

EFFICACY AND SAFETY OF GINGER EXTRACT NANOPARTICLES  
RELIEVES PAINS IN KNEE OSTEOARTHRITIS

Mrs. Punyanut Amorndoljai



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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.

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Public Health Sciences

College of Public Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

ประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัดขิงนาโนลดอาการปวดในผู้ป่วยโรคเข่าเสื่อม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





บุญยง อมรตลใจ : ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสารสกัดซิงนาโนลดอาการปวดในผู้ป่วยโรคเข่าเสื่อม (EFFICACY AND SAFETY OF GINGER EXTRACT NANOPARTICLES RELIEVES PAINS IN KNEE OSTEOARTHRITIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ.สุรศักดิ์ ฐานิพานิชสกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. นพ.สัณญาณ เนียมปุก, รศ. ดร.อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์, 138 หน้า.

ซิง ( *Zingiber officinale* Roscoe) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งนิยมนำมาใช้รักษาโรคข้ออักเสบ ปวดข้อ การศึกษาพบว่าสารสำคัญมีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดี คือ 6-gingerol แต่สารนี้ดูดซึมได้น้อยและพบอาการข้างเคียง แสบร้อนอก ท้องเสียหากใช้โดยการกิน การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัดซิงนาโนในการรักษาผู้ป่วยเข่าเสื่อมโดยรูปแบบการทดลองคลินิกแบบสุ่ม (Randomized double-blind-active control trial) ที่โรงพยาบาลท่าช้าง จังหวัดสิงห์บุรี ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม พศ. 2557 กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้ป่วยเข่าเสื่อมจำนวน 120 ราย อายุระหว่าง 50-75 ปี วินิจฉัยตามเกณฑ์ของวิทยาลัยแพทย์โรคข้อและรูมาติซึมสหรัฐอเมริกาโดยสุ่มให้ทายา แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดซิงนาโน จำนวน 60 ราย และกลุ่มที่ได้รับ 1% ไโคฟีแนคเจล จำนวน 60 ราย ผู้ป่วยจะได้รับการประเมินผลการรักษาโดยใช้แบบประเมิน WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities osteoarthritis), KOOS (Knee Injury and osteoarthritis outcome score), และแบบประเมินสภาวะทั่วไปของโรคด้วยผู้ป่วยและแพทย์ โดยติดตามในสัปดาห์ที่ 4, 8, และ 12 ความปลอดภัยติดตามจากการตรวจชีวเคมีและโลหิตวิทยาในเลือดหลังการรักษาครบ 12 สัปดาห์ ผลการวิจัย จากผู้ป่วยทั้งหมด 118 ราย กลุ่มละ 59 รายเท่ากัน เข้าร่วมการศึกษาจนครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สามารถลดอาการปวดข้อเข่าและอาการอื่นๆจากโรคข้อเข่าเสื่อมได้ และยังเพิ่มสภาวะทั่วไป การทำกิจวัตรประจำวันและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยก่อนและหลังการรักษา แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  จากตัววัด WOMAC, KOOS, และแบบประเมินสภาวะทั่วไปของโรค แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มสารสกัดซิงนาโนและไโคฟีแนคเจลนอกจากอัตราการตอบสนองในการลดปวดอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากลุ่มสารสกัดซิงนาโนดีกว่ากลุ่ม 1% ไโคฟีแนคเจลอย่างมีนัยสำคัญ ( $[40/59(67.7\%) \text{ vs. } 27/59(45.7\%) \text{ } p < 0.05]$ ) อาการไม่พึงประสงค์ทางคลินิกและทางห้องปฏิบัติการชีวเคมี โลหิตวิทยาไม่พบความแตกต่างหลังการรักษา สรุปผลการวิจัย สารสกัดซิงนาโน มีประสิทธิภาพในการลดปวดและลดอาการข้อเข่าเสื่อม คุณภาพชีวิตดีขึ้น ในการรักษา 12 สัปดาห์ โดยผลการรักษาไม่แตกต่างจากการใช้ไโคฟีแนคเจล

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สาธารณสุข

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5579052653 : MAJOR PUBLIC HEALTH SCIENCES

KEYWORDS: OSTEOARTHRITIS / KNEE

PUNYANUT AMORNDOLJAI: EFFICACY AND SAFETY OF GINGER EXTRACT NANOPARTICLES RELIEVES PAINS IN KNEE OSTEOARTHRITIS. ADVISOR: PROF. DR.SURASAK TANEAPANICHSKUL, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUNYARN NIEMPOOG, M.D., ASSOC. PROF. UBONTHIP NIMMANNIT, Ph.D., 138 pp.

Background: Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) is one of the most common used for treating osteoarthritis. The studies reported to contain the active compound namely, 6-gingerol were evaluated anti-inflammatory action. However, the major adverse event of oral ginger is heartburn and gastrointestinal disturbances and due to poor absorptions, rapid metabolism and elimination of active ingredient. Objectives: An evaluation of the efficacy and safety of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract nanoparticles were used for treatment of the knee OA. Material and Methods: A randomized, double-blind, active controlled was conducted at Tha Chang Hospital, Singburi Province between May and October 2014. One hundred and twenty patients between the age of 50-75 years with knee OA, based on American College of Rheumatology (ACR) criteria, were randomized into two groups applying 5%w/w ginger extracts NLC and control 1%w/w diclofenac gel for 12 weeks. The efficacy of treatment was monitored at 4, 8, and 12 weeks by using the WOMAC OA composite index, KOOS and PGA. The t-test was used to compare the mean scores at baseline in each group. Repeated ANOVA was used to compare the mean scores and Chi-square test was used to compare the dichotomous variables between two groups at 4, 8 and 12 weeks. The safety of ginger extract NLC was proved by laboratory tests after 12 weeks of treatment. Results: One hundred and eighteen participants completed the study. Both ginger extract NLC and diclofenac gel could significantly improve knee pain, stiffness, physical function and PGA of treatment in 12 weeks. In the repeated ANOVA, there were no differences in the results between these two groups. The response rate of 5%w/w ginger extract NLC was significantly greater than 1%w/w topical diclofenac [40/59(67.7%) vs. 27/59(45.7%) p<0.05] with at least a 50% reduce in pain. There were no serious adverse events or abnormal laboratory values. Conclusion: Ginger extract nanoparticles relieves joint pain and improves problematic symptoms and improves the quality of life in knees OA during a 12 week treatment with no different to 1%w/w diclofenac gel group.

Field of Study: Public Health Sciences

Academic Year: 2014

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Prof. Surasak Taneepanichskul, M.D., for his patience, instruction and immense knowledge.

I am deeply grateful to my co-advisor, Assoc. Prof. Sunyarn Niempoog, M.D., Head of the Orthopaedics Department, Faculty of Medicine, Thammasat University, for his important diagnosed and investigated all participants and Assoc. Prof. Ubonthip Nimmannit, Ph.D., Director of Nanotechnology Development Unit, National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, for support throughout this study. Their experience and concept have had a remarkable influence on this entire work.

I appreciate to express my warm and sincere thanks to Prof. Somboon Kietinun, M.D., Assoc. Prof. Nijisiri Ruangrugri, Ph.D. Their kind and valuable advices gave me a lot of power and have provided inspiration for many Thai traditional Medicine to fulfil their work.

During this work I have collaborated with many colleagues and staffs member of College of Public Health Sciences, Chulalongkorn University, for support to complete my doctoral dissertation.

Special thanks also go to all staff member of Tha Chang Hospital, Singburi Province and all patients who participated in this study.

Without all of their support, it would be impossible for me to reach this achievement, I deeply appreciate them all.

## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT .....	iv
ENGLISH ABSTRACT .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES .....	xii
LIST OF FIGURES.....	xiv
LIST OF ABBREVIATIONS .....	1
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
Introduction .....	1
Research gap .....	3
Research question.....	4
Objective .....	4
General objective.....	4
Specific objectives .....	4
Conceptual framework .....	5
Operational definition .....	5
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	7
Osteoarthritis .....	7
Pathogenesis .....	8
Classification of osteoarthritis.....	8
Risk factor for osteoarthritis .....	9
Sign and symptom of knee osteoarthritis.....	10

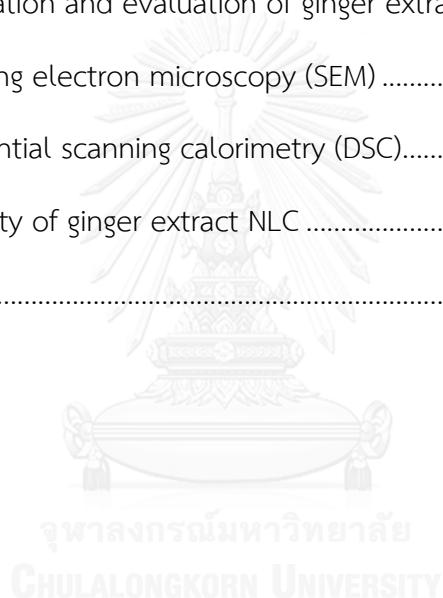


	Page
Investigations and diagnosis .....	12
Treatment of knee osteoarthritis .....	14
Outcome measurement of knee osteoarthritis .....	18
The Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) OA Index.....	19
Index of severity for osteoarthritis (ISOA) .....	19
The knee injury and osteoarthritis outcome score (KOOS).....	19
Visual analog scales (VAS).....	20
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Ginger) .....	20
Pharmacological activities of <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	21
Preclinical safety data.....	23
Clinical studies.....	25
Nanoparticles .....	27
Nanostructured lipid carriers (NLC).....	28
Transdermal drug delivery systems and NLC .....	29
Characterization of lipid nanoparticles.....	32
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY.....	35
Study design .....	35
Sample size .....	36
Preparation of ginger extract nanostructure lipid carrier (NLC).....	36
Formulation of ginger extract NLC .....	37
Characterization of ginger extract NLC.....	37
Particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential analysis.....	37
<i>In vitro</i> release study of 6- gingerol from formulations .....	38

	Page
Scanning electron microscopy (SEM).....	39
Differential scanning calorimetry (DSC) investigations .....	39
Stability of ginger extract NLC .....	40
Physical stability .....	40
Chemical stability .....	40
Research procedure for clinical study .....	41
Data collection .....	41
Pilot study .....	41
Efficacy and safety study .....	42
Data analysis.....	45
Baseline .....	45
Efficacy .....	45
Safety analysis .....	45
Ethical consideration .....	47
CHAPTER IV RESULTS .....	48
Part I Preparation and evaluation of ginger extract NLC .....	48
Particle size, PI and zeta potential analysis .....	48
In vitro release study of 6- gingerol from NLC formulations .....	49
Scanning electron microscopy (SEM).....	50
Differential scanning calorimetry (DSC) investigations .....	50
Stability of ginger extract NLC .....	51
Physical stability .....	51
Chemical stability .....	51

	Page
Part II Pilot study .....	52
Part III A comparative study of 5% w/w ginger extract NLC to 1%w/w diclofenac gel for treatment of knee osteoarthritis (OA) .....	56
Section 1 Clinical flow chart.....	57
Section 2 Characteristic of patients with knee osteoarthritis.....	58
Section 3 Efficacy measurement.....	60
Baseline efficacy outcome .....	60
Comparative of 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w topical diclofenac gel for treatment of knee OA.....	62
Evaluation of efficacy for treatment of knee OA by WOMAC.....	62
Evaluation of efficacy for treatment of knee OA by KOOS .....	65
Evaluation of efficacy for treatment of knee OA by PGA.....	68
Evaluation of efficacy for treatment of knee OA by ISOA .....	69
Clinical efficacy for treatment of knee OA by the OMERACT-OARSI...	70
Section 4 Safety evaluation.....	71
CHAPTER V DISCUSSION, CONCLUSION AND RECOMMENDATION.....	73
DISCUSSION.....	73
Co-intervention .....	78
Limitation .....	78
CONCLUSION AND RECOMMENDATION.....	78
REFERENCES.....	80
APPENDIX A Ethical consideration.....	89
APPENDIX B Case report form.....	96
APPENDIX C Modified WOMAC scale .....	109

	Page
APPENDIX D Knee and osteoarthritis outcome score (KOOS).....	112
APPENDIX E Index of severity for osteoarthritis of the knee (Knee ISOA).....	117
APPENDIX F Global assessment by patient .....	118
APPENDIX G Global assessment by the investigator .....	119
APPENDIX H Adverse drug reaction by Naranjo' algorithm .....	120
APPENDIX I Ethical certificate .....	121
APPENDIX J Preparation and evaluation of ginger extract NLC .....	122
APPENDIX K scanning electron microscopy (SEM) .....	123
APPENDIX L Differential scanning calorimetry (DSC).....	124
APPENDIX M Stability of ginger extract NLC .....	125
VITA .....	138



## LIST OF TABLES

Table 1	The criteria for diagnostic of knee OA and diagnostic accuracy.....	13
Table 2	Compositions of the developed ginger extract NLC formulations (%W/W) .	38
Table 3	The schedule of study.....	43
Table 4	Summary of measured variable.....	44
Table 5	Summary of statistical analysis.....	45
Table 6	Characteristic of patients with knee OA in pilot study.....	53
Table 7	Comparison of the different laboratory value and efficacy variables before and after taking 5% w/w ginger extract NLC for 4 weeks by 95% CI.....	54
Table 8	Efficacy evaluation of the OMERACT-OARSI responder criteria.....	55
Table 9	Baseline demographic and clinical characteristics of patient in 1%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC groups.....	59
Table 10	Baseline efficacy variable of patient in 1%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC group.....	61
Table 11	The WOMAC parameter at baseline, 4-weeks, 8-weeks and 12-weeks in 1%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC group.....	63
Table 12	Efficacy evaluation of the mean WOMAC in 5%w/w ginger extract NLC and the 1%w/w topical diclofenac group by the repeated ANOVA.....	64
Table 13	Efficacy of mean KOOS parameter in 5%w/w ginger extract NLC and the 5%w/w topical diclofenac gel group by the repeated ANOVA.....	66
Table 14	The comparison of the mean KOOS in 1%w/w topical diclofenac gel and 5%w/w ginger extract NLC at initiation and at 12 weeks of treatment by the paired t-test and unpaired t-test.....	67
Table 15	Clinical efficacy for treatment of knee OA by the OMERACT-OARSI responder criteria.....	70

Table 16 Laboratory tests at the initiation and following 12 weeks of treatments between 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w topical diclofenac gel group.....	72
Table 17 Mean particle size (Z-ave) ,polydispersity index (PDI) and zeta potential value of ginger extract NLC.....	122
Table 18 Percentage contents of 6-gingerol remaining after 1, 2, 3 and 6 months storage at 4 <sup>0</sup> C and 25 <sup>0</sup> C.....	125
Table 19 Physical stability of ginger extract NLC at various time intervals under various storage conditions.....	126
Table 20 Mean and SD of particle size and polydispersity index (PI) analysis at 1, 3, and 6 months.....	126
Table 21 HPLC conditions for analysis of ginger extract, formulation, and Franz diffusion cell.....	128
Table 22 Parameters of quantitative evaluation for 6-gingerol.....	132
Table 23 Validation of the precision of the analytical method for 6-gingerol in formulation .....	134
Table 24 Validation of the precision of the analytical method for 6-gingerol in Franz diffusion cell.....	134
Table 25 Validation of the precision of the analytical method for 6-gingerol in ginger extract .....	135
Table 26 Validation of the accuracy of the analytical method for 6-gingerol in formulation .....	136
Table 27 Validation of the accuracy of the analytical method for 6-gingerol in Franz diffusion cell.....	136
Table 28 Validation of the accuracy of the analytical method for 6-gingerol in ginger extract .....	137

## LIST OF FIGURES

Figure 1 Conceptual framework.....	5
Figure 2 The three types of NLC and SLN.....	29
Figure 3 Model of the stratum corneum and intercellular and.....	30
Figure 4 Flow chart.....	46
Figure 5 Cumulative amount per unit area ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) of 6-gingerol released .....	50
Figure 6 Clinical flow chart of participants.....	58
Figure 7 Percentage of improvement in WOMAC parameter at the initiation and following 12 weeks of treatments between 5%w/w ginger extract NLC.....	62
Figure 8 Percentage of improvement of PGA parameter at 4-week, 8-week and .....	68
Figure 9 Mean of ISOA at 4-week, 8-week and 12-week in topical diclofenac .....	69
Figure 10 SEM image of ginger extract NLC .....	123
Figure 11 DSC thermogram of ginger extract, tween <sup>®</sup> 80 and .....	124
Figure 12 Chromatogram of 6-gingerol standard.....	129
Figure 13 Chromatogram of 6-gingerol in ginger extract .....	130
Figure 14 Chromatogram of 6-gingerol in formulation .....	130
Figure 15 Chromatogram of 6- gingerol in Franz diffusion cell .....	131
Figure 16 Calibration curve of standard 6-gingerol range from 100-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .....	132
Figure 17 Calibration curve of 6-gingerol in formulation range from 1-80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .....	133
Figure 18 Calibration curve of 6-gingerol in Franz diffusion cell range from 5-25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .....	133

## LIST OF ABBREVIATIONS

µg	Microgram
µl	Microliter (s)
°C	Degree Celcius
AAOS	American Society of Orthopedic Surgeons
AFM	Atomic force microscopy
ALP	Alkaline phosphatase
ANOVA	Analysis of variance
BMI	Body mass index
BP	Blood pressure
bpm	Beats per minute
BUN	Blood Urea Nitrogen
CBC	Complete Blood count
COX	Cyclooxygenase
Cr	Creatinine
CV	Coefficient of variation
dl	Deciliter
DSC	Differential scanning calorimetry
Et al.	<i>Et alii</i> , and others
EULAR	European league against rheumatism
g	Gram
h	Hour
Hct.	Hematocrit
HLB	Hydrophile-lipophile balance
HPH	High pressure homogenization
HPLC	High performance liquid chromatography
HR	Heart rate
IC <sub>50</sub>	50% Inhibitory concentration
IL	Interleukin



## LIST OF ABBREVIATIONS (Continued )

IPM	Isopropyl myristate
ISOA	Index of severity for osteoarthritis
KOOS	knee injury and osteoarthritis outcome score
LD <sub>50</sub>	lethal dose, 50%
LFT	Liver function test
LR	Likelihood ratio
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeters of mercury
mV	millivolt
n	Sample size
NICE	National institute for clinical excellence
NLC	Nanostructure lipid carrier
nm	Nanometer
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
o/w	Oil in water
OA	Osteoarthritis
OARSI	Osteoarthritis research society international
OMERACT	Outcome measures in rheumatology committee
OR	Odd ratio
PDI	Polydispersity index
PGA	Patient global assessment
QOL	Quality of life
r <sup>2</sup>	Coefficient of determination
RBC	Red blood cell
RFT	Renal function test
ROM	Range of motion

## LIST OF ABBREVIATIONS (Continued )

rpm	Round per minute
RR	Respiratory rate
SC	Stratum corneum
SD	Standard deviation
SEM	Scanning electron microscope
SGOT	Serum glutamic oxaloacetic transferase
SGPT	Serum glutamic pyruvate transferase
SLN	Solid lipid nanoparticle
Sport/rec	Sport and recreation
T	Temperature
TEM	Transmission microscopy
TRVP1	Transient receptor potential vallinoid number 1
UV	Ultraviolet
VAS	Visual analog scales
w/w	Weight by weight
WBC	White blood cell count
WNL	Within normal limit
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities
Z-ave	Mean particle size determined by PSC

# CHAPTER I

## INTRODUCTION

### Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common of joint disorder, and there is evidence that a majority affects more than one-third of persons older than 65 years. Patients with OA are at a higher risk of death compared to the general population by odds ratio of 1.54 [1] The prevalence of OA increases with age and generally affects women more frequently than men. About 13% of women and 10% of men aged 60 years and older have symptomatic knee OA. The proportions of people affected with symptomatic knee OA are likely to increase due to the aging of the population and the rate of obesity or overweight in the general population[2] . Females, particularly those of  $\geq 55$  years, tended to have more severe OA in the knee but not in other sites. A leading cause of chronic disability not only to high cost of treatment but also, to affect the health status of older persons on 3 primary dimensions: physical disability, psychological disability, and pain. Social support and social activity are also affected by arthritis. Unfortunately, until today there is no proper therapeutic intervention available to treat OA. Currently, acetaminophen and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) including cyclo-oxygenase II inhibitors are used for relief of pain and stiffness. Although, these pharmaceutical agents reduce both pain and improve physical functions temporarily without healing the cartilage nor sub-chondral damage, long term usage of NSAIDs is associated with enhancing risk for renal insufficiency, gastrointestinal bleeding, hypertension and congestive heart failure. Because of the high incidence of adverse events associated with NSAIDs therapy, effective and safer alternative treatments for the management of OA pain are highly desirable[5-3] . As a result, the interesting of alternative in natural product has inspired the study for new

pain of relief and stiffness agents from these sources. Many herbal medicinal recipes have been reported to reduce pain and stiffness in human and suitable safety profile.

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) is widely used in folk medicine, and is popular as a food spice. It has many therapeutic uses; it is useful in flatulence, gingivitis, toothache, asthma, osteoarthritis and rheumatism. Phytochemical studies have shown that the ginger rhizome contains a wide variety of biologically active compound. Active components present in the volatile oil (1-3%) are the mono and sesquiterpens (  $\beta$ -phellandrene, curcumene, cineole, geranyl acetate, terphineol, terpenes, borneol, geraniol, limonene,  $\beta$ -elemene, zingiberol, linalool,  $\alpha$ -zingiberene,  $\beta$ -sesquiphellandrene,  $\beta$ -bisabolene, zingiberenol). The non-volatile oil pungent of ginger consists of gingerol, shogaol, paradols and zingerone (4.0-7.5%). The pungent of ginger have demonstrated anti-inflammatory actions *in vitro*, inhibiting leukotriene synthesis, the active of cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2). In addition, it has been suggested that ginger and its constituents; particularly shogaols have agonize vallinoid (capsacin) receptor TRPV1, which are involved in the central and peripheral processing of noxious stimuli. *In vivo*, they also reported that the active constituents in ginger, 6-gingerol, is an effective anti-inflammatory substance because of its inhibition of macrophage activation, more specifically by inhibition of pro-inflammation cytokines and antigen presentation by lipopolysaccharide-activated macrophage. 6-gingerol acts as an anti-inflammatory compound that used to treat inflammation without interfering with the antigen presenting function of macrophage 6-.

Levy *et al.* reported 6-shogaol reduced the inflammatory response and protected the femoral cartilage from damage produced in a complete Freund's adjuvant monoarthritic model of the knee joint of rats. This study showed 6-shogaol decrease in the concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in the blood concentration and infiltration of leukocytes, including lymphocytes and monocytes /macrophages, into the synovial cavity of the knee7] , [8.

Unfortunately, due to poor absorption, rapid metabolism and elimination of active compound the bioavailability of polyphenolic compound is poor. The fact that gingerol and shogaol are insoluble in water limits its application in aqueous base systems. An undertaking approach to solve this problem is to prepare as the nanoparticle of ginger extract. Recently, the beneficial properties of nanoparticles-based delivery systems include increased the biodegradability, biocompatibility as well as non-toxicity and inexpensive. Praditbongkotch A. evaluated the anti-inflammatory activity of ginger extract, microemulsion formulations containing ginger extract .The ginger extract, acetone crude extract gave the highest yield of 10.97% and had 6-gingerol content of 10.70-11.44%. The anti-inflammatory activity of ginger extracts were evaluated in a carrageenan-induced rat paw edema test and compared with that of indomethacin. The result showed microemulsion formulation using Cremophor® RH 40 and Carbopol 940 with 5% w/w ginger extract demonstrated slower onset and longer duration of anti-inflammatory activity[9] . However, there were so few studies in case of therapeutic efficacy of the topical ginger extract nanoparticles in patients with knee osteoarthritis. Therefore, the researcher conducted a double blind randomized controlled trial to assess the efficacy and safety of ginger extract nanoparticle in emulsion gel, which is high amounts of 6-gingerol for topical administration on patients with knee OA. To realize this, relief of pain, stiffness agents and improve quality of life in patient. The result of this study may contribute to the knowledge of alternative management of patient with knee OA.

#### Research gap

There have been a few of previous studies using ginger extract nanoparticles relieved pains in knee OA.

## Research question

1. Do the efficacy of ginger extract NLC can reduce pain and improve quality of life of the patient with knee OA?
2. Do any side effects occur in participants with knee OA who use ginger extract NLC and how?

## Objective

### General objective

To evaluate the efficacy and side-effects of 5% w/w ginger extract NLC *versus* 1% w/w non-steroidal anti-inflammation drug on relieving knee pain in osteoarthritis patients.

### Specific objectives

1. To evaluate the efficacy of 5% w/w ginger extract NLC (treatment group) on relieving knee pain for 12 weeks of treatment.
2. To evaluate the efficacy of 1% w/w diclofenac gel (controlled group) on relieving knee pain for 12 weeks of treatment.
3. To evaluate the patients' global assessment of improvement after receiving 5% w/w ginger extract NLC and 1% w/w diclofenac gel.
4. To compare average scores of WOMAC, KOOS, and ISOA in knee OA patients after receiving 5% w/w ginger extract NLC and 1% w/w diclofenac gel.
5. To compare laboratory result i.e. blood for hematology (CBC), liver function test, and renal function test of knee OA patients after receiving 5% w/w ginger extract NLC and 1% w/w diclofenac gel to evaluate side effects.
6. To evaluate the adverse event of knee OA patients after receiving 5% w/w ginger extract NLC and 1% w/w diclofenac gel.

## Conceptual framework

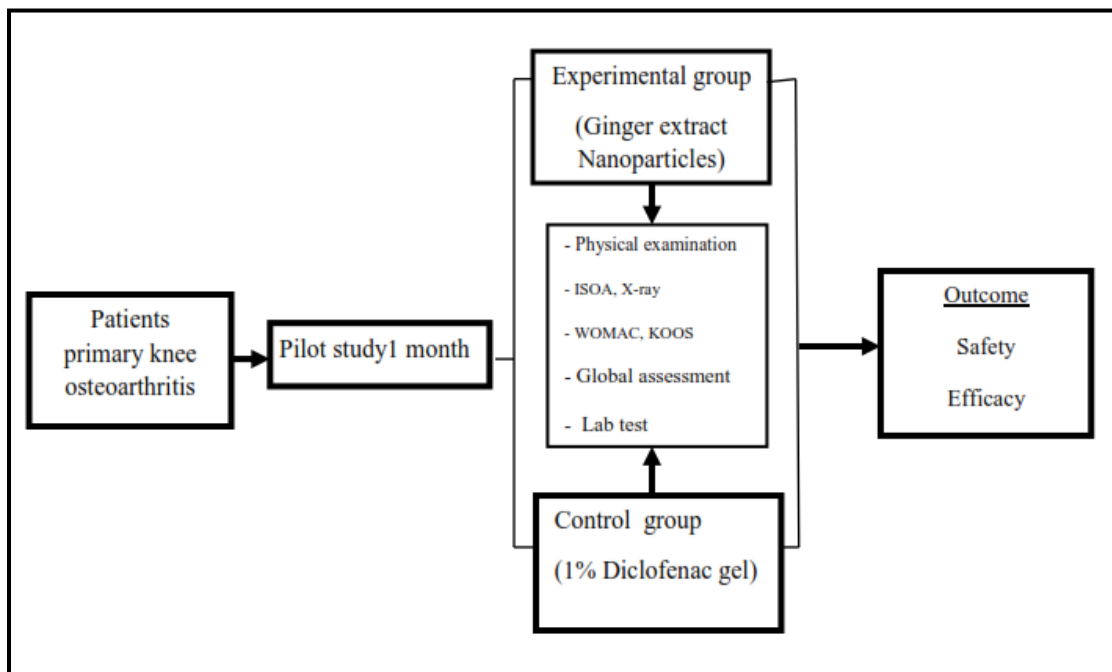


Figure 1 Conceptual framework

## Operational definition

### Knee osteoarthritis

Diagnosis criteria were based on American College of Rheumatology classification knee pain and radiographic osteoarthritis and at least 1 of the following 3 items [10].

1. Over 50 years of age
2. Less than 30 minutes of morning stiffness
3. Crepitus on active motion

### Grading of Kellgren Lawrence

OA is graded on radiographs according to criteria of Kellgren Lawrence.

Grade 0 - Normal radiograph

Grade 1 - Doubtful narrowing of the joint spaces and possible osteophytes.

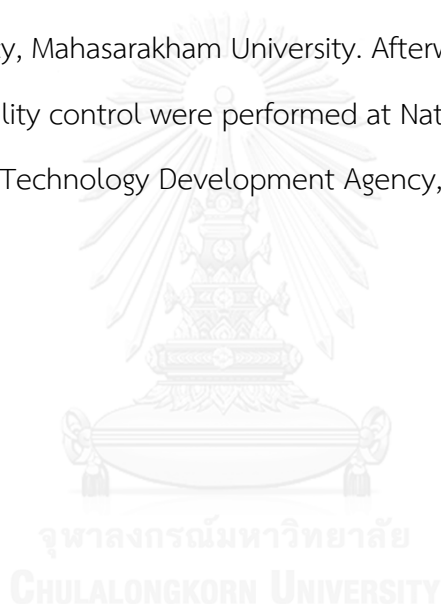
Grade 2 - Definite osteophytes and absent or questionable narrowing of the Joint spaces.

Grade 3 - Moderate osteophytes and joint space narrowing, some sclerosis and possible deformity.

Grade 4 - Large osteophytes, marked narrowing of the joint.

### **Ginger extract nanostructure lipid carrier (NLC)**

Ginger, the rhizome extract of the herb *Zingiber officinale* Roscoe, produced at Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University. Afterwards, ginger extract NCL were prepared and the quality control were performed at National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, Thailand.





## CHAPTER II

### LITERATURE REVIEW

In this study, the author has reviewed relevant concept, theories, and research on the following topics:

1. Osteoarthritis
2. Treatment of knee osteoarthritis
3. Ginger ( *Zingiber officinale* Roscoe)
4. Nanoparticles

#### Osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disorder of the synovial joints that results in localized loss of hyaline cartilage, remodeling of underlying bone and osteophyte formation at the joint margins[11] . It is characterized by joint pain, stiffness and limited range of movement. Patients with OA are at a high risk of death compared with the general population by odds ratio of 1.54[1] . OA commonly affects the hands, feet, spine, and large weight-bearing joints such as the hips and knees. Knee OA is more important not only for its high prevalence rate compare with other types of OA but also for its presentation at earlier age groups particularly in young age groups of women. The incidence of knee OA increase by age and higher average weight of the population. The greatest incidence of arthritis and musculoskeletal disease is expected to be high in most of the developing countries including Thailand. In the Community-Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases (COPCAORD) study, the prevalence of symptomatic knee OA in Thai rural area was 11.3% [12].This number was equal to the World Health Organization (WHO) estimates that OA will be the fourth leading cause of disability by 2020[13] .

