

การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารออกซิเรสเวอราทรอลโดยใช้พีเพอรีนเป็นสารเพิ่ม
ชีวปริมาณออกฤทธิ์ในหนูแรท



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Pharmacokinetic Study of Oxyresveratrol by Using Piperine as Bioenhancer, in Rats



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacology
Inter-Department of Pharmacology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารออกซิเรสเวอราทรอล
โดย	โดยใช้พีเพอรินเป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ในหนูแรท
สาขาวิชา	นายธีรรินทร์ จันทรแสง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.พิสิฐ เขมาวุฒม์
	ศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ร้อยโทหญิง ดร.เนาวรัตน์
สุธัมนานพพงษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.พิสิฐ เขมาวุฒม์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์สุพีชา วิทยเลิศปัญญา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.เกศรา ณ บางช้าง)

ธีรรินทร์ จันทร์แสง : การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารออกซิเรสเวอราทรอลโดยใช้พีเพอรีนเป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ในหนูแรท. (Pharmacokinetic Study of Oxyresveratrol by Using Piperine as Bioenhancer, in Rats) อ.ที่ปรึกษาหลัก :
 รศ. ภก. ดร.พิสิฐ เขมาวุฒม์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ภก. ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ

สาร Oxyresveratrol เป็นสารสำคัญในแก่นของต้นมะหาด โดยได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร Oxyresveratrol ในหลายด้าน แต่อย่างไรก็ตามสาร Oxyresveratrol เป็นสารที่มีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ต่ำจึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการนำมาพัฒนาเป็นยารับประทาน ดังนั้นจุดประสงค์ในการศึกษานี้ เพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol ที่เปลี่ยนไปเมื่อให้สาร Piperine เป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ในหนูแรท ซึ่งขนาดที่ให้แบ่งเป็นสาร Oxyresveratrol เดี่ยวขนาด 10 mg/kg หรือ สาร Oxyresveratrol ขนาด 10 mg/kg ให้ร่วมกับสาร Piperine 1 mg/kg โดยการบริหารยาทางหลอดเลือดดำ และ สาร Oxyresveratrol เดี่ยวขนาด 100 mg/kg หรือ สาร Oxyresveratrol ขนาด 100 mg/kg ให้ร่วมกับสาร Piperine 10 mg/kg โดยการบริหารยาทางปากจากนั้นเก็บตัวอย่างเลือด, อวัยวะ, ปัสสาวะ และ อุจจาระ ตามเวลาที่กำหนดนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ จากผลการศึกษาพบว่าสาร Piperine สามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสาร Oxyresveratrol ขึ้นประมาณ 2 เท่า รวมถึงสามารถช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol สูงสุดในพลาสมาโดยการบริหารทางปากและ เมื่อคำนวณอัตราส่วนปริมาณยาในอวัยวะต่อพลาสมามีค่าประมาณ 10-100 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับค่าปริมาณการกระจายยาที่สูง ประมาณ 50 L/kg ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสารเมื่อได้รับร่วมกับสาร Piperine มีค่า Conversion ratio ลดลงในทั้งสองรูปแบบการบริหาร โดยสรุปสาร Piperine สามารถปรับปรุงค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol ได้ทั้งในทั้งสองรูปแบบการบริหารยา การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์นี้จึงสามารถนำมาเป็นข้อมูลในการพัฒนาสาร Oxyresveratrol เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไปได้

สาขาวิชา เภสัชวิทยา

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5987152320 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORD: Oxyresveratrol, Piperine, Bioenhancer, Pharmacokinetics

Dhirarin Junsang : Pharmacokinetic Study of Oxyresveratrol by Using Piperine as Bioenhancer, in Rats. Advisor: Assoc. Prof. PHISIT KHEMAWOOT, Ph.D. Co-advisor: Prof. KITTISAK LIKHITWITAYA, Ph.D.

Oxyresveratrol, the main bioactive compound with several pharmacological activities, is found in the heartwood of Mahad. However, this substance has an obstacle to develop as a phytopharmaceutical product because of its low bioavailability. This study aims to investigate the pharmacokinetic profiles of oxyresveratrol alone and in combination with piperine as a bioenhancer in rats. This pharmacokinetic study was carried out in Wistar rats by receiving oxyresveratrol 10 mg/kg intravenously, with or without piperine 1 mg/kg or oxyresveratrol 100 mg/kg orally, with or without piperine 10 mg/kg. Blood samples, internal organs, urine, and feces were analyzed by LC-MS/MS. The results showed that the bioavailability of oxyresveratrol tends to increase approximately 2-fold with significantly increase maximum concentration in rat plasma when orally coadministered with piperine. Oxyresveratrol had a high tissue to plasma ratio of 10–100 fold and could distribute to several tissues with a large volume of distribution (approximately 50 L/kg). The conversion ratio of oxyresveratrol glucuronide also declined after combination with piperine via all route of administration. In conclusion, our study represents the improvement of oxyresveratrol pharmacokinetic parameters via both intravenous and oral combination with piperine. This pharmacokinetic data might be strategizing for the further development of oxyresveratrol as a phytopharmaceutical product.

Field of Study: Pharmacology

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ เกษ์ชกร ดร. พิสิฐ เขมาวุฒม์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และศาสตราจารย์ เกษ์ชกร ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูฒติอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านทั้งสองได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงตรวจแก้ไขความเรียบร้อยอีกทั้งช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานอีกด้วย ตลอดจนให้แนวคิดในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมาและขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำหลักสูตร สาขาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ช่วยถ่ายทอดความรู้และแนวคิดต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เกษ์ชกร ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์ ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาเอื้อเฟื้อสารทดสอบ Oxyresveratrol และสารทดสอบ Piperine สำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเภสัชกร นัฐพล หารราชคุณาศัย เภสัชกรหญิง ภาณิต ทรงวุฒิ และดร. ทศพล ออนุกุลวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือรวมถึงช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณพี่ๆเพื่อนๆที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเพื่อนๆร่วม ศึกษาในสาขาวิชาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้เป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัว ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึง ที่ได้เปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนให้ความสนับสนุนในทุกๆเรื่อง คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้ทำวิทยานิพนธ์เสมอมาจนสำเร็จการศึกษา ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์สำเร็จไปได้ด้วยดี

ธีรรินทร์ จันทร์แสง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	9
สารบัญรูปภาพ.....	10
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	12
บทที่ 1 บทนำ	14
ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางานวิจัย (Background and rationale).....	14
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	15
กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....	16
Experimental design	17
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of literatures).....	18
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	18
คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ	19
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา	19
การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์.....	21
Absorption.....	21
Distribution.....	21
Elimination	22
สารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioenhancers).....	24

คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ	25
กลไกในการเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Mechanisms of Action)	26
Effect on drug metabolizing enzymes.....	26
Effect on the intestinal absorption	27
Effect on permeation characteristics.....	27
Effect on efflux transporters	27
บทบาทในการเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์	28
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and methods)	30
สัตว์ทดลอง (Animal models).....	30
การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination).....	30
การดูแลสัตว์ทดลอง.....	30
สารทดสอบ	30
สารเคมี.....	31
เครื่องมือและอุปกรณ์	31
Animal experiment.....	31
Sample preparation.....	31
LC-MS/MS equipment.....	32
วิธีการทดลอง (Methods).....	32
การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic study).....	32
การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	34
การทดสอบการกระจายตัวไปยังอวัยวะต่างๆ (Tissue distribution study)	34
การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation).....	36
การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation).....	37
การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS	38

HPLC conditions.....	38
MS conditions.....	39
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง	41
การศึกษาการทนต่อยาในสัตว์ทดลอง (Animal tolerability).....	41
การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic study).....	43
การทดสอบการกระจายตัวไปยังอวัยวะต่างๆ (Tissue distribution study).....	47
การศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism study).....	52
การศึกษากระบวนการขับถ่ายยา (Excretion study)	55
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย.....	57
อภิปรายผลการทดลอง.....	57
สรุปผลการวิจัย.....	61
บรรณานุกรม.....	63
ประวัติผู้เขียน.....	71

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของสาร Oxyresveratrol	19
ตารางที่ 2 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol	21
ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของสาร Piperine	25
ตารางที่ 4 แสดงสารทดสอบที่ให้ในแต่ละกลุ่มสัตว์ทดลองในการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์	32
ตารางที่ 5 แสดงสารทดสอบที่ให้ในแต่ละกลุ่มสัตว์ทดลองในการศึกษาการกระจายตัวไปยังอวัยวะ ต่างๆ	35
ตารางที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ Mobile phase ที่เวลาต่างๆ	38
ตารางที่ 7 แสดงค่า Parameters ในระบบ Mass spectrometry	39
ตารางที่ 8 แสดงค่า AST, ALT และ Creatinine ของตัวอย่างเลือดก่อนให้สารทดสอบ และ หลังให้ สารทดสอบ 24 ชั่วโมง	42
ตารางที่ 9 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine	46
ตารางที่ 10 แสดงร้อยละการขับถ่ายของสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine	56

สารบัญญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 แก่นมะหาด Artocarpus lacucha (17).....	18
รูปภาพที่ 2 ต้นมะหาด Artocarpus lacucha (18).....	18
รูปภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร Oxyresveratrol.....	19
รูปภาพที่ 4 ปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol (30).....	23
รูปภาพที่ 5 ปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol (16).....	23
รูปภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Piperine.....	25
รูปภาพที่ 7 แสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับ Oxyresveratrol เฉลี่ยในพลาสมา กับ เวลา กลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ แสดงผลในรูปแบบกราฟเชิงเส้น (ก); แสดงผลในรูปแบบกราฟเซมิล็อก (ข).....	44
รูปภาพที่ 8 แสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับ Oxyresveratrol เฉลี่ยในพลาสมา กับ เวลา กลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาทางปาก แสดงผลในรูปแบบกราฟเชิงเส้น (ก); แสดงผลในรูปแบบกราฟ เซมิล็อก (ข).....	45
รูปภาพที่ 9 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 5 นาทีภายหลังได้รับยา *แตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05.....	48
รูปภาพที่ 10 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 1 ชั่วโมงภายหลังได้รับยา.....	48
รูปภาพที่ 11 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 2 ชั่วโมงภายหลังได้รับยา * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05.....	49

- รูปภาพที่ 12 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 4 ชั่วโมงภายหลังได้รับยา 49
- รูปภาพที่ 13 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกิน ที่เวลา 1 ชั่วโมงภายหลังได้รับยา 50
- รูปภาพที่ 14 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกิน ที่เวลา 5 นาทีภายหลังได้รับยา 50
- รูปภาพที่ 15 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกิน ที่เวลา 2 ชั่วโมง ภายหลังได้รับยา 51
- รูปภาพที่ 16 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกิน ที่เวลา 4 ชั่วโมง ภายหลังได้รับยา 51
- รูปภาพที่ 17 แสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับ Oxyresveratrol glucuronide เฉลี่ย ในพลาสมากับเวลาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ แสดงผลในรูปแบบกราฟเชิงเส้น (ก); แสดงผลในรูปแบบกราฟเขมิล็อก (ข) 53
- รูปภาพที่ 18 แสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับ Oxyresveratrol glucuronide เฉลี่ย ในพลาสมากับเวลาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกินแสดงผลในรูปแบบกราฟเชิงเส้น (ก); แสดงผลในรูปแบบกราฟเขมิล็อก (ข) 54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
$AUC_{0-\infty}$	area under the curve from time zero to infinity
AUC_{0-t}	area under the curve from time zero to the last sampling point
C_{max}	maximal plasma concentration
CE	collision energy
Cl	clearance
CV	coefficient of variation
CXP	collision exit potential
DMSO	dimethyl sulfoxide
DP	declustering potential
EP	entrance potential
F_{rel}	relative bioavailability
IS	internal standard
i.v.	intravenous
K_p	tissue to plasma ratio
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry
LD_{50}	50% lethal dose
LLOQ	lower limit of quantitation
MRM	multiple reaction monitoring
MRT	mean resident time
m/z	mass-to-charge ratio
NSS	normal saline solution
OXY	oxyresveratrol
PIP	piperine
p.o.	per os
Q	quadrupole

QC	quality control
R^2	correlation coefficient
RE	relative error
SD	standard deviation
SMEDDS	self-emulsifying drug delivery system
$T_{1/2}$	elimination half-life
T_{max}	time to reach maximal plasma concentration;
UDPGA	UDP-glucuronic acid
UDP-GDH	UDP-glucose dehydrogenase
UGT	uridine glucuronosyl transferase
V_d	volume of distribution
XlogP	partition coefficient



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางานวิจัย (Background and rationale)

องค์การสหประชาชาติได้ให้นิยามประชากรทั้งเพศชายและเพศหญิงที่มีอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป ว่า ‘ผู้สูงอายุ’ ปัจจุบันผู้สูงอายุทั่วโลกมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นในอัตราที่รวดเร็ว จากการศึกษาทางสถิติพบว่าในปีคริสต์ศักราช 2015 ทั่วโลกมีประชากรผู้สูงอายुरาว 901 ล้านคน และมีการคาดการณ์ว่าประชากรผู้สูงอายุทั่วโลกจะมีจำนวนมากกว่า 2.1 พันล้านคน ในปีคริสต์ศักราช 2050 (1) ประเทศไทยได้เริ่มเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ (Aging society) คือมีสัดส่วนประชากรผู้สูงอายุมากกว่าร้อยละ 10 ต่อประชากรรวมในประเทศนับตั้งแต่ปีคริสต์ศักราช 2009 เป็นต้นมา จากการเก็บข้อมูลทางสถิติพบว่าในปีคริสต์ศักราช 1990 อัตราส่วนผู้สูงอายุภายในประเทศอยู่ที่ร้อยละ 7.36 และได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 12.89 ในปีคริสต์ศักราช 2010 แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่จำนวนประชากรผู้สูงอายุจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และได้มีการคาดการณ์ว่าในอนาคต ในปีคริสต์ศักราช 2020 จะเพิ่มเป็นร้อยละ 19.12 และในปีคริสต์ศักราช 2040 จะมีอัตราส่วนผู้สูงอายุต่อประชากรทั้งประเทศมากถึงร้อยละ 32.12 นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มที่ผู้สูงอายุจะมีอายุยืนยาวขึ้น (2)

การที่โครงสร้างประชากรภายในประเทศเปลี่ยนแปลงเข้าสู่สังคม ‘ผู้สูงอายุ’ อย่างรวดเร็ว จึงมีผลกระทบต่อรูปแบบการพัฒนาประเทศในอนาคต โดยเฉพาะในด้านการแพทย์และสาธารณสุข เนื่องจากการจัดหางบประมาณสำหรับดูแลผู้สูงวัยจะเป็นสิ่งที่ทำทลายการสาธารณสุขของประเทศ จากข้อมูลทางสถิติยังแสดงให้เห็นว่าในแต่ละปีประเทศไทยได้มีการนำส่งยาจากต่างประเทศเข้ามาเป็นจำนวนมาก โดยมีมูลค่ามากกว่า 1 แสนล้านบาท ในปีคริสต์ศักราช 2012 (3) และยังพบว่าในปีคริสต์ศักราช 2015 มีประชากรมากกว่า 19 ล้านคนป่วยเป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง โดยโรคที่มีอัตราการเจ็บป่วยเป็นอันดับต้น คือ โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคมะเร็งและเนื้องอก โรคปอดอักเสบ โรคหลอดเลือดสมอง และโรคทางจิตเวช (4) โรคเรื้อรังของผู้สูงวัยที่พบส่วนใหญ่เป็นโรคเรื้อรังที่ต้องได้รับการรักษาต่อเนื่องเป็นเวลานาน ตัวอย่างโรคที่พบบ่อยในผู้สูงวัย เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson’s disease) ซึ่งเป็นโรกระบบประสาทเสื่อม (Neurodegenerative disease) โรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (Cardiovascular diseases) โรคเบาหวาน (Diabetes) และโรคอ้วน (Obesity) หากรัฐมีมาตรการที่ช่วยป้องกันโรคเหล่านี้ รัฐจะสามารถบริหารงบประมาณทางสาธารณสุขได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการป้องกันมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการรักษาโรค ดังนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญที่จะต้องหาวิธีรับมือกับสังคมผู้สูงอายุและการเข้าสู่สังคม

ผู้สูงอายุ โดยการหาแนวทางในการป้องกันและรักษาโรคเรื้อรัง ด้วยการใช้ทรัพยากรและยาสมุนไพรภายในประเทศ เพื่อเป็นการลดภาระค่าใช้จ่ายของภาครัฐในอีกทางหนึ่ง

สมุนไพรนั้นถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมานาน โดยเฉพาะในซีกโลกตะวันออก ทั้งในประเทศญี่ปุ่น จีน อินเดีย และอีกหลายประเทศทั่วโลก ในประเทศไทยมีการนำสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของการรักษาและบรรเทาอาการป่วยมาตั้งแต่ในสมัยโบราณ รัฐบาลจึงมุ่งเน้นและส่งเสริมให้ใช้สมุนไพรพื้นบ้านเข้ามามีบทบาทในการรักษาเพิ่มมากขึ้น พืชสมุนไพรหลายชนิดในวงศ์ Moraceae เช่น รากหม่อน *Morus alba* L. และแก่นต้นมะหาด *Artocarpus lacucha* นั้นมีสารสำคัญคือ Oxyresveratrol โดยได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร Oxyresveratrol ว่ามีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท (Neuroprotective activity) ในสภาวะขาดอาหาร (5, 6) ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของ 6-hydroxydopamine ซึ่งเป็นแบบจำลองโรคพาร์กินสัน (7) และจากพิษของ β -amyloid peptide ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคความจำเสื่อมได้ (8) รวมไปถึงฤทธิ์ในหลายด้าน เช่น ฤทธิ์ทำให้ผิวขาว (9-11) ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริม (12-14) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม การที่นำสาร Oxyresveratrol มาพัฒนาเป็นยารับประทาน มีอุปสรรคที่สำคัญได้แก่ การที่ Oxyresveratrol มีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ต่ำ (15) ทั้งนี้เนื่องจาก Oxyresveratrol ที่ถูกดูดซึมไปแล้วนั้นจะถูกขับออกขับออกกลับสู่ทางเดินอาหารโดย P-glycoprotein และยังถูกทำลายหรือกำจัดอย่างรวดเร็วโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายอีกด้วย (16) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้จำเป็นต้องมีการศึกษาทดลองซึ่งจะเป็นประโยชน์ในเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สาร Oxyresveratrol เพื่อให้มีปริมาณออกฤทธิ์ที่เพียงพอในการใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมสำหรับผู้สูงวัยต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives)

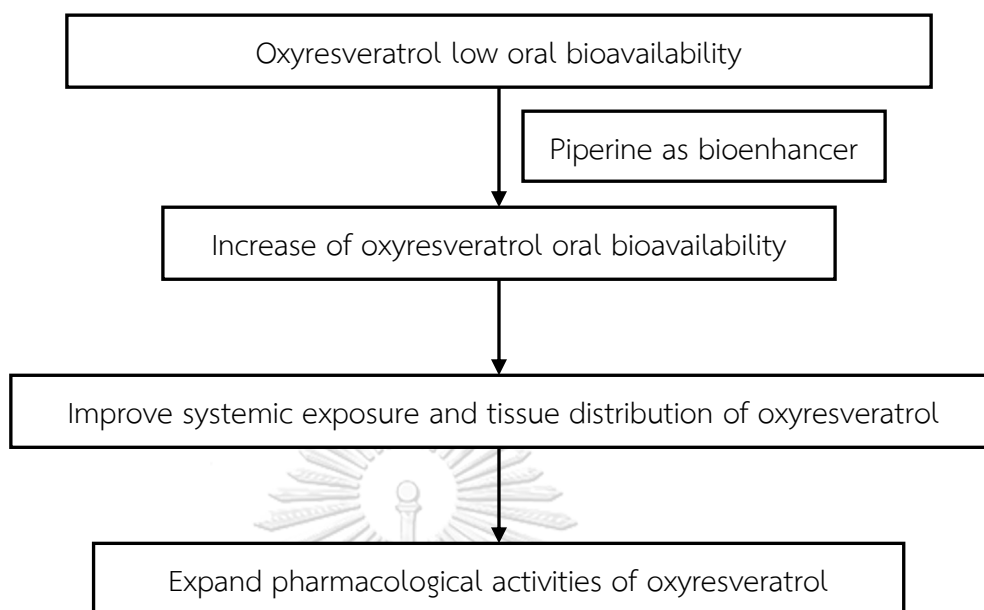
เพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อให้สาร Piperine เป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ในหนูแรท

