บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

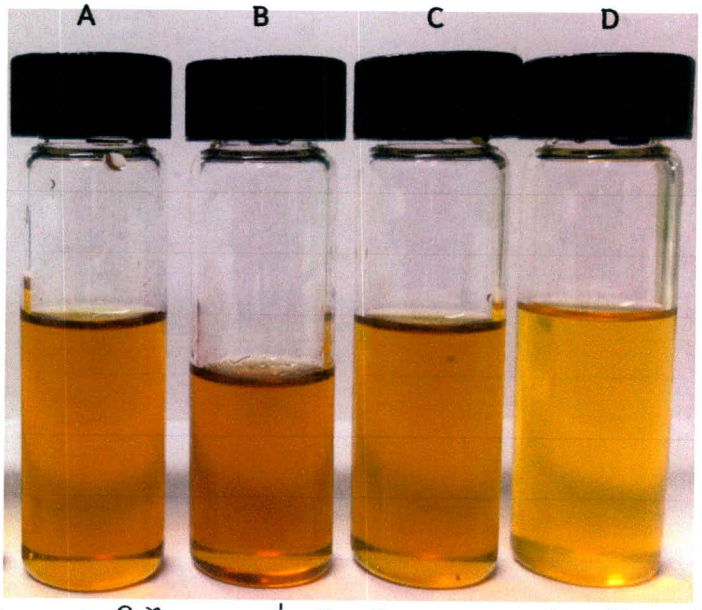
ทำการเตรียมสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อ และข้าวก่ำลืมผัวโดยการใช้เทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction) โดยแต่ละตัวอย่างจะถูกสกัดด้วยสภาวะของอุณหภูมิและความดันที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 สภาวะ โดยปริมาณสารสกัดที่ได้ในแต่ละสภาวะของการสกัดจากข้าวกล้องบดละเอียดน้ำหนักเริ่มต้น 50 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดได้ในแต่ละสภาวะ

สภาวะที่	ความดัน (bar)	อุณหภูมิ (°C)	ร้อยละสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ได้		
			ข้าวก่ำบิ้ง	ข้าวก่ำต่อ	ข้าวก่ำลืมผัว
1	200	45	4.15	4.10	4.06
2	200	60	4.25	4.38	4.52
3	300	45	4.32	4.50	4.62
4	300	60	5.96	5.04	6.10
5	450	45	5.48	5.30	5.66
6	450	60	6.44	6.26	6.78

จากการเตรียมสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อ และข้าวก่ำลืมผัวด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดทั้งหมด 6 สภาวะนั้น พบว่าสภาวะที่สามารถเตรียมสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลได้ปริมาณสูงสุดคือ ที่ความดัน 450 bar และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิและความดันจะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide) มีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient) และความสามารถในการละลายสูงขึ้น จึงทำให้สามารถสกัดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลซึ่งเป็นสารในกลุ่มไม่มีขั้วได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งมีความใกล้เคียงกับรายงานวิจัยของ Xu และ Godber (2000) ที่หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากรำข้าวด้วยเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดได้ที่ความดัน 680 bar อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยสามารถสกัดแกมม่า-โอไรซานอลได้สูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายถึง 4 เท่า นอกจากนั้นการสกัดด้วยเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดยังเป็นวิธีที่สามารถกำจัดตัวทำละลายซึ่งก็คือ

คาร์บอนไดออกไซด์ออกได้โดยง่าย ไม่มีความเป็นพิษและเป็นที่ยอมรับในการนำสารสกัดที่ได้มาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบทางยาและอาหารอีกด้วย เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่มีอยู่นั้น ความดันสูงสุดที่สามารถใช้ในการเตรียมตัวอย่างสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลได้นั้นคือ ที่ความดัน 450 bar ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้หากมีการใช้ความดันที่สูงกว่า 450 bar จะสามารถเตรียมสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลได้ปริมาณสูงกว่านี้



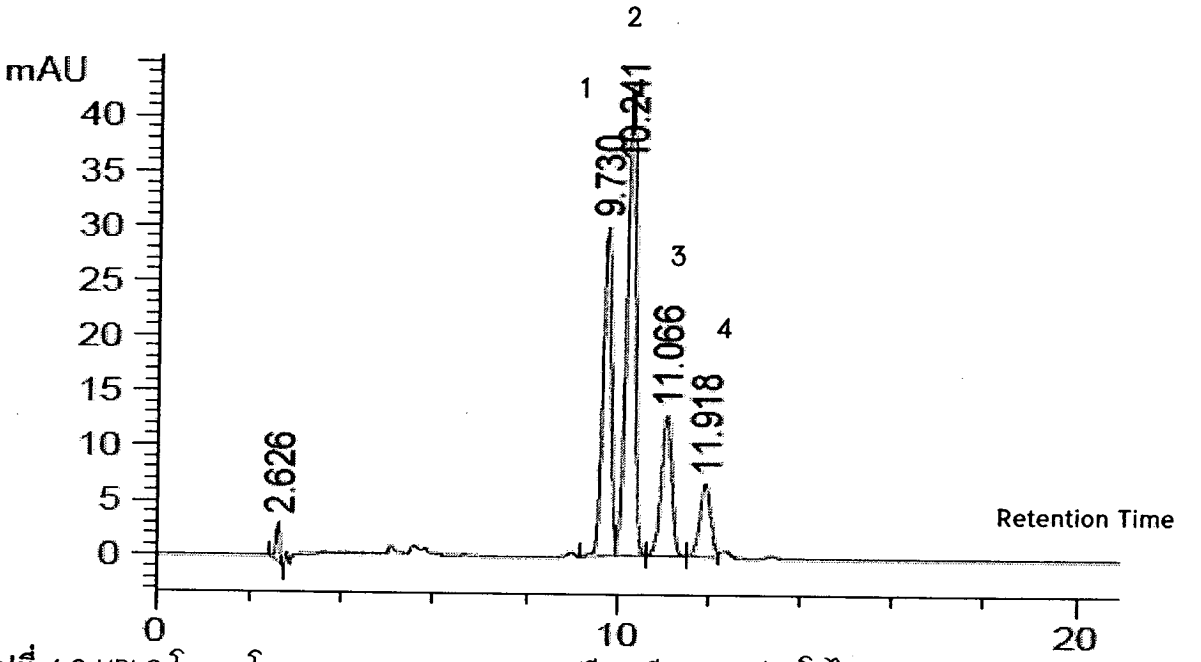
รูปที่ 4.1 สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่เตรียมด้วยเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ความดัน 450 bar อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อ A: ข้าวก่ำบิ้ง, B: ข้าวก่ำต่อ, C: ข้าวก่ำลืมผัว, และ D: ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1

จากรูปที่ 4.1 แสดงสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดจะพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อและข้าวก่ำลืมผัว (A, B, และ C) จะมีสีเข้มกว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่เตรียมได้จากข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 (D, ข้าวขาว) จึงมีความเป็นไปได้ในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่เตรียมจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อและข้าวก่ำลืมผัวจะสามารถสกัดสารกลุ่มแอนโธไซยานินซึ่งเป็นสารที่มีสีม่วงแดงออกมาได้ด้วยบางส่วน

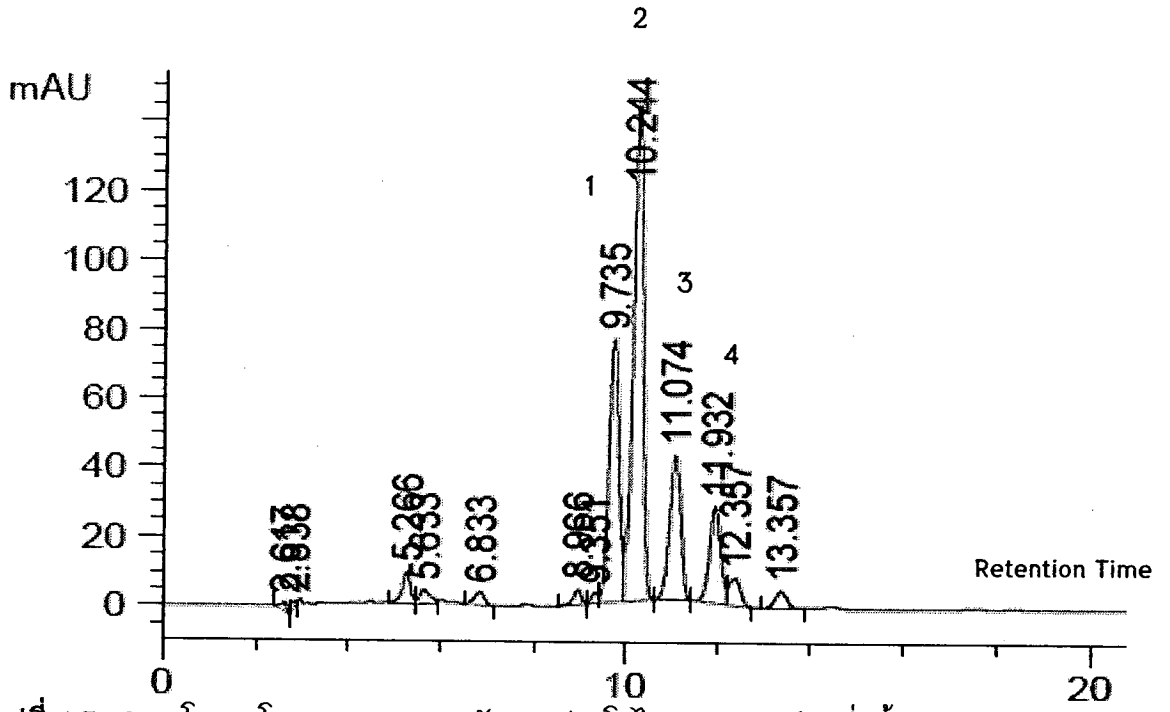
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล

เมื่อนำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เมื่อศึกษา HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าสารมาตรฐานเปรียบเทียบแกมม่า-โอไรซานอลประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้งหมด 4 ชนิดดังนี้ cycloartenyl ferulate (1), 24-

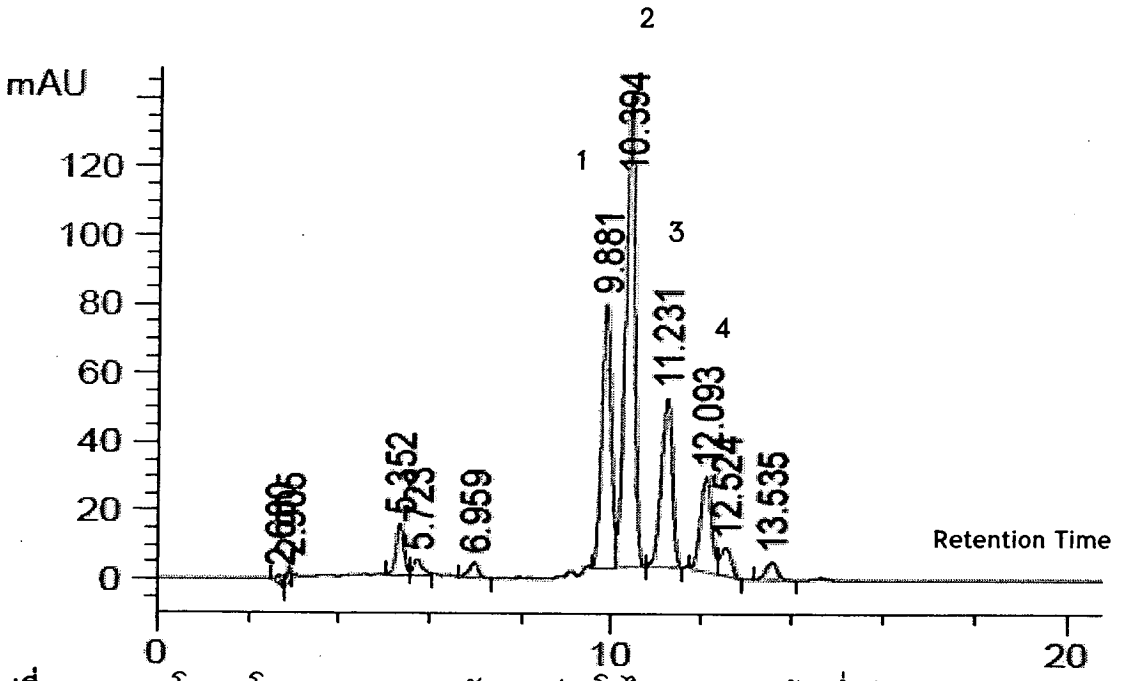
methylenecycloartanyl ferulate (2), campesteryl ferulate (3) และ sitosteryl ferulate (4) ตามลำดับ โดยในปี ค.ศ. 1999 Xu และ Godber สามารถแยกสารสำคัญจากน้ำมันรำข้าวได้ถึง 10 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย Δ^7-stigmastenyl ferulate, stigmasteryl ferulate, cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, Δ^7-campestenyl ferulate, campesteryl ferulate, Δ^7-sitotenyl ferulate, sitosteryl ferulate, campestanyl ferulate และ sitostanyl ferulate และพบว่า cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate และ campesteryl ferulate เป็นสารสำคัญหลักที่พบในสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล



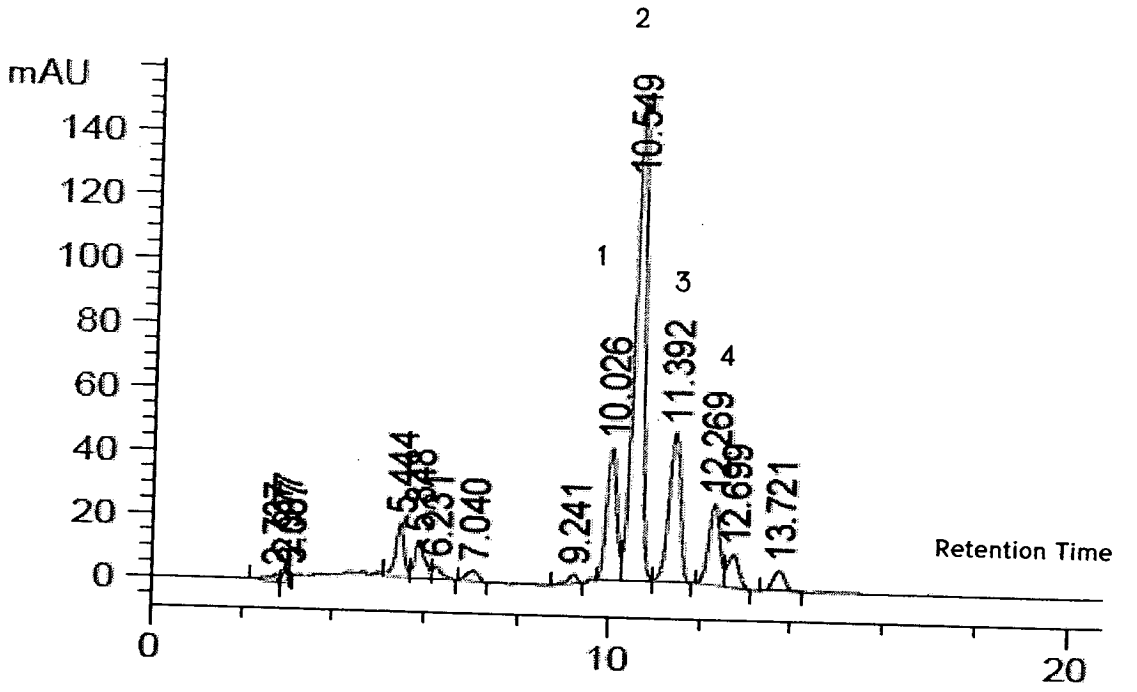
รูปที่ 4.2 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเปรียบเทียบแกมม่า-โอไรซานอล



