

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาดังนี้มีการนำสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลที่สกัดจากข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด 3 ชนิดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction) คือข้าวเจ้าปิ่น, ข้าวเจ้าต่อและข้าวเจ้าลิ้มผั่ว มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 และฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง iNOS ในเซลล์ colorectal carcinoma HCT 116 จากการทดสอบการเตรียมสารสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดทั้งหมด 6 สภาวะพบว่าสภาวะที่ให้ปริมาณสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลซึ่งเป็นสารในกลุ่มไม่มีขั้วได้สูงที่สุดคือ ที่ความดัน 450 bar และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยได้สารสกัดในปริมาณ 3.22, 3.13 และ 3.39 กรัมจากข้าวกล้องบดละเอียดน้ำหนักเริ่มต้น 50 กรัมของข้าวเจ้าปิ่น ข้าวเจ้าต่อ และข้าวเจ้าลิ้มผั่วตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลมาวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอโรซานอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลทั้งหมดประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิด คือ cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, campesteryl ferulate และ sitosteroyl ferulate เหมือนที่พบในสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอล และยังประกอบด้วยองค์ประกอบอื่นๆ อีกอย่างน้อย 4-5 ชนิด โดยสารสกัดจากข้าวเจ้าลิ้มผั่วมีปริมาณแกมมา-โอโรซานอลสูงที่สุด โดยมีปริมาณแกมมา-โอโรซานอลเท่ากับ 7.05 ± 0.47 %w/w รองลงมาคือ ข้าวเจ้าปิ่น (6.57 ± 0.43 %w/w) และข้าวเจ้าต่อ (6.31 ± 0.38 %w/w) จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ colorectal carcinoma HCT 116 ของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างซึ่งได้มีการปรับให้มีปริมาณของแกมมา-โอโรซานอลซึ่งคิดจากสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิด ให้มีปริมาณเท่ากัน และเท่ากับสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอลด้วยพบว่าสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลมี 50% inhibition concentration (IC_{50}) อยู่ระหว่าง 23.47 – 27.81 $\mu\text{g/mL}$ โดยเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากสูงไปต่ำได้ดังนี้ สารมาตรฐานเคอร์คูมิน ($IC_{50} = 12.43 \pm 1.65 \mu\text{g/mL}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวเจ้าลิ้มผั่ว ($23.47 \pm 1.88 \mu\text{g/mL}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวเจ้าปิ่น ($25.38 \pm 2.07 \mu\text{g/mL}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวเจ้าต่อ ($27.81 \pm 2.15 \mu\text{g/mL}$) > สารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอล ($28.72 \pm 2.07 \mu\text{g/mL}$) ตามลำดับ นอกจากนี้ในการศึกษาการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ยังพบว่าสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลมี 50% inhibition concentration (IC_{50}) อยู่ระหว่าง

24.63 – 37.51 $\mu\text{g/mL}$ โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ในเซลล์ Colorectal carcinoma HCT 116 จากสูงไปต่ำไปดังนี้ สารมาตรฐานเคอร์คูมิน ($\text{IC}_{50} = 25.68 \pm 1.98 \mu\text{g/mL}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวท่าส้มผิว ($34.63 \pm 2.62 \mu\text{g/mL}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวท่าปิ้ง ($36.63 \pm 2.72 \mu\text{g/mL}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวท่าต่อ ($37.51 \pm 2.36 \mu\text{g/mL}$) > สารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอล ($44.85 \pm 2.58 \mu\text{g/mL}$) ตามลำดับ นอกจากนั้นสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลที่สกัดจากข้าวท่าสายพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือยังมีแนวโน้มในการยับยั้งการปลดปล่อย NF-KB (p65) ซึ่งเป็น mediator ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบจากการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ในเซลล์ HCT 116 ได้อีกด้วย โดยก่อนนำสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสและฤทธิ์ยับยั้งการปลดปล่อย NF-KB (p65) นั้นได้ทำการปรับปริมาณของสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิดให้มีปริมาณเท่ากับสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอลแล้ว จึงมีความเป็นไปได้ที่สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอลซึ่งอาจเกิดจากสารสำคัญรองอื่นๆ ที่พบในสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลทั้ง 3 ตัวอย่างหรืออาจเกิดจากสารสำคัญในกลุ่มไม่มีชีวิตอื่นๆ เช่น โทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอร์รอล เป็นต้น ซึ่งต้องมีการศึกษาถึงปริมาณของโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอร์รอลที่พบในสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลต่อไป

