



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเตรียมและการประเมินพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุเคอเซตินโดยใช้ poloxamer 407 ที่ถูกคอนจูเกต

Preparation and evaluation of quercetin loaded polymeric micelle using poloxamer 407 conjugated

โดย

- | | | |
|-------------------|------------|---------------|
| 1. นสภ. ปาจริย์ | ศรีจันทร์ | รหัส 60210050 |
| 2. นสภ. ภคกุล | วิเชียรสาร | รหัส 60210063 |
| 3. นสภ. นิสารัตน์ | วัชรสินธุ์ | รหัส 60210196 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ก

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเตรียมและการประเมินพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุเคอร์เซตินโดยใช้ poloxamer 407 ที่ถูกคอนจูเกต

Preparation and evaluation of quercetin loaded polymeric micelle using poloxamer 407 conjugated

โดย

- | | | |
|-------------------|------------|---------------|
| 1. นสภ. ปาจริย์ | ศรีจันทร์ | รหัส 60210050 |
| 2. นสภ. ภคกุล | วิเชียรสาร | รหัส 60210063 |
| 3. นสภ. นิสารัตน์ | วัชรสินธุ์ | รหัส 60210196 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

จากอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งของประชากรไทยมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นสาเหตุการเสียชีวิต 3 อันดับแรกของประเทศในกลุ่มโรคไม่ติดต่อ และพบว่าโรคมะเร็งตับมีอัตราการเสียชีวิตมากที่สุดจากมะเร็งทุกชนิด ปัจจุบันการใช้สารสกัดจากสมุนไพรในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษาโรคมะเร็ง แต่ยังพบปัญหาในเรื่องของความสามารถในการละลายน้ำได้น้อยและไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยา เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ผื่นแดง โลหิตจาง เจ็บปากและคอ จึงมีการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ polymeric micelle เพื่อช่วยเพิ่มค่าการละลาย และหลีกเลี่ยงการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน แต่เนื่องจาก polymeric micelle ยังไม่สามารถนำส่งยาให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งได้ จึงมีการดัดแปลงโครงสร้างของ polymeric micelle โดยนำไปคอนจูเกตกับ folic acid เนื่องจาก folic acid มีความสามารถในการจับกับ receptor บนเซลล์มะเร็งได้ จึงทำให้มีการนำส่งยาได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น โดยคณะผู้จัดทำหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์และสามารถนำไปต่อยอดงานด้านอื่นต่อไปในอนาคตได้

คณะผู้จัดทำ

นสภ. ปาจริย์ ศรีจันทร์ รหัส 60210050

นสภ. ภคกุล วิเชียรสาร รหัส 60210063

นสภ. นิศารัตน์ วัชรสินธุ รหัส 60210196

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การเตรียมและการประเมินพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุเคอเซตินโดยใช้ Poloxamer 407 ที่ถูก
คอนจูเกต

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|-------------------|------------|---------------|
| 1. นสภ. ปาจริย์ | ศรียันตร์ | รหัส 60210050 |
| 2. นสภ. ภคกุล | วิเชียรสาร | รหัส 60210063 |
| 3. นสภ. นิศารัตน์ | วัชรสินธุ์ | รหัส 60210196 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง
2. ญญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาเคอเซตินโดยใช้พอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ประกอบด้วย poloxamer 407 และ folic acid รวมถึงเพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาโดยใช้ folic acid มาทำให้ออกฤทธิ์ที่เซลล์มะเร็งได้จำเพาะ การนำพอลิเมอร์ไมเซลล์มาใช้เพื่อเพิ่มความสามารถในการนำส่งยาที่ละลายน้ำได้น้อย, เพิ่มค่าการละลายและการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เมื่อใช้ในการนำส่งยาต้านมะเร็ง โดยช่วยปกป้องไม่ให้ยาถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ในงานวิจัยนี้จะทำการใช้สาร folic acid (FA) ที่ช่วยให้ไปจับกับ receptor บนเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะเจาะจงและลดผลข้างเคียงจากยาโดยทำการสังเคราะห์ folic acid ร่วมกับ poloxamer 407 จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค TLC, SEM และ UV-vis พบว่าคุณสมบัติของสารมีการเปลี่ยนไปจากสารตั้งต้นและได้วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดคอนจูเกตของ folic acid มีค่าเท่ากับ 2.12 ± 0.26 % ซึ่งในการศึกษาการพัฒนาระบบนำส่งยาระบบนาโนแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ได้ทำการเปรียบเทียบ poloxamer 407 ทั้ง 5 ความเข้มข้น (100, 200, 500, 750 และ 1000 mg) โดยพิจารณาเลือกสูตรตำรับจากปัจจัยทางกายภาพ, ขนาดอนุภาค, zeta potential และความสามารถในการกักเก็บยา พบว่า poloxamer 407 ที่ความเข้มข้น 500 mg มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็นอนุภาคและสามารถบรรจุยาเคอเซตินได้ดี (ขนาดอนุภาค 91.43 ± 59.51 nm, zeta potential -13.53 ± 4.86 และความสามารถในการกักเก็บยา $74.37 \pm 17.72\%$ ตามลำดับ) ดังนั้นจึงนำมา

พัฒนาต่อโดยทำการบรรจุตัวคอนจูเกตระหว่าง poloxamer 407-folic acid เข้าไป (500:50, 500:100 และ 500:150 mg ตามลำดับ) พบว่าสูตรตำรับที่ประกอบด้วย poloxamer 407-folic acid conjugate (500:100 mg) เป็นสูตรตำรับที่ดีที่สุดทั้งก่อนและหลังบรรจุยาสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนพอลิเมอร์ไมเซลล์ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาและใช้เป็นระบบนำส่งยาได้ในอนาคต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2021

: Preparation and evaluation of quercetin loaded polymeric micelle using poloxamer 407 conjugated

By 1. Miss Pajaree Srichan ID 60210050
 2. Miss Pakakul Wichiansan ID 60210063
 3. Miss Nisarath Watcharasin ID 60210169

Advisor:

1. Assist. prof. Watcharaphong Chaemsawang, Ph.D.
2. Putthiporn Khongkaew, Ph.D.

ABSTRACT

The objective of study was to develop a drug delivery system as polymeric micelle for quercetin that was prepared from poloxamer 407 with folic acid and to develop a drug delivery system by using folic acid for improving specificity towards cancer cells. Using polymeric micelle to enhance solubilization of poor water-soluble drugs and further to improve its solubility. It also inhibits cancer cells when using this drug delivery for cancer treatment and protects drugs from immune systems. In this study, we used folic acid for binding with a receptor on cancer cells and reducing side effects from the drug by synthesizing folic acid with poloxamer.

The synthesized polymer was then analyzed by TLC, SEM and UV-vis techniques. It was found that the properties of the substance changed from the substrate and the percentage of folic acid conjugate was analyzed at $2.12 \pm 0.26\%$.

In this study, we developed polymeric micelle nanotechnology for drug delivery system comparison of 5 concentration of poloxamer 407 (100, 200, 500, 750 and 1,000 mg). A master formula is selected from the factors of its physical properties,

particle size, zeta potential, and entrapment. The results showed that Poloxamer 407 concentration 500 mg have the property of preparation for particles and the property of good for loading quercetin (size 91.43 ± 59.51 nm, zeta potential -13.53 ± 4.86 and % EE $74.37 \pm 17.72\%$, respectively). Therefore, they were used to develop further by containing 3 concentrations of Poloxamer 407 - folic conjugate (500:50, 500:100 and 500:150 mg, respectively). The formulation consisting of Poloxamer 407 conjugated folic acid (500 mg :100 mg) was the best formulation that can be formed both before and after loading the drug for polymeric micelle nanoparticle that can be developed and used as a drug delivery system in the future.

Major advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง และ ภญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่คอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยและเอื้อเฟื้อสถานที่เครื่องมือรวมถึงอุปกรณ์ในการทำโครงการวิจัยและขอขอบพระคุณพี่น้องวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

นสภ. ปาจริย์ ศรีจันทร์ รหัส 60210050

นสภ. ภคกุล วิเชียรสาร รหัส 60210063

นสภ. นิศารัตน์ วัชรสินธุ รหัส 60210196

สารบัญ

คำนำ.....	ข
บทคัดย่อ.....	ค
ABSTRACT.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
สมมติฐาน	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
กรอบแนวคิด.....	3
บทที่ 2	4
มะเร็ง	4
Phenolic compounds.....	6
Polymeric micelle.....	10
Poloxamer.....	12
Folic acid	15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
บทที่ 3	19

วัตถุดิบและสารเคมี.....	19
เครื่องมือที่ใช้.....	19
วิธีดำเนินวิจัย	20
บทที่ 4	24
ศึกษาผลการสังเคราะห์การ conjugate ระหว่าง Poloxamer407 และ Folic acid โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR, TLC, SEM และ UV -visible.....	24
ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelle ที่มีส่วนประกอบของ Poloxamer407 (P407)	
29	
ศึกษาผลของ polymeric micelle ที่ประกอบด้วย P407 และ P407 - FA conjugate	34
ศึกษาผลของ poloxamer 407 และ poloxamer 407 ที่คอนจูเกตกับ folic acid และการบรรจุยาเคอเซติน.....	36
บทที่ 5	38
สรุปผลการวิจัย	38
บรรณานุกรม.....	40
ภาคผนวก.....	43

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle	29
ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ % Entrapment ของ polymeric micelle	31
ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % Entrapment ของ P407 - FA conjugate	34
ตารางที่ 4 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ P407 และ P407 - FA conjugate	36

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย	3
รูปที่ 2 อัตราการเสียชีวิตอย่างหยาบจากโรคไม่ติดต่อที่สำคัญต่อประชากรแสนคน ปีพ.ศ. 2557-2561.....	4
รูปที่ 3 แผนภาพของ MULTI-STAGE CARCINOGENESIS.....	5
รูปที่ 4 วงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง	6
รูปที่ 5 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (FLAVONOIDS)	7
รูปที่ 6 ตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (FLAVONOIDS).....	8
รูปที่ 7 โครงสร้างของเคอซีติน (QUERCETIN).....	9
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของ POLOXAMER	12
รูปที่ 9 TYPICAL POLOXAMER GRADES	12
รูปที่ 10 USES OF POLOXAMER.....	13
รูปที่ 11 ค่าการละลายของ POLOXAMER	14
รูปที่ 12 กระบวนการเอนโดไซโทซิสยาผ่านตัวรับโฟเลต	16
รูปที่ 13 สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยา ESTERIFICATION ระหว่าง POLOXAMER 407 และ FOLIC ACID. 20	
รูปที่ 14 FTIR ของ FOLIC ACID	24
รูปที่ 15 FTIR ของ POLOXAMER 407.....	25
รูปที่ 16 FTIR ของ POLOXAMER 407-FOLIC ACID CONJUGATE.....	25
รูปที่ 17 การทดสอบเอกลักษณ์ด้วย TLC.....	26
รูปที่ 18 FOLIC ACID.....	27
รูปที่ 19 POLOXAMER 407.....	27
รูปที่ 20 P407 - FA CONJUGATE.....	28
รูปที่ 21 แสดงขนาดอนุภาคของ POLYMERIC MICELLE ที่เตรียมจาก POLOXAMER 407 ขนาดต่างๆโดยมีค่า *P<0.05 เมื่อเทียบกับ POLOXAMER 407 750 MG, 1000 MG.....	29
รูปที่ 22 แสดง ZETA POTENTIAL ของ POLYMERIC MICELLE ที่เตรียมจาก POLOXAMER ขนาดต่างๆโดยมี**P<0.05 เมื่อเทียบกับ POLOXAMER 407 500 MG, 750 MG, 1000 MG	30
รูปที่ 23 ลักษณะทางกายภาพของกลุ่มที่มี POLOXAMER 407 ; POLOXAMER 407 100 MG (A), POLOXAMER 407 200 MG (B), POLOXAMER 407 500 MG(C), POLOXAMER 407 750 MG (D), POLOXAMER 407 1,000 MG (E)	30

รูปที่ 24 แสดงขนาดอนุภาคของ POLYMERIC MICELLE ที่เตรียมจาก POLOXAMER 407 ขนาดต่างๆ ที่	
LOAD ยาเคอเซติน	32
รูปที่ 25 แสดง ZETA POTENTIAL ของ POLYMERIC MICELLE ที่เตรียมจาก POLOXAMER 407 ขนาดต่างๆ ที่	
LOAD ยาเคอเซติน	32
รูปที่ 26 แสดง % ENTRAPMENT ของ POLYMERIC MICELLE ที่เตรียมจาก POLOXAMER 407 ขนาดต่างๆ ที่	
LOAD ยาเคอเซติน	33
รูปที่ 27 แสดงลักษณะทางกายภาพของ POLYMERIC MICELLE โดยเตรียมจาก POLOXAMER 407 ที่	
บรรจุยาเคอเซติน (A, B, C, D และ E คือ POLOXAMER 407 ปริมาณ 100 , 200 , 500 , 750 และ	
1000 MG ตามลำดับ).....	33
รูปที่ 28 แสดงขนาดของอนุภาคที่เตรียมจาก P407 - FA CONJUGATE ขนาด 50, 100 และ 150 MG	35
รูปที่ 29 แสดง ZETA POTENTIAL ที่เตรียมจาก P407 - FA CONJUGATE ขนาด 50,100 และ 150 MG.	35
รูปที่ 30 ลักษณะทางกายภาพของกลุ่มที่มี POLOXAMER 407 : P407 - FA CONJUGATE โดย P407 :	
P407 - FA CONJUGATE 500 MG : 50 MG (A), P407 : P407 - FA CONJUGATE 500 MG : 100	
MG (B), P407 : P407 - FA CONJUGATE 500 MG : 150 MG (C).....	36
รูปที่ 31 ลักษณะทางกายภาพของกลุ่มที่มี POLOXAMER 407 : P407 - FA CONJUGATE ที่บรรจุยาเคอ	
เซติน (500 MG : 100 MG : 5 MG)	37

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งถือเป็นโรคที่พบได้มากเป็นอันดับต้น ๆ ของประชากรไทย และนับว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของไทย อุบัติการณ์ภาพรวมของประเทศยังคงสูงและมะเร็งบางชนิดมีแนวโน้มสูงขึ้นจากการรายงานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) พบประชากรทั่วโลกเสียชีวิตจากโรคมะเร็งไม่ติดต่อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยโรคมะเร็งเป็นสาเหตุที่ทำให้เสียชีวิตเป็นอันดับสองมีผู้เสียชีวิต 9.0 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 22¹ จากการรายงานข้อมูลของกองยุทธศาสตร์และแผนงานสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ระหว่างปีพ.ศ. 2557-2561 พบอัตราการเสียชีวิตอย่างหยาบอันมีสาเหตุมาจากโรคมะเร็งไม่ติดต่อที่สำคัญ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในประชากรไทย โดยในปีพ.ศ. 2561 โรคมะเร็งไม่ติดต่อที่เป็นสาเหตุการตาย 3 อันดับแรก ได้แก่ โรคมะเร็งรวมทุกประเภท รองลงมาคือ โรคหลอดเลือดสมอง และโรคหัวใจขาดเลือดคิดเป็นอัตราการเสียชีวิตเท่ากับ 12.33, 47.1 และ 31.8 ต่อประชากรแสนคนตามลำดับ¹ ซึ่งสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง การใช้ชีวิตที่เปลี่ยนไปของประชาชน ชนิดของโรคมะเร็งที่พบบ่อยในแต่ละประเทศไม่เหมือนกันเนื่องจากประชาชนมีการติดเชื่อที่แตกต่างกัน ได้รับรังสี หรือสารเคมี พฤติกรรมการบริโภคอาหาร รวมไปถึงคุณสมบัติทางพันธุกรรม และวิธีการดำเนินชีวิต และอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน การเกิดมะเร็งประกอบด้วยหลายขั้นตอน (Multi stage carcinogenesis) ได้แก่ initiation, promotion, progression ซึ่งในการรักษามะเร็งเป็นการรักษาแบบผสมผสานประกอบด้วยศัลยกรรม รังสีรักษา เคมีบำบัด ฮอร์โมน การรักษาแบบมุ่งเป้าและการรักษาโดยการเพิ่มภูมิคุ้มกันเพื่อรักษามะเร็ง ซึ่งการเลือกวิธีการรักษานั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละบุคคล ในขณะที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษามาก่อนการรักษามะเร็ง สิ่งที่ผู้ป่วยต้องเผชิญได้แก่ อาการและความรุนแรงของโรคที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา² ในปัจจุบันมีการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งหลายชนิดทั้งจากการสังเคราะห์ และจากธรรมชาติ อย่างเช่น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นต้น

