



การพัฒนาอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลจากไฮยาลูโรนิกแอซิดบรรจุเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน  
เพื่อการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีการเชื่อมต่อนิโกลกุลพอลิเมอร์กับยา

DEVELOPMENT OF QUERCETIN-LOADED/CURCUMIN-LOADED HYALURONIC ACID  
NANOPARTICLES FOR CANCER THERAPY USING POLYMER-DRUG CONJUGATION

ฉติมา วงศ์จิตราภรณ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การพัฒนาโนพาร์ทีเคิลจากไฮยาโลโรนิกแอซิดบรรจุเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน  
เพื่อการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีการเชื่อมต่อโมเลกุลพอลิเมอร์กับยา



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF QUERCETIN-LOADED/CURCUMIN-LOADED HYALURONIC ACID  
NANOPARTICLES FOR CANCER THERAPY USING POLYMER-DRUG CONJUGATION



THITIMA WONGJITTRAPORN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Pharmaceutical Product Development)  
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University  
2021  
Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาโนพาร์ทีเคิลจากไฮยาโลโรนิกแอซิดบรจุเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน  
เพื่อการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีการเชื่อมต่อโมเลกุลพอลิเมอร์กับยา

ของ

ฉติมา วงศ์จิตราภรณ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน  
(อาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล) (รองศาสตราจารย์ ดร.ชูดา จิตตสุโก)

..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภิมิน ตันวิเชียร) (รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี่)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนา นาโนพาร์ทิเคิลจากไฮยาโลโรนิกแอซิดบรรจุคอร์ซีตินหรือคอร์คูมิน เพื่อการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีการเชื่อมต่อโมเลกุลพอลิเมอร์กับยา
ผู้วิจัย	ธิติมา วงศ์จิตรภรณ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิษฐกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิน ดันวิเชียร

การเชื่อมต่อโมเลกุลพอลิเมอร์และยาเคมีบำบัดด้วยปฏิกิริยาทางเคมีเป็นกลยุทธ์หนึ่งที่ใช้พัฒนา นาโนพาร์ทิเคิลเพื่อรักษาโรคมะเร็งได้ ไฮยาโลโรนิกแอซิดเป็นพอลิเมอร์ที่เพิ่มการกำหนดเป้าหมายในการนำส่ง ยาไปยังเซลล์เป้าหมาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำเพื่อพัฒนาพอลิเมอร์นาโนพาร์ทิเคิลบรรจุคอร์ซีตินหรือคอร์คูมิน เพื่อนำส่งสารสำคัญจากสมุนไพรแบบมุ่งเป้าสำหรับเซลล์มะเร็งด้วยไฮยาโลโรนิกแอซิด โดยวิธีการเชื่อมต่อ โมเลกุลพอลิเมอร์กับสารสำคัญจากสมุนไพรด้วยปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชัน ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของ พารามิเตอร์จากสูตรตำรับต่อสมบัติของนาโนพาร์ทิเคิล และศึกษาประสิทธิภาพของนาโนพาร์ทิเคิลต่อ ความจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็ง จากผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นจะทำให้ ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นและค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าจะติดลบมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของคอร์ซีตินหรือคอร์คูมินมาก ขึ้นกลับทำให้ขนาดอนุภาคเล็กลงและค่าศักย์ไฟฟ้าก็ติดลบน้อยลงด้วย ชนิดและความเข้มข้นของสารสำคัญ จากสมุนไพร จะส่งผลต่อความสามารถในการบรรจุยาและประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยา โดยคอร์คูมินจะมี ประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยาและความสามารถในการบรรจุยาสูงกว่า และความสามารถในการบรรจุยาและ ประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยาของสารสำคัญจากสมุนไพรมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นสารมากขึ้น การมี เอนไซม์ esterase จะช่วยทำให้สารสำคัญจากสมุนไพรถูกปลดปล่อยออกมาจากพอลิเมอร์นาโนพาร์ทิเคิลได้ นาโนพาร์ทิเคิลจากคอร์ซีตินหรือคอร์คูมิน ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารสำคัญจากสมุนไพร อิสระ โดยมีประสิทธิภาพและความจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ ดังนั้นการปรับเปลี่ยน พารามิเตอร์จากสูตรตำรับให้เหมาะสม จะทำให้ได้นาโนพาร์ทิเคิลที่มีสมบัติตามที่ต้องการและสามารถออกฤทธิ์ ยับยั้งที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง และการใช้ไฮยาโลโรนิกแอซิดเป็นพอลิเมอร์จะช่วยให้เพิ่มการนำส่งยา แบบมุ่งเป้าสำหรับเซลล์มะเร็งได้

คำสำคัญ : ไฮยาโลโรนิกแอซิด, คอร์ซีติน, คอร์คูมิน, การเชื่อมต่อโมเลกุลพอลิเมอร์และยา, การนำส่งยาแบบ มุ่งเป้า, นาโนพาร์ทิเคิล

Title	DEVELOPMENT OF QUERCETIN-LOADED/CURCUMIN-LOADED HYALURONIC ACID NANOPARTICLES FOR CANCER THERAPY USING POLYMER-DRUG CONJUGATION
Author	THITIMA WONGJITTRAPORN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Dr. Duangratana Shuwisitkul
Co Advisor	Assistant Professor Dr. Sujimon Tunvichien

Polymer-drug conjugate (PDC) with chemical reactions is one strategy that can successfully develop nanoparticles for cancer therapy. Hyaluronic acid (HA) offers an advantage of increased drug targeting. The research aimed to develop hyaluronic acid nanoparticles, containing quercetin or curcumin, for cancer targeted drug delivery. The polymer molecules were conjugated with the drug by esterification. The processing parameters affecting the properties of nanoparticles were compared. The efficiency of nanoparticles on the specificity of killing cancer cells was studied. The results showed that an increase in polymer concentration led to an increase in particle size and a decrease in zeta potential. The quercetin or curcumin concentration increased with the decrease in zeta potential and particle size. The types and concentrations of quercetin or curcumin affected drug loading capacity and drug conjugation efficiency. The incorporation of curcumin enhanced the drug loading capacity and drug conjugation efficiency in comparison with quercetin. The increase in drug concentration tended to increase drug loading capacity and drug conjugation efficiency. The presence of esterase allowed the drug to be released from hyaluronic acid nanoparticles. The hyaluronic acid-drug conjugated nanoparticles had more toxicity to cells than free drugs when studying cell viability. They were more specific to the cancer cells than the normal cells. In conclusion, the optimization of processing parameters can result in hyaluronic acid nanoparticles with the desired properties. The nanoparticles have specific inhibitory effects on cancer cells. The use of hyaluronic acid as a polymer enhanced targeted drug delivery for cancer cells.

Keyword : Hyaluronic acid, Quercetin, Curcumin, Polymer–drug conjugates, Targeted drug delivery system, Nanoparticles

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อ.ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิษฐกุล และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. ศุภจิน ตันวิเชียร ที่ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์ทั้งในด้านการศึกษาและการทำวิจัย ให้ความช่วยเหลือในการติดต่อประสานงานและอำนวยความสะดวกในการไปทำวิจัยนอกสถานที่ และให้การดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ รศ. ดร. วีระศักดิ์ สามี รศ. ดร. ชุตา จิตตสุโก รศ. ดร. สริน ทัดทอง และ อ. ดร. วิภาพร เสรีเด่นชัย ที่ได้ให้ความเมตตากรุณามาเป็นประธาน และกรรมการในการสอบปริญญา นิพนธ์ และช่วยชี้แนะแนวทางทำให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณที่นักวิทยาศาสตร์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ และนักวิทยาศาสตร์นิเวศศาสตร์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีนิเวศศาสตร์ ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้ หอปฏิบัติการ รวมถึงอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ และขอขอบคุณบุคคลที่เกี่ยวข้องอีกหลายท่านที่ คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุน ในด้านสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำปริญญาานิพนธ์

ธิตติมา วงศ์จิตราภรณ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ .....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ .....	1
วัตถุประสงค์.....	2
สมมติฐานการวิจัย.....	2
ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา .....	2
กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย .....	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย .....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
ระบบนำส่งยาสู่เป้าหมาย (Targeted drug delivery system).....	4
นาโนพาร์ทิเคิล (Nanoparticles) .....	4
พอลิเมอร์นาโนพาร์ทิเคิล (Polymer nanoparticles) .....	6
นาโนพาร์ทิเคิลจากการเชื่อมโมเลกุลพอลิเมอร์และยา (nanoparticles from polymer–drug conjugation) .....	7
พอลิเมอร์สำหรับนาโนพาร์ทิเคิลจากการเชื่อมโมเลกุลพอลิเมอร์และยา.....	9



ไฮยาลูโรนิกแอซิด (Hyaluronic acid; HA) .....	10
ระบบนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งจากไฮยาลูโรนิกแอซิด.....	10
สารสำคัญจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง .....	13
Human colon adenocarcinoma cell line (CaCO-2 cells).....	16
Human keratinocyte cell line (HaCaT cells) .....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	17
สารเคมี.....	17
วิธีการทดลอง .....	18
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการศึกษา .....	22
1. สมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล .....	22
1.1 ขนาด การกระจายของขนาดอนุภาค และประจุพื้นผิวอนุภาค.....	22
1.2 ลักษณะรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิล.....	26
1.3 ประสิทธิภาพการกักเก็บ .....	28
1.4 การเกิดอันตรกิริยาของหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ สารสำคัญจากสมุนไพร และนาโนพาร์ทิเคิล .....	29
2. การรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง (cell viability) .....	31
3. ประสิทธิภาพการปลดปล่อย.....	34
บทที่ 5 ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ.....	37
ข้อเสนอแนะ.....	37
บรรณานุกรม .....	38
ภาคผนวก.....	44
ประวัติผู้เขียน.....	50

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ Quercetin .....	14
ตาราง 2 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ Curcumin .....	15
ตาราง 3 สูตรตำรับ Hyaluronic acid-quercetin (HA-QT) conjugate .....	18
ตาราง 4 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ hyaluronic acid ต่อขนาดอนุภาค และการกระจาย ของขนาดอนุภาค (ที่ความเข้มข้น quercetin คงที่ 4 mM).....	23
ตาราง 5 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ hyaluronic acid ต่อ zeta potential (ที่ความเข้มข้น quercetin คงที่ 4 mM) .....	24
ตาราง 6 ผลของความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมินต่อขนาดอนุภาค และการกระจายของ ขนาดอนุภาค (ที่ความเข้มข้น hyaluronic acid คงที่ 0.05%) .....	25
ตาราง 7 ผลของความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมินต่อ zeta potential (ที่ความเข้มข้น hyaluronic acid คงที่ 0.05%) .....	25
ตาราง 8 ผลของความเข้มข้นของเคอร์ซีตินต่อประสิทธิภาพการกักเก็บ .....	28
ตาราง 9 ผลของความเข้มข้นของเคอร์คูมินต่อประสิทธิภาพการกักเก็บ .....	29

## สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 การสังเคราะห์ Polymer-Drug Conjugates .....	7
ภาพประกอบ 2 การเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อนิวโดยใช้นิว NHS ester derivative .....	8
ภาพประกอบ 3 การเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อนิวโดยใช้นิว DCC และ DMAP เป็น reagent .....	8
ภาพประกอบ 4 การเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อนิวโดยใช้นิว EDC เป็น reagent.....	9
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Hyaluronic acid.....	10
ภาพประกอบ 6 โครงสร้างทางเคมีของ Quercetin .....	14
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างทางเคมีของ Curcumin.....	15
ภาพประกอบ 8 ลักษณะรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิลจากกลองจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ก1) HA-QT 2 mM (ก2) HA-QT 4 mM (ก3) HA-QT 6 mM (ข1) HA-Cur 2 mM (ข2) HA-Cur 4 mM (ข3) HA-Cur 6 mM (ค) Blank solution.....	27
ภาพประกอบ 9 FT-IR spectrum ของ (ก) Hyaluronic acid, (ข) Quercetin, (ค) Curcumin, (ง) HA-QT conjugate, (จ) HA-Cur conjugate.....	30
ภาพประกอบ 10 อัตราการรอดชีวิตของ HaCaT cells เมื่อทดสอบด้วย quercetin *แสดงการ ทดสอบทางสถิติ (* $p = 0.664$ ).....	32
ภาพประกอบ 11 อัตราการรอดชีวิตของ CaCO-2 cells เมื่อทดสอบด้วย quercetin *แสดงการ ทดสอบทางสถิติ (* $p = 0.138$ , ** $p < 0.001$ ) .....	33
ภาพประกอบ 12 อัตราการรอดชีวิตของ HaCaT cells เมื่อทดสอบด้วย curcumin *แสดงการ ทดสอบทางสถิติ (* $p = 0.066$ , ** $p = 0.842$ ) .....	33
ภาพประกอบ 13 อัตราการรอดชีวิตของ CaCO-2 cells เมื่อทดสอบด้วย curcumin *แสดงการ ทดสอบทางสถิติ (* $p = 0.128$ , ** $p < 0.001$ ) .....	34
ภาพประกอบ 14 อัตราการปลดปล่อยของ quercetin ที่ pH 5.5 .....	35
ภาพประกอบ 15 อัตราการปลดปล่อยของ quercetin ที่ pH 7.4 .....	35
ภาพประกอบ 16 อัตราการปลดปล่อยของ curcumin ที่ pH 5.5 .....	36

ภาพประกอบ 17 อัตราการปลดปล่อยของ curcumin ที่ pH 7.4 .....	36
ภาพประกอบ 18 ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค อักษรภาษาอังกฤษแสดงความเข้มข้นของ hyaluronic acid (A) HA 0.025% (B) HA 0.05% (C) HA 0.075% ตัวเลขแสดงการเจือจางสูตรตำรับ (1) No dilute (2) F:SWI (1:3) (3) F:SWI (1:9) (4) F:SWI (1:15) (5) F:SWI (1:19) (6) F:SWI (1:29) .....	45
ภาพประกอบ 19 ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค อักษรภาษาอังกฤษแสดงความเข้มข้นของ hyaluronic acid (D) HA 0.1% (E) HA 0.2% (F) HA 0.3% ตัวเลขแสดงการเจือจางสูตรตำรับ (1) No dilute (2) F:SWI (1:3) (3) F:SWI (1:9) (4) F:SWI (1:15) (5) F:SWI (1:19) (6) F:SWI (1:29) .....	46
ภาพประกอบ 20 zeta potential อักษรภาษาอังกฤษแสดงความเข้มข้นของ hyaluronic acid (A) HA 0.025% (B) HA 0.05% (C) HA 0.075% ตัวเลขแสดงการเจือจางสูตรตำรับ (1) No dilute (2) F:SWI (1:3) (3) F:SWI (1:9) (4) F:SWI (1:15) (5) F:SWI (1:19) (6) F:SWI (1:29) .....	47
ภาพประกอบ 21 zeta potential อักษรภาษาอังกฤษแสดงความเข้มข้นของ hyaluronic acid (D) HA 0.1% (E) HA 0.2% (F) HA 0.3% ตัวเลขแสดงการเจือจางสูตรตำรับ (1) No dilute (2) F:SWI (1:3) (3) F:SWI (1:9) (4) F:SWI (1:15) (5) F:SWI (1:19) (6) F:SWI (1:29) .....	48
ภาพประกอบ 22 ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค เมื่อเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน F:SWI (1:29) อักษรภาษาอังกฤษแสดงชนิดของสารสำคัญจากสมุนไพร (A) Quercetin (B) Curcumin (C) ไม่มีสารสำคัญจากสมุนไพร (Blank solution) ตัวเลขแสดงความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพร (1) 2 mM (2) 4 mM (3) 6 mM .....	49
ภาพประกอบ 23 zeta potential เมื่อเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน F:SWI (1:29) อักษรภาษาอังกฤษแสดงชนิดของสารสำคัญจากสมุนไพร (A) Quercetin (B) Curcumin (C) ไม่มีสารสำคัญจากสมุนไพร (Blank solution) ตัวเลขแสดงความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพร (1) 2 mM (2) 4 mM (3) 6 mM .....	49

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันการพัฒนายารักษาโรคมะเร็งมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก มีการวิจัยเพื่อค้นหายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพ และความปลอดภัยมากขึ้น โดยเฉพาะยามะเร็งในกลุ่มยามุ่งเป้า (targeted therapy) ที่สามารถไปจับกับตัวรับที่เฉพาะเจาะจงทำให้ยาที่มีประสิทธิภาพและผลข้างเคียงลดลง ระบบนำส่งยามะเร็งก็มีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยเป้าหมายของการพัฒนาระบบนำส่งยามะเร็งยุคใหม่ ทำเพื่อแก้ปัญหาข้อเสียของยารักษาโรคมะเร็งรูปแบบดั้งเดิม ได้แก่ มีความเป็นพิษสูง ละลายน้ำได้ไม่ดี ดูดซึมได้น้อยเมื่อให้โดยการรับประทาน และส่งผลทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของร่างกาย (Masood, 2016) จึงเกิดการพัฒนาระบบนำส่งยาสู่เป้าหมาย (targeted drug delivery system) โดยนำความรู้ทางนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว

การนำอนุภาคระดับนาโนเมตร (nanoparticles) มาใช้เพื่อนำส่งยารักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากขนาดของอนุภาคดังกล่าวมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อมวลที่สูง สามารถดูดซับหรือเป็นตัวพาสารประกอบ เช่น ยาโมเลกุลเล็ก หรือยาโปรตีน ไปกับอนุภาคได้ง่าย และสามารถทำการเชื่อมต่อกับสารกำหนดเป้าหมาย เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการนำส่งยา (De Jong & Borm, 2008) ทำให้มีปริมาณยาสะสมที่บริเวณเป้าหมายเพียงพอจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา และลดผลข้างเคียงต่อเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งการพัฒนาอนุภาคระดับนาโนเมตรสามารถทำได้หลายรูปแบบ หนึ่งในนั้นคือการนำพอลิเมอร์มาเชื่อมต่อกับโมเลกุลยา (polymer-drug conjugates) ดังนั้นสมบัติของพอลิเมอร์จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

ในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมาพืชสมุนไพรได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เพื่อใช้เป็นยาทางเลือก (alternative medicine) สำหรับรักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับสารสำคัญต่างๆ ในพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถป้องกันและรักษามะเร็งได้ (H. Wang et al., 2012) จากการสืบค้นข้อมูลพบรายงานการวิจัยเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ที่นำเทคโนโลยีการนำพอลิเมอร์มาเชื่อมต่อกับสมุนไพร โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโดยตรง (direct conjugation) มาใช้เพื่อนำส่งสารสำคัญจากสมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาระบบนำส่งยารูปแบบนาโนพาร์ทิเคิลเพื่อรักษาโรคมะเร็งแบบเฉพาะเจาะจง (targeted delivery system) โดยใช้สารสำคัญจากสมุนไพรเป็นสารออกฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็ง เตรียมโดยใช้เทคนิคการเชื่อมต่อนิโพลิเมอร์และสารสำคัญจากสมุนไพรด้วยปฏิกิริยาทางเคมีแบบเชื่อมต่อโดยตรง (direct conjugation) ซึ่งจะนำสารสำคัญจากสมุนไพร

ออกฤทธิ์ดีและเฉพาะเจาะจงมากขึ้นในการทำลายเซลล์มะเร็ง เป็นการเพิ่มโอกาสในการพัฒนาสารสำคัญจากสมุนไพรเป็นยารักษามะเร็งในอนาคตต่อไป

