



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตเพื่อนำส่งแอลฟา-แมนังโกสติน
เข้าสู่เซลล์มะเร็ง

Development of folate conjugated polymeric micelles for cancer cell
targeted delivery of alpha-mangostin

โดย

นสภ. สรिता เจริญศักดิ์	61210003
นสภ. เจนจิรา เทพณรงค์	61210012

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2565

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตเพื่อนำส่งแอลฟา-แมนโกสติน
เข้าสู่เซลล์มะเร็ง

Development of folate conjugated polymeric micelles for cancer cell
targeted delivery of alpha-mangostin

โดย

นสภ. สรिता เจริญศักดิ์	61210003
นสภ. เจนจิรา เทพณรงค์	61210012

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2565
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

สาร α -mangostin เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยจากฤทธิ์ต้านมะเร็ง ดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนา ระบบนำส่งเพื่อนำส่งสาร α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็ง โดยในโครงการงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตโดยศึกษาระบบนำส่งที่ประกอบไปด้วย TPGS ที่เชื่อมต่อกับ folic acid เทียบกับระบบนำส่งที่ประกอบไปด้วย poloxamer 188 (P188) ที่เชื่อมต่อกับ folic acid เพื่อหาบบนำส่งที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการนำส่ง α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็ง

คณะผู้จัดทำหวังว่าโครงการงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิชา 791591 โครงการงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 จะเป็นข้อมูลความรู้ที่ผู้อ่านสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อยอดได้ทั้งด้านสารสำคัญทางพิษศาสตร์ของมั่งคุดและการพัฒนาระบบนำส่งเพื่อนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งในอนาคตต่อไป

สรिता เจริญศักดิ์

เจนจิรา เทพณรงค์

15 มีนาคม 2566

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ปีการศึกษา 2565

เรื่อง การพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโพลีเพปไทด์เพื่อนำส่งแอลฟา-แมนโกสตินเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|---------------------------|------|----------|
| 1. นสภ. สรिता เจริญศักดิ์ | รหัส | 61210003 |
| 2. นสภ. เจนจิรา เทพณรงค์ | รหัส | 61210012 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญ.ศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์
2. ภก.รศ.ดร.ฉัตรพิชญ์ สุขงกช
3. ญ.ศ.ดร.ชฎาพร พรหมปัญญา

บทคัดย่อ

การศึกษาการพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโพลีเพปไทด์เพื่อนำส่ง α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็งนี้ได้แบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วน คือ ขั้นตอนการสกัดสาร α -mangostin จากส่วนเปลือกของมังคุด และขั้นตอนการสังเคราะห์สารพอลิเมอร์ที่เชื่อมต่อกับ folic acid เพื่อใช้เป็นระบบนำส่ง α -mangostin

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกมังคุดเมื่อนำมาสกัดแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึก และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ^1H , ^{13}C NMR และเทคนิค HPLC ได้สาร α -mangostin 75.05 mg (6.40%) ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 98% เหมาะสำหรับการศึกษาระบบนำส่งในขั้นตอนถัดไป จากนั้นศึกษาการสังเคราะห์ conjugated polymer โดยทดลองใช้พอลิเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ poloxamer 188 (P188) และ d- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) เชื่อมต่อกับ folic acid ด้วยปฏิกิริยา esterification ติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย ^1H NMR พบว่า conjugate folic acid-P188 (24.93%) ปรากฏสัญญาณ 4.57 ppm ซึ่งบ่งชี้การเกิด conjugation ด้วยเอสเทอร์ ในขณะที่สาร folic acid-TPGS ไม่พบสัญญาณการเกิดพันธะดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำเฉพาะ conjugate folic acid-P188 ไปศึกษาพัฒนาสูตรตำรับโดยระบบตัวทำละลาย ethanol:propylene glycol:water อัตราส่วน 37.72:37.72:24.56 (EPW 70) และ ethanol:propylene glycol:water อัตราส่วน 32.35:32.35:35.3 (EPW 60) วัดขนาดอนุภาคด้วย Dynamic Light Scattering (DLS) particle size analyzer พบว่าในระบบตัวทำละลาย EPW 70 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 156.87 ± 3.70 nm ซึ่งมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่ใช้ระบบตัวทำละลาย EPW 60 (165.97 ± 0.84 nm) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อย่างไรก็ตามขนาดที่ได้ยังไม่เหมาะสมสำหรับนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งจึงต้องมีการพัฒนาโดยอาจเปลี่ยนพอลิเมอร์ชนิดอื่นเพื่อให้ได้ไมเซลล์ที่มีขนาดเล็กลง

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ภาณุ.ผศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์

Senior Project Academic Year 2022

: Development of folate conjugated polymeric micelles for cancer cell targeted delivery of alpha-mangostin

By

1. Miss. Sarita Chatoensak ID 61210003
2. Miss. Janejira Thepnarong ID 61210012

Advisor:

1. Assist. Prof. Dr. Thanchanok Sirirak, Ph.D
2. Assoc. Prof. Dr. Thirapit Subongkot, Ph.D
3. Dr. Chadaporn Prompanya, Ph.D

ABSTRACT

This study aims to development of folate-conjugated polymeric micelles for cancer cell-targeted delivery of alpha-mangostin. The study was divided into two parts: the first part is the extraction of α -mangostin from the mangosteen pericarp and the second part is the synthesis of folic acid conjugated to poloxamer 188 (P188) to deliver α -mangostin into the cancer cells.

The study found that the methanol extract from the mangosteen pericarp was extracted by chromatography. Purified by the crystallization method. α -mangostin was identified by ^1H , ^{13}C NMR and HPLC techniques, the percent yield of α -mangostin 75.05 mg (6.40%) with a purity greater than 98%, making it suitable to use in the next step of delivery system studies. Next, the conjugated polymer synthesis was studied by using two polymers, P188 and d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS), conjugated folic acid by esterification reaction. Following the reaction with ^1H NMR, conjugate folic acid-P188 (24.93%) showed a signal of 4.57 ppm, indicating ester conjugation, whereas folic acid-TPGS showed no such bonding signal. Therefore, this study uses the conjugate folic acid-P188, which was studied and formulated with a solvent system. Apart from this, we also compare ethanol: propylene glycol: water, ratio 37.72:37.72:24.56 (EPW 70), and ethanol: propylene glycol: water, ratio 32.35:32.35:35.3 (EPW 60). Particle sizes were measured by a Dynamic Light Scattering (DLS) particle size analyzer. The system, which uses the EPW 70 solvent system, had

an average particle size of 156.87 ± 3.70 nm, which was significantly smaller than that of the EPW 60 solvent system (165.97 ± 0.84 nm). However, the size obtained is still not suitable for drug delivery into cancer cells. As a result, the development of other polymers may be used to obtain smaller micelles.

Major Advisor: Assist. Prof. Dr. Thanchanok Sirirak, Ph.D.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตเพื่อนำส่ง α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็ง สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ภาณุ.ผศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักโครงการวิจัย และ ภก.รศ.ดร.กิริพิทย์ สุปงกช และ ภาณุ.ดร.ชฎาพร พรหมปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการวิจัย ที่คอยให้ความรู้ คำปรึกษา และข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือ และสนับสนุนงบประมาณในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

สรีตา เจริญศักดิ์

เจนจิรา เทพณรงค์

15 มีนาคม 2566

เรื่อง	สารบัญ	หน้า
ปกใน		ก
คำนำ		ข
บทคัดย่อ		ค
Abstract		ง
กิตติกรรมประกาศ		ช
สารบัญ		๗
สารบัญตาราง		ฅ
สารบัญภาพ		ญ
บทที่ 1 บทนำ		1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง		3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย		8
บทที่ 4 ผลการวิจัย		13
บทที่ 5 วิจารย์ผลการวิจัย		24
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย		26
เอกสารอ้างอิง		27
ภาคผนวก		29

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 ^1H (400 MHz, CDCl_3) และ ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) NMR spectra ของผลึก C-1 เทียบกับสาร α -mangostin	17
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์การสกัด α -mangostin ด้วย HPLC	18
ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีตา	23
ตารางที่ 4 แสดงผลการทดลองของขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ ค่าศักย์ซีตา	32

สารบัญรูป

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 ผลการสกัด α -mangostin จากเปลือกมังคุด	13
รูปที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย Thin Layer Chromatography ของสารสกัด แต่ละชั้นเทียบกับสารมาตรฐาน	14
รูปที่ 3 ผลการตกผลึกของสารสกัด fraction C	15
รูปที่ 4 ผลการตกผลึกของสารสกัด fraction D	15
รูปที่ 5 ^1H NMR spectrum ของผลึก C-1 (400 MHz; CDCl_3)	16
รูปที่ 6 ^{13}C NMR spectrum ของผลึก C-1 (100 MHz, CDCl_3)	16
รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของสาร α -mangostin	17
รูปที่ 8 ^1H NMR spectrum ของ conjugate folic acid-P188 (400 MHz; DMSO-d_6)	19
รูปที่ 9 ^1H NMR spectrum ของ folic acid (400 MHz; DMSO-d_6)	20
รูปที่ 10 ^1H NMR spectrum ของ poloxamer 188 (400 MHz; DMSO-d_6)	20
รูปที่ 11 ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ folic acid-P188	21
รูปที่ 12 ^1H NMR spectrum ของ conjugate folic acid-TPGS (400 MHz; DMSO-d_6)	21
รูปที่ 13 ^1H NMR spectrum ของ TPGS (400 MHz; DMSO-d_6)	22
รูปที่ 14 ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ folic acid-TPGS	22
รูปที่ 15 สาร C-1 ที่ได้จากการตกผลึก	30
รูปที่ 16 สาร conjugate folic acid-P188	30
รูปที่ 17 สาร conjugate folic acid-TPGS	31
รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของ folic acid	31

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มังคุด หรือ *Garcinia mangostana* Linn. วงศ์ Guttiferae เป็นพืชเศรษฐกิจของไทย โดยปกติการบริโภคมังคุดจะบริโภคเพียงส่วนเนื้อด้านใน และทิ้งส่วนเปลือก แต่จากการศึกษาพบว่าส่วนเปลือกของมังคุดมีสารสำคัญที่หลากหลาย ได้แก่ α -mangostin β -mangostin และ γ -mangostin เป็นต้น โดยจะพบ α -mangostin ปริมาณมากที่สุด ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยจากการศึกษาของ Yukihiro Akao และคณะ (2008) เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่า α -mangostin มีความสามารถในการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ในระยะ G1 และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis โดยการกระตุ้นผ่าน intrinsic pathway (1) แต่ด้วยคุณสมบัติทางเคมีของสาร α -mangostin ที่มีค่าการละลายและความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งต่ำจึงต้องมีการพัฒนาระบบนำส่งที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น จากการศึกษาของ Thi Kieu Trang Phan และคณะ (2020) พบว่าสาร α -mangostin ที่บรรจุในไลโปโซมมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งดีกว่าสาร α -mangostin อิสระ (2)

ระบบนำส่งที่ต่อกับ folic acid เป็นระบบการนำส่งที่คาดว่าจะมีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็ง เนื่องจากเซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่มีการกระจายของตัวรับโฟเลตมากกว่าในเซลล์เนื้อเยื่อปกติ ตัวอย่างเช่น เซลล์มะเร็งรังไข่ เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก จากการศึกษาของ Adeel Masood Butt และคณะ (2015) ที่มีการใช้ poloxamer 407 (P407)-vitamin E (TPGS) เป็นระบบนำส่งยา doxorubicin เข้าสู่เซลล์มะเร็งรังไข่ (SKOV3) พบว่า ระบบนำส่งที่มี folic acid (folic acid-P407-TPGS) เป็นส่วนประกอบ มีความพิษและมีความสามารถในการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งรังไข่ มากกว่าระบบนำส่งที่ไม่มี folic acid (P407-TPGS-DOX) (3)

คณะผู้จัดทำจึงพัฒนาสูตรตำรับเพื่อนำส่งสาร α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็ง โดยการศึกษาสูตรนำส่งที่ประกอบไปด้วย TPGS ที่เชื่อมต่อกับ folic acid เทียบกับระบบนำส่งที่ประกอบไปด้วย poloxamer 188 (P188) ที่เชื่อมต่อกับ folic acid