ฟลาโวนอยด์เป็นสารเมตาบอไลต์ชั้นทุติยภูมิจากธรรมชาติในกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenolic compounds) สามารถพบได้ในอาหารได้ เช่น ผัก ผลไม้และเครื่องดื่มบางชนิด ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฟลาโวนอยด์ในการนำมาเป็นยารักษาโรคได้หลายอย่างเช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ เป็นต้น การนำสารสกัดฟลาโวนอยด์มาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งออกฤทธิ์ผ่านการเกิดอะพอพโตซิสของเซลล์ การยับยั้งวัฏจักรของเซลล์และยับยั้งการพัฒนาและความรุนแรงของโรคมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับนิวเคลียร์แฟกเตอร์ แคปปา บี นิวเคลียร์แฟกเตอร์ แคปปา บี (NFKB)³ โดยสารต้นแบบที่เลือกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ เคอเซติน (Quercetin) ซึ่งเป็นสารหนึ่งในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เนื่องจากมีฤทธิ์ทาง เภสัชวิทยาที่โดดเด่น เช่น ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant), ต้านพิษ (Antitoxic) และต้านมะเร็ง (Anticancer) ซึ่งงานวิจัยนี้สนใจฤทธิ์ทางต้านมะเร็งของเคอเซติน เนื่องจากมีกลไกในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Anti-proliferative) ได้หลายชนิด แต่เคอเซตินยังมีข้อจำกัด คือ ความสามารถในการละลายน้ำที่ไม่ดี มีความเสถียรต่ำเมื่ออยู่ในร่างกาย มีค่าการละลายเพียงแค่ 60 mg/L และมีค่า logP เท่ากับ 1.5⁴ จึงทำให้การดูดซึมเข้าสู่ร่างกายลดลงส่งผลต่อค่าชีวประสิทธิผล (Bioavailability) ที่ลดลงเช่นกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบนำส่งยาเพื่อช่วยเพิ่มการละลาย แต่อย่างไรก็ตามระบบนำส่งก็ยังมีปัญหาความไม่จำเพาะกับเซลล์มะเร็ง จึงทำให้เกิดงานวิจัยในครั้งนี้ เพื่อที่จะแก้ไขข้อจำกัดในเรื่องการละลายของเคอเซตินและนำส่งยาไปสู่เป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง⁵ เพื่อลดอาการข้างเคียงและพิษที่เกิดจากการใช้ยา โดยระบบนำส่งที่ทางผู้วิจัยเลือกมาใช้ในการครั้งนี้คือระบบ polymeric micelle เพราะ polymeric micelle ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยเพื่อนำส่งยาหลายชนิดโดยเฉพาะยาที่สามารถละลายน้ำได้น้อยสามารถก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้ด้วยตนเองเช่นเดียวกับไมเซลล์ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวโดยจะกักเก็บยาละลายน้ำได้น้อยไว้บริเวณแกนกลางในอนุภาค มีรายงานว่า polymeric micelle สามารถเพิ่มค่าการละลายและการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เมื่อใช้ในการนำส่งยาด้านมะเร็ง⁶ โดยช่วยปกป้องไม่ให้ยาถูกทำลายได้ง่ายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก และหลีกเลี่ยงการถูกกำจัด (Capture) หรือจับกลืนกิน (Opsonization) โดยระบบภูมิคุ้มกัน reticuloendothelial system (RES) ในร่างกาย ทำให้อยู่ในกระแสเลือดได้นาน⁷ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ระบบ polymeric micelle ยังมีข้อจำกัดคือ ยังไม่มีความจำเพาะกับเซลล์เป้าหมายอย่างเช่นเซลล์มะเร็ง ทางผู้วิจัยจึงพัฒนาระบบ polymeric micelle ให้อยู่ในรูป drug targeting โดยทำการสังเคราะห์สายพอลิเมอร์กับ ligand ที่เป็นสารเป้าหมายของเซลล์มะเร็ง ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการใช้สาร folic acid (FA) ซึ่งมีรายงานว่า การนำ P407 มา conjugate กับ folic acid ทำให้สามารถไปจับกับ folate receptor บนเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะเจาะจงต่อเป้าหมายและส่งผลให้อาการข้างเคียงจากยามะเร็งลดลงได้⁸

ดังนั้น วัตถุประสงค์ในงานวิจัยในครั้งนี้คือการพัฒนาาระบบนำส่ง polymeric micelle โดยใช้ poloxamer 407 ร่วมกับ poloxamer 407 ที่ถูก conjugated กับ folic acid เพื่อนำส่งยาเคอเซตินไปยัง เซลล์มะเร็งเป้าหมาย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาาระบบนำส่งยาโดยใช้โพลิเมอร์ไมเซลล์ที่ประกอบด้วย poloxamer และ folic acid
2. เพื่อพัฒนาาระบบนำส่งยาโดยใช้ folic acid มาทำให้ออกฤทธิ์ที่เซลล์มะเร็งได้จำเพาะ

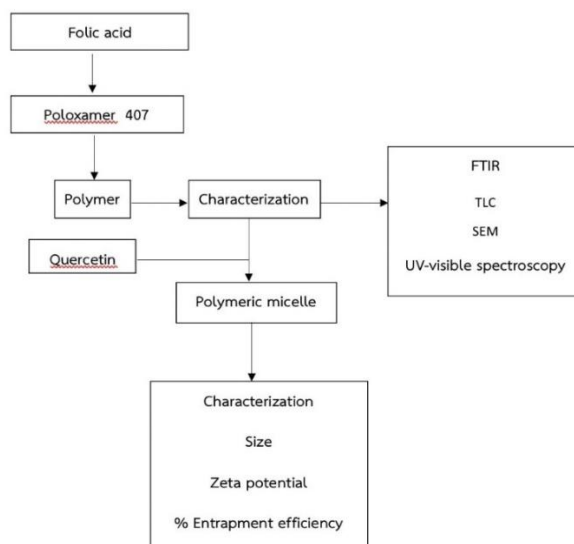
สมมติฐาน

1. Folic acid สามารถเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการนำส่งเซลล์มะเร็งได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พัฒนาระบบนำส่งยาให้จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากยิ่งขึ้น
2. ได้ผลิตภัณฑ์อนุภาคที่บรรจุสารสกัดเคอเซตินซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

กรอบแนวคิด



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

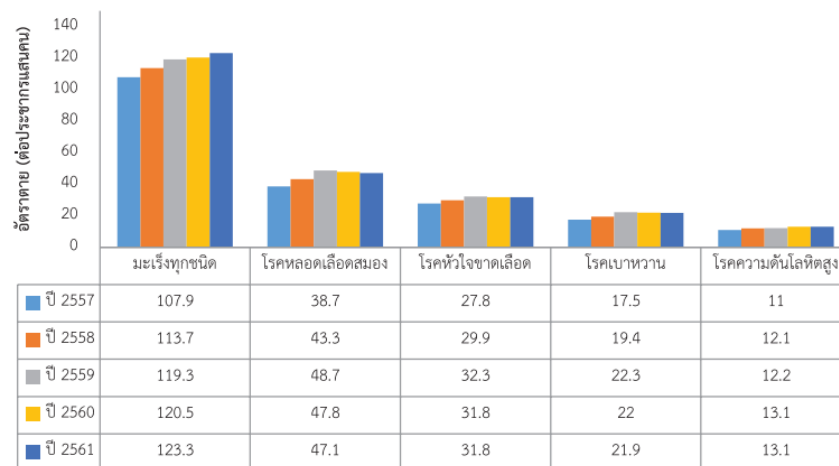
บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. มะเร็ง

1.1 อุบัติการณ์การเกิดมะเร็ง

โรคมะเร็งถือเป็นโรคที่พบได้มากเป็นอันดับต้น ๆ ของประชากรทั่วโลก จากรายงานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) ในปี พ.ศ. 2559 พบประชากรทั่วโลกเสียชีวิตจากโรคไม่ติดต่อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยโรคมะเร็งเป็นสาเหตุที่ทำให้เสียชีวิตเป็นอันดับสองที่มีผู้เสียชีวิตถึง 9.0 ล้านคน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 22 จากการรายงานข้อมูลของกองยุทธศาสตร์และแผนงานสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ระหว่างปีพ.ศ. 2557-2561 พบอัตราการเสียชีวิตอย่างหยาดอันมีสาเหตุมาจากโรคไม่ติดต่อที่สำคัญ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในประชากรไทย โดยในปีพ.ศ. 2561 โรคไม่ติดต่อที่เป็นสาเหตุการตาย 3 อันดับแรกได้แก่ โรคมะเร็งรวมทุกประเภท รองลงมาคือ โรคหลอดเลือดสมอง และโรคหัวใจขาดเลือดคิดเป็นอัตราการเสียชีวิตเท่ากับ 123.3, 47.1 และ 31.8 ต่อประชากรแสนคนตามลำดับ¹



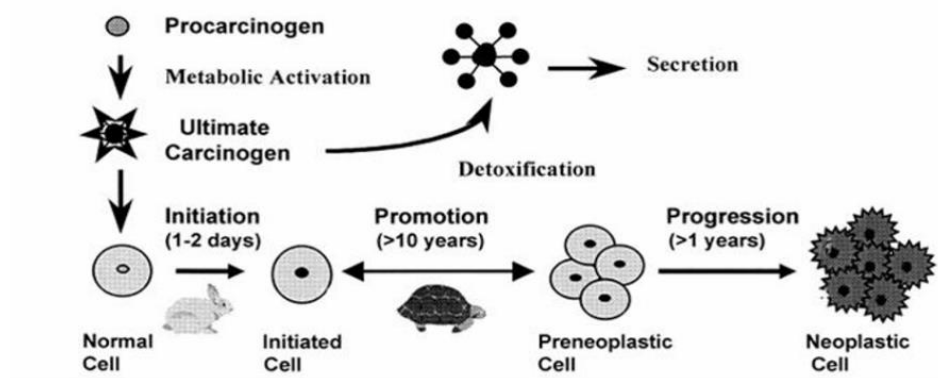
รูปที่ 2 อัตราการเสียชีวิตอย่างหยาดจากโรคไม่ติดต่อที่สำคัญต่อประชากรแสนคน ปีพ.ศ. 2557-2561

1.2 มะเร็ง⁹

มะเร็งหรือเนื้องอกชนิดร้ายแรง เกิดจากความผิดปกติของการแบ่งตัวของเซลล์ ร่างกายสามารถกลูกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ผ่านทางระบบเลือดหรือระบบน้ำเหลือง ส่งผลให้เกิดความผิดปกติได้ทั้งแบบเฉพาะที่และแบบทั่วร่างกาย มะเร็งเกิดจากปัจจัยเสี่ยงหลากหลาย (Multifactorial processes) ไม่ว่าจะเป็น อายุ แสงแดด รังสีอัลตราไวโอเลต สารเคมีเชื้อไวรัส รวมไปถึงความผิดปกติจากการซ่อมแซม DNA หรือเกิดความผิดปกติของ DNA damage มากเกินไป

1.3 กลไกการเกิดมะเร็ง⁹

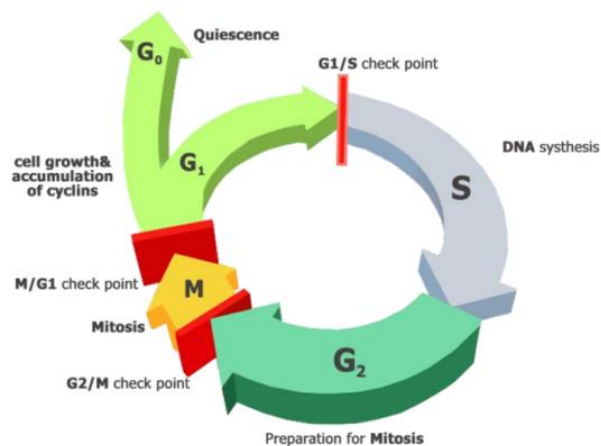
การเกิดมะเร็งประกอบด้วยหลายขั้นตอน (Multi-stage carcinogenesis) ได้แก่ initiation, promotion และ progression



รูปที่ 3 แผนภาพของ multi-stage carcinogenesis

1.4 วงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง¹⁰

วงจรชีวิตของเซลล์โดยทั่วไปจะมี 4 ระยะ คือระยะ G1 ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้น โดยมีการเจริญเติบโตของเซลล์เกิดขึ้น ในระยะ S จะเป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอชุดใหม่ขึ้นมา ระยะ G2 เป็นขั้นตอนที่เซลล์เตรียมการแบ่งตัว และในระยะ M จะเกิดการแบ่งเซลล์ โดยเซลล์ปกติจะมีกลไกคอยควบคุมให้มีจำนวนเซลล์อยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยมีกลุ่มยีน oncogene ที่มีหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและควบคุมการแบ่งเซลล์เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตายไป และมีกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene) ทำหน้าที่ในการหยุดยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S ถ้ามีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นกับกลุ่มยีนเหล่านี้ อาจส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือการแบ่งเซลล์แบบควบคุมไม่ได้จนเจริญมากผิดปกติและกลูกลามไปบริเวณข้างเคียงและยังสามารถกระจายเข้าสู่กระแสเลือดและต่อมน้ำเหลืองอีกทั้งกระจายไปสู่อวัยวะที่อยู่ห่างออกไปได้อีก



รูปที่ 4 วงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง

2. Phenolic compounds

2.1 Phenolic compounds⁹

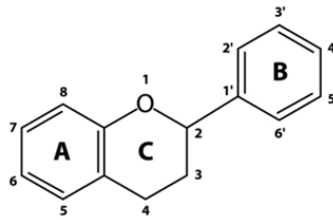
Phenolic compounds คือสารที่สูตรโครงสร้างมี OH group บน aromatic ring ตั้งแต่ 1 กลุ่มขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติที่จะละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผักและผลไม้ทั่วไป อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม

1. Simple phenols/phenolic acid และอนุพันธ์ เช่น gallic acid, ellagic acid, tannic acid, vanillin, catechol, resorcinol และ salicylic acid เป็นต้น

2. Phenylpropanoids ได้แก่ phenolic compound ที่ aromatic ring มี three-carbon side chain เกาะอยู่ แบ่งได้หลายกลุ่มได้แก่ hydroxycinnamic acids (ferulic acid, caffeic acid หรือ coumaric acid), coumarins (umbelliferone, scopoletin, aesculetin หรือ psoralen), lignans (pinoresinol, eugenol หรือ myristicin)

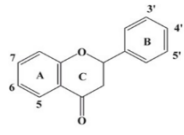
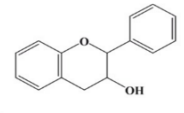
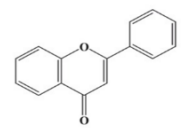
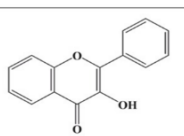
3. Flavonoids เป็นกลุ่มสำคัญของ phenolic compounds จะได้แก่สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น C₆-C₃-C₆ แบ่งได้เป็นหลายกลุ่มได้แก่ catechins, proanthocyanins, anthocyanidins, flavones, flavonols, flavonones และ isoflavones

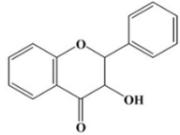
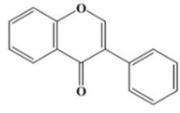
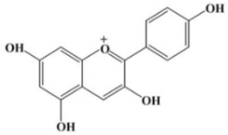
มีรายงานถึงฤทธิ์ของ phenolic compounds อย่างมากมายรวมทั้งฤทธิ์ต้านมะเร็ง เชื่อว่าฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารในกลุ่มนี้จะเกิดจาก multifunctional activities ซึ่งทราบกันดีว่ากลไกต่างๆเหล่านี้มีส่วนในกระบวนการก่อมะเร็ง