## Pathogenesis

OA is a complex disease, whose pathogenesis changes the tissue homeostasis of cartilage and subchondral bone, determine the predominance of destructive process. The cartilage is a dense connective tissue comprises of chondrocytes. This tissue is highly organized into a network of two main extracellular matrixes (ECM); type II collagen and aggrecan. Chondrocytes control cartilage metabolism and maintain the structural integrity of the ECM with the cartilage. The catabolic and anabolic factors secreted by chondrocytes are responsible for keeping a balance between matrix synthesis and degradation. OA joints, a combination of mechanical and biochemical events breaks this equilibrium, accordingly causing the degradation process to take precedence and resulting in a loss of cartilage matrix [14]. Degradation of cartilage results from enzymes produced by the chondrocytes in response to stimuli such as mechanical, tissue injury, and inflammatory cytokines and mediators. Although proteoglycan is replaceable to a certain degree, the loss of type II collagen is essentially irreversible. These concepts are the importance of discovering a therapeutic agent that either treats its loss, or inhibits or slow down its degradation.

### Classification of osteoarthritis

**Primary osteoarthritis**, there is idiopathic OA which is further divided into localized or generalized form of the disease. Localized OA most common target joint affected is the knee joint, whereas hand, shoulder, feet, hip, and spine are less frequently affected. Generalized OA consists of involvement of three or more joint site. This type was considered a primarily degenerative disorder and a natural occurrence of “wear-and-tear” on joints as a result of aging. With aging, the water content of the cartilage increases, and the protein makeup of cartilage degenerates. Finally, cartilage starts with degenerate by flaking or forming tiny crevasses. Severe cases, there is a total loss of cartilage cushion between the bone of joints. Repetitive

use of the worn joints over the years can irritate and inflame the cartilage, causing joint pain and swelling. Loss of the cartilage cushion causes friction between the bones, leading to pain and limitation of joint mobility. Inflammation of the cartilage can also stimulate new bone outgrowths (spurs, also referred to as osteophytes) to form around the joints.

**Secondary osteoarthritis** is caused by another disease or condition. Conditions that may also result from trauma, congenital or developmental disorder, septic arthritis, and other disease such as diabetes mellitus, acromegaly, hypothyroidism, or neuropathic arthropathy. Obesity causes OA by increasing the mechanical stress on the cartilage. In fact, next to aging, obesity is the most powerful risk factor for knee OA [15], [16].

#### **Risk factor for osteoarthritis**

OA has a multifactorial etiology, can be considered the risk between systemic and local factors. However, we only know that these factors seem to happen more often with people who have the condition.

##### 1.3.1 Systemic risk factors

#### **Age**

It is most important factor for development of osteoarthritis; with increasing age the tensile property of cartilage in articular cartilage is decreased results in accumulation of glycation which causes mechanical failure. About 1 in 10 to 2 in 10 people age over 60 have osteoarthritis that cause them pain [15]

#### **Gender**

Women have a higher level of pain and disability than men. In addition, female particularly those  $\geq 55$  years tended to have more severe OA in knee but not in other

site. The results of this study demonstrated sex differences incidence of knee OA particularly after menopausal age[17] .

### **Diet**

Rapid change in diet and lifestyle by consumption of undefined carbohydrate and junk foods increased the rate of chronic disease. Furthermore, chondrocytes are powerful source of reactive oxygen species, which may damage cartilage collagen and synovial fluid hyaluronate[18] .

Local risk factors

### **Obesity**

Overweight is a risk factor and a positive association between obesity and knee OA results in substantial overloading and damage to the knee joint [19, 20].

### **Joint injury and trauma**

Articular cartilage undergo loading from daily physical activities, in joints injuries and trauma the cartilage loses its flexibility, destroy the cell and decrease the loading of the sub-chondral bone.

### **Occupation**

The lifting of heavy loads was found mainly in farmers, factory workers, and general labors; all of these stress activities causes the strong association between knee injury and OA[21] .

## **Sign and symptom of knee osteoarthritis**

### **Pain**

Pain is the most common symptom in knee OA, a leading cause of chronic disability, and a major source of the disability attributable to OA. Pain in knee OA typically exacerbates by activity and relieves by rest. In advance cases synovitis may

appear and leads to pain at rest or night. However, women are more likely to report pain and pain correlates strongly with psychological variables such as anxiety and depression[22] .

### **Stiffness**

Early morning stiffness is occasionally severe but most patients complain more of inactivity, getting stiffness in the latter of the day. Stiffness is initially due to pain and muscle spasm but later capsular contracture and incongruity of the joint surface contribute.

### **Crepitus**

Crepitus is a common finding and is probably due to the disruption of the normally smooth articulating surfaces of the joints. It is palpable over the wide area of the joint[23] .

### **Restricted movement**

Restricted movement can occur in the affected joint due to pain, capsular thickening or the presence of an osteophyte, but may be accentuated by effusion and soft tissue swelling[23] , [24].

### **Tenderness**

Tenderness to palpation of involved joints may be evident with or without associated signs of inflammation. Point tenderness away from the joint line suggests a periarticular lesion.

### **Deformity and instability**

In advanced cases, patients may present with instability symptoms or genu valgum (knock knee) or varum because of severe cartilage loss, osteophyte, re-modeling and bone attrition.

## Investigations and diagnosis

The most common presenting symptom in persons with knee OA is pain that is worse with using and better with resting. Diagnosis is based on patient's history and examination that is the correct attribution of sign and symptom affected site. However, imaging can assist in making a diagnosis of knee OA by refuting other diagnosis when the clinical picture from history and physical examination leaves this diagnosis unclear. Plain radiographs are helpful in assessing for the presence and severity of OA. The major radiographic features of OA include: joint space narrowing, subchondral sclerosis, osteophytes and subchondral cyst. The addition of laboratory criteria enhances the diagnostic accuracy; however, these tests are not necessary for all patients[10].

American College of Rheumatology clinical classification criteria for OA of the knee are indicated:[25]

1. Using history and physical examination
  - a) Pain in the knee
  - b) And 3 of the following
    - Over 50 years of age
    - Less than 30 minutes of morning stiffness
    - Crepitus on active motion
    - Bony tenderness
    - Bony enlargement
    - No palpable warmth of synovium
2. Using history, physical examination and radiographic findings
  - a) Pain in the knee
  - b) Radiographic evidence of osteophytes
  - c) And 1 of the following

- Over 50 years of age
  - Less than 30 minutes of morning stiffness
  - Crepitus on active motion
3. Using history, physical examination and laboratory findings
- a) Pain in the knee
- b) And 5 of the following
- Over 50 years of age
  - Less than 30 minutes of morning stiffness
  - Crepitus on active motion
  - Bony tenderness
  - Bony enlargement
  - No palpable warmth of synovium
  - ESR < 40 mm/hour
  - Rheumatoid Factor (RF) < 1:40
  - Synovial Fluid (SF) sign of osteoarthritis

The criteria for diagnostic of knee OA and diagnostic accuracy are given in Table 1.

**Table 1** The criteria for diagnostic of knee OA and diagnostic accuracy

---

**Clinical criteria**

- Age older than 50 years
  - Bony enlargement
  - Bony tenderness
  - Crepitus
  - No palpable warmth
  - Stiffness for less than 30 minutes
-

---

**Laboratory criteria**

- Erythrocyte sedimentation rate (ESR) less than 40 mm per hour
  - Rheumatoid factor less than 1:40
  - Synovial fluid analysis: clear, viscous, white blood cell count less than 2,000 per  $\mu\text{L}$ .
- 

**Radiographic criteria**

- Presence of OA
- 

**Diagnostic accuracy**

Criteria	Sensitivity	Specificity	LR+	LR-
	(%)	(%)		
Knee pain plus at least three clinical criteria	95	69	3.1	0.07
Knee pain plus at least five clinical criteria or Laboratory criteria	92	75	3.7	0.11
Knee pain plus at least three clinical criteria plus osteophytes present	91	86	6.5	0.01

*LR+* = positive likelihood ratio, *LR-* = negative likelihood ratio

Reference: Altman, R, et al.: *Arthritis Rheum* 29:1039, 1986 [25]

**Treatment of knee osteoarthritis**

The treatment goals for patients with OA include patient education about the disease and its therapy, control pain and swelling, minimize disability, improving function, prevent progression, and improve the quality of life.

Treatment of knee OA can be subdivided in to non-pharmacological, pharmacological, and surgical treatments which must be optimal treatment according to individual risk factor, and the severity of joint pain and deformity[26] .

**Non-pharmacological treatment of osteoarthritis**

Non-pharmacologic therapies for knee OA which there is reasonably strong evidence of efficacy include exercise programs, weight loss, and patient education. In



addition non-pharmacological intervention, other than surgical approaches, generally begin before medications are as following[27] .

### **Patient education**

Patient with OA should be informed of their diagnosis and to enhance understanding of the condition. Patient who have conceptions of disease and its natural history address better and report less pain. The most important goal is to instill a positive attitude.

### **Weight reduction**

The majority of patients with OA are either overweight or obese. There is good evidence for efficacy of weight loss decreases pain substantially in those with knee OA. Losing 5 kg of weight reduces the force on the knee by 15-30 kg with each step.

Other methods of unloading an osteoarthritis joint include canes and walkers, which can reduce joint force. A study of soft, elastic heeled sport shoes or the use of insoles for patients with knee OA diminishes impact loading.

### **Physiotherapy**

Physiotherapy should be started as soon as possible to improve joint mobility, increase muscle strength, reduce pain and also facilitates weight loss. All patients should participate in an exercise program to lead to improve knee pain, mobilize the joint and strengthen the surrounding muscle. Exercise program should be individualized and combined both range of motion (ROM) and strengthening exercise.

A part from exercise program, physiotherapy include pain relief modalities such as hot pack, short wave, ultrasound, and transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). Some of these may not be relevant, depending on the person [11].

## **Pharmacological treatment of osteoarthritis**

Pharmacological intervention is the most widely used form of treatment and involves the use of the simple analgesics such as paracetamol (acetaminophen) along with NSAIDs. However, there are no specific pharmacologic therapies that can prevent the progression of joint damage due to OA [28].

Type of pharmacological therapy can be categorized as oral, topical, or intra-articular injection.

### **Oral therapy**

Analgesics is the primary indication for the use of pharmacologic agents in patient with OA who do not respond to non-pharmacologic intervention.

#### **Acetaminophen (Paracetamol)**

Acetaminophen is the drug of choice for pain relief in OA of the knee. Clinical trials found evidence that acetaminophen is superior to placebo, but less effective in relieving pain of knee OA than non-steroidal anti inflammation drugs (NSAIDs). There has been much debate about whether acetaminophen or NSAIDs should be used as first-line agent. The recent Osteoarthritis Research Society International (OARSI) in 2010 review along with European League Against Rheumatism (EULAR), the UK National Institute for Clinical Excellence (NICE) and the American Society of Orthopedic Surgeons (AAOS) guideline recommended acetaminophen 4 g/day for OA of the hip or knee. Furthermore, adverse effects of therapeutic doses of acetaminophen are seldom seen. However, the risk of GI complications is greater with the combination of acetaminophen and NSAIDs than with either alone [29, 30].

#### **Non-steroidal anti inflammation drugs (NSAIDs)**

The non-steroidal anti-inflammation drugs have both analgesic and anti-inflammatory effect in patients with OA who fail to response to acetaminophen or for

those with moderate to severe pain. They achieve the latter by inhibiting the catalytic function of cyclooxygenase (COX) enzyme that convert arachidonic acid to prostaglandins. There are two types of COX enzyme. The constitutive COX-1 enzyme produces homeostatic prostaglandins within the intestinal tract, within the kidney, and within blood platelets and vascular endothelium. The inducible COX-2 enzyme produce prostaglandins involved in the inflammatory response. Non-selective NSAIDs inhibit both COX-1 and COX-2 enzyme. The activity of analgesic is achieved within 1 week and anti-inflammatory effect within 3 weeks [31].

### **Selective COX-2 inhibitors**

There are drugs which selectively inhibit the COX-2 enzyme, which is the enzyme shown to be induced during inflammation. Hence, this class of drugs should provide analgesic and anti-inflammatory effect without the GI tract adverse effects of conventional NSAIDs. In 2005, the FDA recommended that warnings appear on the labels of selective COX-2 inhibitor concerning their heart risks and requiring each prescription to have a guide description the risks. So, selective COX-2 inhibitors are an option for patients at low cardiovascular risk who have a history of peptic ulcer, GI bleeding, or GI intolerance to NSAIDs.

### **Opioids**

Opioids also may have a beneficial role in the treatment of knee OA. Guidelines from the American College of Rheumatology support the use of opioid therapy when other treatments have been ineffective or are inappropriate. Tramadol (Ultram), with or without acetaminophen, decreases pain intensity, relieves symptoms, and improve function [32-34].

## **Topical therapy**

### **Topical NSAIDs**

The use of topical therapies avoids many of the adverse effects associated with systemic medications. A meta-analysis of RCTs compared topical NSAIDs with placebo or oral NSAIDs in patients with knee OA. Typically, topical NSAIDs were superior to placebo in relieving pain, but only for the first two weeks of treatment. Topical NSAIDs were less effective than oral NSAIDs, even in the first week of treatment [35].

### **Topical capsaicin**

Capsaicin derived from pepper plants and preparation of capsaicin cream 0.025% (Zostrix) induces depletion of substance P involved in transmitting pain. A review of placebo controlled trials of capsaicin concluded that it was significantly more effective than placebo, but less effective than topical NSAIDs [36, 37].

### **Intra-articular injections**

In acute exacerbation of knee OA, intra-articular glucocorticoids can be used after aspiration of a joint effusion. This may provide short term relief. A systemic review of clinical trial found a significant short term reduction in pain and improve in patient self-assessment with intra-articular corticosteroid injection compared with placebo injection. However, good evidence of long term benefit is lacking.

Intra-articular hyaluronic acid injection for OA are minimally effective. A meta-analysis show that studied demonstrating benefit from intra-articular hyaluronic acid injection were poorly designed or industry sponsored, whereas, other studies demonstrated no clinically significant improvement in function [38].

## **Outcome measurement of knee osteoarthritis**

The choice of an outcome measure is a major step in the design of clinical trials. In evaluating the symptomatic severity of knee OA, scientific group such as the

OMERACT (Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials), the AAOS (American Society of Orthopedic Surgeons), and OARSI (Osteoarthritis Research Society International) have raised the importance of evaluating at least three dimensions: pain, patient's global assessment of disease status, and physical function [39, 40].

In recent decades, there are clinical tools for the outcome measurement in knee OA patients have been used.

### **The Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) OA Index**

The WOMAC index is multidimensional, self-administered health status evaluation instrument for patients with knee OA. It is consisted of 24 items that are grouped into three dimensions, enclosing pain (five items), stiffness (two items), and function (17 items). Patient responses can be recorded in a format of VAS scale [41, 42]

### **Index of severity for osteoarthritis (ISOA)**

The index of severity for osteoarthritis of the knee by Lequesne *et al* is consisted of three dimension, including pain or discomfort (five items), the maximum walking distance (two items), and activities of daily living (ADL; four items). Each dimension has a maximum total score of 8; consequently, the total score range from 0 to 24 [43].

### **The knee injury and osteoarthritis outcome score (KOOS)**

The KOOS is a knee specific instrument, developed to assess the patient's opinion about their knee associated problem. It comprises 42 items in 5 separate of scored subscales; (1) pain; (2) other symptoms such as swelling, restricted range of motion and mechanical symptoms; (3) activities of daily living; (4) disability on a level physically more demanding than activities of daily living; (5) knee-related quality of life [44, 45].

### Visual analog scales (VAS)

VAS average pain on knee movement using a 10-cm horizontal VAS was evaluated. The VAS was marked every 1 cm increment with the descriptions “no pain” on the left end and “worst pain” on the right end. Subsequent recordings of VAS were done on separate sheets of paper in order to prevent the subject from comparing score with the previous one.



### *Zingiber officinale* Roscoe (Ginger)

*Zingiber officinale* Roscoe, known as ginger, is in family Zingiberaceae which prefers tropical climate regions such as South East Asia, India, China and Jamaica. The important constituents present in two distinct groups of chemicals, volatile oils (1-3%) and non-volatile pungent compounds (4-7%).

The volatile oils components in ginger consist mainly of sesquiterpene hydrocarbons, predominantly zingiberene (35%), curcumene (18%) and farnesene (10%). The non-volatile pungent compounds are gingerols, the others compounds are shogals, gingediol, gingerdione and paradols [46].

The biological active constituents including the main pungent principles, the gingerols, which conduct as a series of homologues with a range of unbranched alkyl chain lengths. In the fresh ginger rhizome is the most constituent in gingerol series. On the other hand, in dried ginger powder, shogaol, a dehydrated product of gingerol, is a predominant pungent constituent.

### **Pharmacological activities of *Zingiber officinale* Roscoe.**

The extracts from ginger rhizomes are very valuable products responsible for its medicinal properties. Oleoresins are obtained by solvent extraction (acetone, ethanol, dichloromethane ). The major pungent component of ginger oleoresin is 6-gingerol. There are many investigators on pharmacological activities of gingerols from *Zingiber officinale* Roscoe [47].

#### **Analgesic activity**

6-gingerol has been reported on pain receptor induced by acetic acid and formaline in mice and paw edema induced by carrageenin in rat. The acetic test is normally used to study the peripheral analgesic effect of drugs. However this test is a nonspecific, it is widely used for analgesic screening and involves local cholinergic and histaminic receptors, and mediators acetylcholine and histamine [48]. The results have shown that both of 6-gingerol (50mg , 100 and 250 mg/kg) and indometacin (10 mg/kg) significantly decreased the carrageenin induced the paw edema [49]. In addition, the study of Young *et al.* studied the activities of analgesic and anti-inflammatory of 6-gingerol. The study used male mice whom were pretreated with 6-gingerol (12.5, 25 mg and 50 mg/kg), indomethacin (10 mg/kg) intraperitoneally. Writhing response was induced by 1% acetic acid (0.1 ml/g) and control group received normal saline. The result showed 6-gingerol (25 mg and 50 mg/kg) produced significant and dose dependent inhibition when compared with control group. The inhibition at 25 mg/kg of 6-gingerol was similar to indomethacin [50]. Similarly, the study by Mascolo *et al.* who conducted to mice orally with ginger extract (50 and 100 mg/kg) . Ginger extract was able blocking writhing induced by injection of 0.6 % acetic acid solution and percent inhibition were 3.3 and 8.6 respectively. This result showed that 6-gingerol at the dose of 50 and 100 mg/kg had more edema inhibition than indomethacin at the dose of 10 mg/kg [46].

### Anti-inflammatory activity

Inflammation is associated with large range of mediators that initiate the inflammatory response. Two major cytokines involved in the initiation of inflammation are TNF- $\alpha$  and IL-1. In addition to cytokines, metabolites of arachidonic acid also participate in the inflammatory process. Products produced by the metabolism include both cyclooxygenase products (prostaglandins, thromboxanes) and lipoxygenase products (leukotrienes). 6-gingerol had been reported to have anti-inflammatory action, which include suppression of the both cyclooxygenase and lipoxygenase [7, 51]. In vitro study of anti-inflammatory activity was used U937 cell culture. Ginger extract with dichloromethane: methanol (1:1 v/v) was able to inhibit Lipopolysaccharide (LPS)-induced production of PGE<sub>2</sub>. The IC<sub>50</sub> for inhibition was less than 0.1  $\mu$ g/ml which similar to indomethacin. The rank order of IC<sub>50</sub> to inhibit PGE<sub>2</sub> production was 10-gingerol<8-gingerol<6-gingerol<6-shogaol [51].

In vivo study of anti-inflammatory activity was used widely in animal model. The inflammation as rat paw edema was induced by injection of carrageenan (1 mg/paw), compound 48/80(10  $\mu$ g/paw) or serotonin (240 ng/paw). Intraperitoneal conduction of ginger hydroalcoholic extract significantly reduced paw edema at dose 180 and 310 mg/kg for carrageenan-induced paw edema. All dose of ginger (18.6, 62 and 186 mg/kg) significantly reduced paw edema volume for 40/80 compound and highest dose of ginger (310 mg/kg) significant reduced paw edema volume for serotonin-induced [52].

Ginger ethanol extract (50-800 mg/kg) and diclofenac (100 mg/kg) were conducted by intraperitoneal to rat. Paw edema was induced by in plantar injection of fresh egg albumin (0.5 mg/kg). All dose of Ginger ethanol extract significant reduction in fresh egg albumin induced acute inflammation of rat paw edema [53]. Recently, the hydroalcoholic extract of ginger is also observed to be effective in ameliorating the collagen-induced inflammatory process and arthritis in rat [54]. Evaluating ginger extract intra-peritoneally for 26 consecutive days ameliorated the clinical scores, disease



incidence, joint temperature, swelling and cartilage destruction. Biochemical studies showed that the ginger administered cohorts had a reduction in the serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF-  $\alpha$  and anti—CII antibodies in the serum. The extract (200 mg/kg/day) was observed to be better than 2 mg/kg/day of indomethacin used as a positive control. The extract of ginger was a good anti-inflammatory drugs for OA and that it mediates its protective effects by decreasing inflammation and modulating the inflammatory cytokines [54].

Topical formulation of ginger extract containing 5% gingerols was into plaster and solution. The study was to evaluate anti-inflammatory activity by cotton oil-induced ear edema in mice. The result found that ginger extract in acetone solution exhibited dose-dependent topical anti-inflammation ( $IC_{50}=142 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), nearby reference drug (indomethacin,  $IC_{50} =93 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). In addition, ginger extract loaded in plaster reduced edema 66 % and indomethacin in acetone solution reduced edema 57% [55].

### Preclinical safety data

#### Acute toxicity

Normally, ginger is safe drug without adverse events and has a wide range of utility. Ahmad *et al.* (2002) tested ginger oleoresin on adult Swiss mice. The oleoresin exhibited a marked action on the central nervous system. A single dose up to 0.5 g/kg effected in vasodilatation, activeness, and alertness in animals. A dose up to 3 g/kg was nonlethal, while doses above that resulted in mortalities, an abnormal gait associated with abdominal cramps, and gastric irritation. The  $LD_{50}$  is 6.284 g/kg. Death may be due to the direct action on the CNS resulting in respiratory failure as well as circulatory arrest [56].

Oral extract (80%ethanol) at 2.5 g/kg was not associated with mortality in mice. Two out of 10 animals suffered mild diarrhea. Dose of 3 and 3.5 g/kg caused 20% and

30% mortality, respectively, within 72 h after consumption. The acute oral LD<sub>50</sub> in rat and acute dermal LD<sub>50</sub> in rabbits of ginger oil exceeded 5 g/kg body weight [57, 58].

A patented ginger extract (EV.EXT.33) was investigated by oral gavage in concentration of 100, 333, 1,000 mg/kg to three groups of 22 pregnant female rats from day 6 to 15 of gestation. For comparison, fourth group received the vehicle, sesame oil. The rats were killed on day 21 of gestation and investigated for standard parameter of reproduction performance. The fetuses were inspected for sign of teratogenic and toxic effect. The result showed that pregnant rats during the period of organogenesis caused neither maternal nor developmental toxicity at daily dose of up to 1,000 mg/kg body weight [59, 60].

### Drug interaction

Not many ginger-drug interaction have been reported in literature. Ginger does not display interact with the anti-coagulant drug warfarin in rats or man. In 2005, Jiang *et al.* studied the effect of herbal medicines on warfarin response in healthy subject. This study designed an open label, three ways crossover, randomized in 12 healthy volunteers. Ginger was ingested at a dose of 400 mg (three times a day for one week) before warfarin, and was continued for a further week after it. Ginger was not found statistically to exert significant effect on either the clotting status or the kinetics and dynamics of warfarin [61].

In Taiwan, the synergistic effect of ginger and nifedipine on anti-platelet aggregation in normal human volunteers and hypertensive patients was conducted. This study had been shown that the percentage of platelet aggregation induced by collagen, adenosine diphosphate (ADP) and epinephrine in hypertensive patients. Both aspirin and ginger could potentiate the anti-platelet aggregation effect of nifedipine in normal human volunteers and hypertensive patients. These result recommended that

ginger and epinephrine have a synergistic effect of ginger and nifedipine on anti-platelet aggregation [62].

### Clinical studies

The study by Bliddal *et.al.* conducted a randomized, placebo-controlled, cross-over study of ginger extract (170 mg EV.ext.33) and Ibuprofen (400 mg) in OA for 3 weeks each. The result found that Ibuprofen was better than ginger extract and both treatments were better than the placebo treatment in reducing the pain [63].

In 2000, Jariya studied efficacy of HMP-33 (ginger extract) compare with diclofenac in the knee OA treatment. The study designed open comparative in 40 knee OA patients from out-patient of Chulalongkorn Hospital. The treatment group received one capsule of HMP-33 (225mg) twice a day and control group received diclofenac 1 tablet (25mg) twice a day. All patients received medicine for 3 months, after that patients in both groups were measured the efficacy of treatment by WOMAC, VAS, and patient's Global Assessment Score. HMP-33(ginger extract) had the same efficacy in treatment of knee OA as diclofenac. Moreover no side effect from ginger extract was found [64].

In 2001, Altman and Marcussen evaluated the efficacy of ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. This study designed a randomized, double-blind, placebo controlled, multicenter, parallel-group, 6 weeks study. After washout, patients received ginger extract or placebo 1 capsule twice daily, morning and evening. Each capsule contained 255 mg of EV.EXT.77, extracted from 2,500-4,000 mg of dried ginger rhizomes and 500-1,500 of dried galanga rhizome whereas matching placebo capsules contained coconut oil and minimize a possible pungent sensation. Result was shown that 247 evaluable patients, percentage of responders a reduction in knee pain on standing and after walking 50 feet was superior in the ginger extract group compared with the control group [65].

In 2003, Wigler *et al.* studied the effect of a ginger extract (Zintona enteric coated) on the patients suffering from gonarthrosis. 29 patients with symptomatic OA knee were included after randomization in a double blind, placebo controlled, and crossover study of 6 months period. The treatment group received a ginger extract (250 mg per capsule, qid), while the placebo group received the same number of identical looking capsule per day. The main outcomes were evaluated by a 100 mm visual analog scale (VAS) of pain on movement and of handicap. Result of Zintona was as effective as placebo during the first 3 months of the study, but at the end of 6 months, 3 months after crossover, the ginger group showed a significant superiority over the placebo group [66].

In 2006, Haghghi *et al.* compared the effect of indomethacin and ginger on relieving osteoarthritis pain. A randomized, double blind, parallel group clinical study was designed to evaluate of 52 responders a reduction with knee pain to ginger extract and indomethacin. The treatment group ingested one capsule of ginger four times a day. Each capsule contained 250 mg of ginger powder whereas control group received 25 mg of indomethacin. All patients were evaluated before and after 6 weeks of drug consumption. The result showed improvement in both groups. Ginger is as effective as indomethacin in relieving symptom of osteoarthritis with negligible side effects [67].

In 2011, Zakeri *et al.* investigated the effect of ginger extract on knee pain, stiffness, and difficulty in patients with knee osteoarthritis (OA). 204 patients with knee OA were enrolled in a randomized controlled trial. After a 1-week washout, the treatment group received ginger extract (103 cases) which Zintona capsules contained 250 mg of powdered ginger and placebo group (101 cases) received placebo capsules being matched with Zintona capsules, contained starch. All patients were measured by a reduction in pain >15 mm on VAS or 20% reduction in mean score of each index of the Western Ontario and Mc Master Universities (WOMAC) criteria after 6 weeks. Result displayed pain reduction according to VAS was more significant in ginger than

placebo group. While pain reduction according to WOMAC was greater in ginger than placebo group, the difference was not statistically significant. Result of reduction in morning stiffness and difficulty were statistically greater in ginger than the placebo group. In addition there was no difference between the two group in side effect of therapy [68].

In 2012, Niempoog *et al.* evaluated the efficacy of the combination of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe ) and plai (*Zingiber cassumunar*) gel for the treatment of OA of the knee using 1% diclofenac gel as a comparator. A double-blind, randomized, controlled trial of the combination of 4% ginger and plai extract in a gel (Plygersic gel) as compared with 1% solution of diclofenac in patients with knee OA. The number of participants in each group totaled fifty. The results showed both Plygersic gel and diclofenac gel significantly improve knee joint, symptoms, daily activities, sports activities and quality of life measured by KOOS following 6 weeks of treatment Plygersic gel [69].

### **Nanoparticles**

Nanoparticles are of great interest in drug delivery. It appears that nature, in making the biological system, has extensively used nanometer scale.

Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructure lipid carriers (NLC) are the two main types of lipid nanoparticles. In the last two decades, SLN and NLC focused mainly on pharmaceutical non dermal administration routes, ie. parenteral, ocular and pulmonary administration. During the last 5 years SLN and NLC have been intensive investigated for dermal application because of many positive features that have been reported after their application to the skin. Due to the lipid matrix, that can be prepared by several types of oil, for example, vegetable oil (e.g. soybean oil) and medium chain triglycerides (e.g. capric triglycerols) with the concentration of 10-20% of oil phase.

However, the first generation of SLN overcame some problems related to nanoparticulate carrier technologies which limited the use such as physical and chemical stability of phospholipids, drug leakage during storage, lack of scale-up production feasibility, non-availability of cheap pharmaceutical material, and requirement of using organic solvent in some methods. SLN were produced from a solid only [70, 71].

### **Nanostructured lipid carriers (NLC)**

In the second generation technology of NLC, the particles can be produced by mixing various different lipid molecules, for example blending solid lipid with liquid lipid (oil) whereas ensuring that the mixture of such lipids is still in solid state. The concept of NLC comprises the creation of a less ordered solid matrix leading to high drug-load. Therefore, NLC have an increased drug loading capacity in comparison to SLN and the possibility of drug expulsion during storage is less. In addition some desirable methods used to conduct SLN are also available for the production of NLC [72, 73].

There are three types of NLC that can be summarized (Figure 2).