2. วัตถุประสงค์

- 2.1. เพื่อสกัดแยกสารมาตรฐาน α -mangostin จากเปลือกมังคุด
- 2.2. เพื่อพัฒนาสูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลต สำหรับนำส่ง α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็ง

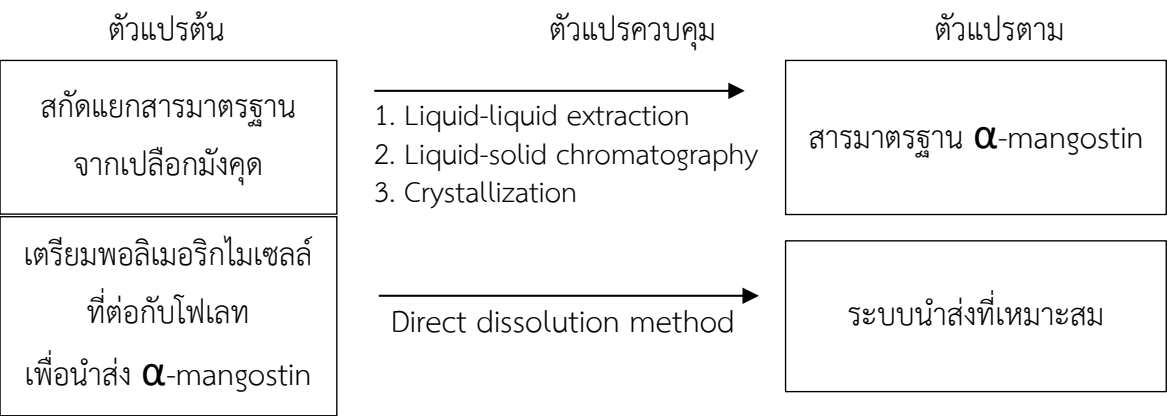
3. สมมติฐาน

- 3.1. สามารถสกัดแยกสารมาตรฐาน α -mangostin จากเปลือกมังคุดได้
- 3.2. สามารถพัฒนาสูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตเพื่อนำส่ง α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็งที่มีความคงตัวได้

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 4.1. ได้สารมาตรฐาน α -mangostin จากเปลือกมังคุด
- 4.2. ได้สูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตเพื่อนำส่ง α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็งที่เหมาะสม

5. กรอบแนวคิด



บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมังคุด (4, 5)

มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn. วงศ์ Guttiferae) มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้น สูง 10-12 m มีลักษณะเปลือกสีดำ มียางสีเหลือง ระบบรากเป็นรากแก้ว มีลักษณะใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว ขอบใบเรียบ ใบหนา ด้านหลังใบมีสีเขียวเข้มหรือ สีเขียวแกมเหลือง และเป็นมัน ดอกมีลักษณะเป็น unisexual-dioecious หรือ polygamous ออกที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง โดยกลีบเลี้ยงมีสีเขียวอมเหลืองและกลีบดอกมีสีแดง ผลเป็นแบบ berry เมื่อสุกจะมีสีม่วงเข้มหรือสีม่วงแกมน้ำตาล เปลือกหนาประมาณ 0.8-1 cm และผลจัดเป็นแบบ aril fruit โดยเนื้อเกิดจาก integument มีสีขาวใส อ่อนนุ่มคล้ายวุ้น ภายในผลมีเมล็ดคล้ายเปลือกหอย เปลือกหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลบางใส ผิวเมล็ดขรุขระและแตกได้ง่าย

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

- ส่วนของเนื้อ ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย
- ส่วนของเปลือก มีสารสำคัญ xanthone และ tannin โดย xanthone ที่โดดเด่นในมังคุด คือ α -mangostin และ γ -mangostin ซึ่งจะมีปริมาณมากในยางสีเหลือง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และในส่วนของ tannin มีฤทธิ์ทางยา คือ ฝาดสมาน
- ส่วนของน้ำมังคุด ช่วยปรับระดับภูมิคุ้มกันให้สมดุล โดยการหลั่ง interleukin I และ Tumor necrosis factor ช่วยยับยั้งการหลั่ง histamine

2. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดที่ได้จากเปลือกมังคุด

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดที่ได้จากเปลือกมังคุดด้านมะเร็ง

ในปี ค.ศ. 2020 Thi Kieu Trang Phan และคณะ (2) ได้ทำการศึกษาการปลดปล่อยและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสาร α -mangostin ที่บรรจุในไลโปโซม โดยการศึกษาได้นำสาร α -mangostin ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด บรรจุลงในไลโปโซมที่มี relatively high efficiency (55.3% $\pm$ 2.3%) แล้วศึกษาการปลดปล่อยยาในหลอดทดลอง ที่ pH 5.5 และ 7.4 เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าสารสกัด α -mangostin ที่บรรจุในไลโปโซมมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์ Hep-G2 ดีกว่าสารสกัด α -mangostin ที่ไม่บรรจุในไลโปโซมในช่วงหลังจาก 48 และ 96 ชั่วโมง จากผลการศึกษาคณะผู้จัดทำเสนอว่าการใช้ไลโปโซมสำหรับการนำส่ง α -mangostin เป็นวิธีการที่มีแนวโน้มจะทำให้การพัฒนา α -mangostin เป็นสารเคมีบำบัดที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคต

ในปี ค.ศ. 2016 Arina Novilla และคณะ (6) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่ได้จากเปลือกมังคุด (Mangosteen Peel Extract; MPE) และ α -mangostin โดยใช้ imatinib และ isotretinoin เป็น positive control และเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษา คือ leukemia cell lines (HL-60 และ K-562) และ normal lymphocyte cells ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า MPE มีความเป็นพิษต่อ HL-60 และ K-562 มากกว่า isotretinoin และ imatinib ตามลำดับ ส่วน α -mangostin มีความเป็นพิษต่อ HL-60 มากกว่า isotretinoin แต่มีความเป็นพิษต่อ K-562 น้อยกว่า imatinib และในการศึกษาความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งพบว่า MPE และ α -mangostin มีความจำเพาะต่อ HL-60 มากกว่า isotretinoin แต่ MPE และ α -mangostin มีความจำเพาะต่อ K-562 น้อยกว่า imatinib ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทั้ง MPE และ α -mangostin มีความพิษและจำเพาะต่อ HL-60 สูงกว่า isotretinoin จึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อ leukemia cell lines (HL-60) ได้

ในปีค.ศ. 2020 Chun-Shiang Lin และคณะ (7) ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งปากมดลูกของสาร β -mangostin โดยการศึกษาครั้งนี้ได้นำสาร β -mangostin ที่มี purity มากกว่าร้อยละ 96 มาศึกษาความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa, SiHa) โดยใช้ MTT assay และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความสามารถของสาร β -mangostin และ DMSO (control treatment) พบว่า สาร β -mangostin มีผลกับวัฏจักรของเซลล์ HeLa และ SiHa อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามสาร β -mangostin สามารถยับยั้งการเคลื่อนไหวของเซลล์ การยึดเกาะของเซลล์ การแสดงออกของ cytoskeletal actin ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ β -mangostin ยังมีผลยับยั้งการแสดงออกของ Integrin α V และ β 3 ลดการส่งสัญญาณการยึดเกาะของ Kinase/Src signaling ลดการเกิด nuclear translocation และ messenger RNA expression ของ AP-1 ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า β -mangostin มีศักยภาพในการต้านมะเร็งปากมดลูก

ในปี ค.ศ. 2008 Yukihiro Akao และคณะ (1) ได้ทำการศึกษาสารต้านมะเร็ง xanthenes ที่ได้จากเปลือกมังคุด โดย prenylated xanthenes ที่ได้จากเปลือกมังคุด ประกอบด้วย α -mangostin, β -mangostin, γ -mangostin และ methoxy- β -mangostin ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้านแบคทีเรีย และต้านมะเร็ง โดยการศึกษาจะมุ่งเน้นเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในมนุษย์ (human colon cancers DLD-1 cells) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า α -mangostin, β -mangostin และ γ -mangostin มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ DLD-1 ที่ความเข้มข้น 5 μ M ถึง 20 μ M และพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ DLD-1 มาจากฤทธิ์ของสารกลุ่ม

xanthenes ที่ไปยับยั้งการแสดงออกของ cyclins, CDC2 และ p27 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในวัฏจักรเซลล์ และฤทธิ์ของ α -mangostin และ β -mangostin ยับยั้งวัฏจักรเซลล์ระยะ G1 ส่วน γ -mangostin ยับยั้งวัฏจักรเซลล์ในระยะ S นอกจากนี้ α -mangostin ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis โดยการกระตุ้นผ่าน intrinsic pathway ตามกลไก down-regulation

3. ระบบการนำส่ง α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็ง

ในปี ค.ศ. 2021 Yedi Herdiana และคณะ (8) ได้ทำการศึกษาการนำส่ง α -mangostin ในรูปแบบ nanoparticle เพื่อต้านมะเร็งเต้านม โดยจากการศึกษาพบว่า α -mangostin มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง แต่มีปัญหาในเรื่องการละลายซึ่งส่งผลให้มีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายต่ำ ดังนั้นจึงต้องเพิ่มการละลายและความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ของ α -mangostin ในการพัฒนาเป็นยาใหม่ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า nanotechnology เป็นวิธีที่ดี เนื่องจากทำให้การรักษามีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยการเพิ่ม stability และ biocompatibility เมื่อเทียบกับยาปกติ และส่งผลให้ permeability, retention effect และความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ nanotechnology ยังช่วยให้การรักษามีความปลอดภัยมากขึ้นโดยการลดอาการข้างเคียงจากการขนส่งยาไปเฉพาะเซลล์มะเร็งที่กำหนด

ในปีค.ศ. 2019 Duy Toan Pham และคณะ (9) ได้ทำการศึกษาการนำส่ง α -mangostin โดยใช้ Crosslinked silk fibroin-based nanoparticles (FNPs) เพื่อเป็นยาเคมีบำบัด โดยจากการศึกษานี้บรรจุ α -mangostin ลงใน FNPs โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) หรือ polyethylenimine (PEI) เป็น crosslinker โดยเปรียบเทียบ 3 ตำรับ EDChigh-FNPs (ใช้ EDC:FNPs อัตราส่วน 1000:1), EDClow-FNPs (ใช้ EDC:FNPs อัตราส่วน 200:1), PEI-FNPs (ใช้ PEI:FNPs อัตราส่วน 1:1) ลักษณะที่พบ คือ เป็นอนุภาคทรงกลม ขนาดโดยเฉลี่ย 300 nm ประจุที่พื้นผิวอนุภาคจะอยู่ที่ -15 ถึง +30 mV ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของ crosslinker และระบบ FNPs ที่มี crosslinker จะมี entrapment efficiency เฉลี่ยร้อยละ 70 และ drug loading เฉลี่ยร้อยละ 7 และผู้วิจัยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR), X-ray Diffractometer (XRD) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) เพื่อยืนยันว่า α -mangostin ถูกบรรจุอยู่ใน FNPs ในส่วนของความสามารถในการละลายของ α -mangostin ที่บรรจุใน FNPs ดีกว่า α -mangostin อิสระถึงสามเท่า นอกจากนี้ในส่วนของประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งพบว่า α -mangostin ที่บรรจุใน FNPs ทั้ง 3 ตำรับมีผลกับการตายของเซลล์ Caco-2 (colorectal), MCF-7 (breast adenocarcinoma) จึงแสดงให้เห็นว่า α -mangostin ที่บรรจุใน FNPs มีศักยภาพสูงสำหรับการเป็นยาด้านมะเร็ง