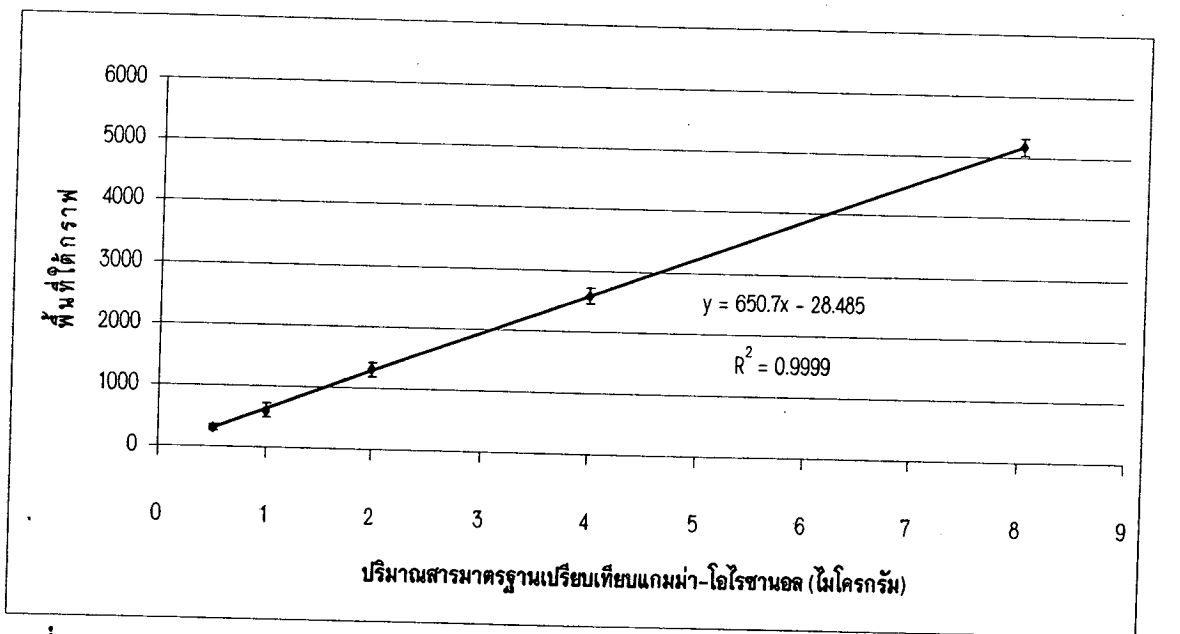
รูปที่ 4.3 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง



รูปที่ 4.4 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำต่อ



รูปที่ 4.5 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว



รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารมาตรฐานเปรียบเทียบแกมม่า-โอไรซานอลกับพื้นที่ใต้กราฟจาก HPLC โครมาโทแกรม

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

สภาวะที่	ความดัน (bar)	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล (%w/w)		
			ข้าวก่ำบิ้ง	ข้าวก่ำต่อ	ข้าวก่ำลืมผัว
1	200	45	4.48 ± 0.34	4.39 ± 0.28	4.65 ± 0.36
2	200	60	4.77 ± 0.43	4.68 ± 0.35	4.88 ± 0.38
3	300	45	5.15 ± 0.37	4.86 ± 0.32	5.45 ± 0.43
4	300	60	5.92 ± 0.44	5.82 ± 0.39	6.15 ± 0.35
5	450	45	5.45 ± 0.29	5.55 ± 0.38	5.78 ± 0.46
6	450	60	6.57 ± 0.43	6.31 ± 0.38	7.05 ± 0.47

หมายเหตุ: Mean ± S.D.

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลจากสารสกัดจากข้าวก่ำจำนวน 3 ตัวอย่าง (รูปที่ 4.3 - 4.5) คือ ข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อ และข้าวก่ำลืมผัว ตามลำดับ พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้งหมดประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิดดังที่พบในสารมาตรฐานเปรียบเทียบแกมม่า-โอไรซานอลและยังประกอบด้วยองค์ประกอบอื่นๆ อีกอย่างน้อย 4-5 ชนิด เมื่อคำนวณหาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลจากพื้นที่ใต้กราฟของสารสำคัญหลัก 4 ชนิดจาก HPLC โครมาโทแกรม คือ cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, campesteryl ferulate, และ sitosteryl ferulate เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเปรียบเทียบแกมม่า-โอไรซานอล พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 4.39 - 7.05 โดยน้ำหนักเมื่อทำการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด โดยสภาวะที่สามารถสกัดได้แกมม่า-โอไรซานอลสูงสุดในการศึกษาครั้งนี้คือ ที่ความดัน 450 bar และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยสารสกัดจากข้าวก่ำลืมผัวมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูงที่สุด โดยมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลเท่ากับ 7.05 ± 0.47 %w/w รองลงมาคือข้าวก่ำบิ้งและข้าวก่ำต่อ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จึงได้คัดเลือกสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว ข้าวก่ำบิ้งและข้าวก่ำต่อที่สกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดที่ความดัน 450 bar และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มาทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS และฤทธิย์ยับยั้งการกระตุ้น NF-KBในเซลล์ colorectal carcinoma HCT 116 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ โดยนำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างมาจัดทำมาตรฐานของสารสกัดโดยการปรับให้มีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล (คิดจากสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิด) ให้มีปริมาณเท่ากันทั้งหมด รวมทั้งสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลด้วย ก่อนที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริก

ออกไซด์และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS และฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้น NF-KB ด้วยเทคนิค cell-based assay

4.3 การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

โมโนไซด์ (monocytes) และแมคโครฟลาจเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า เช่น endotoxin (ได้แก่ LPS), inflammatory cytokines, ultraviolet light, arsenite และอื่นๆ ทำให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ออกมาจำนวนมาก ไนตริกออกไซด์ที่ปลดปล่อยจำนวนมากนี้เป็นตัวกลางของการก่อพยาธิสภาพต่างๆ ในการประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในครั้งนี้ใช้เซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 เป็นแบบทดสอบโดยกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อจำลองการกระตุ้นในภาวะอักเสบและทำการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ปลอดปล่อยออกมา โดยวัดในรูปของไนไตรท์โดยใช้ Griess reagent สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำสายพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้จัดได้ว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ (Kim *et al.*, 2004) ซึ่งใช้สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ซึ่งจากการทดสอบความเป็นพิษได้ใช้สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50 และ 100 µg/mL และทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการใช้ cell proliferation reagent WST-1 โดยผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

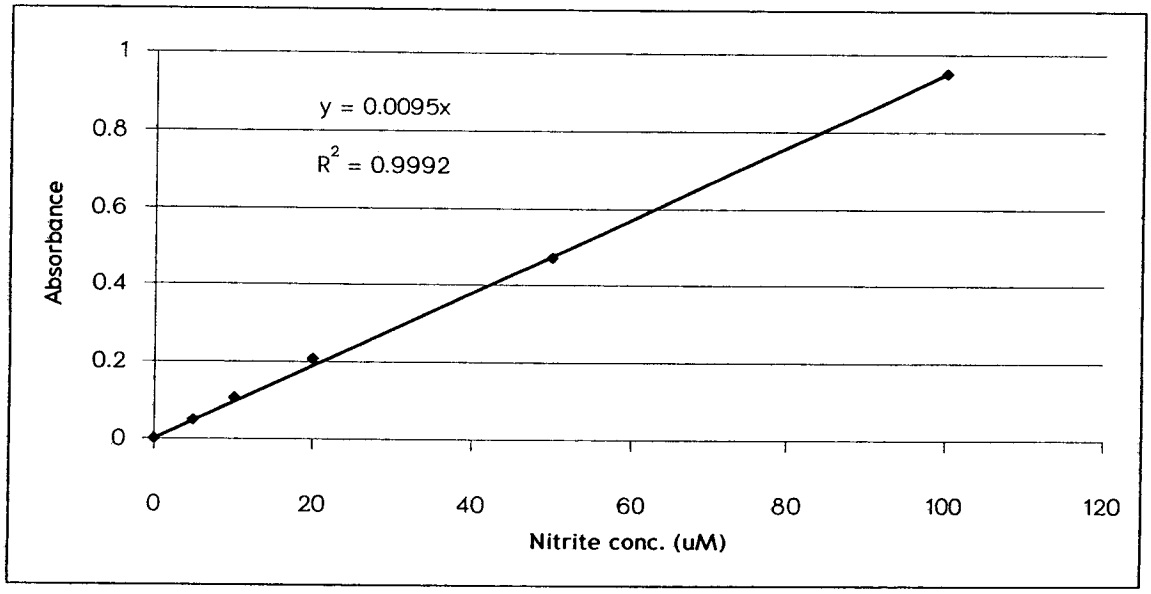
ตารางที่ 4.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7

สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล	**ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น**				
	1 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
ข้าวก่ำบิ้ง	0	0	0	0	15.14 ± 2.58
ข้าวก่ำต่อ	0	0	0	0	13.48 ± 2.49
ข้าวก่ำลืมผัว	0	0	0	0	18.59 ± 2.64
สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล	0	0	0	0	11.87 ± 2.18
สารมาตรฐานเคอร์คูมิน	0	0	0	5.36 ± 1.82	27.56 ± 2.08

หมายเหตุ 0 คือ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ด้วย cell proliferation WST-1 พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อ ข้าวก่ำลืมผัว และสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น 100 μg/mL โดยสารมาตรฐานเคอร์คูมินที่ใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง (reference standard) เริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น 50 μg/mL ดังนั้นจึงเลือกทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่าง รวมทั้งสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลที่ความเข้มข้น 1, 10, 25 และ 50 μg/mL ส่วนสารมาตรฐานเคอร์คูมินเลือกทดสอบที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 25 μg/mL

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 เรียบร้อยแล้วจึงนำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อ ข้าวก่ำลืมผัว สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลและสารมาตรฐานเคอร์คูมินมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 โดยละลายสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลและสารมาตรฐานที่จะใช้ทดสอบด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วเตรียมให้ได้ความเข้มข้นดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 จะถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ IFN-γ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรหลังจากเติม Griess reagent เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของโพแทสเซียมไนไตรท์ (KNO_2)



รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานของโพแทสเซียมไนไตรท์

จากรูปที่ 4.7 แสดงกราฟเส้นตรงของสารมาตรฐานโพแทสเซียมไนไตรท์เพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยมีค่า R^2 = 0.9992 และมีสมการเส้นตรง y = 0.0095x

ตารางที่ 4.4 IC_{50} (50% inhibition concentration) ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7

สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล	IC_{50} (μg/mL)
ข้าวก่ำบิ้ง	25.38 ± 2.07^{bc}
ข้าวก่ำต่อ	27.81 ± 2.15^{cd}
ข้าวก่ำลืมผัว	23.47 ± 1.88^{b}
สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล	28.72 ± 2.07^{d}
สารมาตรฐานเคอร์คูมิน	12.43 ± 1.65^{a}

หมายเหตุ: Mean ± S.D., ที่ระดับความเชื่อมั่น ≥ 95%

จากตารางที่ 4.4 ซึ่งแสดง 50% inhibition concentration ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลมี 50% inhibition concentration อยู่ระหว่าง 23.47 – 27.81 μg/mL โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 จากสูงไปต่ำไปดังนี้ สารมาตรฐานเคอร์คูมิน (IC_{50} = 12.43 ± 1.65 μg/mL) > สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว (23.47 ± 1.88 μg/mL) > สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง (25.38 ± 2.07 μg/mL) > สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำต่อ (27.81 ± 2.15 μg/mL) > สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล (28.72 ± 2.07 μg/mL) ตามลำดับ โดยพบว่าสารมาตรฐานเคอร์คูมินออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ ได้ดีที่สุด มีค่า 50% Inhibition concentration = 12.43 ± 1.65 μg/mL นอกจากนั้นยังพบว่าค่า 50% Inhibition concentration ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว ข้าวก่ำบิ้งและข้าวก่ำต่อมีค่าต่ำกว่ามาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล โดยก่อนนำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์นั้นได้ทำการปรับปริมาณของสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิดให้มีปริมาณเท่ากับสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลแล้ว จึงมีความเป็นไปได้ว่าการที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลอาจเกิดจากสารสำคัญอื่นๆ ที่พบอีก 4-5 ชนิดในสารสกัดแกมม่า-โอไรซา

นอลทั้ง 3 ตัวอย่าง หรืออาจเกิดจากสารสำคัญกลุ่มไม่มีขั้วอื่นๆ เช่น โทโคไตรอีนอลและโทโค เฟอรอล เป็นต้น

4.4 การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (iNOS)

ในการประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งเอนไซม์ iNOS ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HCT 116 เป็นการทดสอบที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ ในความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อจำลองการกระตุ้นในภาวะอักเสบและทำการวัดปริมาณ iNOS protein ที่ได้จาก Cell lysate ด้วยเทคนิค ELISA ด้วยชุดตรวจ Human iNOS assay kit (R&D system) สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำสายพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือที่สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ได้นั้น สามารถกล่าวได้ว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS โดยความเข้มข้นของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้คือ 1, 10, 25, 50 และ 100 μg/ml เป็นความเข้มข้นที่ใช้ตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ colorectal carcinoma HCT116 ก่อนโดยการใช้ cell proliferation reagent WST-1 โดยผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT116 ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความเป็นพิษต่อเซลล์ colorectal carcinoma HCT116

สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ colorectal carcinoma HCT 116 ที่ความเข้มข้น				
	1 μg/mL	10 μg/mL	25 μg/mL	50 μg/mL	100 μg/mL
ข้าวก่ำปิ้ง	0	0	0	0	0
ข้าวก่ำต่อ	0	0	0	0	0
ข้าวก่ำลืมผัว	0	0	0	0	0
สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล	0	0	0	0	0
สารมาตรฐานเคอร์คูมิน	0	0	0	0	8.39 ± 1.68

หมายเหตุ 0 คือ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ colorectal carcinoma HCT 116

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT116 ด้วย cell proliferation WST-1 พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำปิ้ง ข้าวก่ำต่อ ข้าวก่ำลืมผัว และสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT116 ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 100 μg/mL โดยสารมาตรฐานเคอร์คูมินที่ใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง (reference standard) เริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT116 ที่ความเข้มข้น 100 μg/mL ดังนั้นจึงเลือกทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่าง รวมทั้งสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, และ 100 μg/mL ส่วนสารมาตรฐานเคอร์คูมินเลือกทดสอบที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, และ 50 μg/mL

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT116 เรียบร้อยแล้วจึงนำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำปิ้ง ข้าวก่ำต่อ ข้าวก่ำลืมผัว สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลและสารมาตรฐานเคอร์คูมินมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS จากเซลล์ HCT116 โดยละลายสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลและสารมาตรฐานที่จะใช้ทดสอบด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วเตรียมให้ได้ความเข้มข้นดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์ HCT116 จะถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ IFN-γ ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.6 IC_{50} (50% inhibition concentration) ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ HCT116

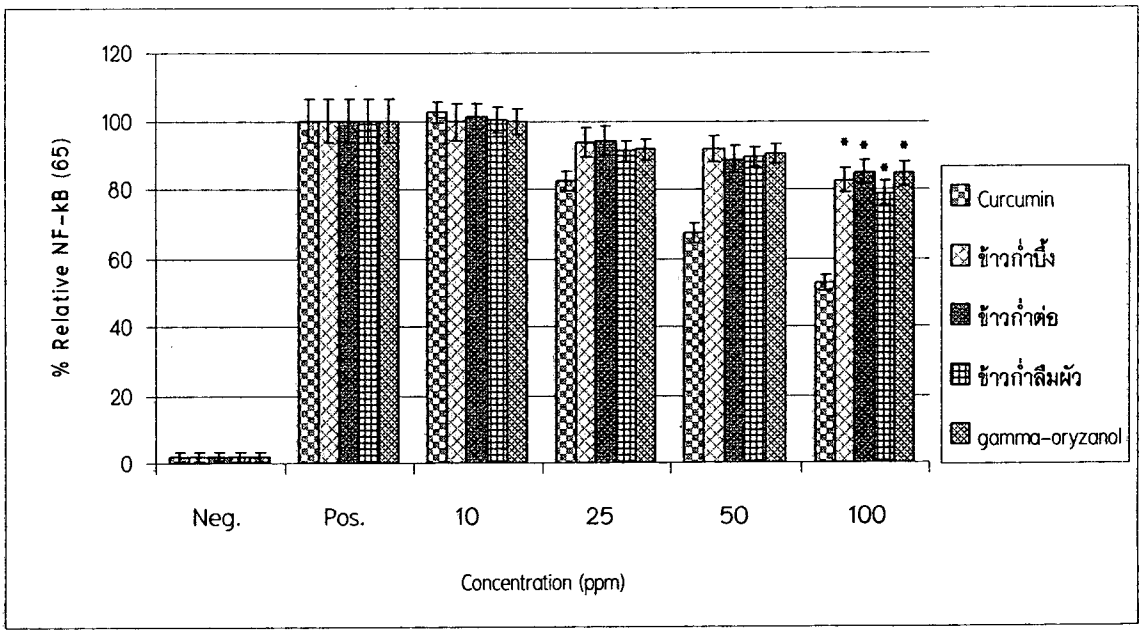
สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล	IC_{50} (μg/mL)
ข้าวก่ำบิ้ง	36.63 ± 2.72^{b}
ข้าวก่ำต่อ	37.51 ± 2.36^{b}
ข้าวก่ำลืมผัว	34.63 ± 2.62^{b}
สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล	44.85 ± 2.58^{d}
สารมาตรฐานเคอร์คูมิน	25.68 ± 1.98^{a}

หมายเหตุ: Mean ± S.D., ที่ระดับความเชื่อมั่น ≥ 95%

จากตารางที่ 4.6 ซึ่งแสดง 50% inhibition concentration ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ HCT116 พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลมี 50% Inhibition concentration อยู่ระหว่าง 24.63 – 37.51 μg/mL โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ HCT116 จากสูงไปต่ำไปดังนี้ สารมาตรฐานเคอร์คูมิน (IC_{50} = 25.68 ± 1.98 μg/mL) > สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว (34.63 ± 2.62 μg/mL) > สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง (36.63 ± 2.72 μg/mL) > สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำต่อ (37.51 ± 2.36 μg/mL) > สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล (44.85 ± 2.58 μg/mL) ตามลำดับ โดยพบว่าสารมาตรฐานเคอร์คูมินออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS จากเซลล์ HCT116 ได้ดีที่สุด นอกจากนั้นยังพบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว ข้าวก่ำบิ้งและข้าวก่ำต่อต่างมีค่าต่ำกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล โดยก่อนนำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS นั้นได้ทำการปรับปริมาณของสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิดให้มีปริมาณเท่ากับสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลแล้ว จึงมีความเป็นไปได้ที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลอาจเกิดจากสารสำคัญอื่นๆ อีก 4-5 ชนิดที่ตรวจพบในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างหรืออาจเกิดจากสารสำคัญกลุ่มไม่มีขั้วอื่นๆ เช่น โทโคไตรอีนอลและโทโค เฟอรอล เป็นต้น เช่นเดียวกับฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7

4.5 การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการกระตุ้นการปลดปล่อย NF-KB (p65)

ในการประเมินฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการปลดปล่อย NF-KB (p65) ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HCT 116 เป็นการทดสอบที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อจำลองการกระตุ้นในภาวะอักเสบและทำการวัดปริมาณ total NF-KB (p65) ที่ได้จากการ nuclear extract ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ชุดตรวจ total NF-KB (p65) (Life technology) ในสภาวะปกติแล้วเมื่อ NF-KB (p65 และ p50) ในนิวเคลียสจะจับอยู่กับ inhibitory subunit (IKB_α) เมื่อมี inflammatory cytokines มากระตุ้น จะทำให้เกิดฟอสฟอรีเลชันของ IKB_α แล้วหลุดออกไป ทำให้ NF-KB (p65 และ p50) ถูกปลดปล่อยเป็นอิสระ แล้วสามารถเข้าไปจับกับส่วนของ promoter แล้วกระตุ้นการเกิด translation ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น COX-2 และ iNOS เป็นต้น ดังนั้นสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำสายพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือที่สามารถยับยั้งการกระตุ้นการสร้าง NF-KB (p65) ได้นั้น จึงสามารถกล่าวได้ว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการกระตุ้นการเกิดฟอสฟอรีเลชัน (phosphorylation) ของ NF-KB ได้ โดยความเข้มข้นของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้คือ 10, 25, 50 และ 100 μg/ml เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT116 ดังแสดงในตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเปรียบเทียบแกมม่า-โอไรซานอลและเคอร์คูมิน



รูปที่ 4.8 ฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการสร้าง NF-KB (p65) ณ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล เมื่อ Neg.: negative control (ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ), Pos.: positive control (ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ)

จากรูปที่ 4.8 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการสร้าง NF-KB (p65) ณ ความเข้มข้น 10, 25, 50, และ 100 μg/mL ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล โดยพบว่าสารมาตรฐานเคอร์คูมินมีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการสร้าง NF-KB (p65) จาก LPS และ IFN-γ ได้ดีที่สุด ตามมาด้วยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว ข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อและสารมาตรฐานเปรียบเทียบแกมม่า-โอไรซานอล โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล 100 μg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการสร้าง NF-KB (p65) เมื่อเปรียบเทียบกับชุด positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการทดสอบทั้ง 3 วิธีพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำพันธุ์พื้นเมืองมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ใน mouse macrophage cell นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซด์ไนตริกออกไซด์ซินเทสและฤทธิยับยั้งการสร้าง NF-KB (p65) ใน HCT 116 colorectal carcinoma cell จึงมีความเป็นไปได้ที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำพันธุ์พื้นเมืองจะมีศักยภาพในการต้านการอักเสบและป้องกันการก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้ เมื่อพิจารณาจากฤทธิ์ข้างต้นจะเห็นว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัวจะมีฤทธิ์สูงที่สุด ตามมาด้วยข้าวก่ำต่อและข้าวก่ำบิ้ง ตามลำดับ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัวมาใช้ในการพัฒนาระบบนำส่งสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสู่ลำไส้ใหญ่

4.6 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไมโครแคปซูล

การเตรียมไมโครแคปซูลของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล โดยวิธีโคอาเซอเวชันเชิงซ้อน (complex coacervation) ที่ประกอบด้วยสารที่เป็นเปลือกของไมโครแคปซูล คือ เพคตินและเจลาติน (gelatin Type A) อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักและส่วนแกนของไมโครแคซูล คือ สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลและน้ำมันรำข้าว อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดโคอาเซอเวชันเชิงซ้อน เพื่อให้ได้ไมโครแคปซูลที่มีรูปร่างทรงกลมและมีขนาดสม่ำเสมอ เริ่มจากการใช้น้ำมันรำข้าว ซึ่งจะใช้เป็นสารเจือจางเป็นสารแกนกลางก่อน หลังจากที่ได้สภาวะในการเตรียมที่เหมาะสมแล้ว จึงจะใช้สารผสมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลกับน้ำมันรำข้าวเป็นสารแกนกลางเพื่อกักเก็บสารสกัดในไมโครแคปซูลต่อไป

ขั้นตอนการทดลองที่มีผลต่อขนาดของไมโครแคปซูลและการกักเก็บสารสำคัญมากที่สุด คือ ขั้นตอน A เพื่อให้สารแกนกลางมีการกระจายตัวเป็นหยดที่มีขนาดสม่ำเสมอและถูกหุ้มด้วยสารที่เป็นเปลือก (shell/coat) อย่างสมบูรณ์ โดยได้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ ชนิดของเครื่องผสม อัตราเร็วในการผสม (rpm) และระยะเวลาในการผสม

ตำรับ F-01 และ F-02 ใช้เครื่องผสมแบบใบพัด ที่อัตราเร็ว 500 รอบต่อนาทีและ 1000 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลา 5 นาที และใช้อัตราความเร็วรอบเดียวกันทุกขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และ 4.8 โดยไมโครแคปซูลที่เตรียมได้แสดงในรูปที่ 4.9 สำหรับตำรับ F-01 และรูปที่ 4.10 สำหรับตำรับ F-02 พบว่า สภาวะในการเตรียมยังไม่เหมาะสม เพราะการเกิดไมโครแคปซูลและการกักเก็บสารสำคัญไม่สมบูรณ์

ตำรับ F-03 ถึง F-05 ใช้เครื่องผสมแบบ homogenizer ที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาทีในขั้นตอน A โดยปรับเปลี่ยนเวลาในการใช้เครื่องผสมเป็นเวลา 7, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ

ตำรับ F-03 ใช้อัตราความเร็วรอบในขั้นตอน B-F เท่ากับ 1000 รอบต่อนาที ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.11 แสดงไมโครแคปซูลที่เตรียมได้ ซึ่งยังไม่ได้ไมโครแคปซูลที่เสถียร

ตำรับ F-04 เพิ่มระยะเวลาในขั้นตอน A เป็น 15 นาที และอัตราความเร็วรอบในขั้นตอน B-D ซึ่งเป็นขั้นตอนการเกิด complex coacervation เป็น 1500 รอบต่อนาทีและในขั้นตอน E-F เป็น 1000 รอบต่อนาที ดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่าได้ไมโครแคปซูลที่เสถียร แต่ขนาดยังแตกต่างกันมาก (รูปที่ 4.12)

ตำรับที่ F-05 ใช้อัตราเร็วรอบในขั้นตอน A 5000 รอบต่อนาที แต่เพิ่มระยะเวลาเป็น 30 นาที และอัตราความเร็วรอบในขั้นตอน B-F เท่ากับ 1500 รอบต่อนาที ดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่าไมโครแคปซูลมีขนาดแตกต่างกันมากและมีสารแกนกลางบางส่วนที่ไม่ถูกกักเก็บ (รูปที่ 4.13)

ตำรับที่ F-06 เพิ่มอัตราเร็วรอบในขั้นตอน A เป็น 8000 รอบต่อนาที ระยะเวลาเป็น 15 นาทีและอัตราความเร็วรอบในขั้นตอน B-F เท่ากับ 1300 รอบต่อนาที ดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่า การเกิดไมโครแคปซูลสมบูรณ์ ผนังไมโครแคปซูลแข็งแรง แต่มีขนาดแตกต่างกันมาก (รูปที่ 4.14)

ตำรับที่ F-07 ใช้อัตราเร็วรอบในขั้นตอน A เป็น 8000 รอบต่อนาที ระยะเวลาเป็น 15 นาที และเพิ่มอัตราความเร็วรอบในขั้นตอน B-F เท่ากับ 1500 รอบต่อนาที ดังแสดงในตารางที่ 4.13 พบว่า การเกิดไมโครแคปซูลสมบูรณ์ ผนังไมโครแคปซูลแข็งแรง แต่มีขนาดแตกต่างกันมาก (รูปที่ 4.15)

ตำรับที่ F-08 เป็นสูตรตำรับที่มีสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลผสมกับน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วน 1:1 เป็นสารแกนกลาง เพื่อกักเก็บสารสกัดไว้ในไมโครแคปซูล โดยใช้สภาวะในการเตรียมไมโครแคปซูล เหมือนสูตรตำรับ F-07 ซึ่งมีรายละเอียดในตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.16 พบว่าไมโครแคปซูลที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน แต่เกาะกลุ่มกันมาก ซึ่งยังต้องปรับสภาวะในการเตรียมให้เหมาะสมต่อไป

สำหรับการแยกไมโครแคปซูลและการทำให้แห้ง ทดลองแยกไมโครแคปซูลและทำให้แห้งด้วยวิธีการต่างๆ คือ ตั้งไว้ให้ตกตะกอนและรินส่วนใสด้านบนออก จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้ iso-

propyl alcohol หรือ acetone และโดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) หรือโดยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)

