

รหัสโครงการ : DIG5 180013-2

ชื่อโครงการ : โครงการการพัฒนายาเตรียมรูปแบบยาน้ำจากสารสกัดพอลิฟอสฟอรัส และการศึกษาศักยภาพของยาเตรียมในการระงับความรู้สึกเจ็บปวดในภาวะ neuropathic pain

ชื่อนักวิจัย : พาณิ ศิริสะอาด¹ จินตนาภรณ์ วัฒนธร² สุภาพร มัชฌิมะประ²สุรพล นรการกิจกุล¹ ศิริวิภา ปิยะมงคล¹ สุพร จารุมณี¹

¹ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อีเมลล์ : pmpti008@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : มีนาคม 2551- มีนาคม 2553

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนายาเตรียมรูปแบบยาน้ำจากสารสกัดพอลิฟอสฟอรัส และศึกษาฤทธิ์ในการลดความเจ็บปวดในภาวะปวดทางระบบประสาท

การดำเนินการวิจัยเริ่มจากศึกษาคุณสมบัติการละลายของสารสกัดพอลิฟอสฟอรัส และความเข้ากันได้กับสารละลายที่เหมาะสม พบว่าสารสกัดพอลิฟอสฟอรัส สามารถเข้ากันได้ดีในพีอีจี 200 และแอลกอฮอล์ จึงได้พัฒนายาน้ำจากสารสกัดพอลิฟอสฟอรัส ความเข้มข้น 10% w/v ยาเตรียมที่ได้มีความคงตัวอย่างน้อย 1 ปี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7-8 รับประทานง่าย มีรสชาติ สีและกลิ่นเฉพาะตัว

การควบคุมคุณภาพอาศัยลายพิมพ์มือโครมาโทกราฟี โดยวิธีรังคเลขผิวบาง (TLC) ใช้แผ่น silica gel 60 F₂₅₄, Developing Solvent ที่ประกอบด้วย Toluene : Ethyl acetate : Formic acid ในอัตราส่วน 32:14:5, การทดสอบโดยเตรียมสารมาตรฐานในเอทิลแอลกอฮอล์ แต่ละตัวให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายพอลิฟอสฟอรัส ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ฟันด้วยสารละลายของกรดซัลฟิวริก 60% ในแอลกอฮอล์) นำไปส่องภายใต้แสงยูวีในช่วงความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และโดยวิธีไฮเปอร์ฟอร์แมนติควิดโครมาโทกราฟี(HPLC)เทียบกับสารมาตรฐาน 5 ชนิด โดยมีการปรับความเหมาะสมของระบบ โดยใช้ คอลัมน์ Cosmosil[®] ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ผ่านเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย Acetonitrile และ DI water (ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 ด้วย phosphoric acid) ปรับสัดส่วนร้อยละของ Acetonitrile (ACN) จาก 20%ACN – 90%ACN – 90%ACN – 20%ACN ในเวลา 0 – 35 – 45 – 50 นาที ตามลำดับ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

25 องศาเซลเซียส ปริมาตรที่ฉีดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ตำแหน่งช่วงความยาวคลื่นแสงยูวีของสารมาตรฐานแต่ละตัวคือ Caffeic acid (320 nm), Chlorogenic acid (325 nm), Quercetin dehydrate (375 nm), Chrysin (270 nm), Pinocembrin (256 nm) ได้ค่าเวลาขับออกจากคอลัมน์ของสาร Caffeic acid, Chlorogenic acid, Quercetin dehydrate, Chrysin และ Pinocembrin ตามลำดับ การหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิส โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานทั้ง 5 ตัว พบว่ามีปริมาณ Caffeic acid ในตัวอย่างเท่ากับ 65.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Quercetin dehydrate เท่ากับ 134.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ Chrysin และ Pinocembrin พบในปริมาณต่ำ

การศึกษาความคงตัว ในสารละลายผสม ของแอลกอฮอล์และฟิอิจี 400 ในอัตราส่วน 9:1 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รวมทั้งตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิ 2-8 สลับกับ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 รอบ เทียบกับตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน จากโครมาโตแกรมของสารละลายพรอพอลิส พบว่าปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีความคงตัวดี ยกเว้นเก็บที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มสารประกอบบางชนิดอาจมีการเปลี่ยนแปลงสภาพหรือสลายตัว

จากการศึกษาศักยภาพในการระงับความเจ็บปวดและภาวะปวดระบบประสาทของสารสกัดพรอพอลิส และยาเตรียมชนิดจากสารสกัดพรอพอลิส พบว่าสารสกัดพรอพอลิสและยาน้ำที่มีพรอพอลิส เป็นองค์ประกอบขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถระงับอาการปวดและภาวะปวดระบบประสาทในสัตว์ทดลองได้ โดยกลไกไม่น่าจะผ่านการยับยั้ง cyclooxygenase2 (COX2) ดังนั้นผลิตภัณฑ์ยาเตรียมที่มีสารสกัดพรอพอลิส เป็นองค์ประกอบน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพในการบรรเทาอาการปวดและภาวะปวดระบบประสาทได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับความปลอดภัยและประสิทธิผลในคน รวมทั้งสารสำคัญที่คาดว่าจะเป็สารออกฤทธิ์

Project Code : DIG5 180013-2

Project Title : Development of Propolis Liquid Extract and Study on the Analgesic Potential of Propolis liquid Extract in Neuropathic Pain

Investigator : Panee Sirisa-ard¹, Jintanaporn Wattanathorn², Supaporn Muchimapura²,
Surapol Natakankitkul¹, Sirivipa Piyamongkol¹, Suporn Charumanee¹

¹ Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai,

² Faculty of Medicine, Khonkan University, Chiang Mai,

E-mail Address : pmpti008@gmail.com

Project Period : March 2008 – March 2010

This research aims to develop pharmaceutical dosage forms of propolis extract and to study effects in reducing pain in conditions neuropathic pain.

The experiment was started on the soluble characterization of propolis extract. The results showed propolis extract was good compatibility of PEG 200 and alcohol mixture. Pharmaceutical dosage forms of propolis extract was developed by concentration 10% w/v propolis extract. The stability of mixture can keep at least in 1 year storage at room temperature, pH 7-8, easy of use with unique tastes, smells and color.

The quality control study was performed by TLC chromatographic fingerprint on silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate, developing solvent using Toluene: Ethyl acetate: Formic acid in the ratio 32:14:5, spot standard compounds prepared by the ethyl alcohol 95% each to a concentration of 1mg/ml and 10 mg/ml sample, spraying reagent (sulfuric acid 60% in ethyl alcohol) led to light under UV lamp at the wavelength 365 nm. Compared with HPLC chromatographic fingerprint on five flavonoid standards by adjusting the appropriate system HPLC using Cosmosil[®] column size 4.6 x 250 mm via mobile phase: Acetonitrile: DI water (adjusted pH = 3 with phosphoric acid) gradient from 20% ACN - 90% ACN. - 90% ACN - 20% ACN in at 0 - 35 - 45-50 minutes, respectively. Flow rate: 1 mL/ min (room temp. 25 °C), injection volume: 10 µL. Uv detection: Caffeic acid (320 nm), Chlorogenic acid (325 nm), Quercetin dehydrate (375 nm), Chrysin (270 nm), Pinocembrin (256 nm) to the retention time of Caffeic acid, Chlorogenic acid, Quercetin dehydrate, Chrysin and Pinocembrin respectively. Active ingredients in the

extract Propolis by comparing the standard curve of 5 reference standards showed that the amount Caffeic acid in the sample was 65.97 $\mu\text{g/mL}$ and Quercetin dehydrate was 134.15 $\mu\text{g/mL}$ for Chrysin and Pinocembrin found in low concentration.

The stability study was performed in a mixture of alcohol and PEG200 in a 9:1 ratio when stored at room temperature, 45 °C, and also samples collected at the cycle of temperature 2-8 °C and at 45 °C alternating with six times compared to samples kept at temperature 2-8 °C for three months. From stability study of the propolis chromatogram, we found that the amount of flavonoid compounds were good stability in almost temperature storages, except the temperature 45°C, on change conditions may be degradation of some compounds.

The results from the study of the determination of the effect of propolis and propolis product on pain and neuropathic pain showed that the propolis extract and the product containing propolis extract at dose of 200 mg/kg BW could attenuate the severity in pain and neuropathic pain conditions in animals. The possible underlying mechanism should not relate to the inhibition of cyclo-oxygenase2 (COX2). Thus, the product containing propolis appears to be the potential alternative strategy to attenuate pain and neuropathic pain. However, further researches on safety, clinical trial and the possible active ingredient are still required.