4. การนำส่งสารไปยังเซลล์มะเร็งโดยใช้ระบบนำส่งที่เชื่อมต่อกับ folic acid

ในปี ค.ศ. 2015 Adeel Masood Butt และคณะ (3) ได้ทำการศึกษาการนำส่ง Doxorubicin (DOX) ไปยังเซลล์มะเร็ง โดยใช้ Poloxamer 407 (P407) และ Vitamin E TPGS (d- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate, TPGS) ในการนำส่ง DOX ไปยังเซลล์มะเร็งในรูปแบบ mixed micelle system encapsulating โดย poloxamers ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นพอลิเมอร์ ที่ได้จากการสังเคราะห์ระหว่าง polyethylene oxide (PEO) และ polypropylene oxide (PPO) เพื่อนำส่งยาที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำเข้าสู่เซลล์มะเร็ง และเพื่อป้องกันการถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นการเพิ่ม retention time ของยาในกระแสเลือด ในส่วนของ TPGS มีความสามารถในการนำมาทำเป็น micelles และเพิ่มความคงตัวของยาใน colloidal systems และนอกจากนี้ TPGS ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอกได้ และนอกจากนั้น การศึกษานี้ยังใช้ folic acid ในการทำหน้าที่ เป็น ligand บนผิวของ micelles เพื่อไปจับกับเซลล์เป้าหมาย โดยเฉพาะเซลล์ที่มี folic acid receptor เป็นจำนวนมาก จากการศึกษาความสามารถในการจับกับ DNA ของ DOX ด้วยเครื่อง fluorescent detector ที่ความยาวคลื่น excitation 471 nm และความยาวคลื่น emission 556 nm พบว่า P407-TPGS และ folic acid-P407-TPGS เพิ่มความสามารถในการจับกับ DNA ใน เซลล์มะเร็งรังไข่ (SKOV3) ร้อยละ 21 และ ร้อยละ 33 ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการจับ DNA ที่มากขึ้น จะเพิ่มการนำยาเข้าสู่เซลล์ และเพิ่ม retention time ของยาในเซลล์มากขึ้น และจากการศึกษาเปรียบเทียบการนำส่ง DOX ในระบบนำส่ง folic acid-P407-TPGS, P407-TPGS และการนำส่ง DOX อย่างอิสระ ในเซลล์มะเร็งรังไข่ (SKOV3) พบว่าการนำส่ง DOX ในระบบนำส่ง folic acid-P407-TPGS มี IC_{50} เท่ากับ $3.6 \pm 0.4 \mu M$ ในระบบนำส่ง P407-TPGS มี IC_{50} เท่ากับ $4.8 \pm 0.5 \mu M$ และการนำส่ง DOX อย่างอิสระ มี IC_{50} เท่ากับ $7.7 \pm 0.4 \mu M$ จึงสามารถสรุปได้ว่า ระบบนำส่ง folic acid-P407-TPGS มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ (SKOV3) มากกว่า ระบบนำส่ง P407-TPGS และการนำส่ง DOX อย่างอิสระตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2011 Yu Mi และคณะ (10) ได้ศึกษาการพัฒนาการพัฒนาระบบนำส่งยาแบบ micelles โดยใช้โพลิเมอร์สังเคราะห์ใหม่เป็น TPGS2k conjugated folic acid โดยการทดลองนี้ได้บรรจุยา docetaxel และนำส่งยาไปยังเซลล์ MCF7 (breast cancer cells) ผลการศึกษาพบว่า TPGS2k micelles ขณะบรรจุยาและไม่บรรจุยามีขนาดประมาณ 30 nm และ TPGS2k conjugated folic acid micelles ขณะบรรจุยาามีขนาด 50 nm ค่า encapsulation efficiency ของ TPGS2k micelles และ TPGS2k conjugated folic acid micelles มีค่าเท่ากับร้อยละ 78.11 และร้อยละ 66.33 ตามลำดับ และยังพบว่า TPGS2k micelles มีค่า critical micelle concentration (CMC) เท่ากับ 0.0219 mg/mL ซึ่งน้อยกว่า traditional micelles with TPGS (CMC เท่ากับ 0.2 mg/mL)

แสดงว่า TPGS2k micelles มีความคงตัวดีกว่า traditional micelles with TPGS และเมื่อนำ TPGS2k conjugated folic acid micelles ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 พบว่าค่า IC_{50} น้อยกว่าค่าของ TPGS2k micelles ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าการเชื่อมต่อของ TPGS2k กับ Folic acid จะช่วยเสริมฤทธิ์ยา ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 มากขึ้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

1.1. สารเคมีและวัสดุ

- 1.1.1. Ethanol; Merck, Germany
- 1.1.2. n-Hexane; Honeywell, South Korea
- 1.1.3. Ethyl acetate; Scharlab S.L., Spain
- 1.1.4. Silica gel; Merck, Germany
- 1.1.5. Methanol; VWR International, France
- 1.1.6. Purified water
- 1.1.7. Folic acid; Tokyo chemical industry, Japan
- 1.1.8. Poloxamer 188 ; Kolliphor, USA
- 1.1.9. TPGS; Antares health Product, USA
- 1.1.10. Dimethyl sulfoxide (DMSO); Carlo Ebra Reagents, France
- 1.1.11. 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI); Tokyo chemical industry, Japan
- 1.1.12. Dialysis tubing; sigma aldrich, US
- 1.1.13. Propylene glycol; Chemipan, Malaysia

1.2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.2.1. Deciscator; นำเข้าโดย fortune scientific, Thailand
- 1.2.2. Evaporator; Kittisit Enterprise, Thailand
- 1.2.3. Sonicator; WiseClean, Germany
- 1.2.4. HPLC Agilent 1260 Infinity Quaternary Pump VL (G1311C); Agilent, US
- 1.2.5. VertiSep™ C₁₈ HPLC column (250 x 4.6 mm, 5 μm); Vertical, Thailand
- 1.2.6. Freeze dryer; Biobase, China
- 1.2.7. NMR Bruker Avance III HD 400 MHz spectrometer; Bruker, Germany
- 1.2.8. UV spectrophotometer U-2900; Hitachi High Technologies, America
- 1.2.9. Zetasizer Nano-ZS; Malvern Instrument, UK

2. วิธีวิจัย

2.1. การสกัดสาร α -mangostin (2)

- 2.1.1. สกัดเปลือกมังคุดแห้งที่บดเป็นผง น้ำหนัก 1,173.24 g โดยการหมักด้วยตัวทำละลาย ethanol 3 L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรอง แล้วทำการหมักตัวอย่างซ้ำด้วย ethanol อีก 24 ชั่วโมง ทำการสกัดซ้ำ จนกระทั่ง สารละลายสีจางลงแล้วนำสารสกัดที่ได้มาทำให้แห้ง ด้วยวิธีการลดความดัน (evaporator)
- 2.1.2. นำสารสกัด ethanol จากเปลือกมังคุดที่ได้ มากระจายใน deionized water โดยเครื่อง sonicate จากนั้น partition ด้วย n-hexane แยกสารสกัดชั้นน้ำและ n-hexane ออกจากกัน จากนั้น partition ซ้ำจนกระทั่งสารละลายชั้น n-hexane ใส แล้วนำชั้นน้ำมา partition ต่อด้วย ethyl acetate จนสารละลายชั้นน้ำใส นำสารละลายอินทรีย์ที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธีการลดแรงดันได้สารสกัด n-hexane และ ethyl acetate
- 2.1.3. แยกสารโดยใช้ Dry column vacuum chromatography
 - 1) นำสารสกัด ethyl acetate extract มาละลายด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดบดผสมกับ silica gel จากนั้นนำมาทำให้แห้งและเก็บไว้ใน desiccator เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
 - 2) บรรจุ silica gel ลงใน column จากนั้นโปรยสารสกัดที่เตรียมจาก 2.1.3. ข้อที่ 1 ลงบนผิวหน้าของ silica gel ใน column ชะด้วยตัวทำละลาย n-hexane : ethyl acetate ไล่ความเข้มข้นจากอัตราส่วน 10:0 ไปยัง 5:5 จากนั้นนำสารสกัดแต่ละชั้นมาทำให้แห้งและชั่งน้ำหนัก นำสารสกัดแต่ละชั้นมาติดตามองค์ประกอบทางเคมีด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) เทียบกับสารมาตรฐาน α -mangostin โดยใช้ระบบตัวทำละลาย n-hexane:ethyl acetate ในอัตราส่วน 3:2 ติดตามด้วย UV 254 nm จากนั้นนำสารสกัดชั้นที่มีสาร α -mangostin เป็นองค์ประกอบมาตกผลึกด้วยตัวทำละลาย n-hexane และ ethyl acetate ล้างผลึกที่ได้ด้วย n-hexane ที่เย็น จากนั้นทำการตกผลึกซ้ำ 2-3 ครั้ง จนได้สาร α -mangostin ที่บริสุทธิ์ นำผลึกที่ได้ทำให้แห้ง บันทึกน้ำหนัก ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์

2.2. การพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารสกัด α -mangostin (2, 11)

สารบริสุทธิ์ α -mangostin พิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารโดยเปรียบเทียบ retention time กับสารมาตรฐาน α -mangostin ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ HPLC

Agilent 1260 Infinity Quaternary Pump VL (G1311C) ประกอบด้วย UV spectrophotometer ในการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสาร โดยใช้ stationary phase: VertiSep™ C₁₈ HPLC column (250 x 4.6 mm, 5 μm) mobile phase เป็น MeOH:H₂O ในอัตราส่วน 95:5 และฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 10 μL ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส และใช้เทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) โดยวัดทั้ง ¹H NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃) และ ¹³C NMR spectrum (100 MHz, CDCl₃) แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ spectrum ของสาร α-mangostin จากการศึกษาของ Zhu Xiuzhi และคณะ (12)

2.3. การสังเคราะห์ระบบนำส่งด้วย conjugate folic acid-P188 และ conjugate folic acid-TPGS ดัดแปลงจากจากการศึกษาของ Adeel Masood Butt และคณะ (3)

2.3.1. การสังเคราะห์ conjugate folic acid-P188

- 1) ละลาย folic acid ปริมาณ 0.8153 g ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 30 mL ใน Two-neck flask และคนผสมอย่างต่อเนื่องทิ้งไว้ข้ามคืน
- 2) เติม 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) ปริมาณ 0.9970 g ลงในสารละลาย และคนผสมสารละลายข้ามคืนภายใต้สภาวะก๊าซไนโตรเจน และหลีกเลี่ยงการสัมผัสแสง
- 3) เติม Poloxamer 188 (P188) ปริมาณ 9.4565 g ลงในสารละลาย และคนผสมสารละลาย 24 ชั่วโมงติดต่อกัน ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน และหลีกเลี่ยงการสัมผัสแสง
- 4) หลังจากทำปฏิกิริยากันเสร็จสมบูรณ์ ทำ dialyzed สารละลายด้วย deionized water เป็นเวลา 5 วันเพื่อกำจัด folic acid ที่ไม่ทำปฏิกิริยา
- 5) นำ dialyzed solution ทำแห้งด้วยวิธีการ freeze dried เพื่อทำการ conjugate folic acid กับ P188 วิเคราะห์และตรวจสอบการเกิด conjugation ด้วย ¹H NMR spectra เปรียบเทียบระหว่างสารบริสุทธิ์ P188, folic acid และ conjugate folic acid-P188
- 6) คำนวณระดับการแทนที่โดยการอิงจากความเข้มข้นจากข้อมูล ¹H NMR spectra สามารถวัดได้จากการหาค่า total integral values ของ 5- folic acid aromatic protons ที่บริเวณ 6.5-9.0 ppm หารด้วย methyl group protons ของ polypropylene oxide (PPO) ที่ 1.05 ppm

$$\text{Degree of substitution (\%)} = \frac{\text{Total integral values at 6.5–9.0 ppm}}{\text{integral values at 1.05 ppm}} \times 100$$

- 7) พิสูจน์คุณภาพของ conjugate folic acid-P188 ด้วยเทคนิค UV spectrophotometry โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน folic acid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนในตัวทำละลาย DMSO จำนวน 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0650, 0.0325,

0.0195 และ 0.0098 mg/mL และบันทึกค่าการดูดกลืนของแสง UV ที่ความยาวคลื่น 360 nm เพื่อทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนของแสง UV และความเข้มข้นของสารละลาย

- 8) conjugate folic acid โดยเตรียมตัวอย่าง 10 mg ละลายด้วย DMSO วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 360 nm และบันทึกผล
- 9) คำนวณ folic acid ที่อยู่ใน conjugate ด้วยน้ำหนัก ตามสมการนี้

$$\text{Conjugation of folic acid (wt \%)} = \frac{\text{Weight of FA in conjugate}}{\text{Total weight of conjugate}} \times 100$$