สำหรับการเตรียมไมโครแคปซูลของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล โดยวิธีโคอาเซอเวชันเชิงซ้อน (complex coacervation) ที่ประกอบด้วยสารที่เป็นเปลือกของไมโครแคปซูล คือ เพคติน และเจลาติน (gelatin Type A) ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และส่วนที่เป็นแกนของไมโครแคปซูล คือ สารสกัดแกมมา-โอโรซานอล และน้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก โดยการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดโคอาเซอเวชันเชิงซ้อน เพื่อให้ได้ไมโครแคปซูลที่มี รูปร่างทรงกลม และมีขนาดสม่ำเสมอ โดยในตอนเริ่มต้นได้ใช้น้ำมันรำข้าวซึ่งจะใช้เป็นสารเจือจางให้เป็นสารแกนกลางก่อน หลังจากที่ได้สภาวะในการเตรียมที่เหมาะสมแล้ว จึงจะใช้สารผสมของสารสกัดกับน้ำมันรำข้าวเป็นสารแกนกลางเพื่อกักเก็บสารสกัดในไมโครแคปซูลต่อไป โดยศึกษาทั้งหมด 7 ตำรับ ซึ่งใช้สภาวะในการเตรียมที่แตกต่างกันโดยมีการปรับเปลี่ยน ชนิดของเครื่องผสม ความเร็วรอบ และเวลาที่ใช้ผสมในขั้นตอนย่อย 6 ขั้นตอนในแต่ละตำรับ ใน 6 ตำรับแรกไม่เกิดเป็นไมโครแคปซูลของน้ำมันรำข้าวตามที่ต้องการหรือได้ไมโครแคปซูลที่มีขนาดที่แตกต่างกันมาก หรือมีการเกิดไมโครแคปซูลที่ไม่สมบูรณ์ สำหรับในตำรับที่ 7 ได้ไมโครแคปซูลที่มีขนาดการกระจายตัวสม่ำเสมอแต่ยังมีขนาดที่แตกต่างกัน ไม่เกิดเกาะกุ่มกัน และมีความเสถียร ในทุกขั้นตอนการเตรียม จึงนำสภาวะในการเตรียมไมโครแคปซูลเหมือนสูตรตำรับที่ 7 นี้ ไปใช้เตรียมตำรับที่มีสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล ผสมกับน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วน 1:1 เป็นสารแกนกลาง เพื่อกักเก็บสารสกัด

ไว้ในไมโครแคปซูล ซึ่งพบว่าไมโครแคปซูลที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน แต่เกาะกลุ่มกันมากไม่เหมาะสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นำส่งสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล จึงมีการเปลี่ยนรูปแบบการนำส่งโดยการเตรียมสารสกัดให้อยู่ในรูปแบบยาเม็ดและนำไปเคลือบหลายชั้นด้วยพอลิเมอร์ โดยที่พอลิเมอร์ในชั้นหนึ่งสามารถทนต่อการกระเพาะอาหาร พอลิเมอร์ในอีกชั้นหนึ่งสามารถทนต่อสภาวะในลำไส้เล็กเพื่อป้องกันไม่ให้สารสกัดละลายออกมา และเมื่อพบกับสภาวะในตอนต้นของลำไส้ใหญ่สารสกัดก็สามารถที่จะละลายออกมาได้