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

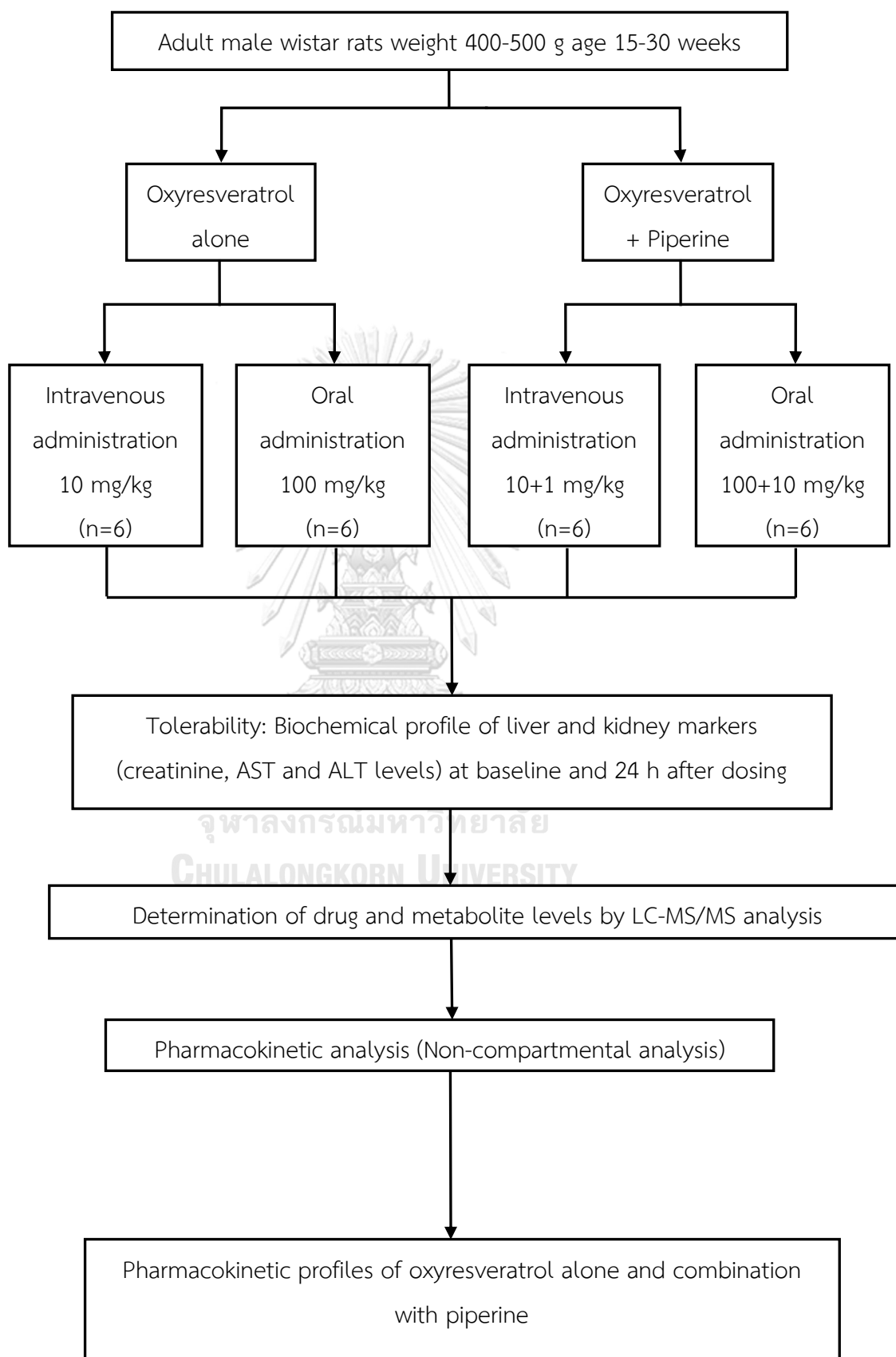
สาร Oxyresveratrol มีค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสาร Piperine เป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ คือ

- สาร Oxyresveratrol มีค่าชีวปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 50% เมื่อให้ร่วมกับสาร Piperine
- สาร Oxyresveratrol สามารถเข้าสู่อวัยวะออกฤทธิ์ที่สำคัญทางเภสัชวิทยาได้เพิ่มขึ้นมากกว่า 50% เมื่อให้ร่วมกับสาร Piperine

กรอบแนวคิดงานวิจัย (Conceptual framework)



Experimental design



บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of literatures)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

Artocarpus lacucha รู้จักกันในชื่อของ ‘ขนุนป่า’ หรือ ‘มะหาด’ ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Moraceae มะหาดเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ มีความสูงประมาณ 15-20 เมตร และอาจมีความสูงได้ถึง 30 เมตร ทรงพุ่มกลมแผ่กว้าง ลำต้นตรง เปลือกลำต้นมีสีน้ำตาลอมแดงจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ต้นแก่ผิวจะหยาบและแตกเป็นสะเก็ดเล็กๆ มีน้ำยางสีขาว ลักษณะของใบเป็นใบเดี่ยวเรียวยาวกลับ รูปขอบขนานหรือรูปไข่ กว้าง 8-10 ซม. ยาว 10-20 ซม. ปลายใบมน หลังใบเป็นมันสีเขียวเข้ม ท้องใบสีดอกเป็นช่อกลม สีเหลืองหม่น แยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน ช่อดอกตัวผู้กลม ช่อดอกตัวเมียรูปไข่หรือรูปขอบขนาน ผลรวมรูปร่างบิดเบี้ยวสีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-8 ซม. ผลแก่มีผิวขรุขระ มีขนนุ่มคล้ายกำมะหยี่ เนื้อในสีเหลืองเข้มถึงชมพู เมล็ดรูปขอบขนานหรือเกือบกลม สีน้ำตาลเทาจำนวนมาก ขนาด 1.2 ซม.



รูปภาพที่ 1 แก่นมะหาด *Artocarpus lacucha* (17) ภาพที่ 2 ต้นมะหาด *Artocarpus lacucha* (18)

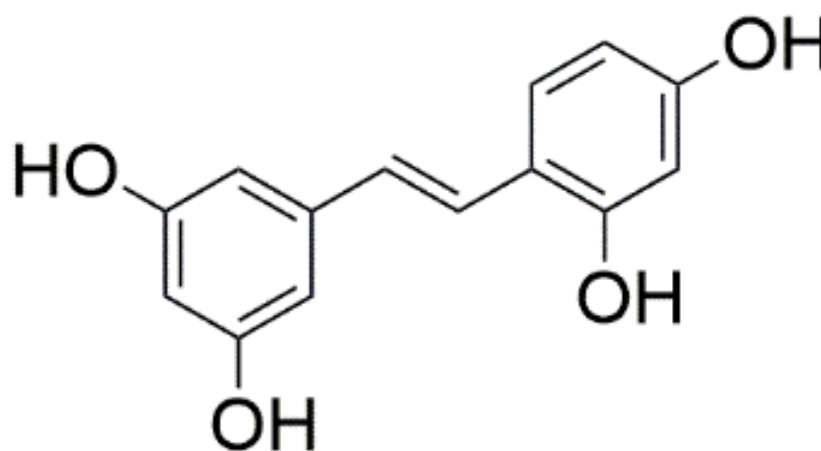
พรรณไม้ชนิดนี้มักพบขึ้นทั่วไปในเขตร้อนชื้น ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 100-1,800 เมตร และถูกใช้อย่างแพร่หลายในทวีปอินเดียและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตัวอย่างเช่น ประเทศเนปาล อินเดีย ศรีลังกา พม่า เวียดนาม ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และทางตอนใต้ของประเทศจีน ในประเทศไทยมีการนำมะหาดมาใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านในการรักษาโรคต่างๆ เป็นระยะเวลานาน โดยส่วนที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ แก่น (19)

โดยพบว่าสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในแก่นมะหาดคือ สาร Oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene (20, 21)

คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของสาร Oxyresveratrol (22)

Empirical Formula	$C_{14}H_{12}O_4$
มวลโมเลกุล	244.24 g/mol
ค่า XLogP	2.8



รูปภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร Oxyresveratrol

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา

สาร Oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) ได้มีรายงานการวิจัยถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของ Oxyresveratrol ในหลายด้านเช่น

ในปีคริสต์ศักราช 1998 Sritularak และคณะ (9) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase จากการสุ่มพืช 24 ตัวอย่างพบว่าสารสกัดจากมะหาด ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase มากที่สุด ซึ่งเอนไซม์ Tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างเมลานินในมนุษย์ โดย Oxyresveratrol มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ดีเนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลมากขึ้น ซึ่งเป็นการยับยั้งการเกิดเม็ดสีและช่วยให้ผิวขาว หลังจากนั้นในปีคริสต์ศักราช 2006 การศึกษาของ Likhitwitayawuid และคณะ (10) พบว่าสาร Oxyresveratrol และ 2,4,3',5'-tetrahydroxybibenzyl ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการเปลี่ยนรูปร่างทางเคมีของสาร Oxyresveratrol ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase เช่นกัน จึงน่าจะมีผลเสริมฤทธิ์ทำให้สาร Oxyresveratrol เป็นสารที่มีฤทธิ์ทำให้ผิวขาว

Chao และคณะ (7) ในปี 2008 ศึกษาสาร Oxyresveratrol ถึงฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทต่อพิษของ 6-hydroxydopamine ในเซลล์ประสาท จากการทดลองเมื่อให้สาร Oxyresveratrol ในเซลล์ SH-SY5Y ปรากฏว่า Oxyresveratrol สามารถลดการปล่อย Lactate dehydrogenase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจะลดการทำงานของ Caspase-3 และลดการเกิดของ Reactive oxygen species ภายในเซลล์ และพบว่า Oxyresveratrol สามารถเพิ่มระดับของ ยีน *SIRT1* ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการลดการเกิด Oxidative stress ได้อีกด้วย

ในปีคริสต์ศักราช 2010 Aftab และคณะ (23) ได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant activity) ของสาร Oxyresveratrol และ Resveratrol รวมถึงการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารทั้ง 2 ตัว จากการทดลองพบว่าสาร Oxyresveratrol และ Resveratrol มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ 27-30 % และเมื่อผสมกันสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ถึง 41%

จากการศึกษาของ Chatsampun และคณะ (24) ในปี 2011 ในการทดสอบ DNA damage ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร Riboflavin พบว่า Oxyresveratrol มีฤทธิ์ปกป้องดีเอ็นเอ และสามารถปกป้องดีเอ็นเอได้ดีกว่า Trolox และ Ascorbic acid อีกด้วย

จากการทดลองของ Lipipun และคณะ (13) ในปี 2011 ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้าน Herpes simplex virus ของครีม Oxyresveratrol ในสัตว์ทดลองที่ความเข้มข้นและขนาดการใช้ยาที่แตกต่างกัน พบว่า Oxyresveratrol 10% w/w สามารถใช้ทาภายนอกเพื่อบรรเทาอาการได้อย่างมีนัยสำคัญ

ในการทดสอบความเป็นพิษของสาร Oxyresveratrol ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ T98 และ T100 ที่ความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 100 µg/mL ไม่พบการเกิด mutagenic activity และ ไม่พบความเป็นพิษที่ความเข้มข้นดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [25] (25)

การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์

Absorption

การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol นั้นพบว่าสาร Oxyresveratrol มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีเนื่องจากมีหมู่ Hydroxyl groups ถึง 4 ตำแหน่งและสามารถดูดซึมได้เร็ว จากการทดลองในหนูแรทที่ขนาดยา 100 - 400 µmol/kg ในรูปแบบสารแขวนตะกอน (Suspension) ตรวจพบค่าความเข้มข้นสูงสุดที่เวลา (T_{max}) 15 นาทีหลังจากให้ยา แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ ประมาณ 10-15% โดยการที่สาร Oxyresveratrol มีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ต่ำ อาจเนื่องจากสาร Oxyresveratrol ที่ถูกดูดซึมแล้วจะถูกขับออกกลับสู่ทางเดินอาหารโดย P-glycoprotein ที่บริเวณลำไส้เล็ก (15) และถูกทำลายก่อนเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด (First pass metabolism) เป็นอย่างมาก (16) ที่เวลา 10 ชั่วโมงซึ่งเป็นจุดเวลาสุดท้ายในการทดลองยังตรวจพบสาร Oxyresveratrol ที่จุดเวลาดังกล่าว จึงเห็นได้ว่า สาร Oxyresveratrol มีระยะเวลาที่อยู่ในร่างกายได้ค่อนข้างนาน โดยที่ขนาด 400 µmol/kg (~100 mg/kg) มีค่า AUC_{0-t} อยู่ที่ 235.69 ± 68.63 (µg·ml⁻¹·min) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sangsen และคณะ (26) ในปีคริสต์ศักราช 2015 ที่ทำการศึกษาในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar โดยได้รับสาร Oxyresveratrol ในรูปแบบสารแขวนตะกอนที่ขนาด 180 mg/kg ซึ่งแสดงค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ตามตารางที่ 2 ตารางที่ 2 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol (26)

Parameters	Oxyresveratrol aqueous suspension
C_{max} (ng/ml)	662 ± 82
T_{max} (min)	10
AUC_{0-10h} (ng.h/ml)	1897 ± 220
F_{0-10h} (%)	~14

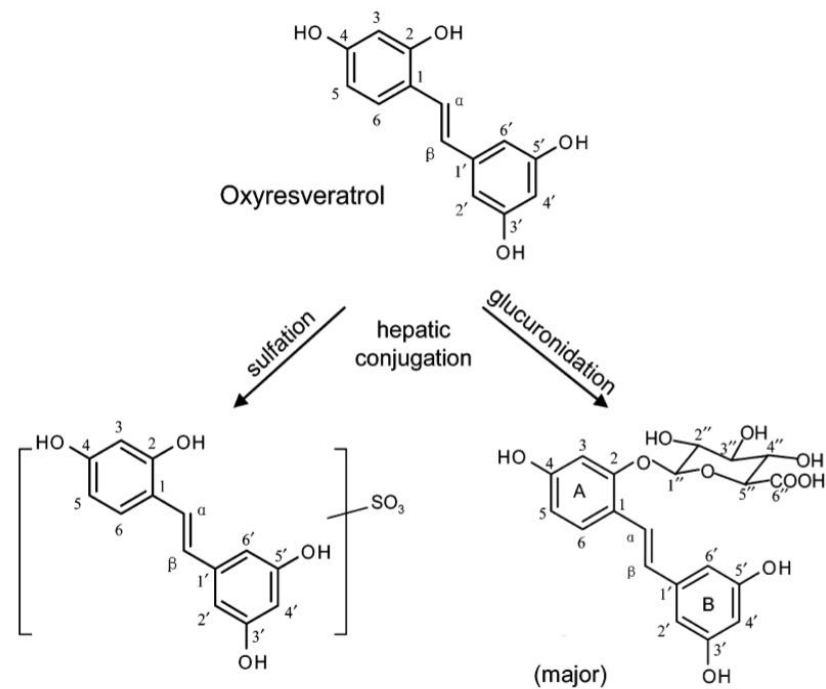
Distribution

กระบวนการกระจายของสาร Oxyresveratrol จากการทดลองเมื่อให้สาร Oxyresveratrol แก่หนูแรทที่ขนาด 40 mg/kg ด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง โดยศึกษาการผ่านเนื้อเยื่อ

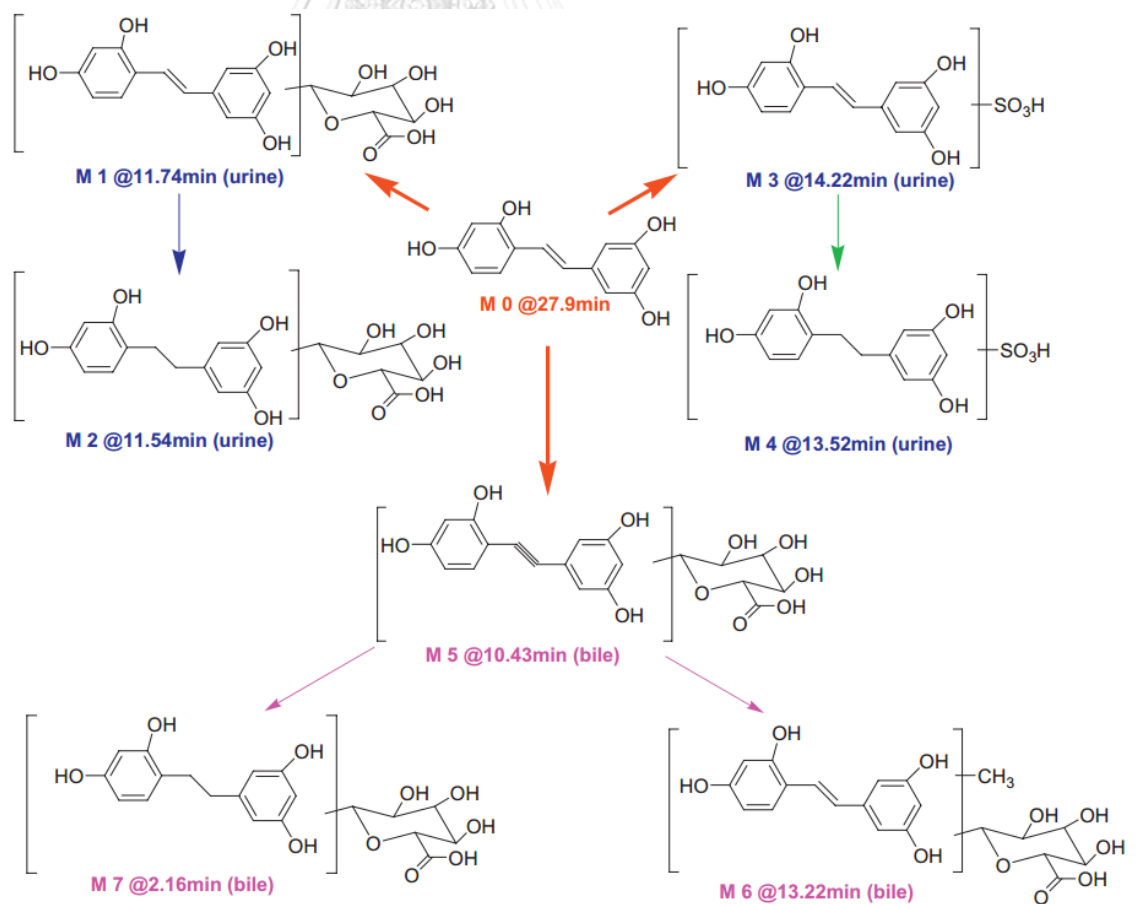
หลังจากให้ยา 1 ชั่วโมงตรวจพบสาร Oxyresveratrol ปริมาณสูงที่สุดในบริเวณพลาสมา ($0.626 \pm 0.059 \mu\text{g/mL}$) รองลงมาคือตับ ($0.139 \pm 0.007 \mu\text{g/mL}$) และสมอง ($0.038 \pm 0.010 \mu\text{g/mL}$) ตามลำดับ เนื่องจากสาร Oxyresveratrol เป็นสารซึ่งมีความสามารถในการซึมผ่าน Blood-brain-barrier ในสมองปกติได้ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย (27) จากการทดลองของ Bertram และ Davies พบว่าสาร Oxyresveratrol มีค่า V_d อยู่ที่ $77.73 \pm 21.90 \text{ L/kg}$ ซึ่งเป็นค่าปริมาณการกระจายของที่ค่อนข้างสูง (28)