2.3.2. การสังเคราะห์ conjugate folic acid-TPGS

- 1) ละลาย folic acid ปริมาณ 1.5718 g ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 30 mL ใน Two-neck flask และคนผสมทิ้งไว้ข้ามคืน
- 2) เติม 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) ปริมาณ 0.8661 g ลงในสารละลาย และคนผสมสารละลายข้ามคืนภายใต้ก๊าซไนโตรเจน และหลีกเลี่ยงการสัมผัสแสง
- 3) เติม TPGS ปริมาณ 7.6422 g ลงในสารละลาย และคนผสมสารละลาย 24 ชั่วโมง ติดต่อกัน ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน และหลีกเลี่ยงการสัมผัสแสง
- 4) หลังจากทำปฏิกิริยากันเสร็จสมบูรณ์ ทำ dialyzed สารละลายด้วย deionized water เป็นเวลา 5 วันเพื่อกำจัด folic acid ที่ไม่ทำปฏิกิริยา
- 5) นำ dialyzed solution ทำแห้งด้วยวิธีการ freeze dried วิเคราะห์และตรวจสอบการเกิด conjugation ด้วย ^1H NMR spectra เปรียบเทียบระหว่างสารบริสุทธิ์ TPGS, folic acid และ conjugate folic acid-TPGS
- 6) คำนวณระดับการแทนที่โดยการอิงจากความเข้มข้นจากข้อมูล ^1H NMR spectra สามารถวัดได้จากการหาค่า total integral values ของ 5-folic acid aromatic protons ที่บริเวณ 6.5-9.0 ppm หาค่าด้วย integral values ของ TPGS ที่บริเวณ 0.82 ppm

$$\text{Degree of substitution (\%)} = \frac{\text{Total integral values บริเวณ 6.5–9.0 ppm}}{\text{integral values บริเวณ 0.82 ppm}} \times 100$$

- 7) พิสูจน์คุณภาพของ conjugate folic acid-TPGS โดยใช้ UV spectrophotometer โดยเตรียมสารละลาย folic acid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนใน DMSO จำนวน 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0650, 0.0325, 0.0195 และ 0.0098 mg/mL และบันทึกค่าการดูดกลืนของแสง UV ที่ความยาวคลื่น 360 nm เพื่อทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนของแสง UV และความเข้มข้นของสารละลาย

- 8) วัดความเข้มข้นของ conjugate folic acid และตัวอย่าง 10 mg ที่ละลาย DMSO ด้วย UV Spectrophotometer โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 360 nm และบันทึกผล
- 9) คำนวณ folic acid ที่อยู่ใน conjugate ด้วยน้ำหนัก ตามสมการนี้

$$\text{Conjugation of folic acid (wt \%)} = \frac{\text{Weight of FA in conjugate}}{\text{Total weight of conjugate}} \times 100$$

2.3.3. การเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์

- เตรียม conjugate folic acid-P188 เป็นพอลิเมอร์ไมเซลล์ โดยวิธี Direct dissolution method ในระบบตัวทำละลาย EPW 70 ประกอบด้วย ethanol:propylene glycol:water อัตราส่วน 37.72:37.72:24.56 โดยมีวิธีการดังนี้
 - 1) ชั่ง folic acid-P188 ปริมาณ 10.4 mg และ α -mangostin 1.9 mg ละลายด้วยตัวทำละลายระบบ EPW 70
 - 2) นำสารละลายที่ได้ไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และปรับปริมาตรสารละลายด้วยตัวทำละลายระบบ EPW 70 จนครบ 2 mL
- เตรียม conjugate folic acid-P188 เป็นพอลิเมอร์ไมเซลล์ โดยวิธี Direct dissolution method ในระบบตัวทำละลาย EPW 60 ประกอบด้วย ethanol:propylene glycol:water อัตราส่วน 32.35:32.35:35.3 โดยมีวิธีการดังนี้
 - 1) ชั่ง folic acid-P188 ปริมาณ 10.3 mg และ α -mangostin 2.3 mg ละลายด้วยตัวทำละลายระบบ EPW 70
 - 2) นำสารละลายที่ได้ไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที และปรับปริมาตรสารละลายด้วยตัวทำละลายระบบ EPW 70 จนครบ 2 mL

2.4 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของพอลิเมอร์ไมเซลล์

การวัดขนาดประจุที่พื้นผิว (ค่าศักย์ซีตา) การกระจายขนาดของ พอลิเมอร์ไมเซลล์ ที่มี α -mangostin โดยใช้ Dynamic Light Scattering (DLS) particle size analyzer (Zetasizer Nano-ZS; Malvern Instrument, Malvern, UK) ที่มี 4 mW Helium-neon laser ที่มุม 173 องศา ทำการวัด 3 ครั้งต่อสูตรตำรับ

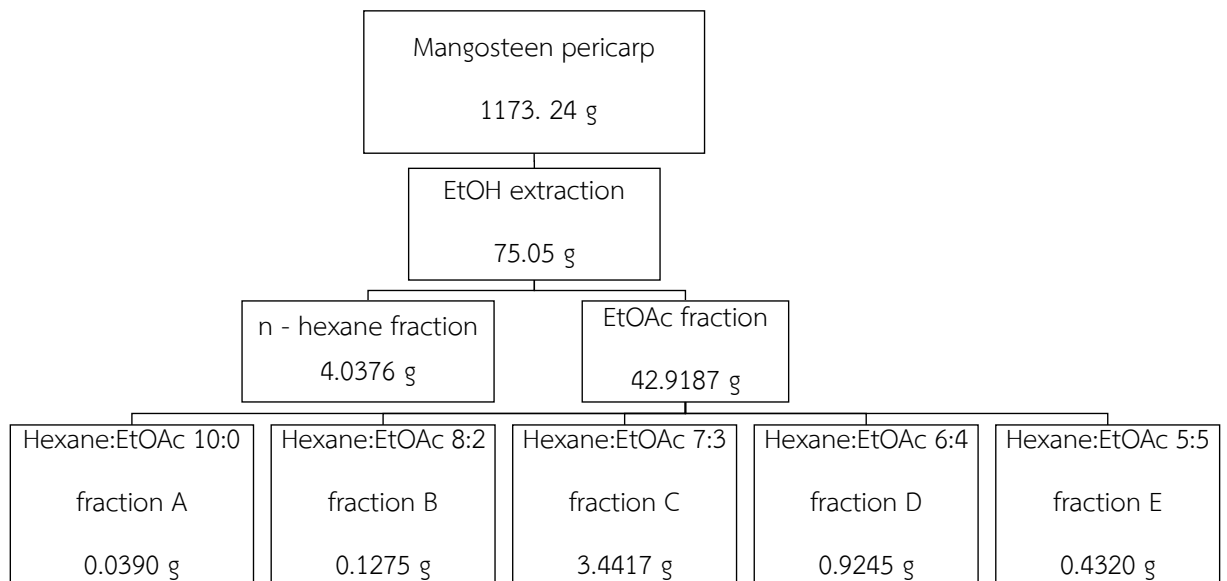
บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ศึกษาผลการสกัดสาร α -mangostin จากเปลือกมังคุด

ผลการสกัดสาร α -mangostin

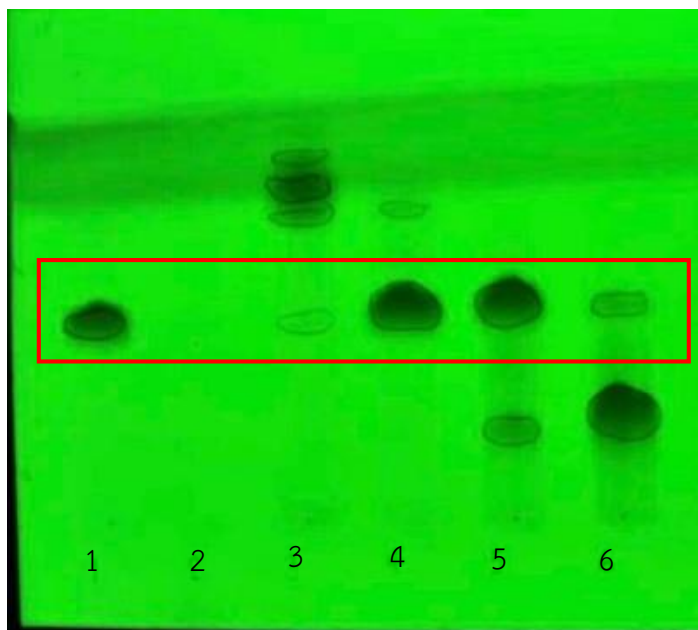
จากการทดลองการสกัดสาร α -mangostin จากเปลือกมังคุดแห้งที่บดเป็นผง 1,173.24 g ด้วยตัวทำละลาย 95% ethanol ได้สารสกัด ethanol ปริมาณ 75.05 g (6.40%) แล้วนำสารสกัด 95% ethanol ที่ได้มา partition ด้วย n-hexane โดยนำชั้นน้ำที่ได้มา partition ต่อด้วย ethyl acetate แล้วนำสารละลายอินทรีย์ที่ได้จากทั้ง 2 ส่วน มาทำให้แห้งด้วยวิธีการลดแรงดันจนได้สารสกัด n-hexane 4.0376 g (0.34%) และ ethyl acetate 42.9187 g (3.66%) จากนั้นนำสารสกัด ethyl acetate มาสกัดแยกสารโดยใช้ dry column vacuum chromatography ด้วยตัวทำละลาย n-hexane:ethyl acetate ไล่ความเข้มข้นจากอัตราส่วน 10:0 ไปยัง 5:5 พบว่าในอัตราส่วน 7:3 สามารถสกัดสารออกมาได้ 3.4417 g (0.29%) ซึ่งมากกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ ดังผลตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนผังการสกัดแยกจากเปลือกมังคุด

ผลการวิเคราะห์ด้วย Thin Layer Chromatography

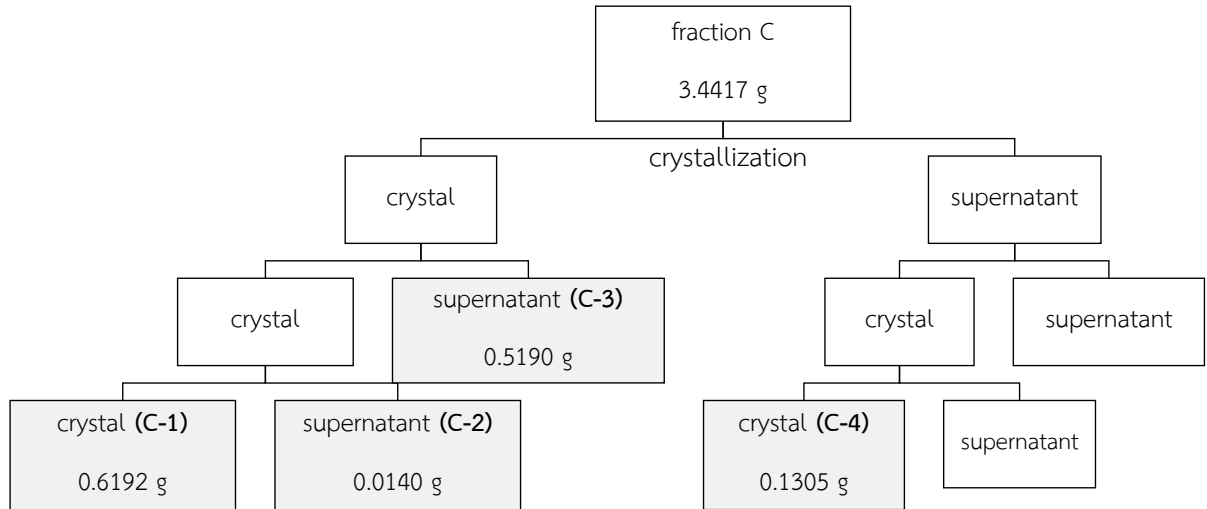
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อสารสกัดแต่ละชั้นมาติดตามองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารมาตรฐาน α -mangostin โดยใช้ระบบตัวทำละลาย n-hexane:ethyl acetate ในอัตราส่วน 3:2 ติดตามด้วย UV 254 nm พบว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลาย n-hexane:ethyl acetate ใน fraction C และ fraction D พบสาร α -mangostin มากที่สุดและมีสารปนเปื้อนอื่น ๆ น้อยที่สุด สังเกตได้จาก spot ที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 2 ดังนั้น สารสกัด fraction C และ fraction D จึงเหมาะสมที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีการตกผลึกมากที่สุด