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาพอลิเมอร์นาโนพาร์ทิเคิลจากเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมินนำส่งยาแบบมุ่งเป้าสำหรับเซลล์มะเร็งด้วยไฮยาลูโรนิกแอซิดโดยวิธีการเชื่อมต่อโมเลกุลพอลิเมอร์กับยา
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของพารามิเตอร์จากสูตรตำรับต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของนาโนพาร์ทิเคิล ต่อความจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็ง

### สมมติฐานการวิจัย

1. ความเข้มข้นของ hyaluronic acid ความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน และชนิดของสารสำคัญ ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล ความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญ และความสามารถในการปลดปล่อยตัวยา
2. ชนิดของเซลล์ และรูปแบบของสารสำคัญจากเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน ส่งผลต่อความจำเพาะต่อเซลล์ และประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิล

### ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา

ตอนที่ 1 การพัฒนาไฮยาลูโรนิกแอซิดนาโนพาร์ทิเคิล

ตัวแปรต้น

1. ความเข้มข้นของ hyaluronic acid
2. ความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน
3. ชนิดของสารสำคัญ

ตัวแปรตาม

1. สมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล
2. ความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญ
3. ความสามารถในการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ

ตอนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ในการทำลายเซลล์

ตัวแปรต้น

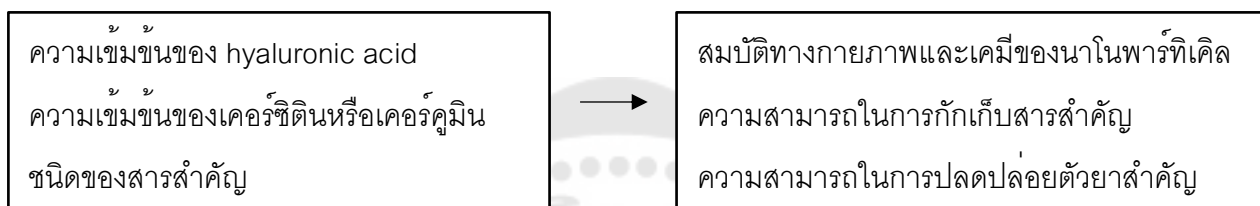
1. ชนิดของเซลล์

2. รูปแบบของสารสำคัญจากเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน  
ตัวแปรตาม

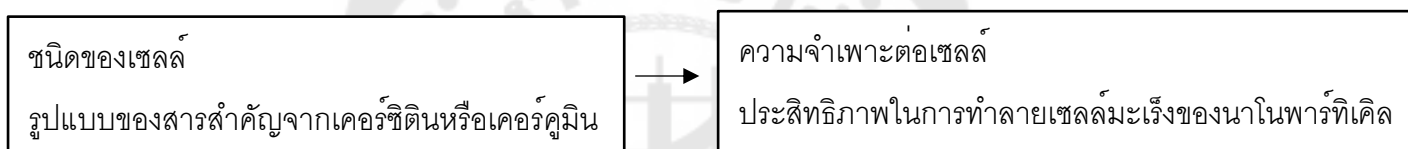
1. ความจำเพาะต่อเซลล์
2. ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิล

### กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

กรอบแนวคิดที่ 1



กรอบแนวคิดที่ 2



### ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ระยะ โดยระยะที่ 1 จะทำการเตรียม hyaluronic acid- quercetin (HA-QT) conjugate และ hyaluronic acid-curcumin (HA-Cur) conjugate และทดสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล ได้แก่ ขนาด และการกระจายของขนาดอนุภาค ประจุที่ผิวอนุภาค ลักษณะรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิล การเกิดอันตรกิริยาของหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ สารสำคัญจากสมุนไพร และนาโนพาร์ทิเคิล ทดสอบความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญ และความสามารถในการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ ในระยะที่ 2 นำนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้มาทดสอบฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ โดยทดสอบความจำเพาะต่อเซลล์เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปกติ (HaCaT cells) และเซลล์มะเร็ง (CaCO-2 cells) ที่ได้รับสารสำคัญ คือ quercetin และ curcumin เทียบกับสารสำคัญทั้งสองในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิล และทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิล

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการพัฒนาระบบนำส่งยาแบบมุ่งเป้าเข้าสู่เซลล์มะเร็งที่ใช้สารสำคัญจากสมุนไพรเป็นสารออกฤทธิ์
2. ทำให้ทราบผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์จากสูตรตำรับต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### ระบบนำส่งยาสู่เป้าหมาย (Targeted drug delivery system)

ระบบนำส่งยาสู่เป้าหมายออกแบบโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์ไปยังเฉพาะบริเวณที่ต้องการ โดยการใช้ตัวพา (carrier) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการนำส่งยา ซึ่งข้อดีของระบบนำส่งรูปแบบนี้คือ ทำให้ยามีความเข้มข้นสูงในเฉพาะบริเวณที่ต้องการ ลดผลข้างเคียงต่อเนื้อเยื่อปกติ และช่วยป้องกันไม่ให้ยาถูกทำลายง่าย ส่งผลให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา (V. Jain, Jain, & Mahajan, 2015)

รูปแบบของระบบนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ

#### Passive targeting drug delivery system

ระบบนำส่งยารูปแบบนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการตอบสนองตามธรรมชาติของร่างกายต่อลักษณะของยาหรือตัวพา ยา ดังนั้นจึงมีความ selective น้อย และมีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดผลข้างเคียง โดยปัจจัยสำคัญที่กำหนดเป้าหมายในการนำส่งยา ได้แก่ ขนาดอนุภาค และพยาธิสภาพของหลอดเลือดเซลล์มะเร็ง ซึ่งกลไกหลักของการนำส่งยาแบบ passive targeting คือ ผลของการเพิ่มการซึมผ่านและการกักเก็บ (enhanced permeability and retention (EPR) effect) ทำให้ยาถูกสะสมมากขึ้นในเซลล์มะเร็ง จึงเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาได้ (V. Jain et al., 2015)

#### Active targeting drug delivery system

ระบบนำส่งยารูปแบบนี้เกิดจากการเชื่อมต่อกับสารที่ทำหน้าที่กำหนดเป้าหมายไว้ที่ผิวของอนุภาคยา ทำให้สามารถนำส่งยาสู่บริเวณเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง จึงมีโอกาสน้อยที่จะเกิดผลข้างเคียง โดยตัวอย่างของสารที่นิยมใช้สำหรับกำหนดเป้าหมายในการนำส่งยา เช่น antibodies, ligands, peptides, polymers, nucleic acids เป็นต้น (V. Jain et al., 2015)

#### นาโนพาร์ติเคิล (Nanoparticles)

ในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมา มีการประยุกต์เอาความรู้ทางนาโนศาสตร์ และนาโนเทคโนโลยีมาใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อพัฒนาอนุภาคระดับนาโนเมตร (nanoparticles) เนื่องจากขนาดของอนุภาคดังกล่าวจะมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อมวลที่สูง สามารถดูดซับหรือเป็นตัวพาสารประกอบ เช่น ยา หรือโปรตีน ไปกับอนุภาคและสามารถผ่าน biological barrier ได้ (De Jong & Borm, 2008) นอกจากนี้ยังมีข้อดีอีกหลายประการ กล่าวคือ สามารถทำการเชื่อมต่อกับสาร



กำหนดเป้าหมาย เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการนำส่งยา หรือทำการดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกส่งผลให้ยาถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ช้า ทำให้มีปริมาณยาสะสมที่บริเวณเป้าหมายเพียงพอจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา และส่วนใหญ่สร้างจากสารที่ย่อยสลายได้ในร่างกาย ดังนั้นจึงไม่ตกค้างในร่างกาย (A. K. Jain & Thareja, 2019) ซึ่งตามคำจำกัดความส่วนใหญ่ระบุให้นาโนพาร์ทิเคิลมีขนาดต่ำกว่า  $0.1 \mu\text{m}$  หรือ  $100 \text{ nm}$  แต่สำหรับการนำนาโนพาร์ทิเคิลมาใช้ในระบบนำส่งยาซึ่งต้องมีการบรรจุสารออกฤทธิ์ลงไปในนาโนพาร์ทิเคิล ส่งผลให้นาโนพาร์ทิเคิลมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยทั่วไปจึงยอมรับขนาดอยู่ในช่วง  $1\text{-}1000 \text{ nm}$  (De Jong & Borm, 2008) (Boholm & Arvidsson, 2016)

ปัจจุบันมีแนวคิดในการนำนาโนพาร์ทิเคิลมาใช้เพื่อนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง เนื่องจากมีปัจจัยหลายประการที่ช่วยส่งเสริมการนำส่งยาของนาโนพาร์ทิเคิล ได้แก่ (V. Jain et al., 2015)

#### 1. ความสามารถในการซึมผ่าน

เนื่องจากเซลล์มะเร็งจะมีกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ดังนั้นบริเวณหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งมักมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของ endothelial cell และมีจำนวน pericytes ลดลง ทำให้เกิดรอยร้าวเป็นรูขนาดใหญ่ประมาณ  $200\text{-}800 \text{ nm}$  (Silva, Cabral Campello, & Paulo, 2021) ซึ่งรอยร้าวขนาดใหญ่ดังกล่าวส่งผลให้หลอดเลือดของเซลล์มะเร็งมีการซึมผ่านเพิ่มมากขึ้น ทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น อนุภาคระดับนาโนเมตร สามารถซึมผ่านจากหลอดเลือดเข้าไปในเซลล์มะเร็งได้ (Dadwal, Baldi, & Kumar Narang, 2018)

#### 2. เพิ่มระยะเวลาในการสะสมที่เซลล์มะเร็ง

ในเนื้อเยื่อปกติระบบน้ำเหลืองจะทำหน้าที่กำจัดสารที่มีโมเลกุลใหญ่ แต่ในเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นบริเวณที่มีการแบ่งตัวมากผิดปกติจนเกิดการกีดกันของหลอดเลือด ทำให้น้ำเหลืองทำงานบกพร่อง ร่วมกับการซึมผ่านที่เพิ่มขึ้นของหลอดเลือด ทำให้เกิดการสะสมของสารที่มีโมเลกุลใหญ่ในเซลล์มะเร็งนานขึ้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้นาโนพาร์ทิเคิลถูกสะสมในเซลล์มะเร็งนานขึ้น ส่งผลให้มีความเข้มข้นสูงกว่าในเลือดหรือในเนื้อเยื่อบริเวณอื่น (Dadwal et al., 2018)

จากหลักการดังกล่าวข้างต้น ทำให้การพัฒนากระบวนการนำส่งยาแบบนาโนพาร์ทิเคิลสามารถเพิ่มการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง และทำให้มีปริมาณยาสะสมที่เซลล์มะเร็งมากขึ้น จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา นอกจากนี้การที่นาโนพาร์ทิเคิลมีขนาดใหญ่ทำให้ไม่สามารถผ่านหลอดเลือดของเซลล์ปกติได้ จึงช่วยลดความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อปกติลง แต่อย่างไรก็ตามนาโนพาร์ทิเคิลมีแนวโน้มถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดผ่าน mononuclear phagocyte system (MPS) เช่น monocytes และ macrophages ซึ่งจัดเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย ดังนั้นจึงมี

การพัฒนาโดยนำ PEG หรือ macromolecules เช่น polysaccharides มาเคลือบบนผิวของนาโนพาร์ติเคิล เนื่องจากสารดังกล่าวจะป้องกันการถูกดูดซับโดยโปรตีน และหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ (Dadwal et al., 2018)

จากพยาธิสภาพของเซลล์มะเร็ง นาโนพาร์ติเคิลจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อนำส่งยาสู่เป้าหมาย เนื่องจากสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์มะเร็งและเกิดการสะสม ผ่านทาง EPR effect ซึ่งนับเป็นกลไกหลักของการนำส่งยาแบบ passive targeting (Dadwal et al., 2018) นอกจากนี้การที่นาโนพาร์ติเคิลมีอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อมวลที่สูง สามารถทำการดัดแปลงพื้นผิวในการเชื่อมต่อกับสารกำหนดเป้าหมาย เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการนำส่งยา ทำให้นาโนพาร์ติเคิลสามารถนำส่งยาแบบ active targeting ได้อีกด้วย (De Jong & Borm, 2008) (Silva et al., 2021)

สามารถแบ่งประเภทของนาโนพาร์ติเคิลที่ใช้ในระบบนำส่งยาได้ 4 ประเภท ได้แก่ (Dadwal et al., 2018; Din et al., 2017)

1. Polymer-based drug carriers เช่น polymeric nanoparticles, polymeric micelles, dendrimers
2. Lipid-based drug carriers เช่น liposome, solid lipid nanoparticles (SLNs)
3. Viral-based nanoparticles
4. Organometallic compound เช่น carbon nanotubes, mesoporous silica nanoparticles

### พอลิเมอร์นาโนพาร์ติเคิล (Polymer nanoparticles)

เป็นการนำพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้และเข้ากันได้กับร่างกาย เช่น polyglycolic acid (PGA), HPMA copolymer, PEG เป็นต้น มาสร้างเป็นอนุภาคคอลลอยด์ในรูปของแข็งที่มีขนาด 10–1,000 nm ซึ่งสามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น solvent evaporation, nanoprecipitation, dialysis, emulsification polymerization เป็นต้น โดยข้อดีของระบบนำส่งรูปแบบนี้ คือ การกระจายของขนาดอนุภาคมีค่าใกล้เคียงกัน มีความคงสภาพที่ดีเมื่ออยู่ในร่างกาย ทำให้อายุมีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดนานขึ้น สามารถบรรจุยาได้ปริมาณมาก และควบคุมการปลดปล่อยของยาได้ ซึ่ง polymeric nanoparticles สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ nanospheres และ nanocapsules (Din et al., 2017)

1. Nanospheres (matrix type) ตัวยาสำคัญ จะกระจายหรือละลายทั่วใน polymer matrix ทำให้โครงสร้างไม่สามารถแยกส่วนผนังห่อหุ้มได้อย่างชัดเจน

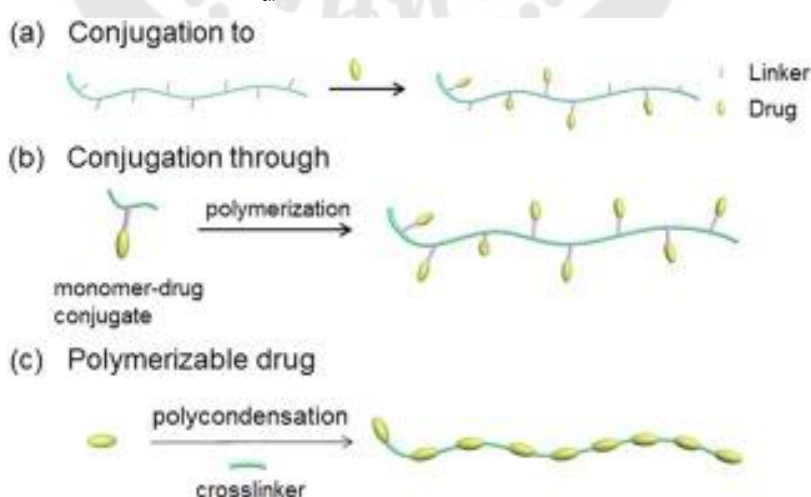
2. Nanocapsules (reservoir type) ตัวยาสำคัญจะกระจายหรือละลายอยู่เฉพาะบริเวณแกนกลางที่ถูกห่อหุ้มด้วย membrane โดยส่วนของแกนกลางและ membrane ที่ห่อหุ้มจะแยกจากกันอย่างชัดเจน

### นาโนพาร์ทิเคิลจากการเชื่อมโมเลกุลพอลิเมอร์และยา (nanoparticles from polymer–drug conjugation)

จัดเป็นระบบนำส่งยาประเภทนาโนพาร์ทิเคิลรูปแบบหนึ่ง ที่มีการนำเอาพอลิเมอร์มาเชื่อมต่อกับโมเลกุลยาด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งระบบนำส่งยารูปแบบนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น ทำให้ยาที่ละลายน้ำได้น้อยสามารถละลายได้ดีขึ้น ป้องกันยาเสื่อมสลายจากการถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้ชีวประสิทธิผลและค่าครึ่งชีวิตของยาในกระแสเลือดเพิ่มมากขึ้น และสามารถควบคุมพฤติกรรมการปลดปล่อยของตัวยาให้เกิดขึ้นเฉพาะบริเวณที่ต้องการได้ (Girase, Patil, & Ige, 2020) แต่อย่างไรก็ตามระบบนำส่งรูปแบบนี้มีข้อจำกัดบางประการ คือ ไม่สามารถใช้ได้กับตัวยาสำคัญทุกชนิด เนื่องจากมียาบางชนิดที่ไม่มีหมู่ฟังก์ชันทางเคมีสำหรับสร้างพันธะโควาเลนต์กับพอลิเมอร์ (Feng & Tong, 2016)

การเชื่อมต่อกับโมเลกุลพอลิเมอร์และยา มี 3 รูปแบบ ได้แก่ (Feng & Tong, 2016)

1. การเชื่อมต่อกับสายพอลิเมอร์
2. การเชื่อมต่อกับโมโนเมอร์ และทำปฏิกิริยา polymerization ให้เกิดเป็นสายพอลิเมอร์
3. การนำยาไปทำปฏิกิริยา polymerization โดยตรงกับโมโนเมอร์



ภาพประกอบ 1 การสังเคราะห์ Polymer-Drug Conjugates

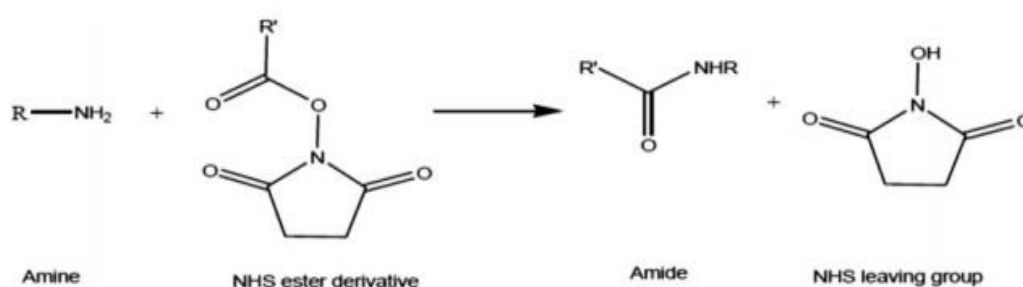
ที่มา: (Feng & Tong, 2016)

การที่ยาจะถูกปลดปล่อยออกจากพอลิเมอร์ได้นั้น พันธะที่เชื่อมต่อยกหว่างพอลิเมอร์และยาเข้าไว้ด้วยกันจะต้องถูกทำลาย ซึ่งปัจจัยที่เป็นตัวกระตุ้นให้พันธะถูกทำลาย ได้แก่ อุณหภูมิ pH แสง เอนไซม์ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน เป็นต้น (Feng & Tong, 2016)

วิธีการเชื่อมต่อโมเลกุลพอลิเมอร์และยา มี 4 วิธี ได้แก่ (Girase et al., 2020)

1. การเชื่อมต่อโดยใช้ N-hydroxysuccinimide (NHS) ester derivative

ถูกนำมาใช้เพื่อเชื่อมต่อกับสารที่มีหมู่เอมีน ( $-NH_2$ ) เพื่อให้เกิดพันธะเอไมด์ และ NHS leaving group



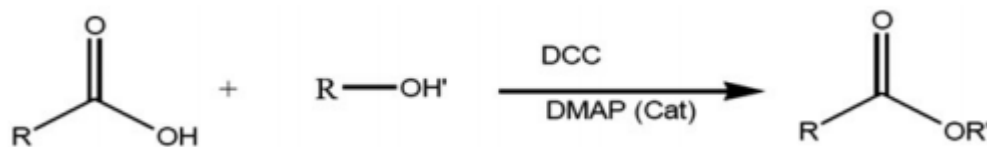
ภาพประกอบ 2 การเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโดยใช้ NHS ester derivative

ที่มา: (Girase et al., 2020)

2. การเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโดยใช้ reagent

2.1 Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

ถูกนำมาใช้ร่วมกับ dimethyl aminopyridine (DMAP) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา esterification ระหว่างสารที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก ( $-COOH$ ) และ สารที่มีหมู่ไฮดรอกซิล ( $-OH$ )

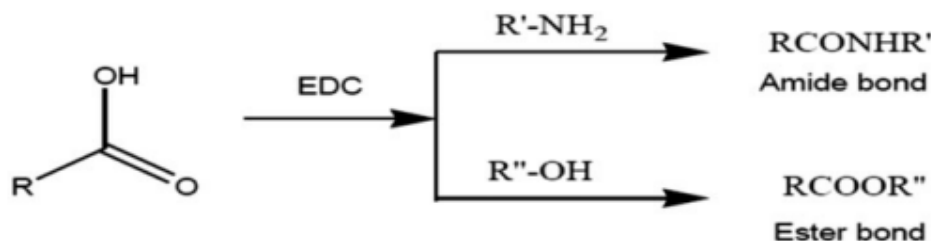


ภาพประกอบ 3 การเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโดยใช้ DCC และ DMAP เป็น reagent

ที่มา: (Girase et al., 2020)

## 2.2 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC, EDCI)

ถูกนำมาใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างสารที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) และสารที่มีหมู่เอมีน (-NH<sub>2</sub>) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เพื่อให้เกิดพันธะเอไมด์ หรือเอสเทอร์ตามลำดับ



ภาพประกอบ 4 การเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโดยใช้ EDC เป็น reagent

ที่มา: (Girase et al., 2020)

3. การนำ hydroxyl group ใน polymers มาเชื่อมต่อกับ alcohols และ amines ทำได้โดยการตัดแปลงหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่มีอยู่ใน polymers ให้กลายเป็นอนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิก โดยทำปฏิกิริยากับกรด anhydrides เช่น succinic anhydride เพื่อให้เกิด succinylated derivative ที่มี free -COOH group ที่สามารถเชื่อมต่อกับโมเลกุลยาหรือโปรตีนได้

### 4. การเชื่อมตอยาและพอลิเมอร์โดยใช้ spacer

Spacer ถูกนำมาใช้เพื่อสร้างพันธะระหว่างยาและพอลิเมอร์ โดยข้อดีของการใช้ spacer คือ สามารถควบคุมตำแหน่งและอัตราการปล่อยยาได้ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกันระหว่างลิแกนด์และโปรตีน ตัวอย่างของ spacer เช่น glycine, alanine, small peptides เป็นต้น

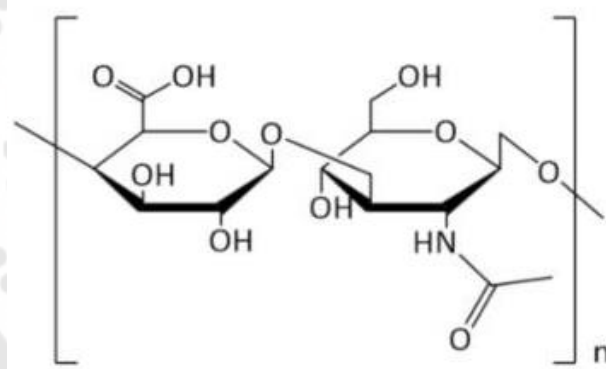
### พอลิเมอร์สำหรับนาโนพาร์ทิเคิลจากการเชื่อมโมเลกุลพอลิเมอร์และยา

พอลิเมอร์ที่ถูกนำมาใช้เพื่อนำส่งยาควรมีคุณสมบัติ คือ มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสม เช่น -COOH, -OH, -SH, -NH<sub>2</sub> ที่สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมต่อกับโมเลกุลยาได้ ควรเป็น hydrophilic polymer เพื่อให้มีค่าการละลายน้ำที่ดี มีค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low polydispersity) ไม่เป็นพิษ และไม่เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ย่อยสลายได้ในร่างกาย หรือถูกกำจัดออกจากร่างกายได้อย่างสมบูรณ์ หาได้ง่าย และเหมาะสมที่จะนำมาใช้กับผู้ป่วย ตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่มีการนำมาใช้ เช่น polyethylene glycol (PEG), polyglutamate,

N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymer, poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polysaccharide เป็นต้น (Girase et al., 2020)

### ไฮยาลูโรนิกแอซิด (Hyaluronic acid; HA)

ไฮยาลูโรนิกแอซิดเป็น polysaccharides ประจุลบ (ภาพประกอบ 5) ที่ประกอบขึ้นจาก glucuronic acid และ N-acetyl-glucosamine พบมากในร่างกายบริเวณผิว น้ำไขข้อ และวุ้นภายในลูกตา ถูกย่อยสลายในร่างกายด้วยเอนไซม์ Hyal-1 และ Hyal-2 เป็นหลัก โครงสร้างทางเคมีของ HA มีหมู่ฟังก์ชันหลายชนิดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ เช่น hydroxyl group (-OH), carboxylic group (-COOH) และ N-acetyl group (-NHCOCH<sub>3</sub>) โดย HA เป็นลิแกนด์ที่สามารถจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ได้หลายชนิด เช่น CD44, RHAMM, และ LYVE-1 (Rao et al., 2020) ดังนั้นจึงมีการนำ HA มาใช้เพื่อกำหนดเป้าหมายในการนำส่งโปรตีน เปปไทด์ กรดนิวคลีอิก รวมถึงยาต้านมะเร็งชนิดต่างๆ



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Hyaluronic acid

ที่มา: (Rao et al., 2020)

### ระบบนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งจากไฮยาลูโรนิกแอซิด

ไฮยาลูโรนิกแอซิดถูกนำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยาเพื่อรักษามะเร็ง เนื่องจาก HA สามารถจับกับตัวรับที่จำเพาะที่พบมากบนพื้นผิวของเซลล์มะเร็ง ทำให้ HA มีสมบัติในการเป็น tumor-targeted drug delivery systems ที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย (Huang & Huang, 2018)

## 1. HA-drug conjugation

HA-drug conjugation เป็นการนำยาต้านมะเร็งมาเชื่อมต่อกับ HA ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งพันธะดังกล่าวนี้จะคงสภาพเมื่ออยู่ในกระแสเลือด แต่เมื่อเข้าสู่เซลล์มะเร็งจะถูก hydrolysis ทำให้ยาถูกปลดปล่อยออกมา จึงสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างตรงเป้าหมาย การนำ HA มาเชื่อมต่อกับตัวยานอกจากทำให้ยาออกฤทธิ์มุ่งเป้าได้แล้ว ยังสามารถเพิ่มการละลายของยา และค่าครึ่งชีวิตในร่างกาย ทำให้เพิ่มการสะสมของยาในเซลล์มะเร็งมีผลทำให้ประสิทธิภาพของยาเพิ่มขึ้น (Huang & Huang, 2018)

HA สามารถนำมาใช้เป็นตัวพาเพื่อนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง โดยนำ hyaluronic acid-graft-poly(dimethylaminoethyl methacrylate) (HPD) มาเชื่อมต่อกับ siRNA ด้วยพันธะ disulfide bonds พบว่า siRNA-HPD สามารถเข้าสู่ melanoma cells (B16F10) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD44 receptor ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากความสามารถในการจับกับ CD44 ของ HA ดังนั้นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD44 receptor จำนวนมาก เช่น เซลล์มะเร็ง จะสามารถนำ siRNA เข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD44 receptor จำนวนน้อย ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของ siRNA ได้ (Yoon et al., 2013)

มีการพัฒนา hyaluronic acid-curcumin (HA-Cur) conjugate เพื่อเพิ่มการละลายและเพิ่มความคงตัวของ curcumin โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโดยตรง (direct conjugation) ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ของ hyaluronic acid กับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของ curcumin ผ่านสารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา คือ dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และ dimethyl aminopyridine (DMAP) ในสารละลายผสมระหว่างน้ำและ dimethyl sulfoxide ทำการตรวจสอบลักษณะของระบบ conjugate โดยใช้ FT-IR, NMR, Dynamic light scattering และ TEM พบว่า HA-Cur conjugate มีการก่อตัวเป็น micelles ในเฟสน้ำ โดยหันส่วนที่เป็น hydrophobic ที่มีโมเลกุลของ curcumin เข้าด้านใน และหันส่วนที่เป็น hydrophilic ที่มี hyaluronic acid ออกด้านนอก ซึ่งการจัดเรียงตัวในรูปแบบ micelles จะช่วยป้องกันไม่ให้ curcumin เสื่อมสลายในสภาวะที่เป็นต่าง จึงช่วยเพิ่มความคงสภาพของ curcumin ที่ pH ของร่างกายได้ จากนั้นทำการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ L929 fibroblast cells และทำการทดสอบเชิงปริมาณเพื่อหา %viability ด้วย MTT assay พบว่า HA-Cur conjugate ที่มีปริมาณ curcumin เทียบเท่า 13 µg สามารถฆ่าเซลล์ได้เกือบ 80% และเมื่อลดความเข้มข้น curcumin ลง ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตจะเพิ่มมากขึ้น (Manju & Sreenivasan, 2011)

นอกจากการเชื่อมต่อระหว่าง HA และ curcumin แล้ว HA ยังสามารถเชื่อมต่อได้กับสารสำคัญจากสมุนไพรอื่น ได้แก่ quercetin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในสมุนไพรหลายชนิด (Bischoff, 2008) ได้มีการพัฒนา hyaluronic acid-quercetin (HA-QT) conjugate micelles โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อทางอ้อม (indirect conjugation) ผ่าน adipic acid dihydrazide (ADH) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) ester derivative เมื่อทำการตรวจสอบ micro-morphology พบว่า สามารถเกิดการรวมตัวเป็น micelles ได้เอง (self-assembled micelles) โดย micelles ที่ประกอบขึ้นจะมีรูปร่างเป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 172.1 nm มีศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค  $-20.30$  mV และมีพฤติกรรมการปลดปล่อยยาเป็นแบบ sustained release และขึ้นกับ pH เมื่อทำการศึกษา in vitro เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ MCF-7 cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่มี CD44 จำนวนมาก พบว่า HA-QT micelles จะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า free quercetin solution ถึง 4 เท่า แต่เมื่อทำการทดสอบกับ L929 cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่มี CD44 น้อย พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจะด้อยลง เมื่อทำการศึกษา in vivo เพื่อทดสอบ pharmacokinetics และ antitumor activity พบว่า HA-QT micelles สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ H22 tumor ในหนูได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่า quercetin ที่อยู่ในรูปแบบ HA-QT micelles จะมีค่าครึ่งชีวิตเพิ่มขึ้น 20.1 เท่า และมี AUC เพิ่มขึ้น 4.9 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ parent drug (Pang, Lu, Du, Yang, & Zhai, 2014)

## 2. HA surface-modified nanoparticle drug delivery system

HA surface-modified nanoparticle เป็นการนำ HA มาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของระบบนำส่งนาโนพาร์ทิเคิล เช่น เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการนำส่งยาสู่เป้าหมาย และเพิ่มระยะเวลาที่ยาอยู่ในกระแสเลือด (Huang & Huang, 2018) โดยมีการนำ HA ที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างกัน 2 ชนิด คือ HA<sub>4800</sub> และ HA<sub>12000</sub> มาเคลือบบนผิวของ liposomes ที่บรรจุยา gemcitabine เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะของ liposome พบว่ามีลักษณะเป็น spherical unilamellar vesicles มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 150-190 nm และมีศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคเป็นลบ จากนั้นนำไปทดสอบกับ pancreatic adenocarcinoma cell lines (MiaPaCa2) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD44 receptor บนผิวเซลล์จำนวนมาก เปรียบเทียบกับ normal pancreatic mesenchymal cells (VIT1) ซึ่งพบ CD44 receptor บนผิวเซลล์น้อย และตรวจวัดโดยใช้การเรืองแสง fluorescence พบว่าใน MiaPaCa2 cell จะตรวจพบการเรืองแสงของ HA-liposome แต่ไม่พบการเรืองแสงใน VIT1 cell และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง HA<sub>4800</sub>-liposome และ HA<sub>12000</sub>-liposome พบว่าการใช้ HA ที่มีมวลโมเลกุลสูงจะยังมี high affinity ต่อ CD44 receptor (Arpicco et al., 2013)



### 3. นาโนพาร์ทิเคิลจากอนุพันธ์ของไฮยาลูโรนิกแอซิด

อนุพันธ์ของไฮยาลูโรนิกแอซิดที่ถูกดัดแปลงให้มีความชอบน้ำและชอบไขมัน (amphiphilic derivative of hyaluronic acid) เป็นอีกพอลิเมอร์หนึ่งที่สามารถนำมาใช้เตรียมเป็นนาโนพาร์ทิเคิล เป็นระบบที่สามารถก่อตัวเป็น nanoparticles ได้เองในน้ำ โดยหันส่วนที่ชอบน้ำออกด้านนอก (hydrophilic shell) และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าด้านใน (hydrophobic core) ทำให้สามารถบรรจุยาต้านมะเร็งไว้บริเวณแกนภายในได้ ซึ่งการมี hydrophilic shell จะช่วยหลีกเลี่ยงการถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Huang & Huang, 2018) จากงานวิจัยได้มีการพัฒนา amphiphilic HA conjugates โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกันระหว่าง hydrophobic 5 $\beta$ -cholanic acid และ hydrophilic HA ผ่านสารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา คือ EDC และ NHS เมื่อทำการศึกษพบว่า HA nanoparticles มีรูปร่างเป็นทรงกลม มีขนาด 350-400 nm มีศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค -40 ถึง -33 mV และสามารถรวมตัวเป็นอนุภาคขนาดนาโนได้เองในสภาวะร่างกาย จากนั้นทำการติดฉลาก HA nanoparticles ด้วยสารเรืองแสง Cy5.5 เพื่อทำการตรวจติดตาม พบว่า HA nanoparticles สามารถเข้าสู่เซลล์มะเร็ง SCC7 ที่มี CD44 อยู่บนผิวเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อทำการทดสอบโดยฉีดเข้าที่หางของหนูที่มีเนื้องอก จะตรวจพบความเข้มแสงของ HA nanoparticles ที่บริเวณเนื้องอกสูงเป็น 4 เท่า เมื่อเทียบกับ HA polymer (Choi et al., 2009)

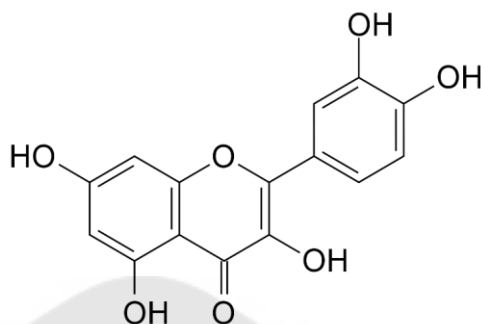
### สารสำคัญจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง

สารสำคัญจากสมุนไพรถูกนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ มาเป็นเวลาหลายพันปี หนึ่งในโรคที่ได้รับความสนใจคือ โรคมะเร็ง พบว่าผู้ป่วยมะเร็งประมาณ 50-60% ในสหรัฐอเมริกา ใช้สารที่ได้จากพืชเป็นยาทางเลือกหรือใช้ควบคู่กับการรักษามะเร็งแบบดั้งเดิม เช่น เคมีบำบัด และการฉายรังสี โดยตัวอย่างของสารสำคัญจากสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง เช่น resveratrol จากองุ่น, genistein จากถั่วเหลือง, quercetin จากหอมแดง, curcumin จากขมิ้น เป็นต้น (Bischoff, 2008; H. Wang et al., 2012)

#### 1. Quercetin

Quercetin เป็นสารประกอบฟีนอลิกของพืช ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม flavonoids มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง ลดความดันโลหิต และบรรเทาภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ทำให้สามารถป้องกันและรักษาโรคได้อย่างหลากหลาย พบได้ในผักผลไม้หลายชนิด เช่น บรอกโคลี, หอมแดง, องุ่น, แอปเปิล, เบอร์รี่ เป็นต้น (Bischoff, 2008) quercetin มีข้อจำกัดในการนำมาใช้ เนื่องจากเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย ไม่คง

สภาพทางเคมี มีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดสั้น และมีชีวประสิทธิผลต่ำ ดังนั้นการใช้ระบบนำส่งยา เช่น lipid-based carriers, nanoparticles, conjugates-based encapsulation มาช่วยในการนำส่งอาจช่วยเพิ่มความคงสภาพและชีวประสิทธิผลของ quercetin ได้ (W. Wang et al., 2016)



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างทางเคมีของ Quercetin

ที่มา: (W. Wang et al., 2016)

ตาราง 1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ Quercetin

ลักษณะ	มักพบอยู่ในรูปผงหรือผลึก ที่มีสีเหลือง
น้ำหนักโมเลกุล	302.23
จุดหลอมเหลว	314–316 °C
logP	1.48
ค่าการละลาย	ละลายได้น้อยในน้ำ (0.01 mg/mL ที่ 25 °C) ละลายได้ปานกลางใน ethanol (4.0 mg/mL ที่ 37 °C) ละลายได้ดีมากใน dimethyl sulfoxide (150 mg/mL ที่ 25 °C)
ความคงสภาพ	เสื่อมสลายเมื่อถูกความร้อน ความเป็นกรด-ด่าง และการเก็บไว้เป็นเวลานาน

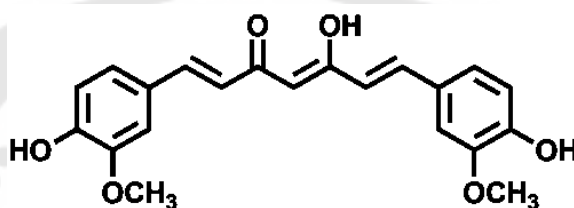
ที่มา: (W. Wang et al., 2016)

มีงานวิจัยหลากหลายที่ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ quercetin ซึ่งพบว่า quercetin สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายกลไก เช่น จากการศึกษาใน human colon cancer cells (CaCO-2) โดยใช้วิธี wound-healing assay พบว่า quercetin มีฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งผ่านทาง toll-like receptor 4 และ nuclear factor-kappa B (NF-KB) (Han, Song, & Zhang, 2016) การศึกษาใน human breast cancer cells (MCF-7) พบว่า quercetin สามารถ

ยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดการ apoptosis ในเซลล์มะเร็ง โดยลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ต้านการเกิด apoptosis และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bax ซึ่งเป็นโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis (Duo, Ying, Wang, & Zhang, 2012) เป็นต้น

## 2. Curcumin

Curcumin เป็นสารที่ได้จากส่วนเหง้าของขมิ้นชัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ต้านการแข็งตัวของเลือด บรรเทาภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ต้านมาลาเรีย และป้องกันโรคอัลไซเมอร์ Curcumin มีข้อจำกัดในการนำมาใช้ เนื่องจากเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย มีการซึมผ่านและการดูดซึมต่ำและถูกเผาผลาญอย่างรวดเร็ว มีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดน้อยกว่า 2 ชั่วโมง (Suresh & Nangia, 2018)



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างทางเคมีของ Curcumin

ที่มา: (Suresh & Nangia, 2018)

ตาราง 2 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ Curcumin

ลักษณะ	มักพบอยู่ในรูปผงหรือผลึก ที่มีสีเหลือง
น้ำหนักโมเลกุล	368.38
จุดหลอมเหลว	183 °C
ค่าการละลาย	ละลายได้น้อยมากในน้ำ (7.8 µg/mL ที่อุณหภูมิห้อง) ละลายใน organic solvents เช่น methanol, ethanol, acetone, DMSO, DMF
ความคงสภาพ	ในสภาวะที่เป็นผง จะเสื่อมสลายภายใน 30 นาที ในสภาวะที่เป็นกรด การเสื่อมสลายจะช้าลง โดยเสื่อมสลายน้อยกว่า 20% ใน 1 ชั่วโมง เสื่อมสลายได้เมื่อโดนแสง

ที่มา: (Suresh & Nangia, 2018) (Sharma, Gescher, & Steward, 2005)

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ curcumin เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis โดยลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-xL ซึ่งเป็นโปรตีนที่ต้านการเกิด apoptosis รวมถึงยับยั้งหรือลดการแสดงออกของ transcription factors เช่น NF- $\kappa$ B, AP-1 ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดการสร้างมะเร็ง (Tomeh, Hadianamrei, & Zhao, 2019) นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยผ่านกลไกต่างๆมากมาย เช่น หยุดวงจรชีวิตของเซลล์, ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง, ลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เช่น cyclin D1 เป็นต้น (Ji, Huang, & Zhu, 2012)

#### Human colon adenocarcinoma cell line (CaCO-2 cells)

CaCO-2 cells เป็น epithelial cells ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเป็นเซลล์ยึดเกาะชั้นเดียว มี tight junctions เชื่อมระหว่างเซลล์ที่ติดกัน สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น monolayer cell ที่มีสมบัติหลายอย่างเหมือน enterocytes ที่พบในลำไส้เล็ก พบการแสดงออกของเอนไซม์หลายชนิด เช่น membrane peptidases, lactase, sulfatase, aminopeptidase N, esterase, sucrase-isomaltase และ dipeptidylpeptidase IV และพบการแสดงออกของ receptors เช่น epidermal growth factor receptor, vitamin B12, vitamin D3, sugar transporters เป็นต้น (Lea, 2015)

มีการศึกษาพบว่ามะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งอีกชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในอนาคต (Sriplung, Wiangnon, Sontipong, Sumitsawan, & Martin, 2006) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาเซลล์มะเร็งจากผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในระยะต่างๆ ของโรค จำนวน 8 cell lines ได้แก่ SW1116, SW620, SW480, DLD-1, HT-29, CaCO-2, COLO205 และ T84 พบว่า CaCO-2 cells มีการแสดงออกของ CD44 receptor มากที่สุด ( $85.9 \pm 9.8\%$ ) (Vázquez-Iglesias et al., 2019)

#### Human keratinocyte cell line (HaCaT cells)

HaCaT cells เป็น keratinocyte cell ที่ได้จากผิวหนังของมนุษย์ มีอายุขัยยาวนาน โดยเมื่อถูกกระตุ้น HaCaT จะมีการเปลี่ยนแปลงและมีการแสดงออกของ specific marker เช่น K14, K10, และ involucrin เป็นต้น (Colombo et al., 2017) โดย HaCaT ย่อมาจาก Ha = human adult, Ca = calcium, T = temperature ซึ่งบ่งบอกถึงที่มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ keratinocytes ของผิวหนังผู้ใหญ่ ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมต่ำ และอุณหภูมิสูง HaCaT เป็นเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ใน alleles ทั้งสองของยีน p53 ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์มีอายุขัยยาวนานและไม่ตาย (immortalization) (Rekus, 2000)

### บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

Amicon<sup>®</sup> stirred cell (Merck KGaA, Germany)

Carbon film grids 300 mesh, copper (Electron Microscopy Sciences, USA)

Cell culture flask 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc., USA)

Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) (Bruker Corporation, USA)

Hemocytometer counting chamber (Paul Marienfeld GmbH & Co. Kg, Germany)

Incubator 37 C<sup>o</sup> ± 5% CO<sub>2</sub> (LEEC Limited, UK)

Incubator shaker (IKA<sup>®</sup> Works (Thailand) Co. Ltd., Thailand)

Microbiological Safety Cabinets class II (FASTER S.r.l., Italy)

Microplate reader (SpectraMax<sup>®</sup> M3, China)

Microscope (Olympus Corporation, Japan)

Multichannel Pipettes (Mettler-Toledo (Thailand) Ltd., Thailand)

Particle size analyzer: Zetasizer (DKSH Thailand Limited, Thailand)

Transmission Electron Microscope (TEM) (Talos™ F200X TEM, Netherlands)

Zentrifugen (Hettich, Germany)

96-well plates (Corning Inc., USA)

#### สารเคมี

Cell Counting Kit-8 (Dojin East, Japan)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck KGaA, Germany)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies Corp., USA)

DMEM without phenol red (Life Technologies Corp., USA)

Fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies Limited, UK)

Human colon adenocarcinoma cell line (CaCO-2 cells) (ATCC, USA)

Human keratinocyte cell line (HaCaT cells) (ATCC, USA)

Hyaluronic acid (Shanghai Huiwen Biotech Corp., Ltd., China)

Minimum Essential Medium (MEM) (Biomedica (Thailand) Co., Ltd., Thailand)

MEM without phenol red (Life Technologies Corp., USA)  
 Penicillin-Streptomycin (pens) (Sigma Aldrich Israel Ltd., Israel)  
 Phosphate buffer solution (PBS) (EMD Millipore Corp., USA)  
 Quercetin (Sigma Aldrich China Inc, China)  
 Sodium Pyruvate (Life Technologies Corp., USA)  
 Triton<sup>®</sup> X-100 (EMD Millipore Corp., USA)  
 1, 3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Sigma Aldrich China Inc, China)  
 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (MilliporeSigma, USA)  
 0.25% Trypsin-EDTA (Life Technologies Corp., USA)

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเชื่อมต่อนโมเลกุลพอลิเมอร์และยา (Hyaluronic acid-quercetin (HA-QT) conjugate)

- 1.1. กระจาย hyaluronic acid ใน DMSO เติม sterile water for injection (SWI) และ ปั่นผสมจนสารละลายใส (SWI:DMSO อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 20 ml (solution 1)
  - 1.2. เติม DCC 25 mg และ DMAP 10 mg ลงในสารละลาย คนให้เข้ากัน และ purge ด้วยแก๊สไนโตรเจน
  - 1.3. นำเข้าเครื่อง incubator shaker ที่ 100 rpm อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
  - 1.4. ละลาย quercetin หรือ curcumin ใน DMSO (solution 2) 12.5 ml จากนั้นหยดลงในสารละลาย solution 1 อย่างช้าๆ
  - 1.5. นำเข้าเครื่อง incubator shaker ที่ 100 rpm อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
- หมายเหตุ blank solution มีวิธีการเตรียมเหมือนขั้นตอนข้างต้น แต่ไม่มีสารสำคัญจากสมุนไพร ดังนั้นขั้นตอน 1.4 จึงเติมเพียง DMSO 12.5 ml ลงใน solution 1

#### ตาราง 3 สูตรตำรับ Hyaluronic acid-quercetin (HA-QT) conjugate

ส่วนประกอบ	ปริมาณหรือความเข้มข้น
Solution 1: Hyaluronic acid solution	
Hyaluronic acid	0.025%-0.3%
DCC	0.125%
DMAP	0.05%
DMSO:SWI (1:1) q.s. to	100%

ส่วนประกอบ	ปริมาณหรือความเข้มข้น
Solution 2: Quercetin/Curcumin solution	
Quercetin/Curcumin	2-6 mM
DMSO	12.5 ml

## 2. การทดสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล

### 2.1 ขนาด การกระจายของขนาดอนุภาค และประจุที่ผิวอนุภาค

ทดสอบขนาด การกระจายของขนาดอนุภาค และประจุที่ผิวอนุภาค ด้วยเครื่อง Particle size analyzer โดยกำหนด condition ดังนี้ อุณหภูมิ 25 °C, Equilibration time 120 วินาที ใช้ cell ชนิด clear disposable zeta cell เลือกสารที่ต้องการวัดเป็น hyaluronic acid มีค่า refractive index 1.666 และ absorbance 0.001 กำหนดตัวทำละลายเป็น H<sub>2</sub>O:DMSO โดยวัดค่า refractive index ของตัวทำละลายผสมก่อนนำมาทดสอบ

### 2.2 ลักษณะรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิล

ตรวจสอบลักษณะรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิล ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) โดยกรองสารละลายนาโนพาร์ทิเคิลด้วย Amicon® stirred cell ใช้แผ่นกรองขนาดรูพรุน 10 kDa จากนั้นเก็บส่วนบนของสารละลาย หยดลงบนแผ่นรองรับตัวอย่าง (carbon film grids) 10 µl และปล่อยให้แห้ง กำจัดความชื้นโดยใช้ desiccator และนำมาวิเคราะห์โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 200 kV

### 2.3 การศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ สารสำคัญจากสมุนไพร และนาโนพาร์ทิเคิล

นำพอลิเมอร์ สารสำคัญจากสมุนไพร และนาโนพาร์ทิเคิล มาวิเคราะห์การเกิดอันตรกิริยาของหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) ของบริษัท Bruker รุ่น Tensor27 โหมด ATR เลขคลื่น (wave number) อยู่ระหว่างช่วง 550-4000 ต่อเซนติเมตร ความละเอียด 4 ต่อเซนติเมตร ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์บันทึก และแปลผลผ่านโปรแกรม OPUS

## 3. การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง (cell viability)

ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ปกติ (human keratinocyte cell line: HaCaT cells) และเซลล์มะเร็ง (human colon adenocarcinoma cell line: CaCO-2 cells)

3.1 Seed cell ลงใน 96 well plate ให้มี cell density 10,000 cells/well สำหรับ HaCaT cells ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% fetal bovine serum และ 0.75% penicillin-streptomycin จากนั้นนำไป incubate ที่ อุณหภูมิ 37 C° ± 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ไปทำการทดสอบ

3.2 Seed cell ลงใน 96 well plate ให้มี cell density 10,000 cells/well สำหรับ CaCO-2 cells ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ Eagle's Minimum Essential Medium, 10% fetal bovine serum และ 0.5% penicillin-streptomycin จากนั้นนำไป incubate ที่ อุณหภูมิ 37 C° ± 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ไปทำการทดสอบ

3.3. ตัวอย่างที่นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ประกอบด้วย hyaluronic acid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml, blank solution, สารสำคัญจากสมุนไพรมันได้แก่ quercetin และ curcumin ความเข้มข้น 0.067, 0.133 และ 0.2 mM และสารสำคัญทั้งสองในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิล ความเข้มข้นของสารละลายรวมเทียบเท่าสารสำคัญอิสระ 0.067, 0.133 และ 0.2 mM โดยใช้ 1% Triton<sup>®</sup>X เป็น positive control และ อาหารเลี้ยงเซลล์เป็น negative control

3.4 ทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย Cell Counting Kit-8 assay

3.4.1 เติมน้ำตัวอย่างที่ต้องการนำมาทดสอบหลุมละ 100 µl

3.4.2 นำเข้า Incubator ที่อุณหภูมิ 37 C° ± 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.3 เมื่อครบเวลา ทำการดูด medium เก้าทิ้ง และล้างด้วย phosphate buffer solution จากนั้นเติมน้ำ culture medium without phenol red 100 µl/well และ Cell Counting Kit-8 assay 10 µl/well

3.4.4 นำเข้า Incubator ที่อุณหภูมิ 37 C° ± 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader จากนั้นคำนวณ Viability จากสูตร

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{absorbance sample}}{\text{absorbance negative control}} \times 100$$

#### 4. การศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บ

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ quercetin และ curcumin โดยชั่งสารสำคัญจากสมุนไพรมัน 10 mg ละลายในสารละลายผสม H<sub>2</sub>O:DMSO ปริมาตร 10 ml (stock solution 1 mg/ml) เจือจางด้วยสารละลายผสมจนได้ความเข้มข้น 2, 6, 8, 12 และ 14 µg/ml สำหรับ quercetin และ 1, 2, 3, 5 และ 7 µg/ml สำหรับ curcumin นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer ความยาวคลื่น 376 nm สำหรับ quercetin และ 436 nm สำหรับ



curcumin สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารและค่าการดูดกลืนแสง

นำสารละลาย hyaluronic acid-quercetin (HA-QT) conjugate และ hyaluronic acid-curcumin (HA-Cur) conjugate ที่เจือจางด้วย SWI ในอัตราส่วน 1:29 ไปกรองโดยใช้ Amicon® stirred cell ใช้แผ่นกรองขนาดรูพรุน 10 kDa จากนั้นเก็บส่วนล่างของสารละลาย นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer เพื่อนำไป drug conjugation efficiency (DCE) และ drug loading capacity (DLC) จากสูตร

$$DCE (\%) = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100$$

$$DLC (\%) = \frac{C_t - C_s}{C_t - C_s + C_p} \times 100$$

หมายเหตุ  $C_t$  คือ ปริมาณสารสำคัญจากสมุนไพรรทั้งหมด,  $C_s$  คือ ปริมาณสารสำคัญจากสมุนไพรรส่วนที่ไม่เกิดนาโนพาร์ทิเคิล และ  $C_p$  คือ ปริมาณของ hyaluronic acid ที่ใช้ในการสังเคราะห์นาโนพาร์ทิเคิล

## 5. การศึกษาการปลดปล่อย in vitro

ศึกษาการปลดปล่อยยาออกจากนาโนพาร์ทิเคิล โดยนำสารละลาย hyaluronic acid-quercetin (HA-QT) conjugate และ hyaluronic acid-curcumin (HA-Cur) conjugate ที่เตรียมได้ไปกรองโดยใช้ Amicon Ultra-15 mL Centrifugal Filters Unit เก็บสารที่อยู่ส่วนบนนำไปละลายใน phosphate-buffer solution (PBS) pH 7.4 และ acetate buffer pH 5.5 ที่มี 1% Tween® 20 เพื่อช่วยละลาย โดยใช้ปริมาตร 20 ml สำหรับ HA-QT conjugate และ 30 ml สำหรับ HA-Cur conjugate นำเข้าเครื่อง incubator shaker ที่ 75 rpm อุณหภูมิ 37 °C ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีเอนไซม์ esterase (1 U/mL) ที่ pH 7.4 และ pH 5.5 ตรวจสอบการปลดปล่อยยาออกจากนาโนพาร์ทิเคิล โดยทำการดูดสารละลายตัวอย่าง 3 ml ที่เวลา 30 นาที, 1, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ทำการเติม medium 3 ml กลับไปทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer (Pang et al., 2014)

## 6. การทดสอบทางสถิติ

ทำการทดสอบทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้การทดสอบ independent sample t-test ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน และ one way ANOVA ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

## บทที่ 4

### ผลและอภิปรายผลการศึกษา

การพัฒนานาโนพาร์ทิเคิลจากการเชื่อมต่อไปโมเลกุลพอลิเมอร์และยาด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ hyaluronic acid เป็นพอลิเมอร์ซึ่งมีสมบัติช่วยเพิ่มความจำเพาะในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง เมื่อนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์มะเร็งซึ่งมีเอนไซม์ esterase ที่ทำหน้าที่สลายพันธะที่เชื่อมต่อกันระหว่างยาและพอลิเมอร์ ทำให้ออกฤทธิ์ปลดปล่อยออกจากพอลิเมอร์และออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ โดยทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของพารามิเตอร์จากสูตรตำรับต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล ตลอดจนศึกษาประสิทธิภาพของนาโนพาร์ทิเคิลต่อความจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็ง

#### 1. สมบัติทางกายภาพและเคมีของนาโนพาร์ทิเคิล

##### 1.1 ขนาด การกระจายของขนาดอนุภาค และประจุที่ผิวอนุภาค

จากการศึกษาขนาด การกระจายของขนาดอนุภาค และประจุที่ผิวอนุภาค โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ hyaluronic acid ในช่วง 0.025%-0.3% พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ hyaluronic acid มีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาคของนาโนพาร์ทิเคิลใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) (ตาราง 4) เกิดจากโครงสร้างของ hyaluronic acid ประกอบขึ้นจากโมโนเมอร์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จำนวนมาก จึงเกิดการยึดเกาะกันผ่านพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล (Kumar et al., 2019) ดังนั้นเมื่อ hyaluronic acid มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จึงเกิดการยึดเกาะกันเองมากขึ้น ทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น และเมื่อทำการทดลองโดยการเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วนที่ต่างกัน พบว่า ค่าการกระจายของขนาดอนุภาค (PDI) มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) เนื่องจากการเจือจางทำให้ความหนาแน่นของอนุภาคในสารละลายลดลง ทำให้อนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มกันน้อยลง เมื่อแต่ละอนุภาคมีการกระจายตัวอย่างอิสระ ขนาดอนุภาคที่วัดได้จึงมีขนาดใกล้เคียงกัน และได้ขนาดอนุภาคที่ตรงตามขนาดอนุภาคจริงมากขึ้น ซึ่งจากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.05% hyaluronic acid และเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน F:SWI (1:29) เป็นสภาวะที่ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็ก ( $175.3 \text{ nm} \pm 4.81$ ) และมีความการกระจายของขนาดอนุภาคต่ำ (0.487) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนการเจือจางอื่น (ตาราง 4)

เมื่อพิจารณาประจุที่ผิวอนุภาค พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง -20 ถึง -80 mV (ตาราง 5) ซึ่งประจุที่ผิวอนุภาคนี้เกิดจากความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าในชั้นสเติร์น (stern layer) กับศักย์ไฟฟ้าในชั้นสารละลาย (diffuse layer) โดยศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้นี้ เรียกว่า zeta potential ซึ่งหากมีค่าสูงจะบ่งบอกถึงความเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์ (Shnoudeh et al., 2019) การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในงานวิจัยมีขั้นตอนการ activate หมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) บนโครงสร้างของ hyaluronic acid ให้พร้อมเกิดพันธะเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) บนโครงสร้างของสารสำคัญจากสมุนไพร ดังนั้นประจุลบที่ผิวอนุภาคจึงเกิดจากหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ที่ไม่ถูกใช้ในการเชื่อมต่อกับปฏิกิริยาทางเคมี (Kumar et al., 2019)

ตาราง 4 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ hyaluronic acid ต่อขนาดอนุภาค และการกระจายของขนาดอนุภาค (ที่ความเข้มข้น quercetin คงที่ 4 mM)

	ความเข้มข้นของ Hyaluronic acid (%)					
	0.025	0.05	0.075	0.1	0.2	0.3
No dilute	504.1 ± 99.06 (0.926)	554.5 ± 62.35 (0.949) **	546.5 ± 116.8 (1.000)	791.1 ± 207.5 (1.000)	1,099 ± 50.14 (1.000)	1,571 ± 161.9 (1.000)
F:SWI (1:3)	690.6 ± 12.99 (0.592)	805.7 ± 20.95 (0.748) **	836.5 ± 122.6 (0.861)	797.4 ± 16.35 (0.724)	2,305 ± 240.0 (1.000)	2,775 ± 171.8 (1.000)
F:SWI (1:9)	533.8 ± 14.87 (0.416)	683.8 ± 24.40 (0.538) **	783.3 ± 71.44 (0.790)	502.6 ± 32.54 (0.547)	699.8 ± 68.43 (0.815)	1,252 ± 158.0 (0.874)
F:SWI (1:15)	440.0 ± 17.26 (0.498)	528.4 ± 19.64 (0.649) **	413.9 ± 13.42 (0.513)	464.3 ± 8.82 (0.495)	1,002 ± 79.32 (0.770)	1,223 ± 140.7 (0.831)
F:SWI (1:19)	300.0 ± 2.98 (0.420)	447.1 ± 18.63 (0.551) **	288.2 ± 16.16 (0.478)	459.4 ± 14.52 (0.571)	804.7 ± 110.7 (0.773)	1,815 ± 294.1 (1.000)
F:SWI (1:29)	192.5 ± 5.55* (0.478)	175.3 ± 4.81* (0.487) **	454.7 ± 18.52* (0.803)	678.0 ± 77.82* (0.685)	1,810 ± 238.4* (1.000)	1,484 ± 94.19* (0.994)

