

บทบาทของเอนไซม์เอสเทอร์สในพลาสติกต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของ  
เคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทในพลาสติกของมนุษย์

นายนั้นนัช	เอี่ยมหิรัญไกรลาศ	5536544033
นางสาวพรจิต	คงสุผล	5536556533

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาการค้นพบและพัฒนาายา  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

THE ROLE OF PLASMA ESTERASES ON METABOLISM OF  
CURCUMIN DIETHYL DISUCCINATE IN HUMAN PLASMA

Mr. Nantanat Aeimhirunkailas 5536544033  
Ms. Ponjit Kongsupon 5536556533

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

2016

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

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

หัวข้อโครงการปริญญาโท บทบาทของเอนไซม์เอสเทอร์ในพลาสมาต่อกระบวนการ  
เมทาบอลิซึมของคอรัลควินไดเอทิลไดซ์ซิเนทในพลาสมาของ  
มนุษย์

นิสิตผู้ดำเนินโครงการ นายนันทนซ์ เอี่ยมหิรัญไกรลาส  
นางสาวพรจิต คงสุผล

สาขาวิชา/ภาควิชา การค้นพบและพัฒนายา/อาหารและเภสัชเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท รองศาสตราจารย์ เกษักร ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์

---

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.รุ่งเพ็ชร สกุลบำรุงศิลป์)

.....ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร)

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

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## คำนำ

โครงการปริญญาโทเรื่อง บทบาทของเอนไซม์เอสเทอร์สในพลาสมาต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของคอรัลควินไดเอทิลไดซัคซิเนทในพลาสมาของมนุษย์ ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2559 ซึ่งจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความคงตัวของคอรัลควินไดเอทิลไดซัคซิเนทในพลาสมาของมนุษย์ โดยคอรัลควินไดเอทิลไดซัคซิเนทเป็นสารอนุพันธ์ของคอรัลควิน ซึ่งมีความคงตัวในพลาสมาของหนูที่สูงกว่าคอรัลควิน แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาความคงตัวในพลาสมาของมนุษย์ คณะผู้จัดทำจึงจัดทำโครงการนี้ขึ้นเพื่อศึกษาความคงตัวโดยการหาค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาและค่าครึ่งชีวิตของคอรัลควินไดเอทิลไดซัคซิเนทในพลาสมาของมนุษย์ ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการวิจัยและพัฒนาสารนี้ให้เป็นยาในอนาคต

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการปริญญาโทฉบับนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจดำเนินงานวิจัยต่อไปในอนาคต

คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

**Abstract**

**Senior project title** : The role of plasma esterases on metabolism of curcumin diethyl disuccinate in human plasma

**Students' name** : Mr. Nantanat Aeimhirunkailas 5536544033  
Miss Ponjit Kongsupon 5536556533

**Advisor/Co-advisor** : Assoc. Prof. Pornchai Rojsitthisak Ph.D.

**Field/Department** : Food and Pharmaceutical Chemistry

Curcumin diethyl disuccinate is a prodrug of curcumin with better stability and anti-cancer activity comparing to curcumin. It releases active parent curcumin in plasma, which is a desired property of prodrug. In pharmacokinetic studies in rats, it had superior tissue distribution in several organs and increased the plasma level of curcumin. Therefore, curcumin diethyl disuccinate has potential for further development as an anticancer agent. An evaluation of plasma metabolism of ester prodrugs is an important part of *in vitro* pharmacokinetic screening in drug development process. Therefore, the aim of this study is to investigate *in vitro* metabolism of curcumin diethyl disuccinate in human plasma. The amounts of remaining in plasma at different time intervals were determined by HPLC and kinetic parameters including hydrolysis rate constant and half-life were subsequently calculated. The results revealed that curcumin diethyl disuccinate can be rapidly metabolized in human plasma with the hydrolysis rate constant and half-life of  $0.1293 \text{ min}^{-1}$  and 5.36 min, respectively. In comparison with previously reported half-life in phosphate buffer pH 7.4 of curcumin diethyl disuccinate at 7.66 h, the degradation of curcumin diethyl disuccinate in human plasma was significantly higher than that in phosphate buffer. The results suggest the involvement of plasma esterases in the hydrolytic process. The information obtained from this study accompanied with other pharmacokinetic studies will be useful for further development of CDD as a drug candidate.

Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University

Student's signature .....

Advisor's signature .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

### บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ : บทบาทของเอนไซม์เอสเทอเรสในพลาสมาต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของ  
เคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทในพลาสมาของมนุษย์

หัวหน้าโครงการ : นายณันทนัช เอี่ยมหิรัญไกรลาศ 5536544033

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวพรจิต คงสุผล 5536556533

อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ เกษชกร ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์

สาขา/ภาควิชา : การค้นพบและพัฒนายา/ อาหารและเภสัชเคมี

เคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทเป็นโปรดรักของเคอร์คิวมินที่มีความคงตัวในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 7.4 และฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งสูงกว่าเคอร์คิวมิน อีกทั้งสามารถปลดปล่อยเคอร์คิวมินในพลาสมาได้ นอกจากนี้ การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของเคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทในหนูแรทแสดงให้เห็นว่าสารนี้สามารถกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ดีและช่วยเพิ่มระดับของเคอร์คิวมินในพลาสมาได้ เคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทจึงมีความน่าสนใจในการนำไปพัฒนาต่อเป็นยา ทั้งนี้ การศึกษาเมทาบอลิซึมในพลาสมาของสารที่มีหมู่เอสเทอร์นั้นเป็นหัวข้อการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในหลอดทดลองหัวข้อหนึ่งที่มีความจำเป็นสำหรับกระบวนการพัฒนายาใหม่ ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาระบวนการเมทาบอลิซึมเคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทในพลาสมาของมนุษย์ ซึ่งทำได้โดยวิเคราะห์หาปริมาณของเคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทที่เหลืออยู่หลังจากบ่มในพลาสมาของมนุษย์ ณ เวลาต่างๆกัน ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) จากนั้น คำนวณหาค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาและค่าครึ่งชีวิตของเคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทในพลาสมา ผลการศึกษาพบว่า เคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในพลาสมาของมนุษย์ได้อย่างรวดเร็วโดยมีค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ  $0.1293 \text{ นาที}^{-1}$  และค่าครึ่งชีวิตในพลาสมาเท่ากับ 5.36 นาที โดยเคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทสลายตัวในพลาสมาได้ไวกว่าในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 7.4 ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานค่าครึ่งชีวิตที่ 7.66 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ในพลาสมาซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์เอสเทอเรสมีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของเคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนท โดยข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ร่วมกับข้อมูลจากการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์อื่นๆจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเคอร์คิวมินไดเอทิลไดซัคซิเนทเป็นยาต่อไป

คณะเภสัชศาสตร์ .....  
ลายมือชื่อนิสิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษารองศาสตราจารย์ เกษัชกร ดร.พรชัย โรจนสีทิตีศักดิ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณนายปวีณวิษฐ์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต นายชวัลพัชร เมืองน้อย และนางสาวพรสิริ จิตรรชเวช ที่ช่วยให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในเรื่องของการเตรียมอุปกรณ์และการใช้เครื่องมือในการทำปริญญานิพนธ์นี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในภาควิชาอาหารและเภสัชเคมีที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำโครงการนี้



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## สารบัญ

	หน้า
คำนำ.....	ก
บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์ ภาษาอังกฤษ.....	ข
บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์ ภาษาไทย.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการศึกษา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	3
2.1 Curcumin.....	3
2.2 Curcumin diethyl disuccinate.....	6
บทที่ 3 เครื่องมือที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัย.....	8
3.1 สารเคมี.....	8
3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ.....	8
3.3 การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	9
3.3.1 การเตรียมสารละลาย curcumin.....	9
3.3.2 การเตรียมสารละลาย dimethylcurcumin.....	9
3.3.3 การเตรียมสารละลาย curcumin diethyl disuccinate.....	9
3.3.4 การเตรียมสารละลายกรดฟอร์มิก 0.2%.....	10
3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	11
3.4.1 การทดสอบ system suitability.....	11
3.4.2 การสร้าง calibration curve ของ curcumin diethyl disuccinate.....	11

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.3 การทดลองศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมามนุษย์.....	12
3.5 การคำนวณค่าครึ่งชีวิต.....	14
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย.....	15
4.1 ผลการทดลอง.....	15
4.1.1 ผลการทดสอบ system suitability.....	15
4.1.2 ผลการสร้าง calibration curve ของ curcumin diethyl disuccinate.....	15
4.1.3 ผลการศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมามนุษย์.....	16
4.1.4 ผลการคำนวณค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาและค่าครึ่งชีวิต.....	18
4.2 อภิปรายผลการทดลอง.....	19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	23
เอกสารอ้างอิง.....	24
ภาคผนวก.....	27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## สารบัญญัตราง