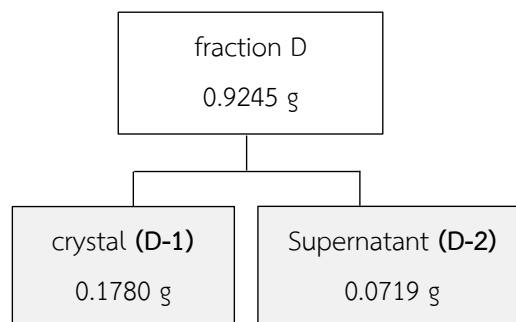
รูปที่ 2 Thin Layer Chromatography ของสารสกัด ethyl acetate แต่ละชั้น เทียบกับสารมาตรฐาน; α -mangostin standard (1); fraction A (2); B (3); C (4); D (5); E (6)

ผลการตกผลึกสาร α -mangostin

จากการนำสารสกัดที่มีสารมาตรฐาน α -mangostin ได้แก่ สารสกัด fraction C และ fraction D มาตกผลึกด้วยตัวทำละลาย n-hexane และ ethyl acetate แล้วล้างผลึกที่ได้ด้วย n-hexane ที่เย็นดังรูปที่ 3 และ 4 ได้เป็นผลึกลักษณะ ผลึกละเอียด สีเหลืองอ่อน โดย fraction C ตกผลึกได้ C1, C2 และ C3 น้ำหนัก 0.6192 g (17.99%), 0.0140 g (0.41%) และ 0.5190 g (15.08%) ตามลำดับ ส่วน fraction D ได้ผลึก D1 น้ำหนัก 0.1780 g (19.25%) พิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของผลึกที่ได้ด้วย ^1H NMR spectroscopy และ HPLC



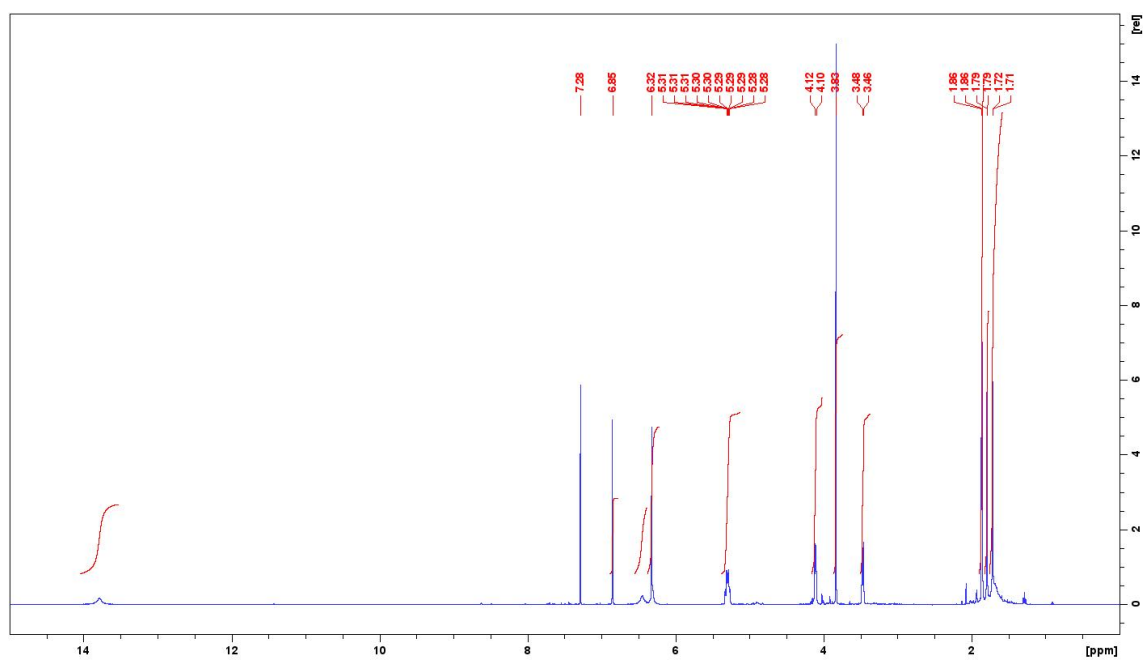
รูปที่ 3 ผลการตกผลึกของสารสกัด fraction C



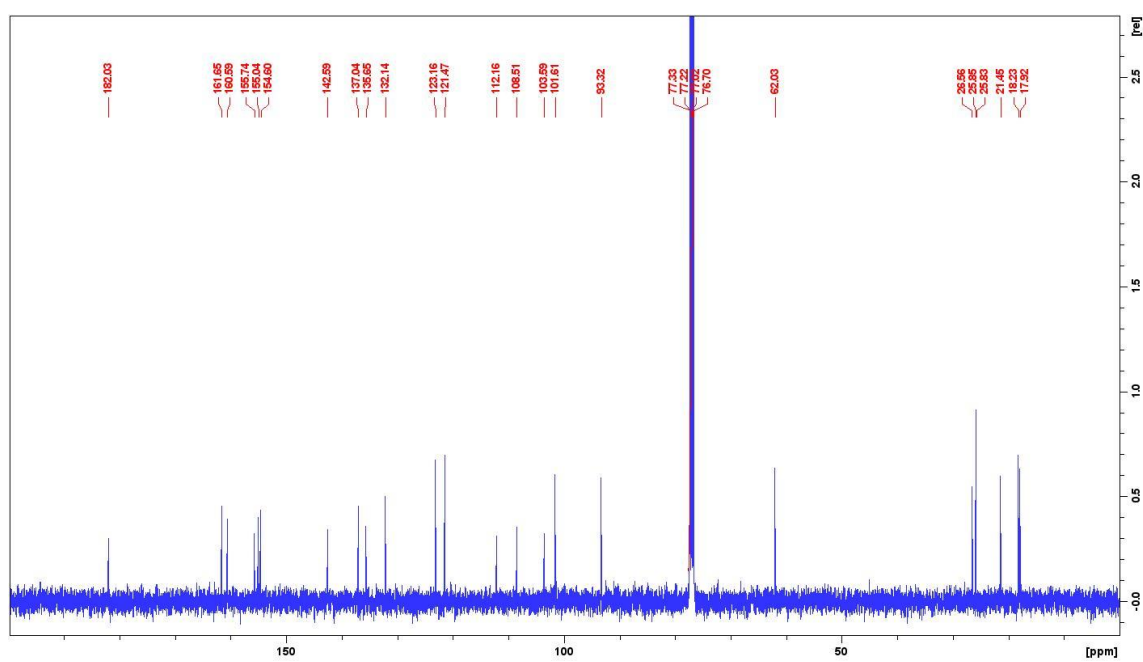
รูปที่ 4 ผลการตกผลึกของสารสกัด fraction D

2. พิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารสกัด α -mangostin

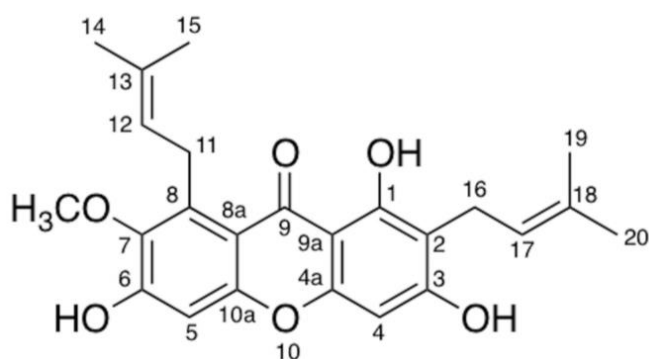
จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารสกัด fraction C และ fraction D ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึก นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสาร โดยพิสูจน์เอกลักษณ์ผลึก C-1 ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy พบว่าผลึกที่สกัดแยกได้เป็นสารบริสุทธิ์ (รูปที่ 5 และ รูปที่ 6) โดยพบสัญญาณที่ใกล้เคียงกับสาร α -mangostin ของการศึกษาของ Zhu Xiuzhi และคณะ (12) ดังตารางที่ 1



รูปที่ 5 ¹H NMR spectrum ของผลิตภัณฑ์ C-1 (400 MHz, CDCl₃)



รูปที่ 6 ¹³C NMR spectrum ของผลิตภัณฑ์ C-1 (100 MHz, CDCl₃)



รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของสาร α -mangostin (13)

ตารางที่ 1 ^1H (400 MHz, CDCl_3) และ ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) NMR spectra ของผลึก C-1 เทียบกับสาร α -mangostin

ตำแหน่ง	ผลึก C-1		α -mangostin (12)	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	-	160.59	-	160.6
1-OH	13.80 (s)	-	13.70	-
2	-	108.51	-	108.5
3	-	161.65	-	161.6
3-OH	6.46 (s)	-	5.69	-
4	6.32 (s)	93.32	6.16	93.3
4a	-	154.60	-	154.5
5	6.85 (s)	101.61	6.68	102.8
6	-	155.74	-	155.8
7	-	142.59	-	142.5
7-OMe	3.83 (s)	62.03	3.77	62.0
8	-	137.04	-	137.0
8a	-	112.16	-	112.2
9	-	182.03	-	182.0
9a	-	103.59	-	101.6
10	-	-	-	-
10a	-	155.04	-	155.3
11	3.47 (2H, d J=7.18 Hz)	21.45	3.70	21.4

ตำแหน่ง	ผลึก C-1		α -mangostin (12)	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
12	5.29 (m)	121.47	5.84	121.5
13	-	132.14	-	133.1
14	1.86a (s)	18.23	1.73	18.2
15	1.86b (s)	25.85	1.73	25.8
16	4.10 (2H, d $J=6.20$ Hz)	26.58	3.70	26.6
17	5.29 (m)	123.16	5.84	123.1
18	-	135.62	-	135.6
19	1.72 (3H, d $J=0.97$ Hz)	17.92	1.65	17.9
20	1.71 (3H, d $J=0.86$ Hz)	25.83	1.65	25.8

การพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC ใช้ mobile phase เป็น methanol:purified water ในอัตราส่วน 95:5 และใช้ stationary phase เป็น C_{18} , 4.6×250 mm, 5 μm พบว่ามี retention time ตรงกับสารมาตรฐาน α -mangostin และร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสัญญาณทั้งหมดที่วิเคราะห์ที่ 254 nm พบว่า crystallize C-1 มีความบริสุทธิ์มากที่สุดที่ 98.82% ดังตารางที่ 2 ดังนั้น จึงนำสาร α -mangostin ในส่วน C-1 ไปทำการพัฒนาตำรับด้วยระบบนำส่งในรูปแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ต่อไป

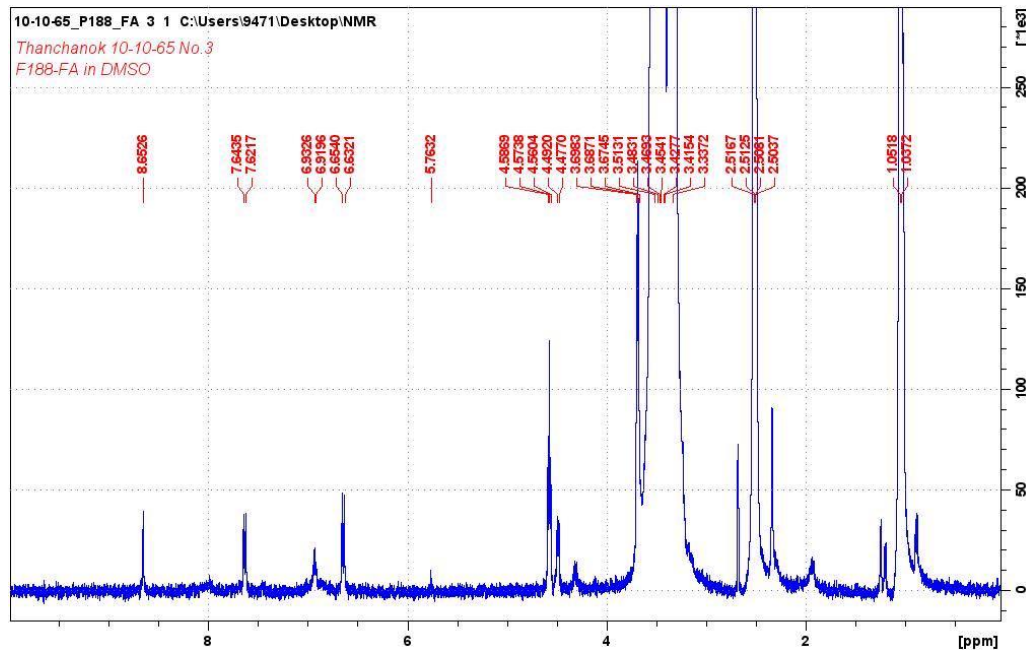
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์การสกัด α -mangostin ด้วย HPLC

	Sample		Retention time	Area % of 254 nm	Weight (g)
1	Fraction C	C-1	8.372	98.8195	0.6192
2		C-2	8.328	94.8321	0.0140
3		C-3	8.317	95.0594	0.1597
4		C-4	8.402	91.8318	0.1305
5	Fraction D	D-1	8.490	88.2678	0.1780
6		D-2	8.461	79.5835	0.0719
7	α -mangostin standard		8.397	97.4831	-

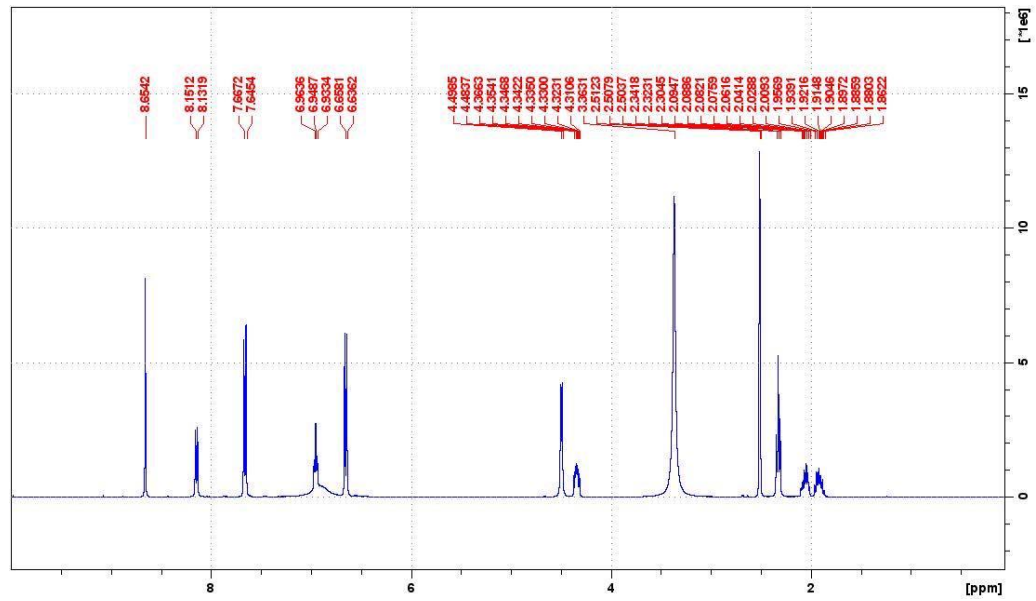
3. ผลการพิสูจน์การสังเคราะห์ระบบนำส่งยา

ผลการพิสูจน์การสังเคราะห์ระบบนำส่งยาด้วย ^1H NMR spectra

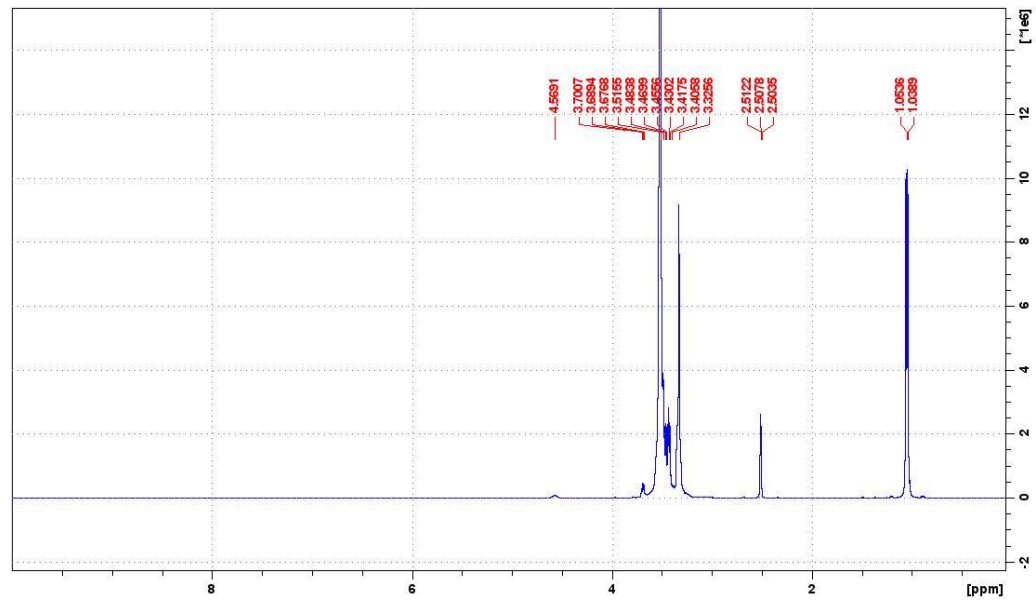
จากการสังเคราะห์สาร conjugate folic acid-P188 และ folic acid-TPGS พบว่าได้สารลักษณะผงสีเหลืองอ่อน โดยได้ปริมาณ 2.4881 g (24.93%) และ 4.3603 g (44.54%) ตามลำดับ เมื่อนำ conjugated polymer ที่สังเคราะห์ได้วิเคราะห์ด้วย ^1H NMR (รูปที่ 8) พบสัญญาณที่ 6.64 ppm, 7.65 ppm และ 8.65 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณ aromatic proton ของ folic acid (รูปที่ 9) และสัญญาณของ polymer ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น (รูปที่ 10) นอกจากนี้พบสัญญาณที่ 4.57 ppm สำหรับ folic acid-P188 เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นสัญญาณของ $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ซึ่งบ่งชี้การเกิดพันธะ ester ระหว่าง folic acid และ P188 (รูปที่ 11) โดยมี degree of substitution ได้เท่ากับ 2.78% และสำหรับ conjugated TPGS ที่สังเคราะห์ได้วิเคราะห์ด้วย ^1H NMR (รูปที่ 12) พบสัญญาณที่ 6.64 ppm, 7.65 ppm และ 8.65 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณ aromatic proton ของ folic acid (รูปที่ 9) และสัญญาณของ TPGS ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น (รูปที่ 13) แต่ไม่พบการ shift ของสัญญาณที่บ่งชี้การเกิดพันธะ ester ระหว่าง TPGS และ folic acid (รูปที่ 14)



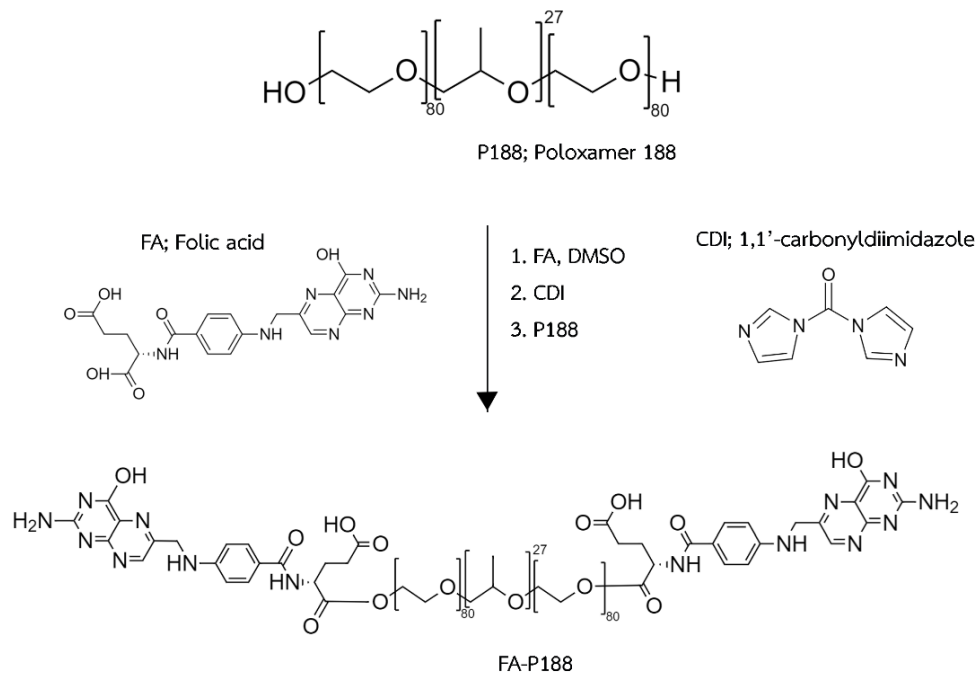
รูปที่ 8 ^1H NMR spectrum ของ conjugate folic acid-P188 (400 MHz; DMSO- d_6)



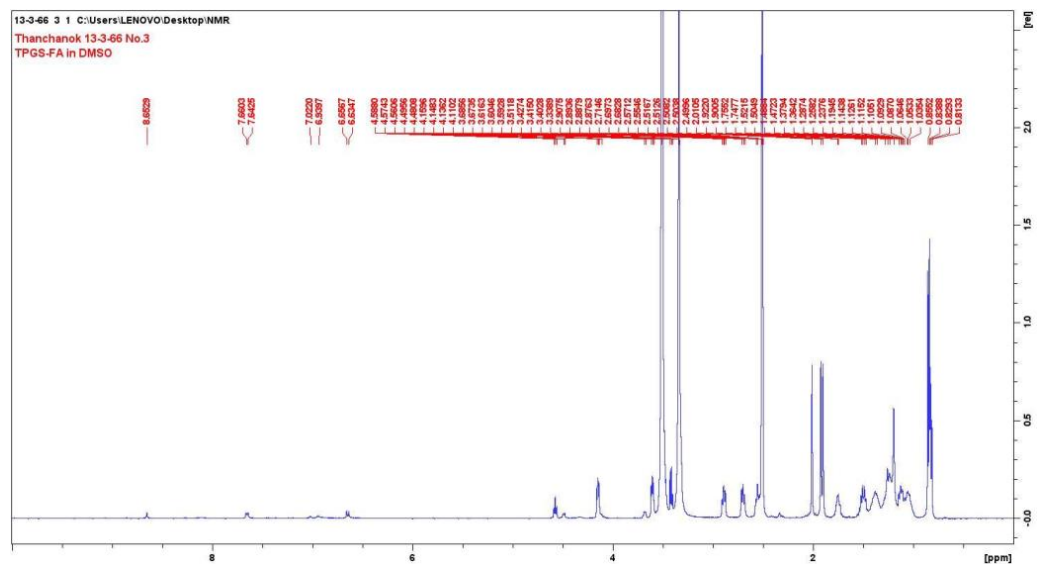
รูปที่ 9 ^1H NMR spectrum ของ folic acid (400 MHz; DMSO- d_6)



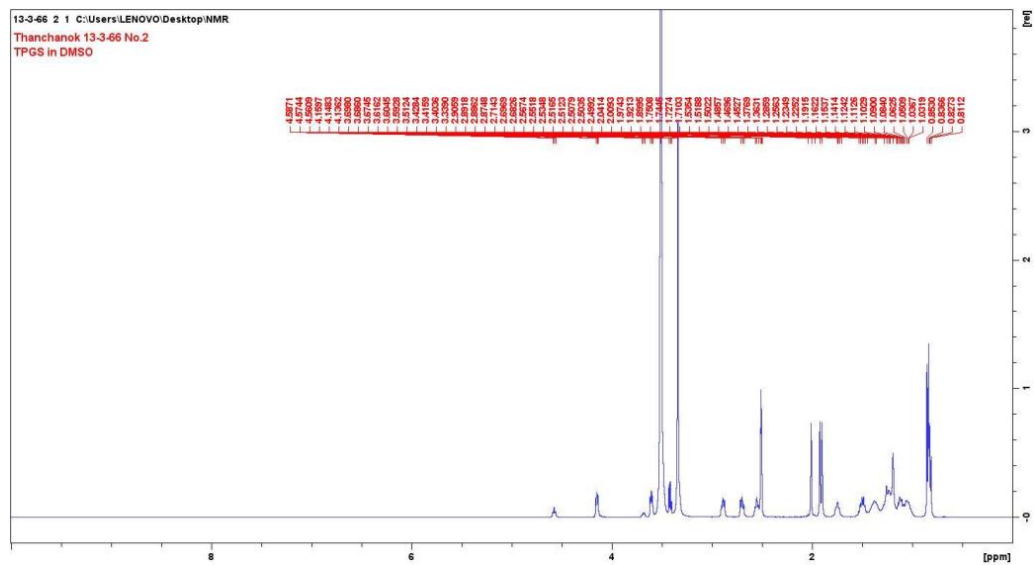
รูปที่ 10 ^1H NMR spectrum ของ poloxamer 188 (400 MHz; DMSO- d_6)