1. The imperfect type

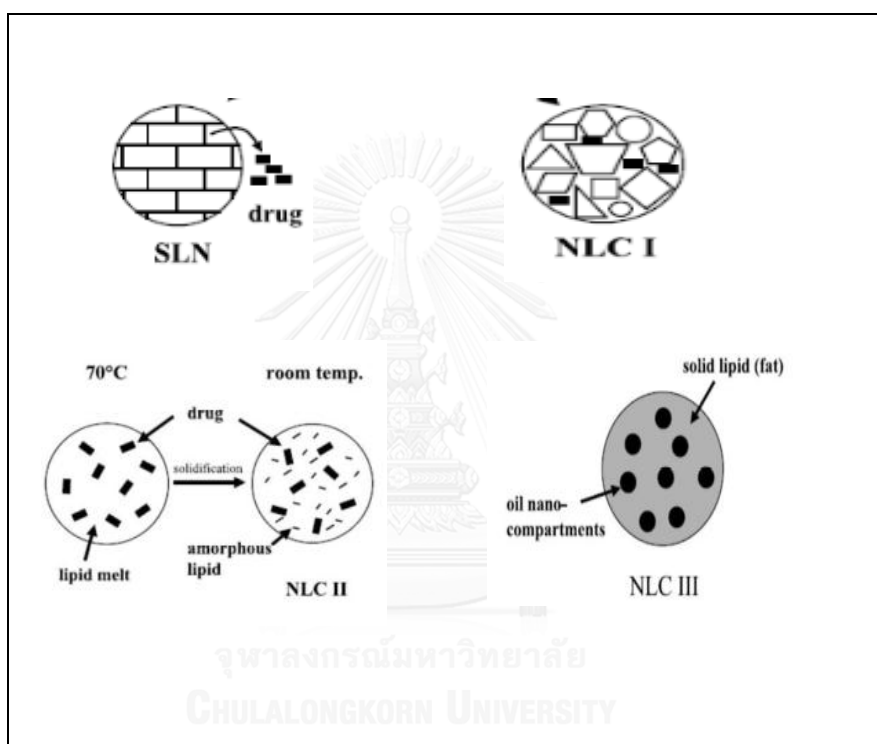
Solid lipid and liquid lipid (oils) are mixed. Caused by molecules, crystallization leads to highly disordered lipids.

2. The amorphous type

A principle problem in SLN is the formation of a perfect crystal, which can be limited of drug load. Thus, NLC avoidance of lipid crystallization can be achieved by mixing special lipids, e.g. hydroxyoctacosanyl hydroxystearate with isopropyl myristate leading to amorphous lipid.

### 3. The multiple type

The third type of NLC represents oil droplets in solid in water dispersion (w/o/w). The solid lipid matrix carries tiny liquid oil nanocompartment. This NLC type utilizes the fact that for a number of drugs, the solubility in oil is higher than their solubility in solid lipid [73].



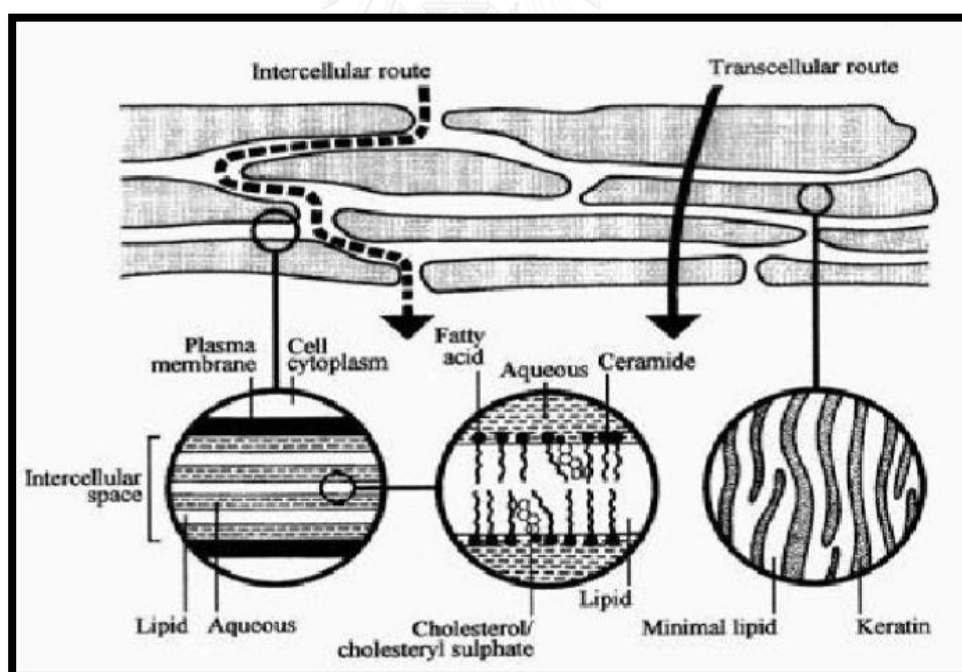
**Figure 2** The three types of NLC and SLN  
(Patidar, A., et al., 2010)

### Transdermal drug delivery systems and NLC

The skin consists of four basic layers: the stratum corneum (SC), viable epidermis, dermis and subcutaneous. The function of skin have been classified as protective, homeostatic of sensorial. The results of skin barrier properties, the skin membrane is equally capable at limiting the molecular transport from and into the

body. There are three potential pathways postulated for the absorption of substances through SC under normal conditions: (a) intercellular (paracellular) pathway; (b); transcellular pathway and (c) transappendageal pathway (Figure 2)

The significant route of transdermal penetration of the majority of the applied drugs is through intercellular spaces. The transdermal absorption process requires drug characteristics or an appropriate carrier which should be able to deliver the drug to the desired skin deepness to reach topical or systemic effect. A good transdermal delivery system must both provide an adequate drug release over long periods of time from the formulation, and allow considerable amounts of drug to overcome the skin barrier, ensure a non-irritancy of the skin, and also ensure that the drug will not be inactivated on the skin's surface or during the permeation process [74].



**Figure 3** Model of the stratum corneum and intercellular and transcellular route of penetration

(Benson H.,2005)



For this reason, a lot of research groups paid attention to the topical application of the NLC composed of physiological and biodegradable lipid observed skin hydration effect. Lipid nanoparticles are not only able to enhance the chemical stability of compounds sensitive to light, oxidation and hydrolysis, but also improve the transdermal delivery of several drugs over the conventional topical preparations such as emulsions, and gels. Predominant the small droplet size provides a large interfacial area for rapid drug release, and so the drug should exhibit an enhance bioavailability, enabling a reduction in dose and more consistent temporal profile of drug absorption [75-77].

In 2005, Ricci *et al.* studied the penetration of indomethacin from NLC-containing gel and without NLC through the stratum corneum and epidermis. They also studied the in vivo indomethacin release by tape-stripping test and the in vivo anti-inflammatory activity using the UV-B induced erythema model. Result showed that the anti-inflammation of indomethacin was more prolonged with indomethacin loaded NLC gel. In addition, the tape stripping test higher amounts of indomethacin were found in the stratum corneum after application of the indomethacin-loaded NCL gel. The in vitro permeation through the stratum corneum and epidermal from indomethacin-loaded NLC gel was more than from gel without NLC [78].

In addition, the advantages of using topical NLC as a drug delivery system are provided increase of skin occlusion. The lipid film formation on the top of skin and using very small lipid particles, which are produced from highly crystallize and low melting point, the highest occlusion will be reached. Particles smaller than 400 nm containing at least 35% lipid of high cystallity have been most effective [76]. In 2004, Souto *et al.* found a higher occlusive factor for SLN in comparison to NLC of the same lipid content. Comparing NLC with different oil content showed that an increase in oil content leads to a decrease of occlusive factor.

Recently, many drugs have been incorporated NLC. For example, aceclofenac is a potential analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agent has been approved for the treatment of various kind of pain, osteoarthritis and rheumatoid arthritis. An arthritis condition demand a controlled release drug delivery system for a prolong period so that can satisfy the goals of the treatment like reduction of the pain and inflammation, showing the disease progression and prevention of adverse reaction. The requirement for formulation of a topical drug delivery system of aceclofenac, which could both increase the presence of drug locally, for a prolonged period, and reduce the risk of systemic toxic. As an alternative route for aceclofenac transdermal administration eliminate these systemic side effect, which also offer many advantages, such as patient compliance and possibility of continuous and controlled drug absorption [79].

From the literature reviews, there are several methods to produce lipid nanoparticles. For example, micro emulsion techniques, solvent evaporation in oil-in-water (o/w) emulsion, solvent displacement technique, solvent diffusion technique, and high pressure homogenization (HPH) technique. These method are dictated by the type of drug especially its solubility and stability. However, HPH technique offers many advantages compared to the other methods such as scale up possibility, avoidance of organic solvents and short production time [80].

In various studies, NLC prepared by different the solid lipid and oil ratio showed significant different in the *in vitro* release profiles. NLC with a higher oil ratio revealed a higher drug release in comparison to NLC consisted of lower oil ratio and to SLN (100 % solid lipid).

### **Characterization of lipid nanoparticles**

Characterization of lipid nanoparticles is a serious challenge result to the colloidal size of the particle and the complexity and dynamic nature of the delivery system. The significant parameters which need to be evaluated for the lipid

nanoparticles are particle size, size distribution kinetics (Zeta potential) and particle morphology [81].

### **Physical appearances**

The physical appearances of NLC's preparations such as clarity, color and phase separation were visually observed.

### **Particle size analysis**

Photon correlation spectroscopy (PCS) is the important widely used method to characterize the particle size of nanoparticles including SLN and NLC. The data showed from PCS is computed as a function of scattering intensity and time curve. After that, they are analyzed by an autocorrelation function to obtain effective diameter (z-ave diameter) and polydispersity index (PI), as an indication of the width of the particle size distribution.

### **Zeta potential**

The evaluation of zeta potential facilitates the prediction of physical stability of colloidal system. Determination of zeta potential value, the suspensions have to be diluted with distilled water and subsequently subjected to a weak electric field. And then, the mobility of particles is measured by Laser Doppler Anemometry.

### **Particle morphology**

To determine the particle shape of NLC, electron microscopic techniques have been widely used in many studies. For example, some techniques are employed by transmission microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), and atomic force microscopy (AFM). These microscopy techniques are mostly used to study the morphology of nanoparticles.

In previous studied, the ginger extract has been demonstrated in several topical preparation and showed the enhancement of chemical stability of 6-gingerol in SLN

and microemulsion. Therefore, this study was designed to incorporate the ginger extract NLC systems and to evaluate of physiochemical properties. These properties of NLC were presented in term of particle size, particle size distribution (PI), zeta potential, and particle morphology. The stability was investigated physically including particle size, particle size distribution (PI), zeta potential, polymorphism and chemically determination of 6-gingerol by HPLC method at 4<sup>o</sup>C, 25<sup>o</sup>C and 40 <sup>o</sup>C at appropriate predetermined time intervals for 6 months. *In vitro* release study was carried out using static Franz diffusion cells. Moreover, the efficacy and safety of ginger extract NLC relieves pains in knee OA patients were also evaluated.



## CHAPTER III

### RESEARCH METHODOLOGY

#### Study design

This study was designed as comparative double blind, randomized active controlled trial. It will be conducted at Tha Chang Hospital, Singburi province. Approval from the ethical committee of Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health.

#### Population and sample

##### Target population

The patients with primary knee OA with grade II-III of Kellgren & Lawrence criteria.

##### Study population

All of the patients diagnosed as knee OA at out-patients department, Tha Chang hospital were recruited in this study.

##### Eligibility criteria

##### Inclusion criteria

1. Both male and female age > 50 yrs.
2. Primary knee OA
3. The severity of knee OA on ISOA index mild or moderate
4. Patients grade II-III of Kellgren and Lawrence criteria
5. Good communication and cooperation

##### Exclusion criteria

Subjects fulfilling any of the following criteria will be excluded from the study.

1. History of medicinal herbs allergy used during investigation
2. History of cancer, diabetes, paralysis and unknown infectious disease

## Sample size

Sample size calculation based on the ability to detect a clinically important difference of mean of pain score between controlled group and treatment group. From literature review, Altman and Marcussen (2001) [65] studied the effect of ginger extract which measured pain VAS as a main outcome of treatment in knee OA. This study used technical sample size calculation by Cohen J. (1988). To use 95% confidential interval, the power of test at 80%, and effect size of this study is 0.15 [Altman], the number of subjects was 50 per group. After adjusting for a 20% drop out, nine subjects per group (60 for total) is suggested to be an appropriate sample.

## Preparation of ginger extract nanostructure lipid carrier (NLC)

The preparation of ginger extract NLC was produced and the quality controlled was performed at National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, Thailand. The ginger extract was extracted from the *Zingiber officinale* Roscoe rhizome by acetone maceration. The ginger extract NLC preparation was prepared by weighting the composition of solid lipid, liquid lipid, surfactant mixture and water, afterward heated at 70 °C and mixed using homogenizer until homogenous nanoparticles was obtained. The quality and stability of preparation were controlled by physical and chemical determination.

Physical stability of ginger extract NLC was determined by heating and cooling cycle which the preparation was kept in the refrigerator at 4°C for 48 hours and turn in to hot air oven at 40 °C for 48 hours, this is called for one cycle. The overall 3 cycles was carried out. Characterizations were of preparation was evaluated by physical appearance, ie. particle size, size distribution kinetics (Zeta potential), particle morphology and phase separation.

Chemical stability of preparation was performed quantitation of active component 6-gingerol by HPLC method in preparation that were kept with 2 methods; heating-cooling cycle and accelerating condition (40°C). Heating and cooling cycles were conducted as same as in physical stability. *In vitro* skin permeation study was investigated by Franz diffusion cells.

### **Formulation of ginger extract NLC**

Table 2 showed the compositions of developed ginger extract NLC formulations. The principle of NLC composed of lipid phase (solid lipid, liquid lipid and ginger extract) which were prepared using different ratios of lipid and surfactant. In this study, drug free NLC dispersions for ginger extract was prepared by various solid lipid, liquid lipid and surfactant (Poloaxamer188, Tween<sup>®</sup> 80, Oleth 10). Formulation was selected based on the stability screening by heating and cooling cycles (3 cycles) of the mixture solid lipid, liquid lipid and surfactant. From the result obtained solid lipid stabilized with Tween<sup>®</sup> 80 (Tw80) showed the best physical appearance (clarity, color and phase separation). The formulations prepared from Cetyl palmitate as solid lipid and Tw80 as stabilizer showed physical instability as well as other stabilizer (Poloaxamer188, Oleth 10).

### **Characterization of ginger extract NLC**

#### **Particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential analysis**

Particle size, PDI and zeta potential were determined by photon correlation spectroscopy, PSC (Malvern, UK) at 25 °C. PSC yields the mean particle size (z-ave) and PDI which is a measure of the width of size distribution. The ginger extract NLC were put in a quartz cuvette with dilution with distilled water to have a suitable scattering intensity. The results were obtained using the average of 3 measurements and 3 replicates.

**Table 2** Compositions of the developed ginger extract NLC formulations (%<sub>w/w</sub>)

Composition	G1	G2	G3	G4	G5	G6
1. Solid lipid	5	5	5	5	5	5
2. Liquid lipid	7	7	7	7	7	7
3. Isopropyl myristate	3	3	3	3	3	3
4. Tween <sup>®</sup> 80	3	5	7	5	5	5
5. Antioxidant	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
6. Ginger extract	5	5	5	5	5	5
7. Hydrogenate lecithin	4	4	4	2	3	6
8. Water q.s.	100	100	100	100	100	100

#### ***In vitro* release study of 6- gingerol from formulations**

The *in vitro* release study is important to characterize release pattern of active substance from dosage forms and leading to predict the *in vivo* performance of dosage forms. In this study, the release patterns of 6-gingerol from NLC were evaluated. Amount of 6-gingerol in the receptor compartment was determined by HPLC method. Additionally, the formulations have small particle size and PDI < 0.3 (G1, G2 and G3) were selected to study the release pattern characteristics. *In vitro* release study was performed by modified Franz diffusion cell. The dialysis membrane was placed between two compartments of Franz diffusion cell. The Ultrafiltration membrane filters having a pore size diameter of 50 nm. (PBVK0.05 $\mu$ m. Millipore, Germany) were soaked in distilled water and soaked in isotonic phosphate buffer saline pH 7.4 for 24 hours before use. The receptor fluid was continuously mixed by magnetic stirring bar throughout the time of study. The temperature was maintained at 37 $\pm$  0.5<sup>o</sup>C. Samples of 500  $\mu$ l. was withdrawn at suitable time interval over 24 h using a syringe needle and



the same volumes were replaced with freshly prepared receptor medium. The sample solution were analyzed by HPLC method. The experiment was done in triplicate.

To elucidate the mechanism of active release from NLC for topical administration. Analysis of 6-gingerol was performed over 24 hr. by HPLC at 282 nm. In this study, sink condition were maintained over the experiment. The release profile obtained from NLC were compared to those of various amount of surfactant. The influence of particle size on the release profile of 6-gingerol from NLC could be excluded. Using one-way ANOVA comparing the different in the mean particle size by PSC of G4, G5 and G6, they were found that the particle size were different from that of G1, G2 and G3 formulations.( $p < 0.05$ )

#### **Scanning electron microscopy (SEM)**

So as to obtain the direct information on the particle size and shape of NLC, SEM analysis was performed. The information on the particle shape determined by SEM was a three- dimension image. The samples were subsequently coated with gold and examined by a scanning electron microscopy (S-400, Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld, Germany).

#### **Differential scanning calorimetry (DSC) investigations**

Differential scanning calorimetry (DSC) is a thermo-analytical method described in the European Pharmacopoeia (EP), United States Pharmacopoeia (USP) and Japanese Pharmacopoeia (JP) and was widely used to evaluate physical properties of drugs as well as to study compatibility and stability of the components in pharmaceutical preparations. Such information was very helpful for analyzing any instability issues during the design and development of new formulations.

Thermal behavior was performed using a Mettler DSC 822 apparatus. The samples weighing approximately 3-5 mg base on the lipid content were placed in 40  $\mu$ l aluminum pans. Heating curves were conducted from 25  $^{\circ}$ C to 120  $^{\circ}$ C at rate of 10

$^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , an empty aluminum pan was used as reference. The DSC parameters including onset, melting point and enthalpy were performed. This thermogram showed the melting of ginger extract, an endothermic process. The enthalpy of the process was given by the area under peak.

### **Stability of ginger extract NLC**

The sample were stored at different temperature ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  and  $40^{\circ}\text{C}$ ). All samples were kept in clear glass vials.

#### **Physical stability**

The physical stability of ginger extract NLC under storage conditions were studied with respect to the particle size, size distribution and zeta potential.

#### **Chemical stability**

Percent drug remaining was measured quantitatively using HPLC analysis at the initial time 1, 2, 3, and 6 months for 6-gingerol. The HPLC conditions conducted for the analysis are below.

<b>Operating parameters</b>	<b>Condition</b>
Brand	Waters model 2695
Stationary Phase	Phenomenex Luna $5\ \mu$ C18 (150 mm x 4.6 mm)
Mobile phase	Acetonitrile : Water : Methanol (40:50:10) with isocratic elution
Flow rate	1.2 mL/ min
Detector	UV detector at 282nm
Injection volume	10 $\mu$ l

## Research procedure for clinical study

After screening, the patients entered a one week washout for anti-inflammatory and analgesic medication, during which they are allowed to take acetaminophen as need up to 4 gm/day. If patients are determined to be eligible for the study, a baseline assessment of pain is performance after washout of medication.

The 5% w/w ginger extract NLC was applied at a dose of 1 gm 3 times a day for 4 weeks and the diclofenac group also received an identical tube containing 1% w/w Diclofenac gel applied similarly. All patients are randomized to receive ginger extract NLC as the controlled group by taking 1% w/w Diclofenac gel, both the investigator and patients were blinded to treatment assessment.

## Data collection

### Pilot study

The participants sign consent form to participate in the program. The patient-collecting procedure as followed.

1. Demographic interview according to research criteria
2. Physical examination by physician; measuring vital signs, body mass index ( BMI )
3. Plain radiographs of knee according to American College of Rhumatology clinical classification criteria
4. Laboratory examination before and after experiment ( day 0 and week4) as followed
5. Blood test: liver function test (SGOT, SGPT, ALP),renal function ( BUN, Creatinine )
6. Physical re-examination in week 4

### **Safety monitoring**

The patients was asked to report to the physician regarding any symptoms occurring after taking. Adverse event of ginger extract NLC, e.g. rash, reddening of skin including laboratory result was evaluated at week 4. Reporting of adverse event is conducted according to guidelines of WHO (Toxicity grading scale for determining the severity of adverse events) and Common terminology criteria for adverse event (CTCAE) version 4.0

### **Efficacy and safety study**

The study was a 12- week, double-blind, active controlled, parallel group trial. Data collection see Table 3.

### **Measurement**

All of the measured variable including administrative variable, baseline variable, efficacy variables, and safety variable was tabulated in Table 4.

**Table 3** The schedule of study

Activity	Trial Period				
	Screening Period	Pilot Period	Treatment Period		
Visit	Day 0	Weeks 4	Weeks 4	Weeks 8	Weeks 12
Written informed consent and patient information	x				
Medical history/Demographic	x				
Review of inclusion/exclusion criteria	x				
Physical examination	x	x	x	x	x
Vital signs )PR., RR., BP.,T.(	x	x	x	x	x
Laboratory test (CBC, LFT, RFT)	x	x			x
X-ray ( Knee )	x				
WOMAC, KOOS, ISOA index	x	x	x	x	x
Drug administration in clinic		x	x	x	x
Adverse event		x	x	x	x
Concomitant therapy		x	x	x	x
Compliance		x	x	x	x
Conclusion		x			x

**Table 4** Summary of measured variable

Variables	Type of variables	Statistic
<b>Baseline variables</b>		
▪ Age (yrs.)	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Sex	Dichotomous categorical	N (%)
▪ Body mass index(Kg/m <sup>2</sup> )	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Duration of disease (yrs.)	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Severity score	Continuous numerical	Mean ± SD
<b>Efficacy variables</b>		
<b>WOMAC</b>		
▪ Pains score	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Stiffness score	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Physical function score	Continuous numerical	Mean ± SD
<b>KOOS</b>		
▪ Symptoms score	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Stiffness score	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Pain score	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Daily function score	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Sport And Recreation	Continuous numerical	Mean ± SD
▪ Quality of life score	Continuous numerical	Mean ± SD
<b>ISOA</b>	Continuous numerical	Mean ± SD
<b>PGA</b>	Continuous numerical	Mean ± SD
<b>Safety variables</b>		
Adverse event	Ordinal categorical	N (%)
Laboratory test	Continuous numerical	Mean ± SD

## Data analysis

### Baseline

The study subjects were examined for their baseline characteristic and demographic data are described as descriptive statistics; mean, SD, 95% CI, percentage and frequencies. Inferential statistics, comparing baseline between treatment group and controlled group were provided.

### Efficacy

Statistical analysis were performed to compare the outcome between the treatment group and controlled group. The statistical analysis were summarized in Table 5

**Table 5** Summary of statistical analysis

Variables	Statistical test
Overall WOMAC score	Repeated measurement ANOVA
WOMAC for pains score	Repeated measurement ANOVA
WOMAC for stiffness score	Repeated measurement ANOVA
WOMAC for physical function score	Repeated measurement ANOVA
Overall KOOS score	Repeated measurement ANOVA
KOOS symptoms score	Repeated measurement ANOVA
KOOS stiffness score	Repeated measurement ANOVA
KOOS pain score	Repeated measurement ANOVA
KOOS daily function score	Repeated measurement ANOVA
KOOS sport And Recreation score	Repeated measurement ANOVA
KOOS quality of life score	Repeated measurement ANOVA

### Safety analysis

The frequencies of adverse events presented with descriptive statistic. Test of statistical hypothesis was not applied because the adverse events were expected to occur in very low frequency from previous study.

## Flow chart

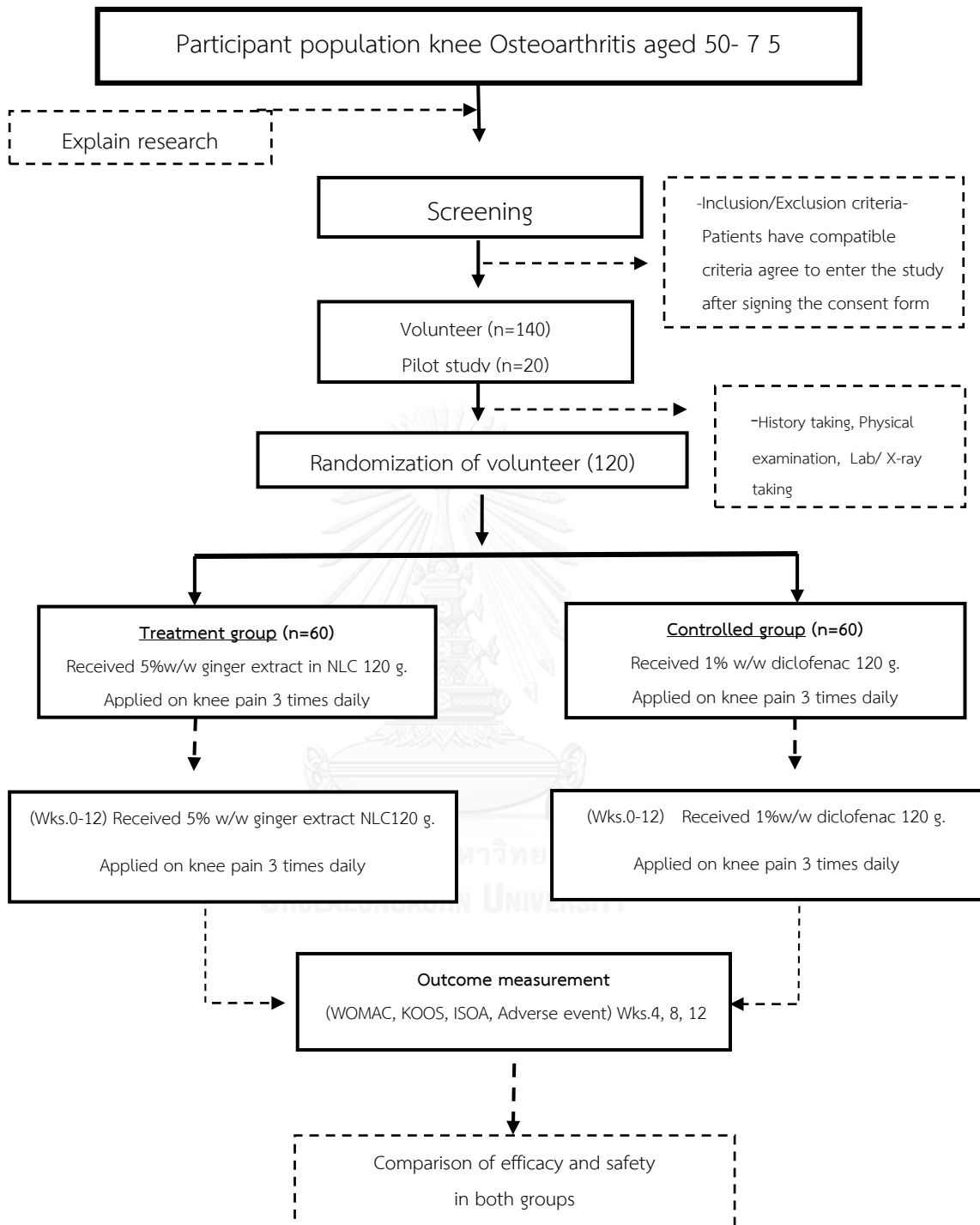


Figure 4 Flow chart



### **Ethical consideration**

This study is conducted in accordance with the ethical principles noted in the most recent version of the Declaration of Helsinki. The research protocol approved by the Ethics Review Committee for Research Involving Human Research Subjects committee of the Traditional Medicine Development Ministry of Public Health code: 12-2556. (Appendix H). All participants voluntarily signed informed consent after they been explain about the procedure clearly without enforcement (For information sheet and consent form, see Appendix A).



## CHAPTER IV

### RESULTS

This chapter consisted of three parts: part I was presented preparation and evaluation of ginger extract NLC, part II was presented in pilot study and part III was presented a comparative study of 5 % w/w ginger extract NLC and 1% w/w diclofenac gel for treatment of knee OA in four sections (1) clinical flow chart, (2) characteristic of patients with knee OA, (3) efficacy outcomes and (4) adverse events.

Part I Preparation and evaluation of ginger extract NLC

#### **Particle size, PI and zeta potential analysis**

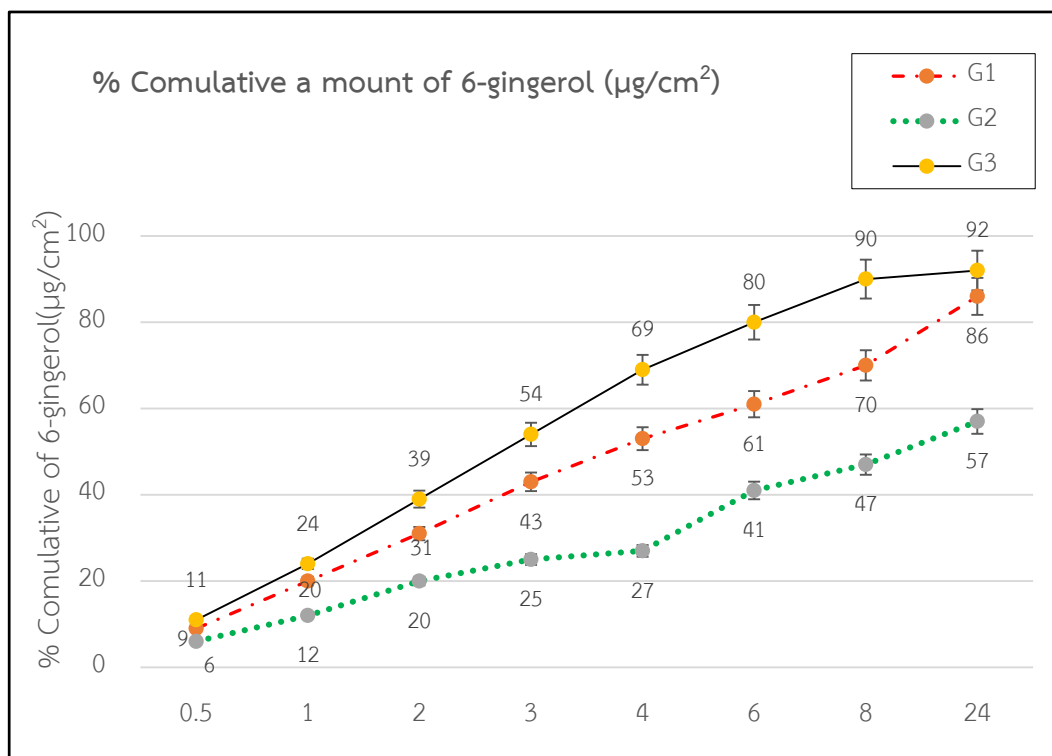
The particle sizes of ginger extract were determined by PSC. The effect of amount of surfactant and co-surfactant on particle size of NLC were demonstrated as in formulation G1-G6 in Appendix J (Table 17). Particle size analysis showed that the particles of formulation G1, G2, G3, G4, G5 and G6 were in the range of  $319.7 \pm 1.28$  to  $490.9 \pm 7.42$ , indicating that these vesicles remained in the nano-size range. (Appendix J, Table 17). The primary role of surfactant was stabilization of the nanoparticles in the colloid state. The 3% of Tween<sup>®</sup>80 was sufficient to cover the surface of nanoparticle effectively and also prevent agglomeration during the homogenization process. At low concentration of surfactant, uncovered interface of oil droplet easily fused into large particle size. High concentration of surfactant could not reduce particle size due to excess surfactants caused bridging between particles. Furthermore, using one way ANOVA at significant level ( $\alpha$ ) of 0.05 to evaluate the data, it was found that the particle size depended significantly on the ratio of surfactant and co-surfactant. Hydrogenated lecithin has long molecules designed by nature with a hydrophilic head and two lipophilic tails. This amphiphilic character used as co-emulsifiers in combination with other emulsifiers with high HLB. From the

result in Appendix J (Table 17), The optimum ratios of co-surfactant and surfactant of 4:5 showed the small particle size of  $319.7 \pm 1.28$

The PDI of the investigated vesicles showed values from  $0.043 \pm 0.04$  to  $0.289 \pm 0.120$ , indicating homogenous populations ( $PDI < 0.3$ ) of vesicles. Regarding zeta potential, all vesicles displayed a negative surface charge ranging from  $-33.5 \pm 0.177$  to  $-47.9 \pm 1.64$  mv. Zeta potential values are lower than  $-30$  mv generally indicate a high degree of physical stability.

