-ionic surface active agents ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดไตรบล็อกโคพอลิเมอร์ (Triblock co-polymer) มีโครงสร้างแบบแอมฟิฟิลิกพอลิเมอร์ ประกอบด้วย Polyethylene oxide (PEO)(A) ซึ่งเป็น

Hydrophilic part และ Polypropylene oxide (PPO)(B) ซึ่งเป็น Hydrophobic part ลักษณะทางกายภาพเป็นผงหยาบ ของแข็งสีขาว มีความมันวาว เมื่อละลายเป็น Solution จะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ทำให้นิยมนำมาใช้ในทางเภสัชกรรม

Poloxamer 407 มีชื่อการค้าที่ถูกจดทะเบียนว่า Pluronic F127® (BASF laboratories, Wyandotte, USA) และ Synperonic F127® (ICI laboratories, Wilton, UK) น้ำหนักโมเลกุล 12,600 มีค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) เท่ากับ 22 ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้นำเสนอ Poloxamer 407 ให้เป็น Inactive ingredient ในการตั้งตำรับเภสัชภัณฑ์ ตัวอย่าง เช่น ผลิตภัณฑ์ยาฉีด ยาากิน ยาพ่นจมูก ยาน้ำใส ยาน้ำแขวนตะกอน ยาตา และยาใช้ภายนอกอื่นๆ ซึ่งมีมากกว่า 30 ชนิด แตกต่างกันไปตามสัดส่วนของหมู่ PEO และ PPO



รูปที่ 7 กลไกการเกิดเป็นไมเซลล์ของ Poloxamer

Poloxamer 407 มีคุณสมบัติ Thermoreversible คือ สารละลาย Poloxamer สามารถเปลี่ยนสถานะจากของเหลวที่อุณหภูมิต่ำไปเป็นเจลได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะเรียกว่า Sol-gel transition temperature ($T_{sol-gel}$) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสถานะ จะค่อยเกิดขึ้นช้า และสามารถผันกลับเป็นของเหลวได้เมื่ออุณหภูมิต่ำลงกว่า $T_{sol-gel}$ จึงเรียก เจลของ Poloxamer ว่า Thermo-reversible gel การเปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลนั้น อธิบายได้โดยทฤษฎีของการก่อตัวเป็นไมเซลล์ เกี่ยวข้องกับค่าความเข้มข้นวิกฤตของการก่อตัวเป็นไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration : CMC) ซึ่งมีค่าเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิต่ำ ค่า CMC มีค่าสูง แสดงว่าสารละลาย Poloxamer จะต้องมีความเข้มข้นมาก จึงจะกลายเป็นเจลได้ กลไกในการก่อตัวเป็นไมเซลล์เกิดจากปฏิกิริยา Micellization เนื่องจากสาย Poloxamer ประกอบด้วยทั้งส่วนที่ชอบน้ำคือ PEO และส่วนที่ไม่ชอบน้ำคือ PPO เมื่ออุณหภูมิสูงค่อยๆสูงขึ้นส่วน PPO จะมีค่าการละลายที่ต่ำลงเรื่อยๆจนถึง $T_{sol-gel}$ จะเกิดการก่อตัวเป็นไมเซลล์ขึ้นโดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำคือ PPO เข้าด้านใน และส่วนที่ชอบน้ำคือ PEO ออกด้านนอก สารละลายจึงมีความหนืดสูงขึ้นจนกลายเป็นเจลในที่สุด โดยไมเซลล์ ที่ได้จะมีลักษณะทรงกลม (Spherical) ส่วนแกนจะเป็น Dehydrated polyPO และด้านนอกจะเป็นสาย Hydrated polyEO โดยลักษณะของไมเซลล์ จะขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย ตัวอย่าง เช่น Poloxamer 407 ความเข้มข้น 20% และ 40% ในน้ำ จะมีลักษณะไมเซลล์ เป็น Face centred cubic และที่ความเข้มข้นสูงสุด 50% จะมีลักษณะไมเซลล์ เป็น Body centred cubic packing

2.3 คุณสมบัติของ Poloxamer 407 สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมได้หลากหลาย

2.3.1 การช่วยเพิ่มค่าการละลาย (Solubilization Promotin)

Poloxamer ช่วยเพิ่มค่าการละลายของตัวยาที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ เช่น Indomethacin, Insulin, Piroxicam, Nifedipine เป็นต้น โดยการก่อตัวเป็นไมเซลล์แล้วหุ้มตัวยาเอาไว้ภายในโครงสร้าง ตัวอย่างเช่น Piroxicam มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นถึง 11 เท่าเมื่อผสมอยู่ในสารละลาย Poloxamer ความเข้มข้น 22.5 % w/w, Nifedipine มีค่าการละลายเพิ่มขึ้นถึง 27 เท่าเมื่อผสมอยู่ในสารละลาย Poloxamer 4 % w/w เป็นต้น

2.3.2 การช่วยเพิ่มความคงตัว (Stabilisation Properties)

มักมีการใช้ Poloxamer เป็นสารช่วยเพิ่มความคงตัวของตำรับยาโปรตีน โดยมีผลให้โปรตีนคงรูปร่าง 3 มิติได้ดี เกิดการแตกออกของสายโปรตีนได้น้อย และลดการเกิดการจับกันทางไฟฟ้า (Electrical binding) ของโปรตีน นอกจากนี้ มีการนำ Poloxamer มาเพิ่มความคงตัวของ Micro- หรือ Nano-particles ให้มีการแตกตัว (Aggregation) ได้ยากขึ้น รวมถึงตำรับไลโปโซม (Liposome) ซึ่ง Poloxamer จะทำให้ไลโปโซมคงตัวและมีค่าครึ่งชีวิตยาวนานขึ้น

2.3.3 คุณสมบัติการยึดติด (Adhesive Properties)

การยึดติดเนื้อเยื่อร่างกายเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของ Poloxamer ที่นำมาใช้ในตำรับยาใช้ภายนอกเช่น ยาหยอดตา, ยาเหน็บทวาร, และยาทาภายนอก เป็นต้น ซึ่งพบว่าทำให้ตำรับเกาะติดกับบริเวณที่ใช้ได้นานขึ้น ทำให้ตัวยาถูกดูดซึมได้ดีขึ้น โดยการยึดติดเนื้อเยื่อร่างกายของ Poloxamer จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและอุณหภูมิ

สูตรตำรับ Poloxamer 407 ถูกควบคุมอย่างจำกัดในการทดสอบในสิ่งมีชีวิต (vivo) เนื่องจากพบว่าเกิดการสูญเสียคุณสมบัติ Thermogelation และมีการเกิดปฏิกิริยาหลากหลายระหว่าง Copolymer และส่วนประกอบอื่นๆในตำรับ เช่น ตัวยาหรือสารช่วยต่างๆในตำรับ จึงควรมีการระมัดระวังในการใช้เพื่อให้เหมาะสม โดย Poloxamer 407 มีข้อดีคือมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (Biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (Biodegradability) และมีความเป็นพิษต่อร่างกายต่ำ (Low toxicity)

2.4 งานวิจัยที่พัฒนา Poloxamer 407 มาใช้ในการนำส่งยาต้านมะเร็ง(13, 15, 29, 30)

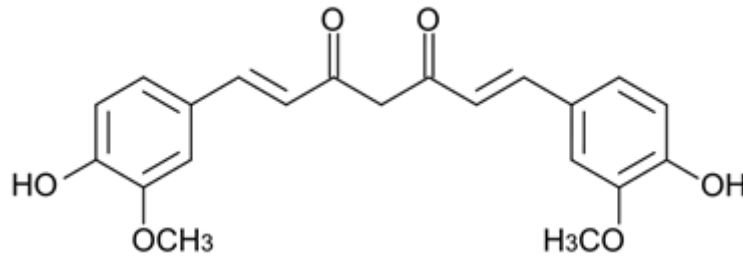
2.4.1 Anti-tumoural drugs (Intramuscular applications)

การศึกษาในการนำส่งยาในรูปแบบไมเซลล์ เพื่อใช้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (Multidrug-resistant cancer) โดยสารที่ใช้ในการทำไมเซลล์ นั้นเป็นส่วนผสมระหว่าง Poloxamers 407 และ D- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา โดยการเพิ่มความเข้มข้นของยาในการนำส่งไปยังเซลล์มะเร็งและยับยั้ง P-glycoprotein (P-gp)

Kabanov และคณะได้อธิบายแนวทางใหม่ในการประยุกต์ใช้ Pluronic® ในการรักษาเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยา โดยถูกค้นพบว่า Pluronic® ที่ได้สามารถเกิดปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาหลายชนิด ซึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งเกิดอาการแพ้ที่รุนแรง เนื่องจากสารต่างๆของยาต้านมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาปฏิชีวนะที่มีส่วนของแอนทราไซคลิน (Anthracycline antibiotics)

Amiji และคณะตรวจสอบประสิทธิภาพของ Paclitaxel หลังจากใช้ในการรักษามะเร็งเฉพาะที่ โดยถูกพัฒนาสูตรตำรับให้สารละลาย PF-127 สามารถเปลี่ยนเป็นเจลได้ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยมีกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ Control และ กลุ่มที่ได้รับสูตรตำรับ Paclitaxel-PF-127 ซึ่งถูกนำมารักษาก้อนมะเร็งโดยใช้ขนาดยา 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในเซลล์ Hematogenic B16 - F1 ของหนู Melanoma โดยผลที่จะนำมาศึกษาได้แก่ การเปลี่ยนแปลงขนาดของก้อนมะเร็ง ซึ่งจะศึกษาระยะเวลาการออกฤทธิ์ของยา และการรอดชีวิตในสัตว์ทดลอง ซึ่งผลดังกล่าวสามารถนำมาวัดประสิทธิภาพได้ การทดลองในหลอดทดลองพบว่า Paclitaxel ที่เป็นสูตรตำรับ Paclitaxel-PF-127 สามารถปลดปล่อยจากเจล PF-127 อย่างช้าๆ(ประมาณ 6.1% หลังให้ยา 6 ชั่วโมง) โดยคาดว่ายาที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อย การใช้สูตรตำรับ Paclitaxel-PF-127 ในการเข้าเซลล์มะเร็ง จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเกิดอย่างช้าในช่วงต้นประมาณ 67% และปริมาณเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นเป็น 72% ที่เวลาเป็นสองเท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำเกลือ นอกจากนั้นพบว่าเซลล์มะเร็งในหนู Mice ที่นำมาศึกษาที่ได้รับสูตรเจล PF-127 สามารถรอดชีวิตได้ถึง 91% ในวันที่ 15 หลังการรักษา เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่รอดชีวิตเพียง 58% การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Paclitaxel มีประโยชน์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำในรูปแบบ Insu gelling ในการรักษาเซลล์มะเร็งเฉพาะที่

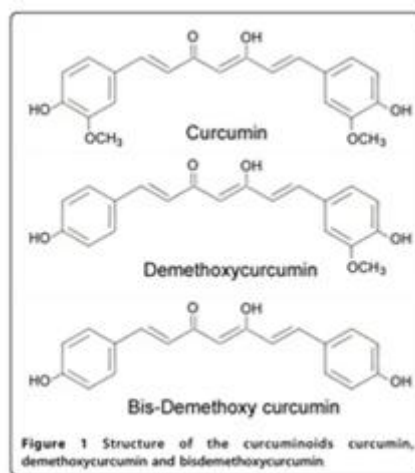
3. คุณสมบัติทั่วไปของเคอร์คูมิน (31, 32, 33)



รูปที่ 8 โครงสร้างของเคอร์คูมิน

3.1 การสกัดเคอร์คูมินจากขมิ้นชัน (Turmeric)

Curcuma longa L (ขมิ้นชัน) มีการปลูกในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งร้อน และแหล่งที่ปลูกขมิ้นชันมากที่สุดคือ อินเดีย ขมิ้นชันประกอบด้วย Curcuminoids 2%–9%



รูปที่ 9 โครงสร้างสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoid) ประกอบด้วยได้แก่ 1. curcumin 2. Demethoxycurcumin 3. Bis-demethoxycurcumin 4. Cyclic curcumin แต่ในทั้งหมดนี้เคอร์คูมินจะพบมากที่สุด และ Cyclic curcumin พบน้อยที่สุด ซึ่งสารเคอร์คูมินเป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล มีสีเหลือง

เคอร์คูมินสามารถแยกได้จากสารผสมเคอร์คูมิน (สารผสมของ Curcumin Demethoxycurcumin และ Bis-demethoxycurcumin) โดยใช้ Column chromatography ซึ่งใช้ Silica gel ในการแยกสาร และใช้ Dichloromethane/acetic acid หรือ Methanol/chloroform เป็น Solvents เพื่อแยกสารทั้งสามออกจากกัน การตรวจสอบสารของเคอร์คูมินจะใช้เทคนิค High Performance

Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Reverse phase C18 columns เป็น Stationary phase โดยใช้ Acetonitrile/water หรือ Chloroform/methanol เป็น Mobile phase เพื่อตรวจสอบสารเคอร์คูมิน โดยใช้ความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 350 - 450 nm

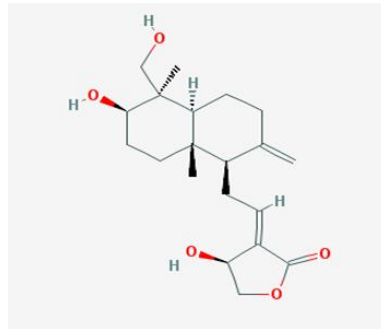
เคอร์คูมินอยด์ละลายน้ำน้อย ละลายในน้ำน้อยกว่า 0.1 mg/ml และละลายในเอทานอลได้ 10 mg/ml ละลายใน DMSO ได้ 25 mg/ml ละลายในอะซิติดเอซิด ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M ละลายใน Na_2CO_3 10 mM ละลายใน Acetone และ Chloroform.

3.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง กับ สารสกัดเคอร์คูมิน

ประสิทธิภาพของเคอร์คูมินจะมีผลในกระบวนการ Transcription factors oncogenes และ Signaling proteins ในแต่ละขั้นตอนของการเกิดมะเร็ง จากชั้นเริ่มต้นไปสู่การกลายพันธุ์ของ DNA ที่ผ่านกระบวนการเติบโตและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากมีมันชั้นสามารถไปที่เซลล์ได้กว้าง และหลากหลาย ส่งผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์เป้าหมาย ทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษาเซลล์มะเร็งได้หลากหลาย เคอร์คูมินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้ง UV irradiation ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน DNA ได้ และการชักนำของ SOS functions นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้ง การผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) และ ความสามารถในการกำจัด DNA damaging superoxide radicals เคอร์คูมินยังมีผลต่อ Phase I และ Phase II ของเอนไซม์ Cytochrome P450 ที่ตับ ซึ่งเกี่ยวข้องในการเกิดออกซิเดชัน และการกำจัดของเสีย โดยเคอร์คูมินจะยับยั้งเอนไซม์ Phase I ที่เหนี่ยวนำให้ตอบสนองเมื่อสัมผัสสารพิษ และการเมตาบอลิซึมของสารก่อมะเร็งที่กระจายใน DNA ที่นำไปสู่กระบวนการออกซิเดชันของสาร ในทางตรงกันข้ามเคอร์คูมินจะเพิ่มเอนไซม์ Phase II ซึ่งช่วยในการกำจัดของเสีย อีกทั้งมีฤทธิ์ในการรักษามะเร็งได้หลากหลายชนิด เช่น มะเร็งในช่องปาก มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้เล็ก เป็นต้น

อีกทั้ง p53 ยังมีความสำคัญในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นเส้นทางการส่งสัญญาณที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการตายของเซลล์ นอกจากนี้ในเซลล์มะเร็งแรกเริ่ม เคอร์คูมินจะเพิ่มการสังเคราะห์ของโปรตีน p53 หรือโปรตีนอื่นๆ ที่เพิ่มความคงตัวของ p53 และเพิ่ม Nuclear translocation เพื่อให้ได้ Transactivate Cip1 และ Gad45 ที่แสดงให้เห็นว่า p53-Associated signaling pathway ของเคอร์คูมิน มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการตายของเซลล์มะเร็ง เคอร์คูมินเพิ่ม p53 ที่ G2 phase ของวัฏจักรเซลล์ และเพิ่มการจับของ p53 กับ DNA ในการทำให้เซลล์ตายใน G2 phase

4. คุณสมบัติทั่วไปของแอนโดรกราโฟไลด์ (34, 35, 36)



รูปที่ 10 โครงสร้างของสารแอนโดรกราโฟไลด์

Andrographis paniculata Ness (Acanthaceae) เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน มีลักษณะเป็นพืชไม้พุ่ม ที่เจริญเติบโตในสภาพภูมิอากาศชื้นบริเวณร้อนในประเทศอินเดีย จีน อินโดนีเซีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาค่อนข้างกว้าง

ส่วนประกอบหลักของ *A. paniculata* Ness คือ Diterpene lactone โดยมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ คือ แอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็ง ไม่มีสี เป็น crystalline โดยมีชื่อทางเคมี คือ 3,14,15,18-tetrahydroxy-5,9 H,10-labda-8(20),12-dien-16-oic acid-lactone มีสูตรทางเคมี $C_{20}H_{30}O_5$ น้ำหนักโมเลกุล 350.45 g/mol ละลายน้ำได้น้อย ละลายได้ดีใน Acetone, Methanol, Chloroform และ Ether จุดหลอมเหลว 229-232° C

คุณสมบัติทางคลินิกในสัตว์ทดลองพบว่า แอนโดรกราโฟไลด์ มีฤทธิ์ต้านไวรัส, ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์, เป็นตัวควบคุมทำให้เกิดการตาย, รักษาเบาหวาน, ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่, ต้านการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด, รักษาโรคพิษมาเนีย, ป้องกันการทำลายตับ, ป้องกันการเกิดแอลกอฮอล์เหนียวน้ำตาลอักเสบ, ป้องกันการเกิดพิษต่อไต, ป้องกันหัวใจถูกทำลาย และต้านการอักเสบ โดยมีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งใน Tumor cell lines หลายๆชนิด เช่น Leukemia, Myeloma, HeLa, Colon (HT-29), Human peripheral blood lymphocytes (HPBLs), และ Human breast cancer MCF-7 ซึ่งพบว่าแอนโดรกราโฟไลด์ สามารถยับยั้ง DNA Topoisomerase II อีกทั้งมีการศึกษาของ Satyanarayana และคณะรายงานว่าแอนโดรกราโฟไลด์ สามารถยับยั้ง Cell cycle จาก Human breast cancer cell MCF-7 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้ง p27 ในกระบวนการ Cell-cycle อีกทั้งลดการแสดงออก Cyclin-dependent kinase ซึ่งมีหลักฐานพบว่า แอนโดรกราโฟไลด์ อาจทำให้เกิด Cytotoxicity ต่อ DNA fragmentation และเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์เกิด Apoptosis-inducing ในเซลล์ T47-D Human breast cancer cell line

5. เครื่อง Tensiometer



รูปที่ 11 เครื่อง Tensiometer

เป็นเครื่องมือวัดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับอากาศ (Surface Tension) แรงตึงผิวระหว่างของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ผสมกัน (Interfacial Tension) โดยอาศัยหลักการวัดแรงที่ผิวต่ออุปกรณ์ วัด เช่น Du Nouy Ring หรือ Wilhelmy Plate นอกจากนี้เครื่องมือยังใช้ศึกษาคุณสมบัติกายภาพอื่นๆ ของของเหลวและวัสดุได้ อาทิเช่น Wetting Properties ของวัสดุ ซึ่งได้จากการวัดมุมสัมผัส (Contact angle) ระหว่างวัสดุนั้นๆ กับของเหลว ความสามารถในการดูดซับของของเหลวกับวัสดุ (Adsorption) โดยอาศัยน้ำหนักการวัดที่เพิ่มขึ้นของวัสดุโดยละเอียด ความหนาแน่นของเหลว (Liquid Density) ความยืดหยุ่นของผิว (Surface Energy) ทั้งนี้มีการควบคุมการทำงานและประมวลผลโดยสมบรูณ์แบบด้วยระบบคอมพิวเตอร์

6. เครื่อง Transmission electron microscopy (TEM)

Transmission Electron Microscope (TEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบาง ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษ เพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ การสร้างภาพจากกล้องประเภทนี้จะทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่างนั่นเอง เครื่อง TEM เหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงเนื่องจากมีกำลังขยายสูงสุดถึง 0.1 nm



รูปที่ 12 เครื่อง Transmission electron microscopy

หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนั้น จะอาศัยลำแสงอิเล็กตรอนวิ่งไปชนกับวัตถุที่ต้องการจะส่อง โดยอาศัยการป้อนพลังงานไฟฟ้าไปยังขดลวดที่เป็นขั้วแคโทด เมื่อพลังงานมากพอ อิเล็กตรอนจะถูกปลดปล่อยออกมา แต่เนื่องจากอิเล็กตรอนเป็นขั้วประจุไฟฟ้า มันจะวิ่งเข้าไปหาอนุภาคที่มีขั้วประจุต่างกัน เช่น ในอากาศ ทำให้อิเล็กตรอนไม่สามารถวิ่งเข้าไปชนเป้าตัวอย่าง หรือ sample ได้ ดังนั้นภายในกล้องจุลทรรศน์จะต้องทำให้เป็นระบบสุญญากาศ และจะมี Condenser เป็นตัวเพิ่มความเข้มแสง ซึ่งจะใช้เป็นขดลวดพันรอบแท่งเหล็ก เพื่อเหนี่ยวนำให้ทิศทางของลำอิเล็กตรอนอยู่ในทิศทางเดียวกัน ซึ่งจะให้เกิดความเข้มของอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น

7. เครื่อง Rotary evaporator

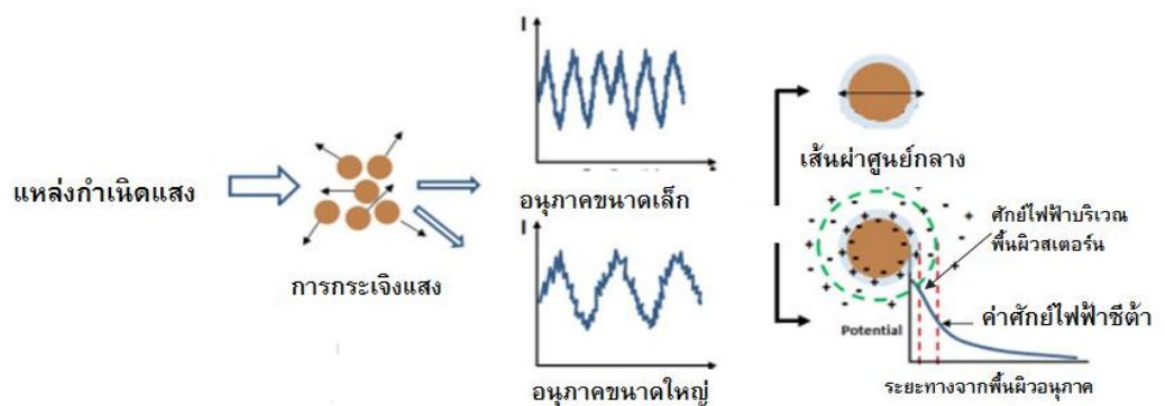
เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการระเหยสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวโดยการกลั่นเพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ออกจากสารที่สนใจ ทำให้สารที่สนใจเข้มข้นขึ้น โดยตัวทำละลายที่ละลายสารที่สนใจจะถูกทำให้กลายเป็นไอ ด้วยระบบสุญญากาศจาก Pump และให้ความร้อนแก่ตัวอย่าง เพื่อให้การกลายเป็นไอง่ายขึ้น จากนั้นไอสารละลายจะผ่าน Condenser ที่มีระบบหล่อเย็น ทำให้ไอสารควบแน่นกลายเป็นของเหลว ไหลลงสู่ Receiving flask โดยระบบประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วนคือ

- ส่วนให้ความร้อนและกลั่นแยกสาร (Rotary Evaporator)
เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการระเหยสารตัวอย่าง โดยกลั่นเพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ สามารถควบคุมความเร็วในการหมุนได้ และมีอ่างให้ความร้อนที่สามารถใช้กับของเหลวที่เป็นน้ำ หรือน้ำมัน ในกรณีน้ำช่วงที่เหมาะสมตั้งแต่ 20°C ถึง 85°C และใช้ได้ถึง 250°C ในกรณีน้ำมัน
- ส่วนทำสุญญากาศภายในระบบ
เป็นส่วนทำสุญญากาศภายในระบบส่วนใหญ่เป็นแบบปั๊ม สุญญากาศ โดยเครื่องในปัจจุบันควบคุมความดันแบบอิเล็กทรอนิกส์ สามารถควบคุมความดันได้ตั้งแต่ ความดันบรรยากาศ ถึง 0 mbar เครื่องใหม่ ๆ จะมีระบบ Condenser ชุดที่สอง ในการควบแน่นตัวทำละลายที่ระเหยผ่าน Condenser ชุดที่หนึ่งออกมา
- ส่วนควบคุมอุณหภูมิภายในระบบ
เป็นอ่างน้ำหมุนเวียนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง ช่วงปรับอุณหภูมิที่เหมาะสม จากประสบการณ์ที่มี ควรอยู่ในช่วง น้ำไม่เป็นน้ำแข็ง ถึงไม่เกิน 10°C องศา

8. เครื่องวัดขนาดอนุภาค ประจุไฟฟ้าบนอนุภาค และน้ำหนักโมเลกุล

หลักการทำงาน จะอาศัยการเคลื่อนที่ของอนุภาคแบบบราวเนียน (Brownian motion) ที่แขวนตะกอนอยู่ในสุตรดาร์บ โดยอนุภาคเหล่านี้จะเคลื่อนที่เข้า-ออกบริเวณช่องกันแสงผ่าน เมื่อแสงเลเซอร์ตกกระทบอนุภาค จะเกิดการกระเจิงแสงเลเซอร์ที่ ความเข้ม (Intensities) แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อ การกระเพื่อมขึ้น-ลงของความเข้มแสงกับเวลา (Time-dependent fluctuations) อนุภาคขนาดใหญ่มีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (Diffusion coefficient) ต่ำ จะเคลื่อนที่ช้ากว่าอนุภาคขนาดเล็ก ทำให้ความถี่ในการกระเพื่อมขึ้น-ลงของ แสงที่กระเจิงต่ำ อนุภาคขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าจึงมีความถี่ในการกระเพื่อมของแสงที่กระเจิงสูงกว่า ซึ่งความถี่ในการกระเพื่อมขึ้น-ลงของความเข้มแสงจะถูกส่งไปยังตัวรับสัญญาณเพื่อนำไปคำนวณหา ขนาดอนุภาค (R) โดยใช้สมการ Stokes-Einstein^{8,9}

การวัดประจุที่ผิวอนุภาคโดยใช้เทคนิคการกระเจิงแสงแบบการเคลื่อนสูงชั่วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม (Electrophoretic light scattering technique) โดยหาความต่างศักย์ระหว่าง ศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวสเตอร์น (Stern potential) กับศักย์ไฟฟ้าในสารละลาย เรียกว่า ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทำควมเข้าใจ และทำนายอันตรกิริยาต่าง ๆ เช่น การเกิดแรงผลัก (Repulsion) และแรงดึงดูด (Attraction) ของประจุระหว่าง อนุภาค และเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้บอกถึงความคงตัวของตำรับได้



รูปที่ 13 หลักการทำงานของเครื่อง Zetasizer

8.1 ความสามารถในการให้บริการวิเคราะห์ทดสอบ

- การวิเคราะห์ขนาดอนุภาค
- การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีตา (Zeta potential)
- การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล
- การวิเคราะห์ความเสถียรของอิมัลชัน
- การวิเคราะห์ความเสถียรของสูตรการเตรียมตัวอย่าง
- การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของฟอกเมนต์
- การวิเคราะห์สิ่งปนเปื้อน

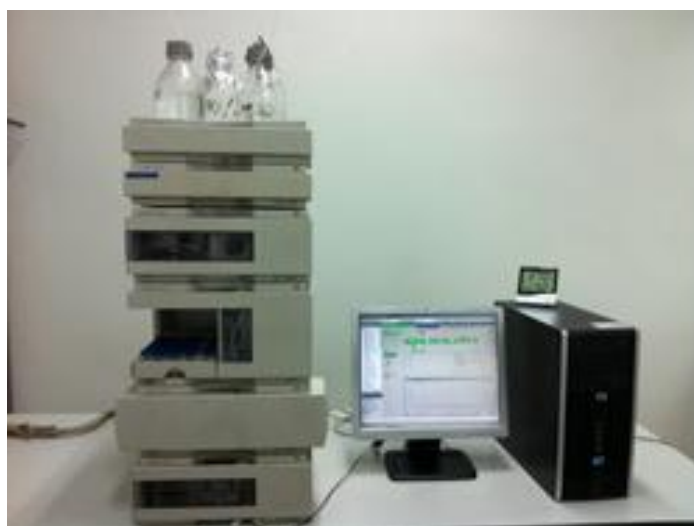
8.2 ตัวอย่างของการวิเคราะห์ตัวอย่างชิ้นงานด้วยเครื่อง Zetasizer

- การกระจายตัวของขนาดอนุภาค
- การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล
- การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า
- การทดสอบประจุของอนุภาคในของเหลวด้วยเทคนิค electrophoretic mobility

8.3 การประยุกต์ใช้งาน

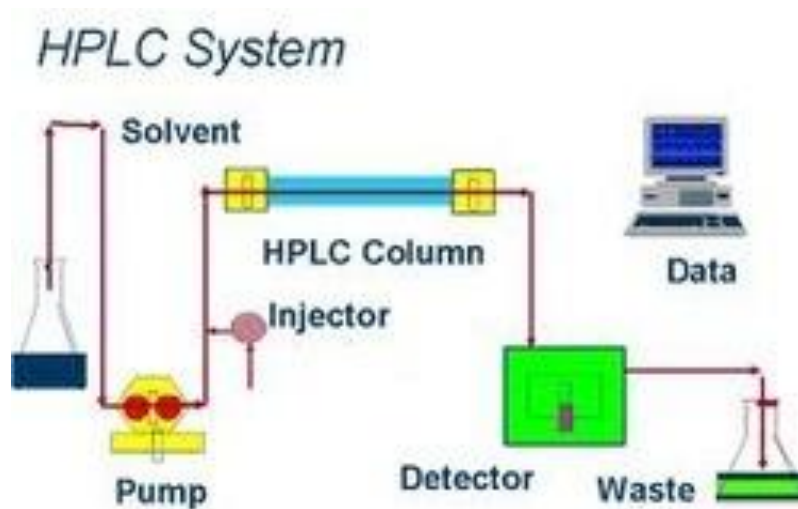
- สารแขวนลอย
- ตัวอย่างพอลิเมอร์
- การเตรียมตัวอย่างยาและเครื่องสำอาง
- การเตรียมอิมัลชัน
- สีและพิกเมนต์
- น้ำหมึกและสารปรับแต่ง
- การบำบัดน้ำเสีย

9. เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



รูปที่ 14 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography

HPLC เป็นวิธีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์สาร หลายชนิดที่ผสมกันได้พร้อมกัน ในการวิเคราะห์ต้องสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เข้าเครื่องตรวจวัดตามลำดับ ดังรูปที่ 15 ซึ่งอธิบายได้ว่า สารแต่ละชนิดแยกจากกันได้ หากเกิด Differential sorption ระหว่าง 2 เฟส คือ Stationary phase และ Mobile phase โดย Stationary phase เป็นของแข็ง หรือ ของเหลว เคลือบอยู่บนของแข็งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วน Mobile phase ที่เป็นของเหลวเรียกว่า สารละลายตัวชะ (Eluent) สารผสมเคลื่อนที่ผ่าน Stationary phase โดยการนำพาของ Mobile phase ด้วยเส้นทางที่แตกต่างกัน (Differential migration) ซึ่งเป็นผลจากการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดที่อยู่ในตัวอย่างบน Stationary phase แตกต่างกัน ทำให้สารแต่ละชนิดแยกจากกันได้ การใช้เครื่อง HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำระดับไมโครกรัมถึงนาโนกรัม สำหรับการวิเคราะห์ สารแต่ละชนิดต้องเลือกใช้คอลัมน์ สารละลายตัวชะ และดีเทกเตอร์ให้เหมาะสม



รูปที่ 15 ระบบการทำงานของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography

9.1 ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC

- Mobile phase / Solvent : หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ Stationary phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์
- Pump : ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (Mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC
- Injector / Autosampler : ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC
- Column : หรือจะเรียกว่า Stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง Mobile phase กับ Stationary phase
- Detector : คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

- 1.1 Rotary evaporator
- 1.2 Volumetric flask ขนาด 10 , 25 , 50 ml
- 1.3 Beaker ขนาด 20 , 50 , 100 , 250 , 400 และ 1000 ml
- 1.4 Cylinder ขนาด 10, 25, 50, 100 ml
- 1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 1.6 เครื่องวัดขนาดอนุภาค ประจุไฟฟ้าบนอนุภาค และน้ำหนักโมเลกุล
รุ่น Zetasizer (Malvern)
- 1.7 High Performance Liquid Chromatography : HPLC (Agilent Technologies)
- 1.8 HPLC vial
- 1.9 Transmission electron microscopy (TEM)
- 1.10 Pipet gun
- 1.11 Micropipet
- 1.12 Dropper
- 1.13 Tips
- 1.14 Test tube
- 1.15 Funnel
- 1.16 12 well plate

1.17 Alcohol burner

1.18 Tensiometer(Kruss)

1.19 Disposable Zeta cell

2. สารเคมี

2.1 Curcumin 75% (Merck)

2.2 Andrographolide 98.27% (Cactus Botanics)

2.3 Ethanol

2.4 Water

2.5 PBS7.4

2.6 Trypsin (Invitrogen)

2.7 Tryptan blue (Invitrogen)

2.8 Acetonitrile AR grade (Burdick&Jackson)

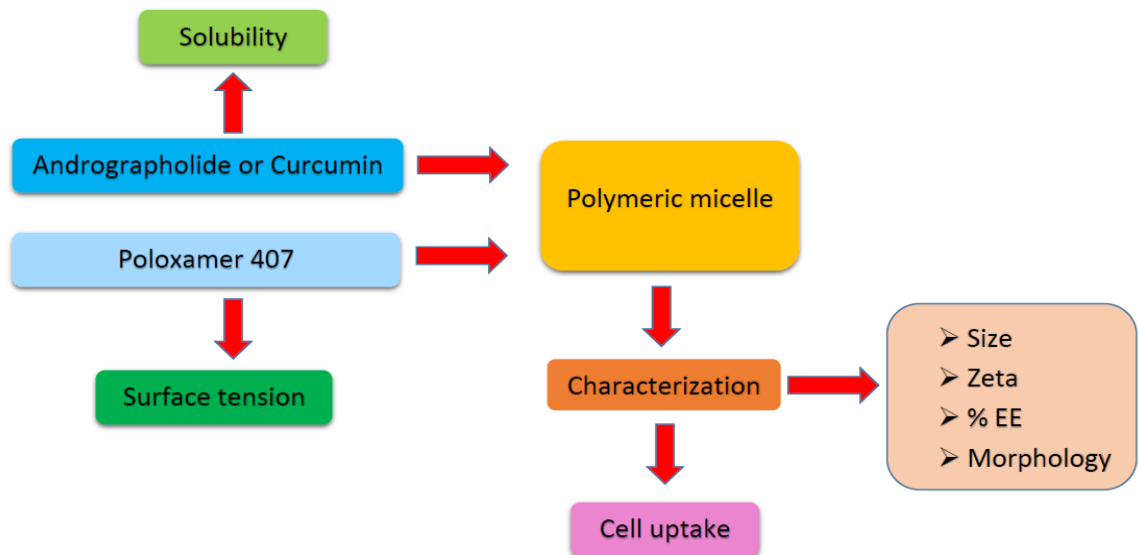
2.9 1%TritonX

2.10 DMEM (Biowest)

2.11 RPMI 1640 (Biowest)

2.12 Poloxamer 407 หรือ Pluronic® F-127 (Sigma)

3. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย



4. การพัฒนาวิธีวิจัย

4.1 ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับสูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์ และ คุณสมบัติและฤทธิ์ของสารต้นแบบที่นำมาใช้ ซึ่งได้แก่ เคอร์คูมิน และแอนโดรกราโฟไลด์ รวมถึงงานวิจัยก่อนหน้านี้ในการนำพอลิเมอร์ไมเซลล์นำส่งยา

4.2 ทดสอบการละลายของ เคอร์คูมิน และแอนโดรกราโฟไลด์ ที่ความเข้มข้น 25 ,30, 50, 75, 100, และ 150 ไมโครโมลาร์ ใน DMEM+ 0.1%DMSO

4.3 ทดสอบแรงตึงผิวของสูตรตำรับ โดยหาแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆของ Poloxamer 407 เพื่อใช้ในการหาจุด Critical Micelle Concentration (CMC) โดยใช้เครื่องวัดแรงตึงผิว (Tensionmeter)

4.4 การพัฒนาสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ โดยใช้วิธี Thin-film hydration โดยจะนำ เคอร์คูมินหรือแอนโดรกราโฟไลด์ ผสมกับ Poloxamer 407 และเติม Ethanol 10 มิลลิลิตร และนำไป Evaporation โดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ที่สภาวะ ความดัน 130 mmHg อุณหภูมิ 50 °C หลังจากระเหยตัวทำละลาย เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร เพื่อให้สารก่อตัวเป็นไมเซลล์ โดยจะเปรียบเทียบสัดส่วนของ Poloxamer กับตัวยาสำคัญที่สัดส่วนต่างๆ ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับเคอร์คูมิน ตำรับที่ 1-7

ตำรับที่	1C	2C	3C	4C	5C	6C	7C
poloxamer407(มิลลิกรัม)	50	100	200	500	200	-	1,000
เคอร์คูมิน(มิลลิกรัม)	5	5	5	5	10	5	5
ความเข้มข้น(mg/ml)	5	10	20	50	20	-	100

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับแอนโดรกราโฟไลด์ ตำรับที่ 1-7

ตำรับที่	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A
poloxamer407(มิลลิกรัม)	50	100	200	500	200	-	1,000
แอนโดรกราโฟไลด์ (มิลลิกรัม)	5	5	5	5	10	5	5
ความเข้มข้น(mg/ml)	5	10	20	50	20	-	100

4.5 การประเมินคุณสมบัติของอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์

4.5.1 การประเมิน ขนาดของอนุภาคและ Zeta potential

นำสูตรตำรับที่เตรียมได้เจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน สารละลาย 1 หยดต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร และนำไปวัดขนาดของอนุภาคและ zeta potential ด้วยเครื่อง zetasizer

4.5.2 การประเมินรูปร่างลักษณะ(Morphology)

โดยใช้เครื่อง Transmission electron microscopy(TEM) และเครื่อง Polarized light microscope

4.5.3 การหาปริมาณ % Entrapment efficiency (%EE) ในสูตรตำรับ

ปิเปตสูตรตำรับที่เตรียมได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Methanol จนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณยาโดยใช้เครื่อง HPLC

การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ HPLC อ้างอิงจากงานวิจัยเรื่อง Design and synthesis of novel bile acid derivatives as drug carriers

โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) และ สภาวะที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้

Curcumin condition

Mobile phase	Acetonitrile : DI water ในอัตราส่วน 50 : 50
Column	Reverse phase column C18, อนุภาคขนาด 5 μm , ความยาว 250 mm, เส้นผ่านศูนย์กลางผ่านใน 4.6 mm
Flow rate	1 ml/min
Detection	UV detector wavelength 421 nm
Injection	ปริมาตร 20 μl
Time	10 min
Retention time	Curcumin มีค่า retention time เท่ากับ 7.2 mins

การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ HPLC อ้างอิงจากงานวิจัยเรื่อง การศึกษาปัจจัยที่ส่งต่อความคงตัวของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล

โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) และ สภาวะที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้

Andrographolide condition

Mobile phase	Acetonitrile : DI water ในอัตราส่วน 40 : 60
Column	Reverse phase column C18, อนุภาคขนาด 5 μ m, ความยาว 250 mm, เส้นผ่านศูนย์กลางผ่านใน 4.6 mm
Flow rate	1 ml/min
Detection	UV detector wavelength 223 nm
Injection	ปริมาตร 20 μ l
Time	10 min
Retention time	Andrographolide มีค่า retention time เท่ากับ 4.2mins

นำ Area under curve มาคำนวณหา % Entrapment efficiency และนำข้อมูลทั้งหมดมาพิจารณาคัดเลือกสูตรเพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

$$\text{สูตรคำนวณ EE \%} = (\text{C drug loaded} / \text{C total drug}) \times 100$$

4.6 การศึกษาคูณสมบัติ cellular uptake

4.6.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับโดยดูดอาหาร RPMI 1640 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal Bovine serum (10% FBS) และ 1% penicillin/streptomycin ใส่ใน Flask เลี้ยงเซลล์ จากนั้นใส่เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ลงไป 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวให้ทั่ว แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37° C และ 5% CO₂ โดยจะทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน

4.6.2 การวัด Cellular uptake

นำเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ใส่ลงใน 12 well plate โดยจะมีเซลล์มะเร็งตับ 100,000 cells/well และแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม คือ

- 1).ระบบนำส่งที่กักเก็บตัวยาสำคัญอยู่ภายใน
- 2).ตัวยาที่ไม่ถูกกักเก็บในอนุภาค

โดยใส่กลุ่มตัวอย่างดังกล่าวลงในเซลล์ HepG2 และ Incubate 3 ชั่วโมง ทำการดูดสารละลายยาทิ้งและล้างด้วย Phosphate buffer อีก 2 ครั้ง เพื่อกำจัดยาที่ไม่เข้าเซลล์ออกให้หมด ทำการเติมตัวทำละลายให้ผนังเซลล์แตก (Cell lysis) เพื่อละลายยาที่อยู่ภายในเซลล์ออกมา และนำมากรอง 0.22 μm เพื่อกำจัดผนังเซลล์ออกไป ทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้ Condition เดียวกับขั้นตอนการหา % Entrapment efficiency

4.7 การศึกษาความคงตัวในสภาวะจำลองของร่างกาย

นำสูตรตำรับที่ได้จากการเตรียมใส่ลงใน Media 3 ชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ DMEM, RPMI1640 และ PBS 7.4 หลังจากนั้นนำไปเข้าตู้ Incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C และทำการวัดขนาดของอนุภาคและ Zeta potential ในวันที่ 1,3 และ 7

5. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ สถิติ One-way ANOVA และ Post-hoc (Tukey)