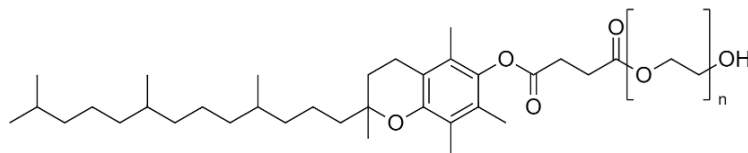
รูปที่ 11 ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ folic acid-P188
 ดัดแปลงจากการศึกษาของ Adeel Masood Butt และคณะ (3)



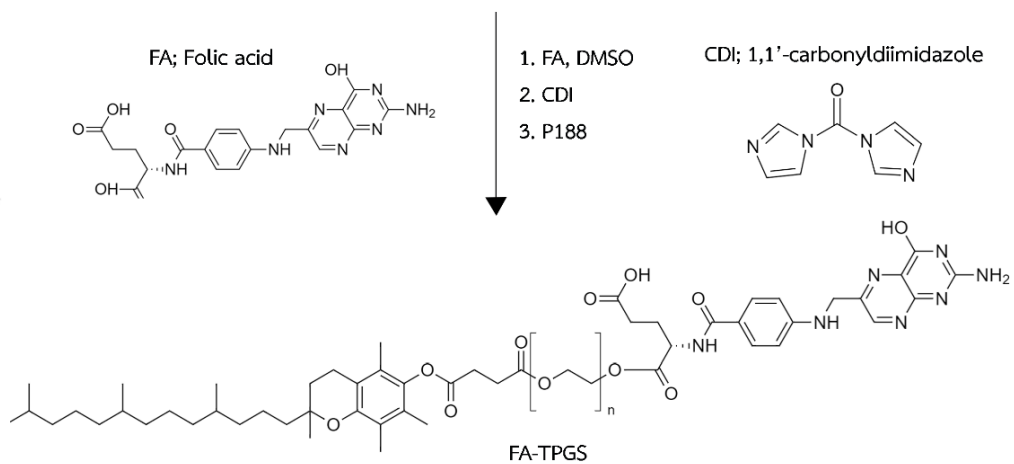
รูปที่ 12 ^1H NMR spectrum ของ conjugate folic acid-TPGS (400 MHz; DMSO- d_6)



รูปที่ 13 ^1H NMR spectrum ของ TPGS (400 MHz; DMSO- d_6)



TPGS; D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate



รูปที่ 14 ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ folic acid-TPGS
ดัดแปลงจากการศึกษาของ Adeel Masood Butt และคณะ (3)

ผลการพิสูจน์คุณภาพระบบนำส่งยาด้วย UV spectrophotometer

วิเคราะห์ปริมาณการเกิด conjugation ของสารสังเคราะห์ conjugate folic acid-P188 ด้วยเทคนิค UV spectro-photometry โดยเตรียมสารละลาย folic acid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนใน DMSO จำนวน 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0650, 0.0325, 0.0195 และ 0.0098 mg/mL และบันทึกค่าการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 360 nm ได้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน $y = 16.045x + 0.0486$ และ $R^2 = 0.9965$ นำสมการมาคำนวณเพื่อหาน้ำหนักของ folic acid ที่อยู่ใน conjugate folic acid-P188 ได้ 0.2271 mg จากสารตัวอย่าง 10.4 mg จะคำนวณได้ conjugation of folic acid เท่ากับ 2.18 wt%

4. ผลการศึกษาการพัฒนาตำรับด้วยระบบนำส่งในรูปแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์

จากผลการทดลองการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีตาของพอลิเมอร์ไมเซลล์ ที่ประกอบด้วย folic acid-P188 ปริมาณ 0.5% w/v ที่บรรจุสาร α -mangostin 2 mg/mL เปรียบเทียบระหว่างระบบตัวทำละลาย EPW 70 และ EPE 60 โดยใช้เครื่อง Zetasizer ทำการวัด 3 ครั้งต่อสูตรตำรับ พบว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ใช้ระบบตัวทำละลาย EPW 70 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 156.87 ± 3.70 nm ซึ่งมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่ใช้ระบบตัวทำละลาย EPW 60 (165.97 ± 0.84 nm) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) แต่ในส่วนการกระจายขนาดและค่าศักย์ซีตา ทั้งกลุ่มที่ใช้ระบบตัวทำละลาย EPW 70 และ EPE 60 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ ค่าศักย์ซีตา

formulation	ขนาด (nm)		PDI		ค่าศักย์ซีตา (mV)	
	mean±SD	p-value	mean±SD	p-value	mean±SD	p-value
folic acid-P188 EPW 70	156.87±3.70	0.0142	0.144±0.02	0.2119	13.00±1.74	0.0704
folic acid-P188 EPW 60	165.97±0.84		0.105±0.04		9.98±1.24	

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

การสกัดสาร α -mangostin จากส่วนเปลือกของมังคุด 1,173.24 g ได้ % yield เท่ากับ 6.40% จากนั้นนำมา partition ต่อด้วย n-hexane และนำชั้นน้ำที่ได้มา partition ต่อด้วย ethyl acetate พบว่าสารสกัดที่ได้จากการ partition ด้วย ethyl acetate มี % yield มากกว่า n-hexane เนื่องจาก α -mangostin เป็นโครงสร้างที่มีขี้ผึ้ง จากนั้นนำสารสกัด ethyl acetate extract มาแยกด้วยตัวทำละลาย n-hexane:ethyl acetate พบว่าอัตราส่วน 7:3 สามารถสกัดสารออกมาได้ 3.4417 g ซึ่งมากกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ เช่นเดียวกับการศึกษาหน้า(2) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย TLC เพื่อติดตามองค์ประกอบทางเคมีพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลาย n-hexane:ethyl acetate พบว่าอัตราส่วน 7:3 และ 6:4 พบสาร α -mangostin มากที่สุดและมีสารปนเปื้อนอื่น ๆ น้อยที่สุด จึงนำส่วนดังกล่าวไปล้างผลึกด้วย n-hexane ที่เย็นเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ ซึ่งพบว่าตกผลึกช้าและการล้างผลึกหลายรอบส่งผลให้ผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยผลจากการพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และ HPLC ยืนยันว่าสารที่ตกผลึกได้เป็นสาร α -mangostin ที่ความบริสุทธิ์มากที่สุดที่ 98.82% จึงนำสาร α -mangostin ที่ได้ไปพัฒนาเป็นระบบนำส่งในรูปแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์

จากการสังเคราะห์สาร conjugate folic acid-P188 และ folic acid-TPGS ด้วย ^1H NMR พบว่ามีเพียง folic acid-P188 (24.93%) ที่เกิดปฏิกิริยา esterification สามารถยืนยันได้โดยสัญญาณที่ 4.57 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของ $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ บ่งชี้การเกิดพันธะ ester ระหว่าง folic acid และ P188 แต่ folic acid-TPGS ไม่พบการ shift ของสัญญาณที่บ่งชี้การเกิดพันธะ ester ระหว่าง folic acid และ TPGS และจากการศึกษาพบว่า folic acid-P188 มี degree of substitution เท่ากับ 2.78% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาหน้า (3) ดังนั้นจึงนำ folic acid-P188 พิสูจน์คุณภาพระบบนำส่งยาด้วย UV spectrophotometer พบว่า Conjugation of folic acid เท่ากับ 2.18 wt%

จากผลการวัดขนาดอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ของ folic acid-P188 ในระบบตัวทำละลาย EPW 70 เปรียบเทียบกับในระบบตัวทำละลาย EPW 60 ที่บรรจุสาร α -mangostin 2 mg/mL พบว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์ในระบบ EPW 70 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 156.87 ± 3.70 nm ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าในระบบ EPW 60 (165.97 ± 0.84 nm) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ขนาดของพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ประกอบด้วย folic acid-P188 เป็นขนาดที่ไม่เหมาะสมกับการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง เนื่องจากขนาดไม่อยู่ในช่วง 10-100 nm (14) และจากการศึกษาหน้าพบว่าระบบนำส่งมีความ

คงตัว ควรมีค่าศักย์ซีตามากกว่าหรือเท่ากับ 30 mV (15) และการวัดค่าศักย์ซีตของพอลิเมอร์ไมเซลล์ในระบบ EPW 70 และ EPW 60 ประกอบด้วย folic acid-P188 ทั้งในระบบตัวตัวทำละลาย EPW 70 และ EPW 60 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าศักย์ซีตเฉลี่ยเท่ากับ 13.00 และ 9.98 mV ตามลำดับ มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 mV จึงควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาระบบนำส่งที่มีความคงตัวมากขึ้น

จากโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ เรื่อง การพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตเพื่อนำส่งสาร α -mangostin เข้าสู่เซลล์มะเร็ง แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสาร α -mangostin ที่นำมาใช้ในโครงการฉบับนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถทำวิธีการดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมได้ในอนาคต และในส่วนของการสังเคราะห์พอลิเมอร์ไมเซลล์ (folic acid-P188 และ folic acid-TPGS) สามารถศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการสังเคราะห์ folic acid-TPGS เลือกใช้พอลิเมอร์อื่น ๆ หรือปฏิกิริยาอื่น ๆ % entrapment และพิสูจน์การนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดแยกสารจากเปลือกมังคุด พบว่าเมื่อนำสารสกัดเอทานอลไปสกัดแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึก พบว่าในขั้นตอนการสกัดแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี การชะสารตัวอย่างตัวทำละลาย n-hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 7:3 และ 6:4 จะเป็นสารสกัดย่อยที่มีปริมาณสาร α -mangostin มากที่สุด (6.40%) การตกผลึกด้วยระบบ n-hexane : ethyl acetate ซ้ำหลายครั้งจะทำให้ได้สารมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น และในส่วนของการพัฒนาสูตรตำรับพอลิเมอร์ไมเซลล์พบว่าสามารถผลิต conjugate folic acid-P188 ได้ % yield เท่ากับ 24.93 โดยระบบนำส่ง folic acid-P188 ใช้ระบบตัวทำละลาย EPW 70 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 156.87 ± 3.70 nm ซึ่งมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่ใช้ระบบตัวทำละลาย EPW 60 (165.97 ± 0.84 nm) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมี อย่างไรก็ตามขนาดที่ได้ยังไม่เหมาะสมสำหรับนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

1. Akao Y, Nakagawa Y, Iinuma M, Nozawa Y. Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen. *International journal of molecular sciences*. 2008;9(3):355-70.
2. Phan TKT, Tran TQ, Pham DTN, Nguyen DT. Characterization, Release Pattern, and Cytotoxicity of Liposomes Loaded With α -Mangostin Isolated From Pericarp of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Natural Product Communications*. 2020;15:1-8.
3. Butt AM, Amin MCIM, Katas H. Synergistic effect of pH-responsive folate-functionalized poloxamer 407-TPGS-mixed micelles on targeted delivery of anticancer drugs. *International Journal of Nanomedicine*. 2015:1321-34.
4. มหาวิทยาลัยศิลปากร ค. มังคุด [12 september 2022]. Available from: https://pharmacy.su.ac.th/herbmed/herb/text/herb_detail.php?herbID=185.
5. เจริญแสง อ, ชูธรรมรัช ศ. สถานการณ์การผลิตมังคุด 2019 [2 september 2022]. Available from: <https://www.doa.go.th/oard8/wp-content/uploads/2019/08/km2.pdf>.
6. Novilla A, Djamhuri DS, Fauziah N, Maesaroh M, Balqis B, Widowati W. Cytotoxic Activity of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Peel Extract and α -mangostin toward Leukemia Cell Lines (HL-60 and K-562). *Journal of Natural Remedies*. 2016;16(2):53-9.
7. Lin CS, Lin CL, Ying TH, Chiou HL, Hung CH, Liao WS, et al. β -Mangostin inhibits the metastatic power of cervical cancer cells attributing to suppression of JNK2/AP-1/Snail cascade. *Journal of cellular physiology*. 2020;235(11):8446-60.
8. Herdiana Y, Wathoni N, Shamsuddin S, Muchtaridi M. α -Mangostin Nanoparticles Cytotoxicity and Cell Death Modalities in Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2021;26:5119.
9. Pham DT, Saelim N, Tiyafoonchai W. Alpha mangostin loaded crosslinked silk fibroin-based nanoparticles for cancer chemotherapy. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2019;181:705-13.
10. Mi Y, Liu Y, Feng SS. Formulation of Docetaxel by folic acid-conjugated d- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS(2k)) micelles for targeted and synergistic chemotherapy. *Biomaterials*. 2011;32(16):4058-66.

11. Zhao Y, Tang G, Tang Q, Zhang J, Hou Y, Cai E, et al. A Method of Effectively Improved α -Mangostin Bioavailability. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2016;41(5):605-13.
12. Zhu X, Li J, Ning H, Yuan Z, Zhong Y, Wu S, et al. α -Mangostin Induces Apoptosis and Inhibits Metastasis of Breast Cancer Cells via Regulating RXR α -AKT Signaling Pathway. *Frontiers in pharmacology*. 2021;12:739658.
13. Guo M, Wang X, Lu X, Wang H, Brodelius PE. α -Mangostin Extraction from the Native Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and the Binding Mechanisms of α -Mangostin to HSA or TRF. *PloS one*. 2016;11(9):e0161566.
14. Zhang Y, Huang Y, Li S. Polymeric micelles: nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(4):862-71.
15. Dąbrowska M, Souto EB, Nowak I. Lipid Nanoparticles Loaded with Iridoid Glycosides: Development and Optimization Using Experimental Factorial Design. *Molecules*. 2021;26(11).

ภาคผนวก

คู่มือโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2565

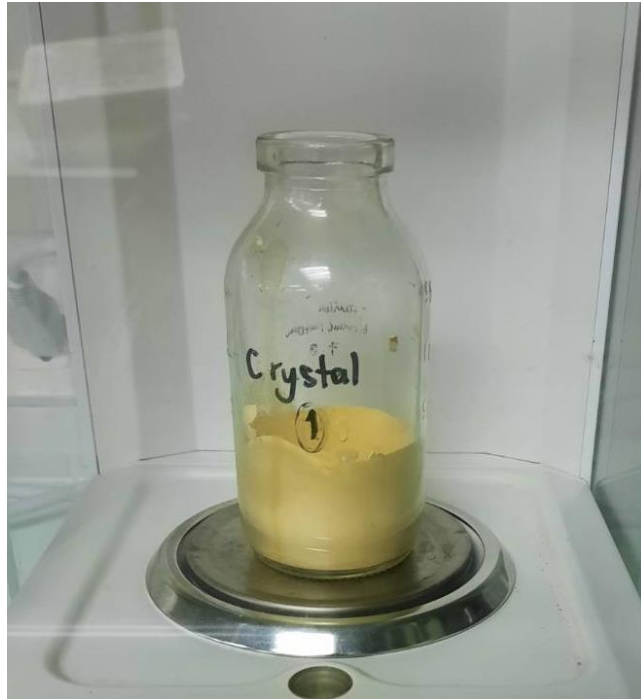
ภาคผนวก (1) ผลการทดลองเพิ่มเติม

ภาคผนวก (2) อักษรวิสุทธิ

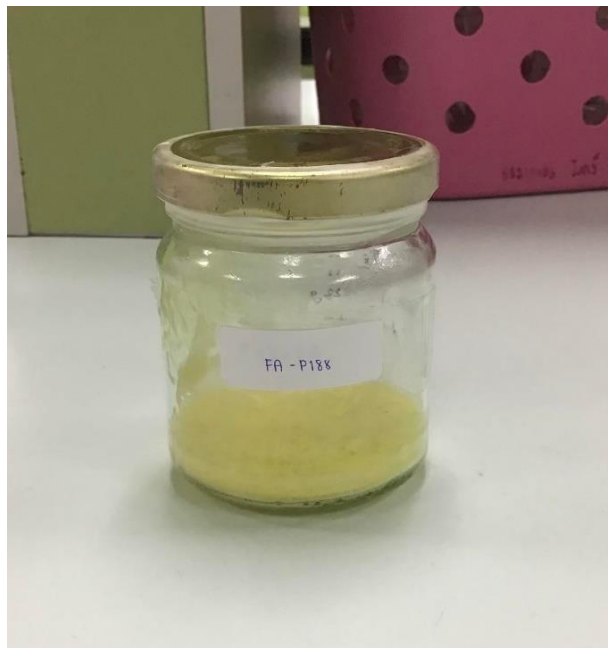
ภาคผนวก (3) แบบฟอร์มรายงานการเงิน

ภาคผนวก (4) แบบฟอร์มอนุญาตให้เผยแพร่โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภาคผนวก (1)
ผลการทดลองเพิ่มเติม



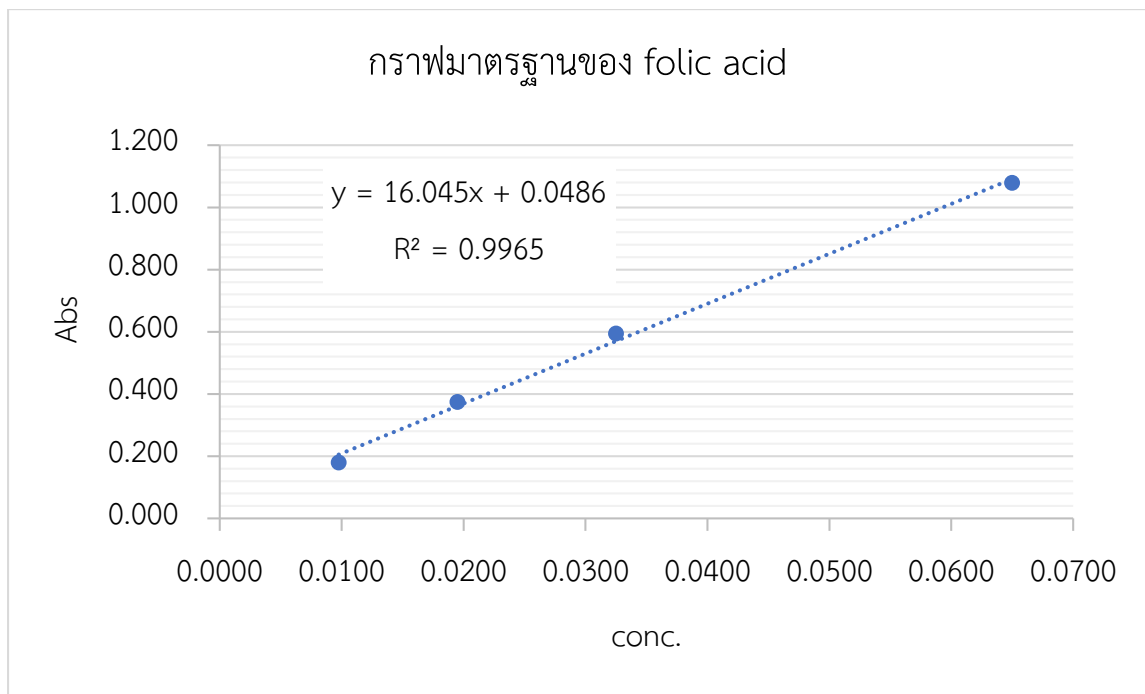
รูปที่ 15 สาร C-1 ที่ได้จากการตกผลึก



รูปที่ 16 สาร conjugate folic acid-P188



รูปที่ 17 สาร conjugate folic acid -TPGS



รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของ folic acid

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดลองของขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคค่าดัชนีซีตา

size	P188 EPW70	P188 EPW60	t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	
n1	153.20	166.40	P188 EPW70 P188 EPW60	
n2	160.60	165.00	Mean	156.8666667 165.9666667
n3	156.80	166.50	Variance	13.69333333 0.703333333
mean	156.867	165.967	Observations	3 3
sd	3.700	0.839	Pooled Variance	7.198333333
			Hypothesized Mean Difference	0
			df	4
			t Stat	-4.154043548
			P(T<=t) two-tail	0.014213605
			t Critical two-tail	2.776445105

PDI	P188 EPW70	P188 EPW60	t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	
n1	0.166	0.142	P188 EPW70 P188 EPW60	
n2	0.139	0.063	Mean	0.143666667 0.105333333
n3	0.126	0.111	Variance	0.000416333 0.001584333
mean	0.144	0.105	Observations	3 3
sd	0.020	0.040	Pooled Variance	0.001000333
			Hypothesized Mean Difference	0
			df	4
			t Stat	1.484396237
			P(T<=t) two-tail	0.211870872
			t Critical two-tail	2.776445105

ค่าดัชนีซีตา	P188 EPW70	P188 EPW60	t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	
n1	11.000	10.000	P188 EPW70 P188 EPW60	
n2	14.200	11.200	Mean	13 9.976666667
n3	13.800	8.730	Variance	3.04 1.525633333
mean	13.000	9.977	Observations	3 3
sd	1.744	1.235	Pooled Variance	2.282816667
			Hypothesized Mean Difference	0
			df	4
			t Stat	2.450733823
			P(T<=t) two-tail	0.07038965
			t Critical two-tail	2.776445105

ภาคผนวก (2)
อักขรวิสุทธิ์

Plagiarism Checking Report
Created on Mar 21, 2023 at 00:34 AM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
3054981	Mar 21, 2023 at 00:34 AM	61210003@go.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	Development of folate conjugated polymeric micelles for cancer cell targeted delivery of alphamangostin.docx	Completed	0.00 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
No data available in table				

ภาคผนวก (3)
แบบฟอร์มรายงานการเงิน
รายงานสรุปการเงิน
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาพอลิเมอร์กัมไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตเพื่อนำส่งแอลฟา-แมนโกสทิน

เข้าสู่เซลล์มะเร็ง

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ญญ.ผศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 23 กรกฎาคม 2565 **ถึงวันที่** 21 มีนาคม 2566

ระยะเวลาดำเนินการ 7 เดือน **ตั้งแต่วันที่** 23 กรกฎาคม 2565

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 10,000 บาท **เมื่อวันที่** 18 มกราคม 2566

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณ ที่ตั้งไว้ (บาท)	งบประมาณที่ใช้ จริง (บาท)	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน (บาท)
1. ค่าสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์	6,900	6,900	0
2. ค่าบริการวิเคราะห์	2,000	2,000	0
3. ค่าจัดทำรูปเล่ม	500	500	0
4. ค่าจัดทำโปสเตอร์	600	600	0
รวม	10,000	10,000	0

(.....ธัญชนก.....)

ญญ.ผศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานวิจัย

ภาคผนวก (4)

แบบฟอร์มอนุญาตให้เผยแพร่โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์



แบบฟอร์มอนุญาตให้เผยแพร่โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์
 ในฐานข้อมูลเว็บ OPAC ของมหาวิทยาลัย

ชื่อ-นามสกุล ญญ.ผศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์

ตำแหน่ง อาจารย์ที่ปรึกษารายวิชาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ต่อกับโฟเลตเพื่อนำส่งแอลฟา-แมนโนสิดินเข้าสู่
 เซลล์มะเร็ง

☒ ๑. อนุญาตให้เผยแพร่โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

☐ ๒. อนุญาตให้เผยแพร่เฉพาะบทคัดย่อ

☐ ๓. ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ผลงานวิจัย เนื่องจาก

.....

.....

.....

.....

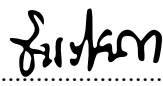
.....

.....

.....

.....

.....

ลงชื่อ..... 

ญญ.ผศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์

อาจารย์ที่ปรึกษารายวิชาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

วันที่..... 4 เมษายน 2566