ตารางที่ 4.7 สภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลและผลที่ได้ของตำรับ F-01

formula	coacervation conditions					mixer type	ผล
	step	rpm	T (°C)	pH	time		
F-01	A	500	40	7.5	5 min	M	ไม่ได้ผล/ไม่เกิดไมโครแคปซูลอย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 4.6)
	B	500	40	4.0	5 min	M	
	C	500	5	4.0	5 min	M	
	D	500	5	4.0	1 hr	M	
	E	500	RT	4.0	4 hr	M	
	F	500	RT	4.0	15 min	M	

M = Mixer (Propeller-type)

ตารางที่ 4.8 สภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลและผลที่ได้ของตำรับ F-02

formula	coacervation conditions					mixer type	ผล
	step	rpm	T (°C)	pH	time		
F-02	A	1000	40	7.5	5 min	M	ไม่ได้ผล/ไม่เกิดไมโครแคปซูลอย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 4.7)
	B	1000	40	4.0	5 min	M	
	C	1000	5	4.0	5 min	M	
	D	1000	5	4.0	1 hr	M	
	E	1000	RT	4.0	4 hr	M	
	F	1000	RT	4.0	15 min	M	

สำหรับสภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลตำรับที่ F-01, F-02, และ F-03 ไม่เกิดไมโครแคปซูลอย่างสมบูรณ์ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลต่อไป

ตารางที่ 4.9 สภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลและผลที่ได้ของตำรับ F-03

formula	coacervation conditions					mixer type	ผล
	step	rpm	T (°C)	pH	time		
F-03	A	**5000**	40	7.5	**7 min**	**H**	ไม่ได้ผล/ไมโครแคปซูลที่ได้ไม่เสถียร (รูปที่ 4.8)
	B	1000	40	4.0	5 min	M	
	C	1000	5	4.0	5 min	M	
	D	1000	5	4.0	1 hr	M	
	E	1000	RT	4.0	4 hr	M	
	F	1000	RT	4.0	15 min	M	

H = Homoginizer (Polytron); M = Mixer (Propeller-type)

ตารางที่ 4.10 สภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลและผลที่ได้ของตำรับ F-04

formula	coacervation conditions					mixer type	ผล
	step	rpm	T (°C)	pH	time		
F-04	A	5000	40	7.5	**15 min**	H	ขนาดไมโครแคปซูลแตกต่างกันมาก การเกิดไมโครแคปซูลไม่สมบูรณ์ (รูปที่ 4.9)
	B	1500	40	4.0	5 min	M	
	C	1500	5	4.0	5 min	M	
	D	1500	5	4.0	1 hr	M	
	E	1000	RT	4.0	4 hr	M	
	F	1000	RT	4.0	15 min	M	

ตารางที่ 4.11 สภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลและผลที่ได้ของตำรับ F-05

formula	coacervation conditions					mixer type	ผล
	step	rpm	T (°C)	pH	time		
F-05	A	5000	40	7.5	**30 min**	H	การเกิดไมโครแคปซูลขนาดแตกต่างกันมาก/มีสารแกนกลางที่ไม่ถูกกักเก็บ (รูปที่ 4.10)
	B	1500	40	4.0	5 min	M	
	C	1500	5	4.0	5 min	M	
	D	1500	5	4.0	1 hr	M	
	E	1500	RT	4.0	4 hr	M	
	F	1500	RT	4.0	15 min	M	

ตารางที่ 4.12 สภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลและผลที่ได้ของตำรับ F-06

formula	coacervation conditions					mixer type	ผล
	step	rpm	T (°C)	pH	time		
F-06	A	**8000**	40	7.5	**15 min**	H	ขนาดแตกต่างกันมาก ไมโครแคปซูลมีความเสถียร (รูปที่ 4.11)
	B	1300	40	4.0	5 min	M	
	C	1300	5	4.0	5 min	M	
	D	1300	5	4.0	1 hr	M	
	E	1300	RT	4.0	4 hr	M	
	F	1300	RT	4.0	15 min	M	

ตารางที่ 4.13 สภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลและผลที่ได้ของตำรับ F-07

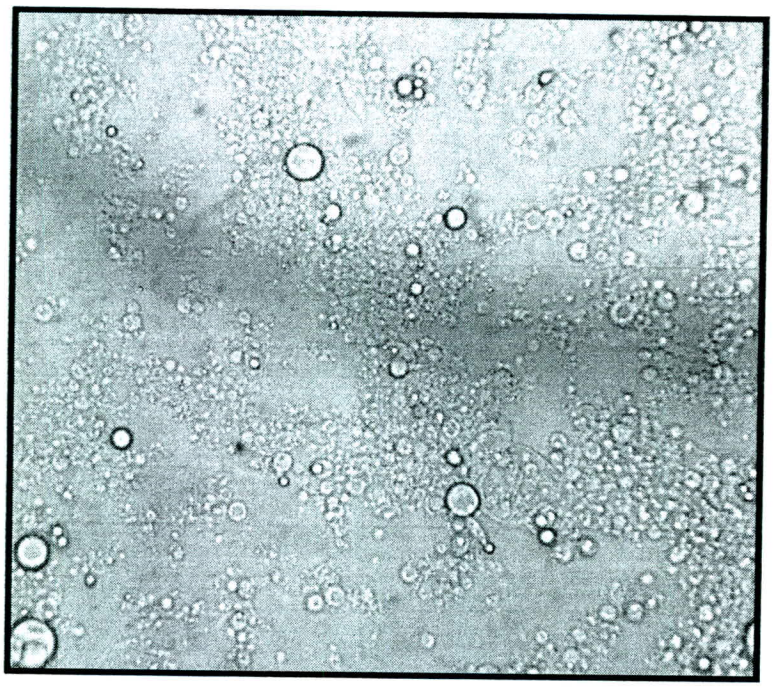
formula	coacervation conditions					mixer type	ผล
	step	rpm	T (°C)	pH	time		
F-07	A	**8000**	40	7.5	**15 min**	H	ไมโครแคปซูลมีขนาดและการกระจายตัวสม่ำเสมอ ไม่เกาะกลุ่มกัน และมีความเสถียร ในทุกขั้นตอนการเตรียม (รูปที่ 4.12)
	B	1500	40	4.0	5 min	M	
	C	1500	5	4.0	5 min	M	
	D	1500	5	4.0	1 hr	M	
	E	1500	RT	4.0	**4 hr**	M	
	F	1500	RT	4.0	15 min	M	

หมายเหตุ Formula F-01 ถึง F-07 แกนกลาง น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ ไม่มีสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

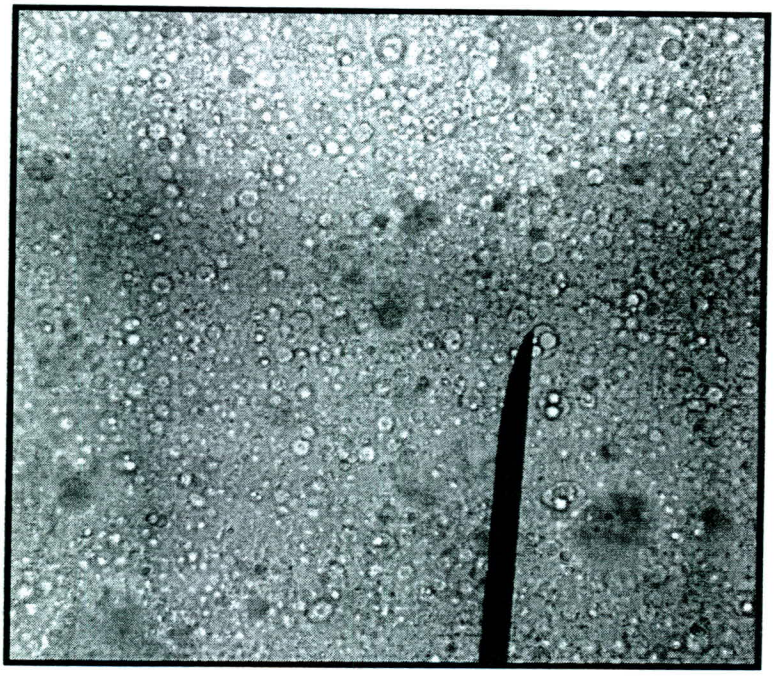
ตารางที่ 4.14 สภาวะการเตรียมไมโครแคปซูลและผลที่ได้ของตำรับ F-08

formula	coacervation conditions					mixer type	ผล
	step	rpm	T (°C)	pH	time		
F-08	A	8000	40	7.5	15 min	H	ไมโครแคปซูลที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน แต่เกาะกลุ่มกันมาก (รูปที่ 4.13)
	B	1500	40	4.0	5 min	M	
	C	1500	5	4.0	5 min	M	
	D	1500	5	4.0	1 hr	M	
	E	1500	RT	4.0	4 hr	M	
	F	1500	RT	4.0	15 min	M	

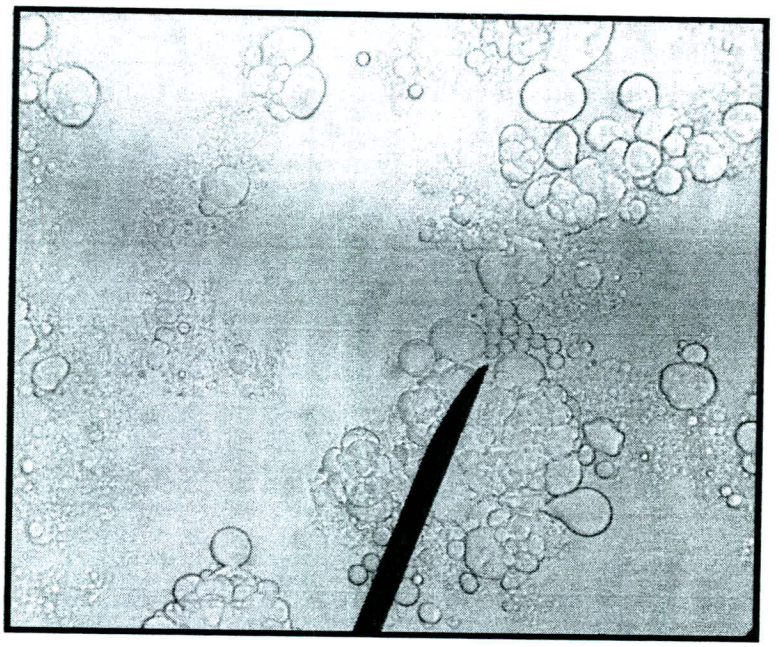
หมายเหตุ Formula F-08 แกนกลาง คือ น้ำมันรำข้าว:สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล = 1:1



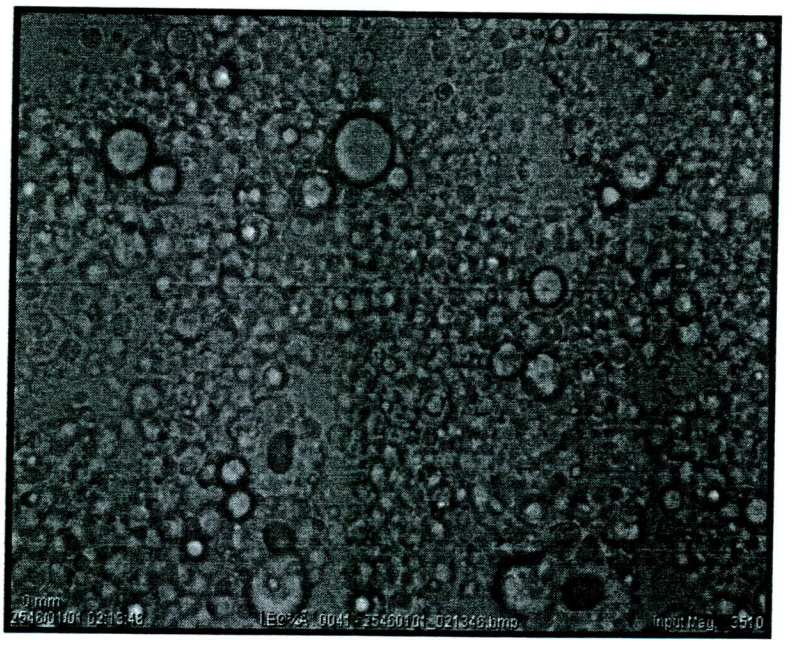
รูปที่ 4.9 ไมโครแคปซูลจากสูตรตำรับ F-01



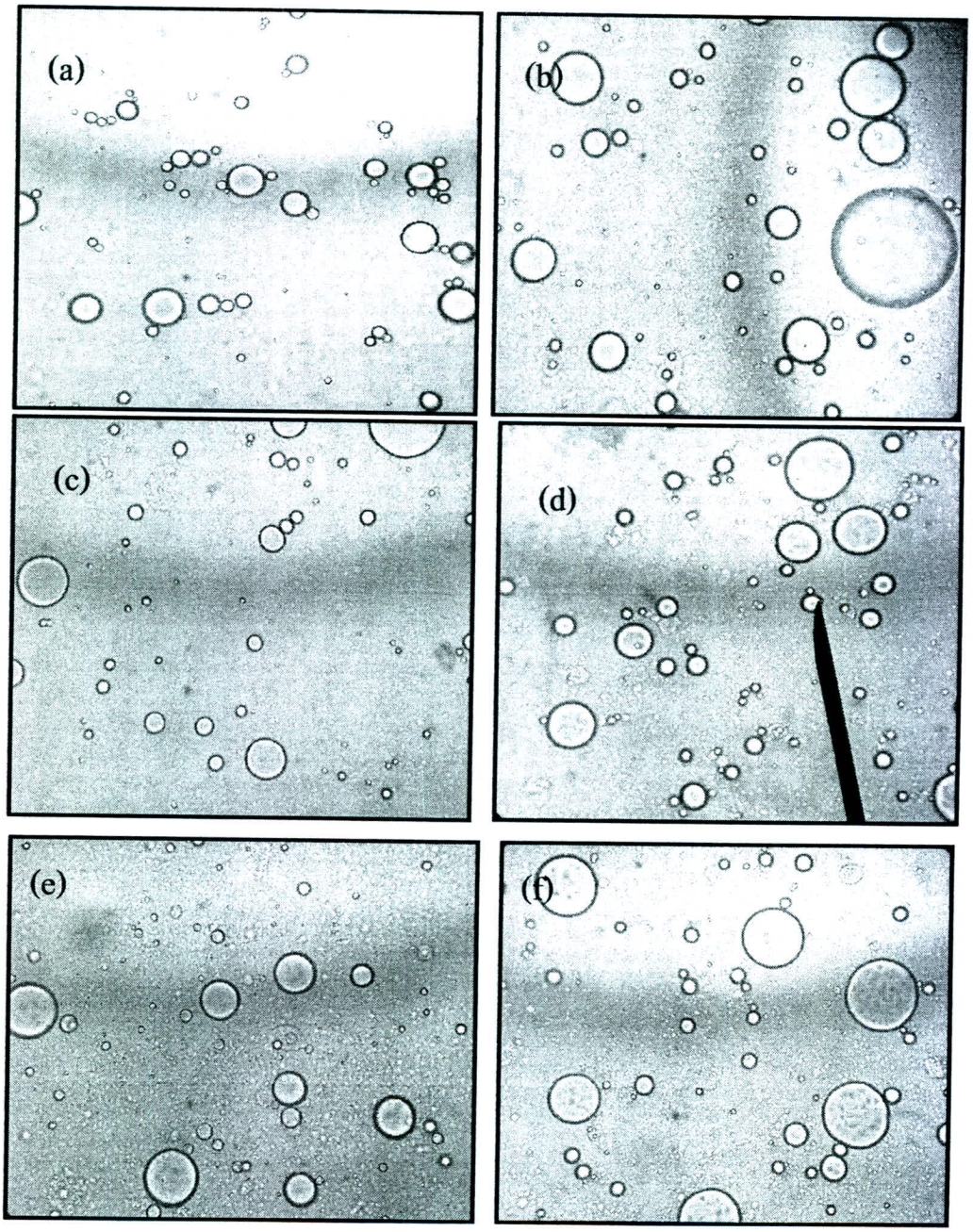
รูปที่ 4.10 ไมโครแคปซูลจากสูตรตำรับ F-02



รูปที่ 4.11 ไมโครแคปซูลจากสูตรตำรับ F-03



รูปที่ 4.12 ไมโครแคปซูลจากสูตรตำรับ F-04



รูปที่ 4.13 ไมโครแคปซูลจากสูตรตำรับ F-05

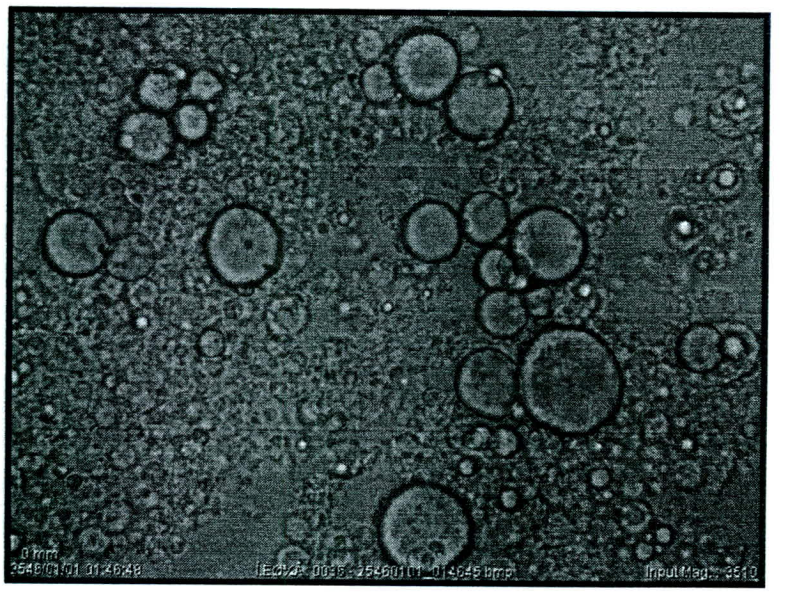
(a) หลังจาก ขั้นตอน A

(b) หลังจากปรับ pH 4.0 (ขั้นตอน B)

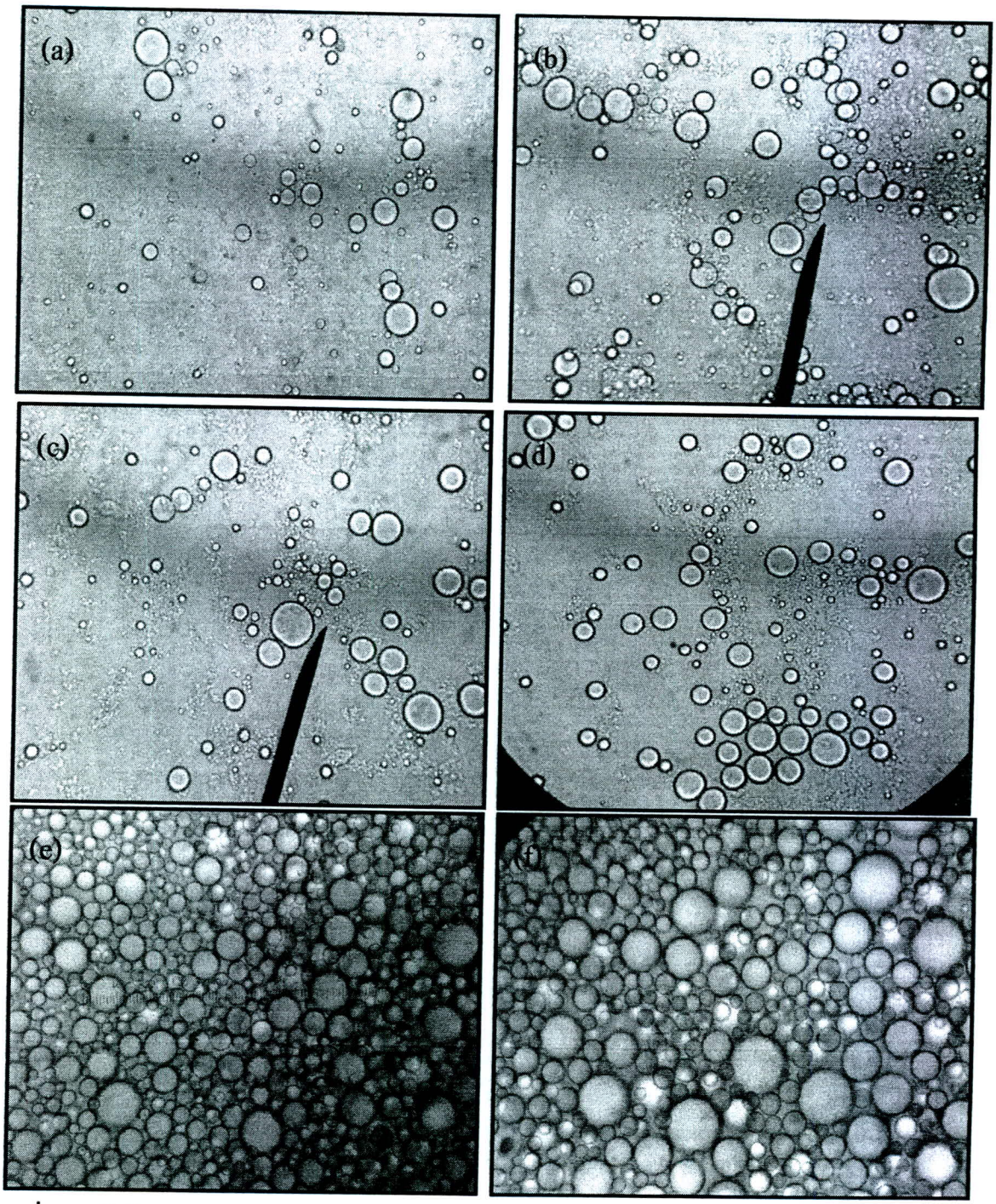
(c) หลังจากเติม SCMC (ขั้นตอน D)

(d), (e) หลังจากเติม GTD ครบ 1 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (ขั้นตอน E)

(f) หลังจากเติม glycine ครบ 15 นาที (ขั้นตอน F)



รูปที่ 4.14 ไมโครแคปซูลจากสูตรตำรับ F-06 (ประมาณ) 16.2 microns



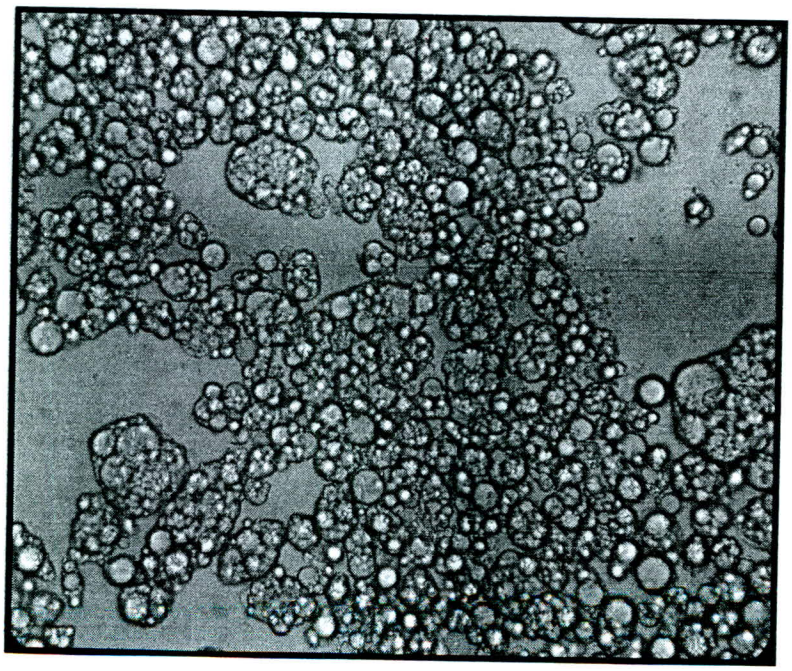
รูปที่ 4.15 ไมโครแคปซูลจากสูตรตำรับ F-07

(a) หลังจากเติม SCMC ครบ 1 ชั่วโมง (ขั้นตอน D)

(b), (c) หลังจากเติม GTD ครบ 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (ขั้นตอน E)

(d) หลังจากเติม glycine ครบ 15 นาที (ขั้นตอน F)

(e), (f) ไมโครแคปซูลที่ได้



รูปที่ 4.16 ไมโครแคปซูลจากสูตรตำรับ F-08

4.7 การทดลองหาสารดูดซับที่เหมาะสม ทำการทดสอบกับน้ำมันรำข้าวและสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

ตารางที่ 4.15 แสดงชนิดและปริมาณสารดูดซับที่ใช้ในการดูดซับน้ำมันรำข้าวซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้น ทดลองใช้สารดูดซับหลายชนิดในการดูดซับน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วนต่างๆ โดยน้ำหนัก พบว่าสารดูดซับที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำมันรำข้าว คือ Prosolv® SMCC และ Avicel® pH 101 ในอัตราส่วนของน้ำมันรำข้าวต่อสารดูดซับเท่ากับ 1:4 และ 1:4.6 ตามลำดับ โดยแป้งมันฝรั่งมีประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำมันรำข้าวได้น้อยที่สุด คือ ต้องใช้ในปริมาณ 25 เท่าโดยน้ำหนัก จึงจะได้สารผสมที่มีลักษณะผงแห้ง

จากนั้นนำผลที่ได้มาทดลองกับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล ซึ่งพบว่าได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 4.16 คือ สารดูดซับที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล คือ Prosolv® SMCC และ Avicel® pH 101 ในอัตราส่วนของสารสกัดต่อสารดูดซับเท่ากับ 1:3 และ 1:4 โดยน้ำหนักสารดูดซับที่เลือกนำมาทดสอบ เป็นสารที่นิยมใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณในยาเม็ด ทั้งนี้เพื่อให้ได้สารที่สามารถทำหน้าที่ได้สองอย่างในสูตรตำรับเดียวกัน ดังนั้นสารดูดซับที่ใช้ในการพัฒนาสูตรตำรับแกรนูลและยาเม็ดแกนน้ำมันรำข้าวและสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลต่อไป คือ Prosolv® SMCC และ Avicel® pH 101 ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของน้ำมันรำข้าว/สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล:สารดูดซับ เท่ากับ 1:4

ตารางที่ 4.15 ผลการทดลองหาสารดูดซับ (adsorbent) ที่เหมาะสมสำหรับน้ำมันรำข้าว

สารดูดซับ	น้ำหนักน้ำมันรำข้าว (กรัม)	น้ำหนักสารดูดซับ (กรัม)	อัตราส่วน
Corn Starch	2.0	14.0	1:7
Prosolv® SMCC*	2.0	8.11	1:4
Potato starch	2.0	50.0	1:25
Eratab® **	2.0	30.0	1:15
Avicel® pH101	2.0	9.2	1:4.6

* Silicified microcrystalline cellulose; ** Rice starch, sprayed-dried

ตารางที่ 4.16 ผลการทดลองหาสารดูดซับ (adsorbent) ที่เหมาะสม สำหรับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

สารดูดซับ	น้ำหนักสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล (กรัม)	น้ำหนักสารดูดซับ (กรัม)	อัตราส่วน
Prosolv® SMC	1	2.68	1:3
Avicel® pH101	1	3.35	1:4

4.8 การพัฒนาสูตรแกรนูลยาเม็ดแกน

แกรนูลยาเม็ดแกนมี 2 สูตร คือ แกรนูลหลอก (สูตรตำรับที่ 1 และ 2) มีน้ำมันรำข้าวเป็นสารสำคัญและแกรนูลที่แท้จริง (สูตรตำรับที่ 3, 4, และ 5) ใช้สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำลืมผัวเป็นสาระสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุดเมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง โดยมีปริมาณสารสำคัญในสูตรแกรนูลเท่ากัน คือ ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก (มีสารสำคัญ 2.0 กรัมของน้ำหนักแกรนูลรวม 80.0 กรัม) ใช้ Prosolv® SMCC หรือ Avicel® pH 101 เป็นสารดูดซับในอัตราส่วนตัวยาต่อสารดูดซับเป็น 1:4 และในสูตรตำรับหนึ่งๆ จะใช้สารเพิ่มปริมาณเป็นสารผสมระหว่างสารชนิดเดียวกับสารดูดซับที่ใช้กับเพคติน ในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนัก ดังแสดงรายละเอียดของสูตรตำรับแกรนูลในตารางที่ 3.2 ในบทที่ 3

สูตรตำรับที่ 3 และ 5 มีสูตรตำรับเหมือนกัน ต่างกันที่วิธีการตอกเม็ด สูตรตำรับที่ 3 ตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกแบบไฮดรอลิก เพื่อศึกษาความสามารถในการตอกอัดของแกรนูล โดยดูจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงตอกและความแข็งของยาเม็ด (pressure-hardness profile) สูตร

ตำรับที่ 4 และ 5 แตกต่างกัน คือ ตำรับที่ 4 มีการเติมสารช่วยไหล (colloidal silicon dioxide, Aerosil®) ในความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของตำรับ

4.9 การประเมินสมบัติพื้นฐานของแกรนูลยาเม็ดแกน

ตารางที่ 4.17 แสดงให้เห็นถึงสมบัติพื้นฐานของแกรนูลหลอก (สูตรตำรับที่ 1 และ 2) และสูตรตำรับแกรนูลที่แท้จริงที่มีสารสกัด (สูตรตำรับที่ 3-5) ได้แก่ สมบัติการไหล ซึ่งแสดงด้วยค่ามุมการไหลและ % compressibility พบว่า มุมการไหลของสูตรแกรนูลหลอกมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่สูตรแกรนูลที่แท้จริง (สูตรที่ 4 และ 5) มีค่าการไหลที่ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกันทั้งสองตำรับ โดยสูตรตำรับที่ 4 มีการเติมสารช่วยไหล (Aerosil® 0.5%) ในขณะที่สูตรตำรับ 5 ไม่มีการเติม Aerosil® ดังนั้นการเติมสารช่วยไหลจึงไม่จำเป็นเมื่อเปรียบเทียบจากคุณสมบัติการไหล

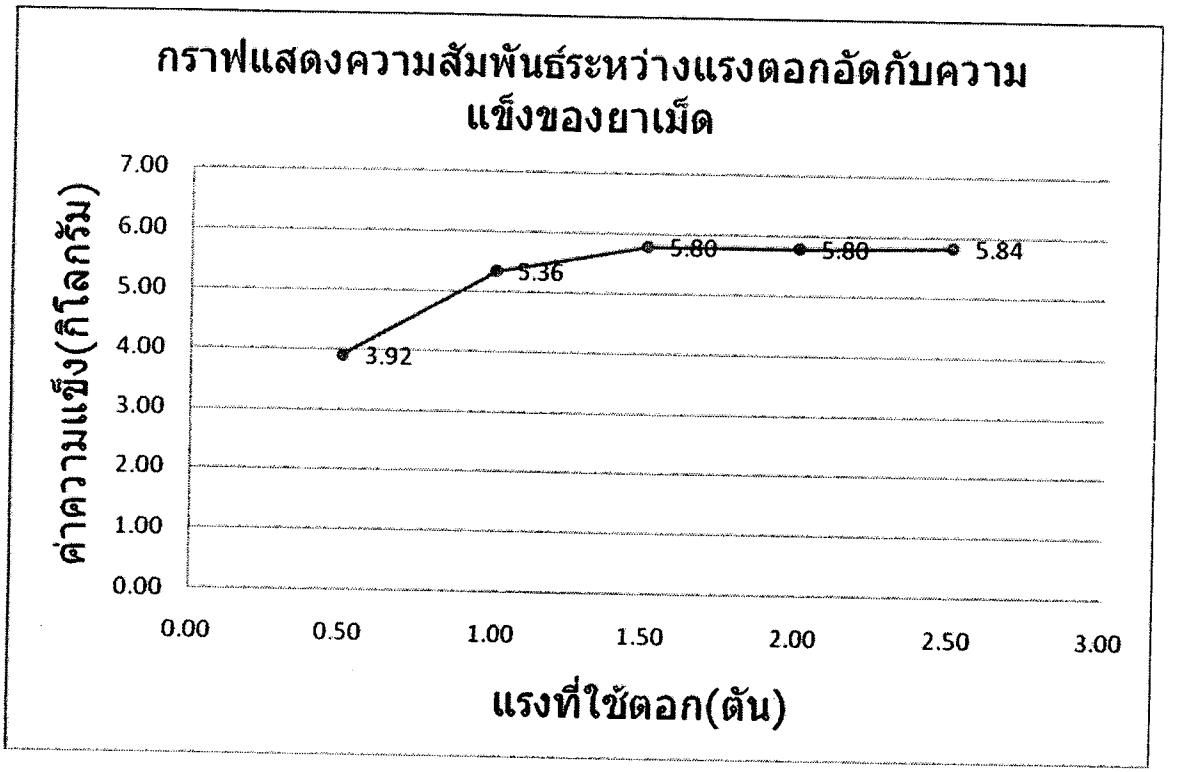
การศึกษาผลของแรงตอกอัดต่อสมบัติยึดเกาะของแกรนูลที่มีสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในสูตรตำรับที่ 3 ซึ่งตอกยาเม็ดด้วยเครื่องตอกแบบไฮดรอลิกที่แรงตอกอัดต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ตัน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.17 ซึ่งจากแนวโน้มของเส้นกราฟแสดงว่าสูตรตำรับแกรนูลจากตำรับที่ 3 มีความสามารถในการตอกอัดได้ดีโดยเฉพาะในช่วง 0.5 – 1.5 ตัน และพบว่าความแข็งยาเม็ดจะคงที่ที่แรงตอกที่ 1.5 ตันขึ้นไปโดยไม่สามารถที่จะตอกอัดให้มีความแข็งมากกว่านี้ได้

ตารางที่ 4.17 สมบัติพื้นฐานของแกรนูลหลอกและแกรนูลจริง

สมบัติพื้นฐานของแกรนูล	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)				
	สูตรตำรับที่				
	1	2	3	4	5
มุมการไหล* (สมบัติการไหล)	33.28±0.93 (Good)	34.60±1.03 (Good)	33.02±0.40 (Good)	36.25±0.22 (Fair)	36.62±0.56 (Fair)
% Compressibility* (สมบัติการไหล)	-	-	-	6.45 (Excellent)	10.71 (Good)
% ความชื้น	-	-	-	5.10±0.51	4.51±0.40

* รายละเอียดการคำนวณอยู่ในภาคผนวก

ดังนั้น สูตรตำรับแกรนูลที่นำไปใช้ตอกยาเม็ดแกนหลอก คือ สูตรตำรับที่ 2 และสูตรตำรับแกรนูลที่นำไปใช้ตอกเม็ดแกนที่แท้จริง คือ สูตรตำรับที่ 5 ซึ่งทั้งสองสูตรตำรับใช้ Avicel®pH 101 เป็นสารดูดซับในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของตัวยา:สารดูดซับ เท่ากับ 1:2



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแรงตอกอัดกับความแข็งของยาเม็ด (สูตรตำรับที่ 3)

4.10 การพัฒนายาเม็ดแกน

สูตรตำรับยาเม็ด

แกรนูลน้ำมันรำข้าว หรือ แกรนูลสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว	
Talcum	1.0%
Ac-Di-Sol®	0.5%
magnesium stearate	0.5%

นำแกรนูลหลอกหรือแกรนูลที่แท้จริงมาผสมกับสารอื่นๆ ตามสูตรตำรับยาเม็ดข้างต้น โดยผสมในถุงพลาสติก โดยผสมแกรนูลกับ Ac-Di-Sol® นาน 2 นาที ตามด้วยการผสม talcum และ magnesium stearate ลงในถุงพลาสติก นาน 1 นาที นำไปตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกยาเม็ดชนิดหมุนรอบ และตรวจสอบน้ำหนักของยาเม็ดและความแข็งของยาเม็ดในระหว่างกระบวนการตอก

4.10.1การประเมินสมบัติยาเม็ดแกน

การประเมินสมบัติยาเม็ดแกนสูตรตำรับที่ 1-5 ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ย ความแข็งของยาเม็ด และร้อยละของความกร่อนของเม็ดยา ดังแสดงผลในตารางที่ 4.18 พบว่า น้ำหนักยาเม็ดแกนมีน้ำหนักเฉลี่ย ประมาณ 240 มิลลิกรัม มีสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัวเท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อเม็ด มีความแข็งประมาณ 4 กิโลกรัม (สูตรตำรับที่ 2 และ 5) และมีค่าร้อยละความ

กร่อนของยาเม็ดต่ำ นั่นคือไม่เกินค่ามาตรฐานซึ่งต้องไม่เกินร้อยละ 0.5 ซึ่งสามารถนำไปเคลือบฟิล์มต่อได้

ตารางที่ 4.18 สมบัติพื้นฐานของยาเม็ดแกนสูตรตำรับที่ 1-5

สมบัติพื้นฐาน	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)				
	สูตรตำรับที่				
	1	2	3*	4	5
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	0.2239±0.0094	0.2405±0.0128	0.3988±0.0109	0.2550±0.0206	0.2388±0.0054
ความแข็งของยาเม็ด (นิวตัน)	32.2±6.2	41.3±1.2	58.4±0.1	46.5±0.6	43.4±0.3
ร้อยละความกร่อนของยาเม็ด	0.69	0.57	0.52	0.64	0.63
เวลาในการแตกตัว (นาที)	N/A	N/A	N/A	N/A	36.23±6.41

* สูตรที่ 3 ตอกด้วยเครื่องตอกแบบไฮดรอลิก ที่แรงตอกอัด 2 ตัน (ศึกษาสมบัติตอกอัดของแกรนูล)

จากการทดลองหาเวลาในการแตกตัวของยาเม็ดแกน (ทดลองเฉพาะสูตรตำรับที่ 5 ซึ่งเป็นยาเม็ดแกนของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล) พบว่า ยาเม็ดแตกตัวช้ามาก เนื่องจากมี pectin ในสูตรตำรับ เกิดเป็นชั้นเจล ทำให้ยาเม็ดแตกตัวได้ช้า จึงได้ปรับสูตรตำรับยาเม็ด โดยตัดเพคตินออกจากสูตรตำรับโดยใช้แลคโทสแทนเพคติน ดังแสดงในตารางที่ 4.19 และผลการประเมินตำรับยาเม็ดแกนปรับปรุงดังแสดงในตารางที่ 4.20 ดังนี้

ตารางที่ 4.19 สูตรตำรับแกรนูลปรับปรุง (ไม่มี pectin) - สูตรตำรับที่ 6

องค์ประกอบ (กรัม)	แกรนูล สูตรตำรับที่ 6	ยาเม็ดแกนสูตรตำรับที่ 6
สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลหรือน้ำมันรำข้าว	33.33	
Avicel PH 101	466.67	
PVP K90 (10% PVP K90 in i- PrOH159 g)	15.9	
Talcum, 1%		5.08
Ac-Di-Sol, 0.5 %		2.54
Magnesium stearate, 0.5%		5.08

ตารางที่ 4.20 ผลการประเมินตำรับยาเม็ดแกนปรับปรุง-สูตรตำรับที่ 6

สมบัติยาเม็ด (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ยาเม็ดแกนสารสกัด สูตรตำรับที่ 6	ยาเม็ดแกนหลอก (สูตรตำรับที่ 6)
น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด (กรัม)	0.2133±0.0075	0.2434±0.0023
ความแข็ง (นิวตัน)	20.5±0.05	57.0±0.51
% ความกร่อน	0.22	0.47
เวลาในการแตกตัว (นาที)	8.34±1.11	N/A

ดังนั้น ยาเม็ดแกนที่นำไปเคลือบฟิล์ม เพื่อนำส่งสารสำคัญสู่ลำไส้ใหญ่ต่อไป คือ สูตรตำรับที่ 6 โดยใช้ยาเม็ดแกนสูตรที่ 6 (ยาเม็ดแกนหลอก) เป็นตำรับทดสอบเบื้องต้น

4.11 การเคลือบยาเม็ดแกนเพื่อนำส่งสู่ลำไส้ใหญ่

การเคลือบยาเม็ดแกนเพื่อนำส่งสู่ลำไส้ใหญ่ ทำการเคลือบยาเม็ดแกน 2 ชั้น ประกอบด้วย ชั้นการเคลือบเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาในลำไส้เล็ก (การเคลือบชั้นในสุด) และการเคลือบเพื่อยับยั้งการปลดปล่อยตัวยาในกระเพาะอาหาร (การเคลือบชั้นนอกสุดของยาเม็ด) ได้ผลดังรายละเอียดต่อไปนี้

4.11.1 การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาเคลือบและสภาวะการเคลือบเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาในลำไส้เล็ก (การเคลือบชั้นในสุด)

ยาเม็ดแกน: ประกอบด้วยยาเม็ดแกนหลอก (น้ำมันรำข้าว) หรือยาเม็ดแกนที่แท้จริง (สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล) และยาเม็ดแลคโทส เพื่อเพิ่มปริมาณของยาเม็ดให้ได้ความจุต่ำสุดของหม้อเคลือบ โดยทำการประเมินคุณภาพยาเม็ดแกนก่อนเคลือบ ในด้านน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด ความแข็ง ความกร่อน และระยะเวลาแตกตัว โดยกำหนดให้ได้ความแข็ง $\geq$ 30 นิวตัน และความกร่อนต้องมีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 0.5

น้ำยาเคลือบ: ทำการปรับสูตรให้มีส่วนประกอบที่เหมาะสม พบว่าสูตรน้ำยาเคลือบเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาในลำไส้เล็ก ประกอบด้วย Eudragit® NE30D ร้อยละ 10 ทำหน้าที่เป็นสารก่อฟิล์มTalcum ร้อยละ 25 ของสารก่อฟิล์ม ทำหน้าที่เป็นสารกันติด

สภาวะในการเคลือบ: ทดลองปรับแรงดันลมในช่วง 2.5-4.5 bar และปรับอุณหภูมิในการเคลือบให้เหมาะสม เนื่องจากมีบางครั้งที่อุณหภูมิในหม้อเคลือบไม่คงที่ ทำให้เม็ดยาเกาะกัน เนื่องจากการระเหยของน้ำยาเคลือบเกิดขึ้นช้า ได้สภาวะที่เหมาะสม ดังนี้

อัตราการหมุนหม้อเคลือบ 9-11 รอบ/นาที (ตั้งค่าไว้ที่ 10 รอบ/นาที)

แรงดันลม 2.5 bar

อัตราการพ่นสารละลาย 2.70-2.83 กรัม/นาที (คำนวณจากน้ำหนักน้ำยาเคลือบเริ่มต้นและน้ำหนักที่เหลือ ต่อช่วงเวลาที่เคลือบ)

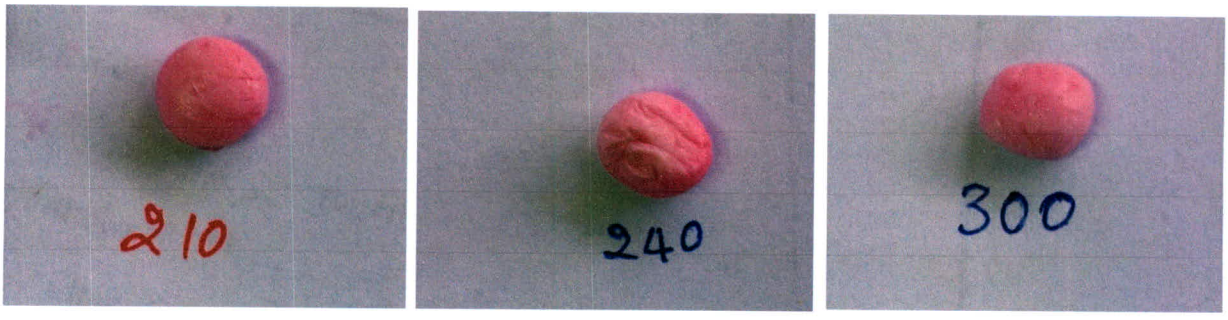
อุณหภูมิในหม้อเคลือบ 97-103 องศาเซลเซียส (ตั้งค่าไว้ที่ 100 องศาเซลเซียส)