บทที่ 4

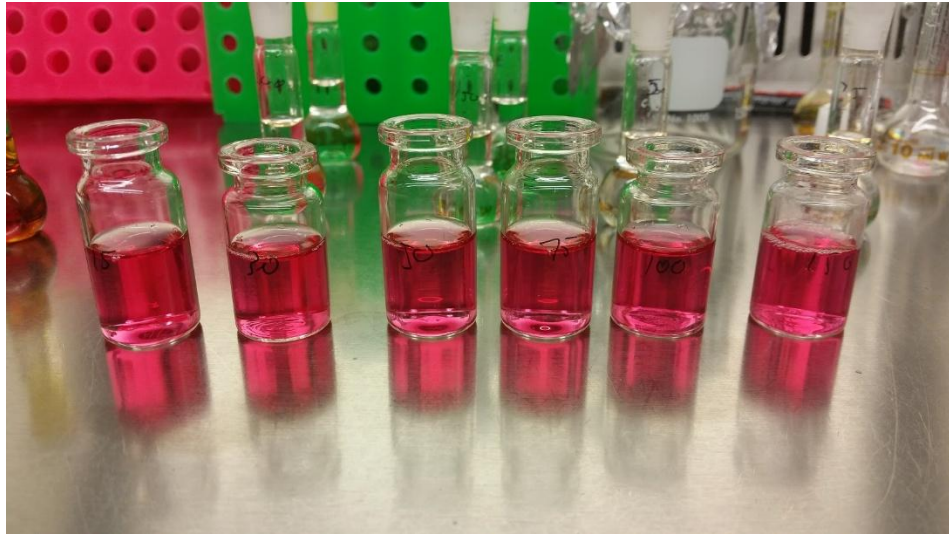
ผลการวิจัย

1. การทดสอบการละลายของตัวยา

ทดสอบการละลายเคอร์คูมินและตัวแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 25 ,30, 50, 75, 100, และ 150 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ในสารละลาย DMEM+0.1%DMSO



รูปที่ 16 แสดงค่าการละลายเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ



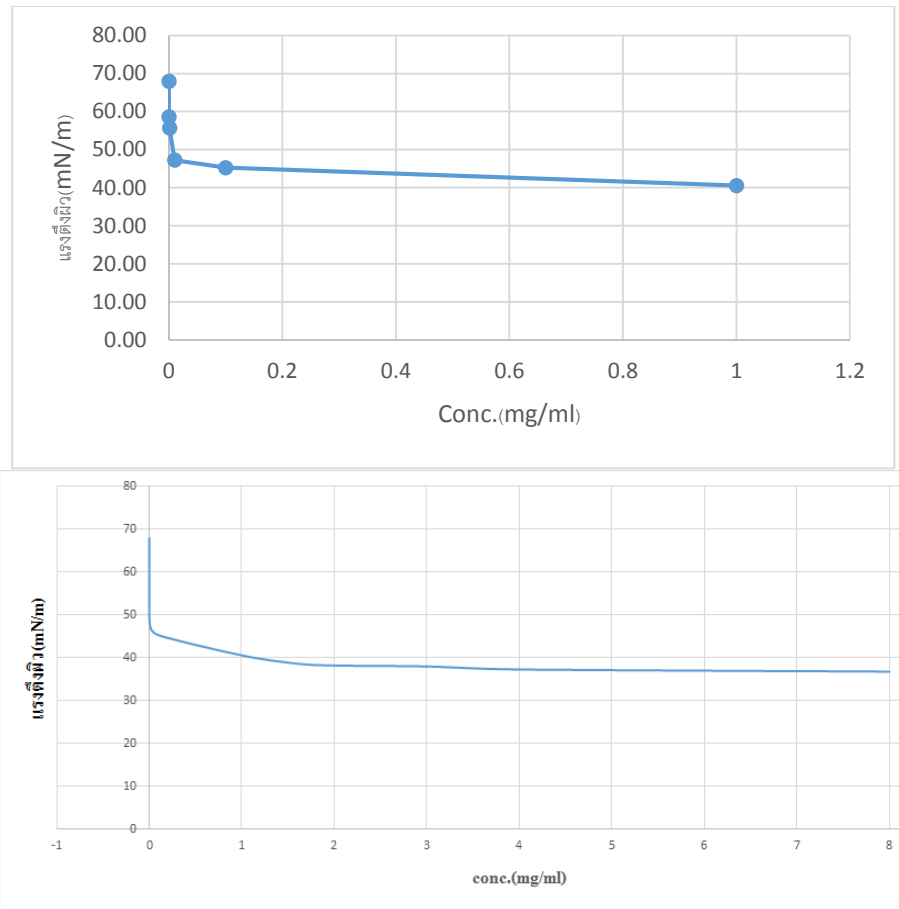
รูปที่ 17 แสดงค่าการละลายแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในปริมาตรตัวทำละลายที่เท่ากันเคอร์คูมินที่ความเข้มข้น 25, 30 และ 50 ไมโครโมลาร์ มีลักษณะเป็นสารละลายใสไม่มีตะกอน และเคอร์คูมินที่ความเข้มข้น 75, 100 และ 150 ไมโครโมลาร์ มีลักษณะสารละลายที่ได้ ขุ่น มีตะกอน และตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ พบว่าในปริมาตรตัวทำละลายที่เท่ากัน แอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 25, 30, 50, 75, 100, และ 150 ไมโครโมลาร์ มีลักษณะสารละลายใส ไม่มีตะกอน จึงสรุปได้ว่าตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ มีค่าการละลายดีกว่าตัวยาคอร์คูมิน

2. การทดสอบแรงตึงผิวของสูตรตำรับ

ตารางที่ 3 การทดสอบแรงตึงผิวของ Poloxamer 407

ความเข้มข้น (mg/ml)	แรงตึงผิว(mN/m)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.
0.00001	68.00	67.80	68.00	67.93	0.12
0.0001	57.80	58.50	59.50	58.60	0.85
0.001	56.30	55.00	55.80	55.70	0.66
0.01	47.70	47.20	46.80	47.23	0.45
0.1	41.20	45.20	45.40	45.27	2.37
1	41.20	39.90	40.60	40.57	0.65
1.6	38.70	38.40	38.80	38.63	0.21
2	38.60	38.60	37.40	38.20	0.69
3	37.60	38.30	38.00	37.97	0.35
4	37.10	37.00	37.70	37.27	0.38
8	36.90	36.80	36.60	36.77	0.15



รูปที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแรงตึงผิวและความเข้มข้นของ Poloxamer 407

การพัฒนาสูตรตำรับนั้น จะต้องหาปริมาณ Poloxamer 407 ที่สามารถก่อไมเซลล์ได้ ซึ่งเรียกจุดนั้นว่า Critical Micelle Concentration (CMC) เนื่องจากการเกิดไมเซลล์มีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย ถ้าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในที่นี้คือ Poloxamer 407 มีค่าต่ำ สารมักจะอยู่เป็นโมเลกุลเดี่ยว เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นถึงค่าหนึ่ง โมเลกุลเหล่านั้นจะเริ่มเกาะกันเองโดยใช้ส่วนหาง(ไม่ชอบน้ำ)หันเข้าหากัน และหันส่วนหัว(ชอบน้ำ)ออกด้านนอกเพื่อยึดเกาะกับโมเลกุลน้ำ เพื่อให้เกิดไมเซลล์ขึ้น เมื่อใส่สารลดแรงตึงผิวถึงจุด CMC จะแสดงว่า มีไมเซลล์เกิดขึ้นแล้ว ถึงแม้จะใส่สารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นก็ไม่ทำให้แรงตึงผิวลดลงไปอีก ผู้วิจัยจึงทำการทดลองโดยใช้ Poloxamer 407 ละลายในน้ำแล้ววัดค่าแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นที่ 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 1.6, 2, 3, 4 และ 8 mg/ml

จากผลการทดลองจะพบว่า ความเข้มข้น ของ Poloxamer 407 ที่ทำให้เกิดจุด Critical Micelle Concentration (CMC) มีค่าเท่ากับ 0.01 mg/ml มีค่าแรงตึงผิวอยู่ที่ 47.23 mN/m เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Poloxamer 407 จนมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 4 mg/ml พบว่าแรงตึงผิวของพอลิเมอร์มีค่าคงที่ จะเห็นได้จากกราฟของแรงตึงผิวที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ Poloxamer 407 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5 mg/ml ขึ้นไปในการเตรียมตำรับ เพื่อให้แน่ใจว่าสามารถเกิดไมเซลล์ได้ในทุกสูตรตำรับ และแรงตึงผิวที่ได้ในแต่ละตำรับนั้นมีค่าไม่แตกต่างกัน

3. การพัฒนาสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาเคอร์คูมิน (ระดับความเข้มข้นของสารละลาย ระดับ 5 = สีเหลืองเข้มที่สุด ถึง ระดับ 1 = สีเหลืองใสที่สุด)

ตำรับ	ส่วนประกอบ	ลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับที่เตรียมได้
1C	5 mg/ml (Poloxamer 50 mg + Curcumin 5 mg)	สารละลายสีเหลือง ระดับ 5 และมีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและแขวนลอยอยู่ในสารละลาย
2C	10 mg/ml (Poloxamer 100 mg + Curcumin 5 mg)	สารละลายสีเหลือง ระดับ 4 และมีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและแขวนลอยอยู่ในสารละลาย
3C	20 mg/ml (Poloxamer 200 mg + Curcumin 5 mg)	สารละลายสีเหลือง ระดับ 3 และมีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและแขวนลอยอยู่ในสารละลาย
4C	50 mg/ml (Poloxamer 500 mg + Curcumin 5 mg)	สารละลายสีเหลือง ระดับ 2 และมีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและแขวนลอยอยู่ในสารละลาย
5C	20 mg/ml (Poloxamer 200 mg + Curcumin 10 mg)	สารละลายสีเหลือง ระดับ 4 และมีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและแขวนลอยอยู่ในสารละลาย
6C	Curcumin 5 mg	ผงยาไม่ละลาย ลอยอยู่ด้านบนขวด
7C	100 mg/ml (Poloxamer 1000 mg + Curcumin 5 mg)	สารละลายสีเหลือง ระดับ 1 ไม่พบตะกอน

ตารางที่ 5 ลักษณะทางกายภาพของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาแอนโดรกราโฟไลด์

ตำรับ	ความเข้มข้น	ลักษณะทางกายภาพของสูตร ตำรับที่เตรียมได้
1A	5 mg/ml (Poloxamer 50 mg + Andrographolide 5 mg)	มีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและ แขวนลอยอยู่ในสารละลาย
2A	10 mg/ml (Poloxamer 100 mg + Andrographolide 5 mg)	มีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและ แขวนลอยอยู่ในสารละลาย
3A	20 mg/ml (Poloxamer 200 mg + Andrographolide 5 mg)	มีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและ แขวนลอยอยู่ในสารละลาย
4A	50 mg/ml (Poloxamer 500 mg + Andrographolide 5 mg)	มีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและ แขวนลอยอยู่ในสารละลาย
5A	20 mg/ml (Poloxamer 200 mg + Andrographolide 10 mg)	มีตะกอนสีขาวที่ก้นขวดและ แขวนลอยอยู่ในสารละลาย
6A	Andrographolide 5 mg	ผงยาไม่ละลาย ลอยอยู่ด้านบน ขวด
7A	100 mg/ml Poloxamer 1000 mg + Andrographolide 5 mg	สารละลายใส ไม่พบตะกอน

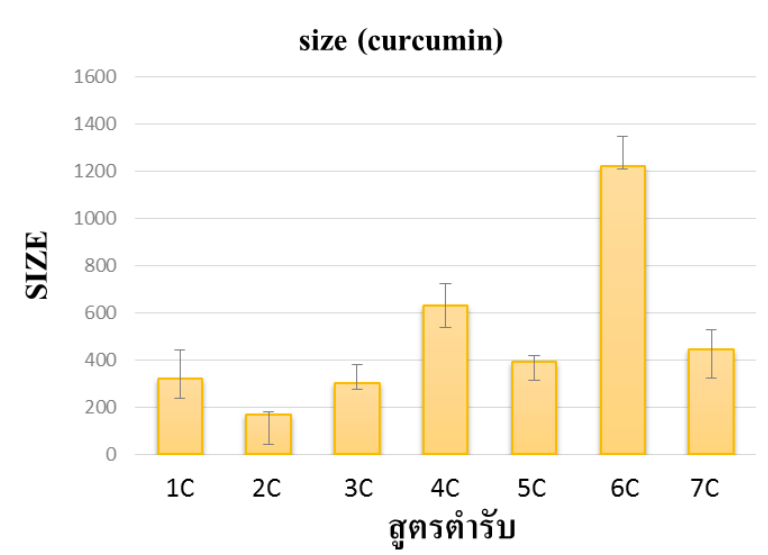
4. การประเมินคุณสมบัติของอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์

4.1 ขนาดของอนุภาคและ zeta potential โดยใช้เครื่อง zetasizer

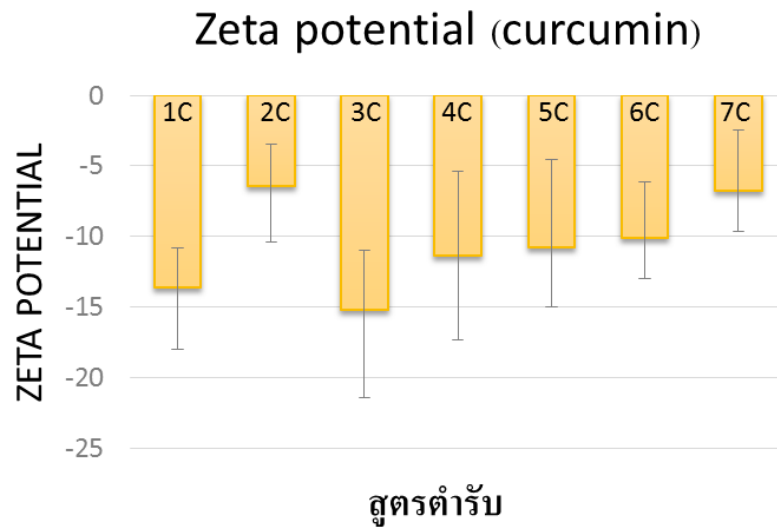
ตารางที่ 6 ขนาดของอนุภาคและ zeta potential ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน

ตำรับ	Size	S.D. _{SIZE}	ZP	S.D. _{ZP}
1C	318.04	122.23	-13.60	2.82
2C	167.43	10.26	-6.42	2.93
3C	301.71	79.49	-15.17	4.22
4C	627.73	93.08	-11.37	5.99
5C	390.88	28.27	-10.79	6.26
6C	1217.58	127.81	-10.09	3.98
7C	444.09	81.87	-6.79	4.38

n=3



รูปที่ 19 กราฟแสดงขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน

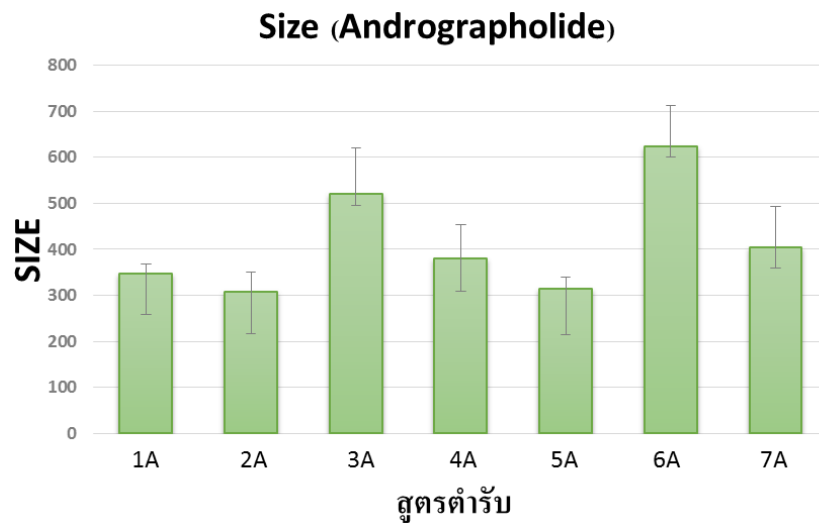


รูปที่ 20 กราฟแสดงค่า Zeta potential ของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมิน

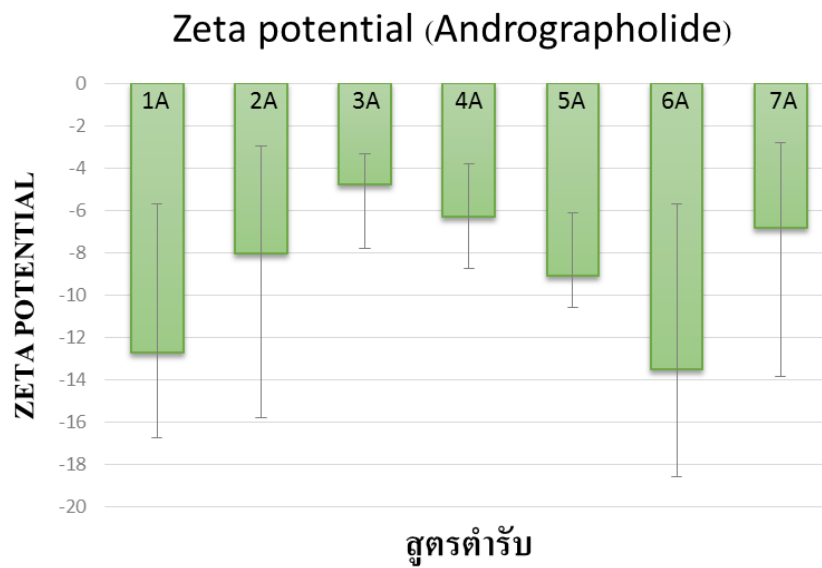
ตารางที่ 7 ขนาดของอนุภาคและ zeta potential ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาแอนโดรกราโฟไลด์

ตำรับ	Size	S.D. _{SIZE}	ZP	S.D. _{ZP}
1A	347.64	44.90	-12.68	6.99
2A	306.77	21.00	-8.01	5.06
3A	520.89	99.65	-4.79	1.49
4A	380.81	71.92	-6.28	2.46
5A	314.48	25.02	-9.10	3.01
6A	622.68	89.74	-13.48	7.79
7A	404.77	89.44	-6.83	4.04

n=3



รูปที่ 21 กราฟแสดงขนาดอนุภาคของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

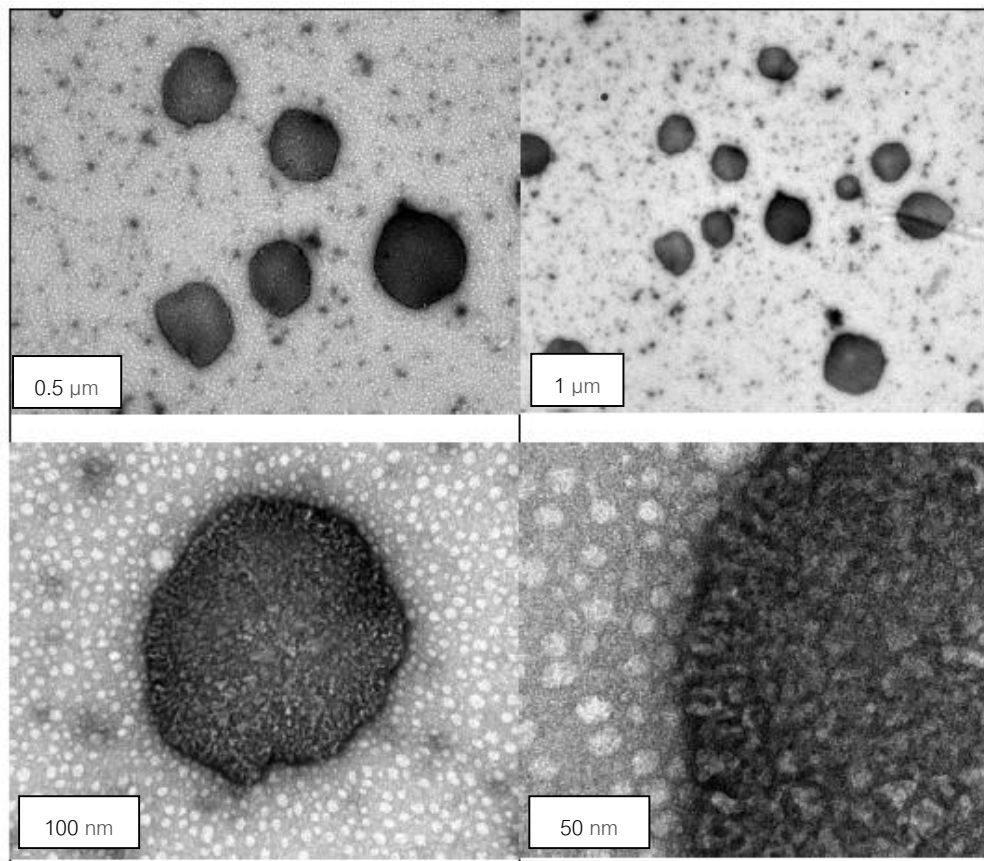


รูปที่ 22 กราฟแสดงค่า Zeta potential ของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

งานวิจัยฉบับนี้เลือกการเตรียมไมเซลล์โดยวิธี Thin-film hydration ในการเตรียมตำรับ เนื่องจากเป็นวิธีที่เตรียมได้สะดวกและราคาถูก (37) สูตรตำรับที่เตรียมขึ้นจะนำมาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ โดยการประเมินคุณสมบัติของอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ซึ่งเป็นการประเมินขนาดอนุภาคและค่าประจุบนพื้นผิวอนุภาค (Zeta potential) ผลการทดสอบขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Zetasizer พบว่าขนาดอนุภาคก่อนกรองของแต่ละสูตรนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโน และอนุภาคหลังการกรองนั้นยังคงมีขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโนเช่นเดียวกับอนุภาคก่อนกรอง

การทดลองหาค่าประจุบนพื้นผิวอนุภาคพบว่า Zeta potential ของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยา พบว่า มีค่า Zeta potential อยู่ในช่วง -4.79 ถึง -15.17 mV ซึ่งไม่เป็นไปตามทฤษฎี ผลการทดลองพบว่าไมเซลล์ที่ยังไม่บรรจุตัวยานั้นเมื่อวัด Zeta potential จะมีประจุเป็นเข้าใกล้ 0 ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี เนื่องจากโครงสร้างของ Poloxamer 407 ซึ่งประกอบด้วย Polypropylene oxide และ Polyethylene oxide มีประจุเป็นกลาง (38) แต่เมื่อวัดค่า Zeta potential ของไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาพบว่ามีค่า Zeta potential อยู่ในช่วง -4.79 ถึง -15.17 เนื่องจากอาจจะเกิดการรบกวนจาก ไอออนของตัวยาสำคัญก็คือตัวยาเคอร์คูมินและตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ เนื่องจากค่า Zeta potential ของตัวยาเคอร์คูมินมีค่า Zeta potential มีค่าเท่ากับ -15.14 mV และตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์มีค่า Zeta potential อยู่ที่ -12.39 mV จึงทำให้ประจุของไมเซลล์เปลี่ยนแปลง

4.2 การประเมินรูปร่างลักษณะ (Morphology) โดยใช้เครื่อง Transmission electron microscopy



รูปที่ 23 ลักษณะอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ได้จากการเตรียม ภายใต้เครื่อง TEM
พอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ได้จากการเตรียม มีลักษณะเป็นทรงกลม และเรียงตัวเป็นชั้นเดียว

4.3 ภาพถ่ายจากอนุภาคพอลิเมอริกไมเซลล์ โดยใช้เครื่อง Polarized light microscope



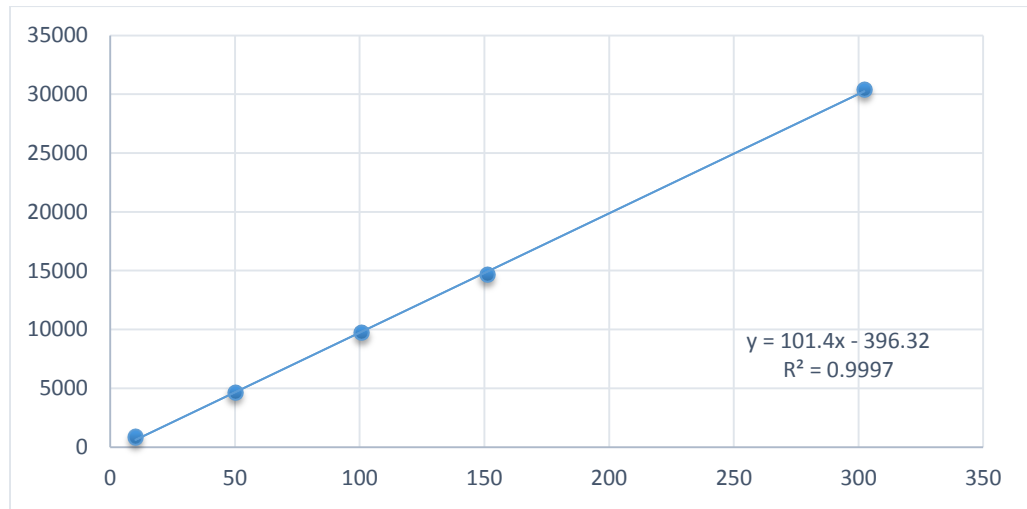
รูปที่ 24 ลักษณะอนุภาคพอลิเมอริกไมเซลล์ที่ได้จากการเตรียม ด้วยเครื่อง Polarized light microscope ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า

5. การหา %Entrapment efficiency(%EE) ในสูตรตำรับด้วยวิธีวิเคราะห์ HPLC

ตารางที่ 8 การหา Standard curve ของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาเคอร์คูมิน

ความเข้มข้นของเคอร์คูมิน (mg/ml)	Area Under the Curve				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.
0.3	30161.80	30508.20	30642.90	30437.63	248.19
0.15	14708.00	14613.30	14621.10	14647.47	52.57
0.1	9854.00	9353.60	10025.70	9744.43	349.19
0.05	4550.50	4657.70	4709.20	4639.13	80.96
0.01	899.10	768.20	925.10	864.13	84.09

n=3



รูปที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของตัวยาเคอร์คูมิน

ค่า Limits of Detection คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถพบ Peak สารได้ เท่ากับ 0.1 uM

ค่า Limits of Quantitation คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถใช้วิธี HPLC ในการวิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.5uM

การคำนวณหาปริมาณ % Entrapment efficiency (%EE) ในสูตรตำรับด้วยวิธีวิเคราะห์ HPLC

ตัวอย่างการวิเคราะห์ % Entrapment efficiency ในสูตรตำรับ

- ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้เป็น AUC เท่ากับ 23747.4

จากสมการที่ได้จาก Standard curve

$$AUC = 101.4(Conc.) - 396.32$$

แทนค่า AUC

$$Conc. = (23747.4 + 396.32)/101.4$$

$$= 238.1037 \text{ mcg/ml}$$

สารตำรับตัวอย่างจำนวน 1 ml มีตัวยาเคอร์คูมิน 238.1037 mcg

สารตำรับตัวอย่างจำนวน 10 ml มีตัวยาเคอร์คูมิน $238.1037 \times 10 \text{ mcg} = 2381.037 \text{ mcg}$

ปิเปตสารตัวรับตัวอย่างจำนวน 5 ml มีตัวยาเคอร์คูมิน 2381.037 mcg

ปิเปตสารตัวรับตัวอย่างจำนวน 10 ml มีตัวยาเคอร์คูมิน $2381.037 \times 10/5$ mcg = 4,762.074 mcg

- คำนวณหา % Entrapment efficiency

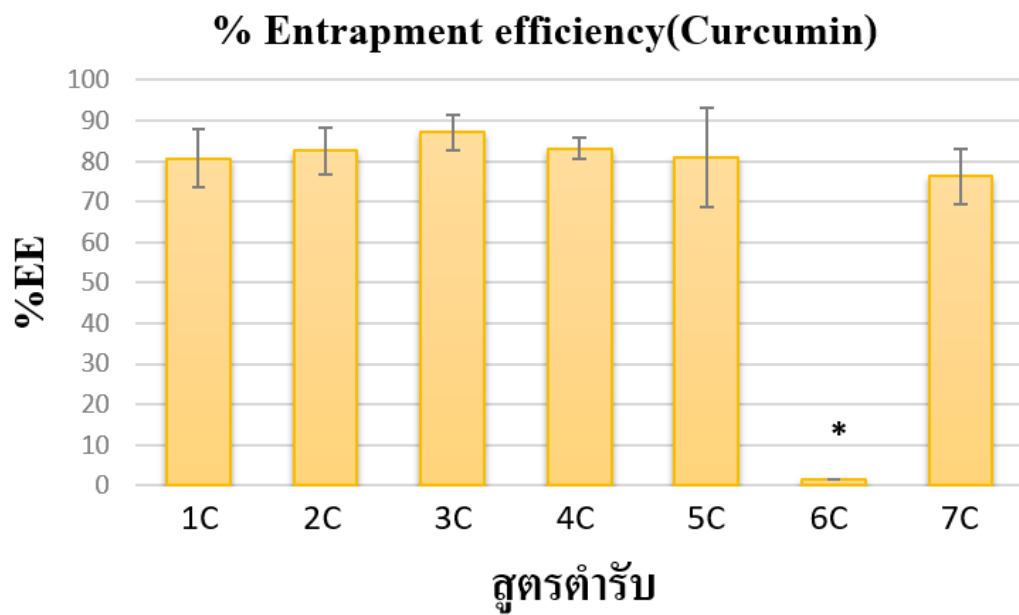
สูตรคำนวณ $EE \% = (C \text{ drug loaded} / C \text{ total drug}) \times 100$

แทนค่า $EE \% = (4,762.074 \text{ mcg} / 5000) \times 100 = 95.24148$

ตารางที่ 9 ผลการคำนวณหาปริมาณ % Entrapment efficiency ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน

ตำรับ	Poloxamer	Curcumin	Sample	AUC(Y)	Conc(x)	% EE	Average % EE	S.D.%EE
1C	50	5	1	21594.90	216.88	86.75	80.68	7.08
			2	18455.37	185.91	72.91		
			3	20903.13	210.05	82.37		
2C	100	5	1	21075.23	211.75	79.91	82.58	5.74
			2	19944.53	200.60	78.67		
			3	23113.80	231.86	89.18		
3C	200	5	1	23747.40	238.10	89.85	87.09	4.43
			2	20387.33	204.97	81.99		
			3	23183.03	232.54	89.44		
4C	500	5	1	20351.50	204.61	80.24	83.11	2.55
			2	21182.87	212.81	85.13		
			3	20887.27	209.90	83.96		
5C	200	10	1	4417.77	47.48	94.95	80.94	12.17
			2	3511.00	38.53	74.82		
			3	3306.67	36.52	73.04		
6C	-	5	1	4.27	3.95	1.55	1.55	0.03
			2	3.03	3.94	1.51		
			3	2.26	3.93	1.57		
7C	1000	5	1	18039.40	181.81	71.30	76.33	6.83
			2	19377.03	195.00	73.59		
			3	20926.60	210.29	84.11		

n=3



รูปที่ 26 กราฟแสดงปริมาณของยาเคอร์คูมินที่ถูกบรรจุอยู่ในพอลิเมอร์ไมเซลล์

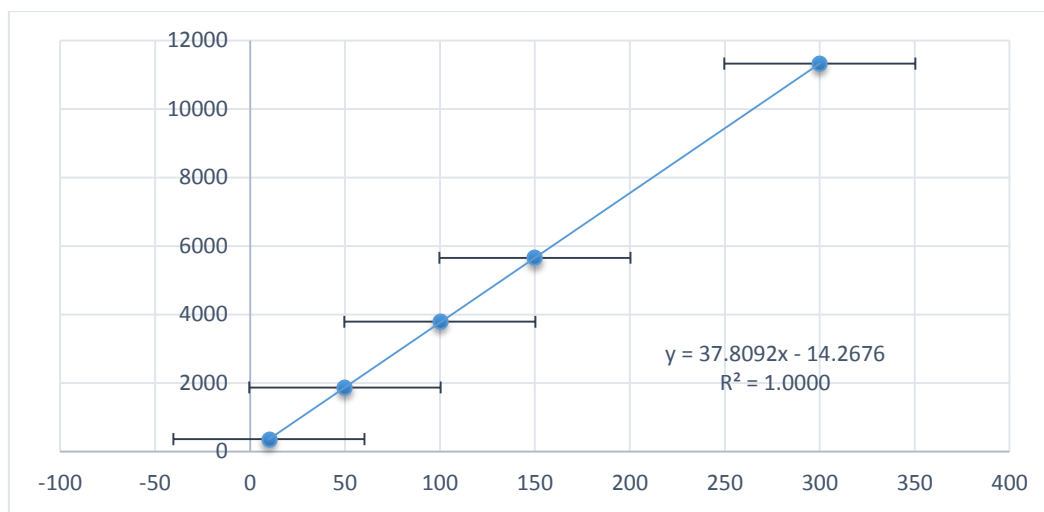
* $P < 0.05$ (sig overall sample)

ตารางที่ 10 การหา Standard curve ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยา

แอนโดกราไฟไลด์

ความเข้มข้นยา แอนโดกราไฟไลด์ (mg/ml)	Area Under the Curve				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.
0.3	11362.15	11314.54	11299.87	11325.47	22.64
0.15	5681.99	5695.62	5582.45	5653.30	3.44
0.1	3777.32	3817.51	3763.62	3786.13	28.01
0.05	1863.94	1868.95	1870.52	1867.77	3.44
0.01	333.51	373.34	372.12	359.63	22.64

n=3



รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของตัวยา แอนโดรกราโฟไลด์

ค่า Limits of Detection คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถพบ peak สารได้เท่ากับ 0.0856 uM

ค่า Limits of Quantitation คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถใช้วิธี HPLC ในการวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.1426 uM

การคำนวณหาปริมาณ % Entrapment efficiency (%EE) ในสูตรตำรับด้วยวิธีวิเคราะห์ HPLC

ตัวอย่างการวิเคราะห์ % Entrapment efficiency ในสูตรตำรับ

- ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้เป็น AUC เท่ากับ 9096.3

จากสมการที่ได้จาก Standard curve

$$AUC = 37.8092(Conc.) - 14.2676$$

แทนค่า AUC

$$Conc. = (9096.3 + 14.2676) / 37.8092$$

$$= 240.9617 \text{ mcg/ml}$$

สารตำรับตัวอย่างจำนวน 1 ml มีตัวยาเคอร์คูมิน 240.9617 mcg

สารตำรับตัวอย่างจำนวน 10 ml มีตัวยาเคอร์คูมิน $240.9617 \times 10 \text{ mcg} = 2409.617 \text{ mcg}$

ปิเปตสารตำรับตัวอย่างจำนวน 5 ml มีตัวยาเคอร์คูมิน 2409.617 mcg

ปิเปตสารตำรับตัวอย่างจำนวน 10 ml มีตัวยาเคอร์คูมิน $2409.617 \times 10/5 \text{ mcg} = 4,819.234 \text{ mcg}$

- คำนวณหา % Entrapment efficiency

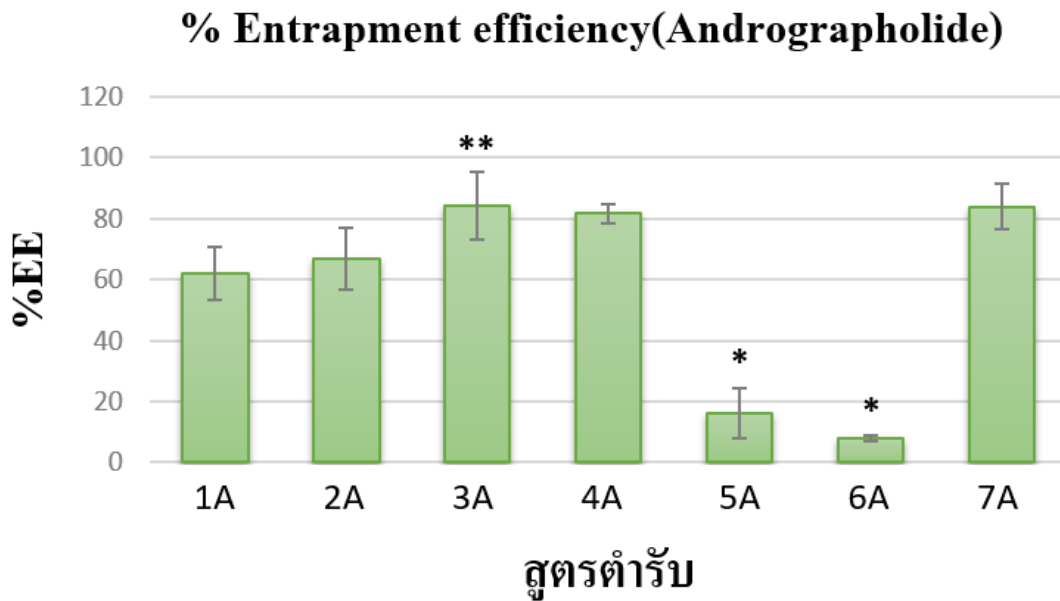
สูตรคำนวณ $EE \% = (C \text{ drug loaded} / C \text{ total drug}) \times 100$

แทนค่า $EE \% = (4,819.234 \text{ mcg} / 5000) \times 100 = 96.3847$

ตารางที่ 11 ผลการคำนวณหาปริมาณ % Entrapment efficiency ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

ตำรับ	Poloxamer	Andrographolide	Sample	AUC(Y)	Conc(x)	% EE	Average % EE	S.D.
1A	50	5	1	6723.20	175.01	68.63	61.98	8.52
			2	5155.77	133.55	52.37		
			3	6242.87	162.31	64.92		
2A	100	5	1	6925.83	181.89	69.96	66.70	10.07
			2	5494.33	144.03	55.40		
			3	7394.93	194.30	74.73		
3A	200	5	1	9096.03	234.71	93.88	84.33	11.11
			2	8606.10	221.75	86.96		
			3	7312.77	187.54	72.13		
4A	500	5	1	7651.20	202.69	79.49	81.69	3.10
			2	7581.50	200.84	80.34		
			3	8366.63	221.61	85.23		
5A	200	10	1	499.70	7.35	14.69	16.11	8.11
			2	691.30	12.42	24.83		
			3	393.37	4.54	8.81		
6A	-	5	1	713.50	19.25	7.40	8.06	0.86
			2	839.17	22.57	9.03		
			3	716.53	19.33	7.73		
7A	1000	5	1	7414.10	196.09	76.90	83.83	7.55
			2	8857.80	234.27	91.87		
			3	7818.00	206.77	82.71		

n=3



รูปที่ 28 กราฟแสดงปริมาณของยาแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกบรรจุอยู่ในพอลิเมอร์ไมเซลล์

* $P < 0.05$ (vs. Sample 1,2,3,4,7)

** $P < 0.05$ (vs. Sample 1)

การวิเคราะห์ปริมาณกักเก็บตัวยาลำคัญพบว่าสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ จะต้องหาปริมาณ Entrapment efficiency คือการหาประสิทธิภาพในการกักเก็บยาของไมเซลล์ โดยใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ และนำค่าที่ได้มาคำนวณให้อยู่ในหน่วยเปอร์เซ็นต์ ซึ่งเรียกว่า % Entrapment efficiency โดยงานวิจัยฉบับนี้ได้ทำการหาปริมาณ Entrapment efficiency เพื่อนำมาศึกษาดูว่าในแต่ละสูตรตำรับที่มีปริมาณของพอลิเมอร์ที่แตกต่างกันนั้นจะทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บยาจะแตกต่างกันหรือไม่

จากการทดลองพบว่า % Entrapment efficiency (%EE) ของยาเคอร์คูมินที่บรรจุในพอลิเมอร์ไมเซลล์นั้น สูตรตำรับที่ 6C (Curcumin 5 mg) มีค่า %EE น้อยกว่าสูตรตำรับ 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 7A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบ %EE ของแต่ละสูตรตำรับพบว่า สูตรที่ 3C ซึ่งมีตัวยาคอร์คูมิน 5 mg กับ Poloxamer 200 mg มีการกักเก็บยาได้มากที่สุด ในทั้ง 7 สูตร โดยมี %EE อยู่ที่ $87.09 \pm 4.43\%$ จากข้อมูลทำให้ผู้วิจัยเลือกสูตรตำรับ 3C (เคอร์คูมิน 5 mg กับ Poloxamer 200 mg) มาศึกษาต่อในขั้น Cell uptake ถัดไป

และผล %EE ของยาแอนโดรกราโฟไลด์ที่บรรจุในพอลิเมอร์ไมเซลล์นั้น พบว่าสูตรตำรับที่ 5A และ สูตรตำรับที่ 6A มีค่า %EE น้อยกว่าสูตรตำรับ 1A, 2A, 3A, 4A, 7A อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($P < 0.05$) อีกทั้งสูตรตำรับที่ 3A มีค่า %EE มากกว่าสูตรตำรับ 1A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งปริมาณยาที่ถูกกักเก็บที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีการก่อไมเซลล์และปริมาณของ Poloxamer 407 ที่ใช้ เช่น ถ้าปริมาณ Poloxamer น้อย อาจทำให้ไมเซลล์ที่ได้ไม่เพียงพอที่จะกักเก็บยา หรือหากปริมาณ Poloxamer มากเกินไปอาจทำให้ไมเซลล์ที่ได้มีขนาดใหญ่ เมื่อนำมากรองจะทำให้ไมเซลล์ไม่สามารถผ่านรูกรองได้ ทำให้เสียยาในส่วนนี้ไป ค่า %EE ที่ได้จึงมีค่าต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบ %EE ของแต่ละสูตรตำรับพบว่า สูตรตำรับที่ 3A ที่มีแอนโดรกราโฟไลด์ 5 mg กับ Poloxamer 200 mg มีการกักเก็บยาได้มากที่สุดในทุก 7 สูตร โดยมี %EE อยู่ที่ $84.33 \pm 11.11\%$ จากข้อมูลทำให้ผู้วิจัยเลือกสูตรตำรับ 3A (แอนโดรกราโฟไลด์ 5 mg กับ Poloxamer 200 mg) มาศึกษาต่อในขั้น Cell uptake ถัดไป

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกักเก็บยาของเคอร์คูมินและแอนโดรกราโฟไลด์พบว่า %EE ของตัวยาเคอร์คูมินเกือบทุกสูตรมีค่ามากกว่ายาแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งปริมาณการกักเก็บยาในไมเซลล์ที่แตกต่างกันจะขึ้นอยู่กับ อัตราส่วนของปริมาณยาต่อพอลิเมอร์ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ใช้ ชนิดของสารละลายที่ใช้ในการละลายฟิล์ม ค่าการละลายของพอลิเมอร์ในสารละลาย ความเข้ากันของยาและพอลิเมอร์ และโครงสร้างความชอบน้ำ และความชอบไขมันของสารที่นำมาใช้ (39) เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของเคอร์คูมิน และแอนโดรกราโฟไลด์ โดยดูจากค่า Log P ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความชอบน้ำหรือชอบไขมัน พบว่าค่า Log P ของตัวยาเคอร์คูมินมีค่าเท่ากับ 3.2 ซึ่งมากกว่าค่า log P ของตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีค่า 2.2 แสดงให้เห็นว่าเคอร์คูมิน สามารถละลายในไขมันได้ดีกว่าแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งผลจากการชอบละลายไขมัน ทำให้ปริมาณยาที่สะสมอยู่บริเวณด้านในไมเซลล์ของตัวยาเคอร์คูมินมีค่ามากกว่าตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ ทำให้พอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินมีประสิทธิภาพการกักเก็บตัวยา มากกว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายาที่ชอบละลายไขมันหรือมีค่าการละลายในน้ำต่ำ จะมีประสิทธิภาพการกักเก็บยาที่สูงกว่ายาที่ละลายน้ำดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hesham Abdul Aziz และ คณะ ปี 2012 ที่ศึกษา ค่าการละลายของยาในสารละลาย Polymeric Solution และผลของ Ovalbumin ในการกระบวนการเกิด Microencapsulation โดยใช้ Gelatin เป็น Coating drug ซึ่งยาที่ใช้ในการศึกษาจะแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ ยากลุ่ม Water-soluble ได้แก่ Pseudoephedrine HCl, Verapamil HCl, Propranolol HCl ยากลุ่ม Sparingly water-soluble ได้แก่ Paracetamol, และยากลุ่ม Water-insoluble ได้แก่ Curcuminoid ผลการทดลองพบว่า Curcuminoid ที่ได้จากกระบวนการ Microencapsulation มี %EE ที่มากที่สุด คือ 98.73 ± 1.06 เมื่อเทียบกับตัวยาอื่นๆ (40) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายาที่ไม่ละลาย

น้ำหรือชอบละลายในไขมันมีค่า %EE มากกว่ายาที่ชอบละลายน้ำ และจากวิจัยของ Asit R Sahu และคณะ ในปี 2015 ที่มีการศึกษาค่าการละลายของตัวยาเคอร์คูมินใน Ethyl oleate ที่มีคุณสมบัติเป็นสายละลายไขมัน ผลการทดลองพบว่าตัวยาเคอร์คูมินมีค่าการละลายใน Ethyl oleate อยู่ที่ 0.368 ± 0.035 mg/ml (41) และงานวิจัยของ Namfa Sermkaew และคณะ ในปี 2013 ที่มีการศึกษาค่าการละลายของตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ที่ละลายใน Ethyl oleate เช่นเดียวกับตัวยาเคอร์คูมิน ผลการทดลองพบว่าตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์มีค่าการละลายอยู่ที่ 0.24 ± 0.07 mg/ml (42) ซึ่งจะเห็นได้ว่าในตัวทำละลาย Ethyl oleate ที่มีคุณสมบัติเป็นสารละลายไขมัน ผลจากงานวิจัยดังกล่าวช่วยสนับสนุนว่าตัวยาเคอร์คูมินมีค่าการละลายไขมันที่มากกว่าตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ ทำให้พอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินมีประสิทธิภาพการกักเก็บตัวยา มากกว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ ดังที่กล่าวไว้ในข้างต้น อีกทั้งโดยมีงานวิจัยของ Anindita Mukerjee และคณะในปี 2009 ที่สนับสนุนผลดังกล่าว ซึ่งผลจากงานวิจัยพบว่าการวัดประสิทธิภาพการกักเก็บยาของยาเคอร์คูมินในพอลิเมอร์ PLGA ซึ่งมีค่า %EE อยู่ที่ $90.88 \pm 0.14\%$ (43) และจากงานวิจัยของ Yunxia Jiang และคณะในปี 2014 มีการวัดประสิทธิภาพการกักเก็บยาของยาแอนโดรกราโฟไลด์ในพอลิเมอร์ PLGA เช่นกัน โดยวัด %EE ได้ค่าอยู่ที่ $75.79 \pm 3.02\%$ (44)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าตัวยาเคอร์คูมินมีความเหมาะสมในการทำไมเซลล์โดยใช้ Poloxamer 407 มากกว่ายาแอนโดรกราโฟไลด์ เนื่องจากมีค่าการละลายไขมันที่มากกว่า ทำให้มีประสิทธิภาพการกักเก็บยา มากกว่าตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

ตารางที่ 12 แสดงขนาดอนุภาค Zeta potential และ % Entrapment efficiency ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมินในแต่ละสูตร

ตำรับ	Poloxamer (mg)	Curcumin (mg)	Size	Zeta potential	% EE
1C	50	5	318.04 ± 122.23	-13.60 ± 2.82	80.67 ± 7.07
2C	100	5	167.43 ± 10.26	-6.42 ± 2.93	82.58 ± 5.74
3C	200	5	301.71 ± 79.49	-15.17 ± 4.22	87.09 ± 4.43
4C	500	5	627.73 ± 93.07	-11.37 ± 5.98	83.11 ± 2.55
5C	200	10	390.88 ± 28.27	-10.79 ± 6.36	80.94 ± 12.17
6C	-	5	1217.58 ± 127.81	-10.09 ± 3.98	1.55 ± 0.03
7C	1000	5	444.09 ± 81.87	-6.79 ± 4.38	76.33 ± 6.83

n=3

ตารางที่ 13 แสดงขนาดอนุภาค Zeta potential และ % Entrapment efficiency ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยแอนโดรกราโฟไลด์ในแต่ละสูตร

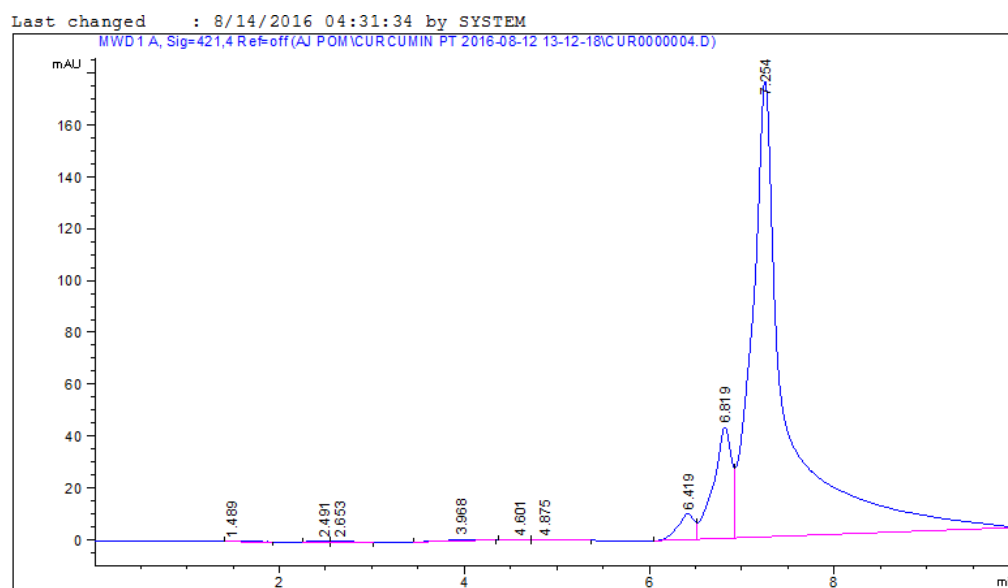
ตำรับ	Poloxamer (mg)	Andrographolide (mg)	Size	Zeta potential	% EE
1A	50	5	347.64 ± 44.89	-12.68 ± 6.99	61.98 ± 8.52
2A	100	5	306.77 ± 21.00	-8.01 ± 5.06	66.69 ± 10.07
3A	200	5	520.89 ± 99.68	-4.79 ± 1.489	84.33 ± 11.11
4A	500	5	380.81 ± 71.92	-6.28 ± 2.46	81.69 ± 3.10
5A	200	10	314.48 ± 25.02	-9.10 ± 3.01	16.11 ± 8.11
6A	-	5	622.68 ± 89.74	-13.48 ± 7.79	8.05 ± 0.86
7A	1000	5	404.77 ± 89.44	-6.83 ± 4.04	83.83 ± 7.55

n=3

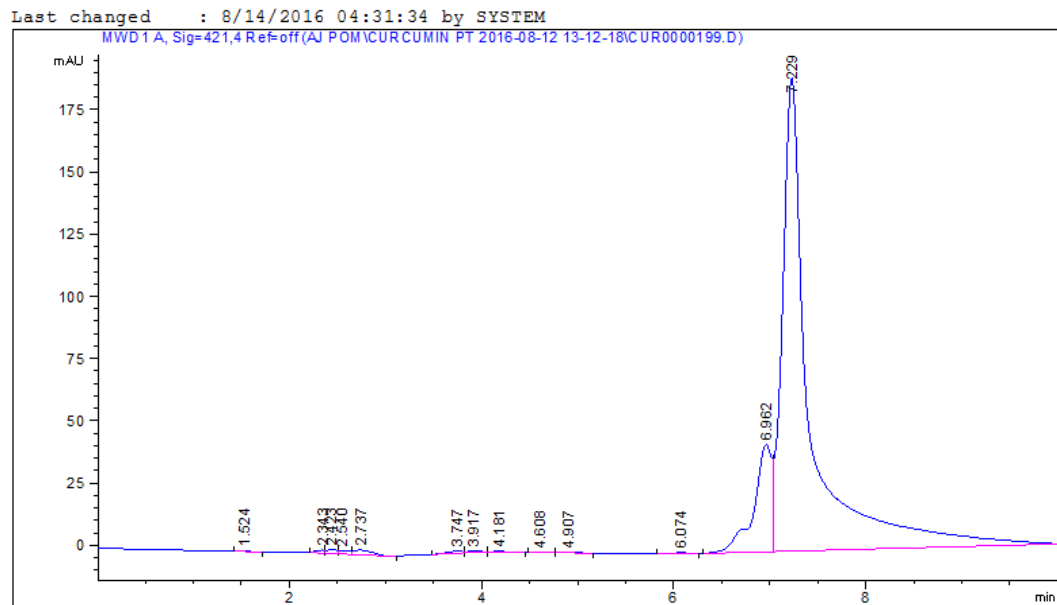
ตัวอย่าง Chromatogram

_เคอร์คูมิน condition

Stationary phase	Reverse phase column C18, อนุภาคขนาด 5 μm , ความยาว 250 mm, เส้นผ่านศูนย์กลางท่อกลางผ่านใน 4.6 mm
Mobile phase	acetonitrile 50 : water 50
Flow rate	1 ml/min



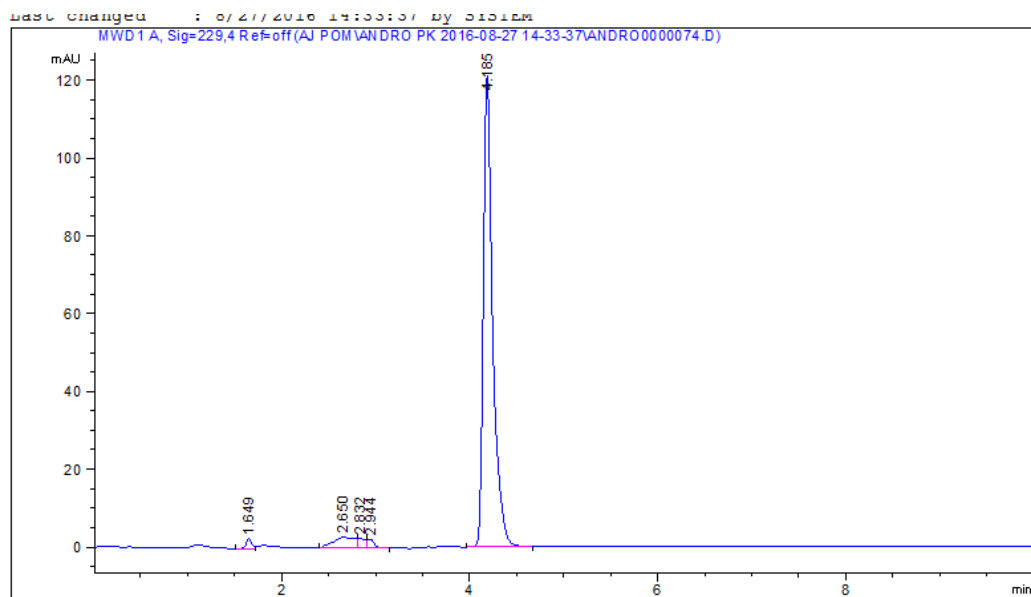
รูปที่ 29 Chromatogram ของตัวยาเคอร์คูมิน



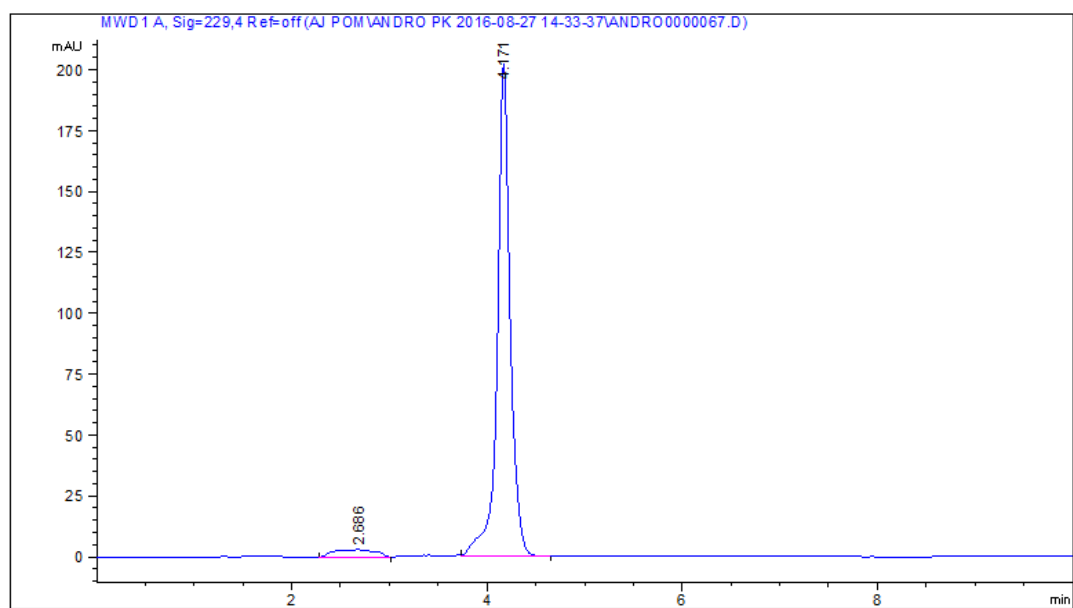
รูปที่ 30 Chromatogram แสดง % Entrapment efficiency ของยาเคอร์คูมินที่บรรจุอยู่ใน
โพลิเมอริกไมเซลล์

- แอนโดรกราไฟไลต์ condition

Stationary phase	Reverse phase column C18, อนุภาคขนาด 5 μm , ความยาว 250 mm, เส้นผ่านศูนย์กลางผ่านใน 4.6 mm
Mobile phase	acetonitrile 40 : water 60
Flow rate	1 ml/min



รูปที่ 31 Chromatogram ของตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

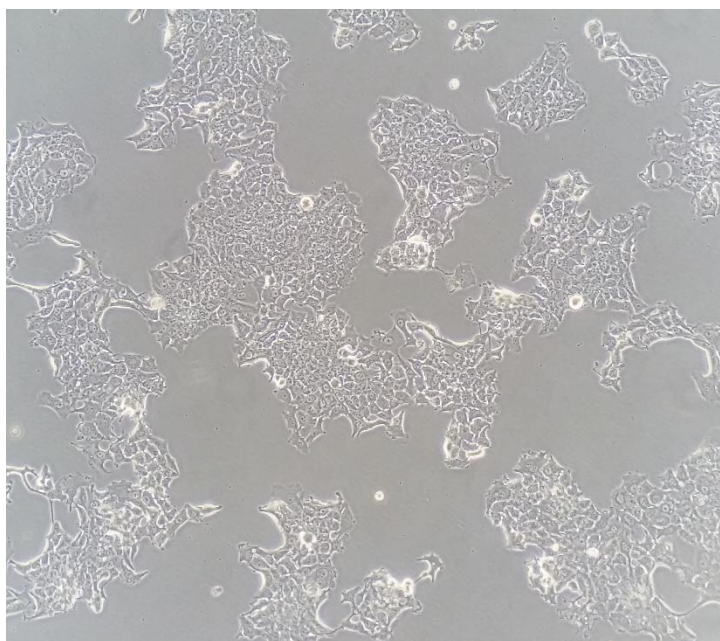


รูปที่ 32 Chromatogram แสดง % Entrapment efficiency ของยาแอนโดรกราโฟไลด์

ที่บรรจุอยู่ในโพลิเมอริกไมเซลล์

6. การศึกษาคุณสมบัติ Cell uptake

6.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)



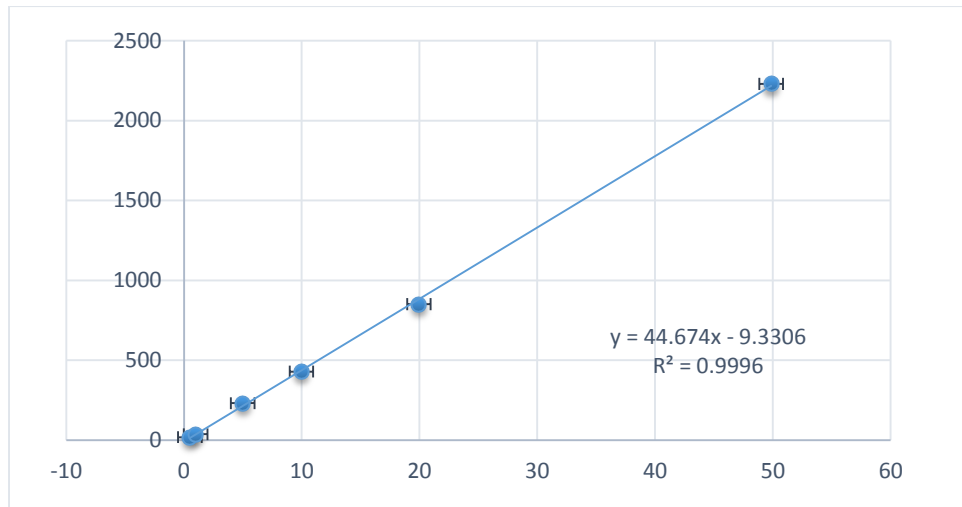
รูปที่ 33 เซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

6.2 การทดสอบ cell uptake ของตัวยาเคอร์คูมิน

ตารางที่ 14 การหาของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาเคอร์คูมิน

ความเข้มข้น (μM)	Area Under the Curve				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.
0.5	18.18	18.79	19.09	18.69	0.46
1	37.54	36.90	37.14	37.19	0.32
5	238.90	228.70	226.70	231.43	6.54
10	432.00	429.10	426.40	429.17	2.80
20	855.00	851.00	848.20	851.40	3.42
50	2248.50	2220.90	2220.40	2229.93	16.08

n=3



รูปที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของตัวยาเคอร์คูมิน

ค่า Limits of Detection คือค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถพบ peak สารได้เท่ากับ 0.0856 uM

ค่า Limits of Quantitation คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถใช้วิธี HPLC ในการวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.1426 uM

การคำนวณหาปริมาณ cell uptake สูตรคำนวณด้วยวิธีวิเคราะห์ HPLC

ตัวอย่างการวิเคราะห์ cell uptake ในสูตรคำนวณ

- ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้เป็น AUC เท่ากับ 3.5

จากสมการที่ได้จาก Standard curve

$$AUC = 44.674(Conc.) - 9.3306$$

แทนค่า AUC

$$Conc. = (3.5 + 9.3306) / 44.674$$

$$= 0.2872 \text{ mcg/ml}$$

ตารางที่ 15 ผลการคำนวณหาปริมาณ Cell uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุ
ตัวยาเคอร์คูมิน

ตำรับ	เซลล์มะเร็ง	Sample	AUC	Conc.(μ M) ใน 300 μ L
สูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ กับตัวยาเคอร์คูมิน	HepG2	1	3.50	N/A
		2	3.30	N/A
		3	3.13	N/A
Blank cell เปล่า	HepG2	1	1.00	N/A
		2	0.49	N/A
		3	1.60	N/A
ตัวยาเคอร์คูมิน	HepG2	1	3.17	N/A
		2	2.83	N/A
		3	2.5	N/A

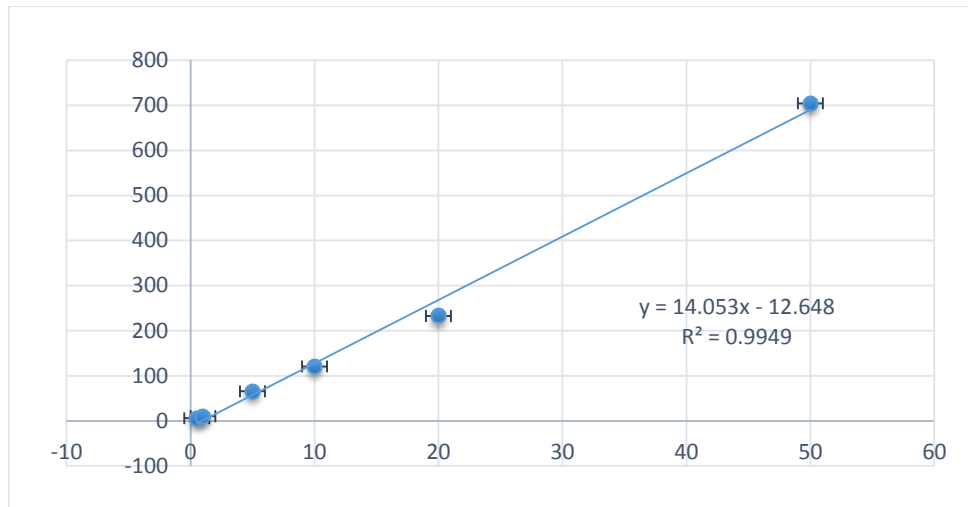
n=3

6.3 การทดสอบ Cell uptake ของตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

ตารางที่ 16 การหาของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

ความเข้มข้น (μ M)	Area Under the Curve				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.
0.5	5.91	5.99	5.62	5.84	0.19
1	10.34	10.13	10.34	10.27	0.12
5	64.20	68.57	64.00	65.57	2.54
10	121.10	120.59	120.51	120.71	0.35
20	232.50	233.34	232.84	232.72	0.66
50	710.15	696.83	707.16	704.67	6.98

n=3



รูปที่ 35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

ค่า Limits of Detection คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถพบ peak สารได้ เท่ากับ 0.0856 uM

ค่า Limits of Quantitation คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถใช้วิธี HPLC ในการวิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.1426 uM