ขนาดอนุภาค (หน่วย nm) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวเลขในวงเล็บแสดงการกระจายของขนาดอนุภาค

\*แสดงการทดสอบทางสถิติ (\* $p < 0.001$ , \*\* $p = 0.001$ )

ตาราง 5 ผลของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ hyaluronic acid ต่อ zeta potential (ที่ความเข้มข้น quercetin คงที่ 4 mM)

	ความเข้มข้นของ Hyaluronic acid (%)					
	0.025	0.05	0.075	0.1	0.2	0.3
No dilute	-50.3 ± 2.84	-37.9 ± 0.49	-38.2 ± 4.80	-76.7 ± 8.65	-69.5 ± 2.25	-76.0 ± 6.13
F:SWI (1:3)	-40.0 ± 0.59	-38.4 ± 0.35	-35.7 ± 1.06	-52.2 ± 0.67	-45.9 ± 0.27	-49.2 ± 1.64
F:SWI (1:9)	-50.7 ± 1.06	-51.4 ± 1.38	-45.2 ± 0.30	-55.6 ± 17.10	-64.6 ± 2.89	-54.7 ± 1.15
F:SWI (1:15)	-31.5 ± 1.00	-40.6 ± 0.29	-33.8 ± 0.92	-45.1 ± 3.10	-61.7 ± 3.20	-48.7 ± 7.46
F:SWI (1:19)	-50.2 ± 1.30	-48.8 ± 1.45	-41.7 ± 1.07	-48.0 ± 5.72	-71.3 ± 2.30	-41.2 ± 8.94
F:SWI (1:29)	-35.7 ± 0.66	-28.3 ± 1.78	-34.0 ± 0.47	-38.1 ± 2.94	-75.9 ± 8.09	-60.3 ± 3.55

zeta potential (หน่วย mV) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมินต่อขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค และประจุที่ผิวอนุภาค ด้วยความเข้มข้นของ hyaluronic acid 0.05% และเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน F:SWI (1:29) เนื่องจากสภาวะดังกล่าวอนุภาคอยู่ในช่วง 200-400 nm พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน (2-6 mM) ทำให้ขนาดอนุภาคของนาโนพาร์ทิเคิลมีแนวโน้มเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 6) เกิดจากปริมาณของสารสำคัญจากสมุนไพรที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์มากขึ้น (Budhian, Siegel, & Winey, 2007) จึงช่วยลดการยึดเกาะกันเองของพอลิเมอร์ในแต่ละอนุภาค ส่งผลให้อนุภาคของนาโนพาร์ทิเคิลมีขนาดเล็กลง และเมื่อพิจารณาประจุที่ผิวอนุภาค พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมิน ทำให้ประจุที่ผิวอนุภาคมีแนวโน้มลดลง โดยสังเกตเห็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ชัดเจนเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 4 mM ไปเป็น 6 mM (ตาราง 7) อาจเป็นเพราะหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) บนโครงสร้างของ hyaluronic acid ถูกใช้ในการเชื่อมต่อกับปฏิกิริยาทางเคมีมากขึ้น (Wu, Liu, Wang, & Huang, 2012) ทำให้เหลือหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) อิสระน้อยลง จึงทำให้ค่าประจุที่ผิวอนุภาคติดลบน้อยลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเคอร์ซีตินและเคอร์คูมิน

ตาราง 6 ผลของความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมินต่อขนาดอนุภาค และการกระจายของขนาดอนุภาค (ที่ความเข้มข้น hyaluronic acid คงที่ 0.05%)

	ความเข้มข้นของ Quercetin (mM)			ความเข้มข้นของ Curcumin (mM)		
	2	4	6	2	4	6
F:SWI	411.0 ± 22.57*	362.9 ± 39.86*	292.9 ± 11.25*	317.9 ± 32.60**	257.0 ± 9.29**	215.5 ± 1.56**
(1:29)	(0.454)	(0.427)	(0.441)	(0.570)	(0.397)	(0.323)

ขนาดอนุภาค (หน่วย nm) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวเลขในวงเล็บแสดงการกระจายของขนาดอนุภาค

\*แสดงการทดสอบทางสถิติ (\* $p = 0.005$ , \*\* $p = 0.002$ )

ตาราง 7 ผลของความเข้มข้นของเคอร์ซีตินหรือเคอร์คูมินต่อ zeta potential (ที่ความเข้มข้น hyaluronic acid คงที่ 0.05%)

	ความเข้มข้นของ Quercetin (mM)			ความเข้มข้นของ Curcumin (mM)		
	2	4	6	2	4	6
F:SWI	-31.0 ± 1.80	-35.7 ± 2.00*	-23.6 ± 1.60*	-40.4 ± 2.02	-39.7 ± 1.01**	-34.3 ± 1.14**
(1:29)						

zeta potential (หน่วย mV) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

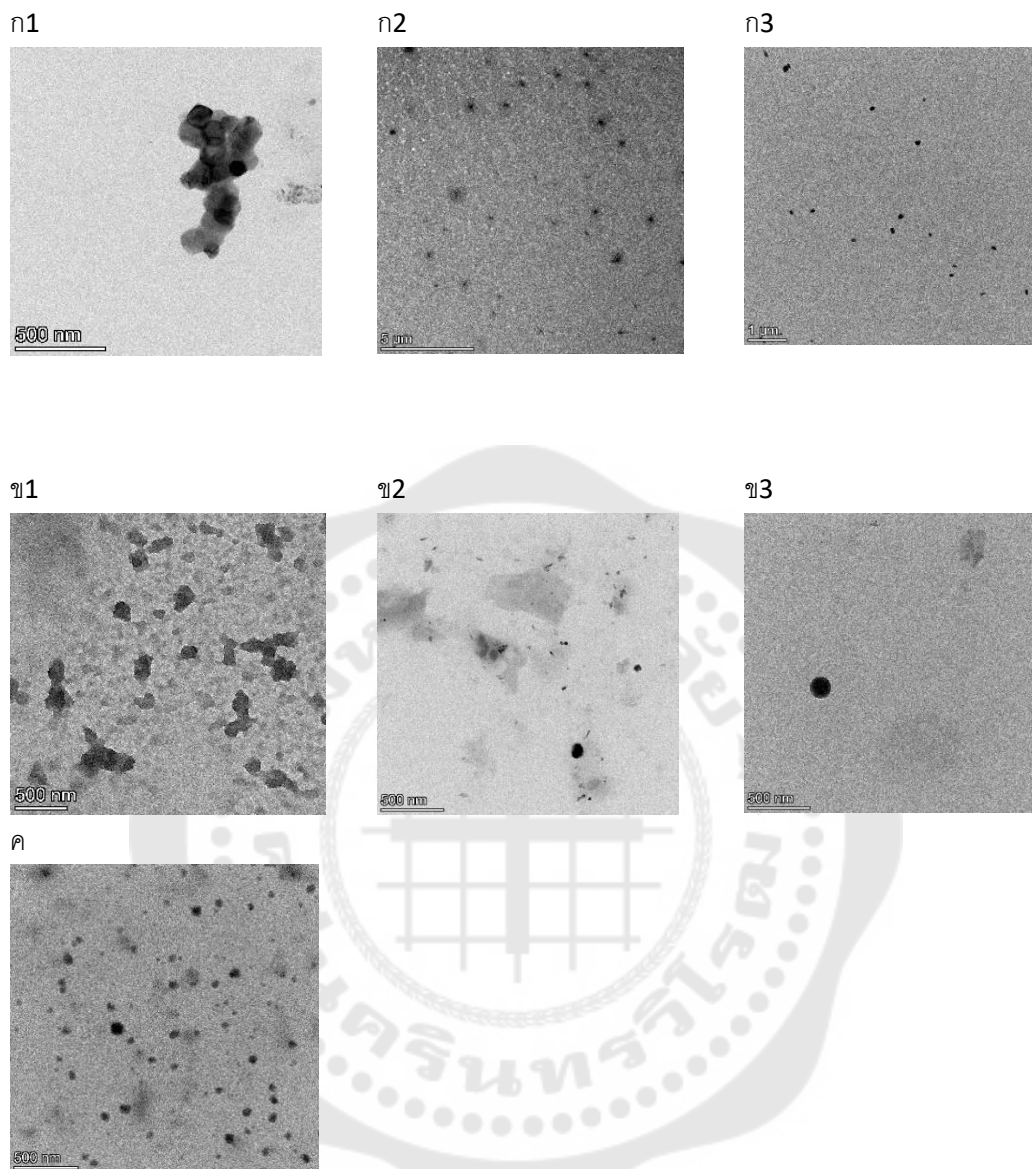
\*แสดงการทดสอบทางสถิติ (\* $p = 0.001$ , \*\* $p = 0.004$ )

ขนาดอนุภาคของนาโนพาร์ติเคิลขึ้นกับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรที่เปลี่ยนแปลง การทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารสำคัญทำให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกับสายพอลิเมอร์มากขึ้น (Budhian et al., 2007) จึงเกิดการฟอร์มเป็นนาโนพาร์ติเคิลจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้อนุภาคของนาโนพาร์ติเคิลมีขนาดเล็กลง (Wu et al., 2012) ดังนั้นขนาดอนุภาคที่เล็กลงจากการเพิ่มความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพร อาจส่งผลให้มีจำนวนอนุภาคที่บรรจุสารสำคัญมากขึ้น และมีขนาดที่เหมาะสมทำให้นาโนพาร์ติเคิลมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้

## 1.2 ลักษณะรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิล

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า hyaluronic acid-quercetin (HA-QT) conjugate และ hyaluronic acid-curcumin (HA-Cur) conjugate ที่ความเข้มข้น 2 mM นาโนพาร์ทิเคิลเกิดการเกาะกลุ่มกัน ทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ (ภาพประกอบ 8 ก1 และ ข1) เมื่อความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรเพิ่มขึ้นเป็น 4 และ 6 mM พบว่าแต่ละอนุภาคมีการกระจายตัวอย่างอิสระมากขึ้น ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง และรูปร่างมีลักษณะเป็นทรงกลมมากขึ้น ตามลำดับ (ภาพประกอบ 8 ก2-ก3 และ ข2-ข3) โดยลักษณะการก่อตัวของนาโนพาร์ทิเคิลเป็นทรงกลม เกิดจากโครงสร้างของนาโนพาร์ทิเคิลที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่างส่วนที่ชอบน้ำ คือ hyaluronic acid และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ คือ สารสำคัญจากสมุนไพร (quercetin หรือ curcumin) จึงเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อตัวเป็นทรงกลม โดยมีสารสำคัญจากสมุนไพรอยู่บริเวณด้านใน และถูกล้อมรอบด้วย hyaluronic acid ที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำได้ (Manju & Sreenivasan, 2011) และเมื่อพิจารณา ลักษณะรูปร่างนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่บรรจุสารสำคัญ พบว่า อนุภาคมีลักษณะค่อนข้างกลม และแต่ละอนุภาคมีขนาดที่แตกต่างกัน ทำให้มีค่าการกระจายของขนาดอนุภาคสูง (ภาพประกอบ 8 ค) ซึ่งภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน มีความสอดคล้องกับข้อมูลขนาดอนุภาค และการกระจายของขนาดอนุภาคที่วัดได้จากเครื่อง particle size analyzer (ตาราง 6)

จากลักษณะการก่อตัวของนาโนพาร์ทิเคิลที่มีการกักเก็บสารสำคัญไว้บริเวณด้านใน จะช่วยเพิ่มความสามารถในการบรรจุและนำส่งสารสำคัญจากสมุนไพรซึ่งส่วนใหญ่ละลายน้ำได้น้อย ให้เข้าสู่ร่างกายได้มากขึ้น (Pang et al., 2014) นอกจากนี้จะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ และเพิ่มความคงสภาพของสารสำคัญ (Manju & Sreenivasan, 2011) ส่งผลให้สารสำคัญจากสมุนไพรมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากขึ้น



ภาพประกอบ 8 ลักษณะรูปร่างของนาโนพาร์ทิเคิลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน  
 (ก1) HA-QT 2 mM (ก2) HA-QT 4 mM (ก3) HA-QT 6 mM (ข1) HA-Cur 2 mM (ข2) HA-Cur 4  
 mM (ข3) HA-Cur 6 mM (ค) Blank solution

### 1.3 ประสิทธิภาพการกักเก็บ

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรร ต่อประสิทธิภาพการกักเก็บ โดยศึกษาความสามารถในการบรรจุยา (Drug loading capacity, DLC) และประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยา (Drug conjugation efficiency, DCE) โดยวิธีทางอ้อม (Indirect method) พบว่า ประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยาของ quercetin เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ quercetin เพิ่มขึ้นจนถึง 4 mM จากนั้นประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยาของ quercetin จะลดลง (ตาราง 8) แต่ประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยาของ curcumin เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อความเข้มข้นของ curcumin เพิ่มขึ้น (ตาราง 9) และเมื่อพิจารณาความสามารถในการบรรจุยา พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรร มีผลทำให้ความสามารถในการบรรจุยาเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ตาราง 8-9) เนื่องจากปริมาณสารสำคัญจากสมุนไพรรที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีโอกาสเกิดการเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์มากขึ้น (Budhian et al., 2007) ส่งผลให้ความสามารถในการบรรจุยาซึ่งเป็นค่าที่สะท้อนอัตราส่วนระหว่างมวลของสารสำคัญจากสมุนไพรรต่อนานาโนพาร์ทิเคิลมีค่าสูงขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของสารสำคัญจากสมุนไพรร พบว่า curcumin มีประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยาและความสามารถในการบรรจุยาสูงกว่า quercetin (ตาราง 8-9) อาจเกิดจากตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) บนโครงสร้างของ curcumin ที่เข้าทำปฏิกิริยากับพอลิเมอร์ (Manju & Sreenivasan, 2011) มีความเกะกะ (steric effect) น้อยกว่า ทำให้มีโอกาสเกิดการเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์มากกว่า จึงมีประสิทธิภาพการกักเก็บสูง

ความสามารถในการบรรจุยา (Drug loading capacity) และประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยา (drug conjugation efficiency) เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการพัฒนานาโนพาร์ทิเคิล โดยความเข้มข้นของสารสำคัญ และความเข้มข้นของพอลิเมอร์ เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อพารามิเตอร์ดังกล่าว (Dora, Singh, Kumar, Datusalia, & Deep, 2010) ดังนั้นการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลให้มีประสิทธิภาพการกักเก็บที่สูงนั้น จำเป็นต้องเลือกใช้สัดส่วนของสารสำคัญและพอลิเมอร์ในปริมาณที่เหมาะสม

ตาราง 8 ผลของความเข้มข้นของเคอร์ซีตินต่อประสิทธิภาพการกักเก็บ

สารตัวอย่าง F:SWI (1:29)	% Drug conjugation efficiency	% Drug loading capacity
ความเข้มข้น ของ Quercetin	2 mM	66.35
	4 mM	78.54
	6 mM	70.55



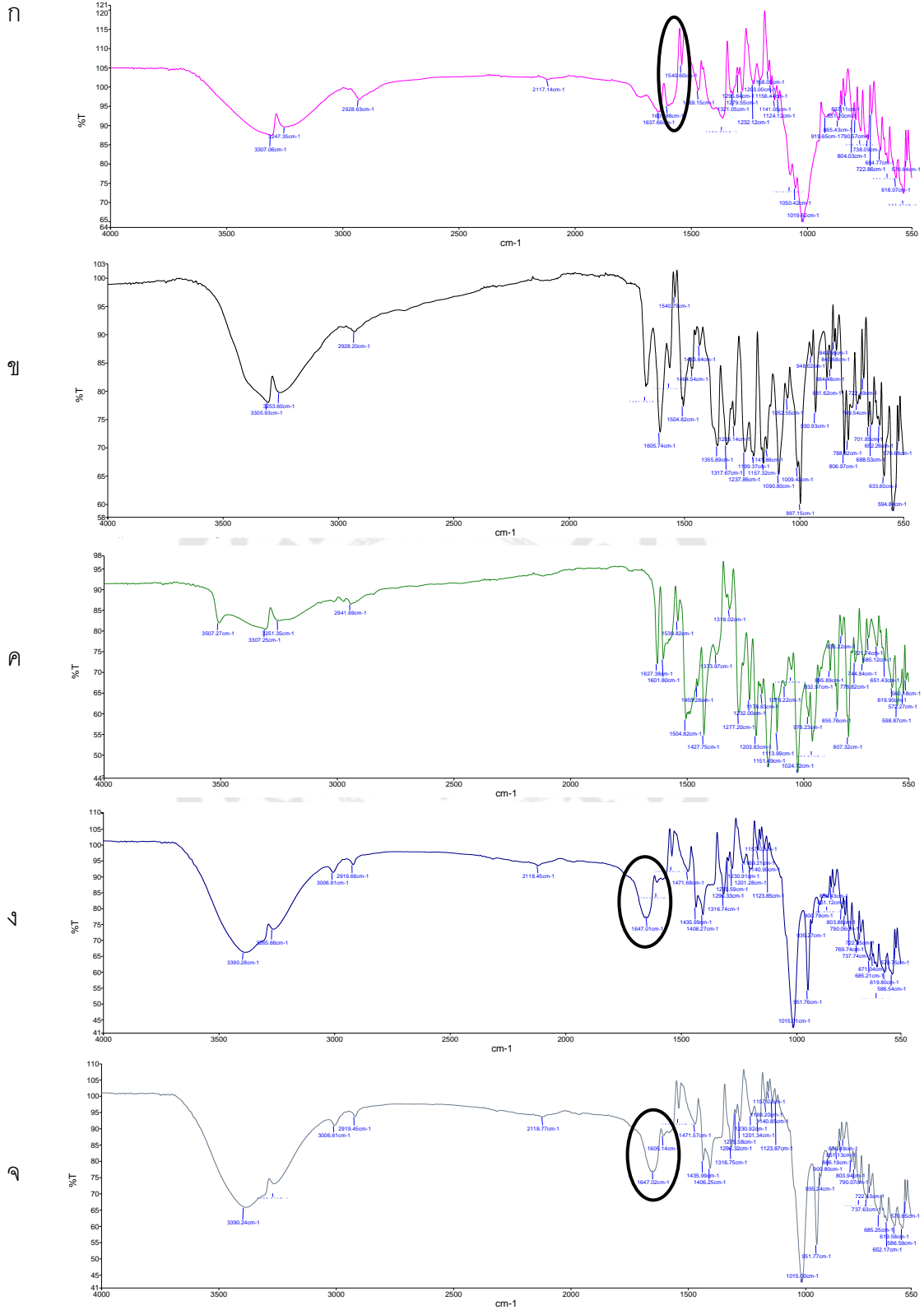
ตาราง 9 ผลของความเข้มข้นของเคอร์คูมินต่อประสิทธิภาพการกักเก็บ

สารตัวอย่าง F:SWI (1:29)	% Drug conjugation efficiency	% Drug loading capacity
ความเข้มข้นของ Curcumin	2 mM	69.16
	4 mM	70.53
	6 mM	71.72

#### 1.4 การเกิดอันตรกิริยาของหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ สารสำคัญจากสมุนไพร และนาโนพาร์ทิเคิล

จากการศึกษาอันตรกิริยาของหมู่ฟังก์ชันโดยใช้เทคนิคของ Fourier-transform infrared spectroscopy เพื่อทำให้เกิดการสั่นของโมเลกุล และทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น (wave number) แตกต่างกันไปพบว่า FT-IR spectrum ของ hyaluronic acid (ภาพประกอบ 9ก) เกิดพีคกว้างในช่วง  $3570-3200\text{ cm}^{-1}$  จาก O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และพีคในช่วง  $1610-1550\text{ cm}^{-1}$  จาก C-O stretching ของคาร์บอกซิเลต แอนไอออน (-COO<sup>-</sup>) (Nandiyanto, Oktiani, & Ragadhita, 2019) และเมื่อเปรียบเทียบ FT-IR spectrum ของนาโนพาร์ทิเคิล ได้แก่ hyaluronic acid-quercetin (HA-QT) conjugate (ภาพประกอบ 9ง) และ hyaluronic acid-curcumin (HA-Cur) conjugate (ภาพประกอบ 9จ) พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยพีคในช่วง  $1610-1550\text{ cm}^{-1}$  เกือบจะหายไปเมื่อมีการเชื่อมต่อทางเคมีระหว่างพอลิเมอร์และสารสำคัญจากสมุนไพร และปรากฏพีคเด่นชัดที่  $1647\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งอยู่ในช่วงการสั่นของพันธะเอสเทอร์ (-COOR) (Pang et al., 2014) จึงสามารถยืนยันได้ว่าบริเวณคาร์บอกซิเลต แอนไอออนเป็นบริเวณที่ใช้ในการเชื่อมต่อทางเคมี โดยนาโนพาร์ทิเคิลเกิดขึ้นจากการเชื่อมต่อระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) บนโครงสร้างของ hyaluronic acid และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) บนโครงสร้างของ quercetin หรือ curcumin ผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

FT-IR spectrum ช่วยยืนยันการเชื่อมต่อทางเคมีระหว่างพอลิเมอร์และสารสำคัญจากสมุนไพรของนาโนพาร์ทิเคิลที่พัฒนาขึ้น การเชื่อมต่อด้วยพันธะเอสเทอร์ซึ่งเป็นพันธะที่ถูกสลายได้ด้วยเอนไซม์ esterase ที่พบภายในเซลล์ (Dong, Pang, Cong, Shen, & Yu, 2019) มีข้อดีทำให้สารสำคัญจากสมุนไพรไม่ถูกเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์อย่างถาวร แต่สามารถถูกปลดปล่อยให้อยู่ในรูปอิสระและออกฤทธิ์ได้เมื่อพันธะเอสเทอร์ถูกทำลาย



ภาพประกอบ 9 FT-IR spectrum ของ (ก) Hyaluronic acid, (ข) Quercetin, (ค) Curcumin, (ง) HA-QT conjugate, (ฉ) HA-Cur conjugate

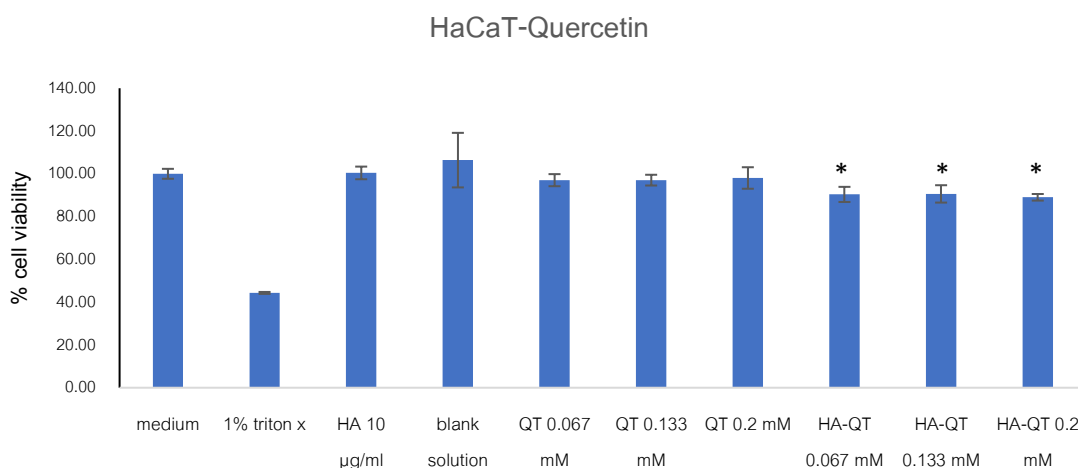
## 2. การรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง (cell viability)

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างสารสำคัญจากสมุนไพร ได้แก่ quercetin และ curcumin และสารสำคัญทั้งสองในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิล โดยใช้ HaCaT cells เป็นตัวแทนของเซลล์ปกติ และ CaCO-2 cells เป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็ง พบว่า สารสำคัญจากสมุนไพรที่อยู่ในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิล มีแนวโน้มเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารสำคัญจากสมุนไพรอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยจากการทดสอบทางสถิติ 12 ชุดการทดสอบ พบเพียง 4 ชุดการทดสอบที่สารสำคัญจากสมุนไพรในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิลเกิดความเป็นพิษไม่แตกต่างกับสารสำคัญจากสมุนไพรอิสระ ได้แก่ CaCO2-quercetin 0.067 mM, HaCaT-curcumin 0.067 mM และ 0.2 mM และ CaCO2-curcumin 0.067 mM โดยความเป็นพิษที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากผลของ hyaluronic acid หรือสารอื่น ๆ ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่างพอลิเมอร์และสารสำคัญจากสมุนไพร ซึ่งยืนยันได้จากผลของ HA solution และ blank solution ที่เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูง (ภาพประกอบ 10-13) ดังนั้น ความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นผลมาจากนาโนพาร์ทิเคิลที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมต่อกับปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งอาจเกิดจากการพัฒนาอายุให้อยู่ในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดเล็ก จะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น (Yadav et al., 2022) ทำให้ภายในเซลล์มีความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรสูงขึ้น จึงเกิดความเป็นพิษมากกว่า quercetin และ curcumin อิสระที่ละลายน้ำได้ยากและเข้าสู่เซลล์ได้น้อย

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรที่อยู่ในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ quercetin และ curcumin ที่อยู่ในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิล โดยมีความเข้มข้นของสารละลายรวมเทียบเท่าสารสำคัญอิสระ 0.067, 0.133 และ 0.2 mM ส่งผลให้ CaCO-2 cells มีอัตราการรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) (ภาพประกอบ 11 และ 13) และระดับความเข้มข้นของ quercetin ที่อยู่ในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิล ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อ CaCO-2 cells แบบ concentration dependent (ภาพประกอบ 11) แต่เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นต่ออัตราการรอดชีวิตของ HaCaT cells พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ quercetin ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 10) และถึงแม้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ curcumin จะส่งผลให้ HaCaT cells มีอัตราการรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) แต่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยังคงมากกว่า 80% ในทุกความเข้มข้น (ภาพประกอบ 12) ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรที่อยู่ในรูปแบบนาโนพาร์ทิเคิลจึงส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อ CaCO-2 cells เท่านั้น ไม่ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อ HaCaT cells

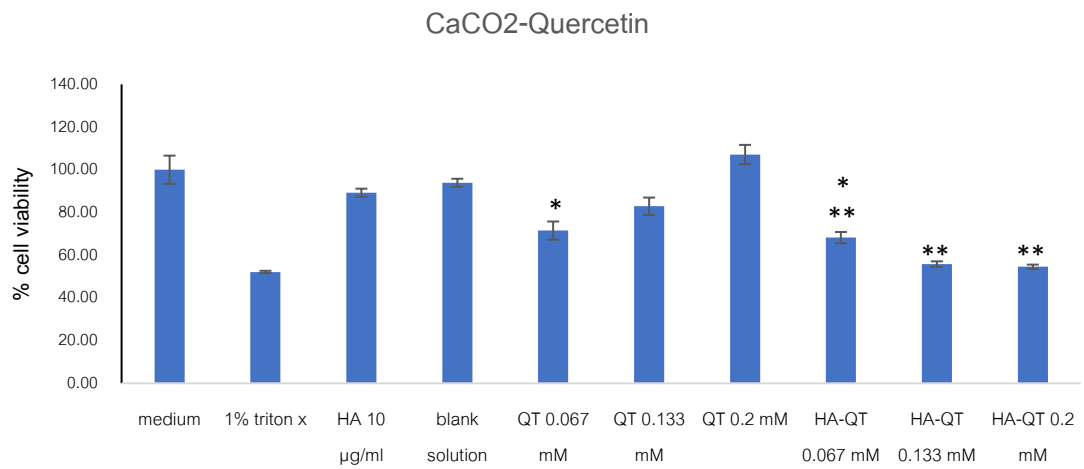
เมื่อเปรียบเทียบชนิดของเซลล์ที่นำมาทดสอบ พบว่า CaCO-2 cells จะมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า HaCaT cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกการทดสอบ ( $p < 0.001$ ) ซึ่งอาจเกิดจาก hyaluronic acid ที่ใช้เป็นพอลิเมอร์ในการเชื่อมต้อมีความจำเพาะเจาะจงกับ cluster determinant 44 (CD44) ซึ่งเป็นตัวรับที่แสดงออกบนผิวของเซลล์มะเร็งจำนวนมาก (Misra et al., 2011) ดังนั้น HA จึงสามารถนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งผ่านทาง CD44-mediated endocytosis (Oh et al., 2010) ทำให้ CaCO-2 cells ซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็ง เกิดความเป็นพิษมากกว่า HaCaT cells ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ

การพัฒนาอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดเหมาะสม และใช้ hyaluronic acid ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถจับกับตัวรับบนผิวเซลล์มะเร็งได้อย่างจำเพาะ (Misra et al., 2011) จะช่วยให้นาโนพาร์ทิเคิลที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะในการนำส่งยาแบบมุ่งเป้าเข้าสู่เซลล์มะเร็ง ซึ่งช่วยลดผลข้างเคียงต่อเนื้อเยื่อปกติ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งมากขึ้น (V. Jain et al., 2015)



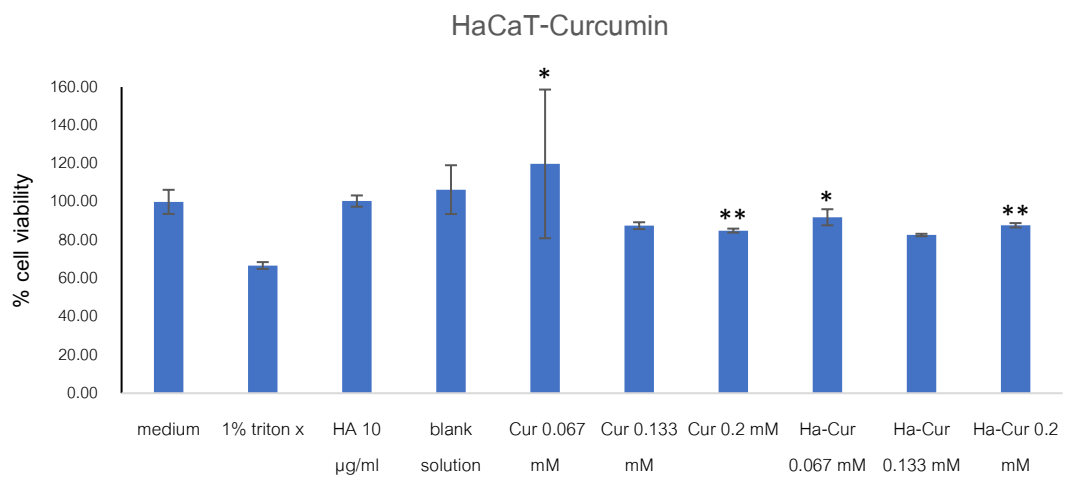
ภาพประกอบ 10 อัตราการรอดชีวิตของ HaCaT cells เมื่อทดสอบด้วย quercetin

\*แสดงการทดสอบทางสถิติ ( $*p = 0.664$ )



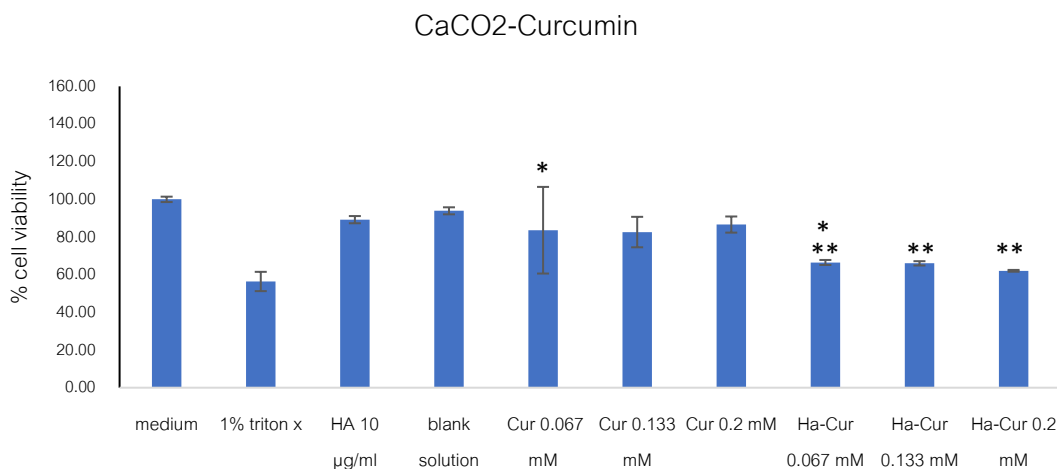
ภาพประกอบ 11 อัตราการรอดชีวิตของ CaCO<sub>2</sub> cells เมื่อทดสอบด้วย quercetin

\*แสดงการทดสอบทางสถิติ (\* $p = 0.138$ , \*\* $p < 0.001$ )



ภาพประกอบ 12 อัตราการรอดชีวิตของ HaCaT cells เมื่อทดสอบด้วย curcumin

\*แสดงการทดสอบทางสถิติ (\* $p = 0.066$ , \*\* $p = 0.842$ )



ภาพประกอบ 13 อัตราการรอดชีวิตของ CaCO<sub>2</sub> cells เมื่อทดสอบด้วย curcumin  
\*แสดงการทดสอบทางสถิติ (\* $p = 0.128$ , \*\* $p < 0.001$ )

### 3. ประสิทธิภาพการปลดปล่อย

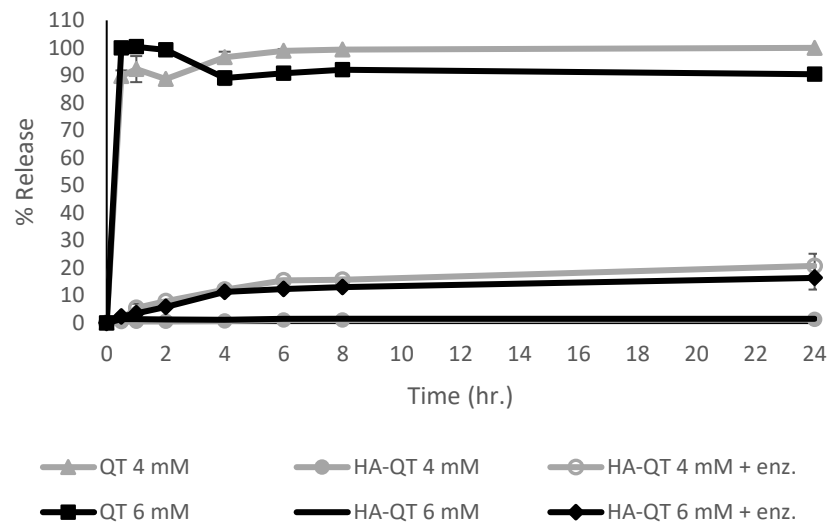
จากการศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยยาออกจากรานาโนพาร์ติเคิล โดยทำการศึกษาที่ pH 7.4 และ pH 5.5 เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ และสภาวะที่มีเอนไซม์ esterase (1 U/mL) พบว่า สภาวะที่มีเอนไซม์ esterase สารสำคัญจากสมุนไพรจะถูกปลดปล่อยออกมาจากรานาโนพาร์ติเคิลได้มากกว่าสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ (ภาพประกอบ 14-17) เกิดจากเอนไซม์ esterase สามารถทำลายพันธะเอสเทอร์ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อมต่อระหว่างพอลิเมอร์และสารสำคัญจากสมุนไพร (Dong et al., 2019) ทำให้สารสำคัญจากสมุนไพรถูกปลดปล่อยออกมาจากรานาโนพาร์ติเคิลได้

เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรต่อประสิทธิภาพการปลดปล่อยยา พบว่า HA-QT 4 mM + enz. มีการปลดปล่อยยามากกว่า HA-QT 6 mM + enz. (ภาพประกอบ 14-15) เนื่องจากที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใส่เท่ากันจึงสามารถทำให้ quercetin ปลดปล่อยออกจากรานาโนพาร์ติเคิลได้ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ quercetin ตั้งต้นจึงมีเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยมากกว่า นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลของ pH พบว่า pH ที่แตกต่างกันไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการปลดปล่อยยา (ภาพประกอบ 14-17) ดังนั้นเอนไซม์ esterase จึงเป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมการปลดปล่อยยาออกจากรานาโนพาร์ติเคิล

แม้มีรายงานถึงชนิดและปริมาณ เอนไซม์ esterase ที่พบในเลือด เช่น butyrylcholinesterase (3,600 U/L), acetylcholinesterase (20.8 U/L) (Li et al., 2005) ที่มีปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์ esterase ภายในเซลล์มะเร็ง (0.45 U/L) (Dong et

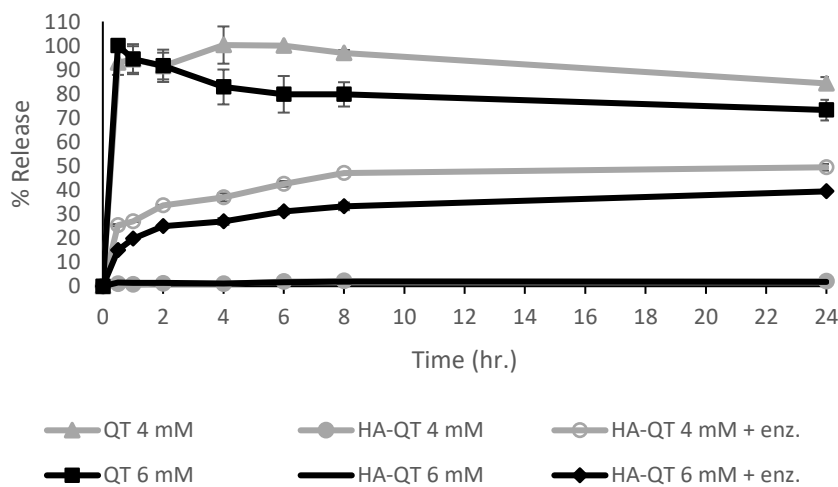
al., 2019) แต่จากงานวิจัยหลายฉบับที่พัฒนาระบบนำส่งยาแบบพอลิเมอร์นาโนพาร์ทิเคิลโดยทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันผ่านพันธะเอสเทอร์ เพื่อนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง ได้แสดงให้เห็นว่าการนำส่งยารูปแบบนาโนพาร์ทิเคิลยังคงมีประโยชน์ เนื่องจากทำให้ยามีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดสูงกว่ายาในรูปอิสระ และมีปริมาณยาเหลือเพียงพอในการนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็ง และส่งผลยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (Pang et al., 2014) (Wei, Senanayake, Bohling, & Vinogradov, 2014)

### Quercetin pH 5.5

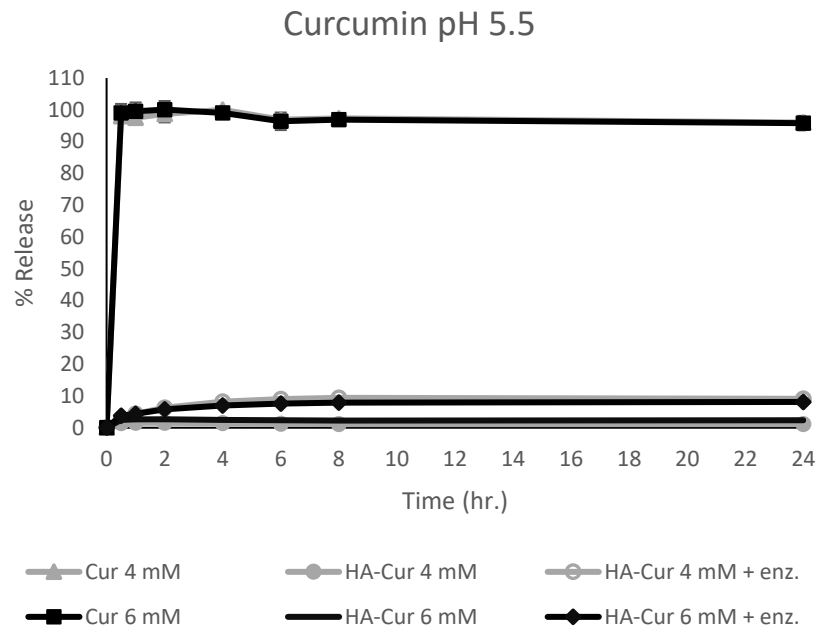


ภาพประกอบ 14 อัตราการปลดปล่อยของ quercetin ที่ pH 5.5

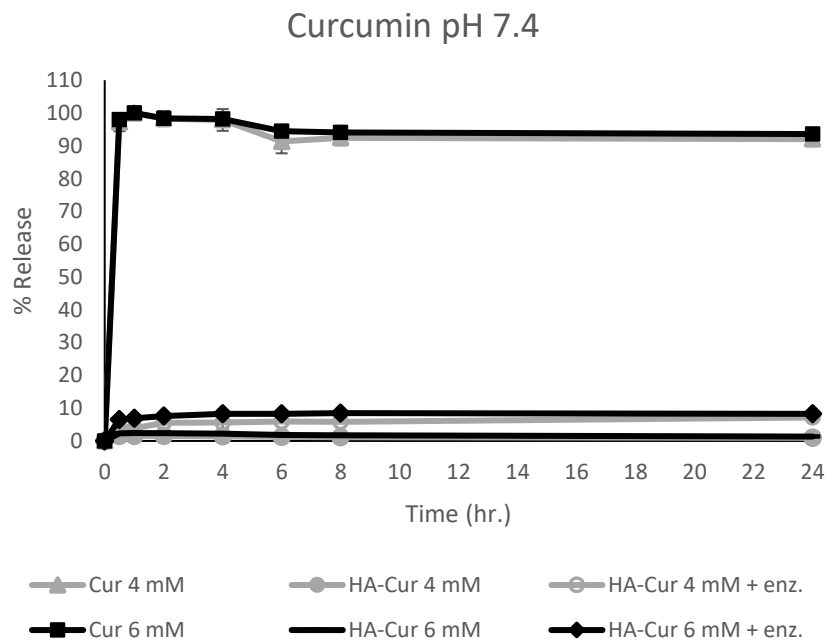
### Quercetin pH 7.4



ภาพประกอบ 15 อัตราการปลดปล่อยของ quercetin ที่ pH 7.4



ภาพประกอบ 16 อัตราการปลดปล่อยของ curcumin ที่ pH 5.5



ภาพประกอบ 17 อัตราการปลดปล่อยของ curcumin ที่ pH 7.4



## บทที่ 5

### ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ

การนำพอลิเมอร์มาเชื่อมต่อกับสารสำคัญจากสมุนไพรได้แก่ quercetin และ curcumin ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีสามารถพัฒนานาโนพาร์ทิเคิลเพื่อการนำส่งยาได้ โดยความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพร จะส่งผลต่อขนาดอนุภาคของนาโนพาร์ทิเคิล ชนิดและความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพร จะส่งผลต่อความสามารถในการบรรจุยา (drug loading capacity) และประสิทธิภาพการเชื่อมต่อยา (drug conjugation efficiency) โดยการปลดปล่อยยาออกจากนาโนพาร์ทิเคิลขึ้นกับเอนไซม์ esterase เพื่อให้ยาอยู่ในรูปอิสระและออกฤทธิ์ได้ การปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์จากสูตรตำรับให้เหมาะสม จะทำให้ได้นาโนพาร์ทิเคิลที่มีสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมในการนำส่งยาเพื่อการทำลายเซลล์มะเร็ง การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยนาโนพาร์ทิเคิลจาก quercetin และ curcumin ทำให้เกิดความเชื่อว่าเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารสำคัญจากสมุนไพรอิสระ โดยมีประสิทธิภาพและความจำเพาะในการทำลายเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ

#### ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาชนิดของพอลิเมอร์เพิ่มเติม เพื่อขยายผลการศึกษาในการนำมาใช้เพื่อนำส่งยาแบบมุ่งเป้าสำหรับเซลล์มะเร็ง
2. เพิ่มระยะเวลาในการทดสอบการปลดปล่อยด้วยยาสำคัญ เพื่อศึกษาระยะเวลาที่ยาจะถูกปลดปล่อยออกมาจากพอลิเมอร์จนหมด
3. ศึกษาความคงสภาพของนาโนพาร์ทิเคิลที่ได้จากการเชื่อมต่อด้วยปฏิกิริยาทางเคมี เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปพัฒนาต่อยอด

## บรรณานุกรม

- Arpicco, S., Lerda, C., Dalla Pozza, E., Costanzo, C., Tsapis, N., Stella, B., . . . Palmieri, M. (2013). Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3, Part A), 373-380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.003>
- Bischoff, S. C. (2008). Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(6). Retrieved from [https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2008/11000/Quercetin\\_potentials\\_in\\_the\\_prevention\\_and.10.aspx](https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2008/11000/Quercetin_potentials_in_the_prevention_and.10.aspx)
- Boholm, M., & Arvidsson, R. (2016). A Definition Framework for the Terms Nanomaterial and Nanoparticle. *NanoEthics*, 10(1), 25-40. doi:10.1007/s11569-015-0249-7
- Budhian, A., Siegel, S. J., & Winey, K. I. (2007). Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *Int J Pharm*, 336(2), 367-375. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.061. (Accession No. 17207944)
- Choi, K. Y., Min, K. H., Na, J., Choi, K., Kim, K., Park, J., . . . Jeong, S. (2009). Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: Synthesis, characterization, and in vivo biodistribution. *Journal of Materials Chemistry*, 19, 4101-4107. doi:10.1039/b900456d
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., . . . Dell'Agli, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of inflammation*, 2017, 7435621-7435621. doi:10.1155/2017/7435621. (Accession No. 29391667)
- Dadwal, A., Baldi, A., & Kumar Narang, R. (2018). Nanoparticles as carriers for drug delivery in cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup2), 295-305. doi:10.1080/21691401.2018.1457039
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International journal of nanomedicine*, 3(2), 133-149. doi:10.2147/ijn.s596. (Accession No. 18686775)

- Din, F. U., Aman, W., Ullah, I., Qureshi, O. S., Mustapha, O., Shafique, S., & Zeb, A. (2017). Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *International journal of nanomedicine*, 12, 7291-7309. doi:10.2147/IJN.S146315. (Accession No. 29042776)
- Dong, H., Pang, L., Cong, H., Shen, Y., & Yu, B. (2019). Application and design of esterase-responsive nanoparticles for cancer therapy. *Drug delivery*, 26(1), 416-432. doi:10.1080/10717544.2019.1588424. (Accession No. 30929527)
- Dora, C. P., Singh, S. K., Kumar, S., Datusalia, A. K., & Deep, A. (2010). Development and characterization of nanoparticles of glibenclamide by solvent displacement method. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 283-290. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20524431/>. (Accession No. 20524431)
- Duo, J., Ying, G. G., Wang, G. W., & Zhang, L. (2012). Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep*, 5(6), 1453-1456. doi:10.3892/mmr.2012.845. (Accession No. 22447039)
- Feng, Q., & Tong, R. (2016). Anticancer nanoparticulate polymer-drug conjugate. *Bioengineering & translational medicine*, 1(3), 277-296. doi:10.1002/btm2.10033. (Accession No. 29313017)
- Girase, M. L., Patil, P. G., & Ige, P. P. (2020). Polymer-drug conjugates as nanomedicine: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69(15), 990-1014. doi:10.1080/00914037.2019.1655745
- Han, M., Song, Y., & Zhang, X. (2016). Quercetin Suppresses the Migration and Invasion in Human Colon Cancer Caco-2 Cells Through Regulating Toll-like Receptor 4/Nuclear Factor-kappa B Pathway. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 2), S237-S244. doi:10.4103/0973-1296.182154. (Accession No. 27279714)
- Huang, G., & Huang, H. (2018). Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *Journal of Controlled Release*, 278, 122-126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.015>
- Jain, A. K., & Thareja, S. (2019). In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 524-539. doi:10.1080/21691401.2018.1561457

- Jain, V., Jain, S., & Mahajan, S. C. (2015). Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment. *Curr Drug Deliv*, 12(2), 177-191. doi:10.2174/1567201811666140822112516. (Accession No. 25146439)
- Ji, J. L., Huang, X. F., & Zhu, H. L. (2012). Curcumin and its formulations: potential anti-cancer agents. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 12(3), 210-218. doi:10.2174/187152012800228733. (Accession No. 22044005)
- Kumar, R., Singh, M., Meena, J., Singhvi, P., Thiagarajan, D., Saneja, A., & Panda, A. K. (2019). Hyaluronic acid - dihydroartemisinin conjugate: Synthesis, characterization and in vitro evaluation in lung cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 495-502. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.124>
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 103-111. doi:10.1007/978-3-319-16104-4\_10. (Accession No. 29787057)
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E. G., Masson, P., & Lockridge, O. (2005). Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol*, 70(11), 1673-1684. doi:10.1016/j.bcp.2005.09.002. (Accession No. 16213467)
- Manju, S., & Sreenivasan, K. (2011). Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. *Journal of colloid and interface science*, 359(1), 318-325. doi:10.1016/j.jcis.2011.03.071. (Accession No. 21492865)
- Masood, F. (2016). Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*, 60, 569-578. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.067>
- Misra, S., Heldin, P., Hascall, V. C., Karamanos, N. K., Skandalis, S. S., Markwald, R. R., & Ghatak, S. (2011). Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *The FEBS journal*, 278(9), 1429-1443. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x. (Accession No. 21362138)
- Nandiyanto, A., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Indonesian Journal of Science and Technology*,

- 4, 97-118. doi:10.17509/ijost.v4i1.15806
- Oh, E. J., Park, K., Kim, K. S., Kim, J., Yang, J. A., Kong, J. H., . . . Hahn, S. K. (2010). Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *J Control Release*, 141(1), 2-12. doi:10.1016/j.jconrel.2009.09.010. (Accession No. 19758573)
- Pang, X., Lu, Z., Du, H., Yang, X., & Zhai, G. (2014). Hyaluronic acid-quercetin conjugate micelles: synthesis, characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 123, 778-786. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.025. (Accession No. 25454664)
- Rao, N. V., Rho, J. G., Um, W., Ek, P. K., Nguyen, V. Q., Oh, B. H., . . . Park, J. H. (2020). Hyaluronic Acid Nanoparticles as Nanomedicine for Treatment of Inflammatory Diseases. *Pharmaceutics*, 12(10), 931. doi:10.3390/pharmaceutics12100931. (Accession No. 33003609)
- Rekus, M. T. (2000). Characterization of growth and differentiation of a spontaneously immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) in a defined, serum-free culture system. *Medizinische Fakultät*. Retrieved from <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-2315/315.pdf>
- Sharma, R. A., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1955-1968. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Surchi, H. S., & Alkelany, S. Z. (2019). Chapter 15 - Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. *Biomaterials and Bionanotechnology*, 527-612. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9>
- Silva, F., Cabral Campello, M. P., & Paulo, A. (2021). Radiolabeled Gold Nanoparticles for Imaging and Therapy of Cancer. *Materials*, 14(1). doi:10.3390/ma14010004
- Sriplung, H., Wiangnon, S., Sontipong, S., Sumitsawan, Y., & Martin, N. (2006). Cancer incidence trends in Thailand, 1989-2000. *Asian Pac J Cancer Prev*, 7(2), 239-244. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839216/>. (Accession No. 16839216)

- Suresh, K., & Nangia, A. (2018). Curcumin: pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability [10.1039/C8CE00469B]. *CrystEngComm*, 20(24), 3277-3296. doi:10.1039/C8CE00469B
- Tomeh, M. A., Hadianamrei, R., & Zhao, X. (2019). A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1033. doi:10.3390/ijms20051033. (Accession No. 30818786)
- Vázquez-Iglesias, L., Barcia-Castro, L., Rodríguez-Quiroga, M., Páez de la Cadena, M., Rodríguez-Berrocal, J., & Cordero, O. J. (2019). Surface expression marker profile in colon cancer cell lines and sphere-derived cells suggests complexity in CD26(+) cancer stem cells subsets. *Biology open*, 8(7), bio041673. doi:10.1242/bio.041673. (Accession No. 31285270)
- Wang, H., Khor, T. O., Shu, L., Su, Z.-Y., Fuentes, F., Lee, J.-H., & Kong, A.-N. T. (2012). Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 12(10), 1281-1305. doi:10.2174/187152012803833026. (Accession No. 22583408)
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., & Gao, Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56. doi:10.1016/j.tifs.2016.07.004
- Wei, X., Senanayake, T. H., Bohling, A., & Vinogradov, S. V. (2014). Targeted Nanogel Conjugate for Improved Stability and Cellular Permeability of Curcumin: Synthesis, Pharmacokinetics, and Tumor Growth Inhibition. *Molecular Pharmaceutics*, 11(9), 3112-3122. doi:10.1021/mp500290f
- Wu, J. L., Liu, C. G., Wang, X. L., & Huang, Z. H. (2012). Preparation and characterization of nanoparticles based on histidine-hyaluronic acid conjugates as doxorubicin carriers. *J Mater Sci Mater Med*, 23(8), 1921-1929. doi:10.1007/s10856-012-4665-8. (Accession No. 22580754)
- Yadav, N., Francis, A. P., Priya, V. V., Patil, S., Mustaq, S., Khan, S. S., . . . Rajagopalan, R. (2022). Polysaccharide-Drug Conjugates: A Tool for Enhanced Cancer Therapy. *Polymers*, 14(5). doi:10.3390/polym14050950
- Yoon, H. Y., Kim, H. R., Saravanakumar, G., Heo, R., Chae, S. Y., Um, W., . . . Park, J. H.

(2013). Bioreducible hyaluronic acid conjugates as siRNA carrier for tumor targeting. *Journal of Controlled Release*, 172(3), 653-661.

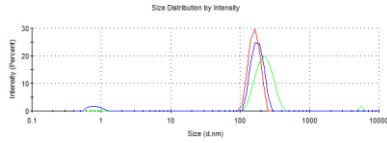
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.008>



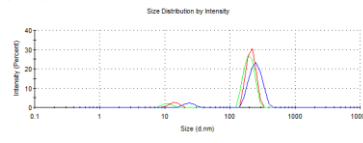




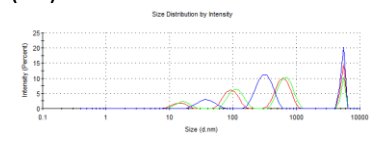
(A1) HA 0.025% No dilute



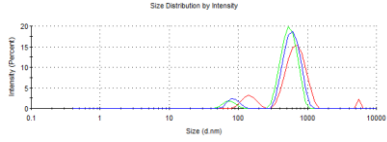
(B1) HA 0.05% No dilute



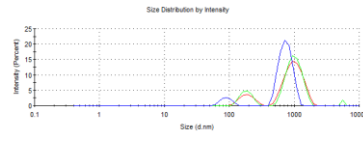
(C1) HA 0.075% No dilute



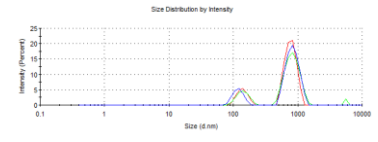
(A2) HA 0.025% F:SWI (1:3)



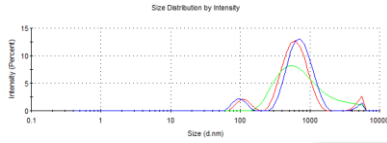
(B2) HA 0.05% F:SWI (1:3)



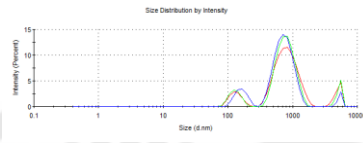
(C2) HA 0.075% F:SWI (1:3)



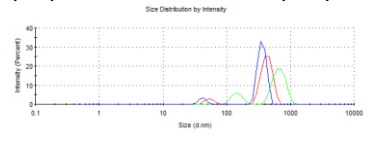
(A3) HA 0.025% F:SWI (1:9)



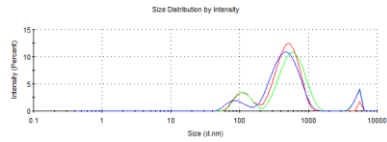
(B3) HA 0.05% F:SWI (1:9)



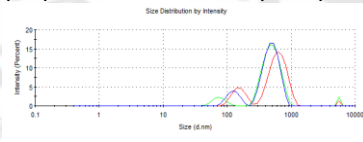
(C3) HA 0.075% F:SWI (1:9)



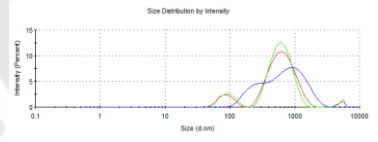
(A4) HA 0.025% F:SWI (1:15)



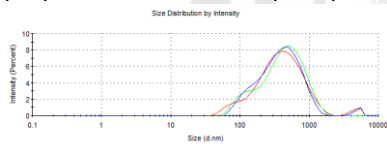
(B4) HA 0.05% F:SWI (1:15)



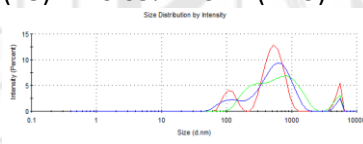
(C4) HA 0.075% F:SWI (1:15)



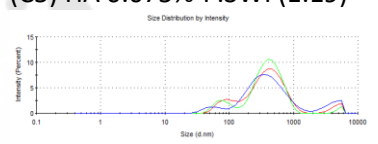
(A5) HA 0.025% F:SWI (1:19)



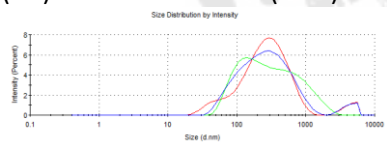
(B5) HA 0.05% F:SWI (1:19)



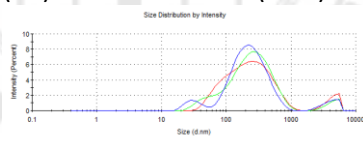
(C5) HA 0.075% F:SWI (1:19)



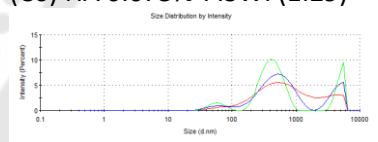
(A6) HA 0.025% F:SWI (1:29)



(B6) HA 0.05% F:SWI (1:29)

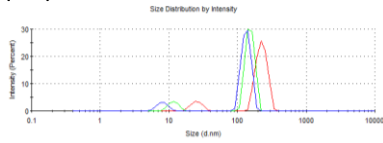


(C6) HA 0.075% F:SWI (1:29)

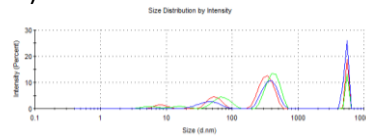


ภาพประกอบ 18 ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค อักษรภาษาอังกฤษแสดงความเข้มข้น  
 ของ hyaluronic acid (A) HA 0.025% (B) HA 0.05% (C) HA 0.075% ตัวเลขแสดงการเจือจาง  
 สูตรตำรับ (1) No dilute (2) F:SWI (1:3) (3) F:SWI (1:9) (4) F:SWI (1:15) (5) F:SWI (1:19) (6)  
 F:SWI (1:29)

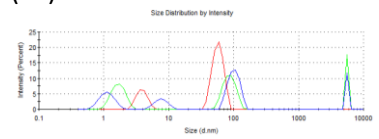
(D1) HA 0.1% No dilute



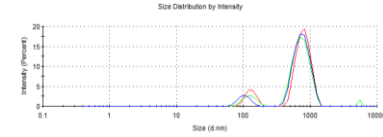
(E1) HA 0.2% No dilute



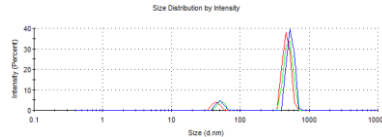
(F1) HA 0.3% No dilute



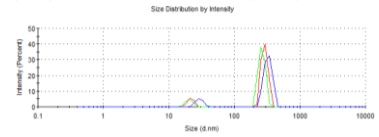
(D2) HA 0.1% F:SWI (1:3)



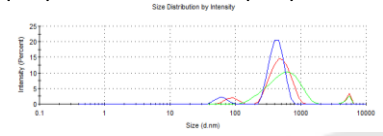
(E2) HA 0.2% F:SWI (1:3)



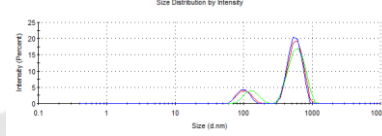
(F2) HA 0.3% F:SWI (1:3)



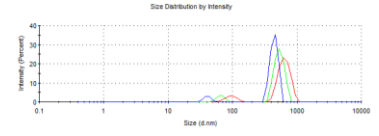
(D3) HA 0.1% F:SWI (1:9)



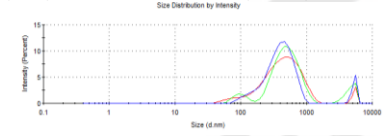
(E3) HA 0.2% F:SWI (1:9)



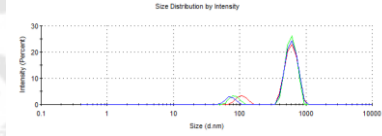
(F3) HA 0.3% F:SWI (1:9)



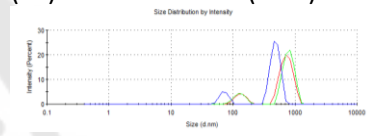
(D4) HA 0.1% F:SWI (1:15)



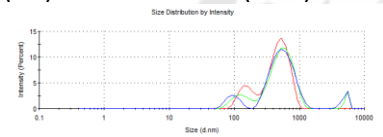
(E4) HA 0.2% F:SWI (1:15)



(F4) HA 0.3% F:SWI (1:15)



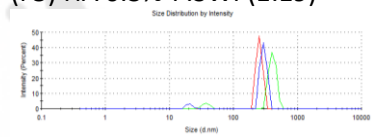
(D5) HA 0.1% F:SWI (1:19)



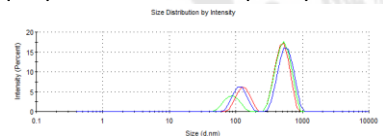
(E5) HA 0.2% F:SWI (1:19)



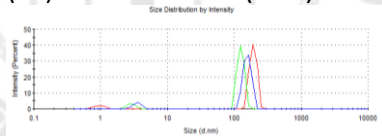
(F5) HA 0.3% F:SWI (1:19)



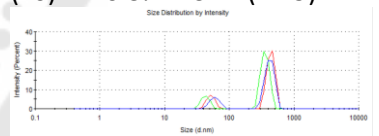
(D6) HA 0.1% F:SWI (1:29)



(E6) HA 0.2% F:SWI (1:29)

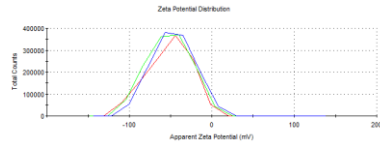


(F6) HA 0.3% F:SWI (1:29)

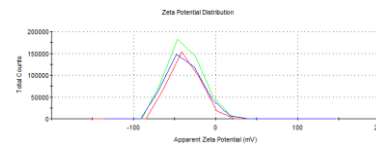


ภาพประกอบ 19 ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค อักษรภาษาอังกฤษแสดงความเข้มข้น  
 ของ hyaluronic acid (D) HA 0.1% (E) HA 0.2% (F) HA 0.3% ตัวเลขแสดงการเจือจางสูตร  
 ต่ำรับ (1) No dilute (2) F:SWI (1:3) (3) F:SWI (1:9) (4) F:SWI (1:15) (5) F:SWI (1:19) (6)  
 F:SWI (1:29)

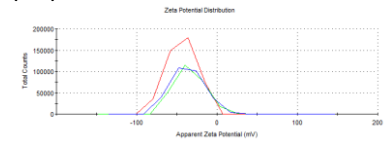
(A1) HA 0.025% No dilute



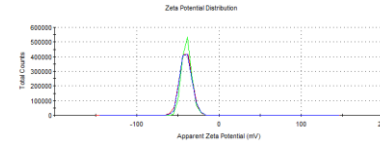
(B1) HA 0.05% No dilute



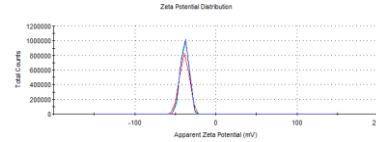
(C1) HA 0.075% No dilute



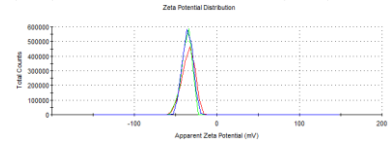
(A2) HA 0.025% F:SWI (1:3)



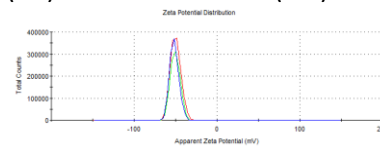
(B2) HA 0.05% F:SWI (1:3)



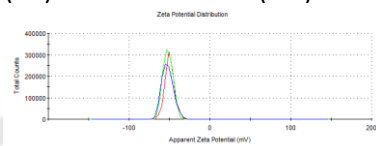
(C2) HA 0.075% F:SWI (1:3)



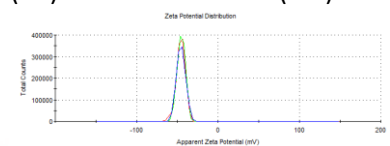
(A3) HA 0.025% F:SWI (1:9)



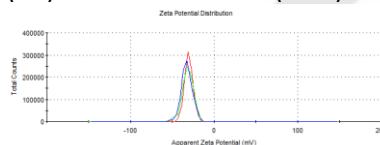
(B3) HA 0.05% F:SWI (1:9)



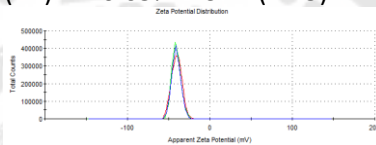
(C3) HA 0.075% F:SWI (1:9)



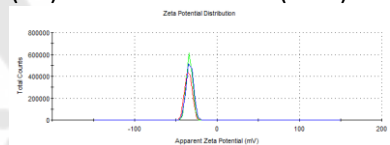
(A4) HA 0.025% F:SWI (1:15)



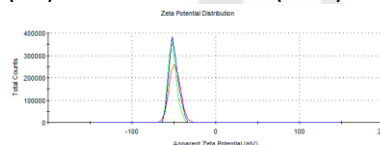
(B4) HA 0.05% F:SWI (1:15)



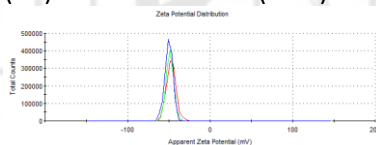
(C4) HA 0.075% F:SWI (1:15)



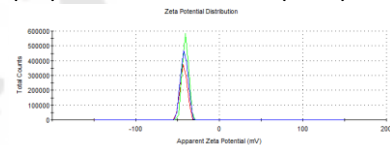
(A5) HA 0.025% F:SWI (1:19)



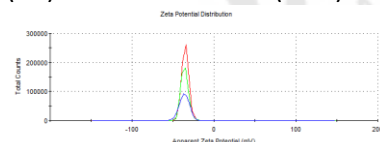
(B5) HA 0.05% F:SWI (1:19)



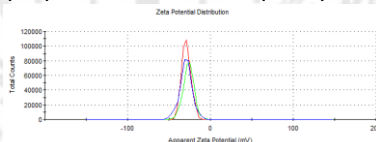
(C5) HA 0.075% F:SWI (1:19)



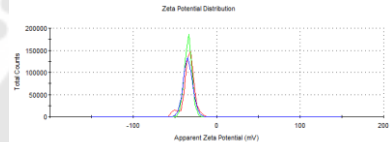
(A6) HA 0.025% F:SWI (1:29)



(B6) HA 0.05% F:SWI (1:29)

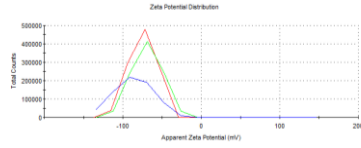


(C6) HA 0.075% F:SWI (1:29)

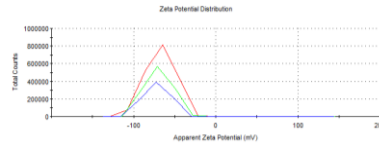


ภาพประกอบ 20 zeta potential อักษรภาษาอังกฤษแสดงความเข้มข้นของ hyaluronic acid (A) HA 0.025% (B) HA 0.05% (C) HA 0.075% ตัวเลขแสดงการเจือจางสูตรตำรับ (1) No dilute (2) F:SWI (1:3) (3) F:SWI (1:9) (4) F:SWI (1:15) (5) F:SWI (1:19) (6) F:SWI (1:29)

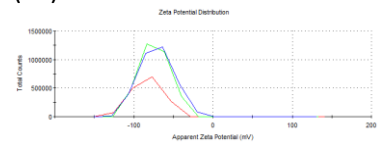
(D1) HA 0.1% No dilute



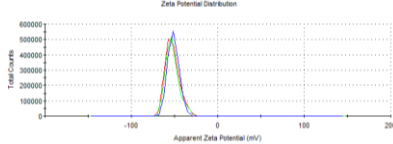
(E1) HA 0.2% No dilute



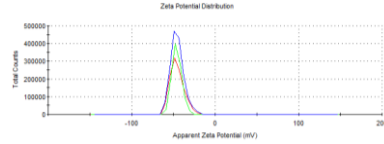
(F1) HA 0.3% No dilute



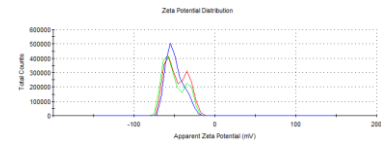
(D2) HA 0.1% F:SWI (1:3)



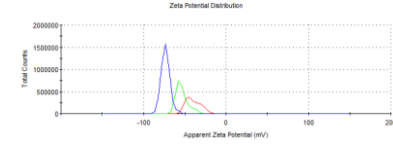
(E2) HA 0.2% F:SWI (1:3)



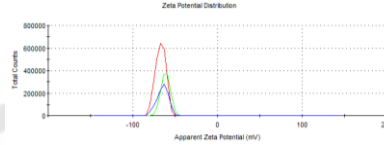
(F2) HA 0.3% F:SWI (1:3)



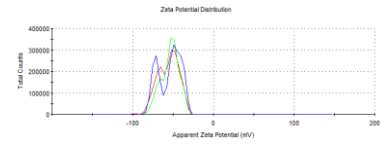
(D3) HA 0.1% F:SWI (1:9)



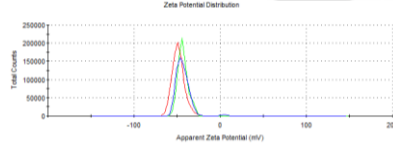
(E3) HA 0.2% F:SWI (1:9)



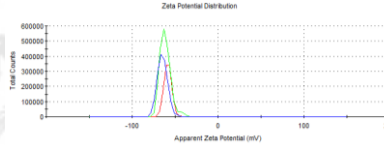
(F3) HA 0.3% F:SWI (1:9)



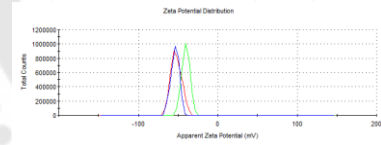
(D4) HA 0.1% F:SWI (1:15)



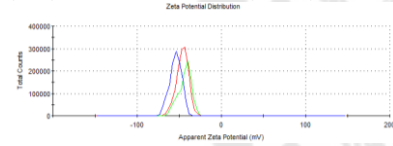
(E4) HA 0.2% F:SWI (1:15)



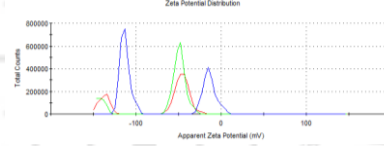
(F4) HA 0.3% F:SWI (1:15)



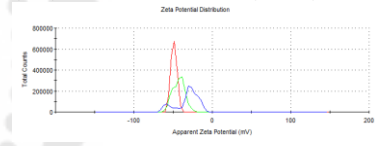
(D5) HA 0.1% F:SWI (1:19)



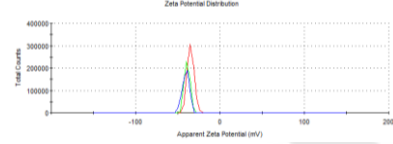
(E5) HA 0.2% F:SWI (1:19)



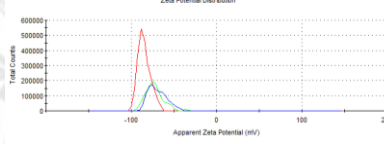
(F5) HA 0.3% F:SWI (1:19)



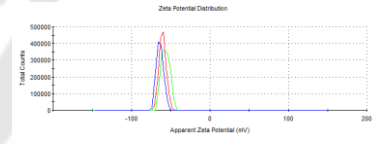
(D6) HA 0.1% F:SWI (1:29)



(E6) HA 0.2% F:SWI (1:29)

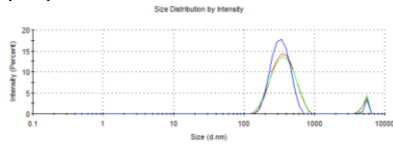


(F6) HA 0.3% F:SWI (1:29)

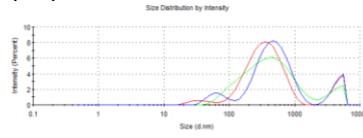


ภาพประกอบ 21 zeta potential อักษรภาษาอังกฤษแสดงความเข้มข้นของ hyaluronic acid (D) HA 0.1% (E) HA 0.2% (F) HA 0.3% ตัวเลขแสดงการเจือจางสูตรตำรับ (1) No dilute (2) F:SWI (1:3) (3) F:SWI (1:9) (4) F:SWI (1:15) (5) F:SWI (1:19) (6) F:SWI (1:29)

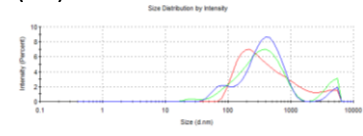
(A1) HA-QT 2 mM



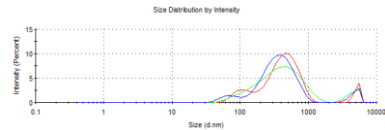
(A2) HA-QT 4 mM



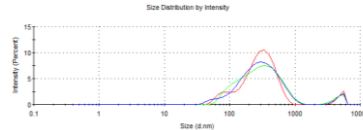
(A3) HA-QT 6 mM



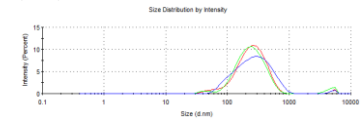
(B1) HA-Cur 2 mM



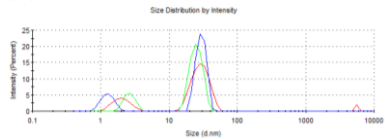
(B2) HA-Cur 4 mM



(B3) HA-Cur 6 mM

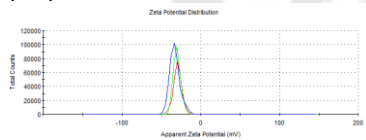


(C) Blank solution

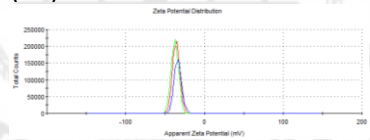


ภาพประกอบ 22 ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค เมื่อเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน F:SWI (1:29) อักษรภาษาอังกฤษแสดงชนิดของสารสำคัญจากสมุนไพรร (A) Quercetin (B) Curcumin (C) ไม่มีสารสำคัญจากสมุนไพรร (Blank solution) ตัวเลขแสดงความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรร (1) 2 mM (2) 4 mM (3) 6 mM

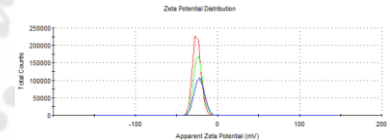
(A1) HA-QT 2 mM



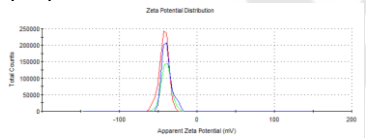
(A2) HA-QT 4 mM



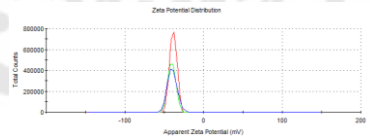
(A3) HA-QT 6 mM



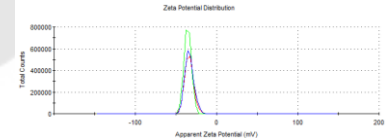
(B1) HA-Cur 2 mM



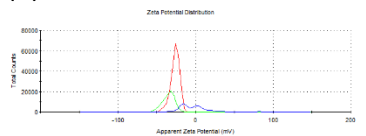
(B2) HA-Cur 4 mM



(B3) HA-Cur 6 mM



(C) Blank solution



ภาพประกอบ 23 zeta potential เมื่อเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน F:SWI (1:29) อักษรภาษาอังกฤษแสดงชนิดของสารสำคัญจากสมุนไพรร (A) Quercetin (B) Curcumin (C) ไม่มีสารสำคัญจากสมุนไพรร (Blank solution) ตัวเลขแสดงความเข้มข้นของสารสำคัญจากสมุนไพรร (1) 2 mM (2) 4 mM (3) 6 mM

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธิดิมา วงศ์จิตราภรณ์
วัน เดือน ปี เกิด	19 ธันวาคม 2539
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2563 เกษัตริศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

