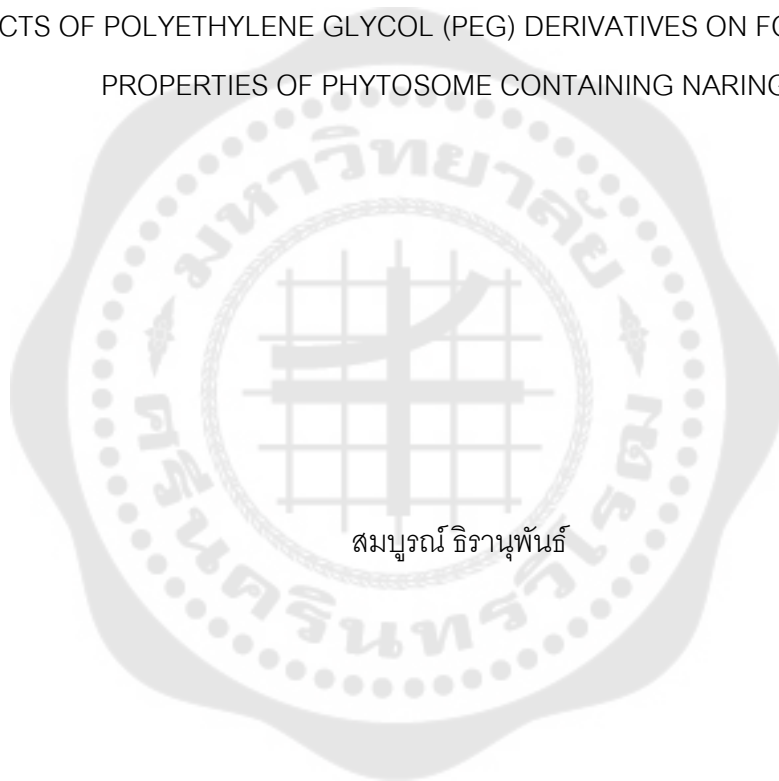




ผลของอนุพันธ์ของพอลิเอทิลีนไกลคอลต่อการสร้างและสมบัติของไฟโตโซมที่บรรจุนาริงจิน  
EFFECTS OF POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) DERIVATIVES ON FORMATION AND  
PROPERTIES OF PHYTOSOME CONTAINING NARINGIN



สมบุญ ธีรานุพันธ์

ผลของอนุพันธ์ของพอลิเอทิลีนไกลคอลต่อการสร้างและสมบัติของไฟโตไซมที่บรรจุนาโนเงิน



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2568  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EFFECTS OF POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) DERIVATIVES ON FORMATION AND  
PROPERTIES OF PHYTOSOME CONTAINING NARINGIN



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

2025

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาบัตร

เรื่อง

ผลของอนุพันธ์ของพหุนามที่เส้นโค้งต่อการศึกษาและสมบัติของไฟโตโซมที่บรรจุนาโนเงิน

ของ

สมบูรณ์ ธิราอนุพันธ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเกษตรศาสตร์  
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาบัตร

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนู ทองนพคุณ) (รองศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา จิตตสุโข)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย)

ชื่อเรื่อง	ผลของอนุพันธ์ของพอลิเอทิลีนไกลคอลต่อการสร้างและสมบัติของไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน
ผู้วิจัย	สมบุญ ธีรานุพันธ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2568
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนู ทองนพคุณ

นารินจิน (Naringin, NG) เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย แต่มีข้อจำกัดในการนำไปใช้เนื่องจากละลายน้ำและดูดซึมได้จำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนานารินจินในรูปแบบไฟโตโซมที่ผสมอนุพันธ์ของพอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างนารินจินและฟอสฟาติลโคลีน (PTC) พบว่าที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง NG:PTC เท่ากับ 1:4 เตรียมได้ไฟโตโซมที่มีสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมและกักเก็บนารินจินได้สูงสุด เมื่อนำสูตรตำรับดังกล่าวมาศึกษาโดยผสมอนุพันธ์ของ PEG ได้แก่ PEG 400, PEG 1500, PEG 4000 และ Lauroyl PEG-32 glycerides (Gelucire® 44/14) พบว่าไฟโตโซมที่เติม PEG 400 แสดงสมบัติเหมาะสมที่สุด โดยมีขนาดอนุภาค  $136.00 \pm 1.45$  นาโนเมตร และสามารถกักเก็บนารินจินได้ร้อยละ  $96.74 \pm 0.01$  ขณะที่การเติมอนุพันธ์ของ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีแนวโน้มทำให้ได้ไฟโตโซมที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น จากการศึกษาความคงสภาพพบว่าอุณหภูมิสูงมีผลทำให้ไฟโตโซมมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นและกักเก็บนารินจินได้ลดลง เมื่อนำไฟโตโซมนารินจินที่ผสม PEG 400 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น โดยลดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เหลือร้อยละ  $22.22 \pm 0.48$  ที่ความเข้มข้น  $1,125 \mu\text{g/mL}$  ซึ่งเหนือกว่าอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับนารินจินรูปแบบอิสระ ผลการศึกษาข้างต้นแสดงว่าการเติมอนุพันธ์ของ PEG มีผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของไฟโตโซมและการเตรียมไฟโตโซมนารินจินที่ดัดแปลงโดยการเติมอนุพันธ์ของ PEG 400 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง Caco-2 ได้

คำสำคัญ : ไฟโตโซม, นารินจิน

Title	EFFECTS OF POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) DERIVATIVES ON FORMATION AND PROPERTIES OF PHYTOSOME CONTAINING NARINGIN
Author	SOMBOON TIRANUPAN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2025
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr Thanu Thongnopkoon

Naringin (NG) is a flavonoid possessing various pharmacological activities but its applications are problematic due to limited solubility and absorption. This study aimed to develop naringin phytosome with the addition of polyethylene glycol (PEG) derivatives to improve the efficacy of naringin. The study to optimize the molar ratio of NG and phosphatidylcholine (PTC) revealed that the suitable molar ratio of NG:PTC was 1:4 by showing acceptable properties with the highest encapsulation efficiency. The PEG derivatives, i.e. PEG 400, PEG 1500, PEG 4000 and Lauroyl PEG-32 glycerides (Gelucire<sup>®</sup> 44/14), were added in the formulations to determine their effects on the phytosome properties. The results showed that the phytosome containing PEG 400 possessed the optimal characteristics, showing a small particle size at  $136.00 \pm 1.45$  nm and a high encapsulation efficiency at  $96.74 \pm 0.01\%$ . The use of PEG with higher molecular weight tended to increase the particle size of phytosomes. The stability study suggested that a higher temperature resulted in the increase in particle size and the reduction of naringin encapsulation. According to the cytotoxicity study against Caco-2 cell line, the results showed that naringin phytosome modified with PEG 400 significantly inhibited cancer cell growth with a dose-dependent manner by reducing the cell viability to  $22.22 \pm 0.48\%$  at 1,125  $\mu\text{g/mL}$ , which was significantly superior to the unprocessed naringin. In conclusion, the addition of PEG derivatives affected the physicochemical properties of the prepared naringin phytosomes. Furthermore, the naringin phytosome modified with PEG 400 significantly improved the anticancer activity of naringin against Caco-2 cells.

Keyword : phytosome, naringin

## กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนุ ทองนพคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ซึ่งให้คำแนะนำอย่างละเอียด ครอบคลุมทั้งด้านหลักการวิจัย การออกแบบการทดลอง ตลอดจนแนวทางในการวิเคราะห์และตีความผลการศึกษา อาจารย์ได้ให้คำปรึกษาอย่างต่อเนื่อง ทั้งยังมอบโอกาสและแรงบันดาลใจทางวิชาการอย่างยิ่ง อันเป็นรากฐานสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณต่อ อาจารย์ ดร. ธิติอนันต์ กุลศิริวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ ผู้ให้การสนับสนุนอย่างยิ่งในงานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ตลอดจนให้คำปรึกษาเชิงเทคนิคอย่างถูกต้องแม่นยำ ทั้งในด้านการเตรียมเซลล์ การออกแบบการทดลอง และการควบคุมคุณภาพของกระบวนการทั้งหมด ความเชี่ยวชาญและความเอาใจใส่ของอาจารย์มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จของข้อมูลในงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอแสดงความขอบพระคุณคณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาโททุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำเพิ่มเติมและข้อเสนอแนะซึ่งช่วยให้ปริญญาโทฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้อำนวยความสะดวกด้านสถานที่ อุปกรณ์ และทรัพยากรทางวิชาการ ตลอดจนบุคลากรทุกท่านที่มีส่วนร่วมสนับสนุนให้การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้เป็นไปอย่างราบรื่น

สมบุญณ์ ธิวานุพันธ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
ตาราง .....	ฅ
ภาพประกอบ .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ภูมิหลัง .....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย .....	1
ความสำคัญของการวิจัย .....	2
ตัวแปรที่ศึกษา .....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ .....	3
กรอบแนวคิดในงานวิจัย .....	3
สมมุติฐานในการวิจัย .....	3
บทที่ 2 .....	4
ทบทวนวรรณกรรม .....	4
1.1 ข้อมูลทั่วไปของนารินจิน (Naringin) .....	4
1.1.1 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีกายภาพของนารินจิน (Naringin) .....	4
1.1.2 โครงสร้างทางเคมี .....	4
1.1.3 สมบัติสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งยา .....	5
1.2 ระบบนำส่งยาแบบไฟโตโซม (Phytosome Drug Delivery System) .....	6

1.2.1 แนวคิดและความเป็นมาของไฟโตโซม	6
1.2.2 กลไกการสร้างและการดูดซึมที่เพิ่มขึ้น	8
1.2.3 องค์ประกอบหลักในการเตรียมไฟโตโซม	10
1.2.4 วิธีการเตรียม Phytosomes	15
2.3 พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) และอนุพันธ์	16
2.3.1 ข้อมูลทั่วไปและสมบัติของ PEG	16
2.3.1.1 โครงสร้างทางเคมีและสมบัติที่สำคัญ	16
2.3.1.2 การจำแนกประเภทและการประยุกต์ใช้ตามน้ำหนักโมเลกุล	17
2.3.1.3 การวิเคราะห์ค่าซีตาโพเทนเชียล (Zeta Potential) ของโพลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) และ Gelucire <sup>®</sup> 44/14 ในระบบอนุภาคนาโน	18
2.3.2 แนวคิดและกลไกเชิงลึกของ PEGylation ในระบบอนุภาคนาโน	20
2.3.2.1 หลักการของ PEGylation ในการปรับปรุงความคงสภาพ (Stability)	20
2.3.2.2 ผลของชั้นสเตลธ์ (stealth effect) และกลไกการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน	21
2.4 มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer)	22
2.4.1 กลไกพื้นฐานของการตายของเซลล์มะเร็ง (Cell Death Mechanisms)	23
2.4.2 บทบาทของ Reactive Oxygen Species (ROS) ต่อการตายของเซลล์มะเร็ง	24
2.4.3 ฟลาโวนอยด์และกลไกการต้านมะเร็ง	25
2.4.4 กลไกการออกฤทธิ์ของ Naringin ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่	26
2.4.5 การพัฒนา naringin ในรูปแบบ phytosome เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ	27
2.4.6 การประเมิน Cytotoxicity ของ phytosome naringin	28
2.4.7 บทสรุปของการทบทวนวรรณกรรม	28
บทที่ 3	30
วิธีดำเนินการวิจัย	30
1. เครื่องมือและอุปกรณ์	30

2. สารเคมี .....	30
3. วิธีการทดลอง .....	31
3.1 การเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน (naringin phytosome) .....	31
3.1.1 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของนารินจิน (naringin, NG) ต่อฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine, PTC) .....	31
3.1.2 การศึกษาผลของอนุพันธ์พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG derivatives) ต่อไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน .....	32
3.2 การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน .....	34
3.2.1 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (particle size) และศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential) บนพื้นผิวของไฟโตโซม .....	34
3.2.2 การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบ (molecular interaction) ในไฟโตโซม .....	34
3.2.4 การวิเคราะห์ร้อยละของประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (encapsulation efficiency, %EE) ของไฟโตโซมนารินจิน .....	34
3.3 การศึกษาความคงสภาพ (stability) ของไฟโตโซมนารินจิน .....	36
3.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) กับ caco-2 cell line .....	36
บทที่ 4 .....	38
ผลการศึกษา .....	38
4.1 การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน .....	38
4.1.1 การศึกษาของอัตราส่วนที่เหมาะสมของนารินจิน (naringin, NG) ต่อ ฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine, PTC) .....	38
4.1.2 การศึกษาผลของอนุพันธ์พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG derivatives) ต่อไฟโตโซมนารินจิน .....	39
4.1.3 การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบในไฟโตโซม .....	41
4.2 การศึกษาความคงสภาพของไฟโตโซมนารินจิน .....	44

Day .....	44
4.3 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) กับ Caco-2 Cell Line .....	48
บทที่ 5 .....	51
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	51
5.1 สรุปผลการศึกษา .....	51
5.1.1 การศึกษาสูตรตำรับที่เหมาะสม .....	51
5.1.2 การศึกษาผลของอนุพันธ์พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG derivatives) .....	51
5.1.3 การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบในไฟโตโซม .....	51
5.1.4 การศึกษาความคงสภาพ .....	52
5.1.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง .....	52
5.2 อภิปรายผล.....	52
5.3 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยในอนาคต (Suggestions).....	53
บรรณานุกรม .....	55
ประวัติผู้เขียน .....	72

## ตาราง

	หน้า
ตาราง 1 สมบัติทางเคมีของนารินจิน (naringin).....	4
ตาราง 2 การเปรียบเทียบลักษณะของไฟโตโซม และลิโปโซม .....	9
ตาราง 3 ข้อมูลศักย์ซีตา (Zeta Potential Summary).....	19
ตาราง 4 น้ำหนักของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินที่อัตราส่วนโดย โมลที่ศึกษา.....	32
ตาราง 5 น้ำหนักของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินและผสมอนุพันธ์ ของ PEG .....	33
ตาราง 6 ขนาดอนุภาค, ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค, ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิว และร้อยละการกักเก็บ สารสำคัญของไฟโตโซมนารินจิน .....	38
ตาราง 7 ขนาดอนุภาค, ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค, ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวและร้อยละการกักเก็บ สารสำคัญของไฟโตโซมนารินจินที่ผสม PEG และอนุพันธ์ของ PEG .....	40
ตาราง 8 ขนาดอนุภาค, ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค, ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวและประสิทธิภาพการกัก เก็บนารินจิน .....	44
ตาราง 9 ร้อยละการรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์เมื่อได้รับไฟโตโซมนารินจินที่ผสม PEG400 เทียบกับนารินจิน .....	49

## ภาพประกอบ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 โครงสร้างโมเลกุลของนารินจิน .....	4
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างและการเรียงตัวภายในไฟโตโซมและลิโปโซม.....	7
ภาพประกอบ 3 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์กับฟอสโฟลิปิด .....	8
ภาพประกอบ 4 ตำแหน่งของคอเลสเตอรอลในผนังของไฟโตโซม.....	13
ภาพประกอบ 5 การเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินด้วยวิธี solvent evaporation .....	32
ภาพประกอบ 6 การเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินและผสมอนุพันธ์ ด้วยวิธี solvent evaporation .....	33
ภาพประกอบ 7 สมการการหา % Encapsulation Efficiency .....	35
ภาพประกอบ 8 ปฏิกิริยา alkaline degradation ของ flavonoid.....	36
ภาพประกอบ 9 สมการการหา % cell viability .....	37
ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของ (A) ไฟโตโซมนารินจินและ (B) ไฟโตโซมนารินจินที่ผสม อนุพันธ์ของพอลิเอทิลีน ไกลคอล (PEG).....	41
ภาพประกอบ 11 FT-IR สเปกตรัม ของ PTC, CHO, NG, ตัวอย่างระเหยร่วม (co-evaporated sample) ของ PTC ร่วมกับ NG และไฟโตโซมที่ประกอบด้วย PTC:CHO:PEG 400 ที่บรรจุ NG...42	
ภาพประกอบ 12 ภาพจำลองการเสื่อมสลายของไฟโตโซมนารินจินในการศึกษาความคงสภาพ ...47	
ภาพประกอบ 13 ลักษณะของไฟโตโซมนารินจินจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน (A) คำรับ P400, (B) คำรับ P1500, (C) คำรับ P4000 และ (D) คำรับ G4414 (scale bar 20 $\mu\text{m}$ ) .....	48
ภาพประกอบ 14 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ต่อ Caco-2 cell lines ของไฟโต โซมนารินจินที่ผสม PEG400 เทียบกับนารินจิน .....	49

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

นารินจิน (Naringin) เป็นสารฟลาโวนอยด์ในกลุ่มฟลาโวนอน (Flavanones) ซึ่งพบได้ในผลไม้ตระกูลส้ม เช่น มะนาว ส้มเขียวหวาน และเกรปฟรุต นารินจินมีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยสารไกลโคไซด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเนโอเฮสเพอริโดส (Neohesperidose) และอะไกลโคนของมันที่เรียกว่า นารินจินิน (Naringenin) ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพหลากหลาย เช่น การต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง และช่วยปกป้องหัวใจ อย่างไรก็ตาม การดูดซึมของนารินจินผ่านทางปากมีข้อจำกัดจากโครงสร้างโมเลกุลที่ไม่สามารถดูดซึมได้ดี และความสามารถในการละลายในไขมันที่ต่ำ ทำให้มีปริมาณที่ออกฤทธิ์ในร่างกายต่ำ (bioavailability) ซึ่งเป็นอุปสรรคในการใช้ประโยชน์จากสารนี้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมและการมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่สูงขึ้น นักวิจัยจึงได้พัฒนาระบบการนำส่งที่เรียกว่า "ไฟโตโซม" (Phytosomes) ซึ่งเป็นสารประกอบระหว่างสารสำคัญจากธรรมชาติและฟอสโฟลิปิด (phospholipid) โดยมีเลซิธิน (Lecithin) เป็นส่วนประกอบหลัก ฟอสโฟลิปิดช่วยปกป้องสารสำคัญจากการถูกทำลายในกระเพาะอาหารและลำไส้ และช่วยเพิ่มการดูดซึมของสารสำคัญเหล่านั้นเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งการใช้ไฟโตโซมช่วยให้สารประกอบสมุนไพรที่มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่สูงขึ้น และสามารถนำส่งไปยังเนื้อเยื่อที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการพัฒนาประสิทธิภาพของไฟโตโซม การศึกษาเกี่ยวกับการใช้ออนุพันธ์ของโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) ในการปรับปรุงคุณสมบัติของไฟโตโซมจึงเป็นหัวข้อที่ได้รับความสนใจ เนื่องจาก PEG สามารถปรับปรุงคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของไฟโตโซม เช่น ความเสถียร การดูดซึม และการส่งสารสำคัญไปยังเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น การศึกษาผลของอนุพันธ์ของ PEG ต่อคุณสมบัติของไฟโตโซม นารินจิน จึงมีความสำคัญในการพัฒนาการใช้งานของนารินจินในทางการแพทย์และเภสัชกรรมอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

#### ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง phosphatidylcholine, cholesterol และ naringin ในการเตรียมไฟโตโซม

2. เพื่อศึกษาผลของการเติมอนุพันธ์ของ polyethylene glycol (PEG) ที่มีต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและความคงสภาพของไฟโตโซมนาริงิน

3. เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (caco-2 cell line) ของไฟโตโซมนาริงินที่มีการเติมอนุพันธ์ของ polyethylene glycol (PEG)

### ความสำคัญของการวิจัย

การวิจัยมีบทบาทสำคัญในการสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่ช่วยพัฒนาสังคมและเศรษฐกิจ การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาสารสำคัญ เช่น นาริงิน (Naringin) ผ่านเทคโนโลยีไฟโตโซม (Phytosome) ถือเป็นตัวอย่างที่เด่นชัดของการใช้วิทยาศาสตร์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรค การพัฒนานี้ช่วยเพิ่มการดูดซึมและชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารจากธรรมชาติที่มีข้อจำกัดเดิม เช่น ความสามารถในการละลายต่ำ การทำเช่นนี้ไม่ได้ส่งเสริมเพียงแค่ด้านสุขภาพ แต่ยังสร้างโอกาสใหม่ในด้านเภสัชกรรมและอุตสาหกรรมยา

อีกทั้งการวิจัยยังมีบทบาทในการปรับปรุงคุณภาพชีวิต การศึกษาสมบัติของนาริงิน เช่น การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ สามารถนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการรักษาใหม่ที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ การผสมผสานเทคโนโลยี เช่น อนุพันธ์โพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) กับระบบไฟโตโซม ยังช่วยเพิ่มความคงสภาพและประสิทธิภาพของสาร ทำให้การรักษามีความแม่นยำและเหมาะสมยิ่งขึ้น

สุดท้าย การวิจัยไม่เพียงช่วยแก้ปัญหาสุขภาพที่มีอยู่ แต่ยังช่วยสร้างแนวทางป้องกันและรับมือกับปัญหาในอนาคต การเตรียมพร้อมสำหรับการใช้ทรัพยากรธรรมชาติในเชิงพาณิชย์ เช่น การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพสูง จะช่วยส่งเสริมเศรษฐกิจและยกระดับคุณภาพชีวิตของประชากรในระยะยาว ดังนั้น การวิจัยจึงเป็นรากฐานสำคัญของความก้าวหน้าในทุกมิติของสังคมขอบเขตของการวิจัย

### ตัวแปรที่ศึกษา

#### 1. ตัวแปรอิสระ แบ่งเป็นดังนี้

- 1.1 อัตราส่วนโดยโมลของ phosphatidylcholine : naringin ในไฟโตโซม
- 1.2 อนุพันธ์ของ polyethylene glycol (PEG)
- 1.3 สภาวะการเก็บไฟโตโซมในการศึกษาความคงสภาพ

#### 2. ตัวแปรตาม ได้แก่

- 2.1 สมบัติทางกายภาพของไฟโตโซม ได้แก่ ขนาดอนุภาค, ศักย์ไฟฟ้าซีต้า, อันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบในตำรับ, สมบัติเชิงความร้อนและประสิทธิภาพการห่อหุ้ม

## 2.2 ความคงสภาพของไฟโตโซม

## 2.3 ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (caco-2 cell line) ใน

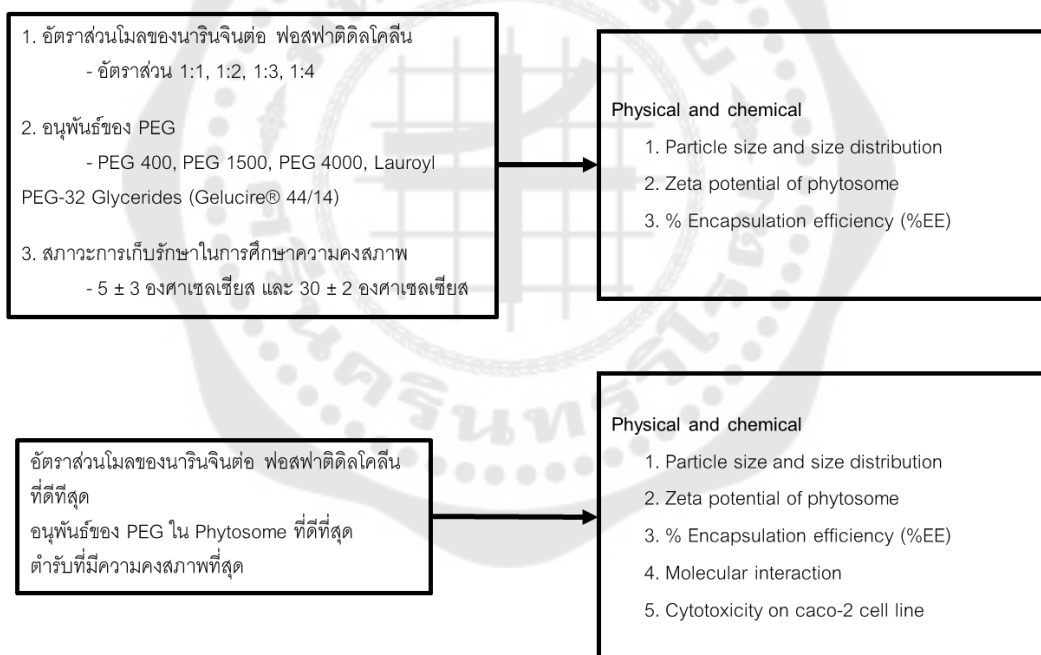
หลอดทดลอง

### นิยามศัพท์เฉพาะ

ไฟโตโซม (phytosome) หมายถึง ระบบนำส่ง (delivery system) ลักษณะเป็นอนุภาคขนาดเล็กที่สร้างจากฟอสโฟลิปิดห่อตัวคล้ายถุงหุ้มที่มีเมมเบรนสองชั้น โดยฟอสโฟลิปิดเกิดอันตรกิริยากับสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยเพิ่มการดูดซึมและเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีในร่างกาย

นารินจิน (naringin) หมายถึง สารพลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งที่พบในผลไม้ตระกูลส้ม

### กรอบแนวคิดในงานวิจัย



### สมมุติฐานในการวิจัย

การเติมอนุพันธ์ของ PEG ในการเตรียมไฟโตโซม นารินจินมีผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและความคงสภาพของไฟโตโซม รวมทั้งช่วยยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (caco-2 cell line) ได้

## บทที่ 2

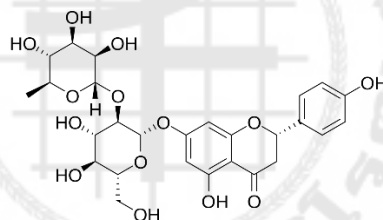
### บททวนวรรณกรรม

#### 1.1 ข้อมูลทั่วไปของนารินจิน (Naringin)

##### 1.1.1 โครงสร้างและสมบัติทางเคมีกายภาพของนารินจิน (Naringin)

นารินจิน (Naringin) เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ที่พบได้ในปริมาณสูงในพืชตระกูลส้ม โดยเฉพาะในเกรปฟรุต (Grapefruit) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของรสขมที่เป็นเอกลักษณ์<sup>(1)</sup> นารินจินได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในวงการเภสัชกรรมและโภชนเภสัช (Nutraceuticals) เนื่องจากมีสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant), การต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory), และการป้องกันเซลล์ประสาท (Neuroprotective)<sup>(2, 3)</sup> อย่างไรก็ตาม การนำนารินจินมาใช้ประโยชน์ทางคลินิกนั้นยังมีข้อจำกัดที่สำคัญอันเนื่องมาจากสมบัติทางเคมีกายภาพของมันเอง<sup>(4)</sup>

##### 1.1.2 โครงสร้างทางเคมี



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างโมเลกุลของนารินจิน

ที่มา: <https://www.medchemexpress.com/>

#### ตาราง 1 สมบัติทางเคมีของนารินจิน (naringin)

Molecular weight	580.5 g/mol
Chemical formula	$C_{27}H_{32}O_{14}$
Physical state	ผงละเอียดสีขาวอมเหลือง
Melting point	ประมาณ 166°C
Boiling point	922-926°C at 760 mmHg
Water solubility	ประมาณ 0.5 g/L ที่ 20°C
Log P	0.44

นารินจิน (Naringin) เป็นสารประกอบในกลุ่ม ฟลาวาโนนไกลโคไซด์ (Flavanone Glycoside) ซึ่งมีสูตรเคมีคือ  $C_{27}H_{32}O_{14}$ <sup>(5)</sup> โครงสร้างพื้นฐานของนารินจินคือ ฟลาวาโนน (Flavanone) ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัวในโครงสร้างแกนแบบ  $C_6H_3O_6$  ที่มีวงแหวน 3 วง<sup>(6)</sup>

โครงสร้างของนารินจินแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลักที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 (C-7) ของวงแหวนฟลาโวนอยด์ ทำให้จัดเป็นสารประเภท flavanone-7-O-glycoside<sup>(7)</sup>

อะไกลโคน (Aglycone): คือส่วนที่ไม่มีน้ำตาล มีชื่อว่า นารินจินิน (Naringenin) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของฟลาวาโนน ส่วนนี้มีคุณสมบัติเด่นคือ ไม่ชอบน้ำ (Lipophilic) หรือละลายได้ดีในไขมัน

ไกลโคน (Glycone moiety): คือส่วนของน้ำตาล ซึ่งเป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharide) ที่มีชื่อว่า นีโอเฮสเปอร์โดส (Neohesperidose) ที่เกิดจากการรวมตัวของน้ำตาลรามโนส (Rhamnose) และ กลูโคส (Glucose) ส่วนนี้มีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก จึงเป็นส่วนที่ทำให้มีสมบัติ ชอบน้ำ (Hydrophilic) สูง<sup>(8,9)</sup>

ลักษณะจำเพาะของนารินจินคือการมีหมู่ฟีนอลิกและหมู่ไฮดรอกซิลหลายตำแหน่ง ซึ่งทำให้โมเลกุลมีความสามารถเป็นทั้งผู้ให้ (donor) และผู้รับ (acceptor) ในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสารอื่น เช่น ฟอสโฟลิปิดหรือโปรตีนได้ การที่ในหนึ่งโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำนี้เองที่ส่งผลโดยตรงต่อสมบัติทางเคมีกายภาพที่ซับซ้อนของนารินจิน<sup>(10)</sup>

### 1.1.3 สมบัติสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งยา

สมบัติทางเคมีกายภาพของนารินจินเป็นปัจจัยกำหนดประสิทธิภาพในการดูดซึมและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสมบัติที่สำคัญมีดังนี้

1.1.3.1 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight): นารินจินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 580.54 g/mol ซึ่งถือว่าเป็นโมเลกุลที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ การมีขนาดโมเลกุลใหญ่เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นกลไกหลักในการดูดซึมสารเข้าสู่กระแสเลือด<sup>(11)</sup>

1.1.3.2 การละลายในน้ำและไขมัน (Solubility):

การละลายในน้ำ: แม้ว่านารินจินจะมีส่วนของน้ำตาลที่ช่วยเพิ่มการละลายในน้ำเมื่อเทียบกับอะไกลโคน (นารินจินิน) แต่โดยรวมแล้วนารินจินยังจัดเป็นสารที่ละลายในน้ำได้น้อยมาก (Poorly water-soluble) การละลายที่ต่ำนี้ทำให้ความเข้มข้นของนารินจินในของเหลวบริเวณลำไส้มีจำกัด ส่งผลให้การดูดซึมเป็นไปได้ไม่ดี<sup>(12)</sup>

การละลายในไขมัน (Lipophilicity): ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งชั้น (Partition coefficient) หรือ Log P ของนารินจินบ่งชี้ว่ามันมีความสามารถในการละลายในไขมันไม่สูงนัก เนื่องจากถูกบดบังด้วยส่วนของน้ำตาลขนาดใหญ่ ทำให้การผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบ (Lipid bilayer) เป็นไปได้ยาก<sup>(13, 14)</sup>

1.1.3.3 ปัญหาการดูดซึมต่ำ : จากสมบัติที่กล่าวมาข้างต้น คือ มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ละลายน้ำได้น้อย และละลายในไขมันได้ไม่ดี ทำให้นารินจินถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Biopharmaceutics Classification System (BCS) Class IV ซึ่งหมายถึงสารที่มีทั้งการละลายต่ำ (Low Solubility) และการซึมผ่านต่ำ (Low Permeability) นอกจากนี้ นารินจินยังอาจถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์จากแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ทำให้ปริมาณยาที่จะเข้าสู่กระแสเลือดลดลงไปอีก ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลโดยตรงทำให้นารินจินมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) ต่ำมาก ซึ่งเป็นความท้าทายหลักในการพัฒนานารินจินให้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีประสิทธิภาพ<sup>(15-18)</sup>

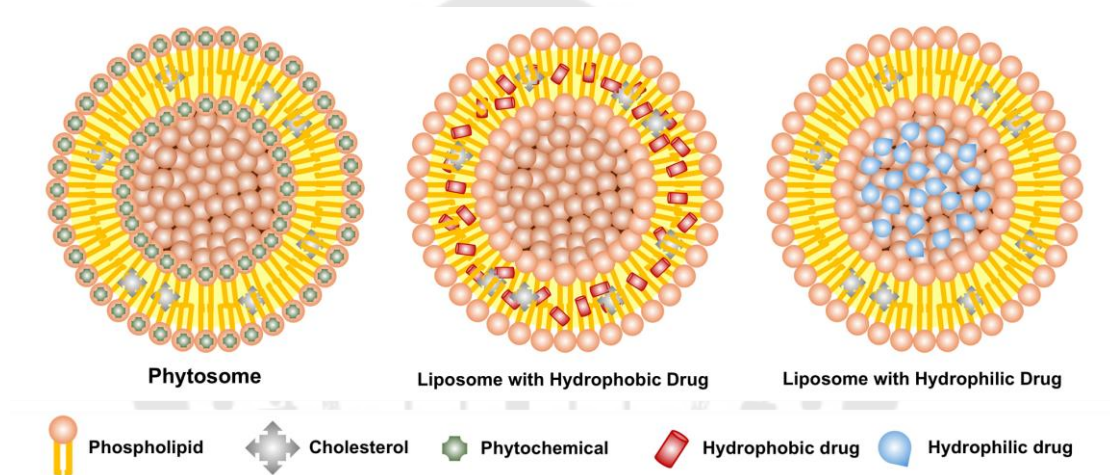
## 1.2 ระบบนำส่งยาแบบไฟโตโซม (Phytosome Drug Delivery System)

สารพฤกษเคมี (Phytochemicals) จำนวนมาก เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) มีศักยภาพทางเภสัชวิทยาสูง แต่การนำมาใช้ประโยชน์มักถูกจำกัดด้วยปัญหาด้านชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) ที่ต่ำ อันเนื่องมาจากการละลายในน้ำได้ไม่ดี มีขนาดโมเลกุลใหญ่ หรือไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของลำไส้ซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบได้<sup>(19)</sup> เพื่อแก้ปัญหานี้ เทคโนโลยีระบบนำส่งยาจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญ และหนึ่งในระบบนำส่งที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับสารสกัดจากพืชคือ "ไฟโตโซม (Phytosome)"<sup>(20)</sup>

### 1.2.1 แนวคิดและความเป็นมาของไฟโตโซม

ไฟโตโซม (Phytosome) เกิดจากการรวมคำคือ phyto หมายถึง พืช หรือ phytonutrients และคำว่า some หมายถึง ลักษณะคล้ายเซลล์จึงอาจเรียกไฟโตโซมอีกชื่อว่า herbosomes.<sup>(21)</sup> ซึ่งไฟโตโซมเป็นระบบนำส่งยาแบบถุง (vesicular drug delivery system) ที่ช่วยเพิ่มการดูดซึมของยาที่ละลายได้ต่ำ<sup>(22)</sup> โดยได้รับการพัฒนาครั้งแรกโดยบริษัท Indena® ในปี 1988 ซึ่งการศึกษาพบว่า ฟอสโฟลิปิดมีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนกับฟลาโวนอยด์<sup>(23)</sup> โดยไฟโตโซม (phytosome) และ ลิโปโซม (liposome) เป็นระบบนำส่งสารสำคัญที่อาศัยโครงสร้างหลักจาก ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ในการจัดเรียงตัวเป็นชั้นทวิภาค โดยมีส่วนหัวที่ชอบน้ำ (Hydrophilic head) อยู่ด้านนอกและส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) อยู่ด้านใน อย่างไรก็ตาม กลไกการบรรจุสารสำคัญมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ลิโปโซม จะมีการจัดเรียงโครงสร้างที่ทำให้สารสำคัญถูกกักเก็บอยู่ภายในถุงกลมๆ โดยสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic

drug) จะถูกบรรจุอยู่ในชั้นไขมันระหว่างฟอสโฟลิปิด หรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ส่วนสารที่ชอบน้ำ (hydrophilic drug) จะถูกกักเก็บอยู่ในแกนกลางที่เป็นน้ำที่ถูกล้อมรอบด้วยส่วนหัวที่ชอบน้ำของฟอสโฟลิปิด ขณะนั้นในไฟโตโซมั้น โครงสร้างมีความจำเพาะเจาะจงกับสารสกัดจากพืช (phytochemical) มากกว่า โดยสารสำคัญจะเกิด อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล (molecular Interaction) ที่แข็งแรงและสร้างสารเชิงซ้อน (Complex) โดยตรงกับ ส่วนหัวที่ชอบน้ำของฟอสโฟลิปิด โครงสร้างนี้ช่วยเพิ่มความเสถียรและเพิ่มการดูดซึมของสารพฤษเคมีเข้าสู่ร่างกายได้ดีขึ้น เนื่องจากถูกห่อหุ้มด้วยโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็นไขมัน ทำให้สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่ายกว่าสารสกัดเดิมๆ<sup>(23)</sup> ดังภาพประกอบ 2

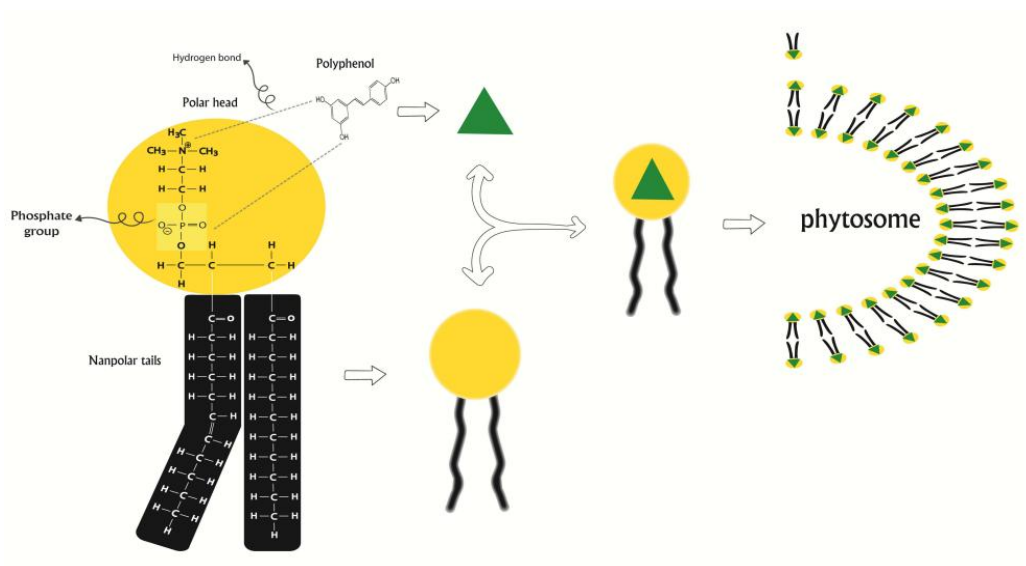


ภาพประกอบ 2 โครงสร้างและการเรียงตัวภายในไฟโตโซมและลิโปโซม

การเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารพฤษเคมี เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) หรือสารโพลีฟีนอลอื่นๆ กับฟอสโฟลิปิดส่วนใหญ่เกิดจากการสร้าง พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ที่แข็งแรงและเสถียร โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่าง หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ที่เป็นขั้ว (Polar) บนโครงสร้างของสารพฤษเคมี กับ ส่วนหัวที่ชอบน้ำ (Hydrophilic head) ของฟอสโฟลิปิด ซึ่งคือ หมู่นโตรเจนหรือหมู่ฟอสเฟต ที่มีประจุหรือมีขั้วสูง<sup>(24-26)</sup> ดังภาพประกอบ 3

การสร้างพันธะนี้ทำให้โมเลกุลสารพฤษเคมีที่ปกติอาจมีขั้วมากเกินไปหรือไม่สามารถละลายในไขมันได้ดี ถูกจับรวมเข้ากับโครงสร้างของฟอสโฟลิปิด<sup>(27)</sup> ส่งผลให้โครงสร้างโดยรวมมีความสมดุลของสมบัติ ชอบน้ำและชอบไขมัน (amphiphilic property) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ<sup>(28)</sup> จึงทำให้สารเชิงซ้อนไฟโตโซมที่เกิดขึ้นใหม่มีคุณสมบัติคล้ายกับโมเลกุลไขมันมากยิ่งขึ้น<sup>(29)</sup> ทำให้ เข้ากันได้ดีกับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane compatibility) ของร่างกายมนุษย์ซึ่งประกอบด้วยไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก (lipid bilayer) และด้วยเหตุนี้จึงสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้ม

เซลล์และถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดในระบบทางเดินอาหารได้ ดีขึ้นกว่าสารสกัดเดิมๆ ที่มีสมบัติชอบน้ำสูงและมักถูกกำจัดออกไปอย่างรวดเร็ว<sup>(28, 30)</sup>



ภาพประกอบ 3 การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์กับฟอสโฟลิปิด

## 1.2.2 กลไกการสร้างและการดูดซึมที่เพิ่มขึ้น

### 1.2.2.1 กลไกการเกิดอันตรกิริยาระหว่างนารินจินกับฟอสฟาติดีลโคลีน

การสร้างไฟโตโซมของนารินจินเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างนารินจินกับฟอสฟาติดีลโคลีนในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น เอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (semi-polar solvent) จึงสามารถละลายสารทั้งมีขั้วและไม่มีขั้วได้อย่างมีประสิทธิภาพ<sup>(24)</sup>

กลไกหลักในการเกิดสารเชิงซ้อนนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล ( $-OH$ ) ของนารินจินกับหมู่ฟอสเฟต ( $PO_4^-$ ) และหมู่โคลีน ( $N^+(CH_3)_3$ ) ของฟอสฟาติดีลโคลีน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีขั้วสูง (polar head group) การเกิดพันธะไฮโดรเจนนี้ช่วยสร้างโครงสร้างเชิงซ้อนที่เสถียรและทำให้ฟอสฟาติดีลโคลีนสามารถห่อหุ้มโมเลกุลนารินจินไว้ภายใน โดยหางกรดไขมันของฟอสฟาติดีลโคลีนจะจัดเรียงตัวล้อมรอบโครงสร้างเชิงซ้อนดังกล่าว<sup>(25)</sup>

ได้เป็นอนุภาคที่มีโครงสร้างด้านนอกเป็นไขมัน (lipophilic surface) ในขณะที่ภายในยังคงมีส่วนที่มีขั้วของนารินจิน ทำให้โมเลกุลเชิงซ้อนนี้สามารถเข้ากันได้ทั้งกับตัวกลางที่เป็นน้ำและไขมัน การเปลี่ยนแปลงสมบัตินี้จะช่วยเพิ่มการกระจายตัว และการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีลักษณะเป็นชั้นไขมันสองชั้น (lipid bilayer) ได้ดีกว่าโมเลกุลของนารินจินอิสระ<sup>(26)</sup>

### 1.2.2.2 กลไกทางเคมีกายภาพของการเกิดพันธะ

การเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างนารินจิน และฟอสฟาติดีลโคลีนเกิดจากแรงระหว่างโมเลกุล (intermolecular interactions) และแรงขับเคลื่อนทางเทอร์โมไดนามิกส์ (thermodynamic driving forces) ประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals forces) และแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interactions) ที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุลของนารินจิน และหมู่ฟอสเฟตของฟอสฟาติดีลโคลีน<sup>(31)</sup>

ขณะเดียวกัน การจัดเรียงตัวของหางกรดไขมันของฟอสฟาติดีลโคลีนรอบหน่วยเชิงซ้อนเป็นผลมาจากแรงไฮโดรโฟบิกระหว่างหางไขมันและสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดอนุภาคที่มีโครงสร้างคล้ายไมเซลล์หรือลิโปโซมขนาดเล็ก ซึ่งโครงสร้างเช่นนี้ไม่เพียงแต่ช่วยให้สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่ายขึ้นเท่านั้น แต่ยังช่วยเพิ่มความคงสภาพของไฟโตโซมทั้งทางกายภาพและทางเคมีในสภาวะแวดล้อมต่างๆ<sup>(30, 32)</sup>

ดังนั้นการเกิดอันตรกิริยาหรือสารเชิงซ้อนระหว่างนารินจินกับฟอสฟาติดีลโคลีนจึงเป็นกระบวนการสำคัญที่ช่วยปรับปรุงสมบัติการละลาย การซึมผ่านเซลล์ และความคงตัวของสภาพของสารสำคัญ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาไฟโตโซมเพื่อการนำส่งสารสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### 1.2.2.3 ข้อดีของไฟโตโซมเมื่อเปรียบเทียบกับลิโปโซม

ไฟโตโซมและลิโปโซมเป็นระบบนำส่งที่มีฟอสโฟลิปิดเป็นส่วนประกอบหลักเช่นเดียวกัน แต่มีความแตกต่างที่สำคัญดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 การเปรียบเทียบลักษณะของไฟโตโซม และลิโปโซม

ลักษณะ	ไฟโตโซม (Phytosome)	ลิโปโซม (Liposome)
โครงสร้าง	สารสำคัญเป็นส่วนหนึ่งของเมมเบรน โดยเกิดอันตรกิริยากับฟอสโฟลิปิด	สารสำคัญถูกกักเก็บอยู่ในช่องว่างตรงกลางหรือแทรกในชั้นไขมัน
ความคงตัว	มีความคงสภาพสูงกว่า เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยา	มีความคงสภาพต่ำกว่า อาจเกิดการรั่วไหลของสารสำคัญออกจากโครงสร้างได้ง่าย
ขนาดยา	บรรจุสารสำคัญในปริมาณที่สูงกว่า	ปริมาณสารสำคัญที่บรรจุได้ถูกจำกัดด้วยขนาดของลิโปโซม
การดูดซึม	ดูดซึมได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเปลี่ยนแปลงสมบัติของโมเลกุลโดยตรง	การดูดซึมขึ้นกับความสามารถของลิโปโซมในการรวมตัวกับเยื่อหุ้มเซลล์

จะเห็นได้ว่าไฟโตโซมมีข้อได้เปรียบในด้านความคงสภาพ ปริมาณยาที่บรรจุได้ และประสิทธิภาพการดูดซึม ซึ่งได้รับการยืนยันจากงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า สารพฤกษเคมีในรูปแบบไฟโตโซมมีชีวปริมาณออกฤทธิ์สูงกว่ารูปแบบสารสกัดปกติอย่างมีนัยสำคัญ<sup>(23, 33-35)</sup>

### 1.2.3 องค์ประกอบหลักในการเตรียมไฟโตโซม

เทคโนโลยีไฟโตโซม เป็นกลยุทธ์ทางเภสัชกรรมในการพัฒนาระบบนำส่งสารสำคัญ โดยอาศัยหลักการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) ระหว่างสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ซึ่งส่วนใหญ่ อยู่ในกลุ่ม โพลีฟีนอล (polyphenols) กับ ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) โครงสร้างที่เกิดขึ้นมีสมบัติแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) คือสามารถเข้ากันได้ทั้งในสถานะที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ซึ่งเป็นสมบัติสำคัญที่ช่วยแก้ไขข้อจำกัดทางชีวเภสัชกรรม ของสารพฤกษเคมีส่วนใหญ่ ได้แก่ การมีค่าการละลายในน้ำต่ำ และความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ต่ำ ดังนั้นการพัฒนาระบบนำส่งนี้จึงสามารถเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ ของสารสำคัญได้อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาบทบาทขององค์ประกอบแต่ละชนิดในไฟโตโซม จึงเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งต่อการออกแบบและปรับปรุงสูตรตำรับไฟโตโซมให้มีประสิทธิภาพสูงสุด องค์ประกอบหลักในระบบนี้ประกอบด้วย สารสำคัญ ทางชีวภาพ (active ingredient), ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine), ตัวทำละลาย (solvent), และ คอเลสเตอรอล (cholesterol)

#### 1.2.3.1 สารสำคัญ (active ingredient, bioactive phytonutrients)

สารสำคัญหรือสารสำคัญทางชีวภาพเป็นแกนกลาง ของโครงสร้างไฟโตโซม โดยเฉพาะสารในกลุ่มโพลีฟีนอล อาทิ เควอซีทิน (Quercetin), รูติน (Rutin), เคอร์คูมิน (Curcumin), และ ซิลิบิน (Silybin) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory effect), และฤทธิ์ปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน (Protection against oxidative stress)<sup>(36, 37)</sup>

อย่างไรก็ตาม สารกลุ่มนี้มีข้อจำกัดด้านสมบัติทางเคมี ภายภาค คือ มีโครงสร้างที่ค่อนข้างมีขั้วแต่มีค่าการละลายในน้ำต่ำ และมีขนาดโมเลกุลใหญ่ ส่งผลให้มีความชีวปริมาณออกฤทธิ์ต่ำเมื่อให้โดยการรับประทาน<sup>(38)</sup> การสร้างสารเชิงซ้อนในรูปแบบไฟโตโซมช่วยเพิ่มศักยภาพของสารกลุ่มนี้โดยอาศัยการเกิด พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล บนโครงสร้างของโพลีฟีนอลกับหมู่ฟอสเฟตที่มีประจุลบ (phosphate head group) ของฟอสโฟลิปิด<sup>(39)</sup> การเกิดสารเชิงซ้อนนี้ไม่เพียงแต่จะเพิ่มความสามารถในการละลายของสารใน

ตัวกลางที่เป็นไขมัน แต่ยังคงช่วยปรับเปลี่ยนสมบัติพื้นผิวของโมเลกุล ทำให้สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของลำไส้เล็กซึ่งมีองค์ประกอบเป็นไขมันได้ดีขึ้น

งานวิจัยของ Maiti และคณะ (2007) ได้แสดงให้เห็นว่า สารเชิงซ้อนเคอร์คูมิน-พอสฟอไลปิด มีค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งชั้น (Partition coefficient) ใน n-octanol/water สูงกว่าเคอร์คูมินอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งชี้ถึงสมบัติการชอบไขมันที่เพิ่มขึ้น และส่งผลให้ค่าการดูดซึมในทางเดินอาหารของหนูทดลองสูงชันกว่า 4 เท่า<sup>(40)</sup> ในทิศทางเดียวกัน Kidd (2009) ได้ทบทวนวรรณกรรมและสรุปว่า สารเชิงซ้อนซิลิบิน-พอสฟาติดิลโคลีน สามารถเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ในมนุษย์ได้สูงกว่าการให้สารสกัดมาตรฐานหลายเท่า<sup>(41)</sup>

### 1.2.3.2 ฟอสฟาติดิลโคลีน (Phosphatidylcholine; PC)

ฟอสฟาติดิลโคลีน เป็นฟอสโฟลิปิดชนิดแอมฟิฟิลิก (amphiphilic phospholipid) ที่ได้รับความนิยมสูงสุดในการเตรียมไฟโตโซม โดยทั่วไปสกัดจากเลซิทีน (lecithin) ของถั่วเหลือง (Soy lecithin) หรือไข่แดง โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนหัวที่มีขั้ว (polar head) ซึ่งคือหมู่ฟอสโฟโคลีน (phosphocholine) และส่วนหางที่ไม่มีขั้ว (nonpolar tails) ซึ่งเป็นสายโซ่กรดไขมัน 2 สาย สมบัตินี้ทำให้ มีบทบาทสำคัญ 3 ประการได้แก่:

**การเป็นสารก่อสารเชิงซ้อน (complexing agent)** ส่วนหัวที่มีขั้วสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสารสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่ส่วนหางซึ่งไม่ชอบน้ำจะจัดเรียงตัวล้อมรอบโมเลกุลสารสำคัญ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เสถียรทางอุณหพลศาสตร์<sup>(42, 43)</sup>

**การเป็นสารเพิ่มการดูดซึม (absorption enhancer)** เนื่องจากฟอสฟาติดิลโคลีนเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ ไฟโตโซมจึงมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) สามารถจับและหลอมรวม กับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เยอบุล่าไส้ (enterocytes) ได้ง่าย ช่วยอำนวยความสะดวกในการนำส่งสารสำคัญเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง<sup>(44)</sup>

**การเป็นสารสำคัญ (intrinsic therapeutic agent)** ฟอสฟาติดิลโคลีนมีบทบาททางสรีรวิทยาในการบำรุงตับ (hepatoprotective) และเป็นแหล่งของโคลีน ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการทำงานของสมองและระบบประสาท<sup>(45)</sup> ถึงแม้ Phosphatidylcholine จะ มีบทบาทในการป้องกันตับและสนับสนุนสุขภาพของระบบประสาท แต่เมื่อถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของระบบนำส่งยา เช่น ลิโปโซมหรือไฟโตโซม พบว่าฟอสฟาติดิลโคลีนมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงและไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่มีนัยสำคัญ Deleanu และคณะ (2023) มีการทดสอบฟอสฟาติดิลโคลีนต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 โดยใช้วิธี MTT assay

พบว่า ฟอสฟาติดีลโคลีนไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) มากกว่า 90% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และเซลล์ยังคงมีลักษณะทางสัณฐานปกติ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างหรือการเสื่อมสลายของเยื่อหุ้มเซลล์<sup>(46)</sup> ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยและความเหมาะสมของ Phosphatidylcholine ในการใช้เป็นองค์ประกอบของระบบนำส่งยาทางชีวภาพ

### 1.2.3.3 ตัวทำละลาย (solvent)

การเลือกตัวทำละลายเป็นขั้นตอนสำคัญ ในกระบวนการเตรียมไฟโตโซม เนื่องจากส่งผลโดยตรงต่อ ประสิทธิภาพของการเกิดสารเชิงซ้อน (complexation efficiency), การกระจายขนาดอนุภาค (particle size distribution) และความคงตัวทางกายภาพ (physical stability) ของผลิตภัณฑ์<sup>(47)</sup> ตัวทำละลายในอุดมคติต้องสามารถละลายได้ทั้งสารสำคัญและฟอสโฟลิปิด เพื่อให้โมเลกุลทั้งสองสามารถเกิดอันตรกิริยาต่อกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยทั่วไปนิยมใช้ตัวทำละลาย 2 ประเภท:

1. ตัวทำละลายอะโพรติก (aprotic solvent) เช่น ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), อะซีโตน (acetone) มีประสิทธิภาพสูงในการละลายส่วนทางที่ไม่ชอบน้ำของฟอสโฟลิปิด

2. ตัวทำละลายโพรติก (protic solvent): เช่น เอทานอล (ethanol) มีความสามารถในการละลายสารกลุ่มโพลีฟีนอลและส่งเสริมการสร้างพันธะไฮโดรเจน<sup>(48)</sup>

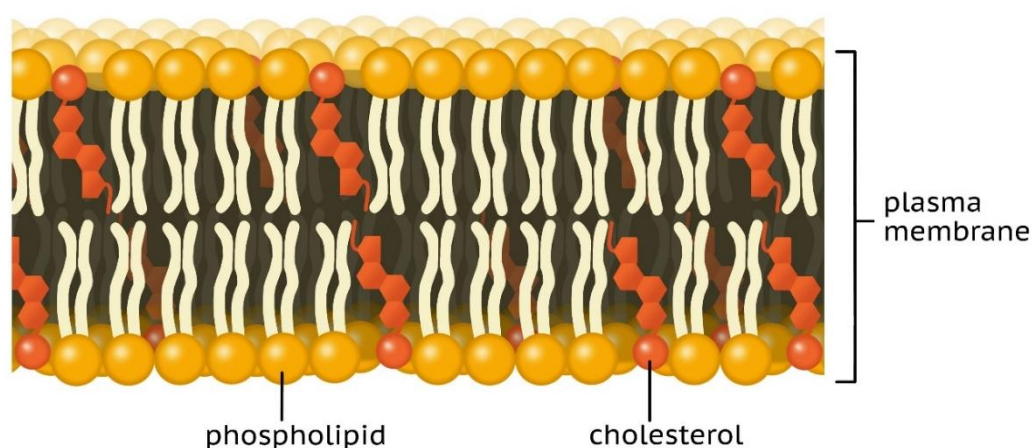
การใช้ตัวทำละลายร่วม (co-solvent system) มักให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าการใช้ตัวทำละลายเดี่ยว แต่การใช้ตัวทำละลาย อะโพรติกอาจมีผลต่อความปลอดภัยและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม Gnananath และคณะ (2017) ได้ทำการทบทวนเทคนิคการสร้างสารเชิงซ้อนระหว่างสารสำคัญกับฟอสโฟลิปิด พบว่าในอดีตนิยมใช้ตัวทำละลายแบบอะโพรติก เช่น คลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทน แต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีการเปลี่ยนมาใช้เอทานอลแทนอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถให้ประสิทธิภาพในการเกิดคอมเพล็กซ์ และความคงตัว ที่เทียบเท่าหรือดีกว่า อีกทั้งยังปลอดภัยต่อการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม<sup>(49)</sup>

งานวิจัยของ Deleanu และคณะ (2023) ได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้เอทานอลในกระบวนการเตรียมไฟโตโซม โดยศึกษาการเตรียมไฟโตโซมจากสารสกัด

ผสมของ *Zingiber officinale* (ginger) และ *Rosa canina* (rosehip) ซึ่งใช้สารสกัดแบบ hydro-alcoholic extract ในขั้นตอนการเตรียมด้วยเทคนิค thin-layer hydration ผลการทดลองพบว่า ไฟโตโซมที่เตรียมจากสารสกัดไฮโดรเอทานอลสามารถเพิ่มระดับของ 6-gingerol ในพลาสมาของหนูทดลองได้มากกว่า 2.6 เท่า เมื่อเทียบกับการให้สารสกัดแบบไม่ผ่านการทำไฟโตโซม ทั้งยังให้ค่า encapsulation efficiency มากกว่าร้อยละ 80 และสามารถต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) สูงกว่าโดยไม่พบความเป็นพิษ<sup>(46)</sup>

#### 1.2.3.4 คอเลสเตอรอล (cholesterol)

คอเลสเตอรอล เป็นสเตอรอลที่มักถูกเติมลงในระบบนำส่งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (lipid-based delivery systems) เช่น ลิโปโซมและไฟโตโซม เพื่อทำหน้าที่เป็น สารปรับความแข็งแรงของผนังเมมเบรน (membrane stabilizer)<sup>(50)</sup>



ภาพประกอบ 4 ตำแหน่งของคอเลสเตอรอลในผนังของไฟโตโซม

บทบาทหลักของคอเลสเตอรอลคือการแทรกตัว (intercalation) เข้าไปในช่องว่างระหว่างโมเลกุลฟอสโฟลิปิดในโครงสร้างสองชั้น (bilayer) ของผนังเมมเบรนของไฟโตโซม ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพดังนี้

**ลดความเหลวของเมมเบรน** โมเลกุลของคอเลสเตอรอลจะจำกัดการเคลื่อนที่ของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของฟอสฟาติดีลโคลีน ทำให้โครงสร้างมีการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบและหนาแน่นมากขึ้น<sup>(51)</sup>

**เพิ่มความแข็งแรงเชิงกล** ช่วยให้โครงสร้างมีความทนทานต่อแรงเฉือน และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา<sup>(52)</sup>

**ลดการรั่วไหลของสาร** การที่โครงสร้างมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น จะช่วยป้องกันการรั่วไหลของสารสำคัญที่ถูกกักเก็บไว้ออกจากระบบนำส่งก่อนเวลาอันควร<sup>(52, 53)</sup>

งานวิจัยของ Maria-Lucia และคณะ (2015) รายงานว่าการเติมคอเลสเตอรอลในชั้นลิปิดสามารถเพิ่มความคงตัวของลิโปโซม และลดการปลดปล่อยตัวยาในสภาวะจำลองในร่างกาย โดยคอเลสเตอรอลจะลดการเคลื่อนที่ของสาย acyl ของฟอสโฟลิปิด ทำให้โครงสร้างลิปิดมีความแข็งแรงและทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ดียิ่งขึ้น<sup>(50)</sup>

Solmaz และคณะ (2014) ได้พัฒนา นาโนไฟโตโซมของเคอควิซินิน (quercetin nano-phytosome) และเปรียบเทียบสูตรที่มีและไม่มีคอเลสเตอรอล พบว่าการเติมคอเลสเตอรอลในอัตราส่วนที่เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บเคอควิซินินได้ถึง 98% และช่วยให้อนุภาคมีความเสถียรทางกายภาพได้นานกว่า 3 สัปดาห์เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ทั้งยังช่วยลดการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม<sup>(52)</sup>

Visht และ Salih (2023) ได้ทำการศึกษาผลของคอเลสเตอรอลต่อการสร้าง ไฟโตโซมของน้ำมันยูคาลิปตัส โดยใช้ตัวทำละลายหลายชนิด พบว่าการเติมคอเลสเตอรอลในระบบทำให้ค่าการกักเก็บ (entrapment efficiency) เพิ่มขึ้นจาก 57% เป็น 65–67% พร้อมทั้งลดอัตราการสูญเสียสารสำคัญในระยะยาว และยังคงปริมาณตัวยาได้อย่างมีนัยสำคัญหลังการเก็บรักษา ผลลัพธ์นี้ยืนยันบทบาทของคอเลสเตอรอลในการเพิ่มความแข็งแรงของชั้นเมมเบรนและเสริมความเสถียรของอนุภาค<sup>(54)</sup> ดังนั้นการเติมคอเลสเตอรอลในอัตราส่วนโดยโมลาร์ที่ผ่านการปรับให้เหมาะสม กับฟอสโฟลิปิด จึงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการเพิ่มความเสถียรและยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์<sup>(55)</sup>

Ciğdem และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาความปลอดภัยของลิโปโซมสูตรเปล่าที่ประกอบด้วย phosphatidylcholine (PC) และ cholesterol (CHO) โดยทดสอบกับเซลล์เยื่อบุจำลองลำไส้ (Caco-2) พบว่าลิโปโซม PC:CHO ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยค่าความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) สูงกว่า 90% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าการใช้ Cholesterol ร่วมกับ Phosphatidylcholine ช่วยเสริมความแข็งแรงของชั้นลิปิดคู่ (lipid bilayer) และเพิ่มความคงตัวของอนุภาค อีกทั้งยังรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการใช้ PC และ CHO ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจึงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการสร้างระบบนำส่งยาที่ปลอดภัยและเสถียรต่อเซลล์<sup>(56)</sup>

การเลือกใช้องค์ประกอบที่เหมาะสมรวมถึงการควบคุมอัตราส่วนระหว่างสารสำคัญ, ฟอสฟาติดีลโคลีน, และคอเลสเตอรอล จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพและประสิทธิภาพของไฟโตโซมที่เตรียมได้

#### 1.2.4 วิธีการเตรียม Phytosomes

วิธีการเตรียมไฟโตโซม มีผลต่อสมบัติของไฟโตโซมที่เตรียมได้ โดยมีวิธีเตรียม 3 วิธี ได้แก่ 1) การตกตะกอนด้วยตัวทำละลาย 2) การระเหยของตัวทำละลาย 3) การระเหยของตัวทำละลายให้เป็นฟิล์ม

1. การตกตะกอนของตัวทำละลาย (anti-solvent precipitation) ในเทคนิคนี้จะนำฟอสฟาติดีลโคลีน และ สารสำคัญ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ไดคลอโรมีเทน หรือ อะซิโตน จากนั้นจะนำไประเหยตัวทำละลายออกอย่างช้าๆ ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น แล้วเติมตัวทำละลาย เช่น n-hexane เพื่อให้เกิดการตกตะกอนซึ่งเป็นอนุภาคของไฟโตโซม จากนั้นนำตัวอย่างทำให้แห้งโดยใช้เครื่องดูดความชื้นแบบสุญญากาศ<sup>(57)</sup> Mukherjee และคณะ (2012) เตรียมไฟโตโซมของ andrographolide โดยการใส่ dichloromethane เป็นตัวทำละลายในการทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน และใช้ n-hexane ในการทำให้ตกตะกอน โดยละลาย andrographolide กับฟอสโฟลิปิด ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ใน dichloromethane และนำไปให้ความร้อนไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เหลือเป็นสารละลายเข้มข้นอยู่ จากนั้นเติม hexane และคนจนเกิดการตกตะกอนและนำไปกรองและเก็บในเครื่องดูดความชื้นสุญญากาศ<sup>(58)</sup>

2. การระเหยตัวทำละลาย (solvent evaporation) เทคนิคนี้เป็นวิธีที่นิยมโดยจะละลายสารสำคัญและฟอสโฟลิปิดในตัวทำละลาย เช่น tetrahydrofuran หรือ ethanol จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่กำหนดอุณหภูมิให้คงที่และเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน หรือนำไป sonication เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของสารสำคัญได้ดีขึ้น จากนั้นนำไประเหยจนตัวทำละลายออกหมด<sup>(59)</sup>

3. การระเหยของตัวทำละลายให้เป็นฟิล์มโดยใช้ rotary evaporator แล้วเติมน้ำเพื่อให้ไฟโตโซมตกตะกอนออกมา (thin layer hydration) ในเทคนิคนี้จะนำ สารสำคัญ และฟอสโฟลิปิดละลายในตัวทำละลายเช่น methanol, dichloromethane จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกอย่างช้าๆด้วย rotary evaporator จนเป็นแผ่นฟิล์มบางๆที่เคลือบก้น flask จากนั้นนำมากระจายในน้ำ (hydration) โดยใช้ rotary evaporator และอาจลดขนาดอนุภาคโดยการใช้อคลื่นเสียง (sonification) หรือการปั่นผสมด้วยความเร็วสูง (homogenization)<sup>(60, 61)</sup>

## 2.3 พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) และอนุพันธ์

พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) และอนุพันธ์ของมัน จัดเป็นสารกลุ่มพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง<sup>(62)</sup> เพื่อการปรับปรุงสมบัติของระบบนำส่งยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบนำส่งรูปแบบอนุภาคนาโน เช่น ไฟโตโซม ลิโปโซม การนำสารกลุ่มนี้มาใช้เป็นตัวแปรหลักในการศึกษา มีวัตถุประสงค์เพื่อแก้ไขข้อจำกัดทางเภสัชจลนศาสตร์ และเพิ่มเสถียรภาพทางเคมีกายภาพของสารสำคัญที่ถูกกักเก็บ<sup>(63)</sup>

### 2.3.1 ข้อมูลทั่วไปและสมบัติของ PEG

พอลิเอทิลีนไกลคอล เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่เกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวง (ring-opening polymerization) ของเอทิลีนออกไซด์<sup>(64)</sup> มีโครงสร้างทางเคมีทั่วไปคือ  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$  โดยที่ 'n' หมายถึงจำนวนหน่วยย่อยของเอทิลีนออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวกำหนดน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย และส่งผลโดยตรงต่อสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ PEG แต่ละเกรด

#### 2.3.1.1 โครงสร้างทางเคมีและสมบัติที่สำคัญ

ความชอบน้ำสูง (hydrophilicity) โครงสร้างของ PEG ที่ประกอบด้วยพันธะอีเทอร์ (ether linkage) และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่ปลายสายโซ่ ทำให้มีความสามารถสูงในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ เป็นผลให้ PEG ละลายได้ดีทั้งในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด สมบัตินี้มีความสำคัญอย่างยิ่งในการเพิ่มการละลายของสารสำคัญที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic drugs) และเพิ่มความเข้ากันได้ของระบบนำส่งยากับสภาวะทางชีวภาพ<sup>(65)</sup>

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) PEG ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง มีความเป็นพิษต่ำ และไม่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการต้านทานการเกาะติดของโปรตีน (protein resistance) ทำให้ไม่ถูกจดจำโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ด้วยเหตุนี้ องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) จึงอนุมัติให้ใช้ PEG ในยาฉีด ยารับประทาน และยาใช้ภายนอก<sup>(66)</sup>

ความยืดหยุ่นของสายโซ่พอลิเมอร์ (chain flexibility) สายโซ่ของ PEG มีความยืดหยุ่นสูงและสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างอิสระในสารละลาย ทำให้ครอบคลุมพื้นที่ ขนาดใหญ่รอบๆ พื้นผิวที่มันไปเกาะอยู่ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดความเกาะหรือการผลักกันเชิงสเตอริก (steric repulsion) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อความคงสภาพและประสิทธิภาพในการนำส่งสารสำคัญของตัวรับ<sup>(67, 68)</sup>

### 2.3.1.2 การจำแนกประเภทและการประยุกต์ใช้ตามน้ำหนักโมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight, MW) เป็นปัจจัยหลักที่กำหนดสถานะทางกายภาพ (ของเหลว, กึ่งแข็ง, ของแข็ง) และการใช้งานของ PEG ในทางเภสัชกรรม

PEG 400 (MW ประมาณ 400 g/mol) เป็นของเหลวหนืดใส ไม่มีสี ใช้เป็นตัวทำละลาย และสารเพิ่มการละลาย (solubilizer) สำหรับสารที่ไม่ละลายน้ำในยาเตรียมรูปแบบของเหลว เช่น ยาน้ำเชื่อม ยาหยอดตา และแคปซูลนิ่ม นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอร์ (plasticizer) ในฟิล์มนำส่งยาผ่านผิวหนัง เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นของฟิล์ม<sup>(69)</sup> ในด้านผลต่อการดูดซึมยา พบว่า PEG 400 สามารถยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein (P-gp) หรือ transporters อื่นๆ ได้ เช่น Ma และคณะ (2017) พบว่า PEG 400 (0.1–5.0 %) ลดการ efflux ของ berberine จากเซลล์ HepG2 และ Caco-2 ได้<sup>(70)</sup> และพบว่า PEG 400 สามารถยับยั้ง P-gp ใน jejunal tissue ของหนูได้<sup>(71)</sup> มีรายงานว่า PEG400 สามารถลดการแสดงออก (expression) ของโปรตีน P-gp ที่ลำไส้ ในการศึกษา in vivo ได้ด้วย<sup>(72)</sup>

PEG 1500 (MW ประมาณ 1,500 g/mol) มีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายขี้ผึ้ง (waxy solid) และเมื่อถูกหลอมเหลวสามารถเปลี่ยนเป็นพื้นที่เหมาะสมสำหรับยาเหน็บ หรือยาขี้ผึ้งได้ เพราะที่อุณหภูมิร่างกาย PEG1500 สามารถหลอมเหลวปลดปล่อยตัวยาออกมาได้อย่างเหมาะสม<sup>(73)</sup> ยิ่งไปกว่านั้น PEG 1500 มักถูกใช้ร่วมกับ PEG ชนิดอื่น เช่น PEG 4000 ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อปรับสมดุลระยะเวลาในการละลายหรือปลดปล่อยตัวยา พบว่าตำรับสูตร paracetamol suppository ที่ใช้ยาพื้นผสมระหว่าง PEG 1500 และ PEG4000 ในอัตราส่วน 75:25 สามารถปลดปล่อย ยาได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ PEG 1500 เพียงอย่างเดียว<sup>(74)</sup> PEG ถูกใช้เป็นสารยึดเกาะที่หลอมเหลวได้ (melttable binder) ในตำรับรูปแบบของแข็ง เช่น ในการผลิตแบบ hot-melt granulation จะช่วยให้ผลิตภักดิ์ที่มีขนาดเหมาะสม ลดปริมาณผงละเอียด และเพิ่มความแข็งแรงของผลิตภักดิ์<sup>(75)</sup>

PEG 4000 (MW ประมาณ 4,000 g/mol) เป็นของแข็งสีขาวในรูปผงหรือเกล็ด และมักใช้เป็นสารหล่อลื่น (lubricant) ในยาเม็ดและแคปซูลเพื่อลดแรงเสียดทานระหว่างการตอกเม็ดยา โดยเฉพาะเมื่อไม่สามารถใช้สารหล่อลื่นทั่วไป เช่น magnesium stearate<sup>(76)</sup> PEG 4000 ยังถูกนำมาใช้เป็น ตัวพาของแข็ง (solid carrier) ในเทคนิค solid dispersion เพื่อเพิ่มอัตราการละลายของยาที่ละลายน้ำได้น้อย โดยวิธีการหลอม (fusion method) โดยผสมตัวยากับ PEG 4000 นำไปหลอมแล้วปล่อยให้เย็นตัวลง ทำให้ได้ตัวยารูป ออสัณฐาน (amorphous) ที่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอใน PEG ซึ่งช่วยปรับปรุงการละลายของตัวยาให้ดีขึ้น

Obada และคณะ (2021) ทำการศึกษา พบว่า PEG 4000 สามารถปรับปรุงอัตราการละลายของ cilostazol ได้เมื่อเตรียมเป็นรูปแบบ solid dispersion ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม<sup>(77)</sup>

Gelucire<sup>®</sup> 44/14 เป็นอนุพันธ์กึ่งแข็งของ PEG / glycerides (lauroyl polyoxyl-32 glycerides) มีลักษณะกึ่งแข็ง semi-solid waxy มีจุดหลอมประมาณ 44°C และมีค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) ประมาณ 14 ซึ่งช่วยให้เมื่อสัมผัสของเหลวในทางเดินอาหาร สามารถเกิดอิมัลชันขนาดเล็ก (self-emulsifying) ได้เอง<sup>(78)</sup> Shinc และคณะ (2019) ได้นำ Gelucire 44/14 มาใช้เตรียมระบบ ก่ออิมัลชันด้วยตนเอง (self-emulsifying drug delivery system, SEDDS) เพื่อเพิ่มการละลายและการดูดซึมของยา valsartan และพบว่าสามารถเพิ่มความสามารถในการดูดซึมได้ประมาณ 6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรทั่วไป<sup>(79)</sup> André และคณะ (2013) มีการใช้ Gelucire 44/14 ร่วมกับกระบวนการ granulation หรือ spray-drying เพื่อสร้างตำรับที่ปลดปล่อยตัวยาวอย่างรวดเร็วโดยมีเป้าหมายให้ยาที่มีละลายน้ำต่ำถูกปล่อยออกมารวดเร็วโดยอาศัยสมบัติของ Gelucire 44/14 ที่เป็น amphiphilic ingredient และสามารถก่ออิมัลชันได้เองเมื่อกระจายในน้ำ<sup>(80)</sup> Patel และคณะ (2016) อธิบายว่าการใช้ Gelucire 44/14 เป็นตัวพาของแข็ง (solidifier) ช่วยให้ระบบ SEDDS มีความเสถียรเป็นรูปของแข็ง และช่วยให้การปลดปล่อยยา และการกระจายตัว เป็นไปได้ดีเมื่อสัมผัสน้ำ<sup>(81)</sup>

Polyethylene glycol (PEG) เป็นสารช่วย (excipient) ที่มีประโยชน์หลากหลายด้านในทางเภสัชกรรม และยังคงมีความปลอดภัยต่อเซลล์ โดยงานวิจัยของ Darya และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาผลของ PEG 400 และ PEG 4000 ต่อความมีชีวิตของเซลล์ Caco-2 โดยใช้วิธี MTT assay พบว่า PEG ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และไม่ทำให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เซลล์ยังคงมีความสมบูรณ์และสามารถทำงานได้ตามปกติ ผลลัพธ์นี้ยืนยันบทบาทของ PEG ในฐานะ excipient ที่ปลอดภัยต่อเซลล์ลำไส้และไม่รบกวนความสมบูรณ์ของเยื่อเซลล์ ดังนั้นการใช้ PEG 400 และ PEG 4000 ในสูตรยาหรือระบบนำส่งยาในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการสร้างระบบนำส่งยาที่ปลอดภัยและเสถียรต่อเซลล์<sup>(82)</sup>

### 2.3.1.3 การวิเคราะห์ค่าซีตาโพเทนเชียล (Zeta Potential) ของโพลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) และ Gelucire<sup>®</sup> 44/14 ในระบบอนุภาคนาโน

โพลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene Glycol: PEG) และ Gelucire<sup>®</sup> 44/14 จัดเป็นสารที่ไม่มีประจุ (Non-ionic) ซึ่งโดยคุณสมบัติพื้นฐานแล้วจะมีค่าศักย์ซีตา (Zeta Potential) ที่เข้าใกล้ ศูนย์ (near-zero) หรือมีค่าติดลบเพียงเล็กน้อยเมื่ออยู่ในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นกลาง (neutral aqueous solution)

อย่างไรก็ตาม ค่าศักย์ซีตาที่แท้จริงของสารเหล่านี้จะมีความแปรผันสูง ขึ้นอยู่กับ บริบทของระบบ ที่ถูกนำไปใช้ (อาทิ บทบาทเป็นสารลดแรงตึงผิวในนาโนอิมัลชัน, โคพอลิเมอร์บนผิวอนุภาคนาโน) และ ค่า pH ของตัวทำละลาย ที่ใช้ในการวัด

ตาราง 3 ข้อมูลศักย์ซีตา (Zeta Potential Summary)

ชนิด	ลักษณะประจุพื้นฐาน	ค่า Zeta Potential ที่พบบ่อย (เมื่อรวมในระบบอนุภาคนาโน)
PEG 400	ไม่มีประจุ (Non-ionic)	โดยทั่วไปใกล้ 0 mV หรือมีค่าลบเล็กน้อย อาจสูงถึง 28 mV เมื่อใช้เป็นส่วนประกอบของไมโครอิมัลชันที่มีสารลดแรงตึงผิวอื่น ๆ <sup>(83)</sup>
PEG 1500	ไม่มีประจุ (Non-ionic)	โดยทั่วไปใกล้ 0 mV หรือมีค่าลบเล็กน้อย เมื่อใช้เป็นส่วนประกอบของอนุภาคนาโน มักให้ค่า 1 mV ถึง 3.7 mV (เป็นบวกเล็กน้อย) หรือให้ค่า ต่ำกว่า $\pm 30$ mV ซึ่งบ่งชี้ถึงเสถียรภาพที่ไม่มากนัก <sup>(84)</sup>
PEG 4000	ไม่มีประจุ (Non-ionic)	โดยทั่วไปใกล้ 0 mV หรือมีค่าลบเล็กน้อย อาจพบค่า -35.4 mV เมื่อใช้เป็นส่วนประกอบของการปรับเปลี่ยนผิวของลิโปโซม (PEGylated liposomes) ในบัฟเฟอร์ PBS (Phosphate Buffered Saline) <sup>(85)</sup>
Gelucire <sup>®</sup> 44/14	ไม่มีประจุ (Non-ionic)	โดยทั่วไปเป็นลบเล็กน้อยถึงปานกลาง มักพบค่าในช่วง -10 mV ถึง -27 mV เมื่อใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว/ลิปิดในระบบนาโนแคเรียจ (Nanostructured Lipid Carrier) หรือไมโครอิมัลชัน <sup>(86, 87)</sup>

### ปัจจัยที่ส่งผลต่อความแปรผันของค่าศักย์ซีตา

ธรรมชาติของสาร (Inherent Properties) PEG และ Gelucire<sup>®</sup> 44/14 เป็นโพลีเมอร์และสารลดแรงตึงผิวที่มีโครงสร้างหลักแบบ Non-ionic จึงไม่มีการแตกตัวเป็นไอออน (ionization) ที่ชัดเจนหรือการมีประจุบวกหรือลบอย่างเด่นชัด ด้วยเหตุนี้ ค่าศักย์ซีตาของสารบริสุทธิ์ที่วัดในน้ำกลั่นจึงมักจะเข้าใกล้ 0 mV

อิทธิพลของ pH และองค์ประกอบของตัวทำละลาย (effect of pH and solvent) แม้จะเป็นสารไม่มีประจุ แต่องค์ประกอบทางเคมีบางส่วนของโมเลกุล อาทิ หมู่ไฮดรอกซิลอาจมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตอน หรือไฮดรอกซิลไอออน ในสารละลาย ทำให้เกิดประจุลบเล็กน้อยบนผิวของอนุภาค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่เป็นด่าง (Higher pH)

อิทธิพลในระบบการนำส่งยา (impact in drug delivery systems) ค่าศักย์ซีตาที่รายงานในการศึกษาวิจัยส่วนใหญ่มักเป็นการวัดเมื่อสารเหล่านี้ถูกนำไปใช้เป็น สารลดแรงตึงผิว (surfactant) หรือ โค-เซอร์แฟกแทนต์ (co-surfactant) บนผิวของอนุภาคนาโนหรือ

ไมโครอิมัลชัน ดังนั้น ประจุที่วัดได้จริงจึงเป็นผลรวมของประจุที่มาจากสารอื่น ๆ ในระบบ (เช่น ยา , ลิปิด) ซึ่งอาจถูกปกคลุมด้วยชั้นของ PEG หรือ Gelucire

จึงสรุปได้ว่า ไม่สามารถระบุค่าศักย์ซีตาเพียงค่าเดียว สำหรับสารเหล่านี้ ได้ แต่มีแนวโน้มที่จะมีค่าประจุสัมบูรณ์ที่ต่ำ และมีแนวโน้มเป็น ลบเล็กน้อยถึงปานกลาง เมื่อถูกนำไปใช้ในระบบนำส่งยาที่มีน้ำเป็นตัวกลาง

### 2.3.2 แนวคิดและกลไกเชิงลึกของ PEGylation ในระบบอนุภาคนาโน

PEGylation คือกระบวนการทางเคมีในการเชื่อมต่อสายโซ่ของ PEG เข้ากับพื้นผิวของโมเลกุลหรืออนุภาคต่างๆ เช่น โปรตีน, เอนไซม์, ลิโปโซม และไฟโตโซม เทคนิคนี้ได้ปฏิวัติวงการนำส่งยาโดยการปรับปรุงคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์และเภสัชพลศาสตร์ของยาได้อย่างมาก<sup>(88)</sup>

#### 2.3.2.1 หลักการของ PEGylation ในการปรับปรุงความคงสภาพ (Stability)

**ความคงตัวทางคอลลอยด์ (Colloidal Stability) :** เมื่ออนุภาคนาโนถูกเคลือบด้วย PEG จะก่อให้เกิดชั้นไฮเดรชัน (hydration layer) รอบตัวอนุภาค ซึ่งชั้นน้ำนี้ทำหน้าที่เป็น “เกราะ” ด้านกายภาพและพลังงาน (energetic/steric barrier) ป้องกันไม่ให้อนุภาคเข้าใกล้กันจนเกิดการเกาะกลุ่ม (aggregation) ซึ่งมักถูกกระตุ้นโดยแรง van der Waals ภายในสารละลาย Chad และคณะ (2018) รายงานว่า PEGylated nanoparticles มีความเสถียรทางคอลลอยด์มากกว่าอนุภาคที่ไม่มี PEG ภายใต้เงื่อนไขชีวภาพหลายรูปแบบ (เช่น pH, ionic strength) นอกจากนี้ นาโนพาร์ติเคิลแบบ PS-PEG มีความเสถียรกว่าพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย COOH ภายในเงื่อนไขต่าง ๆ ดังกล่าว<sup>(89)</sup>

**การป้องกันการสลายตัว (protection from degradation):** สำหรับยาโปรตีนหรือเปปไทด์ ชั้น PEG ที่ครอบคลุมโมเลกุลจะช่วยลดการเข้าถึงของเอนไซม์โปรตีเอส (proteolytic enzymes) และลดการตัดสลาย โดย PEG ทำหน้าที่เป็น “เกราะ” ทางกายภาพไม่ให้เอนไซม์เข้ามาใกล้ตัวยาได้ง่าย นอกจากนี้ PEGylation ยังช่วยลดการจับกับโปรตีนในพลาสมา (protein adsorption) และลดการเคลือบด้วยเซลล์ภูมิคุ้มกัน (opsonization) ซึ่งช่วยยืดอายุของยาในร่างกาย Jung Soo และคณะ (2016) รายงานว่า บทบาทของ PEG coating ที่ช่วยลด aggregation, opsonization และ phagocytosis ซึ่งส่งผลให้เวลาในระบบหมุนเวียนของอนุภาคเพิ่มขึ้น<sup>(90)</sup> Davit และคณะ (2025) รายงานว่า PEGylated liposomes เมื่อเคลือบ PEG แล้วจะลดการรวมกัน (aggregation) และเพิ่มความเสถียรทางคอลลอยด์ของสูตรได้ดี<sup>(91)</sup> Prashant และคณะ (2025) รายงานว่าเมื่อมีการทำ PEGylation แล้ว นาโนพาร์ติเคิลมี colloidal stability สูงขึ้นในซีรัม ลดการจับกับโปรตีน (reduced protein adsorption) และลดการถูกจับโดย

macrophage ได้ดีขึ้น (stealth effect)<sup>(92)</sup> ทั้งนี้ ต้องพิจารณาปัจจัยสำคัญ เช่น ความหนาแน่นของ PEG บนพื้นผิว (PEG surface density), น้ำหนักโมเลกุลของ PEG (PEG MW), การจัดวางโครงสร้าง (conformation) และอัตราการครอบคลุมของ PEG (coverage) ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกัน aggregation และการป้องกันการจับโปรตีน<sup>(93)</sup> อย่างไรก็ตาม มีรายงานบางชิ้นที่ชี้ว่า PEGylation อาจไม่สามารถป้องกันการจับกับโปรตีนได้ 100% เสมอไป และบางกรณียังพบการเพิ่มการจับโปรตีน (protein adsorption) ภายใต้เงื่อนไขหรือพื้นผิวบางแบบ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโครงสร้างพื้นผิวและเคมีพื้นผิวมีบทบาทสำคัญร่วมด้วย<sup>(94)</sup>

### 2.3.2.2 ผลของชั้นสเตลท์ (stealth effect) และกลไกการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน

กลไกที่โดดเด่นและเป็นที่ยอมรับที่สุดของ PEGylation คือการสร้าง "ปรากฏการณ์สเตลท์" (stealth effect) ซึ่งทำให้อนุภาคนาโนสามารถ "ล่องหน" จากการตรวจจับของระบบภูมิคุ้มกันได้<sup>(95)</sup>

การยับยั้งกระบวนการออปโซไนเซชัน (inhibition of opsonization): เมื่ออนุภาคแปลกปลอมเข้าสู่กระแสเลือด โปรตีนในพลาสมาที่เรียกว่า ออปโซนิน (opsonins) (เช่น immunoglobulins และ complement proteins) จะเข้ามาจับที่ผิวของอนุภาคอย่างรวดเร็วในกระบวนการที่เรียกว่า ออปโซไนเซชัน (opsonization) การจับของออปโซนินนี้นำหน้าที่เป็น "ป้าย" หรือ "ธง" ที่ส่งสัญญาณให้เซลล์ฟาโกไซต์ (phagocytic cells) ของระบบเรติคูลูโลเอ็นโดทีเลียล (reticuloendothelial System, RES) หรือที่เรียกว่า ระบบโมโนนิวเคลียร์ฟาโกไซต์ (mononuclear phagocyte system, MPS) ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในตับ ม้าม และไขกระดูก เข้ามาจับกินและกำจัดอนุภาคเหล่านั้น<sup>(95)</sup> การเคลือบผิวอนุภาคด้วย PEG สามารถลดการจับของโปรตีนออปโซนินได้ โดยการสร้างชั้นไฮเดรชันที่ขัดขวางการเข้าถึงของโปรตีนเหล่านั้น<sup>(68)</sup>

กลไกการกีดขวางเชิงสเตอริก (steric hindrance mechanism): สายโซ่ PEG ที่ยืดหยุ่นและเคลื่อนไหวได้อย่างรวดเร็วบนพื้นผิวอนุภาคจะสร้างชั้นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะคล้าย "แปรง" (polymer brush) ที่มีความหนาแน่นสูง ชั้นแปรงนี้จะสร้างการกีดขวางเชิงสเตอริก (steric hindrance) ซึ่งเป็นเกราะป้องกันทางกายภาพที่ขัดขวางไม่ให้โปรตีนออปโซนินขนาดใหญ่เข้ามาสัมผัสและจับกับพื้นผิวของอนุภาคนาโนได้ การลดลงของกระบวนการออปโซไนเซชันนี้ทำให้เซลล์แมคโครฟาจของระบบ RES ไม่สามารถจดจำอนุภาคได้<sup>(96, 97)</sup>

การยืดระยะเวลาการคงอยู่ในกระแสเลือด (prolonged Circulation time): เมื่ออนุภาคนาโนที่ผ่านการทำ PEGylation สามารถหลบเลี่ยงการถูกกำจัดโดยระบบ RES ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มันจะสามารถไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดได้เป็นระยะเวลานานขึ้นอย่างมี

นัยสำคัญ จากหลักฐานที่ไปเป็นหลักชั่วโมงหรือหลายวัน ระยะเวลาการไหลเวียนที่ยาวนานขึ้นนี้จะเพิ่มโอกาสให้อนุภาคนาโนสามารถเดินทางไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เช่น เนื้อเยื่อมะเร็ง) และปลดปล่อยยาออกมาได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้นผ่านปรากฏการณ์ที่เรียกว่า enhanced permeability and retention (EPR) effect<sup>(98)</sup>

การเลือกใช้ PEG และอนุพันธ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน รวมถึงสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวอย่าง Gelucire<sup>®</sup> 44/14 ในการพัฒนาสูตรตำรับไฟโตโซม เป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเอาชนะข้อจำกัดทางเภสัชกรรมหลายประการ โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่โดดเด่นและกลไก PEGylation ที่ซับซ้อน เพื่อสร้างระบบนำส่งยาที่มีความคงตัวสูง สามารถละลายและนำส่งสารสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ พร้อมทั้งมีความสามารถในการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิผลในการรักษาในที่สุด<sup>(99)</sup>

## 2.4 มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer)

มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer; CRC) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก โดยมีอุบัติการณ์และอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับต้นๆ จากข้อมูลของ Hyuna และคณะ (2024) พบว่ามะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 3 (มีผู้ป่วยใหม่ราว 1.9 ล้านคน) และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 2 ทั่วโลก (เสียชีวิตราว 0.9 ล้านคน) โดยทวีปเอเชียมีจำนวนผู้ป่วยสะสมมากที่สุด<sup>(100)</sup>

พยาธิกำเนิดของ CRC มีความซับซ้อน โดยส่วนใหญ่ (ประมาณ 70-80%) เป็นชนิดที่เกิดขึ้นเอง (sporadic) ซึ่งเกิดจากการสะสมการกลายพันธุ์ของยีนหลายชนิดในเซลล์เยื่อบุลำไส้ (colonic epithelial cells) การกลายพันธุ์เหล่านี้ส่งผลต่อเส้นทางการส่งสัญญาณ (signaling pathways) ที่ควบคุมการแบ่งตัว การอยู่รอด และการตายของเซลล์<sup>(101)</sup> เส้นทางการหลักที่มักพบความผิดปกติ ได้แก่:

**Wnt/ $\beta$ -catenin Pathway:** การกลายพันธุ์ของยีน APC (adenomatous polyposis coli) ซึ่งเป็น tumor suppressor gene พบได้ใน CRC ส่วนใหญ่ (ประมาณ 80% ของผู้ป่วย) การที่ APC ทำงานผิดปกติ จะทำให้โปรตีน  $\beta$ -catenin ไม่ถูกสลายและไปสะสมในไซโตพลาสซึม ก่อนที่จะเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (เช่น c-Myc และ Cyclin D1) ซึ่งส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์อย่างไม่หยุดยั้ง<sup>(102)</sup>

**MAPK Pathway:** การกลายพันธุ์ของยีนในตระกูล RAS โดยเฉพาะ KRAS จะกระตุ้นเส้นทางการ MAPK (mitogen-activated protein kinase) อย่างต่อเนื่อง ทำให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวและต้านทานต่อการตาย<sup>(103)</sup>

TGF- $\beta$  Pathway: การกลายพันธุ์ของยีน SMAD4 (พบประมาณ 15-30%) หรือตัวรับ TGF- $\beta$  ทำให้เซลล์มะเร็งสูญเสียการตอบสนองต่อสัญญาณยับยั้งการเจริญเติบโต

p53 Pathway: การกลายพันธุ์ของยีน TP53 (พบประมาณ 50-70%) ซึ่งเป็น "ผู้พิทักษ์จีโนม" (guardian of the genome) ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการซ่อมแซม DNA หรือกระตุ้นการตายเมื่อเซลล์เกิดความเสียหายรุนแรง<sup>(104)</sup>

นอกจากปัจจัยทางพันธุกรรมแล้ว สภาพแวดล้อมของเซลล์มะเร็ง (tumor micro environment; TME) ยังมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่ง TME ประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ ที่ไม่ใช่มะเร็ง เช่น เซลล์ภูมิคุ้มกัน (immune cells), เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (cancer-associated fibroblasts; CAFs) และหลอดเลือด<sup>(105)</sup> การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation)<sup>(105)</sup> ภายใน TME ถือเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักที่กระตุ้นการเกิดมะเร็ง โดยการหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) เช่น Interleukin-6 (IL-6) ซึ่งจะไปกระตุ้นเส้นทาง JAK/STAT3 ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งเพิ่มจำนวน รุกราน และต้านทานต่อการรักษา<sup>(106)</sup> นอกจากนี้ ความเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) หรือภาวะเสียสมดุลของอนุมูลอิสระ (ROS) ภายใน TME ก็เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึม (metabolic reprogramming) ที่เอื้อต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง<sup>(107)</sup>

#### 2.4.1 กลไกพื้นฐานของการตายของเซลล์มะเร็ง (Cell Death Mechanisms)

การตายของเซลล์เป็นกระบวนการทางชีววิทยาที่จำเป็นต่อการรักษาสมดุลของร่างกาย การทำความเข้าใจกลไกเหล่านี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนารักษามะเร็ง ซึ่งมีเป้าหมายเพื่อกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตาย การตายของเซลล์มีหลายรูปแบบ โดยรูปแบบที่มีการควบคุม (regulated cell death; RCD) ที่สำคัญ ได้แก่ 4 รูปแบบดังนี้:

2.4.1.1 Apoptosis (programmed cell death): เป็นกระบวนการตายอย่างเป็นระเบียบ ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ สามารถถูกกระตุ้นได้ 2 เส้นทางหลัก<sup>(108)</sup>

- Extrinsic Pathway (death receptor pathway): เริ่มต้นจากสัญญาณภายนอกเซลล์ เช่น FasL หรือ TRAIL มาจับกับ death receptor บนผิวเซลล์ นำไปสู่การกระตุ้น caspase-8

- Intrinsic Pathway (mitochondrial pathway): เริ่มต้นจากความเครียดภายในเซลล์ (เช่น DNA damage, ROS) กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ทำให้ cytochrome c ถูกปล่อยออกมาซึ่งไซโตโครมาสมิ และกระตุ้น caspase-9

ทั้งสองเส้นทางจะมาบรรจบกันที่การกระตุ้น caspase-3 (executioner caspase) ซึ่งจะไปตัดย่อยโปรตีนสำคัญต่างๆ ภายในเซลล์ นำไปสู่การแตกตัวของ DNA (DNA fragmentation) และการหดตัวของนิวเคลียส (pyknosis)<sup>(109)</sup>

2.4.1.2 Autophagy (autophagic cell death): เดิมทีเป็นกระบวนการที่เซลล์ย่อยสลายองค์ประกอบภายในตัวเอง (autophagosome) เพื่อรักษาสมดุลพลังงานและกำจัดออร์แกเนลล์ที่เสียหาย<sup>(110)</sup> ในบริบทของมะเร็ง autophagy มีบทบาทที่ขัดแย้งกัน (dual role)

Tumor Suppression: ในระยะเริ่มต้น autophagy ช่วยกำจัดโปรตีนและไมโทคอนเดรียที่เสียหาย ป้องกันการสะสมของ ROS และความไม่เสถียรของจีโนม ซึ่งช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็ง

Tumor Promotion: ในมะเร็งที่เกิดขึ้นแล้ว เซลล์มะเร็งมักใช้ autophagy เพื่อความอยู่รอดภายใต้สภาวะขาดแคลนสารอาหารหรือออกซิเจน และเพื่อต้านทานต่อยาเคมีบำบัด<sup>(111)</sup> อย่างไรก็ตาม หากกระบวนการนี้ถูกกระตุ้นมากเกินไป (excessive autophagy) ก็สามารถนำไปสู่การตายของเซลล์ได้เช่นกัน

2.4.1.3 Necroptosis: เป็นการตายของเซลล์ในรูปแบบหนึ่งที่มีลักษณะคล้าย necrosis (เซลล์บวมและแตก) แต่ถูกควบคุมด้วยกลไกเฉพาะ (programmed necrosis) โดยเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ไม่สามารถเข้าสู่ apoptosis ได้ (เช่น caspase-8 ถูกยับยั้ง) กลไกนี้อาศัยการทำงานของโปรตีนไคเนส RIPK1 และ RIPK3 ซึ่งจะสร้างสารเชิงซ้อน "necrosome" และกระตุ้นโปรตีน MLKL ให้ไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์<sup>(112)</sup>

2.4.1.4 Ferroptosis: เป็นการตายของเซลล์ที่ขึ้นอยู่กับการสะสมของธาตุเหล็ก (iron-dependent) และการเกิด lipid peroxidation (การที่ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ) อย่างรุนแรง กลไกนี้ถูกยับยั้งโดยเอนไซม์ GPX4 (Glutathione Peroxidase 4) ซึ่งใช้ glutathione (GSH) ในการกำจัด lipid peroxides การยับยั้ง GPX4 หรือการทำให้ GSH หหมดไปจะนำไปสู่การเกิด Ferroptosis<sup>(113)</sup>

## 2.4.2 บทบาทของ Reactive Oxygen Species (ROS) ต่อการตายของเซลล์มะเร็ง

Reactive Oxygen Species (ROS) เช่น superoxide  $O_2^-$ , hydrogen peroxide  $H_2O_2$  และ hydroxyl radical  $OH^-$  เป็นโมเลกุลที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในไมโทคอนเดรีย ROS มีบทบาทขัดแย้งกัน (paradoxical role) ในเซลล์มะเร็ง<sup>(114)</sup>

ระดับต่ำถึงปานกลาง (Pro-tumorigenic): เซลล์มะเร็งมักมีระดับ ROS พื้นฐานสูงกว่าเซลล์ปกติ ซึ่ง ROS เหล่านี้ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ (second messengers) ที่

สำคัญในการกระตุ้นเส้นทางที่ส่งเสริมการแบ่งตัว เช่น PI3K/Akt และ MAPK และยับยั้งเอนไซม์ PTPs (protein tyrosine phosphatases) ทำให้การส่งสัญญาณการเจริญเติบโตเป็นไปอย่างต่อเนื่อง<sup>(115)</sup>

ระดับสูง (Anti-tumorigenic): เมื่อระดับ ROS สูงเกินกว่าที่ระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant system) ของเซลล์ (เช่น GSH, catalase) จะรับมือ จะก่อให้เกิด ความเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) อย่างรุนแรง ซึ่งจะไปทำลายโมเลกุลชีวภาพต่างๆ ทั้ง DNA, โปรตีน และไขมัน<sup>(116)</sup>

การเพิ่มระดับ ROS ให้สูงถึงจุดที่เป็นพิษ (toxic threshold) ถือเป็นกลไกหนึ่งในการรักษามะเร็ง ROS ในระดับสูงสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ โดยเฉพาะ Apoptosis ผ่านการทำลายไมโทคอนเดรียโดยตรง นำไปสู่การสูญเสียศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondrial membrane potential) และการปล่อย cytochrome c<sup>(115)</sup> นอกจากนี้ ROS ยังสามารถกระตุ้นเส้นทาง ASK1-JNK/p38 MAPK ซึ่งเป็น stress-activated pathway ที่ส่งสัญญาณให้เซลล์เข้าสู่ Apoptosis<sup>(117)</sup>

สารพฤกษเคมี (phytochemicals) หลายชนิด เช่น naringin และ quercetin ถูกพบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยการปรับเปลี่ยนสมดุล ROS ภายในเซลล์ โดยสารเหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็น "pro-oxidant" ในเซลล์มะเร็ง (ต่างจากฤทธิ์ "anti-oxidant" ในเซลล์ปกติ) เพื่อเพิ่ม ROS ให้สูงถึงระดับที่กระตุ้นการเกิด apoptosis ผ่านการทำลายศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย และการกระตุ้น caspase cascade<sup>(118, 119)</sup>

### 2.4.3 ฟลาโวนอยด์และกลไกการต้านมะเร็ง

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นกลุ่มสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่พบได้ทั่วไปในพืช ผัก และผลไม้ มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และที่สำคัญคือ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง<sup>(120)</sup> กลไกหลักที่ฟลาโวนอยด์ใช้ในการต้านมะเร็ง ได้แก่:

1. การยับยั้งเส้นทางสัญญาณที่ส่งเสริมการรอดชีวิต (pro-survival pathways): เส้นทาง PI3K/Akt/mTOR เป็นหนึ่งในเส้นทางที่มักถูกกระตุ้นมากผิดปกติในมะเร็งลำไส้ใหญ่ เส้นทางนี้ส่งเสริมการแบ่งตัว การเจริญเติบโต และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ฟลาโวนอยด์หลายชนิด เช่น Quercetin และ Luteolin สามารถยับยั้งโปรตีนไคเนสในเส้นทางนี้ เช่น PI3K หรือ Akt โดยตรง ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญเติบโต<sup>(121)</sup>

2. การกระตุ้นเส้นทางยับยั้งเนื้องอก (tumor suppressor pathways): ฟลาโวนอยด์สามารถกระตุ้นการทำงานของยีน p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor ที่สำคัญ เมื่อ p53 ถูกกระตุ้น (เช่น จากการที่ฟลาโวนอยด์ก่อให้เกิด ROS หรือ DNA damage) มันจะสั่งให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวเพื่อซ่อมแซม DNA หรือหากเสียหายรุนแรง p53 จะกระตุ้นให้เกิด apoptosis<sup>(122)</sup>

3. การเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวัฏจักรเซลล์ (cell cycle arrest): เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวอย่างต่อเนื่อง ฟลาโวนอยด์สามารถขัดขวางกระบวนการนี้ โดยมักจะเหนี่ยวนำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G0/G1 หรือ G2/M ของวัฏจักรเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถจำลอง DNA และแบ่งตัวต่อไปได้<sup>(123)</sup>

งานของ Jun Hong และ Seung Ho (2024) ได้รายงานยืนยันว่าฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม flavanones เช่น naringin และ naringenin (ซึ่งเป็นรูปแบบ aglycone ของ naringin) มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวน (anti-proliferation) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่สายพันธุ์ Caco-2 และ HT-29 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับกลไกที่กล่าวมาข้างต้น<sup>(124)</sup>

#### 2.4.4 กลไกการออกฤทธิ์ของ Naringin ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

Naringin (Naringenin-7-O-neohesperidoside) เป็นฟลาโวนอยด์หลักที่ให้รสขมในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruits) มีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่สนับสนุนฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ของ naringin ผ่านกลไกที่หลากหลายและสัมพันธ์กัน ดังนี้:

1. การเพิ่ม ROS และกระตุ้น Mitochondrial Dysfunction: Naringin ทำหน้าที่เป็น pro-oxidant ในเซลล์มะเร็ง โดยเพิ่มการผลิต ROS ภายในเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การสูญเสียเสถียรภาพของศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย<sup>(125)</sup>

2. การกระตุ้น Intrinsic Apoptosis: การที่ไมโทคอนเดรียทำงานผิดปกติ จะส่งผลกระทบต่ออัตราส่วนของโปรตีนในตระกูล Bcl-2 โดย naringin จะลดการแสดงออกของ Bcl-2 (โปรตีนต้านการตาย) และเพิ่มการแสดงออกของ Bax (โปรตีนกระตุ้นการตาย) การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนนี้ (Bax/Bcl-2 ratio) ทำให้ cytochrome c ถูกปล่อยออกจากไมโทคอนเดรีย เข้าสู่ไซโตพลาสซึม และกระตุ้น caspase-9 และ caspase-3 ตามลำดับ<sup>(125)</sup>

3. การยับยั้งเส้นทาง PI3K/Akt และ NF- $\kappa$ B: ดังที่กล่าวไปแล้วว่า PI3K/Akt เป็นเส้นทางแห่งการอยู่รอด Naringin สามารถยับยั้งการเติมฟอสเฟต (phosphorylation) ของ Akt ซึ่งเป็นการยับยั้งการทำงานของเส้นทางนี้<sup>(126)</sup> นอกจากนี้ naringin ยังสามารถยับยั้งเส้นทาง NF- $\kappa$ B ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมการอักเสบและการต้านทานต่อ apoptosis โดย naringin อาจ

ยับยั้งการสลายตัวของ IKB $\alpha$  ซึ่งเป็นโปรตีนที่คอยยับยั้ง NF-KB<sup>(127)</sup> เมื่อทั้งสองเส้นทางนี้ถูกยับยั้ง เซลล์มะเร็งจะสูญเสียสัญญาณการอยู่รอดและเข้าสู่ภาวะ apoptosis ได้ง่ายขึ้น

4. การเหนี่ยวนำ G0/G1 Arrest: Naringin สามารถหยุดวัฏจักรเซลล์ในระยะ G0/G1<sup>(128)</sup> กลไกที่เกี่ยวข้องคือการลดระดับการแสดงออกของโปรตีน Cyclin D1 และ CDK4/6 (Cyclin-dependent kinases 4/6) ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่ผลักดันให้เซลล์ผ่านจากระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S (synthesis) พร้อมกันนั้น naringin ยังเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนยับยั้ง CDK เช่น p21 และ p27<sup>(129)</sup> ผลลัพธ์คือเซลล์มะเร็งไม่สามารถสังเคราะห์ DNA และแบ่งตัวต่อไปได้

#### 2.4.5 การพัฒนา naringin ในรูปแบบ phytosome เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

แม้ว่า naringin จะมีศักยภาพในการต้านมะเร็งสูงในระดับห้องปฏิบัติการ แต่การนำไปใช้ทางคลินิกยังมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ ค่าการละลายน้ำต่ำ (low water solubility) และ ค่าชีวประสิทธิผลต่ำ (low oral bioavailability) เมื่อรับประทาน<sup>(130)</sup> naringin จะถูกเมตาบอลิซึมโดยแบคทีเรียในลำไส้ให้กลายเป็น naringenin และถูกดูดซึมได้น้อยมาก

เพื่อแก้ปัญหานี้ เทคโนโลยีไฟโตโซม (phytosome technology) จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ ไฟโตโซม คือสารเชิงซ้อน (complex) ที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของสารพฤษเคมี (เช่น naringin) กับฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เช่น phosphatidylcholine โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างกัน<sup>(29)</sup> โครงสร้างนี้แตกต่างจากลิโปโซมซึ่งเป็นถุงไขมันที่มีช่องว่างตรงกลาง

ข้อดีของไฟโตโซมคือการเปลี่ยนโมเลกุล naringin ที่ชอบน้ำ ให้กลายเป็นสารเชิงซ้อนที่มีคุณสมบัติเป็น amphipathic (มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและชอบไขมัน) ทำให้สามารถเพิ่มการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นไขมันได้ดีขึ้น และยังเพิ่มการคงตัว (stability) ของสาร ป้องกันการถูกทำลายก่อนที่จะถูกดูดซึม<sup>(130)</sup> เทคโนโลยีนี้ประสบความสำเร็จในการเพิ่มการดูดซึมของฟลาโวนอยด์อื่นๆ เช่น quercetin (Quercetin<sup>®</sup>) มาแล้ว<sup>(131)</sup>

งานวิจัยของ Jairam และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของ naringin ต่อการเหนี่ยวนำ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2 และ HL-60 โดยพบว่า naringin สามารถกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ในเซลล์ทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยการทดสอบด้วย flow cytometry และการย้อมสี DNA พบว่าเซลล์มีลักษณะของการตายแบบโปรแกรม (apoptosis) เช่น การหดตัวของนิวเคลียสและการแตกตัวของ DNA นอกจากนี้ การศึกษาด้วยการย้อมสี TUNEL และการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis เช่น caspase-3 และ PARP ยังยืนยันผลการเหนี่ยวนำ apoptosis ของ naringin ในเซลล์มะเร็งลำไส้

ใหญ่ชนิด Caco-2 การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า naringin มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผ่านการเหนี่ยวนำ apoptosis<sup>(132)</sup>

#### 2.4.6 การประเมิน Cytotoxicity ของ phytosome naringin

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เป็นขั้นตอนพื้นฐานในการประเมินสารต้านมะเร็ง โดยนิยมใช้ MTT assay ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต ที่สามารถเปลี่ยนเกลือ MTT (สีเหลือง) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ formazan (สีม่วง) หากเซลล์ตาย เอนไซม์นี้จะไม่ทำงาน ทำให้สีไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

งานวิจัยของ Ratana และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของ naringin ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเหนี่ยวนำ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด WiDr โดยพบว่า naringin สามารถลดความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้การทดสอบ MTT assay และพบว่า IC<sub>50</sub> ของ naringin อยู่ที่ประมาณ 172  $\mu$ M. การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า naringin มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ผ่านการปรับเปลี่ยนการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและการตายของเซลล์<sup>(133)</sup>

กลไกความเป็นพิษของ naringin ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด WiDr คือการกระตุ้น intrinsic apoptosis ผ่านการปล่อย cytochrome c จากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอล และการกระตุ้น caspase cascade (caspase-9 และ caspase-3) นอกจากนี้ยังพบว่า naringin สามารถลดการแสดงออกของ โปรตีนต้านการตาย (anti-apoptotic proteins) เช่น Bcl-2 และ survivin ซึ่งส่งผลให้เซลล์มะเร็งเข้าสู่ apoptosis อย่างมีประสิทธิภาพ<sup>(133)</sup>

Survivin (หรือ BIRC5) เป็นโปรตีนในกลุ่ม inhibitor of apoptosis protein (IAP) ที่แทบจะไม่พบในเนื้อเยื่อปกติ แต่จะแสดงออกสูงมากในเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ รวมถึงมะเร็งลำไส้ใหญ่<sup>(134)</sup> การแสดงออกของ survivin สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognosis) และการดื้อยา<sup>(135)</sup> หน้าที่ของมันคือการยับยั้งการทำงานของ caspase-3 และ -7 โดยตรง การที่ naringin-phytosome สามารถลดระดับ survivin ได้ จึงเป็นการทำลายเกราะป้องกันการตายของเซลล์มะเร็ง และทำให้เซลล์ไวต่อการเข้าสู่ apoptosis มากขึ้น

#### 2.4.7 บทสรุปของการทบทวนวรรณกรรม

จากการทบทวนวรรณกรรมทั้งหมด สรุปได้ว่า มะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดจากความผิดปกติของยีนและการส่งสัญญาณหลายเส้นทาง (เช่น Wnt, PI3K/Akt) รวมถึงสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการอักเสบและภาวะ ROS (TME) Naringin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ธรรมชาติ มีศักยภาพในการต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการออกฤทธิ์หลายเป้าหมาย (multi-target) ได้แก่ การเพิ่ม ROS

ภายในเซลล์มะเร็งจนถึงระดับที่เป็นพิษ, การกระตุ้น intrinsic apoptosis (ผ่านการปรับอัตราส่วน Bax/Bcl-2, ปล่อย cytochrome c, กระตุ้น caspases), การยับยั้งเส้นทางการอยู่รอด (PI3K/Akt, NF-KB) และการหยุดวัฏจักรเซลล์ (G0/G1 arrest)

อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดด้านเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ที่สำคัญของ naringin คือการละลายน้ำและการดูดซึมต่ำ การพัฒนา naringin ในรูปแบบ phytosome ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนกับฟอสโฟลิปิด จึงเป็นแนวทางใหม่ในการพัฒนาระบบนำส่ง (delivery system) ที่มีประสิทธิภาพ<sup>(9)</sup> งานวิจัยยืนยันว่า naringin-phytosome สามารถเพิ่มการดูดซึมเข้าสู่เซลล์และเพิ่มฤทธิ์การต้านมะเร็ง (เช่น การลด cell viability และการยับยั้ง survivin) ได้ดีกว่า naringin อิสระอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น naringin-phytosome จึงมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาเสริมในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่<sup>(136)</sup>



### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Hot plate (WiseTherm, Wisd Laboratory Instrument, Korea)
2. Ultra-sonicator (Elma, Elmasonic S, Germany)
3. Analytical balance (5 digits) (Mettler Toledo XS205DU, Switzerland)
4. Optical Microscope equipped with cellSens Standard Digital Imaging (Olympus BX53 and Olympus DP26, Tokyo, Japan)
5. Photon Correlation Spectrometer (PCS) (Zetasizer<sup>®</sup> Pro, Malvern Instruments, UK)
6. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometer (Spectrum TWO, PerkinElmer, Shelton, CT, USA)
7. UV-Visible Spectrophotometer (Shimadzu UV-2700i, Kyoto, Japan)
8. Ultracentrifuge machine

##### 2. สารเคมี

1. Naringin (NG) (Myskinrecipes, Bangkok, Thailand)
2. Phosphatidylcholine (PTC) (Myskinrecipes, Bangkok, Thailand)
3. Cholesterol (CHO) (Myskinrecipes, Bangkok, Thailand)
4. Polyethylene glycol 400 (PEG 400) (PC drug center, Thailand)
5. Polyethylene glycol 1500 (PEG 1500) (PC drug center, Thailand)
6. Polyethylene glycol 4000 (PEG 4000) (PC drug center, Thailand)
7. Lauroyl PEG-32 Glycerides (Gelucire<sup>®</sup> 44/14) (Gattefossé, Neuilly-Sur-Seine, France)
8. Absolute ethanol (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
9. Sodium Hydroxide
10. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (Gibco<sup>®</sup> by Life Technologies™)

11. Fetal bovine serum, FBS (Gibco®, EU Approved Origin South America)
12. Penicillin Streptomycin (1 0 , 0 0 0 Units/mL penicillin, 1 0 , 0 0 0 µg/mL Streptomycin) (Gibco®, Life Technologies)
13. MTT (3 - ( 4 , 5 -dimethylthiazol-2 -yl) -2 , 5 -diphenyltetrazolium bromide (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)
14. Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
15. Phosphate-buffered solution (PBS) Tablets (Gibco® by Life Technologies™ , NY, USA)

### 3. วิธีการทดลอง

#### 3.1 การเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน (naringin phytosome)

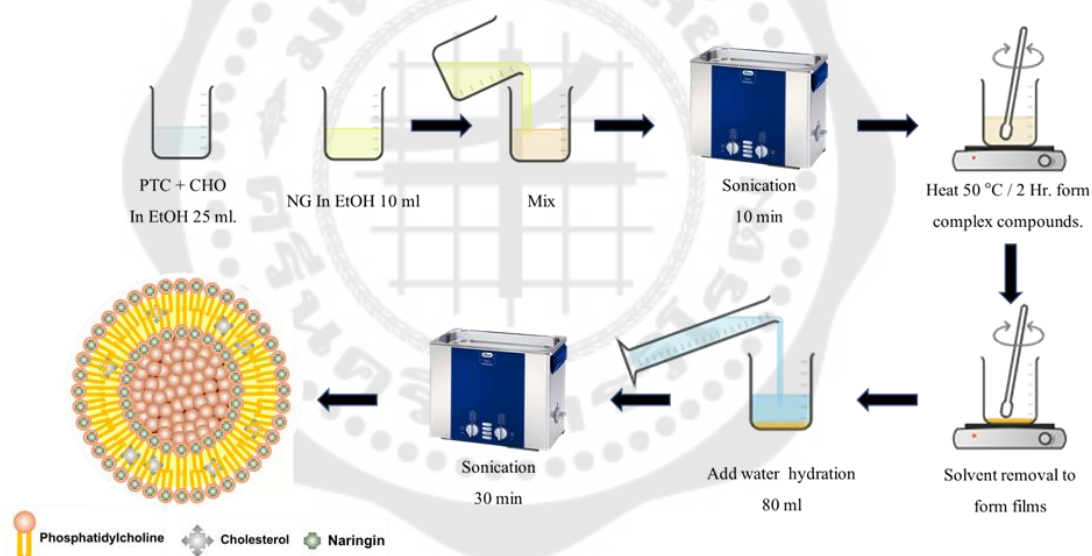
##### 3.1.1 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของนารินจิน (naringin, NG) ต่อฟอสฟาทีดิลโคลีน (phosphatidylcholine, PTC)

ไฟโตโซมของนารินจินถูกเตรียมด้วยวิธี solvent evaporation โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง NG : PTC เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 โดยโมล ตาราง 4 แสดงน้ำหนักและปริมาตรของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมไฟโตโซมของนารินจินที่อัตราส่วนต่างๆ การเตรียมไฟโตโซมทำโดยละลาย PTC และคอเลสเตอรอล (cholesterol, CHO) ในเอทานอล 25 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ที่ 1 แยกละลาย NG ด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ที่ 2 ผสมส่วนประกอบทั้งสองบีกเกอร์เข้าด้วยกันแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นผสมด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนได้สารละลายใส นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยการวางใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จนเกิดเป็นฟิล์มเคลือบที่ก้นบีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำลงในตัวอย่าง (hydration) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที เพื่อสร้างอนุภาคไฟโตโซม ซึ่งสังเกตได้จากการเกิดเป็นคอลลอยด์สีขาวขุ่นที่สม่ำเสมอ

ตาราง 4 น้ำหนักของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินที่อัตราส่วนโดยโมลที่ศึกษา

Ingredient	Blank (PB)	Molar ratio of NG : PTC			
		1:1 (P1)	1:2 (P2)	1:3 (P3)	1:4 (P4)
Phosphatidylcholine, PTC (mg)	500.00	133.68	267.36	401.03	534.71
Cholesterol, CHO (mg)	150.00	40.10	80.21	120.31	160.41
Naringin, NG (mg)	-	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ กำหนดให้อัตราส่วนระหว่าง PTC : CHO คงที่

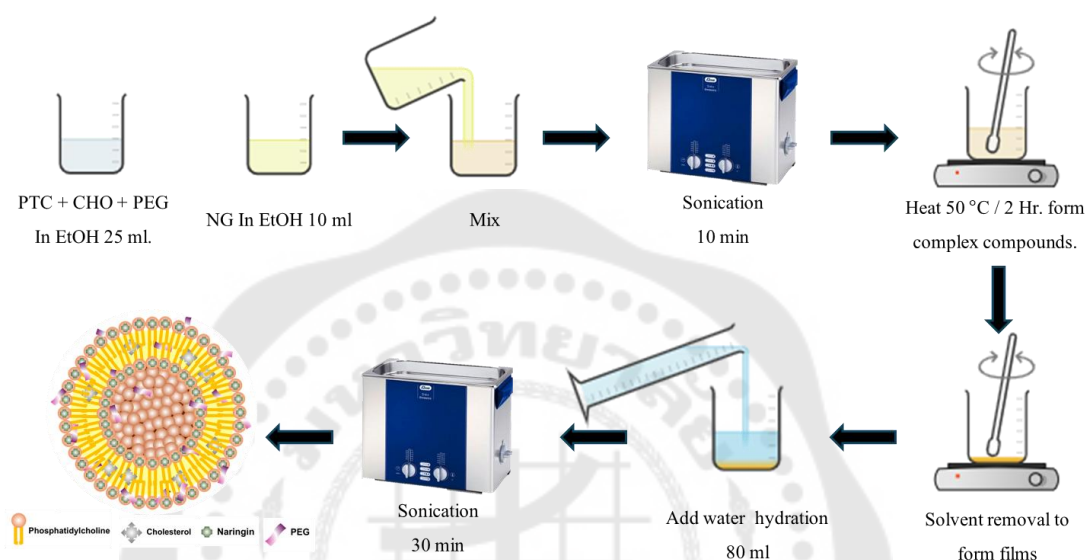


ภาพประกอบ 5 การเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินด้วยวิธี solvent evaporation

### 3.1.2 การศึกษาผลของอนุพันธ์พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG derivatives) ต่อไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน

ทำการคัดเลือกตำรับที่มีอัตราส่วนโดยโมลระหว่าง NG : PTC ที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อ 3.1.1 เพื่อใช้เป็นตำรับหลักในการศึกษาเปรียบเทียบผลของการผสมอนุพันธ์ของ PEG ทั้งนี้การเตรียมไฟโตโซมของนารินจินที่ผสมอนุพันธ์ของ PEG ทำเช่นเดียวกับการเตรียมไฟโตโซมของนารินจินที่แสดงในข้อ 3.1.1 โดยอนุพันธ์ของ PEG ที่ศึกษา ได้แก่ PEG 400, PEG

1500, PEG 4000 และ Gelucire® 44/14 (Lauroyl PEG-32 Glycerides) น้ำหนักของอนุพันธ์ของ PEG ที่ใช้ในการเตรียมแต่ละตำรับแสดงในตาราง 5 โดยทำการผสมอนุพันธ์ของ PEG ในปีกเกอร์ของ PTC และ CHO ก่อนนำมาผสมกับสารละลาย NG ในเอทานอล แล้วเตรียมเป็นไฟโตโซมด้วยกระบวนการเช่นเดียวกับที่แสดงในข้อ 3.1.1 ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 การเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินและผสมอนุพันธ์ด้วยวิธี solvent evaporation

ตาราง 5 น้ำหนักของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินและผสมอนุพันธ์ของ PEG

Ingredient	P4-A	P15-A	P40-A	G-A
PTC (mg)	534.71	534.71	534.71	534.71
CHO (mg)	160.41	160.41	160.41	160.41
NG (mg)	100.00	100.00	100.00	100.00
PEG 400 (mg)	163.11	-	-	-
PEG 1500 (mg)	-	163.11	-	-
PEG 4000 (mg)	-	-	163.11	-
Gelucire® 44/14 (mg)	-	-	-	163.11

หมายเหตุ ตำรับ XX-A เป็นการเติมอนุพันธ์ของ PEG เพิ่มจากเดิมในอัตราส่วน 1:1 เทียบกับ CHO

### 3.2 การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน

#### 3.2.1 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (particle size) และศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential) บนพื้นผิวของไฟโตโซม

ทำการศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีต้าบนพื้นผิวของไฟโตโซมด้วยเทคนิค photon correlation spectroscopy (dynamic light scattering) เริ่มจากการบีบอัดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร มากระจายใน deionized water ให้ได้ 10 มิลลิลิตร สุ่มตัวอย่างบรรจุใน glass cuvette แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer ที่กำหนดอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ใช้ค่า refractive index ของ phospholipid เท่ากับ 1.45 กำหนดให้แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง บันทึกค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (z-average) และค่าแสดงการกระจายขนาดอนุภาค (polydispersity index, PDI) ที่ควรมีค่าต่ำกว่า 0.5 ซึ่งแสดงถึงความใกล้เคียงกันของขนาดอนุภาค กรณีการวิเคราะห์ศักย์ไฟฟ้าซีต้าจะบรรจุตัวอย่างที่เจือจางแล้วใน folded capillary zeta cuvette แล้วนำไปวิเคราะห์ในสภาวะเช่นเดียวกับที่ระบุข้างต้น บันทึกเป็นค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

#### 3.2.2 การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบ (molecular interaction) ในไฟโตโซม

ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบในไฟโตโซม โดยเฉพาะระหว่างนารินจินและฟอสฟาทีดิลโคลีนด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) โดยเลือกตัวอย่างที่เหมาะสมจากการเตรียมไฟโตโซมทั้งที่มีและไม่มีอนุพันธ์ของ PEG (ข้อ 3.1.1 และ 3.1.2) นำมากรองด้วยเมมเบรนไนลอนรูเปิด 0.2 ไมโครเมตร ปล่อยให้ตัวอย่างแห้งที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์เทียบกับสารผสมทางกายภาพ (physical mixture) ในช่วง wavenumber 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  (256 scans)

#### 3.2.4 การวิเคราะห์ร้อยละของประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (encapsulation efficiency, %EE) ของไฟโตโซมนารินจิน

ทำการศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มนารินจินในไฟโตโซมโดยวิธีอ้อม (indirect method) ที่ดัดแปลงจาก Xiao-Lei Yu และคณะ(2023) เริ่มจากการนำไฟโตโซมไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกนารินจินที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้มให้อยู่ส่วนใส (supernatant) ด้านบนของตัวอย่าง บีบอัด supernatant ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม absolute ethanol 5 มิลลิลิตร และ NaOH 4 M ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อให้เกิดผลให้เข้ากันด้วย vortex mixer ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย deionized water จากนั้นนำไปให้

ความร้อนด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตัวอย่างจะมีสีเหลือง เมื่อครบเวลาแล้วรอให้ตัวอย่างเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer<sup>(137)</sup> ที่ความยาวคลื่น 242 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่ไว้วัดถูกหาค่า  $\lambda_{max}$  โดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer Shimadzu UV-2700i การคำนวณร้อยละของประสิทธิภาพการห่อหุ้มทำได้โดยขั้นตอนดังนี้

1. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณให้ได้ค่า  $y$  จาก สมการ  $y = ax+b$
2. นำค่า  $y$  คูณปริมาตรรวมของการเตรียมสารละลายก่อนวัดค่าดูดกลืนแสง เช่น (Conc. sample absorbance ( $\mu\text{g}$ ) =  $y \times 10$ )
3. เมื่อได้ค่า Conc. sample absorbance นำไปเทียบบัญญัติไตรยางค์ของ ปริมาตรของตำรับที่เตรียมได้ เช่น (Free non-entrapped drug ( $\mu\text{g}$ ) = (Conc sample absorbance  $\times 80$ )/0.5) โดย 0.5 หมายถึง ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการเตรียมวันค่าดูดกลืนแสงจากนั้น 80 หมายถึงปริมาตรของตำรับที่เตรียมได้
4. เมื่อได้ค่า Free non-entrapped drug แล้วทำการเปลี่ยนหน่วยจาก  $\mu\text{g}$  เป็น mg โดยการหาร 1000 และคำนวณร้อยละของประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ตามสมการภาพประกอบ 7

$$\% \text{ Encapsulation Efficiency} = \frac{\text{Total drug added} - \text{free non-entrapped drug}}{\text{Total drug added}} \times 100$$

ภาพประกอบ 7 สมการการหา % Encapsulation Efficiency

Total drug added = ปริมาณยาทั้งหมดที่ใส่เข้าไปในสูตรตอนเริ่มต้น (ก่อนทำการห่อหุ้ม)

Free non-entrapped drug = ปริมาณยาที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้มอยู่ในระบบนำส่ง

การวิเคราะห์ร้อยละของประสิทธิภาพการห่อหุ้มจะอาศัยปฏิกิริยา alkaline degradation ของ flavonoid ดังภาพประกอบ 8 โดยฟลาโวนอยด์ทำปฏิกิริยากับสารละลายต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หมู่คาร์บอนิล (C=O) บนวง C-ring จะถูกโจมตีโดยไฮดรอกไซด์ ( $\text{OH}^-$ ) ทำให้พันธะภายในวงไพราโนนเกิดการแตกออก ส่งผลให้วง C-ring ถูกเปิดออก (ring-opening) และเกิดกระบวนการจัดเรียงตัวใหม่ของพันธะ (rearrangement) โดยกระบวนการดังกล่าวก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์หลักสองชนิด ได้แก่



การเตรียมสารละลาย naringin เพื่อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ phytosome-naringin (1.25 mg/mL หรือ 1250 µg/mL) เริ่มจากการชั่งผง naringin ปริมาณ 12.5 มิลลิกรัม และละลายใน DMSO ปริมาตรเล็กน้อยประมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อช่วยให้สารละลายได้สมบูรณ์ จากนั้นเติม medium ลงไปที่ละน้อยจนได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิตร จะได้สารละลาย naringin ที่มีความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยมีปริมาณ DMSO ไม่เกิน 1% v/v ซึ่งปลอดภัยต่อเซลล์ในการทดสอบ จากนั้นนำสารละลาย stock ดังกล่าวมาเตรียมสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทดสอบ cell viability โดยทำการเจือจางด้วย medium ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1125, 1000, 875, 750, 625, 500, 375, 250 และ 125 µg/mL ตามลำดับ โดยใช้ปริมาตรของ stock 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 มิลลิตร ผสมกับ medium ให้ครบ 1 มิลลิตรในแต่ละหลอด ทั้งนี้สารละลาย naringin ที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ phytosome-naringin ช่วยให้สามารถเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างรูปแบบ phytosome และผง naringin ได้อย่างถูกต้องและสอดคล้องกัน

การทดสอบความเป็นพิษของไฟโตโซมามารินจินถูกประเมินโดยการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) เซลล์ caco-2 cell line ถูกเพาะเลี้ยง (8000 เซลล์ ต่อหลุม) บนจาน 96 หลุมจนเซลล์เติบโตจนเต็มพื้นที่ จากนั้นตัวอย่างไฟโตโซมในความเข้มข้นต่างๆ (15–500 µg/mL) ถูกใส่ลงในแต่ละหลุมและเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายที่ไม่มีตัวอย่างผสมถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ หลังจากการนำตัวอย่างออกแล้ว เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง การมีชีวิตของเซลล์ถูกประเมินโดยการทดสอบ MTT โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตุ๊กกลาง (media) เพาะเลี้ยงที่มี MTT (ปีเปต MTT 50 µl ใน PBS 5 mg/ml) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากการเพาะเลี้ยง ตุ๊กกลางถูกนำออกและเติม DMSO 200 µL เพื่อให้ผลึกฟออร์มาซันละลาย และเติมโซเรนเซนไกลซินบัฟเฟอร์ pH 10.5 และหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm เพื่อวัดค่าการดูดซับแสงของผลิตภัณฑ์ฟออร์มาซัน เปอร์เซ็นต์ของการมีชีวิตของเซลล์ถูกคำนวณจากอัตราส่วนของการดูดซับแสงเฉลี่ยของเซลล์ที่ได้รับการรักษาด้วยตัวอย่าง และการดูดซับแสงเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมดังสมการในภาพประกอบ 9

$$\% \text{cell viability} = \left( \frac{\text{absorbance of treated group}}{\text{absorbance of control group}} \right) \times 100$$

ภาพประกอบ 9 สมการการหา % cell viability

## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

#### 4.1 การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน

##### 4.1.1 การศึกษาของอัตราส่วนที่เหมาะสมของนารินจิน (naringin, NG) ต่อ ฟอสฟาทีดิลโคลีน (phosphatidylcholine, PTC)

ในการศึกษานี้ได้เตรียมสูตรตำรับของไฟโตโซมนารินจินโดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของนารินจิน (NG) ต่อฟอสฟาทีดิลโคลีน (PTC) เพื่อประเมินผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ขนาดอนุภาค (particle size), ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค (polydispersity index PDI), ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta potential) และร้อยละการกักเก็บ สารสำคัญ (encapsulation efficiency %EE) ผลการวิเคราะห์แสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ขนาดอนุภาค, ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค, ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิว และร้อยละการกักเก็บ สารสำคัญของไฟโตโซมนารินจิน

Formulation	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	%EE
Blank (PB)	189.80 ± 3.59 <sup>d</sup>	0.35 ± 0.02 <sup>c</sup>	-35.89 ± 0.76 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
P1	151.87 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.00 <sup>a</sup>	-48.17 ± 1.03 <sup>a</sup>	80.56 ± 0.58 <sup>b</sup>
P2	179.23 ± 1.82 <sup>c</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>a</sup>	-35.66 ± 0.41 <sup>b</sup>	82.80 ± 0.55 <sup>bc</sup>
P3	161.87 ± 2.68 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>c</sup>	-29.94 ± 0.60 <sup>c</sup>	85.12 ± 0.27 <sup>cd</sup>
P4	170.93 ± 1.87 <sup>bc</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>a</sup>	-34.57 ± 0.57 <sup>b</sup>	86.12 ± 0.22 <sup>d</sup>

*a, b, c, d* ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) วิเคราะห์โดยใช้ *One-Way ANOVA* และ *Tukey's HSD test* ( $p < 0.05$ ) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกัน ในคอลัมน์เดียวกันถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์พบว่า ขนาดอนุภาคของสูตรตำรับทั้งหมดอยู่ในช่วง 150–180 นาโนเมตร ซึ่งจัดอยู่ในขอบเขตของอนุภาคระดับนาโนเมตร ที่เหมาะสมต่อการนำส่งสารสำคัญ ผ่านเยื่อชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพ<sup>(138)</sup> โดยสูตร P1 มีขนาดอนุภาคต่ำที่สุด (151.87 ± 0.25 nm) สะท้อนถึงการจัดเรียงตัวของโมเลกุล NG และ PTC ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ส่งผลให้เกิดโครงสร้างอนุภาคที่หนาแน่นและมีเสถียรภาพดี

ค่าดัชนีการกระจายตัว (PDI) ของทุกสูตรมีค่าอยู่ระหว่าง 0.2–0.4 ซึ่งแสดงถึงการกระจายตัวของอนุภาคที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ (homogeneous distribution)<sup>(139)</sup> โดยเฉพาะสูตร P1 ที่มีค่า PDI ต่ำที่สุดบ่งชี้ถึงความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคที่สัมพันธ์กับเสถียรภาพของตัวอย่างเมื่อเก็บรักษา

เมื่อพิจารณาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta potential) พบว่าสูตรตำรับทั้งหมดมีค่าเป็นลบในช่วงประมาณ -30 ถึง -50 mV ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงแรงผลัทางไฟฟ้าระหว่างอนุภาค (electrostatic repulsion) เพียงพอที่จะป้องกันการจับกลุ่มกันของอนุภาค (aggregation)<sup>(140)</sup> โดยสูตร P1 มีค่าประจุลบสูงสุด (-48.17 mV) ซึ่งแสดงถึงความเสถียรทางกายภาพที่ดีที่สุด

ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญ (%EE) ของสูตรตำรับทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณ 80-90 % โดยน้ำหนัก โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของ PTC ที่สูงขึ้น ซึ่งให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณของ PTC ต่อ NG ทำให้เกิดการสร้างพันธะระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ NG กับหมู่ฟอสเฟตและโคลีนของ PTC ได้มากขึ้น ส่งผลให้โครงสร้างไฟโตโซมสามารถกักเก็บสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ<sup>(39)</sup> โดยสูตร P4 มีประสิทธิภาพการกักเก็บสูงสุด ( $86.12 \pm 0.22\%$ ) ซึ่งอาจเนื่องมาจากสัดส่วนของ NG ต่อ PTC ที่เหมาะสมต่อการสร้างพันธะภายในชั้นฟอสโฟลิปิด

ดังนั้นสูตร P4 จึงมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อ เนื่องจากมีขนาดอนุภาคที่เหมาะสม การกระจายขนาดอนุภาคเหมาะสม ความเสถียรของอนุภาคอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ และสามารถกักเก็บสารสำคัญได้สูงที่สุดจึงนำสูตร P4 มาพัฒนาต่อโดยการเติม PEG

#### 4.1.2 การศึกษาผลของอนุพันธ์พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG derivatives) ต่อไฟโตโซมวารินจิน

จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่า สูตรตำรับ P4 เป็นสูตรที่มีสมบัติทางเคมีกายภาพเหมาะสมที่สุด ดังนั้นในขั้นตอนต่อมาจึงได้พัฒนาไฟโตโซม โดยการเติมพอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) และอนุพันธ์ของ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ได้แก่ PEG 400, PEG 1500, PEG 4000 และ Gelucire<sup>®</sup> 44/14 เพื่อศึกษาผลของชนิดและขนาดโมเลกุลของ PEG ต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของระบบนำส่งไฟโตโซมที่บรรจุวารินจิน

ผลการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค, ค่าดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค, ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิว และร้อยละการกักเก็บสารสำคัญของแต่ละสูตรตำรับแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ขนาดอนุภาค, ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค, ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวและร้อยละการกักเก็บสารสำคัญของไฟโตโซมนารินจีนที่ผสม PEG และอนุพันธ์ของ PEG

Formulation	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	%EE
P400	136.00 ± 1.45 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>a</sup>	-52.95 ± 0.27 <sup>b</sup>	96.74 ± 0.01 <sup>a</sup>
P1500	258.60 ± 7.56 <sup>c</sup>	0.65 ± 0.11 <sup>d</sup>	-55.25 ± 0.65 <sup>bc</sup>	97.43 ± 0.01 <sup>b</sup>
P4000	248.17 ± 4.65 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.05 <sup>c</sup>	-37.42 ± 0.43 <sup>a</sup>	97.60 ± 0.01 <sup>b</sup>
G4414	365.23 ± 13.14 <sup>d</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>b</sup>	-55.61 ± 1.37 <sup>c</sup>	97.05 ± 0.00 <sup>ab</sup>

*a, b, c, d* ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) วิเคราะห์โดยใช้ *One-Way ANOVA* และ *Tukey's HSD test* ( $p < 0.05$ ) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากตาราง 7 พบว่า สูตรตำรับทั้งหมดที่เติมอนุพันธ์ของ PEG มีขนาดอนุภาคในช่วงประมาณ 130–370 นาโนเมตร ซึ่งยังคงอยู่ในเกณฑ์ของระบบนำส่งระดับนาโนเมตร ขนาดอนุภาคแสดงแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่สูงขึ้น<sup>(141)</sup> โดยสูตร P400 (ผสม PEG 400) มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุด (136.00 ± 1.45 nm) ขณะที่สูตร G4414 (Gelucire® 44/14) มีขนาดอนุภาคใหญ่ที่สุด (365.23 ± 13.14 nm)

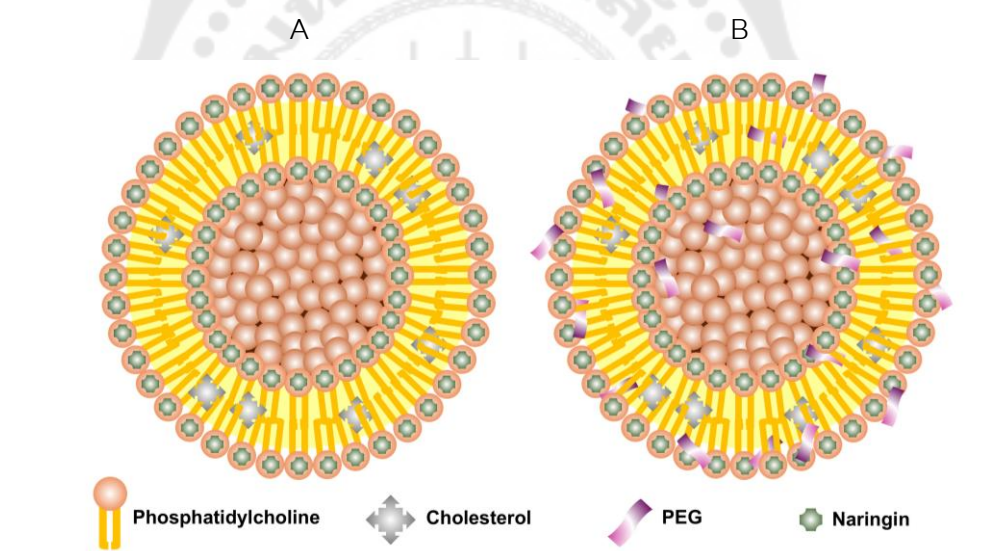
การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักโมเลกุล PEG ส่งผลต่อการยึดตัวของโครงสร้างสายโพลิเมอร์ภายนอกชั้นลิปิด จึงส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของขนาดอนุภาค นอกจากนี้ PEG ยังสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิลของนารินจีน และแรงแวนเดอร์วาลส์กับฟอสโฟลิปิด ส่งผลให้ความหนาแน่นของอนุภาคเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายโซ่โพลิเมอร์

ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค ของสูตรตำรับอยู่ในช่วง 0.2–0.7 โดยสูตร P400 มีค่า PDI ต่ำที่สุดสะท้อนถึงการกระจายของขนาดอนุภาคที่สม่ำเสมอและแสดงแนวโน้มว่ามีเสถียรภาพสูง ส่วนสูตร P1500 มีค่า PDI สูงที่สุด (0.65 ± 0.11) อาจบ่งชี้ถึงการรวมตัวบางส่วนของอนุภาค (partial agglomeration) ซึ่งมักเกิดขึ้นในกรณีที่มี PEG มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและเกิดการพันกันของสายโซ่ (entanglement effect)

เมื่อพิจารณาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิว พบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของทุกสูตรตำรับมีค่าเป็นลบอยู่ในช่วงประมาณ -37 ถึง -56 mV ซึ่งบ่งชี้ถึงความเสถียรทางไฟฟ้าของระบบคอลลอยด์ โดยสูตร G4414 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเป็นประจุลบสูงสุด รองลงมาคือ P1500 และ P400 ซึ่งยังคงมากกว่า -50 mV จัดเป็นระบบที่แสดงแนวโน้มว่ามีความเสถียรทางกายภาพสูง<sup>(142)</sup>

ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญ (%EE) ของสูตรตำรับทั้งหมดมีค่าสูงเกินกว่า 95% โดยน้ำหนักแสดงว่าการเติม PEG หรืออนุพันธ์ของ PEG ไม่ส่งผลกระทบต่อการกักเก็บสารสำคัญ นอกจากนี้ PEG ยังอาจช่วยให้นารินจินผสมเข้ากับฟอสโฟลิปิดและคอเลสเตอรอลได้ดีขึ้น ทำให้สามารถกักเก็บนารินจินได้มากกว่าสูตรตำรับที่ไม่ผสม PEG โดยสูตร P4000 มีประสิทธิภาพการกักเก็บสูงสุด ( $97.60 \pm 0.01\%$ ) ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างสายยาวของ PEG ที่ช่วยลดการรั่วไหลของนารินจินออกจากโครงสร้างไมโทโซม<sup>(39)</sup>

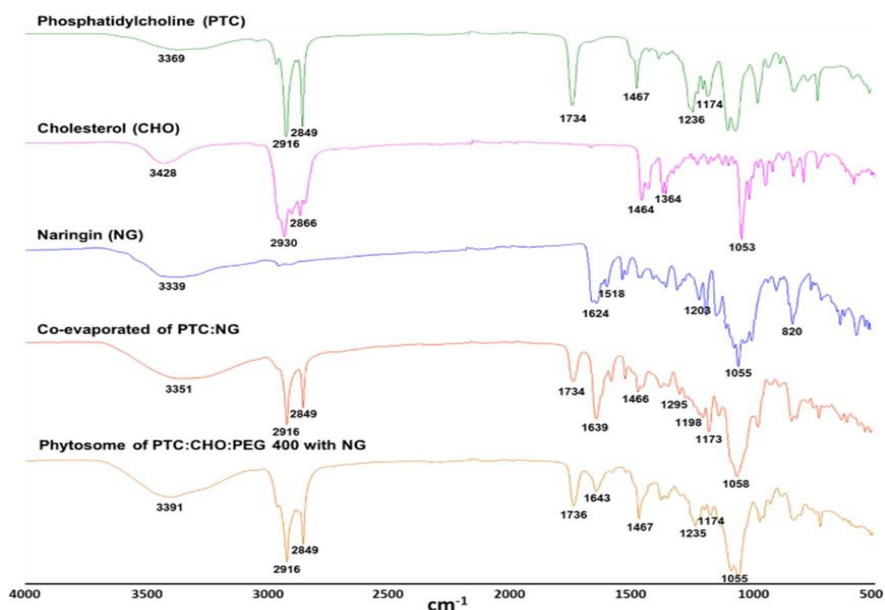
จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า สูตรตำรับ P400 (ตำรับที่ผสม PEG 400) เป็นตำรับที่แสดงสมบัติทางเคมีกายภาพที่เหมาะสมที่สุด โดยมีขนาดอนุภาคเล็ก การกระจายขนาดอนุภาคแคบ ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวสูง และมีประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจินในระดับดีมาก ซึ่งสมบัติเหล่านี้มีแนวโน้มส่งผลเชิงบวกต่อความคงสภาพของระบบในระยะยาวและอาจช่วยส่งเสริมการซึมผ่านเซลล์ซึ่งเป็นเป้าหมายในการทำการทดลองขั้นต่อไป



ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของ (A) ไมโทโซมนารินจินและ (B) ไมโทโซมนารินจินที่ผสมอนุพันธ์ของพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG)

#### 4.1.3 การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบในไมโทโซม

การศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างนารินจิน (NG) กับส่วนประกอบของไมโทโซม ได้แก่ ฟอสฟาติลโคลีน (PTC), คอเลสเตอรอล (CHO) และพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG 400) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในช่วงคลื่น  $4000-500\text{ cm}^{-1}$  ได้ผลดังแสดงในภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 FT-IR สเปกตรัม ของ PTC, CHO, NG, ตัวอย่างระเหยร่วม (co-evaporated sample) ของ PTC ร่วมกับ NG และไฟโตโซมที่ประกอบด้วย PTC:CHO:PEG 400 ที่บรรจุ NG

ผลการวิเคราะห์พบว่า ฟอสฟาติดีลโคลีน (PTC) แสดงแถบดูดกลืนที่  $3369\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ( $-\text{OH}$ ) และอะมิโน ( $-\text{NH}$ ) ที่เกิดจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนในหัวฟอสโฟลิปิดที่ตำแหน่ง  $2849\text{ cm}^{-1}$  และ  $2916\text{ cm}^{-1}$  เป็นการสั่นของหมู่เมทิลีน ( $\text{C}-\text{H}$  stretching) ของหางไฮโดรคาร์บอนที่ตำแหน่ง  $1734\text{ cm}^{-1}$  เป็นการสั่นของหมู่คาร์บอนิล ( $\text{C}=\text{O}$ ) ของเอสเทอร์ซึ่งเป็นพันธะระหว่างกลีเซอรอลกับกรดไขมันที่ตำแหน่ง  $1236\text{ cm}^{-1}$  และ  $1174\text{ cm}^{-1}$  เป็นการสั่นของหมู่ฟอสเฟต ( $\text{P}=\text{O}$  และ  $\text{P}-\text{O}-\text{C}$  ตามลำดับ) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของหัวฟอสโฟลิปิดที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิลของสารสำคัญได้

คอเลสเตอรอล (CHO) แสดงแถบดูดกลืนที่  $3428\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ( $-\text{OH}$ ) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่แอลกอฮอล์ในโครงสร้างสเตอรอลแถบที่  $2930\text{ cm}^{-1}$  และ  $2866\text{ cm}^{-1}$  เป็นการสั่นของหมู่เมทิลีน ( $\text{C}-\text{H}$  stretching) ของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน และแถบที่  $1464\text{ cm}^{-1}$ ,  $1053\text{ cm}^{-1}$  เป็นการสั่นของโครงสร้างคาร์บอนและออกซิเจน ( $\text{C}-\text{C}$ ,  $\text{C}-\text{O}$ ) ซึ่งยืนยันถึงโครงสร้างสเตอรอลของคอเลสเตอรอล

นารินจิน (NG) แสดงแถบการดูดกลืนกว้างที่  $3339\text{ cm}^{-1}$  การสั่นของหมู่ไฮดรอกซิล ( $-\text{OH}$ ) จากหมู่ฟีนอลและแอลกอฮอล์หลายตำแหน่งในโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ แถบที่  $1624\text{ cm}^{-1}$  และ  $1518\text{ cm}^{-1}$  เป็นการสั่นของวงแหวนเบนซีน ( $\text{C}=\text{C}$ ) ในโครงสร้างอะโรมาติก

ของโครงสร้างฟลาโวน และแถบที่  $1203\text{ cm}^{-1}$ ,  $1053\text{ cm}^{-1}$  เป็นการสั่นของหมู่เอเทอร์ (C–O) และ หมู่กลัยโคไซด์ แสดงถึงการมีหมู่น้ำตาลเชื่อมต่อกับส่วน aglycone โดยสเปกตรัมนี้ชี้ให้เห็นถึง ศักยภาพของ NG ในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสารอื่นได้หลายตำแหน่ง

การเตรียมตัวอย่างระเหยร่วม (co-evaporated sample) ระหว่าง PTC กับ NG มีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างสารทั้งสองได้สะดวกขึ้น ทำให้ระบุ แนวโน้มการเกิดอันตรกิริยาระหว่างฟอสโฟลิปิดและสารพฤษเคมีได้ชัดเจนมากขึ้นตามนิยาม ของการเกิดไฟโตโซม โดยสเปกตรัมของ co-evaporated PTC:NG แสดงการเคลื่อน (shift) ของ แถบการดูดกลืนที่  $3351\text{ cm}^{-1}$  และบริเวณ  $1295\text{ cm}^{-1}$  และ  $1173\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นตำแหน่งของหมู่ไฮโดรอกซิลของทั้งสองโมเลกุลและตำแหน่งของหมู่ฟอสเฟตของ PTC ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มการเกิด อันตรกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวจากทั้งสองโมเลกุล โดยคาดว่าเป็นพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ NG กับออกซิเจนในหมู่ฟอสเฟตของ PTC สำหรับการดูดกลืนที่ตำแหน่ง  $2916\text{ cm}^{-1}$  และ  $2849\text{ cm}^{-1}$  (C–H),  $1734\text{ cm}^{-1}$  (C=O) และ  $1055\text{ cm}^{-1}$  (C–O) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ การคงอยู่ของตำแหน่งเดิมแสดงว่าไม่มีการเกิด อันตรกิริยาใดที่บริเวณนี้

กรณีสเปกตรัมของไฟโตโซมที่ประกอบด้วย PTC, CHO, PEG 400 และบรรจุ NG พบความเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ ได้แก่ ไฮดรอกซิล (–OH) ซึ่งเดิมปรากฏที่  $3339\text{ cm}^{-1}$  ของ NG มีการเคลื่อนไปที่  $3391\text{ cm}^{-1}$  และมีลักษณะกว้างขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง หมู่ไฮดรอกซิลของ NG กับหมู่ฟอสเฟต (P=O) ของ PTC หรือหมู่คาร์บอนิลของฟอสโฟลิปิด นอกจากนี้พบว่า แถบการสั่นของวงแหวนเบนซีน (C=C) ของ NG ที่  $1624\text{ cm}^{-1}$  มีการเคลื่อน ตำแหน่งไปที่  $1643\text{ cm}^{-1}$  สะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทางอิเล็กทรอนิกส์ของหมู่ คาร์บอนิลจากการเกิดอันตรกิริยากับลิปิด และการสั่นของหมู่ฟอสเฟต (P=O และ P–O–C) ของ PTC ที่  $1236\text{ cm}^{-1}$  และ  $1174\text{ cm}^{-1}$  มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในหรือรูปร่างของแถบ ซึ่งแสดง ความเป็นไปได้ว่าหมู่ฟอสเฟตมีส่วนร่วมในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ NG

นอกจากนี้ คอเลสเตรอลและ PEG 400 ในสูตรตำรับอาจมีผลต่อการจัดเรียง ตัวของลิปิดและทำให้บางตำแหน่ง เช่น  $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  เกิดการทับซ้อน อย่างไรก็ตามการ เปลี่ยนแปลงของตำแหน่งที่สำคัญยังคงยืนยันได้ว่ามีการเกิดอันตรกิริยาหรือการสร้างสารเชิงซ้อน ระหว่าง NG กับ PTC ภายในโครงสร้างของไฟโตโซม

ผลการวิเคราะห์ด้วย FT-IR แสดงว่าการเตรียมไฟโตโซมที่ประกอบด้วย PTC, CHO, PEG 400 ที่บรรจุสารอินจิน (NG) ส่งผลให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ฟังก์ชันของ

องค์ประกอบต่างๆ ก่อให้เกิดโครงสร้างเชิงซ้อน (phytosomal complex) ที่มั่นคงช่วยเสริมเสถียรภาพโครงสร้างไฟโตโซม ส่งผลให้ระบบนำส่งนี้มีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อการนำส่ง และปลดปล่อยสารสำคัญในเซลล์เป้าหมายต่อไป

#### 4.2 การศึกษาความคงสภาพของไฟโตโซมนารินจิน

การศึกษาความคงสภาพของไฟโตโซมนารินจิน ดำเนินการโดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ขนาดอนุภาค (particle size), ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค (PDI), ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta potential), และประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจิน (%EE) โดยเปรียบเทียบจากวันเริ่มต้นที่ศึกษา (day 0) กับวันที่ 60 ของการศึกษา (day 60) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส โดยผลการศึกษาแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 ขนาดอนุภาค, ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค, ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวและประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจิน

Formulation	Day	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	%EE
P4	Day 0	171.0± 1.80	0.28± 0.01	-34.6± 0.50	86.12± 0.21
P400		136.0± 1.60	0.28± 0.01	-52.9± 0.30	96.74± 0.01
P1500		258.6± 7.50	0.65± 0.11	-55.2± 0.60	97.43± 0.01
P4000		244.7± 5.60	0.48± 0.04	-37.6± 0.40	97.60± 0.01
G4414		365.2± 13.00	0.44± 0.02	-55.6± 1.40	97.05± 0.01
P4	day 60 At 4°C	195.3± 4.50	0.46± 0.06*	-45.9± 1.20	75.52± 0.15*
P400		130.0± 1.20	0.34± 0.03*	-41.5± 0.70*	68.56± 0.07*
P1500		262.6± 3.70	0.75± 0.01	-42.5± 0.20	69.32± 0.11*
P4000		237.9± 2.10	0.56± 0.03	-46.4± 2.60	69.31± 0.01*
G4414		429.7± 2.90*	0.59± 0.05	-49.4± 1.30	68.24± 0.05*
P4	day 60 At 30°C	342.7± 25.90*+	0.68± 0.02*+	-55.4± 1.50	75.48± 0.04*
P400		161.5± 1.90*+	0.42± 0.04*+	-20.9± 0.20*+	60.96± 0.14*+
P1500		562.4± 78.50*+	0.83± 0.06*+	-36.2± 1.40+	62.34± 0.03*
P4000		1917.7± 319.70*+	0.98± 0.03*+	-47.4± 1.70+	61.77± 0.19*
G4414		505.4± 86.80*+	0.71± 0.03*+	-56.1± 2.50*	62.89± 0.06*

\* แสดงถึงค่าเฉลี่ยแตกต่างจาก Day 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) วิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-way

Analysis of Variance (ANOVA) ตามด้วย Tukey's post hoc test

+ แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่ 30°C แตกต่างจาก 4°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) วิเคราะห์ทางสถิติด้วย

Independent-Samples t-test

ผลการศึกษาคงสภาพของไฟโตโซมนารินจีนโดยการเปรียบเทียบผลระหว่าง Day 0 และ Day 60 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การเก็บรักษาไฟโตโซมที่อุณหภูมิ 4°C ทำให้ทุกตัวรับมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น โดยขนาดอนุภาคของ ตัวรับ P4 มีขนาดอนุภาคเพิ่มจาก  $171.0 \pm 1.8$  nm เป็น  $195.3 \pm 4.5$  nm และตัวรับ G4414 เพิ่มจาก  $365.2 \pm 13.0$  nm เป็น  $429.7 \pm 2.9$  nm ( $p < 0.05$ ) สะท้อนถึงการรวมตัวของอนุภาคในระดับจำกัดภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำ<sup>(143)</sup>

ดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) ของทุกตัวรับอยู่ในช่วง 0.3-0.8 ซึ่งเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แสดงถึงการกระจายตัวของอนุภาคมีความไม่สม่ำเสมอและมีเสถียรภาพลดลง ในขณะที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยยังคงมีค่าโดยรวมต่ำกว่า -30 mV ซึ่งบ่งชี้ถึงแนวโน้มความคงตัวของไฟฟ้าของระบบคอลลอยด์<sup>(144)</sup>

อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจีน (%EE) ของทุกตัวรับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น โดยลดลงประมาณ 20–30% ตัวรับ P400 ลดลงจากร้อยละ  $96.74 \pm 0.01$  เหลือ  $68.56 \pm 0.07$  และตัวรับ P1500 ลดจากร้อยละ  $97.43 \pm 0.01$  เหลือ  $69.32 \pm 0.11$  การลดลงดังกล่าวอาจเกิดจากการคลายพันธะระหว่างโมเลกุลฟอสโฟลิปิดกับนารินจีนหรือเป็นผลจากการส่งเสริมการเสื่อมสภาพของผนังไฟโตโซมจากอิทธิพลของ PEG ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี ส่งผลให้นารินจีนบางส่วนรั่วออกจากโครงสร้างไฟโตโซม<sup>(139)</sup>

ในทางตรงกันข้าม การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่งผลกระทบต่อความคงสภาพของไฟโตโซมอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าขนาดอนุภาคของทุกตัวรับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น โดยเฉพาะตัวรับ P4000 และ P1500 ซึ่งมีขนาดอนุภาคเพิ่มจาก  $244.7 \pm 5.6$  nm และ  $258.6 \pm 7.5$  nm เป็น  $1917.7 \pm 319.7$  nm และ  $562.4 \pm 78.5$  nm ตามลำดับ แสดงถึงการรวมตัวของอนุภาคภายใต้อุณหภูมิสูง

ดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคของหลายตัวรับเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะตัวรับ P4000 และ G4414 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.5 แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของอนุภาคที่ไม่สม่ำเสมอและแนวโน้มการเกิดการตกตะกอนของระบบ

ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของตัวรับ P400 เปลี่ยนแปลงจาก  $-52.9 \pm 0.3$  mV เหลือ  $-20.9 \pm 0.2$  mV บ่งชี้ถึงแนวโน้มการลดลงของแรงผลักระหว่างอนุภาค ที่อาจส่งเสริมการรวมตัวกันของอนุภาคได้มากขึ้น

นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจินของทุกสูตรตำรับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะตำรับ P400 และ P4000 ซึ่งเหลือเพียงร้อยละ  $60.96 \pm 0.14$  และ  $61.77 \pm 0.19$  ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Fanfan และคณะ (2022) ที่ระบุว่าอนุภาคนิวเมอซิสสามารถเร่งกระบวนการสลายตัวของฟอสโฟลิปิดและลดความสามารถในการกักเก็บสารออกฤทธิ์ของระบบได้<sup>(145)</sup>

การเปรียบเทียบผลการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าอนุภาคนิวเมอซิสมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาค ดังนั้นการกระจายขนาดอนุภาค และประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจิน โดยขนาดอนุภาคทุกสูตรตำรับมีขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บที่ 30 องศาเซลเซียส มากกว่า 2 เท่าเมื่อเทียบกับการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส สะท้อนให้เห็นถึงผลของอนุภาคนิวเมอซิสต่อการเพิ่มพลังงานจลน์ของระบบและการชนกันระหว่างอนุภาค ซึ่งนำไปสู่การรวมตัว และการเกิดตกตะกอนของระบบนำส่งประเภทถุงขนาดเล็ก (microvesicles)

ดัชนีการกระจายตัวของตำรับที่เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะตำรับที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ ได้แก่ P4000 และ G4414 แสดงถึงความไม่สม่ำเสมอของการกระจายตัวของอนุภาคและแนวโน้มของการตกตะกอนในระบบ

ขณะที่ศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของตัวอย่างเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าโดยรวมลดลงต่ำกว่า  $-30$  mV (ยกเว้นตำรับ P400) บ่งชี้ว่าตำรับยังมีแรงผลักระหว่างอนุภาคและมีแนวโน้มว่ามีเสถียรภาพทางไฟฟ้า อย่างไรก็ตามความแปรปรวนของค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวนี้อาจเกิดจากการที่ PEG ไปรบกวนการจัดเรียงโมเลกุลภายในโครงสร้างของไฟโตโซม โดยเฉพาะ PEG400 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นสายพอลิเมอร์สั้นขนาดเล็กและเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง

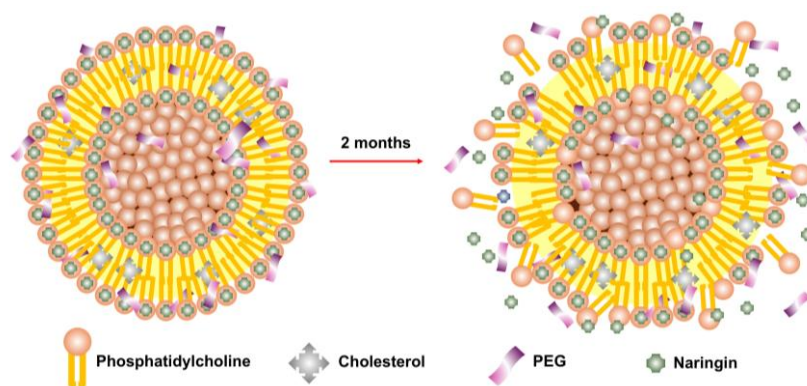
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจินพบว่าทุกสูตรตำรับมีประสิทธิภาพการกักเก็บลดลงเมื่อเก็บที่ 30 องศาเซลเซียส โดยเฉลี่ยลดลงร้อยละ 25–40 ในขณะที่การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ลดลงเพียงร้อยละ 10–20 แสดงถึงผลของอนุภาคนิวเมอซิสต่อการคลายพันธะระหว่างฟอสโฟลิปิดกับนารินจิน และการเร่งการเกิด lipid oxidation ที่ส่งผลให้สารสำคัญรั่วไหลออกจากโครงสร้างได้<sup>(146)</sup>

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างไฟโตโซมที่มี PEG กับตำรับ P4 (ไม่มี PEG) พบว่าการผสมอนุพันธ์ของ PEG ทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจินเพิ่มขึ้นในช่วงเริ่มต้นแต่กลับแสดงแนวโน้มการสูญเสียนารินจินได้มากกว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลาหนึ่ง (พิจารณาจากการเก็บรักษาภายใต้สภาวะทั้งสองอุณหภูมิ) เนื่องจาก PEG มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) สูง ซึ่งอาจ

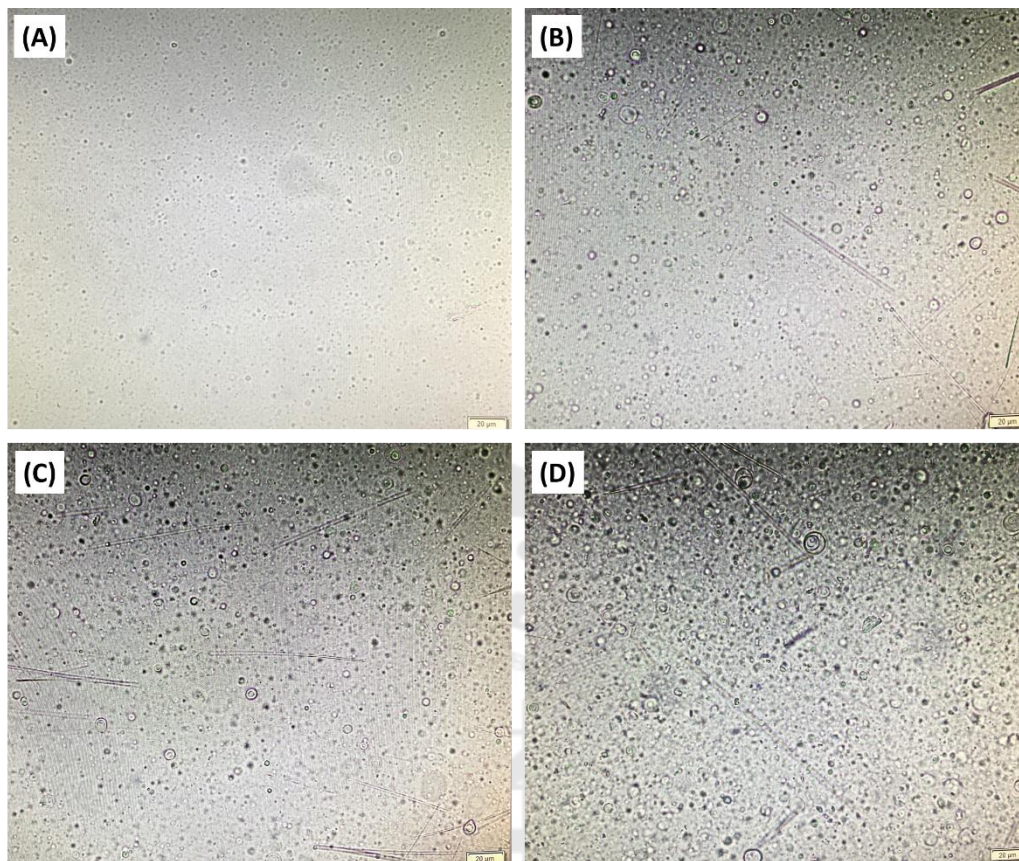
ส่งผลให้โครงสร้างไฟโตโซมสูญเสียความคงสภาพและแตกตัวได้ง่าย จึงเร่งให้เกิดการรั่วไหลของนารินจินออกจากโครงสร้าง ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาตัวรับ P4 ซึ่งไม่มี PEG โครงสร้างไฟโตโซมจึงมีสมบัติชอบน้ำน้อยกว่า ส่งผลให้โครงสร้างมีความคงสภาพและกักเก็บนารินจินได้ดีกว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามปรากฏการณ์นี้อาจเป็นประโยชน์ในกรณีที่ต้องการให้มีการปลดปล่อยสารสำคัญอย่างรวดเร็วเมื่อนำไปใช้ อาจพิจารณาการใส่อนุพันธ์ของ PEG ที่เหมาะสมในตัวรับไฟโตโซม<sup>(147, 148)</sup>

ผลจากการศึกษาความคงสภาพของไฟโตโซมนารินจินพบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ช่วยคงสภาพของอนุภาคไขมันได้ดีกว่า เนื่องจากอนุภาคไขมันจะมีความหนาแน่นและโครงสร้างที่แข็งแรงมากขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลและปฏิกิริยาเคมี เช่น lipid peroxidation เกิดขึ้นช้าลง ส่งผลให้ระบบมีความคงสภาพสูงกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า ในทางกลับกันการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงจะเพิ่มพลังงานจลน์ของอนุภาคและโมเลกุล ทำให้อนุภาคไขมันมีความยืดหยุ่นสูง อนุภาคจึงชนกันและรวมตัวได้มากขึ้น เนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างอนุภาคสามารถเอาชนะแรงผลักทางไฟฟ้าได้ และอาจส่งผลให้นารินจินที่ถูกบรรจุอยู่รั่วไหลออกจากโครงสร้างดังภาพประกอบ 12 การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง<sup>(149-153)</sup>

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและความคงสภาพของไฟโตโซมนารินจินที่เตรียมขึ้นทั้งหมดพบว่าตัวรับ P400 ซึ่งเป็นไฟโตโซมนารินจินที่ผสม PEG400 แสดงสมบัติที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ มีขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคในช่วงที่เหมาะสม สามารถกักเก็บนารินจินได้มากและแสดงแนวโน้มว่ามีความคงสภาพทางเคมีกายภาพที่ยอมรับได้ จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 ต่อไป



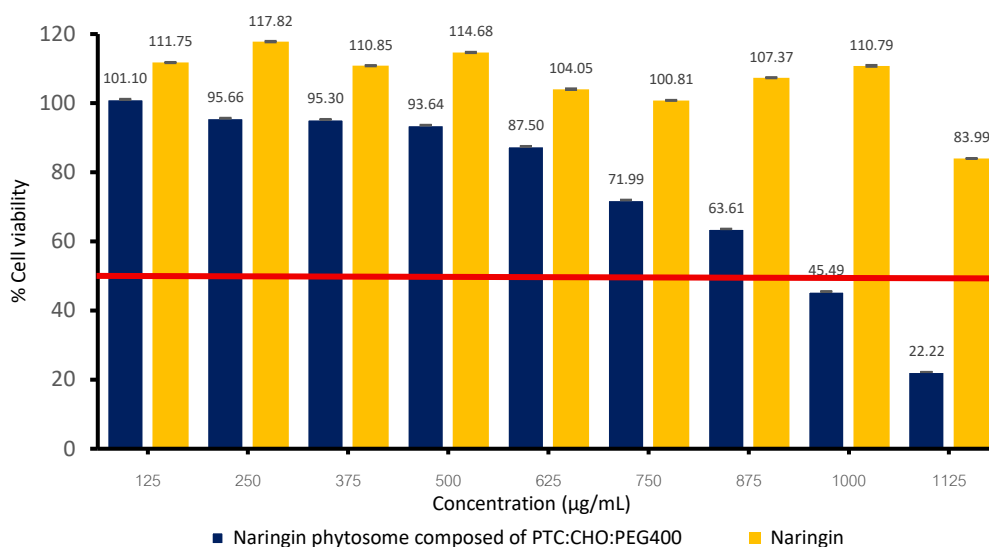
ภาพประกอบ 12 ภาพจำลองการเสื่อมสลายของไฟโตโซมนารินจินในการศึกษาความคงสภาพ



ภาพประกอบ 13 ลักษณะของไฟโตโซมนารินจินจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน (A) ตำรับ P400, (B) ตำรับ P1500, (C) ตำรับ P4000 และ (D) ตำรับ G4414 (scale bar 20  $\mu\text{m}$ )

#### 4.3 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) กับ Caco-2 Cell Line

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของนารินจิน (NG) และไฟโตโซมบรจุนารินจิน ดำเนินการศึกษาด้วยวิธี MTT assay เพื่อประเมินความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 หลังได้รับสารตัวอย่างไฟโนความเข้มข้น 125–1125  $\mu\text{g/mL}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลลัพธ์แสดงเป็นร้อยละการคงอยู่ของเซลล์ (% cell viability) ดังภาพประกอบ 14 และตาราง 9



ภาพประกอบ 14 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ต่อ Caco-2 cell lines ของไฟโตโซมนาารินจินที่ผสม PEG400 เทียบกับนารินจิน

ตาราง 9 ร้อยละการรอดชีวิต (% cell viability) ของเซลล์เมื่อได้รับไฟโตโซมนาารินจินที่ผสม PEG400 เทียบกับนารินจิน

Naringin concentration (µg/mL)	Cell viability (%)	
	Naringin phytosome	Naringin
0	100.00 ± 1.00	100.00 ± 1.00
125	101.10 ± 3.75	111.75 ± 1.25
250	95.66 ± 2.88	117.82 ± 1.55
375	95.30 ± 3.24	110.85 ± 1.36
500	93.64 ± 2.42	114.68 ± 1.36
625	87.50 ± 3.00	104.05 ± 1.73
750	71.99 ± 2.03	100.81 ± 1.10
875	63.61 ± 1.87*	107.37 ± 1.23
1000	45.49 ± 1.64*	110.79 ± 1.98
1125	22.22 ± 0.48*	83.99 ± 0.99*

\* หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Concentration 0 /mL) ( $p < 0.05$ ) วิเคราะห์โดยใช้ One-Way ANOVA และ Dunnett's test ( $p < 0.05$ )

จากผลการทดลอง พบว่า นารินจินอิสระ (free naringin) (ภาพประกอบ 14, แถบสีเหลือง) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ caco-2 อย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเข้มข้น 125–1125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  โดยมีร้อยละการคงอยู่ของเซลล์สูงกว่าร้อยละ 90 ในช่วงการทดสอบ แสดงว่านารินจินรูปแบบปกติมีความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ต่ำ อาจเนื่องมาจากสมบัติทางเคมีของนารินจินที่เป็นฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีขั้ว (polar) และมีการละลายในไขมันต่ำ ทำให้การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีลักษณะเป็นชั้นไขมัน (lipid bilayer) เกิดได้อย่างจำกัด<sup>(154)</sup>

ขณะที่ไฟโตโซมนารินจิน (naringin phytosome) (ภาพประกอบ 14, แถบสีน้ำเงินเข้ม และ ตาราง 9) แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์ caco-2 อย่างชัดเจนในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent) โดยเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ขึ้นไป ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่ความเข้มข้น 750, 875, 1000 และ 1125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  โดยให้ร้อยละการคงอยู่ของเซลล์เท่ากับร้อยละ 71.99, 63.61, 45.49 และ 22.22 ตามลำดับ โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$   $968.89 \pm 6.25$   $\mu\text{g}/\text{mL}$

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า การนำส่งนารินจินในรูปแบบไฟโตโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีกว่านารินจินอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่าโครงสร้างไฟโตโซมมีลักษณะชอบทั้งน้ำและไขมัน (amphiphilic nature) สามารถเข้ากับส่วนไขมัน (lipid bilayer) ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี ช่วยเพิ่มการซึมผ่าน (cellular uptake) ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เข้าสู่เซลล์ได้<sup>(155)</sup>

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า PEG 400 ที่ผสมในไฟโตโซมอาจมีบทบาทเป็นสารช่วยเพิ่มการซึมผ่าน (permeation enhancer) และสามารถยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้<sup>(156)</sup> ลดการขับสารสำคัญออกภายนอกเซลล์ ทำให้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดียิ่งขึ้น โดยทำงานผ่านการยับยั้งเส้นทาง PI3K/AKT/mTOR ซึ่งเป็นเส้นทางส่งสัญญาณชีวภาพที่ส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อ PI3K/AKT ถูกยับยั้งสัญญาณผ่าน AKT จะลดลง ทำให้ mTOR ถูกยับยั้ง ส่งผลให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการสะสมความเครียด ไมโทคอนเดรียเสียหาย และเกิด apoptosis ได้<sup>(126)</sup>

การเพิ่มประสิทธิภาพดังกล่าวสะท้อนภาพรวมของการเพิ่มการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของไฟโตโซมที่เกิดจากโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างนารินจินกับฟอสโฟลิปิดของไฟโตโซมที่ยังทำให้ระบบมีความคงสภาพและนำส่งสารสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นไฟโตโซมนารินจินที่ผสมอนุพันธ์ของพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) จึงมีศักยภาพในการใช้รักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประเมินสมบัติทางเคมีกายภาพของระบบนำส่งไฟโตโซมบรรจุนารินจิน (naringin phytosome) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของนารินจิน โดยครอบคลุมการศึกษาอัตราส่วนของส่วนประกอบ การดัดแปลงด้วยอนุพันธ์พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) การวิเคราะห์อันตรกิริยาระดับโมเลกุล การประเมินความคงสภาพ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

#### 5.1 สรุปผลการศึกษา

##### 5.1.1 การศึกษาสูตรตำรับที่เหมาะสม

การศึกษาได้ดำเนินการพัฒนาสูตรตำรับไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน (Naringin, NG) โดยปรับอัตราส่วนของนารินจินต่อฟอสฟาติลโคลีน (Phosphatidylcholine, PTC) ซึ่งพบว่าตำรับ P4 ที่มีอัตราส่วนโดยโมลระหว่าง NG:PTC เท่ากับ 1:4 แสดงสมบัติทางเคมีกายภาพที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ มีขนาดอนุภาคต่ำกว่า 200 nm และมีการกระจายขนาดอนุภาคต่ำ มีศักย์ไฟฟ้าที่ผิวต่ำกว่า -30 mV ซึ่งแสดงแนวโน้มว่าตำรับมีความคงสภาพทางไฟฟ้าที่ดี และมีประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจินสูงที่ร้อยละ  $86.12 \pm 0.22$

##### 5.1.2 การศึกษาผลของอนุพันธ์พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG derivatives)

เมื่อนำตำรับ P4 มาพัฒนาต่อโดยการเติมอนุพันธ์ของพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) ได้แก่ PEG 400, PEG 1500, PEG 4000 และ lauroyl PEG-32 glycerides (Gelucire® 44/14) พบว่าตำรับ P400 ซึ่งมีการเติม PEG 400 เป็นสูตรที่แสดงสมบัติทางเคมีกายภาพที่เหมาะสมที่สุด โดยมีขนาดอนุภาค  $136.00 \pm 1.45$  nm มีดัชนีการกระจายขนาดอนุภาคเท่ากับ  $0.28 \pm 0.01$  มีศักย์ไฟฟ้าที่ผิว  $-52.9 \pm 0.3$  mV และมีความสามารถในการกักเก็บนารินจิน (%EE) มากกว่าร้อยละ 95

##### 5.1.3 การวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบในไฟโตโซม

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ยืนยันว่ามีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างส่วนประกอบในไฟโตโซมที่บรรจุนารินจิน โดยพบการเลื่อนตำแหน่งและลักษณะกว้างขึ้นของแถบการสั่นของหมู่ไฮดรอกซิลของนารินจินและหมู่ฟอสเฟตของฟอสโฟลิปิด การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้แสดงถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างฟอสฟาติลโคลีนกับนารินจิน เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างฟอสโฟลิปิดกับสารพฤษเคมี (นารินจิน) ซึ่งเป็นหลักการของการสร้างไฟโตโซม

#### 5.1.4 การศึกษาความคงสภาพ

การศึกษาความคงสภาพของไฟโตโซมเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำช่วยคงสภาพของโครงสร้างไขมันได้ดีกว่า โดยมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจินของทุกตำรับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อความคงสภาพ โดยขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจินลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิพบว่าอุณหภูมิสูงมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและประสิทธิภาพการกักเก็บนารินจิน ทั้งนี้ตำรับ P400 ยังแสดงสมบัติที่เหมาะสมที่สุดในด้านความคงสภาพภายใต้สภาวะการเก็บรักษา

#### 5.1.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 ด้วยวิธี MTT assay พบว่านารินจินรูปแบบอิสระไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าร้อยละ 90 ซึ่งอาจเกิดจากสมบัติความมีขั้วและละลายในไขมันได้น้อย ทำให้ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้จำกัด ในทางตรงกันข้ามไฟโตโซมบรรจุนารินจินแสดงผลยับยั้งการเจริญของเซลล์อย่างชัดเจนในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $968.89 \pm 6.25 \mu\text{g/mL}$  ผลลัพธ์นี้ชี้ให้เห็นว่าการนำส่งนารินจินในรูปแบบไฟโตโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีกว่านารินจินอิสระอย่างมีนัยสำคัญ

### 5.2 อภิปรายผล

การเพิ่มประสิทธิภาพของไฟโตโซม: ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการพัฒนาไฟโตโซมบรรจุนารินจิน โดยเฉพาะตำรับที่ผสม PEG 400 (P400) ซึ่งมีขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรในช่วงที่เหมาะสมต่อการนำส่งและมีการกระจายขนาดที่สม่ำเสมอ นอกจากนี้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ผิวยังบ่งชี้ถึงแนวโน้มความคงสภาพของตำรับที่เหมาะสม

บทบาทของฟอสฟาติดีลโคลีน (PTC) และ PEG: การเพิ่มปริมาณ PTC ช่วยเพิ่มความสามารถในการกักเก็บนารินจินได้ ขณะที่การเติมอนุพันธ์ของ PEG ส่งผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของไฟโตโซมแตกต่างกันตามอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน การเติม PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำทำให้ได้ไฟโตโซมที่มีขนาดอนุภาคเล็กและมีการกระจายของขนาดอนุภาคต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อย่างไรก็ตามการเติมอนุพันธ์ของ PEG ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการ

กักเก็บนารินจินได้ในระหว่างการเตรียมไฟโตโซมและมีแนวโน้มที่ดีต่อค่าศักยภาพไฟฟ้าที่ผิวของไฟโตโซม การวิเคราะห์ด้วย FT-IR ยืนยันการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างนารินจินกับฟอสโฟลิปิดที่ใช้ซึ่งเป็นกลไกสำคัญของการเกิดโครงสร้างไฟโตโซม

ผลของอุณหภูมิต่อความคงสภาพ: อุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลอย่างชัดเจนต่อความคงสภาพของไฟโตโซม การเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของไฟโตโซมได้ ในขณะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เร่งให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคและการรั่วไหลของนารินจิน การลดลงอย่างมีนัยสำคัญของร้อยละการกักเก็บนารินจิน (%EE) ที่ 30 องศาเซลเซียสอาจสัมพันธ์กับกลไกการสลายตัวของฟอสโฟลิปิดและการเร่งเกิดออกซิเดชันของไขมันภายใต้อุณหภูมิสูง

การเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง: ไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 ได้ดีกว่านารินจินอิสระอย่างชัดเจน ผลลัพธ์นี้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าโครงสร้างไฟโตโซมซึ่งมีสมบัติที่สมดุลระหว่างความชอบน้ำและไขมัน (amphiphilic property) เช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตสามารถเพิ่มการซึมผ่านของนารินจินเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ PEG 400 อาจช่วยส่งเสริมการซึมผ่าน ทำให้นารินจินแสดงการยับยั้งการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (apoptosis)

### 5.3 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยในอนาคต (Suggestions)

จากผลการวิจัยครั้งนี้ มีข้อเสนอแนะเพื่อการต่อยอดงานวิจัย ดังต่อไปนี้

การศึกษาความคงสภาพเพิ่มเติม: ควรมีการศึกษาความคงสภาพของสูตรตำรับ P400 ในสภาวะอื่น ที่เกี่ยวข้องกับการใช้งานจริง เช่น การเก็บรักษาที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส และการทดสอบความคงสภาพในตัวกลางชีวภาพ (biological media) หรือตัวกลางที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่างกันเพื่อจำลองสภาวะในระบบทางเดินอาหาร

การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญ: ควรมีการศึกษาอัตราและรูปแบบการปลดปล่อยนารินจินจากไฟโตโซม (*in vitro* release study) เพื่อยืนยันว่าโครงสร้างไฟโตโซมสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาการดูดซึมและการออกฤทธิ์ในสิ่งมีชีวิต: ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพทางชีวภาพ (*in vivo* efficacy) ของไฟโตโซมที่บรรจุนารินจินในสัตว์ทดลอง เพื่อประเมินผลทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) และประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (anti-colon cancer activity) รวมถึงการประเมินความเป็นพิษต่อร่างกาย

การปรับปรุงสูตรตำรับเพื่อเพิ่มความคงสภาพ: พิจารณาใช้เทคนิคการทำให้แห้ง เช่น การทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) หรือการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) โดยใช้สารช่วยพยุง (cryoprotectants) เพื่อเพิ่มความคงสภาพในการเก็บรักษาระยะยาว และอำนวยความสะดวกในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการนำไปใช้จริง



## บรรณานุกรม

1. Li L, Yan X, Chen F, Zheng L, Hu Y, He F, et al. A comprehensive review of the metabolism of citrus flavonoids and their binding to bitter taste receptors. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023;22(3):1763–93. eng. 20230304.
2. Emran TB, Islam F, Nath N, Sutradhar H, Das R, Mitra S, et al. Naringin and naringenin polyphenols in neurological diseases: Understandings from a therapeutic viewpoint. *Life (Basel).* 2022;13(1). eng. 20221229.
3. Shilpa VS, Shams R, Dash KK, Pandey VK, Dar AH, Ayaz Mukarram S, et al. Phytochemical properties, extraction, and pharmacological benefits of naringin: A review. *Molecules.* 2023;28(15). eng. 20230725.
4. Chen R, Qi QL, Wang MT, Li QY. Therapeutic potential of naringin: An overview. *Pharm Biol.* 2016;54(12):3203–10. eng. 20160826.
5. Hassan BA, Hamed FM, Abdulridha MM, Baqer FM. Phytoconstituents screening of naringin and naringenin antimicrobial properties extracted from grapefruit peels.(poster). 2021.
6. Jodeh S, Shawarb N, Jaradat N, Warad I, Hussein F, El-Masri M, et al. Synthesis and biological activities of a novel naringin based heterocyclic derivatives. *Moroccan Journal of Chemistry.* 2016;4(1):242–50.
7. Aturki Z, Brandi V, Sinibaldi M. Separation of flavanone-7-o-glycoside diastereomers and analysis in citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2004;52(17):5303–8.
8. Jiang H, Zhang M, Lin X, Zheng X, Qi H, Chen J, et al. Biological activities and solubilization methodologies of naringin. *Foods.* 2023;12(12):2327.
9. Ravetti S, Garro AG, Gaitán A, Murature M, Galiano M, Brignone SG, et al. Naringin: Nanotechnological strategies for potential pharmaceutical applications. *Pharmaceutics.* 2023;15(3):863.
10. Roy AS, Tripathy DR, Chatterjee A, Dasgupta S. A spectroscopic study of the

- interaction of the antioxidant naringin with bovine serum albumin. *Journal of Biophysical Chemistry*. 2010;1(03):141–52.
11. Mohanty S, Konkimalla VB, Pal A, Sharma T, Si SC. Naringin as sustained delivery nanoparticles ameliorates the anti-inflammatory activity in a Freund's complete adjuvant-induced arthritis model. *ACS omega*. 2021;6(43):28630–41.
  12. Matsuda H, Kosuge M, Yoshimura R, Naito Y, Tsuji T, Kurihara K, et al. Determination of the effects of surfactants and cyclodextrins as co-solvent on the solubility of poorly water-soluble flavonoid naringin. *J Solution Chem*. 2025;54(5):626–40.
  13. Zhang L, Song L, Zhang P, Liu T, Zhou L, Yang G, et al. Solubilities of naringin and naringenin in different solvents and dissociation constants of naringenin. *J Chem Eng Data*. 2015;60(3):932–40.
  14. Kaźmierczak T, Cyboran-Mikołajczyk S, Trochanowska-Pauk N, Walski T, Nowicka P, Bonarska-Kujawa D. Insights on the mechanisms of the protective action of naringenin, naringin and naringin dihydrochalcone on blood cells in terms of their potential anti-atherosclerotic activity. *Molecules*. 2025;30(3):547.
  15. Zhang X, Li L, Xu Z, Liang Z, Su J, Huang J, et al. Investigation of the interaction of naringin palmitate with bovine serum albumin: Spectroscopic analysis and molecular docking. *PLoS One*. 2013;8(3):e59106.
  16. Gurunath S, Nanjwade BK, Patil P. Oral bioavailability and intestinal absorption of candesartan cilexetil: Role of naringin as p-glycoprotein inhibitor. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(1):170–6.
  17. Yarlagadda DL, Das S, Anand Vullendula SK, Manandhar S, Dengale SJ, Ranganath Pai KS, et al. Computational-based polyphenol therapy for nonsmall cell lung cancer: Naringin coamorphous systems for solubility and bioavailability enhancement. *Mol Pharm*. 2024;21(8):3951–66.
  18. Hatanaka Y, Uchiyama H, Kadota K, Tozuka Y. Designing amorphous formulations of polyphenols with naringin by spray-drying for enhanced solubility and permeability. *Adv Powder Technol*. 2022;33(11):103627.
  19. Epriliati I, Ginjom IR. Bioavailability of phytochemicals. *Phytochemicals—a global*

- perspective of their role in nutrition and health. 2012;21:401–28.
20. Yu Z, Liu X, Chen H, Zhu L. Naringenin-loaded dipalmitoylphosphatidylcholine phytosome dry powders for inhaled treatment of acute lung injury. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2020;33(4):194–204.
21. Jain N, Gupta BP, Thakur N, Jain R, Banweer J, Jain DK, et al. Phytosome: A novel drug delivery system for herbal medicine. *Int J Pharm Sci Drug Res.* 2010;2(4):224–8.
22. Barani M, Sangiovanni E, Angarano M, Rajizadeh MA, Mehrabani M, Piazza S, et al. Phytosomes as innovative delivery systems for phytochemicals: A comprehensive review of literature. *International journal of nanomedicine.* 2021:6983–7022.
23. Bepe N. Preparation, characterisation and evaluation of artemisia afra phytosomes with modified release properties. 2017.
24. Zhang P, Lin R, Yang G, Zhang J, Zhou L, Liu T. Solubility of naringenin in ethanol and water mixtures. *J Chem Eng Data.* 2013;58(9):2402–4.
25. Semalty A, Semalty M, Singh D, Rawat M. Preparation and characterization of phospholipid complexes of naringenin for effective drug delivery. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2010;67(3):253–60.
26. Tsuchiya H. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules.* 2015;20(10):18923–66.
27. Mehmood H. Phytosome as a novel carrier for delivery of phytochemicals: A comprehensive review. *Middle east journal of applied science & technology.* 2023;6(4):21–51.
28. Amin T, Bhat SV. A review on phytosome technology as a novel approach to improve the bioavailability of nutraceuticals. *Int J Adv Res Technol.* 2012;1(3):1–5.
29. Nanavati B. Phytosome: A novel approach to enhance the bioavailability of phytoconstituent. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP).* 2017;11(03).
30. Lu M, Qiu Q, Luo X, Liu X, Sun J, Wang C, et al. Phyto-phospholipid complexes (phytosomes): A novel strategy to improve the bioavailability of active constituents.

- Asian journal of pharmaceutical sciences. 2019;14(3):265–74.
31. Conti Nibali V, Branca C, Wanderlingh U, D'Angelo G. Intermolecular hydrogen-bond interactions in dppe and dmpe phospholipid membranes revealed by far-infrared spectroscopy. *Applied Sciences*. 2021;11(21):10038.
  32. Halevas EG, Avgoulas DI, Katsipis G, Pantazaki AA. Flavonoid-liposomes formulations: Physico-chemical characteristics, biological activities and therapeutic applications. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2022;5:100059.
  33. Singh MR, Singh D, Kanwar J, Chauhan NS. *Advances and avenues in the development of novel carriers for bioactives and biological agents*. Academic Press; 2020.
  34. Karimi N, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, KEYVANI F, Pezeshki A, Gholian MM. *Phytosome and liposome: The beneficial encapsulation systems in drug delivery and food application*. 2015.
  35. Patel J, Patel R, Khambholja K, Patel N. An overview of phytosomes as an advanced herbal drug delivery system. *Asian J Pharm Sci*. 2009;4(6):363–71.
  36. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010;2(12):1231–46.
  37. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Frontiers in nutrition*. 2018;5:370438.
  38. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*. 2007;43(4):348.
  39. Semalty A, Semalty M, Rawat MSM, Franceschi F. Supramolecular phospholipids–polyphenolics interactions: The phytosome® strategy to improve the bioavailability of phytochemicals. *Fitoterapia*. 2010;81(5):306–14.
  40. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm*. 2007;330(1-2):155–63.
  41. Kidd PM. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical

- polyphenols: The silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev.* 2009;14(3):226–46.
42. Human C, Aucamp M, de Beer D, van Der Rijst M, Joubert E. Food-grade phytosome vesicles for nanoencapsulation of labile c-glucosylated xanthenes and dihydrochalcones present in a plant extract matrix—effect of process conditions and stability assessment. *Food Science & Nutrition.* 2023;11(12):8093–111.
43. Hashemzadeh H, Hanafi-Bojd MY, Iranshahy M, Zarban A, Raissi H. The combination of polyphenols and phospholipids as an efficient platform for delivery of natural products. *Sci Rep.* 2023;13(1):2501.
44. Pawar AY, Patil SS, More PS, Jadhav PR, Bhavar SR. Preparation and characterization of nanocochelete by using phosphatidylcholine as lipid carrier for enhancement of permeability and bioavailability of rosuvastatin. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 2021;47(12):2004–12.
45. Gundermann K-J, Kuenker A, Kuntz E, Drożdż M. Activity of essential phospholipids (epl) from soybean in liver diseases. *Pharmacol Rep.* 2011;63(3):643–59.
46. Deleanu M, Toma L, Sanda GM, Barbălată T, Niculescu LŞ, Sima AV, et al. Formulation of phytosomes with extracts of ginger rhizomes and rosehips with improved bioavailability, antioxidant and anti-inflammatory effects in vivo. *Pharmaceutics.* 2023;15(4):1066.
47. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences.* 2015;10(2):81–98.
48. Bhattacharya S. Phytosomes: The new technology for enhancement of bioavailability of botanicals and nutraceuticals. *International Journal of Health Research.* 2009;2(3):225–32.
49. Gnananath K, Sri Nataraj K, Ganga Rao B. Phospholipid complex technique for superior bioavailability of phytoconstituents. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(1):35–42. eng. 20170413.
50. Briuglia M-L, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on

- liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*. 2015;5(3):231–42.
51. Jovanović AA, Balanč BD, Ota A, Ahlin Grabnar P, Djordjević VB, Šavikin KP, et al. Comparative effects of cholesterol and  $\beta$ -sitosterol on the liposome membrane characteristics. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2018;120(9):1800039.
52. Rasae S, Ghanbarzadeh S, Mohammadi M, Hamishehkar H. Nano phytosomes of quercetin: A promising formulation for fortification of food products with antioxidants. *Pharm Sci*. 2014;20(3):96–101.
53. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013;8(1):102.
54. Visht S, Salih SS. Effect of cholesterol and different solvents on particle size, zeta potential and drug release of eucalyptus oil phytosome. *Pharmacognosy Res*. 2023;15(3):578–90. eng.
55. Reza Mozafari M, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J Liposome Res*. 2008;18(4):309–27.
56. Yücel Ç, Değim Z, Yılmaz Ş. Development of cisplatin-loaded liposome and evaluation of transport properties through caco-2 cell line. *Turkish J Pharm Sci*. 2016;13(1):95–108.
57. Murugan V, Mukherjee K, Maiti K, Mukherjee PK. Enhanced oral bioavailability and antioxidant profile of ellagic acid by phospholipids. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(11):4559–65.
58. Patil M, Patil S, Chittam K, Wagh R. Phytosomes: Novel approach in herbal medicines. *Asian J Pharm Sci Res*. 2012;2:1–9.
59. Sikarwar MS, Sharma S, Jain AK, Parial S. Preparation, characterization and evaluation of marsupin–phospholipid complex. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(1):129–37.
60. Maryana W, Rachmawati H, Mudhakir D. Formation of phytosome containing silymarin using thin layer-hydration technique aimed for oral delivery. *Materials today: proceedings*. 2016;3(3):855–66.

61. Sadak Vali C, Khan A, Mohammed JS, Kumar R, Siva Prasad S, Bharathi MP, et al. Preparation of ginkgo phytosomes by rotary evaporation technique and its evaluation. *Neuro Quantology*. 2022;20(9):492–9.
62. D'souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (peg): A versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert opinion on drug delivery*. 2016;13(9):1257–75.
63. Mahmood TH, Al-Samydai A, Sulaibi MA, Alqaraleh M, Abed Al, Shalan N, et al. Development of pegylated nano-phytosome formulation with oleuropein and rutin to compare anti-colonic cancer activity with olea europaea leaves extract. *Chem Biodivers*. 2023;20(8):e202300534.
64. Penczek S, Pretula J, Slomkowski S. Ring-opening polymerization. *Chemistry Teacher International*. 2021;3(2):33–57.
65. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly (ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed*. 2010;49(36):6288–308.
66. Veronese FM, Pasut G. Pegylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2005;10(21):1451–8.
67. Li Y, Hu Y. Computational investigation of the influence of chain length on the shielding effect of pegylated nanoparticles. *RSC advances*. 2014;4(92):51022–31.
68. Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, Capriotti AL, Palchetti S, et al. Effect of polyethyleneglycol (peg) chain length on the bio-nano-interactions between pegylated lipid nanoparticles and biological fluids: From nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale*. 2014;6(5):2782–92.
69. Sadeghi F, Afrasiabi H. Comparison of physicomechanical properties of films prepared from organic solutions and aqueous dispersion of eudragit rl. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2011;19(2):100.
70. Ma B-L, Yang Y, Dai Y, Li Q, Lin G, Ma Y-M. Polyethylene glycol 400 (peg400) affects the systemic exposure of oral drugs based on multiple mechanisms: Taking berberine as an example. *RSC advances*. 2017;7(5):2435–42.
71. Husain A, Makadia V, Valicherla GR, Riyazuddin M, Gayen JR. Approaches to

- minimize the effects of p-glycoprotein in drug transport: A review. *Drug Dev Res.* 2022;83(4):825–41.
72. Yang D, Zhang M, Zhao M, Li C, Shang L, Zhang S, et al. Study on the effect of pharmaceutical excipient peg400 on the pharmacokinetics of baicalin in cells based on mrp2, mrp3, and bcrp efflux transporters. *Pharmaceutics.* 2024;16(6):731.
73. Belniak P, Świąder K, Szumilo M, Hyla A, Poleszak E. Comparison of physicochemical properties of suppositories containing starch hydrolysates. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2017;25(3):365–9.
74. Ilomuanya M, Ifudu N, Odulaja J, Igwilo C. Assessment of the effect of base type and surfactant on the release properties and kinetics of paracetamol suppositories. *J Chem Pharm Res.* 2012;4(6):3280–6.
75. Forster SP, Dippold E, Chiang T. Twin-screw melt granulation for oral solid pharmaceutical products. *Pharmaceutics.* 2021;13(5):665.
76. Li J, Wu Y. Lubricants in pharmaceutical solid dosage forms. *Lubricants.* 2014;2(1):21–43.
77. Sawafta O, Alhadid S, Awwad IAA, Migdadi E, Aljaberi A. Impact of the manufacturing technique on the dissolution-enhancement functionality of peg4000 in cilostazol tablets. *Pharmacia.* 2021;68:243–50.
78. Gattefossé. Gelucire® 44/14: Self-emulsifying excipient for solubility and oral bioavailability enhancement Saint-Priest, France: Gattefossé; 2020  
[\[https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2020/03/Brochure\\_Gelucire-44-14\\_Self-emulsifying-excipient-for-solubility-and-oral-bioavailability-enhancement.pdf\]](https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2020/03/Brochure_Gelucire-44-14_Self-emulsifying-excipient-for-solubility-and-oral-bioavailability-enhancement.pdf)
79. Shin DJ, Chae BR, Goo YT, Yoon HY, Kim CH, Sohn SI, et al. Improved dissolution and oral bioavailability of valsartan using a solidified supersaturable self-microemulsifying drug delivery system containing gelucire® 44/14. *Pharmaceutics.* 2019;11(2):58.
80. da Fonseca Antunes AB, De Geest BG, Vervaet C, Remon JP. Gelucire 44/14 based

- immediate release formulations for poorly water-soluble drugs. *Drug development and industrial pharmacy*. 2013;39(5):791–8.
81. Patel N, Prajapati HN, Dalrymple DM, Serajuddin AT. Development of solid sedds, ii: Application of acconon® c-44 and gelucire® 44/14 as solidifying agents for self-emulsifying drug delivery systems of medium chain triglyceride. *International Journal of Pharmaceutical Excipients*. 2016;3(2).
82. Hodaie D, Baradaran B, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Effects of polyethylene glycols on intestinal efflux pump expression and activity in caco-2 cells. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;51(3):745–53.
83. Taher S, Al-Kinani K, Hammoudi Z, Ghareeb M. Co-surfactant effect of polyethylene glycol 400 on microemulsion using bcs class ii model drug. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* | Jan–Mar. 2022;12(1).
84. Elsewedy HS, Dhubiab BEA, Mahdy MA, Elnahas HM. Development, optimization, and evaluation of pegylated brucine-loaded plga nanoparticles. *Drug Deliv*. 2020;27(1):1134–46.
85. Demirbolat GM, Erdoğan Ö, Coşkun GP, Çevik Ö. Peg4000 modified liposomes enhance the solubility of quercetin and improve the liposome functionality: In vitro characterization and the cellular efficacy. *Turkish journal of chemistry*. 2022;46(4):1011–23.
86. Islam N, Khan NU, Razzaq A, Khan ZU, Mena F, Alfaifi MY, et al. Self-emulsifying micelles as a drug nanocarrier system for itraconazole oral bioavailability enhancement; in vitro and in vivo assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(12):101839.
87. Ortiz AC, Yañez O, Salas-Huenuleo E, Morales JO. Development of a nanostructured lipid carrier (nlc) by a low-energy method, comparison of release kinetics and molecular dynamics simulation. *Pharmaceutics*. 2021;13(4):531.
88. Li C, Li T, Tian X, An W, Wang Z, Han B, et al. Research progress on the pegylation of therapeutic proteins and peptides (tpps). *Front Pharmacol*. 2024;15:1353626.
89. Curtis C, Toghiani D, Wong B, Nance E. Colloidal stability as a determinant of

- nanoparticle behavior in the brain. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;170:673–82.
90. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. Pegylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Del Rev*. 2016;99:28–51.
91. Makharadze D, Del Valle LJ, Katsarava R, Puiggali J. The art of pegylation: From simple polymer to sophisticated drug delivery system. *Int J Mol Sci*. 2025;26(7):3102.
92. Kesharwani P, Kumar V, Goh KW, Gupta G, Alsayari A, Wahab S, et al. Pegylated plga nanoparticles: Unlocking advanced strategies for cancer therapy. *Mol Cancer*. 2025;24(1):205.
93. Shi L, Zhang J, Zhao M, Tang S, Cheng X, Zhang W, et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale*. 2021;13(24):10748–64.
94. El-Baz N, Nunn BM, Bates PJ, O'Toole MG. The impact of pegylation on cellular uptake and in vivo biodistribution of gold nanoparticle mri contrast agents. *Bioengineering*. 2022;9(12):766.
95. Owens III DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;307(1):93–102.
96. Li M, Jiang S, Simon J, Paßlick D, Frey M-L, Wagner M, et al. Brush conformation of polyethylene glycol determines the stealth effect of nanocarriers in the low protein adsorption regime. *Nano Lett*. 2021;21(4):1591–8.
97. Krishnan J, Poomalai P, Ravichandran A, Reddy A, Sureshkumar R. A concise review on effect of pegylation on the properties of lipid-based nanoparticles. *Assay Drug Dev Technol*. 2024;22(5):246–64.
98. Fan W, Peng H, Yu Z, Wang L, He H, Ma Y, et al. The long-circulating effect of pegylated nanoparticles revisited via simultaneous monitoring of both the drug payloads and nanocarriers. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2022;12(5):2479–93.
99. Islam N, Ullah Khan N, Razzaq A, Ullah Khan Z, Mena F, Alfai MY, et al. Self-emulsifying micelles as a drug nanocarrier system for itraconazole oral bioavailability enhancement; in vitro and in vivo assessment. *Saudi Pharmaceutical*

- Journal. 2023;31(12):101839.
100. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209–49.
101. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683–91.
102. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6(1):479–507.
103. Hymowitz SG, Malek S. Targeting the mapk pathway in ras mutant cancers. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(11):a031492.
104. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546–58.
105. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
106. Huang B, Lang X, Li X. The role of il-6/jak2/stat3 signaling pathway in cancers. *Front Oncol*. 2022;12:1023177.
107. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27–41.
108. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
109. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):448.
110. White E. The role for autophagy in cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(1):42–6.
111. Eskelinen E-L. The dual role of autophagy in cancer. *Current opinion in pharmacology*. 2011;11(4):294–300.
112. Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, et al. The role of necroptosis in

- cancer biology and therapy. *Mol Cancer*. 2019;18(1):100.
113. Stockwell BR, Angeli JPF, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*. 2017;171(2):273–85.
114. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, et al. Ros in cancer therapy: The bright side of the moon. *Exp Mol Med*. 2020;52(2):192–203.
115. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ros-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(7):579–91.
116. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016;1863(12):2977–92.
117. Dhanasekaran DN, Reddy EP. Jnk signaling in apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(48):6245–51.
118. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, et al. Interfering with ros metabolism in cancer cells: The potential role of quercetin. *Cancers (Basel)*. 2010;2(2):1288–311.
119. Ahamad MS, Siddiqui S, Jafri A, Ahmad S, Afzal M, Arshad M. Induction of apoptosis and antiproliferative activity of naringenin in human epidermoid carcinoma cell through ros generation and cell cycle arrest. *PLoS One*. 2014;9(10):e110003.
120. Li Y, Zhang T, Chen GY. Flavonoids and colorectal cancer prevention. *Antioxidants*. 2018;7(12):187.
121. Zughaibi TA, Suhail M, Tarique M, Tabrez S. Targeting pi3k/akt/mtor pathway by different flavonoids: A cancer chemopreventive approach. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12455.
122. Priyadarsini RV, Murugan RS, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunagaran D, Nagini S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (hela) cells through p53 induction and nf- $\kappa$ b inhibition. *Eur J Pharmacol*. 2010;649(1-3):84–91.

123. Smeu A, Marcovici I, Dehelean CA, DumitreI S-I, Borza C, Lighezan R. Flavonoids and flavonoid-based nanopharmaceuticals as promising therapeutic strategies for colorectal cancer—an updated literature review. *Pharmaceuticals*. 2025;18(2):231.
124. Shin JH, Shin SH. A comprehensive review of naringenin, a promising phytochemical with therapeutic potential. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024;34(12):2425.
125. Chen CH, Tien N, Yao CH, Chen SJ, Bau DT, Pandey S, et al. Naringin induces ros-stimulated g1 cell-cycle arrest and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Environ Toxicol*. 2024;39(11):5059–73.
126. Cheng H, Jiang X, Zhang Q, Ma J, Cheng R, Yong H, et al. Naringin inhibits colorectal cancer cell growth by repressing the pi3k/akt/mtor signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2020;19(6):3798–804.
127. Huang Q, Li W, Jing X, Liu C, Ahmad S, Huang L, et al. Naringin's alleviation of the inflammatory response caused by actinobacillus pleuropneumoniae by downregulating the nf- $\kappa$ b/nlrp3 signalling pathway. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2):1027.
128. He J, Zhang H-P. Research progress on the anti-tumor effect of naringin. *Front Pharmacol*. 2023;14:1217001.
129. Ghanbari-Movahed M, Jackson G, Farzaei MH, Bishayee A. A systematic review of the preventive and therapeutic effects of naringin against human malignancies. *Front Pharmacol*. 2021;12:639840.
130. Wang Y, Li X, Lv H, Sun L, Liu B, Zhang X, et al. Therapeutic potential of naringin in improving the survival rate of skin flap: A review. *Front Pharmacol*. 2023;14:1128147.
131. Riva A, Ronchi M, Petrangolini G, Bosisio S, Allegrini P. Improved oral absorption of quercetin from quercetin phytosome®, a new delivery system based on food grade lecithin. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2019;44(2):169–77.
132. Vanamala J, Leonardi T, Patil BS, Taddeo SS, Murphy ME, Pike LM, et al. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis*. 2006;27(6):1257–65.

133. Banjerdpongchai R, Wudtiwai B, Khawon P. Induction of human hepatocellular carcinoma hepg2 cell apoptosis by naringin. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(7):3289–94.
134. Krieg A, Werner TA, Verde PE, Stoecklein NH, Knoefel WT. Prognostic and clinicopathological significance of survivin in colorectal cancer: A meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(6):e65338.
135. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8(1):61–70.
136. Zeng J-n, Tan J-y, Mo L. Naringin inhibits colorectal carcinogenesis by inhibiting viability of colorectal cancer cells. *Chin J Integr Med*. 2023;29(8):707–13.
137. Yu X-L, Meng X, Yan Y-D, Han J-C, Li J-S, Wang H, et al. Optimisation of the extraction process of naringin and its effect on reducing blood lipid levels in vitro. *Molecules*. 2023;28(4):1788.
138. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385(1-2):113–42.
139. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):57.
140. Bannunah AM, Vllasaliu D, Lord J, Stolnik S. Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: Effect of size and surface charge. *Mol Pharm*. 2014;11(12):4363–73.
141. Moghimi SM, Hunter A, Andresen T. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: An integrated analysis and perspective. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2012;52(1):481–503.
142. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (part 2). *Tropical journal of pharmaceutical research*. 2013;12(2):265–73.
143. Khan J, Alexander A, Saraf S, Saraf S. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile

- of plant actives. *Journal of controlled release*. 2013;168(1):50–60.
144. Muller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol*. 2004;113(1-3):151–70.
145. Song F, Yang G, Wang Y, Tian S. Effect of phospholipids on membrane characteristics and storage stability of liposomes. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2022;81:103155.
146. Kozik V, Pentak D, Paździor M, Zięba A, Bąk A. From design to study of liposome-driven drug release part 1: Impact of temperature and ph on environment. *Int J Mol Sci*. 2023;24(14):11686.
147. Wu J, Zhao C, Lin W, Hu R, Wang Q, Chen H, et al. Binding characteristics between polyethylene glycol (peg) and proteins in aqueous solution. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2(20):2983–92.
148. Nakamura K, Yamashita K, Itoh Y, Yoshino K, Nozawa S, Kasukawa H. Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different peg-modification methods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2012;1818(11):2801–7.
149. Hernández-Caselles T, Villalain J, Gómez-Fernández J. Stability of liposomes on long term storage. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 1990;42(6):397–400.
150. Roy B, Guha P, Bhattarai R, Nahak P, Karmakar G, Chettri P, et al. Influence of lipid composition, ph, and temperature on physicochemical properties of liposomes with curcumin as model drug. *Journal of oleo science*. 2016;65(5):399–411.
151. Yu M, Song W, Tian F, Dai Z, Zhu Q, Ahmad E, et al. Temperature-and rigidity-mediated rapid transport of lipid nanovesicles in hydrogels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(12):5362–9.
152. Mosca M, Ceglie A, Ambrosone L. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2011;164(2):158–65.
153. Lehman SE, Benkstein KD, Cleveland IV TE, Anderson KW, Carrier MJ, Vreeland WN. Particle metrology approach to understanding how storage conditions affect long-

- term liposome stability. *Langmuir*. 2023;39(35):12313–23.
154. Raha S, Yumnam S, Hong GE, Lee HJ, Saralamma VVG, Park H-S, et al. Naringin induces autophagy-mediated growth inhibition by downregulating the pi3k/akt/mtor cascade via activation of mapk pathways in ags cancer cells. *Int J Oncol*. 2015;47(3):1061–9.
155. Kidd PM. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: The silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev*. 2009;14(3):226–46. eng.
156. Cao S, Zhang M, Yuan M, Yang D, Zhao M, Zhang S, et al. The pharmaceutical excipient peg400 affect the absorption of baicalein in caco-2 monolayer model by interacting with udp-glucuronosyltransferases and efflux transport proteins. *Pharmacology research & perspectives*. 2022;10(1):e00928.



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายสมบูรณ์ ธีรานุพันธ์
วัน เดือน ปี เกิด	14 มีนาคม 2539
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
ที่อยู่ปัจจุบัน	1894/15 ถนนบรรทัดทอง แขวงรองเมือง เขตปทุมวัน กทม
ผลงานตีพิมพ์	Development of PEG-modified phytosome of naringin for improving physical properties, stability and cytotoxicity in Caco-2 cells