การคำนวณหาปริมาณ cell uptake สูตรคำนวณด้วยวิธีวิเคราะห์ HPLC

ตัวอย่างการวิเคราะห์ cell uptake ในสูตรคำนวณ

- ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้เป็น AUC เท่ากับ 8.666667

จากสมการที่ได้จาก Standard curve

$$\text{AUC} = 14.053(\text{Conc.}) - 12.648$$

แทนค่า AUC

$$\text{Conc.} = (8.666667 + 12.648) / 14.053$$

$$= 1.5169 \text{ mcg/ml}$$

ตารางที่ 17 ผลการคำนวณหาปริมาณ Cell uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุ
ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

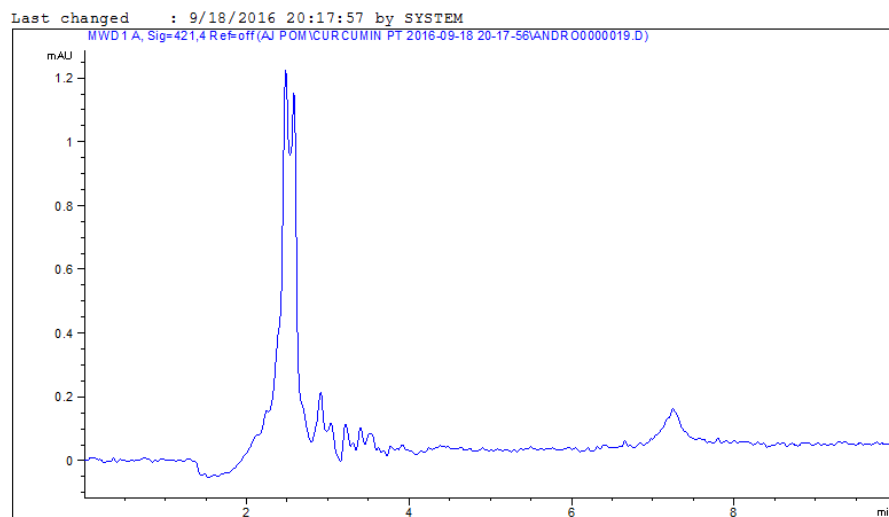
ตำรับ	เซลล์มะเร็ง	Sample	AUC	Conc.(μ M) ใน 300 μ L
สูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับตัวยา แอนโดรกราโฟไลด์	HepG2	1	8.67	2.12
		2	8.72	2.12
		3	8.33	2.09
Blank cell เปล่า	HepG2	1	N/A	N/A
		2	N/A	N/A
		3	N/A	N/A
ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์	HepG2	1	4.68	1.83
		2	4.42	1.81
		3	4.12	1.79

n=3

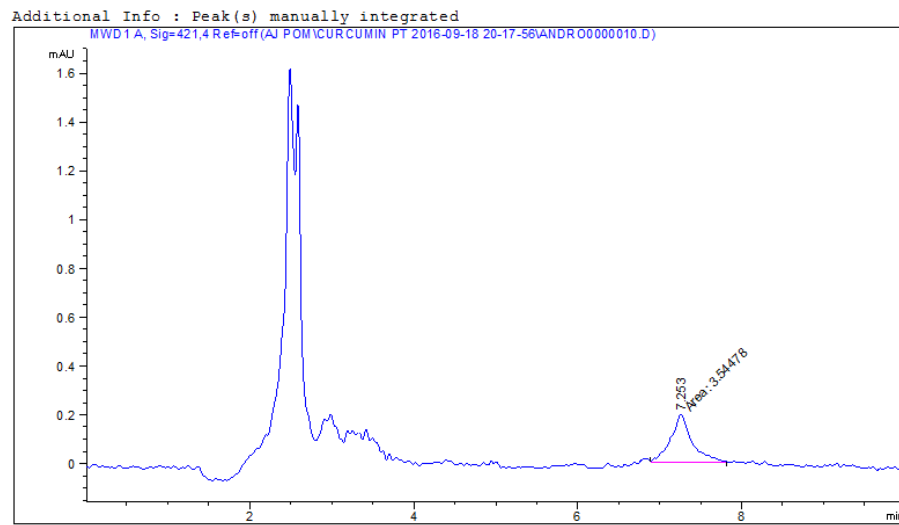
ตัวอย่าง Chromatogram

เคอร์คูมิน condition

Stationary phase	Reverse phase column C18, อนุภาคขนาด 5 μm , ความยาว 250 mm, เส้นผ่านศูนย์กลางท่อผ่านใน 4.6 mm
Mobile phase	acetonitrile 50 : water 50
Flow rate	1 ml/min



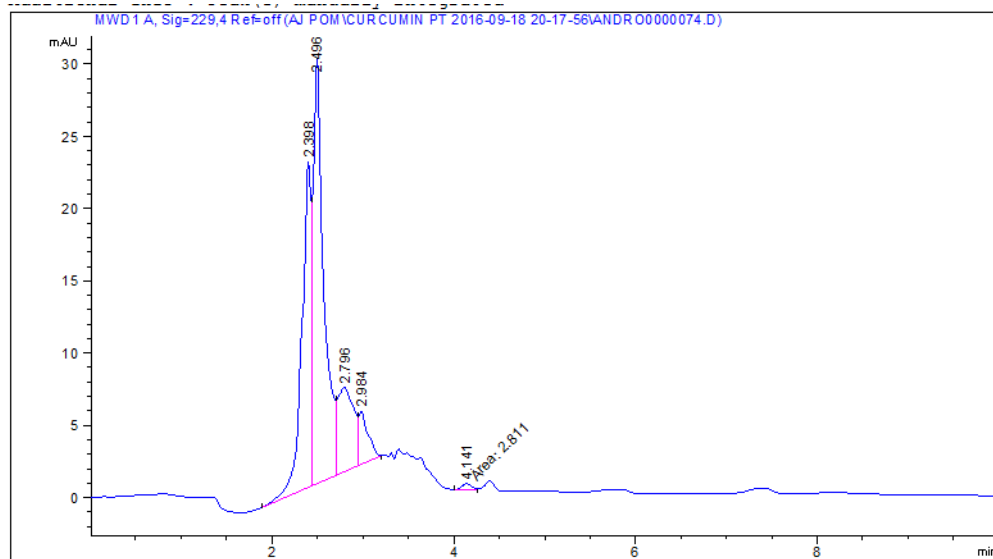
รูปที่ 36 Chromatogram แสดงปริมาณ % uptake ของตัวยาเคอร์คูมินในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)



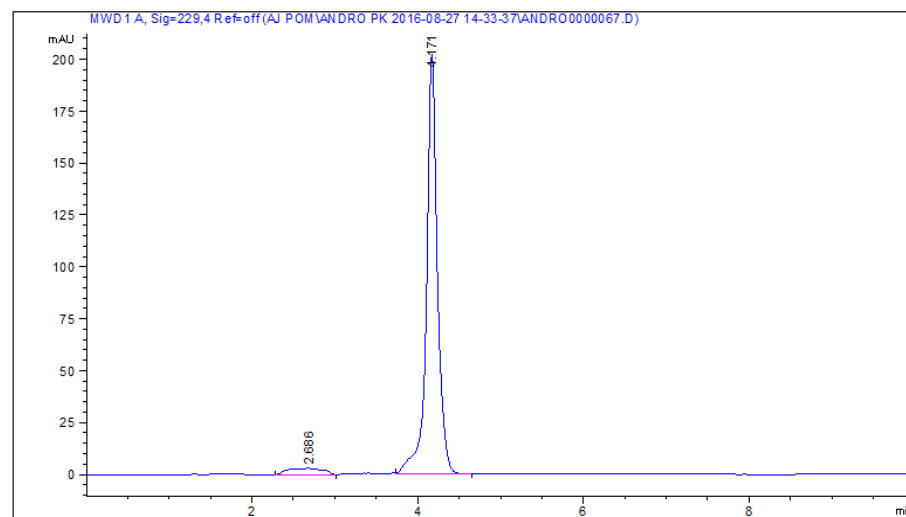
รูปที่ 37 Chromatogram แสดงปริมาณ % uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับตัวยาเคอร์คูมินในเซลล์มะเร็งตับ(HepG2)

- แอนโดรกราไฟไลต์ condition

Stationary phase	Reverse phase column C18, อนุภาคขนาด 5 μm , ความยาว 250 mm, เส้นผ่านศูนย์กลางผ่านใน 4.6 mm
Mobile phase	Acetonitrile 40 : Water 60
Flow rate	1 ml/min



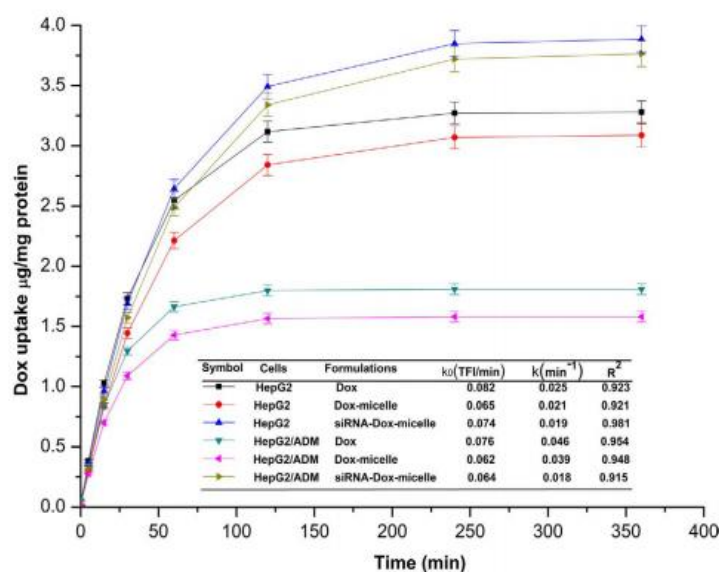
รูปที่ 38 Chromatogram แสดงปริมาณ % uptake ของตัวยาแอนโดกราโฟไลด์
ในเซลล์มะเร็งตับ(HepG2)



รูปที่ 39 Chromatogram แสดง ปริมาณ % uptake ของสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์กับตัวยา
แอนโดกราโฟไลด์ในเซลล์มะเร็งตับ(HepG2)

การศึกษาคุณสมบัติของ cellular uptake คือการหาปริมาณของสารที่ถูก uptake เข้าเซลล์ ในที่นี้จะเป็นการศึกษา ปริมาณของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับตัวยาที่ถูก uptake เข้าเซลล์

ผลการคำนวณหาปริมาณ Cellular uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับตัวยาเคอร์คูมินในสูตร 3C มีการรายงานผล Cellular uptake เป็น N/A เนื่องจากปริมาณ Cellular uptake ที่ได้มีค่าน้อยมาก ซึ่งต่ำกว่าค่า Limits of Quantitation จึงต้องพิจารณาจากค่า AUC ซึ่งพบว่า ค่า AUC ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินมีค่ามากกว่าตัวยาเคอร์คูมินเดี่ยวๆ แสดงให้เห็นว่าสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินมีปริมาณ Cellular uptake มากกว่าตัวยาเคอร์คูมินเดี่ยวๆ และ ผลการคำนวณหาปริมาณ Cell uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์กับตัวยาเอนโดกราฟไฟไลด์ ในสูตรที่ 3A มีปริมาณ Cellular uptake เท่ากับ 2.11 ซึ่งมากกว่าตัวยาเอนโดกราฟไฟไลด์เดี่ยวๆที่มีปริมาณ Cellular uptake เท่ากับ 1.81 ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่นำตัวยาเคอร์คูมินมาพัฒนาเป็นสูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์ในการรักษา มะเร็งลำไส้ พบว่าสูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินสามารถเพิ่ม Cell uptake ได้เมื่อเทียบกับตัวยาเคอร์คูมินเดี่ยวๆ ($p < 0.05$) (45) โดยสาเหตุของปริมาณ Cellular uptake ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินที่มีค่าต่ำ อาจมีสาเหตุมาจาก เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เกิดกระบวนการ Efflux ทำให้ยาถูกขับออกจากเซลล์ ค่าที่วัดได้จึงมีค่าต่ำ โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่นำยาในรูปแบบไมเซลล์มาทดสอบการ uptake ในเซลล์มะเร็งตับ พบว่าปริมาณยาสะสมในเซลล์มะเร็งตับในช่วงเวลาที่ 2.5 กราฟจะมีลักษณะเป็นเส้นตรง ดังต่อไปนี้



รูปที่ 40 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยาที่ถูก uptake และเวลาต่างๆ(46)

แสดงให้เห็นว่า ที่เวลาดังกล่าวยาที่ผ่านเข้าเซลล์จะถูกขับออกในปริมาณที่เท่าๆกัน โดยงานวิจัยฉบับนี้ได้ทำการทดสอบปริมาณการ Cellular uptake ที่ 3 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าปริมาณยาในเซลล์ที่พบได้น้อยเป็นผลมาจากเซลล์ HepG2 เกิดกระบวนการ Efflux ทำให้ยาถูกขับออกจากเซลล์

7. การศึกษาคุณสมบัติความคงตัวของสูตรตำรับ

ตารางที่ 18 ลักษณะทางกายภาพของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมิน

sample	ตำรับ	ลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับหลังจากวัน		
		day 0	day 1	day 3
1	DMEM +curcumin	สารละลายสีแดงเข้ม	สารละลายสีแดงเข้ม	สารละลายสีแดงเข้ม
2	DMEM +curcumin	สารละลายสีแดงเข้ม	สารละลายสีแดงเข้ม	สารละลายสีแดงเข้ม
3	DMEM +curcumin	สารละลายสีแดงเข้ม	สารละลายสีแดงเข้ม	สารละลายสีเหลืองเข้ม มีตะกอนขาวที่ก้นขวด
4	RPMI1640 +curcumin	สารละลายสีแดง	สารละลายสีแดง อ่อน	สารละลายสีเหลืองอ่อน มีตะกอนขาวที่ก้นขวด
5	RPMI1640 +curcumin	สารละลายสีแดง	สารละลายสีแดง อ่อน	สารละลายสีเหลืองอ่อน มีตะกอนขาวที่ก้นขวด
6	RPMI1640 +curcumin	สารละลายสีแดง	สารละลายสีแดง อ่อน	สารละลายสีเหลืองอ่อน มีตะกอนขาวที่ก้นขวด
7	PBS 7.4 +curcumin	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง
8	PBS 7.4 +curcumin	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง
9	PBS 7.4 +curcumin	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง

ตารางที่ 19 ความคงตัวของขนาดของอนุภาคและ Zeta potential ของสูตรพอลิเมอร์
ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน

sample	ตำรับ	ลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับหลังจากวัน			
		day 1		day 3	
		size	ZP	size	ZP
1	DMEM +curcumin	277.11±26.02	0.24±0.29	334.75±78.98	-12.31±3.53
2	DMEM +curcumin	325.80±77.08	-9.92±0.82	384.35±16.76	-20.95±4.60
3	DMEM +curcumin	299±113.14	-8.49±4.41	440.85±123.67	-15.95±2.62
4	RPMI1640 +curcumin	95.18±6.75	-1.38±0.18	138.4±20.93	-2.19 ±0.59
5	RPMI1640 +curcumin	127.05±0.50	-0.58±0.43	184.43±11.50	-2.08 ±0.06
6	RPMI1640 +curcumin	107.06±15.62	-16.60±4.53	127.79 ±9.73	-18 ±2.97
7	PBS7.4 +curcumin	437.15±60.03	-2.15±1.49	882.30±22.35	-24.85 ±0.12
8	PBS 7.4 +curcumin	243.8±16.26	-5.44±0.96	442.60±7.92	-14.30±0.06
9	PBS 7.4 +curcumin	301.55±62.86	-3.92±2.83	454±40.45	-9.78 ±2.99

n=3

ตารางที่ 20 ลักษณะทางกายภาพของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาแอนโดรกราโฟไลด์

sample	ตำรับ	ลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับหลังจากวัน		
		day 0	day 1	day 3
1	DMEM +andrographolide	สารละลายสีแดง ขมพู	สารละลายสีขมพู เข้ม	สารละลายสีขมพู เข้ม
2	DMEM +andrographolide	สารละลายสีแดง ขมพู	สารละลายสีขมพู เข้ม	สารละลายสีขมพู เข้ม
3	DMEM +andrographolide	สารละลายสีแดง ขมพู	สารละลายสีขมพู เข้ม	สารละลายสีขมพู เข้ม
4	RPMI1640 +andrographolide	สารละลายสีขมพู	สารละลายสีขมพู อ่อน	สารละลายสีขมพู อ่อน มีตะกอนขาวๆ คล้ายรา
5	RPMI1640 +andrographolide	สารละลายสีขมพู	สารละลายสีขมพู อ่อน	สารละลายสีขมพู อ่อน มีตะกอนขาวๆ คล้ายราแต่น้อย กว่า sample 4
6	RPMI1640 +andrographolide	สารละลายสีขมพู	สารละลายสีขมพู อ่อน	สารละลายสีขมพู อ่อน
7	PBS 7.4 +andrographolide	สารละลายสีใส	สารละลายสีใส	สารละลายสีใส
8	PBS 7.4 +andrographolide	สารละลายสีใส	สารละลายสีใส	สารละลายสีใส
9	PBS 7.4 +andrographolide	สารละลายสีใส	สารละลายสีใส	สารละลายสีใส

ตารางที่ 21 ความคงตัวของขนาดของอนุภาคและ Zeta potential ของสูตรพอลิเมอร์
ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมิน

sample	ตำรับ	ลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับหลังจากวัน			
		day 1		day 3	
		size	ZP	size	ZP
1	DMEM +andrographolide	278.3±11.88	0.05±0.06	412.1±9.33	-15.35 ±7.57
2	DMEM +andrographolide	208.20±10.47	0.07±0.05	386.65±37.55	-25.95 ±0.07
3	DMEM +andrographolide	449.3±50.77	-0.16±0.16	346.70±0.14	13.22±12.13
4	RPMI1640 +andrographolide	105.67±39.22	-0.17±0.04	292.85±17.47	15.15±5.73
5	RPMI1640 +andrographolide	197.55±48.01	0.10±0.29	276.15±5.02	-17.55 ±1.63
6	RPMI1640 +andrographolide	235±107.19	-0.52±0.11	310.25 ±2.33	-8.22 ±4.93
7	PBS 7.4 +andrographolide	666.95±21.14	-0.39±0.27	367.95 ± 0.96	-6.89 ±0.09
8	PBS 7.4 +andrographolide	417.40±93.48	-0.25±0.39	497.50±18.81	-12.52±5.06
9	PBS 7.4 +andrographolide	257.40±1.13	-0.06±0.62	541.10±14.42	12.20±0.99

n=3

การศึกษาความคงตัวในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ DMEM , RPMI 1640 และ PBS 7.4 เป็นตัวทำละลาย โดยทำการศึกษาสภาวะคงตัวในวันที่ 1, 3 และ 7 ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถสรุปผลการศึกษาได้ เนื่องจากเครื่อง Zetasizer ที่ใช้ในการวัดผลเสีย ทำให้ไม่สามารถเก็บข้อมูลขนาดอนุภาคและ Zeta potential ในวันที่ 7 ได้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการเตรียมสูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์ในการนำส่งตัวยาเคอร์คูมินและตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) โดยใช้ Poloxamer 407 เป็นพอลิเมอร์ที่ใช้ก่อไมเซลล์โดยจะต้องหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดของพอลิเมอร์ที่สามารถก่อไมเซลล์ได้ (Critical Micelle Concentration) และจากผลการทดลองจะพบว่า ความเข้มข้นของ Poloxamer 407 ที่ทำให้เกิดจุด critical micelle concentration มีค่าเท่ากับ 0.01 mg/ml เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ poloxamer 407 จนมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 4 mg/ml พบว่าแรงตึงผิวของพอลิเมอร์มีค่าคงที่ จะเห็นได้จากกราฟของแรงตึงผิวที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ Poloxamer 407 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5 mg/ml ขึ้นไปในการเตรียมตำรับ เพื่อให้แน่ใจว่าสามารถเกิดไมเซลล์ได้ในทุกสูตรตำรับ และแรงตึงผิวที่ได้ในแต่ละตำรับนั้นมีค่าไม่แตกต่างกัน ทางผู้วิจัยเลือกใช้วิธี Thin-film hydration ในการเตรียมตำรับเนื่องจากเป็นวิธีที่เตรียมได้สะดวกและราคาถูก สูตรตำรับที่เตรียมขึ้นจะนำมาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ (Physical stability) ได้แก่ การศึกษา Morphology โดยส่องผ่านกล้อง Polarized light microscope และ Transmission electron microscopy (TEM) พบว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ได้จากการเตรียม มีลักษณะเป็นทรงกลม และเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี และในการประเมินคุณสมบัติของอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ซึ่งเป็นการประเมินขนาดอนุภาคและค่าประจุบนพื้นผิวอนุภาค (Zeta potential) ผลการทดลองพบว่าขนาดอนุภาคก่อนกรองของแต่ละสูตรนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโน ในส่วนของขนาดอนุภาคหลังจากการกรองนั้นพบว่าขนาดอนุภาคเล็กกว่าอนุภาคก่อนกรอง เนื่องจากอนุภาคของพอลิเมอร์ไมเซลล์บางส่วนที่มีขนาดอนุภาคใหญ่เกินกว่า 0.45 ไมโครเมตรจะไม่ถูกกรองผ่านรูกรองได้ แต่อย่างไรก็ตามอนุภาคหลังการกรองนั้นยังคงมีขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโนเช่นเดียวกับอนุภาคก่อนกรอง โดยขนาดอนุภาคส่วนใหญ่มีขนาดต่ำกว่า 500 นาโนเมตร ทำให้พอลิเมอร์ไมเซลล์นั้นยังสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ และการทดลองหาค่าประจุบนพื้นผิวอนุภาคพบว่า Zeta potential ของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยา มีค่า Zeta potential อยู่ในช่วง -4.79 ถึง -15.17 mV ซึ่งไม่เป็นไปตามทฤษฎี เนื่องจากโครงสร้าง