ตารางที่	หน้า
1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin diethyl disuccinate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ..	10
2. ค่าเฉลี่ยและ %CV ของค่า retention time, peak area และ tailing factor ของสาร curcumin, dimethylcurcumin และ curcumin diethyl disuccinate ในการทดสอบ system suitability.....	15
3. ความเข้มข้นของสารละลาย curcumin diethyl disuccinate ที่ใช้ในการสร้าง calibration curve.....	27
4. peak area ของ curcumin diethyl disuccinate และ dimethylcurcumin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และอัตราส่วน peak area ของสารทั้งสอง.....	28
5. ความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสติกที่เวลาต่าง ๆ ของการทดลองทั้ง 5 ครั้งและค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของแต่ละช่วงเวลา.....	29
6. ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสติกและค่า natural log ของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของแต่ละช่วงเวลา.....	30

  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
 เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างทางเคมีของ curcumin.....	3
2. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ curcumin.....	5
3. การสลายตัวของ curcumin.....	5
4. โครงสร้างของ curcumin diethyl disuccinate.....	6
5. Calibration curve ของ curcumin diethyl disuccinate.....	16
6. HPLC chromatogram ของการศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมามนุษย์ที่เวลา 0, 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที.....	16
7. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมา และเวลาในช่วง 0 - 20 นาที.....	18
8. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า natural log ของความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาและเวลาในช่วง 0 - 20 นาที.....	18
9. โครงสร้างของ (A) curcumin diethyl disuccinate, (B) curcumin และ (C) สาร intermediate ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจากกระบวนการ metabolism ในพลาสมา.....	21

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการศึกษา

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) เป็นสมุนไพรที่ถูกใช้มาเป็นเวลานานกว่า 4,000 ปี โดยถูกใช้เป็นเครื่องเทศในอาหาร เครื่องสำอาง และยา ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากพบว่า ขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ ต้านเซลล์มะเร็ง รักษาการติดเชื้อ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร และมีฤทธิ์ปกป้องตับ<sup>(1-6)</sup> โดยฤทธิ์ดังกล่าวเป็นผลมาจากสารสำคัญกลุ่ม curcuminoids โดยมี curcumin เป็นสารออกฤทธิ์หลัก curcumin เป็นสารที่มีความปลอดภัยสูงและไม่พบความเป็นพิษเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน<sup>(7)</sup> อย่างไรก็ตาม curcumin มีข้อจำกัดในการพัฒนาเป็นยาเพราะมีค่าการละลายและความคงตัวต่ำ โดยสามารถสลายตัวได้ด้วยปฏิกิริยา hydrolysis และ oxidation จึงไม่คงตัวภายใต้สภาวะที่มีแสง ความชื้น และออกซิเจน นอกจากนี้ curcumin ยังสลายตัวได้ง่ายในภาวะที่เป็นด่างจึงทำให้มีค่า bioavailability ต่ำเมื่อรับประทาน เนื่องจาก curcumin สลายตัวในสภาวะต่างของลำไส้ สารส่วนใหญ่จึงถูกทำลายในทางเดินอาหาร curcumin จึงถูกดูดซึมได้น้อยและถูกกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว<sup>(8-12)</sup> โดยคาดว่าสาเหตุของการสลายตัวของ curcumin มาจากแตกตัวของหมู่ phenolic ภายในโครงสร้าง<sup>(13)</sup>

มีงานวิจัยจำนวนมากศึกษาเกี่ยวกับวิธีในการเพิ่มค่า bioavailability ของ curcumin โดยหนึ่งในวิธีเหล่านั้นคือการทำให้ curcumin ให้อยู่ในรูป prodrug ซึ่งมีข้อดีคือทำให้ curcumin มีความคงตัว ละลายน้ำได้ดีขึ้น และเป็นการป้องกันหมู่ phenolic ทั้งสองหมู่ของ curcumin<sup>(14, 15)</sup> โดย prodrug ของ curcumin ตัวหนึ่งที่น่าสนใจคือ curcumin diethyl disuccinate ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยเชื่อมสาร curcumin ต่อกับ succinic acid ethyl ester ด้วยพันธะ ester จากการศึกษาพบว่า curcumin diethyl disuccinate มีความคงตัวต่อการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis มากกว่า โดย curcumin diethyl disuccinate จะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ในพลาสมาของมนุษย์ได้ curcumin ออกมา<sup>(16)</sup> ซึ่งเป็นคุณสมบัติของยาชนิด prodrug ที่สำคัญ สาร curcumin diethyl disuccinate จึงมีความน่าสนใจในการนำไปพัฒนาต่อเป็นยา โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ในด้านการดูดซึมและการกระจายตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในหนู<sup>(17)</sup> นอกจากนี้ยังมี

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

**เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

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

การศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการ metabolism ของสารดังกล่าวในพลาสมาของหนู<sup>(18)</sup> แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของสารดังกล่าวในพลาสมาของมนุษย์มาก่อน

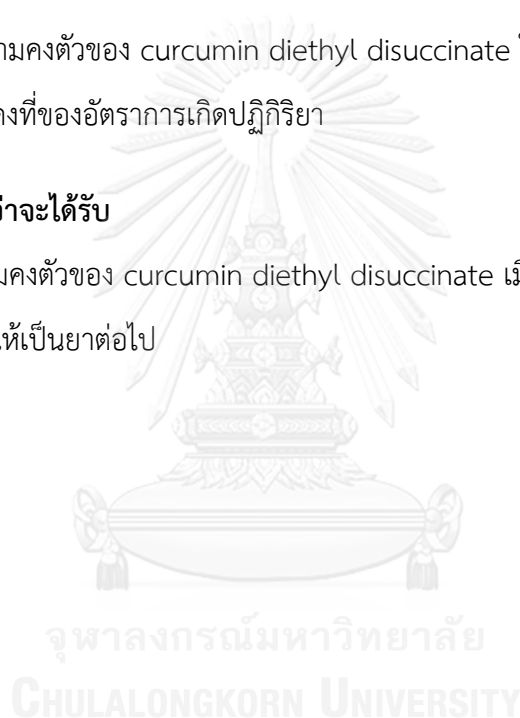
คณะผู้จัดทำจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในภายในพลาสมาของมนุษย์ โดยในการศึกษานี้จะหาค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา และค่าครึ่งชีวิตของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมา โดยอาศัยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาของมนุษย์โดยการหาค่าครึ่งชีวิตและค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate เมื่ออยู่ในพลาสมาของมนุษย์เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาให้เป็นยาต่อไป



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

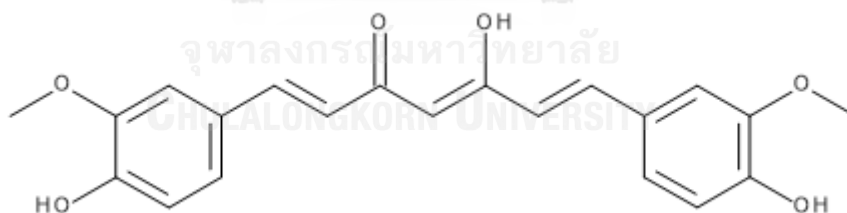
## บทที่ 2

### ปริทรรศน์วรรณกรรม

#### 2.1 Curcumin

ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่โบราณ โดยเชื่อว่ามีฤทธิ์เพิ่มความอยากอาหาร ฟอกเลือด บำรุงร่างกาย รักษาโรคผิวหนัง โรคที่เกี่ยวข้องข้องอาการปวดท้องและดีซ่าน เป็นต้น ซึ่งส่วนเหง้าของขมิ้นชันเป็นส่วนที่มีสารออกฤทธิ์ในการรักษา โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนของน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีสารจำพวก sesquiterpene ketone และ alcohol และส่วนที่ไม่ใช่น้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารในกลุ่ม curcuminoid โดยมี curcumin เป็นองค์ประกอบหลัก<sup>(19, 20)</sup>

Curcumin มีชื่อ IUPAC คือ (1E,6E)-1,7-bis (4 - hydroxy - 3 - methoxyphenyl) - 1,6 -heptadiene-3,5-dione โดยมีโครงสร้างเป็นหมู่ methoxyphenyl 2 หมู่เชื่อมต่อกันด้วยสาย hydrocarbon ที่มีหมู่ ketone 2 หมู่ ดังแสดงในรูปภาพที่ 1 curcumin มีค่า logP ประมาณ 3.0 ซึ่งบ่งบอกว่าเป็นสารที่ละลายในน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่น DMSO, methanol, ethanol, acetonitrile, chloroform และ ethyl acetate เป็นต้น และละลายได้น้อยในตัวทำละลาย hydrocarbon เช่น cyclohexane และ hexane เป็นต้น<sup>(21)</sup>



รูปภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ curcumin

มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร curcumin เป็นจำนวนมาก โดยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญได้แก่