การพัฒนา ยาเม็ดของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลเพื่อนำส่งสู่ลำไส้ใหญ่ เริ่มจากพัฒนายาเม็ดแกนของสารสกัดให้มีสมบัติพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการนำไปเคลือบฟิล์ม ได้แก่ ความแข็ง ร้อยละของความกรอบของเม็ดยา และเวลาในการแตกตัวที่เหมาะสม โดยได้ยาเม็ดแกนของสารสกัดที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 240 มิลลิกรัมต่อเม็ด มีปริมาณสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล 8.0 มิลลิกรัม ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณสารสำคัญ คือ แกมมา-โอโรซานอล 50 ไมโครกรัมต่อเม็ด โดยเริ่มต้นจากการหาสารดูดซับที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับน้ำมันรำข้าวซึ่งใช้การศึกษาเบื้องต้นให้แห้งสนิทและได้เป็นผงแห้งที่ไหลได้แทนการใช้สารสกัดที่มีปริมาณน้อย มีการทดลองใช้สารดูดซับหลายชนิดซึ่งเป็นสารดูดซับที่นิยมใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณในยาเม็ดในการดูดซับน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วนต่างๆ โดยน้ำหนัก ซึ่งจะทำให้หน้าที่ได้สองอย่างในสูตรตำรับเดียวกันคือช่วยดูดซับและเพิ่มปริมาณพบว่าสารดูดซับที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำมันรำข้าว คือ Prosolv[®], SMCC และ Avicel[®] pH 101 ในอัตราส่วนของน้ำมันรำข้าวต่อสารดูดซับ เท่ากับ 1:4 และ 1:4.6 ตามลำดับ โดยแป้งมันฝรั่งมีประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำมันรำข้าวได้น้อยที่สุด คือ ต้องใช้ในปริมาณ 25 เท่าโดยน้ำหนัก จึงจะได้สารผสมที่มีลักษณะผงแห้ง นำผลที่ได้มาทดลองดูดซับกับสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล ซึ่งพบว่า ได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน คือ สารดูดซับที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล ได้แก่ Prosolv[®] SMCC และ Avicel[®] pH 101 ในอัตราส่วนของสารสกัดต่อสารดูดซับ เท่ากับ 1:3 และ 1:4 โดยน้ำหนัก แล้วจึงนำผลการศึกษาจากการดูดซับไปเตรียมแกรนูลสำหรับการดกอัดเป็นเม็ดยาแกนต่อไป

ในการศึกษามีการเตรียมแกรนูลของยาเม็ดแกน 2 ชนิด คือ แกรนูลหลอกที่มีน้ำมันรำข้าวเป็นสารสำคัญ และแกรนูลจริงที่ใช้สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลเป็นสารสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยมีปริมาณสารสำคัญในสูตรแกรนูลเท่ากัน คือ ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ใช้ Prosolv[®] SMCC หรือ Avicel[®] pH 101 เป็นสารดูดซับในอัตราส่วนด้วยยาต่อสารดูดซับเป็น 1:4 และในสูตรตำรับแต่ละตำรับจะใช้สารเพิ่มปริมาณที่เป็นส่วนผสมของสารดูดซับที่ใช้ในตำรับกับเพคตินในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนัก รวมทั้งการเติมสารช่วยไหล (colloidal silicon dioxide, Aerosil[®]) ในความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในตำรับแกรนูลจริง จากผลการประเมินสมบัติพื้นฐานแกรนูลที่ได้ทางด้านสมบัติการไหล ซึ่งแสดงด้วยค่ามุมการไหลและ % compressibility พบว่า มุมการไหลของสูตรแกรนูลหลอกมีค่าใกล้เคียงกัน ในสูตรแกรนูลจริงก็เช่นเดียวกันที่มีค่าการไหลใกล้เคียงกันไม่ว่าจะมี

การผสมสารช่วยไหล (Aerosil® 0.5%) ในสูตรตำรับหรือไม่ ดังนั้นการเติมสารช่วยไหลจึงไม่จำเป็น และตำรับที่นำไปตอกเป็นเม็ดยาสำหรับการเคลือบต่อไปได้แก่ สูตรตำรับแกรนูลที่นำไปใช้ตอกยาเม็ดแกนหลอก คือ สูตรตำรับที่ 2 และสูตรตำรับแกรนูลที่นำไปใช้ตอกเม็ดแกนจริง คือ สูตรตำรับที่ 5 ซึ่งทั้งสองสูตรตำรับใช้ Avicel® pH 101 เป็นสารดูดซับในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของตัวยา:สารดูดซับ 1:4

