

ผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin การทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2
และการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในหนูแรท



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF POMELO ON THE PHARMACOKINETICS OF SIMVASTATIN, CYP3a2 ACTIVITY
AND *Mdr1a*, *Mdr1b* AND *Slc21a5* mRNA EXPRESSIONS IN RATS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin
การทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 และการ
แสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ
Slc21a5 ในหนูแรท

โดย

นายกฤษกรณ์ ระย้าศิลป์

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์สุพีชา วิทยเลิศปัญญา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนุญ หนูจักร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ร้อยโทหญิง ดร. เนาวรัตน์ สุธัมมาถพงษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุพีชา วิทยเลิศปัญญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. นุศรา ปิยะพลรุ่งโรจน์)

ฤกษ์กรณ์ รัชยาธิลป์ : ผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin การทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 และการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในหนูแรท (EFFECT OF POMELO ON THE PHARMACOKINETICS OF SIMVASTATIN, CYP3a2 ACTIVITY AND *Mdr1a*, *Mdr1b* AND *Slc21a5* mRNA EXPRESSIONS IN RATS) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.สุพิชา วิทยเลิศปัญญา, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์, 111 หน้า.

ส้มโอ (*Citrus grandis* L. Osbeck) เป็นผลไม้ประเภท citrus ด้วยความคล้ายคลึงกันทางพฤกษศาสตร์กับเกรปฟรุต์ (*Citrus paradisi*) ที่มีรายงานว่าก่อให้เกิดการรบกวนเภสัชจลนศาสตร์ของยาหลายชนิดรวมถึงยา simvastatin ที่ใช้รักษาโรคภาวะไขมันในเลือดสูงแต่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายได้โดยเฉพาะต่อกล้ามเนื้อ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 (CYP3a2) และการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในหนูแรทเพศผู้ โดยแบ่งหนูแรทออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้น้ำส้มโอ (2ml/kg) เท่านั้นวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน กลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น (ขนาดยา 20 mg/kg) และกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอ (2ml/kg) วันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin (20mg/kg) โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดในหนูกลุ่มที่ได้ยา simvastatin เป็นเวลาทั้งหมด 12 ชั่วโมงเพื่อวัดระดับ simvastatin และ simvastatin acid ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในเซลล์ตับและลำไส้เล็กของหนูแรทด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) รวมถึงศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ด้วยเทคนิค HPLC ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีค่า $AUC_{0-\infty}$ ของ simvastatin เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า ($p<0.01$) และ simvastatin acid เป็น 3 เท่า ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin อย่างเดียว ค่าความเข้มข้นสูงสุดเฉลี่ยของยา (C_{max}) เพิ่มขึ้น 3.9 เท่า ($p<0.01$) และ simvastatin acid เพิ่ม 3.6 เท่า ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin อย่างเดียว ส่วนค่า K_{el} , $t_{1/2}$ และ T_{max} ไม่แตกต่างกันในทั้งสองกลุ่ม พบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในเซลล์ลำไส้เล็กในกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอเท่านั้นและกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 79.8% ($p<0.01$) และ 84.3% ($p<0.01$) ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1b* ในลำไส้ของหนูทั้งสองกลุ่มลดลง 52.6% ($p<0.05$) และ 56.9% ($p<0.05$) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นมีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในเซลล์ลำไส้เล็กไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ขณะที่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กของหนูทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในเซลล์ตับของหนูแรทกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอเท่านั้นและกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin พบว่ามีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่กลุ่มที่ได้รับยา simvastatin อย่างเดียวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในเซลล์ตับของหนูแรททุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 พบว่าหนูกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอเท่านั้น และกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ลดลงถึง 51.77% ($p<0.01$) และ 49.17% ($p<0.01$) ตามลำดับ แต่ในหนูที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

โดยสรุปน้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับยา simvastatin และ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรท และมีผลลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับและลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในลำไส้เล็กของหนูแรท รวมถึงมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นความเสี่ยงของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างน้ำส้มโอกับยา simvastatin

สาขาวิชา เภสัชวิทยา

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5787102820 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: SIMVASTATIN / POMELO / FOOD DRUG INTERACTION

KRITSAKORN RAYASILP: EFFECT OF POMELO ON THE PHARMACOKINETICS OF SIMVASTATIN, CYP3a2 ACTIVITY AND *Mdr1a*, *Mdr1b* AND *Slc21a5* mRNA EXPRESSIONS IN RATS. ADVISOR: ASSOC. PROF.SUPEECHA WITTAYALERTPANYA, CO-ADVISOR: ASST. PROF. PIYANUCH WONGANAN, Ph.D., 111 pp.

Pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) is a citrus fruit which has been used as food or herbal medicine. It has been noted that pomelo is botanically related to grapefruit (*Citrus paradisi*) which has been demonstrated to interact with many drugs including simvastatin. It is an HMG-CoA reductase inhibitor used extensively for the treatment of dyslipidemia patients. However, simvastatin has been reported to be a risk of musculoskeletal side effects. This study aimed to investigate the effects of pomelo on the pharmacokinetics of simvastatin, CYP3a2 activity and *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* mRNA expressions in rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into four groups: control, simvastatin, pomelo and combine group. In pomelo group, they were orally administered pomelo juice (2 ml/kg, *po*) twice daily for 7 days. In combine group, they were orally received pomelo juice (2ml/kg, *po*) twice daily for 7 days and administered simvastatin (20mg/kg) single dose on day 7 with pomelo juices (2 ml/kg, *po*) and simvastatin group was orally administered simvastatin (20mg/kg) single dose. Plasma samples were collected over 12 hour period to measure level of simvastatin and simvastatin acid using LC-MS/MS. The expressions of hepatic and intestinal *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Slc21a5* mRNA were measured using the real-time RT-PCR. Enzyme CYP3a2 activity was investigated in rat hepatic microsomes using midazolam 1'-hydroxylation as probe reaction measured by HPLC. The results of this study clearly illustrated that area under the curve from time 0 to infinity ($AUC_{0-\infty}$) for simvastatin and simvastatin acid in combine group was significantly increased by 4-fold ($p<0.01$) and 3-fold ($p<0.01$) respectively, compared with simvastatin group. Maximum concentration for simvastatin and simvastatin acid in combine group was higher than simvastatin group by 3.9-fold ($p<0.01$) and 3.6-fold ($p<0.01$) respectively, but no significant differences in K_{el} , $t_{1/2}$ and T_{max} . Real-time RT-PCR analysis showed the levels of *Mdr1a* and *Mdr1b* mRNA in the intestine of pomelo group and combine group were significantly lower than control group but did not alter in simvastatin group. The mRNA levels of *Mdr1a* were decreased by 79.8% ($p<0.01$) and 84.3% ($p<0.01$) of pomelo and combine group, respectively. Similar to the levels of *Mdr1b* mRNA in rat intestine, they were decreased by 52.6% ($p<0.05$) and 56.9% ($p<0.05$) in pomelo and combine group, respectively, whereas intestinal *Slc21a5* mRNA expression remained unchanged. Conversely, pomelo and combine group dramatically down-regulated the expression of hepatic *Slc21a5* mRNA by 61.5% and 58.6% ($p<0.05$) respectively, however the expressions of *Mdr1a* and *Mdr1b* mRNA in the livers did not change. Moreover, rat hepatic CYP3a2 activity of pomelo group and combine group were dramatically decreased by 51.77% ($p<0.01$) and 49.17% ($p<0.01$), respectively, but remained unchanged in simvastatin group when compared with control.

In conclusion, administration of pomelo significantly enhance plasma simvastatin and simvastatin acid levels, down-regulated the expression of intestinal *Mdr1a* and *Mdr1b* and hepatic *Slc21a5* mRNAs in rats and also inhibit CYP3a2 activity. It can suggest that there is a risk of pomelo and drug interaction which is associated with inhibition of drug transporters expressions and CYP3A activity caused by pomelo.

Field of Study: Pharmacology

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก รศ.สุพิชา วิทยเลิศปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม โดยให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนช่วยชี้แนวทางในการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น ไม่ว่าจะ เป็นปัญหาทางด้านการศึกษาหรือปัญหาด้านการทำงานวิจัย รวมถึงให้กำลังใจ และความเมตตาต่อนิสิตผู้จัดทำ วิทยานิพนธ์เสมอจึงขอกราบขอบพระคุณ

ขอกราบขอบพระคุณกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่เมตตาให้ คำปรึกษางานวิจัย ข้อคิดเห็น และได้ชี้แนะแนวคิดอันเป็นประโยชน์แก่งานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำหลักสูตรสหสาขาเภสัชวิทยา ตลอดจนอาจารย์ทุกท่านที่ได้ ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้จัดวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณทุนวิจัย "ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 2/2560" และ "ทุนอุดหนุน โครงการวิจัย เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปี พ.ศ. 2561 (งบประมาณแผ่นดิน)" ซึ่งเป็นแหล่งเงิน ทุนอุดหนุนสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ Clinical Pharmacokinetics Research Unit in Renal and Cardiovascular Disease และบุคลากรในภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุก ท่านที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาต่าง ๆ ตลอดจนแนวทางการแก้ปัญหาในการทำงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณคุณนันทพร พรหมพิลา และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ PK Chula research ทุก ท่านที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาตลอดจนแนวทางในการปฏิบัติงานในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการฝ่ายนิติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และภาควิชา นิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การช่วยเหลือการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชา ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็น กำลังใจในการจัดทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่สนับสนุนการศึกษาการทำงานวิจัย ให้ข้อคิดเห็น และกำลังใจซึ่งเป็นแรงผลักดันให้ผู้เขียนจัดทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	3
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	5
บทที่ 1 บทนำ.....	7
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย.....	7
1.2 วัตถุประสงค์	10
1.3 สมมติฐานการวิจัย	10
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	10
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย.....	11
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	12
2.1 โรคไขมันในเลือดสูง (Dyslipidemia).....	12
2.2 โครงสร้างของยา simvastatin (Simvastatin structure).....	14
2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยา simvastatin (Mechanism of actions).....	15
2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological effects).....	15
2.5 เภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin (Pharmacokinetics of simvastatin).....	16
2.6 ผลที่ไม่พึงประสงค์จากยา (Adverse drug reaction)	20
2.7 การเกิดอันตรกิริยาของยา simvastatin (Drug interaction).....	21
2.8 ส้มโอ (Pomelo).....	23

2.9 เอนไซม์ไซโทโครมพี450 (Cytochrome P450)	27
2.10 ตัวขนส่งยา (Drug transporters).....	29
2.11 การศึกษาผลที่เกี่ยวข้องกับส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา (Related effect of pomelo on pharmacokinetics of drugs)	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
3.1 สัตว์ทดลอง (Animals)	34
3.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)	34
3.3 การเตรียมน้ำส้มโอ (Pomelo juice preparation).....	35
3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood sampling).....	35
3.5 การเก็บตัวอย่างตับและลำไส้เล็กของหนูแรท (Liver and Intestinal tissues).....	35
3.6 รูปแบบการวิจัย (Research design).....	36
3.7 การทดลอง (Experiments).....	36
3.8 การวิเคราะห์ตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics analysis).....	47
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis).....	47
3.10 จริยธรรมการใช้สัตว์เพื่อการทดลอง (Ethical Consideration).....	48
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	49
4.1 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin ในหนูแรทด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ LC-MS/MS.....	49
4.2 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรท	60
4.3 ผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทโดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท	64
บทที่ 5 การอภิปรายและสรุปผลการศึกษา	65
5.1 การอภิปรายผลการศึกษา (Discussion).....	65

5.2 สรุปผลการศึกษา (Conclusion)	71
รายการอ้างอิง	72
ภาคผนวก ก.....	83
ภาคผนวก ข.....	110
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	111



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงเกณฑ์การตัดสินภาวะผิดปกติของระดับไขมันในเลือด.....	13
ตารางที่ 2	แสดงพารามิเตอร์หลังจากอาสาสมัครได้รับ simvastatin acid โดยวิธีฉีด intravenous.....	17
ตารางที่ 3	แสดงความสัมพันธ์ด้วยค่า correlation coefficients ของ <i>MDR1</i> gene ในมนุษย์และ หนูแรท.....	29
ตารางที่ 4	แสดงลำดับของไพรเมอร์จำนวนสี่คู่สำหรับ quantitative real-time RT-PCR	40
ตารางที่ 5	ผลการตรวจความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ simvastatin.....	56
ตารางที่ 6	ผลการตรวจความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ simvastatin acid.....	56
ตารางที่ 7	แสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และ simvastatin acid ในพลาสมาหนูแรทสองกลุ่มภายหลังจากได้รับยา simvastatin และกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ ร่วมกับยา simvastatin.....	59
ตารางที่ 8	เปรียบเทียบระดับ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin.....	95
ตารางที่ 9	เปรียบเทียบระดับ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับ ยา simvastatin เท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin.....	96
ตารางที่ 10	ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-Hydroxymidazolam.....	99
ตารางที่ 11	แสดงผลการทดลองจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 1'-Hydroxymidazolam ใน ไมโครโซมจากตับของหนูแรททั้ง 4 กลุ่ม ด้วยเทคนิค HPLC.....	99
ตารางที่ 12	แสดงการเปลี่ยนหน่วยความเข้มข้นจากหน่วย µg/ml เป็นหน่วย µmol/L.....	102
ตารางที่ 13	แสดงผลการวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP3a2 ที่ได้จากการวัดความเข้มข้นของ 1'-hydroxymidazolam ด้วยเทคนิค HPLC.....	103
ตารางที่ 14	แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> ในลำไส้เล็กของหนู แรทด้วยวิธี real-time RT-PCR.....	104
ตารางที่ 15	แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1b</i> ในลำไส้เล็กของหนู แรทด้วยวิธี real-time RT-PCR.....	105
ตารางที่ 16	แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Slc21a5</i> ในลำไส้เล็กของหนู แรทด้วยวิธี real-time RT-PCR.....	106
ตารางที่ 17	แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> ในตับของหนูแรท ด้วยวิธี real-time RT-PCR.....	107
ตารางที่ 18	แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> ในตับของหนูแรท ด้วยวิธี real-time RT-PCR.....	108

ตารางที่ 19 แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> ในตับของหนูแรท ด้วยวิธี real-time RT-PCR.....	109
--	-----



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	แสดงโครงสร้าง ก) simvastatin และ ข) simvastatin acid (active form).....14
ภาพที่ 2	แสดงกลไกการทำงานของยา simvastatin โดยการยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อ mevalonate pathway ในการสร้างคอเลสเตอรอล.....16
ภาพที่ 3	แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา statin และ statin β -hydroxy acid.....19
ภาพที่ 4	แสดง ก) โครงสร้างหลักของสารประกอบฟิวแรโนคูมาริน ข) bergamottin ค) 6',7'-dihydroxybergamottin.....26
ภาพที่ 5	แสดงแมสสเปคตรัมของ (ก) simvastatin (ข) simvastatin acid และ (ค) lovastatin ในโหมด positive ESI full scan.....51
ภาพที่ 6	แสดงแมสสเปคตรัม Product ion ของ (ก) simvastatin (ข) simvastatin acid และ (ค) lovastatin.....52
ภาพที่ 7	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน simvastatin acid, lovastatin (internal standard) และ simvastatin.....53
ภาพที่ 8	(ก) แสดงโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมาในหนูแรท (ข) แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน simvastatin acid และ simvastatin ในพลาสมาในหนูแรท (เติมlovastatin (internal standard) ก่อนการตรวจวิเคราะห์).....54
ภาพที่ 9	(ก) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ simvastatin กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ ของ simvastatin (area ratio) ของการวิเคราะห์ผล 3 ชุด (ข) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ simvastatin acid กับอัตราส่วนพื้นที่ ใต้กราฟของ simvastatin acid (area ratio) ของการวิเคราะห์ผล 3 ชุด.....55
ภาพที่ 10	แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin.....57
ภาพที่ 11	แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่ม ที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ ร่วมกับยา simvastatin..... 58
ภาพที่ 12	แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ใน ลำไส้เล็กของหนูแรทด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR61
ภาพที่ 13	แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ <i>Mdr1a</i> , <i>Mdr1b</i> และ <i>Slc21a5</i> ในตับ ของหนูแรทด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR63
ภาพที่ 14	แสดงผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3a2 ในหนูแรทเมื่อใช้ midazolam เป็นสับสเตรท วิเคราะห์ระดับ 1'-Hydroxymidazolam ด้วยเทคนิค HPLC.....64

ภาพที่ 15	แสดงระดับความเข้มข้นของ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น.....	91
ภาพที่ 16	แสดงระดับความเข้มข้นของ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ ร่วมกับยา simvastatin.....	91
ภาพที่ 17	แสดงระดับความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น.....	92
ภาพที่ 18	แสดงระดับความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ ร่วมกับยา simvastatin.....	92
ภาพที่ 19	แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln simvastatin และเวลาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น.....	93
ภาพที่ 20	แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln simvastatin และเวลาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ ร่วมกับยา simvastatin	93
ภาพที่ 21	แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln simvastatin acid และเวลาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น.....	94
ภาพที่ 22	แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln simvastatin acid และเวลาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ ร่วมกับยา simvastatin.....	94
ภาพที่ 23	(ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ (ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐานบริสุทธิ์ 1'-Hydroxymidazolam และ Diazepam (internal standard).....	97
ภาพที่ 24	กราฟมาตรฐานของ 1'-Hydroxymidazolam.....	98

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	Percent
1'-OH-MDZ	1'-hydroxymidazolam
AUC	Area under the curve
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CL	Clearance
C _{max}	Maximum concentration
CV	Coefficient of Variation
CYP	Cytochrome P450
DZP	Diazepam
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
g	gram
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA
hr	Hour
Kel	Elimination rate constant
l	Liter
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry
LLOQ	Lower limit of quantification
LV	Lovastatin
MDZ	Midazolam
µg	Microgram
MgCl ₂	Magnesium Chloride
µg/ml	Microgram per milliliter

μl	Microliter
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M_w	Molecular weight
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ng	Nanogram
ng/ml	Nanogram per milliliter
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
PCR	Polymerase chain reaction
P-gp	P-glycoprotein
R^2	Coefficient of determination
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SV	Simvastatin
SVA	Simvastatin acid
T_{max}	Time at maximum concentration
$t_{1/2}$	Half-life
V	Volt

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ยากลุ่มสแตติน (statins, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, HMG-CoA reductase inhibitors) ได้แก่ ซิมวาสแตติน (simvastatin) ปราวาสแตติน (pravastatin) ฟลูวาสแตติน (fluvastatin) อะโทวาสแตติน (atorvastatin) โรสุวาสแตติน (rosuvastatin) และ พิทาวาสแตติน (pitavastatin)¹ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาซิมวาสแตติน (simvastatin, SV) ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นยาอันดับแรก (first-line drug) ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) หรือภาวะคลอเลสเตอรอลในเลือดสูง (hypercholesterolemia) รวมถึงการรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดตีบตันหรือหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis)^{2, 3}

simvastatin เป็น inactive lactone prodrug เมื่อถูกไฮโดรไลสจะถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูป hydroxy acid ชื่อว่า simvastatin acid (SVA) ซึ่งเป็น active form สามารถออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการลดระดับคลอเลสเตอรอลได้³ หลังรับประทาน simvastatin ยาจะถูกดูดซึมและเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยาที่บริเวณลำไส้เล็กและตับภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง และยาจะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะและอุจจาระในที่สุด⁴

simvastatin และ simvastatin acid เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 (CYP3A4) หากรับประทานยาในขนาดสูงหรือรับประทานยาหรือสารอื่นที่มีฤทธิ์ต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของยานี้อาจก่อให้เกิดอันตรกิริยาได้หากยานั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 (CYP3A4 inhibitors) ผลดังกล่าวส่งผลให้ simvastatin และ simvastatin acid ในกระแสเลือดสูงขึ้นซึ่งเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียง เช่น กล้ามเนื้ออักเสบ (myopathy) ในรายที่รุนแรงอาจเกิดภาวะกล้ามเนื้อตาย (rhabdomyolysis) และเสียชีวิตได้⁵

ยาที่เป็นตัวเหนี่ยวนำไซโทโครมพี3เอ4 (CYP3A4 inducers) ก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยา simvastatin และจะส่งผลในทางตรงกันข้ามกับยาที่มีฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 เช่น การรับประทานยาร่วมกันระหว่างยา simvastatin และยาไรแฟมพิซิน (rifampicin)⁶ คาร์บามาซีปีน (carbamazepine) หรือยาเฟนิโทอิน (phenytoin) เป็นต้น⁷ พบว่าค่า AUC และ C_{max} ของยา simvastatin จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเนื่องด้วยยาที่เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ทำให้เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ทำงานมากขึ้นส่งผลให้การรักษาด้วยยา simvastatin ประสิทธิภาพลดลง

คือการลดระดับไขมันหรือคอเลสเตอรอลลดลง⁸ ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อผู้ป่วยเมื่อมีการใช้ยาทั้งตัว เหนียวนาเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 และตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4ร่วมกับยา simvastatin

ปัจจุบันนิยมบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น เช่น การบริโภคผัก ผลไม้ สมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเป็นพิเศษเนื่องจากคุณประโยชน์และอุดมไปด้วยสารอาหาร แต่การรับประทานดังกล่าวนี้นี้อาจก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยา (food or herbal-drug interaction) และก่อให้เกิดผลที่ไม่พึงประสงค์ได้เช่นเดียวกัน เช่นรับประทานสมุนไพรเซนต์จอห์นเวิร์ต (St. John's Wort) สารสกัดจากแปะก๊วย และเกรปฟรุต (grape fruit) เป็นต้น มีรายงานว่าหากรับประทานสมุนไพรเซนต์จอห์นเวิร์ต⁹ หรือสารสกัดจากแปะก๊วย¹⁰ ร่วมกับยา simvastatin จะทำให้ระดับยา simvastatin ในกระแสเลือดลดลง ในขณะที่หากรับประทานเกรปฟรุตร่วมกับยา simvastatin ทำให้ระดับยา simvastatin ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น¹¹ เพราะฉะนั้นการรับประทานอาหารหรือสมุนไพรร่วมกับยา simvastatin อาจทำให้เปลี่ยนแปลงเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin จึงต้องพึงระวัง

อย่างไรก็ตามข้อมูลความปลอดภัยในการรับประทานยาร่วมกับอาหารยังไม่เพียงพอสำหรับผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นและมีความเป็นไปได้มากขึ้นที่ผู้ป่วยจะรับประทานร่วมกับยาแผนปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากทราบคุณสมบัติที่เสริมฤทธิ์กัน เช่น ถ้ารับประทานอาหารบางชนิดร่วมกับยา simvastatin แล้วจะมีคุณสมบัติเสริมกันในการลดไขมันในกระแสเลือด ผู้ป่วยอาจเชื่อและทำตามเพื่อทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้ดียิ่งขึ้น

ส้มโอ (pomelo) เป็นผลไม้ที่พบได้ในแถบเอเชียมีคุณสมบัติเป็นยาที่ใช้กันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันเนื่องด้วยส้มโอเป็นผลไม้ที่มีวิตามินและสารอาหาร เช่น วิตามินซี ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) รวมถึงมีคุณค่าทางยามานำมาใช้รักษาไข้ แก้ปวด เป็นต้น¹² นอกจากนี้มีงานวิจัยพบว่าหากรับประทานส้มโอสามารถลดระดับไขมันในเลือดได้¹³ จึงมีแนวโน้มที่ผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันในเลือดสูงนั้นจะรับประทานส้มโอร่วมกับยา simvastatin เพื่อลดปัญหาดังกล่าว แต่ยังไม่มีความเชื่อถือของการรับประทานยา simvastatin ร่วมกับส้มโอแล้วจะก่อให้เกิดประโยชน์หรือโทษอย่างไร โดยเฉพาะอย่างยิ่งความคล้ายคลึงกันของส้มโอและเกรปฟรุตที่มีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ และฟูราโนคูมาริน (furanocoumarins) เช่นเดียวกัน ซึ่งมีรายงานว่าสารประกอบดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4ได้^{14, 15} ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4¹⁶

นอกจากนี้การขนส่งยาก็มีความสำคัญ ปกติกระบวนการขนส่งยานั้นต้องอาศัย drug transporters โดยยา simvastatin นั้นเป็นสับสเตรทของพีไกลโคโปรตีน (P-glycoprotein, P-gp) ซึ่งเป็น efflux transporter และ organic anion-transporting polypeptide1B1 (OATP1B1) ซึ่งเป็น influx transporter ที่มีบทบาทต่อการการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาได้เนื่องจากการแสดงออก

ของตัวขนส่งยามีผลต่อยา simvastatin หากมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ transporters จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเภสัชจลนศาสตร์ของยาในร่างกายผู้ป่วยได้^{17, 18}

การศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาในหนูแรทซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับมนุษย์โดยใช้ยีนเทียบเคียงเพื่อศึกษาถึงผลกระทบต่อมนุษย์ได้ โดยพบว่ายีน *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* มีความใกล้เคียงมีความใกล้เคียงกับยีน *MDR1* และ *SLCO1B1* ในมนุษย์เป็น 76.5%, 75.3% และ 72% ตามลำดับ^{19, 20} และศึกษาผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ โดยใช้ไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 (CYP3a2) ในหนูแรทมีลักษณะใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ของมนุษย์ประมาณ 73%²¹

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ simvastatin และ simvastatin acid เมื่อให้ร่วมกับส้มโอ และศึกษาว่าการเกิดอันตรกิริยาของส้มโอต่อยา simvastatin นั้นมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ และการแสดงออกของ drug transporters เช่น P-gp และ OATPs หรือไม่ อันเป็นปัจจัยที่สามารถอธิบายถึงกลไกการเกิดอันตรกิริยา โดยใช้หนูแรทเป็นโมเดลในการศึกษาทดลอง

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และ simvastatin acid ในหนูแรท

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในตับของหนูแรทและการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรท

1.3 สมมติฐานการวิจัย

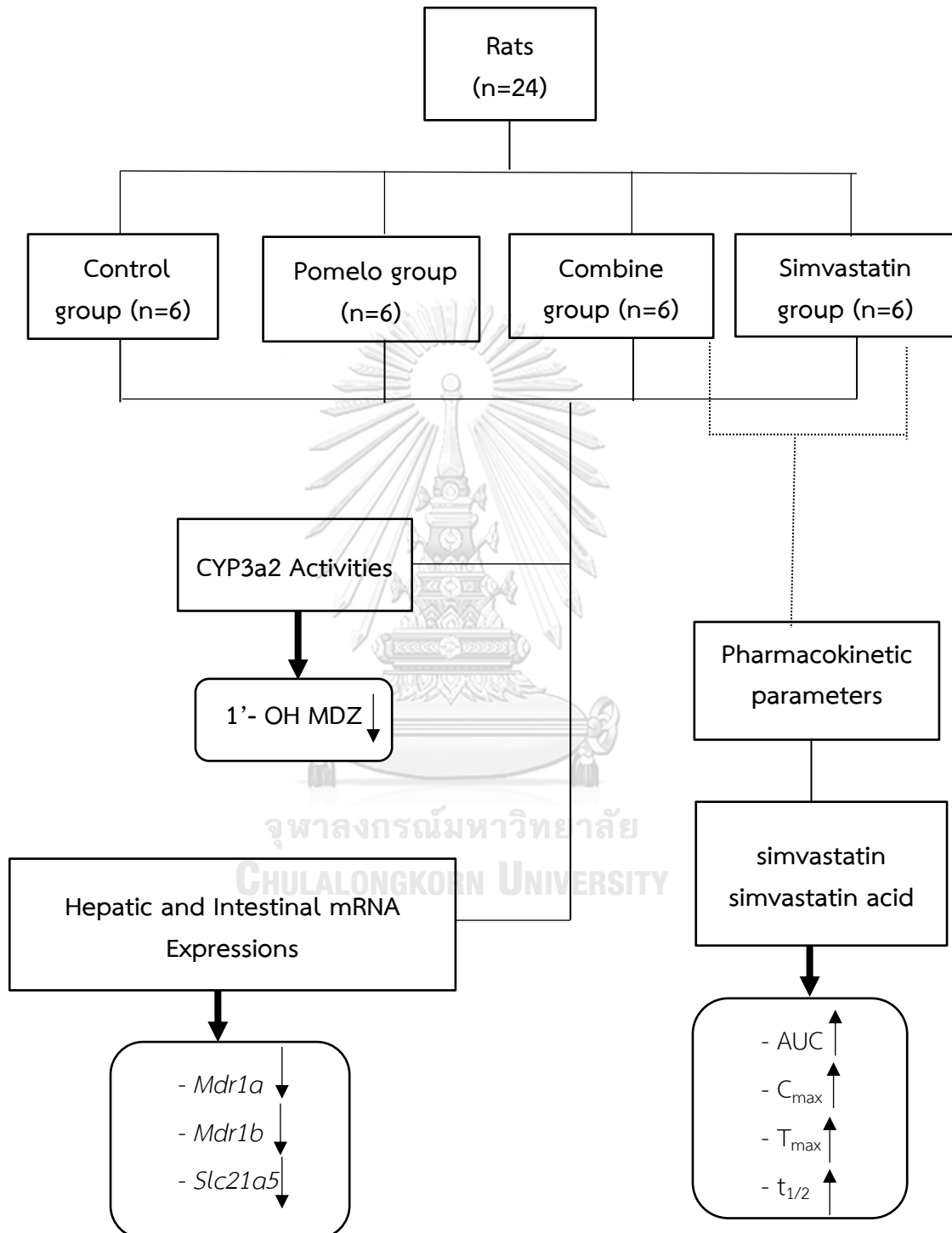
1.3.1 น้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับของ simvastatin และ simvastatin ในเลือดของหนูแรท

1.3.2 น้ำส้มโอมีผลต่อการลดการทำงานของเอนไซม์ CYP3a2 ในตับและลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรท

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 และผลต่อการแสดงออกของ drug transporters ในหนูแรท หากเกิดอันตรกิริยาต่อกันจะเป็นการทำนายผลที่มีโอกาสเกิดได้ในมนุษย์ซึ่งอาจได้รับความเสี่ยงอันจะเป็นข้อมูลที่ประโยชน์ในการใช้ยาดังกล่าวในผู้ป่วยต่อไป

1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 โรคไขมันในเลือดสูง (Dyslipidemia)

ผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันในเลือดผิดปกติหรือไขมันในเลือดสูง (dyslipidemia) มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) จนเป็นเหตุให้หลอดเลือดตีบก่อให้เกิดลิ่มเลือด (thrombosis) เกิดการอุดตันในหลอดเลือดและผู้ป่วยอาจเสียชีวิตในที่สุด²² ความผิดปกติดังกล่าวนี้ จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart disease) หลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease หรือ stroke) และโรคหลอดเลือดแดงส่วนปลาย (peripheral arterial disease) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากขึ้นในปัจจุบันรวมถึงผู้ป่วยอาจมีสาเหตุมาจากปัจจัยหรือพฤติกรรมเสี่ยงอื่น เช่น พฤติกรรมการรับประทานอาหาร การสูบบุหรี่ และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นต้น^{23, 24}

2.1.1 เกณฑ์ที่ใช้ตัดสินระดับไขมันผิดปกติในเลือด

National Cholesterol Education Program (NCEP) ได้ระบุเกณฑ์การตัดสินระดับไขมันผิดปกติในเลือดและความรุนแรงของความผิดปกติ²⁵ ดังแสดงในตารางที่ 1

มีการระบุว่าผู้ที่มีความเสี่ยงน้อยต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจนั้น ควรีระดับไขมันในเลือดดังนี้คือ TC <200 mg/dL, LDL-C <100 mg/dL, HDL-C >40 mg/dL และ TG <150 mg/dL นอกจากนี้ควรมีอัตราส่วน TC/ HDL-C <4.5 และ LDL-C/HDL-C < 3.0

ตารางที่ 1 แสดงเกณฑ์การตัดสินภาวะผิดปกติของระดับไขมันในเลือด

ระดับไขมัน (mg/dL)	ความหมายทางคลินิก
Non HDL-Cholesterol	
<130	เหมาะสม
130-159	ใกล้เคียงค่าเหมาะสม (ยอมรับได้)
160-189	กำกวม
190-219	สูง
≥220	สูงมาก
LDL cholesterol	
<100	เหมาะสม
100-129	ใกล้เคียงค่าเหมาะสม (ยอมรับได้)
130-159	กำกวม
160-189	สูง
≥190	สูงมาก
Total cholesterol (TC)	
<200	เหมาะสม
200-239	กำกวม
≥240	สูง
HDL cholesterol	
<40ชาย	ต่ำ
<50 หญิง	ต่ำ
Triglyceride (TG)	
<150	เหมาะสม
150-199	กำกวม
200-499	สูง
≥500	สูงมาก

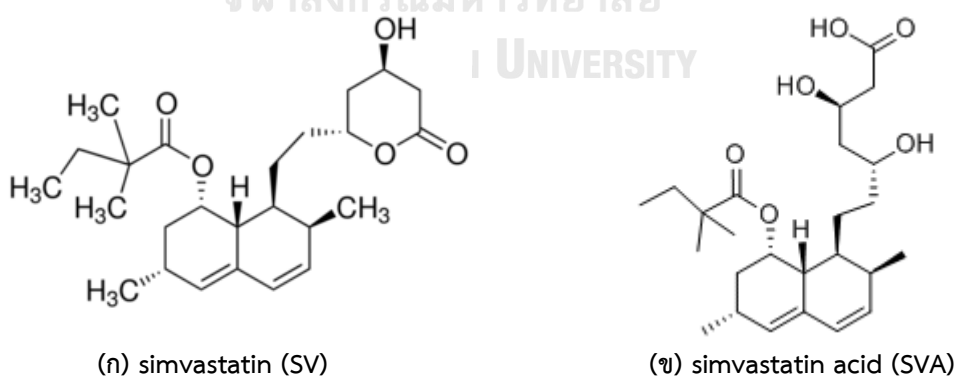
2.1.2 การรักษาด้วยการใช้ยา simvastatin

หากการรักษาด้วยการควบคุมปัจจัยเสี่ยงแล้วระดับไขมันในเลือดยังสูงเกินเป้าหมายที่กำหนดไว้จึงพิจารณาใช้ยาเพื่อช่วยลดระดับไขมัน²⁶ อย่างไรก็ตามหากเลือกยาไม่ถูกต้องอาจเกิดผลเสียรวมถึงสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ปัจจุบันยาที่ใช้ลดไขมันในเลือด (antihyperlipidemic drugs) มีหลายชนิดที่นิยมใช้มากที่สุดคือยากลุ่มสแตติน

ยากลุ่มสแตติน (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, HMG-CoA reductase inhibitors) ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ.1976 ยากลุ่มนี้มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ mevalonate ซึ่งเป็น intermediate pathway ในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล หลังจากทราบคุณสมบัติของยาแล้วจึงถูกนำมาใช้ในทางคลินิกในปี ค.ศ.1980^{2, 27} โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา simvastatin เนื่องจากยามีประสิทธิภาพสูงสุดและผู้ป่วยทนต่อยาได้ดี²⁸

2.2 โครงสร้างของยา simvastatin (Simvastatin structure)

ยา simvastatin มีโครงสร้าง hydrogenated naphthalene มีคาร์บอนจำนวน 7 อะตอม และมีหมู่ methyl ที่ตำแหน่งที่ 7 และหมู่ hydroxyl ตำแหน่งที่ 4 เมื่อถูกไฮโดรไลซิสจะเปลี่ยนแปลงเป็น β -hydroxy simvastatin acid²⁹ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้าง (ก) simvastatin และ (ข) simvastatin acid (active form)²³

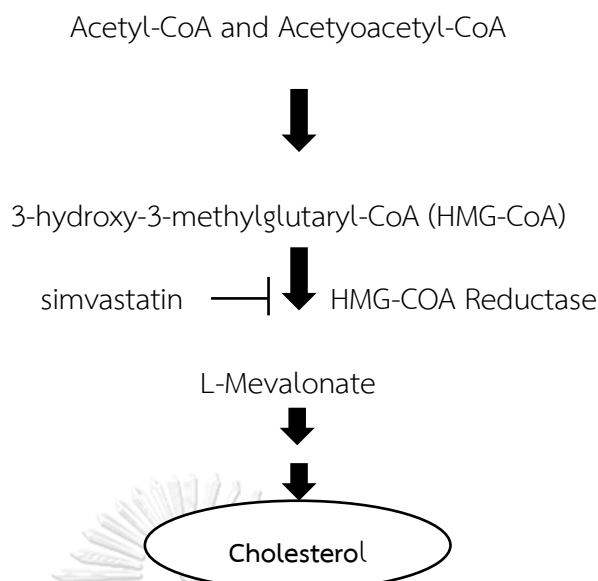
โครงสร้างของยา simvastatin มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ HMG- CoA และมีความจำเพาะกับเอนไซม์ HMG CoA reductase ดังนั้นยาชนิดนี้จึงเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ HMG CoA reductase เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนและจับกันอย่างสมบูรณ์แต่สามารถเกิดปฏิกิริยาผันกลับได้²³

2.3 กลไกการออกฤทธิ์ของยา simvastatin (Mechanism of actions)

ยา simvastatin ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase โดยปกติคอเลสเตอรอลถูกสร้างจาก acetyl-CoA โดยเอนไซม์ HMG-CoA reductase เป็นเอนไซม์ในขั้นกำหนดอัตรา (rate limiting enzyme) ในการสร้างและสังเคราะห์คอเลสเตอรอลที่ตับ หากเอนไซม์นี้ถูกยับยั้ง HMG CoA จะไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็น mevalonate จึงไม่เกิด mevalonate pathway ดังแสดงในภาพที่ 2 ทำให้การสร้างคอเลสเตอรอลลดลงและระดับ LDL-C ในเลือดลดลงตามไปด้วย²³ กระบวนการดังกล่าวนี้มีผลต่อ LDL receptor gene ซึ่งทำให้ยีนมีการแสดงออกมากขึ้น LDL receptors ที่ผนังของเซลล์ตับเพิ่มปริมาณมากขึ้นเพิ่มการจับกับ LDL ทำให้ระดับ LDL-C ในกระแสเลือดถูกเก็บเข้าเซลล์ตับมากขึ้นมีผลให้ระดับ LDL-C ในกระแสเลือดลดลงตามลำดับ²⁹

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological effects)

การศึกษาในสัตว์ทดลองและทางคลินิกพบว่ายา simvastatin มีความแรงเป็น 2 เท่าของยาโลวาสแตติน (lovastatin) ปราวาสแตติน (pravastatin) และมีความแรงเป็น 7 เท่าของฟลูวาสแตติน (fluvastatin) โดย simvastatin เมื่อใช้ขนาด 40 mg ต่อวันสามารถลดระดับ total cholesterol ได้ถึง 30% ลด LDL cholesterol 35-45% และลดระดับ triglycerides 20-40% แต่จะเพิ่ม HDL-C 5-10%²³ ยา simvastatin ยังมีผลทำให้ plaque stability และมีฤทธิ์เป็น anti-inflammation ลดการเกิด collagenolytic activity และลดการเกิด thrombosis (antithrombotic)³⁰



ภาพที่ 2 แสดงกลไกการทำงานของยา simvastatin โดยการยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อ mevalonate pathway ในการสร้างคอเลสเตอรอล³¹

2.5 เกณฑ์จลนศาสตร์ของยา simvastatin (Pharmacokinetics of simvastatin)

2.5.1 การดูดซึมยา (Absorption)

มีรายงานการศึกษาการดูดซึมยา simvastatin ไม่มากนักในมนุษย์แต่มีงานศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง³² simvastatin นั้นจะถูกดูดซึม 60-80% ที่บริเวณลำไส้เล็กของสุนัข hepatic extraction ของ simvastatin ประมาณ 90% และ simvastatin acid (active form) 80% การศึกษาของ Todd และคณะ³³ ได้ศึกษาการดูดซึมของ simvastatin ในอาสาสมัครโดยได้รับยา simvastatin ที่ถูกติดฉลากสารกัมมันตรังสีพบว่ายาส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป inactive form จากการวิจัยของ Lennernäs และคณะ³⁴ ได้ศึกษาพารามิเตอร์อื่นๆในอาสาสมัครได้แก่ $AUC_{0-\infty} = 58.1 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$, $C_{\text{max}} = 58.1 \mu\text{g}/\text{L}$, $T_{\text{max}} = 1.2$ ชั่วโมง การประเมินค่าการดูดซึมของลำไส้เล็ก (intestinal absorption) และ first pass extraction ของยา simvastatin ยังไม่มีการศึกษาในมนุษย์ แต่มีการศึกษาในสุนัขพบว่ามีความ fraction of the administered dose absorbed (f_a) = 60-80% และ ค่า liver extraction ratio (E_H) = 80%³⁵

2.5.2 การกระจายตัวของยา (Distribution)

Germershausen และคณะ³⁶ ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของยา simvastatin และยา lovastatin ในสัตว์ทดลองโดยใช้วิธีติดฉลากสารกัมมันตรังสีพบว่าหลังจากรับประทานยาดังกล่าว ภายใน 24 ชั่วโมงพบว่ายา lovastatin, lovastatin acid (active form), simvastatin และ simvastatin acid จะกระจายตัวในเซลล์ตับมากกว่ายา pravastatin 50% แต่พบในบริเวณไต ม้าม ต่อมหมวกไต อัณฑะ และกระเพาะอาหารน้อยกว่า 3-6 เท่า อาจเป็นเพราะยา simvastatin และยา lovastatin มีความจำเพาะกับเซลล์ตับมากกว่าบริเวณอื่นเมื่อเทียบกับยา pravastatin นอกจากนี้พบว่ายา simvastatin มีค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ต่ำ และ simvastatin acid เข้าสู่กระแสโลหิตน้อยกว่า 5% ของขนาดยาที่ให้ simvastatin และ simvastatin acid จับกับพลาสมาโปรตีน ประมาณ 95%³² นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพารามิเตอร์การกระจายตัวของยาดังแสดงในตารางที่ 2

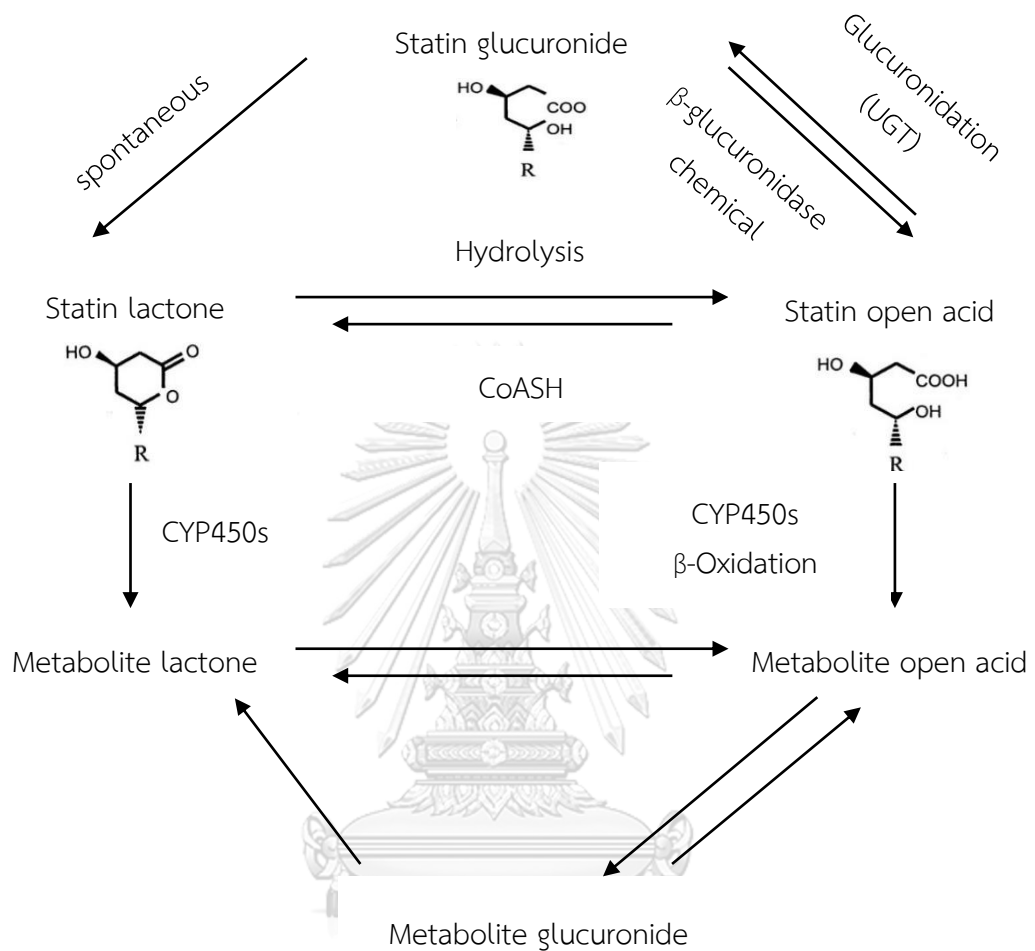
ตารางที่ 2 แสดงพารามิเตอร์หลังจากอาสาสมัครได้รับ simvastatin acid โดยวิธีฉีด intravenous³⁴

พารามิเตอร์	ปริมาณ
f_u (L)	4-5
Plasma : blood ratio	1.7
$CL_{H,b}$ (L/h)	31.8
E_H (%)	35
$t_{1/2}$ (h)	1.9

f_u = ส่วนที่กระจายตัวในพลาสมา (fraction unbound in plasma), $CL_{H,b}$ = ค่า clearance โดยตับ (hepatic blood clearance), E_H = ค่าอัตราการไหลของเลือดผ่านตับ (hepatic extraction ratio), $t_{1/2}$ = ค่าครึ่งชีวิต (elimination half-life)

2.5.3 การเมแทบอลิซึมของยา (Metabolism)

ยา simvastatin จะอยู่ในรูปที่ยังไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (inactive prodrug หรือ inactive lactone prodrug) เมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสของวงแหวนแลคโตน (lactone ring) โดยเอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterase) หรือเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) จะถูกเปลี่ยนแปลงกลายเป็นยาที่มีหมู่ไฮดรอกซีซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้³² เป็นรูป active acid form คือ β -hydroxy acid หรือ simvastatin acid (SVA) เป็น potent competitive inhibitor ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ในขณะเดียวกัน simvastatin acid นั้นสามารถถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น simvastatin ได้โดยผ่าน acyl glucuronide และ CoASH-dependent pathway นอกจากนี้ simvastatin อาจถูกเปลี่ยนเป็นวงแหวนแลคโตนที่มีการออกฤทธิ์ที่คล้ายคลึงกับ coenzyme A แต่กระบวนการนี้ในมนุษย์จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase (UGT) ซึ่งไม่ใช่กระบวนการหลักของการเปลี่ยนแปลงยา simvastatin เพราะวงแหวนแลคโตนของสเตตินนั้นส่วนมากถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ไซโทโครมพี 450 อย่างรวดเร็ว³ เมื่อ simvastatin ผ่านกระบวนการ oxidative metabolism โดยผ่านไซโทโครมพี 450 โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 (CYP3A4) ซึ่งพบเอนไซม์นี้ได้มากที่บริเวณลำไส้เล็กและตับ ในขณะที่ simvastatin acid นั้นจะมีกระบวนการเมแทบอลิซึมผ่าน β -oxidation และ oxidative metabolism ซึ่งผ่านเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4เช่นกัน³⁷ ทั้ง simvastatin และ simvastatin acid หากผ่านกระบวนการ oxidative metabolism ได้ผลิตภัณฑ์กลายเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ (inactive metabolites)³⁸ เช่น เปลี่ยนแปลงไปเป็น 6A-hydroxy 3A,5A-dihydrodiol 6-hydroxy 6-hydroxymethyl และ 6-exomethylene derivatives ทั้งในหนูแรทและในมนุษย์ ดังแสดงในภาพที่3



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 3 แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของ statins และ statin β -hydroxy acid²⁹

2.5.4 การกำจัดยา (Excretion)

มีรายงานการศึกษาในหนูแรทและในสุนัขด้วยวิธีสารทดสอบติดแสง พบว่าเมื่อสัตว์ทดลองได้รับ simvastatin acid ด้วยวิธีฉีดเข้าเส้นเลือดดำยาจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ 12.6% และถูกกำจัดออกทางอุจจาระ 76.5% เมื่อเทียบกับในมนุษย์ที่ได้รับด้วยวิธีการกิน ยาจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ 12.9% และถูกกำจัดออกทางอุจจาระ 57.6%³²

2.6 ผลที่ไม่พึงประสงค์จากยา (Adverse drug reaction)

แม้ว่ายา simvastatin จะมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยได้ดีและนิยมใช้อย่างแพร่หลาย แต่ก็มีผลข้างเคียงและข้อจำกัดในการใช้ เนื่องด้วยเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 เมื่อถูกยับยั้งการทำงานจะทำให้ระดับยา simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้น³⁸ ส่งผลต่อระบบทางเดินอาหาร อาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง (abdominal pain) ท้องอืด (flatulence) คลื่นไส้ (nausea) ท้องผูก (constipation) ท้องเสีย (diarrhea) รวมถึงอาจเกิดความผิดปกติที่กล้ามเนื้อ (myotoxicity)³⁹ ซึ่งเป็นผลข้างเคียงสำคัญที่ถูกรายงานไว้เป็นจำนวนมาก โดย The American College of Cardiology/American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (ACC/AHA/NHLBI) ได้แบ่งผลข้างเคียงต่อกล้ามเนื้อจากการใช้ยาไว้เป็น 4 กลุ่มดังนี้⁴⁰

กลุ่มที่ 1 myopathy คือ ภาวะที่ผู้ป่วยมีความผิดปกติของกล้ามเนื้อจะเกิดกับกล้ามเนื้อมัดใดก็ได้ และอาการที่เกิดขึ้นสัมพันธ์ต่อการใช้ยาในกลุ่มสเตติน

กลุ่มที่ 2 myalgia คือ ภาวะที่ผู้ป่วยมีอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อโดยที่ยังไม่พบการเพิ่มสูงขึ้นของระดับเอนไซม์ครีเอตินไคเนส (creatin kinase ; CK) ในเลือด

กลุ่มที่ 3 myositis คือ ภาวะที่ผู้ป่วยมีอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้ออาจมีอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อร่วมด้วยและตรวจพบค่า CK สูงขึ้นในกระแสเลือด

กลุ่มที่ 4 rhabdomyolysis คือ ภาวะกล้ามเนื้อสลายตัวโดยตรวจพบค่า CK สูงในกระแสเลือดมากกว่า 10 เท่าของค่าปกติ และอาจตรวจพบภาวะไตเสื่อมที่เกิดจากการสลายตัวของกล้ามเนื้อส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตได้⁴¹

ในกรณีที่ใช้ยา simvastatin แบบการรักษาด้วยยาตัวเดียว (monotherapy) มีอุบัติการณ์ของการเกิด myopathy และ myalgia พบได้น้อยกว่าร้อยละ 5 ส่วนอุบัติการณ์ของการเกิด myositis และ rhabdomyolysis นั้นพบได้น้อยมาก⁴² โดยองค์การอาหารและยาในสหรัฐอเมริกา (USFDA) ได้ระบุอัตราการเกิด rhabdomyolysis ที่มีความสัมพันธ์ต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ใช้ยา simvastatin พบได้น้อย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถมองข้ามอันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ต้องใช้ยาชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ยังพบอุบัติการณ์เกิด adverse effects ของ ยา simvastatin เพิ่มสูงขึ้นหากใช้ยาหลายตัวร่วมกัน เช่น รับประทาน simvastatin ร่วมกับยาไซโคลสปอริน (cyclosporine) ยาในกลุ่มไฟเบรต (fibrate) ยาในกลุ่มแมโครไลด์ (macrolide) หรือยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เป็นต้น⁴³⁻⁴⁵

ประเทศไทยมีการรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยในปี ค.ศ.1984-2009 พบว่าอุบัติการณ์การเกิด rhabdomyolysis จากยา simvastatin ถึงร้อยละ 6.36%⁴⁶ นอกจากนี้ยังมีผลข้างเคียงอื่นๆที่เกิดจากยาได้ เช่น ผลกระทบต่อตับและระบบประสาทส่วนกลาง เพราะฉะนั้นการใช้ยา simvastatin จึงต้องอยู่ภายใต้การดูแลและคำสั่งของแพทย์เท่านั้น

2.7 การเกิดอันตรกิริยาของยา simvastatin (Drug interaction)

การเกิดอันตรกิริยาของยา simvastatin เกิดได้จากยาหรืออาหารที่ผู้ป่วยได้รับร่วมกันซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) หรือเภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) ของยา simvastatin ได้ ผลดังกล่าวนี้ อาจทำให้การรักษาด้วยยาชนิดนี้ไม่ได้ผลหรืออาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงจากยา

2.7.1 อันตรกิริยาระหว่างยา (Drug-Drug interaction)

การรับประทานยา simvastatin ร่วมกับยาอื่นจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้ เมื่อยาที่รับประทานร่วมกันมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 มีการแบ่งระดับอันตรายในการใช้ยาอื่นร่วมกับยา simvastatin เป็น 4 ระดับดังนี้⁴⁷

ระดับที่ 1 severe มีหลักฐานชัดเจนในการห้ามใช้ ได้แก่ ยาไซโคลสปอริน (cyclosporine) และยาเจมไฟโบรซิล (gemfibrozil) เป็นต้น

ระดับที่ 2 major โอกาสก่อให้เกิด ADR (adverse drug reaction) ได้มาก หากจำเป็นต้องใช้ควรใช้อย่างระมัดระวังมากขึ้นหรือมีการปรับขนาดยา ได้แก่ ยาแอมโลดิปีน (amlodipine) และยาเวอราปามิล (verapamil) เป็นต้น

ระดับที่ 3 moderate โอกาสที่จะเกิดความรุนแรงจาก ADR น้อยลง ได้แก่ ยาดิจอกซิน (digoxin) ยาเฟนิโทอิน (phenytoin) และยาวาร์ฟาริน (warfarin) เป็นต้น

ระดับที่ 4 mild แทบจะไม่เกิด ADR จากยา ได้แก่ ยาคาร์บามาเซพีน (carbamazepine) และยาโคลพิโดเกรล (clopidogrel) เป็นต้น

ยาที่มีฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 มีผลเพิ่มชีวประสิทธิผลทำให้ระดับยา simvastatin ในร่างกายมากขึ้น โดยเฉพาะตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4ชนิดแรง (potent CYP3A4 inhibitors) เช่น ยาคีโตโคนาโซล (ketoconazole) ยาไอทราโคนาโซล (itraconazole) และยาเจมไฟโบรซิล (gemfibrozil) เป็นต้น ในทางตรงกันข้ามหากรับประทานยาที่มีฤทธิ์เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 เช่น ยาคาร์บามาเซพีน (carbamazepine) ยาไรแฟมพิซิน (rifampicin) ยาโอเมพราโซล (omeprazole) จะทำให้ยา simvastatin ถูกกำจัดมากขึ้น ลด efficacy ของยา จึงควรหลีกเลี่ยงในการใช้ร่วมกัน หากมีความจำเป็นต้องใช้ควรปรับขนาดยาให้เหมาะสม

2.7.2 อันตรกิริยาระหว่างอาหารและยา (Food drug interaction)

มีการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอาหารหรือสมุนไพรกับยา (food or herbal-drug interaction) มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่พบว่าเกรปฟรุ้ตนั้นสามารถก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยาได้หลายชนิด เช่น ยาด้านชัก (anticonvulsant) ยาคาร์บามาเซพีน carbamazepine ยากลุ่มปิดกั้นแคลเซียม (calcium channel blockers) เช่น ยาเวอราปามิล (verapamil) รวมถึงกลุ่มยาลดไขมัน (antihyperlipidemic drugs) เช่น ยา lovastatin และยา simvastatin เป็นต้น โดยพบว่าเกรปฟรุ้ตทำให้ระดับยาที่รับประทานร่วมกันมีในกระแสเลือดมากขึ้น โดยพิจารณาจาก AUC และ C_{max} ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยา ดังนั้นการศึกษอันตรกิริยาระหว่างยาและอาหารนั้นจะเป็นประโยชน์สำคัญต่อผู้ป่วย เพื่อเป็นข้อมูลความปลอดภัยในการใช้ยา⁴⁸

2.8 ส้มโอ (Pomelo)

ส้มโอมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus maxima* หรือ *Citrus grandis* (L.) Osbeck ในปัจจุบันชื่อ *Citrus grandis* มักนำมาใช้เรียกมากกว่า แต่ชื่อทางวิทยาศาสตร์ภายใต้ International Code of Botanical Nomenclature จะใช้ *Citrus maxima* (J. Burman) Merrill⁴⁹ ส้มโอเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในประเทศไทยและเป็นผลไม้ที่มีความนิยมในการบริโภคอย่างกว้างขวางทั้งในและต่างประเทศเนื่องด้วยมีคุณค่าทางโภชนาการสูง พันธุ์ส้มโอที่นิยมบริโภคและส่งออกมากที่สุดคือส้มโอพันธุ์ทองดีหรือขาวทองดี ขนาดผลใหญ่ประมาณ 15 เซนติเมตร เปลือกหนา 1 เซนติเมตร เนื้อผลมีสีแดงและสีชมพูมีรสชาติดีมากคือมีรสหวานมากกว่ารสเปรี้ยวและรสชาติหวานนุ่มจึงนิยมนำมารับประทานมากที่สุดโดยอาจเป็นอาหารว่างหรือนำมาทำเป็นสลัดหรือทำเป็นน้ำผลไม้

12

มีรายงานว่าส้มโอมีคุณสมบัติในการรักษาโรคได้ เช่น พบว่าในประเทศฟิลิปปินส์และในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ใช้สารสกัดจากใบ ดอก และเปลือกจากส้มโอมีคุณสมบัติระงับประสาทใช้รักษาโรคลมชัก ชักกระตุกหรือไอที่มีการชักร่วม (epilepsy) สารสกัดจากใบส้มโอสามารถนำมาใช้รักษาแผลบวมหรืออักเสบได้ เมล็ดนำมาใช้ลดอาการไอ รักษาอาการอาหารไม่ย่อยและอาการปวดช่วงเอวได้ ในประเทศบราซิลใช้ยางจากต้นส้มโอมาใช้รักษาอาการไอได้เช่นกัน¹² เนื้อของส้มโอมีคุณสมบัติเป็นยาลดไข้ (antipyretics) ยาต้านพิษ (antitoxic) และมีฤทธิ์เป็นสารกระตุ้นหัวใจ (cardiac stimulant)⁵⁰ นอกจากนี้เนื้อส้มโอยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งสามารถไปจับกับ reactive oxygen species ยับยั้งการเกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide formation) และ scavenging reactive oxygen รวมถึงยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (free radicals)⁵¹ นอกจากนี้ส้มโอมีฤทธิ์ลดไขมัน (antihyperlipidemic)¹³ โดยนักวิจัยพบว่าส้มโอจะทำให้เกิด delay fat digestion คือทำให้การย่อยและดูดซึมไขมันช้าลงที่บริเวณทางเดินอาหาร ซึ่งส้มโอจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และ pancreatic cholesterol esterases⁵² รวมถึงยับยั้งการเกิด formation ของ cholesterol micellization⁵³ และจะเกิด bile acid binding⁵⁴

ส้มโอมีองค์ประกอบทางพฤกษเคมี (phytochemicals หรือ phytonutrients) ได้แก่ เจอรานิออล (geraniol) ลิโมนีน (limonene) คาดีนีน (cadinene) ซิทราล (citral) และไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น นอกจากนี้มีความใกล้เคียงกันทางพฤกษศาสตร์กับเกรปฟรุต (grapefruit ; *Citrus paradise* MacFad.) เนื่องจากอยู่ในสกุล (genus) เดียวกัน จึงมีองค์ประกอบทางพฤกษเคมี คล้ายคลึงกันคือมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญเช่นเดียวกันกับเกรปฟรุต^{14, 55, 56}

2.8.1 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

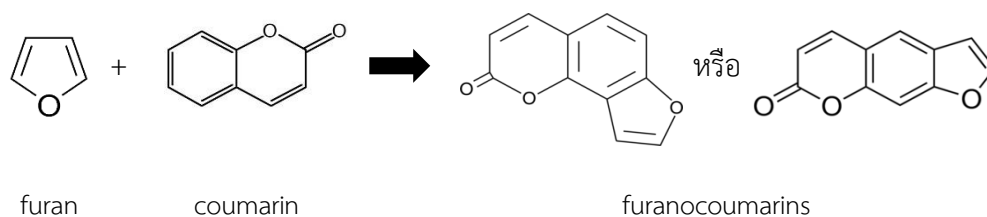
สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทโพลีฟีนอล (polyphenol) ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) ได้แก่ ฟลาวานอล (flavanol) ฟลาวาโนน (flavanone) แคเทชิน (catechin) และแอนโทไซยานิน anthocyanins เป็นต้น สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในได้ในเกรปฟรุตและส้มโอ ได้แก่ นารินจิน (naringin) นารินจีนิน (naringenin) เฮสเพอริดีน (hesperidin) และนีโอเฮสเพอริดีน (neohesperidin) เป็นต้น ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer)¹³ มีรายงานการศึกษาพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์นี้อาจก่อให้เกิดการรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ใน human liver microsome⁵⁷

การศึกษาของ Lim และคณะ⁵⁸ พบว่าสารประกอบนารินจิน (naringin) สามารถยับยั้งการทำงานของ ไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ1และไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 รวมถึงสามารถยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีน ในหนูแรทได้ การศึกษาของ Mandery และคณะ⁵⁹ พบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ในเกรปฟรุต เช่น นารินจิน (naringin) นารินจีนิน (naringenin) สามารถยับยั้งการทำงานของ OATP1B1 และ OATP1B3 ในเซลล์ HEK293

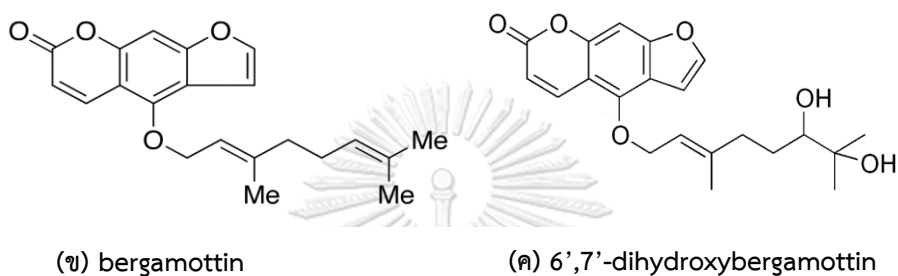
2.8.2 สารประกอบฟิวแรโนคูมาริน (Furanocoumarins)

สารประกอบฟิวแรโนคูมาริน (furanocoumarins) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชในวงศ์ Rutaceae และ Umbelliferae โครงสร้างของ furanocoumarins ประกอบด้วยวงแหวนฟิวแรน (furan ring) ต่ออยู่กับวงคูมาริน (coumarin) มีหลายไอโซเมอร์ได้แก่ psoralen (major) และ angelicin (minor)^{14, 15} ดังภาพที่ 4 (ก) สารประกอบ furanocoumarins ที่พบในส้มโอและเกรปฟรุต ได้แก่ เบอร์กามอททิน (bergamottin, BG) และ 6',7'-dihydroxybergamottin (DHBG) ดังแสดงในภาพที่ 4 (ข) และภาพที่ 4 (ค) สารประกอบชนิดนี้อาจรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อไซโทโครมพี450 (cytochrome P450, CYP)⁶⁰ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 และยับยั้งการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนการตีมน้ำเกรปฟรุตจึงสามารถเพิ่มระดับยาในเลือดซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยได้^{14, 15}

จากการศึกษาของ Egashira และคณะ⁶¹พบว่าส้มโอมีสารประกอบ furanocoumarins เช่นเดียวกับเกรปฟรุต ดังนั้นจึงคาดว่าส้มโออาจจะมีผลไปเพิ่มระดับยาทาโครลิมีส (tacrolimus) โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4หรือยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีน หรือยับยั้งการทำงานทั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4และพีไกลโคโปรตีน นักวิจัยจึงเตือนผู้ป่วยที่ได้รับยาทาโครลิมีสให้หลีกเลี่ยงการรับประทานส้มโอหรือผลไม้ที่มีความใกล้เคียงกับเกรปฟรุต อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานที่แน่ชัด



(ก) โครงสร้างหลักของ furanocoumarins



ภาพที่ 4 แสดง (ก) โครงสร้างหลักของสารประกอบฟิวเรโนคูมาริน
(ข) bergamottin (ค) 6',7'-dihydroxybergamottin⁶²

นอกจากนี้ ค.ศ.2004 Egashira และคณะ⁶³ พบว่าน้ำส้มโอยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4และยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีน โดยยับยั้ง 6-hydroxylation ของสับสเตรท testosterone โดยน้ำส้มโออาจจะมีผลต่อการยับยั้งกระบวนการ transcellular transport ของยาทาโครลิมีสที่ศึกษาในเซลล์ LLC-GA5-COL150

2.9 เอนไซม์ไซโทโครมพี450 (Cytochrome P450)

เอนไซม์ไซโทโครมพี450 (CYP450) ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ 1950⁶⁴ เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาและสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยพบเอนไซม์ดังกล่าวนี้มากที่บริเวณตับและลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังพบได้ที่สมอง ไต ปอด เป็นต้น แต่ในปริมาณที่น้อยกว่า เอนไซม์ไซโทโครมนี้ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงสารให้เป็นเมแทบอลิต์ที่มีขั้วมากขึ้นเพื่อกำจัดออกจากร่างกายได้ง่ายและยังสามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation ทำให้เกิดเมแทบอลิต์เป็นสารใหม่ที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปคือลดฤทธิ์หรือหมดฤทธิ์หรืออาจมีฤทธิ์มากขึ้น⁶⁵

2.9.1 เอนไซม์ไซโทโครมพี450 3เอ cytochrome P4503A (CYP3A)

เอนไซม์ไซโทโครมพี4503เอ (CYP3A) เป็น subfamily ของเอนไซม์ไซโทโครมพี450 ซึ่งมีความสำคัญโดยมีบทบาทต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา พบว่าไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ มีปริมาณมากที่สุด มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยาหลายชนิด ได้แก่ ยาคาร์บามาเซพีน (carbamazepine) ยาไซโคลสปอริน (cyclosporine) ยาอิริโทรมัยซิน (erythromycin) และ ยาทาโครลิมีส (tacrolimus) เป็นต้น⁶⁵ และมีการแสดงออกเป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์ไซโทโครมพีชนิดอื่น นอกจากนี้เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ ยังมีความเกี่ยวข้องต่อกระบวนการเกิด first-pass metabolism ของยา⁶⁶ พบว่าการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน⁶⁷

2.9.2 เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ (CYP3A) ในมนุษย์

ไอโซฟอร์มของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอที่พบในมนุษย์ ได้แก่ CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 โดยพบยาที่ถูกเมแทบอลิต์ผ่านเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอที่มีมากที่สุด⁶⁷ ส่วน CYP3A5 มีเพียงร้อยละ 20 ส่วนไอโซฟอร์มเอนไซม์ CYP3A7 จะพบการแสดงออกในตับของทารกเท่านั้น ในขณะที่ CYP3A43 จะพบที่บริเวณตับได้เช่นกันแต่มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ CYP3A4 ดังนั้นเอนไซม์ CYP3A4 จึงเป็นไอโซฟอร์มที่นิยมศึกษาในกลุ่ม CYP3A มากที่สุด⁶⁷ รวมถึงยา simvastatin ที่เป็นสับสเตรทของ CYP3A4 ด้วยเช่นกัน โดยวิธีที่นิยมศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ ด้วยวิธี midazolam 1'-hydroxylation โดยใช้

midazolam เป็นสับสเตรทและวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยา คือ 1'-hydroxymidazolam (1'-OH-MDZ)⁶⁸ โดยเทคนิค HPLC ใช้ column C-18 และ UV-detector ด้วยความยาวคลื่น 254 nm

เนื่องด้วยยา simvastatin และ simvastatin acid นั้นเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 หากเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ถูกยับยั้งการทำงานจะทำให้ระดับยา simvastatin และ simvastatin acid ในร่างกายมีมากเกินไปซึ่งอาจส่งผลข้างเคียงจากยาได้เนื่องด้วย simvastatin และ simvastatin acid ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมด้วยเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4เช่นเดียวกัน เพราะฉะนั้นการวัดระดับความเข้มข้นของยา simvastatin และ simvastatin acid สามารถประเมินการเกิดอันตรกิริยาระหว่างอาหารหรือยาที่รับประทานร่วมกันกับยา simvastatin ได้⁶⁹

2.9.3 เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ (CYP3A) ในหนูแรท

เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ ในหนูแรทมี 5 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ CYP3A1/3A23, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18 และ CYP3A62 บางไอโซฟอร์มของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอในหนูแรทมีความเชื่อมโยงจำเพาะเจาะจงกับเพศของหนูแรท เช่น CYP3A2 และ CYP3A18 จะเป็นไอโซฟอร์มที่พบเฉพาะในหนูเพศผู้เท่านั้นในขณะที่ CYP3A9 นั้นจะพบเฉพาะในหนูแรทเพศเมีย⁷⁰⁻⁷⁶

การศึกษาของ Wójcikowski และคณะ ปีค.ศ.2012²¹ พบว่าไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 (CYP3A2) ในหนูแรทพบมากที่สุดที่เซลล์ตับในขณะที่ CYP3A1 มีปริมาณที่น้อยกว่า นอกจากนี้ไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ยังมีความคล้ายคลึงกับไอโซฟอร์มไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4ในมนุษย์ถึง 73% จึงนิยมใช้ในการศึกษาการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในหนูแรทเพศผู้ เพราะฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาผลของการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในหนูแรทเพศผู้เช่นเดียวกัน

2.10 ตัวขนส่งยา (Drug transporters)

การขนส่งยาเข้าสู่ร่างกายโดย carrier mediated processes หรือ transporters ในปัจจุบัน มีผู้ให้ความสนใจมากขึ้น เนื่องจากอาจมีบทบาทต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาหรือมีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาได้ เพราะแต่ละกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์จะต้องอาศัย transporters เพื่อแทรกผ่านเข้าออก cell membrane โดยพบ transporters ได้ใน ลำไส้ ตับ ไต เป็นต้น แบ่ง transporters ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มแรกคือตัวขนส่งยาออก (efflux transporter, pump) เช่นพีไกลโคโพรตีน กลุ่มที่สองคือตัวขนส่งยาเข้าเซลล์ (uptake, influx transporter) เช่น organic anion transporting polypeptides (OATPs)⁶⁵

2.10.1 พีไกลโคโพรตีน (P-glycoprotein)

พีไกลโคโพรตีนเป็น transmembrane transporter โดยยีน ABCB1 ควบคุมการสร้างพีไกลโคโพรตีนซึ่งเป็นสมาชิก adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transporter superfamily (ABC transporters) การขับยาหรือสารออกจากร่างกายนั้นจะมีพีไกลโคโพรตีนเป็นตัวสำคัญช่วยในการขับออกจากร่างกาย เช่น ผ่านทาง biliary canalicular membrane ของเซลล์ตับ ออกสู่ลำไส้หรือผ่านทาง brush border membrane ของ proximal tubule ของไตออกสู่ปัสสาวะ หรือออกสู่ท่อลำไส้จึงทำให้มีการดูดซึมยาลดลงหนูแรทมียีนที่ code เป็น P-gp transporters ด้วยกัน 2 ยีน คือ *Mdr1a* และ *Mdr1b*¹⁹

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ด้วยค่า correlation coefficients ของ *MDR1* gene ในมนุษย์และหนูแรท¹⁹

	Human <i>MDR1</i>	Rat <i>Mdr1a</i>	Rat <i>Mdr1b</i>
Rat <i>Mdr1a</i>	0.762	1	
Rat <i>Mdr1b</i>	0.753	0.886	1

ปี ค.ศ.1998 Takanaga และคณะ⁷⁷ ได้ศึกษาผลขององค์ประกอบของน้ำเกรปฟรุตต่อการขนส่ง [³H]vinblastine ซึ่งเป็นสับสเตรทของพีไกลโคโปรตีนในเซลล์ CaCo-2 พบว่าน้ำเกรปฟรุตสามารถยับยั้งกระบวนการขนส่งได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสารสำคัญในเกรปฟรุต เช่น นารินจินและนารินจินินมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีนแตกต่างกันออกไป

ในปี ค.ศ.2002 Tian และคณะ⁷⁸ พบว่าน้ำเกรปฟรุตและน้ำส้มสกัดสามารถยับยั้ง efflux ที่เป็นสับสเตรทของพีไกลโคโปรตีนที่บริเวณลำไส้เล็กของหนูแรทซึ่งอาจก่อให้เกิดการเพิ่ม bioavailability ของยาได้

จากการศึกษาของ Lim และ คณะ ปี ค.ศ. 2008⁷⁹ พบว่าน้ำส้มโอมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีนที่ศึกษาใน L-MDR1 cell ได้เช่นเดียวกับกับน้ำเกรปฟรุต นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำส้มโอมีผลต่อการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนเกิด down regulated P-gp expression ในเซลล์ขณะที่น้ำเกรปฟรุตนั้นไม่เกิดผลดังกล่าว

2.10.2 Organic anion-transporting polypeptides (OATPs)

OATPs เป็น membrane influx transporter ที่ encode ด้วยยีน solute carrier family 21A (SLC21A) ส่วนในหนูแรทคือ Oatp2 ที่ encode ด้วยยีน *Slc21a5* โดยในหนูแรทนั้นจะมีความคล้ายคลึงกับในมนุษย์ถึง 72%²⁰ การศึกษาของ Niemi ในปี ค.ศ.2011⁸⁰ พบว่า OATP1B1 มีความสำคัญต่อการขนส่งยาเข้าเซลล์ (influx transporter) พบการแสดงออกที่ sinusoidal membrane ของ human hepatocyte OATP1B1 จะถูก code ด้วยยีน *SLCO1B1* นอกจากนี้มีการรายงานว่ายาน simvastatin นั้นมี simvastatin acid เป็นสับสเตรทของ OATP1B1¹⁸

การศึกษาของ Bailey และคณะ⁸¹ ได้ศึกษาผลของนารินจินที่มีในน้ำเกรปฟรุ้ตต่อ OATP1A2 ใน OATP1A2 transfected Hela cell พบว่านารินจินสามารถยับยั้งการทำงานของ OATP1A2 ได้ แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ OATP1A2

นอกจากนี้ในปี ค.ศ.2012 Dolton และคณะ⁸² ได้ศึกษาผลของน้ำเกรปฟรุ้ตต่อการทำงานของ OATPs ได้แก่ OATP1B1, OATP1B2 และ OATP2B1 ที่มีการแสดงออกที่เซลล์ตับโดยใช้เซลล์ HepG2 พบว่าองค์ประกอบของน้ำเกรปฟรุ้ตสามารถยับยั้งการทำงานของ OATP1B1, OATP1B2 และ OATP2B1 ได้ แต่นักวิจัยยังไม่ได้ศึกษาผลน้ำเกรปฟรุ้ตต่อการแสดงออกของ OATPs

การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อ OATPs มีไม่มากนักพบเพียงการศึกษาของ Al-Ghazawi และคณะ⁸³ พบว่าน้ำส้มโอมีผลลดระดับยาซิลเดนาฟิลในกระแสเลือดอาจเนื่องมาจากน้ำส้มไ้ยับยั้งการทำงานของ OATP1A2 หรือยับยั้งการแสดงออกของ OATP1A2 ที่ลำไส้เล็กแต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยยังไม่ได้ศึกษากลไกที่แน่ชัด

นอกจากนี้มีรายงานว่าทั้ง simvastatin และ simvastatin acid (active form) นั้นเป็น สับสเตรท ของพีไกลโคโปรตีนซึ่งเป็นตัวขนส่งยาออก (efflux transporter) ที่ลำไส้เล็กและตับ โดย simvastatin acid เป็นสับสเตรทของ OATP1B1 ที่บริเวณเซลล์ตับดังนั้นเมื่อ OATP1B1 ถูกยับยั้ง การทำงาน simvastatin acid จะไม่ถูกขนส่งเข้าเซลล์ตับอาจมีผลทำให้ระดับ simvastatin และ simvastatin acid ในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น และหากพีไกลโคโปรตีนที่บริเวณลำไส้เล็กถูกยับยั้งจะทำให้ simvastatin และ simvastatin acid ดูดซึมเข้าร่างกายได้มากขึ้นและอาจก่อให้เกิดอันตรายจาก ยาที่มีระดับสูง¹⁸

2.11 การศึกษาผลที่เกี่ยวข้องกับส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา (Related effect of pomelo on pharmacokinetics of drugs)

Butterweck และคณะในปี ค.ศ.2009⁸⁴ ได้ศึกษาอันตรกิริยาของน้ำเกรปฟรุ้ตต่อยา simvastatin ในหนูแรทพบว่าหากได้รับน้ำเกรปฟรุ้ตจะมีผลไปเพิ่มระดับความเข้มข้นของทั้ง simvastatin และ simvastatin acid (active form) ในหนูแรท

ปี ค.ศ.2004 Lilja และคณะ¹¹ ได้ศึกษาผลทางคลินิกของการดื่มน้ำเกรปฟรุ้ตต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin พบว่าอาสาสมัครที่ได้รับยา simvastatin ร่วมกับน้ำเกรปฟรุ้ต จะมีระดับ AUC ของยา simvastatin เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม 3.6 เท่า และมีค่า C_{max} เพิ่มขึ้น 3.9 เท่า ขณะที่ระดับ AUC ของ simvastatin acid (active form) มีค่าเพิ่มขึ้น 3.3 เท่า และ C_{max} เพิ่มขึ้น 4.3 เท่า

ปี ค.ศ.2000 Hou และคณะ⁸⁵ ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโคลสปอริน (cyclosporine) ในสุกร พบว่าเมื่อสุกรได้รับสารสกัดจากเปลือกส้มโอ ระดับยาไซโคลสปอรินเพิ่มสูงขึ้น โดยพิจารณาจาก AUC และ C_{max} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสุกรที่ไม่ได้รับสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

การศึกษาทางคลินิกของ Grenier และคณะ⁸⁶ ได้ศึกษาผลของการดื่มน้ำส้มโอหรือน้ำแครนเบอร์รี่ต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโคลสปอรินในอาสาสมัคร พบว่าผู้ที่ดื่มน้ำส้มโอร่วมกับยาไซโคลสปอรินมีค่า AUC และ C_{max} ของยาไซโคลสปอรินเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ผู้ที่ดื่มแครนเบอร์รี่ไม่แสดงผลดังกล่าว

ในปี ค.ศ.2015 Anlamlert และคณะ⁸⁷ ศึกษาผลของเนื้อส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโคลสปอรินในอาสาสมัคร พบว่าผู้ที่ได้รับทั้งส้มโอและยาไซโคลสปอรินจะมีระดับ AUC และ C_{max} ของยาไซโคลสปอริน เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม

จากการศึกษาของ Lin และคณะในปี ค.ศ. 2011⁸⁸ ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาไซโคลสปอรินและยาทาโครลิมีส (tacrolimus) ในหนูแรทเพศผู้ พบว่าหากหนูที่ได้รับสารสกัดจากเปลือกส้มโอร่วมกับยาไซโคลสปอรินจะมีผลเพิ่ม bioavailability ของยาไซโคลสปอรินและยาทาโครลิมีส เป็น 100% และ 234.7% ตามลำดับ

ในทางตรงกันข้ามการศึกษาปี⁸³ ของ Al-Ghazawi และคณะ ศึกษาผลของการดื่มน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาซิลเดนาฟิล (sildenafil) ในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่าผู้ที่ดื่มน้ำส้มโอจะมีค่า C_{max} , AUC น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่นักวิจัยไม่ได้ศึกษากลไกของกระบวนการดังกล่าว

เนื่องด้วยผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันในเลือดสูงเพิ่มจำนวนมากขึ้นในปัจจุบันกรรกับกระแสความนิยมการใช้สมุนไพรหรือบริโภคอาหารเพื่อหวังผลทางสุขภาพก็เป็นที่ยอมรับมากขึ้น การบริโภคอาหารหรือสมุนไพรเหล่านั้นอาจก่อให้เกิดปัญหาที่ตามมาเมื่อรับประทานร่วมกับยาแผนปัจจุบัน (Food or Herbal-Drug interaction)^{89, 90} และมีความเป็นไปได้ที่ผู้ป่วยจะรับประทานส้มโอและยา simvastatin ร่วมกัน ดังนั้นหากทราบถึงอันตรกิริยาของส้มโอและยาก็จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย แต่เนื่องด้วยยังไม่มีการศึกษาผลทางเภสัชจลนศาสตร์ของส้มโอและยา simvastatin มีเพียงรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงผลขัดแย้งกันกับยาตัวอื่นที่ไม่ใช่ยา simvastatin และยังไม่ทราบกลไกของสารในส้มโอที่แน่ชัด รวมถึงผลการแสดงออกของ drug transporters ต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ นอกจากนี้การเกิดอันตรกิริยา (Food-Drug interaction) ระหว่างกันอาจมีความเป็นไปได้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นข้อมูลความปลอดภัยเพิ่มเติมของการใช้ยาและทำให้การรักษาผู้ป่วยนั้นเป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น หากทราบว่ากรรได้รับยา simvastatin และส้มโอร่วมกันนั้นอาจก่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างกันได้ซึ่งเป็นที่มาของงานวิจัยครั้งนี้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง (Animals)

การศึกษานี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 250-330 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลองคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ สัตว์ทดลองจะอยู่ในสภาวะอุณหภูมิ 24 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการทดลองซึ่งได้รับน้ำและอาหารแบบไม่จำกัดปริมาณ ภายใต้การควบคุมความมืดและสว่างอย่างละ 12 ชั่วโมง ก่อนการทดลองหนูแรทจะถูกงดน้ำและอาหารข้ามคืน

3.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

วิธีคำนวณจำนวนสัตว์ทดลองที่จะใช้ในงานวิจัย อ้างอิงจากงานวิจัยของแก้วกั้วาล และคณะ⁹¹ โดยสูตรที่ใช้คือ

$$n = 2S.D.^2 \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{\delta^2}$$

n = ขนาดตัวอย่างที่ต้องการ

S.D. = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปรหลัก (50%)⁹² (Bangphumi K et al. 2015)

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

Z_{β} = ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างที่ความเชื่อมั่น 95% (1.28)

δ = ค่าความแตกต่างที่มีความสำคัญทางสถิติ (100%)

$$n = 2 \cdot 0.5^2 \frac{(1.96 + 1.28)^2}{1.0^2}$$

$$= 5.25$$

สรุปใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว ออกแบบการทดลองเป็น 4 กลุ่ม ดังนั้นการศึกษานี้ต้องใช้หนูแรทจำนวน 24 ตัว

3.3 การเตรียมน้ำส้มโอ (Pomelo juice preparation)

นำเนื้อส้มโอพันธุ์ทองดีมาปั่นด้วยเครื่องปั่น Hurom HU 500 Slow Juicer จากนั้นนำไปกรองแยกเพื่อเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำส้มโอ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการทดลองและใช้ลือตเดียวกันตลอดการทดลองโดยซื้อจากสวนส้มโอจาก อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ซึ่งในช่วงคือช่วงเดือนมีนาคม

3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood sampling)

เก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะที่บริเวณหาง (tail vein) ครั้งละ 0.3 ml เก็บใน eppendorf tube ที่หล่อหัวเข็มด้วย heparin เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดจะทำการการุณยฆาต (sacrificed) จากนั้นนำเลือดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4500 rpm เป็นเวลา 10 นาที 25 องศาเซลเซียส แยกส่วนพลาสมาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์ด้วยยา simvastatin และ simvastatin acid

3.5 การเก็บตัวอย่างตับและลำไส้เล็กของหนูแรท (Liver and Intestinal tissues)

เก็บตัวอย่างตับและลำไส้เล็กส่วนต้นของหนูแรทภายหลังการการุณยฆาตเพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ transporters และการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 โดยเริ่มต้นจากการนำตับและลำไส้ส่วนต้นออกจากร่างกายหนูแรทหลังการการุณยฆาตทันทีและเก็บตัวอย่างไว้ในหลอดทดลองใสในภาชนะที่บรรจุไนโตรเจนเหลวเย็นจัด (liquid nitrogen) เพื่อคงสภาพตัวอย่างไว้ จากนั้นนำตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกระทั่งวันที่ทำการวิเคราะห์

3.6 รูปแบบการวิจัย (Research design)

Experimental research study

3.7 การทดลอง (Experiments)

3.7.1 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin ในหนูแรท

แบ่งหนูแรทออกเป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 control group คือหนูแรทกลุ่มที่ได้รับ 0.5% CMC (Carboxymethyl cellulose) ปริมาณ 2 ml/kg

กลุ่มที่ 2 simvastatin group คือหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin ขนาด 20 mg/kg เท่านั้น

กลุ่มที่ 3 pomelo group คือหนูแรทกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอปริมาณ 2 ml/kg เท่านั้น

กลุ่มที่ 4 combine group คือหนูแรทกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอปริมาณ 2 ml/kg ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg)

โดยหนูกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอจะได้รับครั้งละ 2 ml/kg เป็นเวลา 7 วันติดต่อกันในเวลา 9.00 น. และ 17.00 น. ในขณะที่หนูกลุ่มอื่นที่ไม่ได้น้ำส้มโอจะได้รับน้ำเปล่าครั้งละ 2 ml/kg เป็นเวลา 7 วันติดต่อกัน ในเวลา 9.00 น. และ 17.00 น.

หนูกลุ่มที่ได้รับ simvastatin จะได้รับยา simvastatin ในสารละลาย 0.5% CMC ซึ่งมีขนาดยา 20 mg/kg ครั้งเดียว (single dose) ผ่านทาง oral gavage โดยหนูกลุ่ม combine group จะได้น้ำส้มโอในวันที่ 7 ก่อนได้รับยา simvastatin 30 นาที

ในวันที่ทำการทดลองเจาะวัดระดับยาในพลาสมาหนู แหนูจะถูกเก็บตัวอย่างเลือดโดยมีระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดคือก่อนได้รับยา (predose) 0 ชั่วโมงและหลังได้รับยา (postdose) ที่เวลา 0.50, 1.00, 1.25, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 6.00, 9.00 และ 12.00 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.7.2 การวัดระดับความเข้มข้นของยา simvastatin และ simvastatin acid (active form) ในตัวอย่างเลือดหนูแรท

วัดระดับความเข้มข้นของยา simvastatin และ simvastatin acid ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Ahmed และคณะ⁹³ โดยเริ่มจากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) จากนั้นจึงทำการตรวจวัดระดับ simvastatin และ simvastatin acid ในตัวอย่างดังนี้

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- Acetonitrile (LC-MS grade) [Merck, Germany]
- Ammonium acetate [Merck, Germany]
- Glacial acetic acid [Fisher Scientific, USA]
- Lovastatin [Toronto Research chemicals, Canada]
- Methyl tertiary butyl ether (MTBE) [Merck, Germany]
- Simvastatin [Toronto Research chemicals, Canada]
- Simvastatin hydroxyl acid, ammonium salt [Toronto Research chemicals, Canada]

วัสดุอุปกรณ์

- Autopipettes ขนาด 1-1000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Cylinder ขนาด 10-1,000 มิลลิลิตร
- Evaporator [Genevac, USA]
- Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [Shimadzu, Japan]

- Luna C18 100A, 3um, 100mm x 2mm [Phenomenex, USA]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- Volumetric flask 500-1,000 ml
- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]

การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS (เครื่องมือ Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ยี่ห้อ Shimadzu, Japan รุ่น 8040)

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ มีขั้นตอนดังนี้

- 1.1) ผสม mobile phase 180 μ l + สารละลายมาตรฐาน simvastatin 5 μ l + สารละลายมาตรฐาน simvastatin acid 5 μ l + สารละลายมาตรฐาน lovastatin (internal standard) 10 μ l
- 1.2) นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ปริมาตร 10 μ l

2) การเตรียมตัวอย่างพลาสมาทั้งในตัวอย่างทดสอบ และตัวอย่างที่ใช้ประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

มีขั้นตอนดังนี้

- 2.1) blank plasma 50 μ l + สารละลายมาตรฐาน simvastatin 5 μ l + สารละลายมาตรฐาน simvastatin acid 5 μ l + สารละลายมาตรฐาน lovastatin (internal standard) 10 μ l
- 2.2) เติมน้ำ ammonium acetate buffer pH=5.0 ปริมาตร 50 μ l
- 2.3) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที
- 2.4) เติมน้ำ MTBE ปริมาตร 1 ml
- 2.5) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที

- 2.6) นำส่วนใสด้านบนไประเหยด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 40 นาที
- 2.7) ละลายกลับด้วย mobile phase (10mM ammonium acetate: acetonitrile; 25:75) ปริมาตร 200 μ l
- 2.8) กรองตัวอย่างด้วย nylon membrane filter ก่อนฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS
- 2.9) นำสารละลายส่วนใสฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ปริมาตร 10 μ l

สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่ใช้วิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่	: 10mM ammonium acetate: acetonitrile (25:75)
คอลัมน์	: Luna C18 100A, 3 μ m, 100mm x 2mm
อัตราการไหล	: 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	: Mass spectrometry
อุณหภูมิคอลัมน์	: 25 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ auto sampler	: 4 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภาวะของ MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Scan mode	: MRM Scan
Ionization mode	: ESI (positive mode)
Source temperature	: 500 องศาเซลเซียส

สภาวะของ MS/MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Compound	Ion transitions (m/z)	Collision Energy (C.E.)	Dwell time (ms)
simvastatin	419.00 > 199.00	-13.5	100
	419.00 > 225.00	-19.4	100
simvastatin acid	437.00 > 303.00	-10.5	100
	437.00 > 285.00	-12.3	100
lovastatin	405.00 > 243.00	-14.8	50
	405.00 > 267.00	-12.8	50

3.7.3 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้หนูแรท

วิเคราะห์การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* โดยวิธี quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยมีเอ็มอาร์เอ็นเอ *GAPDH* เป็น internal control

ตารางที่ 4 แสดงลำดับของไพรเมอร์จำนวนสี่คู่สำหรับ quantitative real-time RT-PCR⁹⁴

mRNA	orientation	primer sequences 5' to 3' orientation
<i>Mdr1a</i>	Forward	5'-TCT GGC GGC CAT TAT CCA T-3'
	Reverse	5'-TCA TAC TAC GGT TGT TTC CTA CAT TTG-3'
<i>Mdr1b</i>	Forward	5'-TGA ATC CCA AAG TGA CAC TGG T-3'
	Reverse	5'-ATA CTT CTG CGA ATT GAT CTC CTT ATT-3'
<i>Slc21a5</i>	Forward	5'-CCA CTG CTG AGG TAG TCT TCC TTA TG-3'
	Reverse	5'-CAG AGC CAG AAT GCT AAG TGT GC-3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'
	Reverse	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- 2-Propanol [Merck, Germany]
- Chloroform [Lab, scan, Thailand]
- DEPC-treated water [Ambion, USA]
- Dichloromethane [Merck, Germany]
- Ethanol [Merck, Germany]
- ImProm-ITM Reverse transcription system [Promega, USA]
- Magnesium chloride
- Primers
- TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® [Applied Biosystem, USA]
- TaqMan® Gene expression assay Master Mix [Applied Biosystems, USA]
- TRIzol® reagent [Gibco, USA]

วัสดุอุปกรณ์

- Autoclave [Sanyo, Japan]
- Autopipettes ขนาด 1-1000 ไมโครลิตร [Glison, USA and Band, Germany]
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Homogenizer [IKA®, Malaysia]
- Nanodrop [Thermo, USA]
- PCR Thermal cycler [Eppendorf, Germany]
- StepOnePlus™ Real-Time PCR system [Applied Biosystems, USA]
- Volumetric flask

- Vortex mixer [Scientific Industries, USA]

3.7.3.1 ขั้นตอนการสกัด RNA ด้วย TRIzol® reagent ด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR system [Applied Biosystems, USA]

มีขั้นตอนดังนี้

- 1.) นำลำไส้เล็กและตับของหนูแรทมาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol® reagent
- 2.) วัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 nm
- 3.) นำ total RNA ที่สกัดได้มาทำ reverse transcription เพื่อสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยใช้ ImProm-ITM Reverse transcription system
- 4.) นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่อง PCR Thermal cycler
- 5.) ตรวจสอบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กและตับของหนูแรทโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* โดยใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ *GAPDH* เป็น internal control ด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR
- 6.) หาปริมาณ mRNA จากการคำนวณค่า C_t ที่ได้จากเครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR มาทำ normalization ด้วยเอ็มอาร์เอ็นเอ *GAPDH* จากนั้นคำนวณหาระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (ค่า C_t คือจำนวนรอบของการทำ PCR น้อยที่สุดแต่ได้ประสิทธิภาพสูงสุด [threshold cycle, Ct])

3.7.4 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในตับหนูแรท

3.7.4.1 การเตรียมไมโครโซมจากตับ

เตรียมไมโครโซมจากตับของหนูแรท โดยใช้วิธี homogenization

มีขั้นตอนดังนี้

- 1.) นำตัวอย่างตับของหนูแรทออกจาก freezer
- 2.) ล้างตัวอย่างด้วย 0.9% normal saline และล้างด้วย cold wash buffer โดยใช้ปิเกตอร์ขนาด 100 ml วางอยู่บนน้ำแข็งตลอดเวลาที่ทำการทดลอง จากนั้นใส่ตัวอย่างลงใน borosilicate glass homogenization tube

- 3.) เติม homogenizing buffer แล้วนำไป homogenize ด้วยเครื่อง homogenizer (volt 120V, rate 2000 rpm)
- 4.) นำ homogenate ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 9000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 5.) นำ supernatant ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว 95000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 6.) นำตะกอน (pellet) ที่ได้มาเติม homogenizing buffer จากนั้นนำไป homogenize ด้วยเครื่อง homogenizer (volt 120V rate 2000rpm)
- 7.) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนถึงวันที่ทำการวิเคราะห์

3.7.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในไมโครโซม

ทำการหาปริมาณโปรตีนในไมโครโซมด้วยวิธี Bio-Rad DC Protein assay เป็น standard protein สำหรับตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซมจากตับของหนูแรท หลักพื้นฐานของวิธีนี้ใช้การเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับสารละลาย alkaline copper tartrate (Reagent A) และสาร folin (Reagent B) ซึ่งจะเกิดระดับสีน้ำเงินที่แตกต่างกัน และสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 405-750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader อย่างไรก็ตามการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวนี้มีความคลาดเคลื่อนประมาณ 5-10%

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

- โปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline (PBS)
- Reagent A: an alkaline copper tartrate solution
- Reagent B: dilute folin reagent

มีขั้นตอนดังนี้

เตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 4 mg/ml

- 1.) เติม BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ, สารละลายบัฟเฟอร์ PBS (blank) และตัวอย่างไมโครโซม ปริมาณ 5 μ l ลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate

- 2.) เติมสาร Reagent A ปริมาณ 25 μl
- 3.) เติมสาร Reagent B ปริมาณ 200 μl
- 4.) ผสมการทุกชนิดให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที จึงทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

3.7.4.3 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในระดับของหนูแรทโดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท

การศึกษานี้จะเริ่มด้วยการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ จากนั้นจึงทำการตรวจวัดปริมาณของ 1'-OH-MDZ ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยา Midazolam 1'-hydroxylation ที่เกิดขึ้นผ่านเอนไซม์ ไซโทโครมพี3เอจากตับหนูแรทในหลอดทดลอง โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท การวัดปริมาณ 1'-OH-MDZ ใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยของ Jurica และคณะ⁹⁵

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมี

- 1'-hydroxymidazolam (1'-OH-MDZ) [Cerilliant, USA]
- Acetonitrile (HPLC grade) [Lab-Scan, Thailand]
- Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) [Aldrich-Sigma, USA]
- Diazepam [Cerilliant, USA]
- Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) [Merck, Germany]
- Dichloromethane (HPLC grade) [Merck, Germany]
- Glucose-6-phosphate (G6P) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) [Aldrich-Sigma, USA]
- Glycerol [BDH Chemical Ltd., England]
- Hydrochloric (HCl) [Merck, Germany]
- Magnesium Chloride (MgCl_2) [Carlo Erba, France]
- Methanol (HPLC grade) [Merck, Germany]

- Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE)
- Midazolam [Cerilliant, USA]
- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) [Aldrich-Sigma, USA]
- Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) [Aldrich-Sigma, USA]
- Phosphoric acid [Merck, Germany]
- Potassium Chloride [Carlo Erba, France]
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) [Merck, Germany]
- Sodium acetate trihydrate [Merck, Germany]
- Sodium pyrophosphate [Aldrich-Sigma, USA]
- TRIS base [Merck, Germany]

วัสดุอุปกรณ์

- Autopipettes ขนาด 1-1000 μl
- Centrifuge [Hettich, USA and Eppendorf, Germany]
- Cylinder ขนาด 5-1,000 ml
- Evaporator [Genevac, USA]
- High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) [Shimadzu]
- Homoginizer [Ika, Malaysia]
- pH meter [Mettler Toledo, Switzerland]
- Reciprocal shaking water bath [Memmert, Germany]
- Symmetry C18 column 3.5 μm , 4.6x100 mm [Water, Japan]
- Ultra-centrifuge [Beckman, USA]
- Volumetric flask
- Vortex Mixer [Scientific Industries, USA]

3.7.4.4 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรอกซิโทโครมพี3เอ2ในไมโครโซมโดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท

โดยการวัด 1'-OHMDZ จากปฏิกิริยา Midazolam hydroxylation โดยใช้ Midazolam ความเข้มข้น 100 μM เป็นสับสเตรท ด้วยเครื่อง High Pressure Liquid Chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่นprominence

มีขั้นตอนดังนี้

- 1.) เตรียมสารละลายที่จะทำปฏิกิริยา (reaction mixture) 1000 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M ของ สารละลายบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 pH=7.4 ปริมาตร 500 μl , regenerating system (ประกอบด้วย 5 mM ของ NADP, 100 mM ของ G6P, 100 mM MgCl_2) ปริมาตร 100 μl ไมโครโซมที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 200 μg , 100 μM ของไมโครโซม ปริมาตร 7 μl และเติม DI water จนปริมาตรครบ 995 μl
- 2.) นำหลอดทดลองมาอุ่นใน reciprocal shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- 3.) เติม 1 unit/ μl ของ G6PD ปริมาตร 5 μl ใน reciprocal shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 4.) เติม MTBE 2 ml ลงในหลอดทดลอง
- 5.) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 20 วินาที
- 6.) เติม 40 mg/ml ของ diazepam (internal standard) ปริมาตร 10 μl
- 7.) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที
- 8.) ดูดส่วนใสด้านบนมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator เป็นเวลา 45 นาที
- 9.) ละลายกลับด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ปริมาตร 150 μl
- 10.) นำสารละลายส่วนใสที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตรการฉีดครั้งละ 10 μl
- 11.) นำระดับความเข้มข้นของ 1'-OH-MDZ ที่วัดได้ มาคำนวณการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรอกซิโทโครมพี3เอ2จากสูตร

$$\text{specific activity} = \frac{\text{enzyme activity } (\mu\text{mol})}{\text{total protein } (\text{mg})}$$

3.8 การวิเคราะห์ตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics analysis)

หาค่า C_{max} , T_{max} , AUC_{0-12} , $AUC_{0-\infty}$ ของ simvastatin, simvastatin acid โดยค่า C_{max} , T_{max} สามารถวิเคราะห์ได้โดยตรงจากข้อมูล ค่า AUC_{0-12} จะถูกคำนวณด้วย trapezoidal rule ส่วน AUC ในส่วนที่เป็นความเข้มข้นสุดท้ายวิเคราะห์จากช่วงสุดท้ายของกราฟความเข้มข้นของยากับเวลา ทำเป็น ln-linear regression ได้ค่าคงที่การกำจัด (elimination rate constant: k_{el}) นำมาคำนวณด้วยสูตร $AUC_{t-\infty} = C_{last}/k_{el}$ เพื่อหาค่า $AUC_{0-\infty}$ ส่วนค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) คำนวณได้จากสมการ $t_{1/2} = \ln 2/k_{el}$

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

3.9.1 สถิติที่ใช้วิเคราะห์พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์

ข้อมูลที่ได้จะแสดงผลด้วยค่า mean±SD ยกเว้นค่า T_{max} ซึ่งจะแสดงเป็น median (range) จะใช้ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% และ 99% ที่นัยสำคัญ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมใช้สถิติ Student's *t*-test (two-tailed) ค่า T_{max} จะใช้ Wilcoxon rank test และโปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ SPSS

3.9.2 สถิติที่ใช้วิเคราะห์การศึกษาการแสดงออกของ mRNA transporters และ การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2

ข้อมูลจะแสดงผลด้วยค่า mean±SEM เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มหลายกลุ่มสถิติที่ใช้คือ one way analysis of variance (Anova) post hoc tests การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมใช้สถิติ Student's *t*-test (two-tailed) ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% และ 99% ที่นัยสำคัญ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ และโปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ SPSS

3.10 จริยธรรมการใช้สัตว์เพื่อการทดลอง (Ethical Consideration)

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ปฏิบัติตามเกณฑ์ของจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิทยาศาสตร์ โดยคำนึงถึงการใช้สัตว์ทดลองอย่างถูกต้องเหมาะสม ซึ่งจะผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการการใช้สัตว์ทดลองตั้งแต่เริ่มทำโครงการงานวิจัยเพื่อให้การศึกษาในครั้งนี้เป็นที่ยอมรับต่อด้านศีลธรรมอย่างเหมาะสม ทั้งทางด้านกฎหมาย การออกแบบการทดลอง สายพันธุ์ของสัตว์ รวมถึงวิธีปฏิบัติต่อสัตว์ในการทดลองตั้งแต่ต้นจนจบการทดลองเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล โดยอาศัยหลักการสามอาร์ (Three Rs) เป็นแนวทางดังนี้

1.) การทดแทน (Replacement of animals)

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาวิจัยในเซลล์ตับและลำไส้เล็กของหนูแรทเพื่อศึกษาการแสดงออกของ transporters และการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2เป็นการแทนการศึกษาในมนุษย์เพราะสามารถเทียบเคียงกันได้

2.) การลด (Reduction of animals)

ใช้จำนวนสัตว์ทดลองต่ำสุดจากการคำนวณขนาดตัวอย่าง ที่ให้ความเชื่อมั่นทางสถิติแม่นยำ และถูกต้องของงานวิจัย

3.) การปรับให้ดีขึ้น (Refinement of animals)

เพื่อให้สัตว์ทดลองมีการทรมานน้อยที่สุด ก่อนการผ่าตัดนักวิจัยจะให้หนูแรทดมยา isoflurane ในขนาดที่เหมาะสมเพื่อเหนี่ยวนำให้สลบเพื่อไม่ให้เกิดความเจ็บปวด ความเครียด และความทุกข์ทรมานหรือให้เกิดน้อยที่สุดรวมถึงสถานที่เลี้ยงหนูแรทที่มีมาตรฐานสากล

บทที่ 4

ผลการศึกษา

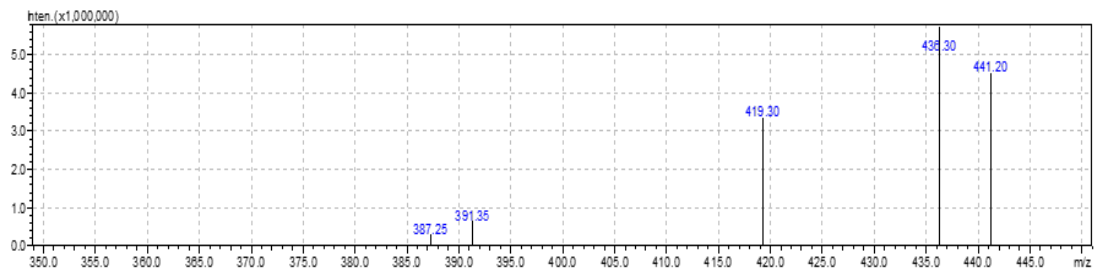
4.1 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin ในหนูแรทด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ LC-MS/MS

4.1.1 MS/MS optimization

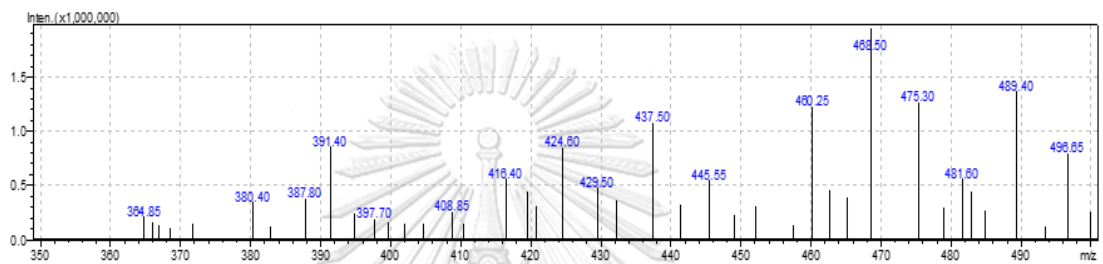
ทำการ optimization สารละลายมาตรฐาน simvastatin, simvastatin acid และสารละลาย internal standard lovastatin ความเข้มข้นเท่ากับ 1 µg/ml โดยเลือกใช้ ESI source ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้แมสสเปกตรัมที่ดีที่สุดจึงได้สแกนไอออนทั้งในโหมด positive และ negative ด้วยการสแกนแบบ Full-scan mass spectrum ซึ่งบันทึกสัญญาณในช่วงมวลต่อประจุ (m/z) 350 ถึง 500 จากนั้นจึงทำการประเมิน Full-scan daughter mass spectrum เพื่อหาปริมาณ product ion ที่มีปริมาณมากที่สุดของสารทั้งสามชนิด

พบสัญญาณในโหมด positive ของ simvastatin, simvastatin acid และ lovastatin มีความหนาแน่นมากกว่าในโหมด negative และจากผลการทดลองพบว่า Full-scan mass spectrum ของ simvastatin มีสัญญาณไอออนที่เด่นชัดที่มีมวลต่อประจุ (m/z) ได้แก่ 436.7, 447.20 และ 419.30 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5 (ก) การทดลองนี้ได้เลือก simvastatin ที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 419.30 เป็น protonated molecular ion $[M+H]^+$ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jemal และคณะ⁹⁶ ขณะที่ Full-scan mass spectrum ของ simvastatin acid มีสัญญาณไอออนที่เด่นชัดที่มีมวลต่อประจุได้แก่ 468.5, 460.25 และ 437.50 เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 5 (ข) การทดลองนี้ได้เลือก simvastatin acid ที่มีมวลต่อประจุเท่ากับ 437.50 เป็น protonated molecular ion และ mass spectrum ของ lovastatin ที่มีสัญญาณไอออนที่เด่นชัดมีมวลต่อประจุได้แก่ 443.3 405.40 และ 427.25 ตามลำดับงานวิจัยนี้ได้เลือกมวลต่อประจุที่เป็น protonated molecular ion คือ 405.40 ดังแสดงในภาพที่ 5 (ค)

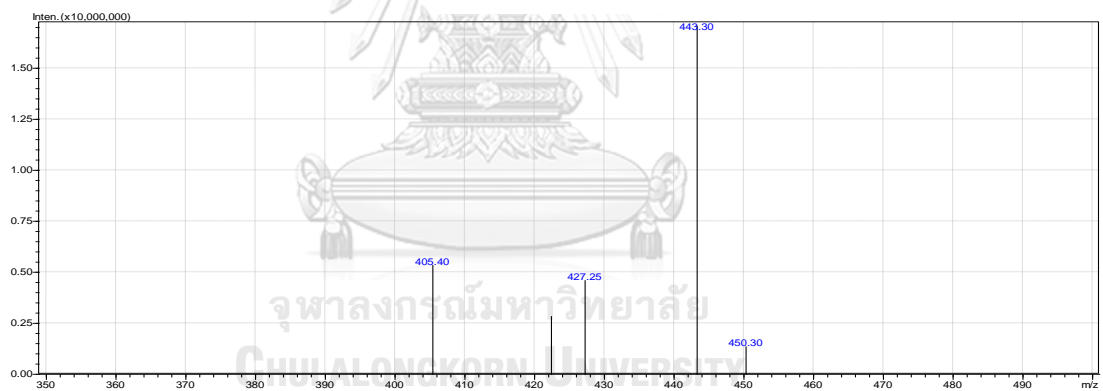
เลือก precursor ion ของ simvastatin ที่มีค่ามวลต่อประจุคือ 419.30 จะได้สเปกตรัม product ion ของ simvastatin มีค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 199.00, 284.95 และ 225.15 เมื่อใช้ collision energy (CE) เท่ากับ -13.5 eV จะได้ค่ามวลต่อประจุ 199.00 มีปริมาณมากที่สุดสำหรับติดตามการเปลี่ยนของปริมาณของค่ามวลต่อประจุ 419.00>199.00 นอกจากนี้จะเลือก second transitions โดยเมื่อเลือกค่า CE เท่ากับ -19.4 eV จะได้ $m/z=225.15$ (m/z 419>225.00) เพื่อใช้ในการยืนยันไอออนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ simvastatin ดังแสดงในภาพที่ 6(ก) หากเลือก precursor ion ของ simvastatin acid ที่มีค่ามวลต่อประจุคือ 437.50 ซึ่งสอดคล้องกับ protonated molecular ion $[M+H]^+$ เมื่อทำการสแกน product ion จะได้สเปกตรัมของ simvastatin acid มีค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 302.95, 285.05 และ 356.90 เมื่อใช้ CE เท่ากับ -10.5 eV จะได้ค่ามวลต่อประจุ 302.95 มีปริมาณมากที่สุดเพื่อติดตามการเปลี่ยนของปริมาณของค่ามวลต่อประจุ 437.00>303.00 นอกจากนี้จะเลือก second transitions หากเลือกค่า CE เท่ากับ -12.3 eV จะได้ค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 285.05 (m/z 419>285.00) เพื่อใช้ในการยืนยันไอออนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ simvastatin acid ดังแสดงในรูปที่ 6(ข) นอกจากนี้จะเลือก precursor ion ของ lovastatin ที่มีค่ามวลต่อประจุคือ 405.40 จะได้สเปกตรัม product ion ของ lovastatin มีค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 243.00, 266.90 และ 198.90 หากใช้ CE เท่ากับ -14.8 eV จะได้ค่ามวลต่อประจุ 243.00 เพื่อติดตามการเปลี่ยนของปริมาณของค่ามวลต่อประจุ 405.00>243.00 นอกจากนี้จะเลือก second transitions โดยเมื่อเลือกค่า CE เท่ากับ -12.8 eV จะได้ค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 266.90 (m/z 405>267.00) เพื่อใช้ในการยืนยันไอออนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ lovastatin ดังแสดงในภาพที่ 6 (ค)



(ก) simvastatin

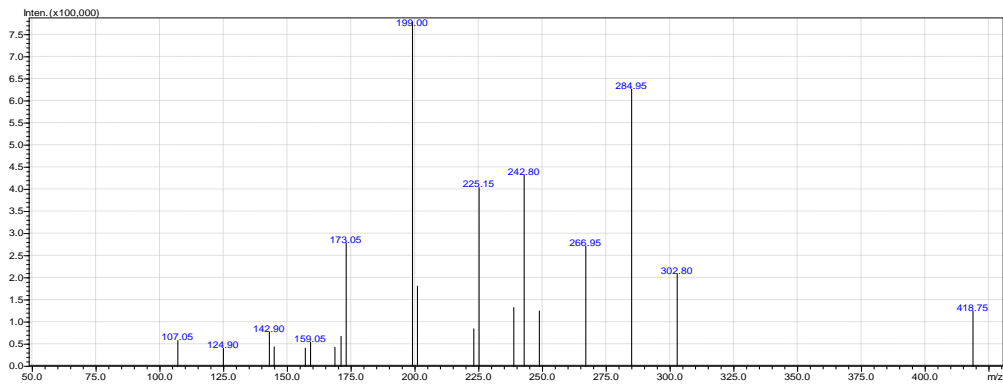


(ข) simvastatin acid

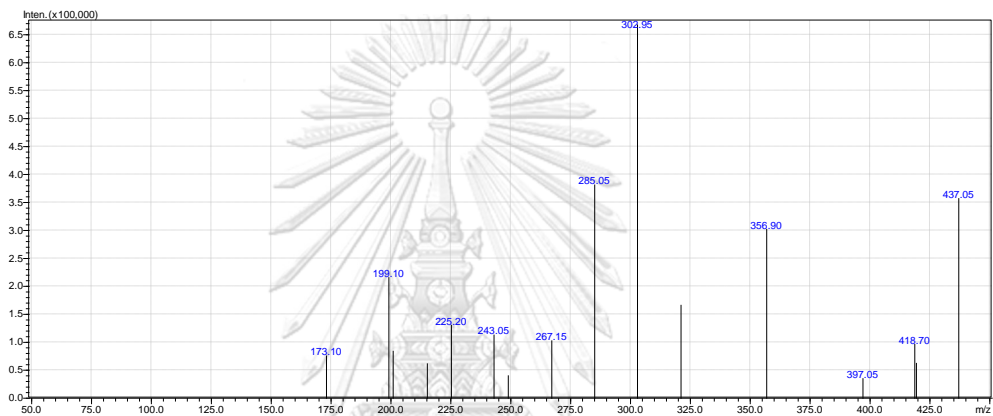


(ค) lovastatin

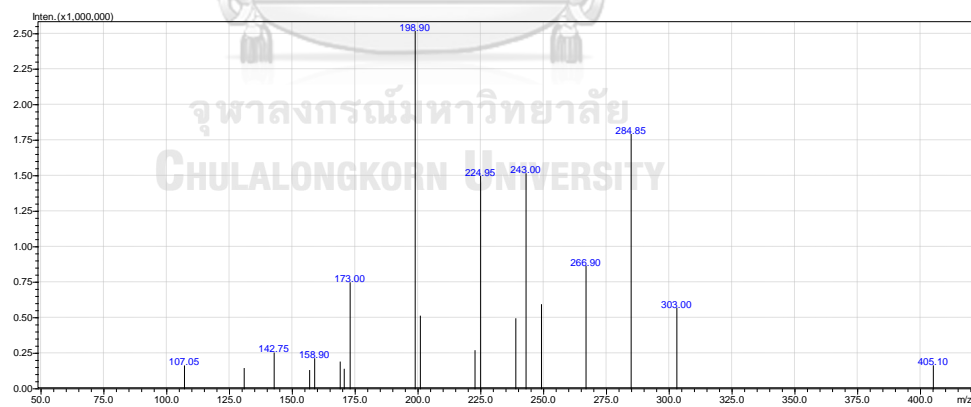
ภาพที่ 5 แสดงแมสสเปคตรัมของ (ก) simvastatin (ข) simvastatin acid และ (ค) lovastatin ในโหมด positive ESI full scan



(ก) simvastatin



(ข) simvastatin acid

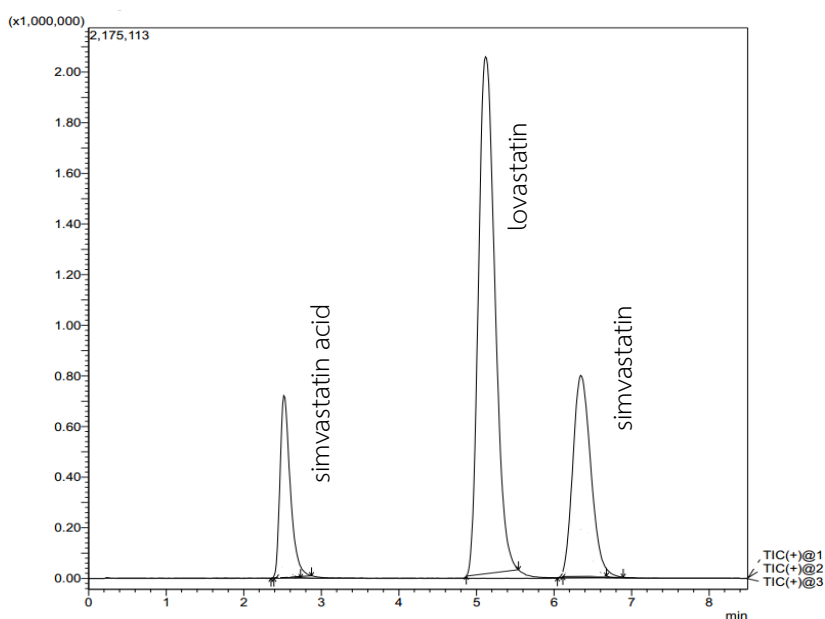


(ค) lovastatin

ภาพที่ 6 แสดงแมสสเปคตรัม Product ion ของ (ก) simvastatin (ข) simvastatin acid และ (ค) lovastatin

4.1.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ simvastatin และ simvastatin acid

การศึกษาค้นคว้านี้ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์จากงานวิจัยของ Ahmed และคณะ⁹³ พบว่าสารละลายมาตรฐาน simvastatin acid lovastatin (internal standard) และ simvastatin มีระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) เท่ากับ 2.51, 5.08 และ 6.31 นาทีตามลำดับ ระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 8 นาที ซึ่งใช้เวลาสั้นกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ดังแสดงในภาพที่ 7



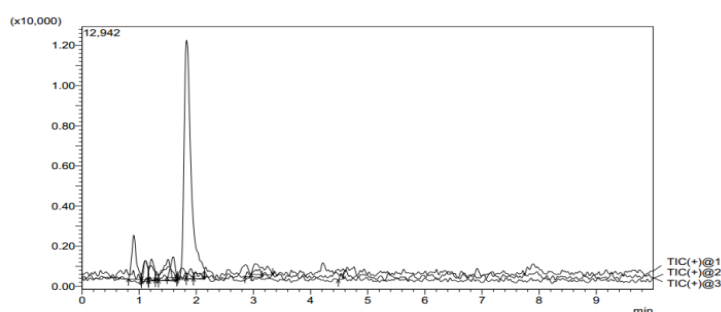
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 7 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน simvastatin acid, lovastatin (internal standard) และ simvastatin

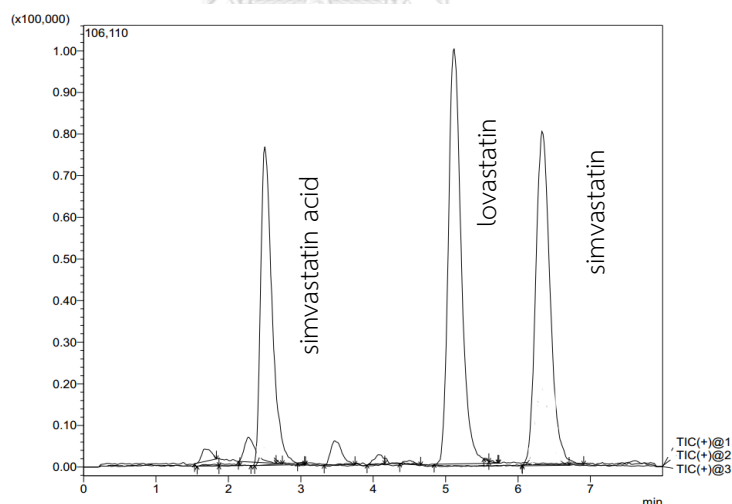
ผลการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Validation method) ความเข้มข้นของ simvastatin และ simvastatin acid ในพลาสมาด้วยเทคนิค LC-MS/MS

1) ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

ทำการทดสอบโดยวิเคราะห์ในแบบลค์พลาสมาของหนูแรทจำนวน 6 ตัวเพื่อทดสอบว่ามีที่กบรบกวนต่อโครมาโทแกรมของสารละลาย simvastatin, simvastatin acid และ lovastatin หรือไม่พบว่าที่ตำแหน่งพีคของ simvastatin, simvastatin acid และ lovastatin ไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น แสดงผลดังแสดงในภาพที่ 8(กและข)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 8 (ก) แสดงโครมาโทแกรมของแบบลค์พลาสมาในหนูแรท

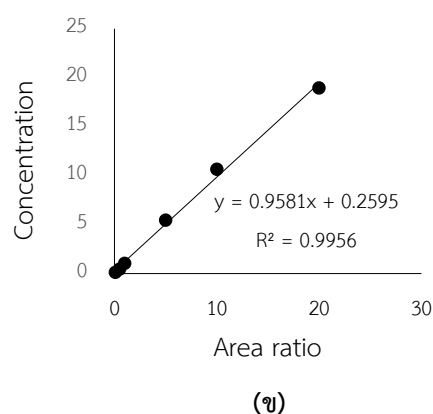
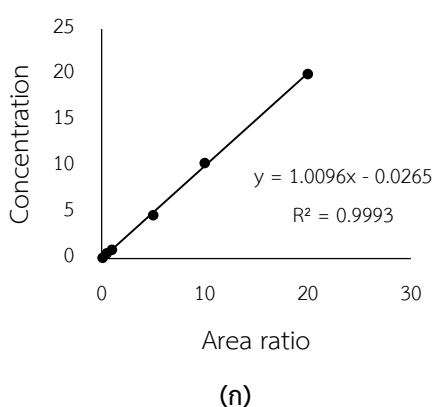
(ข) แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน simvastatin acid และ simvastatin ในพลาสมาในหนูแรท (เติมlovastatin (internal standard) ก่อนการตรวจวิเคราะห์)

ขีดจำกัดของการวิเคราะห์หรือความไว (Limit of Detection or Sensitivity)

จากการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (lower limit of quantitation, LLOQ) จากกราฟมาตรฐานของ simvastatin และ simvastatin acid จำนวนละ 3 ทดสอบ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟเทียบมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.092 ng/ml และ 0.105 ng/ml ตามลำดับ พบว่าความถูกต้องของค่าที่วัดได้อยู่ในเกณฑ์ร้อยละ 80 ถึง 120 และมีค่าความแปรปรวนของการวิเคราะห์ไม่เกินร้อยละ 20 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 และตารางที่ 6

2) ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน simvastatin ในพลาสติกหุ้มจำนวน 6 ความเข้มข้นได้แก่ 0.092, 0.553, 0.955, 4.716, 10.400 และ 20.076 ng/ml เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานโดยทำการทดลองจำนวน 3 ชุด พบว่าผลการทดลองทั้ง 3 ชุดมีความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงโดยค่า R^2 มีค่าเป็นที่ยอมรับในเกณฑ์ค่า R^2 มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.99 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง จากการทดลองนี้มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9993 ดังแสดงในภาพที่ 9 (ก) เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน simvastatin acid ในพลาสติกหุ้มจำนวน 6 ความเข้มข้นได้แก่ 0.105, 0.458, 1.031, 5.442, 10.652 และ 18.935 ng/ml และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9956 ดังแสดงในภาพที่ 9 (ข)



ภาพที่ 9 (ก) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ simvastatin กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ simvastatin (area ratio) ของการวิเคราะห์ผล 3 ชุด

(ข) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ simvastatin acid กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ simvastatin (area ratio) ของการวิเคราะห์ผล 3 ชุด

3) ความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy and Precision)

จากการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน (intra-day and inter-day analysis) โดยตรวจสอบความเข้มข้นของ simvastatin และ simvastatin acid ที่ 3 ความเข้มข้นในพลาสมาหนูแรท (ความเข้มข้นครอบคลุมระดับต่ำ กลาง และ สูง) ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานและทำการทดลองสามวันได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 ผลการตรวจความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ simvastatin

level	simvastatin (ng/ml)	Intra-day analysis (n=3)		Intra-day analysis (n=3)	
		(%Accuracy)	Precision (%CV)	(%Accuracy)	Precision (%CV)
LLOQ	0.092	104.67	2.76	-	-
Low	0.296	99.56	5.03	98.26	9.29
Medium	3.601	106.97	0.77	102.87	3.47
High	14.866	104.71	3.35	99.24	4.93

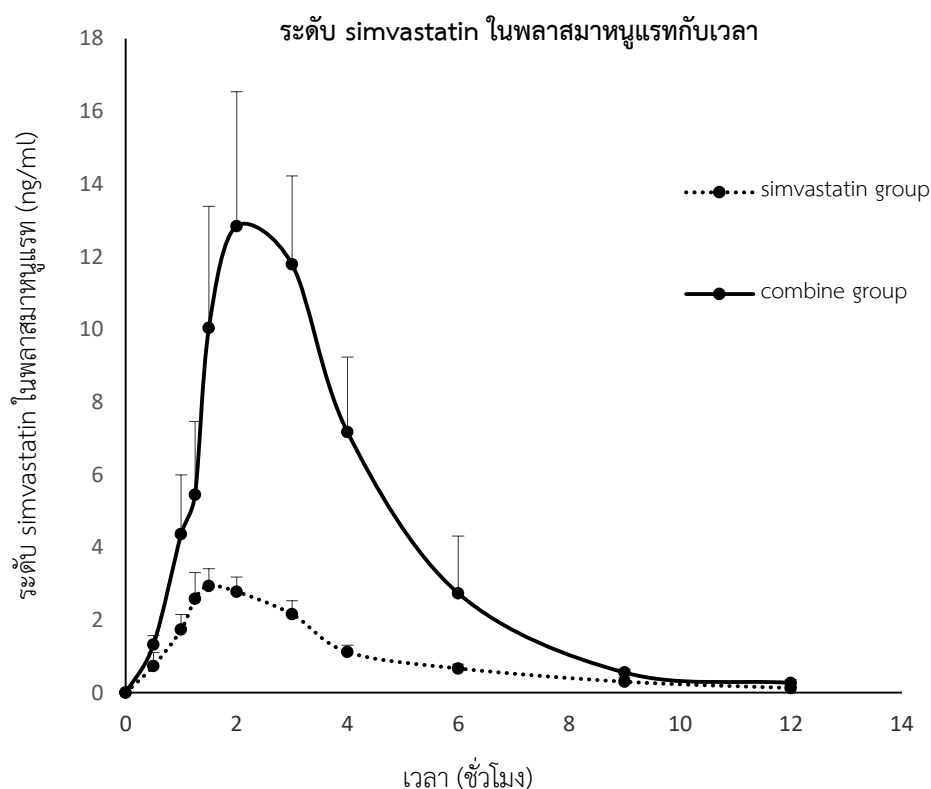
ตารางที่ 6 ผลการตรวจความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ simvastatin acid

level	simvastatin acid (ng/ml)	Intra-day analysis (n=3)		Intra-day analysis (n=3)	
		(%Accuracy)	Precision (%CV)	(%Accuracy)	Precision (%CV)
LLOQ	0.102	101.67	8.93	-	-
Low	0.324	107.89	3.71	101.63	10.20
Medium	3.615	103.28	2.28	104.54	1.50
High	16.792	111.95	2.23	108.79	4.21

LLOQ: lower limit of quantitation, CV: Coefficient of variation

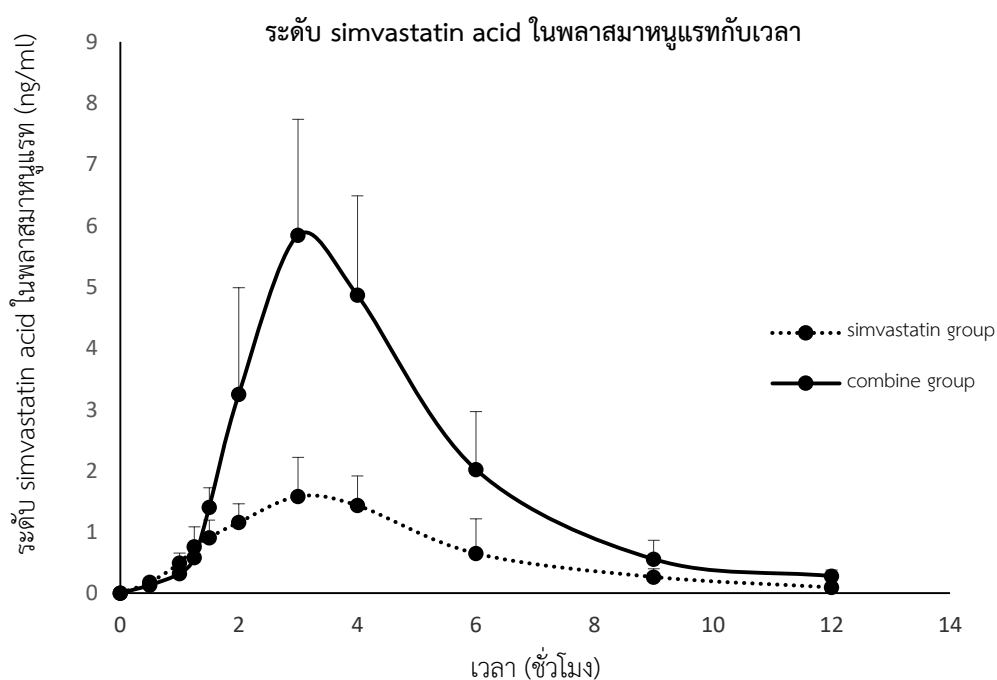
4.1.3 ระดับ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรท

ค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของ simvastatin ณ จุดเวลาต่างๆ ในพลาสมาของหนูแรท ระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีระดับความเข้มข้นของ simvastatin สูงกว่า หนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (20 mg/kg) เท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ (2 ml/kg/day-7 days) ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg) แสดงผลด้วยค่า mean±SD

ค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของ simvastatin acid ณ จุดเวลาต่างๆ ในพลาสมาของหนูแรท ระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีระดับความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาสูงกว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (20mg/kg) เท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ (2 ml/kg-7days) ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg) แสดงผลด้วยค่า mean±SD

4.1.4 พารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ simvastatin และ simvastatin acid ใน

หนูแรท

ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ simvastatin และ simvastatin acid ระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin เปรียบเทียบความแตกต่างแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และ simvastatin acid ในพลาสมาหนูแรทสองกลุ่มภายหลังจากได้รับยา simvastatin (20 mg/kg) และกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ (2 ml/kg/day-7days) ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg) แสดงผลด้วยค่า mean±SD ยกเว้น ค่า T_{max} ที่แสดงด้วยค่า median with ranges

	หนูที่ได้รับยาซิมวาสแตตินเท่านั้น (simvastatin group)	หนูที่ได้รับยาซิมวาสแตตินร่วมกับน้ำส้มโอ (combine group)	p-value
<u>simvastatin</u>			
C_{max} (ng/ml)	3.83 ± 0.75	15.03 ± 1.52	** $p < 0.01$
T_{max} (hr)	1.75 (1.25-3)	3 (2-3)	$p = 0.068$
$t_{1/2}$ (hr)	2.01 ± 0.48	2.12 ± 0.37	$p = 0.67$
AUC_{0-12} (ng·hr/ml)	9.34 ± 2.06	39.36 ± 3.93	
$AUC_{12-\infty}$ (ng·hr/ml)	0.37 ± 0.17	0.84 ± 0.30	
$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/ml)	9.70 ± 2.17	40.20 ± 4.15	** $p < 0.01$
K_{el} (hr ⁻¹)	0.36 ± 0.07	0.34 ± 0.06	$p = 0.56$
<u>simvastatin acid</u>			
C_{max} (ng/ml)	1.89 ± 0.45	6.78 ± 1.07	** $p < 0.01$
T_{max} (hr)	3.5 (3-6)	3 (3-4)	$p = 0.18$
$t_{1/2}$ (hr)	2.31 ± 0.63	2.36 ± 0.67	$p = 0.83$
AUC_{0-12} (ng·hr/ml)	7.57 ± 2.30	21.91 ± 5.49	
$AUC_{12-\infty}$ (ng·hr/ml)	0.31 ± 0.10	0.93 ± 0.40	
$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/ml)	7.87 ± 2.36	22.85 ± 5.78	** $p < 0.01$
K_{el} (hr ⁻¹)	0.32 ± 0.08	0.31 ± 0.08	$p = 0.88$

* $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ simvastatin เท่านั้น

จากผลการทดสอบทางสถิติของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของระดับยา simvastatin พบว่าค่า C_{max} , AUC_{0-12} และ $AUC_{0-\infty}$ ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น ซึ่งมีค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติค่า $p < 0.01$ ในขณะที่ค่าคงที่การกำจัด (K_{el}) ของยา simvastatin ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น รวมทั้งค่า $p = 0.56$ ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของ simvastatin ของหนูแรทในกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น โดยค่า $p < 0.67$ และค่า T_{max} ของยา simvastatin ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ simvastatin เท่านั้น ($p = 0.068$)

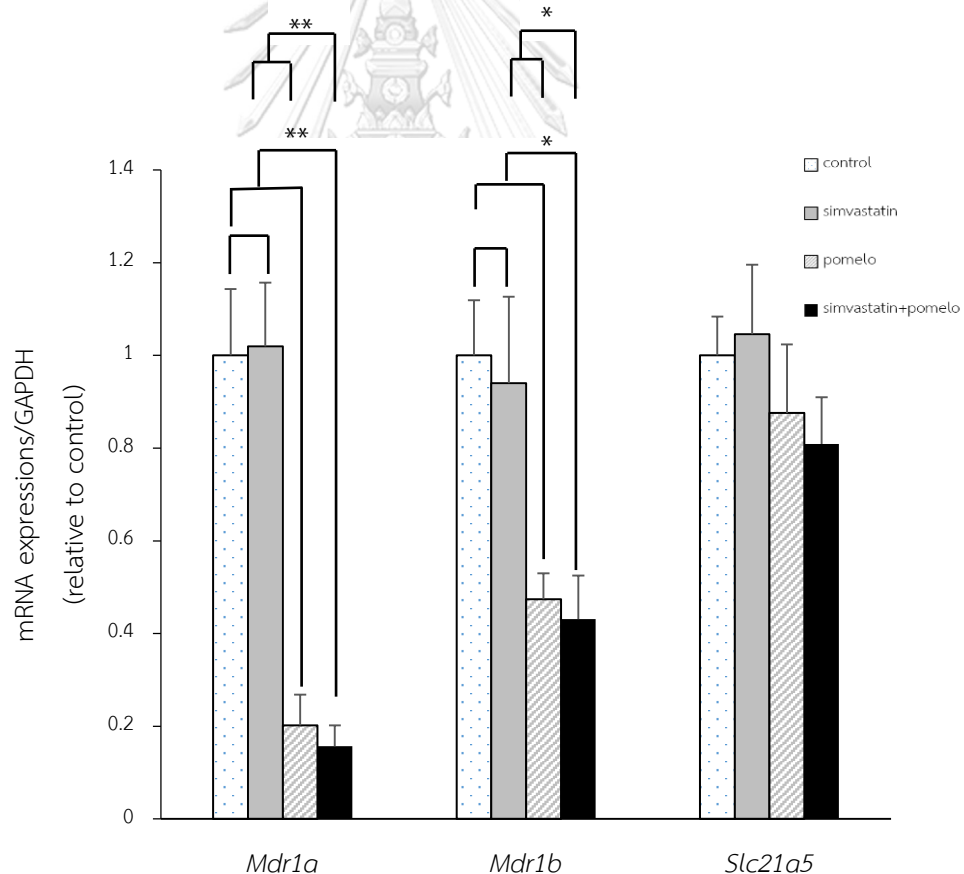
ผลการทดสอบพารามิเตอร์ทางสถิติของระดับ simvastatin acid พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin มีค่า C_{max} , AUC_{0-12} และ $AUC_{0-\infty}$ มากกว่ากลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น $p < 0.01$ ในขณะที่ค่าคงที่การกำจัด (K_{el}) ของยา simvastatin acid ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ simvastatin เท่านั้น ค่า $p = 0.88$ รวมถึงค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของ simvastatin acid ของหนูแรทในกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นโดยค่า $p = 0.83$ และค่า T_{max} ของยา simvastatin acid ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันร่วมกับยา simvastatin ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น ($p = 0.18$)

4.2 การศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับและลำไส้เล็กของหนูแรท

4.2.1 ผลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กของหนูแรท

พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในลำไส้เล็กลดลงถึง 79.8% และ 84.3% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $**p < 0.01$ ($p = 0.009$ และ $p = 0.007$ ตามลำดับ)

แต่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในลำไส้เล็กของหนูกลุ่มที่ได้รับ simvastatin เท่านั้นและ หนูกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.932$) นอกจากนี้พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ น้ำส้มโอเท่านั้นและกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin และการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1b* ในลำไส้เล็กลดลง 52.6% และ 56.9% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ $*p<0.05$ ($p=0.025$ และ $p=0.017$ ตามลำดับ) ขณะที่การแสดงออกของเอ็มอาร์ เอ็นเอ *Mdr1b* ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและหนูกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.894$) อย่างไรก็ตามพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ ร่วมกับยา simvastatin และหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นมีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กหนูแรทไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ($p=0.720$, $p=0.581$ และ $p=0.826$ ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 12

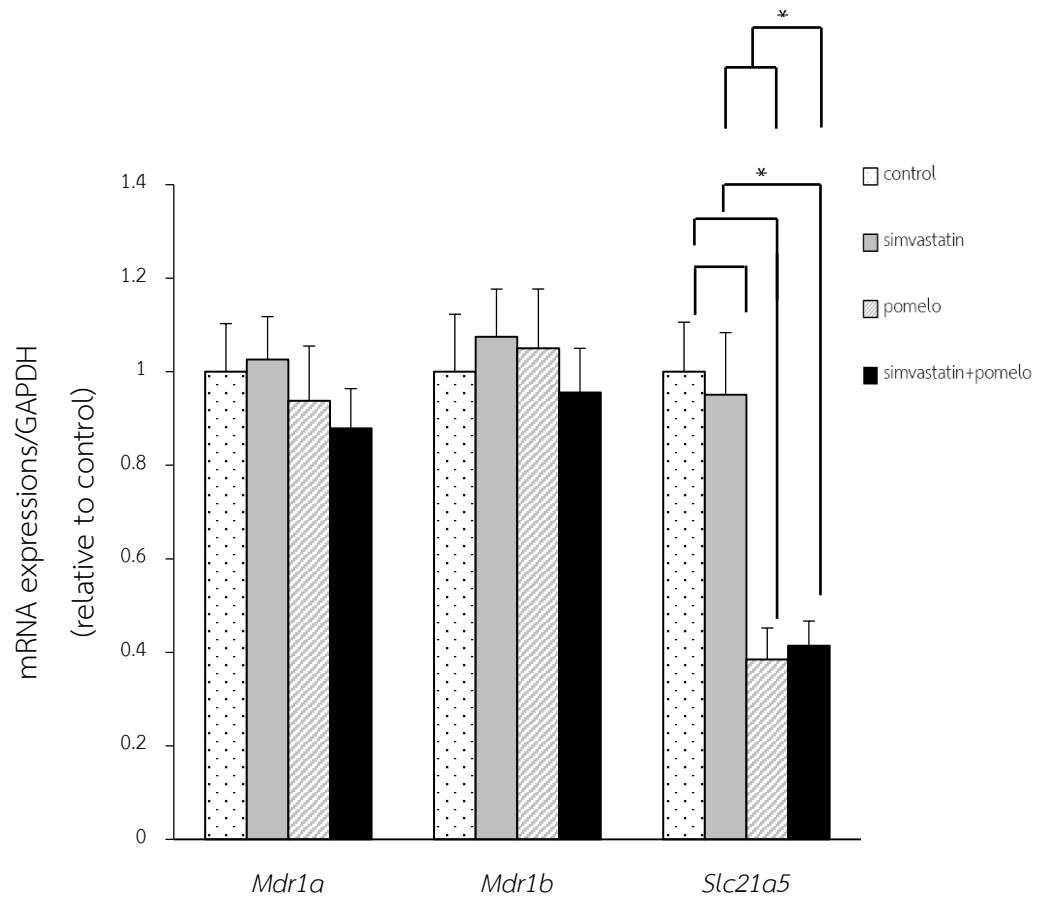


ภาพที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กของหนู แรทด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR แสดงผลด้วยค่า mean±SEM

** $p<0.01$ และ * $p<0.05$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control

4.2.2 ผลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับของหนู แรท

จากผลการทดลองพบว่าหนูแรทที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้น และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับของหนูแรทลดลง 61.5 % และ 58.6% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม $p < 0.05$ ($p = 0.034$ และ $p = 0.040$ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอชนิดนี้ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ($p = 0.902$) ในขณะที่การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในตับของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้น กลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin และกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ($p = 0.867$, $p = 0.744$ และ $p = 0.732$ ตามลำดับ) เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1b* ในตับของหนูแรทซึ่งพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้น หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin และหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.898$, $p = 0.909$ และ $p = 0.688$ ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 13

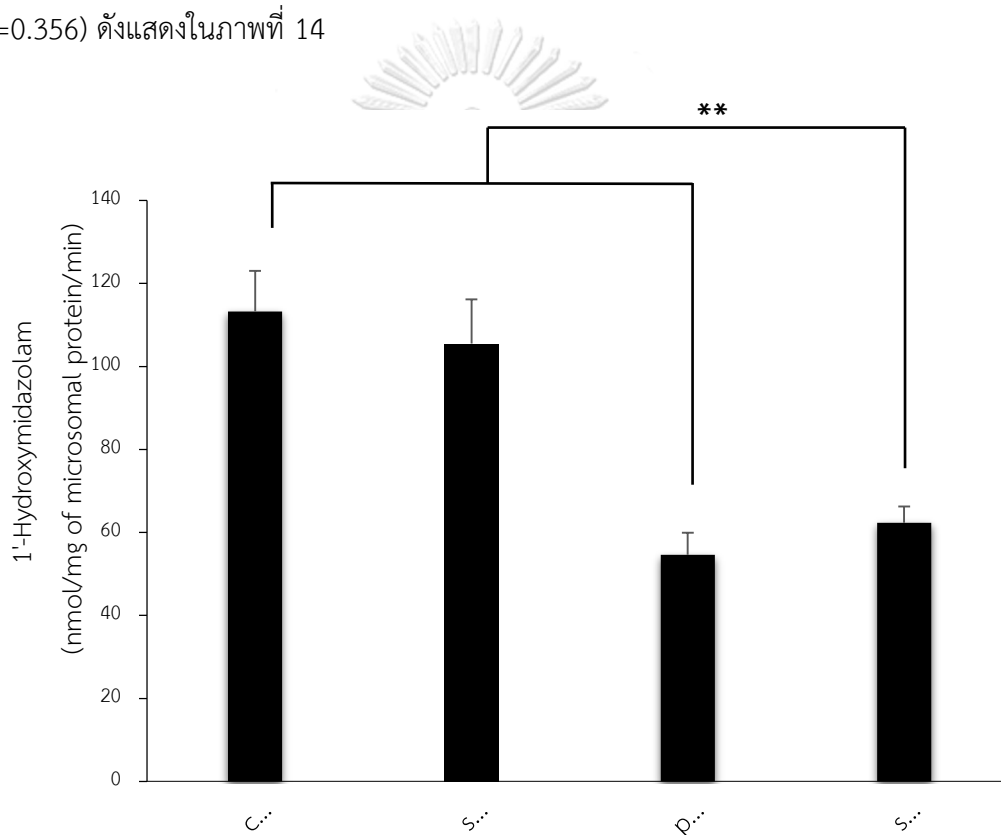


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในตับของหนูแรท ด้วยเทคนิค quantitative real-time RT-PCR แสดงผลด้วยค่า mean±SEM * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control

4.3 ผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทโดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2โดยใช้ midazolam เป็นสับสเตรท พบว่า หนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอเท่านั้นและหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin มีการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ลดลง 51.77% และ 49.17% ตามลำดับเมื่อเทียบกับหนูแรทกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) แต่การทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ระหว่างหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เทานั้นกับหนูแรทกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.356$) ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงผลของน้ำส้มโอต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในหนูแรทเมื่อใช้ midazolam เป็นสับสเตรท วิเคราะห์ระดับ 1'-Hydroxymidazolam ด้วยเทคนิค HPLC แสดงผลด้วยค่า mean±SEM

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control

บทที่ 5

การอภิปรายและสรุปผลการศึกษา

5.1 การอภิปรายผลการศึกษา (Discussion)

อันตรกิริยาระหว่างยากับอาหาร (Food and Drug Interaction) ของยา simvastatin ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากเป็นยา simvastatin ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาผู้ป่วยมีภาวะไขมันในเลือดสูงและมีการรายงานถึงความปลอดภัยของการใช้ยา simvastatin ร่วมกับอาหารหรือสมุนไพรที่มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือกระบวนการขจัดยา อาหารหรือสมุนไพรเหล่านั้นอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อยาและส่งผลกระทบต่อร่างกายได้ ข้อมูลการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้ยาร่วมกับอาหาร พืช ผักผลไม้ ที่มีความเป็นไปได้สูงในการบริโภคร่วมกันจึงต้องมีเพียงพอเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้ยา¹⁸

ส้มโอเป็นผลไม้อีกหนึ่งชนิดหนึ่งที่คาดการณ์ว่าอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกาย การกระจายตัวของยาในร่างกายและการกำจัดยาออกจากร่างกาย เนื่องจากส้มโอมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกับเกรปฟรุ้ตที่เป็นผลไม้จากต่างประเทศ โดยมีรายงานว่า การรับประทานเกรปฟรุ้ตร่วมกับยา simvastatin ทำให้ระดับยาสูงขึ้นมากกว่าปกติอาจเป็นผลจากการยับยั้งการทำงานและการแสดงออกของพีไกลโคโปรตีนจึงส่งผลให้มีปริมาณยาที่เป็นสับสเตรทของพีไกลโคโปรตีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นในกระแสเลือดเนื่องจากยาไม่ถูกส่งออกจากร่างกายจึงก่อให้เกิดอันตรายจากยาได้^{97,99} นอกจากนี้มีรายงานว่าตัวขนส่ง (drug transporters) มีความสำคัญต่อกระบวนการดูดซึมยาและกระบวนการขจัด simvastatin ได้แก่ พีไกลโคโปรตีนและ OATP1B1¹⁰³ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลจากน้ำเกรปฟรุ้ต แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างส้มโอกับยา simvastatin มาก่อน

งานวิจัยนี้จึงศึกษาอันตรกิริยาระหว่างระหว่างน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin โดยศึกษา ระดับยาในเลือดของหนูแรทและการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของพีไกลโคโปรตีนซึ่งเป็น efflux transporter ที่ถูกสร้างจากยีน *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในหนูแรท และศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของ OATP1B1 (*Oatp2* ในหนูแรท) ซึ่งเป็น influx transporter ที่ถูกสร้างจากยีน *Slc21a5* โดยศึกษาทั้งในเซลล์ตับและเซลล์ลำไส้เล็กของหนูแรท^{18, 19, 98} โดยมีสมมติฐานของ

การศึกษาคือน้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับของยา simvastatin ในเลือดของหนูแรทและสมมติฐานที่สองคือน้ำส้มโอมีผลลดการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในไมโครโซมจากเซลล์ตับและลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในเซลล์ตับและลำไส้เล็กของหนูแรท

5.1.1 น้ำส้มโอมีผลต่อการเพิ่มระดับของยา simvastatin ในเลือดของหนูแรท

ผลจากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) และการพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin และ simvastatin acid สนับสนุนสมมติฐานนี้โดยพบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดเฉลี่ย (C_{max}) และค่า $AUC_{0-\infty}$ ของทั้ง simvastatin และ simvastatin acid ในกลุ่มที่ได้รับยาพร้อมกับน้ำส้มโอมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาอย่างเดียวจึงส่งผลให้มีค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ของ simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้น ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Anlamlert และคณะ⁸⁸ ที่ศึกษาผลของเนื้อส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา cyclosporine ในอาสาสมัครเพศชายชาวไทยสุขภาพดีพบว่ากลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับเนื้อส้มโอร่วมกับยา cyclosporine จะมีค่าเฉลี่ยระดับ C_{max} และ $AUC_{0-\infty}$ ของระดับยา cyclosporine สูงขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นว่าเนื้อส้มโอมีผลไปเพิ่มชีวประสิทธิผลของระดับยา cyclosporine ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 เช่นเดียวกับยา simvastatin

การศึกษาของ Lin และคณะ ในปี ค.ศ.2011⁸⁸ ได้สนับสนุนสมมติฐานโดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอเมื่อให้ร่วมกับยา cyclosporine และยา tacrolimus พบว่าสารสกัดดังกล่าวจะเพิ่มระดับชีวประสิทธิผลของยาทั้งสองชนิดในหนูแรท เนื่องจากยาทั้งสองชนิดนี้จะถูกดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็กเมื่อได้รับสารสกัดดังกล่าวส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของพีไกลโคโปรตีนทำให้ยาไม่ถูกกำจัดออกจากบริเวณลำไส้เล็กจึงมีปริมาณยา cyclosporine และ tacrolimus มากขึ้น รวมไปถึงน้ำส้มโออาจมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในลำไส้เล็กและตับจึงเพิ่มปริมาณการดูดซึมยาทั้งสองชนิด

การศึกษาของ Lilja ในปี ค.ศ.2004¹¹ พบว่าเมื่ออาสาสมัครได้รับเกรปฟรุ้ตร่วมกับยา simvastatin มีค่าชีวประสิทธิผลของยา simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin อย่างเดียว นักวิจัยอ้างว่าเกรปฟรุ้ตรบกวนเมแทบอลิซึมของยา simvastatin โดยมีกลไกคือน้ำเกรปฟรุ้ตมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ซึ่งเป็น CYP3A4-mediated ที่มีผลต่อ first-pass metabolism บริเวณผนังลำไส้เล็กจึงทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างเกรปฟรุ้ตและยา simvastatin ได้ อันตบต่อไปคือเกิดสมดุลไดนามิกระหว่าง simvastatin และ simvastatin acid จึงทำให้ระดับการเพิ่มขึ้นของ simvastatin และ simvastatin acid เป็นจำนวนเท่าที่ไม่แตกต่างกัน

ฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ simvastatin และ simvastatin acid จะเพิ่มขึ้นเป็น 4 และ 3 เท่าตามลำดับซึ่งเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนเท่าที่ไม่แตกต่างกัน นั่นคือเกิดสภาวะสมดุลไดนามิกระหว่าง simvastatin และ simvastatin acid หลังได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin รวมไปถึงน้ำส้มโอมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทซึ่งเป็น first-pass metabolism ที่ตบทำให้ลดการกำจัด simvastatin acid แต่เพิ่มการดูดซึมยามากขึ้นส่งผลให้ระดับยาของ simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้นในหนูแรทซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดอันตรกิริยาระหว่างน้ำส้มโอและยา simvastatin แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการอธิบายการทำงานของน้ำส้มโอต่อการดูดซึมของยายังมีไม่มากนัก แต่มีการศึกษาในหลอดทดลอง^{58, 63, 99} ที่แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มโอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 และพีไกลโคโปรตีนซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจเป็นเหตุให้การได้รับน้ำส้มโอทำให้เกิดการดูดซึมยา simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้นในการทดลองนี้

5.1.2 น้ำส้มโอมีผลลดการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในเซลล์ตับของหนูแรท

ผลที่ได้จากการศึกษาการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ในเซลล์ตับสนับสนุนสมมติฐานนี้โดยพบว่าน้ำส้มโอมีผลลดการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทหลังได้รับน้ำส้มโอเป็นเวลา 7 วันทั้งในกลุ่มที่ได้รับเพียงน้ำส้มโอเท่านั้นและกลุ่มที่ได้รับร่วมกับยา

simvastatin ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในน้ำเกรปฟรุตที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ selectivity ต่อเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ใน human liver microsomes⁶⁰ และงานวิจัยที่ศึกษาผลของน้ำส้มโอต่อการลดการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในหลอดทดลอง⁶³ ซึ่งกลไกการเกิดการยับยั้งนักวิจัยอ้างว่าเนื่องมาจากองค์ประกอบที่ซับซ้อนในน้ำส้มโอสารประกอบสำคัญดังกล่าวจะไปจับกับเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ส่งผลให้เกิด irreversible deactivate ต่อเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในไมโครโซมจากเซลล์ตับของมนุษย์จึงส่งผลต่อการยับยั้งฤทธิ์ต่อเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4

มีรายงานถึงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ที่ส้มโอไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 โดยพบว่าสารประกอบเบอร์กามอทินแสดงฤทธิ์เป็น substrate-dependent inhibition¹⁰⁰ และยับยั้งเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ โดยสารประกอบเบอร์กามอทินเป็น mechanism-based, NADPH-dependent และเป็น CYP3A-dependent metabolism⁶⁸ ในการศึกษาจากหลอดทดลองด้วยไมโครโซมจากตับของมนุษย์¹⁰¹ นอกจากนี้พบว่าน้ำส้มโอก็ถูกระบุว่ามีกลไกเช่นเดียวกันกับเกรปฟรุต โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีฤทธิ์ไป inactivate เอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ในลำไส้เล็กของมนุษย์¹⁰² การศึกษาน้ำส้มโอในหลอดทดลองที่มีสารประกอบ bergamottin พบว่าแม้ว่าจะมีปริมาณที่น้อยกว่าในเกรปฟรุตแต่น้ำส้มโอก็มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ¹⁰³ รวมไปถึงสารประกอบ flavonoid เช่น สารประกอบ naringin ก็มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอในไมโครโซมของมนุษย์เช่นกัน¹⁰⁴

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.1.3 น้ำส้มโอมีผลต่อการลดการแสดงออกของ *Mdr1*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กและตับ

โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งยาบนผิวเซลล์ (membrane transport protein) เป็นตัวกำหนดที่สำคัญในการดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกาย การกระจายตัวของยาในร่างกายและการกำจัดยาออกจากร่างกาย โปรตีนเหล่านี้บางครั้งถูกยับยั้งการแสดงออกด้วยยาหรือสารแปลกปลอมที่เข้าไปในร่างกาย ทำให้ส่งผลต่อการทำงานของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* เป็นการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในการขับยาออกจากร่างกาย ส่วนเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* เป็นเอ็มอาร์เอ็นเอที่มีความสำคัญต่อการขนส่งยาเข้าสู่เซลล์⁹⁸

จากผลการศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในลำไส้เล็กของหนูแรทที่ได้รับน้ำส้มโอพบว่าการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ลดลงแต่การแสดงออกของ เอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำส้มโอก่อให้เกิด down regulated expression ของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* แต่ไม่มีผลต่อเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในเซลล์ลำไส้เล็กของหนูแรท การยับยั้งการแสดงออกของ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ทำให้อัตราและปริมาณการดูดซึมยา (Bioavailability) ในลำไส้เล็กเพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตาม ผลของน้ำส้มโอต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ในเซลล์ตับของหนูแรทให้ผลที่แตกต่าง โดยพบว่าน้ำส้มโอไม่มีผลต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* แต่มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำส้มโอก่อให้เกิด down regulated expression ของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* แต่ไม่มีผลต่อเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในเซลล์ตับของหนูแรท การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับที่ลดลงนั้นส่งผลให้การนำเข้าไปกำจัดในเซลล์ตับลดลงและทำให้ปริมาณยาในกระแสเลือดสูงขึ้น

จากผลการทดลองพบว่าเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ที่เซลล์ลำไส้เล็กและเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ที่เซลล์ตับไม่ถูกลดการแสดงออกนั้นขัดแย้งกับสมมติฐานที่ว่าน้ำส้มโอมีผลต่อการลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ทั้งสองเซลล์ การที่น้ำส้มโอมีผลต่อการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* แตกต่างกันในลำไส้เล็กและเซลล์ตับของหนูแรทอาจเป็นผลมาจากความจำเพาะในการแสดงออกของ transporter ในแต่ละตำแหน่งที่แตกต่างกัน (site-specificity) โดยพบว่าเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* แสดงออกอย่างจำเพาะที่เซลล์ตับ (liver-specific expression)^{105, 106}

จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าน้ำส้มโอมีผลต่อเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ในลำไส้เล็กและเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับของหนูแรทซึ่งสนับสนุนสมมติฐานของการวิจัย นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์ของน้ำส้มโอมีคุณสมบัติที่จำเพาะต่อตำแหน่ง (site specificity) โดยที่น้ำส้มโอมีฤทธิ์ลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ที่ลำไส้เล็กแต่ไม่แสดงผลที่ตับขณะที่น้ำส้มโอมีผลลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ตับแต่ไม่แสดงผลที่บริเวณลำไส้เล็กของหนูแรท

5.1.4 ข้อจำกัดของงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาผลของปริมาณน้ำส้มโอที่แตกต่างกัน โดยกำหนดให้หนูได้รับน้ำส้มโอในขนาดเดียวคือ 2 ml/kg จำนวน 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน หากกำหนดปริมาณน้ำส้มโอน้อยลง เช่น เป็นครั้งเดียวต่อวันอาจจะไม่ทำให้เห็นผลดังในการทดลองครั้งนี้ เช่นในการศึกษาของ Egashira และคณะ¹⁰⁹ ได้ศึกษาผลของการได้รับปริมาณความเข้มข้นของน้ำส้มโอที่แตกต่างกันต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา tacrolimus ในหนูแรท พบว่าหนูที่ได้รับน้ำส้มโอปริมาณความเข้มข้น 100% จะมีค่าชีวประสิทธิผลที่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูที่ได้รับน้ำส้มโอความเข้มข้น 50% ไม่แตกต่างกับหนูในกลุ่มควบคุมซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลกระทบนั้นขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำส้มโอที่ให้ (concentration dependence)

ข้อจำกัดของงานวิจัยอีกประการคือไม่ได้ตรวจวัดสารสำคัญในน้ำส้มโอ (พันธุ์ทองดี) ได้แก่สารประกอบ flavonoids และ furanocoumarins จึงไม่ทราบปริมาณที่แน่นอนของสารประกอบดังกล่าว นอกจากนี้ไม่ได้วัดการทำงานเทียบเคียงกับไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ4 ที่บริเวณลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นข้อจำกัดของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ในหนูแรทเพศผู้ที่ทำการตรวจวัดได้เฉพาะเซลล์ตับเท่านั้น รวมถึงไม่ทราบปริมาณของโปรตีนที่ถูกสร้างจากยีน *Mdr1a*, *Mdr1b* และ *Slc21a5* ทั้งเซลล์ตับและลำไส้เล็กซึ่งเป็นประเด็นที่ควรศึกษาต่อไป

5.2 สรุปผลการศึกษา (Conclusion)

การศึกษานี้พบว่าน้ำส้มโอมีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin โดยน้ำส้มโอมีผลยับยั้งการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* และ *Mdr1b* ซึ่งเป็น efflux transporter ที่สำคัญบริเวณลำไส้เล็กของหนูแรทส่งผลให้ simvastatin และ simvastatin acid ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กมากขึ้นและลดการขับยา simvastatin ออก ทำให้ปริมาณยา simvastatin และ simvastatin acid เพิ่มขึ้นในกระแสเลือด ในขณะเดียวกัน น้ำส้มโอมีผลต่อการลดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ซึ่งเป็น liver-specific influx transporter มีผลลดการทำลายยาจึงทำให้ปริมาณยา simvastatin เพิ่มขึ้นในร่างกายเช่นกัน นอกจากนี้ น้ำส้มโอที่เข้าสู่เซลล์ตับได้มีผลลดการทำงานของไอโซเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2 ซึ่งส่งเสริมการลดการทำลายยา simvastatin ทำให้ชีวประสิทธิผลของยาเพิ่มขึ้นในร่างกายด้วยเช่นกัน

การรับประทานร่วมกันระหว่างน้ำส้มโอกับยา simvastatin หรือยาที่มีความใกล้เคียงกับยา simvastatin อาจก่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างกันได้จึงต้องพึงระวังฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของน้ำส้มโอกับยาชนิดต่างๆที่มีความเป็นไปได้ที่จะได้รับร่วมกัน รวมถึงใช้เป็นข้อมูลความปลอดภัยเบื้องต้นสำหรับผู้ป่วยได้

รายการอ้างอิง

1. Chinwong D, Patumanond J, Chinwong S, Siriwattana K, Gunaparn S, Hall JJ, et al. Statin therapy in patients with acute coronary syndrome: low-density lipoprotein cholesterol goal attainment and effect of statin potency. *Therapeutics and clinical risk management*. 2015;11:127.
2. Farnier M, Davignon J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. *The American journal of cardiology*. 1998;82(4):3J-10J.
3. Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L, Yu X, Zhao JJ, et al. In vitro metabolism of simvastatin in humans [SBT] identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P4 5 0 s. *Drug Metabolism and Disposition*. 1997;25(10):1191-9.
4. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2005;19(1):117-25.
5. Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clinical pharmacokinetics*. 2002;41(5):343-70.
6. Kyrklund C, Backman JT, Kivistö KT, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ. Rifampin greatly reduces plasma simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2000;68(6):592-7.
7. Bellosa S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins. *Circulation*. 2004;109(23 suppl 1):III-50-III-7.
8. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;80(6):565-81.
9. Sugimoto Ki, Ohmori M, Tsuruoka S, Nishiki K, Kawaguchi A, Harada Ki, et al. Different effects of St John's wort on the pharmacokinetics of simvastatin and pravastatin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001;70(6):518-24.
10. Dai L-L, Fan L, Wu H-Z, Tan Z-R, Chen Y, Peng X-D, et al. Assessment of a pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between simvastatin and Ginkgo biloba extracts in healthy subjects. *Xenobiotica*. 2013;43(10):862-7.

11. Lilja JJ, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Effects of regular consumption of grapefruit juice on the pharmacokinetics of simvastatin. *British journal of clinical pharmacology*. 2004;58(1):56-60.
12. Morton J. Pummelo. *Fruits of warm climates*'(Ed JF Morton) pp. 1987:147-51.
13. Mäkyänen K, Jitsaardkul S, Tachasamran P, Sakai N, Puranachoti S, Nirojsinlapachai N, et al. Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. *Food chemistry*. 2013;139(1):735-43.
14. Guo L-Q, Yamazoe Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2004;25(2):129-36.
15. Wagstaff DJ. Dietary exposure to furocoumarins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1991;14(3):261-72.
16. Kim H, Yoon Y-J, Shon J-H, Cha I-J, Shin J-G, Liu K-H. Inhibitory effects of fruit juices on CYP3A activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006;34(4):521-3.
17. De Schryver N, Wittebole X, Van den Bergh P, Haufroid V, Goffin E, Hantson P. Severe rhabdomyolysis associated with simvastatin and role of ciprofloxacin and amlodipine coadministration. *Case reports in nephrology*. 2015;2015.
18. Holtzman CW, Wiggins BS, Spinler SA. Role of P-glycoprotein in Statin Drug Interactions. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2006;26(11):1601-7.
19. Takeuchi T, Yoshitomi S, Higuchi T, Ikemoto K, Niwa S-I, Ebihara T, et al. Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1. *Pharmaceutical research*. 2006;23(7):1460-72.
20. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2003;1609(1):1-18.
21. Wójcikowski J, Haduch A, Daniel WA. Effect of classic and atypical neuroleptics on cytochrome P450 3A (CYP3A) in rat liver. *Pharmacological Reports*. 2012;64(6):1411-8.
22. Amarenco P, Labreuche J, Lavallée P, Touboul P-J. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis. *Stroke*. 2004;35(12):2902-9.

23. Mauro VF, MacDonald JL. Simvastatin: a review of its pharmacology and clinical use. *Dicp.* 1991;25(3):257-64.
24. คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ค. เกสัชวิทยา. 2555;ฉบับปรับปรุงใหม่ 2555.
25. Bays HE, Jones PH, Orringer CE, Brown WV, Jacobson TA. National lipid association annual summary of clinical lipidology 2016. *Journal of clinical lipidology.* 2016;10(1):S1-S43.
26. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama.* 2002;287(3):356-9.
27. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2001;5(4):378-87.
28. Plosker GL, McTavish D. Simvastatin. *Drugs.* 1995;50(2):334-63.
29. Pedersen TR, Tobert JA. Simvastatin: a review. *Expert opinion on pharmacotherapy.* 2004;5(12):2583-96.
30. Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *The American journal of cardiology.* 2003;91(4):4-8.
31. Gazzero P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, et al. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacological reviews.* 2012;64(1):102-46.
32. Vickers S, Duncan C, Chen I-W, Rosegay A, Duggan D. Metabolic disposition studies on simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug. *Drug Metabolism and Disposition.* 1990;18(2):138-45.
33. Todd PA, Goa KL. Simvastatin. *Drugs.* 1990;40(4):583-607.
34. Lennernäs H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clinical pharmacokinetics.* 1997;32(5):403-25.
35. Pan HY, DeVault AR, Wang-Iverson D, Ivashkiv E, Swanson BN, Sugerman AA. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin and lovastatin. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 1990;30(12):1128-35.
36. Germershausen JI, Hunt VM, Bostedor RG, Bailey PJ, Karkas JD, Alberts AW. Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and

- pravastatin in rats in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;158(3):667-75.
37. Aura A-M, Mattila I, Hyötyläinen T, Gopalacharyulu P, Bounsaythip C, Orešič M, et al. Drug metabolome of the simvastatin formed by human intestinal microbiota in vitro. *Molecular BioSystems*. 2011;7(2):437-46.
38. Prueksaritanont T, Ma B, Yu N. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *British journal of clinical pharmacology*. 2003;56(1):120-4.
39. O'Sullivan S. Statins: A review of benefits and risks. *TSMJ*. 2007;8:52-6.
40. Pasternak RC, Smith SC, Bairey-Merz CN, Grundy SM, Cleeman JI, Lenfant C. ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. *Circulation*. 2002;106(8):1024-8.
41. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *Jama*. 2003;289(13):1681-90.
42. Cressman M, Hoogwerf B, Moodie D, Olin J, Weinstein C. HMG-CoA reductase inhibitors. A new approach to the management of hypercholesterolemia. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 1987;55(1):93-100.
43. Goldman JA, Fishman AB, Lee JE, Johnson RJ. The role of cholesterol-lowering agents in drug-induced rhabdomyolysis and polymyositis. *Arthritis & Rheumatology*. 1989;32(3):358-9.
44. Neuvonen PJ. Drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors (statins): the importance of CYP enzymes, transporters and pharmacogenetics. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*. 2010;11(3):323-32.
45. Wanner C, Krämer-Guth A, Galle J. Use of HMG-CoA reductase inhibitors after kidney and heart transplantation. *BioDrugs*. 1997;8(5):387-93.
46. Boonmuang P, Nathisuwan S, Chaiyakunapruk N, Suwanekesawong W, Pokhagul P, Teerawattanapong N, et al. Characterization of statin-associated myopathy case reports in Thailand using the health product vigilance center database. *Drug safety*. 2013;36(9):779-87.

47. Kellick KA, Bottorff M, Toth PP. A clinician's guide to statin drug-drug interactions. *Journal of clinical lipidology*. 2014;8(3):S30-S46.
48. Muntingh G. An overview of interactions between grapefruit juice and drugs. *SA Pharmaceutical Journal*. 2011;78(8):40-5.
49. Scora RW, Nicolson DH. The correct name for the shaddock, *Citrus maxima*, not *C. grandis* (Rutaceae). *Taxon*. 1986:592-5.
50. Arias BA, Ramón-Laca L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;97(1):89-95.
51. Suarez J, Herrera M, Marhuenda E. In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine*. 1998;5(6):469-73.
52. Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug discovery today*. 2007;12(19):879-89.
53. Myers-Payne SC, Hui DY, Brockman HL, Schroeder F. Cholesterol esterase: a cholesterol transfer protein. *Biochemistry*. 1995;34(12):3942-7.
54. Insull Jr W. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *Southern medical journal*. 2006;99(3):257-74.
55. Saita T, Fujito H, Mori M. Screening of furanocoumarin derivatives in citrus fruits by enzyme-linked immunosorbent assay. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(7):974-7.
56. Mokbel MS, Sukanuma T. Antioxidant and antimicrobial activities of the methanol extracts from pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) fruit albedo tissues. *European Food Research and Technology*. 2006;224(1):39-47.
57. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*. 2002;139(1):1-21.
58. Lim S-L, Lim L-Y. Effects of citrus fruit juices on cytotoxicity and drug transport pathways of Caco-2 cell monolayers. *International journal of pharmaceutics*. 2006;307(1):42-50.

59. Mandery K, Balk B, Bujok K, Schmidt I, Fromm MF, Glaeser H. Inhibition of hepatic uptake transporters by flavonoids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;46(1):79-85.
60. Tassaneeyakul W, Guo L-Q, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;378(2):356-63.
61. Egashira K, Fukuda E, Onga T, Yogi Y, Matsuya F, Koyabu N, et al. Pomelo-induced increase in the blood level of tacrolimus in a renal transplant patient. *Transplantation*. 2003;75(7):1057.
62. จักรทอง ส. Bergamottin and Its Role as Inhibitors of CYP3A4. *KKU Science Journal* 2012;40(4):1025-35.
63. Egashira K, Ohtani H, Itoh S, Koyabu N, Tsujimoto M, Murakami H, et al. Inhibitory effects of pomelo on the metabolism of tacrolimus and the activities of CYP3A4 and P-glycoprotein. *Drug metabolism and disposition*. 2004;32(8):828-33.
64. Danielson P. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current drug metabolism*. 2002;3(6):561-97.
65. Goodman LS. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*: McGraw-Hill New York; 1996.
66. Wilkinson GR. Cytochrome P450 3A (CYP3A) metabolism: Prediction of *In Vivo* activity in humans. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 1996;24(5):475-90.
67. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2006;2(6):875-94.
68. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997;283(3):1552-62.
69. Kantola T, Kivistö KT, Neuvonen PJ. Erythromycin and verapamil considerably increase serum simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1998;64(2):177-82.

70. Gonzalez FJ, Nebert D, Hardwick J, Kasper C. Complete cDNA and protein sequence of a pregnenolone 16 α -carbonitrile-induced cytochrome P-450. A representative of a new gene family. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(12):7435-41.
71. Gonzalez FJ, Song B-J, Hardwick JP. Pregnenolone 16 α -carbonitrile-inducible P-450 gene family: gene conversion and differential regulation. *Molecular and Cellular Biology*. 1986;6(8):2969-76.
72. Kirita S, Matsubara T. cDNA cloning and characterization of a novel member of steroid-induced cytochrome P450 3A in rats. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1993;307(2):253-8.
73. Wang H, Kawashima H, Strobel HW. cDNA Cloning of a Novel CYP3A from Rat Brain. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;221(1):157-62.
74. Matsubara T, Kim H, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004;309(3):1282-90.
75. Yamazoe Y, Murayama N, Shimada M, Yamauchi K, Nagata K, Imaoka S, et al. A sex-specific form of cytochrome P-450 catalyzing propoxycoumarin O-depropylation and its identity with testosterone 6 β -hydroxylase in untreated rat livers: reconstitution of the activity with microsomal lipids. *The Journal of Biochemistry*. 1988;104(5):785-90.
76. Robertson GR, Farrell GC, Liddle C. Sexually dimorphic expression of rat CYP3A9 and CYP3A18 genes is regulated by growth hormone. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;242(1):57-60.
77. Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, SAWADA Y. Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1998;21(10):1062-6.
78. Tian R, Koyabu N, Takanaga H, Matsuo H, Ohtani H, Sawada Y. Effects of grapefruit juice and orange juice on the intestinal efflux of P-glycoprotein substrates. *Pharmaceutical research*. 2002;19(6):802-9.

79. Lim S-L, Tan M, Lim L-Y. Effects of citrus fruit juices on P-glycoprotein-mediated transport in L-MDR1 cells and CYP3A4-mediated metabolism in human intestinal microsomes. *Tree Forestry Sci Biotech*. 2008;2:102-11.
80. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacological reviews*. 2011;63(1):157-81.
81. Bailey D, Dresser G, Leake B, Kim R. Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007;81(4):495-502.
82. Dolton MJ, Roufogalis BD, McLachlan AJ. Fruit Juices as Perpetrators of Drug Interactions: The Role of Organic Anion-Transporting Polypeptides. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2012;92(5):622-30.
83. Al-Ghazawi MA, Tutunji MS, AbuRuz SM. The effects of pummelo juice on pharmacokinetics of sildenafil in healthy adult male Jordanian volunteers. *European journal of clinical pharmacology*. 2010;66(2):159-63.
84. Butterweck V, Zdrojewski I, Galloway C, Frye R, Derendorf H. Toxicological and pharmacokinetic evaluation of concomitant intake of grapefruit juice and simvastatin in rats after repeated treatment over 28 days. *Planta medica*. 2009;75(11):1196-202.
85. Hou Y-C, Hsiu S-L, Tsao C-W, Wang Y-H, Chao P-DL. Acute intoxication of cyclosporin caused by coadministration of decoctions of the fruits of *Citrus aurantium* and the pericarps of *Citrus grandis*. *Planta medica*. 2000;66(07):653-5.
86. Grenier J, Fradette C, Morelli G, Merritt GJ, Vrandeć M, Ducharme MP. Pomelo juice, but not cranberry juice, affects the pharmacokinetics of cyclosporine in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;79(3):255-62.
87. Anlamlert W, Sermsappasuk P, Yokubol D, Jones S. Pomelo enhances cyclosporine bioavailability in healthy male Thai volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2015;55(4):377-83.
88. Lin S-P, Chao P-DL, Tsai S-Y, Wang M-J, Hou Y-C. *Citrus grandis* peel increases the bioavailability of cyclosporine and tacrolimus, two important immunosuppressants, in rats. *Journal of medicinal food*. 2011;14(11):1463-8.

89. Huang SM, Lesko LJ. Drug-Drug, Drug—Dietary Supplement, and Drug—Citrus Fruit and Other Food Interactions: What Have We Learned? *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2004;44(6):559-69.
90. Fugh-Berman A. Herb-drug interactions. *The Lancet*. 2000;355(9198):134-8.
91. แก้วกั้งวาล จ. ตำราการวิจัยทางคลินิก. 2554;1:107.
92. Bangphumi K, Kittiviriyakul C, Towiwat P, Rojsitthisak P, Khemawoot P. Pharmacokinetics of Curcumin Diethyl Disuccinate, a Prodrug of Curcumin, in Wistar Rats. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2016;41(6):777-85.
93. Ahmed TA, Horn J, Hayslip J, Leggas M. Validated LC–MS/MS method for simultaneous determination of SIM and its acid form in human plasma and cell lysate: Pharmacokinetic application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2012;2(6):403-11.
94. Xu D, Li F, Zhang M, Zhang J, Liu C, Hu M-y, et al. Decreased exposure of simvastatin and simvastatin acid in a rat model of type 2 diabetes. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014;35(9):1215-25.
95. Juřica J, Dostálek M, Konečný J, Glatz Z, Hadařová E, Tomandl J. HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats. *Journal of Chromatography B*. 2007;852(1):571-7.
96. Jemal M, Ouyang Z, Powell ML. Direct-injection LC–MS–MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2000;23(2):323-40.
97. Kane GC, Lipsky JJ, editors. *Drug–grapefruit juice interactions*. Mayo Clinic Proceedings; 2000: Elsevier.
98. Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenetics and genomics*. 2006;16(12):873-9.
99. Xu J, Go ML, Lim L-Y. Modulation of digoxin transport across Caco-2 cell monolayers by citrus fruit juices: lime, lemon, grapefruit, and pummelo. *Pharmaceutical research*. 2003;20(2):169-76.
100. Paine MF, Criss AB, Watkins PB. Two major grapefruit juice components differ in time to onset of intestinal CYP3 A4 inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;312(3):1151-60.

101. Lin H-l, Kent UM, Hollenberg PF. The grapefruit juice effect is not limited to cytochrome P450 (P450) 3A4: evidence for bergamottin-dependent inactivation, heme destruction, and covalent binding to protein in P450s 2B6 and 3A5. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;313(1):154-64.
102. Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. Seville orange juice-felodipine interaction: Comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001;69(1):14-23.
103. Guo L-Q, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000;28(7):766-71.
104. Miniscalco A, Lundahl J, Regårdh C, Edgar B, Eriksson U. Inhibition of dihydropyridine metabolism in rat and human liver microsomes by flavonoids found in grapefruit juice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1992;261(3):1195-9.
105. Enokizono J, Kusuhara H, Sugiyama Y. Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases. *Drug metabolism and disposition*. 2007;35(6):922-8.
106. Lacombe O, Woodley J, Solleux C, Delbos J-M, Boursier-Neyret C, Houin G. Localisation of drug permeability along the rat small intestine, using markers of the paracellular, transcellular and some transporter routes. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2004;23(4):385-91.



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน simvastatin, simvastatin acid และ lovastatin ในพลาสมาหนูแรท สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

1.1) การเตรียมสารละลายของ simvastatin เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 4, 2, 0.4 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ความเข้มข้นละ 5 μl spiked ลงใน mobile phase หรือ plasma ให้ได้ปริมาตรรวม 200 μl จะได้ simvastatin ใน mobile phase หรือ plasma ที่ความเข้มข้น 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 ng/ml ตามลำดับ

1.1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 $\mu\text{g/ml}$ จาก 1,000 $\mu\text{g/ml}$ (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \mu\text{g/ml})V_1 &= (10 \mu\text{g/ml}) (500 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 5 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin เท่ากับ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 5 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 495 μl จะได้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$

1.1.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1,000 ng/ml จาก 10 $\mu\text{g/ml}$ simvastatin

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (10,000 \text{ ng/ml}) V_1 &= (1,000 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 100 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin 10,000 ng/ml จำนวน 100 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 900 μl จะได้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml

1.1.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 80 ng/ml จาก 1,000 ng/ml simvastatin

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (80 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 8 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin 1,000 ng/ml จำนวน 8 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 992 μl จะได้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 80 ng/ml

1.1.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 40 ng/ml จาก 80 ng/ml simvastatin

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (80 \text{ ng/ml})V_1 &= (40 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 500 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin 80 ng/ml จำนวน 500 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 500 μl จะได้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 40 ng/ml

1.1.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 ng/ml จาก 40 ng/ml simvastatin

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (40 \text{ ng/ml})V_1 &= (20 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 500 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin 40 ng/ml จำนวน 500 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 500 μl จะได้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml

1.1.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 4 ng/ml จาก 20 ng/ml simvastatin

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (20 \text{ ng/ml})V_1 &= (4 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin 20 ng/ml จำนวน 200 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 800 μl จะได้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 4 ng/ml

1.1.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2 ng/ml จาก 4 ng/ml simvastatin

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (4 \text{ ng/ml})V_1 &= (2 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 500 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin 4 ng/ml จำนวน 500 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 500 μl จะได้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 2 ng/ml

1.1.8) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.4 ng/ml จาก 2 ng/ml simvastatin

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (2 \text{ ng/ml})V_1 &= (0.4 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin 2 ng/ml จำนวน 200 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 800 μl จะได้ simvastatin ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/ml

1.2) การเตรียมสารละลายของ simvastatin acid เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 4, 2, 0.4 ng/ml โดยทำ serial solution จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10 µg/ml แล้วนำสารมาตรฐานที่ได้ความเข้มข้นละ 5 µl spiked ลงใน mobile phase หรือ plasma ให้ได้ปริมาตรรวม 200 µl จะได้ simvastatin acid ใน mobile phase หรือ plasma ที่ความเข้มข้น 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 ng/ml ตามลำดับ

1.2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 µg/ml จาก 1,000 µg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \mu\text{g/ml})V_1 &= (10 \mu\text{g/ml}) (500 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 5 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin acid เท่ากับ 1,000 µg/ml จำนวน 5 µl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 495 µl จะได้ simvastatin acid ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml

1.2.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 1,000 ng/ml จาก 10 µg/ml simvastatin acid

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (10,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (1,000 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 100 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin acid 10,000 ng/ml จำนวน 100 µl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 900 µl จะได้ simvastatin acid ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml

1.2.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 80 ng/ml จาก 1,000 ng/ml simvastatin acid

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (80 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 8 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin acid 1,000 ng/ml จำนวน 8 µl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 992 µl จะได้ simvastatin acid ที่ความเข้มข้น 80 ng/ml

1.2.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 40 ng/ml จาก 80 ng/ml simvastatin acid

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (80 \text{ ng/ml})V_1 &= (40 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 500 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin acid 80 ng/ml จำนวน 500 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 500 μl จะได้ simvastatin acid ที่ความเข้มข้น 40 ng/ml

1.2.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 ng/ml จาก 40 ng/ml simvastatin acid

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (40 \text{ ng/ml})V_1 &= (20 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 500 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin acid 40 ng/ml จำนวน 500 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 500 μl จะได้ simvastatin acid ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml

1.2.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 4 ng/ml จาก 20 ng/ml simvastatin acid

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (20 \text{ ng/ml})V_1 &= (4 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin acid 20 ng/ml จำนวน 200 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 800 μl จะได้ simvastatin acid ที่ความเข้มข้น 4 ng/ml

1.2.7) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2 ng/ml จาก 4 ng/ml simvastatin acid

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (4 \text{ ng/ml})V_1 &= (2 \text{ ng/ml}) (1,000 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 500 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin acid 4 ng/ml จำนวน 500 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 500 μl จะได้ simvastatin acid ที่ความเข้มข้น 2 ng/ml

1.2.8) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.4 ng/ml จาก 2 ng/ml simvastatin acid

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (2 \text{ ng/ml})V_1 &= (0.4 \text{ ng/ml}) (1,000 \text{ } \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \text{ } \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลายความเข้มข้นของ simvastatin acid 4 ng/ml จำนวน 200 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 800 μl จะได้ simvastatin acid ที่ความเข้มข้น 2 ng/ml

1.3) การเตรียมสารละลายของ lovastatin เพื่อใช้เป็น internal standard ของ simvastatin และ simvastatin acid

1.3.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ (100,000 ng/ml)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (100,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (1,000 \text{ ng/ml})(1,000 \text{ } \mu\text{l}) \\ V_1 &= 10 \text{ } \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นจะต้องใช้ lovastatin ความเข้มข้น 100,000 ng/ml ปริมาตร 10 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 990 μl จะได้ lovastatin ความเข้มข้น 1,000 ng/ml

1.3.2) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3.5 ng/ml จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1000 ng/ml

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (1,000 \text{ ng/ml})V_1 &= (3.5 \text{ ng/ml})(1,000 \text{ } \mu\text{l}) \\ V_1 &= 3.5 \text{ } \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นจะต้องใช้ lovastatin ความเข้มข้น 1,000 ng/ml ปริมาตร 3.5 μl และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile 996.5 μl จะได้ lovastatin ความเข้มข้น 3.5 ng/ml

2) การเตรียมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในการแยกสาร simvastatin, simvastatin acid และ lovastatin

2.1) เตรียมสารละลาย ammonium acetate ความเข้มข้น 10mM ปริมาตร 500 ml pH=5.00

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad N &= g/M_w = CV/1,000 \\ g/77.08 &= (10 \times 10^{-3} M)(500)/1000 \\ g &= 0.3854 \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องชั่ง ammonium acetate เท่ากับ 0.3854 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 ml จากนั้นปรับ pH ด้วย acetic acid เท่ากับ 5.00

3) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 1'-Hydroxymidazolam (standard solution)

สารละลายมาตรฐานที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

3.1) การเตรียมสารละลายของ 1'-Hydroxymidazolam เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50, 40, 20, 10, 5, 2.5 µg/ml แล้วนำสารละลายมาตรฐานที่ได้ปริมาตรละ 10 µl เติมลงในสารละลายหรือในไมโครโซมปริมาตรรวม 50 µl จะได้สารละลายหรือไมโครโซมที่มี 1'-Hydroxymidazolam ความเข้มข้น 10, 8, 4, 2, 1, 0.5 µg/ml ตามลำดับ

3.1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 50 µg/ml จาก 1000 µg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ (1000 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (50 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 20 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1'-Hydroxymidazolam ความเข้มข้น 1000 µg/ml ปริมาตร 20 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 380 µl จะได้ 1'-Hydroxymidazolam ที่มีความเข้มข้น 50 µg/ml

3.1.2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 40 µg/ml จาก 50 µg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (50 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (40 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 320 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1'-Hydroxymidazolam ความเข้มข้น 50 µg/ml ปริมาตร 320 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 60 µl จะได้ 1'-Hydroxymidazolam ที่มีความเข้มข้น 40 µg/ml

3.1.3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 20 µg/ml จาก 30 µg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (30 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (20 \mu\text{g/ml}) (360 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 240 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1'-Hydroxymidazolam ความเข้มข้น 30 µg/ml ปริมาตร 240 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 120 µl จะได้ 1'-Hydroxymidazolam ที่มีความเข้มข้น 20 µg/ml

3.1.4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 µg/ml จาก 20 µg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (20 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (10 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1'-Hydroxymidazolam ความเข้มข้น 20 µg/ml ปริมาตร 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 200 µl จะได้ 1'-Hydroxymidazolam ที่มีความเข้มข้น 10 µg/ml

3.1.5) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 10 µg/ml จาก 5 µg/ml (stock solution)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณจาก} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ (10 \mu\text{g/ml}) V_1 &= (5 \mu\text{g/ml}) (400 \mu\text{l}) \\ V_1 &= 200 \mu\text{l} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1'-Hydroxymidazolam ความเข้มข้น 10 µg/ml ปริมาตร 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 200 µl จะได้ 1'-Hydroxymidazolam ที่มีความเข้มข้น 5 µg/ml

3.1.6) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2.5 µg/ml จาก 5 µg/ml (stock solution)

คำนวณจาก $C_1V_1 = C_2V_2$
 $(5 \text{ µg/ml}) V_1 = (2.5 \text{ µg/ml}) (400 \text{ µl})$
 $V_1 = 200 \text{ µl}$

ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1'-Hydroxymidazolam ความเข้มข้น 5 µg/ml ปริมาตร 200 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol 200 µl จะได้ 1'-Hydroxymidazolam ที่มีความเข้มข้น 2.5 µg/ml

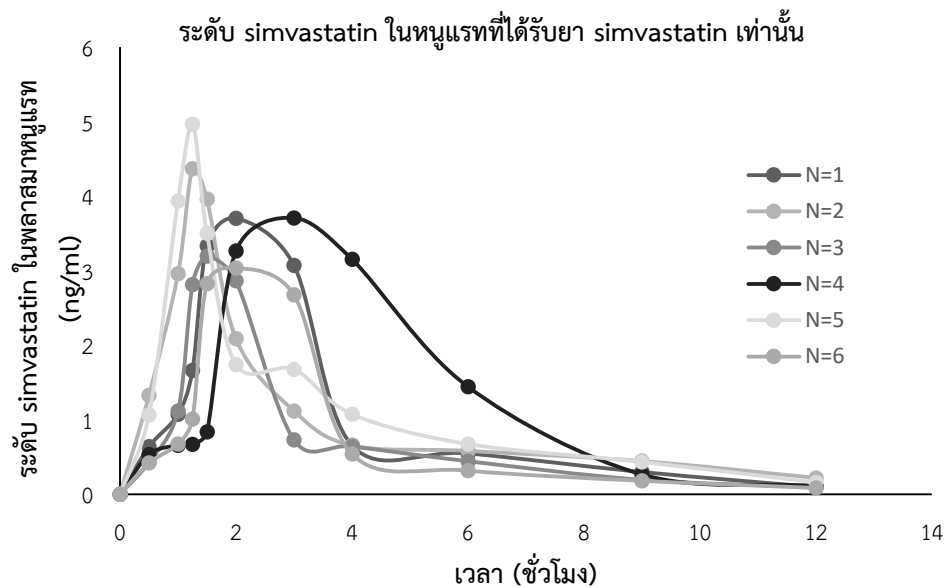
3.2) เตรียมสารละลายของ Diazepam ที่ความเข้มข้น 40 µg/ml จาก 1,000 µg/ml ปริมาตร 1ml

คำนวณจาก $C_1V_1 = C_2V_2$
 $(1,000 \text{ µg/ml}) V_1 = (40 \text{ µg/ml}) (1,000 \text{ µl})$
 $V_1 = 40 \text{ µl}$

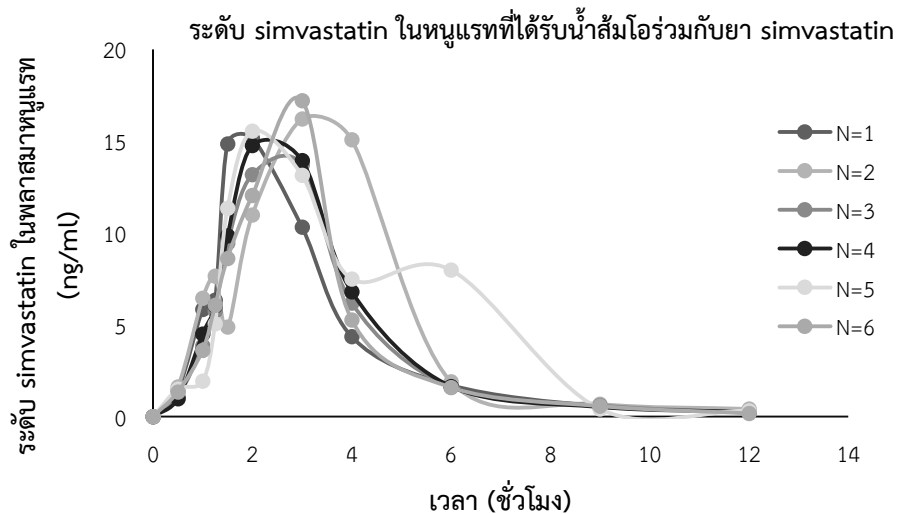
ดังนั้นต้องใช้สารละลาย 1,000 µg/ml Diazepam 40 µl และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 1,000 µl จะได้ Diazepam ที่มีความเข้มข้น 40 µg/ml

4. ระดับซิมวาสแตตินในพลาสมาของหนูแรทหลังได้รับยาซิมวาสแตติน

ภาพที่ 15-16 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับ simvastatin ในพลาสมาหนูแรทกับเวลาหลังจากได้รับยา simvastatin ในกลุ่มหนูแรทที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น (20 mg/kg) และกลุ่มหนูแรทที่ได้รับส้มโอ (2ml/kg-7day) ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg)



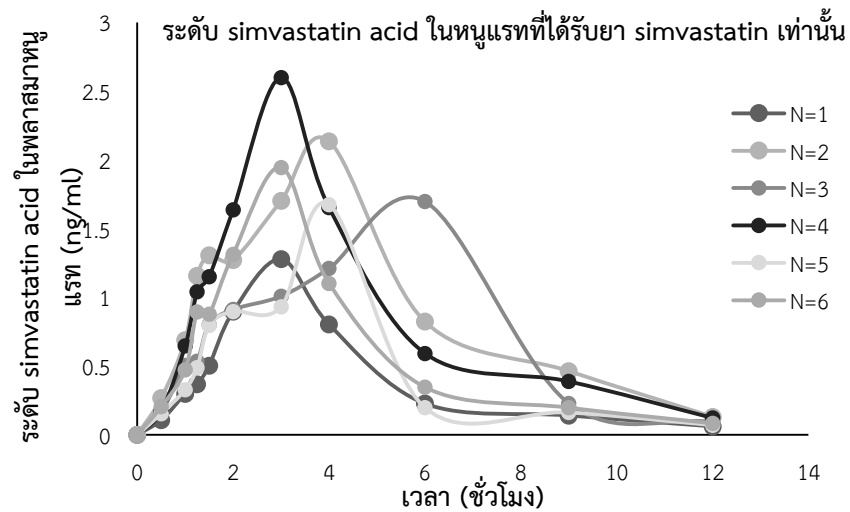
ภาพที่ 15 แสดงระดับความเข้มข้นของ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (20 mg/kg) เท่านั้น



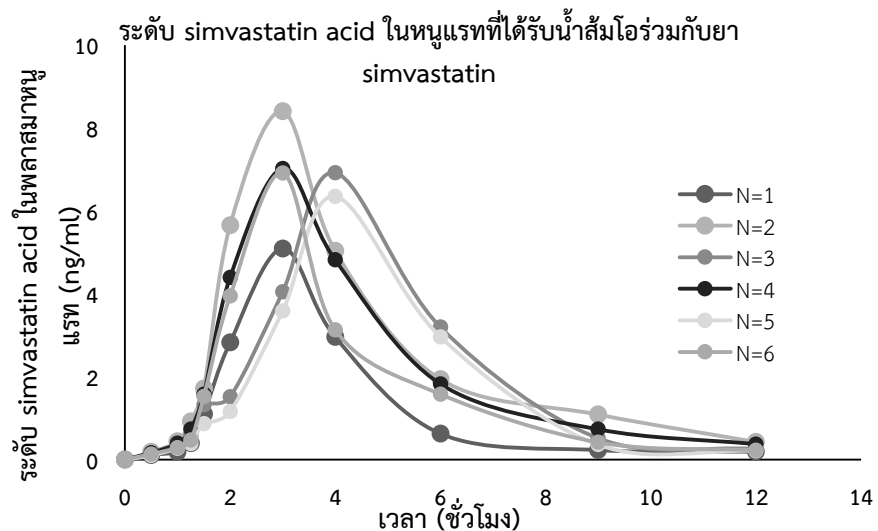
ภาพที่ 16 แสดงระดับความเข้มข้นของ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้น้ำส้มโอ (2 ml/kg-7days)ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg)

5. ระดับ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทหลังได้รับยา simvastatin

ภาพที่ 17-18 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับ simvastatin acid ในพลาสมาหนูแรท กับเวลาหลังจากได้รับยา simvastatin ในกลุ่มหนูแรทที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น (20 mg/kg) และกลุ่มหนูแรทที่ได้รับส้มโอ (2ml/kg-7day) ร่วมกับยา simvastatin (20 mg/kg)



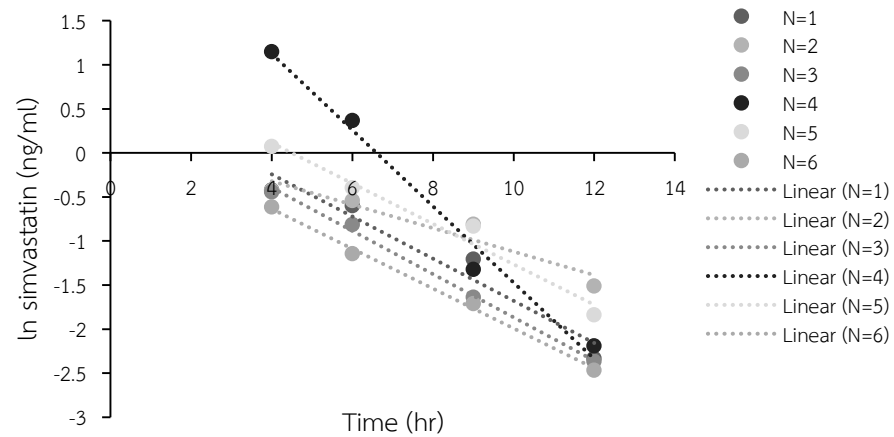
ภาพที่17 แสดงระดับความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (20mg/kg) เท่านั้น



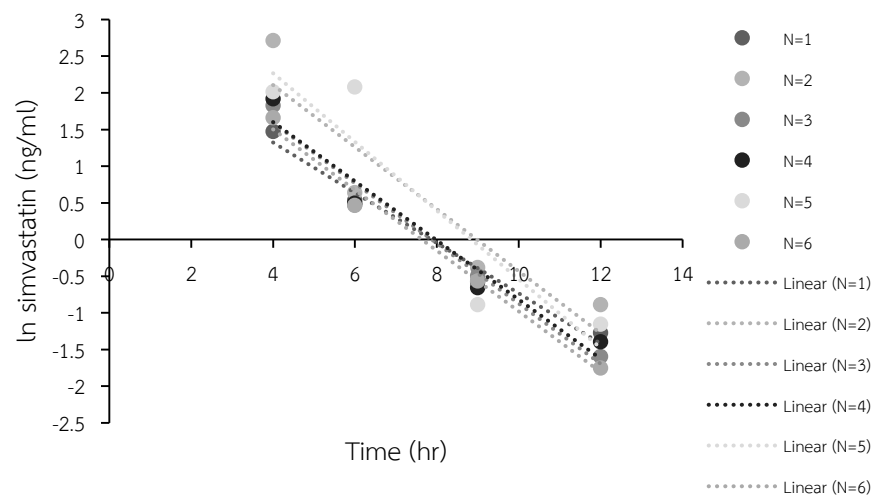
ภาพที่18 แสดงระดับความเข้มข้นของ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอ (2 ml/kg-7days) ร่วมกับยา simvastatin (20mg/kg)

6. การหาค่าความชันเพื่อหาค่า K_{el}

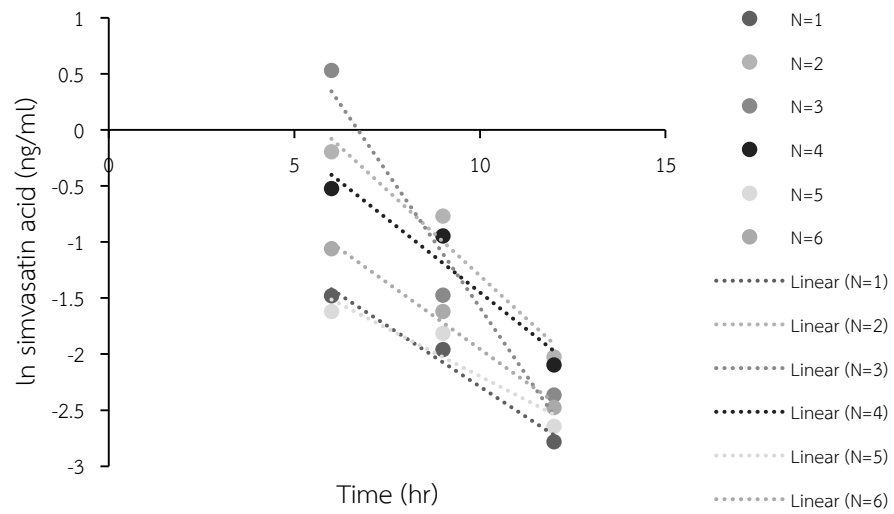
จากกราฟเส้นตรง \ln simvastatin และ \ln simvastatin acid กับเวลา ดังแสดงในภาพที่ 19-22 (โดยค่าความชันที่ได้จะแสดงในค่าพารามิเตอร์ในตารางที่ 8-9)



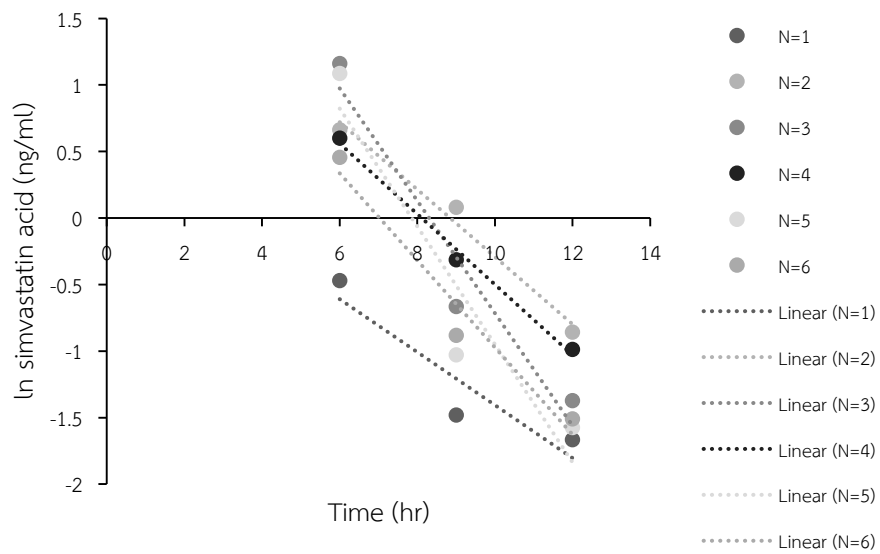
ภาพที่ 19 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง \ln simvastatin และเวลาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น



ภาพที่ 20 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง \ln simvastatin และเวลาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin



ภาพที่ 21 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln simvastatin acid และเวลาของหนูแรทก
 กลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น



ภาพที่ 22 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln simvastatin acid และเวลาของหนูแรทก
 กลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin

7. ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin ในหนูแรท

ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ simvastatin และ simvastatin acid ในหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้นและหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin เปรียบเทียบความแตกต่างแสดงในตารางที่ 8 และตารางที่ 9

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบระดับ simvastatin ในพลาสมาของหนูแรทระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin เท่านั้น (20mg/kg) และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin (20mg/kg)

group	Pharmacokinetic parameters					
	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (hr)	AUC ₀₋₁₂ (ng·hr/ml)	AUC _{0-∞} (ng·hr/ml)	K _{el} (hr ⁻¹)	t _{1/2} (hr)
Simvastatin group						
N=1	3.70	2.00	9.39	9.80	0.24	2.90
N=2	4.37	1.25	10.99	11.68	0.32	2.14
N=3	3.19	1.50	7.59	7.84	0.38	1.85
N=4	3.71	3.00	8.90	9.16	0.43	1.60
N=5	4.96	1.25	12.31	12.68	0.42	1.64
N=6	3.04	2.00	6.83	7.06	0.36	1.95
mean±SD	3.82±0.75	1.83±0.67	9.34±2.06	9.70±2.17	0.36±0.07	2.01±0.48
Combine group						
N=1	15.16	2.00	39.12	40.18	0.26	2.64
N=2	16.22	3.00	43.47	44.74	0.32	2.15
N=3	13.71	3.00	36.24	36.89	0.31	2.23
N=4	14.76	2.00	38.68	39.5	0.30	2.33
N=5	13.14	3.00	44.34	45.13	0.40	1.72
N=6	17.21	3.00	34.33	34.74	0.41	1.67
Mean±SD	15.03±1.52	2.67±0.52	39.36±3.93	40.20±4.15	0.34±0.06	2.32±0.11
p-value	0.000**	0.068	0.000**	0.000**	0.56	0.67

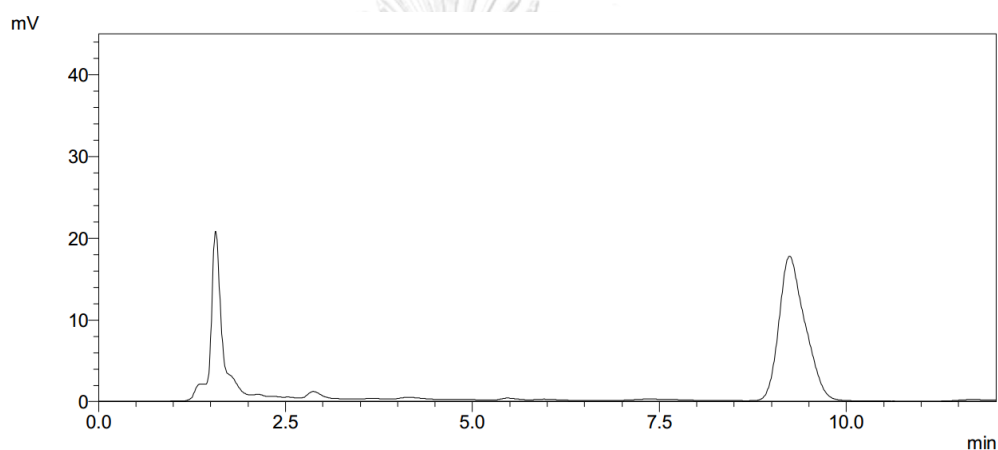
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบระดับ simvastatin acid ในพลาสมาของหนูแระระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับ ยา simvastatin เท่านั้น (20mg/kg) และหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำส้มโอร่วมกับยา simvastatin (20mg/kg)

group	Pharmacokinetic parameters					
	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (hr)	AUC_{0-12} (ng·hr/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/ml)	K_{el} (hr ⁻¹)	$t_{1/2}$ (hr)
Simvastatin group						
N=1	1.28	3.00	4.85	5.14	0.22	3.19
N=2	2.14	4.00	10.27	10.70	0.31	2.27
N=3	1.70	6.00	7.25	7.48	0.42	1.63
N=4	2.60	3.00	10.31	10.65	0.36	1.92
N=5	1.68	4.00	5.58	5.77	0.37	1.87
N=6	1.95	3.00	7.15	7.50	0.24	2.94
mean±SD	1.89±0.45	3.83±1.17	7.57±2.30	7.87±2.36	0.29±0.03	2.31±0.63
Combine group						
N=1	5.09	3.00	14.96	15.91	0.36	1.942
N=2	8.40	3.00	30.18	31.85	0.26	2.656
N=3	6.92	4.00	21.44	22.04	0.39	1.768
N=4	7.02	3.00	25.99	27.00	0.33	2.107
N=5	6.35	4.00	17.84	18.52	0.42	1.670
N=6	6.91	3.00	21.08	21.76	0.43	1.597
Mean±SD	6.78±1.07	3.33±0.52	21.91 ±5.49	22.85±5.78	0.31±0.08	2.36±0.66
p-value	0.000**	0.180	0.000*	0.002**	0.88	0.83

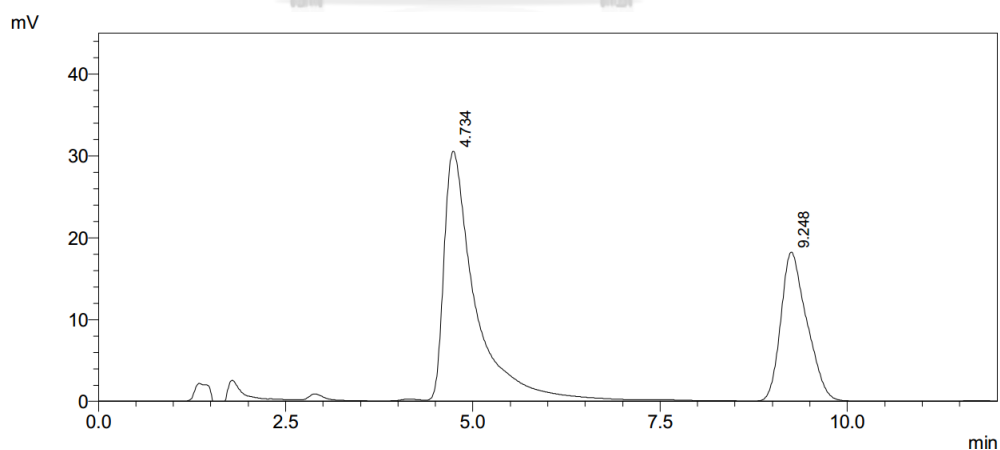
8.) ผลการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Validation method) ความเข้มข้นของ 1'-Hydroxymidazolam ในไมโครโซมจากตับหนูแรทด้วยเทคนิค HPLC

8.1) การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity/Selectivity)

ทำการทดสอบในสารละลายพบว่า 1'-Hydroxymidazolam และ Diazepam (internal standard) มีระยะเวลาอยู่ในคอลัมน์ (retention time) เท่ากับ 4.7 ± 0.5 และ 9.2 ± 0.5 นาทีตามลำดับ พบว่าที่ตำแหน่งพีคของ 1'-Hydroxymidazolam และ Diazepam ไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นเมื่อเทียบกับ blank แสดงผลระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 15 นาที ดังแสดงในภาพที่ 23



(ก)



(ข)

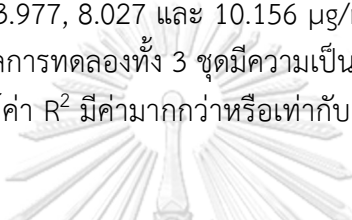
ภาพที่ 23 (ก) สารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) และ (ข) สารละลายที่มีสารมาตรฐานบริสุทธิ์ 1'-Hydroxymidazolam และ Diazepam (internal standard)

8.2) ขีดจำกัดของการวิเคราะห์หรือความไว (Limit of Detection or Sensitivity)

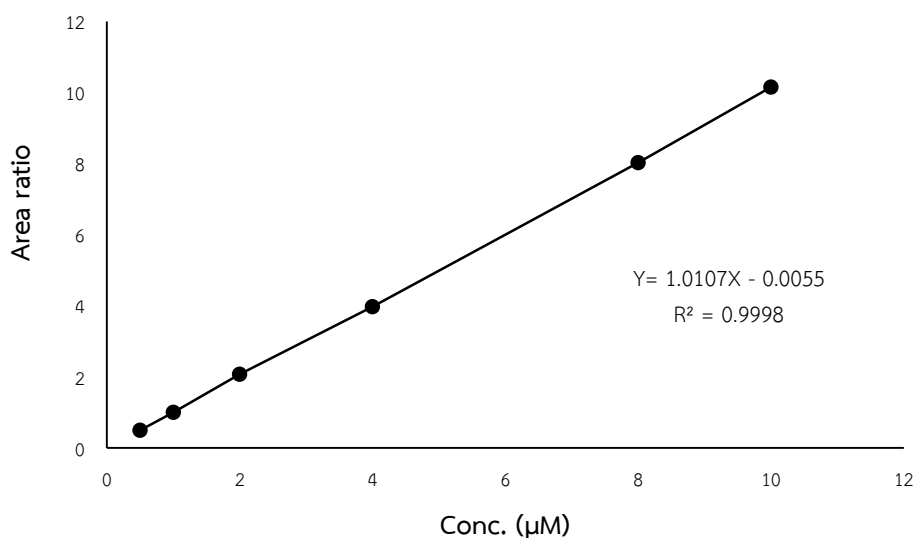
จากการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (lower limit of quantitation, LLOQ) จากกราฟมาตรฐานของ 1'-Hydroxymidazolam จำนวน 3 ทดลองพบหว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ 1'-Hydroxymidazolam มีค่าเท่ากับ 0.563 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าความถูกต้องของค่าที่วัดได้อยู่ในเกณฑ์ร้อยละ 80 ถึง 120 และมีค่าความแปรปรวนของการวิเคราะห์ไม่เกินร้อยละ 20 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ x

8.3) ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity/Standard calibration curve)

จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของ 1'-Hydroxymidazolam จำนวน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.563, 1.003, 2.076, 3.977, 8.027 และ 10.156 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานโดยทำการทดลองจำนวน 3 ชุด พบว่าผลการทดลองทั้ง 3 ชุดมีความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงโดยค่า R^2 มีค่าเป็นที่ยอมรับในเกณฑ์ค่า R^2 มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.99 ซึ่งการทดลองนี้มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9998 ดังแสดงในภาพที่ 24



The linearity of standard of 1-OH-Midazolam



ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐานของ 1'-Hydroxymidazolam

8.4) ความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy and Precision)

จากการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน (intra-day and inter-day analysis) โดยตรวจสอบความเข้มข้นของ 1'-Hydroxymidazolam ด้วย 3 ความเข้มข้น (ความเข้มข้นครอบคลุมระดับต่ำ กลาง และสูง) ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานและทำการทดลองสามวันได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ความถูกต้องและเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ 1'-Hydroxymidazolam

level	1'-OH-MDZ (µg/ml)	Intra-day analysis (n=3)		Inter-day analysis (n=3)	
		%Accuracy	Precision (%CV)	%Accuracy	Precision (%CV)
LLOQ (0.5µg/ml)	0.563	112.67	2.05	-	-
Low (1.5µg/ml)	1.574	104.22	0.37	104.96	0.61
Medium (3µg/ml)	3.017	100.67	0.57	100.48	1.17
High (6µg/ml)	5.983	98.61	0.39	99.70	1.80

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดลองจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 1'-Hydroxymidazolam ในไมโครโซมจากตับของหนูแรททั้ง 4 กลุ่ม ด้วยเทคนิค HPLC

Group	Sample No.	Area of 1'-OH- MDZ	Area of DZP (IS)	Area ratio	Measured value (ug/ml)
control group	N=1	491703	375346	1.31	6.25
	N=2	567134	370676	1.43	6.99
	N=3	873678	395329	2.21	10.05
	N=4	475844	380675	1.25	6.07
	N=5	761209	388372	1.96	9.33
	N=6	663125	387792	1.71	7.75
	Mean	638782.17	383031.76	1.66	7.74
	SEM	64309.55	3740.37	0.15	0.67

ตารางที่ 11(ต่อ) แสดงผลการทดลองจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 1'-Hydroxymidazolam ในไมโครโซมจากตับของหนูแรททั้ง 4 กลุ่ม ด้วยเทคนิค HPLC

Group	Sample No.	Area of 1'-OH- MDZ	Area of DZP (IS)	Area ratio	Measured value (ug/ml)
pomelo group	N=1	171623	373093	0.46	2.46
	N=2	244296	394026	0.72	3.72
	N=3	404055	374125	1.09	4.97
	N=4	315913	390017	0.83	4.09
	N=5	307915	370983	0.84	4.14
	N=6	218289	369981	0.59	3.03
	Mean	277015	378704	0.72	3.73
	SEM	33780	4285.26	0.09	0.36
simvastatin group	N=1	781497	398723	1.96	8.65
	N=2	554459	401782	1.48	7.16
	N=3	432020	378965	1.18	5.23
	N=4	588427	387123	1.75	7.81
	N=5	397005	389221	1.10	5.05
	N=6	550625	387764	1.52	7.38
	Mean	550672	390596	1.41	6.88
	SEM	55501	3407.97	0.13	0.59
combine group	N=1	379116	412083	0.94	4.40
	N=2	395743	391825	1.01	4.78
	N=3	254611	380017	0.69	3.50
	N=4	370827	398739	0.93	4.36
	N=5	227124	378541	0.60	3.08
	N=6	285337	401884	0.69	3.49
	Mean	318793.42	393848	0.81	3.93
	SEM	29387.89	5325.12	0.07	0.27

ความเข้มข้นที่ได้จากเครื่อง HPLC ในการทดลองครั้งนี้จะได้หน่วยความเข้มข้นเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ทำการเปลี่ยนหน่วยความเข้มข้นให้เป็นความเข้มข้นไมโครโมลต่อ ลิตร ($\mu\text{mol/L}$) เพื่อนำไปคำนวณหา enzyme activity ดังนี้

ต้องเปลี่ยนความเข้มข้นจาก $\mu\text{g/ml}$ เป็น $\mu\text{g/L}$

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้น } 1 \mu\text{g/ml} &= \frac{1\mu\text{g}}{\text{ml}} \times \frac{1000\text{ml}}{1\text{L}} \\ &= \frac{1000 \mu\text{g}}{\text{L}} \end{aligned}$$

จากนั้นเปลี่ยนหน่วยความเข้มข้นจาก $\mu\text{g/L}$ เป็น $\mu\text{mol/L}$ ดังนี้

จาก $Mol = \frac{g}{Mw}$ (1'-Hydroxymidazolam มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 341.77 g/mol)

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้น } 1 \mu\text{g/ml} &= \frac{1000 \mu\text{g}}{1\text{L}} \times \frac{1}{Mw} \\ &= \frac{1000 \mu\text{g}}{1\text{L}} \times \frac{1}{341.77 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \\ &= \frac{1000 \mu\text{mol}}{341.77 \text{L}} \end{aligned}$$

ดังนั้นจาก 1 $\mu\text{g/ml}$ จะได้ 2.926 $\mu\text{mol/L}$

ตารางที่ 12 แสดงการเปลี่ยนหน่วยความเข้มข้นจากหน่วย $\mu\text{g/ml}$ เป็นหน่วย $\mu\text{mol/L}$

group	sample	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{mol/L}$	group	sample	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{mol/L}$
control	N=1	6.25	6250	18.29	pome lo	N=1	2.460	2460	7.20
	N=2	6.99	6997	20.47		N=2	3.724	3724	10.90
	N=3	10.05	10058	29.43		N=3	4.970	4970	14.54
	N=4	6.074	6074	17.77		N=4	4.085	4085	11.95
	N=5	9.328	9328	27.29		N=5	4.140	4140	12.11
	N=6	7.746	7746	22.66		N=6	3.027	3027	8.86
simvastatin	N=1	8.650	8650	25.31	com bine	N=1	4.396	4396	12.87
	N=2	7.160	7160	20.95		N=2	4.782	4782	13.99
	N=3	5.230	5230	15.30		N=3	3.503	3503	10.24
	N=4	7.810	7810	22.85		N=4	4.357	4357	12.73
	N=5	5.050	5050	14.78		N=5	3.076	3076	8.98
	N=6	7.380	7380	21.59		N=6	3.492	3492	10.22

จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า specific activity

$$\text{specific activity} = \frac{\text{enzyme activity } (\mu\text{mol})}{\text{total protein (mg)}}$$

การทดลองครั้งนี้ใช้โปรตีน 200 mg ในสารละลาย 1000 ml คำนวณได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Specific activity} &= \frac{\text{enzyme activity of interest } \mu\text{mol}}{1\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{200 \text{ mgprotein}} \\ &= \frac{\text{enzyme activity of interest } (\mu\text{mol})}{200 \text{ mgprotein}} \end{aligned}$$

ตารางที่ 13 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครมพี3เอ2ที่ได้จากการวัดความเข้มข้นของ 1'-Hydroxymidazolam ด้วยเทคนิค HPLC

Sample group		1'OH-MDZ ($\mu\text{mol/L}$)	CYP3a2 activity ($\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$)	Sample group		1'OH-MDZ ($\mu\text{mol/L}$)	CYP3a2 activity ($\mu\text{mol}/\text{mgprotein}$)		
control	N=1	18.29	0.091	pomelo	N=1	7.20	0.036		
	N=2	20.47	0.102		N=2	10.90	0.055		
	N=3	29.43	0.147		N=3	14.54	0.073		
	N=4	17.77	0.089		N=4	11.95	0.060		
	N=5	27.29	0.136		N=5	12.11	0.061		
	N=6	22.66	0.113		N=6	8.86	0.044		
	mean		0.113		mean		0.056		
	SEM		0.0098		SEM		0.0076		
				p-value		0.000**			
Simvastatin	N=1	25.31	0.127	combine	N=1	12.87	0.064		
	N=2	20.95	0.105		N=2	13.99	0.070		
	N=3	15.30	0.077		N=3	10.24	0.051		
	N=4	22.85	0.114		N=4	12.73	0.064		
	N=5	14.78	0.074		N=5	8.98	0.045		
	N=6	21.59	0.108		N=6	10.22	0.051		
	mean		0.106		mean		0.062		
	SEM		0.0107		SEM		0.0040		
p-value		0.356		p-value		0.000**			

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในลำไส้เล็กของหนูแรทด้วยวิธี realtime RT-PCR

Sample	Ct of Intestinal Mdr1a			Ct of GAPDH			DcT			DDcT			Normalized			t-test
	1	2	Mean	1	2	Mean	Mean	SD	SEM	DcT - DcTcontrol	Mean	SD	SEM	Mean	SD	
Control N1	28.45	26.40	27.43	24.76	24.85	24.81				-1.2783				2.175		
Control N2	27.23	28.71	27.97	23.64	23.69	23.67				0.407				0.677		
Control N3	27.39	28.06	27.73	23.29	24.46	23.88	3.898	0.683	0.279	-0.048	0.000	0.683	0.279	0.927	0.594	0.243
Control N4	26.68	27.90	27.29	23.04	23.91	23.48				-0.083				1.115		
Control N5	27.54	28.37	27.96	23.84	23.06	23.45				0.607				0.950		
Control N6	28.56	27.03	27.80	22.46	24.54	23.50				0.397				0.589		
Pomelo N1	30.35	30.93	30.64	25.47	26.44	25.96				0.7867				0.681		
Pomelo N2	31.82	32.90	32.36	25.32	24.27	24.80				3.667				0.520		
Pomelo N3	32.72	31.07	31.90	24.68	25.12	24.90	6.355	0.986	0.402	3.097	2.457	0.986	0.402	0.105	0.163	0.066
Pomelo N4	31.61	31.79	31.70	25.92	25.26	25.59				2.212				0.226		
Pomelo N5	32.57	31.74	32.16	26.03	24.99	25.51				2.747				0.194		
Pomelo N6	31.95	32.07	32.01	25.71	26.05	25.88				2.232				0.191		
Simvastatin N1	27.59	28.27	27.93	23.32	24.63	23.98				0.0567				0.862		
Simvastatin N2	29.12	27.52	28.32	24.70	24.81	24.76				-0.333				1.130		
Simvastatin N3	29.05	29.01	29.03	25.68	23.82	24.75				0.382				0.688		
Simvastatin N4	28.43	29.52	28.98	25.08	23.67	24.38	3.844	0.528	0.216	0.702	-0.054	0.528	0.216	0.551	0.137	0.09504886
Simvastatin N5	29.64	28.94	29.29	25.93	25.79	25.86				-0.468				1.241		
Simvastatin N6	29.32	30.81	30.07	26.71	26.95	26.83				-0.663				1.58		
Combine N1	32.35	31.93	32.14	24.06	24.31	24.19				4.0567				0.054		
Combine N2	32.15	31.51	31.83	26.03	26.53	26.28				1.652				0.285		
Combine N3	31.82	32.07	31.95	26.02	26.78	26.40	6.749	1.115	0.455	1.647	2.851	1.115	0.455	0.286	0.109	0.045
Combine N4	33.30	32.52	32.91	24.34	25.64	24.99				4.022				0.175		
Combine N5	32.69	31.74	32.22	25.83	26.08	25.96				2.362				0.055		
Combine N6	31.80	32.65	32.23	24.15	25.77	24.96				3.367				0.175		
														0.087		

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *MDr1b* ในลำไส้เล็ก
ของหนูแรทด้วยวิธี realtime RT-PCR

Sample	Ct of Interstitial Mdr1b		Ct of GAPDH		Dct			DDct			Normalized					t-test
	1	2	1	2	Mean	SD	SEM	-Dctcon	Mean	SD	SEM	Mean	ค่าที่ได้	Mean	SD	
Control N1	27.81	27.62	22.18	22.24	22.71	5.01	0.9117	0.53	0.466			0.53	0.466			
Control N2	28.43	26.90	24.33	23.04	23.69	3.98	-0.113	1.08	0.949			1.08	0.949			
Control N3	26.39	27.06	23.99	23.46	23.73	3.00	-1.093	2.13	1.871	0.836	0.341	1.140	1.00	0.536	0.219	
Control N4	27.48	27.12	22.81	24.27	23.54	3.76	-0.333	1.26	1.105			1.26	1.105			
Control N5	28.77	27.63	23.75	22.32	23.04	5.17	1.072	0.48	0.417			0.48	0.417			
Control N6	26.62	28.41	24.24	23.49	23.87	3.65	-0.443	1.36	1.192			1.36	1.192			
Pomelo N1	30.10	29.53	24.12	25.83	24.98	4.84	0.7467	0.60	0.523			0.60	0.523			
Pomelo N2	30.24	29.28	24.20	25.19	24.70	5.07	0.972	0.51	0.447			0.51	0.447			
Pomelo N3	28.56	30.52	25.01	24.56	24.79	4.76	0.662	0.63	0.554	0.497	0.203	0.541	0.474	0.138	0.056	0.042088
Pomelo N4	30.92	28.38	25.22	25.01	25.12	4.54	-0.442	0.74	0.646			0.74	0.646			
Pomelo N5	29.18	31.09	25.35	24.71	25.03	5.11	1.012	0.50	0.435			0.50	0.435			
Pomelo N6	31.44	29.85	24.31	25.05	24.68	5.97	1.872	0.27	0.240			0.27	0.240			
Simvastatin N1	30.82	29.41	25.13	24.25	24.69	5.43	1.3317	0.40	0.348			0.40	0.348			
Simvastatin N2	28.39	27.72	24.39	25.02	24.71	3.35	-0.743	1.67	1.468			1.67	1.468			
Simvastatin N3	29.96	28.60	25.22	23.49	24.36	4.93	0.832	0.56	0.493	0.033	0.346	1.107	0.970	0.458	0.187	0.92017
Simvastatin N4	29.15	28.73	26.07	24.93	25.50	3.44	-0.653	1.57	1.379			1.57	1.379			
Simvastatin N5	28.50	30.23	25.82	25.31	25.57	3.40	-0.293	1.23	1.075			1.23	1.075			
Simvastatin N6	30.94	28.38	25.72	25.96	25.84	3.82	-0.273	1.21	1.060			1.21	1.060			
Combine N1	28.23	30.07	24.51	25.02	24.77	4.39	0.2917	0.82	0.716			0.82	0.716			
Combine N2	30.85	29.35	26.19	24.43	25.31	4.79	0.697	0.62	0.541			0.62	0.541			
Combine N3	29.51	30.29	25.01	25.18	25.10	4.81	0.712	0.61	0.535	1.289	1.067	0.491	0.431	0.230	0.094	0.037801
Combine N4	31.72	32.18	24.04	25.54	24.79	7.16	3.067	0.12	0.105			0.12	0.105			
Combine N5	30.04	29.38	25.43	24.08	24.76	4.96	0.862	0.55	0.483			0.55	0.483			
Combine N6	32.65	31.01	25.05	26.21	25.63	6.20	2.107	0.23	0.204			0.23	0.204			

ตารางที่ 17 แสดงผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1a* ในตับของหนูแรททั้ง ด้วยวิธี realtime RT-PCR

Sample	Ct of Liver/Mdr1a		Ct of GAPDH			Dct			DDCt			Normalized					ttest
	1	2	Mean	1	2	Mean	SD	SEM	Dct - Dctcontrol	Mean	SD	SEM	Mean	ค่าที่ได้	Mean	SD	
Control N1	27.27	28.09	27.68	23.42	25.01	24.22			0.8667					0.494			
Control N2	28.23	27.71	27.97	24.29	25.18	24.74			0.637					0.579			
Control N3	26.39	27.06	26.73	24.97	24.60	24.79	1.94		-0.658					1.421			
Control N4	27.13	26.59	26.86	25.77	24.15	24.96	1.90	2.598	-0.698	0.740	0.302	0.000	1.111	1.461	1.00	0.473	0.193
Control N5	28.78	27.36	28.07	25.51	26.72	26.12	1.96		-0.643					1.406			
Control N6	28.24	28.97	28.61	26.69	24.33	25.51	3.10		0.497					0.638			
Pomelo N1	27.52	29.18	28.35	25.03	26.62	25.83	2.53		-0.0733					0.947			
Pomelo N2	30.97	27.20	29.09	24.71	24.85	24.78	4.31		1.707					0.276			
Pomelo N3	29.35	27.99	28.67	25.32	25.96	25.64	3.03	2.746	0.432	0.905	0.369	0.148	1.042	0.668	0.938	0.508	0.207
Pomelo N4	28.43	26.34	27.39	25.05	24.22	24.64	2.75		0.152					0.811			
Pomelo N5	30.08	27.46	28.77	27.33	26.99	27.16	1.61		-0.988					1.786			
Pomelo N6	27.35	29.02	28.19	25.71	26.15	25.93	2.26		-0.343					1.142			
Simvastatin N1	26.72	27.63	27.18	24.68	25.37	25.03	2.15		-0.4483					1.229			
Simvastatin N2	27.17	26.29	26.73	25.02	26.19	25.61	1.13		-1.473					2.500			
Simvastatin N3	28.01	28.42	28.22	26.32	24.78	25.55	2.67		0.067	0.425	0.425	-0.022	1.250	0.860	1.126	0.783	0.320
Simvastatin N4	30.31	29.15	29.73	25.96	26.14	26.05	3.68	2.577	1.082	1.042	0.425			0.425			
Simvastatin N5	30.02	29.50	29.76	25.21	26.64	25.93	3.84		1.237					0.382			
Simvastatin N6	27.46	28.84	28.15	26.39	25.90	26.15	2.01		-0.593					1.359			
Combine N1	29.67	30.07	29.87	25.33	26.51	25.92	3.95		1.3517					0.353			
Combine N2	30.85	27.49	29.17	24.60	25.62	25.11	4.06		1.462					0.327			
Combine N3	28.38	29.93	29.16	26.28	25.14	25.71	3.45		0.847	1.069	0.436	0.379	0.977	0.501	0.879	0.697	0.285
Combine N4	27.75	26.28	27.02	25.54	24.31	24.93	2.09		-0.508					1.281			
Combine N5	27.61	29.36	28.49	24.72	26.35	25.54	2.95		0.352					0.706			
Combine N6	26.01	27.75	26.88	24.20	26.82	25.51	1.37		-1.228					2.110			

ตารางที่ 18 แสดงผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Mdr1b* ในตับของหนูแรททั้ง ด้วยวิธี real- time RT-PCR

Sample	Ct of Liver Mdr1b		Ct of GAPDH		Dct			DDct			Normalized				t-test				
	1	2	1	2	CtPsp-CtGAPDH	Mean	SD	SEM	Dct-control	Mean	SD	SEM	2 ^{Δ(-DDct)}	Mean		ค่าที่ได้	Mean	SD	SEM
Control N1	26.68	27.37	27.03	24.39	23.93	24.16			-0.1733				1.13	1.080					
Control N2	28.02	26.19	27.11	23.84	24.28	24.06			0.007				1.00	0.953					
Control N3	28.42	28.49	28.46	24.67	24.52	24.60	0.198		0.822	3.038	0.486	0.198	0.57	0.542	1.045		0.300	0.123	
Control N4	26.84	27.53	27.19	22.70	25.09	23.90			0.252				0.84	0.804					
Control N5	26.40	28.62	27.51	25.15	24.72	24.94			-0.463				1.38	1.320					
Control N6	27.05	28.91	27.98	24.81	25.96	25.39			-0.443				1.36	1.302					
Pomelo N1	29.13	27.42	28.28	26.02	25.29	25.66			-0.4183				1.34	1.279					
Pomelo N2	28.70	32.74	30.72	23.98	25.56	24.77			2.912				0.13	0.127					
Pomelo N3	26.91	28.62	27.77	25.27	24.90	25.09			-0.338	3.319	1.421	0.580	1.28	1.227	1.097		0.678	0.277	0.872
Pomelo N4	29.59	27.43	28.51	25.13	24.45	24.79			0.682				0.62	0.597					
Pomelo N5	27.28	26.38	26.93	24.81	25.27	25.04			-1.148				2.22	2.122					
Pomelo N6	27.59	28.08	27.84	24.42	25.14	24.78			0.017				0.99	0.946					
Simvastatin N1	28.57	28.16	28.37	24.77	25.32	25.05			0.2817				0.82	0.788					
Simvastatin N2	27.33	27.72	27.53	25.70	24.81	25.26			-0.768				1.70	1.631					
Simvastatin N3	27.60	30.19	28.90	23.66	25.08	24.37			1.487				0.36	0.342	1.206		0.814	0.332	0.672
Simvastatin N4	26.27	29.63	27.95	26.79	24.64	25.72	0.540		-0.803	3.193	1.323	0.540	1.75	1.671					
Simvastatin N5	26.21	27.42	26.82	24.32	25.70	25.01			-1.233				2.35	2.251					
Simvastatin N6	30.91	29.57	30.24	25.89	24.59	25.24			1.962				0.26	0.246					
Combine N1	29.24	28.90	29.07	25.86	25.87	25.87			0.1667				0.89	0.853					
Combine N2	30.83	29.32	30.18	24.14	26.86	25.50			1.637				0.32	0.308					
Combine N3	31.15	27.69	29.42	26.61	25.13	25.87			0.512				0.70	0.672	0.999		0.721	0.294	0.893
Combine N4	29.92	28.05	28.99	23.48	24.27	23.88			2.072				0.24	0.228					
Combine N5	26.68	29.63	28.16	25.99	26.08	26.04			-0.918				1.89	1.809					
Combine N6	27.81	28.44	28.13	26.21	25.89	26.05			-0.963				1.95	1.867					

ตารางที่ 19 แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ *Slc21a5* ในตับของหนูแรททั้งด้วยวิธี realtime RT-PCR

Sample	Ct of Liver <i>slc21a5</i>		Ct of GAPDH		Dct			DDCt			Normalized				t-test	
	1	2	1	2	Mean	SD	SEM	Dct - Dctcontrol	Mean	SD	SEM	2 ^{Δ(-DDCt)}	Mean	SD		SEM
Control N1	30.45	26.40	28.43	25.31	24.15	24.73	3.70	0.6350				0.64	0.590			
Control N2	27.23	28.71	27.97	26.48	24.92	25.70	2.27	-0.790				1.73	1.583			
Control N3	31.39	27.06	29.23	25.60	26.05	25.83	3.40	0.340	0.000	0.646	0.264	0.79	0.723	1.00	0.481	0.196
Control N4	26.68	27.90	27.29	24.49	25.67	25.08	2.21	-0.850				1.80	1.650			
Control N5	29.54	28.37	28.96	26.29	24.83	25.56	3.40	0.335				0.79	0.726			
Control N6	28.56	27.03	27.80	25.09	23.72	24.41	3.39	0.330				0.80	0.728			
Pomelo N1	29.17	26.53	27.85	24.66	25.45	25.06	2.80	-0.2650				1.20	1.100			
Pomelo N2	30.70	27.04	28.87	23.42	25.67	24.55	4.33	1.265				0.42	0.381			
Pomelo N3	29.49	28.09	28.79	22.21	22.49	22.35	6.44	3.380	2.061	1.955	0.798	0.10	0.088	0.385	0.364	0.157
Pomelo N4	28.96	29.22	29.09	24.61	24.34	24.48	4.62	1.555				0.34	0.312			
Pomelo N5	30.74	26.57	28.66	25.72	23.14	24.43	4.23	1.165				0.45	0.408			
Pomelo N6	32.03	32.31	32.17	24.43	23.26	23.85	8.33	5.265				0.03	0.024			
Simvastatin N1	29.92	29.12	29.52	24.08	25.26	24.67	4.85	1.7900				0.29	0.265			
Simvastatin N2	28.07	28.64	28.36	26.61	25.92	26.27	2.09	-0.970				1.96	1.793			
Simvastatin N3	32.55	29.93	31.24	24.45	24.59	24.52	6.72	3.660	0.648	1.823	0.744	0.08	0.072	0.951	0.815	0.333
Simvastatin N4	30.34	27.27	28.81	25.27	25.81	25.54	3.27	0.205				0.87	0.794			
Simvastatin N5	28.80	28.37	28.59	24.73	25.55	25.14	3.45	0.385				0.77	0.701			
Simvastatin N6	28.19	27.31	27.75	25.01	26.74	25.88	1.88	-1.185				2.27	2.081			
Combine N1	29.08	28.91	29.00	23.07	24.48	23.78	5.22	2.1600				0.22	0.205			
Combine N2	27.43	27.68	27.56	23.02	25.99	24.51	3.05	-0.010				1.01	0.922			
Combine N3	26.62	28.79	27.71	22.91	23.59	23.25	4.46	1.395	1.744	1.512	0.617	0.38	0.348	0.414	0.374	0.153
Combine N4	30.70	30.53	30.62	24.90	23.30	24.10	6.52	3.455				0.09	0.083			
Combine N5	29.32	26.86	28.09	25.72	24.08	24.90	3.19	0.130				0.91	0.837			
Combine N6	30.29	32.24	31.27	24.53	25.21	24.87	6.40	3.335				0.10	0.091			

ภาคผนวก ข

เลขที่ใบรับรอง 16/2559



เลขที่โครงการวิจัย 017/2559

คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ภาษาไทย) ผลของส้มโอต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา simvastatin การทำงานของ CYP3A2 และ การแสดงออกของยีน Mdr1a, Mdr1b และ Slc21a5 ในหนูแรท

(ภาษาอังกฤษ) Effect of pomelo on the pharmacokinetics of simvastatin, CYP3A2 activity and Mdr1a, Mdr1b and Slc21a5 gene expressions in rats

ผู้เสนอโครงการใช้สัตว์ทดลอง อาจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์สภากาชาดแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามที่ขอเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้

ลงนาม..... *สมนึก สงวนรังศิริกุล*

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมพล สงวนรังศิริกุล)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

ลงนาม..... *Dr*

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ์)

คณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่รับรอง : ตุลาคม พ.ศ.2559

วันหมดอายุ : ตุลาคม พ.ศ.2560

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

Kritsakorn Rayasilp

Education

2014 – Present

Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Master of Science (Pharmacology)

2011 – 2014

Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Bachelor of Science (Chemistry)

Certification

2015

November Standard Course in Clinical Trials and GCP Training Program, Faculty of
Medicine, Chulalongkorn University

2016

May Training on the Use of Laboratory Animals of Scientific Purposes, Chulalongkorn
University

August Laboratory Rodents Management: from housing to diseases and surveillance
programs

2017

May The 39th Pharmacological and Therapeutics Society Meeting: Illustrious
issues in Pharmacology 2017, Faculty of Pharmacological
Sciences, Burapha University

Publications Rayasilp K, Wittayalerpanya S and Wonganan P. Effect of pomelo on Mdr1a,
Mdr1b and Slc21a5 expressions in rats. Proceeding of the

39th Pharmacological and Therapeutics Society Meeting (2017)