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

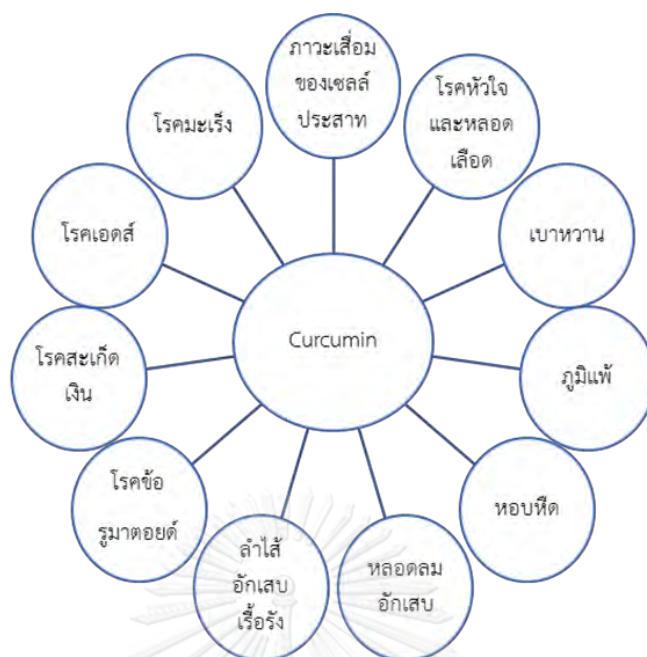
- **ฤทธิ์ต้านการอักเสบ:** จากการศึกษาในมนุษย์ พบว่า curcumin สามารถยับยั้งการทำงานของสารที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบภายในร่างกาย และสามารถต้านการอักเสบที่เกิดจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น การอักเสบในผู้ป่วยโรคเอดส์ การอักเสบหลังการผ่าตัด เป็นต้น<sup>(22)</sup>
- **ฤทธิ์ต้านมะเร็ง:** มีการศึกษา *in vitro* และ *in vivo* พบว่า curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม และมะเร็งทางเดินอาหาร เป็นต้น รวมถึงมีศึกษาในมนุษย์พบว่า curcumin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งในผู้ป่วยโรค familial adenomatous polyposis มะเร็งตับอ่อน และ multiple myeloma<sup>(23)</sup>
- **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ:** จากการศึกษา *in vitro* พบว่า curcumin และสารอนุพันธ์ของ curcumin มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า alpha-tocopherol และเทียบเท่ากับวิตามินเอ ซีและอี<sup>(24)</sup>

นอกจากนี้ curcumin มีฤทธิ์ในการรักษาโรคเรื้อรังอื่น ๆ ดังรูปภาพที่ 2

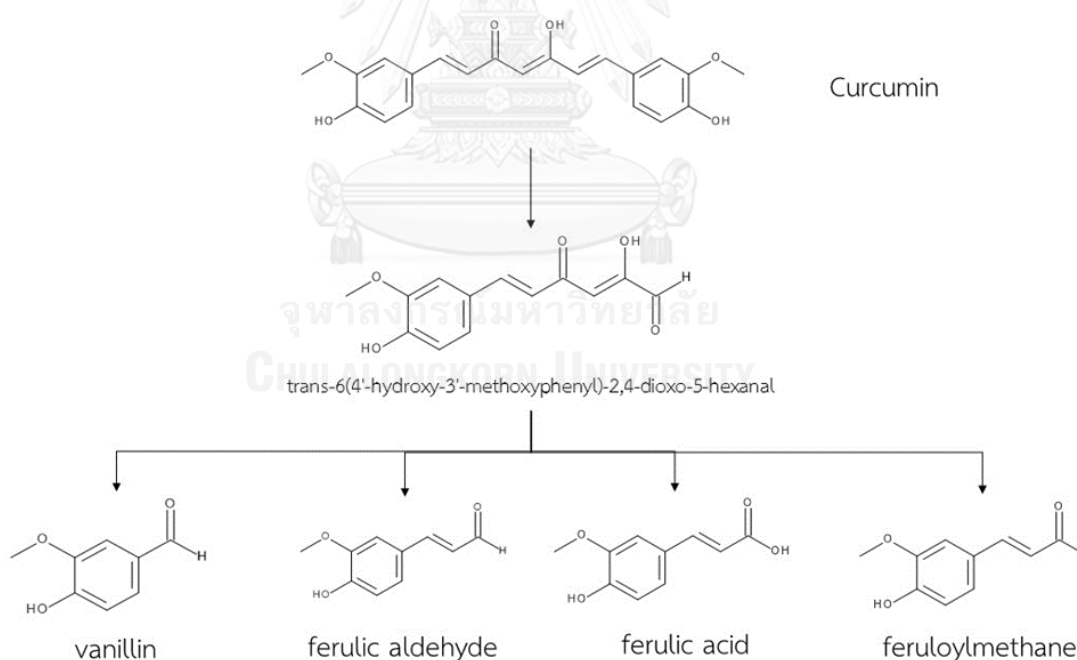
ด้วยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ curcumin จึงเป็นสารที่มีความน่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นยา แต่เนื่องจาก curcumin เป็นสารที่ละลายตัวได้ง่ายเมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นต่าง จึงนำมาพัฒนาเป็นยาได้ยาก โดย 90% ของ curcumin ที่ละลายในสารละลายต่างจะสลายตัวภายใน 30 นาที นอกจากนี้ยังสลายตัวเมื่อสัมผัสกับแสงแดด โดยการสลายตัวมักเกิดในส่วนของสาย hydrocarbon เกิดเป็น trans-6(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal ซึ่งเกิดการสลายตัวต่อไป ได้เป็น ferulic aldehyde, ferulic acid, feruloylmethane และ vanillin<sup>(21)</sup> กระบวนการสลายตัวของ curcumin เกิดขึ้นดังรูปภาพที่ 3

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปภาพที่ 2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ curcumin



รูปภาพที่ 3 การสลายตัวของ curcumin

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

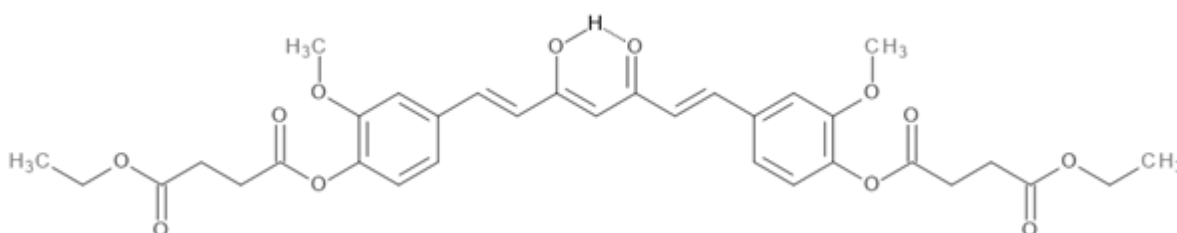
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



นอกจากความไม่คงตัวเมื่ออยู่ในสารละลายต่างแล้ว curcumin ยังมีค่า bioavailability ที่ต่ำอันเนื่องมาจากถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการ metabolism ในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว จากการศึกษาที่ให้อาสาสมัครรับประทาน curcumin ขนาด 2 g ระยะเวลาห่าง พบว่า 1 ชั่วโมงหลังรับประทาน อาสาสมัครมีปริมาณ curcumin ในเลือดต่ำกว่า 10 ng/mL<sup>(25)</sup> และพบ metabolite ที่มาจากกระบวนการ metabolism หลัก 2 กระบวนการคือ กระบวนการ O-conjugation ได้ผลิตภัณฑ์เป็น curcumin glucuronide และ curcumin sulfate และกระบวนการที่ 2 คือ กระบวนการ reduction ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น tetrahydrocurcumin, hexahydrocurcumin และ octahydrocurcumin นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ metabolism อื่น ๆ เช่น dihydrocurcumin glucuronide, tetrahydrocurcumin glucuronide, ferulic acid และ dihydroferulic acid เป็นต้น<sup>(21)</sup>

## 2.2 Curcumin diethyl disuccinate

Curcumin diethyl disuccinate (รูปภาพที่ 4) เกิดจากการนำ curcumin มาทำปฏิกิริยา esterification กับ ethyl succinyl chloride ได้เป็น prodrug ของ curcumin ซึ่งมีความคงตัวในสารละลาย phosphate buffer (pH 7.4) สูงกว่า curcumin สามารถถูกเปลี่ยนแปลงกลับเป็น curcumin ได้ในพลาสมา และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มากกว่า curcumin (colorectal adenocarcinoma cell) มากกว่า curcumin โดยค่า IC<sub>50</sub> ของ curcumin diethyl disuccinate และ curcumin เท่ากับ  $1.84 \pm 0.11$  และ  $3.31 \pm 0.16$   $\mu\text{M}$  ตามลำดับ<sup>(16)</sup> จากงานวิจัยของ Wongsrisakul et al พบว่า curcumin diethyl disuccinate มีฤทธิ์ลดปวด (antinociceptive) ในหนู mice เมื่อให้ในขนาด 20 – 80 mg/kg โดยการรับประทาน<sup>(26)</sup>



รูปภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของ curcumin diethyl disuccinate

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

นอกจากนี้ Bangphumi et al ได้ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ curcumin diethyl disuccinate ในหนู rat พบว่า เมื่อฉีด curcumin diethyl disuccinate ให้ทางหลอดเลือดดำ สารจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็น curcumin และมีค่าความเข้มข้น curcumin ในพลาสมาสูงสุด 676  $\mu\text{g/L}$  ที่เวลา 5 นาที หลังจากนั้นปริมาณของ curcumin ในพลาสมาจะลดลงในช่วง 30 นาที แล้วค่อย ๆ มีปริมาณสูงขึ้นจนถึงระดับความเข้มข้นในพลาสมาสูงสุดครั้งที่ 2 ที่เวลา 2 ชั่วโมง รวมถึงพบว่า curcumin diethyl disuccinate สามารถกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อและสะสมในสมอง หัวใจ ลำไส้ ม้าม ไต และตับ ได้มากกว่า และมีค่า volume of distribution สูงกว่า curcumin ถึง 2 เท่า<sup>(17, 18)</sup>



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

### บทที่ 3

## เครื่องมือที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 สารเคมี

- 1) Curcumin, purity 98.0% (MW 368.39 g/mol)
- 2) Curcumin diethyl disuccinate, purity 98.0% (MW 624.60 g/mol)
- 3) Dimethylcurcumin, purity 99.6% (MW 396.40 g/mol)
- 4) Acetonitrile (Burdick & Jackson<sup>®</sup>, HPLC grade)
- 5) Formic acid (Emsure<sup>®</sup>)
- 6) Ultrapure water
- 7) พลาสมามนุษย์ จากสภาอากาศไทย

### 3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) Analytical balance (Mettler Toledo, AG245)
- 2) เครื่อง HPLC (Shimadzu<sup>™</sup> SCL – 10AD)
- 3) คอลัมน์ Inertsil<sup>®</sup> ODS-3 (4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m)
- 4) Volumetric flask ขนาด 5, 10, 25, 50 และ 100 mL
- 5) Automatic pipette ปริมาตร 1 – 10  $\mu$ L, 20 – 200  $\mu$ L และ 100 – 1,000  $\mu$ L
- 6) Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL (Eppendorf<sup>®</sup>)
- 7) Heating Block
- 8) นาฬิกาจับเวลา
- 9) เครื่อง centrifuge
- 10) vortex mixer

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

### 3.3 การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

#### 3.3.1 การเตรียมสารละลาย curcumin

- 1) ชั่ง curcumin 0.010 g ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10.00 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 10.00 mL จะได้สารละลาย curcumin ความเข้มข้น 1.0 mg/mL หรือ 2,700  $\mu\text{M}$
- 2) ปิเปตสารละลายในข้อ 1) มา 1.000 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10.00 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 10.00 mL จะได้สารละลาย curcumin ความเข้มข้น 270  $\mu\text{M}$
- 3) ปิเปตสารละลายในข้อ 2) มา 0.560 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 5.00 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 5.00 มิลลิลิตร จะได้ curcumin stock solution ความเข้มข้น 30  $\mu\text{M}$

#### 3.3.2 การเตรียมสารละลาย dimethylcurcumin

- 1) ชั่ง dimethylcurcumin 0.010 g ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25.00 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 25.00 mL จะได้สารละลาย dimethylcurcumin ความเข้มข้น 0.40 mg/mL หรือ 1,000  $\mu\text{M}$
- 2) ปิเปตสารละลายในข้อ 1) มา 1.000 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50.00 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 50.00 mL จะได้สารละลาย dimethylcurcumin ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$
- 3) ปิเปตสารละลายในข้อ 2) มา 0.300 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10.00 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 10.00 mL จะได้ dimethylcurcumin stock solution ความเข้มข้น 0.6  $\mu\text{M}$

#### 3.3.3 การเตรียมสารละลาย curcumin diethyl disuccinate

- 1) ชั่ง curcumin diethyl disuccinate 0.010 g ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25.00 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 25.00 mL จะได้สารละลาย curcumin diethyl disuccinate ก. (สารละลาย CDD ก.) ความเข้มข้น 0.40 mg/mL หรือ 627.6  $\mu\text{M}$

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

- 2) ปิเปตสารละลายในข้อ 1) มา 1.000 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 5.00 mL ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 5.00 mL จะได้สารละลาย curcumin diethyl disuccinate ข. (สารละลาย CDD ข.) ความเข้มข้น 125.5  $\mu\text{M}$
- 3) นำสารละลาย CDD ก. และ ข. มาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นดังตารางที่ 1

### 3.3.4 การเตรียมสารละลายกรดฟอร์มิก 0.2%

ตวง formic acid ปริมาตร 2 mL เจือจางด้วย ultrapure water และปรับปริมาตรจนครบ 1,000 mL

ตารางที่ 1 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin diethyl disuccinate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายเริ่มต้น	ความเข้มข้นเริ่มต้น ( $\mu\text{M}$ )	ปริมาตรเริ่มต้น (mL)	ปริมาตรสุดท้าย (mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย ( $\mu\text{M}$ )	ชื่อสารละลาย
สารละลาย CDD ก.	627.6	0.637	10.00	40.0	CDD standard A
	627.6	0.558	10.00	35.0	CDD standard B
	627.6	0.478	10.00	30.0	CDD standard C
	627.6	0.398	10.00	25.0	CDD standard D
	627.6	0.319	10.00	20.0	CDD standard E
	627.6	0.239	10.00	15.0	CDD standard F
สารละลาย CDD ข.	125.5	0.797	10.00	10.0	CDD standard G
	125.5	0.398	10.00	5.00	CDD standard H
	125.5	0.159	10.00	2.00	CDD standard I

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

### 3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยมีการตั้งค่าระบบของเครื่อง HPLC ดังนี้

Mobile phase:	acetonitrile	อัตราส่วน 70%
	0.2% formic acid solution	อัตราส่วน 30%
Flow rate:	1.5 mL/min	
Injection volume:	50 $\mu$ L	
Detection:	400 nm	
Run time:	9 min	
อุณหภูมิ:	33 °C	

#### 3.4.1 การทดสอบ system suitability

- 1) ปิเปต curcumin stock solution ความเข้มข้น 30  $\mu$ M ปริมาตร 5.00  $\mu$ L ใส่ลงใน microcentrifuge tube
- 2) ปิเปตสารละลาย CDD standard C ความเข้มข้น 30  $\mu$ M ปริมาตร 5.00  $\mu$ L ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากข้อ 1)
- 3) ปิเปต dimethylcurcumin stock solution ความเข้มข้น 0.6  $\mu$ M ปริมาตร 100  $\mu$ L ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากข้อ 2)
- 4) ปิเปต acetonitrile ปริมาตร 490  $\mu$ L ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากข้อ 3) ผสมสารผ่าน vortex mixer นาน 10 วินาที
- 5) ปิเปตสารผสมในข้อ 4) มา 600  $\mu$ L ใส่ลงใน HPLC vial
- 6) นำสารผสมฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยฉีดซ้ำกัน 5 ครั้ง
- 7) นำผลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์หาค่า %CV ของ retention time และ peak area ของสารทั้งสามชนิด ค่า %CV ที่ได้ ไม่ควรมีค่าเกิน 2%

#### 3.4.2 การสร้าง calibration curve ของ curcumin diethyl disuccinate

- 1) ปิเปตสารละลาย CDD standard A ถึง I มาความเข้มข้นละ 5.00  $\mu$ L แยกใส่ลงใน microcentrifuge tube หลอดละ 1 ความเข้มข้น

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

- 2) ปิเปต dimethylcurcumin stock solution ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากข้อ 1) แต่ละหลอด
- 3) ปิเปต acetonitrile ปริมาตร 400  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากข้อ 2) แต่ละหลอด ผสมสารผ่าน vortex mixer นาน 10 วินาที
- 4) ปิเปตพลาสมาปริมาณ 95  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน microcentrifuge tube แต่ละหลอด ผสมสารผ่าน vortex mixer นาน 10 วินาที จะได้สารผสมที่มีความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ดังตารางที่ 3 ในภาคผนวก
- 5) นำสารผสมไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 4  $^{\circ}\text{C}$  ความเร็วรอบ 4,000 rpm นาน 5 นาที
- 6) ปิเปตส่วน supernatant ของสารผสมแต่ละความเข้มข้นมา 200  $\mu\text{L}$  แยกใส่ลงใน HPLC vial
- 7) นำ supernatant แต่ละความเข้มข้นฉีดเข้าเครื่อง HPLC
- 8) บันทึกค่า peak area ของแต่ละความเข้มข้น
- 9) นำค่าที่ได้มาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate กับอัตราส่วน peak area ของ curcumin diethyl disuccinate และ dimethylcurcumin