สำหรับการตอกเป็นเม็ดแกนมีการนำแกรนูลที่ได้ผสมกับ Ac-Di-Sol®, Talcum และ Magnesium stearate ในความเข้มข้น 1.0, 0.5 และ 0.5% ตามลำดับ และนำไปตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกยาเม็ดชนิดหมุนรอบ โดยในหนึ่งเม็ดให้มีแกมมา-ไฮโรซานอลเท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อเม็ด พบว่า น้ำหนักยาเม็ดแกนที่ได้มีน้ำหนักเฉลี่ย 240 มิลลิกรัม มีความแข็งประมาณ 4 กิโลกรัม และมีค่าร้อยละความกร่อนของยาเม็ดต่ำ อย่างไรก็ตาม เวลาในการแตกตัวของยาเม็ดแกนที่มีสารสกัดแกมมา-ไฮโรซานอลมีการแตกตัวช้ามาก เนื่องจากมีเพคตินในสูตรตำรับ ทำให้เกิดเป็นชั้นเจลส่งผลให้เม็ดยามีการแตกตัวที่ช้า จึงได้ปรับสูตรตำรับโดยตัดเพคตินออกจากสูตรตำรับและใช้แลคโทสแทน โดยเม็ดยาแกนที่ได้มีความเหมาะสมสำหรับการเคลือบฟิล์มต่อไปได้

การพัฒนากระบวนการนำส่งยาเม็ดไปยังลำไส้ใหญ่ ใช้วิธีการเคลือบยาเม็ดแกนด้วยเครื่องเคลือบยาเม็ดแบบถังเคลือบมีรูรอบตัว ทำการเคลือบยาเม็ดแกนสองชั้นด้วยพอลิเมอร์สังเคราะห์สองชนิด คือ Eudragit® NE 30D และ Eudragit® L100 ซึ่งการเคลือบด้วย Eudragit® L100 จะยับยั้งการปลดปล่อยสารสำคัญจากยาเม็ดในกระเพาะอาหารโดยอาศัยกลไกการควบคุมการละลายของสารเคลือบใน pH ที่แตกต่างกัน และการเคลือบด้วย Eudragit® NE 30D จะชะลอการปลดปล่อยสารสำคัญบริเวณลำไส้เล็ก โดยอาศัยกลไกการพองตัวและ/หรือการกร่อนของพอลิเมอร์ที่ขึ้นกับระยะเวลา

ผลการศึกษาพบว่า การเคลือบฟิล์มยาเม็ดแกน ด้วย Eudragit® NE 30D นาน 1.5 ชั่วโมง ตามด้วยการเคลือบด้วย Eudragit® L100 นาน 4 ชั่วโมงสามารถป้องกันการปลดปล่อยสารสกัดแกมมา-ไฮโรซานอลในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้นาน 2 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับและมีการปลดปล่อยสารสำคัญอย่างรวดเร็วและทันทีในสภาวะจำลองของลำไส้ใหญ่ ส่วนต้นที่เป็นบริเวณเป้าหมายของการนำส่งสารแกมมา-ไฮโรซานอล โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารแกมมา-ไฮโรซานอลได้มากกว่าร้อยละ 80 ที่เวลาหนึ่งชั่วโมงในสภาวะจำลองของลำไส้ใหญ่ และมีการปลดปล่อยสารสำคัญที่สมบูรณ์ (ร้อยละ 85) ภายในเวลา 2 ชั่วโมง

อย่างไรก็ตาม พบว่า มีการปลดปล่อยสารแกมมา-ไฮโรซานอลจากยาเม็ดในสภาวะจำลองของลำไส้เล็กสูงถึงร้อยละ 14.24 ซึ่งทำให้มีการสูญเสียสารสำคัญปริมาณหนึ่งไปก่อนถึงบริเวณเป้าหมาย ดังนั้น แนวทางการพัฒนาต่อไปเพื่อแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าว อาจต้องพัฒนาสูตรตำรับยาเม็ดแกนที่มีระบบการกระตุ้น (trigger) การแตกตัวของยาเม็ดอย่างรวดเร็ว ไม่ขึ้นกับชั้นของฟิล์ม

เคลือบเมื่อเม็ดเคลื่อนที่ถึงบริเวณที่เป็นเป้าหมาย หรือใช้ระบบการควบคุมการปลดปล่อยด้วยยา/สารสำคัญโดยอาศัยเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ร่วมด้วย