2.2 Flavonoids³

รูปที่ 5 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (Phenylbenzopyrones) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว (C6-C3-C6) เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (Benzene ring) 2 วง (A และ B) เชื่อมต่อกับวงแหวนไพแรน (Heterocyclic pyran ring) ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐาน ได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่

สูตรโครงสร้าง	ตัวอย่าง ฟลาโวนอยด์	หมู่แทนที่					
		5	6	7	3'	4'	5'
 ฟลาโวนอน	ฮิโรดิคทีฮอล	OH	H	OH	OH	OH	H
	เฮสเพอริดิน	OH	H	OH	OH	OCH	H
	นารินจีนิน	OH	H	OH	H	OH	H
 ฟลาโวนอล	แคทีชิน	H	H	H	H	H	H
	แกลโลแคทีชิน	H	H	H	OH	OH	OH
 ฟลาโวน	ฮาพิจีนิน	OH	H	OH	H	OH	H
	โครซิน	OH	H	OH	H	H	H
	ลูติโอลิน	OH	H	OH	OH	OH	H
 ฟลาโวนอล	แคมป์เฟอรอล	OH	H	OH	H	OH	H
	ไมริซิดิน	OH	H	OH	OH	OH	OH
	เคอร์ซีดิน	OH	H	OH	OH	OH	H

สูตรโครงสร้าง	ตัวอย่าง ฟลาโวนอยด์	หมู่แทนที่					
		5	6	7	3'	4'	5'
 ฟลาวาโนนอล	แทนซิโพลิน	OH	H	OH	OH	OH	H
 ไอโซฟลาโวน	เดดซีน	H	H	OH	H	OH	H
	จีนิตซีน	OH	H	OH	H	OH	H
	ไกลซิซีน	OH	OCH	OH	H	OH	H
	ฟอร์โมโนเนดิน	H	H	OH	H	OCH	H
 แอนโธไซยานิดิน	เดลฟิไดน	OH	H	OH	OH	OH	OH
	ไซยานิดิน	OH	H	OH	OH	OH	H
	มาลวิดิน	OH	H	OH	OCH	OH	OCH ₃
	พีไอนิดิน	OH	H	OH	OCH	OH	H
	พิลาโรนิน	OH	H	OH	H	OH	H
	พิทุนิน	OH	H	OH	OH	OH	OCH ₃

รูปที่ 6 ตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

2.2.1 Flavanone เช่น Hesperetin, Naringenin

2.2.2 Flavanols เช่น Epicatechin, Epigallocatechin Gallate (EGCG)

2.2.3 Flavonol เช่น Quercetin, Kaempferol, Fisetin, Myricetin, Galangin, Casticin (vitexicarpin)

2.2.4 Flavones เช่น Apigenin, Chrysin, Luteolin, Baicalein, Tangeretin, Acacetin, Flavopiridol/Alvolidib, Wogonin, Eupatorin

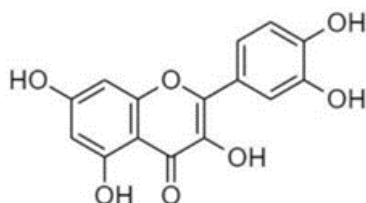
2.2.5 Anthocyanidins เช่น Cyanidin, Pelargonidin, Delphinidin,

2.2.6 Isoflavonoids เช่น Genistein, Daidzein

2.2.7 Flavanonols เช่น Taxifolin

ซึ่ง flavonoid มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ด้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ด้านการเกิดมะเร็ง (Anticancer) ยับยั้งการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Antiproliferation) ด้านการอักเสบ (Antiinflammation) ฤทธิ์ปรับการทำงานของภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation) รวมถึงการยับยั้งการพัฒนาและความรุนแรงของโรคมะเร็ง เช่น การแพร่กระจาย (Metastasis) การสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) การอักเสบที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง (cancer-related Inflammation) และการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็ง (Multidrug resistance)⁹

2.3 Quercetin



รูปที่ 7 โครงสร้างของเคอซีติน (Quercetin)

เคอซีติน (Quercetin) (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบในอาหาร ผัก ผลไม้หลากหลายชนิดอยู่ในรูป glycoside เช่น หัวหอม, บร็อคโคลี่ และใส่ลงในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อใช้ป้องกันหรือรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น มะเร็ง โดยมีงานวิจัยมากมายยืนยันว่าการใช้ของเคอซีตินในแต่ละขนาดมี biological functions ที่แตกต่างกัน เช่น anti-inflammatory, anti-oxidant และ anti-cancer¹¹

โดยคุณสมบัติของเคอซีตินคือละลายน้ำได้น้อย, ชีวประสิทธิผลต่ำ (Bioavailability), ไม่คงตัวและมีค่าครึ่งชีวิตที่สั้นซึ่งอาจจะเป็นการลดประสิทธิภาพในการรักษาเมื่อใช้ในการทำเภสัชภัณฑ์ และมีความ lipophilic สามารถละลายใน Ethanol (4 mg/ml, 37 °C) ได้ระดับปานกลาง ละลายใน dimethyl sulfoxide (150 mg/ml, 25 °C) ได้ระดับสูง อย่างไรก็ตามสามารถละลายในน้ำประมาณ 0.01 mg/ml (25 °C) จึงทำให้ยากแก่การทำผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบปริมาณมาก¹² แต่ถ้ามีการคอนจูเกตให้อยู่ในรูป quercetin glycoside จะมีการดูดซึมที่เพิ่มขึ้น

เคอเซตินมีประโยชน์ต่อการรักษาโรคมะเร็งเนื่องจากขนาดการรักษาที่เหมาะสมของเคอเซตินจะไม่เกิดพิษต่อเซลล์ปกติ งานวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจต่อฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ซึ่งมีกลไกในการป้องกันวงจรของเซลล์, การเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส ยับยั้ง angiogenesis และ metastasis ในการทดลอง in vitro ส่วนในการทดลอง in vivo มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ xenograft tumor¹¹

3. Polymeric micelle^{6, 7, 13, 14}

พอลิเมอร์ไมเซลล์ (Polymeric Micelle) เป็นระบบนำส่งยาอนุภาคระดับนาโนสามารถเตรียมได้จากการใช้พอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นแอมฟิฟิลิกมีทั้งชนิดบล็อกโคพอลิเมอร์ (Block copolymer) หรือ กราฟท์โคพอลิเมอร์ (Graft copolymer) พอลิเมอร์จะเกิดการเรียงตัวของโมเลกุลขึ้นได้เองเมื่อถึงจุด Critical micelle concentration (CMC) จะเกิดเป็นพอลิเมอร์ไมเซลล์ มีโครงสร้างเป็นสองส่วนคือ ส่วนแกนชั้นใน (Inner core) เป็นส่วนไม่ชอบน้ำหรือไม่มีขั้วจะกักเก็บยาที่ละลายน้ำไม่ได้เอาไว้ สามารถเพิ่มการละลายของยา และส่วนแกนชั้นนอก (Outer core) เป็นส่วนชอบน้ำหรือมีขั้ว คอยป้องกันไม่ให้ยาถูกทำลายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ไมเซลล์กับไมเซลล์ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวพบว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์มีค่า CMC ต่ำกว่าและมีความเสถียรทางจลนศาสตร์ที่มากกว่าจึงถูกทำลายได้ช้ากว่าและมีความเป็นพิษต่ำกว่าไมเซลล์ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิว

3.1 วิธีการเตรียมบรรจุยาใน polymeric micelle

3.1.1 Direct dissolution

วิธีนี้เป็นการนำยาและโคพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้มาละลายในสารละลายน้ำ ยาที่เติมเข้าไปจะไปอยู่ในไมเซลล์โดยใช้อุณหภูมิต่ำหรือใช้แรงในการผสม วิธีนี้มีข้อเสียคือ ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาค่ำ

3.1.2 Dialysis

ละลายโคพอลิเมอร์และยาในสารละลายอินทรีย์จนเกิดไมเซลล์ การกระจายของขนาดไมเซลล์จะขึ้นกับวิธีที่ใช้ในการกำจัดสารละลาย ใช้กับโคพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำไม่ได้ สามารถใช้วิธีนี้เมื่อสารละลายอินทรีย์เข้ากันได้กับน้ำ หลังจากที่กำลังสารละลายออกแก๊สนิคยาจะถูกเก็บรวมไว้ในไมเซลล์ วิธีการนี้ต้องการความคงตัวของบล็อกโคพอลิเมอร์ในตัวทำละลายชนิดอินทรีย์และมีความยากในการกำจัดยาอิสระและตัวทำละลายอินทรีย์

3.1.3 Evaporation or film method

ละลายยาและโคพอลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยง่าย เมื่อตัวทำละลายระเหยไปแล้วจะเกิดฟิล์มบางๆ ขึ้นจากนั้นเติมน้ำแล้วคนหรือใช้คลื่นเสียงเพื่อลดขนาดและเกิดเป็นไมเซลล์ ใช้กับโคพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้น้อยและวิธีนี้สามารถบรรจุยาได้มากและมีประสิทธิภาพในการกักเก็บยาสูง ข้อเสียคือ ใช้กับพอลิเมอร์ที่มีค่า HLB ต่ำ

3.1.4 Freeze-drying

ละลายยาและโคพอลิเมอร์ในตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและสารละลายอินทรีย์ เช่น tert-butanol (TBA) จากนั้นเติมน้ำหรือบัฟเฟอร์ไปในผงแห้งแช่แข็งเพื่อให้เกิดเป็นไมเซลล์ ข้อเสียคือ ตัวทำละลายอินทรีย์ตกค้างในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย

3.1.5 Microphase separation

ละลายยาที่ไม่ละลายน้ำร่วมกับโคพอลิเมอร์ในตัวทำละลายระเหยที่ผสมน้ำได้ เช่น tetrahydrofuran (THF) จากนั้นหยดสารละลายลงในน้ำภายใต้เครื่องกวนสารแม่เหล็กจะทำให้เกิดไมเซลล์ขึ้นได้เอง จากนั้นลดความดันเพื่อกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ ข้อเสียคือ ตัวทำละลายอินทรีย์ตกค้างในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย

3.1.6 Oil in water emulsion

นำตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ไดคลอโรมีเทนหรือคลอโรฟอร์ม เติมลงในน้ำที่มีโคพอลิเมอร์แล้วคนช้าๆ เพื่อให้เกิดอิมัลชัน จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกไปจะเกิดไมเซลล์ขึ้น ปัญหาหลักคือการกำจัดยาอิสระและตัวทำละลายอินทรีย์ออกยาก

3.2 ข้อดีของ polymeric micelles

3.2.1 บรรจุยาที่ไม่ละลายน้ำได้ง่าย

3.2.2 การปลดปล่อยตัวยาสัมพันธ์โครงสร้างพอลิเมอร์

3.2.3 ไม่จำเป็นต้องปรับสภาพพื้นผิว มีส่วนที่ชอบน้ำอยู่แล้ว

3.2.4 เตรียมง่ายและราคาถูก

3.3 ข้อเสียของ polymeric micelles

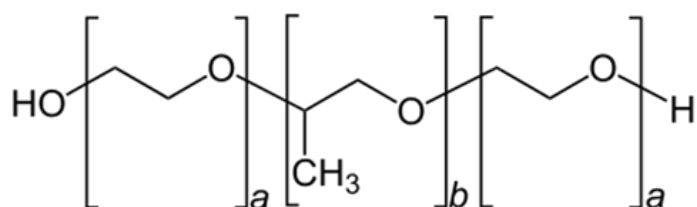
3.3.1 ความคงตัวต่ำเมื่อเจือจางเข้าสู่กระแสเลือด

3.3.2 ลักษณะซับซ้อน

4. Poloxamer¹⁵

Poloxamer หรือ Pluronic มีโครงสร้างเป็น PEO-block-PPO-block-PEO จัดเป็นพอลิเมอร์ชนิด triblock copolymer ที่ไม่มีประจุ มีส่วนที่ไม่มีขั้วคือ PPO และส่วนที่มีขั้วคือ PEO มีลักษณะพิเศษคือสามารถยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein efflux pump (P-gp) จึงทำให้ไมเซลล์อยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น นอกจากนี้ยังมีการเชื่อมต่อหมู่ทางเคมีที่ไวต่อตัวกระตุ้นกับสายพอลิเมอร์ ทำให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยยา เซลล์มะเร็งเป้าหมาย¹⁶ Pluronic มีจำหน่ายในท้องตลาดมากมาย โดยแตกต่างกันไปตามน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยโครงสร้างและอัตราส่วนระหว่างหน่วยที่ไม่ชอบน้ำกับหน่วยที่ชอบน้ำ

4.1 โครงสร้างโมเลกุล



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของ poloxamer

4.2 สูตรโมเลกุลและมวลโมเลกุล

มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$

Poloxamer	Physical form	a	b	Average molecular weight
124	liquid	12	20	2090-2360
188	solid	80	27	7680-9510
237	solid	64	37	6840-8830
338	solid	141	44	12700-17400
407	solid	101	56	9840-14600

รูปที่ 9 Typical poloxamer grades

4.3 หน้าที่ของสาร

Dispersing agent, emulsifying agent, solubilizing, tablet lubricant, wetting agent

4.4 การใช้ในทางเภสัชกรรม

Poloxamer เป็น nonionic polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer ใช้เป็น emulsifying หรือ solubilizing agent และสามารถใช้ในการช่วยนำส่งยาได้ ซึ่งส่วนของ polyoxyethylene มีความเป็น hydrophilic ส่วน polyoxypropylene มีความเป็น hydrophobic

Use	Concentration (%)
Fat emulsifier	0.3
Flavor solubilizer	0.3
Fluorocarbon emulsifier	2.5
Gelling agent	15–50
Spreading agent	1
Stabilizing agent	1–5
Suppository base	4–6 or 90
Tablet coating	10
Tablet excipient	5–10
Wetting agent	0.01–5

รูปที่ 10 Uses of poloxamer

4.5 คุณสมบัติทั่วไป

- ความเป็นกรด/เบส pH=5.0-7.4 เมื่อมีความเข้มข้น 2.5%w/v aqueous solution
- ความหนาแน่น 1.06 g/cm³ ที่ 25°C
- จุดหลอมเหลว 16°C (poloxamer 124), 52-57°C (poloxamer 188), 49°C (poloxamer 237), 57°C (poloxamer 338), 52-57°C (poloxamer 407)

- ค่าการละลาย

Type	Solvent				
	Ethanol (95%)	Propan-2-ol	Propylene glycol	Water	Xylene
Poloxamer 124	Freely soluble	Freely soluble	Freely soluble	Freely soluble	Freely soluble
Poloxamer 188	Freely soluble	-	-	Freely soluble	-
Poloxamer 237	Freely soluble	Sparingly soluble	-	Freely soluble	Sparingly soluble
Poloxamer 338	Freely soluble	-	Sparingly soluble	Freely soluble	-
Poloxamer 407	Freely soluble	Freely soluble	-	Freely soluble	-

รูปที่ 11 ค่าการละลายของ Poloxamer

4.6 ความคงตัวและการเก็บรักษา

ถ้าเป็นสารละลายจะคงตัวในสภาวะกรด, เบส, โลหะที่มีประจุ แต่โอกาสที่จะปนเปื้อนจะขึ้นได้ ควรเก็บวัตถุดิบในภาชนะที่ปิดสนิทแน่น ในที่เย็นและแห้งความไม่เข้ากันขึ้นกับความเข้มข้นสำหรับ poloxamer 188 จะไม่เข้ากับ phenol และ paraben