### 3.4.3 การทดลองศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมามนุษย์

- 1) แยกวิธีการทดลองเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ช่วงเวลา 0 วินาที

1. ปิเปตสารละลาย CDD standard C ปริมาตร 5.0  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน microcentrifuge tube
2. ปิเปต dimethylcurcumin stock solution ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากข้อ 1.
3. ปิเปต acetonitrile ปริมาตร 400  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน microcentrifuge tube จากข้อ 2. ผสมสารผ่าน vortex mixer นาน 10 วินาที
4. ปิเปตพลาสมา ปริมาตร 95  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน centrifuge tube จากข้อ 3. ผสมสารผ่าน vortex mixer นาน 10 วินาที

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

Time point อื่น ๆ

1. ปิเปตพลาสมาปริมาตร 95  $\mu\text{L}$  ลงใน microcentrifuge tube จำนวน 9 หลอด บ่มพลาสมาใน heating block ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 15 นาที
  2. ปิเปตสารละลาย CDD standard C ปริมาตร 5.0  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน centrifuge tube จากข้อ
    1. แต่ละหลอด ผสมสารผ่าน vortex mixer นาน 10 วินาที นำไปบ่มต่อใน heating block พร้อมจับเวลา
  3. เมื่อครบเวลา 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120 นาทีแล้ว ปิเปต acetonitrile ปริมาตร 400  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน centrifuge tube จากข้อ 2. ผสมสารผ่าน vortex mixer นาน 10 วินาที
  4. ปิเปต dimethylcurcumin stock solution ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ใส่ลงใน centrifuge tube แต่ละหลอด
- 2) นำสารผสมที่ได้จากข้อ 1) ไป centrifuge ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  ความเร็วรอบ 4,000 rpm นาน 5 นาที
  - 3) ปิเปตส่วน supernatant ของสารผสมแต่ละช่วงเวลามา 200  $\mu\text{L}$  แยกใส่ลงใน HPLC vial
  - 4) นำ supernatant แต่ละช่วงเวลาฉีดเข้าเครื่อง HPLC
  - 5) บันทึกค่า peak area ของแต่ละช่วงเวลา
  - 6) นำค่า peak area ที่ได้มาคำนวณเป็นอัตราส่วน peak area ของ curcumin diethyl disuccinate และ dimethylcurcumin
  - 7) นำค่าอัตราส่วน peak area ที่ได้ แปลงเป็นความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาโดยใช้ calibration curve
  - 8) ทำการทดลองข้อ 1) - 7) ทั้งหมด 5 ครั้ง
  - 9) หาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาในแต่ละช่วงเวลา หลังจากนั้นนำค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ได้มาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์เปรียบเทียบกับเวลา

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



### 3.5 การคำนวณค่าครึ่งชีวิต

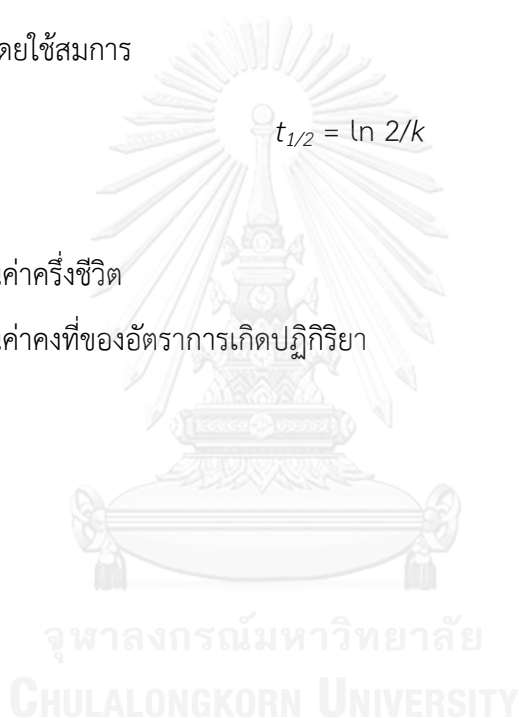
- 1) นำค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ได้ในแต่ละช่วงเวลามาคำนวณตามหลักปฏิกิริยาแบบ pseudo first order reaction โดย
  1. หาค่า natural log ของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นในแต่ละช่วงเวลา
  2. นำค่าที่ได้จากข้อที่ 1. มาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์เปรียบเทียบกับเวลา
  3. หาสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า natural log ของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นกับเวลา โดยค่าคงที่ของ อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าเท่ากับค่าความชันของกราฟ

- 2) หาค่าครึ่งชีวิตโดยใช้สมการ

เมื่อ

$t_{1/2}$  แทนค่าครึ่งชีวิต

$k$  แทนค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## บทที่ 4

### ผลและอภิปรายผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการทดลอง

##### 4.1.1 ผลการทดสอบ system suitability

จากการทดสอบ system suitability พบว่า %CV ของค่า retention time และ peak area ของสารทั้งสามชนิด มีค่าต่ำกว่า 2% แสดงว่าระบบมีความแปรปรวนต่ำ และค่า tailing factor ของ curcumin, dimethylcurcumin และ curcumin diethyl disuccinate มีค่าเท่ากับ 1.02, 0.90 และ 0.91 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แสดงว่า peak ของสารมีความสมมาตร (tailing factor < 2) ระบบดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมต่อการใช้งาน

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยและ %CV ของค่า retention time, peak area และ tailing factor ของสาร curcumin, dimethylcurcumin และ curcumin diethyl disuccinate ในการทดสอบ system suitability

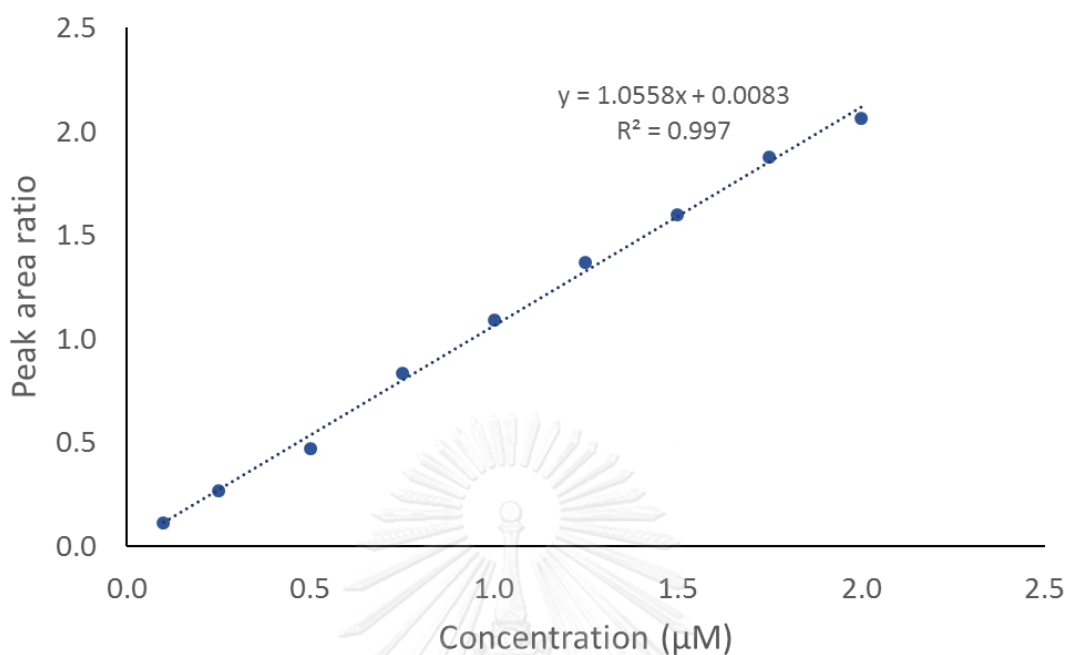
	Curcumin		Dimethylcurcumin		Curcumin diethyl disuccinate	
	ค่าเฉลี่ย	%CV	ค่าเฉลี่ย	%CV	ค่าเฉลี่ย	%CV
Retention time	2.1232	0.0906	4.356	0.2249	7.5124	0.1463
Peak area	14,187	1.3696	7,857	0.8085	15,519	0.729
Tailing factor	1.02	1.55	0.90	1.571	0.91	1.738

##### 4.1.2 ผลการสร้าง calibration curve ของ curcumin diethyl disuccinate

จากผลการสร้าง calibration curve ของ curcumin diethyl disuccinate ที่ความเข้มข้น 0.100 - 2.00  $\mu\text{M}$  พบว่าได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการ  $y = 1.0558x + 0.0083$  และมีค่า  $r^2 = 0.997$  ดังรูปภาพที่ 5

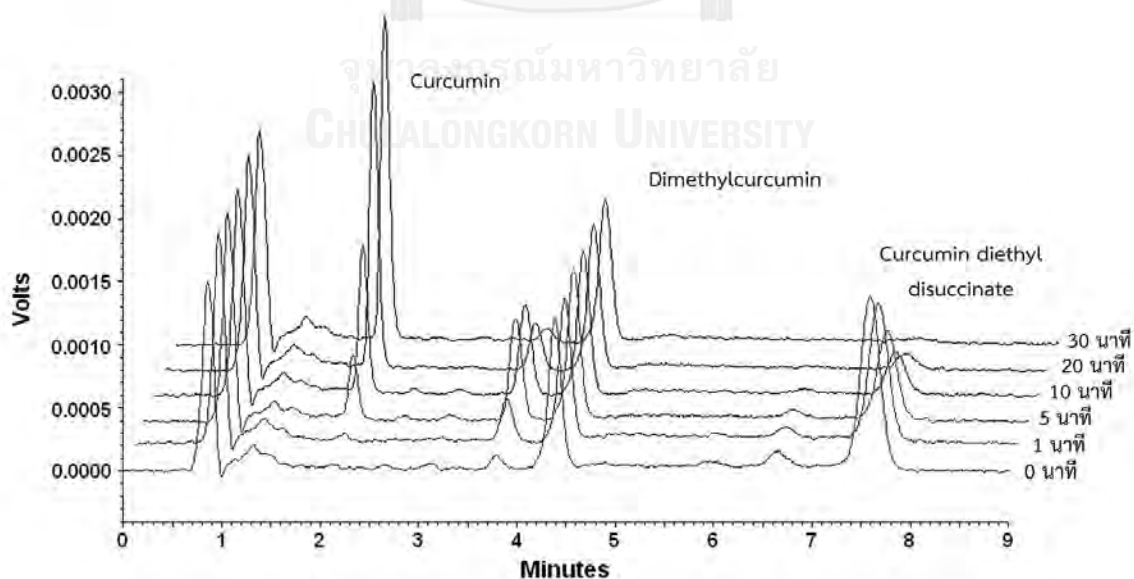
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปภาพที่ 5 Calibration curve ของ curcumin diethyl disuccinate

#### 4.1.3 ผลการศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมามนุษย์



รูปภาพที่ 6 HPLC chromatogram ของการศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate

ในพลาสมามนุษย์ที่เวลา 0, 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

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

จากการศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมามนุษย์พบว่า peak area ของ curcumin diethyl disuccinate มีค่าลดลง เมื่อเวลาผ่านไป และไม่พบ peak ของ curcumin diethyl disuccinate เมื่อเวลา 30 นาทีเป็นต้นไป อย่างไรก็ตามในบางการทดลองพบว่า peak area ของ curcumin diethyl disuccinate ที่เวลา 0.5 นาที มีค่าน้อยกว่าที่เวลา 1 นาที

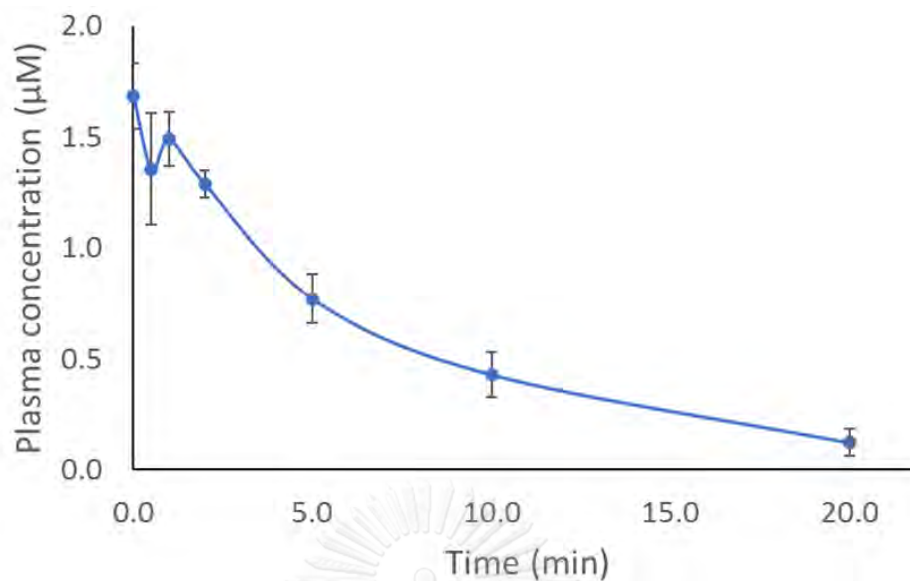
ในการตรวจวัดสาร curcumin ในพลาสมาพบว่า เริ่มตรวจวัดได้เมื่อเวลาบ่มพลาสมานาน 2 นาที และพบว่า peak area ของ curcumin มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่ผ่านไป โดยมีค่ามากที่สุดที่เวลา 60 นาที และมีค่าลดลงเล็กน้อยที่เวลา 120 นาที

นอกจากนี้ ยังพบ peak ของสาร unknown ซึ่งมี retention time ประมาณ 3.8 นาที โดย peak ของสารดังกล่าวเริ่มปรากฏตั้งแต่วันที่ 0 นาที และค่อย ๆ มีขนาดใหญ่ขึ้น มีขนาดใหญ่ที่สุดที่เวลา 5 นาที แล้วมีขนาดเล็กลง จนกระทั่งเวลา 60 นาที จึงไม่พบ peak ดังกล่าวอีกต่อไป

เมื่อนำค่า peak area มาคำนวณเป็นอัตราส่วน peak area ของ curcumin diethyl disuccinate และ dimethylcurcumin แล้วนำค่าดังกล่าวแปลงเป็นความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาโดยใช้ calibration curve จะได้ค่าดังตารางที่ 5 ในภาคผนวก เนื่องจากที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที ตรวจวัดความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ได้ประมาณ 0  $\mu\text{M}$  คณะผู้วิจัยจึงตัดค่าเหล่านี้ทิ้งเพราะค่าที่ได้ต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ calibration curve เมื่อนำค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาในช่วงเวลา 0 - 20 นาทีมาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ที่เหลืออยู่ในพลาสมาและเวลา จะได้กราฟดังรูปภาพที่ 7

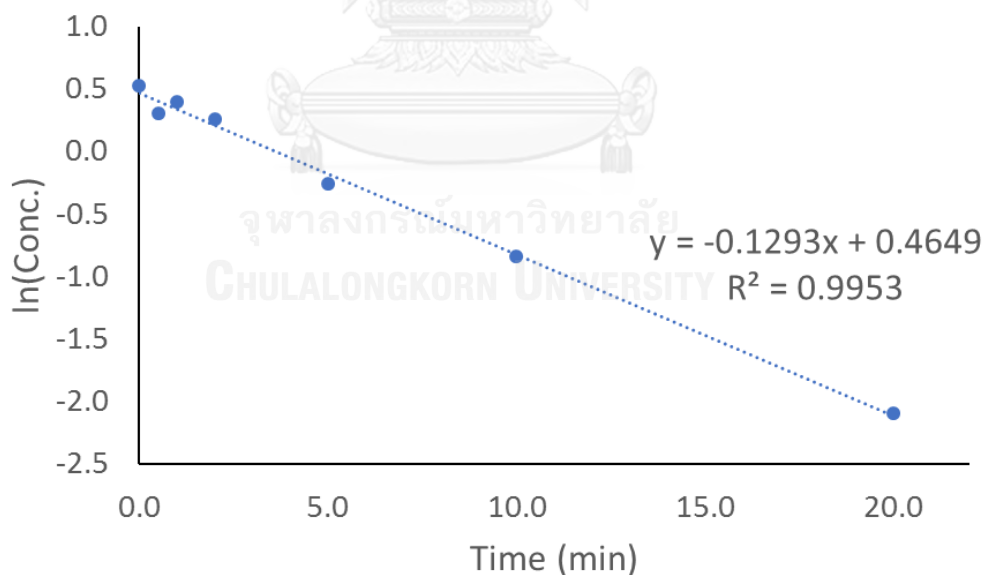
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปภาพที่ 7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาและเวลาในช่วง 0 - 20 นาที

#### 4.1.4 ผลการคำนวณค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาและค่าครึ่งชีวิต



รูปภาพที่ 8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า natural log ของความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาและเวลาในช่วง 0 - 20 นาที

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า natural log ความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาและช่วงเวลาต่างๆ พบว่าได้สมการเส้นตรง  $y = -0.1293x + 0.4649$  ซึ่งเป็นไปตามสมการอัตราการเกิดปฏิกิริยาแบบ pseudo first order โดยมีค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ  $0.1293$  นาที<sup>-1</sup>

การคำนวณค่าครึ่งชีวิต

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

$$t_{1/2} = 0.693/0.1293$$

$$t_{1/2} = 5.3589 \text{ นาที}$$

จากการคำนวณพบว่า curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมามีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 5.36 นาที

#### 4.2 อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาความคงตัวของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมามนุษย์พบว่า curcumin diethyl disuccinate มีค่าครึ่งชีวิตในพลาสมา 5.36 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากงานวิจัยของ Wichitnithad et al พบว่า curcumin diethyl disuccinate มีค่าครึ่งชีวิตในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) เท่ากับ 7.66 ชั่วโมง<sup>(16)</sup> จะเห็นว่าค่าครึ่งชีวิตของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาและในสารละลาย phosphate buffer ต่างกันถึง 85 เท่า จึงกล่าวได้ว่าการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมานั้นถูกเร่งด้วยเอนไซม์ในพลาสมา โดยคาดว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด metabolism ของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาเป็นเอนไซม์จำพวก esterase เนื่องจากโครงสร้างของ curcumin diethyl disuccinate มีพันธะ ester ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์เหล่านี้ จึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาต่อว่าเอนไซม์ใดในพลาสมาทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลง curcumin diethyl disuccinate จากการศึกษาของ Ratnatilaka Na Bhuket et al พบว่าเมื่อใช้สาร bis(4-nitrophenyl) phosphate และ phenylmethanesulfonyl fluoride เพื่อยับยั้งเอนไซม์ esterase ในพลาสมาหนู จะสามารถลดการเกิด ex vivo metabolism ของ curcumin diethyl disuccinate ได้<sup>(18)</sup> โดยสาร bis(4-nitrophenyl)phosphate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carboxyesterase ได้<sup>(27-29)</sup> และสาร phenylmethanesulfonyl fluoride สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carboxyesterase

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

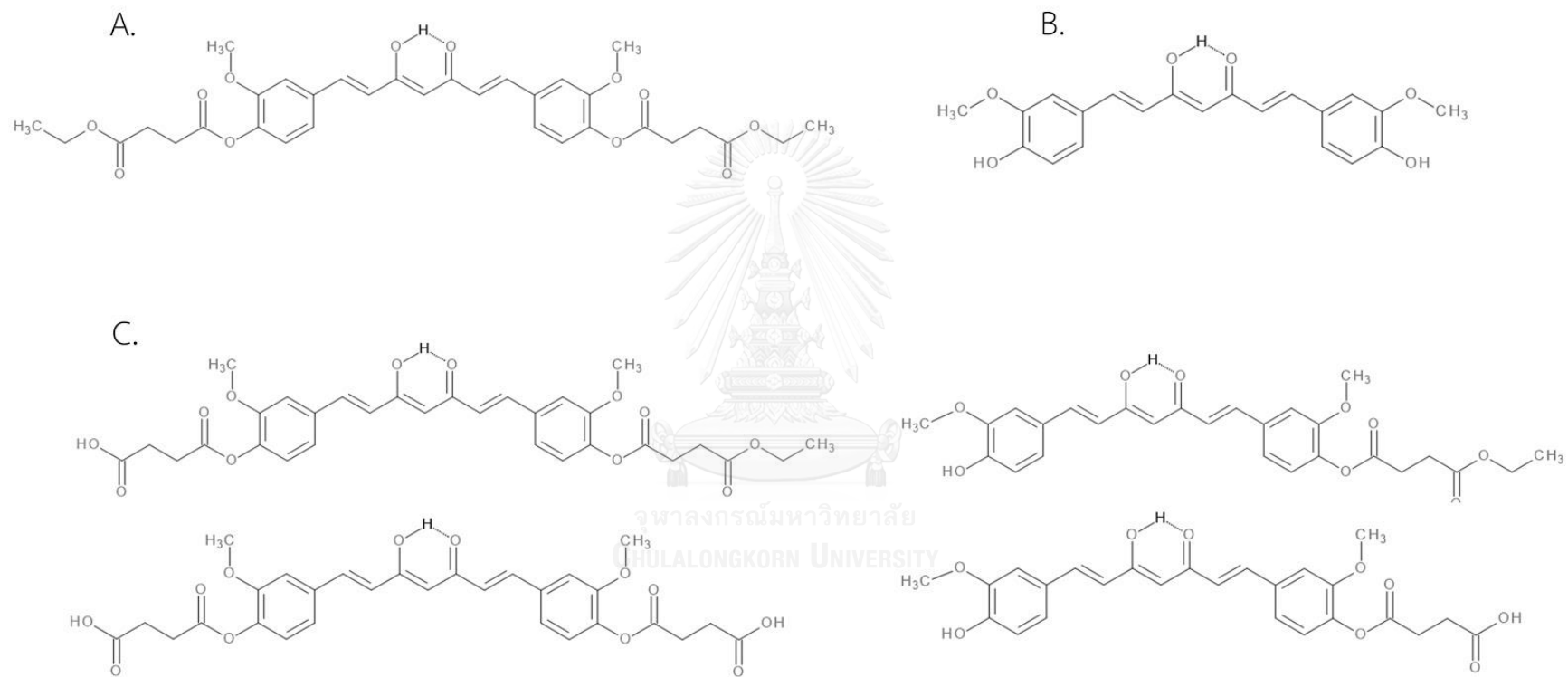
และ serine esterase ได้อย่างจำเพาะ<sup>(28, 29)</sup> จึงคาดว่าเอนไซม์ carboxyesterase มีบทบาทสำคัญในการเกิด metabolism ของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาหนู rat อย่างไรก็ตาม เนื่องจากพลาสมาของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันจะมีชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน<sup>(30)</sup> จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่าเอนไซม์ esterase ชนิดใดที่เกี่ยวข้องกับการเกิด metabolism ของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาของมนุษย์

ดังที่ได้กล่าวไปแล้วว่า curcumin diethyl disuccinate สามารถถูก metabolize ในพลาสมาและปลดปล่อย curcumin ได้ เนื่องจาก curcumin diethyl disuccinate มีพันธะ ester อยู่ 4 ตำแหน่ง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง curcumin diethyl disuccinate เป็น curcumin อาจเกิดผ่าน intermediate ที่เกิดจากการตัดพันธะ ester พันธะใดพันธะหนึ่งของ curcumin diethyl disuccinate เสียก่อน โดย intermediate ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นมีโครงสร้างดังแสดงในดังรูปภาพที่ 9 ซึ่ง intermediate เหล่านี้ คาดว่าเป็น peak ที่ถูกกล่าวถึงในหัวข้อ 4.1.3 ว่าเป็นสาร unknown ที่ retention time ประมาณ 3.8 นาที เนื่องจากสาร unknown นี้ปรากฏขึ้นก่อนที่จะตรวจพบสาร curcumin และมี peak area เพิ่มขึ้นขณะที่ peak area ของ curcumin diethyl disuccinate ลดลง จนถึงระดับหนึ่ง peak area ของสารนี้จึงลดลงพร้อมกับพบว่า curcumin มี peak area เพิ่มขึ้น จึงคาดว่าสาร unknown ดังกล่าวเป็นสาร intermediate ซึ่งเกิดขึ้นก่อนที่จะถูก metabolize ต่อไปเป็น curcumin ดังนั้น peak ของสาร unknown จึงควรถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไปว่าเป็นสาร intermediate ดังที่ได้คาดการณ์ไว้หรือไม่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปภาพที่ 9 โครงสร้างของ (A) curcumin diethyl disuccinate, (B) curcumin และ (C) สาร intermediate ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจากการกระบวนการ metabolism ในพลาสมา



ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดสารด้วยเครื่อง HPLC คณะผู้วิจัยได้ตั้งค่าระบบ HPLC โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Ratnatilaka Na Bhuket et al ซึ่งใช้ระบบ mobile phase แบบ isocratic elution ของ acetonitrile และสารละลาย formic acid<sup>(18)</sup> แต่พบว่าวิธีการตั้งค่าระบบ HPLC ดังกล่าวไม่สามารถแยกสาร unknown กับ dimethylcurcumin ซึ่งเป็นสาร internal standard ได้ จึงจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนการตั้งค่าระบบ HPLC เพื่อให้สามารถแยกสารทั้ง 2 ออกจากกัน จนได้เป็นวิธีการที่กล่าวถึงในบทที่ 3 นอกจากการใช้ระบบ mobile phase แบบ isocratic elution ดังกล่าวแล้ว ยังมีการตรวจวัด curcumin diethyl disuccinate โดยใช้ระบบ mobile phase แบบ gradient elution ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Wichitnithad et al ซึ่งใช้ระบบ mobile phase แบบ gradient elution ของ acetonitrile และสารละลาย acetic acid<sup>(16)</sup> และงานวิจัยของ Bangphumi et al ซึ่งใช้ gradient elution ของ methanol และสารละลาย formic acid<sup>(17)</sup>

จากผลการทดลองหัวข้อ 4.1.3 พบว่าความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาที่เวลา 0.5 นาที มีค่าที่ผิดไปจากที่ควร ทางคณะผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุมาจากการเตรียมตัวอย่างทดสอบโดยแยกภาชนะบรรจุและใช้สารตั้งต้นในปริมาณน้อย ทำให้เกิดความแปรปรวนของความเข้มข้นของสารตัวอย่าง จึงได้ผลการทดลองที่ไม่ตรงตามคาดไว้ ดังนั้นสำหรับการศึกษาในอนาคต ควรใช้วิธีการเตรียมสารตัวอย่างเป็นชุดตัวอย่างขนาดใหญ่ก่อนแล้วจึงแบ่งบรรจุตัวอย่างแยกออกไป เพื่อลดความแปรปรวนจากการแยกเตรียมตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

Curcumin diethyl disuccinate สามารถถูก metabolize ในพลาสมาของมนุษย์โดย เอนไซม์ในพลาสมามีบทบาทในการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ curcumin diethyl disuccinate โดยที่ curcumin diethyl disuccinate มีค่าครึ่งชีวิตในพลาสมาเท่ากับ 5.36 นาที และมีค่าคงที่ของ อัตราการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ  $0.1293 \text{ นาที}^{-1}$



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

## เอกสารอ้างอิง

1. Dall'Acqua S, Stocchero M, Boschiero I, Schiavon M, Golob S, Uddin J, et al. New findings on the in vivo antioxidant activity of Curcuma longa extract by an integrated (1)H NMR and HPLC-MS metabolomic approach. *Fitoterapia*. 2016;109:125-31.
2. Kim J, Jeong SW, Quan H, Jeong CW, Choi JI, Bae HB. Effect of curcumin (Curcuma longa extract) on LPS-induced acute lung injury is mediated by the activation of AMPK. *Journal of Anesthesia*. 2016;30(1):100-8.
3. Aravind SR, Krishnan LK. Curcumin-albumin conjugates as an effective anti-cancer agent with immunomodulatory properties. *International Immunopharmacology*. 2016;34:78-85.
4. Dhiman R, Aggarwal N, Aneja KR, Kaur M. In Vitro Antimicrobial Activity of Spices and Medicinal Herbs against Selected Microbes Associated with Juices. *International Journal of Microbiology*. 2016;2016:9.
5. Rajashekhara N, Ashok BK, Sharma PP, Ravishankar B. The evaluation of anti-ulcerogenic effect of rhizome starch of two source plants of Tugaksheeree (*Curcuma angustifolia* Roxb. and *Maranta arundinacea* Linn.) on pyloric ligated rats. *Ayu*. 2014;35(2):191-7.
6. Vinay B, Adiga S, Kamath S, Mohandas Rao K, Avin S. Hepatoprotective activity of combination of Phyllanthus niruri and Curcuma longa extracts against ethanol induced toxicity in wistar rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2016;7(1):P12-P8.
7. USFDA. Substances generally recognized as safe. Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). In: Code of Federal Regulations title 21 food and drugs. 2016.
8. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metabolism and Disposition*. 1999;27(4):486-94.
9. Sharma RA, Ireson CR, Verschoyle RD, Hill KA, Williams ML, Leuratti C, et al. Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels. *Clinical Cancer Research*. 2001;7(5):1452-8.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

10. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004;44(2):97-111.
11. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*. 2005;41(13):1955-68.
12. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics*. 2007;4(6):807-18.
13. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997;15(12):1867-76.
14. Li J, Shin GH, Chen X, Park HJ. Modified curcumin with hyaluronic acid: Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin challenge. *Food Research International*. 2015;69:202-8.
15. Parvathy KS, Negi PS, Srinivas P. Curcumin– amino acid conjugates: Synthesis, antioxidant and antimutagenic attributes. *Food Chemistry*. 2010;120(2):523-30.
16. Wichitnithad W, Nimmannit U, Wacharasindhu S, Rojsitthisak P. Synthesis, characterization and biological evaluation of succinate prodrugs of curcuminoids for colon cancer treatment. *Molecules*. 2011;16(2):1888-900.
17. Bangphumi K, Kittiviriyakul C, Towiwat P, Rojsitthisak P, Khemawoot P. Pharmacokinetics of Curcumin Diethyl Disuccinate, a Prodrug of Curcumin, in Wistar Rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2016;41(6):777-85.
18. Ratnatilaka Na Bhuket P, Niwattisaiwong N, Limpikirati P, Khemawoot P, Towiwat P, Ongpipattanakul B, et al. Simultaneous determination of curcumin diethyl disuccinate and its active metabolite curcumin in rat plasma by LC-MS/MS: Application of esterase inhibitors in the stabilization of an ester-containing prodrug. *Journal of Chromatography B*. 2016;1033-1034:301-10.
19. Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends in Food Science & Technology*. 2005;16(12):533-48.
20. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica*. 1991;57(1):1-7.

**บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

21. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 2014;19(12):20091-112.
22. Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2003;9(1):161-8.
23. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009;41(1):40-59.
24. Kim DS, Park SY, Kim JK. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from betaA(1-42) insult. *Neuroscience Letters*. 2001;303(1):57-61.
25. Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007;595:453-70.
26. Wongsrisakul J, Wichitnithad W, Rojsitthisak P, Towiwat P. Antinociceptive effects of Curcumin Diethyl Disuccinate in animals models. *Journal of Health Research*. 2010;24:175-80.
27. Hatfield MJ, Potter PM. Carboxylesterase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2011;21(8):1159-71.
28. Li W, Zhang J, Tse FL. Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. *Biomedical chromatography*. 2011;25(1-2):258-77.
29. Li W, Fu Y, Flarakos J, Zhang D. LC-MS bioanalysis of ester prodrugs and other esterase labile molecules. In: W. Li JZ, F.L., Tse, editor. *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations*: John Wiley & Sons, Inc; 2013. p. 431-45.
30. Bahar FG, Ohura K, Ogihara T, Imai T. Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;101(10):3979-88.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

### ภาคผนวก

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน curcumin diethyl disuccinate ที่ใช้ในการสร้าง calibration curve

ชื่อสารละลาย	ความเข้มข้นเริ่มต้น ( $\mu\text{M}$ )	ปริมาตรเริ่มต้น ( $\mu\text{L}$ )	ปริมาตรสุดท้าย ( $\mu\text{L}$ )	ความเข้มข้นสุดท้าย ( $\mu\text{M}$ )
CDD standard A	40.0	5.00	100	2.00
CDD standard B	35.0	5.00	100	1.75
CDD standard C	30.0	5.00	100	1.50
CDD standard D	25.0	5.00	100	1.25
CDD standard E	20.0	5.00	100	1.00
CDD standard F	15.0	5.00	100	0.750
CDD standard G	10.0	5.00	100	0.500
CDD standard H	5.00	5.00	100	0.250
CDD standard I	2.00	5.00	100	0.100

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

ตารางที่ 4 แสดง peak area ของ curcumin diethyl disuccinate และ dimethylcurcumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และอัตราส่วน peak area ของสารทั้งสอง

Curcumin diethyl disuccinate		Dimethylcurcumin		อัตราส่วน Peak area
ความเข้มข้น ( $\mu\text{M}$ )	peak area	ความเข้มข้น ( $\mu\text{M}$ )	peak area	
0.100	1,280	0.1	11,302	0.1133
0.250	3,041	0.1	11,302	0.2691
0.500	5,368	0.1	11,451	0.4688
0.750	8,651	0.1	10,376	0.8338
1.002	13125	0.1	12017	1.0922
1.248	15,504	0.1	11,335	1.3678
1.500	18,105	0.1	11,324	1.5988
1.752	21,917	0.1	11,678	1.8768
1.998	24,030	0.1	11,649	2.0628

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของ การทดลองทั้ง 5 ครั้ง และค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของแต่ละช่วงเวลา

เวลา (นาทีก)	ความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ( $\mu\text{M}$ )					
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	การทดลองที่ 4	การทดลองที่ 5	ค่าเฉลี่ย
0.0	1.666	1.647	1.464	1.834	1.808	1.684
0.5	1.363	1.585	1.552	0.955	1.327	1.356
1.0	1.513	1.358	1.509	1.672	1.398	1.490
2.0	1.365	1.263	1.338	1.239	1.237	1.288
5.0	0.879	0.852	0.820	0.627	0.682	0.772
10.0	0.522	0.419	0.545	0.354	0.309	0.430
20.0	0.161	0.139	0.191	0.083	0.038	0.122
30.0	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
60.0	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
120.0	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ curcumin diethyl disuccinate ในพลาสมาและค่า natural log ของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของแต่ละช่วงเวลา

เวลา (นาทีก)	ค่าเฉลี่ย ( $\mu\text{M}$ )	ค่า natural log ของค่าเฉลี่ย
0.0	1.684	0.521
0.5	1.356	0.305
1.0	1.490	0.399
2.0	1.288	0.253
5.0	0.772	-0.259
10.0	0.430	-0.845
20.0	0.122	-2.100
30.0	0.008	-4.846
60.0	0.008	-4.846
120.0	0.008	-4.846

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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