(อุณหภูมิลมขาเข้า 65-67 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมขาออก 68-72 องศาเซลเซียส)

% ความชื้นสัมพัทธ์ 17-18 %

ระยะเวลาในการเคลือบ: ปรับระยะเวลาเคลือบ ตั้งแต่ 2-6 ชั่วโมง ประเมินความคงตัวของฟิล์ม โดยการนำยาเม็ดที่เคลือบแล้วทดสอบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ด้วยเครื่องวัดการละลาย (USP Apparatus II)

การทดลองเพื่อการปรับสูตรน้ำยาเคลือบและสภาวะการเคลือบที่เหมาะสมสำหรับการเคลือบ จะใช้ยาเม็ดแกนแลคโทสที่มีสีชมพู เคลือบด้วยน้ำยาเคลือบที่เวลาต่างๆ และประเมินการเปลี่ยนแปลงของยาเม็ดเคลือบหลังการทดสอบการละลายในตัวกลาง คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ดังแสดงในรูปที่ 4.18 จะเห็นว่า การเคลือบฟิล์มนาน 3 ชั่วโมงขึ้นไป ได้ฟิล์มที่แข็งแรงที่จะสามารถชะลอการปลดปล่อยตัวยาในสภาวะจำลองของลำไส้เล็กได้



รูปที่ 4.18 ลักษณะยาเม็ดแกนแลคโทสที่เคลือบด้วย Eudragit® NE30D หลังจากทดสอบการละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 นาน 4 ชั่วโมง; (A), (B) และ (C) เมื่อเคลือบนาน 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการทดลองเคลือบฟิล์มยาเม็ดแกนหลอกและยาเม็ดแกนที่มีสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลด้วย Eudragit® NE30D พบว่า ยาเม็ดแกนที่มีสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล ฟิล์มที่เคลือบมีผิวขรุขระ ร่อน ไม่ติดกับยาเม็ดแกน ในขณะที่ยาเม็ดแกนหลอก (ยาเม็ดน้ำมันรำข้าว) ที่เคลือบฟิล์มแล้ว ได้ยาเม็ดที่มีลักษณะผิวมันเรียบ ดังรูปที่ 4.19 และรูปที่ 4.20

รูปที่ 4.19 ยาเม็ดแกนสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลและยาเม็ดแลคโทสที่เคลือบฟิล์มด้วย Eudragit®

รูปที่ 4.20 ยาเม็ดแกนน้ำมันรำข้าวและยาเม็ดแลคโทสที่เคลือบฟิล์มด้วย Eudragit®

จากทดลองพบว่า ปัญหาการเคลือบฟิล์มบนยาเม็ดแกนสารสกัดข้างต้น เกิดจากการแยกตัวและซึมผ่านออกมาของสารสกัดมาที่บริเวณผิวของยาเม็ด ขณะเคลือบยาเม็ดที่อุณหภูมิสูง ทำให้ฟิล์มของ Eudragit® NE30D ซึ่งเป็นสารกระจายตัวในน้ำ (aqueous dispersion) ไม่เชื่อมหรือยึดติดกับผิวหน้าของเม็ดยา ทำให้ได้ฟิล์มที่ร่อนออกมาจากผิวยาเม็ด แต่ปัญหานี้พบว่าไม่เกิดขึ้นกับยาเม็ดแกนน้ำมันรำข้าว จึงปรับสูตรตำรับแกรนูลเป็นสูตรตำรับที่ 7 ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.21 และสูตรตำรับยาเม็ดแกนในตารางที่ 4.22 ตามลำดับ โดยในสูตรตำรับที่ 7 ได้ปรับปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลลง แต่ทดแทนสารสกัดด้วยน้ำมันรำข้าวให้มี สารสกัด:น้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วน 1:2 โดยน้ำหนักเพื่อแก้ไขปัญหายาเม็ดมีผิวขรุขระหลังการเคลือบฟิล์มด้วย Eudragit® NE30D แกรนูลมีปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลร้อยละ 2.22 เมื่อนำมาตอกเป็นยาเม็ดแกนมีปริมาณสารสกัด 5.33 มิลลิกรัมต่อเม็ด โดยน้ำหนักยาเม็ดแกนเท่ากับ 240 มิลลิกรัม

เมื่อนำยาเม็ดแกนสูตรตำรับที่ 7 มาเคลือบด้วย Eudragit® NE30D นาน 4 ชั่วโมง (ใช้สภาวะการเคลือบตามข้อ 4.10.1) และประเมินตำรับยาเม็ดแกนที่เคลือบแล้วโดยการทดสอบการละลายในสภาวะจำลองของลำไส้เล็ก (pH6.8) พบว่า ยาเม็ดไม่ผ่านการทดสอบทั้งนี้ดังแสดงในตารางที่ 4.23 อาจเนื่องจากผลของ Avicel® pH 101 ที่เป็นองค์ประกอบในสูตรตำรับที่ทำให้ยาเม็ดแตกตัวได้ง่าย จึงพัฒนาสูตรแกรนูลเป็นสูตรตำรับที่ 8 โดยใช้ colloidal silicon dioxide (Aerosil®) ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก เป็นสารดูดซับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลแทน Avicel® pH 101 และใช้แลคโทสเป็นสารเจือจางในตำรับยาเม็ดแกนการพัฒนาสูตรตำรับใหม่นี้ ทำให้มีปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 3.33 คิดเป็นปริมาณสารสกัด 8 มิลลิกรัมต่อหนึ่งเม็ด โดยสูตรตำรับแกรนูลและสูตรตำรับยาเม็ดแกน ตำรับที่ 8 แสดงในตารางที่ 4.21 และในตารางที่ 4.22 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.21 สูตรตำรับแกรนูลสูตรตำรับที่ 7 และสูตรตำรับที่ 8

องค์ประกอบในแกรนูล (กรัม)	สูตรตำรับที่ 7	สูตรตำรับที่ 8
สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล	11.11	16.67
น้ำมันรำข้าว	22.22	-
Aerosil®	-	16.67
Avicel® pH 101	306.67	-
Lactose	133.32	440.00
PVP K90 (15% PVP K90 in i-PrOH 177.78 g)	26.67	26.67
To make	500.00 g	500.00 g

ตารางที่ 4.22 สูตรตำรับยาเม็ดแกน สูตรตำรับที่ 7 และสูตรตำรับที่ 8

องค์ประกอบในแกรนูล	สูตรตำรับ7	สูตรตำรับ8
สารสำคัญ	แกรนูลสูตรตำรับ 7	แกรนูลสูตรตำรับ 8
Talcum	1.0%	1.0%
Ac-Di-Sol®	0.5%	0.5%
Magnesium stearate	0.5%	0.5%
ปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลต่อเม็ด	5.3 มิลลิกรัม	8.0 มิลลิกรัม

ตารางที่ 4.23 แสดงผลการประเมินยาเม็ดแกนสูตรตำรับที่ 7 และสูตรตำรับที่ 8 ก่อนนำไปเคลือบฟิล์ม พบว่า มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด ในช่วง 240 มิลลิกรัม ความแข็งของเม็ดยาใกล้เคียงกัน และมีร้อยละของความกร่อนต่ำ และมีเวลาการแตกตัวน้อยกว่า 30 นาที

ตารางที่ 4.23 ผลการประเมินตำรับยาเม็ดแกน สูตรตำรับที่ 7 และสูตรตำรับที่ 8

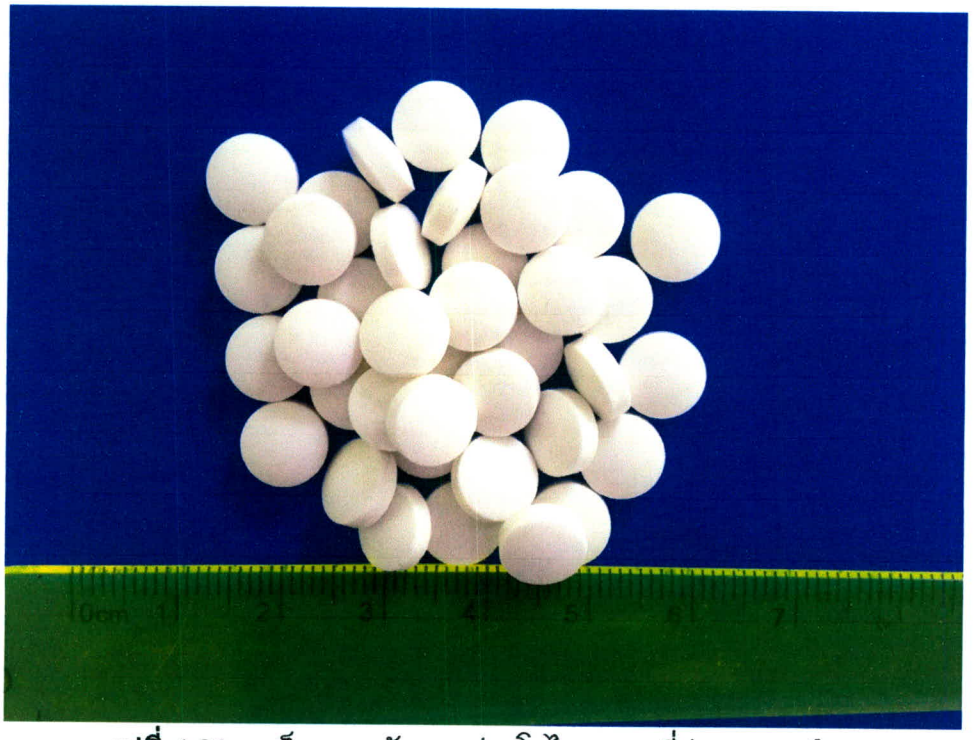
สมบัติยาเม็ด (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ยาเม็ดแกนสารสกัด สูตรตำรับที่ 7	ยาเม็ดแกนสารสกัด สูตรตำรับที่ 8
น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด (กรัม)	0.2374±0.0048	**0.2437±0.0341**
ความแข็ง (นิวตัน)	28.8±1.55	26.5±3.57
%ความกร่อน	0.14	0.56
เวลาในการแตกตัว (นาที)	20.82±1.38	26.82±2.93

นำยาเม็ดแกนสูตรตำรับที่ 8 มาเคลือบด้วย Eudragit® NE30D ใช้สภาวะการเคลือบตามข้อ 4.10.1 เก็บตัวอย่างยาเม็ดที่เคลือบที่เวลาต่างๆ ทุกครึ่งชั่วโมง นำยาเม็ดที่ได้มาทำการเคลือบฟิล์มชั้นต่อไปด้วย Eudragit® L-100 D ในข้อ 4.10.2

4.11.2 การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาเคลือบและสภาวะการเคลือบเพื่อยับยั้งการปลดปล่อยตัวยาในกระเพาะอาหาร (การเคลือบชั้นนอกสุดของยาเม็ด)

การเคลือบยาเม็ดชั้นนอกสุด เป็นการเคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายที่ pH ต่ำกว่า 6.0 ซึ่งเป็นการเคลือบเพื่อป้องกันกรดในกระเพาะอาหาร โดยสารเคลือบจะไม่ละลายใน pH ของกระเพาะอาหาร จึงป้องกันการปลดปล่อยตัวยาในกระเพาะอาหาร สูตรน้ำยาเคลือบประกอบด้วย Eudragit®L-100 D และมี Talcum ร้อยละ 25 ของปริมาณพอลิเมอร์เป็นสารกันติด ด้วยสภาวะการ

เคลือบเหมือนกับการเคลือบเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาในลำไส้เล็ก (ใช้สภาวะการเคลือบตามข้อ 4.10.1)



รูปที่ 4.21 ยาเม็ดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ผ่านการเคลือบ

1. การประเมินสมบัติยาเม็ดสารสกัดที่เคลือบแล้ว

เมื่อนำยาเม็ดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสูตรตำรับที่ 8 ที่ผ่านการเคลือบฟิล์มของ Eudragit® NE30D โดยใช้เวลาในการเคลือบนาน 1 ชั่วโมงครึ่ง ตามด้วยเคลือบฟิล์มของ Eudragit®L-100 D นาน 4 ชั่วโมง มาประเมินคุณสมบัติยาเม็ด แสดงผลในตารางที่ 4.24 พบว่า ยาเม็ดสารสกัดหลังการเคลือบมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.2646±0.0024 กรัม เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักยาเม็ดแกนร้อยละ 8.58 และมีค่าความแข็งเฉลี่ย 40.6±5.52 นิวตัน เพิ่มขึ้นจากยาเม็ดแกน (26.5±3.57 นิวตัน) ในการศึกษานี้ไม่ทำการทดสอบความกร่อนและหาเวลาการแตกตัว เนื่องจากเป็นยาเม็ดเคลือบ