เนื่องจาก Poloxamer เป็นสารที่เพิ่มการละลาย เพิ่มความคงตัว และมีความเป็นพิษน้อย จึงนิยมใช้ในการทำระบบนำส่งยาที่ไม่ละลายน้ำเข้าสู่ร่างกาย เพื่อเพิ่มชีวประสิทธิผล (Bioavailability) เพิ่มการใช้ยาของผู้ป่วย เพิ่มผลลัพธ์ในการรักษา ซึ่งขนาด โครงสร้าง และคุณสมบัติการดูดซึมของ poloxamer ก็จะมีผลต่อการนำไปใช้ในทางเภสัชกรรม ไม่ว่าจะเป็นระบบนำส่งยา, ระบบอนุภาคนาโน, เครื่องสำอาง โดยเฉพาะการทำระบบนำส่งยามะเร็งเข้าสู่เนื้องอก ซึ่งการที่ยามีขนาดที่เป็นระดับนาโน ทำให้มีประโยชน์ต่อการแพร่เข้าสู่เนื้องอก (Permeability and retention; EPR)

Poloxamer 407 หรือ ชื่อทางการค้าว่า Pluronic F127 เป็นสารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ มีคุณสมบัติก่อเจลโดยเมื่อเจลอยู่ในตัวทำละลายที่ดี ซึ่งมีความเข้มข้นตัวทำละลายอุณหภูมิ และระยะเวลาที่พอเหมาะ สายพอลิเมอร์จะหลุดออกจากกัน ทำให้เจลสูญเสียโครงสร้างไป อย่างไรก็ตามโครงสร้างของเจลสามารถคืนตัวได้โดยการปรับสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมจึงถูกเรียกว่า เจลแบบผันกลับได้ (Reversible gels) การเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับได้ระหว่างสถานะของโซล (Sol) และเจล (Gel) เรียกว่า การเปลี่ยนสถานะโซล-เจล (Sol-gel transition) หรือ การเกิดเจล (Gelation) ซึ่งขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล และความเข้มข้นของ

บล็อกโพลีเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบแต่ละส่วน¹⁷ Poloxamer ประกอบด้วยเอทิลีนออกไซด์ (ethylene oxide) ที่ชอบน้ำและโพรพิลีนออกไซด์ (Propylene oxide) ที่ไม่ชอบน้ำทำให้มีโครงสร้างแบบแอมฟิฟิลิกจึงสามารถเกิดไมเซลล์ได้เองในสารละลายที่เป็นน้ำ จากการศึกษาพบว่าการนำ poloxamer 407 มาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมดังนี้¹⁸

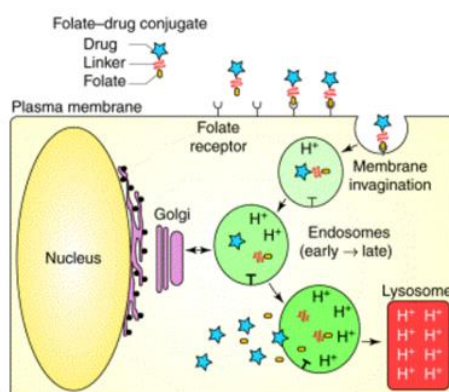
1. Poloxamer 407 ช่วยเพิ่มคุณสมบัติโมเลกุลยาที่ละลายน้ำได้น้อยเช่น อินโดเมทาซิน (Indomethacin) หรือ อินซูลิน (Insulin) นอกจากนี้ยาที่ละลายน้ำได้เช่น ไพร็อกซิแคม ละลายได้เพิ่มขึ้น 11 เท่าหลังจากใส่ poloxamer 407 22.5%
2. Poloxamer 407 เพิ่มความคงตัวได้ในยาที่เป็นโปรตีน ช่วยลดแนวโน้มที่เปปไทด์จะแยกออกจากกันเมื่อ CMC ต่ำและขาดการยึดเกาะกันด้วยไฟฟ้าสถิต poloxamer 407 ในโพลีที่บรรจุโปรตีน (Epsilon-caprolactone) อนุภาคขนาดเล็กช่วยเพิ่มความเข้ากันน้ำและป้องกันไม่ให้อนุภาคขนาดเล็กรวมตัวกัน นอกจากนี้ยังใช้กับอิมัลชันหลายตัวของ W/O/W เพื่อเพิ่มความคงตัว
3. Poloxamer 407 มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการยึดเกาะกับบริเวณที่ออกฤทธิ์ ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้ยาวนานขึ้น มักใช้ในสูตรตำรับยาใช้ภายนอก เช่น ยาทาผิวหนัง ยาเหน็บทวารหนัก ยาตา แรงยึดเกาะโดยทั่วไปเพิ่มขึ้นตามความแรงของเจล และขึ้นกับค่าพารามิเตอร์ เช่น อุณหภูมิและความเข้มข้น poloxamer 407

5. Folic acid¹⁹

การนำส่งยาโดยผ่านตัวรับโฟเลต (Target drug delivery via folate receptor) โดยปกติแล้วตัวรับโฟเลตนั้นพบได้น้อยมากในเซลล์ปกติ แต่จะมีเพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งของเยื่อบุผิว (Epithelial cancer) ของรังไข่ ต่อมม้าม ลำไส้ใหญ่ ปอด ต่อมลูกหมาก เป็นต้น ด้วยนี้เองตัวรับโฟเลตจึงเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจสำหรับนำส่งสารจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและจำเพาะเจาะจง จากการทดลองพบว่าในหนึ่งชั่วโมงเซลล์มะเร็งหนึ่งเซลล์สามารถนำสารเข้าสู่เซลล์โดยผ่านตัวรับโฟเลตได้ถึงหนึ่งล้านโมเลกุล นอกจากนี้กรดโฟลิกยังไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย รวมถึงวิธีการเชื่อมต่อโมเลกุลต่างๆ เข้ากับกรดโฟลิกก็ทำได้สะดวก

ปัจจุบันจึงได้มีการทดลองนำโมเลกุลต่างๆ มาเชื่อมต่อกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับตัวรับโฟเลต หรือนำมาเชื่อมต่อกับกรดโฟลิกซึ่งเป็นลิแกนด์ของตัวรับโฟเลตเพื่อใช้ในการ

วินิจฉัยและบำบัดรักษาโรคมะเร็ง โมเลกุลดังกล่าวได้แก่ เกล็ดขั้วรังสี MRI contrast agents ยาเคมีบำบัด antisense nucleotide และ ribozyme โปรตีนและทอกซิน immunotherapeutic agent ลิโพโซมรวมถึงพลาสมิด



รูปที่ 12 กระบวนการเอนโดไซโทซิสยาผ่านตัวรับโฟเลต

เอนโดไซโทซิสเป็นกระบวนการที่ใช้ในการนำสารเข้าสู่เซลล์โดยผ่านตัวรับโฟเลต เริ่มต้นจากโฟเลตหรือโฟเลตที่มียาต่อเอาไว้จับกับตัวรับซึ่งปรากฏอยู่ที่ผิวเซลล์ จากนั้นเมื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการเว้าเป็นถุงห่อหุ้มสารเอาไว้เรียกว่าเอนโดโซมแล้วเคลื่อนที่สู่ภายในเซลล์ เมื่อความเป็นกรดภายในเอนโดโซมเพิ่มขึ้น (pH 5) ตัวรับโฟเลตจะปลดปล่อยโมเลกุลโฟเลตหรือยาออกจากเอนโดโซมเข้าสู่ไซโทพลาซึมต่อไป

สำหรับการบำบัดรักษาโรคมะเร็งนั้น มีการเตรียมกรดโพลิกทั้งแบบที่ต่ออยู่กับชีวพิษ(toxin) และต่ออยู่กับยาต้านมะเร็ง โดยการนำยามาต่อเข้ากับกรดโพลิกหรือผ่านตัวเชื่อม(linker) ด้วยพันธะที่เหมาะสม เช่น ไดซัลไฟด์ หรือการต่อกรดโพลิกเข้ากับ polyethyleneglycol (PEG) ที่อยู่บนผิวด้านนอกของลิโพโซมซึ่งมียาเหล่านี้บรรจุอยู่ข้างใน การนำส่งยาโดยผ่านตัวรับโฟเลตนี้ยังมีข้อดีเนื่องจากอาจเชื่อมต่อยาต้านมะเร็งมากกว่าหนึ่งชนิดที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกันเข้ากับกรดโพลิกหนึ่งโมเลกุลเพื่อนำส่งยาเหล่านั้นไปออกฤทธิ์ยังเป้าหมายพร้อมกัน

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง^{8, 20-23}

Vipin Saxena และ M Delwar Hussain ได้ทำการศึกษาระบบนำส่ง Gambogic acid (GA) ที่มีค่าการละลายต่ำและเกิดผลข้างเคียงให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นโดยใช้ Poloxamer 407 และ D- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) โดยใช้วิธี thin-film hydration และทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคที่ได้จะปลดปล่อย Gambogic acid ออกมาแบบเน้นเป็นระยะเวลา 4 วัน และยังเพิ่มประสิทธิภาพในการนำ Gambogic acid เข้าสู่เซลล์ NCI/ADR-RES ที่มีการดื้อยาเป็น 2.9 เท่า และเซลล์ MCF-7 เป็น 1.6 เท่า เมื่อเทียบกับ Gambogic acid ที่ไม่มีการห่อหุ้ม

Nischal Koirala และคณะได้ทำการศึกษาวิจัยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็ง แต่ลดผลข้างเคียงจากยา ซึ่ง folate receptor (α subunit) จะมีการแสดงออกมากเกินไปในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งตับ โดยทำการประเมินความจำเพาะและความเป็นพิษของ folic acid-containing drug delivery vehicle (DDV) ในมะเร็งตับ ซึ่ง DDV จะเตรียมจาก folic acid (FA) และ fluorescein isothiocyanate (FITC) ทำการคอนจูเกตร่วมกับ polyethylene glycol (PEG) เพื่อเพิ่มการละลายน้ำและเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาของ FA ligands ในการจับกับ folate receptor บนผิวเซลล์ ผ่านทางกระบวนการสังเคราะห์ modified chemo-enzymatic จากนั้นจึงทำการฉีด intra-arterial/intravenous เข้าสู่ hepatoma ของหนู (N1S1) และเซลล์ human monocytic (U937) ผลการศึกษาพบว่าพบ FITC ในเซลล์มะเร็งตับปริมาณมากซึ่งสัมพันธ์กับเป้าหมายของการนำส่ง DDV

Asghar Narmani และคณะได้ทำการศึกษาการนำกรดโพลิลิกมาทำเป็นอนุภาคนาโนเพื่อเป็นตัวช่วยนำส่งยาการนำส่งยาเคมีบำบัดโดยใช้อนุภาคนาโนถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างในการทำมาวินิจฉัยและนอกจากนี้ยังมีศักยภาพที่ยอดเยี่ยมในการแก้ไขข้อเสียบางประการของวิธีการรักษาและการวินิจฉัยแบบเดิม เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะเกี่ยวกับขนาดอนุภาคนาโน ความเสถียรสูง ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ การดูดซึมทางชีวภาพ ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ ปลอดภัย พิษ ความสามารถในการบรรจุยาที่ดี ศักยภาพในการรักษาเนื้องอกที่ถูกสะสมอยู่ สามารถเอาชนะปัญหาการดื้อยาในเซลล์มะเร็ง มีพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดีเยี่ยมและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยาไปยังเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้น

จากการศึกษาของ Zhang และคณะ โดยศึกษาประสิทธิภาพด้านเซลล์มะเร็งระดับที่แพร่กระจายไปยังปอดในสัตว์ทดลองของพอลิเมอร์ไมเซลล์บรรจุยา paclitaxel เปรียบเทียบระหว่างการควบคุมกับไมควบคุมโฟเลต พบว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ควบคุมโฟเลตสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งระดับไปยังปอดได้ และยังสามารถนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ดีกว่าอย่างชัดเจน

เตรียม FA-functionalized P407 โดยวิธี carbodiimide crosslinker และเติม CDI ลงไปในสารละลายที่เตรียมใช้วิธี thin-film hydration ในการเตรียมไมเซลล์ (P407-TPGS/FA-P407-TPGS) และทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยแบ่งเป็น Blank micelle, Doxorubicin และ ไมเซลล์ที่โหลด Doxorubicin โดย alamarBlue assay ผลการศึกษาพบว่าขนาดของไมเซลล์มีขนาดน้อยกว่า 200 นาโนเมตร และมี Encapsulation efficiency เท่ากับ 85 % และ 73 % สำหรับ P407-TPGS และ FA-P407-TPGS micelles ตามลำดับ ในการศึกษา Intracellular trafficking โดยใช้ Nile red-loaded micelles นอกจากนี้ยังพบว่าไมเซลล์แสดงผลของพิษในปริมาณน้อยซึ่งเป็นปริมาณที่ปกติสำหรับ human cell line WRL-68 และเพิ่มการดูดซึมของ DOX, ลด drug efflux, เพิ่มการจับ DOX-DNA ใน SKOV3 และ DOX-resistant SKOV3 ในเซลล์มะเร็งรังไข่ของมนุษย์ เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองเมื่อเทียบกับ free DOX จึงสรุปได้ว่าไมเซลล์ FA-P407-TPGS-DOX แสดงศักยภาพในระบบการนำส่ง nano-drug ไปยังเป้าหมายเนื่องจากปัจจัยเสริมฤทธิ์กันหลายประการ เพิ่มความจำเพาะในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง, ยับยั้งการดื้อยาหลายชนิด และมีความจำเพาะเจาะจงต่อโฟเลตรีเซปเตอร์

Adeel Masood Butt และคณะได้ทำการศึกษา ผลการเสริมฤทธิ์ของไมเซลล์ผสม Poloxamer 407 และ วิตามิน E TPGS (D-α-tocopheryl polyethylene glycol succinate) folate-functionalized ต่อการนำส่งยาต้านมะเร็งแบบกำหนดเป้าหมาย ซึ่ง Poloxamer 407 และ วิตามิน E TPGS มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เป็น polymer ในการนำส่งยาและสารช่วยเพื่อเพิ่ม drug retention time และความคงตัว นอกจากนี้ TPGS ยังลดการดื้อยา ช่วยเพิ่มการตายแบบ apoptosis และมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง โดยทำการคอนจูเกตกับกรดโฟลิกเพื่อจับกับโฟเลตรีเซปเตอร์บนเซลล์มะเร็ง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบและสารเคมี

- 1.1 Quercetin
- 1.2 Poloxamer 407 (P407)
- 1.3 Folic acid (FA)
- 1.4 DI water
- 1.5 DMSO
- 1.6 CDI
- 1.7 Methanol
- 1.8 Ethanol
- 1.9 Dichloromethane
- 1.10 Potassium Permanganate
- 1.11 Potassium carbonate
- 1.12 Sodium hydroxide

2. เครื่องมือที่ใช้

- 2.1 Zetasizer
- 2.2 Beaker
- 2.3 Volumetric flask
- 2.4 UV-vis spectrophotometer
- 2.5 เครื่องชั่ง
- 2.6 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)
- 2.7 Rotary evaporator
- 2.8 Sonicator
- 2.9 Scanning Electron Microscopy (SEM)
- 2.10 Freeze dryer
- 2.11 Magnetic stirrer

- 2.12 Magnetic bar
- 2.13 Dialysis bag
- 2.14 TLC- Silica gel 60 GF254 Aluminium sheets

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สังเคราะห์การเกิดพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย Poloxamer 407 (P407) และ Folic acid (FA)⁸

การสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย P407 และ FA ดัดแปลงวิธีการของ Butt AM

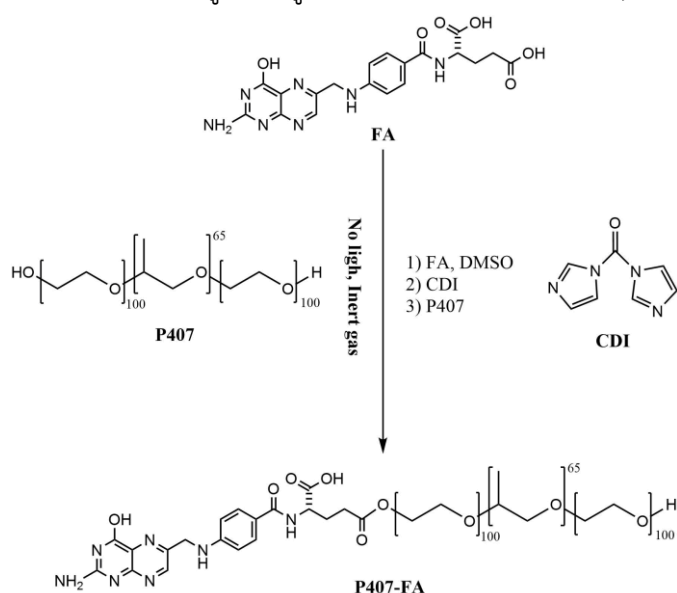
และคณะ ดังนี้

3.1.1 โดยนำ FA 0.5 g ละลายด้วย DMSO 20 ml คนผสมกันในบีกเกอร์จนได้สารละลายใส นำไป sonicate ด้วย sonicator จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป stirrer overnight ในสภาวะกันแสงและแก๊สเฉื่อย 1 คืน

3.1.2 จากนั้นใส่ carbonyldiimidazole (CDI) ในอัตราส่วน FA:CDI (1:1.5 mole/mole) ไปในสารละลาย stirrer overnight ในสภาวะกันแสงและแก๊สเฉื่อย 1 คืน

3.1.3 เติม P407 ใส่ลงไปในสารละลายให้ได้สารละลายใส นำไป sonicate ด้วย sonicator และ stirrer overnight ในสภาวะกันแสงและแก๊สเฉื่อยอีก 1 คืนหลังจากเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วทำการ dialysis เป็นเวลา 3 วันเพื่อแยกสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกมา

3.1.4 นำ P407 ที่ถูกคอนจูเกตแล้วไปทำการ freeze dry



รูปที่ 13 สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยา esterification ระหว่าง Poloxamer 407 และ Folic acid

2. Characterization polymer ที่สังเคราะห์ คือ FTIR, UV-vis, SEM, TLC^{8, 24-26}

2.1.1 นำไปวิเคราะห์ characterization ของ P407-FA conjugate โดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในการวิเคราะห์โมเลกุลของสาร เพื่อนำมาศึกษาองค์ประกอบของการเปลี่ยนแปลงของสาร

2.1.2 Scanning Electron Microscopy (SEM) นำ P407, FA และ P407-FA conjugate ไปทำการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดเพื่อดูลักษณะพื้นผิวของตัวอย่างทั้งสามชนิดในรูปแบบภาพ 3 มิติ

2.1.3 วิเคราะห์เชิงคุณภาพของ FA ที่นำไปคอนจูเกตกับ P407 และ degree of conjugation ของ FA ประเมินโดยใช้ UV-vis spectroscopy ในการหาปริมาณสาร เพื่อหาความเข้มข้นของ FA ที่ถูกคอนจูเกต โดยนำตัวอย่างไปละลาย DI water ปรับปริมาตรด้วยน้ำใน volumetric flask ให้ได้ 10 ml และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงยูวี (UV absorbance) ที่ 285 nm คำนวณโดยใช้ calibration curve ที่พลอต กราฟระหว่าง UV absorbance กับ FA concentrations

2.1.4 Thin layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสาร ใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี นำ P407-FA conjugate มาละลายด้วย ethanol เตรียม mobile phase โดยใช้ dichloromethane และ methanol (8.8:1.2) stationary phase คือ silica gel ใช้ potassium permanganate stain ซึ่งประกอบด้วยต่างทับทิม 1.5 กรัม, โพแทสเซียมคาร์บอเนต 4.5 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 กรัม แล้วปรับด้วยน้ำ 200 มิลลิลิตร เป็นตัวย้อมสีเพื่อดูการเคลื่อนที่ของสาร

3. การเตรียม polymeric micelle ที่ประกอบด้วย P407 และยาเคอเซติน ดัดแปลงวิธีการของ Osamah Alghazwat และคณะ²⁷

3.1 การเตรียม polymeric micelle ที่ประกอบด้วย P407 และวิเคราะห์ผล

3.1.1 เตรียม P407 100, 200, 500, 750 และ 1000 mg โดยนำแต่สูตรมาละลายด้วย acetone 10 ml แล้วตามด้วย DI water 10 ml ใส่ใน round-bottom flask คนละใบ

3.1.2 นำไประเหยตัวทำละลายออกจากด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดันใน 250-400 mbar อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสและรอบหมุน 2 rpm

3.1.3 นำอนุภาค polymeric micelle มากรองด้วย membrane filter 0.45 μm แล้วทำการ dilute 10 เท่าด้วยน้ำ

3.1.4 นำสารที่เตรียมได้ไปวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer

3.2 การเตรียม polymeric micelle ประกอบด้วย P407 และยาเคอเซติน และวิเคราะห์ผล

3.2.1 เตรียม P407 100, 200, 500, 750 และ 1000 mg โดยนำแต่ละสูตรมาละลายด้วย acetone 10 ml แล้วเติมยาเคอเซติน 5 g ลงไปแล้วตามด้วย DI water 10 ml ใส่ใน round-bottom flask คนละใบ

3.2.2 นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 250-400 mbar อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสและรอบหมุน 2.5 rpm

3.2.3 นำอนุภาค polymeric micelle มากรองด้วย membrane filter 0.45 μm แล้วใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

3.2.4 นำสารที่เตรียมได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrometer ที่ความยาวคลื่น 353 nm

3.2.5 นำสารละลายที่เหลือที่ได้จากการกรองในข้อที่ 3 มา dilute 10 เท่าด้วยน้ำ

3.2.6 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 5 มาวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer

4. การเตรียม polymeric micelle ที่ประกอบด้วย P407, P407-FA conjugate และยาเคอเซติน ดัดแปลงวิธีการของ Osamah Alghazwat และคณะ²⁷

4.1 การเตรียม polymeric micelle ที่ประกอบด้วย P407 และ P407-FA conjugate และวิเคราะห์ผล

4.1.1 เตรียม P407-FA conjugate 50, 100 และ 150 mg โดยนำแต่ละสูตรมาละลายด้วย acetone 10 ml ลงไปจากนั้นนำ P407 500 mg มาละลายแล้วตามด้วย DI water 10 ml ใส่ใน round-bottom flask คนละใบ

4.1.2 นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 250-400 mbar อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสและรอบหมุน 2 rpm

4.1.3 นำอนุภาค polymeric micelle มากรองด้วย membrane filter 0.45 μm แล้วทำการ dilute 10 เท่าด้วยน้ำ

4.1.4 นำสารที่เตรียมได้ไปวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer

4.2 การเตรียม polymeric micelle ที่ประกอบด้วย P407, P407-FA conjugate และยาเคอเซตินและวิเคราะห์ผล

4.2.1 เตรียม P407 500 mg และ P407-FA conjugate 50 mg ละลายด้วย acetone 10 ml แล้วเติมยาเคอเซติน 5 g ลงไปแล้วตามด้วย DI water 10 ml ใส่ใน round-bottom flask

4.2.2 นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 250-400 mbar อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสและรอบหมุน 2 rpm

4.2.3 นำอนุภาค polymeric micelle มากรองด้วย membrane filter 0.45 μm แล้วใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

4.2.4 นำสารที่เตรียมได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrometer ความยาวคลื่น 353 นาโนเมตร

4.2.5 นำสารละลายที่เหลือที่ได้จากการกรองในข้อที่ 3 มา dilute 10 เท่าด้วยน้ำ

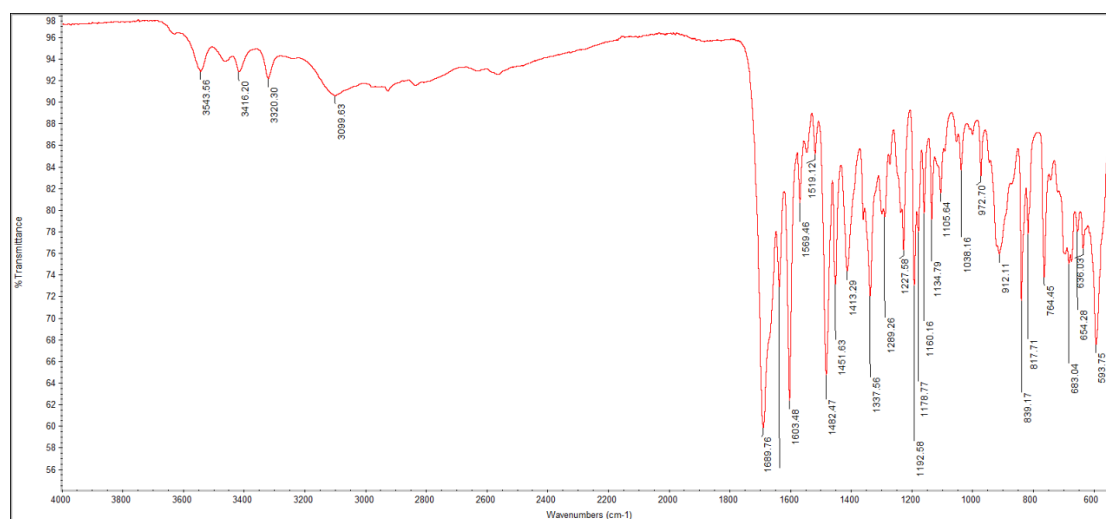
4.2.6 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 5 มาวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

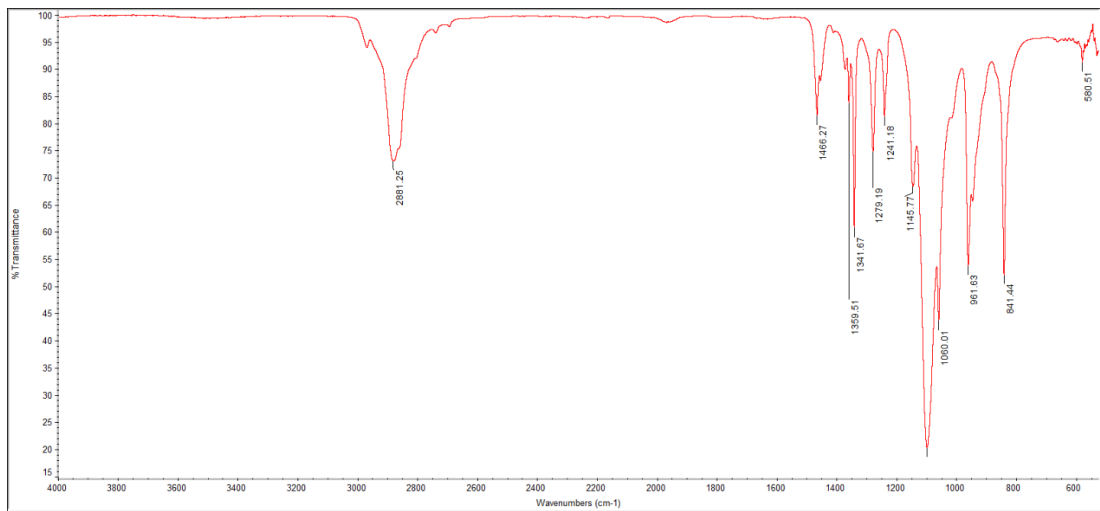
ตอนที่ 1 : ศึกษาผลการสังเคราะห์การ conjugate ระหว่าง Poloxamer407 และ Folic acid โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR, TLC, SEM และ UV-visible

1. การวิเคราะห์ด้วย FTIR²⁸



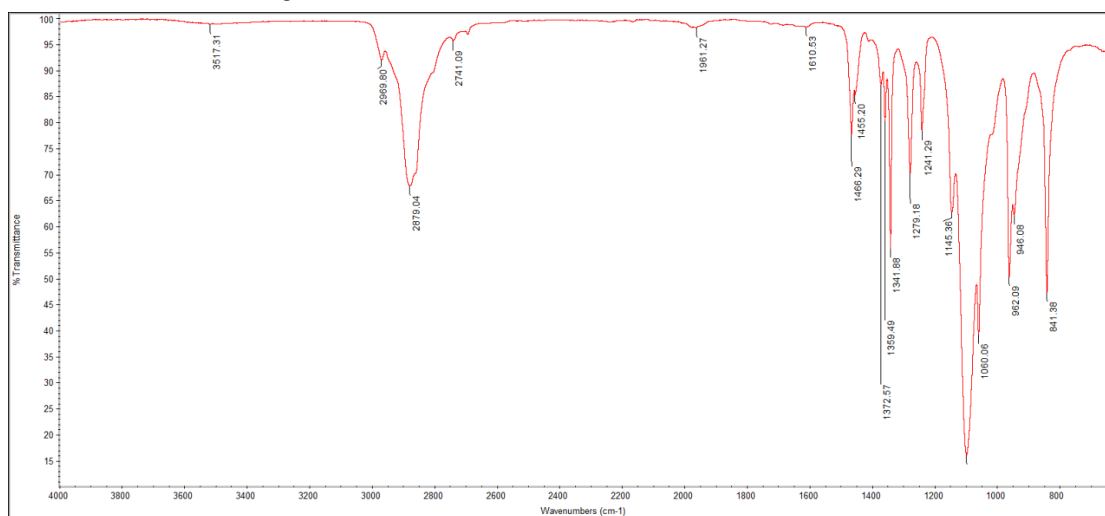
รูปที่ 14 FTIR ของ Folic acid

จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR จากรูปที่ 14 สเปกตรัมการดูดกลืนของ Folic acid สามารถอธิบายผลการวิเคราะห์ องค์ประกอบของพันธะเคมี องค์ประกอบของพันธะเคมีเป็นกลุ่มของอะโรมาติก (aromatic group) ได้แก่พันธะของ C-H พบได้ที่พีคการดูดกลืน 3000-3100 (Stretching) cm^{-1} , พันธะของ C=C พบได้ที่พีคการดูดกลืน 1500-1700 (Bending) cm^{-1} และพันธะของ C-H พบได้ที่พีคการดูดกลืน 680-860 (Bending) cm^{-1} นอกจากนี้โครงสร้างโมเลกุลของ folic acid ยังพบสเปกตรัมที่ 3300-3500 เนื่องจากโครงสร้างมีพันธะ amine N-H (Stretching) ในโครงสร้าง พบ peak ที่ 1630-1690 cm^{-1} ซึ่งเป็นพันธะ Amide C=O (Stretching) และ พีคที่ 3500-3700 cm^{-1} เป็นพันธะ Amide N-H (Stretching)



รูปที่ 15 FTIR ของ Poloxamer 407

จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR จากรูปที่ 15 สเปกตรัมการดูดกลืนของ Poloxamer 407 สามารถอธิบายผลการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบของพันธะเคมี องค์ประกอบของพันธะเคมีเป็นกลุ่มของ Alkyl C-H (Stretching) พบพีคที่ $2850\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ และพบพีคที่ $1000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นพันธะ O-H (Bending)

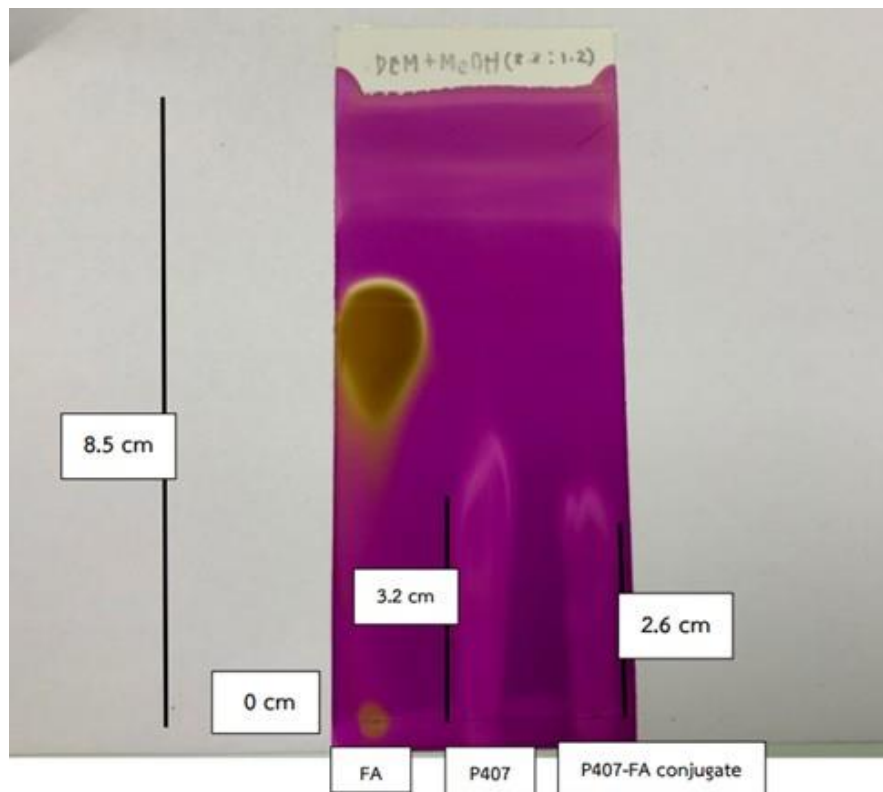


รูปที่ 16 FTIR ของ Poloxamer 407-Folic acid conjugate

เนื่องจาก Poloxamer 407 มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่า Folic acid มาก จึงเกิดการบดบังแสงอินฟราเรดที่จะไปตกกระทบที่ Folic acid ทำให้กราฟ FTIR ที่ได้จากการวิเคราะห์ P407 - FA conjugate มีความคล้ายคลึงกับกราฟ FTIR ที่ได้จากการวิเคราะห์ Poloxamer 407

ดังนั้น ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการพิสูจน์การคอนจูเกตระหว่าง Poloxamer 407 และ Folic acid โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

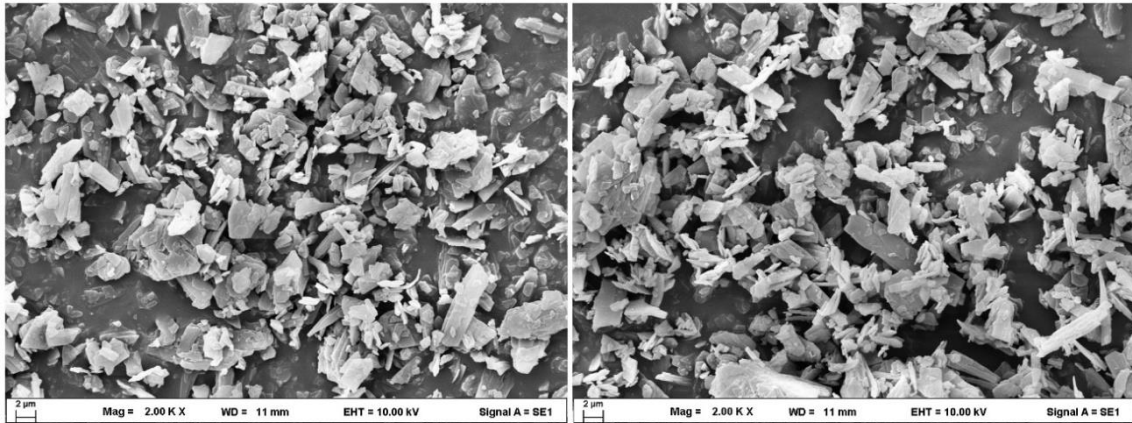
2. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC



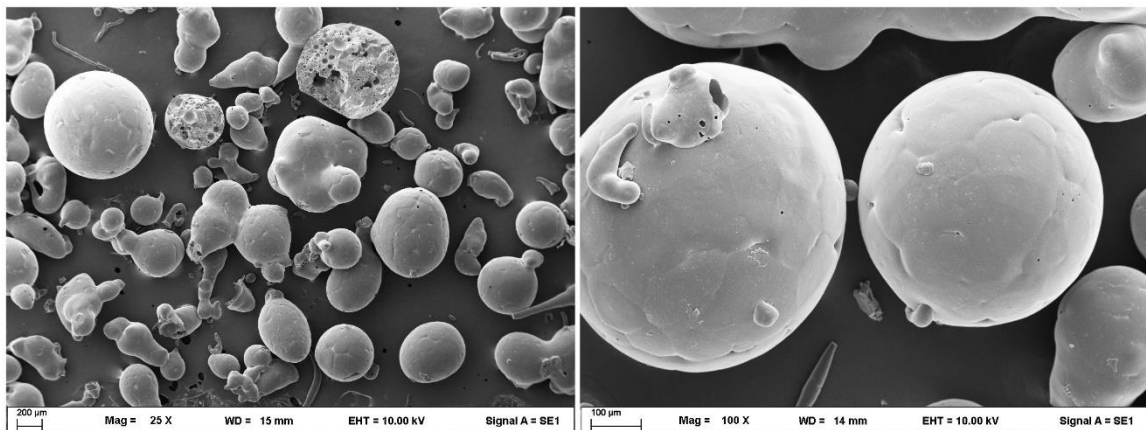
รูปที่ 17 การทดสอบเอกลักษณ์ด้วย TLC

จากการวิเคราะห์ของสารที่สังเคราะห์ขึ้นโดย P407-FA conjugate ด้วยเทคนิค TLC ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยการแบ่งปันสารระหว่างตัวดูดซับชนิดแข็งกับตัวทำละลาย เป็นวิธีการเบื้องต้นสำหรับการวิเคราะห์สารที่สังเคราะห์ขึ้น ใช้ potassium permanganate staining เพื่อการเคลื่อนที่ของสาร เนื่องจาก Poloxamer 407 ไม่มี chromophore จึงต้องทำให้เกิดการออกซิไดซ์กับหมู่ OH บนโครงสร้างทุกสาร โดยบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาก็จะสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้น ส่วนบริเวณที่ไม่เกิดปฏิกิริยาก็จะเป็นม่วงเหมือนเดิม²⁶ จากผลการวิเคราะห์พบว่า spot ของ P407 - FA conjugate (0.31) มีค่า Rf แตกต่างจาก spot ของ Poloxamer 407 (0.38) และ Folic acid (0.00) บ่งบอกว่าการเกิดปฏิกิริยาและการคอนจูเกตของ Poloxamer 407 และ Folic acid เกิดขึ้น

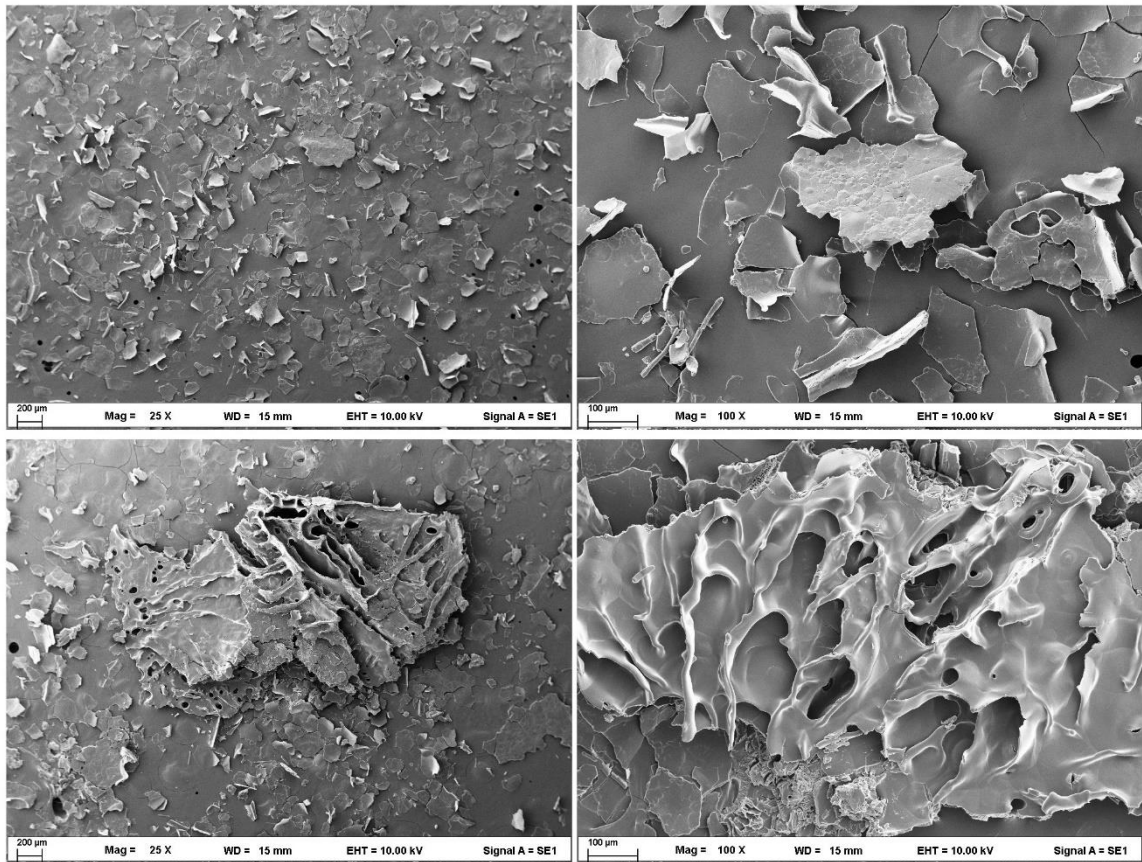
3. การวิเคราะห์ด้วย SEM



รูปที่ 18 Folic acid



รูปที่ 19 Poloxamer 407



รูปที่ 20 P407 - FA conjugate

จากการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าลักษณะของ folic acid เป็นผลึก ส่วน Poloxamer 407 มีลักษณะเป็นทรงกลม ผิวค่อนข้างเรียบ ในขณะที่ P407 - FA conjugate มีลักษณะเป็นแผ่น ซึ่งบ่งบอกได้ว่า Folic acid และ Poloxamer เกิดปฏิกิริยาอนุจกกันขึ้น ส่งผลทำให้เกิดสาร P407 - FA conjugate ที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากสารตั้งต้น

ตอนที่ 2 : ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelle ที่มีส่วนประกอบของ Poloxamer407 (P407)

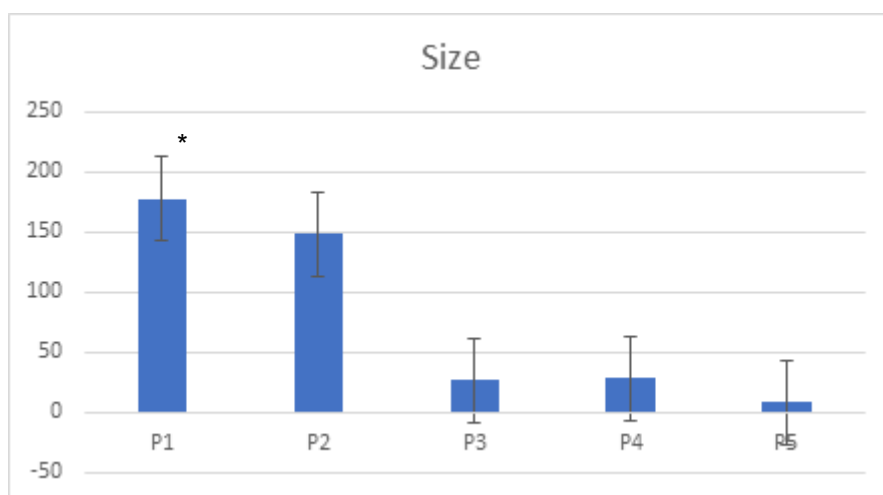
1. ผลของ P407 ต่อการเกิด polymeric micelle

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle

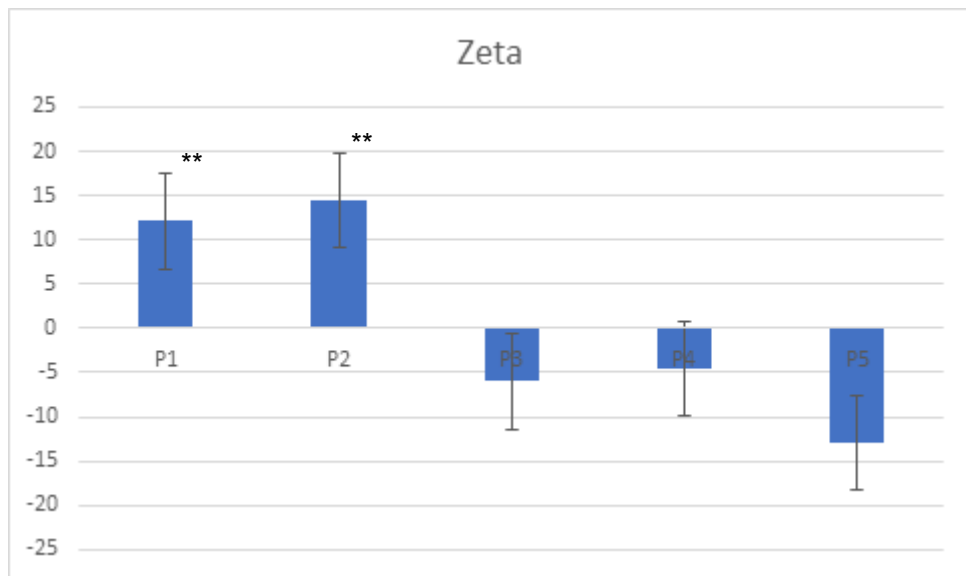
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
Poloxamer 407 100 mg (P1)	177.55 ± 68.99*	0.55 ± 0.21	12.11 ± 3.02**
Poloxamer 407 200 mg (P2)	148.39 ± 93.42	0.35 ± 0.16	14.43 ± 5.54**
Poloxamer 407 500 mg (P3)	26.64 ± 35.65	0.48 ± 1.42	-6.00 ± 4.62
Poloxamer 407 750 mg (P4)	28.07 ± 3.45	0.55 ± 0.15	-4.59 ± 3.47
Poloxamer 407 1000 mg (P5)	28.19 ± 6.53	0.61 ± 0.02	-12.97 ± 6.93

ค่าที่ปรากฏในตารางแสดงถึงค่า mean ± SD (n = 3) โดยผลของขนาดอนุภาคมี *P<0.05 เมื่อเทียบกับ Poloxamer 407 750 mg, 1000 mg และผลของ zeta potential มี **P<0.05 เมื่อเทียบกับ Poloxamer 407 500 mg, 750 mg, 1000 mg

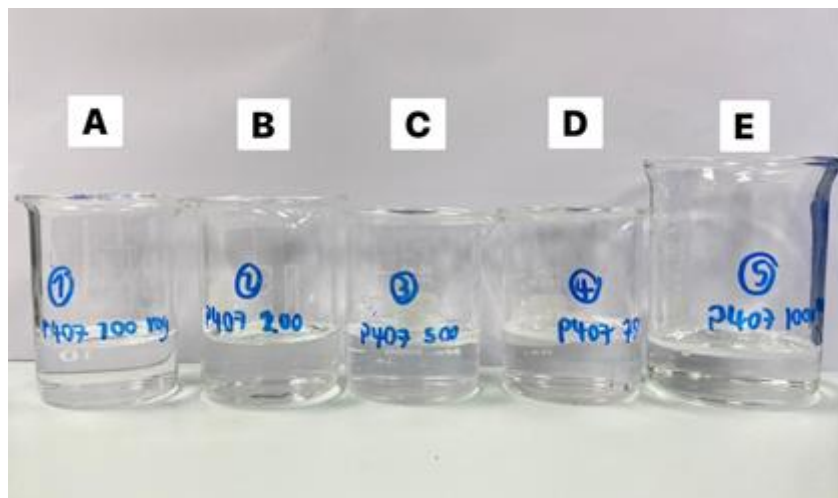
กราฟแสดงผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle



รูปที่ 21 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer 407 ขนาดต่างๆ โดยมีค่า *P<0.05 เมื่อเทียบกับ poloxamer 407 750 mg, 1000 mg



รูปที่ 22 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ โดยมี ** $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ Poloxamer 407 500 mg, 750 mg, 1000 mg



รูปที่ 23 ลักษณะทางกายภาพของกลุ่มที่มี poloxamer 407 ; Poloxamer 407 100 mg (A), Poloxamer 407 200 mg (B), Poloxamer 407 500 mg (C), Poloxamer 407 750 mg (D), Poloxamer 407 1,000 mg (E)

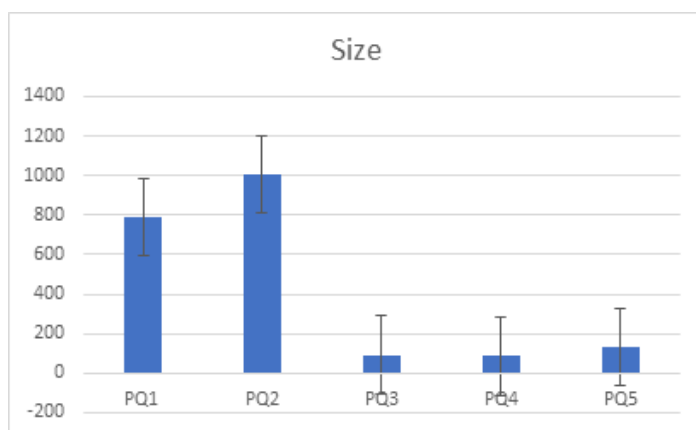
จากผลการทดลองการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่ประกอบด้วย Poloxamer 407 ที่ปริมาณ 100, 200, 500, 750 และ 1,000 mg พบว่ากลุ่มที่มีปริมาณ poloxamer 407 100 mg มีขนาดอนุภาคที่แตกต่างจากกลุ่มที่มี Poloxamer 407 750 mg และ 1000 mg อย่างมีนัยสำคัญโดยที่มีค่า P-value เท่ากับ 0.45 ทั้ง 2 กลุ่ม ในส่วนของการกระจายอนุภาคพบว่ามีความโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของ Poloxamer 407 ในส่วนของ zeta potential พบว่ากลุ่มที่มีปริมาณ Poloxamer 407 100 mg มีค่า zeta potential ที่แตกต่างจากกลุ่มที่มี Poloxamer 407 500 mg, 750 mg, 1000 mg อย่างมีนัยสำคัญโดยที่มีค่า P-value เท่ากับ 0.008, 0.013 และ 0.001 ตามลำดับ และกลุ่มที่มี Poloxamer 407 200 mg มีค่า zeta potential ที่แตกต่างจากกลุ่มที่มี Poloxamer 407 500, 750 และ 1,000 mg อย่างมีนัยสำคัญโดยที่มีค่า P-value เท่ากับ 0.003, 0.006 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Jiraphong และคณะที่เป็นการสังเคราะห์ Polymeric micelle โดยใช้ Poloxamer 407 พบว่าขนาดอนุภาคที่ได้อยู่ในช่วง 20-35 nm ซึ่งจากกราฟที่มีการพล็อตระหว่างความเข้มข้นของ Poloxamer 407 และขนาดอนุภาค พบว่าในส่วนของกระจายขนาดอนุภาคเมื่อมีการใช้ปริมาณของ Poloxamer 407 เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการกระจายขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้น²⁹ นอกจากนี้ยังมีการวิจัยของ Maria ที่พบว่าขนาดของอนุภาคจะเล็กลงเมื่อมีการเพิ่มปริมาณของพอลิเมอร์ซึ่งสัมพันธ์กับการบีบอัดของ polymeric network และการระเหยของสารละลายระหว่างที่มีการก่อตัวเป็น nanoparticle³⁰ จากรูปที่ 23 จะเห็นได้ว่าลักษณะทางกายภาพมีลักษณะเป็นสารละลายใสในทุกความเข้มข้น

2. ผลของ Poloxamer 407 ต่อการเกิด polymeric micelle และการบรรจุยาเคอเซติน

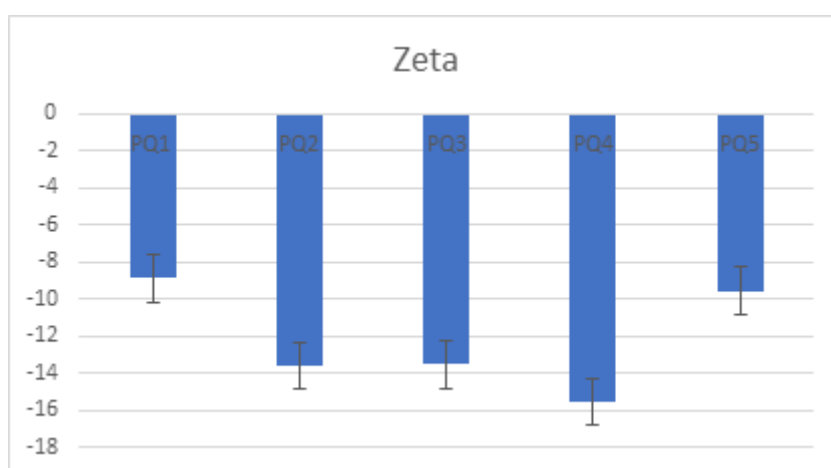
ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ % Entrapment ของ polymeric micelle

Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% Entrapment
Poloxamer 407 100 mg (PQ1)	790.29 ±681.26	0.80 ±0.19	-8.86 ± 5.55	64.72 ±10.59
Poloxamer 407 200 mg (PQ2)	1006.77 ±1621.68	0.60 ±0.28	-13.59 ±1.70	77.28 ± 9.83
Poloxamer 407 500 mg (PQ3)	91.43 ±59.51	0.34 ±0.12	-13.53 ±4.86	74.37± 17.72
Poloxamer 407 750 mg (PQ4)	86.41 ±36.88	0.38 ±0.14	-15.54± 4.65	67.65± 6.98
Poloxamer 407 1000 mg (PQ5)	132.2 9 ±167.52	0.45 ±0.09	-9.55± 6.55	63.35 ± 4.73

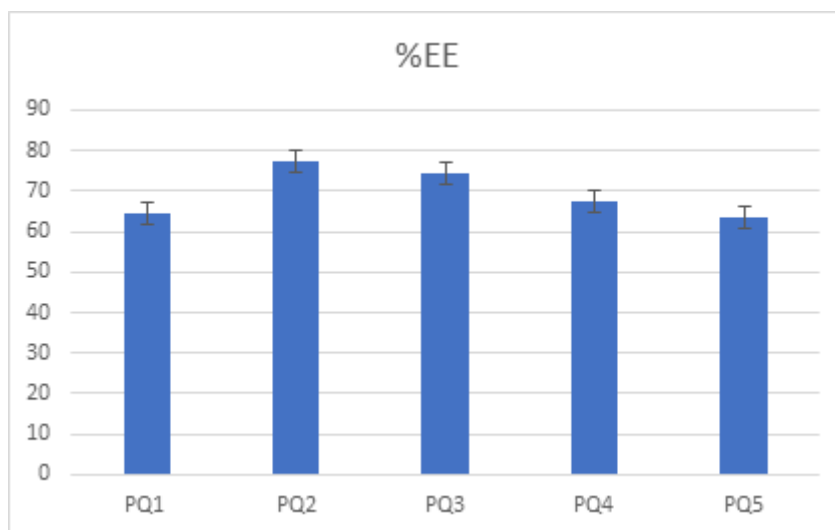
กราฟแสดงการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ % Entrapment ของ polymeric micelle



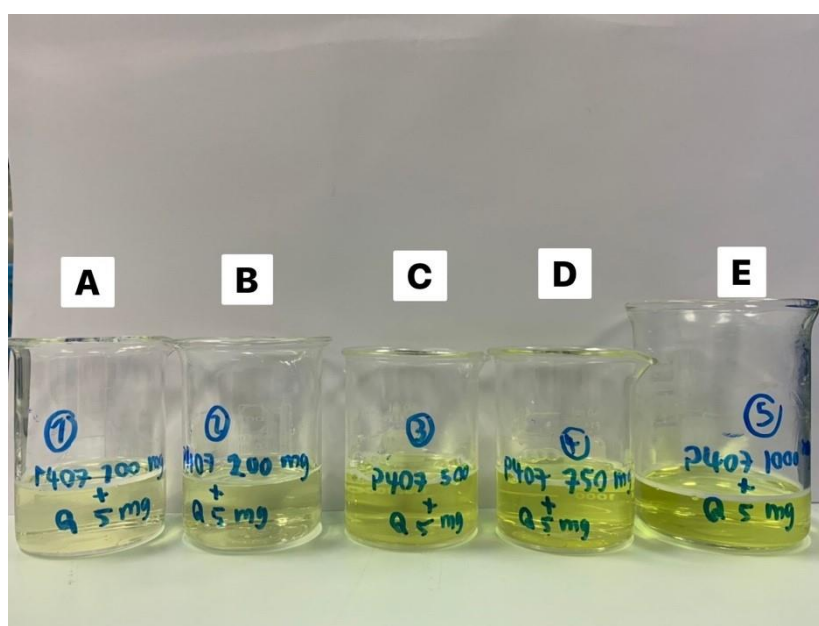
รูปที่ 24 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก Poloxamer 407 ขนาดต่างๆ ที่ load ยาเคอเซติน



รูปที่ 25 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก Poloxamer 407 ขนาดต่างๆ ที่ load ยาเคอเซติน



รูปที่ 26 แสดง % entrapment ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก Poloxamer 407 ขนาดต่างๆที่ load ยาเคอเซติน



รูปที่ 27 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle โดยเตรียมจาก Poloxamer 407 ที่บรรจุยาเคอเซติน (A, B, C, D และ E คือ Poloxamer 407 ปริมาณ 100 , 200 , 500 , 750 และ 1000 mg ตามลำดับ)

จากผลการทดลองการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ค่า zeta potential และ % Entrapment ของ polymeric micelles ที่บรรจุยาเคอเซติน พบว่าทั้งการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ค่า zeta potential และ % Entrapment ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่ม จากผลการวัดพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของ Poloxamer 407 ส่งผลทำให้แนวโน้มการกระจายของขนาดอนุภาคลดลง เมื่อพิจารณาขนาดอนุภาคที่วิเคราะห์ข้างต้นแล้วพบว่าเมื่อใช้ Poloxamer 407 100 mg, 200 mg และ 1000 mg มาทำการบรรจุยาเคอเซติน พบว่ามีขนาดเกินช่วงของ nanoparticle ที่เหมาะสมซึ่งอยู่ที่ขนาด 1 – 100 nm³¹ ดังนั้น จึงพิจารณาเปรียบเทียบการใช้ Poloxamer 407 500 mg และ 750 mg ซึ่งขนาดอนุภาคทั้งก่อนโหลดยา และหลังโหลดยา มีขนาดอยู่ในช่วงของ nanoparticle จากผลการวัดพบว่าขนาดของอนุภาคไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=1.000$) ส่วนค่า zeta potential พบว่าก็ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($P=1.000$) เนื่องจากการกระจายขนาดของอนุภาคมีค่าใกล้เคียงกันจึงพิจารณา % entrapment พบว่าสูตร Poloxamer 407 500 mg มี % entrapment มากกว่าสูตร Poloxamer 407 750 mg โดยมีค่าเท่ากับ 74.37 ± 17.72 และ 67.65 ± 6.98 ตามลำดับ ดังนั้นสามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมได้แก่ สูตรที่ใช้ Poloxamer 407 ปริมาณ 500 mg

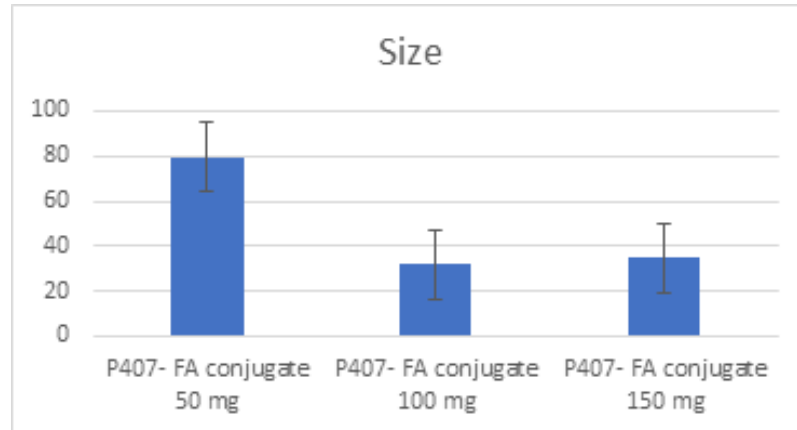
จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของสูตร Poloxamer 407 ปริมาณ 100, 200, 500, 750 และ 1,000 mg ที่บรรจุยาเคอเซติน พบว่าได้สารละลายใสมีสีเหลือง

ตอนที่ 3 : ศึกษาผลของ polymeric micelle ที่ประกอบด้วย P407 และ P407 - FA conjugate

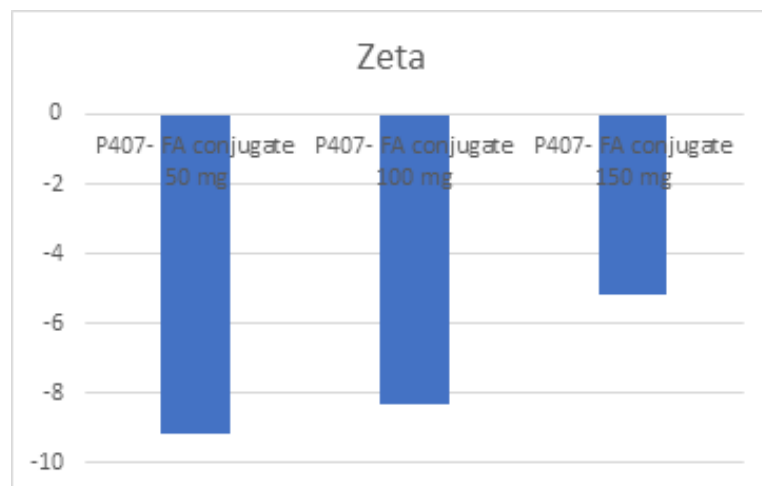
ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % Entrapment ของ P407 - FA conjugate

Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
P407 - FA conjugate 50 mg	41.66 ± 39.84	0.54 ± 0.26	-9.18 ± 1.11
P407 - FA conjugate 100 mg	31.86 ± 17.23	0.59 ± 0.16	-8.36 ± 4.87
P407 - FA conjugate 150 mg	34.77 ± 19.52	0.62 ± 0.05	-5.16 ± 4.05

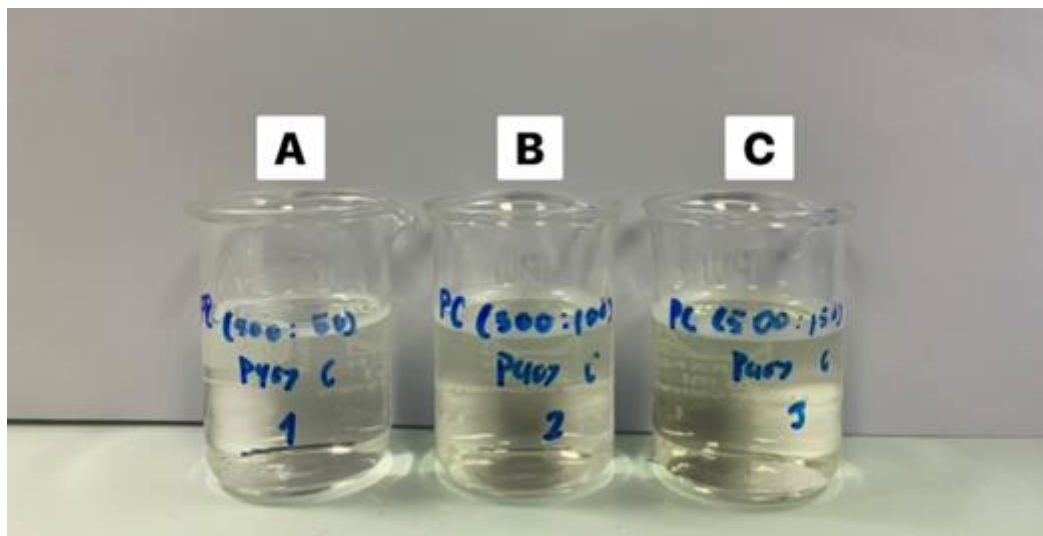
กราฟแสดงการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ P407 - FA conjugate



รูปที่ 28 แสดงขนาดของอนุภาคที่เตรียมจาก P407 - FA conjugate ขนาด 50, 100 และ 150 mg



รูปที่ 29 แสดง zeta potential ที่เตรียมจาก P407 - FA conjugate ขนาด 50,100 และ 150 mg



รูปที่ 30 ลักษณะทางกายภาพของกลุ่มที่มี Poloxamer 407 : P407 - FA conjugate โดย P407 : P407 - FA conjugate 500 mg : 50 mg (A), P407 : P407 - FA conjugate 500 mg : 100 mg (B), P407 : P407 - FA conjugate 500 mg : 150 mg (C)

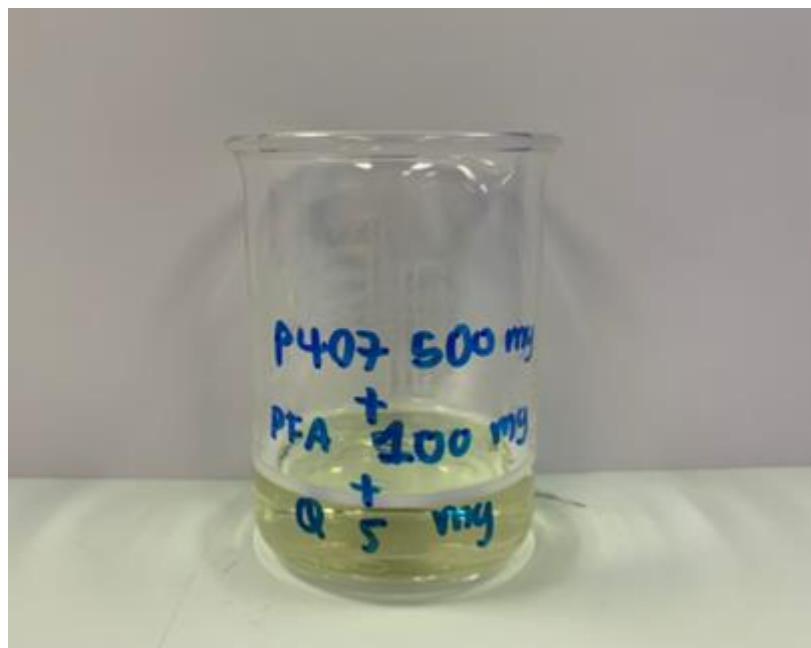
เมื่อพิจารณาขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค ค่า zeta potential ของ P407 - FA conjugate ในแต่ละสูตรพบว่ามีความใกล้เคียงกัน ลักษณะทางกายภาพจะเห็นได้ว่าจากรูป A มีลักษณะเป็นสารละลายใสสีเหลืองอ่อนน้อยกว่ารูป B และ C โดยรูป C มีลักษณะทางกายภาพเป็นสารละลายใสสีเหลืองเข้มที่สุดจากสามความเข้มข้น จึงทำการพิจารณาขนาดอนุภาคเนื่องจากขนาดอนุภาคมีความสำคัญต่อการเข้าสู่เซลล์ จากการวิจัยของ Zhang และคณะ พบว่าขนาดของ nanoparticle เป็นส่วนที่สำคัญในการเข้าสู่เซลล์เนื่องจาก ซึ่งขนาดอนุภาคที่เล็กจะมีความสามารถในการเข้าสู่เซลล์เนื่องจากได้ดีกว่าขนาดอนุภาคที่ใหญ่³² โดย P407 - FA conjugate 100 mg มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า P407 - FA conjugate 50 และ 150 mg ดังนั้น จึงเลือกใช้ปริมาณ P407 - FA conjugate ที่ 100 mg

ตอนที่ 4 : ศึกษาผลของ poloxamer 407 และ poloxamer 407 ที่คอนจูเกตกับ folic acid และการบรรจุยาเคอเซติน

ตารางที่ 4 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ P407 และ P407 - FA conjugate

Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% Entrapment
PCQ	37.01 ± 6.22	0.35 ± 0.01	-2.50 ± 1.63	65.13 ± 8.37

PCQ = Poloxamer 407 + Poloxamer 407-Folic acid conjugate + Quercetin



รูปที่ 31 ลักษณะทางกายภาพของกลุ่มที่มี Poloxamer 407 : P407 - FA conjugate : ยาเคอเซติน
(500 mg : 100 mg : 5 mg)

ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ poloxamer และ poloxamer 407 ที่คอนจูเกตกับ folic acid และการ load ยาเคอเซติน พบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง nanoparticle มีค่าเท่ากับ 37.01 ± 6.22 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสม มีการกระจายของอนุภาคค่อนข้างต่ำ และมีความสามารถในการกักเก็บยาอยู่ที่ 65.13 ± 8.37 และจากรูปที่ 31 แสดงถึงลักษณะทางกายภาพโดยมีลักษณะเป็นสารละลายใสสีเหลืองอ่อน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาพัฒนาระบบนำส่งยา polymeric micelle ที่ประกอบไปด้วย Poloxamer 407 และ Poloxamer 407-Folic acid conjugate ในการก่อตัวเป็น polymeric micelle เพื่อนำส่งยาเคอเซติน ไปยังเซลล์มะเร็งตับอย่างจำเพาะเจาะจง จากผลการวิเคราะห์สารที่คอนจูเกตระหว่าง Poloxamer 407 และ Folic ที่สังเคราะห์ขึ้นพบว่าสารที่สังเคราะห์ขึ้นมีการคอนจูเกตกันระหว่างสองสารซึ่งสามารถยืนยันได้จากผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ของสารตั้งต้นและสารที่สังเคราะห์ขึ้น นอกจากนี้ผลการตรวจสอบจาก FTIR และ SEM ในการดูลักษณะสัณฐานวิทยา มีผลสอดคล้องกันถึงการเปลี่ยนแปลงของสารที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารตั้งต้นที่ใช้ในการเตรียม ในส่วนของการเตรียมและประเมินคุณสมบัติของระบบนำส่งยา polymeric micelle ได้แก่ ขนาดของอนุภาค, การกระจายตัวของอนุภาค, zeta potential และ % entrapment efficiency โดยในการเตรียมตำรับจาก Poloxamer 407 ขนาดอนุภาคเล็กลงเมื่อใช้ปริมาณพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น โดยขนาดอนุภาคที่ใช้ Poloxamer 407 100 mg มีความแตกต่างกับ Poloxamer 407 750 และ 1000 mg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การกระจายของขนาดอนุภาคใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้นในส่วนของ Zeta potential มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ใช้ Poloxamer 407 100 และ 200 mg เทียบกับ 500, 750, 1000 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นเตรียมระบบนำส่งที่บรรจุยาเคอเซติน เพื่อประเมิน % entrapment efficiency ร่วมด้วยในการเลือกสูตรที่เหมาะสม พบว่าหลังจากบรรจุยา ขนาดของอนุภาคและ zeta potential ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะเห็นว่าหลังจากทำการโหลดยาขนาดของอนุภาคที่เกิดขึ้นในทุกสูตรความเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดก่อนโหลดยา การกระจายขนาดของอนุภาคมีความใกล้เคียงกัน แม้ว่า Poloxamer 407 100, 200 และ 1000 mg จะบรรจุยาได้ดีแต่ขนาดอนุภาคไม่อยู่ในช่วงอนุภาคนาโนซึ่งการพัฒนาระบบนำส่งยาต้องพิจารณาขนาดอนุภาคของระบบนำส่งเพื่อประสิทธิภาพในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ซึ่งพบว่า Poloxamer 407 500 และ 750 mg มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงอนุภาคนาโนคือ 91.43 ± 59.51 และ 86.41 ± 36.88 nm ตามลำดับ จึงเปรียบเทียบความสามารถบรรจุยา Poloxamer 500 mg สามารถบรรจุยาได้ดีกว่า 750 mg เท่ากับ 74.37 ± 17.72 และ 67.65 ± 6.98 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกสูตรที่เหมาะสมคือ สูตรที่ใช้ P407 500 mg จากการศึกษาค้นคว้าผลการเลือกสูตร

Poloxamer 407-Folic acid conjugate ที่เหมาะสมมาใช้ทำเป็น polymeric micelle ร่วมกับ Poloxamer 407 พบว่า ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและ zeta potential ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากขนาดของอนุภาคมีความสำคัญต่อการเข้าเซลล์ ดังนั้น Poloxamer 407-Folic acid conjugate 100 mg ซึ่งมีขนาดอนุภาคเล็กที่สุดจากทั้งสามสูตร คือ 31.86 ± 17.23 nm จึงเป็นสูตรที่เหมาะสมที่นำมาใช้ครั้งนี้

ดังนั้น ระบบนำส่งยาในรูปแบบ polymeric micelle ที่มีการใช้ Poloxamer 407 ร่วมกับการคอนจูเกต ด้วย folic acid เมื่อประเมินถึงคุณสมบัติทางกายภาพพบว่า มีขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วงอนุภาคนาโนที่เหมาะสมและมีความสามารถในการกักเก็บปริมาณยาได้ถึง 65.13 ± 8.37 แต่ยังไม่สามารถประเมินถึงประสิทธิภาพในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะเจาะจง เนื่องจากยังไม่ได้มีการทดสอบในเซลล์ จึงอาจเป็นแนวทางในการดำเนินการวิจัยต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

1. แพทย์หญิงสุพัตรา ศรีวณิชชากร, อรรถเกียรติ กาญจนพิบูลวงศ์, ภาณุวัฒน์ คำวังสง่า, แก้วทา ส. รายงานสถานการณ์โรค NCDs เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้อง พ.ศ. 2562. สำนักพิมพ์อักษรกราฟิกแอนด์ดีไซน์: กลุ่มเทคโนโลยีระบาดวิทยา และมาตรการชุมชน กองโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2563.
2. ชัยญานุช พะลัง, หนูนวล ป. การสนับสนุนทางสังคมและการปรับตัวของผู้ป่วยมะเร็งที่มารับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. วารสารโรคมะเร็ง. 2563;2:62-4.
3. สุทธนะ ว. ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์: กลไกการออกฤทธิ์. ศรีนครินทร์เวชสาร. 2556:567-77.
4. Information NCfB. Quercetin 2021 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin#section=Solubility>.
5. NATHIYA S, DURGA M, T D. QUERCETIN, ENCAPSULATED QUERCETIN AND ITS APPLICATION- A REVIEW. Int J Pharm Pharm Sci. 2014;6(10).
6. รังสิมาวงศ์ ว. พอลิเมอร์ไมเซลล์เพื่อการนำส่งยา: การบรรจุยาด้วยวิธีทางกายภาพและปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพ POLYMERIC MICELLES FOR DRUG DELIVERY: DRUG LOADING BY PHYSICAL ENTRAPMENT AND FACTORS AFFECTING ITS EFFICIENCY. ไทยโภชยนิพนธ์ Thai Bulletin of Pharmaceutical Science (TBPS). 2557;9:62-73.
7. ธีรทัศน์ กันโสม, โอปณะโสภิต ป. พอลิเมอร์ไมเซลล์สำหรับนำส่งยาสู่นี้องอกเป้าหมาย. Thai bulletin pharmaceutical sciences. 2562;14:13-25.
8. Butt AM, Mohd Amin MC, H K. Synergistic effect of pH-responsive folate-functionalized poloxamer 407-TPGS-mixed micelles on targeted delivery of anticancer drugs. Int J Nanomedicine. 2015;10:1321-34.
9. เหล่าภัทรเกษม พ. บทบาทของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการป้องกันและรักษามะเร็ง. 2548;20:180-9.
10. แผนบริหารการสอนประจำบทที่ 4 ชีวเคมีของโรคมะเร็ง. p. 75-102.
11. Tang S-M, Deng X-T, Zhou J, Li Q-P, Ge X-X, Miao L. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020;121:109604.
12. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. Trends in Food Science & Technology. 2016;56:21-38.

13. Ghezzi M, Pescina S, Padula C, Santi P, Del Favero E, Cantù L, et al. Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions. *Journal of Controlled Release*. 2021;332:312-36.
14. Mauro Almeida, Mariana Magalhães, Francisco Veiga, Figueiras A. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *Journal of Polymer Research*. 2017.
15. Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th edition. Raymond C Rowe PJS, Marian E Quinn, editor. Gurnee, USA: Pharmaceutical Press.
16. Biswas S, Kumari P, Lakhani PM, Ghosh B. Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;83:184-202.
17. Gioffredi E, Boffito M, Calzone S, Giannitelli SM, Rainer A, Trombetta M, et al. Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications. *Procedia CIRP*. 2016;49:125-32.
18. Gilles Dumortier, Jean Louis Grossiord, Florence Agnely, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*. 2006;12:2709-28.
19. โรจนราชา กตธ. โฟเลต: จากวิตามินสู่การพัฒนา (Folate: from vitamin to drug development). *วารสาร ไทยโภชนาการ*. 2549;3:1-15.
20. Saxena V, MD H. Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:713-21.
21. Nischal Koirala, Dola Das, Ehsan Fayazzadeh, Sanghamitra Sen, Andrew McClain, Judit E. Puskas, et al. Folic acid conjugated polymeric drug delivery vehicle for targeted cancer detection in hepatocellular carcinoma. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2019;107(11):2522-35.
22. Narmani A, Rezvani M, Farhood B, Darkhor P, Mohammadnejad J, Amini B, et al. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug Dev Res*. 2019;80:404-24.

23. Yan Zhang, Hui Zhang, Wenbin Wu, Fuhong Zhang, Shi Liu, Rui Wang, et al. Folate-targeted paclitaxel-conjugated polymeric micelles inhibits pulmonary metastatic hepatoma in experimental murine H22 metastasis models. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:2019-30.
24. Mohamed MA, Jaafar J, Ismail AF, Othman MHD, Rahman MA. Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In: Hilal N, Ismail AF, Matsuura T, Oatley-Radcliffe D, editors. *Membrane Characterization*: Elsevier; 2017. p. 3-29.
25. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope): ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา; 2016 [Available from: <http://science.buu.ac.th/part/mc/index.php/service-tools/sem.html>].
26. Stains for TLC Plates: SiliCycle; 2022 [Available from: <https://www.silicycle.com/faq/thin-layer-chromatography/stains-for-tlc-plates>].
27. Alghazwat O, Talebzadeh S, Oyer J, Copik A, Liao Y. Ultrasound responsive carbon monoxide releasing micelle. *Ultrason Sonochem*. 2021;72:105427-.
28. IR Spectrum Table & Chart: Merck KGaA, Darmstadt, Germany; 2022 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>].
29. Jiraphong Suksiriworapong TR, Atitaya A-gomol, Varaporn Buraphacheep Junyaprasert, Doudngdaw Chantasart. Development and Characterization of Lyophilized Diazepam-Loaded Polymeric Micelles. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2014;15:52-64.
30. Maria Homs GC, Marta Monge, Daniel Morales, Conxita Solans. Influence of polymer concentration on the properties of nano-emulsions and nanoparticles obtained by a low-energy method. *Colloids and surfaces A*. 2017.
31. Giorgia Adamo SC, Giulio Gherzi,. Functionalization of nanoparticles in specific targeting and mechanism releas. Elsevier. 2017:57-80.
32. Mingming Zhang SG, Dongjuan Yang, Yan Fang, Xiaojie Lin, Xuechao Jin, Yuli Liu, Xiu Liu, Kexin Su, Kai Shi. Influencing factors and strategies of enhancing nanoparticles into tumors in vivo. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(8):2265-85.

ภาคผนวก

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ

การเตรียมและการประเมินพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุเคอเซตินโดยใช้ poloxamer 407 ที่ถูก
คอนจูเกต

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 26 มิถุนายน 2564 ถึง 11 เมษายน 2565

ระยะเวลาดำเนินการ 10 เดือน ตั้งแต่วันที่ 26 มิถุนายน 2564 ถึง 11 เมษายน 2565

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 15,000 บาท เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2565

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้ จริง	จำนวนคงเหลือ/ เกิน
1.ค่าอุปกรณ์สำหรับ ปฏิบัติการ	1,500 บาท	475 บาท	เหลือ 1,025 บาท
2.ค่าสารเคมีและวัตถุดิบ	11,000 บาท	10,000 บาท	เหลือ 1,000 บาท
3.ค่าไปสเตอร์	500 บาท	200 บาท	เหลือ 300 บาท
4.ค่าพิมพ์เอกสาร	500 บาท	300 บาท	เหลือ 300 บาท
5.ค่าวิทยานิพนธ์	1,500 บาท	1,800 บาท	เกิน 300 บาท
รวม	15,000 บาท	12,775 บาท	เหลือ 2,225 บาท

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย