

การสังเคราะห์และการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบ
ของเคอร์คิวมินโปรดรักส์

นายนพลสิทธิ์	มุสิวีรพัฒน์	5736531033
นางสาวมินตราณี	อบรมสุข	5736559633
นางสาวสุชญา	พรหมยรัตน์	5736573333

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตร์บัณฑิต สาขาการค้นพบและพัฒนายา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

SYNTHESIS AND EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF
CURCUMIN PRODRUGS

Mr. Noppasit	Musiwiraphat	5736531033
Ms. Mintranee	Obromsuk	5736559633
Ms. Suchaya	Promayarat	5736573333



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Doctor of Pharmacy Program in
Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University 2018

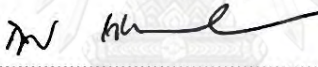
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการปริญญาโท	การสังเคราะห์และการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ เคอร์คิวมินโปรดรั๊กส์
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นายนพลสิทธิ์ มุสิวีรพัฒน์ นางสาวมินทรานี อบรมสุข นางสาวสุชญา พรหมยารัตน์
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนาายา / อาหารและเภสัชเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท	รศ. ภก. ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต


..... คณบดี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพชร สุกุลบำรุงศิลป์)


..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนาายา
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำนำ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อสังเคราะห์ curcumin monoglutaric acid (CMG) ซึ่งเป็น prodrug ของสาร curcumin ที่สามารถพบได้ในขมิ้นชัน และทดสอบค่าการละลายน้ำที่อุณหภูมิ 25°C รวมถึงประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์ human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) เพื่อจำลองสภาวะการอักเสบให้เหมือนกับโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผล (ulcerative colitis) เทียบกับ curcumin คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่ต้องการทราบข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการสังเคราะห์ ผลการศึกษาค่าการละลายน้ำ และผลการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ prodrug ของ curcumin ชนิดนี้



คณะผู้จัดทำ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โครงการลำดับที่ 3.1

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ	: การสังเคราะห์และการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของเคอร์คิวมินโปรดรักส์		
หัวหน้าโครงการ	: นายณพลสิทธิ์ มุสิวิวัฒน์	5736531033	
ผู้ร่วมโครงการ	: นางสาวมินทราณี อบรมสุข	5736559633	
	: นางสาวสุชญา พรหมยรัตน์	5736573333	
อาจารย์ที่ปรึกษา	: รศ.ภก.ดร.พรชัย โรจนันธิพิศศักดิ์		
สาขา/ภาควิชา	: การค้นพบและพัฒนาญา/ อาหารและเภสัชเคมี		

เคอร์คิวมิน (curcumin) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่พบในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีศักยภาพในการรักษาโรคได้หลายชนิด อย่างไรก็ตาม curcumin มีค่าการละลายน้ำต่ำ ประมาณ 0.068 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ทำให้เป็นข้อจำกัดในการพัฒนา curcumin เพื่อนำมาใช้ทางคลินิก งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรดรักของ curcumin ชนิดใหม่ คือ curcumin monoglutaric acid (CMG) และเปรียบเทียบค่าการละลายน้ำและฤทธิ์ต้านอักเสบของ CMG กับ curcumin ผลการศึกษาพบว่า CMG สามารถสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา glutarylation ที่หมู่ phenolic hydroxyl ของ curcumin ด้วย glutaric anhydride โดยใช้ 4-dimethylaminopyridine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิตร้อยละ 46.5 โครงสร้างทางเคมีของสารที่สังเคราะห์ขึ้นผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy และ liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry เมื่อประเมินการละลายน้ำของ CMG ตาม OECD guideline ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography ได้ค่าการละลายน้ำที่อุณหภูมิ 25.0±0.1 องศาเซลเซียส เท่ากับ 8.06±0.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของ CMG และ curcumin ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ในเซลล์ human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin-8 (IL-8), prostaglandin E-2 (PGE-2) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ภายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย interleukin-1β (IL-1β) โดยใช้เซลล์ที่ได้รับ 0.5% dimethyl sulfoxide เป็นกลุ่มควบคุม ผลการวัดปริมาณ IL-8 และ PGE-2 ด้วยเทคนิค ELISA พบว่า CMG ยับยั้งการหลั่ง IL-8 และ PGE-2 ได้ร้อยละ 46.87 และ 40.41 ตามลำดับ ขณะที่ curcumin ยับยั้งการหลั่ง IL-8 และ PGE-2 ได้ร้อยละ 25.08 และ 23.71 ตามลำดับ ผลการวัดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ด้วยเทคนิค western blot พบว่า CMG และ curcumin สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ได้ร้อยละ 42.37 และ 21.86 ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า CMG เป็นโปรดรักที่มีค่าการละลายน้ำและมีฤทธิ์ต้านอักเสบดีกว่า curcumin และมีศักยภาพสำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของลำไส้ในสัตว์ทดลองต่อไป

คณะเภสัชศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต

.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

.....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Project No. 3.1
Academic year 2018

Abstract

Senior project title : Synthesis and evaluation of anti-inflammatory activity of curcumin prodrugs
Students' name : Mr. Noppasit Musiwiraphat 5736531033
 : Miss Mintrane Obromsuk 5736559633
 : Miss Suchaya Promayarat 5736573333
Advisor : Assoc. Prof. Pornchai Rojsitthisak, Ph.D.
Field/Department : Drug Discovery and Development/ Food and Pharmaceutical Chemistry

Curcumin, a polyphenolic compound found in turmeric (*Curcuma longa* L.), has been shown for its potential in the treatment of human diseases. However, the development of curcumin for clinical applications is hindered from its low water solubility ($\sim 0.068 \mu\text{g/ml}$). In this study, we aimed to synthesize curcumin monoglutaric acid (CMG) as a new curcumin prodrug and to compare the water solubility and anti-inflammatory activity with curcumin. The synthesis of CMG was achieved by glutarylation a phenolic hydroxyl group of curcumin with glutaric anhydride using 4-dimethylaminopyridine as a catalyst. The reaction yield was 46.5%. The synthesized CMG was then structurally characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. The water solubility of CMG was determined in accordance with the OECD guideline using high-performance liquid chromatography. The water solubility of CMG at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ was $8.06 \pm 0.61 \mu\text{g/ml}$. Anti-inflammatory effects of CMG and curcumin were evaluated at $5 \mu\text{M}$ using interleukin- 1β -induced human epithelial colorectal adenocarcinoma cell lines (IL- 1β -induced Caco-2 cell lines) as a cellular model. Interleukin-8 (IL-8), prostaglandin E-2 (PGE-2) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were used as inflammatory protein markers for the assay. The cells treated with 0.5% dimethyl sulfoxide were used as a control. The reduction of IL-8 and PGE-2 secreted by the IL- 1β -induced Caco-2 cells detected by ELISA was found to be 46.87 and 40.41%, respectively, for CMG and 25.08 and 23.71%, respectively, for curcumin. Western blot analysis also demonstrated that CMG and curcumin reduced COX-2 expression in the induced cells by 42.37 and 21.86%, respectively. Therefore, CMG is a prodrug of curcumin with improved water solubility and enhanced anti-inflammatory activity, and has the potential to be further investigated for the anti-inflammatory activity in animal models.

Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

Student's signature
Advisor's signature

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาปริญญาโทฉบับนี้ คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เกสัชกร ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณนาย ปวีณวัชร รัตนติลก ณ ภูเก็ต นายชวัลพัชร เมืองน้อย นายพลศักดิ์ อีรวงศ์อนันต์ นางสาวพรสิรี จิตรถเวช นายวุฒินนท์ ทวีเศรษฐ และนายปิยพันธุ์ สุพัฒนานุรักษ์ ที่ช่วยให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในเรื่องการเตรียมอุปกรณ์และการใช้เครื่องมือในการทำปริญญาโทฉบับนี้ รวมถึงเจ้าหน้าที่ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี ศูนย์วิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำโครงการนี้



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 Curcumin	3
2.2 การหาค่าการละลายน้ำของสาร	8
2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบโดยใช้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2	9
บทที่ 3 วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	10
3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	10
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	13
3.2.1 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG	13
3.2.2 การศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG	14
3.2.3 การประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2	16
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	25
4.1 ผลการสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG	25
4.2 ผลการศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG	29
4.3 ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2	32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	36
รายการอ้างอิง	37
ภาคผนวก	39

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การทดสอบความเหมาะสมของ chromatographic system ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (system suitability test)	29
ตารางที่ 2 แสดงค่าการละลายน้ำของ CMG	31



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Cur	3
รูปที่ 2 กลไกการเกิดโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมิแฟล	7
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ CDG	8
รูปที่ 4 กระบวนการสังเคราะห์ CMG	14
รูปที่ 5 ¹ H NMR spectrum ของ CMG	25
รูปที่ 6 IR spectrum ของ CMG	26
รูปที่ 7 Mass spectrum ของ CMG	28
รูปที่ 8 Chromatogram ของ Cur และ CMG จากการทำ system suitability test	30
รูปที่ 9 Calibration curve ของ CMG	30
รูปที่ 10 ตัวอย่าง chromatogram ของ CMG ในการศึกษาค่าการละลายน้ำ	32
รูปที่ 11 แสดงผลความเป็นพิษของเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ DMEM, 0.5% DMSO, Cur และ CMG ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 μ M	33
รูปที่ 12 แสดงผลความเป็นพิษของเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur และ CMG ภายหลังการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β และแสดงปริมาณตัวชี้วัดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่หลังจากเซลล์ Caco-2	35
รูปที่ 13 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 1)	40
รูปที่ 14 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 2)	40
รูปที่ 15 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 3)	40
รูปที่ 16 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 4)	40
รูปที่ 17 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 5)	41
รูปที่ 18 Chromatogram ของ CMG 2 μ g/mL	41
รูปที่ 19 Chromatogram ของ CMG 4 μ g/mL	41
รูปที่ 20 Chromatogram ของ CMG 6 μ g/mL	41
รูปที่ 21 Chromatogram ของ CMG 8 μ g/mL	42
รูปที่ 22 Chromatogram ของ CMG 10 μ g/mL	42
รูปที่ 23 Chromatogram ของ CMG ในการศึกษาค่าการละลายน้ำครั้งที่ 1	42
รูปที่ 24 Chromatogram ของ CMG ในการศึกษาค่าการละลายน้ำครั้งที่ 2	43
รูปที่ 25 Chromatogram ของ CMG ในการศึกษาค่าการละลายน้ำครั้งที่ 3	43

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผลเป็นหนึ่งในรูปแบบของโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (Inflammatory bowel disease) โดยจะเกิดการอักเสบเรื้อรังที่บริเวณลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ว่าโรคนี้อาจเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงที่มีความสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่¹ ในปัจจุบันมีการรักษาโรคนี้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการให้ยาต้านอักเสบ mesalamine แต่มีงานวิจัยพบว่าเมื่อทำการใช้ Curcumin (Cur) ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่พบในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ร่วมกับยา mesalamine จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามากกว่าการใช้ mesalamine เพียงอย่างเดียว² ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนา Cur เพื่อจะใช้ในการต้านการอักเสบในแบบจำลองโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผล

Cur มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory activity) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative activity) และฤทธิ์ต้านเนื้องอก (antitumor activity) เป็นต้น ดังนั้น Cur จึงเป็นสารที่มีศักยภาพในการรักษาโรคได้หลากหลาย เช่น โรคตับอักเสบ (hepatitis) โรคดีซ่าน (jaundice) โรคเบาหวาน (diabetes) และโรคมะเร็งปอด (lung cancer) เป็นต้น³ อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur นั้นมีค่าการละลายน้ำที่ค่อนข้างจำกัด (0.068 µg/mL ที่อุณหภูมิ 25°C) ส่งผลให้ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้น้อย และมีความเข้มข้นที่บริเวณเป้าหมายต่ำ ทำให้การพัฒนาสารชนิดนี้ในรูปแบบที่ไม่ทำการปรับปรุงโครงสร้างจึงเป็นไปได้ค่อนข้างยาก ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่พัฒนา curcumin diglutaric acid (CDG) โดยนำ glutaric acid มาต่อเข้ากับ Cur ผลปรากฏว่าอนุพันธ์ชนิดนี้มีค่าการละลายน้ำที่สูงขึ้น⁴

งานวิจัยชิ้นนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อสังเคราะห์ curcumin monoglutaric acid (CMG) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Cur ที่มีค่าการละลายน้ำสูงขึ้น โดยอาศัยปฏิกิริยา esterification ระหว่างหมู่ฟีนอลของ Cur กับ glutaric anhydride โดยใช้ 4-dimethylaminopyridine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากที่ทำ การสังเคราะห์สารแล้ว ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยเทคนิค ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy และ liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry จากนั้นจึงนำ CMG มาศึกษาค่าการละลายน้ำที่อุณหภูมิ 25°C โดยประเมินตาม OECD guideline และศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของ CMG ในเซลล์ Caco-2 ต่อปริมาณตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin-8 (IL-8) และ prostaglandin E-2 (PGE-2) โดยอาศัยเทคนิค ELISA และ cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยอาศัยเทคนิค western blot เพื่อจำลองสภาวะการอักเสบให้เหมือนกับโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผล เทียบกับ Cur ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 5 µM เพื่อที่จะนำ ข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการพัฒนา CMG เพื่อเป็น prodrug ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG
- 2) เพื่อศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG ที่อุณหภูมิ 25°C
- 3) เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ CMG โดยใช้เซลล์ Caco-2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้ทราบถึงวิธีการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG
- 2) ได้ prodrug ของ Cur ที่มีค่าการละลายน้ำดีกว่า Cur
- 3) ได้ prodrug ของ Cur ที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบดีกว่า Cur
- 4) ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เพื่อนำไปพัฒนา prodrug ของ Cur ที่มีประสิทธิภาพต่อไป



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

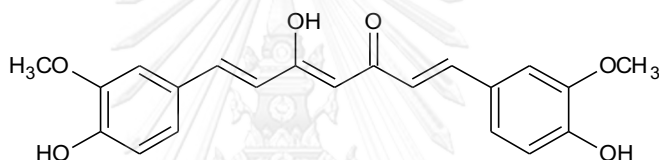
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Curcumin

2.1.1 คุณสมบัติโดยทั่วไปของ curcumin

Cur เป็นสารในกลุ่ม curcuminoids ที่พบมากที่สุด ในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีชื่อ IUPAC คือ 1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione โดยมีโครงสร้างเป็น หมู่ methoxyphenyl 2 หมู่เชื่อมต่อกันด้วยสาย hydrocarbon ที่มีหมู่ ketone 2 หมู่ ดังแสดงในรูปที่ 1 Cur มีค่าการละลายน้ำที่น้อย โดยมีค่า log P ประมาณ 3.0 และค่าการละลายน้ำที่อุณหภูมิ 25°C เท่ากับ 0.068 $\mu\text{g}/\text{ml}^4$ แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น methanol, ethanol, ethyl acetate, chloroform และ DMSO เป็นต้น⁵



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Cur

เป้าหมายทางชีวภาพของ Cur นั้นมีค่อนข้างหลากหลาย ดังนี้

- เอนไซม์ COX ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน arachidonic acid เป็น prostaglandin H₂ ซึ่งเป็น intermediate ที่ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นอนุพันธ์ ของ prostaglandin ที่ควบคุมความหลากหลายของหน้าที่ทางสรีรวิทยา (physiological functions) ที่จะนำไปสู่การอักเสบ การปวด หรือเป็นไข้ Cur มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิ่มเลือด (anti-thrombotic effects) โดยยับยั้งการรวมกลุ่มกันของเกล็ดเลือด หลังจากทำ thrombotic challenge และยับยั้งการสังเคราะห์ platelet thromboxane การค้นพบนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของ Cur ในการยับยั้งฤทธิ์ของ COX ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้ง platelet-activation factor และ arachidonic acid-mediated aggregation แบบจำเพาะเจาะจง⁶

- Cur สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม lipoxygenase family ได้หลายชนิด โดยแต่ละชนิดก็มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกัน เช่น neutrophil-mediated inflammatory diseases ที่เกิดจากการเกิด metabolism ของ arachidonic acid ด้วย 5-lipoxygenase (5-LOX) ทำให้ได้สารสื่อกลางการอักเสบซึ่งก็คือ leukotriene B₄ (LTB₄), Platelet 12-Lipoxygenase (12-LOX) จะแสดงออกที่เกล็ดเลือด และจะแสดงออกมากกว่าปกติในเนื้องอกหลายชนิดรวมทั้ง prostate adenocarcinoma ดังนั้น 12-LOX จึงเป็น biomarker สำหรับวัดความรุนแรง ของโรคได้ 12-LOX จะเปลี่ยน arachidonic acid ให้

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เป็น 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid [12(S)-HETE] ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดเนื้องอก โดยการกระตุ้น cell proliferation การกระตุ้นให้มีหลอดเลือดมาเลี้ยงเพิ่ม และการกระจายของเนื้องอก⁶

- เอนไซม์ epoxigenases หรือที่รู้จักกันในชื่อ cytochrome P450s (CYPs) ซึ่งเป็น monooxygenases ที่มี heme เป็นส่วนประกอบ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิด metabolism ต่าง ๆ ทั้งโมเลกุลภายในและภายนอกร่างกาย CYPs จะทำหน้าที่ metabolize ยาต่าง ๆ และยังเกี่ยวข้องกับอันตรกิริยาระหว่างยากับยาอีกด้วย Cur มีฤทธิ์ยับยั้ง CYP isoenzyme อย่างแรงเช่น CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6 และยับยั้ง CYP2E1 อย่างอ่อน ดังนั้นการยับยั้ง CYP ของ Cur สามารถลดปริมาณสารก่อมะเร็งต่าง ๆ ที่เกิดจากการ metabolized ผ่าน CYPs ได้⁶

- Cur มีฤทธิ์ยับยั้ง Protein Kinase C (PKC) ซึ่งเป็น serine/threonine protein kinase ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการทำงานของเซลล์ เช่น การเจริญเติบโต การพัฒนาของเซลล์และการเกิด apoptosis นอกจากนี้ PKC isozymes ยังเกี่ยวข้องกับพยาธิ สรีรวิทยาของโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็ง เบาหวาน อัลไซเมอร์ และโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น ดังนั้น PKC จึงเป็นเป้าหมายในการรักษาโรคเหล่านี้ PKC สามารถแบ่งประเภทตามโครงสร้างและกลไกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) classical PKCs ซึ่งอาศัย Ca^{2+} และ diacylglycerol (DAG) ในการออกฤทธิ์ 2) novel PKCs อาศัยเพียง DAG ในการออกฤทธิ์ และ 3) atypical PKCs สามารถออกฤทธิ์ได้โดยไม่ต้องอาศัย Ca^{2+} หรือ DAG โดย DAG เป็น secondary messenger ที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสของ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) ด้วย phospholipase C (PLC) และ DAG จะกระตุ้น PKC ให้อยู่ในรูปที่พร้อมออกฤทธิ์โดยจับที่ C1 domain ทำให้เกิด membrane translocation⁶

- เอนไซม์ใน Aldo-Keto reductase (AKR) family ที่สามารถรีดิวซ์ ketone และ aldehyde ต่าง ๆ ในร่างกายได้ เอนไซม์ aldehyde reductase (ALR1), aldose reductase (ALR2) และ human small intestine reductase (HSIR) เป็น 3 เอนไซม์ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน มีหน้าที่รีดิวซ์หมู่ carbonyl ใน NADPH-dependent manner เหมือนกัน และยังถูกยับยั้งด้วย Cur ได้เหมือนกัน โดย ALR1 จะกำจัด reactive aldehydes ให้กลายเป็นเมตาบอไลต์ที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ดังนั้นการยับยั้ง ALR1 จึงอาจส่งผลเสียต่อร่างกายได้ ส่วน ALR2 เป็นเอนไซม์ชนิดแรกใน polyol pathway สามารถรีดิวซ์ glucose ให้เป็น sorbitol แล้วถูกเมตาบอไลต์ต่อด้วย sorbitol dehydrogenase ได้ fructose การสะสมของ sorbitol ในเนื้อเยื่อจะนำไปสู่ oxidative stress และเพิ่ม membrane permeability ดังนั้น การที่ ALR2 ทำงานมากเกินไปจะกระตุ้นให้เกิดผลต่อพยาธิสรีรวิทยาได้ เช่น การเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดเป็นระยะเวลานานในผู้ป่วยโรคเบาหวาน จะส่งผลเสียต่อการมองเห็น ระบบหลอดเลือด และหัวใจ ไต และระบบประสาท นอกจากนี้ ALR2 ยังเกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยเพิ่มการทำงานของสารสื่อกลาง การยับยั้ง ALR2 จึงน่าจะช่วยให้ผลการรักษาที่ดีสำหรับ โรคเบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนได้

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

แต่เนื่องจาก ALR1 และ ALR2 มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน ดังนั้นการยับยั้ง ALR2 จึงเป็นการ ยับยั้ง ALR1 ด้วยซึ่งทำให้เกิดผลเสียจากการยับยั้งตามมา⁶

- NF- κ B ซึ่งจัดเป็นหนึ่งใน transcription factors family ของ eukaryotic proteins เกี่ยวข้องกับความเจ็บป่วยต่าง ๆ รวมถึง HIV, มะเร็ง และโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง เช่น ข้ออักเสบและหอบหืด เป็นต้น NF- κ B ควบคุมการแสดงออกของยีนส์ เช่น TNF, COX-2, MMP-9, IL-8, cell surface adhesion molecules, eotaxin และ antiapoptotic proteins นอกจากนี้ NF- κ B ยังกระตุ้น iNOS ซึ่งทำให้การตอบสนองต่อการอักเสบรุนแรงมากขึ้นโดยผ่าน synergistic effect กับ COX-2 สำหรับโรคมะเร็ง NF- κ B สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตและแพร่กระจาย และยังส่งผลต่อ apoptosis แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับประเภทและสถานะของเซลล์ NF- κ B ถูกควบคุมโดยโปรตีน I κ B ซึ่งเป็น inhibitory proteins ที่แยกตัวออกจาก NF- κ B ในไซโตพลาสซึม โดยการจับกันของ NF- κ B กับ I κ B จะยับยั้งการเคลื่อนย้ายของ NF- κ B ไปยังนิวเคลียส และส่งผลยับยั้งการจับกันของ NF- κ B กับ DNA เมื่อเกิดการเหนี่ยวนำโดย cytokines หรือ phorbol esters แล้ว I κ B kinase (IKK) จะเกิด phosphorylated I κ B α ขึ้นอย่างรวดเร็วที่ตำแหน่ง Ser-32 และ Ser-36 ส่งผลให้ I κ B α เกิด proteolytic degradation ผ่าน proteasome pathway นำไปสู่การปลดปล่อย NF- κ B และเคลื่อนไปยังนิวเคลียสได้ นอกจากนี้ NF- κ B ยังถูกควบคุมโดยกระบวนการ phosphorylation ของ p65 เพื่อทำให้เกิดการกระตุ้นอย่างเหมาะสม ข้อมูลจากหลายการศึกษาพบว่า Cur ทำให้ NF- κ B เกิด downregulation อีกทั้งยังยับยั้ง IKK และ proteasome 26S จึงกีดการทำงานของ NF- κ B ซึ่งนำไปสู่การยับยั้ง transcription ของ inducible mediators จำนวนมาก ผลการก่อกวนมีคัมกันของ Cur เชื่อว่าเกิดขึ้นผ่านการยับยั้งของ NF- κ B ใน leukocytes ซึ่ง นำไปสู่การเกิด downregulation ของ IL-2 นอกจากนี้ Cur ยังยับยั้ง phorbol ester ที่เหนี่ยวนำให้ NF- κ B จับกับ promoter ของ glutathione-S-transferase P1-1 (GSTP1-1) gene นำไปสู่การยับยั้งการแสดงออกของ GSTP1-1 ซึ่งเป็น apoptosis inhibitor อีกด้วย⁶

- Tubulin ซึ่งเป็น eukaryotic protein ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ การส่งสัญญาณ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดย tubulin มี 2 isoforms ได้แก่ α และ β ซึ่งเมื่อเกิด heterodimerization จะอยู่ในรูปของ cytoskeleton และ microtubules โดยจากการทดลองแบบ *in vitro* พบว่า tubulin อาจเป็นเป้าหมายของ Cur และเป็นสาเหตุของการขัดขวางการรวมกลุ่มกันของ microtubule รวมถึงกีดการทำงานของ GTPase และมีฤทธิ์เป็น partial antagonist ของ colchicine ซึ่งเป็น tubulin binder จึงคาดว่า Cur อาจจับกับ tubulin โดยตรง แต่อย่างไรก็ตาม Cur และ colchicine อาจไม่ได้แย่งจับ tubulin ที่ binding site เดียวกัน แต่อาจจับกับบริเวณ allosteric site แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ active site บน tubulin⁶

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Cur มีหลากหลาย เช่น

**บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- ฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory activity): Cur สามารถยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor ที่จะถูกแสดงออกเมื่อเกิดการอักเสบ และสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ของเซลล์ที่เกิดการอักเสบได้ด้วย⁶

- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative activity): เกิดจากการที่โปรตอนที่หมู่ฟีนอลของ Cur ถูกให้แก่ reactive oxygen และ nitrogen species ผ่านทางการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ดังนั้นทำให้สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระในบริเวณเนื้อเยื่อได้⁶

- ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer activity): Cur สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และกระตุ้นการเกิด apoptosis นอกในร่างกายและยับยั้งการเกิดเนื้องอกในร่างกาย Cur สามารถลดอัตราการเกิดการเจริญและการแพร่กระจายของเนื้องอกได้ และ Cur ยังสามารถยับยั้งผลของ phorbol ester tumor promoter และ downregulate phorbol ester-induced tumor markers หลายชนิด⁶

แต่เนื่องจาก Cur มีค่าการละลายน้ำที่ต่ำ (0.068 μ g/ml ที่อุณหภูมิ 25°C) ส่งผลให้ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้น้อย และมีความเข้มข้นที่บริเวณเป้าหมายต่ำ จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนา Cur ให้เป็นสารเดี่ยวที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสูง^{3,4}

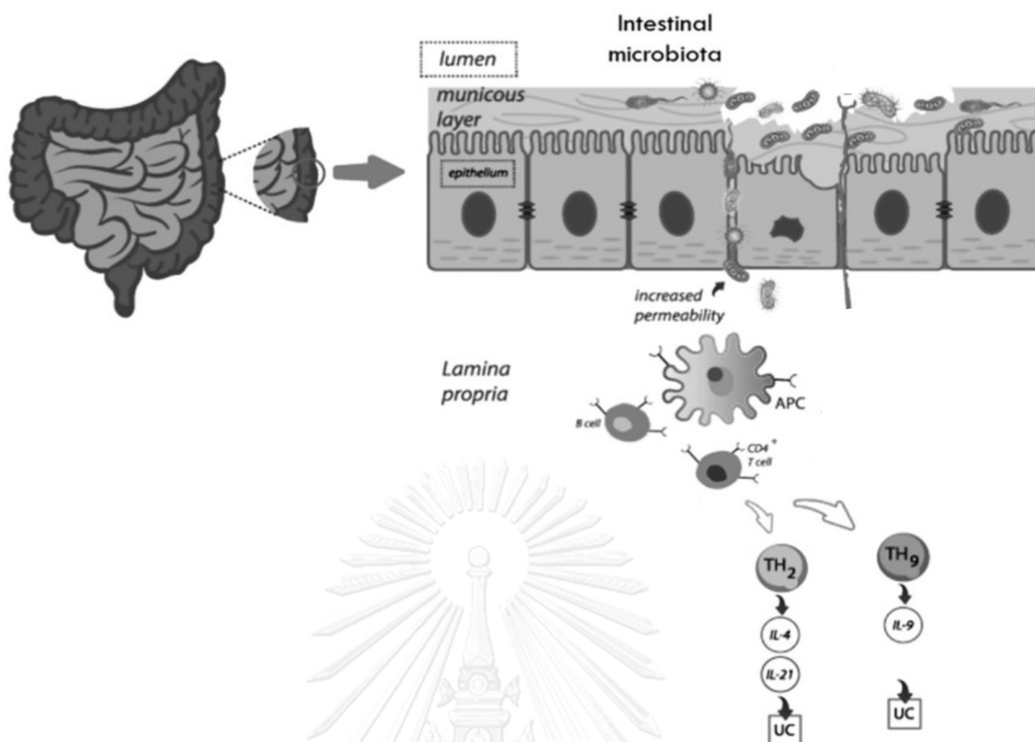
2.1.2 การใช้ Cur สำหรับการต้านการอักเสบในโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผล

โรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผลคือสภาวะที่เซลล์บริเวณลำไส้ใหญ่เกิดการอักเสบ ส่งผลให้เกิดแผลที่ลำไส้ใหญ่ โดยมีอาการคืออุจจาระเป็นเลือด (bloody diarrhea) ปวดเกร็ง (cramps) และปวดท้อง (abdominal pain) ในปัจจุบันการรักษาโรคนี้อาจใช้ยาตามระดับความรุนแรงของโรค ในกรณีที่ไม่รุนแรง จะทำการใช้ยาต้านอักเสบเช่น mesalamine หรือ sulfasalazine แต่ถ้าความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นจะพิจารณาใช้ยาต้านอักเสบกลุ่มสเตียรอยด์ในรูปแบบรับประทานหรือฉีดต่อไป⁷

สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผลคือความไม่สมดุลของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายร่วมกับเยื่อเมือกลำไส้ใหญ่มีการทำงานที่ผิดปกติ ส่งผลให้แบคทีเรียบริเวณลำไส้ใหญ่สามารถผ่านเข้ามายังบริเวณที่ปราศจากเชื้อได้ แบคทีเรียที่เข้ามาจะทำการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้หลั่ง cytokines เช่น interleukin-1 β (IL-1 β) ซึ่งจะทำการกระตุ้นให้ T cells ทำงานอย่างผิดปกติโดย T cells จะไปกระตุ้นเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ใหญ่ให้เกิดการหลั่ง cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-8 และ PGE-2 เป็นต้น ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบจนนำไปสู่การอักเสบอย่างเรื้อรังในที่สุด⁸ (รูปที่ 2)

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 2 กลไกการเกิดโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผล⁸

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Cur สามารถทำให้เกิดการต้านอักเสบในโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผลได้ เนื่องจากสามารถรับอนุมูลอิสระ ส่งผลให้ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเช่น COX-1, COX-2, LOX, TNF- α , IFN- γ และ iNOS เป็นต้น โดยตัวอย่างกลไกของ Cur ในการต้านอักเสบในโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผลมีดังนี้

- ยับยั้งการทำงานของ TLR-4 receptor ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในกระบวนการที่ทำให้เกิดการอักเสบ⁷
- เพิ่มปริมาณ PPAR- γ ซึ่งเป็น nuclear receptor super family ชนิดหนึ่ง ซึ่งจะช่วยรวมกลุ่มของเม็ดเลือดขาวให้เคลื่อนที่มายังบริเวณที่เกิดการอักเสบ และยังมียานวิจัยที่พบว่าการใช้ Cur ร่วมกับยาต้านอักเสบ dexamethasone จะช่วยเพิ่มปริมาณของ PPAR- γ และช่วยลดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 และ PGE-2 ได้⁷

- ลดการทำงานของ NO และ iNOS โดยมีการศึกษาโดยใช้หนูเป็นโมเดลพบว่า Cur สามารถที่จะลดการแสดงออกของ iNOS ใน colonic mucosa ซึ่งส่งผลให้ลดปริมาณการผลิต nitrite ส่งผลให้ความรุนแรงของโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผลลดลง⁷

- กระตุ้นให้เกิดการทำงานของ cytokines ที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ เช่น interleukin-4 (IL-4) และ interleukin-10 (IL-10) ส่งผลให้เกิดการลดจำนวนของ cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่บริเวณลำไส้ใหญ่ เช่น IL-8 และ PGE-2 เป็นต้น⁷

บทความและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

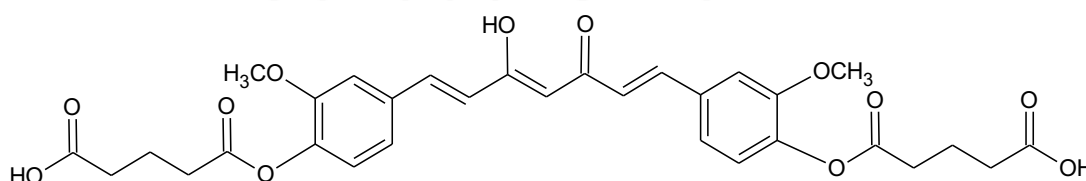
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

นอกจากนี้การใช้ Cur ร่วมกับยาต้านอักเสบ mesalamine ที่ใช้ในการรักษาโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผลในปัจจุบัน พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าการได้รับยา mesalamine เพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่า Cur เป็นสารที่มีแนวโน้มในการต้านอักเสบในโรคลำไส้ใหญ่อักเสบชนิดมีแผลได้²

2.1.3 Curcumin prodrugs

Prodrug หมายถึงอนุพันธ์ของสารใดสารหนึ่งและไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา แต่เมื่อผ่านกระบวนการทางเคมีหรือทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จะถูกเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่มีฤทธิ์ (active form) ได้ การพัฒนา prodrug จะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ คุณสมบัติทางชีวเภสัชกรรม คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ และ/หรือความคงตัวให้กับสารที่ออกฤทธิ์⁹ ในกรณีการพัฒนา prodrug ของ Cur นิยมออกแบบผ่านการเติมหมู่แทนที่ต่อกับหมู่ฟีนอลของ Cur เนื่องจากหมู่ฟีนอลในโครงสร้างของ Cur สามารถทำให้ Cur เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและไฮโดรไลซิสได้ง่าย อีกทั้งยังมีจุดมุ่งหมายในการลดการเกิด phase II conjugation ที่หมู่ฟังก์ชันนี้ prodrug ของ Cur ที่นิยมถูกพัฒนาคือ ester prodrug เพราะที่บริเวณเนื้อเยื่อของลำไส้ใหญ่มีเอนไซม์ esterase ที่สามารถตัดพันธะเอสเทอร์ได้เป็นจำนวนมาก ทำให้ prodrug สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นรูปที่มีฤทธิ์ได้ที่บริเวณออกฤทธิ์ได้^{10,11}

กรดไดคาร์บอกซิลิก (dicarboxylic acids) เช่น กรดซักซินิก (succinic acid) และกรดกลูตาริก (glutaric acid) เป็นสารที่ได้รับความนิยมในการนำมาต่อกับหมู่ฟีนอลของ Cur เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำให้แก่ prodrug เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีความปลอดภัยสูง และยังสามารถเกิดรูปเกลือได้ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาต่ารับต่อไป จากงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการสังเคราะห์และศึกษาค่าการละลายน้ำของ CDG (รูปที่ 3) ซึ่งเป็น prodrug ชนิดหนึ่งของ Cur พบว่าค่าการละลายน้ำของ prodrug ชนิดนี้สูงกว่า Cur ประมาณ 110 เท่า ซึ่งเมื่อทำ Hot-plate test โดยใช้หนูเป็นโมเดลในการทดลองแล้วพบว่า CDG ส่งผลให้มีฤทธิ์ลดอาการปวด (antinociceptive activity) ที่มากกว่า Cur⁴



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ CDG

2.2 การหาค่าการละลายน้ำของสาร

ค่าการละลายน้ำเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อค่าชีวสมมูล (bioavailability) ของยาและเป็นหนึ่งในปัจจัยที่กำหนดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยา ดังนั้นในการพัฒนายาใหม่จึงเป็นเรื่องที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่จะต้องหาวิธีหรือกระบวนการในการเพิ่มค่าการละลายน้ำของยาให้กับสารที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ และหา **บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญาญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญาญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

วิธีทดสอบที่เหมาะสมเพื่อประเมินค่าการละลายน้ำของยานั้น¹² วิธีในการศึกษาค่าการละลายน้ำของสารมีระบุไว้ใน OECD guideline¹³ โดยในปัจจุบันมีระบุไว้ 2 วิธีดังนี้

- Column elution method: อาศัยการชะของสารที่ต้องการศึกษากับน้ำ โดยใช้ micro-column ที่ต่อด้วย inert support material ซึ่งถูกทำให้อิ่มตัวด้วยสารที่ต้องการศึกษา ค่าการละลายน้ำของสารสามารถหาได้จาก mass concentration ของสารที่ถูกชะออกมา

- Shake flask method: ใช้กับสารที่อยู่ในรูปของแข็ง โดยทำการนำสารไปละลายในน้ำที่อุณหภูมิหนึ่งๆพร้อมทำการเขย่าจนสารอยู่ในสภาวะอิ่มตัว จากนั้นจะทำการหาค่า mass concentration ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม

จากงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งได้ทำการประเมินค่าการละลายน้ำของ Cur และ CDG พบว่าผู้วิจัยทำการประเมินค่าการละลายน้ำโดยใช้ shake flask method ตาม OECD guideline เพื่อศึกษาค่าการละลายน้ำที่เปลี่ยนแปลงภายหลังจากการเติมกรดกลูตาริกเข้าไปในโครงสร้าง⁴

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบโดยใช้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2

เซลล์ Human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) เป็นเซลล์ที่ได้รับความนิยมในการเป็นแบบจำลองแทนเซลล์ลำไส้ใหญ่ของมนุษย์เนื่องจากการศึกษาวิจัยแล้วพบว่าเซลล์ Caco-2 สามารถเลียนแบบชั้นโครงสร้างของลำไส้ใหญ่ และสามารถทำหน้าที่หลั่ง cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้เหมือนกับเซลล์ลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ เช่น IL-6, IL-8 และ PGE-2 เป็นต้น และสามารถใช้ IL-1 β เป็นสารในการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเซลล์ได้¹⁴ และยังคงมีงานวิจัยที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบที่บริเวณลำไส้ใหญ่ของสารประกอบโพลีฟีนอลในทับทิม (*Punica granatum* L.) โดยใช้เซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบเป็นแบบจำลองแทนเซลล์ลำไส้ใหญ่ที่เกิดการอักเสบของมนุษย์ เพื่อทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-6, IL-8 โดยอาศัยเทคนิค ELISA¹⁵ หรืองานวิจัยที่ใช้ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β เพื่อเป็นแบบจำลองแทนเซลล์ลำไส้ใหญ่ที่เกิดการอักเสบของมนุษย์ เพื่อทดสอบความสามารถของ Cur ในการลดการแสดงออกของ NF-kB ในเซลล์¹⁶

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 1) Curcumin (Cur) 95% (KLIFE[®] Lot No. KL20170828)
- 2) Curcumin monoglutaric acid (CMG)
- 3) Glutaric acid anhydride (ALDRICH[®] Lot No. WXBC0744V)
- 4) 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) (ReagentPlus[®] ALDRICH \geq 99% Lot No. MKBT6293V)
- 5) Dichloromethane (DCM) (Burdick & Jackson[®])
- 6) 1 M Hydrochloric acid (HCl) (Burdick & Jackson[®] 36.5 - 38.0% Lot. E41W60)
- 7) Ethyl acetate (EtOAc) (Burdick & Jackson[®] Batch No. 17 08 0424)
- 8) Hexane (Burdick & Jackson[®])
- 9) Acetic acid glacial (AR[®] Lot No. G09W62)
- 10) Sodium sulphate anhydrous (Na₂SO₄) (MERCK[®] Lot No. AM1023549 742)
- 11) Methanol HPLC grade (Lot No. 18 11 0115)
- 12) Acetonitrile HPLC grade (Burdick & Jackson[®] Matl No. 100197 Lot No. S61A1H)
- 13) Formic acid (EMSURE[®] 98 - 100% Index number : 607-001-00-0)
- 14) Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) (MERCK[®] Lot No. TA5035334)
- 15) TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (MERCK[®] Lot No. HX85273054)
- 16) Deionized Water
- 17) Ultra-Purified Water
- 18) อาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM))
(SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 19) Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA)
- 20) L-Glutamine 200 mM (100X) (Gibco, Grand Island, NY, USA)
- 21) Nonessential amino acids (Gibco, Grand Island, NY, USA)
- 22) Penicilin-Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)
- 23) Fungizone (Gibco, Grand Island, NY, USA)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- 24) Sodium bicarbonate (NaHCO_3) (MW 84.01) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 25) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)
(SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 26) TMB substrate (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- 27) Human IL-8 ELISA MAX™ Capture Antibody (200X) (Biolegend, San Diego, CA, USA)
- 28) Human PGE-2 ELISA MAX™ Detection Antibody (200X) (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA)
- 29) Primary anti-COX-2 rabbit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- 30) Anti-rabbit igG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- 31) β -actin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- 32) Chemiluminescent substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 33) Acrylamide (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 34) N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 35) Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 36) Sodium chloride (NaCl) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 37) Potassium chloride (KCl) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 38) Disodium phosphate (Na_2HPO_4) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 39) Monopotassium phosphate (KH_2PO_4) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 40) Tween® 20 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 41) Bovine serum albumin (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA)
- 42) Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 43) Ammonium persulphate (APS) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 44) Glycerine (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 45) β -mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 46) Trisaminomethane (Tris) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 47) Bromophenol blue (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 48) BCA protein assay reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 49) 2-Mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 50) Ethanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 51) Protein molecular weight marker (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.1.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- 1) เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (Sartorius® Serial No. 20902448)
- 2) Hotplate stirrer (Labtech® Serial No. 04039171240153)
- 3) แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar) ขนาด 20x7 mm
- 4) ปีกเกอร์ Pyrex® ขนาด 10, 50, 100, 250, 500 และ 1000 mL
- 5) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask) Pyrex® ขนาด 250 mL
- 6) ขวดก้นกลม (Round bottom flask) Schott Duran® ขนาด 100 mL
- 7) Separatory funnel GLASSCO® Borosilicate glass ขนาด 500 mL
- 8) หลอดหยด (dropper) และจุกยาง
- 9) แท่งแก้วสำหรับคนสาร
- 10) Buchi® Evaporator Rotavapor R-200 type B 465 No. 888071
- 11) กระบอกตวง Witeg® ขนาด 10, 25, 100 และ 1000 mL
- 12) กรวยแก้วกรองสารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 mm
- 13) กระดาษกรอง Whatman® ขนาด 110 mm Cat No. 1001 110
- 14) Paraffin film Parafilm® 4 In. x 125 Ft.roll
- 15) สำลี
- 16) TLC viewing cabinets (Spectroline® Model CM-10 wavelength 365/254)
- 17) ขวดแก้วสีชา (vial) CNW® ขนาด 32 x 11.6 mm
- 18) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) (Hettich® zentrifugen D-78532 Tuttlingen Serial No. 0008629-08-00)
- 19) Volumetric flask Witeg® ขนาด 5.0000, 10.000, 500.00, 1000.0 และ 2000.0 mL
- 20) Costar® Microcentrifuge tube Cat No. 3621 ขนาด 1.7 mL
- 21) Corning® CentriStar™ Centrifuge tube Medical grade ขนาด 15 mL และ 50 mL
- 22) Micropipette RAININ® Pipet-Lite XLS ขนาด 2-20 µL, 20-200 µL และ 100-1000 µL
- 23) Micropipette tips Mettler toledo® ขนาด 20 µL, 200 µL และ 1000 µL
- 24) Vortex Mixer (VORTEX GENIE 2® Model: G-560E Serial No. 2-99947)
- 25) Ultrasonic cleaner set (Model WUC-A02H Serial No. 0083309159M006)
- 26) HPLC vial (สีใส)
- 27) HPLC vial (สีชา)
- 28) Shimadzu® High performance liquid chromatography (HPLC) system model: 10A Serial No. C21014114160

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- 29) Analytical column Kinetex[®] C8 ขนาด 50x4.6 mm (2.6 μ m, 100 Å) Lot No. LB18950114 Serial No. 767066-3
- 30) Thermo Scientific™ SHKE6000-8CE MaxQ™ 6000 Incubated/Refrigerated Stackable Shaker, 240V 50Hz
- 31) Bruker[®] 300 MHz NMR spectrometer
- 32) Bruker[®] IR Spectrometer
- 33) Bruker[®] micrOTOF-QII (MTQ) mass spectrometry Serial No. 10146
- 34) Thermo Scientific™ Forma™ Model 371 CO₂ Incubators Serial No. 313500-4110
- 35) CLARIOstar[®] BMG Labtech Microplate Reader Serial No. 430-0281
- 36) Thermo Scientific™ Orion star A211 pH Meter Serial No. B252665426
- 37) Costar[®] 96 Well Cell Culture Cluster Polystyrene Plate
- 38) Costar[®] 96 Well EIA/RIA Polystyrene Plate
- 39) Costar[®] 6 Well Cell Culture Cluster Polystyrene Plate
- 40) Nitrocellulose membrane
- 41) ฟองน้ำ
- 42) Electrophoresis equipments
- 43) ถุงพลาสติกใส
- 44) Cassette แปะแผ่นฟิล์ม

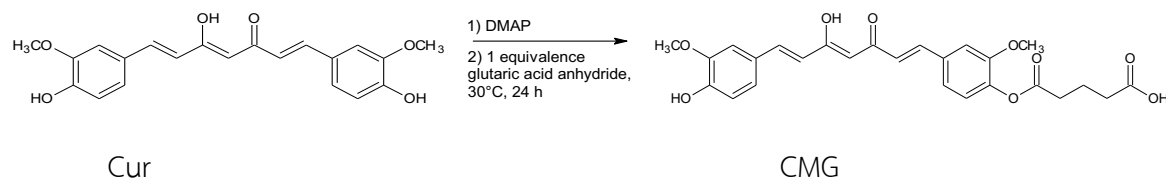
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG

3.2.1.1 การสังเคราะห์ CMG

การสังเคราะห์ CMG ทำได้โดยละลาย Cur ปริมาณ 1.84 g (5 mmol) และ glutaric acid anhydride ปริมาณ 100 mg (1 mmol) ใน DCM ปริมาตร 20 mL โดยใช้ DMAP 183 mg (1.5 mmol) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 4) จากนั้นคนสารละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1 M HCl จำนวน 10 mL จากนั้นเทสารละลายผสมใส่ separatory funnel เติมน้ำ แล้วทำการเขย่าเพื่อล้างเอาสารที่อยู่ในชั้นน้ำออกไป ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น แล้วเก็บชั้นสารละลายอินทรีย์บรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ แล้วเติม anhydrous Na₂SO₄ เพื่อกำจัดน้ำออกจากระบบ จากนั้นกรองผง anhydrous Na₂SO₄ ออก แล้วนำชั้นสารละลายอินทรีย์ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (thin layer chromatography; TLC) ที่มี mobile phase เป็น ethyl acetate : DCM : hexane ในสัดส่วน 2 : 4 : 4 และมี acetic acid เข้มข้นประมาณ 1% v/v ผสมอยู่ สำหรับ stationary phase ที่ใช้เป็นชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ทำการบดคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

ส่องแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ต่อมานำชิ้นสารละลายอินทรีย์ที่ได้มาสกัดแยกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)



รูปที่ 4 กระบวนการสังเคราะห์ CMG

3.2.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy IR spectroscopy และ liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry โดย $^1\text{H-NMR}$ spectrum ได้จากการใช้เครื่อง Bruker® 300 MHz NMR spectrometer แล้ววัด spectrum ของ CMG ที่ละลายใน CDCl_3 ส่วน IR spectrum ได้จากการใช้เทคนิค FTIR-ATR spectroscopy และสำหรับ mass spectrum ได้จากการวัดด้วยเทคนิค electrospray ionization ของเครื่อง Bruker® micrOTOF-QII (MTQ) mass spectrometry ภายใต้ positive mode โดยตั้งค่าพารามิเตอร์สำหรับการบันทึก mass spectrum ดังนี้: วิเคราะห์สารที่มีค่าประจุต่อมวล (m/z) ในช่วง (mass range) 50-1000 m/z , end plate offset -500 V, capillary voltage -4.5 kV, nebulizer pressure 2.5 bar, drying gas flow rate 8.0 L/min และ drying gas temperature 220°C ขณะที่การบันทึก MS^2 spectrum ตั้งค่าพารามิเตอร์เช่นเดียวกับการบันทึก MS spectrum และเพิ่มการตั้งค่า collision energy 15 eV และ isolation width 10 m/z ระหว่างการบันทึก mass spectrum ใช้สารละลาย sodium formate เป็นสารละลายมาตรฐาน โปรแกรมที่ใช้ในการควบคุมและวิเคราะห์ผล คือ micrOTOF control และ Bruker HyStar 3.2

3.2.2 การศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG

3.2.2.1 การเตรียม standard stock solution ของ Cur

ชั่ง Cur จำนวน 10.0 mg ละลายใน acetonitrile ให้ได้ปริมาตร 10.0 mL ใน 10 mL-volumetric flask จะได้ primary standard stock solution ความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้นนำไปเจือจางด้วย acetonitrile ให้ได้ secondary standard stock solution ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ และนำไปเจือจางด้วย acetonitrile อีกครั้งจนได้ tertiary standard stock solution ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$

3.2.2.2 การเตรียม standard stock solution ของ CMG

ชั่ง CMG จำนวน 10.0 mg ละลายใน acetonitrile ให้ได้ปริมาตร 10.0 mL ใน 10 mL-volumetric flask จะได้ primary standard stock solution ความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้นนำไปเจือจางด้วย acetonitrile ให้ได้ secondary standard stock solution ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ และนำไปเจือจางด้วย acetonitrile อีกครั้งจนได้ tertiary standard stock solution ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

จางด้วย acetonitrile ให้ได้ secondary standard stock solution ความเข้มข้น 100 µg/mL และนำไปเจือจางด้วย acetonitrile อีกครั้งจนได้ tertiary standard stock solution ความเข้มข้น 50 µg/mL

3.2.2.3 HPLC condition สำหรับการศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG

ใช้เครื่อง Shimadzu® 10A HPLC system ที่ประกอบด้วย degasser unit, pump และ UV-Vis detector โปรแกรมที่ใช้สำหรับควบคุมเครื่อง HPLC และประมวลผลข้อมูล คือ Class VP ใช้คอลัมน์ C8 ขนาด 50x4.6 mm (2.6 µm, 100 Å) injection volume เท่ากับ 10 µL อุณหภูมิของ column oven 33°C mobile phase ที่ใช้เป็นแบบ isocratic โดยใช้ 2% v/v acetic acid-acetonitrile (60 : 40, v/v) ปรับ flow rate เท่ากับ 1.0 mL/min ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm และทำการวิเคราะห์ครั้งละ 7 นาที

3.2.2.4 การเตรียม standard solution เพื่อทดสอบความเหมาะสมของ chromatographic system ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (system suitability test)

นำ Cur tertiary standard stock solution และ CMG tertiary standard stock solution มาผสมและเจือจางด้วย acetonitrile ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Cur และ CMG เป็น 3.0 µg/mL จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง แล้วนำค่า retention time และ peak area ของ Cur และ CMG ที่ได้ทั้ง 5 ครั้ง มาคำนวณหา %RSD

3.2.2.5 การเตรียม calibration curve ของ CMG

นำ CMG tertiary standard stock solution มาเจือจางด้วย 50% acetonitrile in water ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL และ 10 µg/mL นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และนำค่า peak area ที่ได้มาสร้างเป็น calibration curve ของ CMG

3.2.2.6 การศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG ที่ 25°C

การศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG อ้างอิงตาม OECD guideline¹³ ทำได้โดยละลาย CMG 5 mg ด้วยน้ำ 1.0 mL ในขวดสีชา แล้วนำไปปั่นผสมใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 25°C ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตของผสมมาใส่ microcentrifuge tube แล้วนำไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 25°C ความเร็วรอบ 1000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายจำนวน 500 µL ใส่ microcentrifuge tube แล้วเติม 50% acetonitrile in water อีก 500 µL จากนั้นปิเปตสารละลายผสมใส่ขวด และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณหาความเข้มข้นของ CMG จากค่า peak area เทียบกับสมการที่ได้จากการทำ calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน CMG แล้วคูณด้วยค่า dilution factor ทำเช่นนี้ทั้งหมด 3 ครั้ง ในวันที่แตกต่างกัน โดยค่าการละลายน้ำของ CMG จะได้จากการเฉลี่ยของทั้ง 3 ครั้ง

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.2.3 การประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2

3.2.3.1 การเตรียมสารที่ใช้ในการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบ

3.2.3.1.1 การเตรียมสารละลาย Cur และ CMG ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 μM

เตรียม Cur primary stock solution ความเข้มข้น 27000 μM โดยชั่ง Cur 1 mg ละลายใน DMSO 100 μL ใน microcentrifuge tube จากนั้นเตรียม Cur secondary stock solution ความเข้มข้น 135 μM ใน 0.5% DMSO โดยปิเปต Cur primary stock solution ปริมาตร 30 μL และ DMSO 5970 μL ลงใน microcentrifuge tube ทำการเตรียม Cur tertiary stock solution ความเข้มข้น 100 μM ใน 0.5% DMSO โดยปิเปต Cur secondary stock solution ปริมาตร 4.4 mL และ 0.5% DMSO 1600 μL จากนั้นทำการเจือจาง Cur tertiary stock solution ด้วย 0.5% DMSO ให้ได้สารละลาย Cur ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 μM

เตรียม CMG primary stock solution ความเข้มข้น 20000 μM โดยชั่ง CMG 1 mg ละลายใน DMSO 100 μL ใน microcentrifuge tube จากนั้นเตรียม CMG secondary stock solution ความเข้มข้น 100 μM ใน 0.5% DMSO โดยปิเปต CMG primary stock solution ปริมาตร 30 μL และ DMSO 5970 μL ลงใน microcentrifuge tube จากนั้นทำการเจือจาง CMG secondary stock solution ด้วย 0.5% DMSO ให้ได้สารละลาย CMG ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 μM

3.2.3.1.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในเทคนิค ELISA

1) การเตรียมสารละลาย 10X Phosphate buffered saline (PBS)

ชั่ง NaCl 80 g, KCl 2 g, Na_2HPO_4 6.1 g, KH_2PO_4 2 g และตวงน้ำกลั่น 800 mL ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเทลงใน 1 L-volumetric flask และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2) การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffered Saline with Tween[®]20 (PBST)

ตวง 10X PBS 25 mL และปิเปต Tween[®] 20 125 μL ลงในบีกเกอร์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 250 mL

3) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน IL-8 ความเข้มข้น 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 pg/mL








เตรียมสารละลายมาตรฐาน IL-8 โดยปิเปต IL-8 ความเข้มข้น 80 ng/mL จำนวน 6.25 μL แล้วทำการเจือจางด้วย 1% BSA ใน 0.05% PBST ให้ได้ความเข้มข้น IL-8 เท่ากับ 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 และ 15.6 pg/mL ดังรูป

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด


The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

							
ความเข้มข้น IL-8 (pg/mL)	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6
ปริมาตรสารที่ปีเปต (μ L)	250	250	250	250	250	250	250

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน PGE-2 ความเข้มข้น 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 pg/mL

เตรียมสารละลายมาตรฐาน PGE-2 โดยปีเปต PGE-2 ความเข้มข้น 80 ng/mL จำนวน 6.25 μ L แล้วทำการเจือจางด้วย 1% BSA ใน 0.05% PBST ให้ได้ความเข้มข้น PGE-2 เท่ากับ 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 และ 15.6 pg/mL ดังรูป

							
ความเข้มข้น PGE-2 (pg/mL)	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6
ปริมาตรสารที่ปีเปต (μ L)	250	250	250	250	250	250	250

3.2.3.1.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในเทคนิค western blot

1) การเตรียมสารละลาย 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS 50 g ลงในบีกเกอร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 mL

2) การเตรียมสารละลาย 10% ammonium persulphate (APS)

ชั่ง APS 0.05 g ลงใน microcentrifuge tube ละลายในน้ำกลั่น 500 μ L

3) การเตรียมสารละลาย Lumi's lysis buffer







ตวงสารละลาย 10% SDS 10 mL, glycerol 10 mL, β -mercaptoethanol 10 mL, 0.25M Tris pH 6.8 16 mL และ 0.1% bromophenol blue 1 mL ลงใน 100 mL-volumetric flask และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL โดยชั่ง BSA 2 mg ละลายในน้ำกลั่น 1 mL จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 1.25, 0.06 และ 0.03 mg/mL ดังรูป

						
ความเข้มข้น BSA (mg/mL)	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03
ปริมาตรสารที่ปิเปต (μ L)	500	500	500	500	500	500



5) การเตรียม BCA protein assay reagent A ใน 4% CuSO_4

ปิเปต BCA protein assay reagent A และ 4% CuSO_4 ในอัตราส่วน 50:1 ตามลำดับ ใส่ลงใน microcentrifuge tube

6) การเตรียม 5% 2-Mercaptoethanol ใน Dye 5X

ปิเปต 2-Mercaptoethanol ปริมาตร 25 mL ใส่ใน microcentrifuge tube ที่มี 5X Dye อยู่ 475 μ L

7) การเตรียมสารละลาย resolving gel buffer (3 M Tris-HCl pH 8.85)

ชั่ง Tris 36.33 g และตวงน้ำกลั่น 80 mL ลงในบีกเกอร์ จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl จนได้ pH 8.85 เทสารลงใน 100 mL-volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

8) การเตรียมสารละลาย stacking gel buffer (0.25 M Tris-HCl pH 6.8)

ชั่ง Tris 3.028 g และตวงน้ำกลั่น 80 mL ลงในบีกเกอร์ จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl จนได้ pH 6.8 เทสารลงใน 100 mL-volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

9) การเตรียมสารละลาย resolving gel

เตรียม 10% gel โดยปิเปตน้ำกลั่น 16.68 mL, resolving gel buffer 10 mL, acrylamide 13.34 mL, 10% SDS 400 μ L, 10% APS 400 μ L และ TEMED 40 μ L ลงใน centrifuge tube (ควรใส่ 10% APS และ TEMED ที่หลังสุด เนื่องจาก APS และ TEMED จะทำให้เกิด polymerisation ของ acrylamine แล้วทำให้สารละลายที่ได้แข็ง)

10) การเตรียมสารละลาย stacking gel

เตรียม 4% gel โดยปิเปตน้ำกลั่น 7.4 mL, stacking gel buffer 2.6 mL, acrylamide 2.6 mL, 10% SDS 200 μ L, 10% APS 200 μ L และ TEMED 40 μ L ลงใน centrifuge tube (ควรใส่ 10%

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

APS และ TEMED ที่หลังสุด เนื่องจาก APS และ TEMED จะทำให้เกิด polymerisation ของ acrylamine แล้วทำให้สารละลายที่ได้แข็ง)

11) การเตรียมสารละลาย 5X running buffer

ชั่ง Tris base 15.1 g, glycerine 94 g และตวง 10% SDS 50 mL ลงใน 1 L-volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 mL ด้วยน้ำกลั่น

12) การเตรียมสารละลาย transfer buffer

ตวง 100% ethanol 233 mL และ 5X running buffer 100 mL ลงใน 1 L-volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 mL ด้วยน้ำกลั่น

13) การเตรียมสารละลาย 10X TBS (Tris-buffer saline)

ชั่ง Tris 24.2 g, NaCl 80 g และตวงน้ำกลั่น 900 mL ลงในบีกเกอร์ จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl จนได้ pH 7.6 เทสารลงใน 1 L-volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 mL ด้วยน้ำกลั่น

14) การเตรียมสารละลาย wash buffer (TBST)

ตวง 10X TBS และ Tween[®]20 1 mL และตวงน้ำกลั่น 900 mL ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเทสารลงใน 1 L-volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 mL ด้วยน้ำกลั่น

15) การเตรียมสารละลาย blocking buffer (5% skim milk in TBST)

ชั่ง non-fat dry milk 5 g ลงใน 100-mL volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL ด้วย wash buffer

16) การเตรียมสารละลาย 5% BSA in TBST

ชั่ง BSA 1 g ลงใน 20-mL volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ 20 mL ด้วย wash buffer

17) การเตรียมสารละลาย primary COX-2 rabbit

ละลาย primary COX-2 rabbit ลงในสารละลาย 5% BSA in TBST ให้ได้ความเข้มข้น 1:1000 ปริมาตร 10 mL

18) การเตรียมสารละลาย anti-rabbit IgG

ละลาย anti-rabbit IgG ลงในสารละลาย blocking buffer ให้ได้ความเข้มข้น 1:2000 ปริมาตร 10 mL

19) การเตรียมสารละลาย β -actin

ละลาย β -actin ลงในสารละลาย blocking buffer ให้ได้ความเข้มข้น 1:20000 ปริมาตร 10 mL

3.2.3.2 การประเมินความเป็นพิษของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ที่ความหนาแน่น 10,000 เซลล์/หลุม ในเพลทขนาด 96 หลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (อาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ประกอบด้วย 15% FBS, 1% Pen-Strep, 1% NEAA, 1% L-glutamine และ 0.2% fungizone) บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ **บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ออก ล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Cur และ CMG ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 μM ลงในหลุม ปริมาตร 200 μL /หลุม โดยใช้ 0.5% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม โดยใส่สารแต่ละความเข้มข้นแบบ quadruplicate นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดของเหลวออกจากเซลล์ จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน ปริมาตร 200 μL /หลุม จากนั้นใส่สารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 20 μL /หลุม จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 0.5 mg/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ออกจากนั้นใส่ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ดังสมการ

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของเซลล์ในกลุ่มควบคุม}}$$

3.2.3.3 การประเมินความเป็นพิษของสภาวะที่ใช้ในการทดลองต่อเซลล์ Caco-2

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ที่ความหนาแน่น 40,000 เซลล์/หลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ในเพลทขนาด 6 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Cur หรือ CMG ที่ความเข้มข้น 5 μM ลงในหลุม ปริมาตร 2 mL /หลุม โดยใช้ DMSO 0.5% เป็นกลุ่มควบคุม โดยใส่สารแต่ละความเข้มข้นแบบ duplicate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดของเหลวออกจากเซลล์ ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง และทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานลงในหลุม 2 mL /หลุม จากนั้นทำการเหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วยการใส่ IL-1 β ความเข้มข้น 100 ng/mL ปริมาตร 20 μL /หลุม จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 10 ng/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดของเหลวออกจากเซลล์ จากนั้นใส่อาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน ปริมาตร 2 mL /หลุม จากนั้นใส่สารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 200 μL /หลุม จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 0.5 mg/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ออกจากนั้นใส่ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ดังสมการ

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของเซลล์ในกลุ่มควบคุม}}$$

3.2.3.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่น 40,000 เซลล์/หลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ในเพลทขนาด 6 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ทำการ **บดคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาณิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาณิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

ล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Cur หรือ CMG ที่ความเข้มข้น 5 μM ลงในหลุม ปริมาตร 2 mL/หลุม โดยใช้ DMSO 0.5% เป็นกลุ่มควบคุม โดยใส่สารแต่ละความเข้มข้นแบบ duplicate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดของเหลวออกจากเซลล์ ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง และทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน ปริมาตร 2 mL/หลุม จากนั้นทำการเหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วยการใส่ IL-1 β ความเข้มข้น 100 ng/mL ปริมาตร 20 μL /หลุม จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 10 ng/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับนำไปหาปริมาณของ IL-8 และ PGE-2 และทำการเก็บเซลล์สำหรับนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน COX-2

3.2.3.4.1 การวัดปริมาณ IL-8 ด้วยเทคนิค ELISA

ละลาย capture Ab 200X ด้วย PBS ที่ pH 7.2-7.4 แล้วใส่ลงในเพลทขนาด 96 หลุม ปริมาตร 50 μL /หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย 0.05% PBST จำนวน 4 ครั้ง จากนั้น block เพลท ด้วย 1% BSA ใน PBS ปริมาตร 100 μL /หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมทำการเขย่า ล้างเพลทด้วย PBST 0.05% จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นใส่สารละลายมาตรฐาน IL-8 แต่ละความเข้มข้น และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทดสอบ ปริมาตร 50 μL /หลุม โดยใส่แต่ละสารแบบ duplicate นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงพร้อมทำการเขย่า ล้างเพลทด้วย 0.05% PBST จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเจือจาง biotin-labeled detecting Ab 200X ด้วย 1% BSA ใน 0.05% PBST แล้วใส่ลงในเพลท ปริมาตร 50 μL /หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมทำการเขย่า ล้างเพลทด้วย 0.05% PBST จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเจือจาง HRP-conjugated Avidin ด้วย 1% BSA ใน PBST 0.05% ในอัตราส่วน 1:2000 แล้วใส่ลงในเพลท ปริมาตร 50 μL /หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาทีพร้อมทำการเขย่า ล้างเพลทด้วย 0.05% PBST จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย TMB substrate ปริมาตร 50 μL /หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที (หลีกเลี่ยงแสงขณะทำ) แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 2M H₂SO₄ ปริมาตร 50 μL /หลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm และ 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

3.2.3.4.2 การวัดปริมาณ PGE-2 ด้วยเทคนิค ELISA

ละลาย capture Ab 200X ด้วย PBS ที่ pH 7.2-7.4 แล้วใส่ลงในเพลทขนาด 96 หลุม ปริมาตร 50 μL /หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย 0.05% PBST จำนวน 4 ครั้ง จากนั้น block เพลท ด้วย 1% BSA ใน PBS ปริมาตร 100 μL /หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมทำการเขย่า ล้างเพลทด้วย PBST 0.05% จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นใส่สารละลายมาตรฐาน PGE-2 แต่ละความเข้มข้น และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทดสอบ ปริมาตร 50 μL /หลุม โดยใส่แต่ละสารแบบ duplicate นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงพร้อมทำการเขย่า ล้างเพลทด้วย 0.05% PBST จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเจือจาง biotin-labeled detecting Ab 200X ด้วย 1% BSA ใน 0.05% PBST แล้วใส่ลงในเพลท ปริมาตร 50 μL /หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมทำการ

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เขย่า ล้างเพลทด้วย 0.05% PBST จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเจือจาง HRP-conjugated Avidin ด้วย 1% BSA ใน PBST 0.05% ในอัตราส่วน 1:2000 แล้วใส่ลงในเพลท ปริมาตร 50 μ L/หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีพร้อมทำการเขย่า ล้างเพลทด้วย 0.05% PBST จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย TMB substrate ปริมาตร 50 μ L/หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที (หลีกเลี่ยงแสงขณะทำ) แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 2M H_2SO_4 ปริมาตร 50 μ L/หลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm และ 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

3.2.3.4.3 การวัดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ด้วยเทคนิค western blot

1) การเก็บตัวอย่างและการเตรียมโปรตีน

ล้างเซลล์ Caco-2 ด้วย cold PBS จำนวน 2 ครั้ง ดูดของเหลวออกจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงให้หมด แล้วทำการ lyse cells ด้วยการเติม lysis buffer จำนวน 60 μ L ต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C พร้อมทำการเขย่า เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดเซลล์ออกจากเพลท และถ่ายใส่ microcentrifuge tube นำไป centrifuge แล้วเก็บส่วนใสไว้ใน microcentrifuge tube โดยแบ่งเก็บ 2 ชุด เพื่อนำไปวัดปริมาณโปรตีน และเตรียมโปรตีนเพื่อทำ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

1.1) การวัดปริมาณโปรตีน

ปิเปตโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง จำนวน 3 μ L ลงใน microcentrifuge tube แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น จำนวน 27 μ L จากนั้นปิเปตน้ำกลั่น (blank), สารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น และ โปรตีนตัวอย่าง จำนวน 10 μ L ลงในไมโครเพลท 96 หลุม โดยใส่แต่ละสารแบบ duplicate ทำการปิเปตสารละลายผสมของ BCA protein assay reagent A และ 4% $CuSO_4$ ลงในเพลท ปริมาตร 200 μ L/หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

1.2) การเตรียมโปรตีนเพื่อทำ SDS-PAGE

ผสมโปรตีนที่ได้จากการเก็บเซลล์กับ loading buffer (5% 2-Mercaptoethanol ใน 5X dye) และน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่ 40 μ g ใน microcentrifuge tube ทำการ centrifuge และนำโปรตีนตัวอย่างไปแช่ในน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไป centrifuge และนำโปรตีนตัวอย่างไปพักไว้บนน้ำแข็งก่อนไหลดลงเจล

2) การทำ SDS-PAGE

ทำความสะอาดกระจก electrophoresis plate ด้วย 70% ethanol แล้วประกอบกระจกเข้ากับที่ตั้ง โดยทำให้ขอบล่างของเพลททั้งสองอยู่ในระนาบเดียวกัน จากนั้นตรวจสอบการรั่วโดยการเติมน้ำกลั่นเข้าไประหว่างกระจกทั้งสอง ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง หากไม่มีน้ำกลั่นรั่วออกมาให้เทน้ำกลั่นทิ้ง แต่หากมีน้ำกลั่นรั่วออกมาให้ประกอบกระจกใหม่ จากนั้นเทสารละลาย resolving gel ลงไประหว่างเพลท ให้ได้ระดับของเจลประมาณ $\frac{3}{4}$ ของเพลท และเทน้ำกลั่นลงไป ตั้งทิ้งไว้ 15-30 นาที รอจนเจลแข็งแล้วจึงเทน้ำ

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

กลั่นออก เทสารละลาย stacking gel ลงไปให้เต็มด้านบนของเพลท จากนั้นใส่หวี (combs) โดยไม่ให้มีฟองอากาศเหลืออยู่ในกระจกเพื่อให้เกิดเป็นหลุมที่จะโหลดโปรตีน แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้เจลแข็ง นำเฉพาะกระจกไปต่อกับอุปกรณ์ electrophoresis เท 1X running buffer ลงใน chamber โดยระดับของ running buffer ต้องอยู่สูงกว่าเครื่องหมายที่ระบุไว้ข้างนอก tank ทำการดึงหรือออกจากนั้นใช้ปิเปตต์ขนาด 1 mL ตูด running buffer แล้วฉีดใส่แต่ละหลุม 2-3 ครั้ง เพื่อล้าง acrylamide ที่เกินออกมา ซึ่งอาจไปขวางการไหลสารได้ จากนั้นโหลด molecular weight marker ปริมาตร 5 μ L/หลุม และสารละลายโปรตีนตัวอย่าง ปริมาตร 20 μ L/หลุม แล้วจึงให้แรงดันไฟฟ้าที่ 90 V เป็นเวลา 15 นาที แล้วต่อด้วย 120 V ทำการหยุดรันเมื่อเห็นแถบของโปรตีนลงมาที่ด้านล่างของกระจก

3) การย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลง nitrocellulose membrane

ตัด nitrocellulose membrane ให้พอดีกับแถบของโปรตีนที่เราต้องการย้ายในแผ่นเจล นำ nitrocellulose membrane, ฟองน้ำ และกระดาษ Whatman 3 MM แห่ลงใน transfer buffer ประมาณ 10 นาที แล้วทำการย้ายโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane โดยจัดเรียงวัสดุที่เตรียมไว้ใน transfer buffer ดังนี้

***** (+) ขั้วไฟฟ้าบวก
 ||| ฟองน้ำ
 // กระดาษ Whatman 3MM
 ----- nitrocellulose membrane
 ----- polyacrylamide gel
 // กระดาษ Whatman 3MM
 ||| ฟองน้ำ
 ***** (-) ขั้วไฟฟ้าลบ

ใช้ centrifuge tube ไล่อากาศออกให้หมด จากนั้นเท transfer buffer และใส่ ice pack ลงใน chamber แล้วนำแผ่นเจลที่ถูกประกอบไว้แล้วใส่ใน chamber จากนั้นเท transfer buffer ให้เกือบถึงขอบบนสุดของ chamber แล้วจึงเริ่มให้แรงดันไฟฟ้าที่ 100 V ประมาณ 1 ชั่วโมง

4) การตรวจสอบปริมาณโปรตีน COX-2 โดยใช้แผ่นฟิล์ม

แช่ membrane ลงในสารละลาย blocking buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมทำการเขย่า จากนั้นเทสารละลาย blocking buffer ออก แล้วล้างด้วย TBST จำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที ทำการแช่ membrane ในสารละลาย primary COX-2 rabbit ที่เตรียมไว้ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืนพร้อมทำการเขย่า เมื่อครบเวลาแล้ว นำสารละลาย primary COX-2 rabbit ออก ล้างด้วย TBST จำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที ทำการแช่ membrane ในสารละลาย anti-rabbit IgG ที่อุณหภูมิห้อง

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่พร้อมทำการเขย่า เมื่อครบเวลาแล้ว นำสารละลาย anti-rabbit IgG ออก ล้างด้วย TBST จำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที จากนั้นนำ membrane มาวางบนแผ่นพลาสติก ทำการเติม chemiluminescent substrate จำนวน 200 μL /แผ่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้าย membrane ลงใน cassette จากนั้นทำการทดลองในห้องล้างฟิล์ม (ห้องมืด) โดยนำแผ่นฟิล์มวางลงบนแผ่นพลาสติกที่ด้านล่างมี membrane วางอยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 วินาที เมื่อครบเวลานำแผ่นฟิล์มแช่ในสารละลาย developer จนกระทั่งเริ่มเห็นแถบของโปรตีน นำแผ่นฟิล์มแช่ในน้ำ ประมาณ 30 วินาที จากนั้นย้ายแผ่นฟิล์มไปแช่ลงในสารละลาย fixer รอจนกระทั่งแผ่นฟิล์มใส แช่แผ่นฟิล์มในน้ำอีกครั้งหนึ่ง ก่อนจะนำแผ่นฟิล์มไปล้างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้โปรแกรม ImageJ แปรผลความเข้มของโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มออกมาเป็นตัวเลข (density)

5) การตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ load ด้วย β -actin

นำ membrane ออกจาก cassette แล้วล้างด้วย TBST จำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที นำมาแช่ต่อด้วย stripping buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที พร้อมทำการเขย่า จากนั้นเทสารละลาย stripping buffer ออก แล้วล้างด้วย TBST จำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที ทำการบ่ม membrane ด้วย β -actin ปริมาตร 5 mL/แผ่น ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมทำการเขย่า จากนั้นนำ β -actin ออก แล้วล้างด้วย TBST จำนวน 3 รอบ รอบละ 3 นาที นำ membrane วางบนแผ่นพลาสติก จากนั้นทำการเติม chemiluminescent substrate จำนวน 200 μL /แผ่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้าย membrane ลงใน cassette จากนั้นทำการทดลองในห้องล้างฟิล์ม (ห้องมืด) โดยนำแผ่นฟิล์มวางลงบนแผ่นพลาสติกที่ด้านล่างมี membrane วางอยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 วินาที เมื่อครบเวลานำแผ่นฟิล์มแช่ในสารละลาย developer จนกระทั่งเริ่มเห็นแถบของโปรตีน นำแผ่นฟิล์มแช่ในน้ำ ประมาณ 30 วินาที จากนั้นย้ายแผ่นฟิล์มไปแช่ลงในสารละลาย fixer รอจนกระทั่งแผ่นฟิล์มใส แช่แผ่นฟิล์มในน้ำอีกครั้งหนึ่ง ก่อนจะนำแผ่นฟิล์มไปล้างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้โปรแกรม ImageJ แปรผลความเข้มของโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มออกมาเป็นตัวเลข (density)

3.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมในการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2 ซึ่งทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 4 ครั้ง โดย Post-Hoc ที่นำมาคำนวณ คือ Scheffe, Turkey และ Duncan และใช้ analysis of variance (ANOVA) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างหลายกลุ่ม โดยกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p\text{-value} < 0.05$ และข้อมูลของงานวิจัยนี้แสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการสังเคราะห์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG

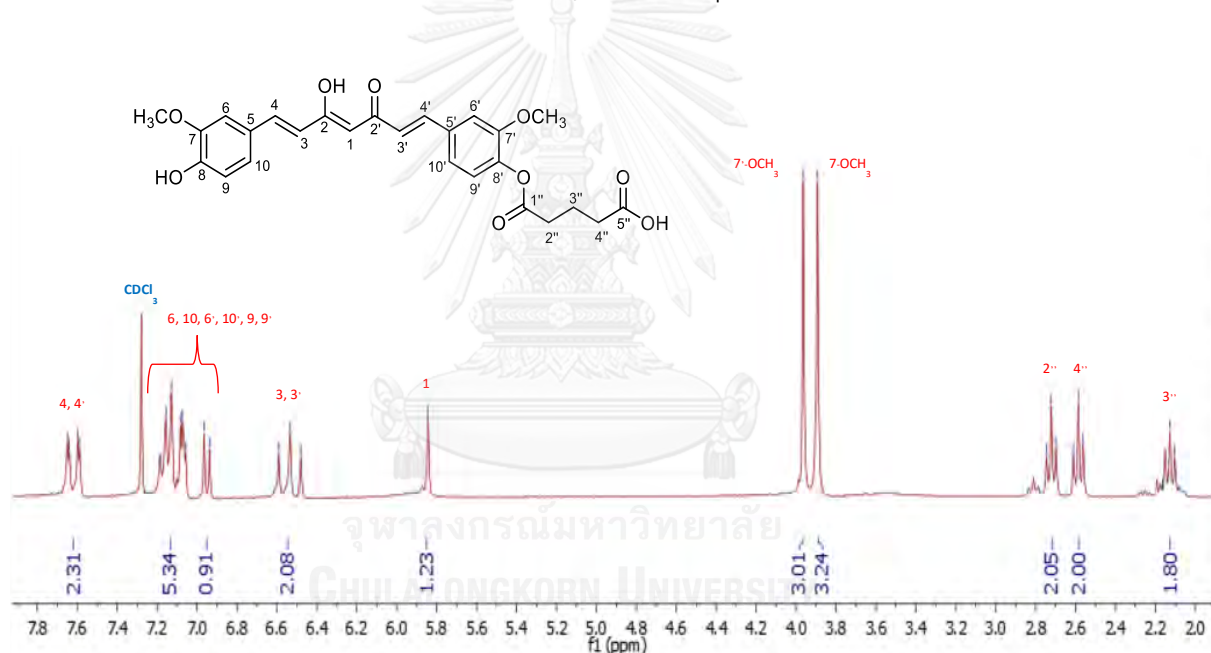
4.1.1 ผลการสังเคราะห์ CMG

จากการสังเคราะห์ CMG ได้ปริมาณ 0.19658 g คิดเป็น %yield เท่ากับ 46.52%

4.1.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CMG

4.1.2.1 $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

เมื่อนำ CMG ไปวิเคราะห์ $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) ได้ NMR spectrum ดังนี้



รูปที่ 5 $^1\text{H NMR}$ spectrum ของ CMG

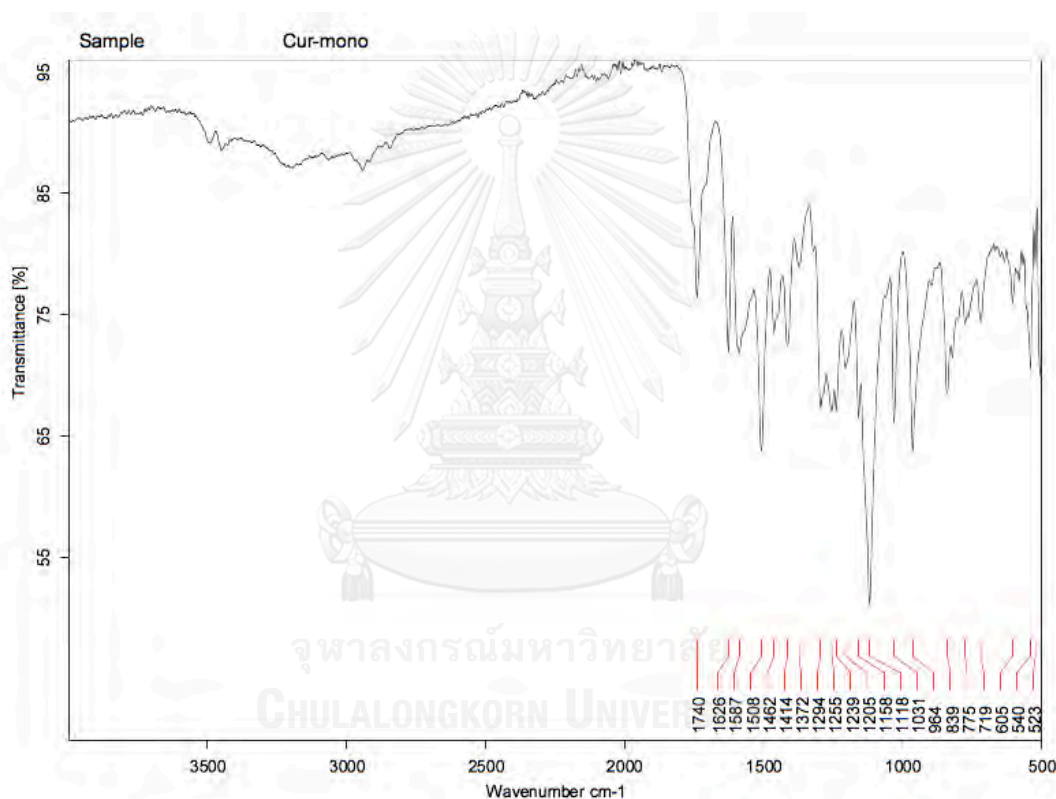
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.62 (dd, $J = 15.8, 3.1$ Hz, 2H, 4, 4'), 7.20 – 6.95 (m, 6H, 6, 10, 6', 10', 9, 9'), 6.54 (t, $J = 16.6$ Hz, 2H, 3, 3'), 5.84 (s, 1H, 1), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 2.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2''), 2.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 4''), 2.12 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 3'').

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.1.2.2 IR spectroscopy

นำ CMG ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR-ATR spectroscopy ได้ IR spectrum ของ CMG ดังรูปที่ 6 ซึ่งพบ peak ที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของสาร ดังนี้ peak ที่ 1740 cm^{-1} แสดงถึง C = O stretching จาก carbonyl group ของหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ ส่วน peak ที่ 1626 cm^{-1} เกิดจากการซ้อนทับกันของ C = C stretching กับ C = O stretching ของ carbonyl group นอกจากนี้ยังพบ peak ที่ 1587 cm^{-1} และ 1508 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะของ C = C_{ring} symmetric aromatic ring stretching และ peak ที่ 1462 cm^{-1} และ 1372 cm^{-1} แสดงถึง C – H bending ของ methylene และ methyl group และยังพบ peak ของ C – O stretching ที่ 1031 cm^{-1}



รูปที่ 6 IR spectrum ของ CMG

4.1.2.3 Mass spectrometry

เมื่อนำ CMG ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrospray ionization ของเครื่อง Bruker® micrOTOF-QII mass spectrometer ภายใต้ positive mode ได้ MS spectrum ดังรูปที่ 7A ซึ่งแสดงไอออนของ $[M+H]^+$ สูตรโมเลกุล $C_{26}H_{27}O_9$ ที่ m/z เท่ากับ 483.1652 โดยมี calculated m/z ของ $[M+H]^+$ เท่ากับ 483.1650 และ mass error ระหว่างค่า m/z ที่วัดได้กับ calculated m/z เท่ากับ -0.5 ppm จึงสรุปได้ว่าสารดังกล่าวเป็น CMG นอกจากนี้ยังแสดงโมเลกุลไอออนของ CMG ที่ไม่มีหมู่ glutaric acid $[M-C_5H_7O_3]^+$ ที่ m/z เท่ากับ 369.1329, sodium adduct ion $[M+Na]^+$ ของ CMG ที่ m/z เท่ากับ

เป็นข้อมูลเพิ่มเติมของนิตินิติของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

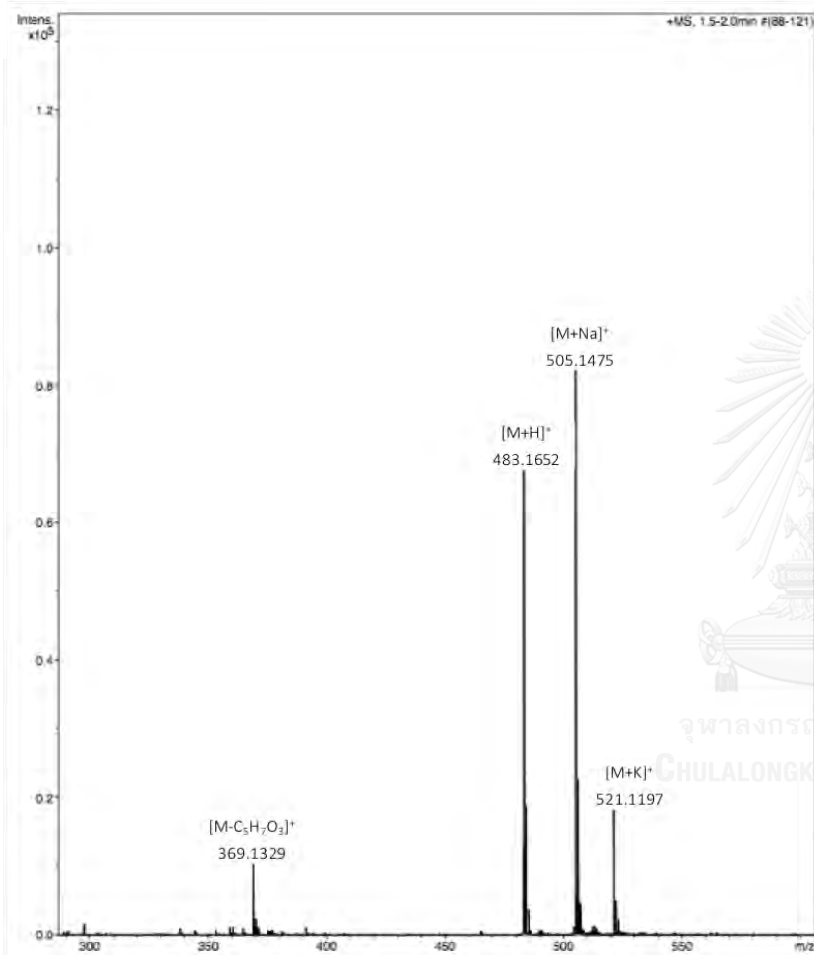
505.1475 และ potassium adduct ion $[M+K]^+$ ของ CMG ที่ m/z เท่ากับ 521.1197 เมื่อทำการแตกไอออน $[M+H]^+$ จะได้ MS^2 spectrum ของ CMG ที่แสดงการแตกตัวได้ fragment ต่าง ๆ ดังรูปที่ 7B



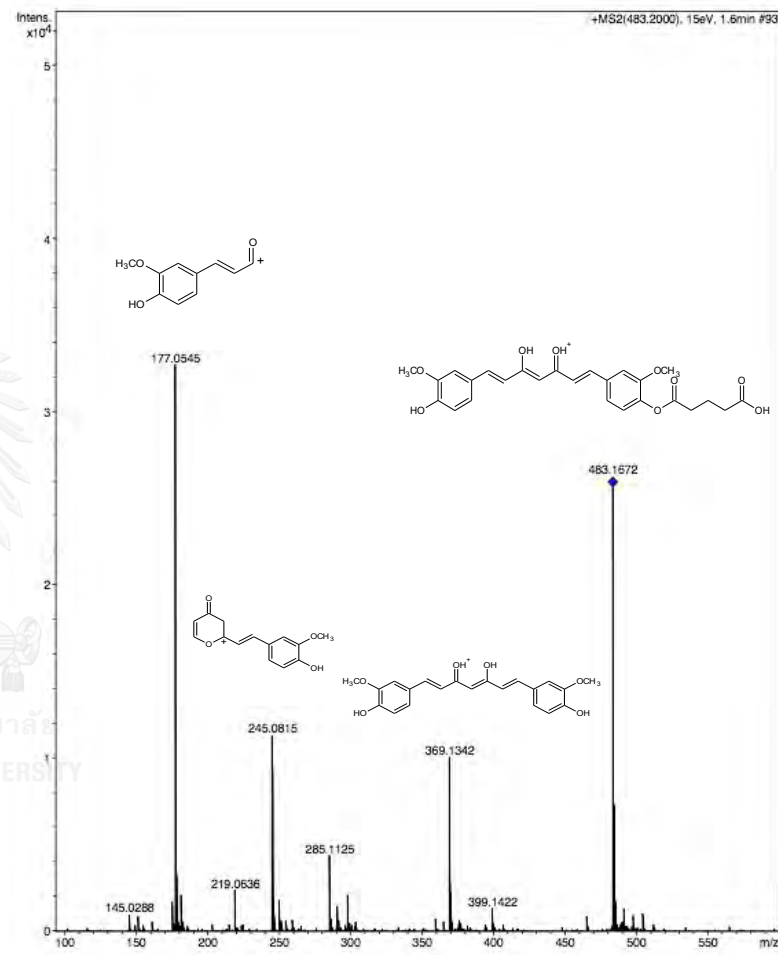
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

A



B



รูปที่ 7 (A) MS spectrum ของ CMG (B) MS² spectrum ของ CMG

4.2 ผลการศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG

4.2.1 การทดสอบความเหมาะสมของ chromatographic system ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (system suitability test)

จากการทดสอบความเหมาะสมของ chromatographic system ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (system suitability test) โดยการนำ standard solution ที่มี Cur และ CMG ความเข้มข้นอย่างละ 3.0 µg/mL ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำการฉีดซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง ได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทดสอบความเหมาะสมของ chromatographic system ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (system suitability test)

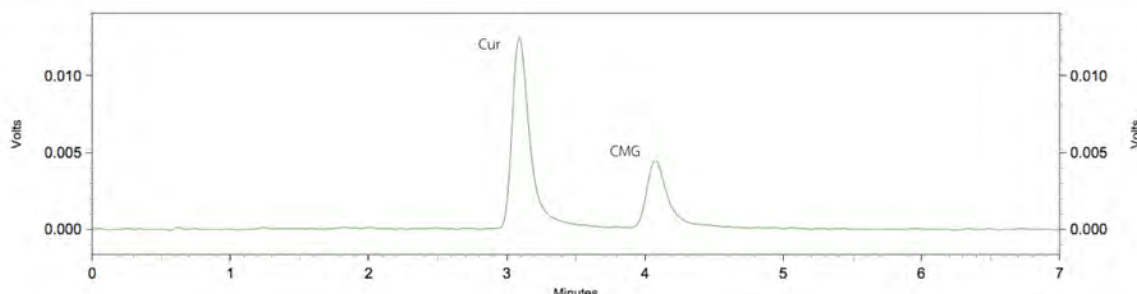
System suitability	Retention time (min)		Peak area	
	Cur	CMG	Cur	CMG
Sys suit1	3.077	4.056	118960	60016
Sys suit2	3.082	4.067	120598	58189
Sys suit3	3.081	4.062	122076	60712
Sys suit4	3.082	4.063	122820	58831
Sys suit5	3.085	4.07	121954	58895
Average	3.0814	4.0636	121281.6	59328.6
SD	0.002881	0.00532	1525.369	1014.965
%RSD	0.093496	0.130913	1.257709	1.710752

จากเกณฑ์ที่ระบุไว้ในหัวข้อ system suitability ของ USP40 สำหรับการฉีด standard solution ซ้ำ 5 ครั้ง จะต้องมีการ %RSD ไม่เกิน 2.0% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความเหมาะสมของ chromatographic system ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยการฉีด standard solution ที่มี Cur และ CMG ซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง ผลปรากฏว่า %RSD ทั้ง retention time และ peak area ของ Cur และ CMG

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

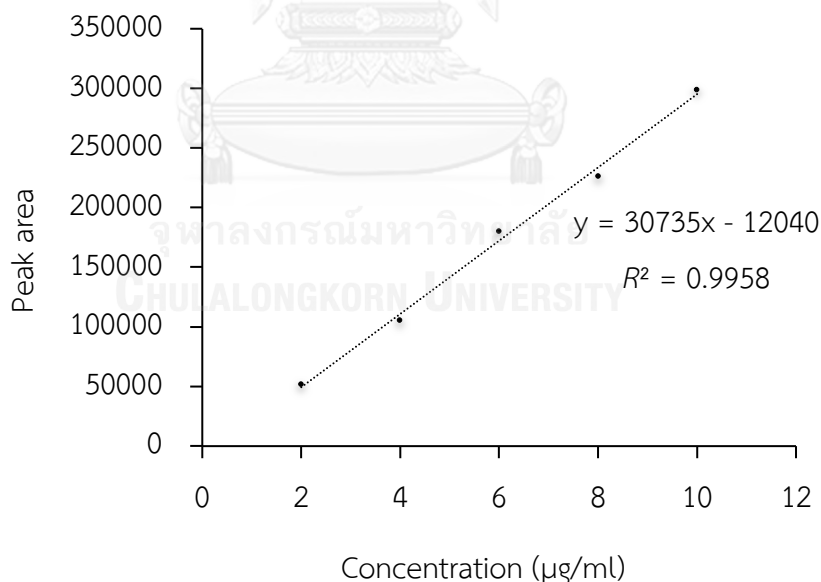
น้อยกว่า 2.0% แสดงว่า chromatographic system ที่เลือกใช้ มีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์



รูปที่ 8 Chromatogram ของ Cur และ CMG จากการทำ system suitability test

4.2.2 การเตรียม calibration curve ของ CMG

เมื่อนำ CMG standard solution ความเข้มข้น 2.000 $\mu\text{g/mL}$, 4.000 $\mu\text{g/mL}$, 6.000 $\mu\text{g/mL}$, 8.000 $\mu\text{g/mL}$ และ 10.000 $\mu\text{g/mL}$ ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และนำค่า peak area ของ CMG ที่ได้มาสร้างเป็น calibration curve (รูปที่ 10)



รูปที่ 9 Calibration curve ของ CMG

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.2.3 การศึกษาการละลายน้ำของ CMG

จากการศึกษาค่าการละลายน้ำของ CMG โดยใช้ shake flask method อ้างอิงตาม OECD guideline ที่อุณหภูมิ 25°C โดยใช้เทคนิค HPLC เมื่อนำ peak area ที่ได้จากการศึกษาทั้ง 3 ครั้ง (ตารางที่ 2) มาเทียบกับสมการที่ได้จากการทำ calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน CMG แล้วคูณด้วยค่า dilution factor พบว่าได้ค่าการละลายน้ำของ CMG เท่ากับ $8.06 \pm 0.61 \mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 2 แสดงค่าการละลายน้ำของ CMG

ครั้งที่	ค่าการละลายน้ำ ($\mu\text{g/mL}$)
1	8.13
2	7.42
3	8.64
Average	8.06
SD	0.61

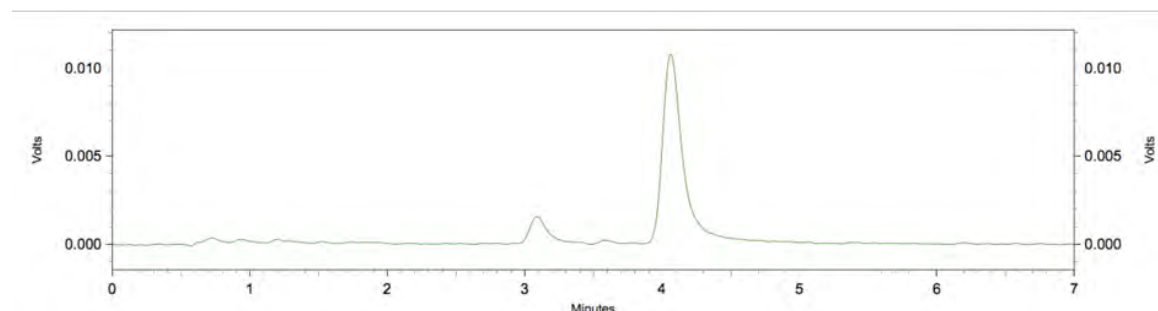
จากการศึกษาของ Muangnoi C. และคณะ⁴ ได้ศึกษาการเพิ่มค่าการละลายน้ำของ Cur โดยนำไปสังเคราะห์เป็นโปรดรักต์กับหมู่ม carboxylic acid นั่นคือ glutaric acid ได้เป็น CDG แล้วทำการวัดการละลายของ Cur และ CDG โดยใช้ shake flask method พบว่าการละลายน้ำของ Cur และ CDG มีค่าเท่ากับ $0.068 \mu\text{g/mL}$ และ $7.48 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ จะเห็นว่าเมื่อทำการสังเคราะห์โปรดรักต์ของ Cur โดยนำ Cur ไปทำการ conjugate กับ glutaric acid ทำให้ Cur มีค่าการละลายน้ำเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาจึงพบว่า CMG มีค่าการละลายมากที่สุด ตามด้วย CMG และ Cur โดยที่ CMG มีค่าการละลายน้ำมากกว่า Cur ถึง 120 เท่า

ในการทดสอบหาค่าการละลายน้ำของ CMG ได้ chromatogram แสดงดังรูปที่ 10 จะเห็นว่าที่ retention time ประมาณ 3 นาที มี peak ปรากฏขึ้น ซึ่งอยู่บริเวณเดียวกับ retention time ของ Cur เมื่อพิจารณา retention time เทียบกับ chromatogram ที่ได้จากการทำ system suitability อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น peak ของ Cur เนื่องจาก CMG สามารถเกิด keto-enol tautomerization ได้เช่นเดียวกับอนุพันธ์ของ Cur อื่น ๆ¹⁷ peak ที่ตำแหน่ง 3 นาทีจึงอาจจะเป็น peak

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ของ tautomer ของ CMG เช่นกัน ดังนั้น จึงอาจจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อว่า peak ที่ตำแหน่งดังกล่าวคือ Cur หรือ tautomer ของ CMG โดยใช้เทคนิค LC-Q-TOF/MS



รูปที่ 10 ตัวอย่าง chromatogram ของ CMG ในการศึกษาค่าการละลายน้ำ

4.3 ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2

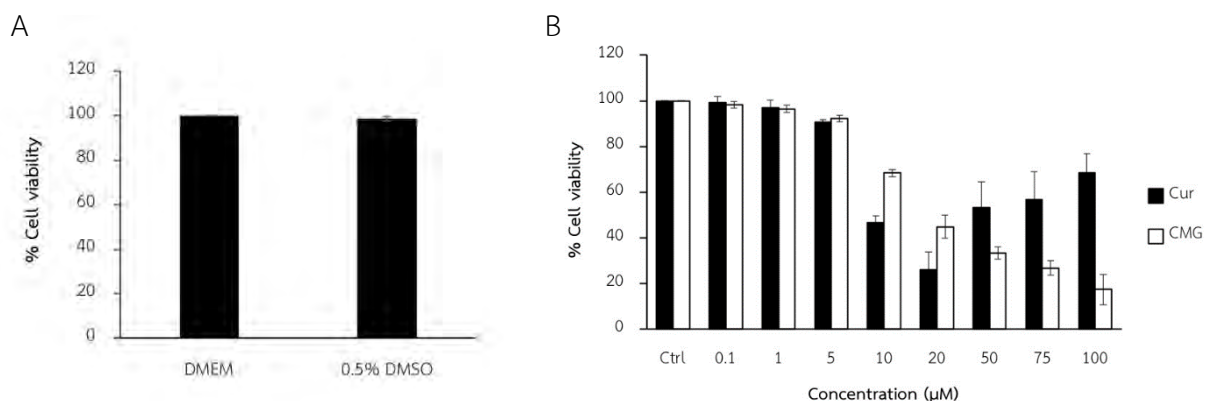
4.3.1 ผลการประเมินความเป็นพิษของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2

การประเมินความเป็นพิษของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี MTT assay โดยทำการเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน (DMEM) ที่มี Cur และ CMG ผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 μM และนำไปวัดร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.5% DMSO ใน DMEM) จากการศึกษาพบว่า เซลล์ Caco-2 ที่ได้รับตัวทำละลายที่ใช้คือ 0.5% DMSO มีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (DMEM) (รูปที่ 11A) แสดงให้เห็นว่าการใช้ 0.5% DMSO เป็นตัวละลายสารตัวอย่าง (Cur และ CMG) นั้นไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2

ในส่วนของการทดสอบของความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 ของ Cur และ CMG พบว่า เซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur หรือ CMG ที่ความเข้มข้นมากกว่า 5 μM มีร้อยละของการมีชีวิตรอดน้อยกว่า 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.5% DMSO)¹⁸ ซึ่งก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 และยังพบว่าการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 เป็นไปในแบบแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ CMG ที่ได้รับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า Cur ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 μM ทำให้ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ Caco-2 เพิ่มขึ้น ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุอาจเกิดจาก Cur บางส่วนตกตะกอน เนื่องจาก Cur มีค่าการละลายในน้ำต่ำ ความเข้มข้นของ Cur ที่มากกว่า 20 μM อาจมีปริมาณตัวทำละลายไม่เพียงพอ ส่งผลให้ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 μM มากกว่าความเป็นจริง (รูปที่ 11B) ดังนั้น ในการประเมินฤทธิ์การต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อไปนั้นจะใช้ความเข้มข้นของ Cur และ CMG ที่ความเข้มข้น 5 μM

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 11 (A) แสดงผลความเป็นพิษของเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ 0.5% DMSO เทียบกับ DMEM (B) แสดงผลความเป็นพิษของเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur และ CMG ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 μM

4.3.2 ผลการประเมินความเป็นพิษของสภาวะที่ใช้ในการทดลองต่อเซลล์ Caco-2

การประเมินความเป็นพิษของสภาวะที่ใช้ในการทดลองต่อเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี MTT assay โดยทำการให้ 0.5% DMSO (กลุ่มควบคุม), Cur ความเข้มข้น 5 μM และ CMG ความเข้มข้น 5 μM จากนั้นเหนี่ยวนำเซลล์ Caco-2 ให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β ความเข้มข้น 10 ng/mL แล้วนำไปวัดร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ พบว่าเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur หรือ CMG ที่ความเข้มข้น 5 μM ทั้งที่ถูกเหนี่ยวนำและไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 12A) แสดงให้เห็นว่าปริมาณตัวชี้วัดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่วัดได้จากการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β ไม่ได้เป็นผลมาจากการตายของเซลล์

4.3.3 ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β

4.3.3.1 ผลของ Cur และ CMG ต่อการหลั่งของ IL-8 จากเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

จากการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2 โดยการวัดปริมาณ IL-8 ด้วยเทคนิค ELISA พบว่าภายหลังการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β ปริมาณ IL-8 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.5% DMSO) สำหรับเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur และ CMG ก่อนทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการอักเสบ พบว่าปริมาณ IL-8 น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ IL-1 β เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย Cur และ CMG สามารถ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

ยับยั้งการหลั่ง IL-8 ได้ร้อยละ 25.08 และ 46.87 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β เพียงอย่างเดียว และยังพบว่าเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur และ CMG เพียงอย่างเดียวมีปริมาณของ IL-8 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 12B) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต่อการหลั่ง IL-8 ของ Cur และ CMG ในเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ พบว่า CMG สามารถลดการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β ได้ดีกว่า Cur ประมาณ 2 เท่า

4.3.3.2 ผลของ Cur และ CMG ต่อการหลั่งของ PGE-2 จากเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

จากการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2 โดยการวัดปริมาณ PGE-2 ด้วยเทคนิค ELISA พบว่าภายหลังการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β ปริมาณ PGE-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.5% DMSO) ในการทดสอบฤทธิ์ของ Cur และ CMG พบว่าเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur และ CMG ก่อนทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการอักเสบ มีปริมาณ PGE-2 น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ IL-1 β เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย Cur และ CMG สามารถยับยั้งการหลั่ง PGE-2 ได้ร้อยละ 23.71 และ 40.41 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β เพียงอย่างเดียว และยังพบว่าเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur และ CMG เพียงอย่างเดียวมีปริมาณของ PEG-2 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 12C) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต่อการหลั่ง PGE-2 ของ Cur และ CMG ในเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ พบว่า CMG สามารถลดการหลั่ง PGE-2 ในเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β ได้ดีกว่า Cur ประมาณ 2 เท่า

4.3.3.3 ผลของ Cur และ CMG ต่อการแสดงออกของโปรตีน COX-2 จากเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

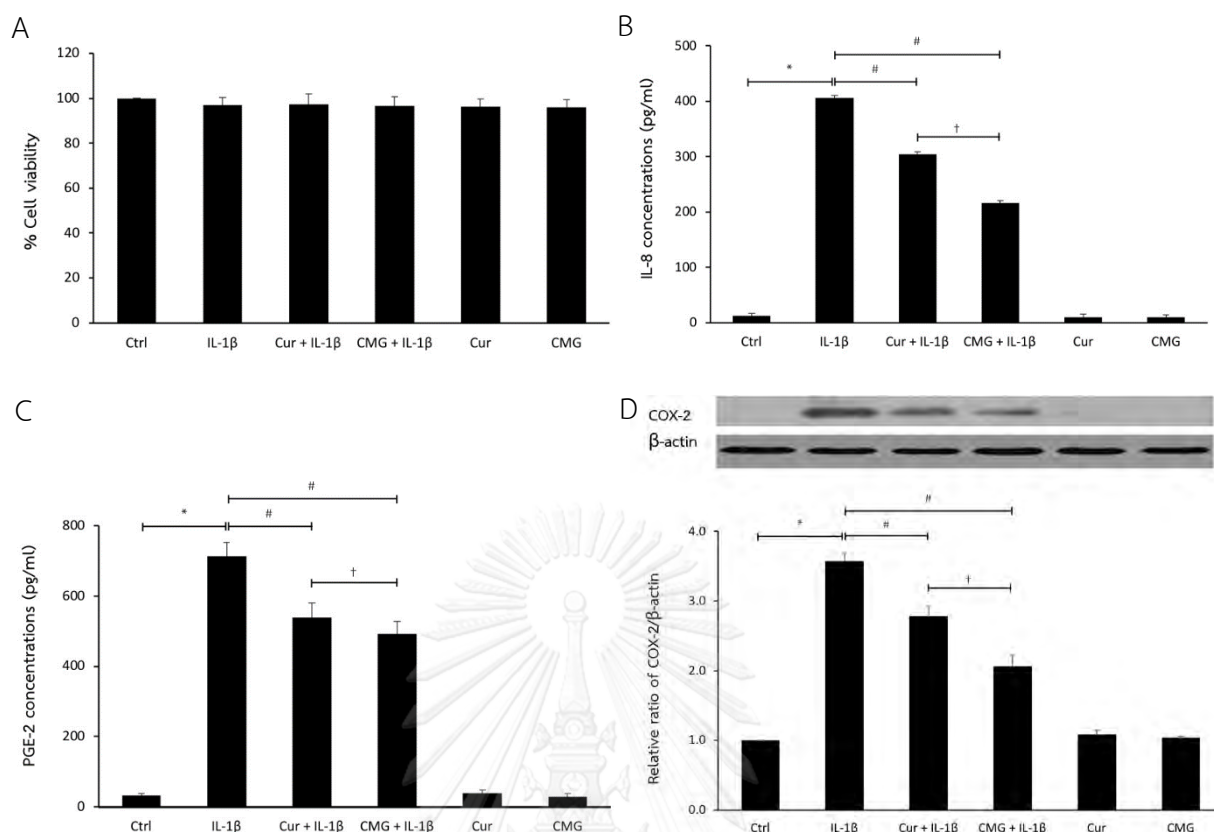
จากการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur และ CMG ต่อเซลล์ Caco-2 โดยการวัดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 เทียบกับ β -actin ด้วยเทคนิค western blot พบว่าภายหลังการเหนี่ยวนำให้เซลล์ Caco-2 เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β เซลล์ Caco-2 มีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการทดสอบฤทธิ์ของ Cur และ CMG พบว่าเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur และ CMG ก่อนทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการอักเสบ มีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β เพียงอย่างเดียว โดย Cur และ CMG สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ได้ร้อยละ 21.86 และ 42.37 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ IL-1 β เพียงอย่างเดียว และยังพบว่าเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ Cur และ CMG เพียงอย่างเดียวมีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 12D) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ของ Cur และ CMG ในเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ พบว่า CMG สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β ได้ดีกว่า Cur ประมาณ 2 เท่า

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 12 (A) แสดงผลความเป็นพิษของเซลล์ Caco-2 หลังได้รับ Cur และ CMG ความเข้มข้น 5 μ M และภายหลังการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β (B) แสดงปริมาณ IL-8 ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ Caco-2 หลังได้รับ Cur และ CMG ความเข้มข้น 5 μ M และภายหลังการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β , * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ Ctrl; # $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ IL-1 β ; † $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ Cur และ IL-1 β ($n=4$) (C) แสดงปริมาณ PGE-2 ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ Caco-2 หลังได้รับ Cur และ CMG ความเข้มข้น 5 μ M และภายหลังการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β , * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ Ctrl; # $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ IL-1 β ; † $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ Cur และ IL-1 β ($n=4$) (D) แสดงการแสดงออกของโปรตีน COX-2 เทียบกับ β -actin ที่ถูกสร้างจากเซลล์ Caco-2 หลังได้รับ Cur และ CMG ความเข้มข้น 5 μ M และภายหลังการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการอักเสบด้วย IL-1 β , * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ Ctrl; # $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ IL-1 β ; † $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ Cur และ IL-1 β ($n=4$)

บทความย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

CMG สามารถสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา glutarylation ระหว่างหมู่ phenolic hydroxyl ของ Cur กับ glutaric anhydride โดยใช้ DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิต 46.52% จากการศึกษาค่าการละลายน้ำที่อุณหภูมิ 25°C พบว่ามีค่าเท่ากับ 8.06 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมากกว่าค่าการละลายของ Cur ประมาณ 120 เท่า สำหรับการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ CMG ในเซลล์ Caco-2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการอักเสบด้วย IL-1 β พบว่า CMG สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-8, PGE-2 และการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ได้ดีกว่า Cur ประมาณ 2 เท่า แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถเพิ่มค่าการละลายน้ำและฤทธิ์ต้านอักเสบของ Cur ได้ และมีศักยภาพสำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของลำไส้ในสัตว์ทดลองต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยพบว่า CMG มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบได้ดีกว่า Cur ในแบบจำลองภาวะลำไส้อักเสบ ดังนั้น จึงมีแนวโน้มในการนำ CMG ไปพัฒนาเป็นยารักษาภาวะลำไส้อักเสบ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคุนสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของ CMG เพียงอย่างเดียว คือ ค่าการละลายน้ำ ซึ่งหากจะพัฒนา CMG ต่อไปเป็นยา ควรทำการศึกษาคุนสมบัติทางเคมีฟิสิกส์อื่น ๆ และคุนสมบัติทางชีวเภสัชกรรมของ CMG เพิ่มเติม เช่น การศึกษาความคงตัวของ CMG ที่ pH ต่าง ๆ การปลดปล่อย Cur ในพลาสมา การศึกษาการซึมผ่านเซลล์ลำไส้ เป็นต้น เพื่อที่จะนำข้อมูลมาใช้ในการประกอบการเลือกวิธีการบริหารยาและพัฒนา รูปแบบเภสัชภัณฑ์ให้สอดคล้องกัน นอกจากนี้ในการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบของ CMG ควรทำการประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบในแบบจำลองเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ชนิดอื่น ๆ เช่น HT-29 เป็นต้น รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวเปรียบเทียบกับ CDG เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอักเสบของ CMG ก่อนจะนำไปทำการทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไป

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

เอกสารอ้างอิง

1. Axelrad J, Lichtiger S, Yajnik V. Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World J Gastroenterol.* 2016;22(20):4794.
2. Lang A, Salomon N, Wu J et al. Curcumin in Combination With Mesalamine Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2015;13(8):1444-1449.e1.
3. Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S. A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. *Curr Pharm Des.* 2013;19(11):2032-2046.
4. Muangnoi C, Jithavech P, Ratnatilaka Na Bhuket P et al. A curcumin-diglutamic acid conjugated prodrug with improved water solubility and antinociceptive properties compared to curcumin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018;82(8):1301-1308.
5. Priyadarsini K. The Chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules.* 2014;19(12):20091-20112.
6. Pouliquen D. *Curcumin.* New York NY: Nova Science Publishers, Inc.; 2014.
7. Baliga M, Joseph N, Venkataranganna M, Saxena A, Ponemone V, Fayad R. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations. *Food Funct.* 2012;3(11):1109.
8. Mazieiro R, Frizon R, Barbalho S, Goulart R. Is curcumin a possibility to treat inflammatory bowel diseases?. *J Med Food.* 2018;21(11):1077-1085.
9. Kerns EH. Stability Challenges in Drug Discovery. *Chemistry and biodiversity.* 2009;6(11):1875-86.
10. Ratnatilaka Na Bhuket P, El-Magboub A, Haworth IS, Rojsitthisak P. Enhancement of curcumin bioavailability via the prodrug approach: Challenges and prospects. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2017;42(3):341-53.
11. Wichitnithad W, Nimmannit U, Wacharasindhu S, Rojsitthisak P. Synthesis, characterization and biological evaluation of succinate prodrugs of curcuminoids for colon cancer treatment. *Molecules.* 2011;16(2):1888-1900.

บทความย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

12. M. K. Modasiya, V. M. Patel. Studies on solubility of curcumin. *Int. J. of Pharm. & Life Sci.* 2012;3(3):1490-97.
13. OECD (1995), Test No. 105: Water Solubility, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris.
14. Van De Walle J, Hendrickx A, Romier B, Larondelle Y, Schneider Y. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicology in Vitro.* 2010;24(5):1441-1449.
15. Hollebeeck S, Winand J, Hérent M et al. Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of human intestine. *Food Funct.* 2012;3(8):875.
16. Jobin, C. A. Bradham, M. P. Russo et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and pro-inflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J. Immunol.* 1999;3474-3483.
17. Kawano S, Inohana Y, Hashi Y, Lin J. Analysis of keto-enol tautomers of curcumin by liquid chromatography/mass spectrometry. *Chinese Chemical Letters.* 2013;24(8):685-687.
18. López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J Funct Biomater.* 2014;5(2):43-57

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

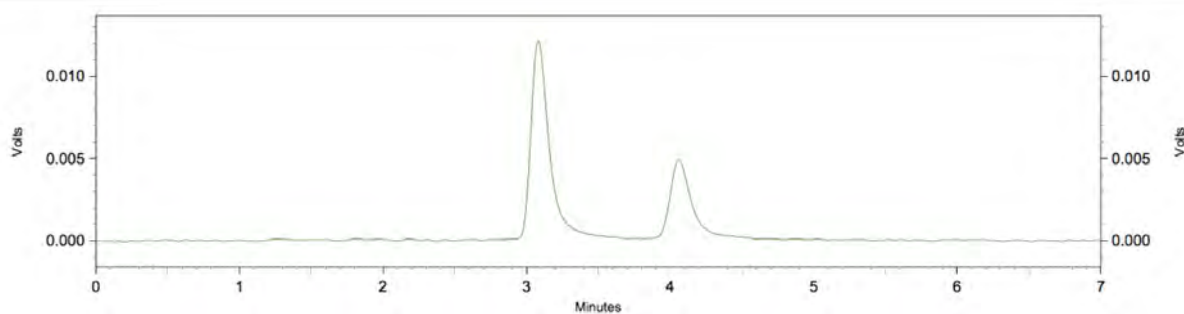
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

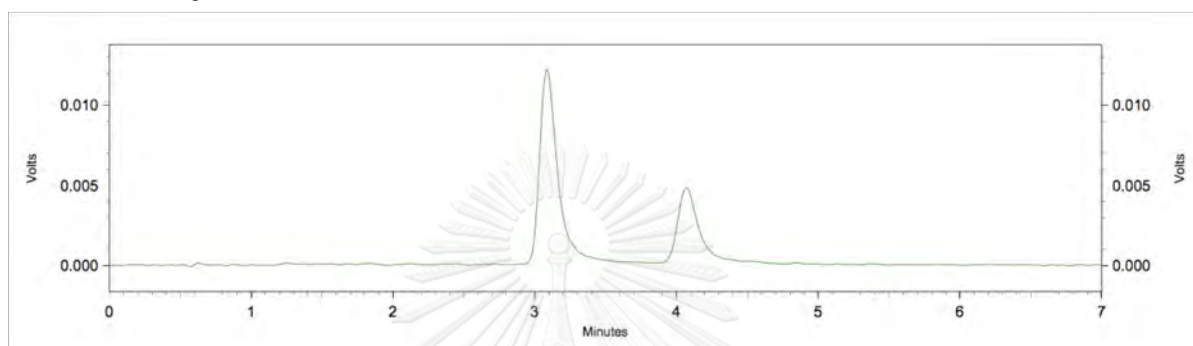


บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

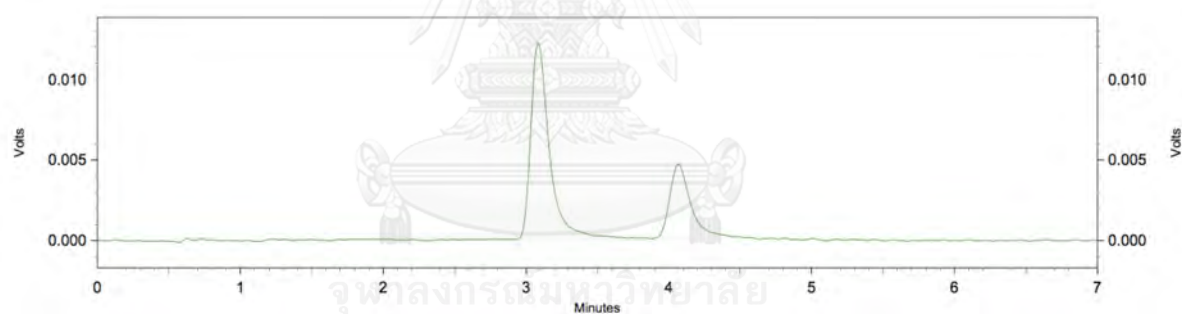
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



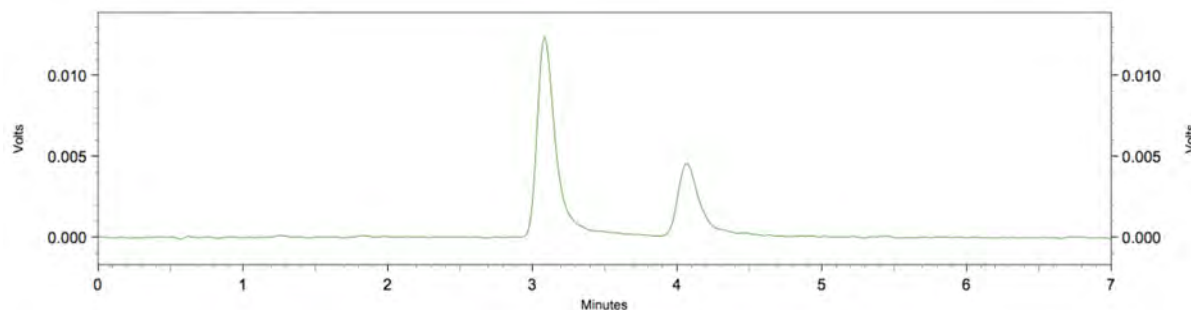
รูปที่ 13 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 1)



รูปที่ 14 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 2)



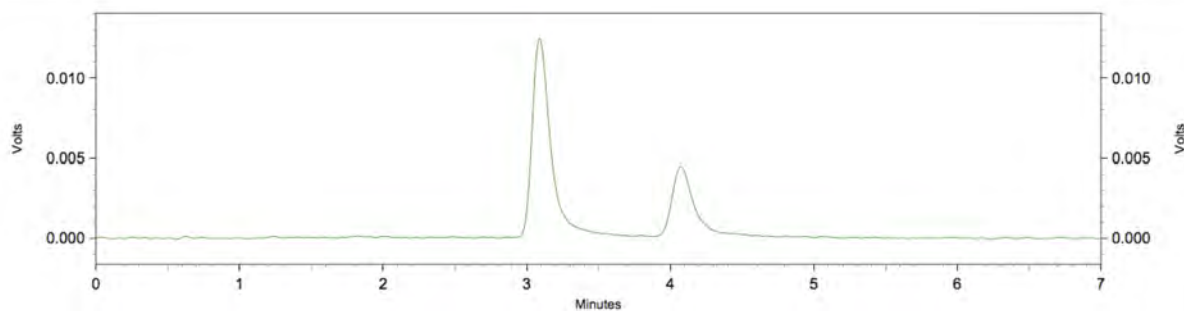
รูปที่ 15 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 3)



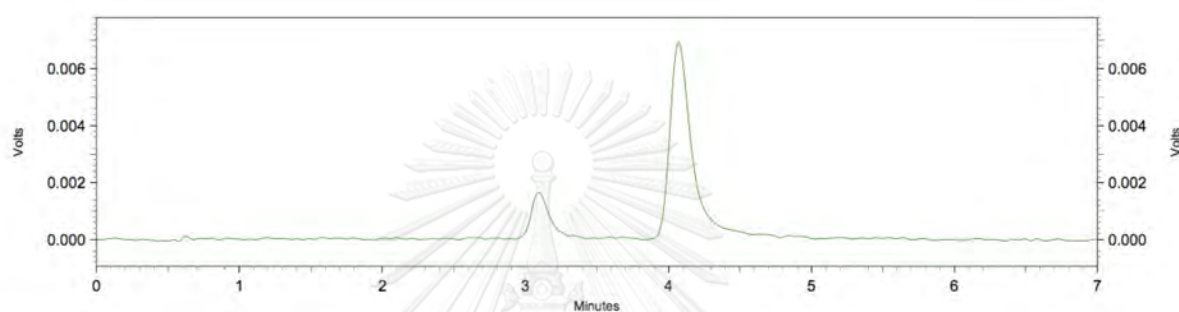
รูปที่ 16 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 4)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

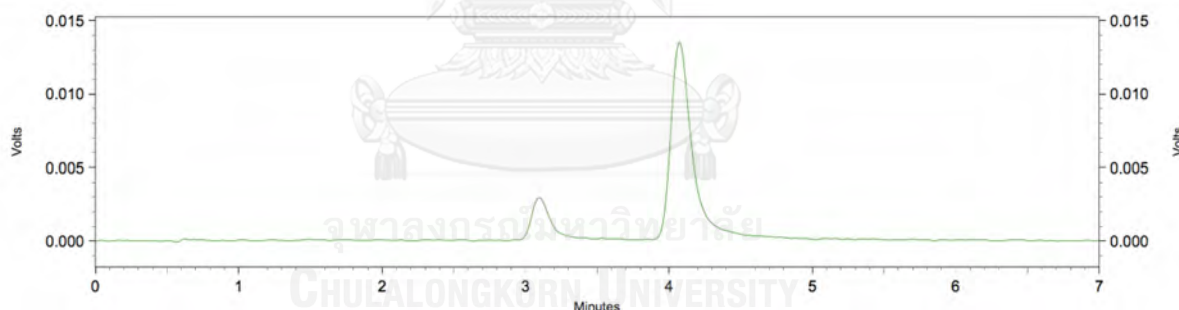
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



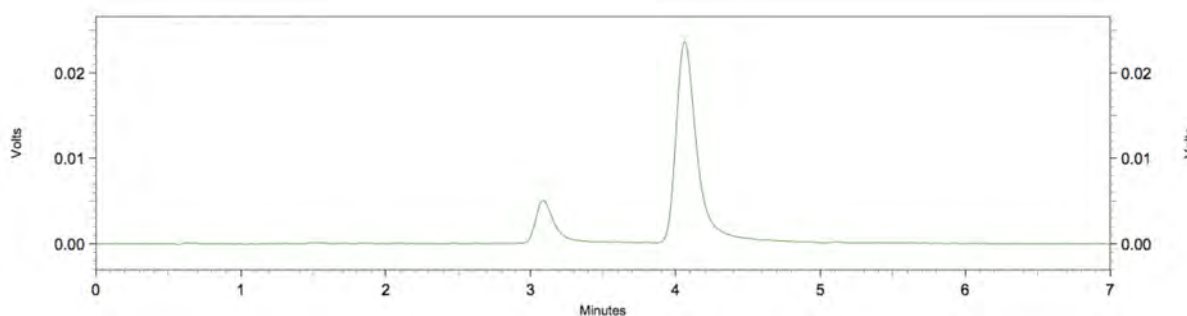
รูปที่ 17 Chromatogram ของ Cur และ CMG (system suitability 5)



รูปที่ 18 Chromatogram ของ CMG 2 $\mu\text{g/mL}$



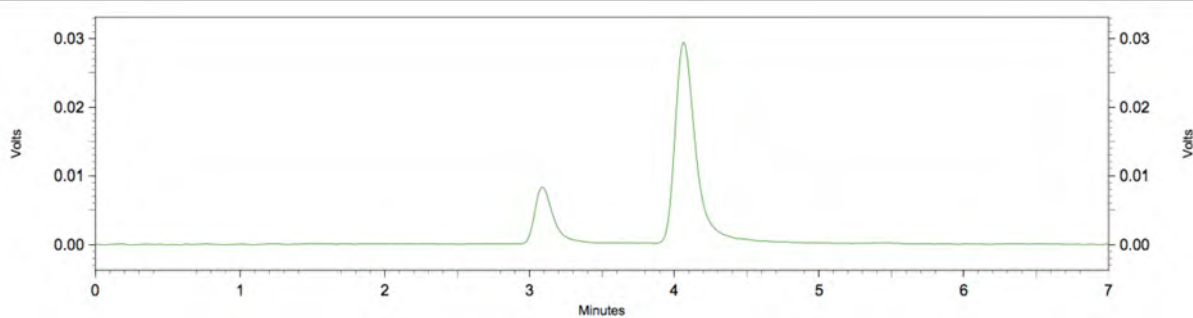
รูปที่ 19 Chromatogram ของ CMG 4 $\mu\text{g/mL}$



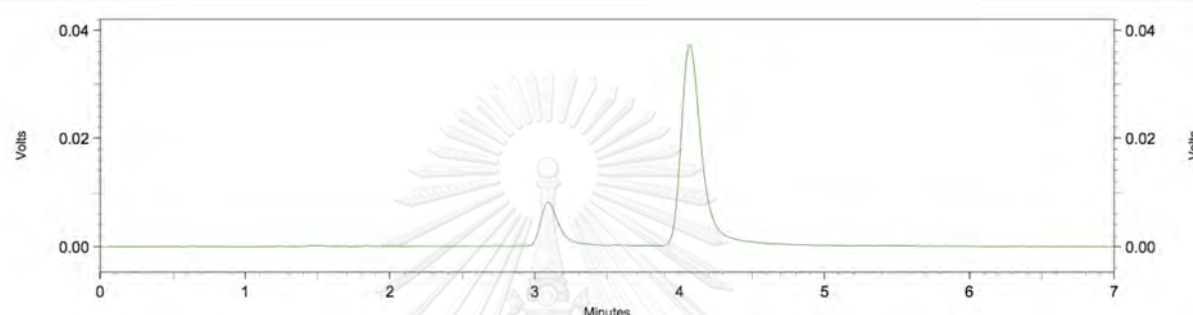
รูปที่ 20 Chromatogram ของ CMG 6 $\mu\text{g/mL}$

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

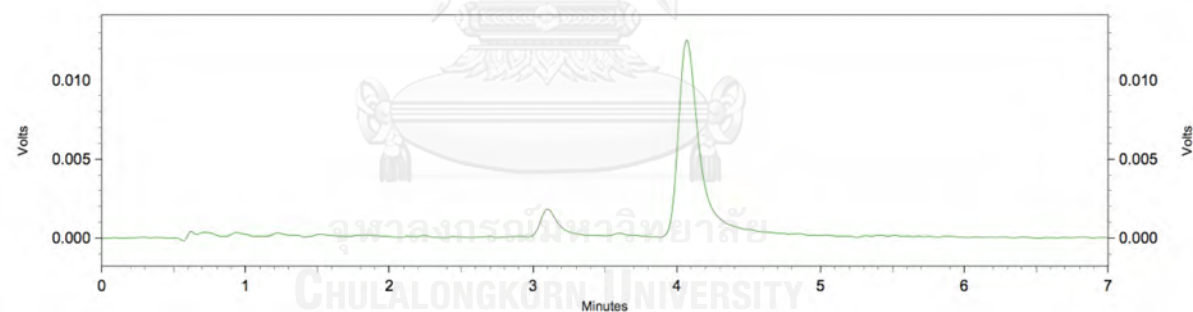
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



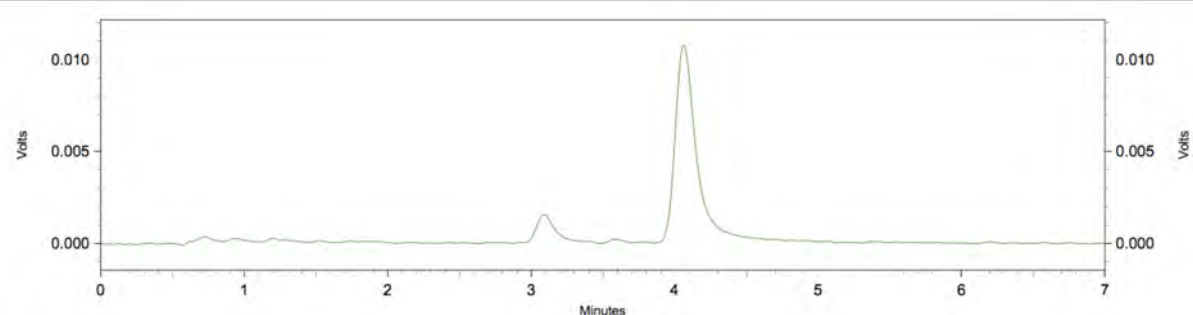
รูปที่ 21 Chromatogram ของ CMG 8 µg/mL



รูปที่ 22 Chromatogram ของ CMG 10 µg/mL



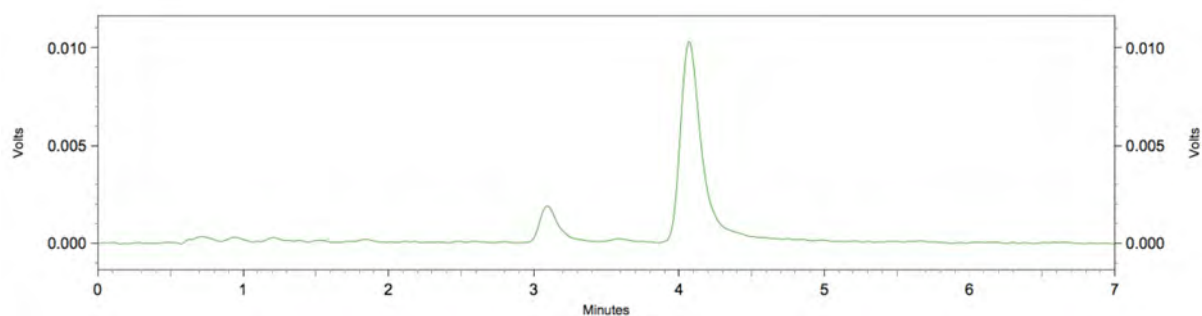
รูปที่ 23 Chromatogram ของ CMG ในการศึกษาค่าการละลายน้ำครั้งที่ 1



รูปที่ 24 Chromatogram ของ CMG ในการศึกษาค่าการละลายน้ำครั้งที่ 2

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 25 Chromatogram ของ CMG ในการศึกษาค่าการละลายน้ำครั้งที่ 3



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.