ของ Poloxamer 407 นั้นประกอบด้วย Polypropylene oxide และ Polyethylene oxide ซึ่งจะต้องมีประจุเป็นกลาง โดยสาเหตุการเปลี่ยนแปลงของค่า Zeta potential ดังกล่าวนั้นอาจเกิดจากการรบกวนจากไอออนของตัวยาสำคัญก็คือตัวยาเคอร์คูมินและตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ เนื่องจากค่า Zeta potential ของตัวยาเคอร์คูมิน และตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์เดียวนั้นมีค่า Zeta potential อยู่ที่ -15.14 mV และ - 12.39 mV ตามลำดับ จึงทำให้ประจุของพอลิเมอร์ไมเซลล์เปลี่ยนแปลงไป แต่อย่างไรก็ตาม Zeta potential ของอนุภาคนั้นอยู่ในช่วง ± 30 mV ซึ่งถือเป็นช่วงที่เหมาะสมของการคงสภาพ colloid และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกักเก็บตัวยาสำคัญพบว่าสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ในสูตรที่ 3A ซึ่งประกอบด้วย ตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ 5 มิลลิกรัม และ Poloxamer 407 200 มิลลิกรัม และสูตรที่ 3C ซึ่งประกอบด้วย ตัวยาเคอร์คูมิน 5 มิลลิกรัม และ Poloxamer 407 200 มิลลิกรัม มีความสามารถในการกักเก็บตัวยาสำคัญได้สูงสุดโดยวัดจาก % Entrapment efficiency (%EE) พบว่าสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินมีค่า %EE = 87.09 ± 4.43 % และสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ มีค่า %EE = 84.33 ± 11.11 % จึงเลือกสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์สูตรที่ 3 ของทั้งสองตัวยามาทำการศึกษา Cellular uptake ต่อ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ HepG2 เพื่อใช้ในการทดสอบ Cellular uptake ผลการทดสอบพบว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์สามารถช่วยเพิ่มปริมาณ Cellular uptake ได้เมื่อเทียบกับตัวยาสำคัญเดี่ยวๆ โดยสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ ในสูตรที่ 3A มีปริมาณ Cellular uptake เท่ากับ 2.11 ซึ่งมากกว่าตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์เดี่ยวๆที่มีปริมาณ Cellular uptake เท่ากับ 1.81 และสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินในสูตร 3C มีการรายงานผล Cellular uptake เป็น N/A เนื่องจากปริมาณ Cellular uptake ที่ได้มีค่าน้อยมาก ซึ่งต่ำกว่าค่า Limits of Quantitation จึงต้องพิจารณาจากค่า AUC ซึ่งพบว่า ค่า AUC ของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินมีค่ามากกว่าตัวยาเคอร์คูมินเดี่ยวๆ แสดงให้เห็นว่าสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมินมีปริมาณ Cellular uptake มากกว่าตัวยาเคอร์คูมินเดี่ยวๆ ทั้งนี้สาเหตุของปริมาณ Cellular uptake ที่มีค่าน้อยดังกล่าวคาดว่าจะเกิดจากระยะเวลาในการทดสอบที่นานเกินไป ทำให้เซลล์ HepG2 เกิดกระบวนการ Efflux ทำให้ยาถูกขับออกจากเซลล์ ค่าที่วัดได้จึงมีค่าต่ำ และการศึกษาความคงตัวในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ DMEM , RPMI 1640 และ PBS 7.4 เป็นตัวทำละลาย โดยทำการศึกษาศภาพคงตัวในวันที่ 1, 3 และ 7 ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถสรุปผลการศึกษาได้ เนื่องจากเครื่อง Zetasizer ที่ใช้ในการวัดผลเสีย ทำให้ไม่สามารถเก็บข้อมูลขนาดอนุภาคและ Zeta potential ในวันที่ 7 ได้ จึงควรพิจารณานำขั้นตอนดังกล่าวไปใช้ศึกษาต่อการพัฒนาสูตรตำรับในอนาคต

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์สามารถช่วยเพิ่มการนำส่งตัวยาในการรักษามะเร็งได้ แต่พบว่าปริมาณยาที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจยังไม่เพียงพอในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ ซึ่งจะต้องพัฒนาสูตรตำรับต่อไป อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการกักเก็บยาของสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่แตกต่างกันทั้งสองสูตรนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างและความชอบน้ำหรือความชอบไขมันของสารที่นำมาใช้เช่นกัน และเมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างโดยดูจากค่า Log P พบว่ายาคอร์คูมินจะมีความสามารถในการละลายในไขมันได้ดีกว่าแอนโดรกราโฟไลด์ โดยค่า Log P ของตัวยาเคอร์คูมินมีค่าเท่ากับ 3.2 ซึ่งมากกว่ายาแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีค่า log P อยู่ที่ 2.2 ทำให้ยาทั้งสองตัวนี้มีค่าการละลายในไขมันที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บยา และจากการศึกษา งานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่มีการศึกษาค่าการละลายของตัวยาเคอร์คูมินและตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ที่ละลายใน Ethyl oleate ซึ่งเป็นสารละลายไขมันก็ยังสนับสนุนว่าตัวยาเคอร์คูมินมีค่าการละลายใน Ethyl oleate ที่มากกว่าตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์ อีกทั้งงานวิจัยที่สนับสนุนว่ายาก็ไม่ละลายน้ำมีประสิทธิภาพในการกักเก็บยาต่ำกว่ายาที่ชอบละลายน้ำ เนื่องจากยาที่ไม่ละลายน้ำจะมีปริมาณยาที่สะสมอยู่บริเวณด้านในไมเซลล์มากกว่ายาที่ชอบละลายน้ำ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าปัจจัยเกี่ยวกับโครงสร้างและความชอบน้ำและความชอบไขมันของสารที่นำมาใช้นั้น มีผลต่อการพัฒนาสูตรตำรับ จึงควรพิจารณาปัจจัยดังกล่าวในการพัฒนาสูตรตำรับในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

พอลิเมอร์ไมเซลล์ที่เข้าเซลล์มะเร็งได้ดีจะต้องมีค่า Zeta potential เป็นบวก ซึ่งพบว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ได้จากงานวิจัยฉบับนี้มีค่า Zeta potential ที่เข้าใกล้ศูนย์ ทำให้ประสิทธิภาพการ uptake เข้าเซลล์มะเร็งต่ำมีค่าต่ำ ในอนาคตจึงควรพัฒนาระบบนำส่งดังกล่าว โดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกผสมกับ Poloxamer 407 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ uptake เข้าเซลล์มะเร็งได้มากยิ่งขึ้น อีกทั้งทำการศึกษา Cytotoxicity เพิ่มเติม ในการหา IC50 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสูตรตำรับในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับและมะเร็งอื่นๆ

ปัญหางานวิจัย

เนื่องจากเครื่อง zetasizer เสียในช่วงที่ทำการทดสอบความคงตัวของตำรับ จึงไม่สามารถเก็บข้อมูลความคงตัวของสูตรตำรับในวันที่ 7 ได้ ทำให้ไม่สามารถแปลผลในการทดลองนี้ได้

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ ส. สถิติสาธารณสุข พ.ศ.2557. องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก2557
2. กระทรวงสาธารณสุข สก. แนวทางการตรวจคัดกรองวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งตับและท่อน้ำดี. กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข 268/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400. 2012:22-8.
3. Agarwal A. Nano-formulation and Controlled Delivery of Low Solubility Anticancer Drugs. UMI microform 2009.
4. University of California - Los Angeles. "New Nanomaterials To Deliver Anticancer Drugs To Cells Developed." ScienceDaily. ScienceDaily, 8 June 2007. [cited 2016 Jul 5]. Available from sciencedaily: <https://www.sciencedaily.com/releases/2007/06/070607112931.htm>
5. Unal H, Ozturk N, Bilensoy E. Formulation development, stability and anticancer efficacy of core-shell cyclodextrin nanocapsules for oral chemotherapy with camptothecin. Beilstein Journal of organic chemistry. 2015;11:204-12.
6. วราญุทธ สะโคมแสง. การเพิ่มประสิทธิภาพของเคอร์คูมินด้วยระบบนำส่งนาโนในการต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก. Science and Technology RMUTT Journal. 2014;4(1):33-47.
7. Gou M, Men K, Shi H, Xiang M, Zhang J, Song J, et al. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. Nanoscale. 2011;3(4):1558-67.
8. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2010;6(6):714-29.
9. Qi CL1 WL, Zhou XL. Advances in study on anti-tumor mechanism of andrographolide. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2007;32(20):2095-7.
10. Roy P DS, Mondal A, Chatterji U, Mukherjee A. Nanoparticle engineering enhances anticancer efficacy of andrographolide in MCF-7 cells and mice bearing EAC. Curr Pharm Biotechnol. 2012;17(15):2669-26681.

11. Escobar-Chavez JJ, Lopez-Cervantes M, A. Naik² YNK, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *canadian Society for Pharmaceutical Sciences*. 2006;9(3):339-58
12. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research*. 2006;23(12):2709–28.
13. Dian L, Yu E, Chen X, Wen X, Zhang Z, Qin L, et al. Enhancing oral bioavailability of quercetin using novel soluplus polymeric micelles. *Nanoscale Research Letters*. 2014;9(1):1-11.
14. Hussain VSMD. Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2012.
15. Amiji, M. M., Lai, P. K., Shenoy, D. B., and Rao, M., Intratumoral administration of paclitaxel in an in situ gelling poloxamer 407 formulation, *Pharm. Dev. Technol.*, 7(2):195-202, 2002.
16. ปัญจรัก ว. สรีรวิทยาของมะเร็ง: ทัศนมิติมุมมองผ่านศตวรรษที่ 21. *ศรีนครินทร์เวชสาร*. 2015;30(2):175-83.
17. อิศระกุลฤทธา ก. มะเร็งคืออะไร.ความรู้สำหรับประชาชนโรงพยาบาลจุฬารณ์ [Internet].2008.[cited 2016 Jul 5] Available from://www.cccthai.org/l-th/index.php/2009-06-13-08-46-51.html
18. ผลพอนต ส. กลไกการเกิดมะเร็ง.[Internet].2008.[cited 2016 Jul 5] Available form : <http://hopelife.igetweb.com/articles/87340/กลไกการเกิดมะเร็ง.html>.
19. สมบัติวรพัฒน์ ว.สาเหตุการเกิดมะเร็ง.[Internet].2011.[cited 2016 Jul 5] Available :<http://www.absolute-health.org/thai/article-th-0003.htm#next>
20. Cooper GM.The Eukaryotic Cell Cycle. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.[cited 2016 Jul 5] Available from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>

21. American Cancer Society. Liver Cancer Overview. American Cancer Society 2014. [cited 2016 Jul 5] Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003058-pdf.pdf>
22. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Liver Cancer: Introduction. Cancer.Net. 2016. [cited 2016 Jul 4] Available from: <http://www.cancer.net/cancer-types/liver-cancer/introduction>
23. Pepic I, Lovric J, Filipovic-Grcic J. How do polymeric micelles cross epithelial barriers? European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013;50(1):42-55.
24. Murugan K, Choonara YE, Kumar P, Bijukumar D, du Toit LC, Pillay V. Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures. International Journal of Nanomedicine. 2015;10:2191-206.
25. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2010;6(6):714-29.
26. Xu W, Ling P, Zhang T. Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. Journal of Drug Delivery. 2013;2013:340315.
27. Yodkhum K, Wannachaiyasit S, Phaechamud T. Gallic thermosensitive gel. Advanced Material Research. 2010;93-94:433-8.
28. วรพัฒน์ผดุง ฐู, โอปณะโสภิต ป. โซลิดดิสเพอร์ชัน: เทคนิคเพิ่มการละลายของตัวยาละลายน้ำน้อย. Thai journal citation index centre. 2015;11(2):1-15.
29. Saxena V, Hussain MD. Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer. International Journal of Nanomedicine. 2012;7:713-21.
30. Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., and Alakhov, V. Y., Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54(5): 759-779, 2002.

31. Priyadarsini KI. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules* 2014, 19(12), 20091-20112
32. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*. 2011;10:12.
33. Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Division*. 2008;3:14.
34. National Center for Biotechnology Information. Andrographolide. PubChem Compound Database; CID=5318517. [cited 2016 Jul 7] Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Andrographolide#section=Top>
35. Hidalgo MA, Hancke JL, Bertoglio JC, Burgos RA. Andrographolide a New Potential Drug for the Long Term Treatment of Rheumatoid Arthritis Disease. *licensee Intech* 2013:247-70.
36. Sukardiman, Harjotaruno, Widyawaruyanti A, Sisindari, Zaini NC. Apoptosis inducing effect of andrographolide on TD-47 human breast cancer cell line. *Afr J Traditional Complementary and Alternative Medicines* 2007;4(3):345 - 51
37. V.K. Mourya NI, R.B. Nawale, S.S. Kulthe. Polymeric Micelles: General Considerations and their Applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2010.
38. Saxena V, Hussain MD. Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:713-21.
39. Dhakar RC, Maurya SD, Saluja V. From formulation variables to drug entrapment efficiency of microspheres: A technical review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2012;2(6): 128-33
40. Aziz HA, Tan YTF, Peh KK. Solubility of Drugs in Aqueous Polymeric Solution: Effect of Ovalbumin on Microencapsulation Process. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(1):35-45.

41. Sahu AR, Bothara SB. Formulation and Evaluation of Self-microemulsifying drug delivery system of Curcumin for enhanced solubility and dissolution. *Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2015;4(1):48-59.
42. 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):459-66.
43. Mukerjee A, Vishwanatha JK. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Res*. 2009;29(10):3867-75.
44. Jiang Y, Wang F, Xu H, Liu H, Meng Q, Liu W. Development of andrographolide loaded PLGA microspheres: Optimization, characterization and in vitro–in vivo correlation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;475(1–2):475-84.
45. Yang X, Li Z, Wang N, Li L, Song L, He T, et al. Curcumin-encapsulated polymeric micelles suppress the development of colon cancer In vitro and in vivo. *Scientific reports*. 2015:1-15.
46. Zhang C, Zhu W, Liu Y, Yuan Z, Yang S, Chen W, et al. Novel polymer micelle mediated co-delivery of doxorubicin and P-glycoprotein siRNA for reversal of multidrug resistance and synergistic tumor therapy. *Scientific reports*. 2016:1-12.

เอกสารอ้างอิงรูปภาพ

1. สมบัติวรพัฒน์ ว. สาเหตุการเกิดมะเร็ง.[Internet]. 2011. [cited 2016 Jul 5] Available from: <http://www.absolute-health.org/thai/article -th-0003.htm#next>
2. American Cancer Society.Liver Cancer Overview. American Cancer Society 2014.[cited 2016 Jul 5] Available from:<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003058-pdf.pdf>
3. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(4):285-93.
4. Feng Zhao, Ying Zhao, Ying Liu, Xueling Chang, Chunying Chen*, Yuliang Zhao*. Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. Small, 2011, 7(10): 1322-1337
5. Xu W, Ling P, Zhang T. Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. Journal of Drug Delivery. 2013;2013:340315.
6. Godfroy I. polymeric micelles-the future of oral drug delivery. department of chemical and biomolecular engineering university of notre dame.
7. Yodkhum K, Wannachaiyasit S, Phaechemud T. Gallic thermosensitive gel. Advanced Material Research. 2010;93-94:433-8.
8. Reason Wilken MSV, Marilene B Wang, Eri S Srivatsan. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. Molecular Cancer. 2011;10(12):1.
9. Reason Wilken MSV, Marilene B Wang, Eri S Srivatsan. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. Molecular Cancer. 2011;10(12):1.
10. National Center for Biotechnology Information. Andrographolide. PubChem Compound Database; CID=5318517.[cited 2016 Jul 7] Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Andrographolide#section=Top>

ภาคผนวก

ตารางที่ 22 ตัวอย่าง Abbreviations

คำย่อ	คำเต็ม
% EE	Entrapment Efficiency
S.D.	Standard Deviation
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ZP	Zeta Potential
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HepG2	liver hepatocellular cells

ตารางที่ 23 แสดงค่าสถิติ One-way anova ของขนาดอนุภาคสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมิน

ANOVA

size

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6562287.686	6	1093714.614	28.260	.000
Within Groups	2167332.911	56	38702.373		
Total	8729620.597	62			

ตารางที่ 24 แสดงค่าสถิติ Post Hoc(tukey)ของขนาดอนุภาคสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุด้วยเคอร์คูมิน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: size

Tukey HSD

(I) simple	(J) simple	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		J)			Lower Bound	Upper Bound
1	2	150.61111	92.73903	.668	-132.9856	434.2078
	3	16.33333	92.73903	1.000	-267.2633	299.9300
	4	-309.68889*	92.73903	.024	-593.2856	-26.0922
	5	-72.83333	92.73903	.985	-356.4300	210.7633
	6	-899.53333*	92.73903	.000	-1183.1300	-615.9367
	7	-126.04444	92.73903	.821	-409.6411	157.5522
2	1	-150.61111	92.73903	.668	-434.2078	132.9856
	3	-134.27778	92.73903	.773	-417.8745	149.3189
	4	-460.30000*	92.73903	.000	-743.8967	-176.7033

	5	-223.44444	92.73903	.214	-507.0411	60.1522
	6	-1050.14444*	92.73903	.000	-1333.7411	-766.5478
	7	-276.65556	92.73903	.060	-560.2522	6.9411
3	1	-16.33333	92.73903	1.000	-299.9300	267.2633
	2	134.27778	92.73903	.773	-149.3189	417.8745
	4	-326.02222*	92.73903	.014	-609.6189	-42.4255
	5	-89.16667	92.73903	.960	-372.7633	194.4300
	6	-915.86667*	92.73903	.000	-1199.4633	-632.2700
	7	-142.37778	92.73903	.723	-425.9745	141.2189
4	1	309.68889*	92.73903	.024	26.0922	593.2856
	2	460.30000*	92.73903	.000	176.7033	743.8967
	3	326.02222*	92.73903	.014	42.4255	609.6189
	5	236.85556	92.73903	.160	-46.7411	520.4522
	6	-589.84444*	92.73903	.000	-873.4411	-306.2478
	7	183.64444	92.73903	.438	-99.9522	467.2411
5	1	72.83333	92.73903	.985	-210.7633	356.4300
	2	223.44444	92.73903	.214	-60.1522	507.0411
	3	89.16667	92.73903	.960	-194.4300	372.7633
	4	-236.85556	92.73903	.160	-520.4522	46.7411
	6	-826.70000*	92.73903	.000	-1110.2967	-543.1033
	7	-53.21111	92.73903	.997	-336.8078	230.3856
6	1	899.53333*	92.73903	.000	615.9367	1183.1300
	2	1050.14444*	92.73903	.000	766.5478	1333.7411
	3	915.86667*	92.73903	.000	632.2700	1199.4633
	4	589.84444*	92.73903	.000	306.2478	873.4411
	5	826.70000*	92.73903	.000	543.1033	1110.2967
	7	773.48889*	92.73903	.000	489.8922	1057.0856
7	1	126.04444	92.73903	.821	-157.5522	409.6411

2	276.65556	92.73903	.060	-6.9411	560.2522
3	142.37778	92.73903	.723	-141.2189	425.9745
4	-183.64444	92.73903	.438	-467.2411	99.9522
5	53.21111	92.73903	.997	-230.3856	336.8078
6	-773.48889*	92.73903	.000	-1057.0856	-489.8922

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 25 แสดงค่าสถิติ One-way anova ขนาดอนุภาคสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาแอนโดรกราโฟไลด์

ANOVA

size

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	737686.138	6	122947.690	7.732	.000
Within Groups	890516.491	56	15902.080		
Total	1628202.629	62			

ตารางที่ 26 แสดง Post Hoc(tukey)ขนาดอนุภาคสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาแอนโดรกราโฟไลด์

Multiple Comparisons

Dependent Variable: size

Tukey HSD

(I) simple	(J) simple	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		J)			Lower Bound	Upper Bound
1	2	40.87778	59.44574	.993	-140.9078	222.6633
	3	-173.24444	59.44574	.071	-355.0300	8.5411

	4	-33.16667	59.44574	.998	-214.9522	148.6189
	5	33.16667	59.44574	.998	-148.6189	214.9522
	6	-275.03333*	59.44574	.000	-456.8189	-93.2478
	7	-57.12222	59.44574	.960	-238.9078	124.6633
2	1	-40.87778	59.44574	.993	-222.6633	140.9078
	3	-214.12222*	59.44574	.011	-395.9078	-32.3367
	4	-74.04444	59.44574	.873	-255.8300	107.7411
	5	-7.71111	59.44574	1.000	-189.4966	174.0744
	6	-315.91111*	59.44574	.000	-497.6966	-134.1256
	7	-98.00000	59.44574	.652	-279.7855	83.7855
3	1	173.24444	59.44574	.071	-8.5411	355.0300
	2	214.12222*	59.44574	.011	32.3367	395.9078
	4	140.07778	59.44574	.237	-41.7078	321.8633
	5	206.41111*	59.44574	.016	24.6256	388.1966
	6	-101.78889	59.44574	.611	-283.5744	79.9966
	7	116.12222	59.44574	.455	-65.6633	297.9078
4	1	33.16667	59.44574	.998	-148.6189	214.9522
	2	74.04444	59.44574	.873	-107.7411	255.8300
	3	-140.07778	59.44574	.237	-321.8633	41.7078
	5	66.33333	59.44574	.921	-115.4522	248.1189
	6	-241.86667*	59.44574	.003	-423.6522	-60.0811
	7	-23.95556	59.44574	1.000	-205.7411	157.8300
5	1	-33.16667	59.44574	.998	-214.9522	148.6189
	2	7.71111	59.44574	1.000	-174.0744	189.4966
	3	-206.41111*	59.44574	.016	-388.1966	-24.6256
	4	-66.33333	59.44574	.921	-248.1189	115.4522
	6	-308.20000*	59.44574	.000	-489.9855	-126.4145
	7	-90.28889	59.44574	.732	-272.0744	91.4966

6	1	275.03333 [*]	59.44574	.000	93.2478	456.8189
	2	315.91111 [*]	59.44574	.000	134.1256	497.6966
	3	101.78889	59.44574	.611	-79.9966	283.5744
	4	241.86667 [*]	59.44574	.003	60.0811	423.6522
	5	308.20000 [*]	59.44574	.000	126.4145	489.9855
	7	217.91111 [*]	59.44574	.009	36.1256	399.6966
7	1	57.12222	59.44574	.960	-124.6633	238.9078
	2	98.00000	59.44574	.652	-83.7855	279.7855
	3	-116.12222	59.44574	.455	-297.9078	65.6633
	4	23.95556	59.44574	1.000	-157.8300	205.7411
	5	90.28889	59.44574	.732	-91.4966	272.0744
	6	-217.91111 [*]	59.44574	.009	-399.6966	-36.1256

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 27 แสดงสถิติ One-way anova ค่า zeta potential ของอนุภาคสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน

ANOVA

zeta

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	565.361	6	94.227	2.260	.050
Within Groups	2334.496	56	41.687		
Total	2899.858	62			

ตารางที่ 28 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) ค่า zeta potential ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: zeta

Tukey HSD

		Mean					95% Confidence Interval	
		Difference (I-						
(I) simple	(J) simple	J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound		
1	2	-7.18556	3.04366	.235	-16.4931	2.1220		
	3	1.56778	3.04366	.999	-7.7398	10.8753		
	4	-2.23000	3.04366	.990	-11.5375	7.0775		
	5	-2.81111	3.04366	.967	-12.1187	6.4964		
	6	-3.51111	3.04366	.908	-12.8187	5.7964		
	7	-6.81374	3.04366	.292	-16.1213	2.4938		
2	1	7.18556	3.04366	.235	-2.1220	16.4931		
	3	8.75333	3.04366	.078	-.5542	18.0609		
	4	4.95556	3.04366	.665	-4.3520	14.2631		
	5	4.37444	3.04366	.779	-4.9331	13.6820		
	6	3.67444	3.04366	.888	-5.6331	12.9820		
	7	.37181	3.04366	1.000	-8.9357	9.6794		
3	1	-1.56778	3.04366	.999	-10.8753	7.7398		
	2	-8.75333	3.04366	.078	-18.0609	.5542		
	4	-3.79778	3.04366	.872	-13.1053	5.5098		
	5	-4.37889	3.04366	.779	-13.6864	4.9287		
	6	-5.07889	3.04366	.639	-14.3864	4.2287		
	7	-8.38152	3.04366	.104	-17.6891	.9260		
4	1	2.23000	3.04366	.990	-7.0775	11.5375		
	2	-4.95556	3.04366	.665	-14.2631	4.3520		

	3	3.79778	3.04366	.872	-5.5098	13.1053
	5	-.58111	3.04366	1.000	-9.8887	8.7264
	6	-1.28111	3.04366	1.000	-10.5887	8.0264
	7	-4.58374	3.04366	.740	-13.8913	4.7238
5	1	2.81111	3.04366	.967	-6.4964	12.1187
	2	-4.37444	3.04366	.779	-13.6820	4.9331
	3	4.37889	3.04366	.779	-4.9287	13.6864
	4	.58111	3.04366	1.000	-8.7264	9.8887
	6	-.70000	3.04366	1.000	-10.0075	8.6075
	7	-4.00263	3.04366	.842	-13.3102	5.3049
6	1	3.51111	3.04366	.908	-5.7964	12.8187
	2	-3.67444	3.04366	.888	-12.9820	5.6331
	3	5.07889	3.04366	.639	-4.2287	14.3864
	4	1.28111	3.04366	1.000	-8.0264	10.5887
	5	.70000	3.04366	1.000	-8.6075	10.0075
	7	-3.30263	3.04366	.930	-12.6102	6.0049
7	1	6.81374	3.04366	.292	-2.4938	16.1213
	2	-.37181	3.04366	1.000	-9.6794	8.9357
	3	8.38152	3.04366	.104	-.9260	17.6891
	4	4.58374	3.04366	.740	-4.7238	13.8913
	5	4.00263	3.04366	.842	-5.3049	13.3102
	6	3.30263	3.04366	.930	-6.0049	12.6102

ตารางที่ 29 แสดงสถิติ One-way anova ค่า zeta potential ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์กไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

ANOVA

zeta

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	576.013	6	96.002	2.421	.038
Within Groups	2220.811	56	39.657		
Total	2796.824	62			

ตารางที่ 30 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) ค่า zeta potential ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์กไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดรกราโฟไลด์

Multiple Comparisons

Dependent Variable: zeta

Tukey HSD

(I) simple	(J) simple	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		J)			Lower Bound	Upper Bound
1	2	-4.66556	2.96863	.700	-13.7436	4.4125
	3	-7.88889	2.96863	.129	-16.9670	1.1892
	4	-6.40333	2.96863	.335	-15.4814	2.6747
	5	-3.58000	2.96863	.889	-12.6581	5.4981
	6	.80333	2.96863	1.000	-8.2747	9.8814
	7	-5.85333	2.96863	.444	-14.9314	3.2247
2	1	4.66556	2.96863	.700	-4.4125	13.7436
	3	-3.22333	2.96863	.930	-12.3014	5.8547
	4	-1.73778	2.96863	.997	-10.8159	7.3403

	5	1.08556	2.96863	1.000	-7.9925	10.1636
	6	5.46889	2.96863	.526	-3.6092	14.5470
	7	-1.18778	2.96863	1.000	-10.2659	7.8903
3	1	7.88889	2.96863	.129	-1.1892	16.9670
	2	3.22333	2.96863	.930	-5.8547	12.3014
	4	1.48556	2.96863	.999	-7.5925	10.5636
	5	4.30889	2.96863	.771	-4.7692	13.3870
	6	8.69222	2.96863	.069	-.3859	17.7703
	7	2.03556	2.96863	.993	-7.0425	11.1136
4	1	6.40333	2.96863	.335	-2.6747	15.4814
	2	1.73778	2.96863	.997	-7.3403	10.8159
	3	-1.48556	2.96863	.999	-10.5636	7.5925
	5	2.82333	2.96863	.962	-6.2547	11.9014
	6	7.20667	2.96863	.207	-1.8714	16.2847
	7	.55000	2.96863	1.000	-8.5281	9.6281
5	1	3.58000	2.96863	.889	-5.4981	12.6581
	2	-1.08556	2.96863	1.000	-10.1636	7.9925
	3	-4.30889	2.96863	.771	-13.3870	4.7692
	4	-2.82333	2.96863	.962	-11.9014	6.2547
	6	4.38333	2.96863	.757	-4.6947	13.4614
	7	-2.27333	2.96863	.987	-11.3514	6.8047
6	1	-.80333	2.96863	1.000	-9.8814	8.2747
	2	-5.46889	2.96863	.526	-14.5470	3.6092
	3	-8.69222	2.96863	.069	-17.7703	.3859
	4	-7.20667	2.96863	.207	-16.2847	1.8714
	5	-4.38333	2.96863	.757	-13.4614	4.6947
	7	-6.65667	2.96863	.290	-15.7347	2.4214
7	1	5.85333	2.96863	.444	-3.2247	14.9314

2	1.18778	2.96863	1.000	-7.8903	10.2659
3	-2.03556	2.96863	.993	-11.1136	7.0425
4	-.55000	2.96863	1.000	-9.6281	8.5281
5	2.27333	2.96863	.987	-6.8047	11.3514
6	6.65667	2.96863	.290	-2.4214	15.7347

ตารางที่ 31 แสดงสถิติ One-way anova ปริมาณ % Entrapment efficiency ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุด้วยยาเคอร์คูมิน

ANOVA

entrap

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16743.893	6	2790.649	64.265	.000
Within Groups	607.936	14	43.424		
Total	17351.829	20			

ตารางที่ 32 แสดงสถิติ Post Hoc)tukey (ปริมาณ %Entrapment efficiency ของอนุภาคสูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: entrap

Tukey HSD

(I) sample	(J) sample	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
1	2	-1.90531	5.38046	1.000	-20.2774	16.4667
	3	-6.41435	5.38046	.886	-24.7864	11.9577
	4	-2.43090	5.38046	.999	-20.8029	15.9411
	5	-.26017	5.38046	1.000	-18.6322	18.1119
	6	79.13185 [*]	5.38046	.000	60.7598	97.5039
	7	4.34428	5.38046	.980	-14.0278	22.7163
2	1	1.90531	5.38046	1.000	-16.4667	20.2774
	3	-4.50904	5.38046	.976	-22.8811	13.8630
	4	-.52558	5.38046	1.000	-18.8976	17.8465
	5	1.64514	5.38046	1.000	-16.7269	20.0172
	6	81.03717 [*]	5.38046	.000	62.6651	99.4092
	7	6.24959	5.38046	.897	-12.1225	24.6216
3	1	6.41435	5.38046	.886	-11.9577	24.7864
	2	4.50904	5.38046	.976	-13.8630	22.8811
	4	3.98345	5.38046	.987	-14.3886	22.3555
	5	6.15418	5.38046	.904	-12.2179	24.5262
	6	85.54620 [*]	5.38046	.000	67.1742	103.9182
	7	10.75863	5.38046	.455	-7.6134	29.1307
4	1	2.43090	5.38046	.999	-15.9411	20.8029
	2	.52558	5.38046	1.000	-17.8465	18.8976

	3	-3.98345	5.38046	.987	-22.3555	14.3886
	5	2.17073	5.38046	1.000	-16.2013	20.5428
	6	81.56275*	5.38046	.000	63.1907	99.9348
	7	6.77518	5.38046	.859	-11.5969	25.1472
5	1	.26017	5.38046	1.000	-18.1119	18.6322
	2	-1.64514	5.38046	1.000	-20.0172	16.7269
	3	-6.15418	5.38046	.904	-24.5262	12.2179
	4	-2.17073	5.38046	1.000	-20.5428	16.2013
	6	79.39202*	5.38046	.000	61.0200	97.7641
	7	4.60445	5.38046	.974	-13.7676	22.9765
6	1	-79.13185*	5.38046	.000	-97.5039	-60.7598
	2	-81.03717*	5.38046	.000	-99.4092	-62.6651
	3	-85.54620*	5.38046	.000	-103.9182	-67.1742
	4	-81.56275*	5.38046	.000	-99.9348	-63.1907
	5	-79.39202*	5.38046	.000	-97.7641	-61.0200
	7	-74.78757*	5.38046	.000	-93.1596	-56.4155
7	1	-4.34428	5.38046	.980	-22.7163	14.0278
	2	-6.24959	5.38046	.897	-24.6216	12.1225
	3	-10.75863	5.38046	.455	-29.1307	7.6134
	4	-6.77518	5.38046	.859	-25.1472	11.5969
	5	-4.60445	5.38046	.974	-22.9765	13.7676
	6	74.78757*	5.38046	.000	56.4155	93.1596

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 33 แสดงสถิติ One-way anova ปริมาณ % Entrapment efficiency ของอนุภาค
สูตรพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดกราไฟไลด์

ANOVA

entrap

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18780.670	6	3130.112	50.888	.000
Within Groups	861.138	14	61.510		
Total	19641.808	20			

ตารางที่ 34 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) ปริมาณ %Entrapment efficiency ของอนุภาคสูตรพอลิ
เมอริกไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดกราไฟไลด์

Multiple Comparisons

Dependent Variable: entrap

Tukey HSD

(I) sample	(J) sample	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		J)			Lower Bound	Upper Bound
1	2	-4.71956	6.40364	.987	-26.5853	17.1462
	3	-22.35023*	6.40364	.044	-44.2160	-.4845
	4	-19.71037	6.40364	.090	-41.5761	2.1554
	5	45.86528*	6.40364	.000	23.9995	67.7310
	6	53.92110*	6.40364	.000	32.0553	75.7869
	7	-21.85113	6.40364	.050	-43.7169	.0146
2	1	4.71956	6.40364	.987	-17.1462	26.5853
	3	-17.63066	6.40364	.155	-39.4964	4.2351

	4	-14.99080	6.40364	.291	-36.8566	6.8750
	5	50.58484 [*]	6.40364	.000	28.7191	72.4506
	6	58.64066 [*]	6.40364	.000	36.7749	80.5064
	7	-17.13157	6.40364	.176	-38.9973	4.7342
3	1	22.35023 [*]	6.40364	.044	.4845	44.2160
	2	17.63066	6.40364	.155	-4.2351	39.4964
	4	2.63986	6.40364	.999	-19.2259	24.5056
	5	68.21550 [*]	6.40364	.000	46.3497	90.0813
	6	76.27133 [*]	6.40364	.000	54.4056	98.1371
	7	.49909	6.40364	1.000	-21.3667	22.3649
4	1	19.71037	6.40364	.090	-2.1554	41.5761
	2	14.99080	6.40364	.291	-6.8750	36.8566
	3	-2.63986	6.40364	.999	-24.5056	19.2259
	5	65.57565 [*]	6.40364	.000	43.7099	87.4414
	6	73.63147 [*]	6.40364	.000	51.7657	95.4972
	7	-2.14076	6.40364	1.000	-24.0065	19.7250
5	1	-45.86528 [*]	6.40364	.000	-67.7310	-23.9995
	2	-50.58484 [*]	6.40364	.000	-72.4506	-28.7191
	3	-68.21550 [*]	6.40364	.000	-90.0813	-46.3497
	4	-65.57565 [*]	6.40364	.000	-87.4414	-43.7099
	6	8.05582	6.40364	.860	-13.8099	29.9216
	7	-67.71641 [*]	6.40364	.000	-89.5822	-45.8506
6	1	-53.92110 [*]	6.40364	.000	-75.7869	-32.0553
	2	-58.64066 [*]	6.40364	.000	-80.5064	-36.7749
	3	-76.27133 [*]	6.40364	.000	-98.1371	-54.4056
	4	-73.63147 [*]	6.40364	.000	-95.4972	-51.7657
	5	-8.05582	6.40364	.860	-29.9216	13.8099
	7	-75.77223 [*]	6.40364	.000	-97.6380	-53.9065

7	1	21.85113	6.40364	.050	-.0146	43.7169
	2	17.13157	6.40364	.176	-4.7342	38.9973
	3	-.49909	6.40364	1.000	-22.3649	21.3667
	4	2.14076	6.40364	1.000	-19.7250	24.0065
	5	67.71641*	6.40364	.000	45.8506	89.5822
	6	75.77223*	6.40364	.000	53.9065	97.6380

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 35 แสดงสถิติ One-way anova ปริมาณ Cell uptake ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไม่
เซลล์ที่บรรจุด้วยยาเคอร์คูมิน

ANOVA

uptake

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.852	7	3.265	1709.360	.000
Within Groups	.031	16	.002		
Total	22.883	23			

ตารางที่ 36 แสดงสถิติ Post Hoc(tukey) ปริมาณ Cell uptake ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาเคอร์คูมิน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: uptake

Tukey HSD

(I) simple	(J) simple	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
4	6	-.19610 [*]	.03568	.001	-.3196	-.0726
	7	-1.53058 [*]	.03568	.000	-1.6541	-1.4070
	9	-.12857 [*]	.03568	.038	-.2521	-.0050
	13	-2.63799 [*]	.03568	.000	-2.7615	-2.5145
	15	.02845	.03568	.991	-.0951	.1520
	16	.28295 [*]	.03568	.000	.1594	.4065
	18	.28295 [*]	.03568	.000	.1594	.4065
6	4	.19610 [*]	.03568	.001	.0726	.3196
	7	-1.33448 [*]	.03568	.000	-1.4580	-1.2109
	9	.06753	.03568	.574	-.0560	.1911
	13	-2.44189 [*]	.03568	.000	-2.5654	-2.3184
	15	.22455 [*]	.03568	.000	.1010	.3481
	16	.47905 [*]	.03568	.000	.3555	.6026
	18	.47905 [*]	.03568	.000	.3555	.6026
7	4	1.53058 [*]	.03568	.000	1.4070	1.6541
	6	1.33448 [*]	.03568	.000	1.2109	1.4580
	9	1.40201 [*]	.03568	.000	1.2785	1.5255
	13	-1.10741 [*]	.03568	.000	-1.2309	-.9839
	15	1.55903 [*]	.03568	.000	1.4355	1.6826
	16					

	16	1.81353 [*]	.03568	.000	1.6900	1.9371
	18	1.81353 [*]	.03568	.000	1.6900	1.9371
9	4	.12857 [*]	.03568	.038	.0050	.2521
	6	-.06753	.03568	.574	-.1911	.0560
	7	-1.40201 [*]	.03568	.000	-1.5255	-1.2785
	13	-2.50942 [*]	.03568	.000	-2.6330	-2.3859
	15	.15702 [*]	.03568	.008	.0335	.2806
	16	.41152 [*]	.03568	.000	.2880	.5351
	18	.41152 [*]	.03568	.000	.2880	.5351
13	4	2.63799 [*]	.03568	.000	2.5145	2.7615
	6	2.44189 [*]	.03568	.000	2.3184	2.5654
	7	1.10741 [*]	.03568	.000	.9839	1.2309
	9	2.50942 [*]	.03568	.000	2.3859	2.6330
	15	2.66644 [*]	.03568	.000	2.5429	2.7900
	16	2.92094 [*]	.03568	.000	2.7974	3.0445
	18	2.92094 [*]	.03568	.000	2.7974	3.0445
15	4	-.02845	.03568	.991	-.1520	.0951
	6	-.22455 [*]	.03568	.000	-.3481	-.1010
	7	-1.55903 [*]	.03568	.000	-1.6826	-1.4355
	9	-.15702 [*]	.03568	.008	-.2806	-.0335
	13	-2.66644 [*]	.03568	.000	-2.7900	-2.5429
	16	.25450 [*]	.03568	.000	.1310	.3780
	18	.25450 [*]	.03568	.000	.1310	.3780
16	4	-.28295 [*]	.03568	.000	-.4065	-.1594
	6	-.47905 [*]	.03568	.000	-.6026	-.3555
	7	-1.81353 [*]	.03568	.000	-1.9371	-1.6900
	9	-.41152 [*]	.03568	.000	-.5351	-.2880
	13	-2.92094 [*]	.03568	.000	-3.0445	-2.7974

18	15	-.25450*	.03568	.000	-.3780	-.1310
	18	.00000	.03568	1.000	-.1235	.1235
	4	-.28295*	.03568	.000	-.4065	-.1594
	6	-.47905*	.03568	.000	-.6026	-.3555
	7	-1.81353*	.03568	.000	-1.9371	-1.6900
	9	-.41152*	.03568	.000	-.5351	-.2880
	13	-2.92094*	.03568	.000	-3.0445	-2.7974
	15	-.25450*	.03568	.000	-.3780	-.1310
	16	.00000	.03568	1.000	-.1235	.1235

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 37 แสดงสถิติ One-way anova ปริมาณ Cell uptake ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดกราโฟไลด์

ANOVA

uptake

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	100.473	5	20.095	814.392	.000
Within Groups	.296	12	.025		
Total	100.769	17			

ตารางที่ 38 แสดงสถิติ Post Hoc)tukey(ปริมาณ Cell uptake ของอนุภาคสูตรพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุตัวยาแอนโดกราโฟไลด์

Multiple Comparisons

Dependent Variable: uptake

Tukey HSD

(I) simple	(J) simple	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
5	7	2.11003 [*]	.12826	.000	1.6792	2.5408
	8	.29650	.12826	.261	-.1343	.7273
	13	2.11003 [*]	.12826	.000	1.6792	2.5408
	14	-.81091 [*]	.12826	.000	-1.2417	-.3801
	17	-4.90731 [*]	.12826	.000	-5.3381	-4.4765
7	5	-2.11003 [*]	.12826	.000	-2.5408	-1.6792
	8	-1.81353 [*]	.12826	.000	-2.2443	-1.3827
	13	.00000	.12826	1.000	-.4308	.4308
	14	-2.92094 [*]	.12826	.000	-3.3517	-2.4901
	17	-7.01734 [*]	.12826	.000	-7.4481	-6.5865
8	5	-.29650	.12826	.261	-.7273	.1343
	7	1.81353 [*]	.12826	.000	1.3827	2.2443
	13	1.81353 [*]	.12826	.000	1.3827	2.2443
	14	-1.10741 [*]	.12826	.000	-1.5382	-.6766
	17	-5.20381 [*]	.12826	.000	-5.6346	-4.7730
13	5	-2.11003 [*]	.12826	.000	-2.5408	-1.6792
	7	.00000	.12826	1.000	-.4308	.4308
	8	-1.81353 [*]	.12826	.000	-2.2443	-1.3827
	14	-2.92094 [*]	.12826	.000	-3.3517	-2.4901
	17	-7.01734 [*]	.12826	.000	-7.4481	-6.5865

14	5	.81091 [*]	.12826	.000	.3801	1.2417
	7	2.92094 [*]	.12826	.000	2.4901	3.3517
	8	1.10741 [*]	.12826	.000	.6766	1.5382
	13	2.92094 [*]	.12826	.000	2.4901	3.3517
	17	-4.09640 [*]	.12826	.000	-4.5272	-3.6656
17	5	4.90731 [*]	.12826	.000	4.4765	5.3381
	7	7.01734 [*]	.12826	.000	6.5865	7.4481
	8	5.20381 [*]	.12826	.000	4.7730	5.6346
	13	7.01734 [*]	.12826	.000	6.5865	7.4481
	14	4.09640 [*]	.12826	.000	3.6656	4.5272

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.