ตารางที่ 4.24 ผลการประเมินตำรับยาเม็ดสารสกัด สูตรตำรับที่ 7 และสูตรตำรับที่ 8

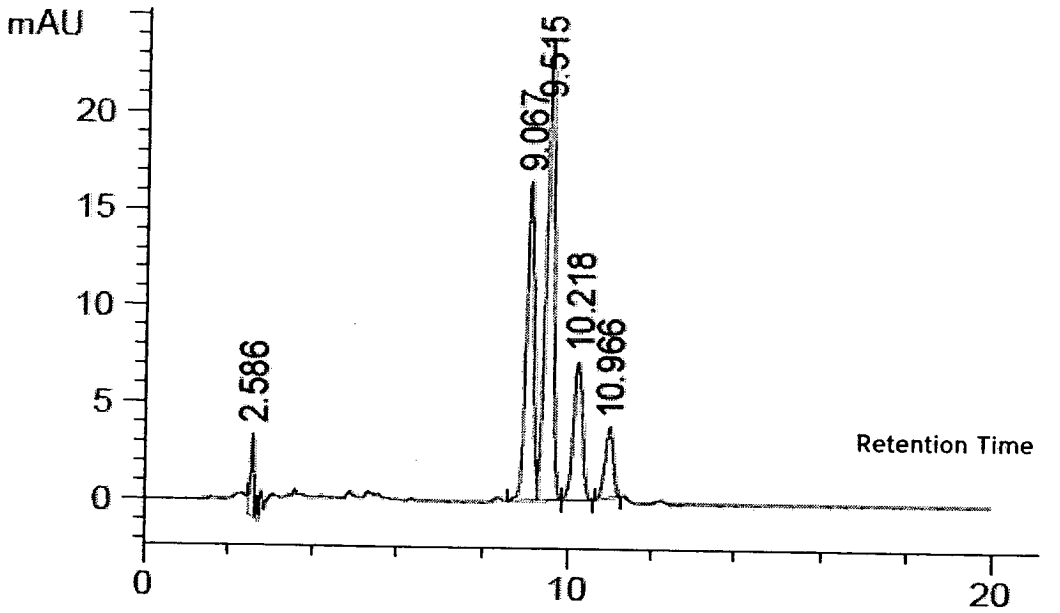
สมบัติยาเม็ด (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ยาเม็ดสารสกัด สูตรตำรับที่ 7	ยาเม็ดสารสกัด สูตรตำรับที่ 8
น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด (กรัม)	*	0.2646±0.0024
ความแข็ง (นิวตัน)	*	40.6±5.52
% ความกร่อน	*	**
เวลาในการแตกตัว (นาที)	*	**
การทดสอบการละลายในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร		
Phase 1: 0.1 N HCl pH 1.2; 2 h	ผ่านการทดสอบ	ผ่านการทดสอบ
Phase 2: PBS pH 6.8; 3 h	**<u>ไม่ผ่านการทดสอบ</u>** ยาเม็ดแตกตัวก่อนครบเวลา 3 ชั่วโมง (แตกตัวที่เวลาตั้งแต่ 4–16 นาที)	ผ่านการทดสอบ
Phase 3: PBS pH 7.4; 2 h	<u>ไม่ทำ</u> เนื่องจากไม่ผ่านการทดสอบการละลายใน Phase 2	ดูดสารละลายที่เวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120 นาที เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลด้วยวิธี HPLC

หมายเหตุ* ไม่ได้ทำเนื่องจากยาเม็ดไม่ผ่านการทดสอบการละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.8

** ไม่ทำ เนื่องจากเป็นยาเม็ดเคลือบ

2. การวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลที่มีในยาเม็ดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

จากรูปที่ 4.22 แสดง HPLC โครมาโทแกรมของแกมมา-โอไรซานอลที่ตรวจวิเคราะห์พบในยาเม็ดนำส่งสารสกัดที่มีแกมมา-โอไรซานอลที่ได้พัฒนาขึ้น โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลได้เท่ากับ 48.25 ± 0.47 ไมโครกรัมต่อเม็ด



รูปที่ 4.22 HPLC โครมาโทแกรมของแกมมา-โอไรซานอลในยาเม็ดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

4.10 การทดสอบการละลายยาเม็ดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร

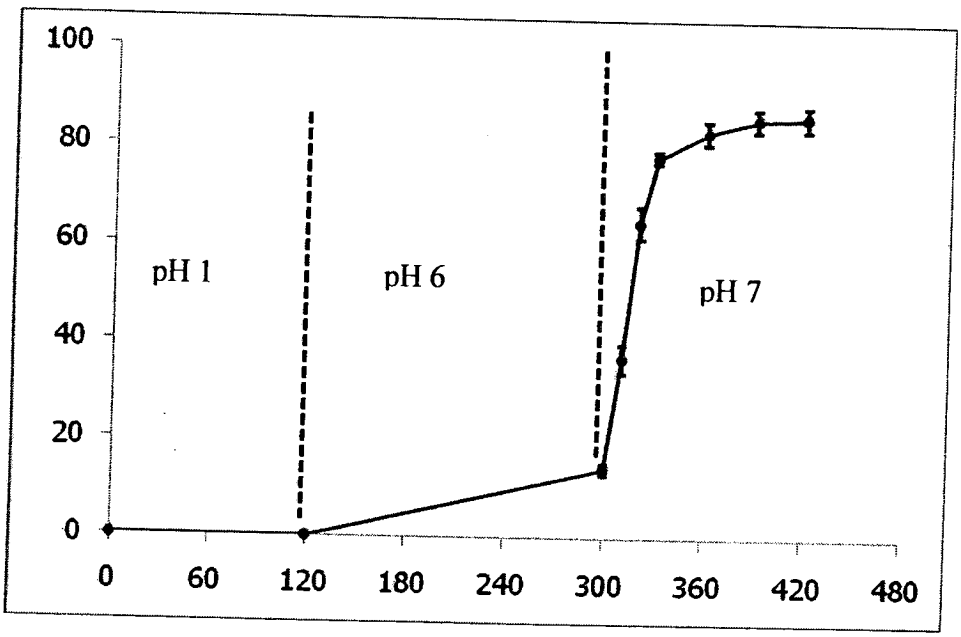
การทดสอบการละลาย ยาเม็ดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลด้วยเครื่องทดสอบการละลาย Dissolution Apparatus II (Paddle) เพื่อประเมินการปลดปล่อยตัวยาในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร ใน 3 เฟสต่อเนื่อง คือ สภาวะจำลองกระเพาะอาหาร (สารละลาย HCl 0.1 N, pH 1.2) นาน 2 ชั่วโมง ตามด้วยสภาวะจำลองลำไส้เล็ก (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสภาวะจำลองลำไส้ใหญ่ส่วนต้นซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายของการปลดปล่อยตัวยา (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยในเฟสที่ 1 และเฟสที่ 2 ดูดสารละลายตัวอย่าง ที่เวลา 2 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ ในเฟสที่ 3 ดูดสารละลายตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ทุก 10, 20, 30, 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับ นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography ได้ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลในยาเม็ดสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 4.25 และรูปที่ 4.20 เป็นกราฟการละลายของแกมมา-โอไรซานอลในยาเม็ดสารสกัด สำหรับโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลในยาเม็ดสารสกัดที่เวลาต่างๆ แสดงในภาคผนวก 2

ตารางที่ 4.25 ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลจากการศึกษาการละลายของยาเม็ดสารสกัด ในสภาวะจำลองทางเดินอาหาร

สภาวะทดสอบ	เวลา (นาที)	ปริมาณแกมมา-โอไรซานอล (ไมโครกรัม)						% Dissolved*
		1	2	3	4	5	Mean± SD (N=5)	Mean± SD (N=5)
เฟสที่ 1 pH 1.2	120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
เฟสที่ 2 pH 6.8	300	8.25	5.40	6.95	6.35	7.38	6.87±1.07	14.24±2.22
เฟสที่ 3 pH 7.4	310	16.29	18.24	19.22	17.21	16.54	17.50±1.22	36.27±2.53
	320	33.43	30.91	32.56	29.54	30.29	31.35±1.61	64.97±3.34
	330	38.72	35.71	36.77	37.87	36.97	37.21±1.14	77.12±2.36
	360	37.17	38.80	40.83	39.54	38.56	38.98±1.34	80.79±2.78
	390	38.55	40.10	41.97	40.67	39.75	40.21±1.25	83.34±2.65
	420	38.88	40.67	42.37	40.98	39.97	40.57±1.29	84.08±2.67

n.d. = not detectable;

* คิดเป็นร้อยละของปริมาณแกมมา-โอไรซานอลในหนึ่งเม็ด (48.25 ± 0.47 ไมโครกรัมต่อเม็ด)



รูปที่ 4.23 การละลายออกของแกมม่า-โอไรซานอลในสภาวะจำลองทางเดินอาหารที่เวลาต่างๆ

จากตารางที่ 4.25 และรูปที่ 4.23 พบว่า ยาเม็ดสารสกัดสูตรตำรับที่ 8 ไม่มีการปลดปล่อยแกมมา-โอไรซานอลในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร แสดงว่าการเคลือบยาเม็ดแกนของสารสกัดด้วยEudragit® L-100 D นาน 4 ชั่วโมง ได้เม็ดยาเคลือบฟิล์มที่สมบูรณ์พอ สำหรับป้องกันการปลดปล่อยสารสกัดจากยาเม็ดในกระเพาะอาหาร เมื่อเปลี่ยนสารละลายตัวกลางเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.8 ซึ่งจำลองสภาวะของลำไส้เล็ก ไม่พบการปลดปล่อยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในช่วงแรก จนถึงท้ายการทดสอบที่เวลา 2 ชั่วโมง 45 นาที สังเกตพบการเปลี่ยนแปลงฟิล์มบนผิวของยาเม็ดสารสกัด เมื่อดูดสารละลายตัวอย่าง ณ เวลา 3 ชั่วโมงไปวิเคราะห์หาปริมาณ พบว่ามีปริมาณแกมมา-โอไรซานอลร้อยละ 14.24 ของปริมาณที่มีในยาเม็ดที่ถูกปลดปล่อยออกมาที่เวลาดังกล่าว

ในเฟสที่ 3 ของการทดสอบ ซึ่งจำลองสภาวะของลำไส้ใหญ่ส่วนต้น พบว่า มีการปลดปล่อยสารสกัดจากยาเม็ดอย่างรวดเร็วและทันที (immediate release) คือ มากกว่าร้อยละ 80 ภายในเวลา 60 นาที ดังนั้นจึงได้ยาเม็ดที่สามารถชะลอการปลดปล่อยสารสกัดในทางเดินอาหารส่วนต้น คือกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และสามารถนำส่งแกมมา-โอไรซานอลไปยังบริเวณที่เป็นเป้าหมายคือ บริเวณลำไส้ใหญ่ส่วนต้นตามต้องการได้

อย่างไรก็ตามพบว่า มีการปลดปล่อยแกมมา-โอไรซานอลปริมาณหนึ่ง (ร้อยละ 14.24) ออกมาจากยาเม็ดสารสกัดก่อนถึงบริเวณเป้าหมาย ทั้งนี้ขึ้นกับระยะเวลาในการเคลือบยาเม็ดแกนของสารสกัดด้วย Eudragit® NE30D ยังไม่เพียงพอที่จะป้องกันการปลดปล่อยแกมมา-โอไรซานอลได้อย่างสมบูรณ์ในสภาวะจำลองของลำไส้เล็ก แต่ถ้าเพิ่มระยะเวลาในการเคลือบฟิล์มชั้นนี้ให้นานขึ้นจะพบว่า มีการชะลอการปลดปล่อยสารสกัดในเฟสที่ 3 ในช่วงแรกๆ ด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เวลาที่เหมาะสมในการเคลือบยาเม็ดด้วย Eudragit® NE30D คือ 1 ชั่วโมงครึ่ง หากใช้เวลาในการเคลือบนาน 2 ชั่วโมง การปลดปล่อยแกมมา-โอไรซานอลในเฟสที่ 3 จะชะลอไปด้วยอย่างไรก็ตามต้องพัฒนาการเคลือบฟิล์มชั้น Eudragit® NE30D ให้มีการปลดปล่อยสารสำคัญก่อนถึงบริเวณเป้าหมายให้น้อยกว่าร้อยละ 10

การปลดปล่อยตัวยา/สารสำคัญก่อนถึงบริเวณที่เป็นเป้าหมายของระบบนำส่งที่ควบคุมด้วยการปลดปล่อยแบบขึ้นกับเวลา (Time-dependent controlled release) เป็นปัญหาที่พบได้ (Leopold, 1999) เนื่องจากการเริ่มต้นปลดปล่อยตัวยา/สารสำคัญจากยาเม็ดต้องอาศัยการพองตัวและ/หรือการกร่อนของพอลิเมอร์ ดังนั้นการปลดปล่อยตัวยา/สารสำคัญ นอกจากขึ้นอยู่กับสมบัติของพอลิเมอร์ที่ใช้แล้วยังขึ้นอยู่กับความหนาของชั้นฟิล์มที่เคลือบ ชั้นฟิล์มที่เคลือบให้หนาเพียงพอที่จะยับยั้งการปลดปล่อยตัวยา/สารสำคัญก่อนถึงบริเวณเป้าหมายได้อย่างสมบูรณ์จะมีผลชะลอการปลดปล่อยตัวยา/สารสำคัญที่บริเวณเป้าหมาย ทำให้เกิดช่วงระยะเวลาที่หน่วงการปลดปล่อยตัวยา (lag time) เนื่องจากการพองตัว/การกร่อนของพอลิเมอร์นั้นต้องใช้เวลาเริ่มต้นและสิ้นสุด แตกต่างจากการควบคุมการปลดปล่อยตัวยาด้วยการละลายของพอลิเมอร์ใน pH ที่

แตกต่างกันในทางเดินอาหาร ซึ่งหน้าที่ของพอลิเมอร์ในการป้องกันการปลดปล่อยตัวยาจะสิ้นสุดลงทันทีที่มีการปลี่ยนแปลง pH สำหรับแนวทางการพัฒนาต่อไปเพื่อแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าว อาจต้องพัฒนาสูตรตำรับยาเม็ดแกนที่มีระบบการกระตุ้น (trigger) การแตกตัวของยาเม็ดอย่างรวดเร็วเมื่อเม็ดยาเคลื่อนที่ถึงบริเวณที่เป็นเป้าหมาย หรือใช้ระบบการควบคุมการปลดปล่อยตัวยา/สารสำคัญโดยอาศัยเอนไซม์ของเชื้อจุลชีพที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ร่วมด้วย

สำหรับสภาวะจำลองทางเดินอาหารสำหรับทดสอบการละลายของยาเม็ดสารสกัดเพื่อนำส่งสู่ลำไส้ใหญ่ที่ใช้ในการศึกษานี้ (Rubinstein, 2007) กล่าวถึง transit time ของยาในรูปแบบของเหลวหรือของแข็งในลำไส้เล็ก ประมาณ 3-4 ชั่วโมง โดยไม่ขึ้นกับขนาดอนุภาค และรายงานการศึกษาของ Schellekens และคณะ (2008) พัฒนาระบบการนำส่งตัวยา mesalazine ศึกษาการละลาย *in vitro* ในสารละลายจำลองสภาวะทางเดินอาหาร (gastro-intestinal simulation system, GISS) ประกอบด้วย 4 เฟส คือ เฟส 1 (กระเพาะอาหาร pH 1.2) นาน 120 นาที เฟส 2 (ลำไส้เล็กส่วน jejunum pH 6.8) นาน 120 นาที เฟส 3 (ลำไส้เล็กส่วน ileum pH 7.5) นาน 30 นาที และเฟส 4 (ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น pH 6.0) นาน 90 นาทีและอ้างอิงตามวารสารตีพิมพ์ของ Martinez และคณะ (2002) ดังนี้

GI segment	Transit time	pH
Stomach	2 h	3.1 ± 1.9
Duodenum	10 min	6.6 ± 0.5
Jejunum	2 h	7.4 ± 0.4
Ileum	1 h	7.5 ± 0.4
Colon	36 – 72 h	7.0 ± 0.7