#### **In vitro release study of 6- gingerol from NLC formulations**

The formulations G1 to G3 were selected to study the related pattern of 6-gingerol according to particle sizes from NLC. The release study was conducted not more than 24 h according to realistic application time. HPLC method was selected to determine the amount of 6- gingerol in receptor compartment. The experiment was performed in three replicates,  $n=3$ . Figure 5 was presented the release profile of 6-gingerol from NLC. The percentage of 6-gingerol release were exhibited approximately 57-92% within 24 h. after statistical analysis with one-way ANOVA and Bonferoni test at 5% significant level, the initial release within the first 2 h. for the G3 formulations was the highest release with significant different ( $p < 0.05$ ) in release profile among varied the ratio of surfactant and co-surfactant.



**Figure 5** Cumulative amount per unit area ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) of 6-gingerol released from NLC a period of 24 h by Franz diffusion cell

### Scanning electron microscopy (SEM)

The particle size and shape of ginger extract NLC formula G3, SEM analysis was performed. Appendix K (Figure 10) showed the SEM image of ginger extract NLC formula G3 with spherical appearance.

### Differential scanning calorimetry (DSC) investigations

Differential scanning calorimetry (DSC) is a thermoanalytical method described physical properties of drugs as well as to study compatibility and stability of the components in pharmaceutical preparations. Such information is very helpful for analyzing any instability issues during the design and development of new formulations. Thermal behavior was performed using a Mettler DSC 822 apparatus. The samples weighing approximately 3-5 mg based on the lipid content were placed in 40

$\mu\text{l}$  aluminum pans. Heating curves were conducted from  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  at rate of  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , an empty aluminum pan was used as reference. The DSC parameters including onset, melting point and enthalpy were performed. This thermogram showed the melting of ginger extract NLC, an endothermic process. The enthalpy of the process was given by the area under peak. DSC thermogram of ginger extract showed melting endothermic (onset temperature) at  $107.23\text{ }^{\circ}\text{C}$  and endothermic peak at  $106.66\text{ }^{\circ}\text{C}$  (main peak) (Appendix L, Figure 11). The melting point of nanoparticle was higher than  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , which is the prerequisite for topical application of lipid carries.

### **Stability of ginger extract NLC**

#### **Physical stability**

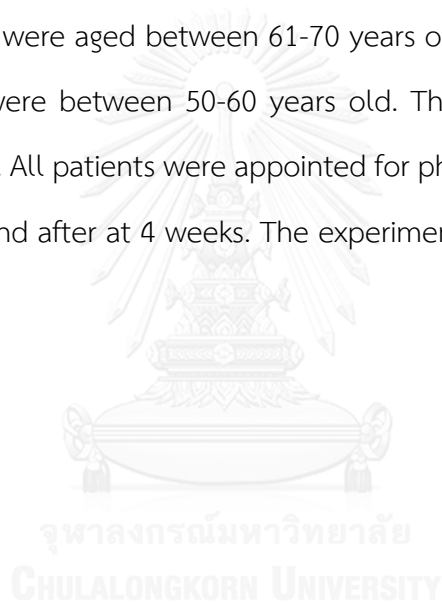
NLC have proven to be suitable carriers for active pharmaceutical especially for the topical route. The carriers demonstrated a good physical stability indicated by zeta potential value. This study, the mean particle size of less than  $350\text{ nm}$  assessed by PSC with narrow size distribution ( $\text{PI} < 0.2$ ) was found in all formulations except G5 formulation ( $\text{PI} < 0.289$ ). Zeta potential value higher than  $-30\text{ mV}$  were obtained indicating a good physical stability of colloidal dispersions. Concerning the effect of varying ratio of surfactant and co-surfactant. Furthermore, increasing the amount of surfactant resulted in the highest percentage of 6-gingerol release. The most suitable of formulation which were obviously stable during a period of 6 months of storage at room temperature ( $25^{\circ}\text{C}$ ) and  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  were selected for clinical trial study, ginger extract, Tween<sup>®</sup>80 and hydrogenated lecithin at ratio of 5:7:4 respectively (Appendix M, Table 18).

#### **Chemical stability**

The percentage of 6-gingerol remaining in NLC showed in Appendix M (Table 18), 6-gingerol in three formulations decreased with time when stored at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . However, content of 6-gingerol slowly decreased at  $4^{\circ}\text{C}$ .

## Part II Pilot study

Pilot study was aimed to study safety and efficacy of 5% w/w ginger extract NLC in small patient group. The pilot study was conducted in new outpatients visiting knee OA during April 2014 to June 2014. The inclusion criteria were; (a) clinical diagnosis of knee OA with grade II-III of Kellgren and Lawrence X-ray, (b) both male and female aged 50-75 years old, (c) no herbal allergies history, (d) no medical diagnosis of cancer, diabetes, paralysis and unknown infection disease. The twenty patients applied 5% w/w ginger extract NLC on knee pain 3 times daily for 4 weeks, comprising 2 males and 8 females; 5 samples were aged between 61-70 years old, three were between 70-75 years old, and two were between 50-60 years old. The BMI of the patients ranged between 22-30 kg/m<sup>2</sup>. All patients were appointed for physical examination and blood examination before and after at 4 weeks. The experimental results were as followed.



**Table 6** Characteristic of patients with knee OA in pilot study

Characteristic	Value				
	Mean	SD	Median	95% CI (Lower-Upper)	%
No. of patients (n=20)					
Sex, %					
Male			3		15
Female			17		85
Age, years	65	6.3	63	60.9-66.8	
Duration of disease	2.8	1.5	3	2.1-3.6	
Body Mass Index, kg/m <sup>2</sup>	25	3.4	25	24.1-27.4	
Heart rate, bpm	72	8	74	69.5-75.9	
Systolic blood pressure, mmHg	126	14	130	119.4-132.7	
Diastolic blood pressure, mmHg	70	8	70	67.0-74.5	
Screening Index of severity for OA (score 0-24)	5.5	2	6.5	4.5-6.4	
Radiographic classification of knee OA , Kellgren and Lawrence X-ray					
Grade II			5		25
Grade III			15		75

All patients had heart rate and blood pressure in normal range and index of severity for OA (ISOA) mild and moderate severity score. Table 6 showed a summary of characteristic of patients with knee OA. Comparison of the different laboratory value and efficacy variables before and after applying 5% w/w ginger extract NLC for 4 weeks at 95% confidence interval level that the average biochemical parameters and hematology were shown in Table 7.

**Table 7** Comparison of the different laboratory value and efficacy variables before and after taking 5% w/w ginger extract NLC for 4 weeks by 95% CI

Parameter	Baseline (n=20) Mean ±SD	Week-4 (n=18) Mean ±SD	Change in value mean (95% CI)
<b>Laboratory values, (normal range)</b>			
<b>Biochemical Parameters</b>			
- ALP (30-120 U/L)	83.3(25.1)	77.1(19.3)	6.2 ( 0.3, -6.9)
- AST (0-50 U/L)	28.1(18.2)	27.2(13.2)	0.9 ( 0.7,-4.4)
- ALT (0-45 U/L)	33.5(18.4)	39.4(18.4)	-5.9 ( -9.4,-17.4)
- BUN (5-23 mg/dl)	15.7(4.9)	13.9(4.9)	1.8 (2.6, 0.2)
- Creatinine (0.7-1.3 mg/dl)	0.93(0.3)	1.0(0.3)	-0.07( 0.05, 0.03)
<b>Hematology</b>			
- White Blood Cell Count (4.00-10.00X10 <sup>3</sup> /μL)	7.7(1.98)	7.7(1.9)	0 ( 0.08,-0.62)
- Total RBC count (3.5-5.50X10 <sup>6</sup> /μL )	4.3(3.3)	4.7(3.3)	-0.4 (0.62,-1.96)
- Platelet count (150-400X10 <sup>3</sup> /μL)	285.5(65.2)	295.9(74.9)	-10.4 ( 5.3,-15.5)
- Hematocrit (35-40%)	38.2(4.4)	39.4(3.6)	- 1.2 (0.47,-0.75)
<b>WOMAC Scale</b>			
- Pain score (0-50)	21.8 (9.9)	12.7(8.9) *	9.1(14.9, 3.4)
- Physical function score (0-150)	73.2 (28.9)	47.2(25.1) *	26 (41.2, 11.5)
- Stiffness score (0-20)	10.5 (3.9)	6.5(2.3) *	4.0 (7.0, 1.1)
<b>KOOS Scale</b>			
- Symptom score (0-20)	11.0 (2.4)	8.1(1.9) *	2.9 (2.2-1.9)
- Pain and Stiffness score (0-44)	13.1 (3.0)	9.8(2.9) *	3.3 (5.9-0.8)
- Daily living score (0-68)	24.7 (11.2)	16.8(12.1) *	8.0 (16.5-5.0)
- Sport and recreation score (0-20)	12 (4.6)	8.7(4.1) *	3.3 (5.7-0.8)
- Quality of life score (0-20)	7.7 (3.2)	5.5(2.8) *	1.2 ( 2.4,0.4)
<b>Patient's global assessment</b>	6.2 (1.0)	4.4(1.2) *	1.8 (2.3,1.2)

\* *p*-value for the difference between the baseline and after treatment (paired t-test),

SD= standard deviation, CI= confidence interval.



Comparison of different blood biochemical results, liver function test and, renal function test, before and after applying ginger extract NLC at 95% confidence interval level, they had indifferent laboratory result, i.e., ALP, AST, ALT, BUN, creatinine, and CBC had normal results. The mean of the WOMAC score in three subscale of WOMAC at the baseline and 4 weeks follow-up period after treatment demonstrated the improvement efficacy after the starting baseline. The paired t-test results showed the significant improvement of WOMAC in all subscale when compared with the baseline and week-4 of treatment. Similarly, the mean of KOOS score in all subscale revealed the significant improvement from the baseline (Table 4.2). Additional, interesting finding was the OMERACT-OARSI responder criteria showed a response rate more than 50% in three domains (Table 8).

**Table 8** Efficacy evaluation of the OMERACT-OARSI responder criteria

Efficacy variables	n	Number (%) of Responder
- 50% reduction in pain	18	9 (50)
- 20% improvement in function	18	12 (66)
- 10% improvement in PGA	18	10 (55)
- OMERACT-OARSI responder*	18	12 (66)

\*A responder is defined as a participant with 1) 50% reduction in pain or 50% improvement function, 2) 20% reduction in pain or 20% improvement function, adding 10% improvement of the PGA

### Adverse events

The major adverse effect was skin reaction at the applied site and this adverse event led to the discontinuation of 2 participants. One had the total score of Naranjo's algorithm +3 or a possible ADR; that was the adverse event appeared after the

suspected drug was given (+1). The adverse reaction was improved when the drug was discontinued (+1). Moreover, the adverse reaction appeared when the drug was re-administered (+2) and there alternative causes that could have affected the reaction (-1). Another also had score +1 as possible ADR. However, all skin reactions were resolved promptly upon withdrawal of treatment.

### **Part III A comparative study of 5% w/w ginger extract NLC to 1%w/w diclofenac gel for treatment of knee osteoarthritis (OA)**

The randomized controlled trial was conducted in outpatients at Tha Chang Hospital, Singburi province between June to October 2014. The protocol followed the 1975 Declaration of Helsinki as revised in 1983 and informed consent was signed by all patients prior to any study-related procedure. It was approved by the ethical committee of the Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health (Thai Clinical Trial Registry No. TCTR 20140306001). Patients were randomized to receive treatment by a simple random sampling, and both the investigators and the patients were blinded to treatment assignment.

Patients with knee OA diagnosed by the American College of Rheumatoid classification criteria using the decision three format radiographic criteria was used. The radiographic changes had to include at least osteophytes and correspond to OA grade 2 and 3 according to the Kellgren and Lawrence criteria.

Inclusion criteria were (a) both males and females between 50-75 years, (b) knee pain of a degree which could be tolerated and be alleviated using acetaminophen as an escape medication for 12 weeks (during the study period). Exclusion criteria were (a) secondary causes of knee OA, (b) history of allergy to medicinal herbs used during study, and (c) severe joint instability or severe deformity (OA grade IV Kellgren and Lawrence). After screening, the patients entered a 1-week washout period for anti-inflammatory and analgesic medications, during which they

were allowed to take acetaminophen 500 mg three times a day (or every 4-6 ) for pain but no other topical analgesics, or oral NSAID and COX-2 inhibitors. If the patients were determined to be eligible for the study, they were randomly assigned to the ginger extract in NLC group or 1% diclofenac group. The ginger extract NLC was applied at a dose of 1 gm 3 times a day for 4 weeks and the diclofenac group also received an identical tube containing 1%w/w Diclofenac gel applied similarly.

The results of the study were consisted in four sections.

Section 1 Clinical flow chart

Section 2 Characteristic of patients with knee OA

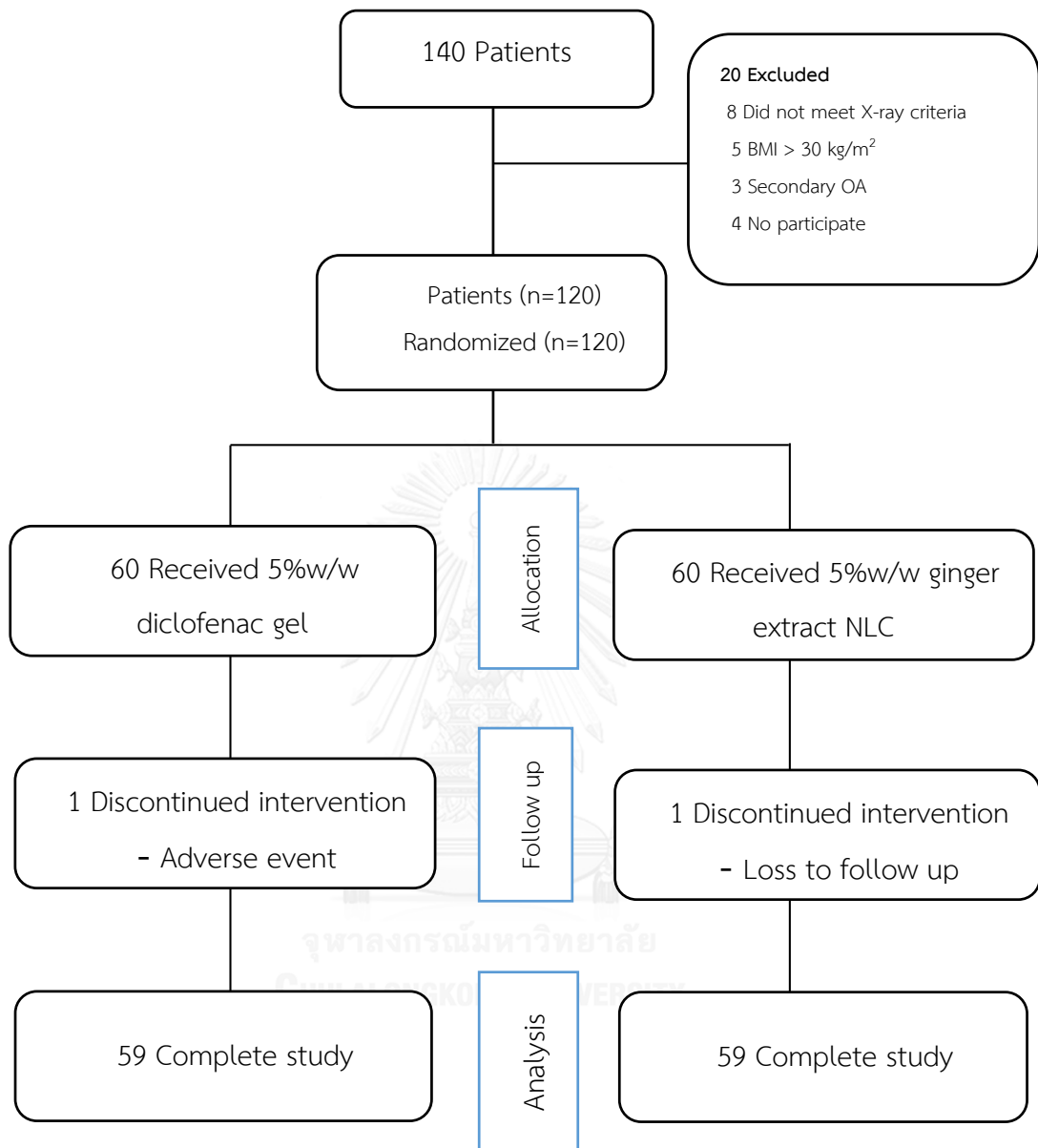
Section 3 Efficacy measurement

Section 4 Safety evaluation

### **Section 1 Clinical flow chart**

Figure 6 presented flow chart of participants. One hundred and forty participants were enrolled and one hundred and twenty participants were eligible for assessment of randomized to treatment with either ginger extract NLC group (n=60) or topical diclofenac gel group (n=60). All participants received their allocated intervention and fifty nine patients (59[98%]) were completed the entire 12-weeks. Discontinuation rate due to an adverse skin reaction in ginger extract NLC group and one case of loss to follow up in topical diclofenac gel group were 1.66 % of dropout rate, similar in both groups (Fig 6).

### Trial flow chart.



**Figure 6** Clinical flow chart of participants

### Section 2 Characteristic of patients with knee osteoarthritis

Summary of the characteristic of patients with knee OA was demonstrated in Table 9. No significant different was found between treatment groups in baseline demographic (gender, age, duration of disease, BMI, HR, and BP) and clinical characteristic (ISOA, grading, and laboratory value).

**Table 9** Baseline demographic and clinical characteristics of patient in 1%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC groups

Variable	1%w/w topical diclofenac (n=59)	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	P-value
Sex, %			0.606 <sup>@</sup>
Male	8 (13.5)	8 (13.5)	
Female	51 (86.4)	51 (86.4)	
Age, years, Mean(SD)	61.9 ± 6.9	61.8 ± 6.7	0.904
Duration of disease	3.2 ± 2.5	2.7 ± 2.4	0.227
Body Mass Index, kg/m <sup>2</sup> , Mean(SD)	25.8 ± 3.1	25.9 ± 3.0	0.827
Heart rate, bpm, Mean(SD)	78.5 ± 10.0	76.5 ± 3.0	0.827
Systolic blood pressure, mmHg, Mean(SD)	137.2 ± 19.5	136.2 ± 17.1	0.765
Diastolic blood pressure, mmHg, Mean(SD)	75.6 ± 10.5	72.6 ± 7.8	0.076
Radiographic classification of knee OA , Kellgren and Lawrence X-ray , %			0.399 <sup>@</sup>
Grade II	10 (8.4)	8 (6.7)	
Grade III	49 (91.6)	51 (93.3)	
<b>Baseline laboratory values, (normal range)</b>			
<b>Biochemical Parameters</b>			
ALP, (30-120 U/L)Mean, SD	77.0 ± 19.6	74.6 ± 20.6	0.517
SGOT (0-50 U/L), Mean, SD	26.0 ± 11.1	25.0 ± 13.0	0.670
SGPT (0-45 U/L), Mean, SD	31.2 ± 16.7	27.1 ± 16.8	0.193
BUN (5-23 mg/dl), Mean, SD	15.7 ± 4.5	15.8 ± 5.8	0.944
Creatinine (0.7-1.3 mg/dl), Mean, SD	1.2 ± 1.3	1.0 ± 0.2	0.271
<b>Hematology</b>			
WBC (4.00-10.00X10 <sup>3</sup> /μL),Mean, SD	7.8 ± 1.9	7.7 ± 1.7	0.748
RBC (3.5-5.50X10 <sup>6</sup> /μL ),Mean, SD	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.4	0.853
Plt. (150-400X10 <sup>3</sup> /μL), Mean, SD	312.5 ± 65.9	286 ± 72.3	0,067
Hct. (35-40%), Mean, SD	38.2 ± 5.0	37.9 ± 3.7	0.737

Student t-test, <sup>@</sup> chi-square

### Section 3 Efficacy measurement

Efficacy variable was assessed by using five instruments.

- a) Western Ontario and McMaster Universities(WOMAC)Osteoarthritis Index
- b) Knee Injury and osteoarthritis outcome Score (KOOS)
- c) Patient's global assessment (PGA)
- d) Index of severity for osteoarthritis (ISOA)
- e) The OMERACT-OARSI responder criteria

### Baseline efficacy outcome

a) Baseline efficacy of WOMAC score assessed pain (classified into pain score, stiffness score and physical function score). Validation of a modified Thai version of WOMAC consisted of 22 questions with 10-mm visual analog scale, analyzed in 3 subscales as the average score for 5 questions on pain, 2 questions on stiffness, and 15 questions on function. The total score is calculated as the mean score for all 22 questions.

b) Baseline of KOOS assessed the patient's activities with a 5-point Likert scale; 0=very good 1=good 2=average 3=poor 4=very poor. KOOS is a 42-item, divided into 5 domains; 9 items addressing pain, 7 items addressing other symptoms, 17 items for function in daily living (ADL), 5 items for function in sports and recreation (Sport/Rec), and 4 items for quality of life (QOL) related to knee function.

c) Baseline of PGA, this self-explanatory questionnaire was assessed by patients and physician with scoring on a 5-point Likert scale (very good=1; good=2; fair=3; poor=4; very poor=5).

d) Baseline of ISOA is consisted of three dimension, including pain or discomfort, the maximum walking distance, and activities of daily living. Each dimension has a maximum total score of 8; consequently, the total score range from 0 to 24.

Comparing the mean of the WOMAC score in three subscale of WOMAC at the baseline between 1%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC group, there were no statistical difference between the two groups with unpaired t-test ( $p>0.05$ ). Similarly, the mean of KOOS in all subscale, PGA, and ISOA demonstrated no significant difference between the two groups (Table 10).

**Table 10** Baseline efficacy variable of patient in 1%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC group

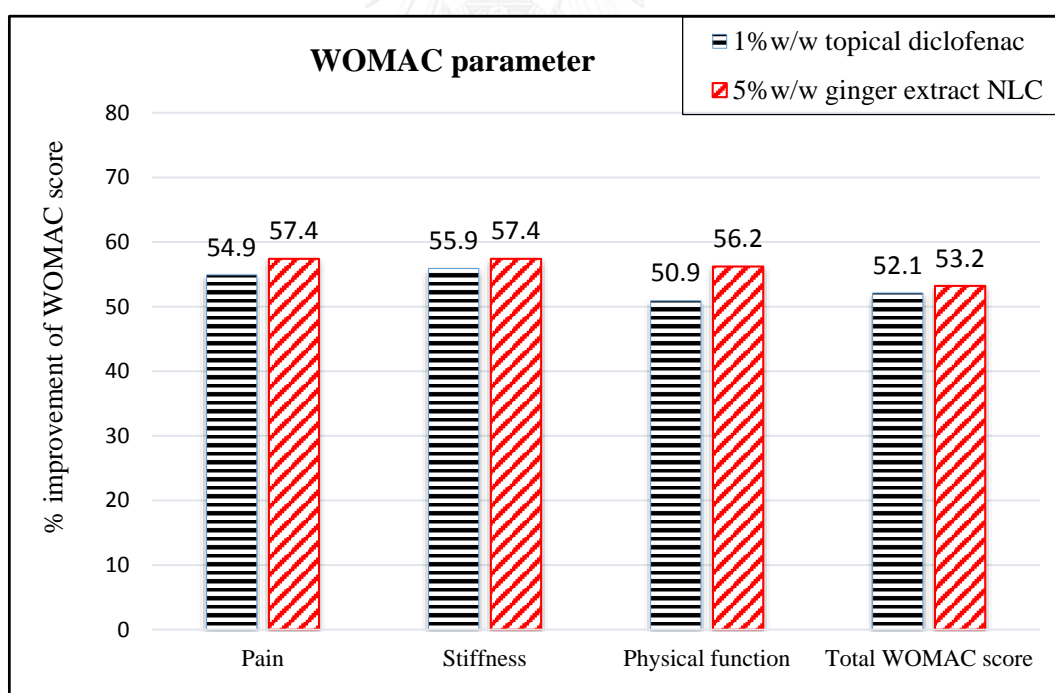
Variable	5%w/w topical diclofenac (n=59)	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	P-value
<b>Baseline efficacy variable</b>			
<b><sup>1</sup>WOMAC parameter</b>			
Pain subscale,(Score 0-50), Mean, SD	22.3±12.0	25.4± 9.0	0.124
Stiffness subscale, (Score 0-20),Mean, SD	9.3± 4.9	10.0 ± 4.4	0.475
Function subscale,(Score 0-150),Mean, SD	67.3 ± 32.4	71.3 ± 3.5	0.471
<b><sup>2</sup>KOOS score</b>			
Symptom (0-28), Mean, SD	10.0±4.8	11.1±4.3	0.211
Pain (0-36), Mean, SD	14.1±7.1	15.3± 5.6	0.399
Daily living (0-68), Mean, SD	25.5±14.6	27.0± 10.9	0.566
Sport/recreation (0-20), Mean, SD	13.2±5.2	13.5± 4.3	0.587
Quality of life (0-16), Mean, SD	9.2±3.0	9.7± 2.8	0.449
<b><sup>3</sup>Patient Global Assessments (PGA),</b>			
(Score 0-10),Mean, SD	8.8 ± 1.9	9.3 ±2.0	0.163
<b><sup>4</sup>Screening Index of severity for OA(ISOA)</b>			
(score 0-24), Mean(SD)	11.0±4.4	10.0±3.9	0.617

<sup>1</sup>WOMAC (0= no knee problems, 10= extreme knee problems),<sup>2</sup>KOOS (0= no knee problems, 4= extreme knee problems),<sup>3</sup>PGA (10 = very poor, 1 = very good), <sup>4</sup>ISOA(0=no severity, 24=extreme severity)

## Comparative of 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w topical diclofenac gel for treatment of knee OA

### Evaluation of efficacy for treatment of knee OA by WOMAC

The assessment of efficacy was done by the Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) OA composite index. The mean of WOMAC parameter of pain, stiffness, and function according to treatment group are presented in Table 11. Each visit at 4, 8, and 12 weeks of the trial, the mean of all subscale of WOMAC score were reduced from baseline in both treatment groups. In addition, the mean of WOMAC values in all the three subscale, pain and stiffness in ginger extract NLC group showed the most percentage of improvement (57.4%) from baseline into their therapies for both groups after 12 weeks of treatment (Figure 7).



**Figure 7** Percentage of improvement in WOMAC parameter at the initiation and following 12 weeks of treatments between 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w topical diclofenac group



**Table 11** The WOMAC parameter at baseline, 4-weeks, 8-weeks and 12-weeks in 1%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC group

WOMAC parameter	1%w/w topical diclofenac		5%w/w ginger extract NLC	
	Mean (SD)	95% CI	Mean (SD)	95% CI
Pain (score 0-50)				
Baseline	22.2 (12.1)	19.1-25.4	25.4 (9.2)	22.9-27.9
Week 4	14.9 (9.6)	11.4-16.5	13.7 (8.7)	11.3-16.0
Week 8	12.8 (8.2)	10.7-15.0	12.9 (7.9)	10.8-15.0
Week 12	10.0 (7.8)	7.9-12.1	10.8 (8.3)	8.6-13.1
Stiffness (score 0-20)				
Baseline	9.3 (4.9)	8.0-10.6	10.1 (4.5)	8.5-11.4
Week 4	5.2 (4.0)	4.1-6.3	5.1 (3.9)	4.0-6.1
Week 8	5.3 (3.6)	4.4-6.3	4.6 (3.9)	3.6-5.7
Week 12	4.1 (3.0)	3.3-4.9	4.3 (3.5)	3.3-5.3
Function (score 0-150)				
Baseline	67.1 (32.6)	58.4-75.7	72.2 (27.6)	64.7-79.6
Week 4	41.6 (29.6)	33.7-49.4	40.2 (28.5)	32.5-47.9
Week 8	41.1 (26.3)	34.1-48.1	34.7 (24.1)	28.2-41.2
Week 12	32.9 (24.7)	26.3-39.5	31.6 (23)	25.3-37.8
Total WOMAC (score 0-220)				
Baseline	98.7 (4.7)	86.1-100.1	100.0 (3.8)	97.5-100.1
Week 4	60.9 (4.1)	49.8-71.9	59.1 (3.9)	48.4-69.7
Week 8	59.1 (3.6)	49.4-68.8	52.3 (3.4)	42.9-61.7
Week 12	47.2 (3.4)	38.0-56.4	46.8 (3.4)	37.6-56.1

**Table 12** Efficacy evaluation of the mean WOMAC in 5%w/w ginger extract NLC and the 1%w/w topical diclofenac group by the repeated ANOVA

Efficacy variable	Treatment group, (n)	Baseline score, Mean (SD)	Reduction of score, Mean (SD)	Mean difference	<sup>1</sup> P-value vs. Baseline	<sup>2</sup> P-value vs. diclofenac
Pain (score 0-50)	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	25.4 (12.1)	10.2 (2.9)	-0.3	0.000	0.106
	1%w/w topical Diclofenac (n=59)	22.2 (9.6)	9.9 (2.8)			
Stiffness (score 0-20)	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	10.1 (4.5)	7.1 (1.6)	-1.4	0.000	0.217
	1%w/w topical diclofenac (n=59)	9.3 (4.9)	5.7 (1.3)			
Physical function (score 0-150)	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	72.2 (27.6)	33.3 (23.8)	-4.8	0.000	0.082
	1%w/w topical diclofenac (n=59)	67.1 (32.6)	28.5 (25.1)			
Total WOMAC (score 0-220)	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	100.0 (28.0)	47.2 (12.4)	-4.3	0.000	0.910
	1%w/w topical Diclofenac (n=59)	98.7 (12.0)	42.9 (21.8)			

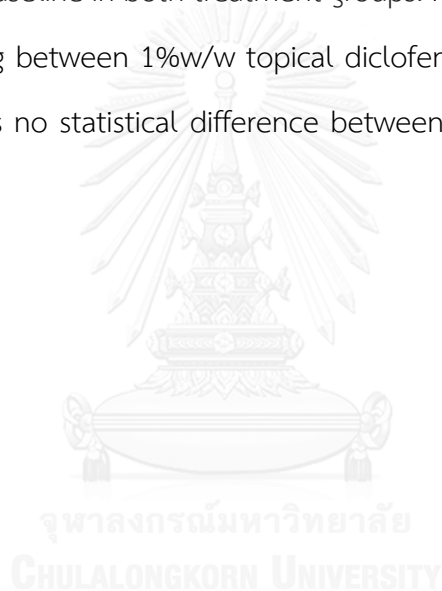
*P-value by repeated ANOVA, Multiple comparisons: Bonferoni, 1 =comparing baseline, 2= comparing between 5%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC groups*

Comparing efficacy of the mean WOMAC in 5%w/w ginger extract NLC between the 1%w/w topical diclofenac groups were demonstrated in Table 12. Mean change from baseline of pain, stiffness, physical function, and total WOMAC on both treatment after each study visit were normally distributed, which was confirmed by Kolmogorov-Smirnov test. Effectiveness of the treatment between baseline vs. mean change in score (at week 4, 8, and 12), showed significant ( $p < 0.05$ ) improvement in all WOMAC subscale. However, comparing the mean difference in changing between topical

diclofenac and ginger extract NLC group, there was no statistical difference between the two groups by repeated ANOVA.

### **Evaluation of efficacy for treatment of knee OA by KOOS**

The knee injury and osteoarthritis outcome score (KOOS) was consisted of subscale; pain, stiffness, symptom, activity daily living (ADL), sport and recreation (Sport/Rec), and quality of life (QOL) according to treatment group are presented in Table 13. Each visit at 4, 8, and 12 weeks of the trial, the mean of all subscale of KOOS were reduced from baseline in both treatment groups. However, comparing the mean difference in changing between 1%w/w topical diclofenac and 5%w/w ginger extract NLC group, there was no statistical difference between the two groups by repeated ANOVA ( $p>0.05$ ).



**Table 13** Efficacy of mean KOOS parameter in 5%w/w ginger extract NLC and the 1%w/w topical diclofenac gel group by the repeated ANOVA

KOOS parameter	1%w/w topical diclofenac		5%w/w ginger extract NLC		<i>p-value</i> <sup>®</sup>
	Mean	SD	Mean	SD	
Pain					0.732
Baseline	14.4	7.00	15.3	7.03	
Week 4	14.3	9.65	14.3	9.83	
Week 8	12.9	1.20	12.8	8.34	
Week 12	9.5	6.90	7.5	5.88	
Stiffness					0.762
Baseline	2.8	1.56	3.5	1.47	
Week 4	2.1	1.48	2.2	1.61	
Week 8	2.4	3.59	2.1	1.92	
Week 12	2.2	1.56	2.0	1.46	
Symptom					0.417
Baseline	7.1	3.75	7.6	3.40	
Week 4	6.6	2.52	5.9	3.49	
Week 8	5.6	3.76	4.5	3.18	
Week 12	4.9	3.36	4.3	2.73	
Activity daily living					0.341
Baseline	25.5	14.67	27.0	19.92	
Week 4	18.7	13.75	18.7	11.44	
Week 8	17.6	11.48	17.6	10.08	
Week 12	15.3	11.47	13.9	12.00	
Sport/rec.					0.277
Baseline	13.1	5.23	13.5	4.39	
Week 4	10.6	4.93	9.5	5.32	
Week 8	10.2	4.77	8.7	4.90	
Week 12	9.1	4.82	7.8	5.48	
Quality of life					0.952
Baseline	9.2	3.08	9.7	2.86	
Week 4	7.3	3.57	6.3	2.76	
Week 8	7.1	2.98	6.4	2.81	
Week 12	6.0	3.33	6.4	3.34	

*P-value*<sup>®</sup> by repeated ANOVA, Multiple comparisons: Bonferoni

**Table 14** The comparison of the mean KOOS in 1%w/w topical diclofenac gel and 5%w/w ginger extract NLC at initiation and at 12 weeks of treatment by the paired t-test and unpaired t-test

Parameter	1%w/w topical Diclofenac		5%w/w ginger extract NLC		Between gr. Different	<sup>1</sup> P-value ( Before: After )	<sup>2</sup> P-value (Between two groups)
	Mean (SD)	Change	Mean (SD)	Change			
<b>Pain (score 0-36)</b>							
Baseline	14.4 (7.0)		15.3 (5.6)			0.000	0.145
Week 12	9.5 (6.9)	4.8	7.6 (3.4)	7.5	-2.7		
<b>Stiffness (score 0-8)</b>							
Baseline	2.8 (1.5)		3.5 (1.4)			0.000	0.158
Week 12	2.2 (1.5)	0.68	2.0 (1.5)	1.5	-0.8		
<b>Symptom (score 0-20)</b>							
Baseline	7.1 (4.8)		7.6 (3.4)			0.000	0.573
Week 12	4.9 (3.3)	2.2	4.3 (2.7)	3.3	-1.0		
<b>Daily living (score 0-68)</b>							
Baseline	25.5 (14.6)		27.0 (10.9)			0.000	0.532
Week 12	15.3 (11.4)	10.2	13.9 (12.)	13.1	-2.8		
<b>Sport/rec. (score 0-20)</b>							
Baseline	13.1 (5.2)		13.5 (4.9)			0.000	0.181
Week 12	9.1 (4.8)	4.0	7.8 (5.4)	5.7	-0.5		
<b>QOL (score 0-16)</b>							
Baseline	9.2 (3.0)		9.7 (2.8)			0.000	0.520
Week 12	6.0 (3.3)	4.8	2.2 (2.1)	7.5	-2.7		

<sup>1</sup>P-value by paired t-test, <sup>2</sup> by unpaired t-test, Sport/rec.= sport and recreation, QOL= quality of life, PGA= Patient global assessment

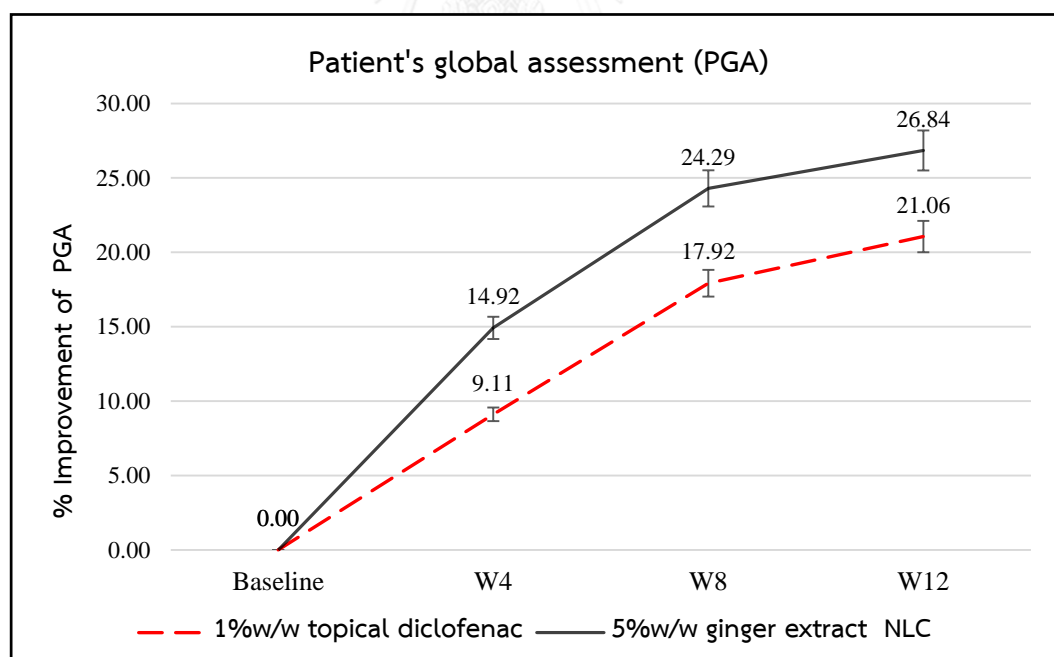
Table 14, the mean KOOS in 1%w/w topical diclofenac gel and 5%w/w ginger extract NLC at initiation and at 12 weeks of treatment were compared by the paired t-test and unpaired t-test. The paired t-test result showed significant of KOOS in six subscales in both groups when compared at before and 12 weeks of treatment ( $p < 0.05$ ). Comparing the result of the treatment after 12 weeks between 5%w/w ginger

extract NLC and 1%w/w diclofenac gel, there were no statistical different between the two groups in the student unpaired t-test (Table 14).

### Evaluation of efficacy for treatment of knee OA by PGA

The assessment of PGA, this self-explanatory questionnaire was assessed in two dimension by patients and physician. Evaluation of efficacy for treatment of knee OA, the OMERACT (Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials), the AAOS (American Society of Orthopedic Surgeons), and OARSI (Osteoarthritis Research Society International) have raised the importance of evaluating at least three dimensions: pain, patient's global assessment of disease status, and physical function.

Figure 8, percentage of improvement of PGA parameter at 4-week, 8-week and 12-week were increased in both groups, but there were no statistical different between the two groups with repeated ANOVA ( $p>0.05$ ).

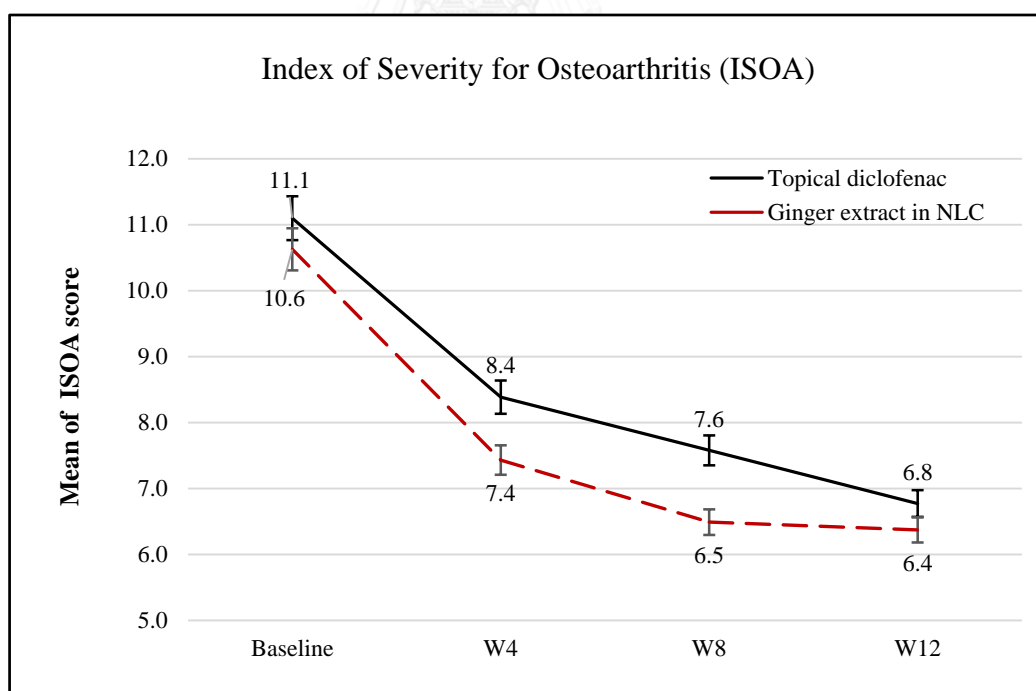


**Figure 8** Percentage of improvement of PGA parameter at 4-week, 8-week and 12-week in topical diclofenac and ginger extract NLC group

### Evaluation of efficacy for treatment of knee OA by ISOA

Index of severity for osteoarthritis (ISOA) is consisted of three dimension, including pain or discomfort, the maximum walking distance, and activities of daily living. Each dimension has a maximum total score of 8; consequently, the total score range from 0 to 24. Sum points for all parameters were graded 6 levels; 0= none, 1-4=mild, 5-7=moderate, 8-10=severe, 11-13=very severe, more than or equal 14=extremely severe.

Effective of treatment between 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w diclofenac gel groups at 4, 8, and 12-week were demonstrated in Figure 9. The change from baseline in average ISOA score were statistical different between before and after treatment for 12-week in both groups (paired t-test,  $p < 0.05$ ) but there were no statistical different between the two groups in the repeated ANOVA.



**Figure 9** Mean of ISOA at 4-week, 8-week and 12-week in topical diclofenac and ginger extract NLC group

### Clinical efficacy for treatment of knee OA by the OMERACT-OARSI

The responder criteria defined by the outcome measures in rheumatology (OMERACT) committee and the osteoarthritis research society International (OARSI) committee. The responder criteria covered three domains (pain, function and PGA) that defined as a participant with 1) 50% reduction in pain or 50% improvement function, 2) 20% reduction in pain or 20% improvement function, adding 10% improvement of the PGA from the baseline.

The response rate for at least a 50% reduction in pain (Table 15) was significantly greater following 5%w/w ginger extract NLC treatment compared with 1%w/w topical diclofenac (67.7% vs. 45.7%  $p < 0.05$ ). However, a 50% improved function and 10% improved PGA was not statistically significant. Similarly, 5%w/w ginger extract NLC had non-significantly greater number of participants with OMERACT-OARSI response rate (72.8% vs. 67.7%;  $p > 0.05$ ) compared to topical diclofenac group.

**Table 15** Clinical efficacy for treatment of knee OA by the OMERACT-OARSI responder criteria

Efficacy variable	Treatment group (n)	Number (%) of participants	<i>p</i> -value <sup>®</sup>
50% reduction in pain	1%w/w topical diclofenac (n=59)	27 (45.7)	0.025
	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	40 (67.7)	
50% improve function	1%w/w topical diclofenac (n=59)	27 (45.7)	0.357
	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	33 (55.9)	
10% improve PGA	1%w/w topical diclofenac (n=59)	33 (55.9)	0.255
	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	40 (67.7)	
OMERACT-OARSI response	1%w/w topical diclofenac (n=59)	40 (67.7)	0.687
	5%w/w ginger extract NLC (n=59)	43 (72.8)	

<sup>®</sup> *chi-square*



#### Section 4 Safety evaluation

Safety was evaluated via laboratory tests and all adverse events including the onset, duration and intensity (mild, moderate, or severe) of events, as well as the action taken and outcomes were reported. The relationship between an adverse event and study medication was assessed by the investigator as unlikely, possible, probable and certain. Adverse events were recorded according to Naranjo's algorithm. The adverse events reported was skin reaction at the application site which led to discontinuation of only one participant in ginger extract NLC who had the total score of Naranjo's algorithm +3 so a possible ADR; the adverse event appear after the suspected drug given (+1). The adverse reaction improved when the drug was discontinued (+1). However, the adverse reaction appeared when the drug was re-administered (+2) and alternative causes that could have caused the reaction (-1). However, the skin reaction resolved promptly upon withdrawal of treatment.

As a part of the safety evaluation, laboratory tests were performed to assess different biochemical and hematological parameters. The paired t-test was used to compare the values at the 12 week period with that of baseline. Statistical analyses of these parameter did not indicate any significant change. In addition, the student unpaired t-test was used to compare the values of laboratory test between topical diclofenac, ginger extract NLC at the 12 weeks period with statistical analyses of these parameters did not indicate significant ( $p>0.05$ ) (Table 16).

**Table 16** Laboratory tests at the initiation and following 12 weeks of treatments between 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w topical diclofenac gel *group*

Laboratory test	Before treatment		Treatment 12 weeks		@ p-value
	1%w/w	5%w/w	1%w/w	5%w/w	
	topical diclofenac	ginger extract NLC	topical diclofenac	ginger extract NLC	
<b>Laboratory values, (normal range)</b>					
<b>Biochemical Parameters</b>					
ALP, (30-120 U/L)Mean, SD	77.0 ± 19.6	74.6 ± 20.6	77.1 ± 18.6	77.0 ± 20.1	0.969
SGOT (0-50 U/L), Mean, SD	26.0 ± 11.1	25.0 ± 13.0	27.4 ± 11.2	27.0 ± 15.0	0.870
SGPT (0-45 U/L), Mean, SD	31.2 ± 16.7	27.1 ± 16.8	38.5 ± 16.1	40.4 ± 20.5	0.626
BUN (5-23 mg/dl), Mean, SD	15.7 ± 4.5	15.8 ± 5.8	13.5 ± 5.3	14.3 ± 4.3	0.347
Creatinine (0.7-1.3 mg/dl), Mean, SD	1.2 ± 1.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.421
<b>Hematology</b>					
WBC (4.00-10.00X10 <sup>3</sup> /μL), Mean, SD	7.8 ± 1.9	7.7 ± 1.7	7.3 ± 2.0	8.0 ± 1.9	0.080
RBC (3.5-5.50X10 <sup>6</sup> /μL),Mean, SD	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.4	5.0 ± 2.7	0.323
Platelet. (150-400X10 <sup>3</sup> /μL),Mean, SD	312.5 ± 65.9	286 ± 72.3	302.7 ± 65.2	288.8 ± 84.0	0.340
Hematocrit (35-40%), Mean, SD	38.2 ± 5.0	37.9 ± 3.7	38.3 ± 3.6	38.1 ± 3.7	0.684

@P-value by unpaired t-test compared between groups at 12 weeks

## CHAPTER V

### DISCUSSION, CONCLUSION AND RECOMMENDATION

#### DISCUSSION

Osteoarthritis commonly affects the elderly people, and if they have associated co-morbid conditions can lead to many treatment and include multiple medications. In these situations giving NSAIDs will blunt the effect of antihypertensive therapy in patients with cardiovascular disease, selective COX-2 inhibitors would further increase risk of CV adverse events and NSAIDs given to patients with diabetes could increase the risk of nephropathy [82]. Although oral medications carry these risks, published guidelines have often recommended topical NSAIDs for treatment of OA knee [83]. Due to the above limitations, there is a need to provide alternative therapies to reduce incidence of adverse effects. In Indian and Chinese medicine, ginger has been used for time immemorial for treatment of rheumatic disorder due to its anti-inflammatory properties and ability to inhibit arachidonic acid metabolism. The active components from ginger are 6-gingerol and 6-shogaol. In animal models, ginger has been shown to act as a dual inhibitor of both cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) [7, 48, 49] inhibits leukotriene synthesis, and to reduce carrageenan-induced rat-paw edema in animal models of inflammation. However, due to poor absorption, rapid metabolism and elimination of active compound, the bioavailability of polyphenolic compounds is poor [9]. The fact that gingerol and shogaol are insoluble in water limits its application in aqueous base systems. A study by Praditbongkotchp A. in 2010 [9], evaluated the anti-inflammatory activity in animal models using microemulsion formulations containing ginger extract. The ginger extract by acetone gave the highest concentration of 6-gingerol content at 10.70-11.44%. Consequently, the purpose of this study were to (1) evaluate the efficacy of 5%w/w ginger extract NLC (Treatment group) for treatment of OA knee among patients, (2) evaluate the efficacy of 1%w/w

diclofenac gel (Controlled group) for treatment of knee OA among patients, (3) evaluate the patients' global assessment of improvement after receiving 5%w/w ginger extract NLC and 1% w/w diclofenac gel, (4) compare average scores of WOMAC, KOOS, and ISOA in knee OA patients after receiving 5% w/w ginger extract NLC and 1% w/w diclofenac gel, (5) compare laboratory result i.e. blood for CBC, liver function test, and renal function test of knee osteoarthritis patients after applying 5%w/w ginger extract NLC and 1% w/w diclofenac gel to evaluate side effects.

### **Pilot study**

The main objective of the pilot study was to assess treatment effect of 5% w/w ginger extract NLC on the intensity of pain and symptom of patient of knee OA by WOMAC scale, KOOS scale, and patients' global assessment. The most reliable indicator of the main outcome is patient self-reporting. These data were reliable according that there was no inter observer variation because all the scores were assessed by the same patient both before and after treatment.

The present study the baseline variables were included sex, age, duration of disease, body mass index, grading of knee OA, pulse, respiratory rate, Index of severity for OA (ISOA) and efficacy variable. Because the continuous of variables were distributed in normal distribution, it was appropriate to report these data in term of means with standard deviations. The average of body mass index of these subjects was 25 which were classified as level 1 of obese group. There were evidence of body weight on severity of knee OA.

The average of severity score of the subjects was 5.5. According to the moderate score (Lequesne's index), the score range from 5-7 categorized into moderate group and the score more than or equal to 14 was extremely severe. Therefore, the subject in pilot study had moderately severe degree of osteoarthritis.

### **Efficacy of treatment of knee OA in pilot study**

In this clinical trial, the efficacy was estimated from WOMAC parameter KOOS parameter, and global assessment index. For efficacy parameter, the author planned to analyze the average of each subscale after 4 weeks of treatment (Table 7).

From the result of this study, the improvement in their pains and other symptoms after treatment for 4 weeks were comparable with baseline. This finding show that there is statistically significant improvement in the efficacy variable in patients of knee OA treatment with ginger extract NLC.

Compared to the previous study by Zaker *et al.* [68] that reported favorable outcome for the application of 250 powdered ginger extract for 6 weeks of treatment. Result showed pain reduction according to WOMAC greater in ginger than placebo group, the different was not statistical significant. However, the result of reduction in stiffness and physical function greater in ginger extract than placebo group.

### **Adverse Events**

Safety analysis revealed no serious adverse events in any clinical observation or laboratory test. However, any minor application-site skin reaction had contact dermatitis, this finding is similar to the result from previous investigations by Niempoog *et al.* [69].

### **A comparative of 5%w/w ginger extract nanostructure lipid carrier (NLC) and 1%w/w diclofenac gel for treatment of knee osteoarthritis (OA)**

#### **Efficacy of treatment of knee OA**

Among the most widely used topical agents are the NSAIDs. These agents are known to reduce the production of prostaglandins that sensitize nerve endings at the site of pains. This effect occurs due to the inhibition of the cyclooxygenase (COX) enzyme that converts arachidonic acid liberated from the phospholipid membrane by

phospholipases to prostanoids such as prostaglandin. The analgesic effects of NSAIDs can be dissociated from anti-inflammatory effects, and this may reflect additional spinal and supraspinal actions of NSAIDs to inhibit various aspects of central pain processing.

From the result of this study (Table 11, 12, Figure 7), there was evidence of WOMAC composite index at 4, 8, 12 weeks. Considering the change from baseline of pain, stiffness and physical function score of treatment, there was statistically significantly pain reduction, stiffness and physical function between before and after treatment in 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w diclofenac gel. Contrarily, pain, stiffness, physical function were not different significantly between experiment and controlled groups. A key issue to consider is the clinical relevance of the effect of treatment knee OA. For proof of efficacy in OA symptom, evaluation of target joint supported by functional evaluation are requested. The previous research conclusion of report relate exclusively to the change from baseline that the patient would consider relevance, rather than the different between groups [84]. Our study, the clinically relevance of WOMAC pain, stiffness, physical function score improved by 40.1%, 70.2%, 46%, respectively, for 5%w/w ginger extract NLC compared to 44.5%, 61.2%, 42.4 for 1%w/w diclofenac gel.

These result can be explained by therapeutically effective concentration in the tissue below the site of application, as found in preclinical study, NSAIDs, have ability to penetrate and absorb into the dermis, especially in the peri-articular tissue and intra-articular compartment. Interestingly, application via the topical route, the subcutaneous and muscular concentration of NSAID, was higher than the concentration in plasma but lower concentration were available to synovial tissue. These included peri-articular bone, synovial joint linings and supporting soft tissue. A recent review acknowledges that the higher concentration of NSIADs in soft tissue around the knee may reduce the inflammation and pain in these function leading to

improvement as presented in several studies on the treatment of topical NSAIDs [85, 86]. It is likely that anti-inflammatory effect of active compound from ginger have shown to be similar to NSAIDs, theoretical consideration allows bridging these results to mechanisms of action to ginger extract NLC. Furthermore, this study was shown *in vitro* release studies of ginger extract NLC, was done by modified Franz diffusion cell method and approximately 92% of 6-gingerol from NLC, was released within 24 hours.

### **Clinical efficacy for treatment of knee OA by the OMERACT-OARSI responder criteria**

From the response rate at least a 50% reduction in pain (Table 15), we demonstrated that significantly greater following 5%w/w ginger extract NLC treatment compared to 1%w/w diclofenac gel (67.7%, 45.7%  $p < 0.05$ ). Previous study [84], treatment of the knee OA with a topical diclofenac solution, the response rate for a 50% reduction in pain was 43.8% and OMERACT-OARSI responder rate was 65.7% whereas, this finding was 72.8% and 67.7% in 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w diclofenac gel, respectively. Similarly, the meta-analysis of suitable trial, the authors found that trial of topical NSAIDs vs. oral NSAIDs for at least 50% pain relief over 8- 12 weeks the responder rate were 55% and 54% respectively [87].

### **Safety evaluation**

In this study, safety was evaluated via laboratory tests and adverse event of 5%w/w ginger extract NLC and 1%w/w diclofenac gel. Laboratory tests were demonstrated different biochemical (ALP, SGOT, SGPT, BUN, Cr.) and hematological (RBC, HCT, PLT, WBC) parameters with in the same group (before-after) and between two groups. The results did not indicate any significant change. Although ginger has been used in clinical for several thousand years, there was still lack of safety evaluation via laboratory test in human. The previous study, evaluated the safety of

ginger by conducting a 35-day toxicity study in rat. The study demonstrated that oral administration of ginger powder up to 2,000 mg/kg to male and female rats was not different with hematological parameters (RBC, WBC, HCT, PLT) and blood biochemical parameters (AST, ALT, ALP, BUN, CR). The results were no significant different in both parameters and results of necropsy suggest that all of the examined organs of rat treated by 2,000 mg/kg of ginger are normal [88]. In the confirmatory study by Niempoog *et al.* had shown none of the patients abnormal laboratory value (CBC, Urine analysis, BUN, CR, AST, ALT, ALP ) after 6 weeks of treatment with Plygersic gel, which consists ginger extract and Plai by the ratio of about 4% by weight [69].

Adverse event, in this study occurred in ginger extract NLC group who had experienced contact dermatitis to a Naranjo's algorithm so a possible ADR. This finding is similar to result from previous study [69].

#### **Co-intervention**

There was no co-intervention in this study because all patients did not have to take any rescue medication at all. This probably implied that the nature of the osteoarthritis was not so serious enough for patients.

#### **Limitation**

Ginger extract has specific fragrance which leads to incomplete double blind technical study.

#### **CONCLUSION AND RECOMMENDATION**

According to the results of this study, it was found that 5%w/w ginger extract NLC relieve joint pain improves problematic symptoms and improve the quality of life in knee OA during a 12 week for treatment. The WOMAC and KOOS parameter revealed a high percentage of improvement in both groups. Furthermore, the OMERACT-OARSI responder rate have shown 72.8% in 5%w/w ginger extract NLC and 67.7% in 1%w/w diclofenac gel groups. The safety and adverse event of 5%w/w ginger extract NLC



revealed no serious adverse events in any observation or laboratory test. Therefore, 5% w/w ginger extract NLC could be recommended as an alternative treatment in patients with knee OA.

This study has been investigated *in vitro* release studies of 5%w/w ginger extract NLC, was done by modified Franz diffusion cell method and approximately 92% of 6-gingerol from NLC. However, this requires further studies on measuring the absorption of ginger component by soft tissue. For the reason, transdermal delivery of anti-inflammatory drug is a topical treatment routinely used in physiotherapy to reduce pain and inflammation in musculoskeletal disorder. In order to weaken the skin barrier and to achieve a clinically effective drug concentration in the target tissue. There little information is available concerning the efficacy of the treatment protocol and the penetration profile of the substance used in the physiotherapy setting.

In addition, further studies should be planned to evaluate for the economic dimension which compare to other topical therapy that might has the impact the cost of treatment.

## REFERENCES

1. Bliddal H, C.R., *The treatment and prevention of knee osteoarthritis: a tool for clinical decision-making*. Expert Opin Pharmacother 2009. 10(1793-804).
2. Grazio S, B.D.O., *Risk factor and predictors of osteoarthritis*. Am J Manag Care 2009. 9: p. 131: 22-6. .
3. Kapstad, K., et al., *The Norwegian System of Compensation to Patients. Faculty of Nursing Education*. Oslo University College. Oslo. Norway, 2007.
4. Altman, R., *Early management of osteoarthritis*. Am J Manag Care 2010. 16(16 Suppl Management: S41-7).
5. Walsh, N.E., and Hurley, M.V, *Evidence based guidelines and current practice for Physiotherapy management of knee osteoarthritis*. Musculoskeletal Care 2009. 7: p. 45-56.
6. Tapsell, L.C., et al., *Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future*. Med. J, 2006. 185(185 (Suppl. 4), S4-S24).
7. Levy, A.S., et al., *6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund's adjuvant*. BMC Pharmacology 2006. 6.
8. Levy, A.S. and O.R. Simon, *Six-shogaol inhibits production of tumour necrosis factor alpha, interleukin-1 beta and nitric oxide from lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages*. The West Indian Medical Journal 2009. 58: p. 295-300.
9. Praditbongkotchp, A., *Formulation of Microemulsion gel of ZINGIBER OFFICINALE Extract Evaluation of Anti-inflammatory activity in rats*, in *Faculty of Pharmaceutical Science 2010*, Chulalongkorn University. p. 211.
10. Altman, R.D., et al., *Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association*. Arthritis Rheum 1986. 29: p. 1039-49.
11. Jordan, K., Arden NK, and D.M.e. al, *EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic*

- Trials (ESCISIT)*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2003. 62: p. 1145-1155.
12. Chaiammuay, P., J. Darmawan, and K.D. Muirden, *Epidemiology of rheumatic disease in rural Thailand : A WHO-ILAR COPCORD study*. *Community – Oriented Programme for the Control of Rheumatic Disease*. *J Rheumatol* 1998. 25: p. 1382-7.
  13. Woolf, A. and B. Pfleger, *Burden of major musculoskeletal conditions*. *Bull World Health Organ.*, 2003. 81: p. 646-56.
  14. Martel-Pelletier, J., D. Lajeunesse, and J.-P. Pelletier, *Etiopathogenesis of osteoarthritis*. *A Textbook of Rheumatology*. , ed. M.L. 15th edition. Baltimore, Williams & Wilkins. 2005.
  15. Verzijl N, e.a., *Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis*. *Arthritis & Rheumatism*, 2002. 46: p. 114-123.
  16. Keefe, F., et al, *The relationship of gender to pain, pain behavior, and disability in osteoarthritis patients: the role of catastrophizing*. *Pain*, 2000. 87: p. 325-334.
  17. Srikanth VK, Fryer JL, and e.a. Zhai G, *A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage* 2005. 13: p. 769-81.
  18. Nishida, C., et al. ,, *The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications*. *Public Health Nutrition*, 2004. 7: p. 245-250.
  19. Felson DT, Lawrence RC, and D. PA, *Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors*. *Ann Intern Med* 2000. 133: p. 635-46.
  20. Lieveense, A., S. Bierma-Zeinstra, and A. Verhagen, et al, *Influence of obesity on the development of osteoarthritis of the hip: a systematic review*. *Rheumatology (Oxford)* 2002. 41: p. 1156-62.
  21. Manninen, P., et al, *Physical workload and the risk of severe knee osteoarthritis*. *candinavian Journal of Work, Environment & Health*, 2002: p. 25-32.
  22. Sluka KA., *Pain mechanisms involved in musculoskeletal disorders*. *Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy*. , 1996. 24: p. 240-254.

23. Dunlop DD . *Impact of joint impairment on disability specific domains at four years.* Journal of Clinical Epidemiology, 1998. 51: p. 1253-1261.
24. Steultjens M, *Range of joint motion and disability in patients with osteoarthritis of the knee or hip.* Rheumatology (Oxford), 2000. 39: p. 955-961.
25. Guidelines, A.C.o.R.S.o.O., *Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update.* Arthritis Rheum 2000. 43: p. 1905-1915.
26. Hochberg MC, et al., *Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee.* American College of Rheumatology. Arthritis Rheum 1995. 38: p. 1541-6.
27. Jordan KM . *The use of conventional and complementary treatments for knee osteoarthritis in the community.* Rheumatology (Oxford), 2003. 62: p. 1145-1155.
28. Zhang W, *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines.* Osteoarthritis Cartilage 2008. 16: p. 137-162.
29. Doherty M, *A randomized controlled trial of ibuprofen, paracetamol or a combination tablet of ibuprofen/paracetamol in community-derived people with knee pain.* Ann Rheum Dis 2011. 70: p. 1534.
30. Towheed TE, *Acetaminophen for osteoarthritis.* Cochrane Database Syst Rev 2006(CD004257).
31. Bjordal JM, et al., *Short-term efficacy of pharmacotherapeutic interventions in osteoarthritic knee pain: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials.* Eur J Pain 2007. 11: p. 125-38.
32. Cepeda, M., *Tramadol for osteoarthritis.* Cochrane Database SysRev 2006(CD005522).
33. Huskisson, E., *Effects of anti-inflammatory drugs on the progression of osteoarthritis of the knee.* LINK Study Group. Longitudinal Investigation of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Knee Osteoarthritis. J Rheumatol 1995. 22: p. 1941.
34. Peloso, P., *Opioid therapy for osteoarthritis of the hip and knee: Use it or lose it.* J Rheumatol, 2001. 28: p. 36.

35. Heyneman CA, Lawless-Liday C, and W. GC, *Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases. A comparison.* Drugs 2000. 60: p. 555-74.
36. Altman, R., A. Aven, and C. Holmburg, et al, *Capsaicin cream 0.025% as monotherapy for osteoarthritis: a double blind study.* Sem Arth Rheum 1994. 23: p. 25-33.
37. Deal , C., *The use of topical capsaicin in managing arthritis pain: a clinician's perspective.* Sem Arth Rheum 1994. 23: p. 48-52.
38. Cibere J, e.a., *Randomized, double-blind, placebo-controlled glucosamine discontinuation trial in knee osteoarthritis.* Arthritis Rheum 2004. 51: p. 738.
39. Bellamy N, Kirwan J, and e.a. Altman R, *Recommendations for a core set of outcome measures for future phase III clinical trials in knee, hip and hand osteoarthritis. Results of consensus development at OMERACTIII.* J Rheumatol, 1997. 24: p. 799-802.
40. Pham T, H.D., et al., *OMERACT-OARSI initiative: Osteoarthritis Research Society International set of responder criteria of osteoarthritis clinical trials revisited.* Osteoarthritis Cartilage 2004. 12: p. 389-99.
41. Bellamy N, et al., *Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to anti-rheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee.* J Rheumatol 1995. 15: p. 1833-1840.
42. Kuptniratsaikul, V., Rattanachaiyanont, M., *Validation of a modified Thai version of the Western Ontario and McMaster (WOMAC) osteoarthritis index for knee osteoarthritis.* Clin Rheumatol 2007. 26: p. 1641-1645.
43. Lequesne, M., et al., *Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee.* Scand J Rheumatoid 1987. 65: p. 85-89.
44. Chaipinyo K., *Osteoarthritis Outcome Scores (KOOS) Thai version Test-Retest Reliability and Construct Validity of the Thai Version of Knee Osteoarthritis Outcome Scores (KOOS).* Thai Journal of Physical Therapy, 2009. 31.
45. Roos, E. and S. oksvig-Larsen, *Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) validation and comparison to the WOMAC in total knee replacement.* Health Qual Life Outcomes, 2003. 1: p. 17.

46. Mascolo, N., et al., *Ethnopharmacologic investigation of ginger (Zingiber officinale)*. J Ethnopharmacol 1989. 27: p. 129-40.
47. Chrubasik, S., M.H. Pittler, and B.D. Roufogalis, *Zingiberis rhizoma: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles*. Phytomedicine, 2005. 12: p. 684-701.
48. Shibata, M., et al., *Modified formalin test: characteristic biphasic pain response*. Pain, 1989. 38: p. 347-352.
49. Thomson, M., et al., *The use of ginger (Zingiber officinale Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent*. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acid 2002. 67: p. 475-478.
50. Young, H.Y., et al., *Analgesic and anti-inflammatory activities of 6-gingerol* Journal of Ethnopharmacology, 2005. 96: p. 207-210.
51. Lantz, R.C., et al., *The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production*. . Phytomedicine, 2007. 14: p. 123-128.
52. Penna, S.C., et al., *Antiinflammatory effect of the hydralcoholic extract of Zingiber officinale rhizomes on rat paw and skin edema*. Phytomedicine, 2003. 10: p. 381-385.
53. Ojewole, J.A., *Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of Zingiber officinale (Roscoe) rhizomes (Zingiberaceae) in mice and rats*. Phytother. Res, 2006. 20: p. 764-772.
54. Fouda, A.M. and M.Y. Berika, *Evaluation of the effect of hydroalcoholic extract of Zingiber officinale rhizomes in rat collagen-induced arthritis*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2009. 104: p. 262-271.
55. Minghetti, P., et al., *Evaluation of the topical Anti-inflammatory Activity of Ginger Dry Extracts from Solutions and Plasters*. Planta Med 2007. 73: p. 1525-1530.
56. Ahmed, R.S., V. Seth, and B.D. Banerjee, *Influence of dietary ginger (Zingiber officinales Rosc) on antioxidant defense system in rat: comparison with ascorbic acid*. Indian Journal of Experimental Biolology, 2002. 38: p. 604-606.
57. Anonymous, *Zingiber officinale (ginger)*. . Alternative Med. Rev, 2003. 8: p. 331-335.
58. Anonymous, *Zingiberis rhizome*. In: *ESCOP Monographs*, in Thieme Press Stuttgart. 2003: New York. p. 547–553.

59. Weidner, M.S., and K. Sigwart, *The safety of a ginger extract in the rat*. J. Ethnopharmacol, 2000. 73: p. 513-520.
60. Weidner, M.S. and K. Sigwart, *Investigation of the teratogenic potential of a Zingiber officinale extract in the rat*. Reprod. Toxicol, 2001. 15: p. 75-80.
61. Jiang, X., et al., *Effect of ginkgo and ginger on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects*. Indian Journal of Experimental Biology, 2004. 38.
62. Young, H., et al., *Synergistic Effect of Ginger and Nifedipine on Human Platelet Aggregation: A Study in Hypertensive Patients and Normal Volunteers*. The American Journal of Chinese Medicine, 2005. 34: p. 545-551.
63. Bliddal H, Rosetzky A, and e.a. Schlinchting P, *A randomized, placebo-controlled cross-over study of ginger extracts and ibuprofen in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage 2000. 8: p. 9-12.
64. Jariya, B., *Efficacy of HMP-33 (Ginger Extract) compare with Diclofenac in the Osteoarthritis Knee treatment*. J Thai Rehabil Med, 2000. 102: p. 57-64.
65. Altman, R.D. and K.C. Marcussen, *Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2001. 44: p. 2531-2538.
66. Wigler I, et al., *The effects of Zintona EC (a ginger extract) on symptomatic gonarthrosis*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. 11: p. 783-9.
67. Haghighi A., Tavalaei N., and O. MB, *Effect of ginger on primary knee osteoarthritis*. Indian Journal of Rheumatology, 2006. 1: p. 3-7.
68. Zakeri, Z., et al., *Evaluating the effects of ginger extract on knee pain, stiffness and difficulty in patients with knee* Journal of Medicinal Plants Research, 2011. 5: p. 3375-3379.
69. Niempoog, S., P. Siriarchavatana, and T. Kajsongkram, *The efficacy of Plygersic gel for use in the treatment of osteoarthritis of the knee*. J Med Assoc Thai, 2012. 95(95 Suppl 10): p. 113-9.
70. Mehnert, W. and K. Mader, *Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. 47: p. 165-96.
71. Patidar, A., et al., *A review on novel lipid based carrier*. International j. of Pharmacy & Pharmaceutical sciences, 2010. 2: p. 30-35.

72. Radtke, M. and R.H. Muller, *NLC. Nano structured lipid carriers: the new generation of lipid drug carriers*. New Drugs 2001. 2: p. 48-52.
73. Saupe, A., et al., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) – Structural investigations on two different carrier systems*. Bio-Med Mater Eng, 2005. 15: p. 393-402.
74. Benson, H., *Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques*. Current Drug Delivery, 2005. 2: p. 23-33.
75. Barry , B.W. and R. Woodford, *Comparative bio-availability of proprietary topical corticosteroid preparations; vasoconstrictor assays on thirty creams and gels*. Br.J.Dermatol, 1974. 91: p. 323-338.
76. Flynn G L., r.R.L. and M.H. I, *In Percutaneous absorption* ed. M. DekkerInc. 1985, New York.
77. Kasting, G.B., R.L. Smith, and B.D. Anderson, *In Prodrugs: topical and ocular drug delivery*. In Prodrugs, ed. K. Sloan, Ed. Marcel Dekker Inc. 1992, New York.
78. Ricci, M., et al., *Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): in vitro and in vivo studies*. J Pharm Sci, 2005. 94: p. 1149-59.
79. Insel , P.A., *Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agent: drug employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout*. The pharmacological basis of therapeutics, ed. A.G. S. Goodman, T. W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor, McGraw-Hill International edition. 1922, , New York.
80. Jahnke, S., *The theory of high pressure homogenization*. In: R.H. Muller S. Benita and B. Bohm (Eds.), *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*. . Medpharm Scientific Publishers, 1998: p. 177-200.
81. Teeranachaideekul , et al., *Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 Development, physicochemical characterization and in vitro release studies* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. 67: p. 141-148.
82. Hernandez-Diaz, S., C. Varas-Lorenzo, and L. Garcia Rodriguez, *Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of acute myocardial infarction*. Basic Clin Pharmacol, 2006. 98: p. 266-274.



83. Altman, R., *Early management of osteoarthritis*. . Am J Manag Care, 2010. 16 Suppl Management.
84. Philip, A., L.M. Thomas, and Z. Shainhouse, *Treatment of osteoarthritis of the knee with a topical diclofenac solution: a randomised controlled, 6-week trial* BMC Musculoskeletal Disorders, 2005. 6.
85. Gondolph-Zink, B. and U. Gronwald, *Active substance concentration in articular and periarticular tissues of the knee joint after cutaneous application of diclofenac-diethylammonium emulgel*. Akt Rheumatol 1996. 21: p. 298-304.
86. Rademacher, J., et al., *Diclofenac concentration in synovial fluid in inflammation and degenerative joint disease*. Br J Pharmacol 1991. 31: p. 537-41.
87. Lin J., et al., *Efficacy of topical NSAIDs in the treatment of steoarthritis: meta-analysis of randomized controlled trials*. BMJ, 2012: p. 329:324.
88. Xianglu Ronga, et al., *A 35-day gavage safety assessment of ginger in rats*. Regul Toxicol Pharmacol, 2009. 54(2): p. 118–123.



APPENDIX

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## APPENDIX A

## Ethical consideration

Patient information sheet and informed consent form

## ข้อมูลสำหรับอาสาสมัคร

ชื่อโครงการ	ประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัดขิงลดอาการปวดในผู้ป่วยโรค เข่าเสื่อม
ผู้รับผิดชอบโครงการ	ศ. นพ. สุรศักดิ์ ฐานิพานิชสกุล
ผู้ร่วมวิจัย	รศ. นพ. สัณญาณ. เนียมปุก รศ. ดร. อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์ นางปุณยนุช อมรตลใจ
ที่อยู่	วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขโทรศัพท์ (ในเวลาทำการ)
ผู้สนับสนุนการวิจัย	กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและ การแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข
สถานที่ทำวิจัย	โรงพยาบาลท่าช้าง จังหวัดสิงห์บุรี
เรียนอาสาสมัครทุกท่านทราบ	

ท่านกำลังได้รับเชิญให้เข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการวิจัยนี้ เนื่องจากท่านได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม ชนิดปฐมภูมิ ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมหรือไม่เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอท่านกรุณาอ่านรายละเอียดและทำความเข้าใจในเอกสารข้อมูลอาสาสมัครฉบับนี้ (หรือแพทย์,พยาบาลวิจัยเป็นผู้อ่านหรืออธิบายให้ท่านทราบหากท่านมีข้อสงสัยใดๆ กรุณาซักถามจนกว่าท่านจะได้รับความกระจ่าง การเข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้ของท่านจะต้องเป็นไปด้วยความสมัครใจ หากท่านตัดสินใจลงนามเข้าร่วมการวิจัยนี้ ท่านจะได้รับสำเนายินยอมเพื่อเข้าร่วมการวิจัยนี้คืนให้ท่าน 1 ฉบับ อย่างไรก็ตามท่านสามารถขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยนี้ได้ตลอดเวลา

## หลักการและวัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ การศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิผลและความปลอดภัยทางคลินิกของสารสกัดขิงในการลดปวดของผู้ป่วยเข่าเสื่อม โดยเปรียบเทียบกับการใช้ยาลดปวดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ การวิจัยที่ผ่านมาพบว่าขิงมีส่วนประกอบสำคัญคือ ชันน้ำมัน อยู่ในปริมาณสูง อันเป็นสารที่ทำให้ขิงมีรสเผ็ดร้อนและมีกลิ่นหอม สารที่ทำให้ขิงมีรสเผ็ดร้อนคือจินเจอร์รอล มีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ ที่

ก่อให้เกิดการอักเสบ ที่เป็นสาเหตุของการปวดและบวม นอกจากนี้ยังพบว่าซิงก์ได้นำมาเป็นยา  
รับประทานในรูปแบบยาเม็ด ยาแคปซูล และมีการจดสิทธิบัตรตำรับยาที่มีซิงก์เป็นส่วนประกอบที่ใช้ใน  
การรักษาโรคไขข้ออักเสบ โดยไม่มีผลข้างเคียง แต่เรายังไม่มีข้อมูลในการนำซิงก์มาใช้ในรูปแบบยา  
ทาภายนอกซึ่งเป็นอนุภาคนาโนในอิมัลชันเจล จึงได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้

ซิงก์เป็นสมุนไพรที่ใช้กันมานานโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดีย) ตาม  
ตำราแผนโบราณในหลายประเทศได้ใช้ซิงก์รักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้อาเจียนจากการเมาเรือ เม  
าเรือและอาเจียนจากการตั้งครรภ์ โรคไขมันในเลือดสูง โรคข้ออักเสบ เป็นต้น ซิงก์จะมีสารอาหารและ  
สารประกอบที่สำคัญหลายชนิดซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำให้ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็น  
อย่างมาก และจากการทดสอบความเป็นพิษของซิงก์โดยการใช้สารสกัดซิงก์ป้อนหนู และให้ทางผิวหนัง  
กระต่าย ขนาดของน้ำมันซิงก์ที่ทำให้หนูและกระต่ายร้อยละ 50 มีขนาดสูงกว่า 5 กรัม/กิโลกรัม และ  
จากการศึกษาผลการใช้ซิงก์เพื่อการบรรเทาอาการอาเจียนในหญิงมีครรภ์ โดยรับประทานซิงก์ 250  
มก. วันละ 4 ครั้ง ไม่พบปัญหาทวิรูปในทารกหลังคลอดและทารกทุกคนปกติ ผลการทดลองเหล่านี้  
แสดงให้เห็นว่าซิงก์มีความปลอดภัยค่อนข้างสูง

นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาวิจัยทางคลินิกเกี่ยวกับประสิทธิผลและความปลอดภัยทางคลินิ  
กของสารสกัดซิงก์ซิงก์เป็นองค์ประกอบในผู้ป่วยโรคเข่าเสื่อม พบว่าสารสกัดซิงก์ บรรจุในแคปซูลอ่อนเจ  
ลาติน ขนาด 170 มก. วันละ 3 ครั้ง ติดต่อกัน 3 สัปดาห์ สามารถลดอาการปวดเข่าได้ และจาก  
การศึกษาที่ใช้สารสกัดซิงก์ ขนาด 30 มก. รับประทานวันละ 2 ครั้ง นาน 1 เดือน ลดอาการปวดบวม  
และอักเสบที่ข้อลดลง

### หากท่านเข้าร่วมวิจัยจะมีอะไรเกิดขึ้นกับท่านบ้าง

เมื่อท่านตัดสินใจเข้าร่วมโครงการวิจัยและเซ็นชื่อลงในเอกสารยินยอม จะมีขั้นตอนการวิจัย  
ทั้งหมด 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการคัดกรอง และขั้นตอนการเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยให้ยาวิจัย ท่าน  
อาจเป็นอาสาสมัครของโครงการวิจัยนี้ได้ หากผลการคัดกรองของท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์การคัด  
กรองเข้าของการวิจัยนี้

ขั้นตอนการคัดกรอง: ท่านจะได้รับการซักประวัติทางการแพทย์ การตรวจร่างกาย เอกซเรย์  
เข่า และตรวจเลือดเพื่อตรวจความสมบูรณ์ของเซลล์เม็ดเลือด ตรวจการทำงานของตับ ไต โดยเจาะ  
เลือดประมาณ 10 มิลลิลิตร (ประมาณ 2 ช้อนชา) นอกจากนี้ทางโครงการวิจัยจะขอให้ท่านตอบ  
แบบสอบถามเพื่อประเมินความรุนแรงของโรคและคุณภาพชีวิต ซึ่งข้อมูลทั้งหมดนี้ใช้เป็นฐานข้อมูล  
เบื้องต้น เพื่อพิจารณาก่อนรับเข้าร่วมโครงการและให้ยาวิจัย

ขั้นตอนการเข้าร่วมโครงการวิจัย: หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์และได้รับเลือกเข้าร่วมเป็น  
อาสาสมัคร ท่านจะได้รับการนัดหมายให้มาตรวจทุก 4 สัปดาห์ (ประมาณ 1 เดือน) อีก 3 ครั้ง รวม

ระยะเวลาที่อยู่ในโครงการ การวิจัยคือ 12 สัปดาห์ 3 เดือน) ท่านจะได้รับการซักประวัติทางการแพทย์ การตรวจร่างกาย ตรวจเลือด ตอบแบบสอบถาม ท่านจะได้รับยาวิจัยกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง โดยให้รับยา วิจัยไปทานที่บ้านทั้งหมด 3 ครั้ง (ทุกๆ 1 เดือน) คือ สัปดาห์ที่ 0, 4, 8

### การใช้ยาวิจัย

การให้ยาวิจัยสำหรับอาสาสมัครทั้งหมด 120 ราย แต่ละรายจะได้รับการสุ่มเพื่อให้ยาวิจัยที่เป็นสารสกัดขิงในระดับอนุภาคนาโน หรือ 1% ไดโคฟีเนคเจล ซึ่งมีลักษณะหลอดยาวิจัยเหมือนกัน ระยะเวลาที่ได้ทนายาวิจัยจะเท่ากันทุกกลุ่มคือ 12 สัปดาห์ ซึ่งทั้งอาสาสมัครและทีมวิจัยจะไม่ทราบว่า ท่านได้รับยาในกลุ่มใดจนสิ้นสุดการวิจัย โดยอาสาสมัครในแต่ละกลุ่มจะได้รับยาวิจัย ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สารสกัดขิงในระดับอนุภาคนาโน ในขนาด 30 กรัม/เดือน

กลุ่มที่ 2 1% ไดโคฟีเนคเจล ในขนาด 30 กรัม/เดือน

ยาวิจัยสำหรับอาสาสมัครทั้งสองกลุ่ม จะบรรจุหลอดยาวิจัยลักษณะ และขนาดเหมือนกันให้ ทาบริเวณเข้าทุกวัน วันละ 3 ครั้ง (เช้า-กลางวัน-เย็น) สารสกัดขิงทำในระดับอนุภาคนาโนทำใน รูปแบบอิมัลชันโดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติในการเตรียมอิมัลชัน ซึ่งจัดทำที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยี แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อย่างไรก็ตาม หากท่านไม่สามารถทน ต่ออาการข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นจากการททายา ท่านอาจจะหยุดยาวิจัยก่อน ครบกำหนด 12 สัปดาห์ หากแพทย์พิจารณาแล้วว่าสมควรให้หยุดยาวิจัย

### ความเสี่ยงและความไม่สบายที่อาจเกิดขึ้น

การททายาวิจัยและขั้นตอนต่างๆ ระหว่างการวิจัย อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่างๆ แก่ท่านในบาง รายดังนี้

#### 1. ความเสี่ยงจากการไม่พึงประสงค์

อาสาสมัครส่วนใหญ่ทนต่อยาได้ดี ที่อาจพบอาการไม่พึงประสงค์ได้บ้างแต่ไม่รุนแรง คือ อาการแสบร้อน อาการผื่นคัน เป็นต้น

#### 2. ความเสี่ยงจากการเจาะเลือด

สำหรับคนส่วนใหญ่แล้ว เข็มสำหรับเจาะเลือดไม่ได้ทำให้เกิดปัญหาที่รุนแรงใดๆ อย่างไรก็ตาม อาจมีรอยขีด หรือเจ็บปวดบริเวณที่เจาะหรืออาจเวียนศีรษะ แต่อาการเหล่านี้จะหายไปตัวเอง หลังจากการพัก

นอกจากนี้ จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่า ขิงสกัดที่ใช้ลดอาการปวดเข่าใน ผู้ป่วยเข่าเสื่อม ซึ่งใช้ขิงสกัดในรูปแบบยารับประทานซึ่งทำให้มีอาการแสบร้อนหน้าอก ท้องเสีย คลื่นไส้ ส่วนการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ขิงสกัดในรูปแบบยาทาอิมัลชันเจล โดยศึกษาฤทธิ์ในการลดการอักเสบ ในหนูทดลอง พบว่ามีประสิทธิผล และจากการวิจัยอื่นๆ ที่ใช้ขิงในหนูทดลองระหว่างตั้งครรภ์ โดยให้

สารสกัดขิงในปริมาณสูงถึง 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่พบความเป็นพิษต่อระบบต่างๆรวมทั้งตัวอ่อนในครรภ์

### **มาตรการเพื่อลดความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น**

การดำเนินการตามกระบวนการวิจัยประกอบด้วย การซักประวัติทางการแพทย์ การตรวจร่างกาย ตรวจเลือด เพื่อประเมินและติดตามความปลอดภัย ป้องกัน ฝ้าระวังและลดความเสี่ยงจากอาการไม่พึงประสงค์ทางการแพทย์หรือความเสี่ยงด้านอื่นๆ หากพบอาการไม่พึงประสงค์ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลตลอดระยะเวลาการศึกษาจนกระทั่งอาการเหล่านั้นได้รับการแก้ไขหรือได้รับการอธิบายอย่างชัดเจนเมื่อสิ้นสุดการวิจัยนี้

### **ค่าใช้จ่าย**

ท่านจะได้รับการตรวจร่างกาย ตรวจเลือด เอกซเรย์ รวมถึงให้ยาวิจัยโดยไม่มีค่าใช้จ่ายตลอดระยะเวลาการรับยา 12 สัปดาห์ ทั้งนี้ท่านจะได้รับค่าตอบแทนเป็นเงินค่าเดินทางและชดเชยเสียเวลาไม่เกิน 200 บาท จากโครงการวิจัยในการ มาพบแพทย์ตามนัดแต่ละครั้ง ทั้งหมด 4 ครั้ง

### **ท่านจะได้ประโยชน์อะไรจากการศึกษานี้**

ท่านจะได้รับยาทาจากโครงการวิจัยนี้โดยไม่มีค่าใช้จ่าย รวมถึงท่านจะทราบเกี่ยวกับภาวะสุขภาพ ผลการตรวจร่างกาย ผลการตรวจเลือด และผลการเอกซเรย์เข้าของท่าน อย่างก็ตามผลการวิจัยทั้งหมดจะเป็นประโยชน์กับการดูแลผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีลักษณะแบบท่านในอนาคต

### **หากท่านไม่ต้องการเข้าร่วมการศึกษาหรือหากท่านเปลี่ยนใจระหว่างเข้าร่วมการศึกษา**

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยหรือการศึกษานี้หากท่านไม่สมัครใจ หลังจากท่านตัดสินใจเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในโครงการนี้แล้ว ท่านสามารถถอนตัวหรือหยุดการศึกษา การตัดสินใจของท่านจะไม่มีผลต่อการรักษาหรือสิทธิการรักษาของท่าน

### **กรณีใดที่จำเป็นต้องยกเลิกหรือยุติการศึกษาทั้งโครงการ**

ระหว่างการทำวิจัยอาจต้องยกเลิกหรือยุติการศึกษาทั้งโครงการ ซึ่งต้องแจ้งให้ท่านทราบเมื่ออาสาสมัครเกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงเสียชีวิตซึ่งพิสูจน์ได้ว่าเกิดจากการใช้ยาวิจัย

### **การปกป้องรักษาข้อมูล**

ข้อมูลส่วนตัวและข้อมูลทางการแพทย์ของท่าน จะถูกเก็บรวบรวมและเก็บไว้ที่สถานที่วิจัยอย่างปลอดภัย โดยจำกัดการเข้าถึงข้อมูลของท่าน ทีมผู้วิจัยจะนำข้อมูลของท่านมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในด้านการวิจัยเท่านั้น ไม่มีการอ้างถึงชื่อท่านในรายงานหรือวารสารใดๆ เลือดของท่านที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์จะถูกทำลายและจะไม่นำส่วนที่เหลือไปใช้ด้านอื่นนอกเหนือจากทางโครงการวิจัยกำหนดไว้

### ความถูกต้องในการดำเนินการวิจัย

การเก็บข้อมูลการวิจัยนี้ จะต้องได้รับการอนุมัติโดยคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในมนุษย์ก่อนโดยจะได้รับแจ้งความคืบหน้าของโครงการวิจัยเป็นระยะ ตลอดโครงการวิจัยนี้

### หากท่านมีคำถามเกี่ยวกับการวิจัยนี้ ท่านสามารถติดต่อใครได้บ้าง

หากท่านมีคำถาม มีอาการไม่พึงประสงค์จากการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ หรือมีความวิตกกังวล ท่านสามารถติดต่อ หัวหน้าโครงการวิจัย ติดต่อ ศ.นพ. สุรศักดิ์ ฐานิพานิชสกุล วิทยาลัยวิทยาศาสตร์ สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-218- 8194) ในเวลาราชการ ( รศ.นพ.สัณญาณ เนียมปุก ภาควิชากระดูกและข้อ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 02-926-9999 และ 02-926-9486 (ในเวลาราชการ) หรือผู้ร่วมวิจัย ปุณยนุช อมรดลใจ โทรศัพท์ 089-9864839 ตลอด 24 ชั่วโมง หรือหากมีข้อร้องเรียนเกี่ยวกับโครงการ สามารถติดต่อได้ที่ สำนักงานเลขานุการ คณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคนด้านการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ต. ตลาดขวัญ อ. เมือง จ. นนทบุรี 11000 โทรศัพท์/ โทรสาร 02-591-6061

## หนังสือยินยอมด้วยความสมัครใจ

### ชื่อโครงการวิจัย “ ประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัดชิงนาโนในการลดอาการปวด ในผู้ป่วยโรคเข่าเสื่อม”

วันที่ให้คำยินยอม วันที่ .....เดือน..... พ.ศ.

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยครั้งนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่เกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้เมื่อใดก็ได้ และเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้โดยสมัครใจ และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคที่ข้าพเจ้าพึงจะได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปแบบที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวของข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้นและจะต้องได้รับคำยินยอมจากข้าพเจ้าเป็นลายลักษณ์อักษร

ก่อนที่ข้าพเจ้าจะตกลงใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ข้าพเจ้าทราบดีว่า เป็นการทดสอบผลของสารสกัดชิงนาโน เพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร หรือยาเปรียบเทียบได้โคฟีเนค ซึ่งใช้ในการรักษาอาการปวดเข่าจากโรคเข่าเสื่อม การวิจัยครั้งนี้เป็นการทำเพื่อหาวิธีการรักษาโรคแนวใหม่ โดยนำสมุนไพรไทยมาประยุกต์ใช้ ซึ่งข้าพเจ้ายินดีที่จะเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครโครงการวิจัยนี้

ในการวิจัยครั้งนี้ จะมีการเจาะเลือดจำนวน 10 มิลลิลิตร (ประมาณ 2 ช้อนชา) จำนวน 2 ครั้งได้แก่  
ครั้งที่ 1 เจาะเลือดวันที่ทำการคัดกรองอาสาสมัคร  
ครั้งที่ 2 เจาะเลือดหลังทายาเดือนที่ 3

(ในระหว่างที่มีการเจาะเลือดอาจมีอาการเจ็บเล็กน้อย หลังจากเจาะเลือดเสร็จแล้วอาจมีรอยแดงหรือเขียวในตำแหน่งที่มีการเจาะเลือดได้ในบางราย ซึ่งค่าตรวจร่างกายและค่าใช้จ่ายในการตรวจทางห้องปฏิบัติการผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด)



ผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดภาวะแทรกซ้อนใด ๆ ที่มีสาเหตุจากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดค่าใช้จ่าย และหรือจะมีการชดเชยค่าตอบแทน ตลอดจนเงินทดแทนความพิการที่อาจเกิดขึ้นตามความเหมาะสม

ข้าพเจ้ายินยอมให้ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน และคณะกรรมการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมยา สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้า เพื่อเป็นการยืนยันถึงขั้นตอนโครงการวิจัยทางคลินิก โดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ในการปิดบังข้อมูล ตามกรอบที่กฎหมายและกฎระเบียบได้อนุญาตไว้

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ในกรณีที่ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ข้าพเจ้าสามารถติดต่อกับหัวหน้าโครงการวิจัย หรือปณณช อมรดลใจ เบอร์โทรศัพท์ **089-986-4839** ตลอด 24 ชั่วโมง หรือสามารถ รศ.นพ.สัญญาณ เนียมปุก หมายเลขโทรศัพท์ 02-926-9999 (ในเวลาราชการ) หรือหากมีข้อร้องเรียนเกี่ยวกับโครงการ สามารถติดต่อได้ที่ สำนักงานเลขานุการคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคนด้านการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ต. ตลาดขวัญ อ. เมือง จ. นนทบุรี 11000 โทรศัพท์/โทรสาร 02-591-6061

ลงนาม.....ผู้ยินยอม วันที่.....  
(.....)

ลงนาม.....พยาน วันที่.....  
(.....)

ลงนาม.....พยาน วันที่.....  
(.....)

ลงนาม.....ผู้วิจัย/ผู้ขอความยินยอม  
(.....) วันที่.....

## APPENDIX B

## Case report form

**Title:** Efficacy and safety of ginger extract nanoparticles relieves pains in knee osteoarthritis

---

**Baseline data**

1. Age.....years
  2. Sex     Male     Female
  3. Address  
.....  
.....
  4. Education level.....
  5. Duration of disease.....years
  6. Affected side     Right     Left     Bilateral
  7. Duration to pain resolved.....
  8. Prior medications     No  
                                   Yes, specify; \_\_\_\_\_
1. \_\_\_\_\_ date of medication    □□ / □□ / 25 □□
  2. \_\_\_\_\_ date of medication    □□ / □□ / 25 □□
  3. \_\_\_\_\_ date of medication    □□ / □□ / 25 □□
  4. \_\_\_\_\_ date of medication    □□ / □□ / 25 □□



## 3. Physical examination

1. HEET	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
2. Chest & Lung	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
3. Cardiovascular	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
4. Abdomen	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
5. Knee	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify
5.1 Swelling		_____
5.2 Effusion	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
5.2 Tenderness	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
6. Other <input type="checkbox"/> none		_____
<b>Study Physician/ PI:</b> _____ <b>Date</b> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / 25 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		

## 4. Laboratory Result

Date of specimens collection   /   / 25  

Renal Function test	Result
BUN (mg/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .
Serum Creatinine (mg/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Liver Function test	Result
Total Protein (g/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Albumin (g/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Globulin (g/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Alkaline Phosphate (U/L)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
SGOT(AST) ( U/L)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
SGPT (ALT) ( U/L)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Total Bilirubin (mg/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .

## 5. Radiological assessment

Study film code	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .
Date of plain film	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>
KL. Grading system (1957)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Study date	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>

Study visit

Visit 2 wk 04

## 1. Participant status

 followup Missed visit Cannot contact Withdraw due to \_\_\_\_\_ Other, specify \_\_\_\_\_

## 2. Vital sign

1. Temperature( $^{\circ}$ C)   . 2. Pulse Rate(bpm)   3. Respiration Rate (t/min)  4. Blood Pressure(mmHg)    /  

## 3. History taking

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---

Study Physician/PI

Date   /   / 25

## 4. Physical examination

1. HEET	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
2. Chest & Lung	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
3. Cardiovascular	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
4. Abdomen	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
5. Knee	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify
5.1 Swelling		_____
5.2 Effusion	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
5.3 Tenderness	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
6. Other <input type="checkbox"/> none		_____
Study Physician/ PI: _____		Date <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / 25 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

## 5. Study drug

Study drug code	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Dispensing date	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>
Amount of dispensing ( g )	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Study date <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>	

## 6. Adverse Drug Reaction

No.	AE / Evaluation from Naranjo's algorithm
1.	
2.	
3.	
4.	



Study visit

Visit 3 wk 08

**1. Participant status** follow up Missed visit Cannot contact Withdraw due to \_\_\_\_\_ Other, specify \_\_\_\_\_**2. Vital sign**1. Temperature( $^{\circ}$ C) .2. Pulse Rate(bpm) 3. Respiration Rate (t/min) 4. Blood Pressure(mmHg)  / **3. History taking**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

---



---



---



---



---



---



---



---

Study Physician/PI

Date  /  / 25

## 4. Physical examination

1. HEET	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
2. Chest & Lung	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
3. Cardiovascular	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
4. Abdomen	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
5. Knee <input type="checkbox"/> 5.1 Swelling	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
<input type="checkbox"/> 5.2 Effusion	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
<input type="checkbox"/> 5.2 Tenderness	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
6. Other <input type="checkbox"/> none		_____
Study Physician/ PI: _____		Date <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>

## 5. Study drug

Study drug code	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Dispensing date	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>
Amount of dispensing ( g )	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Study date <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>	

## 6. Adverse Drug Reaction

No.	AE / Evaluation from Naranjo's algorithm
1.	
2.	
3.	
4.	

Study visit

Visit 4 wk 12

**1. Participant status** followup Missed visit Cannot contact Withdraw due to \_\_\_\_\_ Other, specify \_\_\_\_\_**2. Vital sign**1. Temperature(<sup>o</sup>C).

2. Pulse Rate(bpm)

3. Respiration Rate (t/min)

4. Blood Pressure(mmHg)

 / **3. History taking**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

---



---



---



---



---



---



---

Study Physician/ PI

Date  /  / 25

## 4. Physical examination

1. HEET	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
2. Chest & Lung	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
3. Cardiovascular	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
4. Abdomen	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
5. Knee <input type="checkbox"/> 5.1 Swelling	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
<input type="checkbox"/> 5.2 Effusion	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
<input type="checkbox"/> 5.2 Tenderness	<input type="checkbox"/> WNL	<input type="checkbox"/> Abnormal, specify _____
6. Other <input type="checkbox"/> none		_____
<b>Study Physician/ PI:</b> _____		Date <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / 25 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

#### 4. Laboratory Result

Date of specimens collection   /   / 25

Renal Function test	Result
BUN (mg/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .
Serum Creatinine (mg/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .
Liver Function test	Result
Total Protein (g/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Albumin (g/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Globulin (g/dl)	<input type="text"/> <input type="text"/> .
Alkaline Phosphate ( U/L)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .
SGOT (AST) ( U/L)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .
SGPT ((ALT) ( U/L)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .
Total Bilirubin (mg/dl )	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .

#### 5. Study drug

Study drug code	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Dispensing date	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>
Amount of dispensing ( g )	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> .
Study date <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>	

#### 6. Adverse Drug Reaction

No.	AE / Evaluation from Naranjo's algorithm
1.	
2.	
3.	

## APPENDIX C

### Modified WOMAC scale

(WOMAC validation of a modified Thai version by Kuptniratsaikul V, Rattanachaiyanont M, 2007)

ครั้งที่ \_\_\_\_\_ วันที่ประเมิน  /  / 25

**คำชี้แจง** การประเมินสภาวะสุขภาพ : คำถามต่อไปนี้จะบ่งชี้ความรุนแรงของความเจ็บปวดที่เกิดจากการเสื่อมของกระดูกและข้อ กรุณาบอกความรุนแรงของความเจ็บปวด อาการข้อขัดตึง และความยากลำบากของการทำกิจกรรมที่ **เกิดขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง ที่ผ่านมา**

**ส่วนที่ 1 ความรุนแรงของความเจ็บปวด ภายใน 48 ชม. ที่ผ่านมา ระดับความปวด (0 – 10)**

โดย 0 หมายถึงไม่ปวดเลย และ 10 หมายถึงปวดมากจนทนไม่ได้

**1. ปวดขณะเดิน**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ไม่ปวดเลย

ปวดมากจนทนไม่ได้

**2. ปวดขณะขึ้นลงบันได**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ไม่ปวดเลย

ปวดมากจนทนไม่ได้

**3. ปวดข้อตอนกลางคืน**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ไม่ปวดเลย

ปวดมากจนทนไม่ได้

**4. ปวดข้อขณะอยู่เฉยๆ**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ไม่ปวดเลย

ปวดมากจนทนไม่ได้

**5. ปวดข้อขณะยืนลงน้ำหนัก (ขาข้างนั้นรับน้ำหนักตัว)**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ไม่ปวดเลย

ปวดมากจนทนไม่ได้

**ส่วนที่ 2 ระดับอาการข้อฝืด, ข้อยึด ภายใน 48 ชม. ที่ผ่านมา (0-10)**

โดย 0 หมายถึงไม่มีอาการฝืดเลย และ 10 หมายถึง มีอาการฝืดมากที่สุด

**1. ข้อฝืดช่วงเช้า (ขณะตื่นนอน)**

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ไม่ฝืดเลย

ฝืดมากที่สุด

## 2. ข้อผิดพลาดในช่วงระหว่างวัน

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ไม่ผิดพลาดเลย

ผิดพลาดมากที่สุด

ส่วนที่ 3 ระดับความสามารถในการทำงานข้อ ภายใน 48 ชม. ที่ผ่านมา (0 – 10)

โดย 0 หมายถึงไม่มีอาการผิดพลาด และ 10 หมายถึง ไม่สามารถทำกิจกรรมนั้นๆได้

### 1. การลงบันได

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

### 2. การขึ้นบันได

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

### 3. การลุกยืนจากท่านั่ง

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

### 4. การยืน

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

### 5. การเดินบนพื้นราบ

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

### 6. การขึ้นลงรถยนต์

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

### 7. การไปซื้อของนอกบ้าน หรือการไปจ่ายตลาด

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

### 8. การใส่กางเกง

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)



## 9. การลุกจากเตียง

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

## 10. การถอดกางเกง

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

## 11. การเข้าออกจากห้องอาบน้ำ

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

## 12. การนั่ง

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

## 13. การเข้า-ออกจากส้วม

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

## 14. การทำงานบ้านหนักๆ

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

## 15. การทำงานบ้านเบาๆ

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

ทำได้ดีมาก

เป็นปัญหามากที่สุด (ไม่สามารถทำได้)

## APPENDIX D

## Knee and osteoarthritis outcome score (KOOS)

( KOOS validation of a modified Thai version by Chaipinyo K., 2009 )

แบบประเมินข้อเข่า Knee and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) เป็นเครื่องมือที่ใช้ประเมินสภาวะผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis) ของข้อเข่าโดยให้ คะแนน 0-4 คะแนน (0 = ไม่มีอาการเลย ถึง 4= อาการรุนแรงมากที่สุด) 42 ข้อ รวมทั้งสิ้น 168 คะแนน ดังต่อไปนี้

การประเมินสภาวะสุขภาพ : คำถามต่อไปนี้ จะบ่งชี้ความรุนแรงของความเจ็บปวดที่เกิดจากการเสื่อมของกระดูกและข้อ กรูณาบอกความรุนแรงของความเจ็บปวด อาการข้อขัดตึง และความยากลำบากของการทำกิจกรรมทางกายภาพที่ เกิดขึ้นภายในสัปดาห์ที่ผ่านมา

1. อาการทั่วไป (Symptoms) 5 ข้อ ได้แก่ S1-S5
2. อาการขัดตึงข้อ (Stiffness) 2 ข้อ ได้แก่ S6-S7
3. อาการปวด (Pain) 9 ข้อ ได้แก่ P1-P9
4. การเคลื่อนไหวในกิจวัตรประจำวัน 17 ข้อ ได้แก่ A1- A17
5. การเคลื่อนไหวในการออกกำลังกายและการทำกิจกรรมอื่นๆ 5 ข้อ ได้แก่ SP1-SP5
6. คุณภาพชีวิต 5 ข้อ ได้แก่ Q1-Q5

## คำชี้แจง

แบบประเมินนี้เป็นการสำรวจความคิดเห็นของท่านเกี่ยวกับข้อเข่า ข้อมูลนี้จะช่วยในการติดตามอาการที่เกิดขึ้น และประเมินระดับความสามารถในการเคลื่อนไหวของท่าน

โปรดตอบทุกคำถามโดยเลือกคำตอบข้อที่เหมาะสมที่สุดเพียงข้อเดียวในแต่ละคำถามโดยทำเครื่องหมายที่ตัวเลือกนั้น  หากไม่แน่ใจกรุณาเลือกคำตอบที่ใกล้เคียงที่สุด

1. อาการ คำถามต่อไปนี้ เกี่ยวข้องกับอาการที่เกิดขึ้นกับท่านในช่วงสัปดาห์ที่ผ่านมา

S1 ข้อเข่าของท่านมี อาการบวมหรือไม่

- ไม่มี     ไม่ค่อยมี     บางครั้ง     มีอาการบ่อยๆ     บวม

ตลอดเวลา

S2 ท่านรู้สึกข้อเข่ามีการเสียดสีกัน หรือมีเสียงเกิดขึ้นในข้อขณะเคลื่อนไหวหรือไม่

- ไม่มี     ไม่ค่อยมี     บางครั้ง     เป็นบ่อยๆ     เป็น

ตลอดเวลา

S3 ข้อเข่าของท่านมีอาการติดหรือยึดในขณะเคลื่อนไหวหรือไม่

- ไม่มี     ไม่ค่อยมี     บางครั้ง     เป็นบ่อยๆ     เป็นตลอดเวลา

S4 ท่านสามารถเหยียดเข้าได้สุดหรือไม่

ทำได้ทุกครั้ง  ทำได้เป็นส่วนใหญ่  ทำได้บางครั้ง  ทำไม่ค่อยได้  ทำไม่ได้เลย

S5 ท่านสามารถงอเข้าได้สุดหรือไม่

ทำได้ทุกครั้ง  ทำได้เป็นส่วนใหญ่  ทำได้บางครั้ง  ทำไม่ค่อยได้  ทำไม่ได้เลย

2. การฝึกขัดของข้อ คำถามต่อไปนี้จะเกี่ยวข้องกับการฝึกขัดของข้อเข่าที่ท่านรู้สึกในช่วงสัปดาห์ที่ผ่านมา การฝึกขัดของข้อเข่าเป็นความรู้สึกถึงการจำกัดการเคลื่อนไหวของข้อเข่าหรือเคลื่อนไหวข้อเข่าในทิศทางต่างๆได้ช้าลง

S6 เมื่อท่านตื่นนอนตอนเช้า ระดับความรุนแรงของการฝึกขัดของข้อเข่าเป็นอย่างไร

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

S7 ระดับความรุนแรงของการฝึกขัดของข้อเข่าหลังจากนั่ง นอน หรือพักการใช้ขาในช่วงเวลากลางวันเป็นอย่างไร

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

3. อาการปวด

P1 ท่านรู้สึกว่ามีอาการปวดข้อเข่าบ่อยครั้งเพียงใด

ไม่มีอาการ  ทุกเดือน  ทุกสัปดาห์  ทุกวัน  ตลอดเวลา

โปรดระบุระดับความเจ็บปวดข้อเข่าที่เกิดขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ผ่านมาในขณะที่เคลื่อนไหวข้อเข่าในลักษณะต่อไปนี้

P2 หมุนบิดขาบนเข่าข้างที่ปวดขณะยืน

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

P3 เหยียดเข้าจนสุด

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

P4 งอเข้าจนสุด

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

P5 เดินบนพื้นราบ

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

P6 เดินขึ้น หรือลงบันได

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

## P7 ขณะนอนอยู่บนเตียงตอนกลางคืน

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

## P8 นิ่งหรือนอน

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

## P9 ยืนตรง

ไม่มีอาการ  อาการเล็กน้อย  อาการปานกลาง  อาการรุนแรง  อาการรุนแรงมาก

## 4. การเคลื่อนไหวในชีวิตประจำวัน

คำถามต่อไปนี้จะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเคลื่อนไหวที่เป็นส่วนประกอบของการทำกิจวัตรประจำวัน ซึ่งหมายถึงการเคลื่อนไหวและดูแลตนเอง

## A1 เดินลงบันได

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A2 เดินขึ้นบันได

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A3 ลุกขึ้นจากเก้าอี้

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A4 ยืนตรง

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A5 ก้มหยิบของจากพื้น

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A6 เดินบนพื้นราบ

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A7 ก้าวขึ้นหรือลงจากรถ

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A8 เดินไปที่ขอของระยะใกล้ ๆ

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A9 สวมถุงน่องหรือถุงเท้า

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A10 ลุกขึ้นจากเตียง

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A11 ถอดถุงน่องหรือถุงเท้า

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A12 นอนพลิกตัวบนเตียงโดยไม่ขยับเข่าก่อน

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A13 ก้าวขาเข้าและออกจากห้องน้ำ

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A14 นั่ง

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A15 นั่งลงและลุกจากโถส้วม โปรดระบุ หากเป็นโถส้วมแบบ นั่งยองๆ ไม่ใช่ แบบโถนั่ง

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A16 ทำงานบ้านหนัก ๆ เช่น เคลื่อนย้ายสิ่งของ ขัดพื้น

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## A17 ทำงานบ้านเบาๆ เช่น ทำกับข้าว กวาดบ้าน

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

5. การเคลื่อนไหวในการออกกำลังกาย และการทำกิจกรรมอื่นๆ คำถามต่อไปนี้ เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวที่เป็นส่วนประกอบของการออกกำลังกาย และการทำกิจกรรมอื่นๆ นอกเหนือจากการทำกิจวัตรประจำวัน

โปรดเลือกคำตอบที่แสดงระดับความยากลำบากของการเคลื่อนไหวต่อไปนี้ที่ท่านรู้สึกในช่วงสัปดาห์ที่ผ่านมา

## SP1 ย่อเข่า/ นั่งยองๆ

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## SP2 วิ่ง

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## SP3 กระโดด

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## SP4 หมุนบิดขาบนเข่าข้างที่ปวด

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## SP5 คูกเข่า

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด

## 6. คุณภาพชีวิต

Q1 ท่านรู้สึกว่าการเข้าของท่านมีปัญหาบ่อยเพียงใด

ไม่มีปัญหาเลย  ทุกเดือน  ทุกสัปดาห์  ทุกวัน  ตลอดเวลา

Q2 ท่านได้ปรับเปลี่ยนวิถีชีวิตหรือกิจวัตรประจำวันเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดการบาดเจ็บของข้อเข่ามากขึ้นหรือไม่

ไม่เลย  เล็กน้อย  ปานกลาง  มาก  มากที่สุด

Q3 ท่านรู้สึกไม่มั่นใจต่อสภาพของข้อเข่ามากน้อยเพียงใด

ไม่รู้สึกเลย  ไม่มั่นใจเล็กน้อย  ไม่มั่นใจปานกลาง  ไม่มั่นใจมาก  ไม่มั่นใจมากที่สุด

Q4 โดยทั่วไปแล้ว ท่านคิดว่าข้อเข่าของท่านทำให้เกิดความยากลำบากต่อท่านมากน้อยเพียงใด

ไม่ลำบากเลย  ลำบากเล็กน้อย  ลำบากปานกลาง  ลำบากมาก  ลำบากมากที่สุด



## APPENDIX E

## Index of severity for osteoarthritis of the knee (Knee ISOA)

(Lequesne,1997)

## อาการปวด

1. ขณะนอนบนเตียงตอนกลางคืน

 ไม่มีอาการปวด (0)  ปวดขณะมีการเคลื่อนไหว (1)  ปวดขณะนอนเฉยๆ (2)

2. ข้อฝืดแข็งหลังจากตื่นนอนตอนเช้า

 น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 นาที(0)  ระหว่าง 1-15 นาที(1)  มากกว่าหรือเท่ากับ15นาที(2)

3. ปวดเข่าหลังจากยืนนาน 30 นาที

 ไม่มีอาการปวด )0 (  มีอาการปวด )1 (

4. ขณะเดิน

 ไม่มีอาการปวด(0)  ปวดหลังจากเดินได้ช่วงขณะหนึ่ง(1)  ปวดตั้งแต่เริ่มเดิน (2)

5. ปวดเข่าหลังจากลุกขึ้นยืนโดยไม่ใช้แขนช่วยยัน

 ไม่มีอาการปวด(0)  มีอาการปวด (1)

## ระยะทางสูงสุดที่เดินได้อาจเดินร่วมกับมีอาการปวดก็ได้

 ไม่จำกัดระยะทาง (0)  มากกว่า 1 กม. แต่จำกัดระยะทาง (1)

 900-1,000 ม.(ประมาณ 15 นาที )(2)  500-900 ม. (8-15 นาที )(2)

 300-500 ม. (4)  100-300 ม.(5)  น้อยกว่า 100 ม.(6)

 ใช้เครื่องช่วยเดิน 1 ข้าง (1)  ใช้เครื่องช่วยเดิน 2 ข้าง (2)

## การทํากิจวัตรประจำวัน

1. เดินขึ้นบันไดขั้นมาตรฐานได้

 ทำได้ปกติ (0)  ทำด้วยความลำบาก (1)  ไม่สามารถทำได้ (2)

2. เดินลงบันไดขั้นมาตรฐานได้

 ทำได้ปกติ (0)  ทำด้วยความลำบาก (1)  ไม่สามารถทำได้ (2)

3. นั่งยองๆ ได้

 ทำได้ปกติ (0)  ทำด้วยความลำบาก (1)  ไม่สามารถทำได้ (2)

4. เดินบนพื้นไม้เรียบได้

 ทำได้ปกติ (0)  ทำด้วยความลำบาก (1)  ไม่สามารถทำได้ (2)

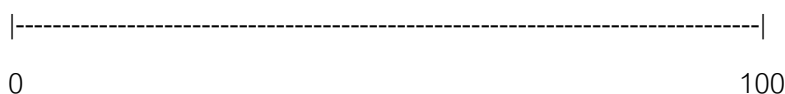
## APPENDIX F

## Global assessment by patient

( by Decha R. 2004 )

คุณหมอยังต้องการทราบว่า ท่านมี **อาการปวด** มาก-น้อย แค่ไหนจากโรคข้อเสื่อมที่เป็นอยู่  
ความ **เจ็บปวด** ข้อ จากโรคที่เป็นอยู่มี มาก-น้อย ในช่วง 48 ชั่วโมงที่ผ่านมา

โดยทำเครื่องหมายที่ตัวเลขนั้น **X** ลงบนเส้นข้างล่างนี้ที่ตรงกับความเจ็บปวดของข้อ



ไม่เจ็บปวดเลย

เจ็บปวดมากที่สุด

กาเครื่องหมาย  ลงในช่องสี่เหลี่ยม หน้าข้อที่ตรงกับความเจ็บปวดข้อที่เป็นอยู่มากที่สุด

- 1. ไม่เจ็บปวดเลย
- 2. เจ็บปวดบ้าง
- 3. เจ็บปวดปานกลาง
- 4. เจ็บปวดค่อนข้างมาก
- 5. เจ็บปวดมากที่สุด

กาเครื่องหมาย  ลงในช่องสี่เหลี่ยม หน้าข้อที่ตรงกับสภาพทั่วไปทั้งหมดของโรคข้อเสื่อม

- 1. ดี มาก
- 2. ดี
- 3. พอใช้
- 4. แย่
- 5. แย่มาก



## APPENDIX G

## Global assessment by the investigator

แพทย์ได้ประเมินอาการปวด มาก-น้อย แคะไหนจากโรคข้อเสื่อมที่เป็นอยู่ ความเจ็บปวดข้อ  
จากโรคที่เป็นอยู่มี มาก-น้อย ในช่วง 48 ชั่วโมงที่ผ่านมา

โดยทำเครื่องหมายที่ตัวเลขนั้น **X** ลงบนเส้นข้างล่างนี้ที่ตรงกับความเจ็บปวดของข้อ

|-----|

0 100

**ไม่เจ็บปวดเลย** **เจ็บปวดมากที่สุด**

กาเครื่องหมาย  ลงในช่องสี่เหลี่ยม หน้าข้อที่ตรงกับความเจ็บปวดข้อที่เป็นอยู่มากที่สุด

1. ไม่เจ็บปวดเลย

2. เจ็บปวดบ้าง

3. เจ็บปวดปานกลาง

4. เจ็บปวดค่อนข้างมาก

5. เจ็บปวดมากที่สุด

กาเครื่องหมาย  ลงในช่องสี่เหลี่ยม หน้าข้อที่ตรงกับสภาพทั่วไปทั้งหมดของโรคข้อเสื่อม

1. ดี มาก

2. ดี

3. พอใช้

4. แย่

5. แย่มาก

## APPENDIX H

## Adverse drug reaction by Naranjo' algorithm

รหัส.....อายุ.....ปี เบอร์โทร.....  
 อาการที่สงสัย.....ในสัปดาห์ที่.....(...../...../.....)

คำถาม	ใช่	ไม่ใช่	ไม่ทราบ	คะแนน
1. เคยมีรายงานที่สรุปแน่นอนถึงอาการเช่นนี้จากยานี้มาก่อน	+1	0	0	
2. อาการไม่พึงประสงค์นั้นเกิดขึ้นภายหลังจากอาสาสมัครได้รับยาที่สงสัยนั้น	+1	-1	0	
3. อาการไม่พึงประสงค์นั้นบรรเทาลงเมื่อหยุดยาที่สงสัยหรือเมื่อมีการให้ specific antagonist	+1	0	0	
4. อาการไม่พึงประสงค์นั้นกลับเป็นซ้ำเมื่อใช้ยานี้อีก	+2	-1	0	
5. อาจมีสาเหตุอื่นนอกเหนือจากยาที่สงสัย ซึ่งเป็นสาเหตุให้อาสาสมัครมีอาการไม่พึงประสงค์นั้น	+1	+2	0	
6. เมื่อทดลองให้ยาหลอก แก้อาสาสมัครอาการไม่พึงประสงค์นั้นหายไปหรือไม่	+1	+1	0	
7. มีการวัดระดับยาในเลือดหรือใน body fluid อื่นและค่าดังกล่าวแสดงถึงระดับที่เป็นพิษ	-1	0	0	
8. อาการไม่พึงประสงค์นั้นรุนแรงเมื่อมีการเพิ่มขนาดยาและหรืออาการไม่พึงประสงค์นั้นลดความรุนแรงลงเมื่อลดขนาดยา	+1	0	0	
9. อาสาสมัครเคยแสดงอาการไม่พึงประสงค์เช่นนี้มาก่อนในอดีตเมื่อใช้ยาที่สงสัยหรือเมื่อใช้ยากลับกัน	+1	0	0	
10. สามารถยืนยันอาการไม่พึงประสงค์ดังกล่าวได้ด้วย objective evidence บางอย่าง	+1	0	0	


คะแนนรวม < 9 = definite      1-4 = possible

5-8 = probable      < 0 = doubtful หรือ unlikely

อาการที่สงสัย ..... มีคะแนนรวม .....

อยู่ในระดับ .....

APPENDIX I  
Ethical certificate

ที่ RLC 0018/57	สำนักงานเลขาธิการคณะกรรมการ พิจารณาการศึกษาวิจัยในคน ฯ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและ การแพทย์ทางเลือก ถนนพญาไท 11000
27 มกราคม 2557	
<p>เรื่อง การพิจารณาโครงร่างการวิจัยฉบับแก้ไข</p> <p>เรียน คณบดีวิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p> <p>สิ่งที่ส่งมาด้วย 1. ผลการพิจารณาโครงร่างการวิจัย (AF 02-008) ลงวันที่ 24 มี.ค. 2557 - 24 มี.ค. 2558</p> <p>2. แบบรายงานความก้าวหน้าของการวิจัย (AF 08-010)</p> <p>3. แบบรายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ชนิดร้ายแรง (AF 02-018)</p> <p>4. แบบรายงานส่วนแก้ไขเพิ่มเติมโครงร่างการวิจัย (AF 02-007)</p> <p>5. แบบรายงานการยุติโครงการวิจัยก่อนกำหนด (AF 01-017)</p> <p>6. แบบรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (AF 01-014)</p>	
<p>ตามที่ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ส่งโครงร่างการวิจัย เรื่อง ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสารสกัดจิงนาโนในการลดปวดในผู้ป่วยโรคเข่าเสื่อม รหัสโครงการ 12-2556 ฉบับแก้ไข Version 3 วันที่ 13 ธันวาคม 2556 โดยมี ศ.นพ.สุรศักดิ์ ฐานิพานิชสกุล เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย ให้คณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน ฯ พิจารณานั้น</p>	
<p>ในการนี้ คณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน ฯ ได้พิจารณาโครงการวิจัยฉบับแก้ไขดังกล่าว และนำเสนอในการประชุมครั้งที่ 1/2557 วันศุกร์ที่ 24 มกราคม 2557 และมีมติ “อนุมัติ” ให้ดำเนินการวิจัย จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบและแจ้งผู้เกี่ยวข้องต่อไปด้วย จะเป็นพระคุณ</p>	
<p>จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบและแจ้งผู้เกี่ยวข้องต่อไปด้วย จะเป็นพระคุณ</p>	
<p>ขอแสดงความนับถือ</p> 	
<p>(นายแพทย์วิชัย โชควิวัฒน์)</p>	
<p>สถาบันการแพทย์แผนไทย โทรศัพท์/โทรสาร 0-2591-6061</p>	<p>ประธานกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน ด้านการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก</p> <p>.....ร่าง</p> <p>.....พิมพ์</p> <p>.....ทาน</p> <p>.....ตรวจ</p> <p>24, 01, 57</p>

## APPENDIX J

## Preparation and evaluation of ginger extract NLC

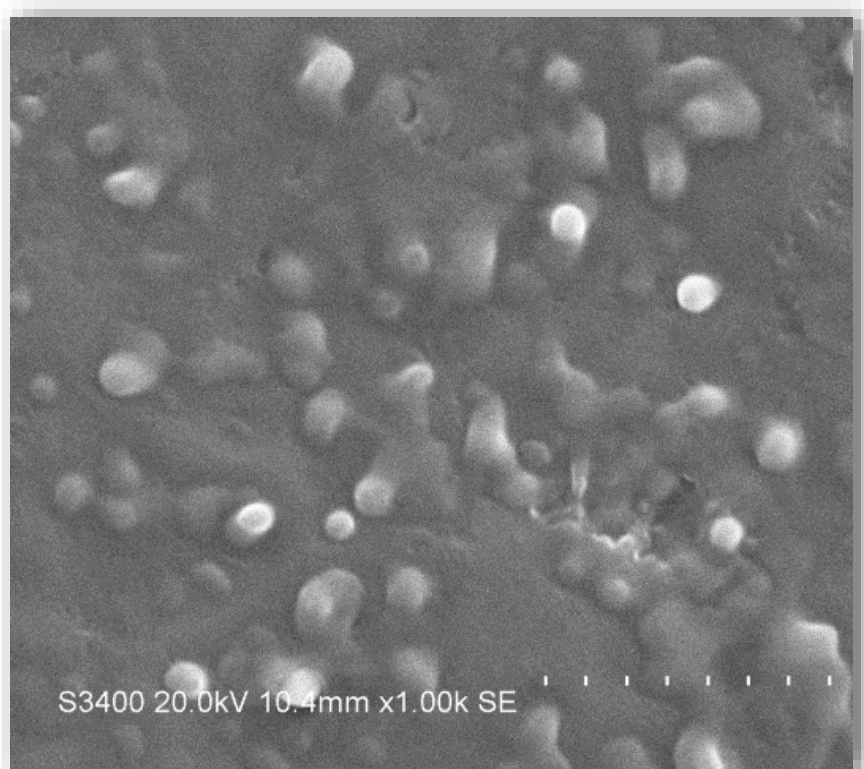
**Table 17** Mean particle size (Z-ave) ,polydispersity index (PDI) and zeta potential value of ginger extract NLC

Formulations	Z-ave	PDI	Zeta (mV)
Ratio (H. lecithin: Tw80)			
G1(4:3)	324.1± 3.85	0.043±0.044	-46.6±2.63
G2 (4:5)	319.7±1.28	0.182±0.072	-38.5±0.81
G3 (4:7)	342.8±6.24	0.074±0.022	-47.9±1.64
G4 (2:5)	479.5±6.94*	0.084±0.044	-33.5±0.177
G5 (3:5)	402.2±6.69*	0.289±0.120	-46.3±0.763
G6 (5:5)	490.9±7.42*	0.067±0.021	-37.1±0.889

\* significant  $p < 0.05$  Analysis of variance, Multiple comparison :Bonferroni



APPENDIX K  
scanning electron microscopy (SEM)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**Figure 10** SEM image of ginger extract NLC

APPENDIX L  
Differential scanning calorimetry (DSC)

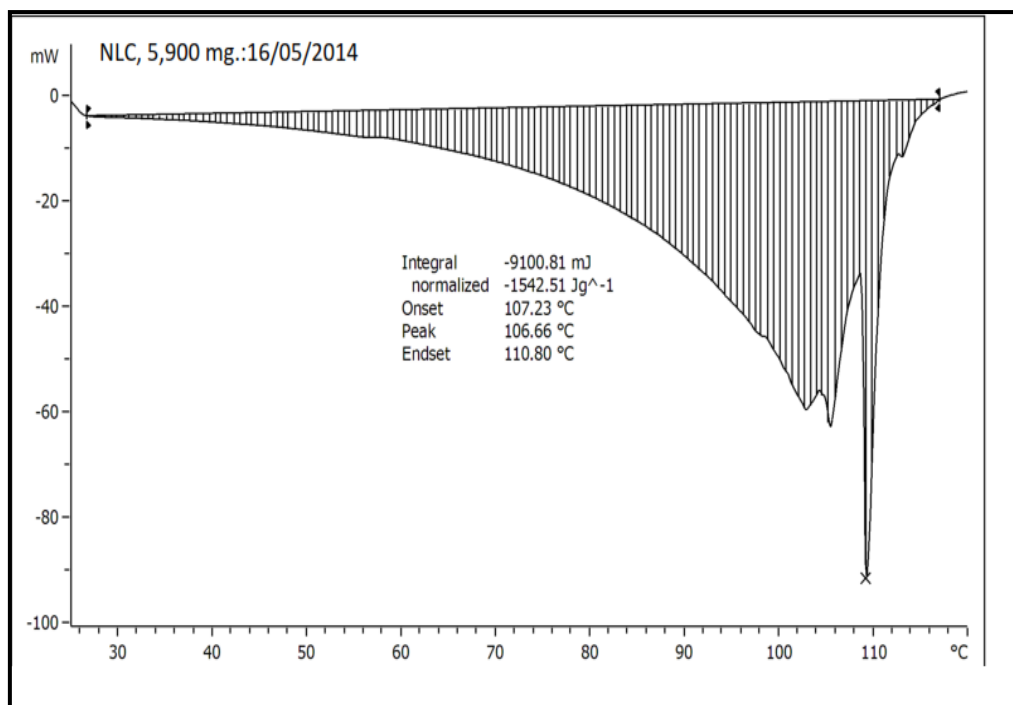


Figure 11 DSC thermogram of ginger extract, tween<sup>®</sup> 80 and hydrogenated lecithin at ratio 5:7:4 respectively

**APPENDIX M**  
**Stability of ginger extract NLC**

**Table 18** Percentage contents of 6-gingerol remaining after 1, 2, 3 and 6 months storage at 4<sup>0</sup>C and 25<sup>0</sup>C

Formulations	% 6- gingerol remaining							
	1 month		2 months		3 months		6 months	
	4 <sup>0</sup> C	25 <sup>0</sup> C	4 <sup>0</sup> C	25 <sup>0</sup> C	4 <sup>0</sup> C	25 <sup>0</sup> C	4 <sup>0</sup> C	25 <sup>0</sup> C
G1	97.8	87.2	96.4	85.1	90.7	80.1	NA	NA
G2	98.2	95.4	97.3	93.4	96.5	88.2	NA	NA
G3	98.6	97.2	97.0	96.1	97.2	93.5	96.2	90.0

**Table 19** Physical stability of ginger extract NLC at various time intervals under

Formulation	HC [3cycle]	Day 0	1 month			3 month			6 month		
			4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
G1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
G2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
G3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

various storage conditions

HC: heating-cooling cycle, +++: stable dispersion, no color changing and no phase separation

ratio (H. lecithin:ween80) G1= (4:3), G2=(4:5), G6=(5:7)

**Table 20** Mean and SD of particle size and polydispersity index (PI) analysis at 1, 3, and 6 months

Formulation	Day 0		1 month			
			4°C		25°C	
	Size (nm)	PI	Size (nm)	PI	Size (nm)	PI
G1	324.1 (3.85)	0.043 (0.044)	334.4 (3.15)	0.053 (0.046)	344.3 (2.35)	0.044 (0.078)
G2	319.7 (1.28)	0.182 (0.072)	339.4 (2.18)	319.7 (1.28)	330.0 (0.152)	0.102 (0.098)
G3	342.8 (6.24)	0.074 (0.022)	332.4 (3.84)	0.088 (0.018)	352.1 (6.24)	0.154 (0.022)



**Table 21** Mean and SD of particle size and polydispersity index (PI) analysis at 1, 3, and 6 months (continued)

Formulation	3 month				6 month			
	4°C		25°C		4°C		25°C	
	Size (nm)	PI	Size (nm)	PI	Size (nm)	PI	Size (nm)	PI
G1	344.3 (2.35)	0.053 (0.046)	344.3 (2.35)	0.123 (0.084)	380.3 (4.11)	0.288 (0.034)	420.5 (3.66)	0.322 (0.08)
G2	350.5 (2.26)	0.093 (0.087)	398.7 (2.98)	0.034 (0.11)	370.5 (3.66)	0.133 (0.087)	388.7 (2.98)	0.234 (0.11)
G3	342.1 (6.24)	0.094 (0.182)	372.1 (3.96)	0.166 (0.082)	363.7 (4.33)	0.150 (0.050)	374.3 (2.11)	0.155 (0.12)



## APPENDIX N

### Validation of analytical method

#### Analysis of 6-gingerol by high performance liquid chromatographic (HPLC) method

Determine of 6-gingerol content in methanol were performance for analysis of 6-gingerol content in ginger extract, formulation, and Franz diffusion cell. HPLC conditions for analysis of ginger extract, formulation, and Franz diffusion cell are summarized in Table 21.

**Table 22** HPLC conditions for analysis of ginger extract, formulation, and Franz diffusion cell

Operating parameters	Condition
Brand	Waters model 2695
Stationary Phase	Phenomenex Luna 5 $\mu$ C18 (150 mm x 4.6 mm)
Mobile phase	Acetonitrile : Water : Methanol (40:50:10) with isocratic elution
Flow rate	1.2 mL/ min
Detector	UV detector at 282nm
Injection volume	10 $\mu$ l

#### Specificity validation

The specificity of analytical method is the ability to measure the analyses accurately and specificity in the presence of other component in the sample. Figure A, B, C, and D showed typical chromatogram of 6- gingerol in 6- gingerol standard, ginger extract solution, ginger extract formulation, and ginger extract in Franz diffusion cell, respectively.

The standard 6- gingerol had retention times at 11.66 sec, whereas all ginger extract, which were ginger extract solution, ginger extract formulation, and ginger extract in Franz diffusion cell showed the non-different retention times at 11.65, 11.67, and 11.67, respectively.

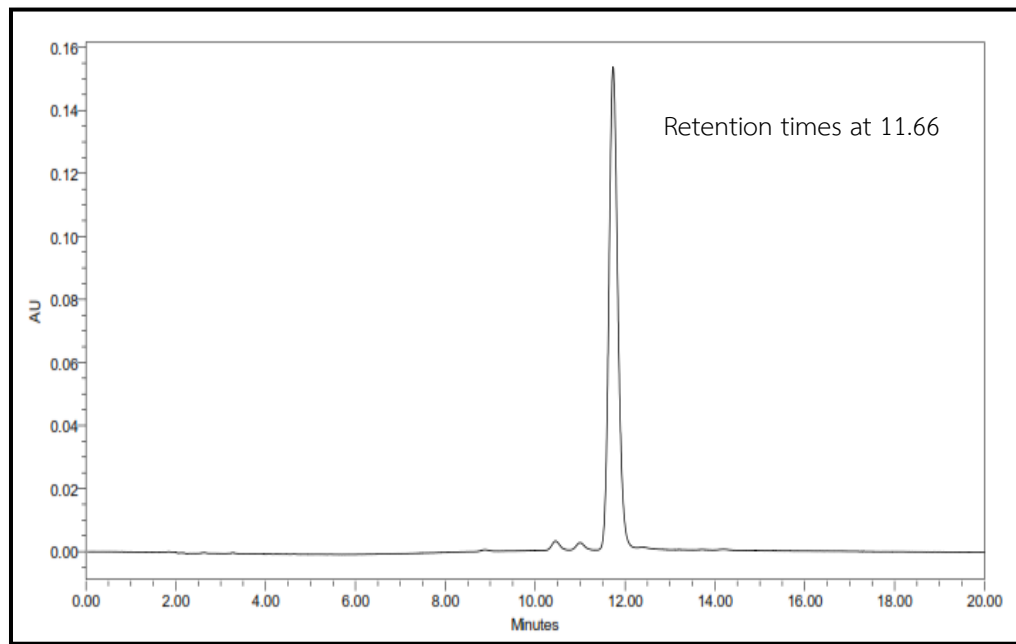


Figure 12 Chromatogram of 6-gingerol standard

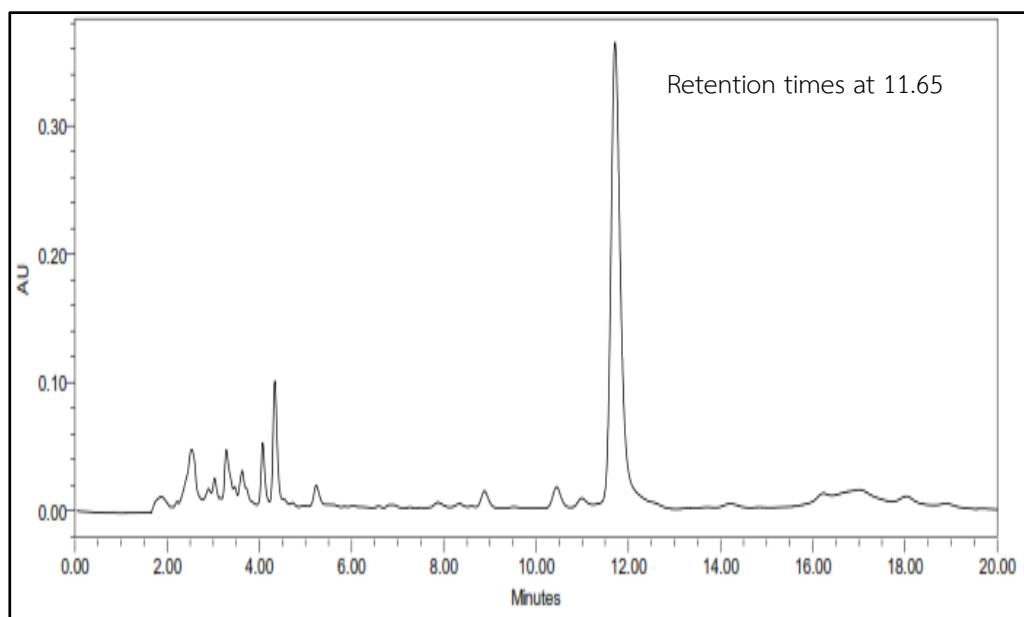


Figure 13 Chromatogram of 6-gingerol in ginger extract

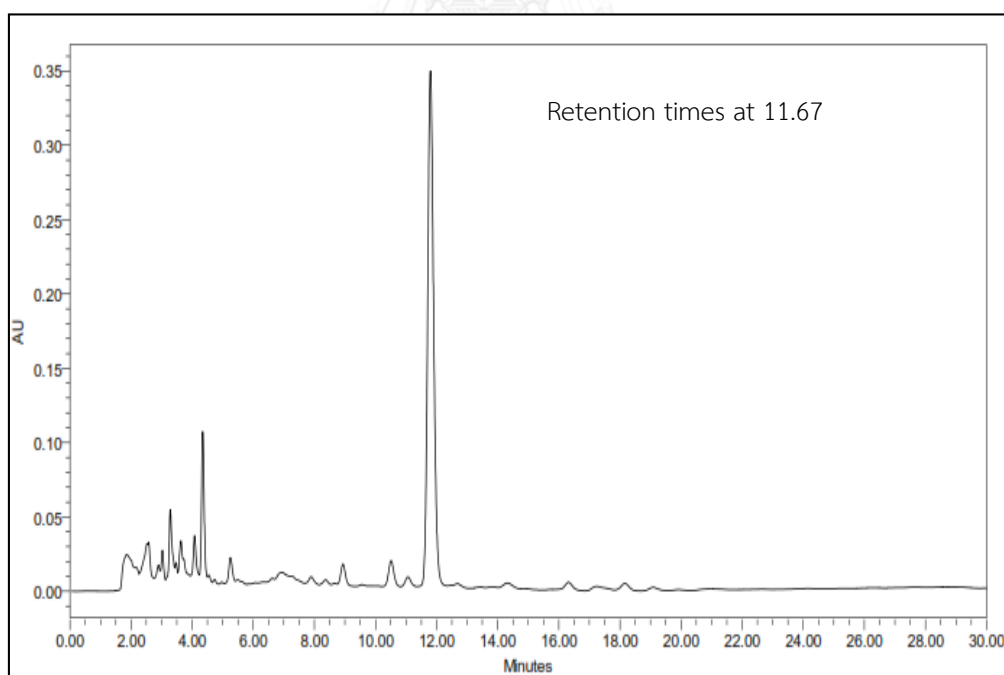
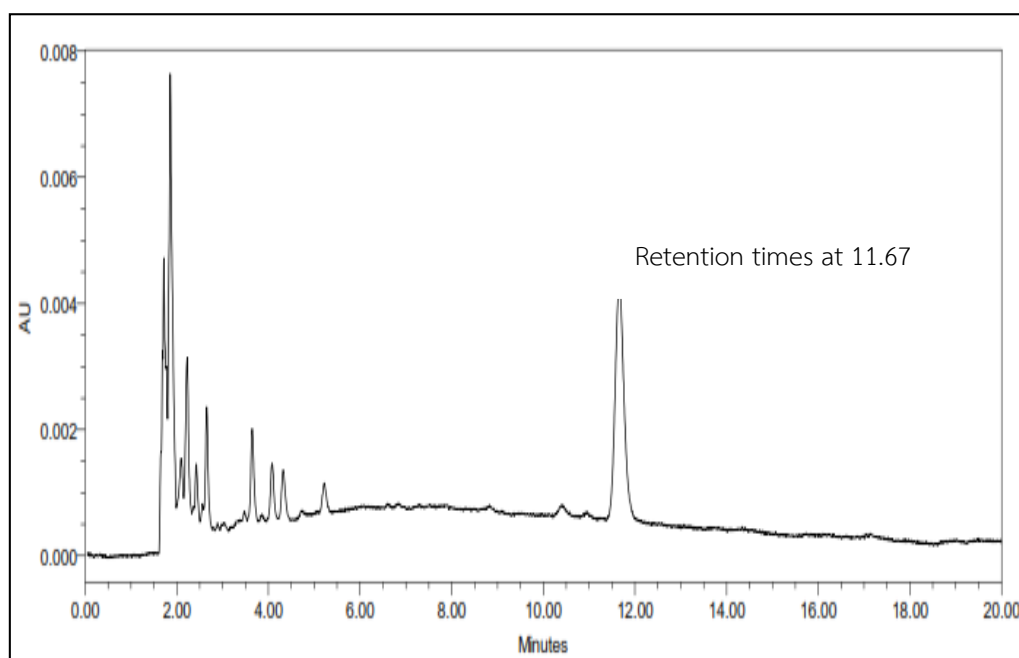


Figure 14 Chromatogram of 6-gingerol in formulation



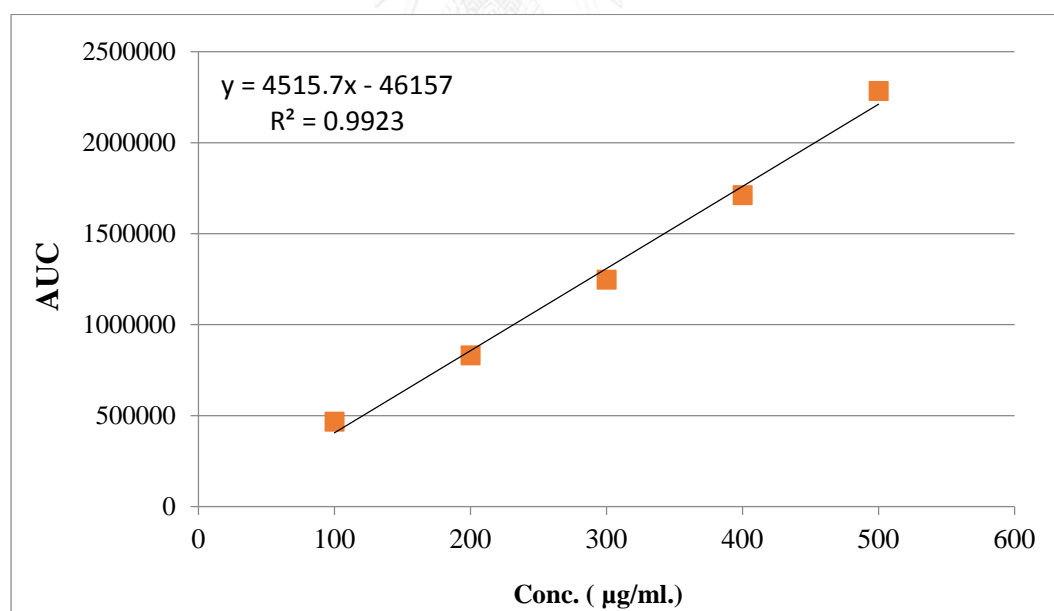
**Figure 15** Chromatogram of 6- gingerol in Franz diffusion cell

### 1. Quantitation parameter

Serial dilutions of standard 6-gingerol (100-500  $\mu\text{g/ml}$ ), 6-gingerol in formulation (1-80  $\mu\text{g/ml}$ ) and (5-25  $\mu\text{g/ml}$ ) were analyzed for study the linearity. Three separate calibration curves of each standard obtained on different days by plotting the peak area versus concentration. The results are showed in Table 22.

**Table 23** Parameters of quantitative evaluation for 6-gingerol

Parameter	6-gingerol in ginger extract	6-gingerol in Formulation	6-gingerol in Franz diffusion cell
Linear range ( $\mu\text{g/ml}$ )	100-500	1-80	5-25
Equation	$Y=4515.7x-46157$	$Y=2882x-1398.8$	$Y=3226.6x+8519$
Linearity ( $r^2$ )	0.9923	0.9988	0.9995
LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	50.667	2.216	0.671
LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	168.891	7.388	2.236

**Figure 16** Calibration curve of standard 6-gingerol range from 100-500  $\mu\text{g/ml}$

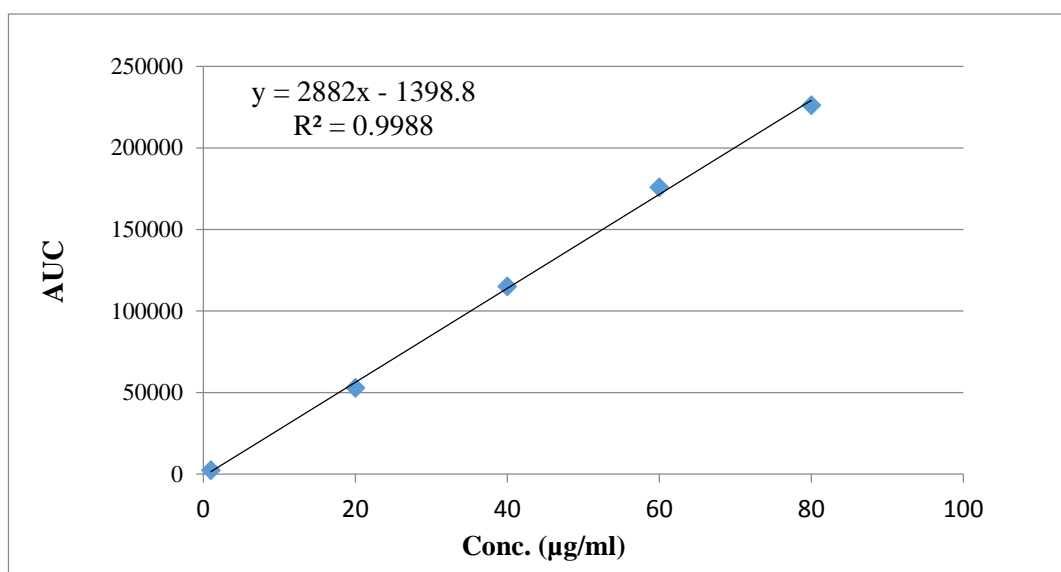


Figure 17 Calibration curve of 6-gingerol in formulation range from 1-80 µg/ml

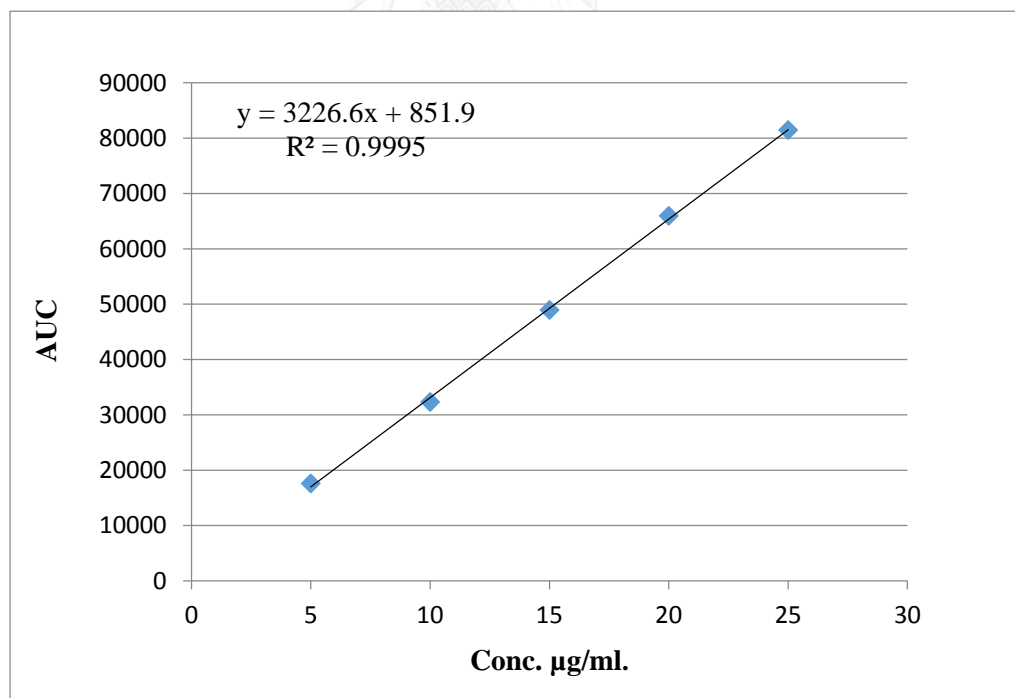


Figure 18 Calibration curve of 6-gingerol in Franz diffusion cell range from 5-25 µg/ml

## 2. Validation of the Precision

Both the intra-and inter-day precisions of the analytical method were studied, which obtained by triplicate analyses in a day and per day over three days, respectively. The results showed in Table 23, 24, 25

**Table 24** Validation of the precision of the analytical method for 6-gingerol in formulation

Actual conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Intra-day <sup>a</sup> (n=3)		Inter-day <sup>b</sup> (n=9)	
	Measured concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	CV (%)	Measured concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	<sup>c</sup> CV (%)
5	5.07±0.019	0.37	5.05±0.006	0.12
15	14.80±0.038	0.26	15.82±0.042	0.26
25	25.21±0.088	0.35	25.73±0.063	0.24

<sup>a</sup>All values are mean±SD as obtained by triplicate analyses in day. <sup>b</sup>All values are mean±SD, obtained by triplicate analyses per day over 3 days. <sup>c</sup>Coefficient of variation=SD/meanX100%

**Table 25** Validation of the precision of the analytical method for 6-gingerol in Franz diffusion cell

Actual conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Intra-day <sup>a</sup> (n=3)		Inter-day <sup>b</sup> (n=9)	
	Measured concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	CV (%)	Measured concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	<sup>c</sup> CV (%)
10	10.75±0.026	0.24	10.81±0.042	0.38
20	21.28±0.057	0.26	20.46±0.059	0.28
40	40.26±0.066	0.16	38.73±0.168	0.43

<sup>a</sup>All values are mean±SD as obtained by triplicate analyses in day. <sup>b</sup>All values are mean±SD, obtained by triplicate analyses per day over 3 days. <sup>c</sup>Coefficient of variation=SD/meanX100%



**Table 26** Validation of the precision of the analytical method for 6-gingerol in ginger extract

Actual conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Intra-day <sup>a</sup> (n=3)		Inter-day <sup>a</sup> (n=9)	
	Measured		Measured	
	concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	CV (%)	concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	CV (%)
100	119.29 $\pm$ 0.85	0.71	101.71 $\pm$ 0.35	0.34
200	213.35 $\pm$ 0.22	0.10	198.51 $\pm$ 0.58	0.29
400	362.34 $\pm$ 0.98	0.27	389.46 $\pm$ 0.32	0.08

<sup>a</sup>All values are mean $\pm$ SD as obtained by triplicate analyses in day. <sup>b</sup>All values are mean $\pm$ SD, obtained by triplicate analyses per day over 3 days. <sup>c</sup>Coefficient of variation=SD/mean $\times$ 100%

### 3. Validation of the accuracy

The accuracy of the method was determined by investigating the recovery of samples of spiking standard 6-gingerol in formulate, Franz diffusion cell, and ginger extract and comparing the measured value to the true, which recoveries closed up to 100% indicating a good accuracy of this method obtained. The results showed Table 26, 27, and 28, respectively.

**Table 27** Validation of the accuracy of the analytical method for 6-gingerol in formulation

Spiked level ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%) <sup>a</sup>			Mean (%)	CV (%) <sup>b</sup>
	Day1	Day 2	Day 3		
5	101.45 $\pm$ 0.37	101.34 $\pm$ 0.25	100.09 $\pm$ 0.14	100.96	0.25
15	98.68 $\pm$ 0.25	101.70 $\pm$ 0.45	102.65 $\pm$ 0.14	101.01	0.35
25	100.84 $\pm$ 0.35	99.38 $\pm$ 0.37	100.52 $\pm$ 0.13	100.25	0.28

<sup>a</sup> All values are mean $\pm$ SD as obtained by triplicate analyses.

<sup>b</sup> Coefficient of variation = SD/mean  $\times$  100%

**Table 28** Validation of the accuracy of the analytical method for 6-gingerol in Franz diffusion cell

Spiked level ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%) <sup>a</sup>			Mean (%)	CV (%) <sup>b</sup>
	Day1	Day 2	Day 3		
10	101.8 $\pm$ 0.05	107.5 $\pm$ 0.12	103.53 $\pm$ 0.12	104.28	0.29
20	103.6 $\pm$ 0.02	106.40 $\pm$ 0.03	106.30 $\pm$ 0.03	105.43	0.09
40	94.02 $\pm$ 0.03	100.65 $\pm$ 0.04	98.98 $\pm$ 0.01	97.88	0.49

<sup>a</sup> All values are mean $\pm$ SD as obtained by triplicate analyses.

<sup>b</sup> Coefficient of variation = SD/mean  $\times$  100%

**Table 29** Validation of the accuracy of the analytical method for 6-gingerol in ginger extract

Spiked level (µg/ml)	Recovery (%) <sup>a</sup>			Mean (%)	CV (%) <sup>b</sup>
	Day1	Day 2	Day 3		
100	101.08±0.97	95.38±0.62	103±1.72	99.82	1.10
200	99.26±0.61	96.32±0.28	101.05±1.32	98.88	0.73
400	96.59±0.25	96.96±0.42	98.60±0.33	97.38	0.34

<sup>a</sup> All values are mean±SD as obtained by triplicate analyses.

<sup>b</sup> Coefficient of variation = SD/mean x 100%



## VITA

Mrs. Punyanut Amorndoljal was born on December 13, 1967 in Nonthaburi, Thailand. In 1989, she graduated with Apply Thai Traditional Medicine (ATTM) degree from the Ayurved Vidyalai (Jivox Komarbhacc), Bangkok, Thailand. In 2004, she received her Master of Sciences in School of Applied Statistics, Program in Population and Development, National Institute of Development Administration (NIDA), Thailand. In 2011, she graduated Master of Sciences in Apply Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Thailand.