Elimination

ปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol ภายหลังจากเข้าสู่ร่างกาย เพื่อกำจัดออก โดยสาร Oxyresveratrol ภายหลังจากเข้าสู่ร่างกายจะถูกทำลายก่อนเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด (First pass metabolism) เป็นอย่างมาก จากรายงานการศึกษาของ Mei และคณะ (16) โดยใช้ Liver microsomes ของมนุษย์และหนูแรท พบว่าสาร Oxyresveratrol ถูกเปลี่ยนแปลงผ่าน Phase II ด้วยกระบวนการ Glucuronidation เป็นหลักและ Sulfation รองลงมาตามรูปภาพที่ 4 ได้เป็นอนุพันธ์ Oxyresveratrol monoglucuronide และ monosulphate ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า Liver microsomes ในหนูแรทพบอัตราการเปลี่ยนแปลงสภาพของสารมากกว่า Liver microsomes ในมนุษย์ และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิด Glucuronidation ของสารใน Liver microsomes กับ Intestinal microsome ของมนุษย์พบว่าอัตราการเกิด Glucuronidation ของสารใน Intestinal microsome สูงกว่าใน Liver microsomes ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hu และคณะในปีคริสต์ศักราช 2014 (29) ในการทดสอบกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol โดยใช้ Intestinal microsome เช่นกัน จากการศึกษาโดย Huang และคณะ (30) ที่ศึกษาปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol ในหนูแรทโดยให้สาร Oxyresveratrol 100 mg/kg ด้วยการบริหารยาทางปากพบว่าสาร Oxyresveratrol ถูกขับออกในรูปแบบ Conjugated metabolites ตามรูปภาพที่ 5 ภายใน 0–12 ชั่วโมงผ่านทางปัสสาวะและน้ำดีเป็นหลัก โดยในการเกิดปฏิกิริยา Glucuronidation นั้นทำให้ตัวสารเองละลายน้ำได้ดีขึ้นกว่าเดิมทำให้ถูกขับถ่ายออกได้ง่ายขึ้นหลังจากบริหารยาทางปาก และจากการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของ Tian และคณะ (31) ในหนูแรท เมื่อให้สาร Oxyresveratrol ที่ขนาด 10 mg/kg โดยการบริหารยาทางปากพบว่าประสิทธิภาพที่ดีในการขับสาร Oxyresveratrol ออกซึ่งค่า CL อยู่ที่ $15.20 \pm 1.68 \text{ L/h/kg}$



รูปภาพที่ 5 ปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol (16)



รูปภาพที่ 4 ปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol (30)

จากการทบทวนวรรณกรรมในการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร Oxyresveratrol ในหลายด้านทำให้มีความเป็นไปได้ในการที่จะผลักดันและพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในทางคลินิกแต่อย่างไรก็ตามสาร Oxyresveratrol ก็ยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้เนื่องจากมีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่ต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่สาร Oxyresveratrol ผ่านจากบริเวณเซลล์เยื่อบุลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดได้ในปริมาณที่น้อยประกอบกับการที่เป็น Substrate ของ P-glycoprotein ที่มีหน้าที่ในการเป็น Efflux transporter ซึ่งวางตัวอยู่บริเวณนั้นจำนวนมาก อีกทั้งถูกทำลายโดยตับและลำไส้ก่อนเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด (First pass metabolism) เป็นอย่างมาก และมีอัตราในการขับออกที่สูงอีกด้วยจึงทำให้มีการหาวิธีในการปรับปรุงสาร Oxyresveratrol เพื่อให้มีประสิทธิภาพพอในการนำไปใช้ในทางคลินิกต่อไป โดยมีการศึกษาก่อนหน้าของ Sangsen และคณะ (26) ที่ทำการปรับเปลี่ยนลักษณะโครงสร้างทางกายภาพหรือการพัฒนาระบบนำส่งแบบไขมันด้วย SMEDDS ให้กับสาร Oxyresveratrol จากการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมพัทธ์เพิ่มขึ้นได้ประมาณ 7.9 เท่า ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในการปรับเปลี่ยนลักษณะโครงสร้างทางกายภาพหรือการพัฒนาระบบนำส่งสามารถช่วยปรับเปลี่ยนค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol ได้ดีกว่าสาร Oxyresveratrol ในรูปแบบเดิม แต่อย่างไรก็ตามยังมีอีกหลายวิธีที่สามารถช่วยเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ได้ซึ่งวิธีการเติมสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ลงไปก็เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการพัฒนาสาร

สารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioenhancers)

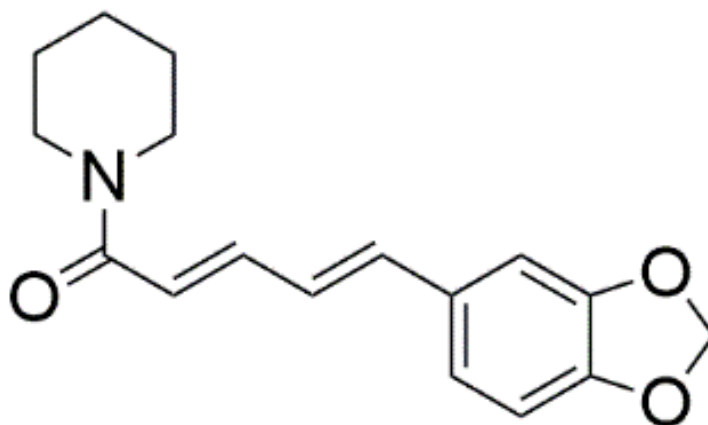
Herbal bioenhancer คือสารสมุนไพรหรือสารชีวโมเลกุลจากพืช ที่สามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์และประสิทธิภาพให้กับตัวยาหรือสารอาหารได้ โดยขนาดของสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่ผสมลงไปต้องปราศจากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยมีรายงานแรกในปี 1920 ของ Bose (32) ที่เกี่ยวข้องกับเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาจากการเติมสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ ว่าสามารถเพิ่มฤทธิ์ของใบเสนียด (*Adhatoda vasika*) ในการแก้อาการหืด (Antiasthmatic effect) ได้เมื่อให้รับประทานร่วมกับตีป्ली ซึ่งแนวคิดนี้มีมาตั้งแต่ในสมัยโบราณ มีการกล่าวถึง พิกัดตรีภูก ในศาสตร์การศึกษาแบบอายุรเวท โดยพิกัดนี้เป็นส่วนผสมระหว่างสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ตีป्ली พริกไทยและขิง ซึ่งสมุนไพรดังกล่าวมี Piperine เป็นสารสำคัญ โดยพบว่าการเติมพิกัดดังกล่าวลงไปในยาหรืออาหารจะสามารถช่วยเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยาสารอาหารและวิตามินได้ ซึ่งสอดคล้องกับนักวิทยาศาสตร์ชาวอินเดียได้ทำการค้นพบและตรวจสอบทางวิทยาศาสตร์ว่า Piperine เป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ตัวแรกของโลก จึงได้มีการบัญญัติศัพท์คำว่า Bioavailability enhancer ขึ้นครั้ง

แรกในปี 1979 (33) และ Piperine เป็นสารแอลคาลอยด์ (Alkaloid) ที่พบมากในเมล็ดพริกไทยและ
 ตีปลี่ซึ่งอยู่ในวงศ์พริกไทย (Piperaceae) มักนิยมนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงเพื่อประกอบอาหาร ในทาง
 การแพทย์พื้นบ้านได้นำผงเมล็ดพริกไทยและตีปลี่มาใช้ในการรักษาโรคต่างๆเช่น สรรพคุณในการต้าน
 ชัก (Seizure disorders) (34) ทางด้านเภสัชวิทยาได้มีรายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ของ Piperine ใน
 การการต้านการอักเสบ (Anti-inflammation) (35, 36) ด้านภาวะซึมเศร้า (Antidepressant) (37)
 ด้านเชื้อรา (Anti-fungal) (38) เป็นต้น รวมไปถึงถึงฤทธิ์ที่สามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์และ
 ประสิทธิภาพให้กับตัวยา สารอาหารและวิตามินบางชนิดได้อีกด้วย (34)

คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของสาร Piperine (39)

Empirical Formula	$C_{17}H_{19}NO_3$
มวลโมเลกุล	285.34 g/mol
ค่าการละลายในน้ำ	0.15 mg/mL
ค่า XLogP	3.5



รูปภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Piperine

กลไกในการเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Mechanisms of Action)

Effect on drug metabolizing enzymes

Piperine เป็นสารที่มีการศึกษามากมายอย่างยาวนานในแง่การรบกวนการทำงานของ Drugs metabolizing enzymes จากการศึกษาก่อนหน้าในหนูแรทและหนูตะเภาถึงฤทธิ์ของสาร piperine ต่อการทำงานของ UDP-glucose dehydrogenase (UDP-GDH) และการเกิดปฏิกิริยา Glucuronidation ในตับและลำไส้เล็ก (40, 41) พบว่าสาร piperine สามารถยับยั้งการทำงานของ UDP-GDH (50% ที่ความเข้มข้น 10 μ M) แบบผันกลับได้ (Reversible inhibitor) ทั้งในตับและลำไส้เล็กโดยเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Non-competitive inhibitor) (40) และสาร Piperine สามารถลดการเกิด UDP-glucuronic acid (UDPGA) ทั้งในเซลล์ลำไส้เล็ก (Enterocytes) และเซลล์ตับ (Hepatocytes) อีกด้วย ทั้งนี้อาจจะเป็นผลจากที่ Piperine ไปยับยั้งการทำงานของ UDP-GDH ซึ่งเป็น Enzyme ที่มีความสำคัญในกระบวนการสร้าง UDPGA จึงส่งผลให้ระดับของ UDPGA ลดลง (40) และพบว่า Piperine สามารถยับยั้งการทำงานของ UDP-glucuronosyl transferase (UGT) ได้ทั้งในตับและลำไส้เล็ก โดยพบว่าที่ตับ Piperine สามารถยับยั้งการทำงานของ UGT1A1 ได้เล็กน้อยในขณะที่ไม่ส่งผลต่อการทำงานของ UGT2B1 ในทางกลับกันพบว่าที่ลำไส้เล็ก Piperine สามารถยับยั้งการทำงานของ UGT1A1 และ UGT2B1 ได้มาก (42) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Suresh และ Srinivasan (43) พบว่า Piperine สามารถลดการทำงานของ UGT ได้ จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า Piperine สามารถลดการทำงานของ Hepatic microsomal UGT ได้ถึง 36% ในหลอดทดลอง และยังสามารถลดการทำงานของ NADPH-cytochrome c reductase ได้ถึง 26% อีกด้วย โดยมีการการศึกษาในสัตว์ทดลองของ Atal และคณะ (33) พบว่าหลังจากให้ Piperine ในขนาด 10 และ 25 mg/kg โดยการบริยายทางปากในหนูแรทสามารถลดการทำงานของ UGT ได้ 36 และ 55% ตามลำดับ นอกจากนี้มีการรายงานถึงโครงสร้างของ Piperine ที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ พบว่าโครงสร้าง Methylendioxyphenyl ring (44, 45) ของ Piperine ที่พันธะคู่บริเวณแขนงข้าง (side chain) เป็นโมเลกุลที่เป็นปัจจัยในการลดการทำงานของ Drug metabolizing enzymes (44) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า Piperine มีแนวโน้มที่สามารถช่วยลดการเกิด Biotransformation จากการทำงานของ Metabolizing enzymes ทั้งในตับและลำไส้เล็กโดยพิจารณาจากขนาดและวิธีการบริหารยาที่เลือกใช้รวมไปถึงชนิดของสัตว์ทดลอง (46)

Effect on the intestinal absorption

Effect on permeation characteristics

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า Piperine สามารถเพิ่มการดูดซึมได้จากการปรับเปลี่ยนบริเวณ Ultrastructure ใน Intestinal brush border โดย Piperine สามารถลดระดับของ Cholesterol ใน Villi ของลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) และ ลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) แต่ไม่มีผลต่อระดับของ Phospholipid เป็นผลให้อัตราส่วนระหว่าง ของ Cholesterol ต่อ Phospholipid เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเมื่อระดับของ Cholesterol ลดลง ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเหลว (Fluidity) เพิ่มขึ้นและทำให้เพิ่มการผ่านของสารเข้าเซลล์โดยในรูปแบบการแพร่ (Passive diffusion) ได้มากขึ้น (47)

Effect on efflux transporters

บทบาทสำคัญของ P-glycoprotein ในการเป็น Efflux transporter ที่เกี่ยวข้องกับเภสัชจลนศาสตร์ โดยเฉพาะภายในเวลาที่ผ่านมาที่มีความสนใจในการทำวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ P-glycoprotein ทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลองโดยจะพบ P-glycoprotein ที่บริเวณต่างๆในเนื้อเยื่อแต่จะพบได้มากในบริเวณด้านบน (Apical surface) ของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว Columnar epithelial ของทั้งลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ และ Biliary canalicular membrane ของ Hepatocyte และที่บริเวณด้านบนของเซลล์ Endothelial ใน Blood capillaries ของสมอง (48, 49) จากตำแหน่งที่ P-glycoprotein ปรากฏทำให้สามารถบ่งชี้ถึงบทบาทในการจำกัดปริมาณยาหรือปกป้องสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์เช่น ช่วยในการจำกัดปริมาณยา จาก Intestinal lumen ไปสู่ Enterocytes รวมถึงการผ่านยาจากระบบหมุนเวียนเลือดเข้าสู่สมอง โดยมีการศึกษาถึงผลของ พริกไทย (Black pepper) หรือสาร Piperine ต่อการทำงานของ P-glycoprotein ซึ่งในการศึกษาของ Bhardwaj และคณะ (50) เมื่อให้ยา Digoxin และ Cyclosporine A ซึ่งเป็น Substrates ของ P-glycoprotein ร่วมกับ Piperine ในเซลล์ Caco-2 พบว่าสาร Piperine สามารถยับยั้งการขับออกของสารโดย P-glycoprotein ได้ที่ IC_{50} 15.5 และ 74.1 μ M ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองของ Sharma และคณะ (51) พบว่า piperine สามารถช่วยเพิ่มเพิ่มการดูดซึมในลำไส้และช่วยเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสาร Cyclosporine A ผ่านการปรับเปลี่ยนการทำงานของ P-glycoprotein

บทบาทในการเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์

จากการทดลองถึงฤทธิ์ของสาร Piperine ในการเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ในยา Phenytoin ในอาสาสมัครสุขภาพดีที่ความเข้มข้นที่สถานะคงตัว (Steady-state) ของยา Phenytoin ผู้ทดลองได้ให้ยา Phenytoin ขนาด 150 หรือ 200 mg 2 ครั้งต่อวันโดยจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากรับประทานยาก่อนนอนที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง โดยในการให้ยาค้างต่อไปได้ทำการให้ยา Phenytoin ร่วมกับ Piperine ขนาด 20 mg และทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลาเดียวกันจากการทดลองพบว่าค่า AUC_{0-12h} , C_{max} ($p < 0.01$) ในกลุ่มที่ให้ร่วมกับ Piperine เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นผลทำให้มีความเป็นไปได้ที่ Piperine สามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยา Phenytoin (52)

ในการศึกษาผลทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Curcumin ที่ให้ร่วมกับสาร Piperine ในสัตว์ทดลองและอาสาสมัครสุขภาพดี โดยสาร Curcumin นั้นเป็นสารสำคัญที่ได้มาจากขมิ้น หรือ *Curcuma longa* Linn. ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายด้านแต่ไม่สามารถนำไปพัฒนาได้เนื่องจากมีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่ต่ำและถูกกำจัดออกได้เร็วผ่านทางตับและลำไส้ โดยในสัตว์ทดลองในกลุ่มแรกให้สาร Curcumin เดี่ยวในหนูแรทขนาด 2 g/kg และให้สาร Curcumin ขนาด 2 g/kg ร่วมกับ Piperine ขนาด 20 mg/kg จากการศึกษาพบว่าซีรัมในกลุ่มที่ให้สารร่วมกับ Piperine มีระดับของสาร Curcumin เพิ่มขึ้นที่เวลา 1-2 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารและค่า t_{max} มีค่าเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.02$) ในทางกลับกัน $t_{1/2}$ และ CL มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร Piperine ($p < 0.02$) และ Piperine สามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ได้ถึง 154% โดยในการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีหลังจากได้รับสาร Curcumin เดี่ยวขนาด 2 g/kg พบว่าระดับของสาร Curcumin นั้นมีค่าต่ำมากหรือต่ำกว่าช่วงที่สามารถวิเคราะห์ได้ และในกลุ่มที่ให้สารร่วมกับ Piperine ขนาด 20 mg/kg พบว่าระดับสารเพิ่มมากขึ้นที่เวลา 0.25 ถึง 1 ชั่วโมง และสามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ได้ถึง 200% ซึ่งจากผลในการศึกษาทำให้มีความเป็นไปได้ที่ Piperine สามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์และค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของ Curcumin โดยไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ทั้งในสัตว์ทดลองและอาสาสมัครสุขภาพดี (53)

ขนาดของ Piperine ที่ใช้ในการเป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ในคนมีค่าประมาณ 15 mg หรือไม่เกิน 20 mg ต่อวัน โดยเป็นขนาดที่น้อยกว่า LD_{50} ที่ได้จากการทดลองในสัตว์ทดลองถึง

ประมาณพันเท่า โดยจากการศึกษาก่อนหน้าได้แนะนำ Effective dose ของ Piperine ที่ใช้ในการเป็นสารเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์คือ 10% (w/w) ของตัวยาหลักหรือสารออกฤทธิ์ (44)

นอกจากนี้มีรายงานที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า Piperine สามารถเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสาร Resveratrol (54) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร Oxyresveratrol โดยที่สาร Oxyresveratrol มีหมู่ Hydroxyl groups มากกว่าสาร Resveratrol 1 ตำแหน่ง (15) โดยมีการศึกษาให้สาร Resveratrol เดี่ยวขนาด 100 mg/kg หรือสาร Resveratrol ขนาด 100 mg/kg ร่วมกับ Piperine ขนาด 10 mg/kg โดยการบริหารยาทางปากในหนูเมซัสสายพันธุ์ C57BL และนำมาวิเคราะห์หาระดับยาที่เวลาต่างๆด้วยเครื่อง LC-MS/MS พบว่าในกลุ่มที่ให้สารร่วมกับ Piperine สามารถเพิ่มค่า AUC ของสาร Resveratrol ได้ถึง 229% และเพิ่มค่า C_{max} ได้ถึง 1544% จากการศึกษานี้ทำให้เห็นว่า Piperine สามารถช่วยเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์และปรับปรุงค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Resveratrol ได้เมื่อให้ร่วมกับสาร Piperine (54)

จากการทบทวนวรรณกรรมถึงฤทธิ์ที่สามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์และประสิทธิภาพให้กับตัวยา สารอาหารและวิตามินได้ของสาร Piperine ประกอบกับพริกไทยเป็นพืชวัตถุดิบที่หาได้ง่าย ราคาถูก สามารถปลูกได้เป็นจำนวนมากและสามารถสกัดสาร Piperine ได้ง่ายในปริมาณสูง จึงมีความเห็นว่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะนำ Piperine มาใช้เป็น Bioenhancer เพื่อเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสาร Oxyresveratrol

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and methods)

สัตว์ทดลอง (Animal models)

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในแต่ละการทดลองเป็นการคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างสำหรับการวิจัยทางเภสัชจลนศาสตร์โดยใช้สูตรคำนวณ คือ

$$N = (2 \times SD^2) \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / \delta^2$$

N = ขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปรหลัก (50%)

$Z_{\alpha/2}$ = ค่านัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (1.96)

Z_{β} = ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างที่ความเชื่อมั่น 95% (1.28)

δ = ค่าความแตกต่างที่มีความสำคัญทางสถิติ (100%)

$$N = (2 \times 0.5^2) \times (1.96 + 1.28)^2 / 1.0^2$$

$$N = 5.25$$

ดังนั้น ขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการสำหรับการวิจัยทางเภสัชจลนศาสตร์คือกลุ่มละ 6 ตัว

การดูแลสัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar อายุ 15-30 สัปดาห์ เพศผู้ จำนวน 24 ตัว น้ำหนักระหว่าง 400-500 กรัม ได้จัดซื้อจากบริษัท โนมูระ สยาม อินเทอร์เน็ตเนชั่นแนล จำกัด สัตว์ทดลองจะเลี้ยงในกรงพลาสติกขนาด 6 × 11 × 5 นิ้ว ที่รองพื้นกรงด้วยวัสดุรองนอนที่ผ่านการ อบนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ตัว/กรง ที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 24 ± 2 °C มีแสงสว่าง 12 ชั่วโมง ไม่จำกัดน้ำและอาหาร (*ad libitum*) โดยได้รับการอนุมัติในการใช้สัตว์ทดลองจาก Chulalongkorn University Animal Care And Use Committee (CU-ACUC) (Approval number 17-33-002, Approval date 8th March 2017)

สารทดสอบ

Oxyresveratrol (ความบริสุทธิ์>98%) และ Piperine (ความบริสุทธิ์>98%) (ในรูปสารสกัดบริสุทธิ์ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ภก.ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วิฑูริ, ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์, คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

สารเคมี

- Analytical standard oxyresveratrol (analytical grade from Sigma-Aldrich, Corp., USA)
- Analytical standard piperine (analytical grade from Sigma-Aldrich, Corp., USA)
- Glycyrrhetic acid as internal standard for LC- MS/MS analysis (analytical grade from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)
- Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, Corp., USA)
- Isoflurane (MINRAD, Inc., USA)
- Heparin (LEO Pharma A/S, Denmark)
- 0.9% Normal saline (General Hospital Products Public, Co., Ltd., Thailand)
- Methanol (Honeywell Burdick & Jackson International, Inc., USA)
- Water HPLC grade (Honeywell Burdick & Jackson International, Inc., USA)
- Sterile water for injection
- β -Glucuronidase from *Escherichia coli* Type VII-A (Sigma-Aldrich, Corp., USA)

เครื่องมือและอุปกรณ์

Animal experiment

- Metabolic cage 3701M081 (Tecniplast, S.p.a., Italy)
- Insulin syringe, size 1 mL (NIPRO, Corp. Ltd., Thailand)
- Stopwatch (Canon, Co., Ltd., China)
- Gavage needle, 13G size 3 inches (BiolascoThai Co., Ltd., Thailand)

Sample preparation

- Microliter centrifuge, model MIKRO (Andreas Hettich, GmbH & Co. KG, Germany)
- Tabletop centrifuge, model EBA 20 (Andreas Hettich, GmbH & Co. KG, Germany)
- Micropipette (Labnet International, Inc., USA)
- Homogenizer, model Yellowline DI 18 Basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany)

- Homogenizer, model WT-130 (Success Technic, Malaysia)
- Vortex mixer, model VX-200 (Labnet International, Inc., USA)
- Analytical balance, model AG135 (Mettler-Toledo International, Inc., Switzerland)
- Analytical balance, model UMT2 (Mettler-Toledo International, Inc., Switzerland)
- Chest freezer, -20°C (Singer, SdnBhd, Malaysia)

LC-MS/MS equipment

- 8060 Triple Quad LC-MS/MS System (Shimadzu Corp., Japan)
- HPLC C18 column, model SynergiTM Fusion-RP (Phenomenex, Inc., USA)
- Guard C18 column, model SecurityGuardTM Fusion-RP (Phenomenex, Inc., USA)

วิธีการทดลอง (Methods)

การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic study)

ในการศึกษาจะแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว เพื่อศึกษาถึง Pharmacokinetic profiles ที่เปลี่ยนแปลงไปของ Oxyresveratrol และ Piperine เมื่อให้ร่วมกันทั้งการกินและการฉีด ดังแสดงในตารางที่ 4 ต่อไปนี้

ตารางที่ 4 แสดงสารทดสอบที่ให้ในแต่ละกลุ่มสัตว์ทดลองในการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์

กลุ่มที่	สารทดสอบ (n=6)	การเก็บตัวอย่าง
1.	Oxyresveratrol PO 100 mg/kg	เลือด, ปัสสาวะ, อุจจาระ
2.	Oxyresveratrol IV 10 mg/kg	เลือด, ปัสสาวะ, อุจจาระ
3.	Oxyresveratrol 100 mg/kg + Piperine 10 mg/kg PO	เลือด, ปัสสาวะ, อุจจาระ
4.	Oxyresveratrol 10 mg/kg + Piperine 1 mg/kg IV	เลือด, ปัสสาวะ, อุจจาระ

*การหาความแตกต่างของระดับสารเดี่ยว Oxyresveratrol เปรียบเทียบกับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับ Piperine ในกระแสเลือดใช้วิธีการทดสอบแบบ Non-parametric test ($p < 0.05$)

ในแต่ละการทดลอง หนูทดลองจะได้รับการอดอาหารก่อนการทดสอบ (Overnight fast) ใน Metabolic cages เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อลดผลรบกวนการดูดซึมยาหรือสารทดสอบจากอาหารที่สัตว์ทดลองกินเข้าไปก่อนการทำการทดลอง

Intravenous bolus administration

หนูทดลองจะถูกดมสลบด้วย 5% Isoflurane ด้วยวิธี Chamber induction method ใน Mobile fume hood เพื่อลดบาดแผลและความเจ็บปวดของสัตว์ทดลองที่อาจเกิดขึ้นได้ในขณะบริหารยาและเก็บเลือดจากสัตว์ทดลอง โดยการให้ยาทางหลอดเลือดดำและเก็บเลือดสัตว์ทดลองจะทำบริเวณ Lateral tail vein ของหนูและจำกัดปริมาตรครั้งละ 300 μ L การเก็บเลือดจะเริ่มเก็บที่เวลา 5, 15, 30 นาที, 1, 2, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไป Centrifuge ที่ 5,000xg นาน 10 นาที แยกเก็บส่วนที่เป็นพลาสมา 50 μ L โดยแบ่งเป็น 2 tubes (สำหรับ Pharmacokinetic study จำนวน 1 tube และ Stock จำนวน 1 tube) เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไปภายหลัง จากการทดสอบหนูจะถูกเลี้ยงใน Metabolic cage เพื่อเก็บปัสสาวะและอุจจาระ ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระจะถูกเก็บ 2 ช่วงระยะเวลาหลังให้ยา คือ ที่เวลา 0-24, 24-48 ชั่วโมงหลังได้รับยา สำหรับตัวอย่างปัสสาวะจะทำการจดปริมาตรของตัวอย่างปัสสาวะในแต่ละช่วงเวลา จากนั้นนำตัวอย่างปัสสาวะไป Centrifuge ที่ 5,000xg นาน 10 นาที แล้วนำส่วนของเหลวที่ได้ไปเจือจางลง 10 เท่าด้วยเมทานอล และถูกแบ่งเป็น 2 tubes (สำหรับ Pharmacokinetic study จำนวน 1 tube และ Stock จำนวน 1 tube) สำหรับตัวอย่างอุจจาระทำการชั่งน้ำหนักจากนั้นตัวอย่างอุจจาระจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ให้มีปริมาตร 10 ml ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

Oral administration

หนูทดลองจะถูกบริหารยาทางปากหลังจากนั้นจะถูกดมสลบด้วย 5% Isoflurane ด้วยวิธี Chamber induction method ใน Mobile fume hood เพื่อลดบาดแผลและความเจ็บปวดของสัตว์ทดลองที่อาจเกิดขึ้นได้ในขณะเก็บเลือดจากสัตว์ทดลอง การเก็บเลือดจะกระทำโดยการเจาะทางหูบริเวณ Lateral tail vein เพื่อทำการเก็บตัวอย่างเลือด 300 μ L ที่เวลา 5, 15, 30 นาที, 1, 2, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไป Centrifuge ที่ 5,000xg นาน 10 นาที แยกเก็บส่วนที่เป็นพลาสมา 50 μ L โดยแบ่งเป็น 2 tubes (สำหรับ Pharmacokinetic study จำนวน 1 tube และ Stock จำนวน 1 tube) เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ภายหลังจากการทดสอบหนูจะถูกเลี้ยงใน Metabolic cage เพื่อเก็บปัสสาวะและอุจจาระ ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระจะถูกเก็บ 2 ช่วงระยะเวลาหลังให้ยา คือ ที่เวลา 0-24, 24-48 ชั่วโมงหลังได้รับยา สำหรับตัวอย่างปัสสาวะจะทำการจดปริมาตรของตัวอย่างปัสสาวะในแต่ละช่วงเวลา จากนั้นนำตัวอย่างปัสสาวะไป Centrifuge ที่ 5,000xg นาน 10 นาที แล้วนำส่วนของเหลวที่ได้ไปเจือจางลง 10 เท่าด้วยเมทานอล และถูกแบ่งเป็น 2 tubes (สำหรับ Pharmacokinetic study จำนวน 1 tube และ Stock จำนวน 1 tube) สำหรับตัวอย่างอุจจาระ ทำการชั่งน้ำหนักจากนั้นตัวอย่างอุจจาระจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ให้มีปริมาตร 10 ml ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างเลือดก่อนให้สารทดสอบและภายหลังให้สารทดสอบไปแล้ว 24 ชั่วโมงจะถูกส่งตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดยนำตัวอย่างเลือด 1,000 μ L ไป Centrifuge ที่ 5,000xg เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนที่เป็นพลาสมา 400 μ L เพื่อเป็นการทดสอบว่าผลของสารทดสอบที่ให้ไม่ได้ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการทำงานของตับและไตในหนูแรทที่นำมาใช้ในการทดลองโดยจะอ้างอิงค่าปกติจาก Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians โดย Biochemical markers ที่ติดตามในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการได้แก่ Creatinine, Aspartate aminotransferase (AST) และ Alanine aminotransferase (ALT)

การทดสอบการกระจายตัวไปยังอวัยวะต่างๆ (Tissue distribution study)

เมื่อการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์เสร็จสิ้นซึ่งจะทำให้ทราบถึง Distribution phase ของสารทำให้สามารถออกแบบการทดลองในการเก็บอวัยวะต่างๆในช่วงเวลาที่เหมาะสมได้ การทดสอบการกระจายตัวไปยังอวัยวะต่างๆ โดยหนูทดลองจะถูกแบ่งเป็น 16 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว โดยดมสลบด้วย Isoflurane ก่อนการให้ยาแล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เวลา 5 นาที, 1, 2 และ 4 ชั่วโมงภายหลังได้รับการบริหารยาทางปากหรือการบริหารยาทางหลอดเลือดดำ โดยอวัยวะภายในของหนูทดลองที่ทำการเก็บจะมีความเกี่ยวข้องกับเภสัชจลนศาสตร์ คือ ลำไส้เล็ก, ตับ, ไต, สมอง, หัวใจ, กระเพาะอาหาร, ปอด, ม้าม เพื่อนำมาหาความสามารถของยาในการผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อ และทำนายถึงการสะสมของยาที่อาจเกิดขึ้นได้ในแต่ละอวัยวะที่แตกต่างกัน จากนั้นตัวอย่างเนื้อเยื่อจะถูกล้างด้วย Normal saline และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 5 แสดงสารทดสอบที่ให้ในแต่ละกลุ่มสัตว์ทดลองในการศึกษาการกระจายตัวไปยังอวัยวะต่างๆ

กลุ่มที่	สารทดสอบ (n=3)	การเก็บตัวอย่าง	เวลาที่เก็บตัวอย่าง
1.	Oxyresveratrol IV 10 mg/kg	เลือด, อวัยวะภายใน	5 นาที
2.			1 ชั่วโมง
3.			2 ชั่วโมง
4.			4 ชั่วโมง
5.	Oxyresveratrol PO 100 mg/kg	เลือด, อวัยวะภายใน	5 นาที
6.			1 ชั่วโมง
7.			2 ชั่วโมง
8.	Oxyresveratrol IV 10 mg/kg + Piperine IV 1 mg/kg	เลือด, อวัยวะภายใน	4 ชั่วโมง
9.			5 นาที
10.			1 ชั่วโมง
11.			2 ชั่วโมง
12.	Oxyresveratrol PO 100 mg/kg + Piperine PO 10 mg/kg	เลือด, อวัยวะภายใน	4 ชั่วโมง
13.			5 นาที
14.			1 ชั่วโมง
15.			2 ชั่วโมง
16.			4 ชั่วโมง

*การหาความแตกต่างของระดับสารเดี่ยว Oxyresveratrol or piperine เปรียบเทียบกับ oxyresveratrol ร่วมกับ piperine ในอวัยวะใช้วิธีการทดสอบแบบ Non-parametric test ($p < 0.05$)

การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

การเตรียมตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะ (Plasma and urine samples)

ตัวอย่างพลาสมาและตัวอย่างปัสสาวะจะถูกละลายที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นนำตัวอย่างพลาสมา 50 μL ไปผสมกับ เมทานอล 200 μL ที่มีสาร Internal standard (Glycyrrhetic acid) ปริมาณ 10 ng แล้วนำไปปั่น Centrifuge ที่ 10,000xg นาน 10 นาที แยกเก็บส่วนที่เป็น Supernatant 150 μL เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างอุจจาระและอวัยวะ (Feces and tissue samples)

นำตัวอย่างอุจจาระและตัวอย่างอวัยวะที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆแล้วไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ในเมทานอลเป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 5,000xg เป็นเวลา 10 นาทีหลังจากนั้นนำ Primary supernatant 50 μL ไปใส่ในหลอดทดลอง 1.5 ml แล้วนำไปผสมกับเมทานอล 200 μL ที่มีสาร Internal standard (Glycyrrhetic acid) ปริมาณ 10 ng แล้วนำไปปั่น Centrifuge ที่ 10,000xg เป็นเวลา 10 นาทีเก็บส่วนที่เป็น supernatant 150 μL เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารในรูป Glucuronide conjugation

ตัวอย่างพลาสมา ตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างอุจจาระ 50 μL เติมสาร β -glucuronidase 2,000 units ใน 100 μL Phosphate buffer (pH 6.8) แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเมทานอล 1,000 μL ที่มีสาร Internal standard (Glycyrrhetic acid) ปริมาณ 50 ng เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วนำไป Vortex เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปปั่น Centrifuge ที่ 10,000xg เป็นเวลา 10 นาทีเก็บส่วนที่เป็น supernatant 150 μL เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

โดยสาร β -glucuronidase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งกระบวนการตัดพันธะของสารในรูป Glucuronide ด้วยน้ำ (ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส) จากการกระบวนการดังกล่าวทำให้ทราบถึงปริมาณสารทั้งหมดจึงสามารถนำมาคำนวณหาปริมาณสารในรูป Glucuronide conjugation ได้ตามนี้

Oxyreveratrol glucuronide = Oxyreveratrol with hydrolysis - Oxyreveratrol without hydrolysis

MS conditions

ทั้งนี้ก่อนเริ่มการวัดตัวอย่างจำเป็นต้องมีการปรับค่าของระบบ Mass spectrometry ให้มีความเหมาะสมในการตรวจวัด โดยค่าต่างๆที่จำเป็นต้องมีการปรับให้เหมาะสมได้แก่

- Declustering potential (DP) เป็นค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้บริเวณทางเข้าหลังผ่าน Electrospray ionization มาเพื่อลดการเกิดการเกาะกลุ่มของไอออนก่อนที่จะเข้าสู่ Analyzer (Q_0)
- Entrance potential (EP) เป็นค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้บริเวณ Q_0 เพื่อให้ไอออนเคลื่อนที่เป็นลำเดี่ยวเข้า Q_1
- Collision energy (CE) เป็นอัตราการเร่งของไอออนเพื่อเข้าสู่ Q_2 เพื่อให้โมเลกุลมีความเร็วพอในการเคลื่อนที่ผ่าน Q_2
- Collision exit potential (CXP) เป็นค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้หลังจากไอออนแตกตัวหมดแล้ว เพื่อให้โมเลกุลเคลื่อนที่เข้าสู่ Detector

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้องเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษาเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติเงื่อนไขหรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้น ๆ และเพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำและยอมรับได้โดยอ้างอิงตาม US FDA Guidelines (55)

- Lower limits of quantification (LLOQ) หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้และสามารถระบุปริมาณของสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยมีค่าความแม่นยำ (Accuracy) และค่าความเที่ยงตรง (Precision) ที่ยอมรับได้
- Linearity เป็น การแสดงความเป็นเส้นตรงของกราฟในช่วงความเข้มข้นที่ต้องการศึกษามีค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น (Correlation coefficient, R^2) มากกว่า 0.99
- ค่าความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึงความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุดโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดสัมพัทธ์ (% Relative error) ที่ได้จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของตัวอย่างควบคุม (Quality control samples) ที่ความเข้มข้นขนาดต่ำ กลาง และสูงกับ Calibration curve

$$\text{สูตรเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดสัมพัทธ์ (\% Relative error)} = \frac{\text{Absolute error} \times 100}{\text{ค่าที่แท้จริง}}$$

$$\text{ค่าความผิดพลาดจริง (Absolute error)} = \text{ค่าที่วัดได้} - \text{ค่าที่แท้จริง}$$

- ความเที่ยงตรง (Precision) ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลการทดสอบหรือผลวิเคราะห์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยจะทำการทดสอบตัวอย่างควบคุม (Quality control samples) ภายในวันเดียวกัน (Intra-day) ซ้ำ 5 ครั้ง และทำการทดสอบระหว่างวัน (Inter-day) ทำซ้ำติดต่อกัน 5 วัน โดยพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation, CV)

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ในการวิเคราะห์หาระดับของสาร Oxyresveratrol และ Piperine ในการศึกษาที่ได้รับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์จากการศึกษาของ Huang และคณะ (30) และ Basu และคณะ (56) ตามลำดับ

HPLC conditions

Mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย 0.2% Formic acid ในน้ำ และ เมทานอล 100% ใช้ระบบการไหลของ Mobile phase เป็นแบบ Gradient เพื่อประโยชน์ในการลดระยะเวลาในการวิเคราะห์สารแต่ละตัวอย่าง และเพิ่ม Sensitivity ในการวัดได้อีกด้วย เนื่องจากสารอื่นๆ ที่ไม่ต้องการจะถูกกำจัดออกในช่วงแรกของการวิเคราะห์ โดยสัดส่วนของ Mobile phase ที่เปลี่ยนแปลงไปได้แสดงดังตารางที่ 1 ในส่วน Stationary phase ใช้ Synergi Fusion RP C18 column (Phenomenex Inc., USA) ในการแยกสารโดยอุณหภูมิของ Column ควบคุมคงที่ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ Mobile phase ที่เวลาต่างๆ

Pump time (min)	Pump flow (mL/min)	Aqueous phase portion (%)	Organic phase portion (%)
0.00 - 0.50	0.50	50	50
0.50 - 1.50	0.50	90	10
01.50 - 3.00	0.50	90	10
3.00 - 4.00	0.50	50	50
04.00 - 5.00	0.50	50	50

MS conditions

ตารางที่ 7 แสดงค่า Parameters ในระบบ Mass spectrometry

	Oxyresveratrol	Piperine	Glycyrrhetic acid (IS)
DP (V)	-45.00	56.00	-100.00
EP (V)	-9.00	9.00	-6.00
CE (V)	-23.00	24.00	-68.00
CXP (V)	-2.00	3.00	-3.00

สาร Oxyresveratrol, Piperine และ Glycyrrhetic acid มี Retention time อยู่ที่ 0.51, 1.81 และ 2.30 นาที ตามลำดับ โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Negative electrospray ionization สำหรับสาร Oxyresveratrol และ Glycyrrhetic acid โดยมี Mass-to-charge ratio อยู่ที่ 245/107 และ 469/409 m/z ตามลำดับ และใช้ Positive ionization mode สำหรับสาร Piperine มี Mass-to-charge ratio อยู่ที่ 286/201 m/z โดยสาร Oxyresveratrol และ Piperine มีค่า Lower limit of quantitation (LLOQ) อยู่ที่ 6.10 และ 0.61 µg/L ตามลำดับ และ Calibration curve ของสาร Oxyresveratrol และสาร Piperine เป็นเส้นตรงที่มีค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น (Correlation coefficient, R²) มากกว่า 0.99 และให้ผลความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดี (Linearity) โดยสาร Oxyresveratrol อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ 6.10-12,500 µg/L และสาร Piperine แสดงค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่ 0.61-1,250 µg/L ซึ่งสารทดสอบทั้งสาร Oxyresveratrol และสาร Piperine แสดงค่าความแม่นยำ (Accuracy) และค่าความเที่ยงตรง (Precision) อยู่ในช่วง ± 10% ซึ่งเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% Recovery) นั้นมีค่ามากกว่า 70% ทั้งสาร Oxyresveratrol และสาร Piperine ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ ในรูปแบบ Non-compartmental analysis โดยโปรแกรม PK solution 2.0 software (Summit Research Services, USA) โดยจะมีพารามิเตอร์ที่พิจารณาดังนี้

- Maximum plasma drug concentration (C_{max})
- Time to reach Maximum plasma drug concentration (T_{max})
- Area under the curve from time zero to the last sampling point (AUC_{0-t})
- Area under the curve from time zero to infinity ($AUC_{0-\infty}$)
- Absolute oral bioavailability, $(AUC_{po}/Dose_{po}) \div (AUC_{iv}/Dose_{iv})$
- Mean residence time (MRT)
- Volume of distribution (V_d)
- Tissue to plasma ratio (K_p)
- The percentage recovery
- Elimination half-life ($T_{1/2}$)
- Clearance (CL)
- AUC_{0-t} of glucuronide metabolite: AUC_{0-t} of parent compound

รายงานผล ในรูปแบบค่ามัธยฐาน \pm ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (Median \pm interquartile range) ใช้สถิติ Mann-Whitney U test สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลของระดับสาร Oxyresveratrol และในการเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol และกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine และรายงานผลการศึกษาก่อนการทนต่อยาในสัตว์ทดลองในรูปแบบค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean \pm standard deviation) ใช้สถิติ Wilcoxon Signed Rank Test ในการเปรียบเทียบระดับเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT) และ Creatinine ก่อนได้รับสารจากกลุ่ม Oxyresveratrol และกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine และหลังจากได้รับที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16 (SPSS, Inc.) สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาการทนต่อยาในสัตว์ทดลอง (Animal tolerability)

จากการศึกษาหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ทั้งหมดที่ได้รับสารทดสอบในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ทั้งการบริหารยา โดยฉีดเข้าหลอดเลือดดำและการบริหารยาทางปากพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ ทั้งก่อนให้สารทดสอบและภายหลังให้สารทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง รวมถึงระดับเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (AST) และ Alanine aminotransferase (ALT) ซึ่งเป็นค่าที่สำคัญในการบ่งชี้การทำงานของตับ พบว่าผลของสารทดสอบทั้งหมดที่ให้ไม่ได้ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่า AST และ ALT เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนให้สารทดสอบและหลังให้สารทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับค่า Creatinine ซึ่งเป็นค่าที่สำคัญในการประเมินการทำงานของไต โดยผลของสารทดสอบทั้งหมดที่ให้ไม่ได้ส่งผลต่อระดับค่า Creatinine และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนให้สารทดสอบและหลังให้สารทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าระดับ Creatinine ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง ดังตารางแสดงที่ 8

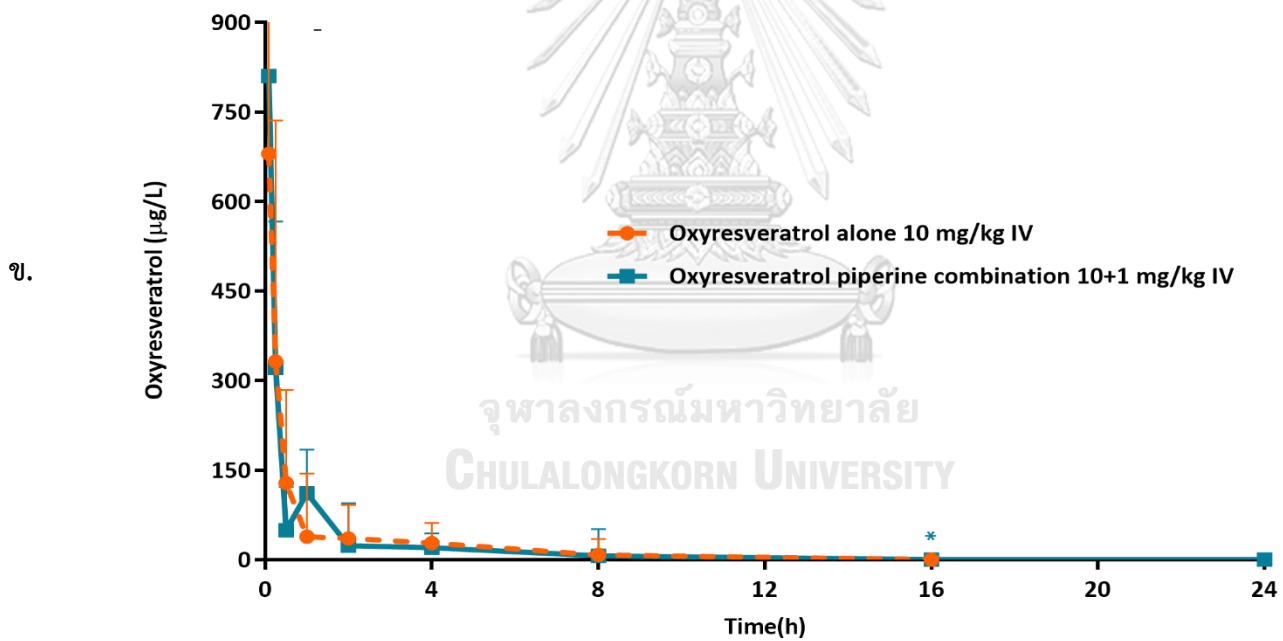
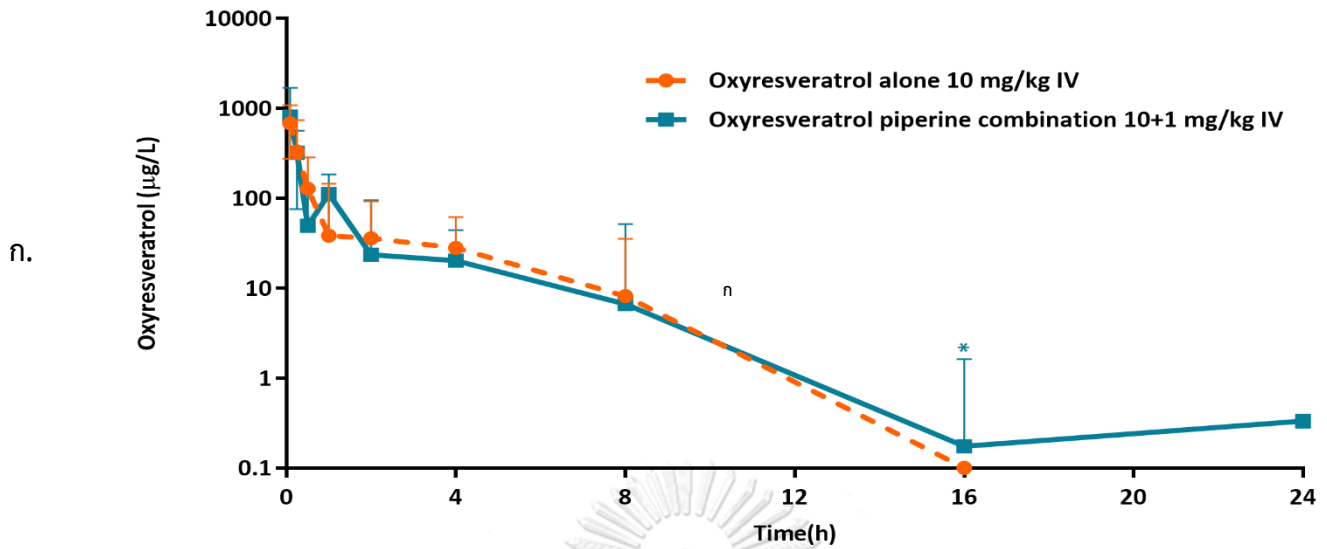
ตารางที่ 8 แสดงค่า AST, ALT และ Creatinine ของตัวอย่างเลือดก่อนให้สารทดสอบ และ หลังให้สารทดสอบ 24 ชั่วโมง

Parameters	Intravenous						Oral					
	Oxyresveratrol (10 mg/kg)		Oxyresveratrol + piperine (10 + 1 mg/kg)		Oxyresveratrol (100 mg/kg)		Oxyresveratrol (100 mg/kg)		Oxyresveratrol + piperine (100 + 10 mg/kg)			
	Predose (0 h)	Postdose (24 h)	Predose (0 h)	Postdose (24 h)	Predose (0 h)	Postdose (24 h)	Predose (0 h)	Postdose (24 h)	Predose (0 h)	Postdose (24 h)	Predose (0 h)	Postdose (24 h)
Physical appearance	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
AST (U/L)	42.00 ± 7.15	45.40 ± 3.78	34.60 ± 17.03	46.75 ± 5.57	32.40 ± 16.47	40.83 ± 22.39	17.66 ± 13.50	23.66 ± 17.32				
ALT (U/L)	5.00 ± 0.00	5.80 ± 1.09	9.40 ± 1.67	7.50 ± 2.88	9.40 ± 9.28	6.83 ± 3.25	7.00 ± 2.28	11.40 ± 11.63				
Creatinine (mg/dL)	0.25 ± 0.15	0.32 ± 0.08	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.08	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.01				

Data are presented as mean ± S.D. (n = 6). *p<0.05 for Predose vs Postdose

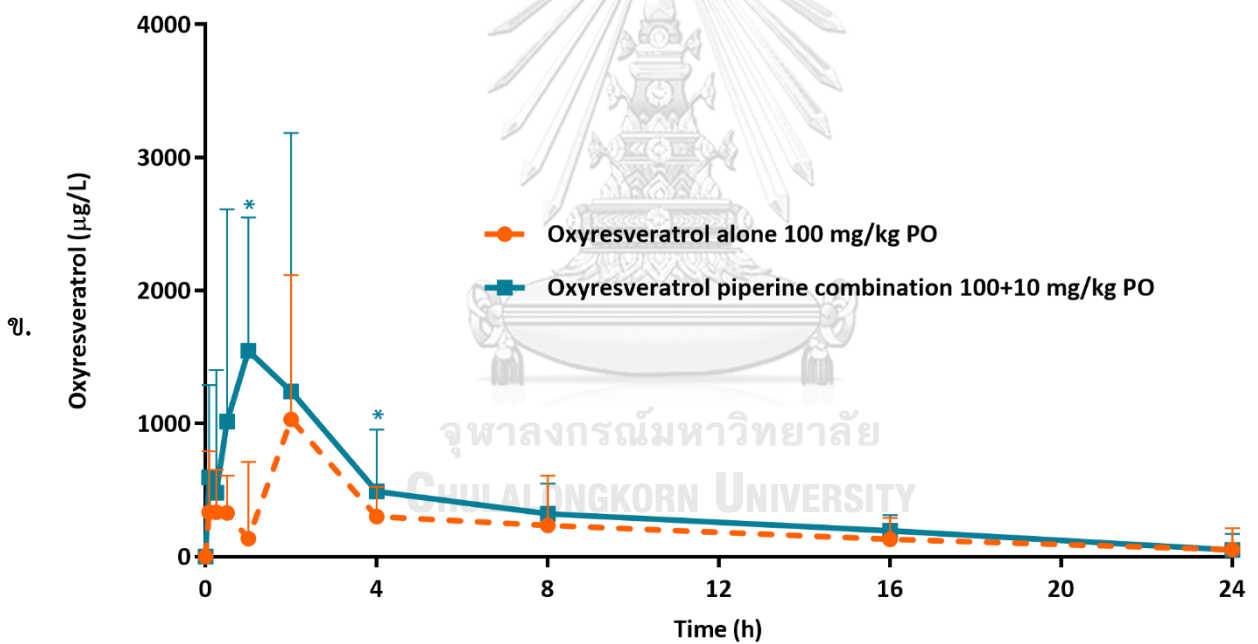
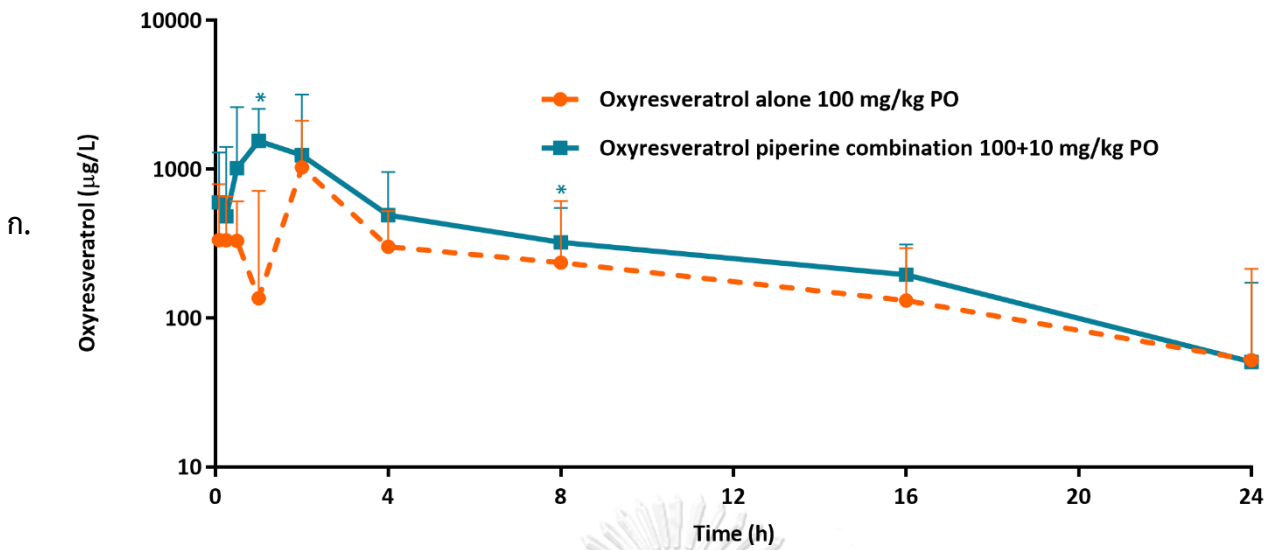
การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic study)

ในการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ดังที่แสดงในรูปภาพที่ 7 ซึ่งแสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับยาเฉลี่ยในพลาสมาและเวลา (Plasma concentration-time profiles) พบว่าระดับของ Oxyresveratrol ในกลุ่มที่ให้สาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เป็น Slope ของกราฟที่แสดงถึง Elimination phase และที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารทดสอบ กลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว ตรวจไม่พบระดับของ Oxyresveratrol แต่ในขณะเดียวกัน กลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ยังสามารถตรวจพบระดับของ Oxyresveratrol เช่นเดียวกับการบริหารยาทางปากโดยกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ดังที่แสดงในรูปภาพที่ 8 พบว่าระดับของสาร Oxyresveratrol ในกลุ่มที่ให้สาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine สูงกว่าที่เวลา 1 และ 4 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังจากได้รับสารทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้สาร Oxyresveratrol เดี่ยว และเมื่อพิจารณาาระดับ Oxyresveratrol ในเวลาต่างๆ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารร่วมกับสาร Piperine มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวซึ่งสอดคล้องกับค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ดังตารางแสดงที่ 9 พบว่าในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ในรูปแบบการบริหารยาทางปากมีค่า AUC_{0-t} และค่า $AUC_{0-\infty}$ เท่ากับ $7,242.70 \pm 5,095.00$ และ $10,672.13 \pm 3695.70$ $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับและ C_{max} $1,554.66 \pm 1,239.19$ $\mu\text{g/L}$ ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Oxyresveratrol เดี่ยว ($p < 0.05$) โดยสอดคล้องกับค่า t_{max} ที่เร็วขึ้นอยู่ที่ 1.00 ± 1.25 ชั่วโมงและค่า Mean resident time อยู่ที่ 6.94 ± 12.85 ชั่วโมง ซึ่งมีแนวโน้มว่าสาร Oxyresveratrol ในกลุ่มที่ให้ร่วมกับ Piperine สามารถอยู่ในร่างกายได้นานกว่ากลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว โดยค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ในกลุ่มที่ให้ร่วมกับสาร Piperine พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว และในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ในรูปแบบการบริหารยาโดยฉีดเข้าหลอดเลือดดำพบว่าค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์นั้นมีแนวโน้มที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว



รูปภาพที่ 7 แสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับ Oxyresveratrol เฉลี่ยในพลาสมา กับเวลา กลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหรยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ แสดงผลในรูปแบบกราฟเชิงเส้น (ก); แสดงผลในรูปแบบกราฟเซมิล็อก (ข)

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P\text{-value} < 0.05$



รูปภาพที่ 8 แสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับ Oxyresveratrol เฉลี่ยในพลาสมา กับ เวลา กลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาทางปาก แสดงผลในรูปแบบกราฟเชิงเส้น (ก); แสดงผลในรูปแบบกราฟ เชมิล็อก (ข)

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05

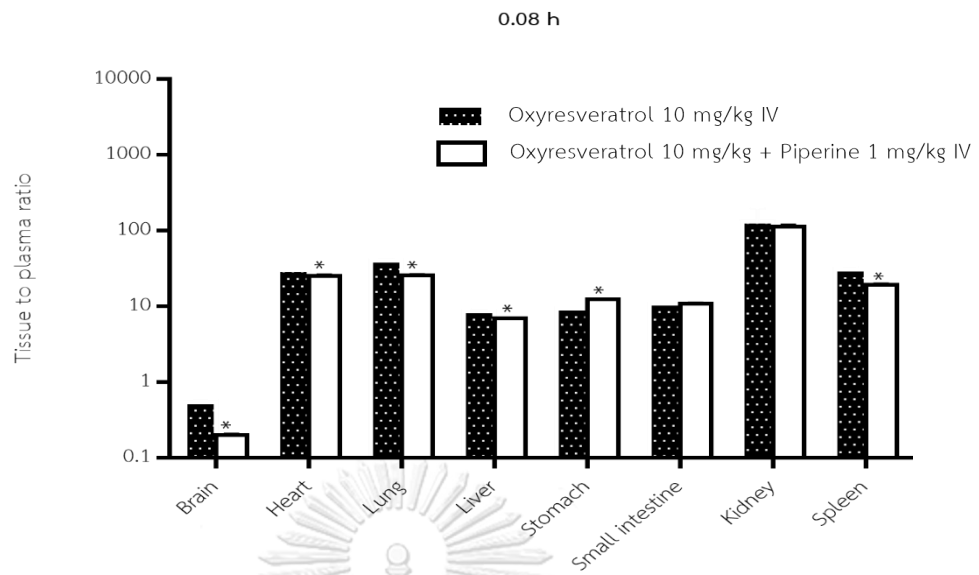
ตารางที่ 9 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine

Parameters	Intravenous			Oral	
	Oxyresveratrol alone (10 mg/kg)	Oxyresveratrol + piperine (10 + 1 mg/kg)	Oxyresveratrol alone (100 mg/kg)	Oxyresveratrol + piperine (100 + 10 mg/kg)	
Oxyresveratrol					
C _{max} (µg/L)	N/A	N/A	1,031.19 ± 1,005.66	1,554.66 ± 1,239.19*	
T _{max} (h)	N/A	N/A	2.00 ± 0.88	1.00 ± 1.25	
AUC _{0-t} (µg.h/L)	510.46 ± 1017.42	703.89 ± 2,399.15	5,844.23 ± 2,101.29	7,242.70 ± 5,095.00*	
AUC _{0-inf} (µg.h/L)	510.66 ± 1017.24	705.76 ± 2,399.85	5,952.22 ± 2,044.13	10,612.13 ± 3,695.70*	
MRT (h)	1.31 ± 0.58	1.21 ± 1.08	6.82 ± 8.08	6.94 ± 12.85	
V _d (L/kg)	38.11 ± 75.75	71.49 ± 100.83	82.70 ± 75.58	87.47 ± 214.26	
CL (L/h/kg)	19.58 ± 18.21	14.17 ± 14.70	16.80 ± 7.94	9.42 ± 4.69	
T _{1/2} (h)	1.35 ± 1.22	3.65 ± 3.60	3.51 ± 2.71	6.66 ± 12.76	
Absolute bioavailability (%)	N/A	N/A	65.76	113.52	
Oxyresveratrol glucuronide					
AUC _{0-t} (µg.h/L)	15,462.96 ± 34,965.18	1,250.43 ± 450.73	10,322.48 ± 10,960.17	7,004.85 ± 1,080.45	
AUC _{0-inf} (µg.h/L)	15,463.28 ± 34,965.18	1,329.16 ± 1,385.69	10,981.35 ± 10,541.59	7,713.59 ± 968.78	
Ratio of AUC oxyresveratrol glucuronide/AUC oxyresveratrol	30.28	1.88	1.84	0.72*	

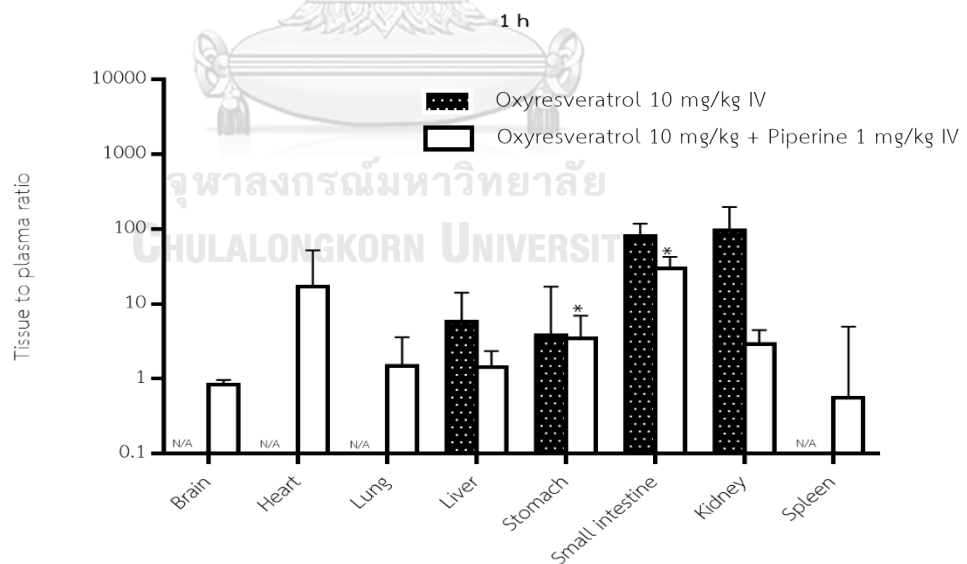
Data are presented as mean ± S.D. (n = 6), *p<0.05 for Oxyresveratrol alone vs Oxyresveratrol + piperine.

การทดสอบการกระจายตัวไปยังอวัยวะต่างๆ (Tissue distribution study)

รูปภาพที่ 9-12 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา (Tissue to plasma ratio, K_p) จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริภรยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 5 นาที 1, 2 และ 4 ชั่วโมงภายหลังได้รับยา พบว่าสาร Oxyresveratrol สามารถกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ โดยพบค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา ในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ประมาณ 10-100 เท่า ได้ในทุกๆอวัยวะที่ทำการทดลองตั้งแต่เวลา 5 นาทีและมีค่าลดลงที่ 1, 2 และ 4 ชั่วโมงตามเวลา และพบว่าบริเวณสมอง ในกลุ่มที่ให้ร่วมกับสาร Piperine มีค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา คงอยู่ได้ที่ 1 และ 2 ชั่วโมง ในขณะที่สาร Oxyresveratrol เดี่ยว ไม่พบค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาที่เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการบริภรยาทางปากดังแสดงในรูปภาพที่ 13-16 พบว่าสาร Oxyresveratrol สามารถกระจายไปได้เกือบทุกอวัยวะในการทดสอบทั้งกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยพบค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาประมาณ 1-100 เท่าตั้งแต่เวลา 5 นาทีจนถึงเวลา 4 ชั่วโมงและพบว่าบริเวณสมอง ในกลุ่มที่ให้ร่วมกับสาร Piperine มีค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา คงอยู่ได้ที่ 1 และ 2 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว ไม่พบค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาที่เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง

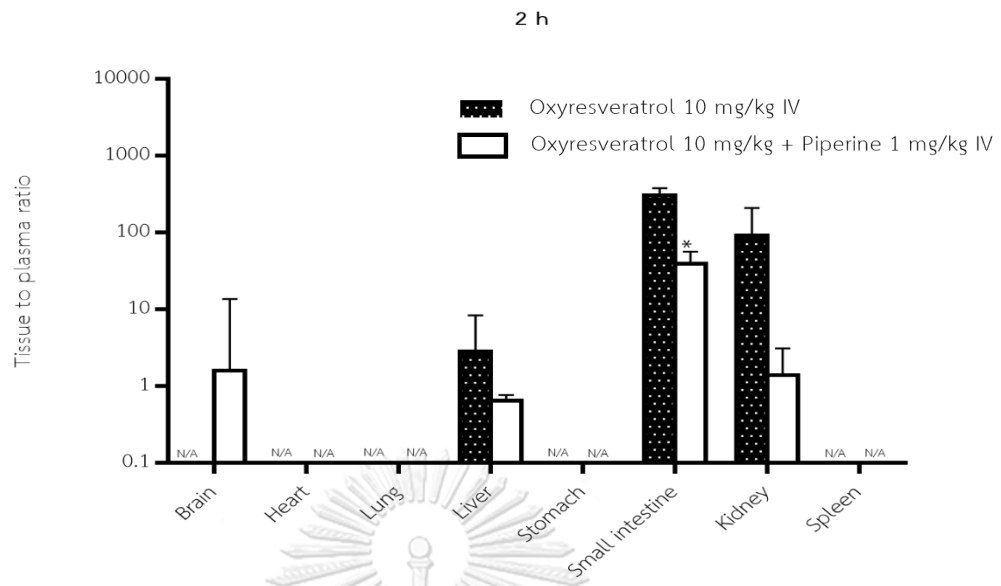


รูปภาพที่ 9 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริเวรยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 5 นาทีภายหลังจากได้รับยา *แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05



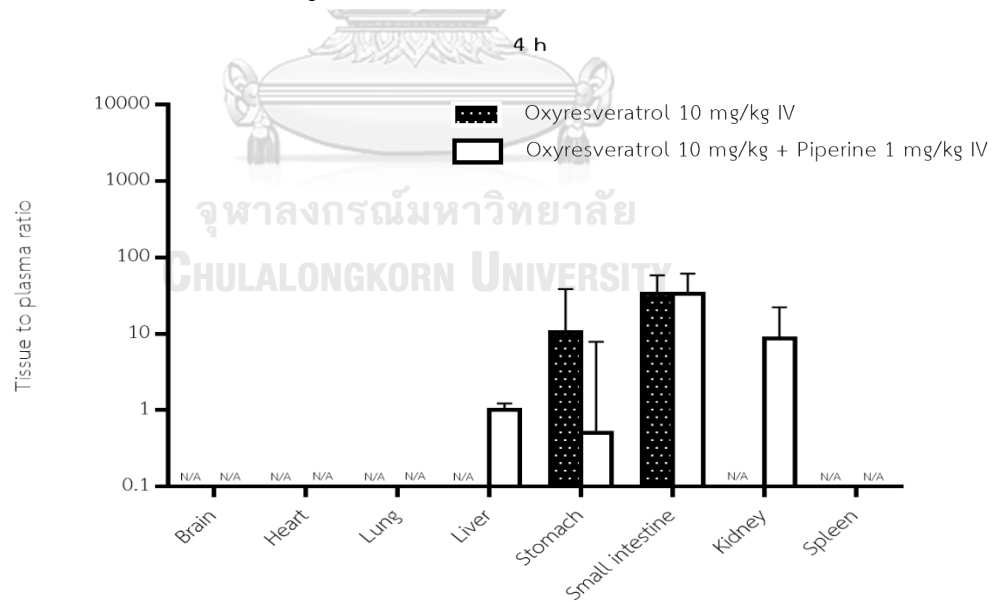
รูปภาพที่ 10 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริเวรยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 1 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับยา

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05



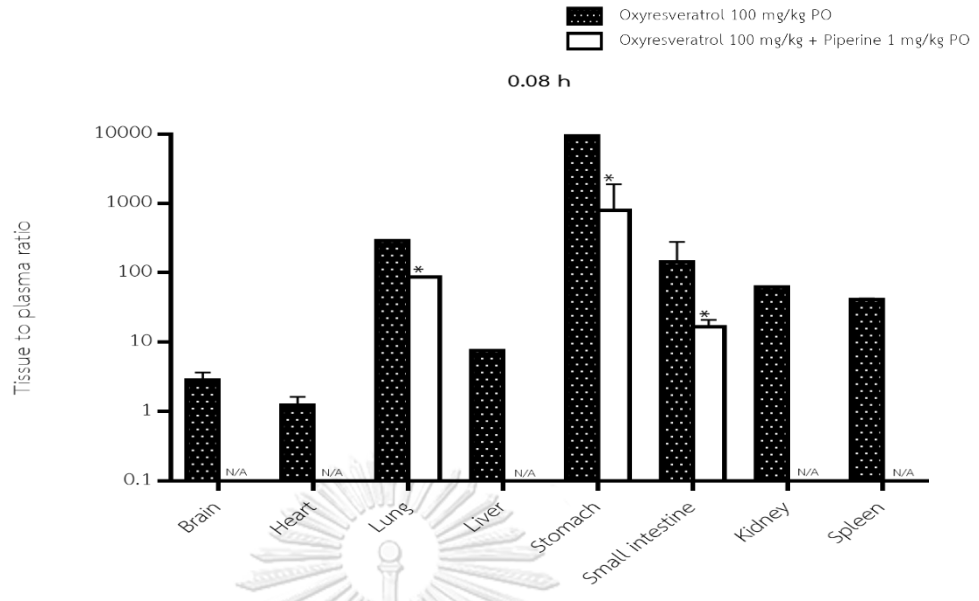
รูปภาพที่ 11 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 2 ชั่วโมง ภายหลังได้รับยา

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05



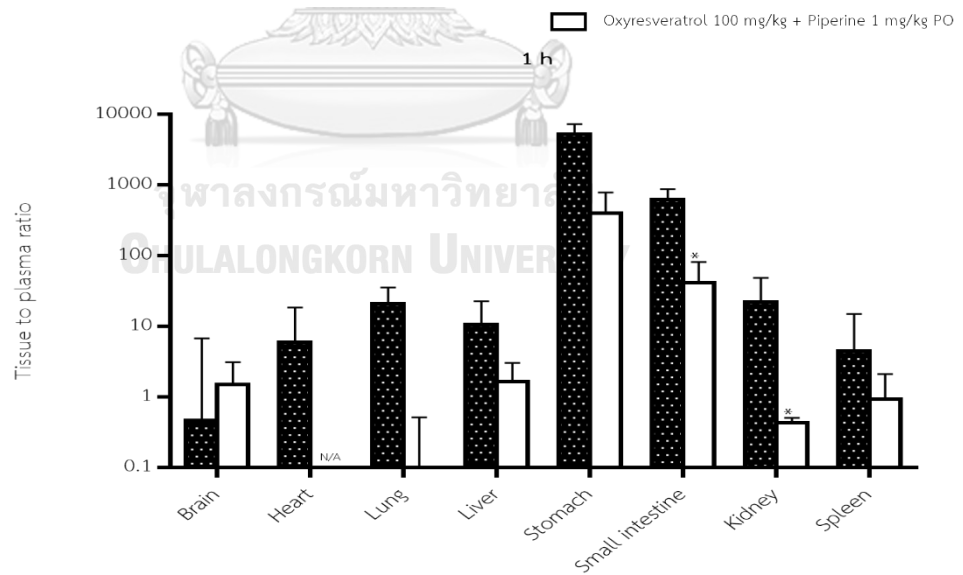
รูปภาพที่ 12 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ที่เวลา 4 ชั่วโมง ภายหลังได้รับยา

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05



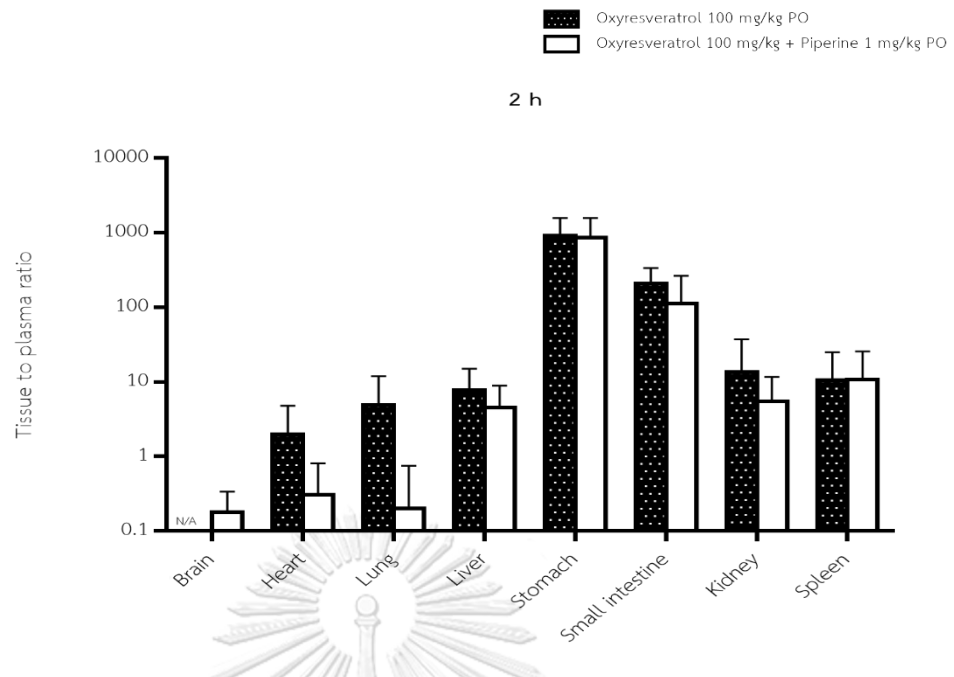
รูปภาพที่ 14 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกิน ที่เวลา 5 นาทีภายหลังจากได้รับยา

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05



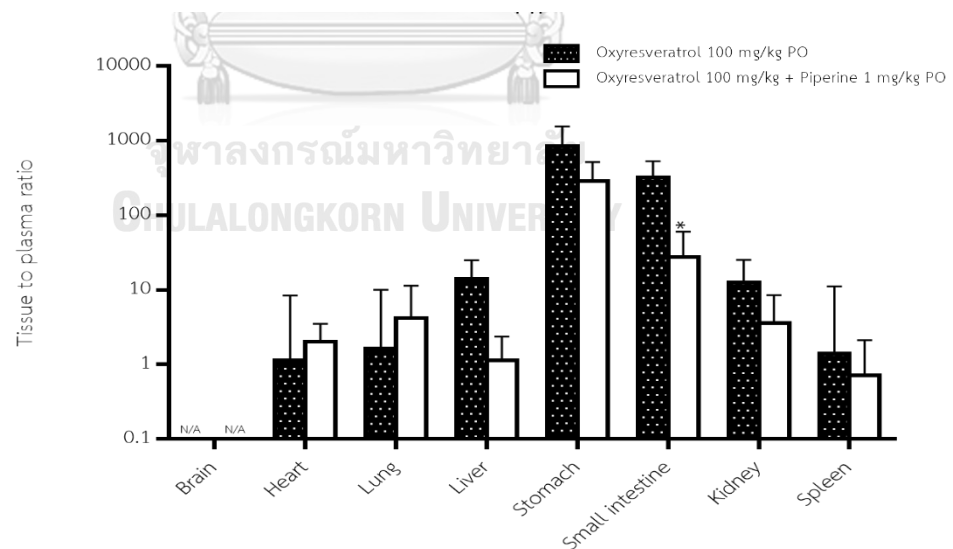
รูปภาพที่ 13 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกิน ที่เวลา 1 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับยา

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05



รูปภาพที่ 15 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกิน ที่เวลา 2 ชั่วโมง ภายหลังได้รับยา

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05



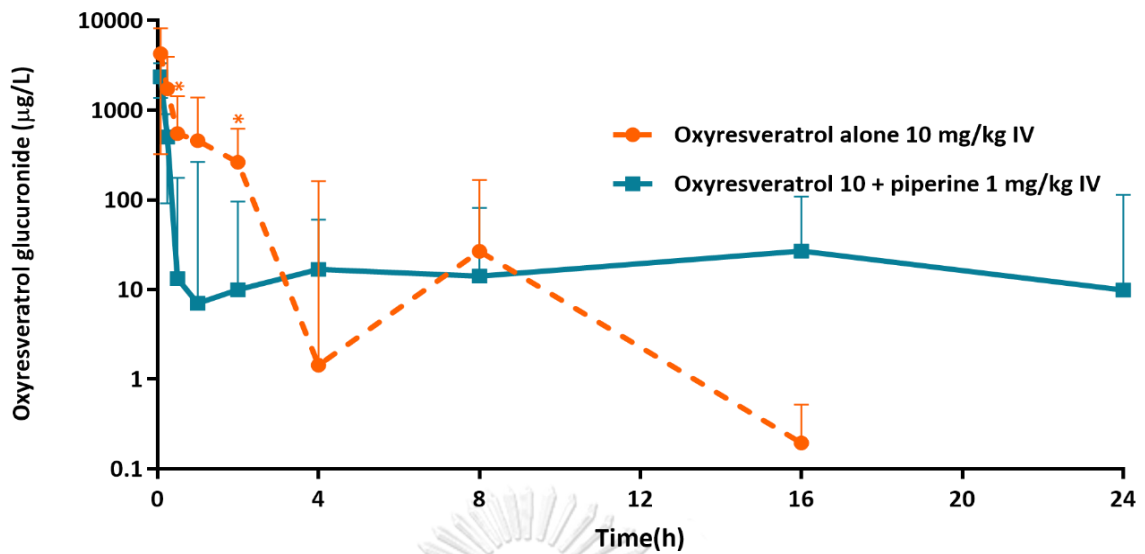
รูปภาพที่ 16 ได้แสดงค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกิน ที่เวลา 4 ชั่วโมง ภายหลังได้รับยา

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05

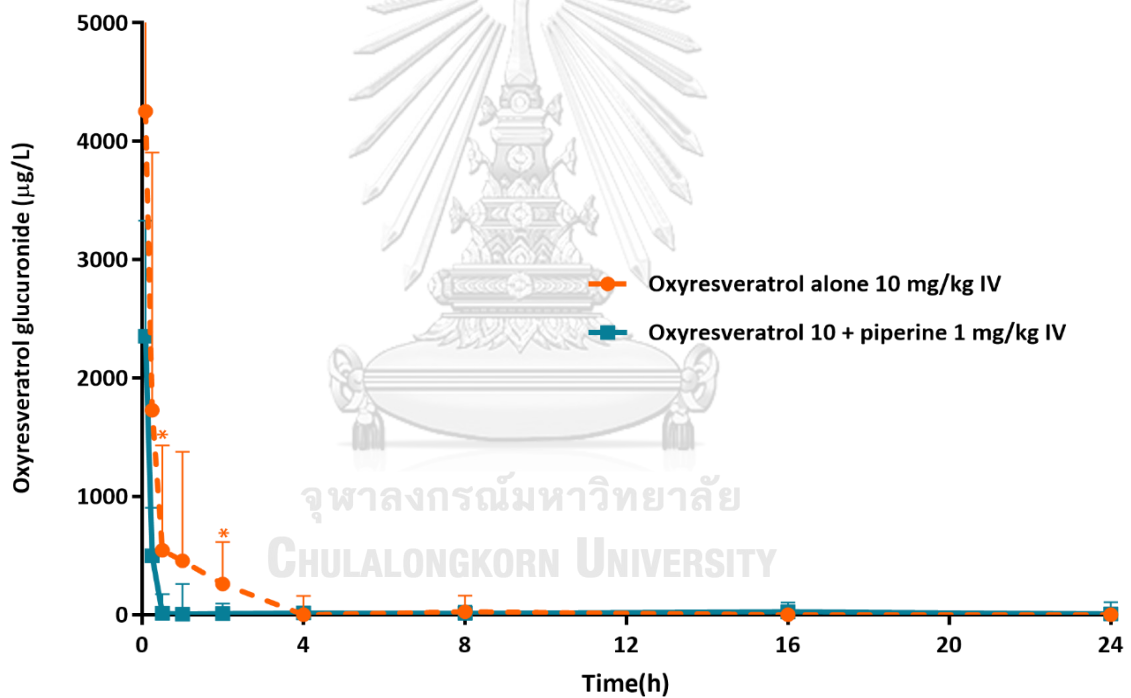
การศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism study)

ในการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมจะแสดงกราฟความสัมพันธ์ของระดับยาเฉลี่ยในพลาสมาและเวลาของสาร Oxyresveratrol ในรูปแบบสาร Oxyresveratrol glucuronide ตามรูปภาพที่ 11 ปรากฏว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมสาร Piperine มีระดับของ Oxyresveratrol glucuronide ในกลุ่มที่ให้สาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เวลา 30 นาทีและ 2 ชั่วโมงและเมื่อพิจารณาที่จุดเวลาอื่นพบว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมสาร Piperine มีแนวโน้มที่สามารถลดการเกิดปฏิกิริยา Conjugation ทำให้ระดับของ Conjugated metabolites ที่จุดเวลาอื่นต่ำกว่าแต่ไม่แตกต่างในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว ($p < 0.05$) โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ซึ่งมีค่า Conversion ratio ในกลุ่มที่ได้รับ Oxyresveratrol เดี่ยวอยู่ที่ 30.28 และในกลุ่มที่ได้รับร่วมกับสาร Piperine พบว่ามีค่าลดลงแต่ไม่แตกต่างในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว ($p < 0.05$) โดยมีค่า Conversion ratio อยู่ที่ 1.88 และในกลุ่มที่ได้รับการบริหารยาทางปากพบว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมสาร Piperine มีแนวโน้มที่สามารถลดการเกิดปฏิกิริยา Conjugation ทำให้ระดับของ Conjugated metabolites ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวตามรูปภาพที่ 12 โดยค่า Conversion ratio ในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวอยู่ที่ 1.84 และในกลุ่มที่ได้รับร่วมกับสาร Piperine พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว ($p < 0.05$) โดยมีค่า Conversion ratio อยู่ที่ 0.72

ก.



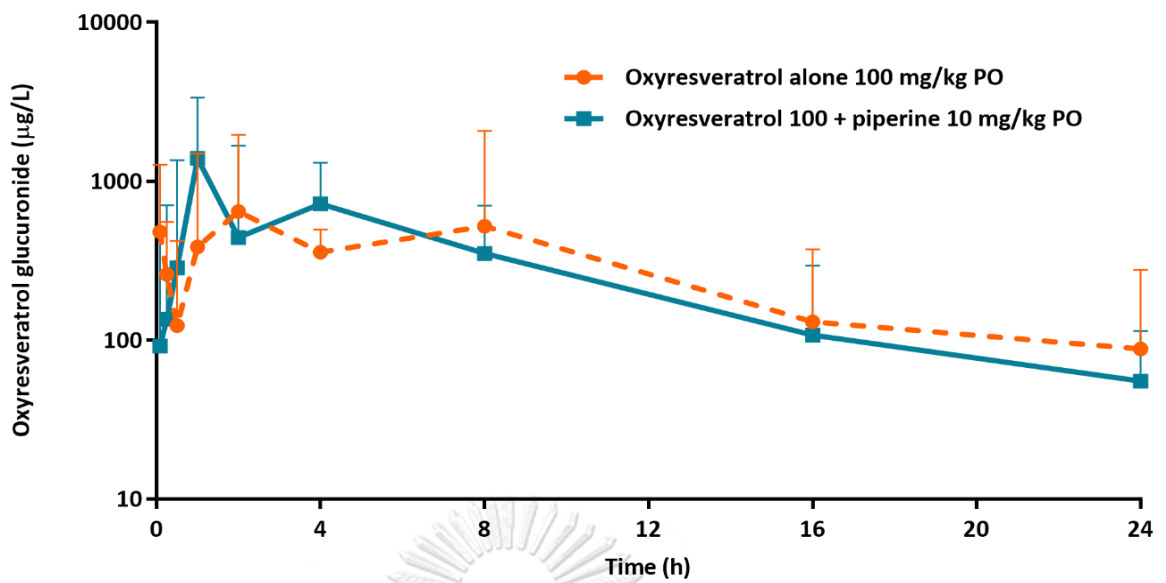
ข.



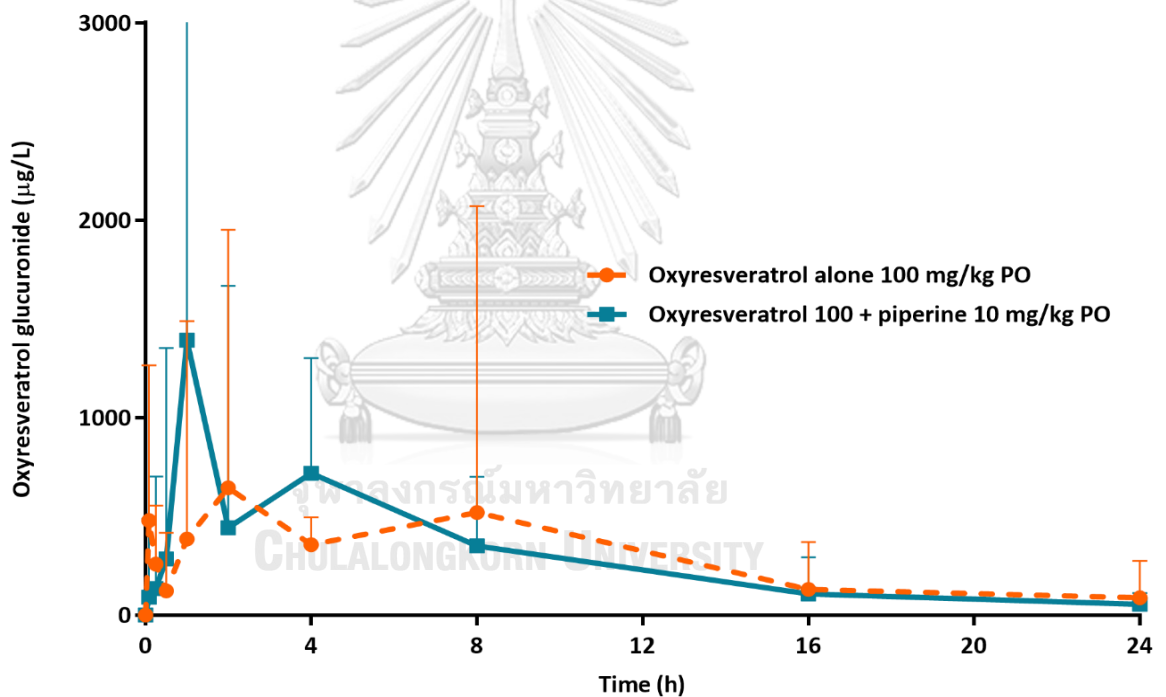
รูปภาพที่ 17 แสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับ Oxyresveratrol glucuronide เฉลี่ย ในพลาสมากับเวลาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริภารยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ แสดงผลในรูปแบบกราฟเชิงเส้น (ก); แสดงผลในรูปแบบกราฟเซมิล็อก (ข)

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05

ก.



ข.



รูปภาพที่ 18 แสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับ Oxyresveratrol glucuronide เฉลี่ย ในพลาสมากับเวลาจากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหารยาจากการกินแสดงผลในรูปแบบกราฟเชิงเส้น (ก); แสดงผลในรูปแบบกราฟเขมิล็อก (ข)

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value < 0.05

การศึกษากระบวนการขับถ่ายยา (Excretion study)

การขับถ่ายยาออกทางปัสสาวะและอุจจาระแสดงออกเป็นร้อยละการขับถ่าย (%Recovery) ของสาร Oxyresveratrol ในรูปแบบ Unchange form และในรูปแบบ Glucuronide conjugates ตามตารางแสดงที่ 9 โดยพบร้อยละการขับถ่ายทางปัสสาวะในรูปแบบ Unchange form จากกลุ่มที่ได้รับการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ มีค่าประมาณ 5-10% ที่เวลา 0-24 ชั่วโมงและมีค่าประมาณ 1-3% ที่เวลา 24-48 ชั่วโมงและพบร้อยละการขับถ่ายทางอุจจาระในรูปแบบ Unchange form มีค่าน้อยกว่า 1% ที่เวลา 0-48 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับการบริหารยาทางปากพบร้อยละการขับถ่ายทางปัสสาวะในรูปแบบ Unchange form มีค่า $3.70 \pm 3.41\%$ ในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและมีค่าน้อยกว่า 1% ในกลุ่มที่ได้รับการเติมสาร Piperine ที่เวลา 0-24 ชั่วโมง โดยที่เวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่ามีค่าน้อยกว่า 1% ในทุกกลุ่มเช่นเดียวกับร้อยละการขับถ่ายทางอุจจาระมีค่าน้อยกว่า 1% ในทุกกลุ่มการทดลองที่เวลา 0-48 ชั่วโมง ร้อยละการขับถ่ายทางปัสสาวะในรูปแบบ Glucuronide conjugates พบว่ากลุ่มที่ได้รับการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ มีค่าประมาณ 10-30% และกลุ่มที่ได้รับการป้อนยามีค่าประมาณ 7-9% ที่เวลา 0-24 โดยที่เวลา 0-48 ชั่วโมงพบว่ากลุ่มที่ได้รับการเติมสาร Piperine เดี่ยวมีค่าร้อยละการขับถ่ายที่ $0.09 \pm 0.05\%$ ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว โดยการขับถ่ายทางอุจจาระในรูปแบบ Glucuronide conjugates มีค่าน้อยกว่า 1% ที่เวลา 0-48 ชั่วโมงในทุกกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 10 แสดงร้อยละการขับถ่ายของสาร Oxyresveratrol เดี่ยวและสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine

Recovery (%)	Intravenous		Oral	
	Oxyresveratrol (10 mg/kg)	Oxyresveratrol + piperine (10 + 1 mg/kg)	Oxyresveratrol (100 mg/kg)	Oxyresveratrol + piperine (100 + 10 mg/kg)
Unchanged Oxyresveratrol				
Urine _{0-24h}	8.51 ± 7.07	5.06 ± 3.22	3.70 ± 3.41	0.88 ± 0.46
Urine _{24-48h}	2.87 ± 1.34	1.78 ± 1.33	0.32 ± 0.08	0.27 ± 0.18
Feces _{0-24h}	0.23 ± 0.20	0.17 ± 0.53	0.21 ± 0.17	0.24 ± 0.43
Feces _{24-48h}	0.17 ± 0.16	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.06	0.10 ± 0.03
Oxyresveratrol glucuronide				
Urine _{0-24h}	29.44 ± 28.07	10.55 ± 9.71	9.89 ± 6.90	7.81 ± 6.68
Urine _{24-48h}	1.39 ± 0.73	0.71 ± 0.57	3.07 ± 2.69	0.09 ± 0.05*
Feces _{0-24h}	0.20 ± 0.16	0.63 ± 0.58	0.19 ± 0.16	0.10 ± 0.08
Feces _{24-48h}	0.30 ± 0.29	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.18	0.14 ± 0.06

Data are presented as mean ± S.D. (n = 6), *p<0.05 for Oxyresveratrol alone vs Oxyresveratrol + Piperine

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาก่อนหน้าได้มีรายงานถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายด้านของสาร Oxyresveratrol และการเกิดพิษในระดับต่ำ แต่ถึงอย่างไรก็ตามสาร Oxyresveratrol ก็มีข้อจำกัดในการที่จะพัฒนาไปเป็น Phytopharmaceutical product เนื่องจากมีค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ต่ำ ซึ่งปัญหานี้มักเป็นปัญหาที่พบได้จากสารที่ได้มาจากธรรมชาติ ซึ่งสาร Oxyresveratrol มีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่ต่ำเนื่องจากอาจเป็นผลมาจากการที่สาร Oxyresveratrol ผ่านจากบริเวณเซลล์เยื่อบุลำไส้เข้ากระแสเลือดได้ในปริมาณที่น้อย ประกอบกับการที่เป็น Substrate ของ P-glycoprotein ที่มีหน้าที่ในการเป็น Efflux transporter ซึ่งวางตัวอยู่บริเวณนั้นจำนวนมาก อีกทั้งถูกทำลายโดยตับและลำไส้ก่อนเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด (First pass metabolism) เป็นอย่างมาก และมีอัตราในการขับออกที่สูง (15, 16, 29) นำมาสู่วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อต้องการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อให้ Piperine เป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ในหนูแรท นอกจากนี้ได้ทำการติดตามความปลอดภัยและความทนต่อสาร Oxyresveratrol จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สัตว์ทดลองทั้งหมดสามารถทนต่อสารทดสอบได้ดี โดยพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพหรือเกิดอาการไม่พึงประสงค์ในสัตว์ทดลอง ทั้งก่อนให้สารทดสอบ และภายหลังให้สารทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง รวมถึงระดับค่า Aspartate aminotransferase (AST) และ Alanine aminotransferase (ALT) ซึ่งเป็นค่าที่สำคัญในการบ่งบอกภาวะการทำงานของตับ พบว่าผลของสารทดสอบทั้งหมดที่ให้ไม่ได้ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่า AST และ ALT เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังให้สารทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมงทั้งในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวหรือในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ทั้งจากการบริหารยาโดยฉีดเข้าหลอดเลือดดำและการบริหารยาทางปาก เช่นเดียวกับระดับของ Creatinine โดยผลของสารทดสอบทั้งหมดที่ให้ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อระดับ Creatinine และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนให้สารทดสอบและหลังให้สารทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าระดับ Creatinine ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลองซึ่งค่า Creatinine เป็นค่าที่สำคัญในการบ่งบอกภาวะการทำงานของไต จากผลการทดลองที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดความเป็นพิษและไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพหรือเกิดอาการไม่พึงประสงค์ แสดงให้เห็นว่าสารทดสอบนั้นมีความปลอดภัยที่ดีในการศึกษาในสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับ

การศึกษาก่อนหน้าที่กล่าวถึงระดับความเป็นพิษที่ต่ำหรือไม่พบอาการไม่พึงประสงค์จากสาร Oxyresveratrol (27, 57, 58)

จากผลการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ซึ่งแสดงผลในรูปแบบกราฟความสัมพันธ์ของระดับสาร Oxyresveratrol ในพลาสมาในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าระดับของสาร Oxyresveratrol ในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine โดยการบริหรยาจากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำมีระดับสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เวลา 16 ชั่วโมง และที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารทดสอบซึ่งเป็นเวลาที่แสดงถึงช่วงการเปลี่ยนแปลงสารและขับออกจากร่างกาย (Elimination phase) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยวที่พบระดับของ Oxyresveratrol ถึงแค่ 16 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารทดสอบ เช่นเดียวกับผลในการบริหรยาทางปาก โดยระดับของสาร Oxyresveratrol จากกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับ Piperine มีระดับสูงกว่าที่เวลา 1 และ 4 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว และเมื่อพิจารณาที่จุดเวลาอื่นๆ กลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับ Piperine มีระดับสาร Oxyresveratrol สูงกว่าตั้งแต่ในช่วงการดูดซึมของสาร (Absorption phase) จนกระทั่งถึงช่วงการเปลี่ยนแปลงสารและขับออกจากร่างกาย (Elimination phase) ทำให้เห็นว่า Piperine สามารถช่วยเพิ่มระดับของสาร Oxyresveratrol ทั้งในรูปแบบการฉีดเข้าหลอดเลือดดำและการบริหรยาทางปาก เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์พบว่าในกลุ่มที่ได้รับสาร Piperine ร่วมด้วยมีค่า C_{max} และ AUC เพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่าซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Oxyresveratrol เดี่ยว ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Johnson และคณะ(54) ที่ทำการศึกษาดังฤทธิ์ของสาร Piperine ในการช่วยเพิ่มระดับของสาร Resveratrol พบว่าในกลุ่มที่ได้รับสาร Piperine ร่วมด้วยสามารถเพิ่มค่า AUC และเพิ่มค่า C_{max} ของสาร Resveratrol ได้ถึง 229% และ 1544% ตามลำดับ ซึ่งสาร Resveratrol เป็นสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร Oxyresveratrol โดยที่สาร Resveratrol มีหมู่ Hydroxyl groups น้อยกว่าสาร Oxyresveratrol 1 ตำแหน่ง (15) ซึ่งสาร Resveratrol เป็นสารที่ถูกทำลายก่อนเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด (First pass metabolism) ผ่าน Phase II metabolism เป็นอย่างมาก เป็นผลให้สาร Resveratrol มีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่ต่ำเช่นเดียวกับสาร Oxyresveratrol (59-62) กลไกของสาร Piperine ในการเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ผ่านการรบกวนการทำงานของ Drugs metabolizing enzymes โดยยับยั้งการทำงานของ UDP-GDH แบบผันกลับได้ (Reversible inhibitor) ทั้งในระดับและลำไส้เล็กโดยเป็นการยับยั้งแบบไม่

แข่งขัน (Non-competitive inhibitor) รวมถึงสามารถลดการเกิด UDP-glucuronic acid (UDPGA) ทั้งนี้อาจจะเป็นผลจากที่ Piperine ไปยับยั้งการทำงานของ UDP-GDH ซึ่งเป็น Enzyme ที่มีความสำคัญในกระบวนการสร้าง UDPGA จึงส่งผลให้ระดับของ UDPGA ลดลง (40) และมีรายงานที่กล่าวถึงการยับยั้งการทำงานของ UDP-glucuronosyl transferase (UGT) ได้ทั้งในระดับและลำไส้เล็ก โดยใช้สาร Piperine (33, 43, 45) ผลต่อ Efflux transporter โดยสาร Piperine สามารถยับยั้งการขับออกของสารโดย P-glycoprotein (51) และในด้านเพิ่มการดูดซึมบริเวณลำไส้ Piperine จะเพิ่มการดูดซึมได้จากการปรับเปลี่ยนบริเวณ Ultrastructure ใน Intestinal brush border โดยสาร Piperine สามารถลดระดับของ Cholesterol ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเหลว (Fluidity) เพิ่มมากขึ้น และทำให้เพิ่มการผ่านของสารเข้าเซลล์โดยในรูปแบบการแพร่ (Passive diffusion) ได้มากขึ้น (63) เมื่อพิจารณาค่า t_{max} พบว่ามีค่าสั้นลงและมีค่า MRT มากขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Oxyresveratrol เดี่ยว ($p < 0.05$) ในกลุ่มที่ได้รับสาร Piperine ร่วมด้วยแสดงให้เห็นแนวโน้มในการที่สาร Oxyresveratrol สามารถเข้าสู่กระแสเลือดและอยู่ในร่างกายได้นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Oxyresveratrol เดี่ยวโดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการบริหารยาทางปาก และเป็นที่น่าสังเกตว่าค่า t_{max} ที่สั้นและค่า C_{max} ที่เพิ่มขึ้นในการศึกษานี้ อาจเป็นผลมาจากรูปแบบยาเตรียมที่เลือกใช้ ซึ่งในการทดลองนี้ได้เตรียมสารในรูปแบบสารละลายใส (Clear solution) เป็นรูปแบบที่มีการดูดซึมดีที่สุดในรูปแบบยาชนิดรับประทาน ทำให้สารทดสอบสามารถดูดซึมได้เร็วกว่าในรูปแบบแขวนตะกอนในการศึกษาอื่นก่อนหน้า (15, 26) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และคณะ (15) ว่าสาร Oxyresveratrol ในรูปแบบสารละลายใสอาจทำให้สามารถดูดซึมได้เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการให้สาร Oxyresveratrol ในรูปแบบสารแขวนตะกอน เนื่องจากในรูปแบบสารละลายไม่ต้องอาศัยขั้นตอนการละลายของสารในทางเดินอาหารและตัวสารไม่จำเป็นต้องถูกปลดปล่อยออกมาจากตำรับ ทำให้ขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนยาออกจากกระเพาะ ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนยาออกจากกระเพาะ จึงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซึมสารในรูปแบบยาชนิดนี้ด้วยเช่นกัน โดยมีรายงานถึงฤทธิ์ของสาร Piperine ที่ช่วยลดเวลาในการผ่านสารออกจากกระเพาะ (64) เป็นผลให้สามารถส่งสาร Oxyresveratrol จากกระเพาะมาลำไส้เล็กเพื่อดูดซึมเร็วขึ้น ทำให้ในกลุ่มที่ได้รับสาร Piperine ร่วมด้วยมีค่า t_{max} ที่สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Oxyresveratrol เดี่ยว และจากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่ได้รับสาร Piperine ร่วมด้วยมีค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 113.52% เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Sangsen และคณะ (26) ที่พัฒนาระบบนำส่งแบบไขมัน SMEDDS ให้กับสาร Oxyresveratrol จากการทดลองพบว่าสามารถ

เพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์สัมพัทธ์เพิ่มขึ้นได้ประมาณ 7.9 เท่า ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในการปรับเปลี่ยนลักษณะโครงสร้างทางกายภาพหรือการพัฒนากระบวนการนำส่งด้วย SMEDDS และการเติมสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ลงไป สามารถช่วยปรับเปลี่ยนค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol ได้ดีขึ้น

จากการทดสอบการกระจายตัวของสาร Oxyresveratrol ไปยังอวัยวะต่างๆ สามารถตรวจพบระดับของสาร Oxyresveratrol ได้ในเกือบทุกอวัยวะที่ทำการทดสอบหลังจากการบริหารยาโดยฉีดเข้าหลอดเลือดดำและการบริหารยาทางปาก ในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดียวโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำพบว่ามีความ V_d ประมาณ 50 L/kg ซึ่งจากค่าปริมาณการกระจายของสารที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเพราะคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของสาร Oxyresveratrol โดยน้ำหนักโมเลกุลของสาร Oxyresveratrol มีค่า 224.07 Da และค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของสารในชั้นน้ำและน้ำมันอยู่ที่ (XLogP) 2.8 แสดงให้เห็นว่าสาร Oxyresveratrol นั้นเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กและมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของสารในชั้นน้ำและน้ำมันสูงจะสามารถกระจายเข้าเซลล์หรืออวัยวะได้ง่ายเพราะละลายในชั้นไขมันได้ดี จากเหตุผลนี้อาจทำให้สารทดสอบสารกระจายตัวไปยังอวัยวะต่างๆได้อย่างรวดเร็วโดยที่ 5 นาทีหลังจากได้รับสารทดสอบสามารถตรวจพบค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมา 10–100 เท่าแต่ในทางกลับกันที่ สมอง พบระดับของสาร Oxyresveratrol ในปริมาณที่ต่ำมากที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ ทั้งนี้ที่ระดับของสาร Oxyresveratrol ต่ำมากอาจเนื่องมาจากกลไกการทำงานของ Blood brain barrier ทำให้เกิดข้อจำกัดในการสะสมของสารทดสอบที่บริเวณเนื้อเยื่อสมอง จากรายงานของ Mei และคณะ (16) พบว่าสาร Oxyresveratrol นั้นเป็น Substrate ของ P-glycoprotein โดยจะพบ P-glycoprotein ที่มีบทบาทในการเป็น Efflux transporter บริเวณด้านบนของเซลล์ Endothelial ใน Blood capillaries ของสมองจำนวนมาก (48, 49) ซึ่งจากตำแหน่งที่ P-glycoprotein ปรากฏในที่นี้ทำให้สามารถบ่งชี้ถึงบทบาทในการจำกัดปริมาณยาหรือปกป้องสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่สมอง แต่ในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine พบว่า สาร Piperine สามารถช่วยให้ค่าความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อสมองต่อความเข้มข้นในพลาสมา คงอยู่ได้ที่ 1 และ 2 ชั่วโมง สอดคล้องการศึกษาก่อนหน้าถึงผลของพริกไทย (Black pepper) หรือสาร Piperine ต่อการทำงานของ P-glycoprotein ผ่านการยับยั้งการขับออกของสารโดย P-glycoprotein ทำให้มีระดับของสารทดสอบในอวัยวะได้มาก (51)

จากการศึกษาก่อนหน้าถึงปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol พบว่าพบว่าสาร Oxyresveratrol ถูกเปลี่ยนสภาพผ่าน Phase II ด้วยกระบวนการ Glucuronidation เป็นหลัก [14, 22] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า Conversion ratio ของสาร Oxyresveratrol ที่ถูกเปลี่ยนสภาพให้อยู่ในรูป Oxyresveratrol glucuronide ซึ่งเป็นสาร Metabolites ในสัดส่วนที่มากอยู่ที่ 30.28 ในกลุ่มที่ได้รับ Oxyresveratrol เดี่ยวโดยการบริหารยา จากการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ เมื่อได้รับร่วมกับสาร Piperine มีค่า Conversion ratio ค่าลดลงแต่ไม่แตกต่างในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 1.88 สำหรับกลุ่มที่ได้รับการบริหารยาทางปากพบว่า กลุ่มที่เติมสาร Piperine มีค่า Conversion ratio อยู่ที่ 0.72 มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol เดี่ยว ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่า Conversion ratio อยู่ที่ 1.84 จากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ถึงบทบาทของสาร Piperine ในการลดการเกิดปฏิกิริยา Glucuronidation ของสาร Oxyresveratrol ในสัตว์ทดลอง มีรายงานของ Atal และคณะ (33) ที่กล่าวถึงฤทธิ์ของสาร Piperine ต่อการเกิดปฏิกิริยา Glucuronidation พบว่าหลังจากให้ Piperine ในขนาด 10 และ 25 mg/kg โดยการบริหารยาทางปากในหนูแรทสามารถลดการทำงานของ UGT ได้ 36 และ 55% ตามลำดับ ในกระบวนการขับถ่ายสาร Oxyresveratrol ผ่านทางปัสสาวะเป็นหลักโดยอ้างอิงจากร้อยละการขับถ่าย (%Recovery) ที่สูงทั้งในรูป Unchanged oxyresveratrol และ Oxyresveratrol glucuronide ภายใน 0-48 หลังจากได้รับสารทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Huang และคณะ (30) ที่ศึกษาปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร Oxyresveratrol ในหนูแรทพบว่าสาร Oxyresveratrol ถูกขับออกในรูป Oxyresveratrol glucuronide ภายใน 0-12 ชั่วโมงผ่านทางปัสสาวะและน้ำดีเป็นหลัก ซึ่งสอดคล้องกับในการศึกษานี้สาร Oxyresveratrol ถูกขับออกในรูป Oxyresveratrol glucuronide ผ่านทางปัสสาวะมากกว่าในรูป Unchanged oxyresveratrol

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานถึงค่าเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยใช้ Piperine เป็นสารเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ในหนูแรทโดยพบว่าสาร Piperine สามารถปรับเปลี่ยนค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร Oxyresveratrol ได้ทั้งในรูปแบบการฉีดเข้าหลอดเลือดดำและการบริหารยาทางปาก โดยในกลุ่มที่ได้รับสาร Oxyresveratrol ร่วมกับสาร Piperine ด้วยการบริหารยาทางปากพบว่าสาร Piperine สามารถเพิ่มค่า C_{max} และ AUC อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติรวมถึงเพิ่มค่า MRT และช่วยเพิ่มระดับความเข้มข้นของสาร Oxyresveratrol ในเนื้อเยื่อต่อความเข้มข้นในพลาสมาบริเวณเนื้อเยื่อสมองในกลุ่มที่ได้รับการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ จากผลการทดลองสาร Piperine สามารถลดการเกิดปฏิกิริยา Glucuronidation ของสาร Oxyresveratrol และพบว่าสาร Oxyresveratrol ถูกขับออกในรูป Oxyresveratrol glucuronide ผ่านทางปัสสาวะเป็นหลักและมีค่าการขับออกลดลงเมื่อได้รับสารทดสอบร่วมกับสาร Piperine การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์นี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสาร Oxyresveratrol เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป



บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. World Population Prospects The 2015 Revision [Online] [Internet]. 2015 [cited 2017 Jul 19].
2. สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. การคาดประมาณประชากรของประเทศไทย พ.ศ. 2553-2583. <http://social.nesdb.go.th/social/Portals/0/Documents/การคาดประมาณ%20e-book.pdf>2013.
3. สำนักงานอาหารและยา. มูลค่าการผลิตและการนำส่งยาเข้ามาในราชอาณาจักร สำหรับยาแผนปัจจุบันและยาแผนโบราณ ประจำปี 2530-2555 [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.fda.moph.go.th/sites/drug/download/2-4.pdf>2012 [เข้าถึงเมื่อ 19 ก.ค. 2560].
4. สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. จำนวนและอัตราการเจ็บป่วยด้วยโรคสำคัญ (ไม่ติดต่อกัน) ปี พ.ศ. 2537-2558 รายปี [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://social.nesdb.go.th/SocialStat/StatReport_Final.aspx?reportid=226&template=2R1C&yeartype=M&subcatid=17 2016 [เข้าถึงเมื่อ 19 ก.ค. 2560].
5. Tadtong S, Chatsumpun N, Sritularak B, Jongbunprasert V, Ploypradith P, Likhitwitayawuid K. Effects of oxyresveratrol and its derivatives on cultured P19-derived neurons. Trop J Pharm Res. 2016;15(2):2619-28.
6. ลิขิตวิทายาวูดี ก, ศรีตุลารักษ์ บ, ทัดทอง ส. รายงานฉบับสมบูรณ์ เรื่องการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของออกซิเรสเวอราทรอล ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2557 2558. CHULALONGKORN UNIVERSITY
7. Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RC. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. Free radical biology & medicine. 2008;45(7):1019-26.
8. Ban JY, Jeon SY, Nguyen TT, Bae K, Song KS, Seong YH. Neuroprotective effect of oxyresveratrol from smilacis chinae rhizome on amyloid Beta protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. Biological & pharmaceutical bulletin. 2006;29(12):2419-24.
9. Likhitwitayawuid K, Sritularak B, De-Eknamkul W. Tyrosinase inhibitors from Artocarpus gomezianus. Planta medica. 2000;66(3):275-7.

10. Likhitwitayawuid K, Sornsute A, Sritularak B, Ploypradith P. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2006;16(21):5650-3.
11. Tengamnuay P, Pengrungruangwong K, Pheansri I, Likhitwitayawuid K. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in vitro anti-tyrosinase and in vivo skin whitening activities. *International journal of cosmetic science*. 2006;28(4):269-76.
12. Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Benchanak K, Lipipun V, Mathew J, Schinazi RF. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Natural product research*. 2005;19(2):177-82.
13. Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, et al. Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral research*. 2011;91(2):154-60.
14. Sasivimolphan P, Lipipun V, Ritthidej G, Chitphet K, Yoshida Y, Daikoku T, et al. Microemulsion-based oxyresveratrol for topical treatment of herpes simplex virus (HSV) infection: physicochemical properties and efficacy in cutaneous HSV-1 infection in mice. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(4):1266-75.
15. Chen W, Yeo SCM, Elhennawy MGAA, Lin H-S. Oxyresveratrol: A bioavailable dietary polyphenol. *Journal of Functional Foods*. 2016;22:122-31.
16. Mei M, Ruan JQ, Wu WJ, Zhou RN, Lei JP, Zhao HY, et al. In vitro pharmacokinetic characterization of mulberroside A, the main polyhydroxylated stilbene in mulberry (*Morus alba* L.), and its bacterial metabolite oxyresveratrol in traditional oral use. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(9):2299-308.
17. ฐานข้อมูลสมุนไพร มะหาด [ออนไลน์] [Internet]. 2010 [เข้าถึงเมื่อ 19 ก.ค. 2560].
18. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร ปวกหาด [ออนไลน์] [Internet]. 2010 [เข้าถึงเมื่อ 19 ก.ค. 2560].
19. Palanuvej C, Issaravanich S, Tunsaringkarn T, Rungsiyothin A, Vipunngeun N, Ruangrunsi N, et al. Pharmacognotic study of *Artocarpus Lakoocha* heartwood. *J Health Res*. 2007;21(4):257-62.

20. Mongolsuk S, Robertson A, Towers R. 429. 2 : 4 : 3? : 5?-Tetrahydroxystilbene from *Artocarpus lakoocha* 1957.
21. Sambhandharaksa C, Thantivatana P, Ratanachai T. Pharmacognostical and phytochemical studies of *Artocarpus lakoocha* Roxb. *J Natl Res Coun* 1962;3(4):245-61.
22. PubChem Compound Database; CID=5281717[Online] [Internet]. 2004 [cited 2017 Jul 24].
23. Aftab N, Likhitwitayawuid K, Vieira A. Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. *Natural product research*. 2010;24(18):1726-33.
24. Chatsumpun M, Chuanasa T, Sritularak B, Likhitwitayawuid K. Oxyresveratrol Protects Against DNA Damage Induced by Photosensitized Riboflavin 2011. 41-4 p.
25. Suwannalert P, Povichit N, Puchadapirom P, Junking M. Anti-Aging Activity and Non-Toxic Dose of Phytooxyresveratrol from *Artocarpus lakoocha* Roxb 2012.
26. Sangsen Y, Wiwattanawongsa K, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Wiwattanapatapee R. Modification of oral absorption of oxyresveratrol using lipid based nanoparticles. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2015;131:182-90.
27. Breuer C, Wolf G, Andrabi SA, Lorenz P, Horn TF. Blood-brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. *Neuroscience letters*. 2006;393(2-3):113-8.
28. Bertram R, Davies N, editors. elucidating pharmacodynamic and disposition of oxyresveratrol. the 2009 Summer Undergraduate Research Poster Symposium; 2009; Washington State University, Washington State, USA
29. Hu N, Mei M, Ruan J, Wu W, Wang Y, Yan R. Regioselective glucuronidation of oxyresveratrol, a natural hydroxystilbene, by human liver and intestinal microsomes and recombinant UGTs. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2014;29(3):229-36.

30. Huang H, Chen G, Lu Z, Zhang J, Guo DA. Identification of seven metabolites of oxyresveratrol in rat urine and bile using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomedical chromatography : BMC*. 2010;24(4):426-32.
31. Tian F, Wei H, Jia T, Tian H. An improved highly sensitive method to determine low oxyresveratrol concentrations in rat plasma and its pharmacokinetic application. *Biomedical chromatography : BMC*. 2014;28(5):667-72.
32. Bose KG. *Pharmacopoeia India*. Bose Laboratories, Calcutta, India 1929.
33. Atal CK, Dubey RK, Singh J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1985;232(1):258-62.
34. Badmaev V, Majeed M, Norkus EP. Piperine, an alkaloid derived from black pepper increases serum response of beta-carotene during 14-days of oral beta-carotene supplementation. *Nutrition Research*. 1999;19(3):381-8.
35. Kumar S, Singhal V, Roshan R, Sharma A, Rembhotkar GW, Ghosh B. Piperine inhibits TNF-alpha induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF-kappaB and IkappaB kinase activation. *European journal of pharmacology*. 2007;575(1-3):177-86.
36. Mujumdar AM, Dhuley JN, Deshmukh VK, Raman PH, Naik SR. Anti-inflammatory activity of piperine. *Japanese journal of medical science & biology*. 1990;43(3):95-100.
37. Lee SA, Hong SS, Han XH, Hwang JS, Oh GJ, Lee KS, et al. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2005;53(7):832-5.
38. Navickiene HM, Alecio AC, Kato MJ, Bolzani VD, Young MC, Cavalheiro AJ, et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 2000;55(6):621-6.
39. PubChem Compound Database; CID=638024 [Online] [Internet]. 2004 [cited 2017 Jul 24].

40. Reen RK, Jamwal DS, Taneja SC, Koul JL, Dubey RK, Wiebel FJ, et al. Impairment of UDP-glucose dehydrogenase and glucuronidation activities in liver and small intestine of rat and guinea pig in vitro by piperine. *Biochemical pharmacology*. 1993;46(2):229-38.
41. Singh J, Dubey RK, Atal CK. Piperine-mediated inhibition of glucuronidation activity in isolated epithelial cells of the guinea-pig small intestine: evidence that piperine lowers the endogenous UDP-glucuronic acid content. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1986;236(2):488-93.
42. Dubey RK, Singh J. Localization and characterization of drug-metabolizing enzymes along the villus-crypt surface of the rat small intestine--I. Monooxygenases. *Biochemical pharmacology*. 1988;37(2):169-76.
43. Suresh D, Srinivasan K. Influence of curcumin, capsaicin, and piperine on the rat liver drug-metabolizing enzyme system in vivo and in vitro. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2006;84(12):1259-65.
44. Dudhatra GB, Mody SK, Awale MM, Patel HB, Modi CM, Kumar A, et al. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:637953.
45. Kesarwani K, Gupta R, Mukerjee A. Bioavailability enhancers of herbal origin: an overview. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013;3(4):253-66.
46. Han HK. The effects of black pepper on the intestinal absorption and hepatic metabolism of drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2011;7(6):721-9.
47. Prakash UN, Srinivasan K. Beneficial influence of dietary spices on the ultrastructure and fluidity of the intestinal brush border in rats. *The British journal of nutrition*. 2010;104(1):31-9.
48. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(21):7735-8.
49. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in

- human normal and tumor tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 1990;38(9):1277-87.
50. Bhardwaj RK, Glaeser H, Becquemont L, Klotz U, Gupta SK, Fromm MF. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2002;302(2):645-50.
 51. Sharma P, Varma MV, Chawla HP, Panchagnula R. In situ and in vivo efficacy of peroral absorption enhancers in rats and correlation to in vitro mechanistic studies. *Farmaco (Societa chimica italiana : 1989).* 2005;60(11-12):874-83.
 52. Pattanaik S, Hota D, Prabhakar S, Kharbanda P, Pandhi P. Effect of piperine on the steady-state pharmacokinetics of phenytoin in patients with epilepsy. *Phytotherapy research : PTR.* 2006;20(8):683-6.
 53. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta medica.* 1998;64(4):353-6.
 54. Johnson JJ, Nihal M, Siddiqui IA, Scarlett CO, Bailey HH, Mukhtar H, et al. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Molecular nutrition & food research.* 2011;55(8):1169-76.
 55. Guidance for Industry BMV, U.S. Department of Health, and Human Services FaDA, Center for Drug Evaluation, and Research (CDER) CfVMC, May 2018. Document, <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf> aa.
 56. Basu DS, B. Patel V, Jana S, Patel H. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS) for simultaneous determination of piperine, cinnamic acid and gallic acid in rat plasma using a polarity switch technique 2013. 967-76 p.
 57. Abdulla M, Mohd Ali H, Ahmed K, Noor S, Ismail S. Evaluation of the anti-ulcer activities of *Morus alba* extracts in experimentally-induced gastric ulcer in rats 2009.

58. Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TF. Oxysresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain research*. 2004;1017(1-2):98-107.
59. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(6):493-506.
60. Das S, Lin HS, Ho PC, Ng KY. The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharmaceutical research*. 2008;25(11):2593-600.
61. Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;302(1):369-73.
62. Ndiaye M, Kumar R, Ahmad N. Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1215:144-9.
63. Sawyer W. Fluorescence spectroscopy in the study of membrane fluidity. In: *Advances in membrane fluidity*. New York: Alan Liss. 1988:161-91.
64. Bajad S, Bedi KL, Singla AK, Johri RK. Piperine inhibits gastric emptying and gastrointestinal transit in rats and mice. *Planta medica*. 2001;67(2):176-9.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธีรรินทร์ จันทร์แสง
วัน เดือน ปี เกิด	28 พฤษภาคม 2537
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลรามาริบัติ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนพญาไท ระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนราชวินิตมัธยม และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีการแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิตจากสำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ที่อยู่ปัจจุบัน	2508/312 ถนนดินแดง แขวงดินแดง เขตดินแดง กรุงเทพมหานคร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY