

การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเทอรอลเพื่อการนำส่งเคอร์คูมิน

นางสาวจุฑามาส รุจิสมนภา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MODIFICATION OF GELATIN STRUCTURE WITH CHOLESTEROL
FOR CURCUMIN DELIVERY

Miss Jutamas Rujisomnapa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตรอลเพื่อการนำส่ง เคอร์คูมิน
โดย	นางสาวจุฑามาส รุจิสมนภา
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ไตรดา กนกพานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.ดิเรก ลาวัณย์ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.ไตรดา กนกพานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อาทิวรรณ ไซดีพฤษ์)

..... กรรมการ
(ดร.อุรษา รัชต์दानนท์ชัย)

จุฑามาส รุจิสมณฑา : การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอลเพื่อการนำส่ง
เคอร์คูมิน (MODIFICATION OF GELATIN STRUCTURE WITH CHOLESTEROL FOR
CURCUMIN DELIVERY) อ. ที่ปรึกษา: อ.ดร.ไศรดา กนกพานนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.
สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, 140 หน้า.

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ มีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพและเข้ากันได้ดีกับ
ร่างกาย มีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาอย่างแพร่หลาย แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถสร้างพันธะ
กับสารประเภทไม่ละลายน้ำได้ งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินโดยการ
เชื่อมพันธะกับคอเลสเตอรอลผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลโดยใช้ N,N'-Disuccinimidyl
carbonate เป็นสารเชื่อมพันธะ (conjugating agent) ปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปลงถูกใช้
ในการประเมินความสำเร็จของการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาติน ปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาติน
ดัดแปลงมีค่าลดลงร้อยละ 4 - 31 เมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลในการดัดแปลงจาก 25 - 125
เปอร์เซ็นต์ของปริมาณหมู่อะมิโนในเจลาติน ความชอบน้ำของเจลาตินที่ทดสอบจากค่ามุมสัมผัสน้ำมี
ค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอล เจลาตินดัดแปลงถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่น (hydrogel sheet)
และเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการกักเก็บและปลดปล่อย
เคอร์คูมินซึ่งมีสมบัติไม่ชอบน้ำ ระดับการเชื่อมโยงพันธะของแผ่นเจลาตินดัดแปลงมีผลต่อปริมาณยาที่
บรรจุ, การดูดซับน้ำ, อุณหภูมิในการย่อยสลาย, การย่อยสลายทางชีวภาพ และปริมาณยาที่บรรจุ การ
ปลดปล่อยเคอร์คูมินเป็นไปตามการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลง ซึ่งมีอัตราสัมพันธ์กับปริมาณ
คอเลสเตอรอลที่ใช้ในการดัดแปลง แผ่นเจลาตินที่ดัดแปลงนี้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ L929
mouse fibroblast เมื่อนำไปบรรจุเคอร์คูมินปริมาณ 100 µg และ 400 µg แล้วนำไปฝังใต้ผิวหนังบน
หลังของหนู BALB-c mice จากการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินในพลาสมาของตัวอย่างที่เก็บวันที่ 3, 6,
10 และ 14 หลังการปลูกถ่ายพบลักษณะการปลดปล่อยของเคอร์คูมินแบบยั่งยืนเป็นเวลาอย่างน้อย
10 วัน โดยมีระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลองสูงสุดในวันที่ 6 หลังการปลูกถ่าย ผลการทดลอง
ทั้งหมดแสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้เจลาตินดัดแปลงในการควบคุมการนำส่งยาชนิดไม่ละลายน้ำ
ภายในร่างกาย

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา ..2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4870261821 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: GELATIN / CHOLESTEROL / MODIFICATION / CURCUMIN / CONTROL RELREASE

JUTAMAS RUJISOMNAPA: MODIFICATION OF GELATIN STRUCTURE WITH CHOLESTEROL FOR CURCUMIN DELIVERY. THESIS ADVISOR: SORADA KANOKPANONT, THESIS COADVISOR:SUTHILUK PATUMRAJ , 140 pp.

Gelatin is a biocompatible and water soluble protein which has been wildy used as a carrier in drug delivery systems. However, hydrophilicity of gelatin may limit its interactions with hydrophobic active agents. In this study, gelatin structure was modified by conjugating with cholesterol through hydroxyl-reactive chemical reaction using N,N'-Disuccinimidyl carbonate as a conjugating agent. Contents of free amino groups of the modified gelatin (determined by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) method) was used to evaluate the success of conjugating reactions. Free amino groups of modified gelatin were decreased by 4 – 31 % with the increases of cholesterol by 25 – 125 %. Changes its in hydrophilicities were evaluated from the increases of water contact angles. Cholesterol modified gelatin was fabricated into hydrogel sheets followed by crosslinking with glutaraldehyde. Degree of modification effects the degree of hydrogel crosslink, drug loading, swelling ratio, degradation temperature and biodegradability of the hydrogel sheet. In *vitro* release of curcumin, a natural antiangiogenesis substance, were tested. Limited diffusion of curcumin from the hydrogel sheets implied strong interactions between curcumin and the modified hydrogel. It was possible to control rate of release by controlling the hydrogel degradation rate. The modified gelatin sheets show no toxicities to L929 mouse fibroblast culture. The curcumin loaded gelatin hydrogel sheets (at 100 µg and 400 µg of curcumin) were subcutaneous implanted on the back of BALB-c mice. HPLC analyses of blood plasma samples (at day 3, 6, 10 and 14) showed sustained release of curcumin for at least 10 days. The plasma curcumin concentration was highest at day 6 after implantation. Results of this study elucidate the promise of using modified gelatin for control release of hydrophobic active agents.

Department.....~~Chemical Engineering~~

Student's signature.....

Field of study.....~~Chemical Engineering~~

Advisor's signature.....

Academic year.....2007.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่านซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ดร.ไศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา, รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม, Prof. Yasuhiko Tabata (จากมหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น), รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, ดร.อุรษา รัชชตานนท์ชัย และ ผศ. ดร. อาทิวรรณ โชติพิฤกษ์ เป็นอย่างสูง สำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัยได้อย่างถูกต้อง

ขอขอบคุณ คุณ ณัฐชญา วงศ์เอกอินทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทดลองในสัตว์ทดลอง, คุณจุฑามาศ รัตนารากรณ์ ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านความรู้พื้นฐานของเซลล์ เทคนิคในการเลี้ยงเซลล์

ขอขอบคุณ ทูสนับสนุนงานวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ขอขอบคุณ ทูรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ ทูพัฒนาศัทยภาพในการทำงานของอาจารย์รุ่นใหม่สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอบคุณมากๆ สำหรับ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการและวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี, ห้องปฏิบัติการและวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์, ห้องปฏิบัติการ iTissue Lab, ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือ งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมา จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ระบบนำส่งยา.....	5
2.1.1 รูปแบบของระบบนำส่งยา.....	6
2.1.2 ยาฝังใต้ผิวหนัง.....	8
2.2 ไขมันชั้น.....	9
2.2.1 เคอร์คูมิน.....	9
2.3. มะเร็ง.....	21
2.3.1 ขบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง.....	22
2.3.2 การใช้เคอร์คูมินรักษามะเร็ง.....	24
2.4 เจลาติน.....	26
2.4.1 คุณสมบัติของเจลาติน.....	26
2.4.2 การใช้เจลาตินในระบบนำส่งภายในร่างกาย.....	30
2.4.3 การดัดแปลงเจลาติน.....	32
2.5 คอเลสเตรอล.....	33
2.6 เอกสารสิทธิ (Patents) ที่เกี่ยวข้อง.....	36
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	38

บทที่	หน้า
3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย.....	38
3.2 เคมีภัณฑ์.....	39
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	40
3.4 วิธีการทดลอง.....	40
3.4.1 การตัดแปลงเจลาติน.....	40
3.4.2 วิธีการขึ้นรูปแผ่นเจลาตินที่ผ่านการตัดแปลงโครงสร้างแล้ว.....	43
3.4.3 การประเมินความสำเร็จในการตัดแปลงเจลาติน.....	44
3.4.3.1 ศึกษาลักษณะสมบัติของเจลาตินดัดแปลง.....	44
3.4.3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของแผ่นเจลาตินดัดแปลง.....	45
3.4.4 ระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง.....	48
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	52
3.6 สถานที่ทำการวิจัย.....	52
4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	53
ความสำเร็จในการตัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเตรอรอล.....	55
4.1 ลักษณะสมบัติของเจลาตินดัดแปลง.....	55
4.2 ลักษณะสมบัติของแผ่นเจลาตินดัดแปลง.....	65
4.3 ระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง.....	87
5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	96
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก	104
ภาคผนวก ก	105
ภาคผนวก ข	107
ภาคผนวก ค	109
ภาคผนวก ง	117
ภาคผนวก จ	119
ภาคผนวก ฉ	121
ภาคผนวก ช	123
ภาคผนวก ซ	125
ภาคผนวก ฌ	138

บทที่

ณ

หน้า

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์140

สารบัญตาราง

ญ

บทที่	หน้า
2.1	เปรียบเทียบสมบัติของเจลาติน Type A และ B.....28
2.2	แสดงองค์ประกอบในเจลาติน.....28
2.3	แสดงค่ามุมสัมผัสของเจลาตินดัดแปลงดัดแปลงทุกอัตราส่วน.....31
3.1	แสดงอัตราส่วนต่างๆของการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเตรอล.....42
4.1	แสดงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโครงสร้างของเจลาตินดัดแปลง57
4.2	แสดงค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวของฟิล์มบางของเจลาตินดัดแปลงที่ไม่มีการเชื่อมโยง พันธะทดสอบโดยใช้เครื่อง contact angle.....65
4.3	แสดงระดับการเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde ของเจลาตินดัดแปลงหลังผ่านการ ขึ้นรูปเป็นแผ่น.....67
4.4	แสดงสัดส่วนการดูดซับน้ำของแผ่นเจลาตินดัดแปลง ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน โดยแช่ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....70
4.5	แสดงอุณหภูมิในการสลายตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลงโดยใช้โปรแกรม Onset จาก เครื่อง Thermogravimetric/Differential Analyzer.....72
4.6	ค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) การย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ถูกย่อยสลายตามใน สภาวะดังรูป 4.16-4.1876
4.7	เปอร์เซ็นต์ของเคอร์คิวมินที่ยังเหลือจากแผ่นเจลาตินดัดแปลงโครงสร้างที่เวลา 24 ชั่วโมง ของการทดลองปลดปล่อยเคอร์คิวมินภายนอกร่างกายจากรูป 4.21-4.23.....85
4.8	ปริมาณเคอร์คิวมินที่พบในพลาสมา (วิเคราะห์โดย HPLC) หลังจากการฝังแผ่นเจลาติน ดัดแปลงใต้แผ่นหลังของ BALBc mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลาต่างๆ.....92
ก.1	แสดงปริมาณ (กรัม) ของสารที่ใช้ในการดัดแปลงเจลาติน 1 กรัมที่อัตราส่วนต่างๆ.....106
ข.1	แสดงปริมาณอะมิโนอิสระที่เปลี่ยนแปลงหลังการดัดแปลงโครงสร้างเจลาตินและหลังการ เชื่อมโยงพันธะ.....108
จ.1	ร้อยละของน้ำหนักที่เหลือของแผ่นเจลาตินดัดแปลง (หนัก 5 มิลลิกรัม) ในสารละลาย PBS pH 7.4 ที่มีเอนไซม์ bacterial collagenase ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร.....120
ฉ.1	จำนวนเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่มีชีวิตบนแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่เวลาต่างๆ (จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์/แผ่นเจลาติน).....122

สารบัญญภาพ

ฉ

บทที่	หน้า
2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในเลือด (C) กับเวลา (t) ที่เกิดจากการฉีดยาเข้าเส้นเลือดแบบไอวีโบลัส.....5
2.2	โครงสร้างของ เคอร์คูมิน, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin.....10
2.3	แสดง peak ของเคอร์คูมิน และอนุพันธ์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....11
2.4	แสดงกราฟ HPLC ของเคอร์คูมิน.....13
2.5	แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของเคอร์คูมินและหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ.....13
2.6	แสดงการสลายตัวของเคอร์คูมินใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2.....14
2.7	แสดงกราฟ HPLC ของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของสารละลายเคอร์คูมินใน 0.1 M phosphate buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....14
2.8	ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในพลาสมาของหนูทดลองโดยการป้อนทางปาก.....16
2.9	แสดงกราฟ HPLC ของ (ก.) พลาสมาหลังจาก 1 ชั่วโมงที่ป้อนเคอร์คูมินทางปาก (ข.) หลังจากที่ได้เติม β -Glucuronidase.....16
2.10	แสดงกราฟ HPLC ของ (ก.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูก่อนป้อนเคอร์คูมินอยด์, (ข.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูหลังป้อนเคอร์คูมินอยด์ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปป่มด้วย b-glucuronidase และ (ค.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูหลังป้อนเคอร์คูมินอยด์ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปป่มด้วย b-glucuronidase/sulfatase.....17
2.11	Electrophoretogram ของ (a) สารมาตรฐานเคอร์คิวมินอยด์ (I: เคอร์คูมิน, II: demethoxycurcumin, III: bisdemethoxycurcumin), (b) เคอร์คิวมินอยด์ ใน urine และ (c) blank urine.....19
2.12	การปลดปล่อยของเคอร์คูมิน (◆) เปรียบเทียบกับที่ผสม PVC21
2.13	แผนภาพแสดงกระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง.....23
2.14	แผนภาพแสดงลักษณะของก้อนมะเร็ง24
2.15	แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin27
2.16	แสดงโครงสร้างของเจลาติน.....29
2.17	แสดงสูตรโครงสร้างของคอเลสเทอรอล.....34
2.18	การเตรียม cholesterol - conjugated PGD-G4 (Chol-PGDG4)35
2.19	การละลายของ paclitaxel กับความเข้มข้นของ Chol-PGDG4 และ PGD-G4.....35
3.1	แสดงแผนการดำเนินการวิจัย.....38

บทที่	หน้า
3.2 ตัวอย่างอุปกรณ์ในการเตรียมสารละลายทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วย ขวดที่มีฝาปิดอย่างแน่นหนา, ถ้วยสแตนเลส, เทอร์โมมิเตอร์, glassbeads และ เครื่องปั่นกวน.....	41
3.3 แสดงตัวอย่างเจลาตินที่ผ่านการตัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอรอล.....	43
3.4 แสดงตัวอย่างแผ่นเจลาตินดัดแปลงหลังจากหยดสารละลายเคอร์คูมิน.....	47
3.5 แผนผังขั้นตอนการทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากระบบนำส่งโดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง.....	49
3.6 แผนภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง.....	50
3.9 แผนผังขั้นตอนการสกัดเคอร์คูมินจากพลาสติก.....	51
4.1 แผนผังการทดสอบคุณสมบัติของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอรอล.....	54
4.2 ปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอรอล	58
4.3 สมการการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตรอรอลโดยผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลโดยใช้ N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC) เป็นสารเชื่อมพันธะ.....	58
4.4 FT-IR spectra ของสารละลายเจลาตินที่ผ่านการทำให้แห้งแข็งในช่วงเลขคลื่น 4000-800 cm ⁻¹	60
4.5 FT-IR spectra ของเจลาตินในช่วงเลขคลื่น 4000-500 cm ⁻¹	60
4.6 FT-IR spectra ของคอเลสเตรอรอล [Merck, Darmstadt, Germany] ในช่วงเลขคลื่น 4000-1000 cm ⁻¹	61
4.7 FT-IR spectra ของผงคอเลสเตรอรอล (Wako, Japan) ที่ใช้ในการดัดแปลงโครงสร้างในช่วงเลขคลื่น 4000-800 cm ⁻¹	61
4.8 FT-IR spectra ของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอรอลโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1 เท่าของคอเลสเตรอรอล.....	62
4.9 FT-IR spectra ของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอรอลโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 2 เท่าของคอเลสเตรอรอล.....	63
4.10 FT-IR spectra ของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอรอลโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 3 เท่าของคอเลสเตรอรอล.....	63
4.11 ระดับการเชื่อมโยงพันธะของแผ่นเจลาตินดัดแปลง.....	61
4.12 การเชื่อมโยงพันธะระหว่างหมู่อะมิโนของเจลาตินกับหมู่แอลดีไฮด์ของ Glutaraldehyde.....	68

บทที่	หน้า
4.13	รูปถ่ายแผ่นเจลลาตินดัดแปลง(ความเข้มข้น 5 % โดยน้ำหนัก) ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้น 0.06 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด.....68
4.14	รูปจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (ความเข้มข้น 5 % โดยน้ำหนัก) ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้น 0.06 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่กำลังขยาย 75 เท่า.....69
4.15	สัดส่วนการดูดซับน้ำของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง.....71
4.16	ร้อยละของน้ำหนักที่เหลือของแผ่นเจลลาติน (หนัก 5 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1 เท่าของคอเลสเตรอลในสารละลาย collagenase เป็นเวลา 15 วัน74
4.17	ร้อยละของน้ำหนักที่เหลือของแผ่นเจลลาติน (หนัก 5 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 2 เท่าของคอเลสเตรอลในสารละลาย collagenase เป็นเวลา 15 วัน.....74
4.18	ร้อยละของน้ำหนักที่เหลือของแผ่นเจลลาติน (หนัก 2 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 3 เท่าของคอเลสเตรอลในสารละลาย collagenase เป็นเวลา 15 วัน.....75
4.19	ค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) การย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่แช่ในสารละลาย เอนไซม์ collagenase (1 units/ml).....76
4.20	การทดสอบความเป็นพิษของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (หนัก 5 มิลลิกรัม) เมื่อใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่าของคอเลสเตรอล ต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast 10,000 เซลล์ ที่เวลา 5 ชั่วโมง, 1 วัน และ 3 วัน.....78
4.21	การปลดปล่อยคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (หนัก 2 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับคอร์คูมิน ปริมาณ 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1, 2 และ 3 เท่า (โดยโมล) ของคอเลสเตรอลในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween80) อุณหภูมิ 37 °C..... 81
4.22	การปลดปล่อยคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (หนัก 2 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับคอร์คูมิน ปริมาณ 15 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1, 2 และ 3 เท่า (โดยโมล) ของคอเลสเตรอลในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween80) อุณหภูมิ 37 °C..... 82

บทที่	หน้า
4.23	การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง(หนัก 2 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับเคอร์คูมิน ปริมาณ 20 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1, 2 และ 3 เท่า (โดย โมล) ของคอเลสเตรอลในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween80) อุณหภูมิ 37 °C..... 83
4.24	การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง(หนัก 2 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับเคอร์คูมิน ปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1, 2 และ 3 เท่า (โดย โมล) ของคอเลสเตรอลในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween80) อุณหภูมิ 37 °C..... 84
4.25	ปริมาณเคอร์คูมินที่ยังเหลือบนแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดลอง ปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกาย.....86
4.26	แสดงกราฟ HPLC ของเคอร์คูมิน.....87
4.27	แสดงกราฟมาตรฐานของเคอร์คูมิน.....88
4.28	ภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง.....89
4.29	ภาพถ่ายหลังจากฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (CG66) ได้ผิวหนังบริเวณแผ่นหลัง BALBcA mice (เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์) เก็บตัวอย่างในวันที่ 3, 6, 10 และ 14.....90
4.30	แสดงกราฟ HPLC ของ (ก.) เคอร์คูมินในสารละลายเอทานอล (ข.) พลาสมาที่แยกจาก หนูที่ได้รับการฝังแผ่น เจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน (ค.) พลาสมาที่แยกจาก หนูที่ไม่ได้ฝังแผ่นเจลลาติน.....91
4.31	ปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมาหลังจากการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงใต้แผ่นหลังของ BALBcA mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ที่ระยะเวลาต่างๆ.....93
ข.1	กราฟมาตรฐานของ β - alanine107
ค.1	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของเจลลาติน(G)โดยใช้ โปรแกรม Onset จากเครื่อง TG/DTA ซึ่งจะได้ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ เจลาตินเป็น 293 องศาเซลเซียส.....110
ค.2	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG25 ที่ผ่านการ ดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล.....111
ค.3	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG50 ที่ผ่านการ ดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล.....112

บทที่	หน้า
ค.4	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าคุณพหุในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG66 ที่ผ่านการ ดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล.....113
ค.5	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าคุณพหุในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG75 ที่ผ่านการ ดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล.....114
ค.6	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าคุณพหุในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG100 ที่ผ่านการ ดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล.....115
ค.7	แสดงผลการวิเคราะห์ค่าคุณพหุในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG125 ที่ผ่านการ ดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล.....116
ง.1	Contact angle.....118
ฉ.1	กราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 mouse fibroblast (n = 4).....122
ช.1	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80 และเคอร์คู มิน ที่ความยาวคลื่น 412.60 นาโนเมตร.....123
ช.2	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80, trypsin, แผ่นเจลาตินดัดแปลง และเคอร์คูมิน ที่ความยาวคลื่น 285.50 นาโนเมตร.....124
ช.1	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปบ่มเอนไซม์ β -glucuronidase.....126
ช.2	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปบ่มเอนไซม์ β -glucuronidase.....127
ช.3	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปบ่มเอนไซม์ β -glucuronidase.....128
ช.4	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำไปบ่มเอนไซม์ β -glucuronidase.....129
ช.5	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำไปบ่มเอนไซม์ β -glucuronidase.....130
ช.6	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำไปบ่มเอนไซม์ β -glucuronidase.....131
ช.7	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปบ่มเอนไซม์ β -glucuronidase.....132

สารบัญภาพ

ณ

บทที่	หน้า
ช.8	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase.....133
ช.9	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase.....134
ช.10	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase.....135
ช.11	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase.....136
ช.12	แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase.....137

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันรัฐบาลไทยสนับสนุนการใช้สมุนไพรไทยในการพัฒนาตำรับยา เครื่องสำอาง ตลอดจนอาหารเสริมต่างๆ สารประกอบธรรมชาติกลุ่มหนึ่งซึ่งได้มีการนำมาศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลาย คือ เคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งเป็นสารสีเหลืองพบอยู่ในพืชจำพวกขมิ้น ซึ่งประกอบด้วย เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นองค์ประกอบหลัก และอนุพันธ์อีกสองชนิด คือ demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin โดยพบว่า เคอร์คูมินอยด์มีฤทธิ์สามารถต่อต้านการอักเสบ , ต่อต้านสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง , ต่อต้านอนุมูลอิสระ, ต่อต้านโรคภูมิแพ้, ต่อต้านแบคทีเรียและต่อต้านกิจกรรมของเนื้องอกได้ [Ishita, C. และคณะ,2004]

ขมิ้นชันมีประโยชน์สำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื่องจากขมิ้นสามารถยับยั้งมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งในช่องปาก มะเร็งผิวหนัง มะเร็งมดลูก เป็นต้น จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโมเลกุลขนาดเล็กของเคอร์คูมินที่แยกได้จากขมิ้น มีฤทธิ์ด้านการสร้างเส้นเลือดฝอยใหม่ [สุทธิลักษณ์และคณะ,2005] ซึ่งการสร้างเส้นเลือดฝอยใหม่ (angiogenesis หรือ neovascularization) จะช่วยให้ก้อนมะเร็งได้รับออกซิเจนและอาหารอย่างเพียงพอต่อการเจริญเติบโต [ชุตินา,2004] ดังนั้นการตัดเส้นทางลำเลียงอาหารและออกซิเจนจึงเป็นวิธีการหนึ่งในการรักษามะเร็ง โดยพบว่าเคอร์คูมิน (3000 มก./กก.นน.ตัว) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่ปลูกถ่ายในหนูชนิดไม่สืบพันธุ์ได้โดยผ่านการยับยั้งการสร้างของหลอดเลือดใหม่ [พรพรมและคณะ, 2006] แต่ในงานวิจัยดังกล่าวพบว่าต้องใช้เคอร์คูมินในปริมาณที่สูงมาก ทั้งนี้เพราะเคอร์คูมินมีความสามารถในการดูดซึมที่กระเพาะอาหารไม่ดี ทำให้เข้าสู่กระแสเลือดได้น้อยมาก มีการศึกษาพบว่าเคอร์คูมินส่วนใหญ่จะถูกขับออกทางอุจจาระอย่างรวดเร็ว และบางส่วนจะถูกขับออกทางปัสสาวะ แต่มีอีกส่วนหนึ่งไปยังตับเพื่อไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในการกำจัดสารก่อมะเร็ง [Wang และคณะ,1996] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้มีการนำความรู้ทางด้านระบบนำส่งยา มาประยุกต์ใช้เพื่อให้สามารถนำส่งยาสำหรับการรักษาโรคมะเร็งในปริมาณที่ต้องการและเฉพาะจุดมากขึ้นเพื่อการใช้เคอร์คูมินในปริมาณน้อยและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเนื่องจากจะสามารถควบคุมหรือกำหนดให้ยาถูกปลดปล่อยออกมาในอัตราเร็วที่ต้องการโดยระบบนำส่งยาที่มีความหมายเน้นในเรื่องตัวพา (carrier) ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษาของยา สารช่วย

ของระบบควบคุมการปลดปล่อยและนำส่งยาซึ่งมักใช้ พอลิเมอร์ ที่มีความเข้ากันได้กับร่างกายได้ดี และมีคุณสมบัติต่างๆที่สามารถคาดการณ์ได้ เช่น เรื่องอัตราการละลาย , การควบคุมการแพร่ของยา , การทำปฏิกิริยาระหว่างยาและพอลิเมอร์หรือเยื่อของร่างกาย ในระยะแรกการใช้พอลิเมอร์มักเลือกชนิดที่ควบคุมยาให้ออกฤทธิ์นาน และต่อมามีการเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีความไม่ชอบน้ำมาควบคุมการปลดปล่อยยาที่มีโมเลกุลใหญ่ นอกจากนี้ยังมีการเติม magnetic bead ในพอลิเมอร์ และใช้การกระตุ้นด้วยสนามแม่เหล็กเพื่อให้ยาปลดปล่อย รวมทั้งการดัดแปลงโครงสร้างของพอลิเมอร์ให้มีความไม่ชอบน้ำมากขึ้นเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยาจากรูปแบบยาฝังใต้ผิวหนัง คุณสมบัติดังกล่าวมักพบในพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดหนึ่งในพอลิเมอร์ที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านระบบนำส่งยา คือ เจลาติน (gelatin) [ณรงค์ ,2535]

เจลาตินเป็นโปรตีนจากธรรมชาติมีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน ซึ่งเกิดจากการเสียสภาพของ collagen โดยขบวนการ acidic และ alkaline โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรม และทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีสมบัติการเข้ากันได้กับร่างกาย ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยา และอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ [Young, S. และคณะ, 2005] เจลาตินมีคุณสมบัติที่ชอบน้ำ และไม่มีพื้นผิวที่เกิดปฏิกิริยาดังนั้นจึงต้องมีการดัดแปลงเจลาตินเนื่องจากพบว่าโปรตีนที่มีหมู่ hydrophobic มากกว่าจะมีพื้นผิวที่เกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า [Kato และ Nakai , 1970] โดยในปัจจุบันมีงานวิจัยในด้านการควบคุมการปลดปล่อยสารจากเจลาตินมากมาย เช่น การศึกษาการนำส่งยาต่อต้านเนื้องอกโดยใช้เจลาตินที่ทำการดัดแปลงในรูปแบบต่างๆ [Y.Tabata,2004] เป็นต้น

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินเพื่อควบคุมการนำส่งเคอร์คูมินในร่างกายซึ่งจะดัดแปลงโดยการเชื่อมพันธะกับคอเลสเทอรอลผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลโดยใช้ N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC) เป็นสารเชื่อมพันธะ (conjugating agent) มีการขึ้นรูปเจลาตินเป็นแผ่นและมีการทดสอบการปลดปล่อยของเคอร์คูมินภายนอกในร่างกาย รวมถึงทดสอบระดับของเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินจากเจลาตินดัดแปลงและศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆ ทั้งทางเคมีและกายภาพของระบบนำส่งยาที่ผลิตได้
2. ทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินและการย่อยสลายของระบบนำส่งภายนอกร่างกาย
3. ทดสอบระดับของเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ต้นแบบของระบบนำส่งเคอร์คูมินที่มีประสิทธิภาพและสามารถควบคุมการปลดปล่อยตัวยาได้นานขึ้นและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้
2. ได้ข้อมูลที่ศึกษาการดัดแปลงเจลาตินด้วยหมู่คอเลสเทอรอลเพื่อส่งผ่านสารออกฤทธิ์ชนิดที่ไม่ละลายน้ำชนิดอื่น

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. ดัดแปลงโมเลกุลของเจลาตินด้วยวิธีเชื่อมพันธะกับคอเลสเทอรอลโดยปรับเปลี่ยนปริมาณของคอเลสเทอรอลและทดสอบผลการดัดแปลงโดยการวัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เปลี่ยนไปด้วยวิธี TNBS
2. ขึ้นรูประบบนำส่งเคอร์คูมินจากเจลาตินที่ทำการดัดแปลงแบบแผ่น
3. ศึกษาลักษณะสมบัติของระบบนำส่งเคอร์คูมินในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ โครงสร้างทางเคมีของเจลาตินดัดแปลง, ค่ามูสมัมผัสน้ำ, เปอร์เซนต์การเชื่อมโยงพันธะ, การดูดซับน้ำ, อุณหภูมิในการสลายตัว และการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย
4. ทดสอบความเป็นพิษของแผ่นเจลาตินดัดแปลง
5. ศึกษาการปลดปล่อยเคอร์คูมินของระบบนำส่งเคอร์คูมินในห้องปฏิบัติการที่เลียนแบบสภาวะของร่างกาย
6. ศึกษาระดับเคอร์คูมินในเลือดโดยใช้สัตว์ทดลองโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณเคอร์คูมินที่ใช้ในสัตว์ทดลอง

บทที่ 2

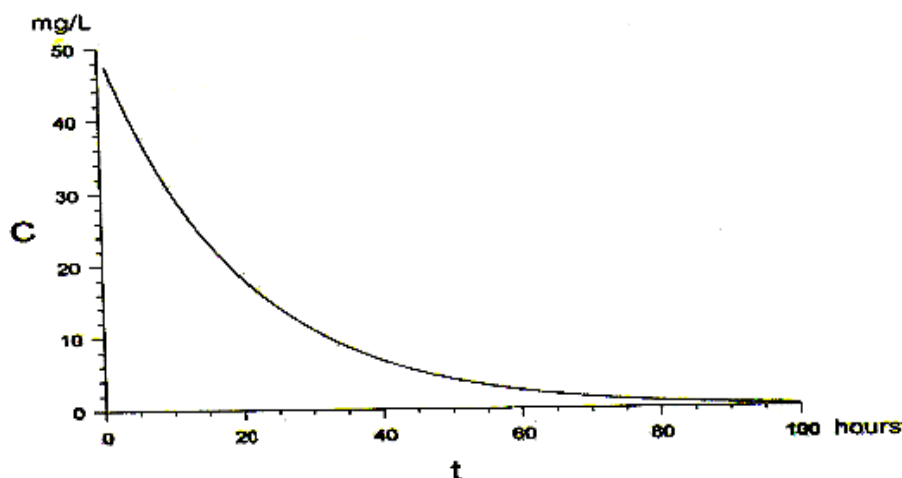
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบนำส่งยา (drug delivery system)

การให้ยาเข้าสู่ร่างกาย มีวัตถุประสงค์ให้ตัวยาเข้าสู่กระแสเลือดและกระจายไปยังตำแหน่งที่ตัวยาจะออกฤทธิ์ เพื่อให้เกิดผลในการรักษาหรือป้องกันโรคตามที่ต้องการโดยที่ยานั้นไม่ทำอันตรายต่อร่างกาย ซึ่งการที่ยาจะมีประสิทธิภาพและปลอดภัย นอกจากขึ้นกับคุณสมบัติของตัวยาแล้ว ยังขึ้นกับกระบวนการต่างๆในการผลิตยา นับตั้งแต่การตั้งสูตรตำรับ การเลือกสรรวัตถุดิบ กระบวนการผลิตและควบคุมคุณภาพ ความคงตัวของยาในภาชนะบรรจุหรือที่จัดเก็บ การปลดปล่อยตัวยาในรูปแบบต่างๆ ณ จุดที่ดูดซึม จนกระทั่งตัวยาเข้าสู่กระแสเลือด นอกจากนี้ กระบวนการต่างๆที่ร่างกายกระทำต่อยา เช่น การจับกับโปรตีนของยาในเลือด การกระจายของยาเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆโดยเฉพาะสู่จุดที่ยาออกฤทธิ์ รวมทั้งการกำจัดยาออกจากร่างกาย ก็มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของยาดังกล่าวเช่นกัน

การให้ยาเข้าสู่ร่างกาย ไม่ว่าจะยาจะอยู่ในรูปเภสัชภัณฑ์ชนิดใด ตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเภสัชภัณฑ์นั้นก่อน แล้วจึงเกิดการละลายในทางเดินอาหาร ตัวยาจะถูกดูดซึมผ่านเข้าสู่กระแสเลือด และกระจายไปตามเนื้อเยื่อต่างๆเพื่อไปออกฤทธิ์ ขณะเดียวกัน ยาจะถูกร่างกายกำจัดออกไปอาจโดยทางปัสสาวะหรือถูกเปลี่ยนแปลงสภาพที่ตับโดยกระบวนการเมแทบอลิซึม [สุพงษ์,2547]

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในพลาสมา กับเวลาใช้อธิบายกระบวนการดูดซึม กระบวนการกระจายของยาไปตามเนื้อเยื่อต่างๆและกระบวนการกำจัดยาได้เป็นอย่างดี โดยจะบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของปริมาณยาในร่างกาย ลักษณะการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของระดับยาในพลาสมา แสดงให้เห็นถึงการที่ยาเข้าสู่หรือออกจากระบบไหลเวียนเลือด การเพิ่มขึ้นหรือลดลงบ่งบอกถึงอัตราเร็วที่ยาเข้าสู่หรือออกจากระบบไหลเวียนเลือด โดยทั่วไปแล้วความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในพลาสมา กับเวลาที่เกิดจากการให้ยาโดยวิธีใดวิธีหนึ่งจะมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันสำหรับยาส่วนใหญ่ เช่น ถ้าเกิดจากการฉีดเข้าเส้นเลือดดำแบบไอวโบลัสซึ่งเป็นการฉีดยาทั้งหมดเข้าสู่กระแสเลือดยาจะกระจายไปตามส่วนต่างๆของร่างกายปริมาณยาในร่างกายจะสูงสุดหลังฉีดจากนั้นจะลดลงเนื่องจากยาถูกกำจัดโดยกลไกการกำจัดยาของร่างกายดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในเลือด(C) กับเวลา(t) ที่เกิดจากการฉีด ยาเข้าเส้นเลือดแบบไอวีโบลัส [สุพงษ์,2547]

พื้นที่ทั้งหมดใต้เส้นโค้งของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในเลือดกับเวลา เรียกว่า ค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง (Area Under the Curve, AUC) เป็นพื้นที่ที่นับตั้งแต่เริ่มให้ยาจนถึงอนันต์ ค่า AUC จะแสดงปริมาณยาที่มีอยู่ในร่างกายทั้งหมดนับตั้งแต่เริ่มให้ยาจนกระทั่งยาถูกกำจัดออกจาก ร่างกายจนหมด ค่า AUC สามารถหาได้จากสมการดังนี้

$$AUC = \int_0^{\infty} C \cdot dt$$

เรียกว่าเป็น moment อันดับศูนย์ ของ concentration-time profile ค่านี้อาจหาโดยการ integrate ก็ได้ ถ้าทราบค่าฟังก์ชันของความเข้มข้นที่เวลาต่าง ๆ ค่านี้จะมีค่าสูงถ้าดูดซึมดี หรือสามารถ ปลดปล่อยอย่างเหมาะสมจนยากำจัดออกช้า ในกรณีของยาฉีด IV Bolus จะใช้สมการ

$$AUC = (A/\alpha) + (B/\beta)$$

$$\text{เมื่อ } A = \frac{D(\alpha - k_{21})}{V_c(\alpha - \beta)} \quad B = \frac{D(k_{21} - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)}$$

α คือ ค่าคงตัวของอัตราการกระจายยา (Distribution Rate Constant)

β คือ ค่าคงตัวของอัตราการทำลายยา (Overall Elimination Rate Constant)

D คือ ขนาดยา (Dose)

V_c คือ ปริมาตรของส่วนกลาง (Volume of the Central Compartment)

k_{21} คือ ค่าคงตัวย่อย

การควบคุมให้ระดับความเข้มข้นของยาในเลือดอยู่ในช่วงการรักษาจำเป็นจะต้องให้ยาหลายๆครั้งต่อวัน เพราะตัวยาคจะถูกปลดปล่อยออกมามากที่สุดในตอนต้นๆ และลดปริมาณลงเรื่อยๆ จนหมด การให้ยาซ้ำในขนาดต่อมาจะได้ระดับยาในเลือดขึ้นๆลงๆเป็นแบบฟันเลื่อย ลักษณะเช่นนี้ทำให้เสี่ยงต่อการที่ระดับยาอาจต่ำมากจนไม่สามารถแสดงฤทธิ์ หรืออาจสูงมากจนเกิดอาการข้างเคียงหรือเป็นพิษได้ [ณรงค์, 2535]

ดังนั้น ระบบนำส่งยา เป็นการเตรียมยาในรูปแบบต่างๆ ที่สามารถควบคุมให้ปลดปล่อยยาในอัตราและปริมาณที่กำหนด และสามารถนำยาไปยังอวัยวะ หรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ เพื่อทำให้เกิดผลสูงสุดในการรักษาและลดผลข้างเคียง

2.1.1 รูปแบบของระบบนำส่งยา

รูปแบบของระบบนำส่งยาแบ่งออกเป็น 2 แบบ แบบแรก แบ่งออกได้ตามวิธีการให้ยา ได้แก่ ระบบที่ใช้รับประทาน ระบบที่ใช้ฉีด ระบบที่ใช้ทางตา ระบบที่ใช้ทางผิวหนัง ระบบที่ใช้สอดในช่องคลอด เป็นต้น และแบบที่สอง แบ่งออกตามกลไกการปลดปล่อยตัวยา เช่น ระบบที่ใช้หลักการแพร่ ระบบที่ใช้หลักการละลาย ระบบที่ใช้แรงดันออสโมซิส ระบบแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งระบบนำส่งยาในรูปแบบที่ต่างกัน จะมีกลไกและลักษณะการปลดปล่อยตัวยาที่แตกต่างกัน เช่น ยาในรูปแบบที่ปลดปล่อยโดยวิธีการละลาย ก็จะต่างไปจากการปลดปล่อยยาโดยวิธีแลกเปลี่ยนไอออน เป็นต้น [ณรงค์, 2535]

ปัญหาหลักในการออกแบบและผลิตระบบนำส่งยานั้น อาจแบ่งออกได้เป็นขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. ทำอย่างไร ยาจึงจะไปถึงและออกฤทธิ์ยังบริเวณที่ต้องการของร่างกาย
2. ทำอย่างไรยาจึงจะถูกปลดปล่อยออกมาในรูปแบบตามต้องการ ในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง
3. ทำอย่างไรจึงจะผลิตยาในรูปแบบที่เหมาะสมโดยมีลักษณะของการปลดปล่อยยาดังกล่าวได้

พอลิเมอร์นับเป็นองค์ประกอบสำคัญอันหนึ่ง ในระบบนำส่งยา ที่ช่วยควบคุมให้การปลดปล่อยยาเป็นไปตามต้องการ โดยทำหน้าที่ใน 3 ลักษณะใหญ่ๆ คือ เป็นสารช่วยควบคุมการปลดปล่อยให้เกิดซ้ำๆ และคงที่ในปริมาณที่ต้องการ เป็นตัวช่วยป้องกัน และนำส่งยาไปยังบริเวณเป้าหมายในร่างกาย โดยไม่ทำให้ยาเกิดการปลดปล่อย หรือตัวยาคถูกทำลายไปก่อน ทั้งนี้พอลิเมอร์ที่เลือกใช้ ต้องมีสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญคือ มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatible)

สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradable) และสามารถย่อยสลายในร่างกายได้เมตาบอไลต์ (metabolite) จากการย่อยสลายที่ไปเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จึงทำให้ไม่เป็นพิษ

ซึ่งโดยทั่วไปแล้วในระบบปลดปล่อย (controlled release system) ที่ใช้พอลิเมอร์เป็นตัวควบคุม จะต้องคำนึงถึงชนิด และสมบัติพื้นฐานของพอลิเมอร์ ชนิดของยาและระบบที่ใช้ควบคุมการปลดปล่อยยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปแบบของยาเตรียม (dosage form) ที่เป็นยากินซึ่งนิยมใช้กันมากที่สุดแบบหนึ่ง มักจะใช้หลักการแพร่ของยาผ่านเมทริกซ์พอลิเมอร์ โดยการเตรียมยากับพอลิเมอร์ในรูปแบบเมทริกซ์ปิด (matrix bead) ที่มียาถูกกักเก็บอยู่ในโครงสร้างปิด การปลดปล่อยยาจะอาศัยหลักการแพร่ของยาที่ละลายผ่านเมทริกซ์ปิดออกมา

ในระบบนำส่งยา การควบคุมการปลดปล่อยให้อยู่ในอัตราและปริมาณที่ต้องการนั้นมีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าตัวยาที่ใช้ในการรักษาเลยทีเดียว เนื่องจากการเตรียมยาเพื่อใช้ในการรักษาแบบเดิมๆ นั้น ยาจะถูกปลดปล่อยออกมาจนถึงระดับที่ให้ผลในการรักษาโดยทันที และค่อยๆ ลดระดับลงจนหมดฤทธิ์ จากนั้นผู้ป่วยต้องรับประทานยาใหม่ ทำให้ต้องเพิ่มความถี่ในการใช้ยา ในขณะที่การเตรียมยาในรูปแบบควบคุมการปลดปล่อย จะทำให้ระดับของยาในพลาสมาคงที่เป็นเวลานานตลอดช่วงการใช้ จึงไม่จำเป็นต้องใช้ยามากครั้ง

พอลิเมอร์ที่ใช้เป็นสารก่อเมทริกซ์ที่สำคัญมีสองประเภท คือ พอลิเมอร์ชนิดชอบน้ำ (hydrophilic polymer) และพอลิเมอร์ชนิดไม่ชอบน้ำ (hydrophobic polymer) มีการศึกษาเป็นจำนวนมากเพื่อนำสารเหล่านี้เป็นสารก่อเมทริกซ์โดยเฉพาะพอลิเมอร์ชนิดชอบน้ำ ขณะที่การศึกษาในพอลิเมอร์ชนิดไม่ชอบน้ำเพื่อเตรียมเป็นยาเม็ดเมทริกซ์มีน้อยกว่า

เทคนิควิธีการเตรียมและผลิตระบบนำส่งยามีมากมายหลายวิธีที่แตกต่างกันแบ่งเป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ คือ เทคนิคทางสรีรวิทยาหรือการให้ยาเพื่อให้มีฤทธิ์ยาวนานขึ้น, เทคนิคทางเคมี, เทคนิคทางฟิสิกส์หรือเภสัชกรรม ในที่นี้จะขอกกล่าวถึงเทคนิคทางฟิสิกส์หรือเภสัชกรรมซึ่งเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

เทคนิคการเตรียมและผลิตระบบนำส่งยาทางฟิสิกส์หรือเภสัชกรรม

1. แคปซูลทำด้วยสารพอลิเมอร์ ภายในบรรจุยาในรูปแบบของของแข็งหรือของเหลว ซึ่งอาจเป็นสารแขวนตะกอน หรือ สารละลาย การปลดปล่อยของตัวยาจะถูกควบคุมโดยการแพร่ (diffusion) ผ่านผนังของแคปซูล
2. การกระจายของอนุภาคในมาทริกซ์ (matrix) ที่เป็นของแข็ง ซึ่งอาจจะถูกหรือไม่ถูกทำลายในร่างกาย การปลดปล่อยของยาจะเกิดจากการแพร่ผ่านมาทริกซ์หรือเกิดจากการค่อยๆ กร่อนละลาย (erosion) ของมาทริกซ์ หรือทั้งสองอย่างรวมกัน

3. การแยกตัวยาคือเป็นชั้นๆซึ่งมีส่วนผสมของสารพอลิเมอร์ ที่แตกต่างกันและทำให้การปลดปล่อยของตัวยามีอัตราไม่เท่ากัน เช่น ยาเม็ดหลายชั้น
4. การกระจายของตัวยาในมาทริกซ์ไฮโดรเจล (hydrogel matrix) ซึ่งจะพองตัวเมื่อโดนน้ำ การปลดปล่อยของตัวยาจะเริ่มเกิดจากที่ผิวเข้าไปยังภายในของมาทริกซ์อย่างช้าๆ โดยยาที่ผิวนอกของมาทริกซ์จะถูกปลดปล่อยออกมาก่อน เนื่องจากผิวนอกของมาทริกซ์จะเปียกน้ำและพองตัวก่อนส่วนใน
5. ไมโครแคปซูล (microencapsulation) ยาจะถูกห่อหุ้มในสารละลายพอลิเมอร์ที่มีความหนืดมาก การปลดปล่อยของยาเกิดจากการแพร่อย่างช้าๆ ผ่านสารละลายพอลิเมอร์นี้ หรือเกิดจากการละลายของสารละลายพอลิเมอร์ที่ห่อหุ้ม
6. เกิดแรงยึดเกาะทางเคมี (chemical bond) ระหว่างตัวยากับโครงร่างพอลิเมอร์ ซึ่งอาจจะเป็นการเชื่อมต่อบน amide หรือ ester และการปลดปล่อยของตัวยาเกิดจากการ hydrolysis
7. เกิดจากโครงสร้างของโมเลกุลที่ใหญ่ของตัวยา โดยอาศัยแรงยึดเกาะแบบ ionic หรือ covalent linkages ซึ่งจะควบคุมการปลดปล่อยของยาโดยวิธี hydrolysis
8. โดยอาศัย mechanical หรือ chemical pump ซึ่งจะปลดปล่อยยาในอัตราเร็วที่ต้องการ

2.1.2 ยาฝังใต้ผิวหนัง (Implants)

ยาฝังใต้ผิวหนังใช้เพื่อให้เกิดการปลดปล่อยยาทันทีที่บริเวณที่เกิดโรคหรืออาการ หรือให้ยาออกฤทธิ์นาน ข้อเสียที่สำคัญของยาฝังใต้ผิวหนัง คือในการฝังหรือนำออกจากร่างกายมักก่อให้เกิดการเจ็บปวดมาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนามาใช้ระบบที่สลายตัวได้ทางชีวภาพ

คุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ควรนำมาใช้เตรียมยาฝังใต้ผิวหนัง (Kuhudic, 1994)

- สลายตัวได้ทางชีวภาพ ด้วยอัตราเร็วที่คาดการณ์ได้ และสามารถทำให้ปราศจากเชื้อได้
- ปราศจากพิษและสารจากการสลายตัวของพอลิเมอร์ไม่มีพิษ
- มีการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันและเนื้อเยื่อร่างกายน้อย ปกติการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันขึ้นกับขนาดและอัตราการสลายตัวของพอลิเมอร์ (Yamaguchi และคณะ ,1993)
- สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้อย่างเที่ยงตรงและถูกต้อง
- ยามีความคงตัวในพอลิเมอร์

ปัจจัยที่มีผลต่อการปลดปล่อยยาได้แก่ คุณสมบัติพอลิเมอร์ เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความหนืดรวมทั้งวิธีการผลิต โดยทั่วไปการปลดปล่อยยาขึ้นกับอัตราส่วนของยาต่อพอลิเมอร์ รวมทั้งค่าคงที่ของการแพร่และการละลายของยา ซึ่งขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีและน้ำหนักโมเลกุลของยา ถ้ามีอัตราส่วนนี้

ต่ำ จะทำให้ยาปลดปล่อยออกมาได้น้อยและอาจต้องใช้เวลารักษานาน การเพิ่มการปลดปล่อยยาทำได้ โดยการเติมสารที่ละลายน้ำได้ดี หรือการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จะยืดเวลาการปลดปล่อยยาได้ ในบางครั้งถ้าตัวยาไม่ละลายและอยู่ในรูปผลึกซึ่งไม่ละลายในพอลิเมอร์ ตัวยาจะไม่สามารถปลดปล่อยด้วยกลไกการแพร่ได้ แต่ขึ้นกับการสลายตัวและกร่อนตัวของพอลิเมอร์ ทั้งนี้ น้ำหนักโมเลกุล และความเป็นผลึกของพอลิเมอร์ จะมีผลอย่างมากต่อการสลายตัวของพอลิเมอร์

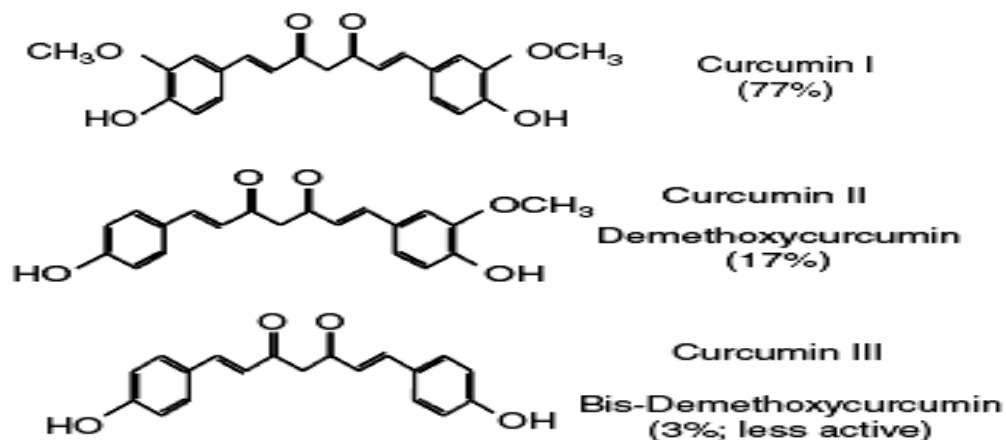
2.2 ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

ขมิ้นชันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ขมิ้นเป็นพืชที่มีลักษณะเป็นเหง้า (rhizome) ปลูกมากแถบตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่อินเดีย ไทย บังคลาเทศ ศรีลังกา อินโดนีเซีย ใต้หวัน บางส่วนของจีน และเกาะจาไมก้า ประกอบด้วยสารสำคัญคือ สารเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญตัวหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในเหง้าขมิ้นชันประมาณ 1-5% ผงขมิ้นชันถูกนำมาใช้ผสมอาหารเป็นเครื่องเทศ ใช้ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งและมัสดาร์ต ทางการแพทย์ขมิ้นมีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น โรคเกี่ยวกับระบบการย่อยอาหาร รักษาโรคผิวหนังบางชนิด มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและรา ฤทธิ์ต้านอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินซีและวิตามินอี มีฤทธิ์สามารถต่อต้านสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ต่อต้านโรคภูมิแพ้ ต่อต้านแบคทีเรียและต่อต้านมะเร็งได้

2.2.1 เคอร์คูมิน (curcumin)

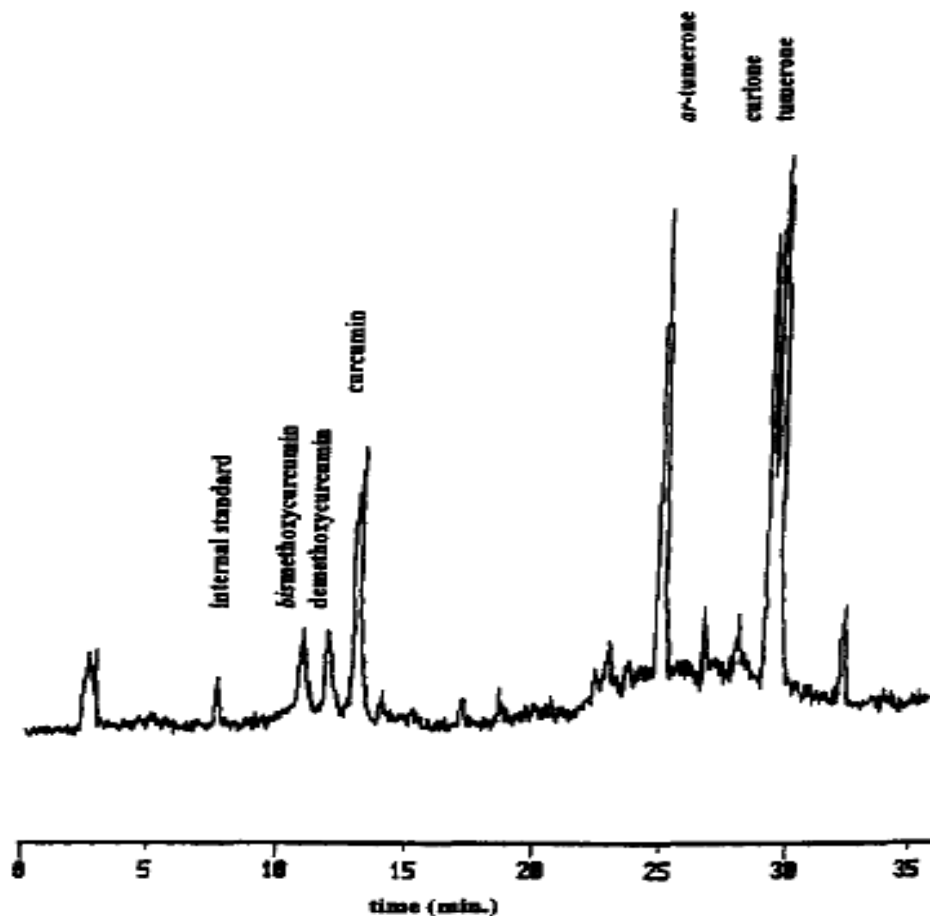
2.2.1.1 องค์ประกอบทางเคมี

สารเคอร์คูมินอยด์เป็นรงควัตถุสีเหลืองมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenolic compound) โครงสร้างทางเคมีของสารเคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วยกรดเฟอร์ริก (ferric acid) 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า diferuloylmethane สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันมีอยู่ 3 ชนิดด้วยกันคือ Bis-(feruloyl)methane หรือ 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ เคอร์คูมิน ($C_{21}H_{20}O_6$) เป็นเคอร์คูมินอยด์ที่พบมากที่สุด ในขมิ้นชัน คือ ประมาณ 77% สำหรับ Feruloyl-(p-hydroxycinnamoyl)methane หรือ demethoxycurcumin ($C_{20}H_{18}O_5$) และ Bis(p-hydroxycinnamoyl)methane หรือ bisdemethoxycurcumin ($C_{19}H_{16}O_4$) เป็นเคอร์คูมินอยด์ที่พบในขมิ้นชันในปริมาณที่น้อยกว่า เคอร์คูมิน ดังรูปที่ 2.2



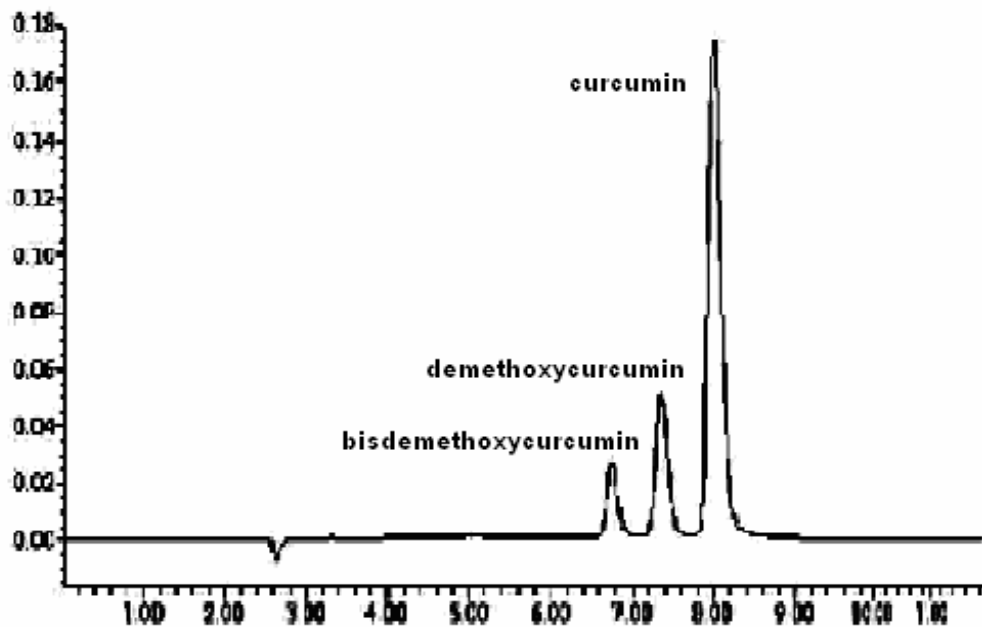
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ เคอร์คูมิน, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin
[ที่มา : Bharat B. Aggarwal และคณะ,2005]

ในปี 1996 Richard Hiserodt และคณะ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์หาปริมาณของเคอร์คูมิน (MW 368), Demethoxycurcumin (MW 338) และ Bisdemethoxycurcumin (MW 308) โดยใช้ column LC-18 และ Mobile phase A ใช้ citric acid ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (pH 3 ใช้ NaOH ในการปรับ pH), Mobile phase B ใช้ acetonitrile ที่อุณหภูมิ 136°C และ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที จากการทดลองจะพบ Bisdemethoxycurcumin 0.57% ที่เวลา 11 นาที , demethoxycurcumin 0.64% ที่เวลา 12 นาทีและ เคอร์คูมิน 1.75% ที่เวลา 13 นาที ตามลำดับดังรูปที่ 2.3



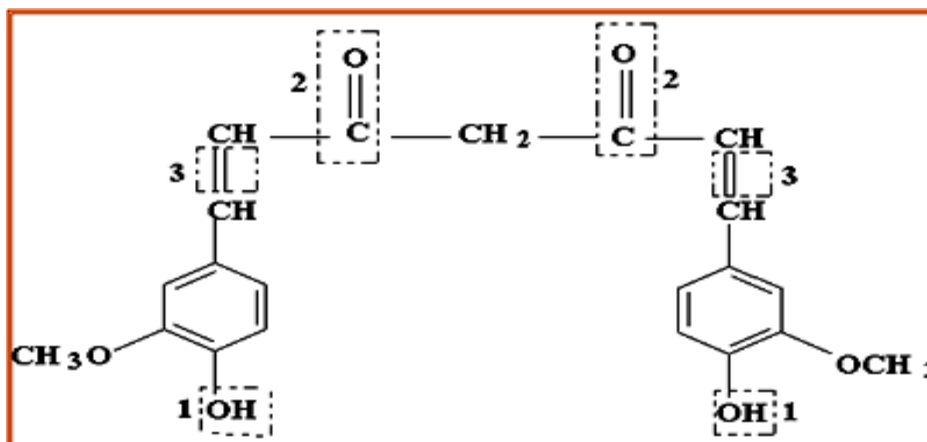
รูปที่ 2.3 แสดง peak ของเคอร์คูมิน และอนุพันธ์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ; column LC-18 และ Mobile phase A ใช้ citric acid ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (pH 3 ใช้ NaOH ในการปรับ pH), Mobile phase B ใช้ acetonitrile ที่อุณหภูมิ 136°C และ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที (ที่มา : Richard Hiserodt และคณะ, 1996)

ในปี 2006 ปรีชา บุญสูง และคณะ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์หาปริมาณของเคอร์คูมิน (MW 368), Demethoxycurcumin (MW 338) และ Bisdemethoxycurcumin (MW 308) โดยใช้ column LC-18 และ Mobile phase ที่ใช้คือ acetic acid ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, acetonitrile และ methanol โดยอัตราส่วนระหว่าง 1% acetic acid : acetonitrile คือ 45 : 55 , อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที, UV-detector วัดที่ $\lambda = 425 \text{ nm}$ จากการทดลองจะพบ Bisdemethoxycurcumin ที่เวลา 6.7 นาที , พบ Demethoxycurcumin ที่เวลา 7.3 นาที และ พบเคอร์คูมินที่เวลา 8.05 นาที ตามลำดับดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงกราฟ HPLC ของเคอร์คูมิน ในสภาวะ column C18 (250 x 4.6 mm.), flow rate 1 ml/min, mobile phase 1% acetic acid : acetonitrile (45:55), UV-detector วัดที่ $\lambda = 425$ nm, injection volume 20 μ l (ปรีชา และคณะ, 2006)

จากสูตรโครงสร้างทางเคมีของเคอร์คูมินจะพบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ 3 ส่วน ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของเคอร์คูมินและหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ

(ที่มา : Y. Sugiyama และคณะ, 1996)

1. Parahydroxyl groups – มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ

2. Keto group – มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ ต่อต้านมะเร็ง ต่อต้านการเปลี่ยนแปลง
3. Double bonds - มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ ต่อต้านมะเร็ง ต่อต้านการเปลี่ยนแปลง

2.2.1.2 คุณสมบัติของเคอร์คูมิน

เคอร์คูมินมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอมส้ม มีน้ำหนักโมเลกุล 368.97 ประกอบด้วย คาร์บอน 68.47% โดยน้ำหนัก, ไฮโดรเจน 5.47 % โดยน้ำหนัก, ออกซิเจน 26.02% โดยน้ำหนัก มีคุณสมบัติโดยทั่วไปดังนี้

ก) การละลาย

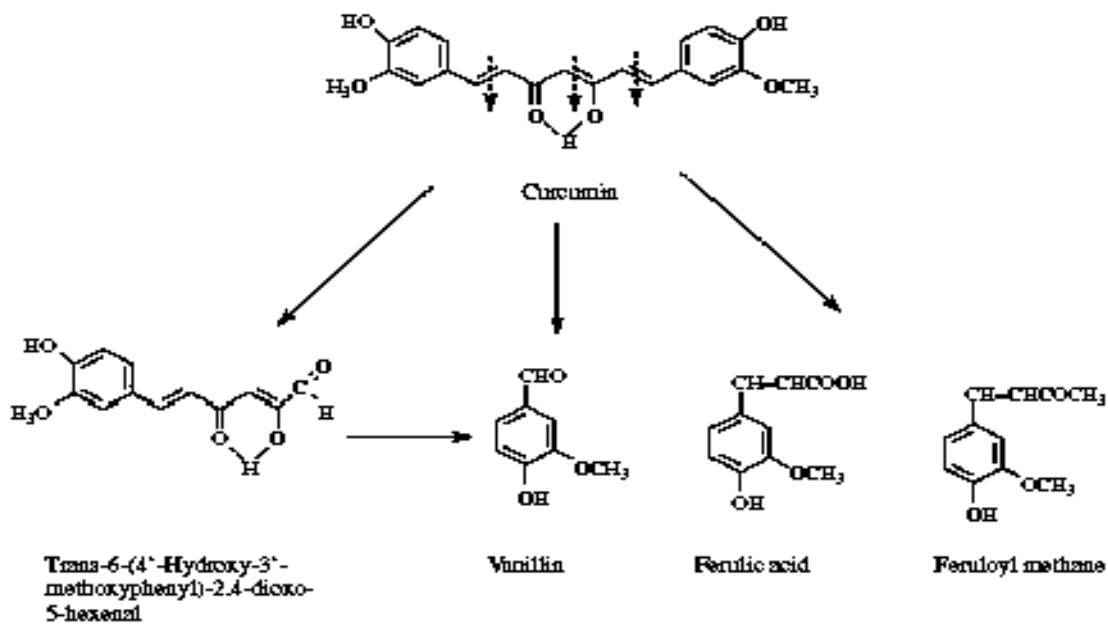
เคอร์คูมินไม่ละลายในน้ำและอีเทอร์ แต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์, กรดแกลเซียลอะซีติก (glacial acetic acid), คลอโรฟอร์ม (chloroform), คีโตน (ketone), อัลคาไล (alkali) และไขมัน เนื่องจากเป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว (nonpolar) [Ishita Chattopadhyay และคณะ, 2004]

ข) จุดหลอมเหลว (Melting point)

เคอร์คูมินในรูปผลึกสีเหลืองอมส้มจะมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 183-186 °C และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไปเป็นเกลืออัลคาไลสีน้ำตาลแดง [Ishita Chattopadhyay และคณะ, 2004]

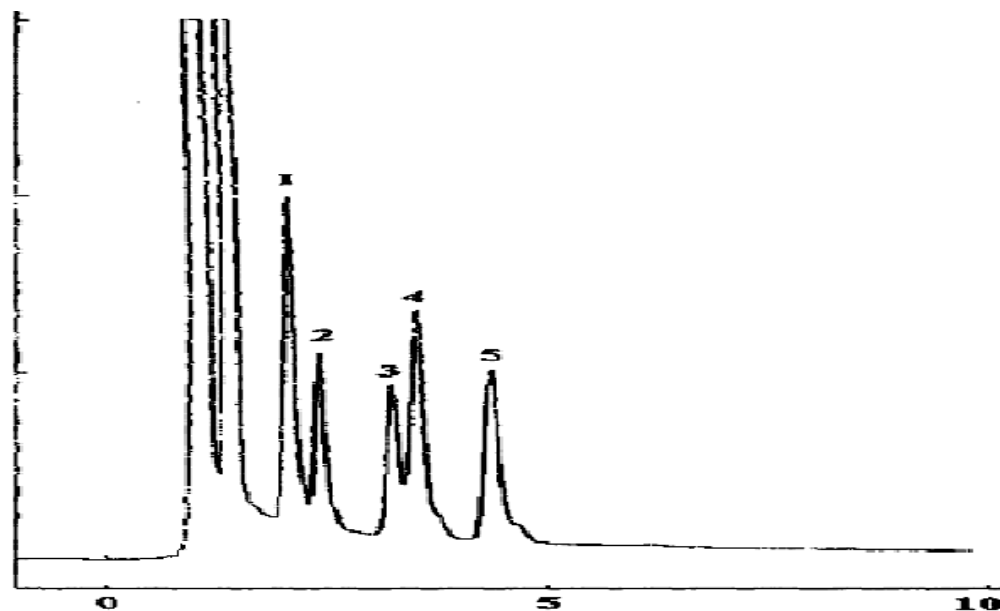
ค) ความคงตัว (Stability)

การสลายตัวของเคอร์คูมิน ขึ้นกับค่า pH ของสารละลาย โดยในสภาวะที่เป็นกรด (pH<7) เคอร์คูมินจะสลายตัวช้า แต่ในสภาวะที่เป็นด่าง (pH>7) เคอร์คูมินจะสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยมีการศึกษาพบว่าเมื่อนำเคอร์คูมินไปแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.2) ความเข้มข้น 0.1 ไมลาร์ เคอร์คูมินจะสลายตัวประมาณ 90 % ภายในเวลา 30 นาที และจากการวิเคราะห์ ผลิตภัณฑ์ที่สลายตัวโดยใช้เครื่อง HPLC และ GC/MS พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักของการสลายตัวของเคอร์คูมินคือ trans-6-(4'- hydroxyl-3'- methoxyphenyl)-,4-dioxo-5-hexenal (molecular weight 248) และผลิตภัณฑ์รองของการสลายตัวคือ vanillin, ferulic acid, feruloyl methane ดังรูปที่ 2.6 และ 2.7 และพบว่า fetal calf serum (FCS), human blood หรือการเติมสาร antioxidants เช่น ascorbic acid (C₆H₈O₆), N-acetylcysteine (C₅H₉NO₃S) หรือ glutathione (C₁₀H₁₇N₃O₆S) สามารถป้องกันการสลายตัวของเคอร์คูมินในอาหารเลี้ยงเซลล์ (cell culture medium) หรือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ได้โดยเมื่อแช่เคอร์คูมินในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มี fetal calf serum หรือ human blood ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เคอร์คูมินจะสลายตัวประมาณ 20 % ภายใน 1 ชั่วโมง และหลังจากให้ความร้อน 8 ชั่วโมง พบว่ายังมีเคอร์คูมินเหลืออยู่อีก ดังนั้นจะเห็นว่าเมื่อเติม serum free medium ลงไปจะช่วยให้เคอร์คูมินมีความคงตัวมากขึ้น [Wang และคณะ, 1996]



รูปที่ 2.6 แสดงการสลายตัวของเคอร์คูมินใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2

[Wang และคณะ, 1996]



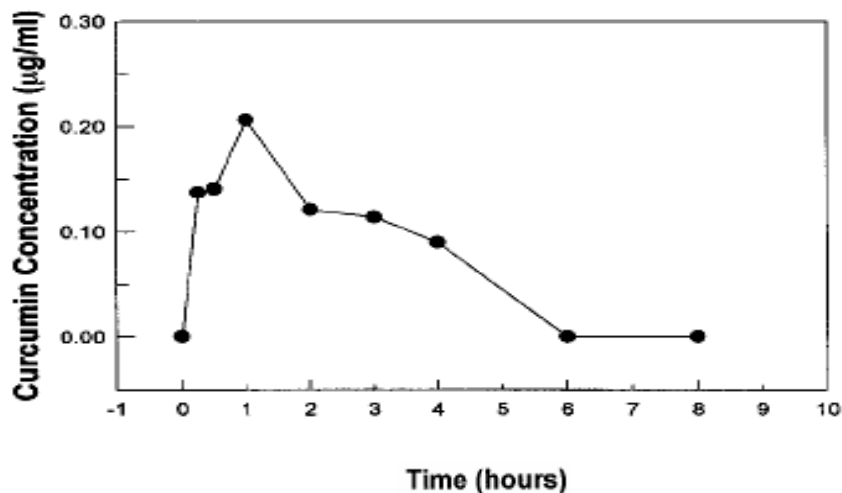
รูปที่ 2.7 แสดงกราฟ HPLC ของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของสารละลายเคอร์คูมินใน 0.1 M phosphate buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในสภาวะ column C18 (250 x 4.6 mm.), flow rate 1 ml/min, mobile phase 35% methanol และ acetic acid, UV-detector วัดที่ $\lambda = 280$ nm, injection volume 20 μ l . (1) vanillic acid, (2) vanillin, (3) ferulic acid, (4) ferulic aldehyde และ (5) feruloyl methane

จากงานวิจัยของ Tonnesen H. and Karlson (1987) ได้ศึกษาความคงตัวของเคอร์คูมินบนตัวยาทั้งหมด 4 ชนิด คือ nifedipine ($C_{17}H_{18}N_2O_6$), clonazepam ($C_{15}H_{10}ClN_3O_3$), furosemide ($C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$) และ chloramphenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) ที่ถูกละลายใน polyethylene glycol 400 (PEG400) เปรียบเทียบกับตัวยาที่ไม่มีเคอร์คูมินโดยการนำตัวอย่างไปส่องแสงที่ 240-600 nm แล้วหาปริมาณของยาที่สลายตัวด้วยเครื่อง HPLC จากการศึกษพบว่าเคอร์คูมินมีความคงตัวบนตัวยา 2 ชนิด คือ furosemide และ chloramphenicol มากกว่า nifedipine และ clonazepam ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสลายตัวไม่แตกต่างกับตัวยาที่ไม่มีเคอร์คูมิน

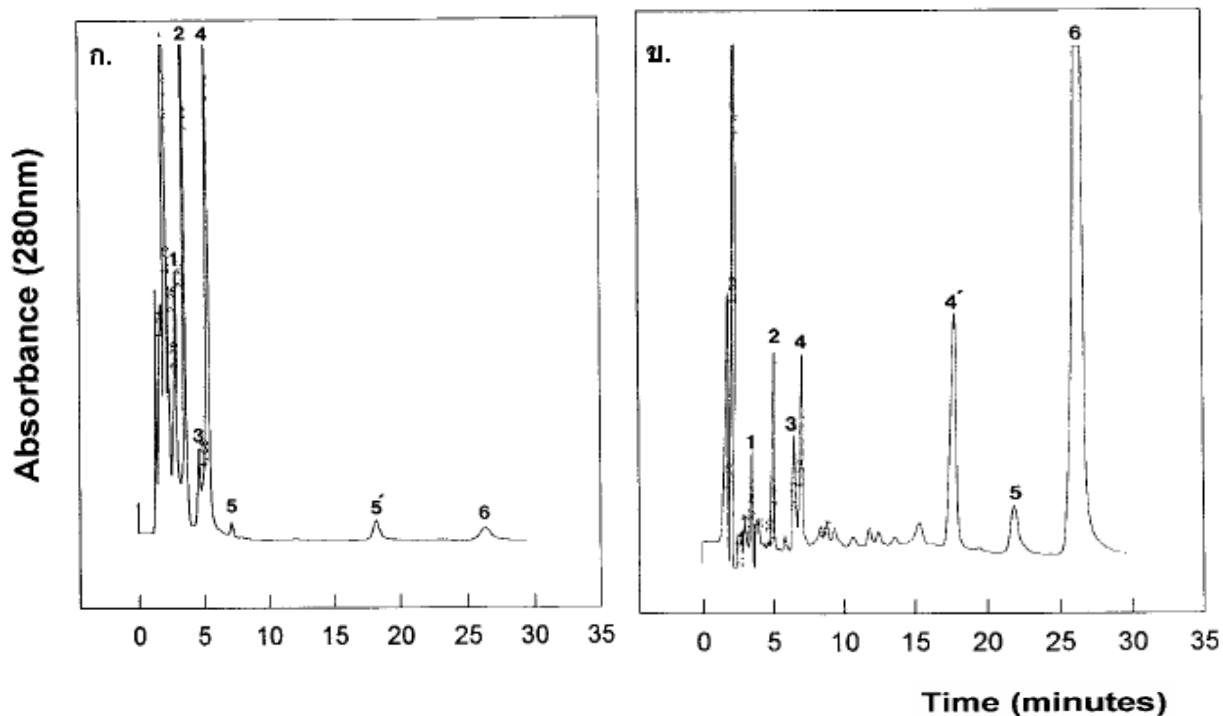
2.2.1.3 การวัดปริมาณของเคอร์คูมิน

การหาปริมาณของเคอร์คูมินสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น UV, HPLC, TLC และ HPTLC ซึ่งมีคณะผู้วิจัยบางกลุ่มได้ทำการศึกษาหาปริมาณของเคอร์คูมินโดยใช้วิธีต่างๆกัน

ในปี ค.ศ. 1998 Min-Hsiung Pan และคณะ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ column C-18 และ Mobile phase ใช้ 40 เปอร์เซ็นต์ ของ THF และ 60 เปอร์เซ็นต์ ของ citric acid ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (pH 3 ใช้ KOH ในการปรับ pH) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ในการวิเคราะห์เคอร์คูมินในเลือดของหนูทดลอง (BALB/c mice อายุ 6-7 สัปดาห์ น้ำหนัก 18-20 กรัม) จากการป้อนทางปาก (1 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวหนู) โดยพบเคอร์คูมินที่มีความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมาที่ 1 ชั่วโมง (0.22 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และจะลดต่ำลงเรื่อยๆ ภายใน 6 ชั่วโมง (5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ดังรูปที่ 2.8 เมื่อทดลองเติมเอนไซม์ β -glucuronidase ลงในพลาสมาจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่สภาวะเดียวกัน จะพบพีคของเคอร์คูมินและ เตตระไฮโดรเคอร์คูมิน (tetrahydrocurcumin (THC)) เกิดขึ้นพร้อมกันดังรูปที่ 2.9

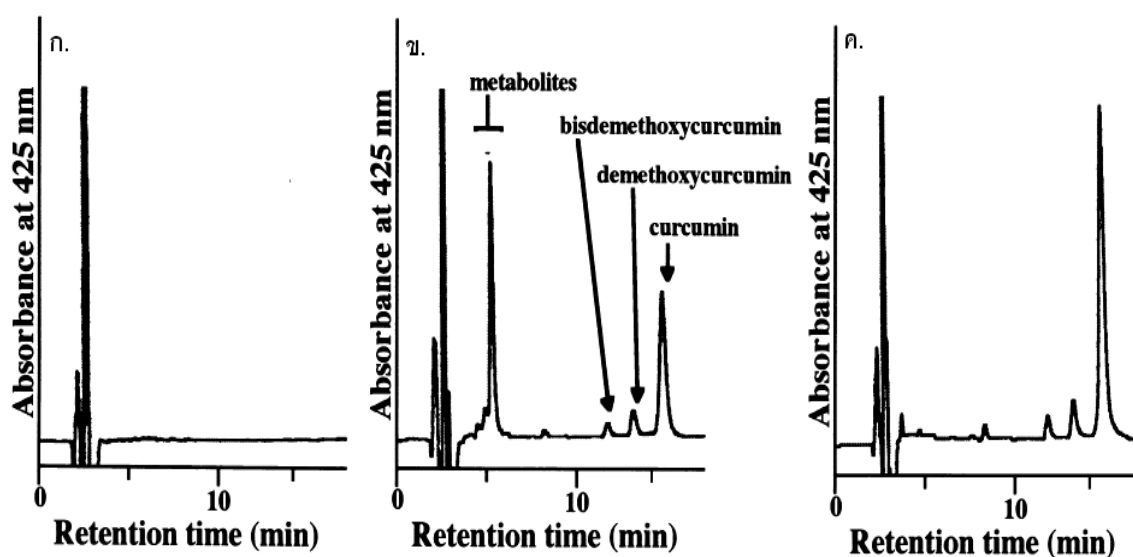


รูปที่ 2.8 ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในพลาสมาของหนูทดลองโดยการป้อนทางปาก (1 กรัม/กิโลกรัมของหนู) [Min-Hsiung Pan และคณะ, 1998]



รูปที่ 2.9 แสดงกราฟ HPLC ของ (ก.) พลาสมาหลังจาก 1 ชั่วโมงที่ป้อนเคอร์คูมินทางปาก. (1) - hexahydrocurcumin-glucuronoside; (2) - THC-glucuronoside, (3) - dihydrocurcumin; (4) - curcumin-glucuronoside; (5) and (5') - THC; (6) - curcumin. (ข.) หลังจากที่ได้เติม β - Glucuronidase. (1) - THC-glucuronoside; (2) - curcumin-glucuronoside; (3) - hexahydrocurcumin; (4) and (4') - THC; (5) - dihydrocurcumin; (6) - curcumin. [Min-Hsiung Pan และคณะ, 1998]

ในปี ค.ศ. 2000 Akira Asai และคณะ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ column C-18 และ Mobile phase ใช้ acetonitrile / น้ำ ในอัตราส่วน 48 : 52 (v/v) , อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที, UV-detector ที่ 425 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์เคอร์คูมินในเลือดของหนูทดลองเพศผู้ (Sprague-Dawley rat อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนัก 210 - 240 กรัม) โดยการป้อนทางปาก (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวหนู) แล้วเก็บผลเลือดที่เวลา 0, 5, 1, 3, 8 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทดลองเติมเอนไซม์ β -glucuronidase และ β -glucuronidase/sulfatase type VIII ลงในพลาสมาแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่สภาวะเดียวกัน พบว่าพลาสมา (สกัดหลังจากป้อนเคอร์คูมิน 1 ชั่วโมง) ที่เติม β -glucuronidase เกิดพีคขึ้น 3 พีคคือพีคเคอร์คูมินอยด์ 3 พีค และพีค metabolite 1 พีค ในขณะที่พลาสมาที่เติม β -glucuronidase/sulfatase type VIII ไม่ปรากฏพีคของ metabolite แต่พบพีคของเคอร์คูมินอยด์เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 2.10

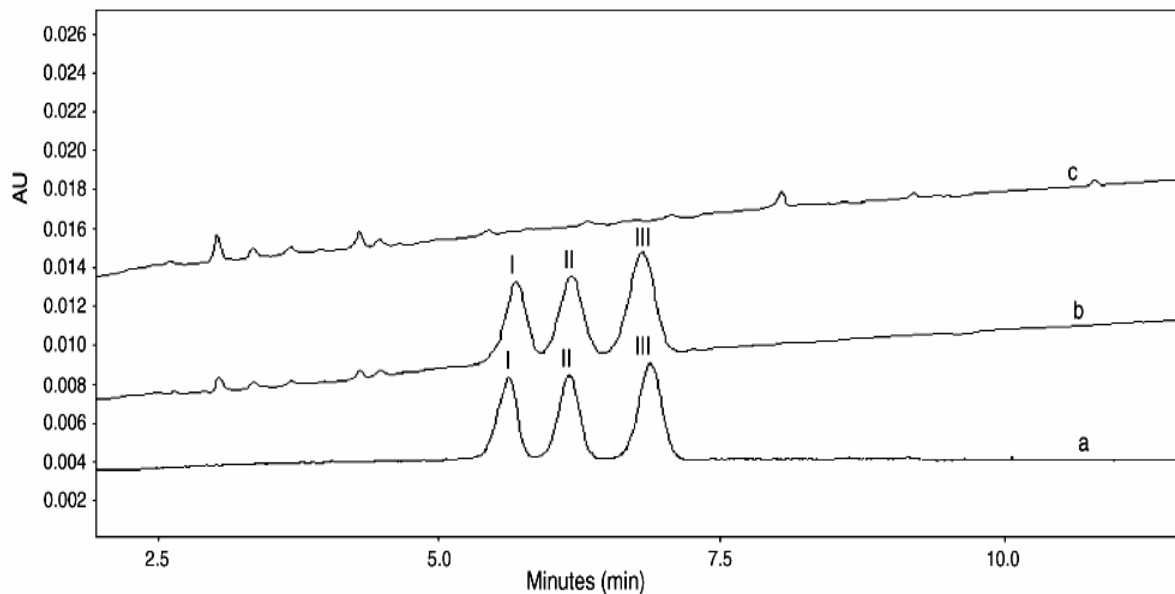


รูปที่ 2.10 แสดงกราฟ HPLC ของ (ก.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูก่อนป้อนเคอร์คูมินอยด์, (ข.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูหลังป้อนเคอร์คูมินอยด์ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปป่มด้วย b-glucuronidase และ (ค.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูหลังป้อนเคอร์คูมินอยด์ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปป่มด้วย b-glucuronidase/sulfatase

ในปี ค.ศ. 2003 Dennis D. Heath และคณะพัฒนาวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินในพลาสมา(plasma) และในปัสสาวะ(urine) โดยสกัดเคอร์คูมินจากตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ด้วย ethyl acetate ผสมกับ

เมทานอล internal standard คือ β -17-estradiol acetate วิเคราะห์โดยใช้ column C-18 และ Mobile phase ใช้สารผสมของ acetonitrile-methanol-water-acetic acid (ที่อัตราส่วน 41:23:36:1 โดยปริมาตร ตามลำดับ) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยพบเคอร์คูมินในพลาสมาและในปัสสาวะมากกว่า 96 % จากการทดลองแสดงว่าวิธีนี้ ใช้ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำในการวัดความเข้มข้นของเคอร์คูมินในพลาสมาและปัสสาวะ

ในปี ค.ศ. 2005 Yuan K และคณะได้ประยุกต์ใช้ capillary zone electrophoresis ในการแยกและการหาปริมาณของเคอร์คูมินในปัสสาวะ จากการทดลองให้หนูกินเคอร์คูมินในปริมาณ 2 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู หลังจากนั้น 12 ชั่วโมง นำปัสสาวะของหนูที่ได้มาแยกและหาปริมาณเคอร์คูมินโดยใช้วิธี capillary electrophoresis (CE) ร่วมกับ photodiode array detection (DAD) แล้วเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆที่มีผลต่อการแยกเคอร์คูมิน เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ความต่างศักย์ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแยกและหาปริมาณเคอร์คูมินโดยผลการทดลองที่ได้พบว่า เมทานอลมีผลกระทบต่อการทำงานของเคอร์คูมินซึ่งจะสามารถแยกได้ดีเมื่อ ความเข้มข้นของ เมทานอลคือ 10 %(v/v) และบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 15 mM และค่าความเป็นกรดต่าง 10.8 ส่งผลให้เกิด peak ที่ดีและมีประสิทธิภาพ อุณหภูมิและความต่างศักย์ที่เหมาะสมในการทดลอง คือ 30 °C , 25 kV และที่ absorbance 262 nm พบว่า เคอร์คูมินจะแยกได้ดีโดยปราศจาก peak อื่นมารบกวน ซึ่งจากการทดลองจะพบเคอร์คูมินในปัสสาวะมากกว่า 93.6 % และมีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยกว่า 2.3 % จากผลที่ได้แสดงว่าวิธีนี้ง่าย, รวดเร็ว และแม่นยำในการแยกและหาปริมาณเคอร์คูมิน ในปัสสาวะ ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 Electrophoretogram ของ (a) สารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ (I: เคอร์คูมิน, II: demethoxycurcumin, III: bisdemethoxycurcumin), (b) เคอร์คูมินอยด์ ในบัฟเฟอร์และ (c) blank บัฟเฟอร์. ในสภาวะ running buffer 15 mM sodium tetraborate buffer ที่ประกอบด้วย 10 % methanol (v/v) ที่ pH 10.8 อุณหภูมิ 30 °C และความต่างศักย์ คือ 25 kV [Yuan K. และคณะ, 2005]

ในปีเดียวกัน M.J. Ansari และคณะ ได้หาปริมาณของเคอร์คูมินในรูปแบบเม็ดยาและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายของเคอร์คูมิน โดยใช้วิธี high-performance thin - layer chromatographic (HPTLC) ในการวิเคราะห์โดยในการทดลองจะทำการฉีดตัวอย่างลงบน aluminium plate ด้วยอัตราคงที่ 150 μ l/s และ mobile phase ประกอบด้วย chloroform : methanol (ที่อัตราส่วน 9.25 : 0.75 v/v) จากการทดลองพบว่าเคอร์คูมินที่ถูกละลายในแก๊สเฉื่อยอะซิติกและโซเดียมไฮดรอกไซด์จะไม่พบเคอร์คูมินหลงเหลืออยู่เลยและเมื่อเกิดการออกซิเดชันจะได้ percent recovery เท่ากับ 19 % หลังจากนั้นเมื่อนำเคอร์คูมินไปฉายรังสี UV ที่ 254 nm และนำไปวางไว้ให้โดนแสงอาทิตย์โดยตรงจะได้ percent recovery เท่ากับ 49 % และ 53.5 % ตามลำดับจะเห็นว่าที่ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เบส มีแสง และเกิดการออกซิเดชัน มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายของเคอร์คูมิน

จากงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาเชิงปริมาณวิเคราะห์ของสารประกอบเคอร์คูมินด้วยวิธีต่างๆที่ผ่านมา พบว่าการใช้ UV-vis spectrophotometry method จะวิเคราะห์ได้แต่ปริมาณของสารประกอบรวมเท่านั้น ไม่สามารถแยกวิเคราะห์องค์ประกอบของสารประกอบได้ การใช้

TLC- spectrophotometric Method ต้องใช้เวลามากในการวิเคราะห์ การใช้ HPLC method แม้จะสามารถแยกองค์ประกอบของสารประกอบออกมาได้ แต่ peak มักมี tailing และมี peak ที่กว้าง แต่การใช้ Thin – layer Chromatographic – Densitometry Method พบว่าสามารถแยกองค์ประกอบของสารประกอบออกจากกันได้ดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย

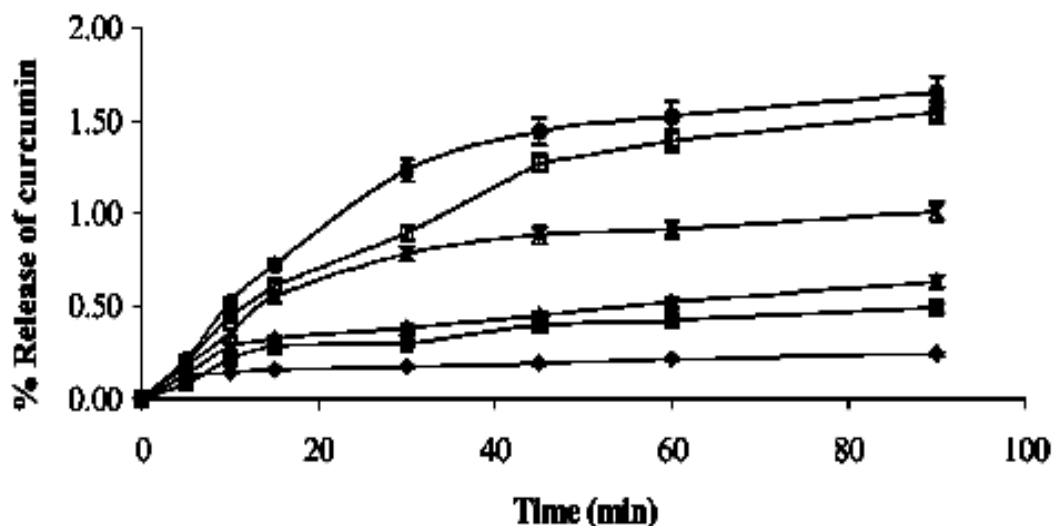
2.2.1.4 ระบบนำส่งของเคอร์คูมิน

การนำส่งเคอร์คูมินในรูปแบบยา (หรือชีววัตถุอื่นๆ) ที่มีลักษณะการปลดปล่อยออกจากระบบนำส่ง (ในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาเม็ด, pellet, หรือแผ่นแปะ เป็นต้น) โดยลักษณะการปลดปล่อยนั้นจะต้องเป็นไปตามที่ได้วางแผนไว้, สามารถทำนายได้, และสามารถควบคุมได้ว่าจะให้ปลดปล่อยออกมาในช่วงใด ด้วยอัตราเร็วเท่าใด โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาการนำส่งในรูปแบบต่างๆ ดังนี้

ในปี 2003 D. Gopinatha และคณะได้พัฒนาขบวนการรักษาบาดแผลที่ผิวหนังโดยการใช้เคอร์คูมินร่วมกับคอลลาเจน [curcumin incorporated collagen matrix (CICM)] เพื่อทำให้เกิดการปลดปล่อยเคอร์คูมินที่ช้าลง โดย คอลลาเจนเป็นวัตถุดิบอย่างดีสำหรับการรักษาบาดแผล เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เข้ากันได้กับร่างกายและสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ จึงไม่เป็นพิษกับร่างกาย การทดลองในขั้นแรกเริ่มจากการนำคอลลาเจนมาผสมกับกับเคอร์คูมินขึ้นรูปเป็นฟิล์มแล้วนำไปทดลองรักษาบาดแผลกับสัตว์(หนู) ซึ่งจะถูกทำให้มีบาดแผลโดยแบ่งหนูออกเป็นสามกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ได้แก่ กลุ่ม 1 control กลุ่ม 2 CFs group (collagen films group) และ กลุ่ม 3 CICM group จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยวิธี Histological analysis และ Statistical analysis จากการทดลองพบว่าบาดแผลของสัตว์จะอยู่ในรูปสะเก็ดแผลในระหว่างวันที่ 7 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลของ Biochemical parameters และ histological analysis พบว่าจะมีการลดลงของบาดแผล และการเพิ่มขึ้นของเซลล์ใน CICM group และ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสัตว์ 3 กลุ่มพบว่า CICM group จะมีการลดลงของบาดแผล, การลดลงของ antioxidant enzyme SOD, การเพิ่มขึ้นของ protein content , การเพิ่มขึ้นของ Hydroxyproline content และ อัตราของ catalase activity มากกว่า CFs และ control group แสดงว่า สามารถนำ CICM ไปประยุกต์ใช้ในการรักษาบาดแผลได้

ในปี ค.ศ. 2004 Anant Paradkar และคณะ ศึกษาการปลดปล่อยของเคอร์คูมินในอนุภาคของ polyvinyl pyrrolidone PVP (เคอร์คูมิน - PVP solid dispersion) โดยผสมเคอร์คูมิน และ PVP ในตัวกลางที่เป็นกรดที่อัตราส่วนของ เคอร์คูมิน:PVP เท่ากับ 1:1, 1:3, 1:7 และ 1:10 เติริยมอนุภาคด้วยวิธี spray drying และทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมิน โดยนำไปแช่ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น

0.1 โมลาร์ (pH 1.2) พบว่าการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคที่อัตราส่วน 1:1, 1:3 และ 1:5 จะน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่อัตราส่วน 1:7 และ 1:10 จะมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านไป 90 นาที ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 การปลดปล่อยของเคอร์คูมิน (◆) เปรียบเทียบกับที่ผสม PVP ที่อัตราส่วน 1:1 (■), 1:3 (▲), 1:5 (×), 1:7 (□) และ 1:10 (●)

[Paradkar A.,1997]

2.3 มะเร็ง [หนังสือสารานุกรมไทยเล่ม 9,2542]

มะเร็งเกิดจากเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติ มีโอกาสเกิดได้กับอวัยวะทุกส่วนของร่างกาย สามารถทำลายเนื้อเยื่อใกล้เคียงและกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้ โดยผ่านไปตามต่อมน้ำเหลืองและกระแสเลือด

นอกจากก้อนมะเร็งจะมีการเติบโตแทรกซึมเข้าไปยังเนื้อเยื่อปกติโดยรอบแล้ว ยังมีการแพร่กระจายไปได้ไกล ๆ เพราะเซลล์มะเร็งมักจะหลุดออกจากกันได้ง่าย เนื่องจากที่ผนังของเซลล์มะเร็งจะมีแคลเซียมไอออนน้อยกว่า และมีประจุไฟฟ้ามากกว่าที่ผนังของเซลล์ปกติ นอกจากนี้ ยังพบว่าในก้อนมะเร็งยังมีน้ำย่อยชนิดที่จะละลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น น้ำย่อยโปรตีน (protease) น้ำย่อยสารไฮอะลิเนน (hyaluronidase) และน้ำย่อยอะมิโนเปปไทด์ (amino peptidase) เซลล์มะเร็งมักจะเป็นรูปกลมต่างจากเซลล์ปกติ ซึ่งมักจะเป็นรูปแบน ดังนั้น เซลล์มะเร็งจึงมีส่วนสัมผัสและการยึดเหนี่ยวระหว่างเซลล์น้อยทำให้เซลล์สามารถแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆได้เนื่องจากเซลล์หลุดจากกันได้ง่าย แล้ว

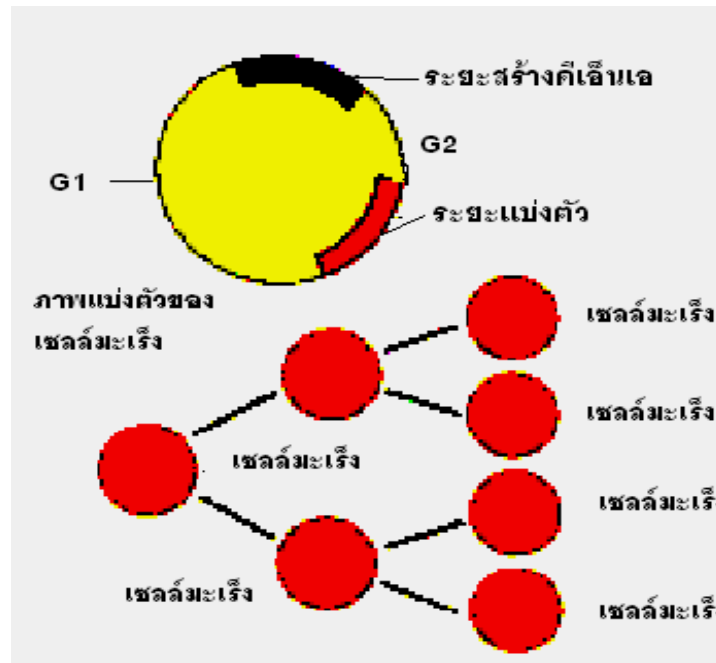
แทรกตัวเข้าตามผนังของหลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลือง (diapedesis) เหมือนเม็ดเลือดขาว หรือจากการแตกของหลอดเลือด ทำให้เซลล์มะเร็งเข้าในกระแสเลือดหรือกระแสน้ำเหลืองได้โดยเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งเมื่อหลุดจากก้อนมะเร็งแล้วสามารถแพร่กระจายได้ 4 วิธี คือ

1. *โดยทางกระแสเลือด* เซลล์มะเร็งจะหลุดเข้ากระแสเลือด แล้วไปเจริญเติบโตในอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ กระดูก สมอง ฯลฯ
2. *โดยทางกระแสน้ำเหลือง* เซลล์มะเร็งหลุดเข้าหลอดน้ำเหลืองแล้วไปเจริญเติบโตในต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง ทำให้ต่อมน้ำเหลืองมีขนาดโตได้มาก ๆ และจากต่อมน้ำเหลืองนี้ เซลล์มะเร็งอาจจะแพร่กระจายเข้าสู่หลอดเลือดอีกทอดหนึ่งก็ได้
3. *โดยการฝังตัวของเซลล์มะเร็ง (implantation)* โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากตำแหน่งเดิม และไปเจริญที่ส่วนอื่น อาจจะเป็นการหลุดโดยธรรมชาติ หรือการหลุดโดยการกระทำของแพทย์ เช่น ขณะผ่าตัด เป็นต้น
4. *โดยการไปจับหรือรวมตัวตามพื้นผิวของผนังเยื่อช่องท้อง (transcoelomic)* โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากก้อนมะเร็ง และไปงอกตามพื้นผิวของเยื่อช่องท้องต่าง ๆ เหมือนกับต้นกาฝากที่แพร่จากกิ่งไม้กิ่งหนึ่งไปยังกิ่งติด ๆ กัน เช่น ตาม พื้นผิวของเยื่อช่องท้อง ช่องปอด เป็นต้น

2.3.1 ขบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง

เมื่อเกิดเป็นสารเซลล์มะเร็งแล้ว เนื่องจากว่าเซลล์มะเร็งมีความพิการหรือการผิดปกติที่ยีนหรือโครโมโซม ฉะนั้น เซลล์มะเร็งจะแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และให้เซลล์ลูกที่เป็นเซลล์มะเร็งเสมอ จะไม่แบ่งตัวให้เซลล์ลูกที่เป็นเซลล์ปกติ ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า เซลล์มะเร็ง มีคุณสมบัติของการถ่ายทอดทางตรง (breed-trueproperty) ซึ่งเซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโต โดยมีวงชีพของเซลล์เหมือนเซลล์ปกติ คือ เมื่อเซลล์แบ่งตัวให้เป็นเซลล์ลูก 2 เซลล์แล้ว บางเซลล์อาจอยู่นอกวงชีพของเซลล์เรียกว่า ระยะจี 0 (G_0) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีการเจริญเติบโต แต่ไม่ตาย และอาจจะกลับเข้าสู่วงชีพของเซลล์ได้ ถ้ามีสิ่งกระตุ้น เซลล์ส่วนใหญ่จะเข้าสู่ระยะ จี/1 (G_1), presynthetic หรือ postmitotic phase) เป็นระยะที่เซลล์เริ่มแสดงลักษณะเฉพาะของมัน และในตอนท้ายๆ ของระยะนี้จะมีการเตรียมการสร้างดีเอ็นเอโดยการสร้างน้ำย่อยต่าง ๆ ถัดไปจะเป็นระยะเอส (S, synthetic phase) คือมีการสร้างดีเอ็นเอจากนั้นจะเข้าสู่ระยะจี 2 (G_2), postsynthetic หรือ premitotic phase) ซึ่งไม่มีการสร้างดีเอ็นเออีก แต่มีการสร้างโปรตีนเพิ่มเพื่อนำไปสร้างอาร์เอ็นเอ และสุดท้ายเซลล์จะเข้าสู่ระยะเอ็ม (M) คือ ระยะแบ่งตัว (mitotic phase) เซลล์มะเร็งจะสร้างดีเอ็นเอช้ากว่าหรือใกล้เคียงกับเซลล์ปกติแต่เซลล์มะเร็ง

ตายยากกว่า เพราะเซลล์ค้างอยู่ในระยะใดระยะหนึ่งของวงชีพของเซลล์ ส่วนใหญ่ที่พบคือ ในระยะจี1 และ จี 0 การที่เซลล์มะเร็งตายน้อยกว่าเซลล์เกิดใหม่ และการที่เซลล์มะเร็งมักจะมีอัตราการแบ่งตัวเร็วกว่าเซลล์ปกติ จึงเป็นผลทำให้เซลล์มะเร็งรวมกันโตเป็นก้อน ดังรูปที่ 2.13 [หนังสือสารานุกรมไทย เล่ม 9,2542]

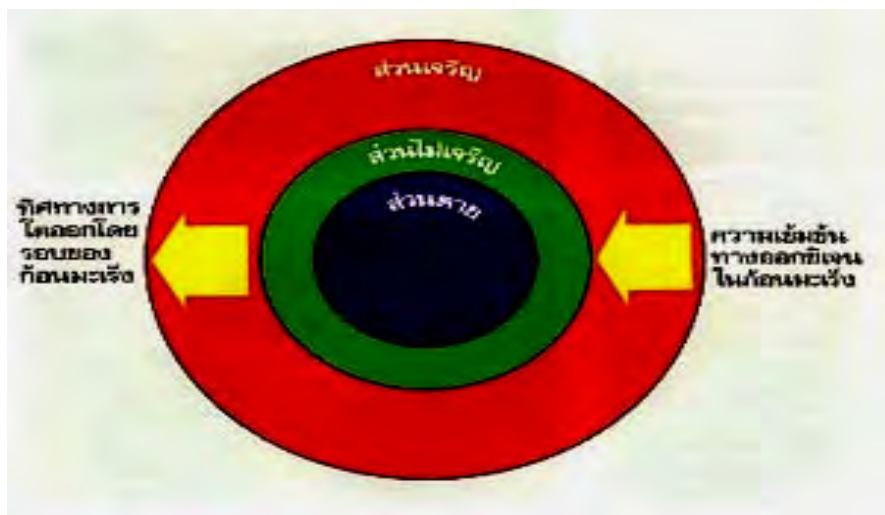


รูปที่ 2.13 แผนภาพแสดงกระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง [หนังสือสารานุกรมไทยเล่ม 9,2542]

ก้อนมะเร็งแต่ละก้อนจะมีหลอดเลือดมาเลี้ยงโดยเฉพาะ การโตของก้อนมะเร็งจะถูกควบคุมโดยสารชนิดหนึ่งที่เรียกว่า สารที่กระตุ้นการเจริญของเซลล์บุผนังด้านในของหลอดเลือดฝอย (tumour angiogenesis factor-TAF) การมีหลอดเลือดฝอยใหม่ ๆ เกิดได้เร็ว ก็จะทำให้ก้อนมะเร็งโตเร็วขึ้นด้วย ก้อนมะเร็งอาจจะแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ

- ก. ส่วนเจริญ เป็นส่วนรอบนอกของก้อนเซลล์ได้รับอาหารและออกซิเจนจากหลอดเลือดอย่างสมบูรณ์ แบ่งตัวได้เร็ว
- ข. ส่วนไม่เจริญอยู่ลึกถัดเข้ามา เป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตแต่ไม่แบ่งตัวส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะจี 1
- ค. ส่วนแกนหรือส่วนตาย อยู่ตรงกลางของก้อนมะเร็ง ประกอบด้วยเซลล์ที่ตายแล้ว อยู่ตรงกลางของก้อนมะเร็ง เพราะขาดออกซิเจน หรือถูกเบียดตาย แต่เซลล์ชั้นนอก ๆ ของส่วนนี้อาจจะไม่ตายแต่ไม่แบ่งตัว และส่วนใหญ่อยู่ในระยะจี 0 เพราะเซลล์สามารถได้กำลังงานจากการสลายตัวของไกลโคเจนในเซลล์เมื่ออยู่ในภาวะที่ขาดออกซิเจนเหมือนกับแบคทีเรียบางชนิด เนื่องจากออกซิเจนจากหลอดเลือด

ฝอยจะมีการซึมซาบได้ในระยะจำกัด และถ้าเซลล์อยู่ห่างจากหลอดเลือดฝอยเกินกว่าระยะทาง 150 ไมโครเมตร จะถือว่าเซลล์นั้นอยู่ในภาวะขาดออกซิเจน ฉะนั้น เมื่อก้อนมะเร็งมีขนาดโตขึ้น ส่วนแกนหรือส่วนตายจะมีขนาดโตขึ้นด้วย ในขณะที่ส่วนเจริญและส่วนไม่เจริญมักจะมีขนาดค่อนข้างคงที่ดังแสดงในรูป 2.14 [หนังสือสารานุกรมไทยเล่ม 9,2542]



รูปที่ 2.14 แผนภาพแสดงลักษณะของก้อนมะเร็ง [หนังสือสารานุกรมไทยเล่ม 9,2542]

2.3.2 การใช้เคอร์คูมินรักษามะเร็ง

ปัจจุบันพบว่าขมิ้นชันมีประโยชน์สำหรับผู้ป่วยมะเร็งเนื่องจากขมิ้นชันสามารถยับยั้งมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งในช่องปาก มะเร็งในระบบย่อยอาหาร มะเร็งผิวหนัง มะเร็งมดลูก เป็นต้น โดยขมิ้นชันจะมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างของมะเร็งที่ระยะเริ่มแรกและระยะสุดท้าย ยับยั้งผลของอนุมูลอิสระ กระตุ้นเอนไซม์ที่ใช้ในการจัดการสารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ลดปฏิกิริยาของโมเลกุลที่จะกลายเป็นมะเร็งและยับยั้งผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบที่ผลิตมาโดยก้อนมะเร็งในเซลล์บางชนิด ขมิ้นชันยังแสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งการคัดลอกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์บางชนิด

เคยมีการศึกษาในสัตว์ทดลองเช่น หนู โดยการทดลองมีการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งหลังจากนั้นให้หนูกินเคอร์คูมินเข้าไป พบว่าหนูจะเกิดอาการเป็นโรคมะเร็งลดลงร้อยละ 25-77 ของจำนวนหนูทั้งหมด และหนูที่มีอาการรุนแรงมีเป็นส่วนน้อย โดยเคอร์คูมินจะถูกดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็กได้ไม่ดี ทำให้เข้าสู่กระแสเลือดได้น้อย เคอร์คูมินส่วนใหญ่ถูกขับถ่ายออกทางอุจจาระอย่างรวดเร็ว และ

บางส่วนจะถูกขับออกทางปัสสาวะ แต่มีอีกส่วนหนึ่งที่ไปยังตับ และไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในการกำจัดสารก่อมะเร็ง [Ying-Jan Wang , และคณะ , 1996]

การศึกษาถึงความเป็นพิษของไขมันชั้นพบว่าเมื่อให้ผงไขมันชั้นแก่หนูถีบจักรทางปากขนาด 10 กรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ ผลการทดสอบพิษเรื้อรังของผงไขมันชั้นในหนูขาวโดยมีกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผงไขมันชั้นขนาด 0.03, 2.5 และ 5.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลานาน 6 เดือน ไม่พบว่ามีความผิดปกติในระบบใด ๆ ของสัตว์ทดลอง นอกจากพบว่าหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับไขมันชั้น 2.5 และ 5.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 8 และ 12 % ตามลำดับ [Sittisomwong N , 1990]

ในปี 2001 Silvia Busquets และคณะได้ศึกษาถึงผลของเคอร์คูมินต่อเซลล์มะเร็งโดยทำการทดลองในหนูซึ่งแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมให้มีการรักษาโดยเคอร์คูมิน กลุ่มที่มีการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งแต่ไม่ได้รับการรักษาโดยเคอร์คูมิน และกลุ่มที่มีการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งและทำการรักษาด้วยเคอร์คูมิน ตามลำดับ ซึ่งเคอร์คูมินที่ถูกละลายใน DMSO:PBS ในอัตราส่วน 1/1000 จะถูกให้ในปริมาณ 250-350 μ l เป็นเวลา 6 วันติดต่อกัน หลังจากนั้นจะทำการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยวิธี Flow cytometry จากการทดลองพบว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งและมีการรักษาด้วยเคอร์คูมินจะมีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตลดลง 31% และเมื่อทำการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยการนำเซลล์มะเร็งไปให้ความร้อนที่ความเข้มข้นต่างๆของเคอร์คูมิน ดังนี้ 0.5 μ M, 25 μ M และ 100 μ M ตามลำดับ เป็นเวลา 180 นาที พบว่า ที่ความเข้มข้นต่ำๆคือ 0.5 μ M เคอร์คูมินจะลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลง 24%และที่ความเข้มข้นสูงกว่า คือ 25 μ M และ 100 μ M จะมีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันที่เวลา 30 นาที หลังจากเติมเคอร์คูมินลงไป

ในปี 2005 Yoysungneon P. และคณะได้ศึกษาถึงผลของเคอร์คูมินต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า เคอร์คูมินอยด์ (Sigma Co. 95%) ในขนาด 3000มก./กก.นน.ตัว สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่ปลูกในหนูชนิดไมส์ได้โดยผ่านการยับยั้งการสร้างของหลอดเลือดใหม่ โดยคณะผู้วิจัย พบว่า เคอร์คูมินอยด์ (Sigma Co. 95%) ในขนาด 3000มก./กก.นน.ตัว สามารถยับยั้ง vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งมีรายงานว่าทั้ง VEGF และ COX-2 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Ferrara *et al.*, 1995; Rerrara, 1995; Kolch *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1992; Eberhart *et al.*, 1994).

จากการศึกษาวิจัยจำนวนมากช่วยยืนยันถึงผลของเคอร์คูมินว่ามีฤทธิ์เป็น anti-angiogenesis คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของหลอดเลือดใหม่ที่มะเร็ง จึงทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ได้ โดยงานวิจัยเหล่านั้นทำการศึกษาด้วยเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกัน อาทิเช่น เซลล์มะเร็งของผิวหนังและ เซลล์มะเร็งของลำไส้ แต่ผลก็ตรงกันคือเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ไม่ว่าจะ เป็นเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกัน ทั้งนี้เพราะกลไกที่เคอร์คูมินสามารถยับยั้งคือ การเจริญของหลอดเลือดใหม่ที่มะเร็งทุกชนิดจำเป็นต้องอาศัยกระบวนการนี้ (Huang, *et al.*, 1997, Rao *et al.*, 1995, Singh *et al.*, 1998) แต่ก็มีนักวิจัยบางกลุ่มที่เชื่อว่า เคอร์คูมินสามารถยับยั้งในกระบวนการแบ่งเซลล์ด้วย โดยผ่านทาง nuclear factor-KB and activator protein-1 (AP-1) (Huang *et al.*, 1991)

2.4 เจลาติน (gelatin)

2.4.1 คุณสมบัติของเจลาติน

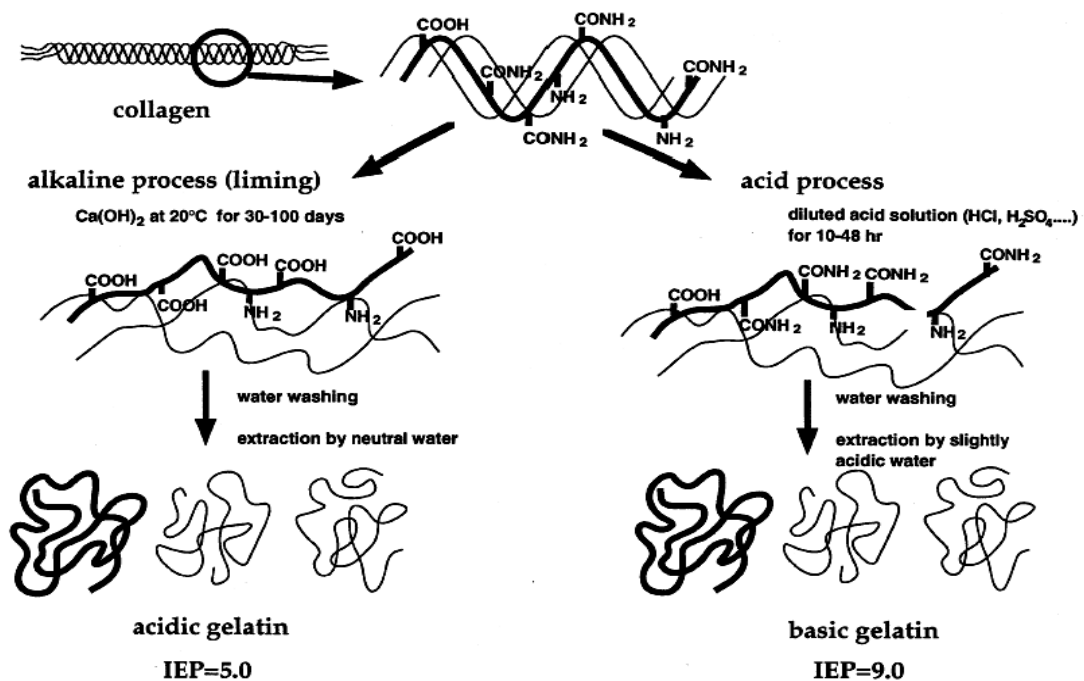
เจลาตินเป็นโปรตีนจากธรรมชาติ มีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน เกิดจากการทำให้คอลลาเจนเสียสภาพโดยขบวนการ acidic และ alkaline process และนำมาทำให้บริสุทธิ์ ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น ผ่านขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อโรค จากนั้นจึงทำให้แห้ง จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมา ซึ่งขั้นตอนการสกัดเจลาตินทั้งสองชนิดนี้ แสดงดังรูปที่ 2.15 โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรม และทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยา และอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ [Young, S. และคณะ, 2005] เจลาตินสามารถจะเกิดเป็นเจลใสและแผ่นฟิล์มที่ยืดหยุ่นได้ สามารถละลายในน้ำร้อน และเจลาตินประกอบด้วยโปรตีน 90-84%, แร่ธาตุ 1-2% และน้ำ 8-15% ซึ่งองค์ประกอบของเจลาตินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของคอลลาเจนที่ใช้และกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ [Tabata, Y. 1998]

1. Basic gelatin (เจลาติน Type A): ได้มาจาก acid process สกัดได้ยากกว่าแบบ alkaline process และเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดกับกลุ่ม amide ในคอลลาเจนมีน้อย จึงทำ

ให้เจลาตินมีค่า Isoelectric point (pI) 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนและเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

2. Acidic gelatin (เจลาติน Type B): ได้มาจาก alkaline process เป็นขบวนการ hydrolysis กลุ่ม amide ในคอลลาเจน ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่ม carboxyl ปริมาณมาก ทำให้เจลาตินมีประจุลบ และมีค่า Isoelectric point (pI) 5.0 ซึ่งเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส



รูปที่ 2.15 แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin
(ที่มา: Tabata, Y. Protein release from gelatin matrices 1998; 31: 287-301.)

สมบัติของเจลาติน Type A และ B สรุปดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบสมบัติของเจลาติน Type A และ B

Property	Type A	Type B
pH	3.8 - 5.5	5.0 - 7.5
Isoelectric point (pI)	7.0 – 9.0	4.7 – 5.4
Gel strength (bloom)	50 -300	50 – 300
Viscosity (cp)	15 -75	20 – 75
Ash (%)	0.3 -2.0	0.5 – 2.0

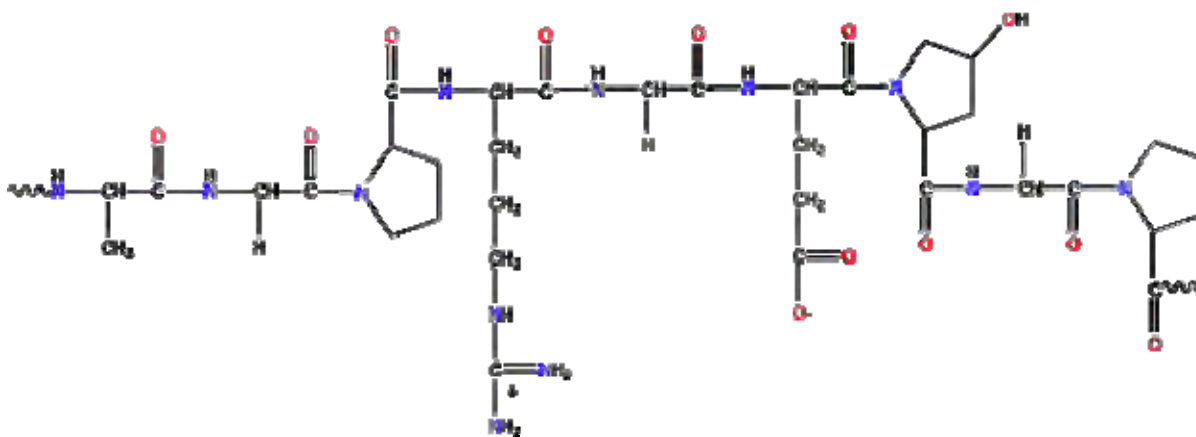
ลักษณะเฉพาะของเจลาติน คือ สารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่มีปริมาณสูง เช่น glycine, proline and hydroxyproline โดยมีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีนมากที่สุด และประกอบด้วย โพรลีนและ ไฮดรอกซีโพรลีน โดยรายละเอียดองค์ประกอบของเจลาตินสรุปดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงองค์ประกอบในเจลาติน

กรดอะมิโน	% กรดอะมิโนในเจลาติน
Alanine	8.9%
Arginine	7.8%
Asperic acid	6.0%
Glutamic acid	10.0%
Glycine	21.4%
Histidine	0.8%
Hydoxylysine	1.0%
Hydroxyproline	11.9%
Isoleucine	1.5%
Leucine	3.3%
Lycine	3.5%
Methionine	0.7%
Phenylanine	2.4%

Proline	12.4%
Serine	3.6%
Threonine	2.1%
Tyrosine	0.5%
Valine	2.2%
Total	100%

ซึ่งโครงสร้างของเจลาตินประกอบไปด้วยหน่วยซ้ำของกรดอะมิโน ที่เรียงตัวกันคือ -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro- ดังแสดงในรูป 2.16



รูปที่ 2.16 แสดงโครงสร้างของเจลาติน

(ที่มา : Lee, SB. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-3), (1-6) - β -glucan
2005; 24:2503-2511.)

2.4.2 การใช้เจลาตินในระบบนำส่งภายในร่างกาย

เจลาตินเป็น reversible thermo-set hydrogel กล่าวคือ เมื่อละลายน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่า gel point (ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส) จะเกิดเป็นเจล แต่เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิให้สูงกว่า gel point ก็จะสามารถเปลี่ยนสภาพกลับเป็นของเหลวได้อีก การใช้ประโยชน์จากเจลาตินในร่างกายจึงจำเป็นที่จะต้องมีการเชื่อมโยงพันธะ (crosslink) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลให้เป็นเครือข่ายร่างแห โดยการเชื่อมหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของเจลาตินอย่างถาวร ด้วยพันธะโควาเลนต์ การเชื่อมโยงพันธะของเจลาตินสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ การใช้สารเคมี ประเภทอัลดีไฮด์ เช่น glutaraldehyde การใช้เอนไซม์ Transglutaminase การใช้ความร้อนร่วมกับกระบวนการดึงน้ำออกจากโมเลกุล (dehydrothermal crosslink) การใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) และการใช้ ลำแสงอิเล็กตรอน เป็นต้น (Ozaki and Tabata, 2005, Tabata and Ikada, 1998) การเชื่อมโยงพันธะมีผลต่อสมบัติทางกายภาพ ทางกล และทางชีวภาพของแผ่นเจลาตินไฮโดรเจล (gelatin hydrogel) กล่าวคือ เจลาตินจะไม่สามารถคืนสภาพเดิมได้อีก แม้จะมีการเปลี่ยนอุณหภูมิไปยัง gel point เพิ่มความแข็งแรง ลดการละลายในน้ำ ทนทานต่อกระบวนการ hydrolyse โดยน้ำ และทนทานต่อกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในร่างกาย การเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีจะทำให้เกิดโครงสร้างเครือข่ายที่แข็งแรงที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น มีการใช้แผ่นเจลาตินที่เชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde ในการส่งผ่านยา และ growth factor ต่างๆ เข้าสู่ร่างกายในระดับการทดลองทางคลินิกและระดับการค้า (Tabata and Ikada, 1998)

ในปี 2002 Nicole J. Einerson และคณะได้ทำการศึกษามูลทาง physicochemical ของ gelatin-based hydrogel โดยจะทำการดัดแปลง gelatin backbone เป็น 3 รูปแบบ คือ PEG-dial-modified gelatin (PG) , EDTADmodified gelatin (EG) และ PEG-dial และ EDTAD modified gelatin (P/EG) แล้วทำการหาปริมาณ lysyl โดยใช้วิธี 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) จากนั้นนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นไฮโดรเจล ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธีใช้ glutaraldehyde ที่ความเข้มข้น 0.1 , 0.01 , 0.001% แล้วนำไปส่องด้วยเครื่อง scanning electron microscopy (SEM) เพื่อดูลักษณะทางกายภาพ จากนั้นทำการหาค่า surface hydrophilicity โดยใช้ contact angle ในการวิเคราะห์ แล้วทำการศึกษาการบวมน้ำ การสลายตัว การปลดปล่อยยาในห้องปฏิบัติการ การสลายตัวและการอักเสบในสัตว์ทดลอง จากผลการทดลองพบว่าโครงสร้างของ modified gelatin จะมีพื้นผิวที่ค่อนข้างเรียบกว่า unmodified gelatin และพบว่าปริมาณ glutaraldehyde มีผลต่อโครงสร้างของเจลาตินซึ่งถ้าความเข้มข้นของ glutaraldehyde ที่นำมาตรวจสอบลดลงจะทำให้พื้นผิวของเจลาตินมีความขรุขระเพิ่มขึ้น และจากการทดลองวัด contact angle จะได้ผลดังตาราง 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงค่ามุมสัมผัสของเจลาตินดัดแปลงดัดแปลงทุกอัตราส่วน

Hydrogel formulation	Surface contact angle (°; mean \pm s.e.m.; n = 2)
G-0.1%	140.5 \pm 0.7
PG-0.1%	162.2 \pm 2.3 ^a
EG-0.1%	169.3 \pm 0.7 ^a
P/EG-0.1%	168.1 \pm 0.4 ^a
G-0.01%	163.2 \pm 1.4 ^a
PG-0.01%	167.3 \pm 3.2
EG-0.01%	168.1 ^b
G-0.001%	153.2 \pm 4.6
PG-0.001%	171.3 \pm 0.7 ^a

[Nicole J. Einerson และคณะ, 2002]

ซึ่งพบว่าไฮโดรเจลที่มีค่ามุม contact angle ต่ำ จะแสดงความเป็น hydrophilic สูงกว่าไฮโดรเจลที่มีค่ามุม contact angle สูงและพบว่าเจลาตินที่มีการดัดแปลงมีผลต่อการปลดปล่อยของยามากกว่าผลจากความเข้มข้นของ glutaraldehyde และเมื่อทำการทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่าเจลาตินที่มีความเข้มข้นของ glutaraldehyde สูงจะมีผลทำให้สัตว์ทดลองเกิดการอักเสบอย่างรุนแรง

ในปี 2004 Yasuhiko Tabata และคณะได้ทำการศึกษานำส่งยาต่อต้านเนื้องอก 2 ชนิดใน 2 รูปแบบที่รวมกับแผ่นเจลาตินไฮโดรเจล คือ ในรูปแบบแผ่นเจลาตินไฮโดรเจลรวมกับ cisplatin (CDDP) และ รูปแบบแผ่นเจลาตินไฮโดรเจลรวมกับ adriamycin (ADM) กับรูปแบบแผ่นเจลาตินไฮโดรเจล รวมกับ CDDP+ ADM และในรูปแบบสารละลาย จากนั้นจะทำการศึกษการปลดปล่อยในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* release) โดยใช้เครื่อง atomic absorption spectrophotometer ในการหาค่า CDDP release และใช้เครื่อง UV/VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 495 nm ในการหาค่า ADM release จากนั้นจะทำการทดลองในสัตว์ทดลองโดยการฉีดเซลล์มะเร็งเข้าไปในหนูทดลองที่เตรียมไว้ แล้วทำการทดลองฉีดยาในรูปแบบสารละลายและทำการฝังแผ่นเจลาตินไฮโดรเจลทั้งสองรูปแบบในสัตว์ทดลองเพื่อศึกษการปลดปล่อย ของยา จากผลการทดลองพบว่า การนำส่งยาในรูปแบบแผ่นเจลาตินไฮโดรเจลรวมกับ CDDP+ADM จะได้ผลได้ดีกว่าในรูปแบบสารละลายและได้ผลดีที่สุดในแง่ของยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่ารูปแบบอื่น

2.4.3 การดัดแปลงเจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของคอลลาเจนกับกรด หรือ lime process .เจลาตินประกอบด้วยหมู่อะมิโนแบบ hydrophobic เป็นส่วนน้อยเช่น proline และ leucine และส่วนที่เป็น hydrophilic อีกหลายตัว เช่น lysine , serine , arginin , hydroxyproline , aspartic และ glutamic acids ดังนั้น เจลาตินจึงเป็น hydrophilic protein ซึ่งทำหน้าที่จำกัดพื้นที่ผิวที่จะเกิดปฏิกิริยาและทำให้เจลาตินละลายน้ำได้ดี [Ofer และ Shlomo ,1997] มีการพบว่าโปรตีนที่มีหมู่ hydrophobic มากกว่าจะมีพื้นที่ผิวที่เกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า โดยใช้วิธีการลดแรงตึงผิวระหว่างโมเลกุล [Kato และ Nakai , 1970]

ค่า hydrophobicity ของโปรตีนสามารถหาได้หลายวิธี เช่น SDS binding , hydrophobic chromatography และ fluorescence ตัวอย่างเช่น pyrene สามารถใช้วิธี fluorescence หาค่า hydrophobicity ของสารละลาย และระบบของสารลดแรงตึงผิว สามารถพิจารณาได้จาก อัตราส่วนระหว่าง peak 1 และ peak 3 ในการปล่อยสเปกตรัมของ pyrene นั้น สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดค่า hydrophobicity ได้ใน hydrophilic อัตราส่วนดังกล่าวจะมีค่าสูง (1.85 ใน acetonitrile) และใน hydrophobic อัตราส่วนดังกล่าวมีค่าต่ำ (0.61 ใน n-hexane) สารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นสูงกว่า CMC ทำให้เกิด hydrophobic ได้ ดังนั้น การลดอัตราส่วน I1/I3 ของสารละลายที่มีค่า 1.87 ถึง 0.9-1.2 [Ofer และ Shlomo ,1997]

การใช้สารเคมีในการดัดแปลงโปรตีนอาจนำไปสู่การเปลี่ยนโปรตีนให้มีค่า hydrophobicity (เกิดจากการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ผิวที่จะเกิดปฏิกิริยาและคุณสมบัติของโปรตีน) ยิ่งไปกว่านั้นการเติมพันธะ Covalent ของหมู่ hydrophobic จะทำให้โปรตีนสามารถละลายน้ำได้ ซึ่งอาจทำให้เกิด amphiphilic protein ตัวอย่างเช่น เมื่อหมู่ hydrophobic หลายหมู่ ถูกนำมาเชื่อมกับ ovalbumin (หมู่ amphiphilic protein จะเกิดขึ้นเมื่อพื้นที่ผิวและแรงตึงระหว่างโมเลกุลลดลง) ovalbumin จะถูกดูดซับที่ความเข้มข้นที่ผิวสูงบน hydrophobic solid surface ซึ่งจะเป็นตัวประสานที่ดีกว่าโปรตีนทั่วไป [Ofer และ Shlomo ,1997]

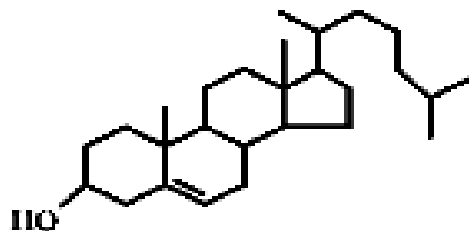
โดยมีคณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองดัดแปลงพื้นที่ผิวเจลาตินด้วยวิธีต่างๆดังต่อไปนี้

ในปี 1982 Arai และ Watanabe ได้ใช้ casein ดัดแปลง โปรตีนถั่วเหลืองและ เจลาตินโดยใช้ปฏิกิริยาของเอมไซม์แล้วตามด้วยการ hydrolysis protein พวกเขาได้เชื่อมโซ่ C₂-C₁₂ กับโมเลกุลของโปรตีนและแสดงการเพิ่มของ surface activity ที่มีเมื่อสายโซ่มีขนาดยาวขึ้น ซึ่งหาได้โดยใช้การวัดแรงตึงผิว การเกิดโฟมและ emulsifying activity

และในปี เดียวกันนี้ Haque และ Kito ได้ใช้ hydrophobic residues ที่หลายๆความยาวกับ ถั่วเหลือง glycinin และโปรตีนเพื่อเพิ่ม surface activity ของโปรตีน การสังเคราะห์ใช้ปฏิกิริยาของ N-hydroxysuccinimide ในกรดไขมันกับ NH_2 ของหมู่ lysine ในสารละลายซึ่งมีเอทานอลความเข้มข้นสูง หรือ สารละลาย urea 8 molar ภายใต้สภาวะดังกล่าวปฏิกิริยาจะถูกกำหนดโดยโปรตีน ที่มีความเข้มข้นต่ำ ทำให้สามารถสมมติได้ว่าผลได้ของปฏิกิริยามีค่าต่ำขึ้นอยู่กับความเป็นไปได้ในการ hydrolysis ในเฟสสารละลาย และ Ofer and Shlomo ได้ใช้วิธีที่จะเชื่อมพันธะ Covalent ระหว่าง hydrophobic group กับโมเลกุลของเจลาตินในสารละลายที่ไม่ใช้น้ำเพื่อเพิ่ม surface active ให้ เจลาตินโดยในขั้นตอนแรกจะทำการเพิ่มหมู่ hydrophobic โดยใส่ N-hydroxysuccinimide fatty acid ester กับ amine ของ หมู่ lysine บน เจลาตินจากนั้นวัดค่า hydrophobicity โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง peak 1(I1) ที่ 378 nm และ peak 3(I3)ที่ 384 nm ของค่า spectra ที่ปล่อยออกมาของ pyrene ที่ความยาวคลื่น 350 - 450 nm และนำไปส่อง SEM จากการทดลองพบว่า เมื่อเติมหมู่ hydrophobic เข้าไปในโมเลกุลของเจลาตินโดยใช้ปฏิกิริยาของ N-hydroxysuccinimide ในกรดไขมันกับ NH_2 ของ หมู่ lysine ทำให้ เจลาตินมีค่า hydrophobicity เพิ่มขึ้น และพบว่าเจลาตินที่ถูกดัดแปลงมีค่า surface active มากกว่า เจลาตินที่ไม่ถูกดัดแปลงที่ทุกๆความเข้มข้น และพบว่าเมื่อจำนวนหมู่ของ hydrophobic เพิ่มขึ้น สายโซ่จะยาวขึ้น ทำให้ความสามารถของโปรตีนในการลดแรงตึงผิวดีขึ้น แรงตึงผิวจึงลดลง ดังนั้น surface active จะเพิ่มขึ้น

2.5 คอเลสเตอรอล(cholesterol)

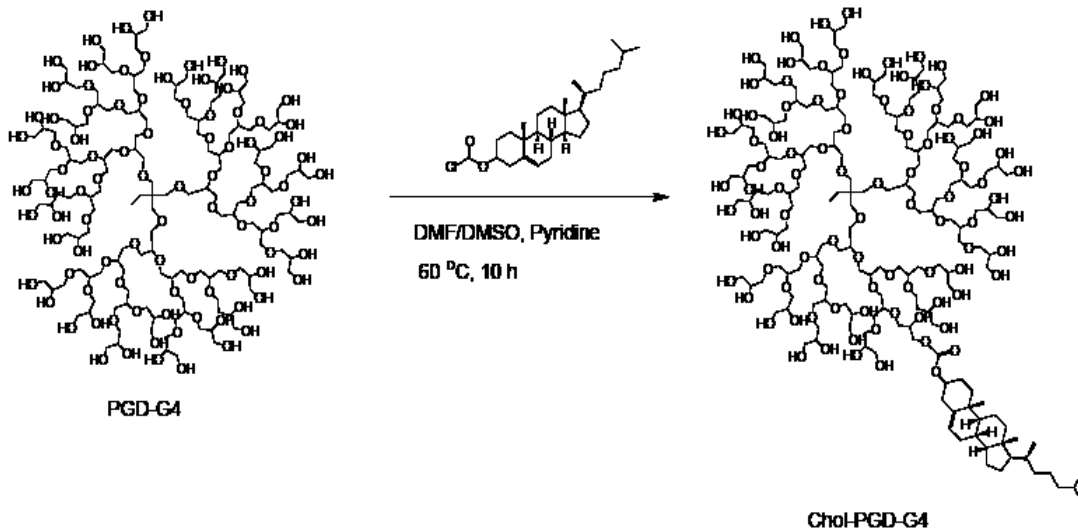
คอเลสเตอรอลเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ชนิดหนึ่งของ steroid ซึ่งไม่สามารถละลายได้ใน aqueous solutions ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คอเลสเตอรอลจะถูกละลายร่วมกับไขมันอื่นๆ เช่น phospholipids หรือ bile acids ดังนั้น คอเลสเตอรอลส่วนมากจะถูกพบใน cell membranes , plasma lipoproteins และ bile มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนไซโคลเพนทาโนฟีแนนทริน (cyclopentanophenanthrene ring) ดังแสดงในรูป 2.17 ซึ่งจะเห็นว่าคอเลสเตอรอลมีส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นหางไฮโดรคาร์บอนซึ่งประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนอะตอมเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วทำให้ละลายได้ในไขมันแต่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ, ส่วนที่เป็นวงแหวนไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วเช่นเดียวกัน ทำให้ละลายได้ในไขมันแต่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ และส่วนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ซึ่งเป็นหมู่ที่มีขั้ว ทำให้สามารถละลายน้ำได้



รูปที่ 2.17 แสดงสูตรโครงสร้างของคอเลสเตอรอล($C_{27}H_{46}O$)

[Bingqing Ji และคณะ,2002]

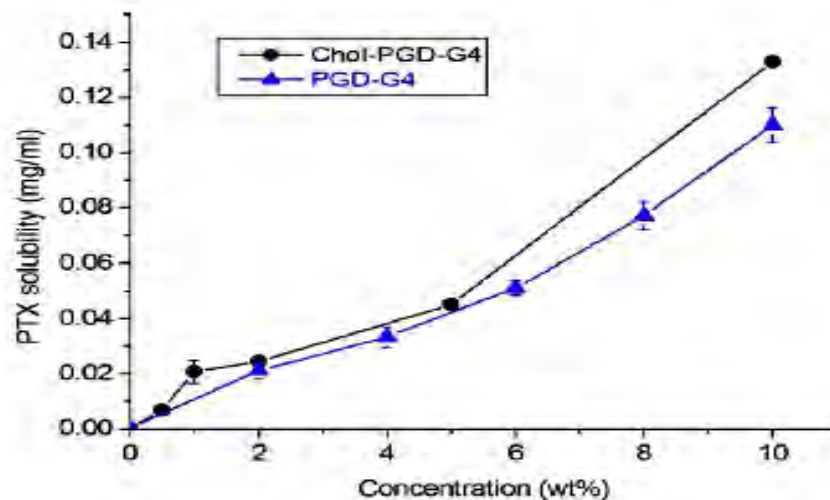
คอเลสเตอรอลมีน้ำหนักโมเลกุล 386.66 มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ $140^{\circ}C$ มีค่าความถ่วงจำเพาะ 1.06 - 1.07 ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในสารละลายอินทรีย์และจะเสถียรที่อุณหภูมิห้องแต่จะว่องไวต่ออนุมูลอิสระ ทำให้สีเปลี่ยน และไม่เสถียร มีผู้สนใจนำคอเลสเตอรอลไปทำการวิจัยตัดแปลงโพลิเมอร์ต่างๆ ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับระบบนำส่งยา โดยในปี 2005 Tooru Ooya และคณะได้ทำการวิจัยโดยนำ polyglycerol dendrimer generation 4 (PGD-G4) ซึ่งเป็นแมโครโมเลกุลชนิดใหม่ที่มีขนาดในช่วงนาโนเมตร โครงสร้างประกอบด้วยแขนงจำนวนมากจัดเรียงตัวอย่างมีระเบียบ มีกลุ่มสำหรับทำปฏิกิริยาอยู่ที่แต่ละปลายโซ่แขนง dendrimers อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการนำส่งยาได้หลายประการ รวมไปถึงการนำส่งยาอย่างจำเพาะเจาะจงไปยังตำแหน่งเป้าหมายและควบคุมการปลดปล่อยตัวยาที่เกิดพันธะหรือเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลของมัน มาทำการ conjugate กับคอเลสเตอรอลในอัตราส่วน 1:1.3 ดังรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 การเตรียม cholesterol - conjugated PGD-G4 (Chol-PGDG4).

[Tooru Ooya และคณะ, 2005]

จากนั้นโครงสร้างที่มีการจัดเรียงตัวใหม่จะถูกหาค่าโดยใช้ dynamic light scattering (DLS) และ atomic force microscopy (AFM) จากการทดลองพบว่า PGD-G4 จะมีการจัดเรียงตัวที่ดีขึ้นหลังจากนำมา conjugate และเมื่อนำ Chol-PGDG4 มาทดสอบการละลายของ paclitaxel ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งชนิดหนึ่งเปรียบเทียบกับ PGD-G4 พบว่า paclitaxel จะละลายใน Chol-PGDG4 ได้ดีกว่าใน PGD-G4 ดังรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.19 การละลายของ paclitaxel กับความเข้มข้นของ Chol-PGDG4 และ PGD-G4

[Tooru Ooya และคณะ, 2005]

2.6 เอกสารสิทธิ (Patents) ที่เกี่ยวข้อง

- United States Patent 6,228,393

DiCosmo , et al. May 8, 2001

การค้นพบระบบนำส่งยาจากของแข็งโดยการใส่ liposome ใน hydrogel ซึ่งทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์กับพื้นผิวของของแข็ง

- Claims
- gelatin hydrogel ถูก crosslink ด้วย polyethylene glycol ได้เป็น polyethylene glycol-gelatin matrix
 - พื้นผิวของ hydrogel ถูกเคลือบด้วย silicon rubber
 - Silicon rubber คือ polydimethylsiloxane.
 - liposome เป็นวัสดุที่ถูกเลือกมาจากกลุ่มที่ประกอบด้วย dipalmitoylphosphatidylcholine และ polyethyleneglycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine
 - fluoroquinolone เป็นยาปฏิชีวนะซึ่งถูกเลือกมาจากกลุ่มที่ประกอบด้วย ciprofloxacin , norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, enoxacin, rosoxacin, amifloxacin, fleroxacin,temafloxacin และ lomefloxacin

- United States Patent 6,632,457

Sawhney, et al. October 14, 2003

การควบคุมการปลดปล่อยของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำผ่านแผ่นไฮโดรเจลโดยการกระจายและการละลายเตรียมรูปแบบของยาที่มีการดัดแปลงความเป็น hydrophobic ในรูปของสารผสม และถูกนำไปกระจายในแผ่นไฮโดรเจลที่มีความสามารถในการดูดซับทางชีวภาพ

- Claims
- ตัวยาถูกละลายในสารที่เป็น hydrophobic ซึ่งจะไปควบคุมการปลดปล่อยตัวยาจากแผ่นไฮโดรเจล
 - สารที่เป็น hydrophobic มีจุดหลอมเหลวน้อยกว่า 65 °C
 - สารที่เป็น hydrophobic ถูกเลือกมาจากกลุ่มที่ประกอบด้วย fatty acids และ triglycerides
 - แผ่นไฮโดรเจลขึ้นรูปมาจากโพลิเมอร์ซึ่งมีสมบัติเป็น Hydrophilic ถูกเลือกมาจาก poly(hydroxyalkyl methacrylate), poly(electrolyte complexes) และ poly(vinylacetate)
 - ตัวยาที่ใช้มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 20,000 ดาลตัน

- ตัวยาสามารถละลายน้ำได้มากกว่า 0.01 mg/mL.

- United State Patent 6,673,843

Arbiser, January 6, 2004

เคอร์คูมินถูกพัฒนาเพื่อใช้สำหรับการรักษาโรคหรือความผิดปกติทางผิวหนังซึ่งถูกแสดงโดย angiogenesis โดยพบว่าเคอร์คูมินจะยับยั้ง การทำงานของ basic fibroblast growth factor (bFGF)

Claims - วิธีการรักษาโดยการขึ้นรูปตัวพา (carrier) ร่วมกับเคอร์คูมิน

- ขึ้นรูปตัวพาในลักษณะเป็นซีฟิงหรือในรูปแบบ hydrogel สำหรับการฝังในร่างกาย ซึ่งประกอบด้วยเคอร์คูมิน 0.5%และ5%

- United States Patent 6,844,024

Su, et al. January 18, 2005

วิธีการเคลือบโพลีเมอร์ลงบนสิ่งปลูกฝัง (implant)

Claims - เตรียมสารละลายโพลีเมอร์ที่ละลายตัวได้ทางชีวภาพแล้วเคลือบบนสิ่งปลูกฝังและทิ้งให้แห้งในอากาศ

- สารละลายประกอบด้วยเคอร์คูมิน

- โพลีเมอร์ที่ใช้เป็นสิ่งปลูกฝัง คือ poly(L-lactic acid), polyglycolic acid, poly-lactic/polyglycolic acid co-polymer, poly(epsilon caprolactone), polyanhydrides, polyorthoesters, poly vinyl acetate, polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalerate, และ collagen

- United State Patent 6,979,470

Badish, et al. December 27, 2005

การยับยั้งกิจกรรมของ cyclooxygenase -2 ด้วยองค์ประกอบของเคอร์คูมินอยด์ซึ่งพบว่าผลของปริมาณเคอร์คูมินอยด์และผลของปริมาณ andrographolide จะมีผลร่วมกันในการยับยั้งกิจกรรมของ COX-2 และมีผลน้อยที่สุดต่อกิจกรรมของ COX-1

Claims - เคอร์คูมินหรือ andrographolide ถูกสกัดมาจากพืช

- ใช้อัตราส่วนระหว่าง เคอร์คูมิน และ andrographolide คือ 1:10 ถึง 10:1

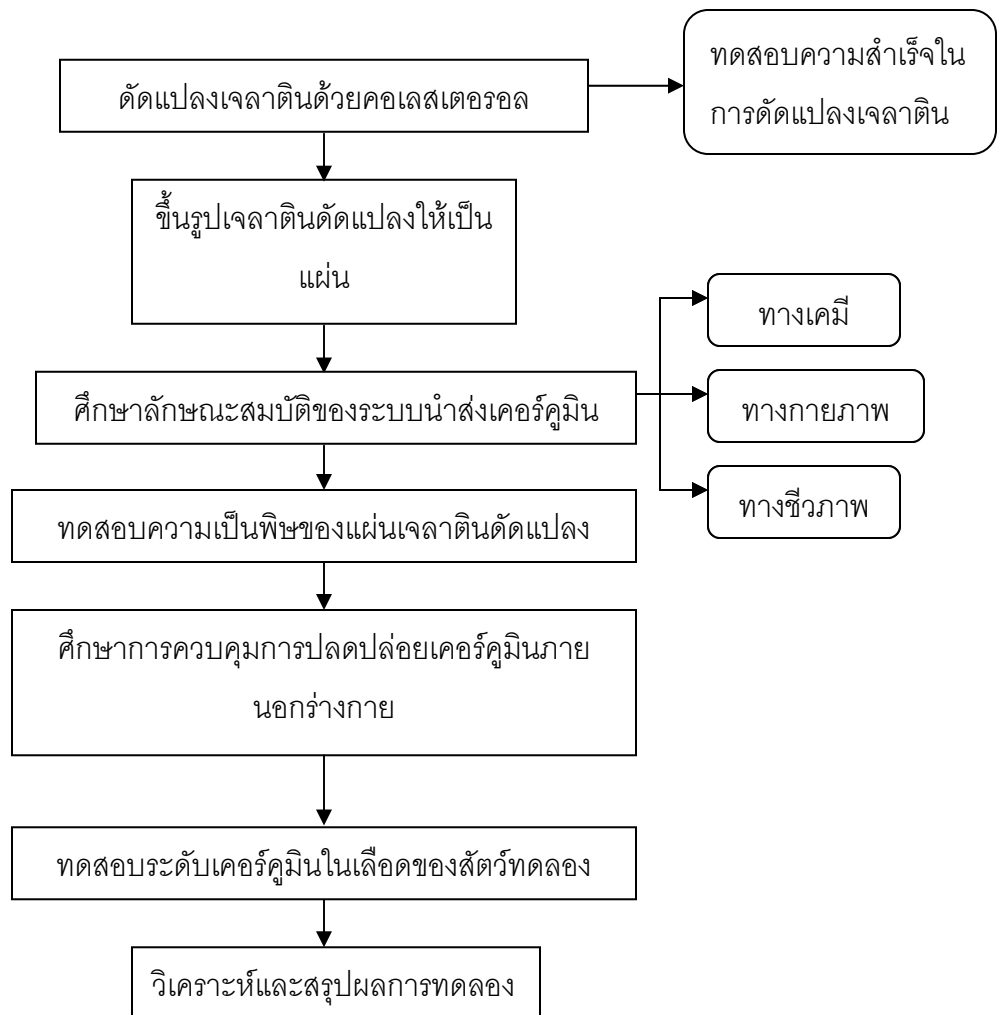
- เคอร์คูมิน หรือ andrographolide จะถูก conjugated ด้วยสารประกอบที่ถูกเลือกมาจากหมู่ที่ประกอบด้วย mono- หรือ disaccharides, amino acids, sulfates, succinate, acetate และ glutathione.

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

สรุปแผนการดำเนินการวิจัยดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงแผนการดำเนินการวิจัย

3.2 เคมีภัณฑ์

- Type A gelatin (116g bloom, pH 4.5, pl 9, Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan)
- DSC (N,N'-Disuccinimidyl carbonate, $C_9H_9N_2O = 256.2$, Novabiochem, Japan)
- DMAP (4-dimethylaminopyridine, $(CH_3)_2NC_5H_4N = 122.17$, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)
- Cholesterol ($C_{27}H_{46}O = 386.65$, Wako, Japan)
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide, $(CH_3)_2SO = 78.13$, Nacalai Tesque , Kyoto, Japan)
- Pyridine 99.5% ($C_5H_5N = 79.10$, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)
- double-distilled water
- Curcumin 95% ($C_{21}H_{20}O_6 = 368.97$, cayman, USA)
- 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)
- β -Alanine (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto , Japan)
- Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$ 99%, Fluka, Buchs, Germany)
- Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Merck, Darmstadt, Germany)
- Hydrochloric acid (HCl 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, USA)
- Ethanol (99.7-100%, VWR International Ltd., Poole Dorset, United Kingdom)
- Trypsin-EDTA (0.25% trypsin with EDTA·Na, Gibco BRL, Canada)
- Acetic acid (SR lab, Thailand)
- Acetone (SR lab, Thailand)
- Citric acid (SR lab, Thailand)
- Gluteroldehyde (Ajax Finechem, Newzealand)
- Glycine (Sigma-Aldrich, Germany)
- Tween 80

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 4-digit balance (Mettler Toledo, Switzerland)
- Magnetic stirrer / Hot plate (RCT Basic, Ika labortechnik, Germany)
- Centrifuge (GPR, Beckman, Thailand)
- 24-well polystyrene tissue culture plate (NUNC, Denmark)
- Polystyrene tissue culture plate (NUNC, Denmark)
- autopipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
- Kim-wipe paper (SR Lab, Thailand)
- Teflon balance dishes
- Dialysis Tube (30/32, cellulose, pore size = 50 A)
- Desiccator (SR Lab, Thailand)
- pH-meter (professional meter PP-50, Germany)
- -40 °C freezer (Heto, PowerDry LL 3000, USA)
- Water bath (1235 PC, Shel-Lab)
- Lyophilizer (Heto, PowerDry LL 3000, USA)
- UV-Vis spectrophotometer (UV -2450, Shimudzu, Japan)
- Spectrophotometer (Genesys 10UV scanning, Thermo Spectronic)
- High performance liquid chromatography (HPLC)
- Contact angle meter, CAM (RE0110, UK)
- Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) (Perkin Elmer Spectrum GX NIR FT-Raman)
- Thermogravimetric/Differential Analyzer, TG/DTA (Diamond, Perkin Elmer, USA)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การดัดแปลงเจลาติน

การดัดแปลงเจลาตินโดยวิธีการเชื่อมพันธะ (conjugate) ด้วยคอเลสเตอรอลผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl-reactive chemical reaction) จากวิธีของ Hermanson, Greg T [Hermanson, Greg T, 1996] โดยใช้ N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC) เป็นสารเชื่อมพันธะ

(conjugating agent) โดยเชื่อมพันธะที่อัตราส่วนระหว่างหมู่ OH ในคอเลสเทอรอล: หมู่ NH_2 ในเจลาติน (จากวิธี TNBS จะได้เจลาติน 1 กรัม มี NH_2 36068 ไมโครกรัม) ดังนี้

- grafted 125% (1.25 : 1)
- grafted 100% (1 : 1)
- grafted 75% (0.75 : 1)
- grafted 66% (0.66 : 1)
- grafted 50% (0.5 : 1)
- grafted 25% (0.25 : 1)

วิธีการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเทอรอล

1. เตรียมสารละลาย 4 ชนิด (เตรียมอุปกรณ์ดังรูปที่ 3.2)

สารละลาย ก : ละลาย 1 กรัมของเจลาตินใน 30 กรัม DMSO และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในขวดที่ปิดอย่างแน่นหนา จนกระทั่งเจลาตินละลายหมด (2-3 ชั่วโมง)

สารละลาย ข : ละลายคอเลสเทอรอลที่ปริมาณต่างๆ กันในสารละลาย pyridine 10 มิลลิลิตร และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลาย ค : ละลาย DSC (ปริมาณ 1-3 เท่าของคอเลสเทอรอล) ใน 5 กรัม DMSO ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลาย ง : ละลาย DMAP (ปริมาณ 1-3 เท่าของคอเลสเทอรอล) ใน 5 กรัม DMSO ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

วิธีการคำนวณหาปริมาณคอเลสเทอรอล, DSC และ DMAP ที่ใช้ในการดัดแปลงเจลาตินแสดงในภาคผนวก ก.

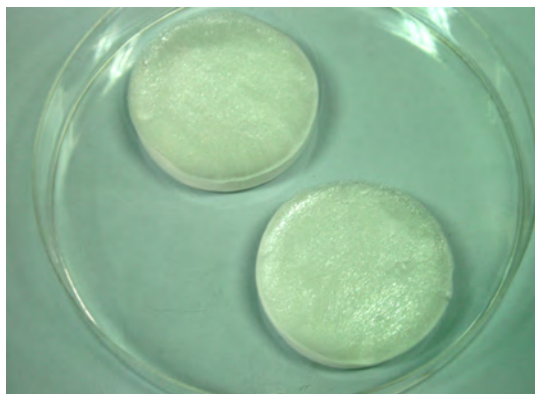


รูปที่ 3.2 ตัวอย่างอุปกรณ์ในการเตรียมสารละลายทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วย ขวดที่มีฝาปิดอย่างแน่นหนา, ถ้วยสแตนเลส, เทอร์โมมิเตอร์, glassbeads และ เครื่องปั่นกวน

2. ผสมสารละลายทั้ง 4 ชนิดเข้าด้วยกันโดยผสมสารละลาย ง ลงสู่สารละลาย ค และ ข ตามลำดับจากนั้นเทลงสู่สารละลาย ก อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
3. ปั่นกวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
4. ทำไดอะไลซิสสารละลายผสมปริมาตร 50 มิลลิลิตร (dialysis cellulose tubing, size 30/32, pore size = 50 A) ในน้ำกลั่น 5 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน โดยการเปลี่ยนน้ำ 3 ครั้ง ในช่วงชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเปลี่ยนน้ำทุก 2 ชั่วโมง (เพื่อให้สารเคมีที่ไม่ทำปฏิกิริยาตกตะกอน ออกมาภายนอกและตัวทำละลายจะถูกแพร่ออกมาภายนอกถุง dialysis) จนกระทั่งค่า conductivity ของน้ำภายนอกถุง dialysis มีค่าต่ำกว่า 10 และไม่มีกลิ่นของสารละลาย DMSO หรือ pyridine (ควรทำไดอะไลซิสใน hood เพราะมีกลิ่นแรงมาก)
5. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
6. นำส่วนใสของสารละลายไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส อย่างต่ำ 6 ชั่วโมง
7. lyophilize ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนต่างๆ ของการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเตรอล

รหัสของเจลาตินที่ดัดแปลงด้วย คอเลสเตรอล	คอเลสเตรอล : เจลาติน (อัตราส่วนโดยโมล)
CG125	1.25 : 1
CG 100	1 : 1
CG 75	0.75 : 1
CG 66	0.66 : 1
CG 50	0.5 : 1
CG 25	0.25 : 1



รูปที่ 3.3 แสดงตัวอย่างเจลลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเตอรอล

3.4.2 วิธีการขึ้นรูปแผ่นเจลลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้ว

- เตรียมสารละลายของเจลลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้ว (ความเข้มข้น 5 % โดยน้ำหนัก) โดยนำไปละลายในน้ำ pH 3 (ปรับ pH โดยใช้กรดอะซิติก) และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
- ขึ้นรูปแผ่นเจลลาตินในภาดเคลือบเทฟลอน (ขนาด 2 x 2 เซนติเมตร) โดยบีบตสารละลายลงในภาดเทฟลอนปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร / ชิ้น (ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ) จะได้แผ่นเจลลาตินที่มีความหนา 0.7 มิลลิเมตร
- นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างต่ำ 6 ชั่วโมง
- lyophilize ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- นำแผ่นเจลลาตินที่ได้ไปเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลายเชื่อมโยงพันธะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สารเคมีที่ช่วยในการเชื่อมโยงพันธะ คือ Glutaraldehyde)
- แช่แผ่นเจลลาตินในสารละลาย glycine 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร/แผ่น พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (เพื่อให้ glycine เข้าไปจับกับหมู่แอลดีไฮด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาจากการเชื่อมโยงพันธะระหว่างเจลลาตินกับ Glutaraldehyde)
- ล้างแผ่นเจลลาติน 5 ครั้ง โดยแช่ในน้ำกลั่นและเขย่าเบาๆเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- นำแผ่นเจลลาตินที่ล้างสะอาดแล้วไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส อย่างต่ำ 6 ชั่วโมง และ lyophilize ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีการเตรียมสารละลายเชื่อมโยงพันธะ

0.01 M HCl : Acetone (25:75) + 25% Glutaraldehyde (GA), 2.4 μ l/ml

3.4.3 การประเมินความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาติน

3.4.3.1 ศึกษาลักษณะสมบัติของเจลาตินดัดแปลง

ก) ปริมาณอะมิโนอิสระ

เนื่องจากเมื่อดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเทอรอล ปริมาณอะมิโนอิสระจะเปลี่ยนไปจึงวัดจำนวนหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้วเปรียบเทียบกับเจลาตินที่ไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ 2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) จากวิธีของ N. Nagai [Nagai, N. และคณะ, 2004] โดยการชั่งน้ำหนักเจลาติน (ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้ว) 5 มิลลิกรัม แล้วบีบอัด 0.4% (w/v) ของ NaHCO_3 และ 0.5% (w/v) ของสารละลาย TNBS (2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงสู่หลอดทดลองและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยอ่างให้ความร้อน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หากพบว่าเจลาตินยังละลายไม่หมดให้เติม 6 N กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่าที่ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ β -alanine (Code 01116-25 Lot No. M4R4957) ที่ทราบความเข้มข้นเพื่อหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระดังแสดงในภาคผนวก ข.

ข) โครงสร้างทางเคมี

ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเจลาติน ที่ทำการดัดแปลงแล้วเปรียบเทียบกับเจลาตินที่ไม่ได้ดัดแปลงโดยใช้เทคนิค FTIR สเปกโตรสโกปี (FT-IR spectroscopy) สภาวะที่ใช้คือ พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 1064 นาโนเมตร, จำนวนการกราดตรวจ 64 scan และการแยกขีด 4 cm^{-1} ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้แก่ เจลาตินซึ่งขึ้นรูปเป็นฟองน้ำ (spong) โดยละลายเจลาตินในน้ำแล้วบีบอัดใส่ 24-well plate ปริมาตรแต่ละหลุมเท่ากับ 0.75 มิลลิลิตร จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำแห้งเยือกแข็ง (lyophilized) ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เจลาตินแบบฟองน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 14 มิลลิเมตร ความหนาประมาณ 3.5 มิลลิเมตร, ผงคอเลสเทอรอล และเจลาตินดัดแปลงซึ่งขึ้นรูปเป็นฟองน้ำ (sponge) การวิเคราะห์โครงสร้างเจลาตินซึ่งมีหมู่อะมิโนอิสระเป็นลักษณะสมบัติที่สำคัญ เกิดพีคที่แสดงการสั่นของแถบเอไมด์ I ที่เลขคลื่น 1622 cm^{-1} และการสั่นของเอไมด์ II ที่เลขคลื่น 1249 cm^{-1}

ค) ค่ามุมสัมผัสน้ำ

ศึกษาสมบัติทางเคมีของแผ่นฟิล์มเจลาตินโดยการวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle) เพื่อหาความเป็น hydrophobicity และ hydrophilicity ของพื้นผิวแผ่นฟิล์มและวัดค่ามุม

สัมผัสน้ำด้วยเครื่อง Contact Angle Meter (CAM) (RE0110, UK) ดังแสดงในภาคผนวก ง. การวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อพิจารณาความเป็น hydrophobicity และ hydrophilicity ของพื้นผิวซึ่งงานสามารถพิจารณาจากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้โดยหากค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวซึ่งงานมีค่ามากกว่า 65 องศา แสดงว่าพื้นผิวซึ่งงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophobicity แต่ถ้าหากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้มีค่าต่ำกว่า 65 องศาแสดงว่าพื้นผิวซึ่งงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophilicity [Vogler, EA. 1998]

3.4.3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของแผ่นเจลาคตินดัดแปลง

ก) ระดับของการเชื่อมโยงพันธะ

ทดสอบหาระดับของการเชื่อมโยงพันธะของเจลาคตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้วโดยใช้ ,4,6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) ดังหัวข้อ 3.4.3 TNBS สามารถบ่งบอกถึงปริมาณกรดอะมิโนอิสระหรือ $-NH_2$ ในโมเลกุล เนื่องจากหมู่ $-NH_2$ เป็นองค์ประกอบที่พบในเจลาคติน ซึ่งถ้าปริมาณกรดอะมิโนในแผ่นเจลาคตินดัดแปลงหลังจากการเชื่อมโยงพันธะเหลือน้อยลงแสดงว่าเกิดการเชื่อมโยงพันธะภายในแผ่นเจลาคตินดัดแปลงมาก ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบและการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ข.

ข) การดูดซับน้ำ (swelling)

การทดสอบการดูดน้ำของแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแล้วทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ SJ. Mao [Mao, SJ. และคณะ, 2003] โดยคำนวณได้จากผลต่างของน้ำหนักแห้งและน้ำหนักเปียกของแผ่นเจลาคตินดัดแปลงน้ำหนักเปียกทำได้โดยแช่ แผ่นเจลาคตินดัดแปลง ในสารละลาย PBS buffer ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นชั่งแผ่นเจลาคตินดัดแปลงทั้งสองด้านด้านละ 10 วินาทีด้วยกระดาษไม่มีขุย และชั่งน้ำหนักทันที จะได้เป็นค่าน้ำหนักเปียกของแผ่นเจลาคตินดัดแปลงซึ่งสามารถคำนวณ % swelling ได้จากสูตร

$$\% \text{ swelling} = \frac{W_{so} - W_o}{W_o} \times 100$$

โดย W_{so} คือน้ำหนักของแผ่นเจลาคตินหลังจากที่ถูกดูดซับน้ำ และ

W_o คือน้ำหนักเริ่มต้นของแผ่นเจลาคติน

ค) อุณหภูมิในการสลายตัว

วิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของแผ่นเจลาคตินด้วยเครื่อง Thermogravimetric/ Differential Analyzer (TG/DTA) เพื่อหาค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของแผ่นเจลาคติน (Degradation temperature, T_d) ซึ่งค่า T_d สามารถบ่งบอกถึงความเสถียรทางอุณหภูมิของสาร และแสดงให้เห็นถึง

ลักษณะเฉพาะของสาร การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของแผ่นเจลลาติน เกิดจากการสลายตัวที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น ในงานวิจัยนี้ทำการทดลองหาค่า T_d เพื่อเปรียบเทียบเจลลาตินทั้งที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างในอัตราส่วนต่างๆ และไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้างว่ามีเสถียรภาพทางอุณหภูมิแตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์หาค่า T_d โดยใช้ค่า onset ของกราฟระหว่างร้อยละของน้ำหนักที่เหลืออยู่ของวัสดุและค่าอุณหภูมิที่ใช้ดังแสดงในภาคผนวก ค.

ง) การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย

การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงด้วยวิธีการย่อยสลายในเอนไซม์ collagenase (CAS No. 9001-12-1) โดยดัดแปลงวิธีของ YS. Choi [Choi, Ys และคณะ, 1998] ในการหาการย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงโดยแช่แผ่นเจลลาตินดัดแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร หนัก 5 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS buffer) ที่ pH 7.4 ที่มีเอนไซม์ bacterial collagenase ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยติดตามผลทุก 24 ชั่วโมง จึงนำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะทำให้แห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง

การย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงคำนวณได้จากสูตร

$$\text{การย่อยสลาย (\%)} = \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100$$

โดย W_o เป็นน้ำหนักเริ่มต้นของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง

และ W_t เป็นน้ำหนักที่เวลาใดๆของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง

จ. ความเป็นพิษของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast

การทดสอบความเป็นพิษตามมาตรฐาน ISO 10993 ได้กำหนดให้ใช้เซลล์ L929 mouse fibroblast จำนวน 0.5-1 ล้านเซลล์/จานเลี้ยงเซลล์ ในการทดสอบ และประเมินจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่เวลา 3 วัน จากงานวิจัยนี้ทดสอบความเป็นพิษของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงโดยประเมินจากการยึดเกาะของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนเซลล์ L929 mouse fibroblast โดยวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อประเมินจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง เพื่อประเมินจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโต ด้วยวิธี MTT assay โดยดัดแปลงวิธีของ Mosmann (Mosmann, 1983; Choi และคณะ, 2004) ในการทดสอบทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร (NUNC, Roskilde, Denmark) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's

modified eagle medium (DMEM) ที่ประกอบไปด้วย 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.25 µg/ml amphotericin-B โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่มีสภาวะความดันบรรยากาศที่มี 5% CO₂ และ 95% air อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นทดสอบการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell adhesion and proliferation) โดยทำการฆ่าเชื้อ (sterilized) แผ่นเจลลาตินในเอทานอลเข้มข้น 70% เป็นเวลา 30 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (autoclave) ทำการเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนใหม่ 3 ครั้ง แต่ละครั้งแช่ทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นแช่ด้วย PBS ทิ้งไว้ข้ามคืน ทำการทดสอบแผ่นเจลลาตินในงานเพาะเซลล์ขนาด 48 หลุม เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตรหลุมละ 350 ไมโครลิตร ก่อนทำการใส่เซลล์จำนวน 10⁴ เซลล์ต่อแผ่นเจลลาติน แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่เวลา 5 ชั่วโมง, 1 วัน และ 3 วัน ด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งมีขั้นตอนการประเมินจำนวนเซลล์อย่างละเอียดแสดงในภาคผนวก จ.

ฉ. การควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกาย

- เตรียมแผ่นเจลลาตินตัดแปลง 2 มิลลิกรัม ในหลอด microcentrifugal ที่มีฝาปิดแน่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หยดสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 10, 15, 20 และ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น บนแผ่นเจลลาตินตัดแปลง (ดังรูปที่ 3.4)
- บั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2-3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (เพื่อให้เคอร์คูมินทั้งหมดถูกดูดซับในแผ่นเจลลาติน) แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง
- เปิดฝาหลอดในที่สะอาดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (เพื่อให้แอลกอฮอล์ระเหยหมด)



รูปที่ 3.4 แสดงตัวอย่างแผ่นเจลลาตินตัดแปลงหลังจากหยดสารละลายเคอร์คูมิน

- เติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลายผสมระหว่าง PBS กับ 0.01% Tween 80 (ช่วยเพิ่มการละลายของเคอร์คูมินใน PBS) ลงในหลอด

- นำไปปั่นในเครื่อง shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 rpm
- เก็บตัวอย่างสารละลาย PBS ที่เวลา 0, 2, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมง (เก็บตัวอย่างสารละลาย PBS ทั้งหมดจากเจลาตินทันทีในการวิเคราะห์การปลดปล่อยยาที่เวลา 0 นาที แล้วใส่สารละลาย PBS ลงไปใหม่จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ) และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของคอร์คูมิน โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer
- ตรวจสอบความเข้มข้นสุดท้ายของคอร์คูมินในแผ่นเจลาตินโดยย่อยสลายแผ่นด้วย trypsin-EDTA (0.25 % wt trypsin, 0.02% EDTA, ใน PBS) 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm จนกระทั่งแผ่นเจลาตินดัดแปลงถูกย่อยหมดและปลดปล่อยคอร์คูมินทั้งหมดออกมา (เวลาที่แผ่นเจลาตินถูกย่อยหมดขึ้นกับความแข็งแรงของการเชื่อมโยงพันธะ) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นสุดท้ายของคอร์คูมินด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer วิธีการคำนวณแสดงดังภาคผนวก จ.

3.4.4 ระดับคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง

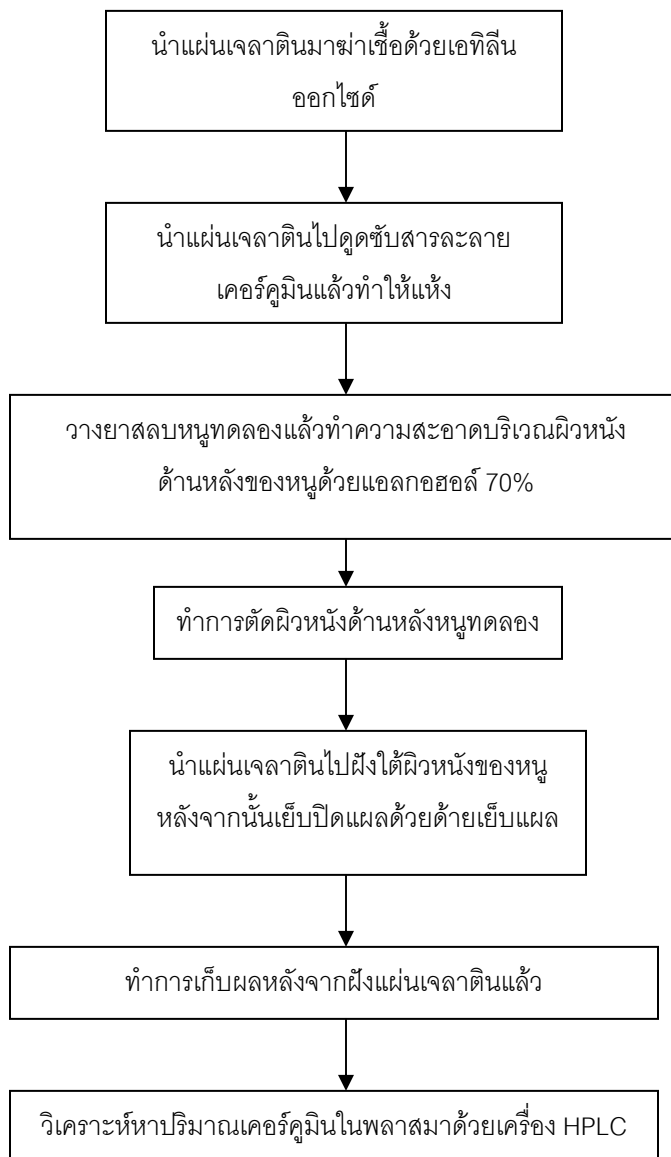
วิธีการทดสอบในสัตว์ทดลอง

1. การทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับคอร์คูมิน กลุ่ม 2 คือ กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น กลุ่ม 3 คือ กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น ในแต่ละกลุ่มจะทำการศึกษาเป็นช่วงเวลา โดยทำการศึกษาในวันที่ 3, 6, 10 และ 14 ในแต่ละช่วงเวลาจะใช้หนูในการปลูกถ่ายจำนวน 3 ตัว (n =3) ดังนั้นใช้หนูในการทดสอบทั้งหมด 36 ตัว และใช้เจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเตอรอลขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ความหนา 0.7 มิลลิเมตร หนัก 10 มิลลิกรัม จำนวน 36 ตัวอย่าง

2. หนูทดลองพันธุ์ BALBcA mice เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 22-25 กรัม อายุ 6-8 สัปดาห์ จำนวน 36 ตัว สั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงตามแนวทางปฏิบัติของ Home office guidelines on the scientific use of animal (Scientific procedures) Act 1986 กล่าวคือ หนูจะถูกเลี้ยงในห้องควบคุมเชื้อที่ภาควิชาสัตววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ 25 +/- 3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 +/- 90 % วงจรการให้แสง 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด มีการถ่ายเท

อากาศ เพียงพอ มีการดูแลให้อาหารและน้ำ ในระหว่างทำการทดลองหนูจะอยู่แยก 1 ตัวต่อ 1 กรง ก่อนการทดลองแต่ละครั้ง หนูทดลองจะถูกงดอาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมง แต่ได้รับน้ำดื่มตามปกติ วิธีการทดลอง สรุปได้ดังแผนผังในรูปที่ 3.5

แผนผังขั้นตอนการทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากระบบนำส่งเคอร์คูมิน



รูปที่ 3.5 แผนผังขั้นตอนการทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากระบบนำส่งโดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง

การทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากระบบนำส่ง โดยการปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองมีรายละเอียดดังนี้

1. เตรียมแผ่นเจลาคตินดัดแปลงขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ความหนา 0.75 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีเอทิลีนออกไซด์ แล้วนำไปดูดซับสารละลายเคอร์คูมิน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ 37 °C ทำให้แห้งก่อนนำมาทำการทดลอง (ก่อนการทดลองได้นำแผ่นเจลาคตินดัดแปลงไปทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์ L929)

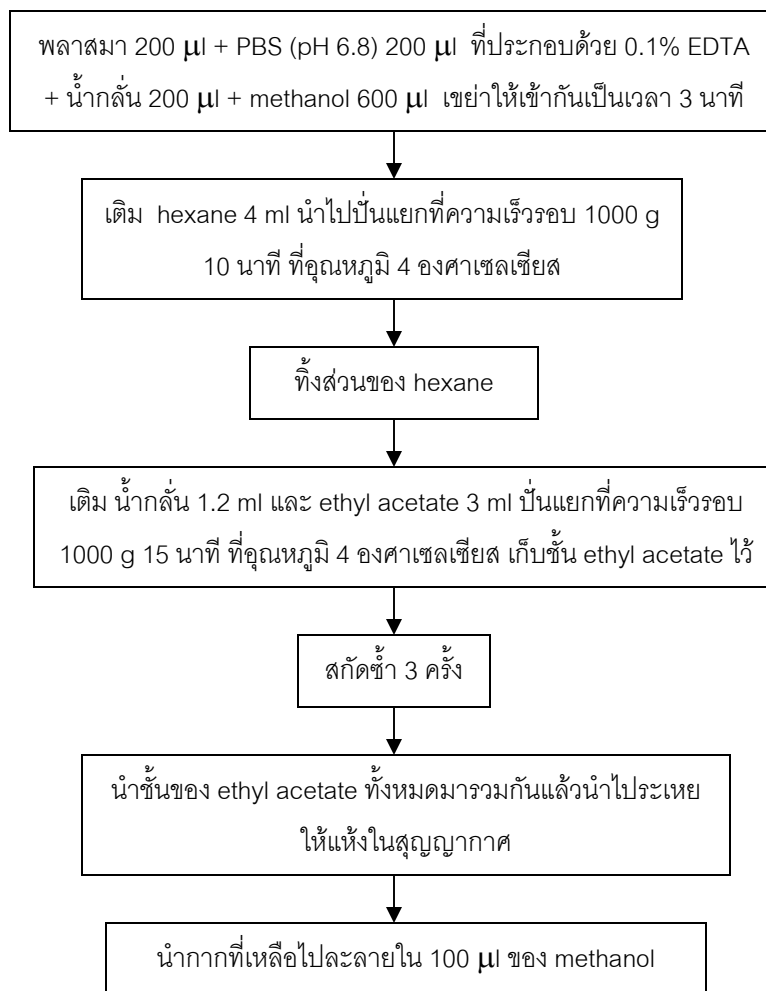
2. ทำการวางยาสลบหนูทดลองโดยวิธีฉีด Barbiturate (Pentobarbital) เข้าที่ช่องท้อง ด้วยปริมาณ 60 มิลลิกรัม/น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม เนื่องจาก Barbiturate มีฤทธิ์กดการหายใจ ดังนั้นการเดินยาเข้าช่องท้องอย่างรวดเร็วจะทำให้สัตว์หยุดหายใจ ฉะนั้นควรเดินยาอย่างช้าๆ และตรวจดูการตอบสนองของสัตว์โดยดูจากการกระพริบตาเมื่อใช้นิ้วเคาะที่หัวถ้าสัตว์กระพริบตาแสดงว่ายังไม่สลบ แต่ถ้าหยุดกระพริบตาแสดงว่าสลบให้หยุดเดินยา

3. หลังจากที่หนูสลบแล้วทำความสะอาดบริเวณผิวหนังด้านหลังของหนูด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วทำการตัดเปิดผิวหนังด้านหลังด้วยกรรไกรให้มีความยาวของแผลประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ผ่านการดูดซับเคอร์คูมินแล้ว ผึ่งใต้ผิวหนังของหนูหลังจากนั้นเย็บปิดแผลด้วยด้ายเย็บแผล ดังรูปที่ 3.6 ขั้นตอนเหล่านี้ทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ



รูปที่ 3.6 แผนภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง

4. หลังการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลง ทำการเก็บเลือดของหนูจากหัวใจหนูที่เวลาต่างๆ ทำการแยกพลาสมาออกจากเลือดโดยการใส่ heparin 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 1000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำพลาสมา 200 ไมโครลิตร ไปปฏิกิริยากับ เอนไซม์ β -glucuronidase type X-A (500 U) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดเคอร์คูมินออกจากพลาสมา วิธีการสกัดเคอร์คูมินออกจากพลาสมาสรุปได้ดังแผนผังในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 แผนผังขั้นตอนการสกัดเคอร์คูมินจากพลาสมา

จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินในพลาสมาด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ column C-18 Mobile phase ใช้ acetonitrile และ 10% acetic acid (50:50) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ตามวิธีของ Min-Hsiung Pan [Min-Hsiung Pan และคณะ, 1998] จากนั้นนำค่าที่ได้ไปวาดกราฟความสัมพันธ์ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในเลือดกับเวลา ค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้งทั้งหมดที่ได้ (AUC) จะเป็นปริมาณที่มีอยู่ในร่างกายทั้งหมดนับตั้งแต่เริ่มให้เคอร์คูมิน [สุพงษ์ เอกศิริพงษ์, 2547] โดยก่อนที่จะทำการเก็บตัวอย่างจะทำการวางยาสลบหนูทดลองโดยใช้วิธีการดังที่กล่าวไว้ในข้อที่ 2

4. เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง ซากของหนูทดลอง จะถูกนำไปทำลายโดยการเผาในเตาเผาซากสัตว์ต่อไป

หมายเหตุ : งานวิจัยนี้ได้ทดลองนำไปใช้จริงในสัตว์ทดลองโดยได้รับความร่วมมือจาก นางสาว ญัฐชญา วงศ์เอกอินทร์ ภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการอนุมัติให้มีการทดลองในสัตว์ทดลองจากการประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย โดยฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบที (t-test) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ (Minitab system for Windows version 14, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P\text{-value} < 0.05$)

3.6 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเคมี ตึกอาคารอนุสาสน์นันทกรรม ชั้น 5 ภาควิชา วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ชั้น 9 ตึก อ.ป.ร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดสอบความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาติน

การประเมินความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอลและการทดสอบลักษณะสมบัติของเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้ว มีวิธีและขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยแสดงในแผนผังรูป 4.1 โดยมีรายงานผลการทดลองโดยลำดับดังต่อไปนี้

4.1 ลักษณะสมบัติของเจลาตินที่ดัดแปลงด้วยคอเลสเตอรอล (cholesterol modified gelatin)

- ก. ปริมาณอะมิโนอิสระ
- ข. โครงสร้างทางเคมีของเจลาตินดัดแปลง
- ค. มุมสัมผัสผิวน้ำ (Water contact angle)

4.2 ลักษณะสมบัติของแผ่นเจลาตินดัดแปลง (modified gelatin sheet)

- ก. ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (Degree of crosslinking)
- ข. การดูดซับน้ำ (Swelling ratio)
- ค. อุณหภูมิในการสลายตัว (Degradation temperature)
- ง. การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (In vitro Biodegradation)
- จ. ความเป็นพิษของแผ่นเจลาตินดัดแปลงต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast
- ฉ. การควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกาย

4.3 ระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง

โดยความหมายของรหัสของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้

G : เจลาติน

CG 25 : เจลาตินที่ถูกดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณคอเลสเตอรอลร้อยละ 25 (โดยโมล) ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน

CG 50 : เจลาตินที่ถูกดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณคอเลสเตอรอลร้อยละ 50 (โดยโมล) ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน

CG 66 : เจลาตินที่ถูกดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณคอเลสเตอรอลร้อยละ 66 (โดยโมล) ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน

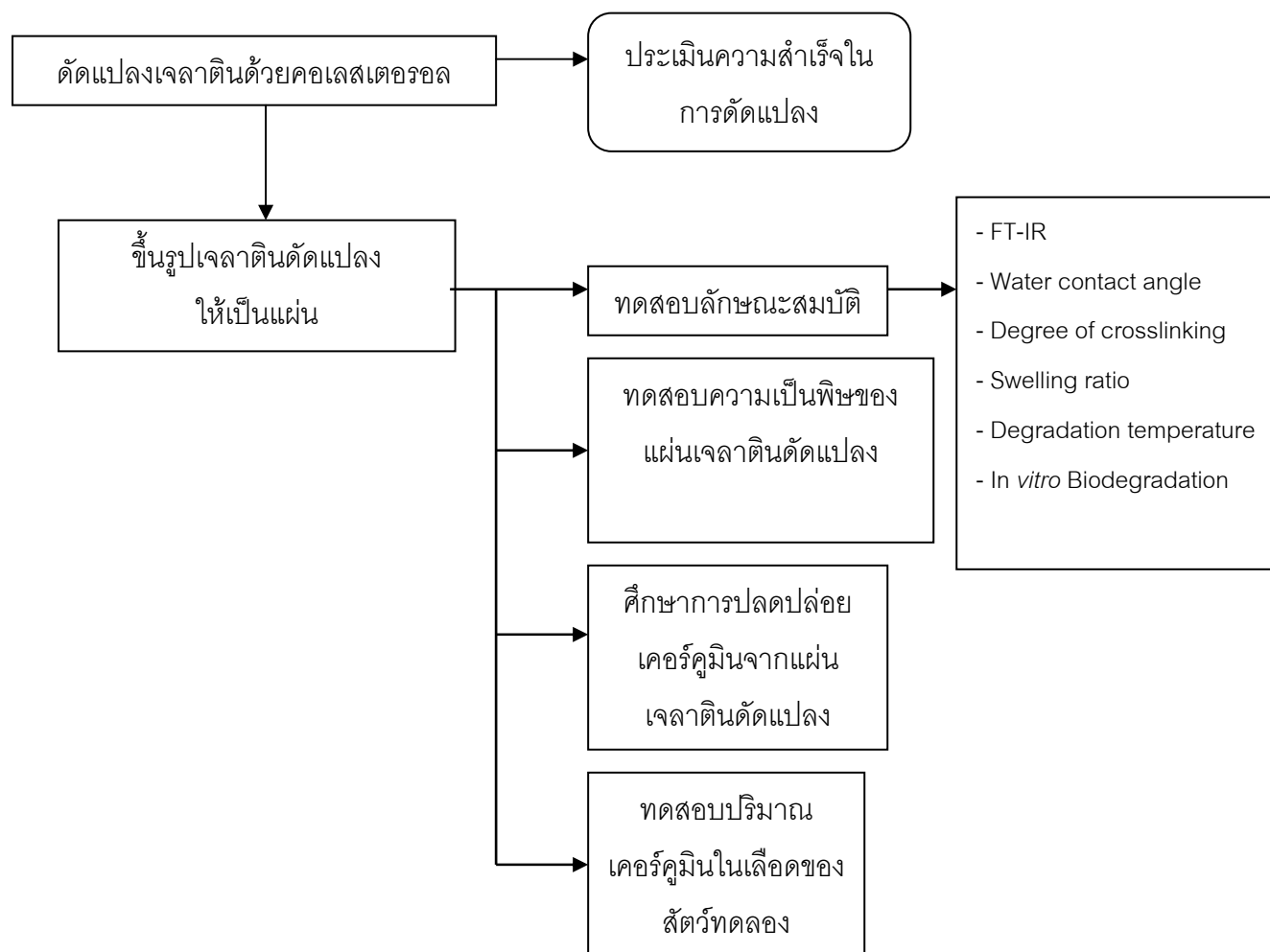
CG 75 : เจลาตินที่ถูกตัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณคอเลสเตรอลร้อยละ 75 (โดยโมล) ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน

CG100 : เจลาตินที่ถูกตัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณคอเลสเตรอลร้อยละ 100 (โดยโมล) ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน

CG125 : เจลาตินที่ถูกตัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณคอเลสเตรอลร้อยละ 125 (โดยโมล) ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน

CHO : คอเลสเตรอล

DSC 1x, DSC 2x, DSC 3x : ตัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินโดยใช้สารเชื่อมพันธะปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของปริมาณคอเลสเตรอลที่ใช้



รูปที่ 4.1 แผนผังการทดสอบสมบัติของเจลาตินที่ตัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอล

ความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเทอรอล

4.1 ลักษณะสมบัติของเจลาตินดัดแปลง

ก. ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

เจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด glycine, proline และ hydroxyproline ในปริมาณสูง โดยมีหน่วยซ้ำของกรดอะมิโนที่เรียงตัวกันคือ glycine-X-Y ซึ่ง X และ Y คือ proline และ hydroxyproline ตามลำดับ ปริมาณอะมิโนอิสระ ($-NH_3^+$) ในเจลาติน (MW~100,000) ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนภายในสายโปรตีนโดยกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยหมู่ $-NH_3^+$ ในโครงสร้าง ได้แก่ histidine, arginine และ lysine ซึ่งมีหมู่ $-NH_3^+$ เป็นองค์ประกอบประมาณ 13 % [Mary, K.H.a., 1992] นอกจากนี้ยังมี $-NH_3^+$ ที่ปลาย N-terminal ของสายโปรตีนด้วยเมื่อมีการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาติน หมู่ $-NH_3^+$ เหล่านี้จะถูกใช้ไปในการเชื่อมโยงพันธะกับคอเลสเทอรอล ดังนั้นความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาติน ทำโดยการวิเคราะห์ปริมาณของหมู่อะมิโนอิสระในเจลาตินที่ถูกดัดแปลงโครงสร้าง โดยวิธีทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปลง กับสารละลาย TNBS (2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid) โดยใช้กราฟมาตรฐานของ beta-alanine ซึ่งประกอบด้วย $-NH_3^+$ 1 หมู่ในโมเลกุล ($CH_3H_7NO_2$) [Nagai, N. และคณะ, 2004] ในการตรวจสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยร้อยละของคอเลสเทอรอลต่อหมู่อะมิโนอิสระต่างๆ มีปริมาณอะมิโนอิสระลดลงเมื่อเทียบกับ G (เจลาติน type A จากบริษัท Nitta Galatin Inc. ประเทศญี่ปุ่น น้ำหนักโมเลกุล~100,000) ซึ่งทดสอบปริมาณอะมิโนอิสระด้วยวิธีเดียวกันกับเจลาตินที่ไม่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอล (G) ได้เท่ากับ $36,068 \mu\text{g} \pm 0.04 / 1$ กรัมเจลาติน ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอล โดยใช้สารเชื่อมพันธะ (DSC) ในปริมาณ 1 เท่าของคอเลสเทอรอล จะเห็นว่าปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปลงมีค่าลดลงตามลำดับเมื่อเพิ่มร้อยละของการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเทอรอลในช่วง 4-31 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณอะมิโนอิสระของ CG66, CG75, CG100 และ CG125 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G โดยที่ CG125 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุด (30.66 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ เนื่องจากมีการใช้คอเลสเทอรอลในการดัดแปลงสูงสุด ทำให้หมู่ $-NH_3^+$ ของเจลาตินเกิดการเชื่อมโยงพันธะกับหมู่ OH ของคอเลสเทอรอลเพิ่มขึ้น โดยมีสารเชื่อมพันธะ (DSC) เป็นสารช่วยให้เกิดการเชื่อมพันธะระหว่างหมู่ทั้งสองด้วยพันธะโควาเลนต์ (ดังสมการการดัดแปลงโครงสร้างในรูปที่ 4.3) DSC จะเชื่อมกับหมู่ OH ของคอเลสเทอรอล จากนั้นจึงเกิดการเชื่อมกับหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน

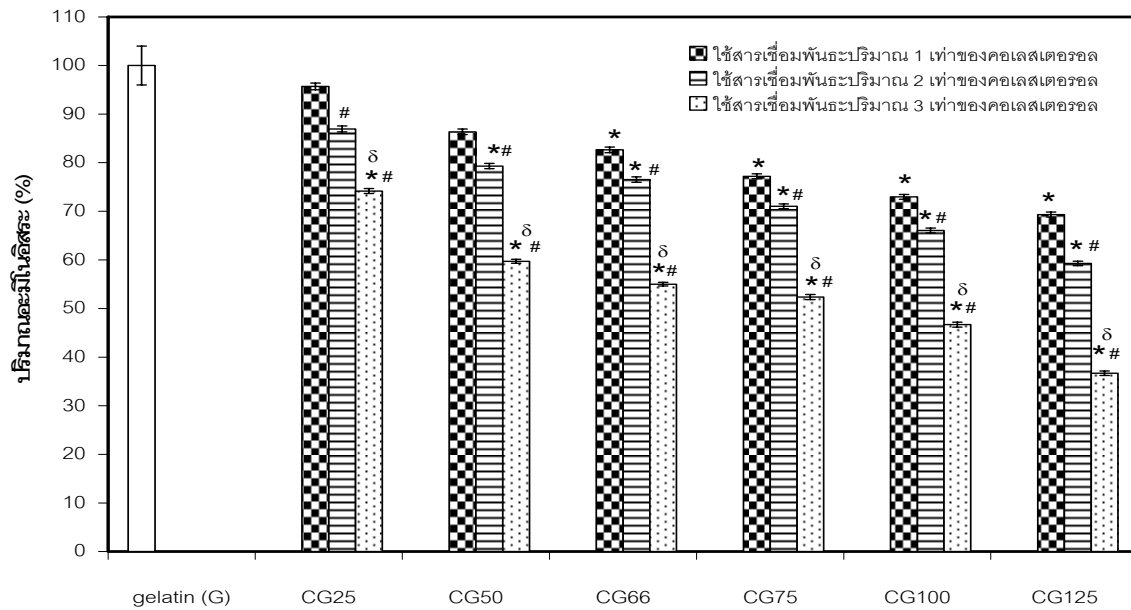
เนื่องจากกระบวนการดัดแปลงโครงสร้างนี้ทำในสารละลายที่ความเข้มข้นต่ำ (1 กรัมเจลาตินต่อสารละลายรวม 50 มิลลิลิตร) จึงอาจทำให้เกิดความไม่ทั่วถึงของสารเชื่อมพันธะในการดัดแปลง ดังนั้นจึงมีการทดลองเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 2 และ 3 เท่า (โดยโมลของคอเลสเทอรอลที่ใช้) พบว่าปริมาณอะมิโนอิสระในแต่ละกระบวนการดัดแปลงมีค่าลดลงมากกว่าเมื่อใช้ DSC 1 เท่า โดยปริมาณอิสระของ CG50, CG66, CG75, CG100 และ CG125 เมื่อใช้ DSC 2x และ 3x ลดลงประมาณ 9 – 47 % เมื่อเทียบกับเมื่อใช้ DSC 1x เจลาตินดัดแปลงทุกอัตราส่วนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G โดยที่ CG125 ที่ผ่านการดัดแปลงโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 3 เท่าของคอเลสเทอรอล มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากถึง 64 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าสารเชื่อมพันธะ(DSC) มีการกระจายตัวอย่างทั่วถึงมากขึ้นจึงมีประสิทธิภาพในการเชื่อมพันธะระหว่างหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินกับหมู่ไฮดรอกซิลของคอเลสเทอรอล อย่างไรก็ตามด้วยลักษณะการทำปฏิกิริยากับหมู่ -OH ของ DSC โดยมี DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [Greg T. Hermanson, 1996] จึงมีความเป็นไปได้ที่กรดอะมิโนใดๆ ในโครงสร้าง -OH ในหมู่ห้อย (Serine, Threonine, Tyrosine) ประมาณ 6.2 % อาจเกิดการเชื่อมโยงกับหมู่ $-NH_3^+$ ภายในโมเลกุลด้วยตัวเองได้

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโครงสร้างของเจลาตินดัดแปลง (mean \pm SD, n=3)

รหัส	ใช้สารเชื่อมพันธะ 1 เท่าของคอเลสเตรอล		ใช้สารเชื่อมพันธะ 2 เท่าของคอเลสเตรอล		ใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่าของคอเลสเตรอล	
	ปริมาณหมู่อะมิโน อิสระ ($\mu\text{g/g}$) $\times 10^2$	ร้อยละของ หมู่อะมิโน อิสระที่ลดลง	ปริมาณหมู่อะมิโน อิสระ ($\mu\text{g/g}$) $\times 10^2$	ร้อยละของ หมู่อะมิโน อิสระที่ลดลง	ปริมาณหมู่อะมิโน อิสระ ($\mu\text{g/g}$) $\times 10^2$	ร้อยละของ หมู่อะมิโน อิสระที่ลดลง
G	360.68 \pm 0.04	-	360.68 \pm 0.04	-	360.68 \pm 0.04	-
CG25	345.14 \pm 0.02	4.30	313.58 \pm 0.01 #	13.06	267.54 \pm 0.01* # δ	25.82
CG50	311.46 \pm 0.01	13.64	286.06 \pm 0.01* #	20.68	215.34 \pm 0.01* # δ	40.29
CG66	298.05 \pm 0.01*	17.36	276.01 \pm 0.02* #	23.47	198.41 \pm 0.01* # δ	44.98
CG75	278.48 \pm 0.01*	22.79	256.26 \pm 0.01* #	28.95	188.88 \pm 0.01* # δ	47.63
CG100	263.13 \pm 0.01*	27.04	238.27 \pm 0.01* #	33.94	168.43 \pm 0.02* # δ	53.30
CG125	250.08 \pm 0.01*	30.66	213.75 \pm 0.01* #	40.73	132.27 \pm 0.01* # δ	63.33

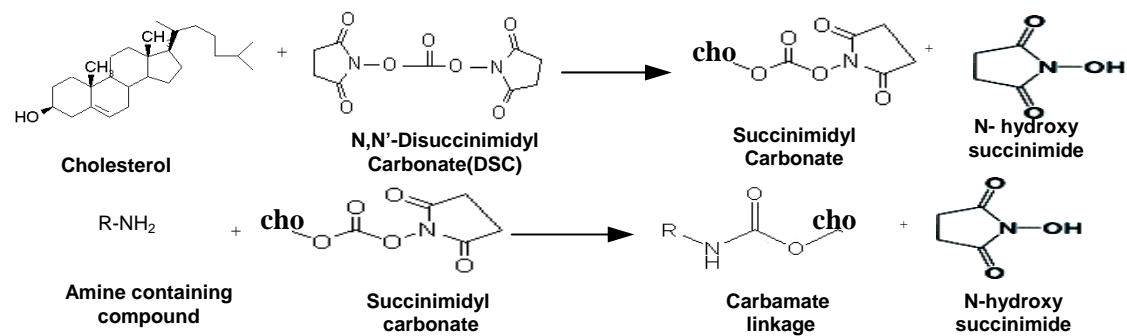
* , #, δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G เมื่อใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1x, 2x, 3x ของปริมาณคอเลสเตรอลทั้งหมด (โมล)

ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$



รูปที่ 4.2 ปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตอรอล

*, #, δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G เมื่อใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1x, 2x, 3x ของปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมด (โมล) ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ (หมายเหตุ G มีหมู่อะมิโนอิสระ 36068 ± 0.04 ไมโครกรัม/กรัม เจลาติน โดยใช้ beta-alanine เป็น standard)



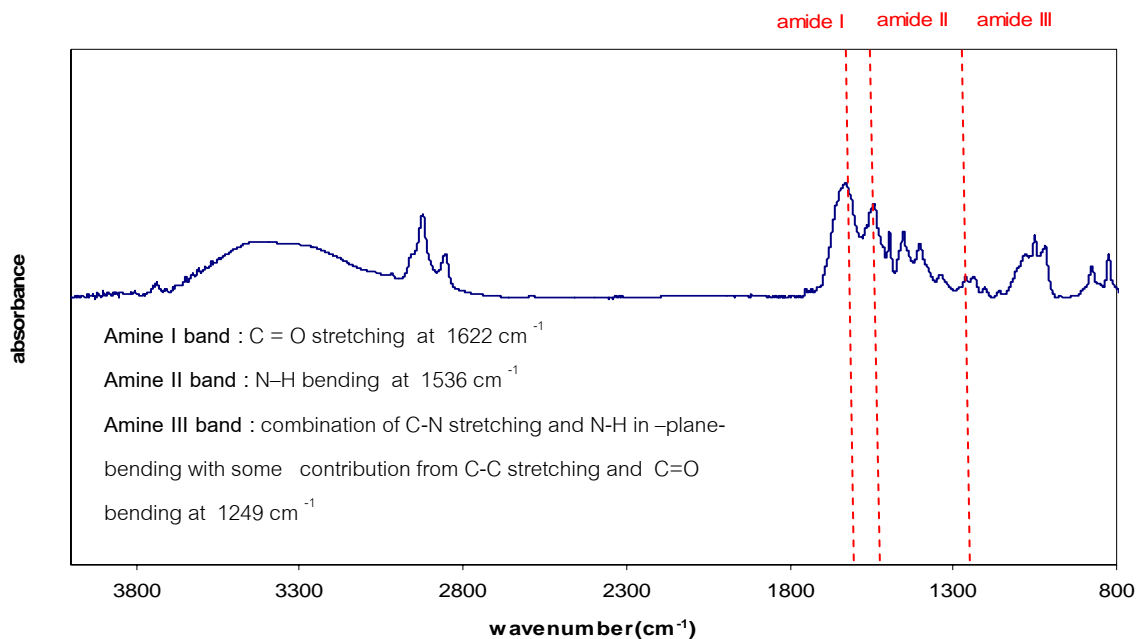
รูปที่ 4.3 สมการการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอลโดยผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลโดยใช้ N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC) เป็นสารเชื่อมพันธะ [Greg T. Hermanson, 1996]

หมายเหตุ: cho แทน cholesterol

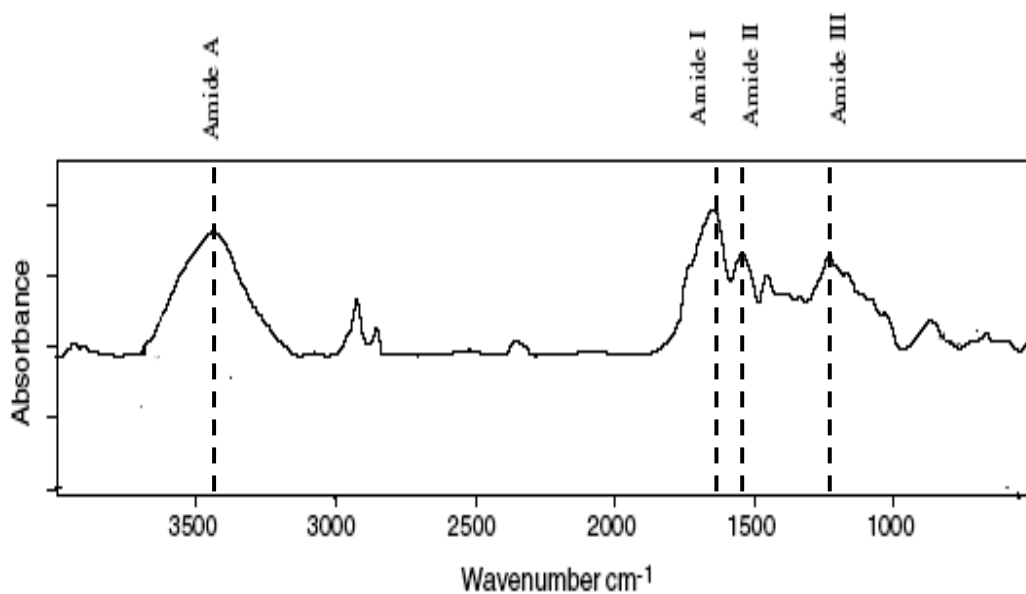
ข. โครงสร้างทางเคมีของเจลาตินดัดแปลง

จากสมการการดัดแปลงในรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้วเจลาตินจะมีโครงสร้างทางเคมีที่เปลี่ยนไป คือมีหมู่อะมิโนอิสระหายไปเนื่องจากเกิดการเชื่อมโยงพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิล ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบความสำเร็จในการดัดแปลงจากโครงสร้างที่เปลี่ยนไปของเจลาตินได้เช่นกันโดยใช้เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR spectroscopy) เพื่อให้เห็นความแตกต่างในการทดลองนี้จึงวิเคราะห์โครงสร้างของเจลาติน, คอลเลสเตอรอล และเจลาตินดัดแปลงเปรียบเทียบกับ การวิเคราะห์โครงสร้างของเจลาตินในช่วงเลขคลื่น (wavenumber) $4000-800\text{ cm}^{-1}$ สเปกตรัมของเจลาตินแสดงดังรูปที่ 4.4 เกิดพีคขึ้นในช่วงเลขคลื่น 1622 cm^{-1} ซึ่งเป็นแถบที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O พีคนี้แสดงถึงแถบเอไมด์ I ของเจลาติน ส่วนพีคที่เกิดขึ้นในช่วงเลขคลื่น 1536 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ N-H แสดงถึงแถบเอไมด์ II ของเจลาตินและที่เลขคลื่น 1249 cm^{-1} เกิดการรวมพีคระหว่างการสั่นของพันธะ N-H และการสั่นแบบยืดของพันธะ C-N สอดคล้องกับงานวิจัยของ Muyonga, J. H., และคณะ ในปี 2003 ซึ่งวิเคราะห์โครงสร้างของเจลาตินในช่วงเลขคลื่น $4000-500\text{ cm}^{-1}$ (รูปที่ 4.5) พบพีคในช่วงเลขคลื่น 3434 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดของหมู่ N-H พีคนี้แสดงถึงแถบเอไมด์ A ของเจลาติน ที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} แสดงถึงแถบเอไมด์ I ของเจลาตินในขณะที่ เอไมด์ II และ เอไมด์ III ของเจลาติน เกิดพีคในช่วงคลื่น 1542 cm^{-1} และ 1235 cm^{-1}

ในปี 2005 Hattab, N. E. และคณะ ได้วิเคราะห์โครงสร้างของคอลเลสเตอรอล (รูปที่ 4.6) [Merck, Darmstadt, Germany] พบพีคในช่วงเลขคลื่น 3602 cm^{-1} และ 3679 cm^{-1} ซึ่งแสดงการสั่นของหมู่ OH ส่วนพีคที่เกิดในช่วงเลขคลื่น $2935 - 2850\text{ cm}^{-1}$ เป็นแถบที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของหมู่ CH_2 และ CH_3 และในช่วงคลื่น 1049 cm^{-1} เป็นแถบที่แสดงถึงหมู่ C-OH เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ซึ่งวิเคราะห์โครงสร้างจากผงคอลเลสเตอรอล [Wako, Japan, รูปที่ 4.7] พบพีคในช่วงเลขคลื่น $2920 - 2847\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นแถบที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของหมู่ CH_2 และ CH_3 และที่ช่วงเลขคลื่น 1015 cm^{-1} เป็นแถบที่แสดงถึงหมู่ C-OH แต่พีคของหมู่ OH ไม่ชัดเจน ดังเช่นที่เห็นจากงานวิจัยของ Hattab, N. E.

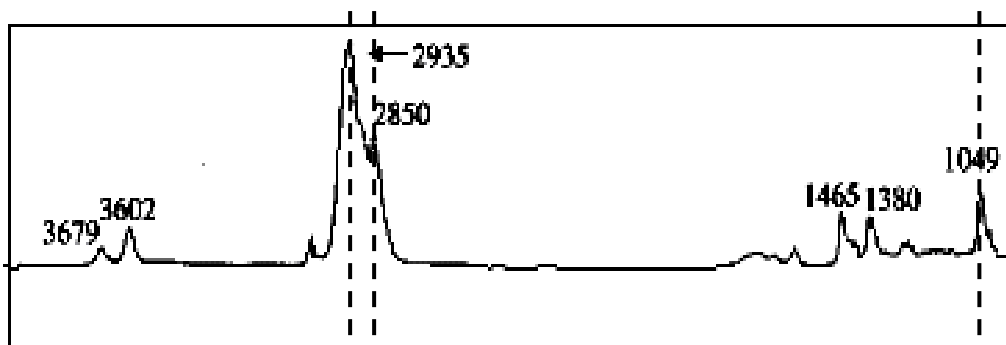


รูปที่ 4.4 FT-IR spectra ของสารละลายเจลาตินที่ผ่านการทำแห้งแข็งในช่วงเลขคลื่น $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$

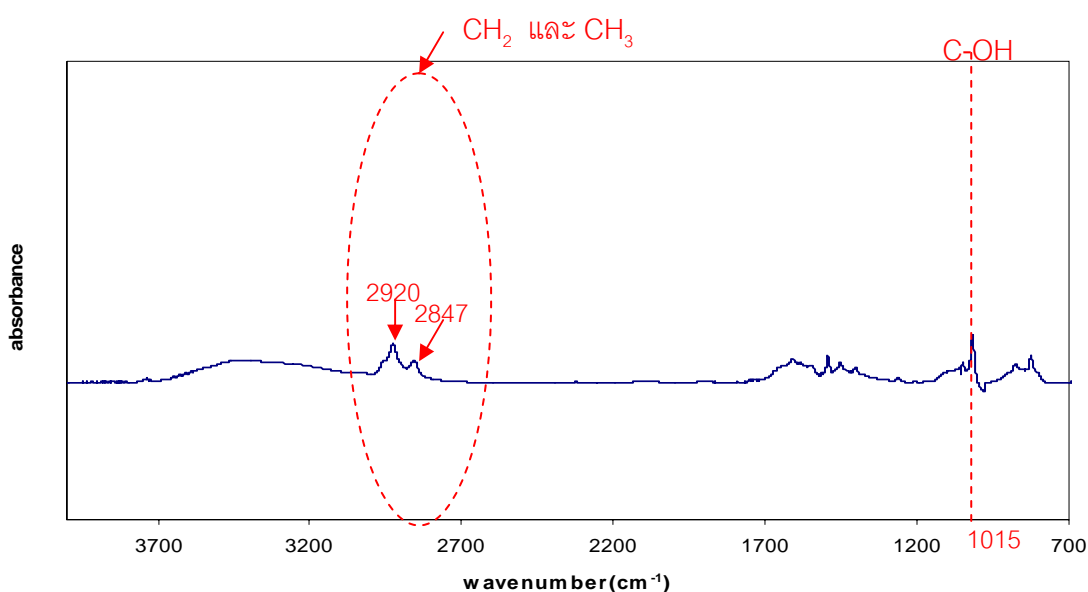


รูปที่ 4.5 FT-IR spectra ของเจลาตินในช่วงเลขคลื่น $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$

[Muyonga, J. H., และคณะ, 2003]



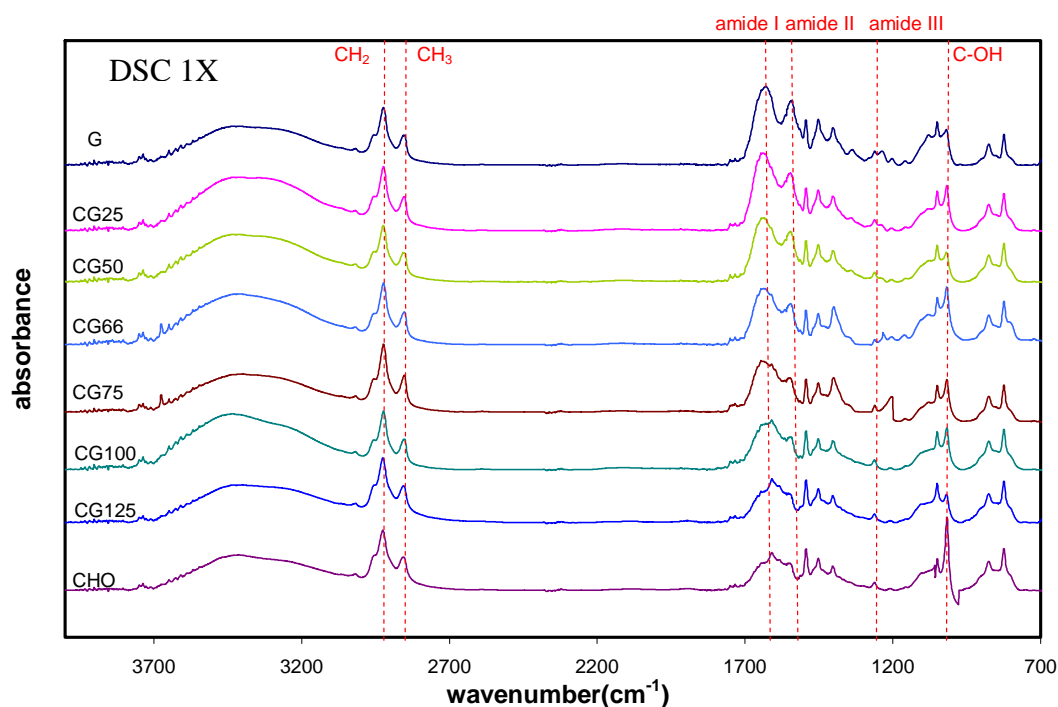
รูปที่ 4.6 FT-IR spectra ของคอลลอยด์คาร์บอน [Merck, Darmstadt, Germany] ในช่วงเลขคลื่น 4000-1000 cm^{-1} [Hattab, N. E. และคณะ, 2005]



รูปที่ 4.7 FT-IR spectra ของผงคอลลอยด์คาร์บอน (Wako, Japan) ที่ใช้ในการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินในช่วงเลขคลื่น 4000-800 cm^{-1}

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของเจลาตินดัดแปลงแสดงดังรูปที่ 4.8 – 4.10 พบว่าลักษณะสเปกตรัมของเจลาตินดัดแปลงปรากฏพีก 2 พีกที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัดคือพีกการสั่นในช่วงเลขคลื่น 1622 cm^{-1} และ 1536 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงแถบเอไมด์ I และ เอไมด์ II ลดต่ำลงเมื่อเทียบกับ G โดยจะลดต่ำลงเรื่อยๆ เมื่อเจลาตินดัดแปลงมีปริมาณคอลลอยด์คาร์บอนเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากเมื่อดัดแปลงโครงสร้างเจลาตินด้วยคอลลอยด์คาร์บอนทำให้เกิดพันธะระหว่างหมู่ NH_2 ของเจลาตินกับหมู่ OH ของคอลลอยด์คาร์บอนเป็นผลให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและหมู่ OH ลดลง จึงส่งผลต่อพีกเอไมด์ I และ เอไมด์ II ซึ่งเป็นพีกที่แสดงถึงหมู่อะมิโนอิสระ ในขณะที่ช่วงเลขคลื่น 1015 cm^{-1} ซึ่งเป็นแถบที่แสดงถึงหมู่ C-OH มีพีกการสั่นที่สูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเจลาตินมีการดัดแปลง

โครงสร้างมากขึ้น เมื่อพิจารณาสเปกตรัมของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเทอรอลโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1 เท่าของคอลเลสเทอรอล (รูปที่ 4.8) พบว่า ที่ช่วงเลขคลื่น 1015 cm^{-1} ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักเมื่อเทียบกับเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 2 เท่า และ 3 เท่าของคอลเลสเทอรอล (รูปที่ 4.9 และ 4.10) ซึ่งมีพีคการสั่นที่ช่วงเลขคลื่น 1015 cm^{-1} เปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะ CG 75, CG 100 และ CG 125 (รูปที่ 4.9) และ CG 66. CG 75, CG 100 และ CG 125 (รูปที่ 4.10) เริ่มมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับคอลเลสเทอรอล การที่มีการเปลี่ยนแปลงของพีคที่ช่วงเลขคลื่น 1015 cm^{-1} เมื่อเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะ (DSC) อาจเป็นตัวบ่งบอกได้ว่าเกิดความสำเร็จในการดัดแปลงโครงสร้างในปริมาณสูง

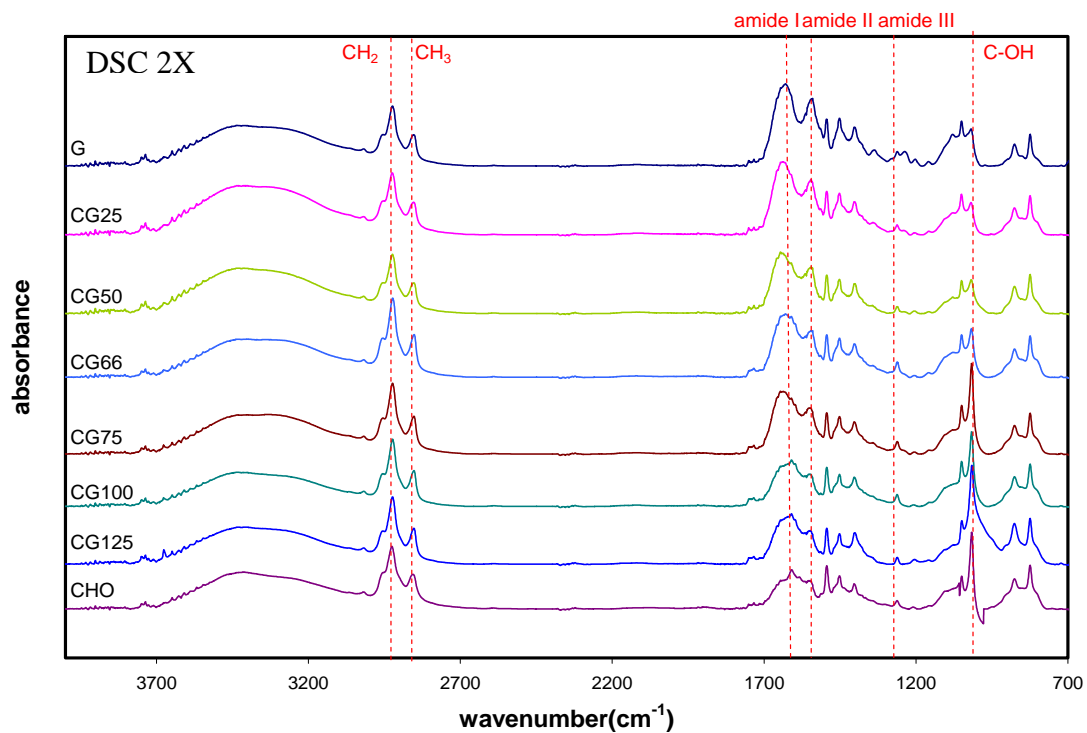


รูปที่ 4.8 FT-IR spectra ของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเทอรอลโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1 เท่าของคอลเลสเทอรอล

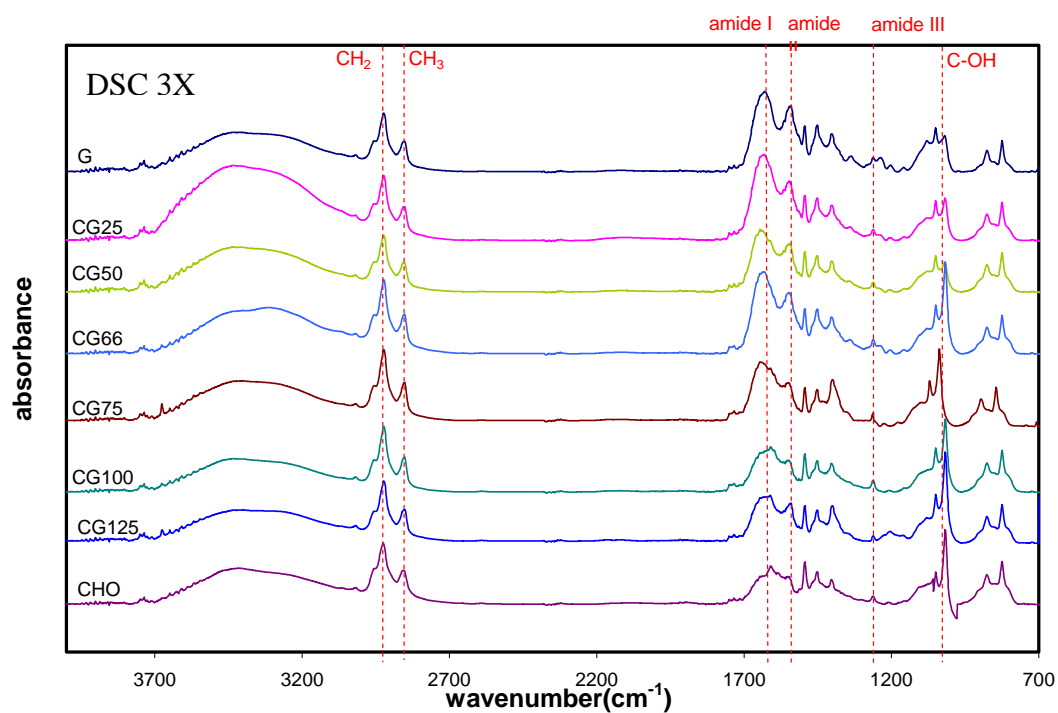
Amine I band : C = O stretching at 1622 cm^{-1}

Amine II band : N-H bending at 1536 cm^{-1}

Amine III band : combination of C-N stretching and N-H in -plane-bending with some contribution from C-C stretching and C=O bending at 1249 cm^{-1}



รูปที่ 4.9 FT-IR spectra ของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอลโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 2 เท่าของคอเลสเตรอล



รูปที่ 4.10 FT-IR spectra ของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอลโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 3 เท่าของคอเลสเตรอล

ค. ค่ามุมสัมผัสน้ำ

การวิเคราะห์พื้นผิวของเจลาตินดัดแปลงด้วยวิธีวัดค่ามุมสัมผัสเพื่อความสะดวก (hydrophilicity) และความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของเจลาตินดัดแปลงได้และสามารถบ่งบอกถึงความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาตินได้ทางอ้อม [Einerson, N.J. และคณะ, 2002] ถ้าเจลาตินดัดแปลงมีความไม่ชอบน้ำมาก อาจบ่งถึงความสำเร็จในการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเตอรอล วิธี contact angle ใช้การหยดน้ำลงบนแผ่นฟิล์มแล้วจับภาพลักษณะของหยดน้ำโดยใช้กล้องวีดีโอและคำนวณหาค่ามุมสัมผัส (ภาคผนวก ง.) จากข้อจำกัดทางการวัดนี้จึงต้องขึ้นรูปเจลาตินดัดแปลงเป็นแบบฟิล์มบางบนแผ่นกระจกสไลด์ ตารางที่ 4.2 แสดงถึงค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวของเจลาตินดัดแปลงที่ปริมาณต่างๆ ค่ามุมสัมผัสน้ำของ G มีค่า 69.88 ในขณะที่ค่ามุมสัมผัสน้ำของเจลาตินดัดแปลงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เทียบกับ G เมื่ออัตราส่วนระหว่างการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินเพิ่มขึ้นซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 75 – 93 องศา สำหรับเจลาตินดัดแปลงโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1 เท่าของคอลเลสเตอรอล ค่ามุมสัมผัสน้ำที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงความเป็น hydrophobicity ที่เพิ่มขึ้น โดยหากค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวชิ้นงานมีค่ามากกว่า 65 องศา แสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophobicity แต่ถ้าหากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้มีค่าต่ำกว่า 65 องศาแสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophilicity [Einerson, N.J. และคณะ, 2002] เมื่อเพิ่มปริมาณของสารเชื่อมพันธะในการดัดแปลงโครงสร้างเป็น 2 และ 3 เท่าของคอลเลสเตอรอลส่งผลให้ค่ามุมสัมผัสเพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นเดียวกันโดยมีค่าอยู่ในช่วง 76 - 102 องศา และ 77 – 110 องศา ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารเชื่อมพันธะส่งผลให้ค่ามุมสัมผัสน้ำเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปลงถูกแทนที่ด้วยคอลเลสเตอรอลปริมาณมากขึ้นเป็นผลให้เจลาตินมีความไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำเป็นการวัดค่าทางอ้อม เนื่องจากมีการดูดซับน้ำของเจลาตินที่ขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ การวัด hydrophobicity จึงอาจทำได้ด้วยการวัดค่ามุมสัมผัสกับสารละลายเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองด้วย (แต่ไม่ได้มีการทดสอบในการศึกษาครั้งนี้)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวของฟิล์มบางของเจลาตินดัดแปลงที่ไม่มีการเชื่อมโยงพันธะทดสอบโดยใช้เครื่อง contact angle (mean \pm SD, n=4)

รหัส	ค่ามุมสัมผัสน้ำ (องศา)		
	ใช้สารเชื่อมพันธะ 1 เท่า ของคอลเลสเตอรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 2 เท่า ของคอลเลสเตอรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่า ของคอลเลสเตอรอล
reference	37.88 \pm 1.66		
G	69.88 \pm 0.86		
CG25	75.05 \pm 0.93 *	76.48 \pm 0.63 *	77.59 \pm 2.00 *
CG50	75.25 \pm 2.02 *	88.98 \pm 0.58 * #	94.34 \pm 1.59 * # δ
CG66	83.49 \pm 1.29*	86.38 \pm 1.63 *	101.91 \pm 2.34 * # δ
CG75	84.39 \pm 0.47 *	90.27 \pm 0.47 * #	101.41 \pm 2.09 * # δ
CG100	85.64 \pm 1.36_*	93.35 \pm 1.66 * #	107.32 \pm 0.74 * # δ
CG125	92.56 \pm 0.97 *	102.08 \pm 1.17 * #	109.38 \pm 2.49 * # δ

reference - แผ่นกระจกสไลด์ (glass slide)

*, #, δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G โดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1x, 2x, 3x ของปริมาณคอลเลสเตอรอลทั้งหมด (ไมล) ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

4.2 ลักษณะสมบัติของแผ่นเจลาตินดัดแปลง (modified gelatin sheet)

ก. ระดับการเชื่อมโยงพันธะ

เจลาตินที่ดัดแปลงแล้วถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มบางเพื่อการใช้ประโยชน์ในร่างกายซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการเชื่อมพันธะ (crosslink) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลให้เป็นเครือข่ายร่างแหโดยการสร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของเจลาตินอย่างถาวร การเชื่อมพันธะมีผลต่อสมบัติทางกายภาพ ทางกล และทางชีวภาพของแผ่นเจลาติน (gelatin hydrogel) กล่าวคือ เจลาตินจะไม่สามารถคืนสภาพเดิมได้อีก แม้จะมีการเปลี่ยนอุณหภูมิไปยัง gel point เพิ่มความแข็งแรง ลดการละลายในน้ำ ทนทานต่อกระบวนการ hydrolyse โดยน้ำ และทนทานต่อกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในร่างกาย นอกจากนี้การเชื่อมพันธะยังทำให้สามารถควบคุมการปล่อยเคอร์คิวมินอย่างต่อเนื่องโดยตรงในบริเวณที่ต้องการให้เป็นไปอย่างช้าๆ ตามการย่อยสลายของแผ่นเจลาติน เราสามารถดัดแปลงอัตราการส่งผ่านสารสำคัญประเภท hydrophobic ได้โดยการปรับเปลี่ยนระดับการเชื่อมพันธะ ในการทดลองนี้ขึ้นรูปเจลาตินดัดแปลงโดยใช้การเชื่อมพันธะด้วยสารละลาย glutaraldehyde ซึ่ง

เชื่อมโยงพันธะระหว่างหมู่อะมิโนอิสระ ($-\text{NH}_3^+$) ของเจลาตินกับหมู่แอลดีไฮด์ของ glutaraldehyde (รูปที่ 4.12) ดังนั้นระดับการเชื่อมโยงพันธะจึงคำนวณได้จากผลต่างของปริมาณกรดอะมิโนของเจลาตินดัดแปลงก่อนการเชื่อมโยงพันธะ (ก่อนการขึ้นรูปเป็นแผ่น) และหลังการเชื่อมโยงพันธะ (หลังการขึ้นรูปเป็นแผ่น) โดยใช้วิธี 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ในการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโนอิสระเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.1 ระดับการเชื่อมโยงพันธะของเจลาตินหลังการขึ้นรูปเป็นแผ่นเจลาตินแสดงดังตารางที่ 4.3 และปริมาณอะมิโนอิสระของตัวอย่างแสดงในภาคผนวก ข.

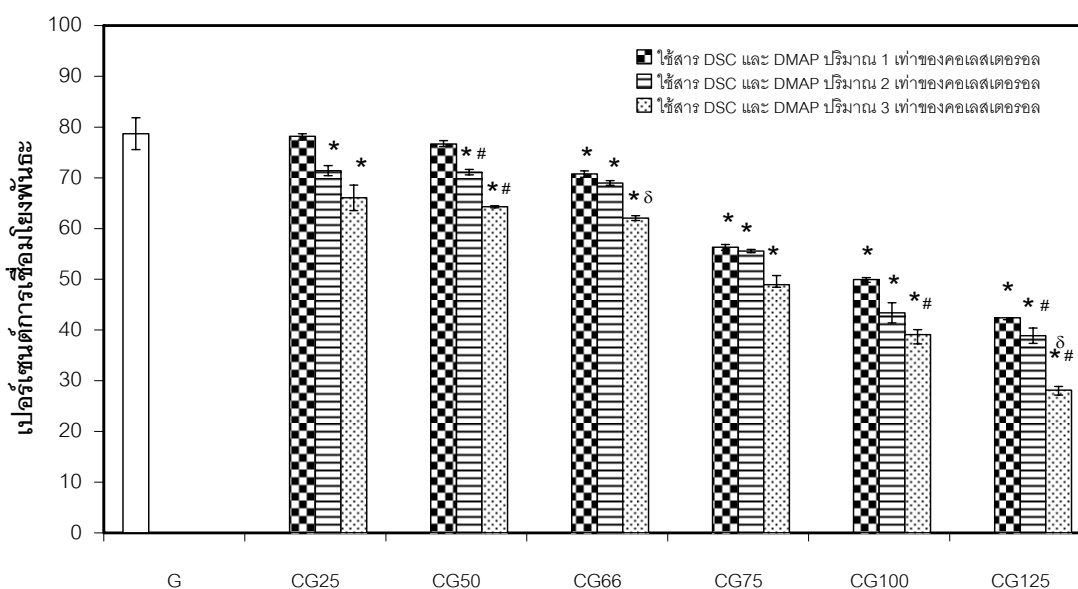
ระดับการเชื่อมโยงพันธะของ G มีค่า 78.70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณอะมิโนอิสระก่อนการขึ้นรูป = 36068 μg และหลังการขึ้นรูป = 7104 μg) แต่สำหรับแผ่นเจลาตินดัดแปลงโครงสร้างมีระดับการเชื่อมโยงพันธะลดลงโดยเฉพาะ CG125 มีเปอร์เซ็นต์การเชื่อมโยงพันธะน้อยที่สุดคือ 42.38 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณอะมิโนอิสระก่อนการขึ้นรูป = 125008 μg และหลังการขึ้นรูป = 14409 μg) สำหรับเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1 เท่าของคอเลสเทอรอล ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ G ผลที่ได้สอดคล้องกับปริมาณอะมิโนอิสระ (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากการเชื่อมพันธะของคอเลสเทอรอลบนโปรตีนต้องการหมู่ $-\text{NH}_3^+$ 1 หมู่ ดังนั้นถ้ามีคอเลสเทอรอลอยู่บนโปรตีนจำนวนมากจะมีหมู่ $-\text{NH}_3^+$ เหลือน้อยที่จะเชื่อมโยงพันธะระหว่างกัน และเมื่อวิเคราะห์ระดับการเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde ของแผ่นเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะ (DSC) พบว่าระดับการเชื่อมโยงพันธะมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อร้อยละของคอเลสเทอรอลในการดัดแปลงเพิ่มขึ้น โดยเมื่อใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 2 และ 3 เท่าของคอเลสเทอรอล ระดับการเชื่อมโยงพันธะของ CG125 จะลดลงเป็น 38.86 และ 28.13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณสารเชื่อมพันธะจึงมีผลต่อการเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปลงจะลดลง

ลักษณะทั่วไปของแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 4.13 ลักษณะของแผ่นเจลาตินดัดแปลงหลังการเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde มีสีเหลืองอ่อน แต่ถ้ามีการใช้คอเลสเทอรอลในปริมาณสูงขึ้นแผ่นจะมีสีขาวมากขึ้น แผ่นเจลาตินดัดแปลง CG100 และ CG125 มีลักษณะของแผ่นที่คล้ายฟองน้ำและยุบกว่าแผ่นเจลาตินที่ดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลในปริมาณที่น้อยกว่า เมื่อพิจารณาลักษณะโครงสร้างภายในของแผ่นเจลาตินดัดแปลงผ่านกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 4.14) พบว่ารูพรุนของแผ่นเจลาตินดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลปริมาณมากขึ้นมีขนาดใหญ่ขึ้นแสดงถึงความสามารถในการเชื่อมโยงพันธะได้น้อยกว่าและโครงสร้างของแผ่นเจลาตินที่เปลี่ยนแปลงไปมากเมื่อมีคอเลสเทอรอลอยู่ในโครงสร้าง

ตารางที่ 4.3 แสดงระดับการเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde ของเจลาตินดัดแปลงหลังผ่านการขึ้นรูปเป็นแผ่น (mean \pm SD, n = 4)

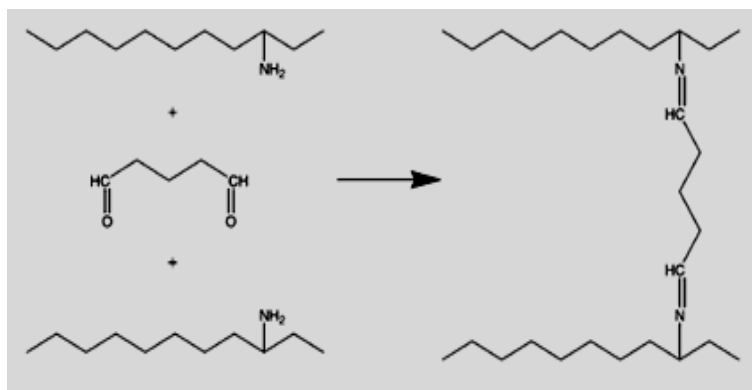
รหัส	ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (%)		
	ใช้สารเชื่อมพันธะ 1 เท่า ของคอเลสเตรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 2 เท่า ของคอเลสเตรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่า ของคอเลสเตรอล
G	78.70 \pm 0.01		
CG25	78.17 \pm 0.00	71.39 \pm 0.02*	66.07 \pm 0.00*
CG50	76.67 \pm 0.01	71.10 \pm 0.00* #	64.29 \pm 0.00* #
CG66	70.76 \pm 0.01*	68.98 \pm 0.01*	62.04 \pm 0.00* δ
CG75	56.30 \pm 0.01*	55.54 \pm 0.01*	48.93 \pm 0.01*
CG100	49.93 \pm 0.01*	43.37 \pm 0.03*	39.07 \pm 0.01* #
CG125	42.38 \pm 0.01*	38.86 \pm 0.01* #	28.13 \pm 0.01* # δ

*, #, δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G โดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1x, 2x, 3x ของปริมาณคอเลสเตรอลทั้งหมด (ไมล) ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

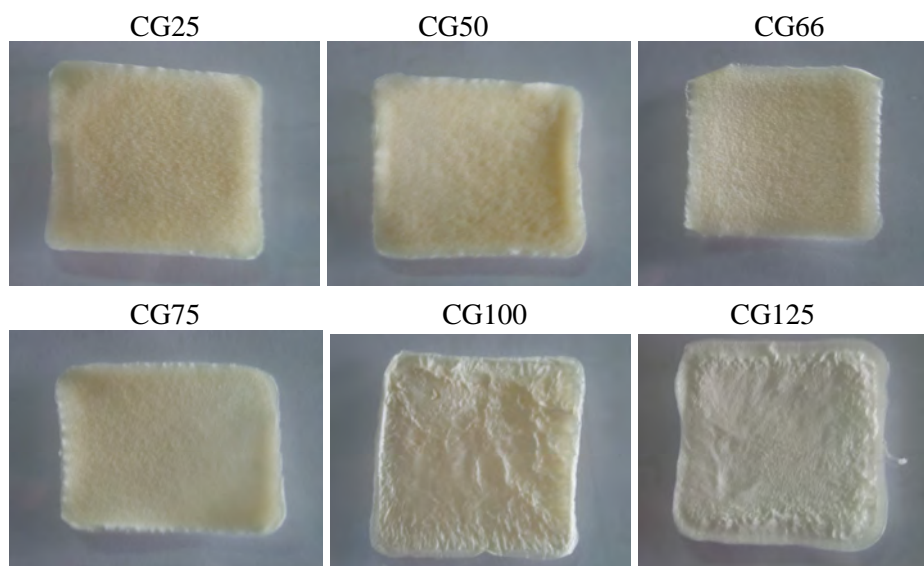


รูปที่ 4.11 ระดับการเชื่อมโยงพันธะของแผ่นเจลาตินดัดแปลง (mean \pm SD, n = 4)

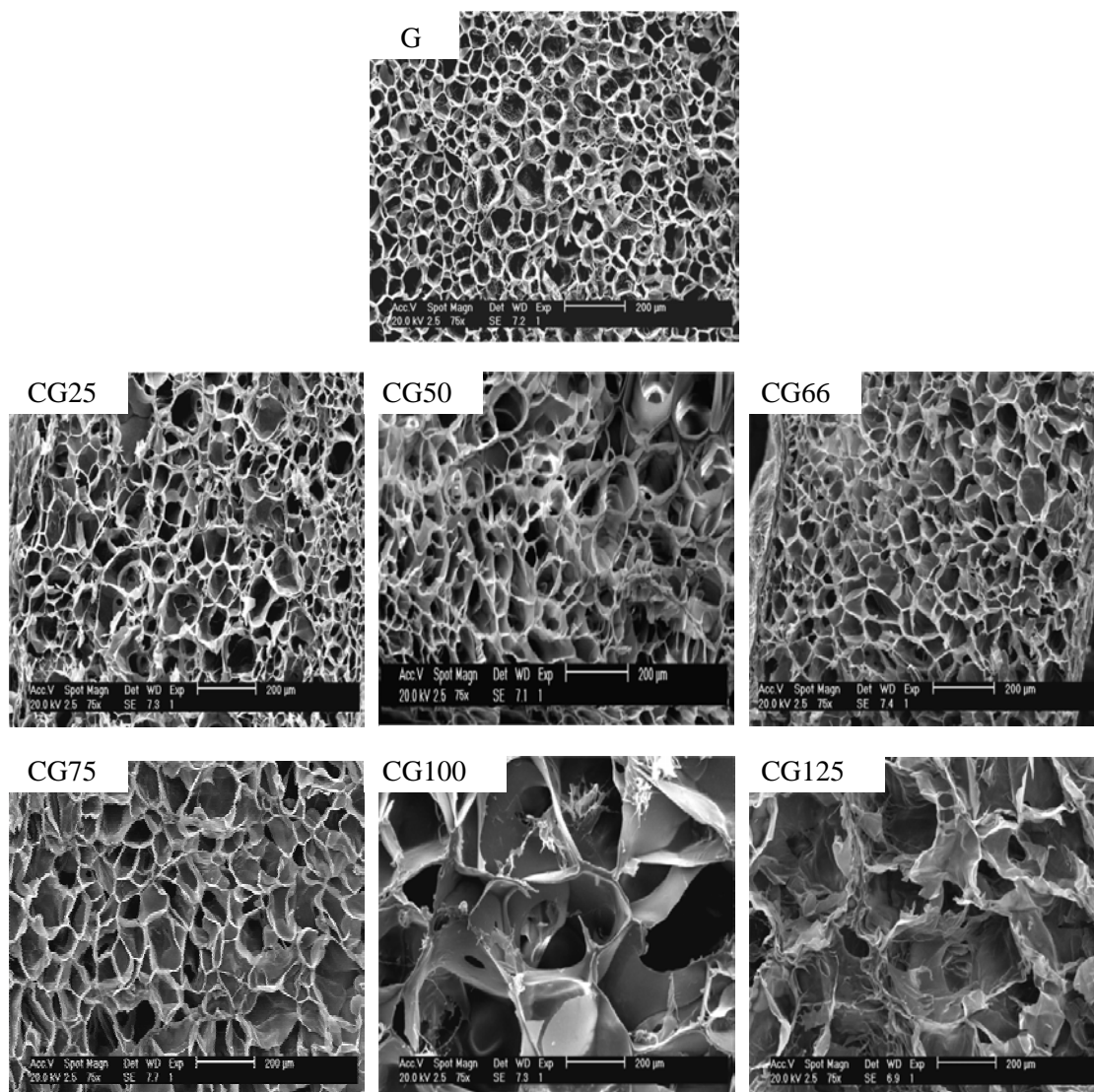
*, #, δ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G โดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1x, 2x, 3x ของปริมาณคอเลสเตรอลทั้งหมด (ไมล) ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$



รูปที่ 4.12 การเชื่อมโยงพันธะระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนกับหมู่แอลดีไฮด์ของ glutaraldehyde [Lee, C.R., 2001]



รูปที่ 4.13 รูปถ่ายแผ่นเจลาตินดัดแปลง (ความเข้มข้น 5 % โดยน้ำหนัก) ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้น 0.06 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด



รูปที่ 4.14 รูปจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดของแผ่นเจลาตินดัดแปลง (ความเข้มข้น 5 % โดยน้ำหนัก) ที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้น 0.06 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่กำลังขยาย 75 เท่า

ข. การดูดซับน้ำ

การดูดซับน้ำของแผ่นเจลาตินดัดแปลงสามารถบ่งบอกถึงระดับของการเชื่อมโยงพันธะทางข้ามโดยวัสดุที่ถูกเชื่อมโยงพันธะระดับสูงจะมีการกักเก็บน้ำได้ลดลง [Liu,H. และคณะ, 2004] การทดสอบการดูดซับน้ำของเจลาตินดัดแปลงซึ่งขึ้นรูปเป็นแผ่นวัดได้จากปริมาณสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ถูกแผ่นเจลาตินดูดซับไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงได้ในรูปของสัดส่วนการดูดซับน้ำ ดังตารางที่ 4.4 เมื่อมีการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอลเลสเตอร์ลเพิ่มมากขึ้นแผ่นเจลาตินดัดแปลงสามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น โดยเฉพาะ CG125

ที่ดูดซับเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับ G มีการดูดซับน้ำได้ประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น CG125 มีการดัดแปลงโครงสร้างมาก ปริมาณอะมิโนอิสระจึงมีค่าลดลงส่งผลให้เจลาตินเชื่อมโยงพันธะได้น้อยลง และเมื่อเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 2x และ 3x พบว่าสัดส่วนการดูดซับน้ำมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ซึ่ง CG25, CG50 และ CG125 ของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเตรอรอลโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 3 เท่าของคอเลสเตรอรอล มีสมบัติการดูดซับน้ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1 เท่าของคอเลสเตรอรอล ผลที่ได้สอดคล้องกับระดับการเชื่อมโยงพันธะ (ตารางที่ 4.3) การดูดซับน้ำยังมีผลต่อการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงเนื่องจากหากแผ่นเจลาตินดัดแปลงสามารถดูดซับน้ำไว้ได้มาก การย่อยสลายของแผ่นเจลาตินมักจะเกิดขึ้นได้ง่ายเนื่องจากเอนไซม์ที่ละลายอยู่ในน้ำสามารถเข้าไปทำลายพันธะภายในโมเลกุลของแผ่นเจลาตินดัดแปลงได้ง่ายรวมทั้งบางพันธะสามารถเกิด ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยโมเลกุลของน้ำ ซึ่งจะทำให้การรายงานผลการศึกษาต่อไปในหัวข้อ ค. และ ง.

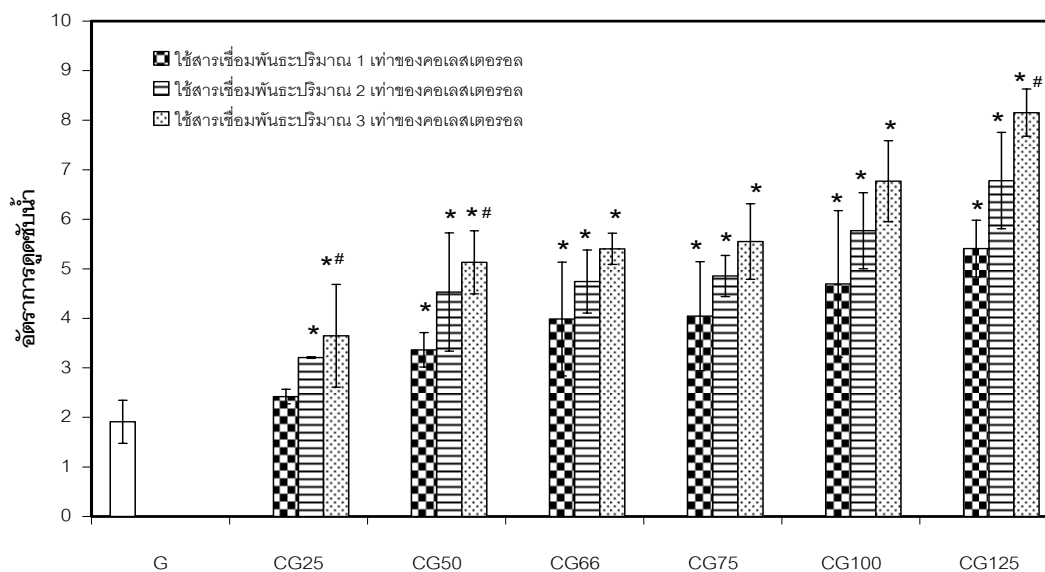
ตารางที่ 4.4 แสดงสัดส่วนการดูดซับน้ำของแผ่นเจลาตินดัดแปลง ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน โดยแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (mean \pm SD, n = 4)

รหัส	สัดส่วนการดูดซับน้ำ		
	ใช้สารเชื่อมพันธะ 1 เท่า ของคอเลสเตรอรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 2 เท่า ของคอเลสเตรอรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่า ของคอเลสเตรอรอล
G	1.91 \pm 0.43		
CG25	2.42 \pm 0.15	3.21 \pm 0.02 *	3.65 \pm 1.04 #
CG50	3.36 \pm 0.35 *	4.53 \pm 1.19 *	5.13 \pm 0.64 #
CG66	3.98 \pm 1.15 *	4.74 \pm 0.63*	5.40 \pm 0.31
CG75	4.04 \pm 1.10 *	4.86 \pm 0.42 *	5.55 \pm 0.76
CG100	4.69 \pm 1.48 *	5.76 \pm 0.77 *	6.77 \pm 0.82
CG125	5.41 \pm 0.57 *	6.78 \pm 0.97 *	8.15 \pm 0.47 #

*, # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G โดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1x และ 2x ของปริมาณคอเลสเตรอรอลทั้งหมด (ไมล) ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

หมายเหตุ: สัดส่วนการดูดซับน้ำคำนวณได้จากสมการ $\frac{W_{so} - W_0}{W_0}$

โดยที่ W_{so} คือน้ำหนักของแผ่นเจลาตินหลังจากที่ถูกดูดซับน้ำ และ W_0 คือน้ำหนักเริ่มต้นของแผ่นเจลาติน



รูปที่ 4.15 สัดส่วนการดูดซับน้ำของแผ่นเจลาตินดัดแปลง (mean \pm SD, n = 4)

*, # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G โดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1x และ 2x ของปริมาณคอเลสเตรอลทั้งหมด (โมล) ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ค. อุณหภูมิในการสลายตัว

สมบัติทางความร้อนของแผ่นเจลาตินดัดแปลงวิเคราะห์จากอุณหภูมิในการสลายตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลงด้วยเครื่อง Thermogravimetric / Differential Analyzer (TG/DTA) (ตัวอย่างการหาแสดงในภาคผนวก ค.) แสดงดังตารางที่ 4.5 จากการวิเคราะห์พบว่าแผ่นเจลาตินที่ไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้างมีค่าอุณหภูมิการสลายตัวสูงสุด คือ 293°C แต่เมื่อร้อยละในการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเตรอลเพิ่มขึ้นเป็นผลให้ค่าอุณหภูมิในการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ในช่วง $271\text{-}291^{\circ}\text{C}$ โดย CG125 ซึ่งมีการดัดแปลงโครงสร้างมากที่สุดมีค่าอุณหภูมิในการสลายตัว (282°C) ลดลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับ G อย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1 เท่าของคอเลสเตรอล อาจเนื่องมาจาก CG125 มีการดัดแปลงโครงสร้างมากที่สุดทำให้มีการเชื่อมโยงพันธะของโมเลกุลภายในแผ่นเจลาตินดัดแปลงด้วย glutaraldehyde ได้น้อยทำให้พันธะภายในโมเลกุลถูกทำลายได้ง่ายกว่าแผ่นเจลาตินที่ไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้าง และเมื่อเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะที่ใช้ในการดัดแปลงโครงสร้างเป็น 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล อุณหภูมิในการสลายตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลงลดลงอีก โดย CG125 มีค่าอุณหภูมิในการสลายตัวลดลงจากเดิมเป็น 280 และ 277°C ตามลำดับ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารเชื่อมพันธะมีผลต่ออุณหภูมิในการสลายตัวเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามค่าอุณหภูมิการสลายตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลงอาจได้รับผลกระทบจากการเชื่อมโยงพันธะของแผ่นด้วย glutaraldehyde ทำ

ให้ค่าที่ได้ค่อนข้างใกล้เคียงกันแม้ว่าจะมีปริมาณคอเลสเตรอลมากขึ้นจาก 25 – 100 % รายงานการศึกษาคุณสมบัติในการสลายตัวของเจลาตินฟิล์ม ซึ่งผลิตจากเจลาติน USP grade (หมายถึงสารเคมีที่รับรองคุณภาพตามมาตรฐาน United States Pharmacopoeia หรือเป็นสารเคมีคุณภาพชั้นเภสัชกรรม (pharmaceutical grade)) พบคุณสมบัติในการเชื่อมสภาพที่ 296 องศาเซลเซียส และเมื่อผสมเจลาตินกับ sorbitol พบว่าคุณสมบัติในการเชื่อมสภาพมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยโดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับฟิล์มเจลาติน สาเหตุที่คุณสมบัติในการสลายตัวมีแนวโน้มลดลงเนื่องจากความเป็น plasticizer หรือ สารเสริมสภาพพลาสติกของ sorbitol ซึ่งนิยมใส่ในพอลิเมอร์เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น [Barreto, PLM. 2002] อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาค่าคุณสมบัติในการย่อยสลายของเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้าง และนำมาขึ้นรูปเพื่อใช้งานด้านการควบคุมการส่งผ่านมวลสาร

ตารางที่ 4.5 แสดงคุณสมบัติในการสลายตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลงโดยใช้โปรแกรม Onset จากเครื่อง Thermogravimetric/ Differential Analyzer (TG/DTA)

รหัส	คุณสมบัติในการสลายตัว (°C)		
	ใช้สารเชื่อมพันธะ 1 เท่าของคอเลสเตรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 2 เท่าของคอเลสเตรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่าของคอเลสเตรอล
G	293		
CG25	291	290	288
CG50	289	287	286
CG66	288	286	285
CG75	286	285	283
CG100	285	282	281
CG125	282	280	277

หมายเหตุ : กราฟการสลายตัวของแผ่นเจลาตินโดยใช้โปรแกรม Onset จากเครื่อง Thermogravimetric / Differential Analyzer (TG/DTA) แสดงในภาคผนวก ค.

ง. การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย

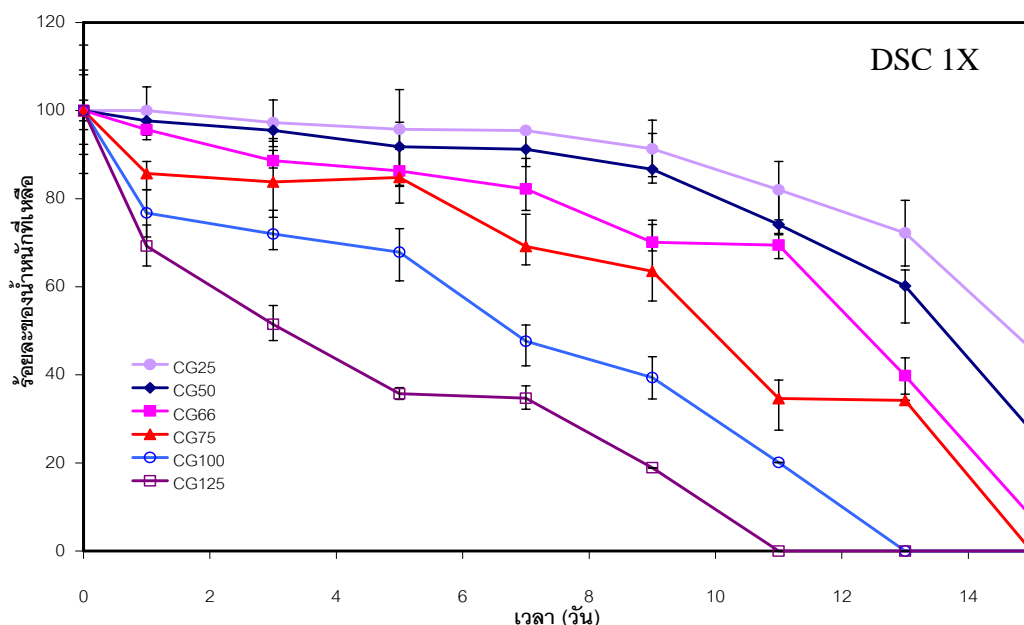
การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงโดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) [Lee, SB. 2003; Ma, L. 2004] เพื่อประมาณการย่อยสลายในรูปของร้อยละของน้ำหนักที่หายไปเทียบกับเวลา ทำโดยการแช่แผ่นเจลาตินดัดแปลงหนัก 5

มิลลิกรัม ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส (1 มิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร (1 มิลลิกรัม = 125 ยูนิต) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ เพื่อจำลองสภาวะของร่างกาย [Campbell, N.A. และคณะ, 1999] การย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1, 2, 3 เท่าของคอลเลสเทอรอล แสดงดังรูปที่ 4.16 - 4.18

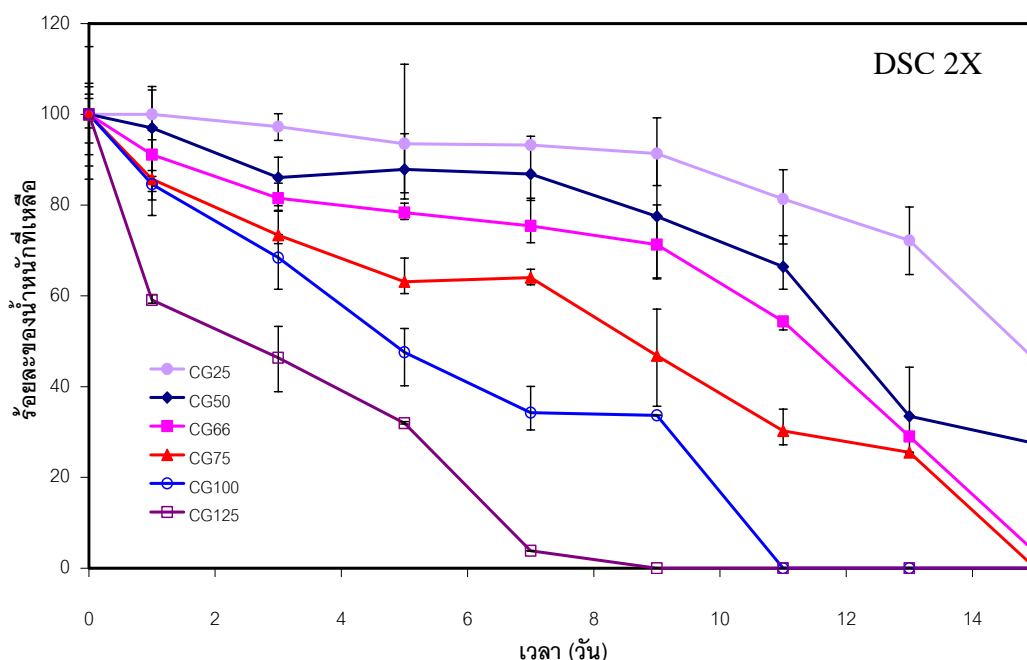
CG125 และ CG100 มีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วอยู่ในช่วง 11-13 วัน ในขณะที่แผ่นเจลลาตินดัดแปลงอื่นๆ มีระยะเวลาการย่อยสลายที่นานกว่า 15 วัน เมื่อร้อยละในการดัดแปลงด้วยคอลเลสเทอรอลลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเจลลาตินที่มีการดัดแปลงโครงสร้างมากมีการสูญเสียหมู่อะมิโนอิสระมากกว่าเจลลาตินที่มีการดัดแปลงโครงสร้างน้อยเป็นผลให้เกิดการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี glutaraldehyde น้อยกว่า ทำให้เอนไซม์คอลลาจีเนสที่ละลายอยู่ใน PBS สามารถเข้าไปทำลายพันธะภายในโมเลกุลของแผ่นเจลลาตินที่มีการดัดแปลงโครงสร้างสูงได้ง่ายกว่า และเมื่อเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 2 เท่าของคอลเลสเทอรอล แผ่นเจลลาตินดัดแปลงมีการย่อยสลายที่เร็วขึ้น (รูปที่ 4.17) CG125 และ CG100 มีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วอยู่ในช่วง 9-11 วัน ในขณะที่แผ่นเจลลาตินดัดแปลงอื่นๆ มีระยะเวลาการย่อยสลายที่นานกว่า เช่นเดียวกับแผ่นเจลลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1 เท่าของคอลเลสเทอรอล ในขณะที่เมื่อเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 3 เท่าของคอลเลสเทอรอล (รูปที่ 4.18) พบว่า CG125 มีการย่อยสลายหมดอย่างรวดเร็วภายใน 7 วัน แต่ CG100 มีการย่อยสลายหมดในวันที่ 11 เช่นเดิม ซึ่งผลการย่อยสลายนี้สอดคล้องกับผลการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำเนื่องจากความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำ (หัวข้อ 4.1 (ค)) โดยแผ่นเจลลาตินที่มีการดัดแปลงโครงสร้างสูงมีความชอบน้ำน้อยความสามารถในการเชื่อมโยงพันธะลดลงทำให้เกิดการย่อยสลายที่เร็ว แนวโน้มของการย่อยสลายที่เร็วขึ้นเมื่อมีปริมาณคอลเลสเทอรอลสูงขึ้น สอดคล้องกับแนวโน้มของอุณหภูมิในการสลายตัวอีกด้วย

เมื่อแสดงการย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงในรูปของค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) ดังตารางที่ 4.6 หรือเวลาที่ทำให้แผ่นเจลลาตินดัดแปลงลดปริมาณลงครึ่งหนึ่ง (โดยน้ำหนัก) พบว่าค่าครึ่งชีวิตของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณคอลเลสเทอรอลในการดัดแปลง ค่าครึ่งชีวิตของ CG25 มีค่าสูงที่สุดคือประมาณ 14 วัน แสดงถึงความแข็งแรงของแผ่นเจลลาตินหลังผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde ทำให้มีระยะเวลาในการย่อยสลายนานที่สุด ในขณะที่แผ่นเจลลาตินดัดแปลงอื่นๆ มีค่าครึ่งชีวิตลดลงตามลำดับโดยเฉพาะ CG100 และ CG125 มีค่าครึ่งชีวิตสั้นมาก ทำให้มีการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว ผลการย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินนี้จะส่งผลถึงความสามารถในการปลดปล่อยเคอร์คิวมินของแผ่นเจลลาตินด้วยเนื่องจากงานวิจัยนี้ควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คิวมินโดยใช้หลักการย่อยสลายของโพลิเมอร์ ดังนั้นหากโพลิเมอร์ย่อยสลายเร็ว

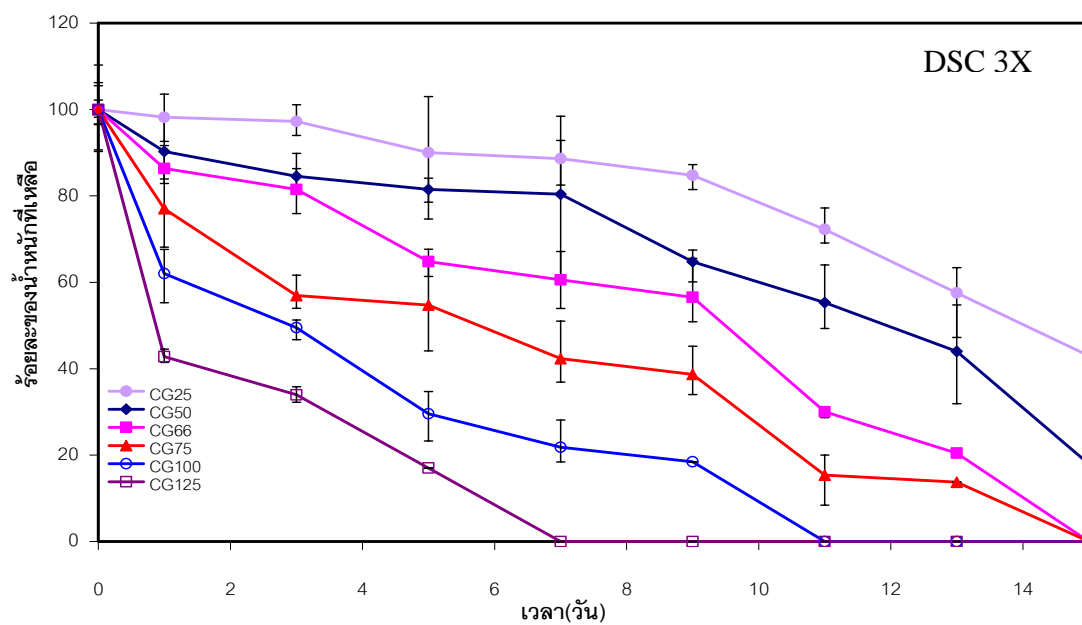
เคอร์คิวมินจะถูกปลดปล่อยออกมาเร็วเช่นเดียวกันจึงสามารถควบคุมได้โดยปรับเปลี่ยนสภาวะในการเชื่อมโยงพันธะ



รูปที่ 4.16 ร้อยละของน้ำหนักรที่เหลือของแผ่นเจลาติน (หนัก 5 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1 เท่าของคอเลสเตรอลในสารละลาย collagenase (1 units/ml) เป็นเวลา 15 วัน (mean \pm SD, n=3)



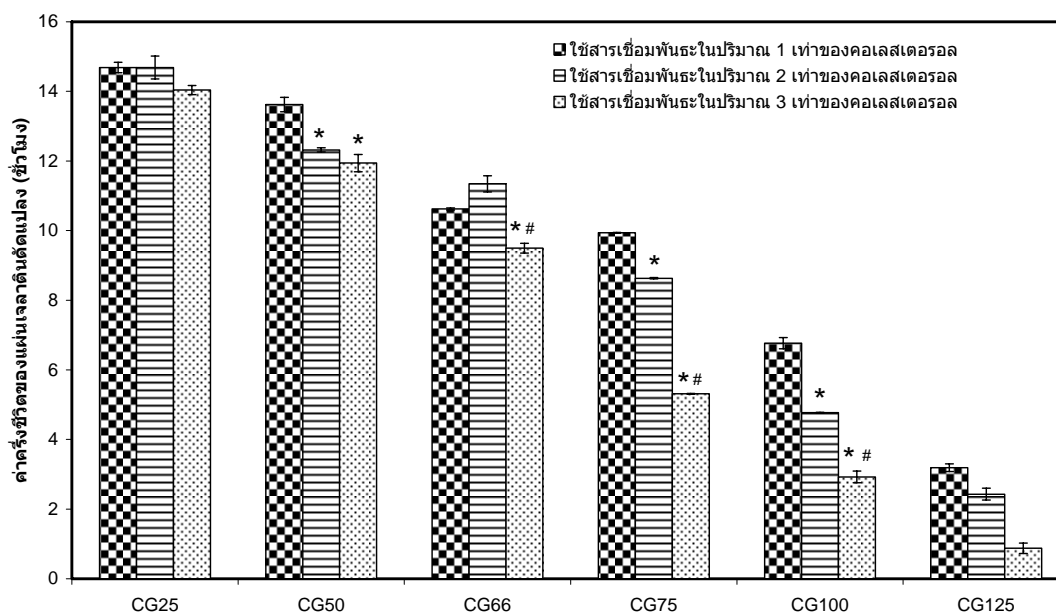
รูปที่ 4.17 ร้อยละของน้ำหนักรที่เหลือของแผ่นเจลาติน (หนัก 5 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 2 เท่าของคอเลสเตรอลในสารละลาย collagenase (1 units/ml) เป็นเวลา 15 วัน (mean \pm SD, n=3)



รูปที่ 4.18 ร้อยละของน้ำหนักที่เหลือของแผ่นเจลาติน (หนัก 5 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 3 เท่าของคอเลสเตรอลในสารละลาย collagenase (1 units/ml) เป็นเวลา 15 วัน (mean \pm SD, n=3)

ตารางที่ 4.6 ค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) ของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ถูกย่อยสลายตามในสภาวะดัง
รูป 4.16 - 4.18

รหัส	ค่าครึ่งชีวิตของการย่อยสลาย (วัน)		
	ใช้สารเชื่อมพันธะ 1 เท่า ของคอลเลสเตรอรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 2 เท่า ของคอลเลสเตรอรอล	ใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่า ของคอลเลสเตรอรอล
CG25	14.68 ± 0.15	14.68 ± 0.33	14.04 ± 0.13
CG50	13.62 ± 0.21	12.32 ± 0.06	11.94 ± 0.25
CG66	10.62 ± 0.03	11.34 ± 0.23	9.49 ± 0.14
CG75	9.94 ± 0.01	8.63 ± 0.02	5.31 ± 0.01
CG100	6.77 ± 0.16	4.77 ± 0.01	2.92 ± 0.17
CG125	3.19 ± 0.11	2.43 ± 0.17	0.87 ± 0.15



รูปที่ 4.19 ค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) การย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่แช่ในสารละลาย
เอนไซม์ collagenase (1 units/ml)

*, # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G โดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1x และ
2x ของปริมาณคอลเลสเตรอรอลทั้งหมด (ไมล) ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

จ. ความเป็นพิษของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast

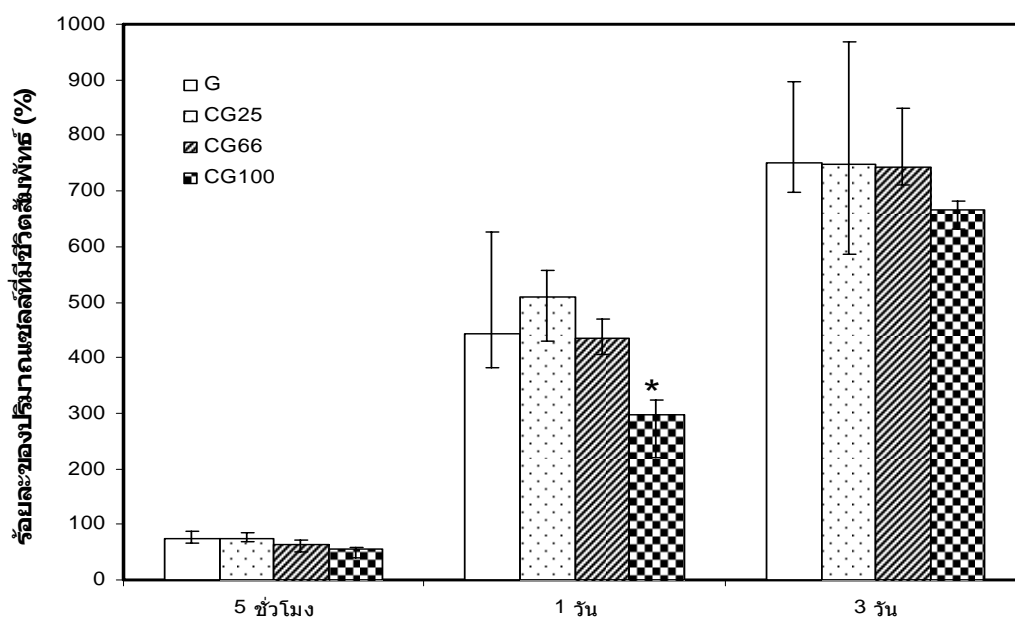
การทดสอบความเป็นพิษของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงโดยการเลี้ยงเซลล์บนแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่เวลาต่างๆ และวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay โดยเซลล์ที่มีชีวิตไมโตคอนเดรียจะทำงานและปล่อยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งทำปฏิกิริยากับสาร MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] เกิดเป็นผลิตภัณฑ์น้ำเงินเข้มของผลึกฟอร์มาซาน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลึกฟอร์มาซานที่เกิดขึ้น [Tour, U. และคณะ, 1999] ซึ่งพิจารณาออกเป็น 2 ลักษณะคือ ศักยภาพการยึดเกาะ (cell adhesion) ของเซลล์ที่เวลา 5 ชั่วโมง และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ที่เวลา 1 วัน และ 3 วัน

รูปที่ 4.20 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของ G, CG25, CG66 และ CG100 ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 3 เท่าของคอเลสเตรอรอล พบว่าการยึดเกาะของเซลล์ที่ 5 ชั่วโมง ของ G, CG25, CG66 และ CG100 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการยึดเกาะของเซลล์ใน G สามารถยึดเกาะได้ประมาณ 75 % และเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามเวลา โดยที่เวลา 1 วันมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากกว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมงเป็น 83 % และที่ 3 วัน มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 90 % จากจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมง เนื่องจากเจลลาตินเป็นวัสดุที่ส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื่องจากโมเลกุลของเจลลาตินมีส่วนประกอบของ Arg-Gly-Asp (RGD)-like sequence ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการยึดเกาะ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดย (RGD)-like sequence จะไปจับกับ integrin receptor ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ [Huang, Y. และคณะ, 2005] เมื่อพิจารณาการยึดเกาะของเซลล์ใน CG 25 สามารถยึดเกาะได้ 74 % ที่ 5 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นที่เวลา 1 วัน และ 3 วัน ในขณะที่ CG 66 และ CG100 เซลล์สามารถยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมงได้เพียง 63 % และ 55 % ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลที่ 1 วัน พบว่า CG 25 และ CG 66 มีการเพิ่มของจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกับ G อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ CG100 มีการเพิ่มของจำนวนเซลล์น้อยกว่า G อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่ามี การเพิ่มของจำนวนเซลล์ลดลงเมื่อมีการดัดแปลงโครงสร้างของเจลลาตินมากขึ้น แต่เมื่อพิจารณาผลที่ 3 วัน พบว่าแผ่นเจลลาตินดัดแปลงมีการเพิ่มของจำนวนเซลล์น้อยกว่า G เพียงเล็กน้อย แสดงว่าคอเลสเตรอรอลซึ่งใช้ในการดัดแปลงโครงสร้างของเจลลาตินไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

รายงานการวิจัยของ Ahmad S. และคณะ ในปี 2006 ทดสอบความเป็นพิษของคอเลสเตรอรอล (ละลายในเอทานอล) ความเข้มข้น 1.0 μM และ 15.0 μM เทียบกับกลุ่มควบคุม (เอทานอล) ทดสอบโดยใช้เซลล์ 5×10^4 เซลล์ และวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้วิธี MTT assay ที่เวลา 4 ชั่วโมง พบว่า คอเลสเตรอรอลมีปริมาณเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และเกิดการลดลงของเซลล์มากกว่า 50 % เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอเลสเตรอรอลแสดงให้เห็นว่าคอเลสเตรอรอลก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ และจากงานวิจัยของ Ji, B. และคณะ ในปี 2002

ซึ่งสังเคราะห์ cholesterol-carborane conjugate (BCH) เพื่อให้นำส่งโบรอนในการรักษามะเร็ง ได้ทดสอบความเป็นพิษของ cholesterol-carborane conjugate (BCH) เทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์ 10^5 เซลล์ และวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay ที่เวลา 72 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน พบว่า BCH มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต 98% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต 100% แสดงให้เห็นว่าคอเลสเทอรอลก่อให้เกิดความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย (Ji, B. และคณะ, 2002)

ในปี 1997 มีรายงานว่าการทดลองของคอเลสเทอรอลออกไซด์ ซึ่งเป็นคอเลสเทอรอลที่ถูก oxygenate มีความเป็นพิษกับเซลล์โดยจะทำลาย endothelial cells, smooth muscle cells และ fibroblast cells จากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT assay ที่เวลา 72 ชั่วโมง คอเลสเทอรอลออกไซด์ที่ถูกเลือกมาทดสอบเช่น 19-OH และ 25-OH พบว่า 25-OH มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่า 19-OH และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคอเลสเทอรอลที่ใช้ในการทดสอบปรากฏว่ามีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลง และมีรายงานอีกว่า การทดลองในสัตว์ทดลอง คอเลสเทอรอลออกไซด์จะถูกจัดการออกจากพลาสมาอย่างรวดเร็วและถูกกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Chang, J. Y., และคณะ, 1997) จากข้อมูลดังกล่าวอาจสันนิษฐานได้ว่าคอเลสเทอรอลอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ได้เช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.20 การทดสอบความเป็นพิษของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (หนัก 5 มิลลิกรัม) เมื่อใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่าของคอเลสเทอรอล ต่อเซลล์ L929 mouse fibroblast $10,000$ เซลล์ ที่เวลา 5 ชั่วโมง, 1 วัน และ 3 วัน (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$) (mean \pm SD, n=4)

จ. การควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกาย

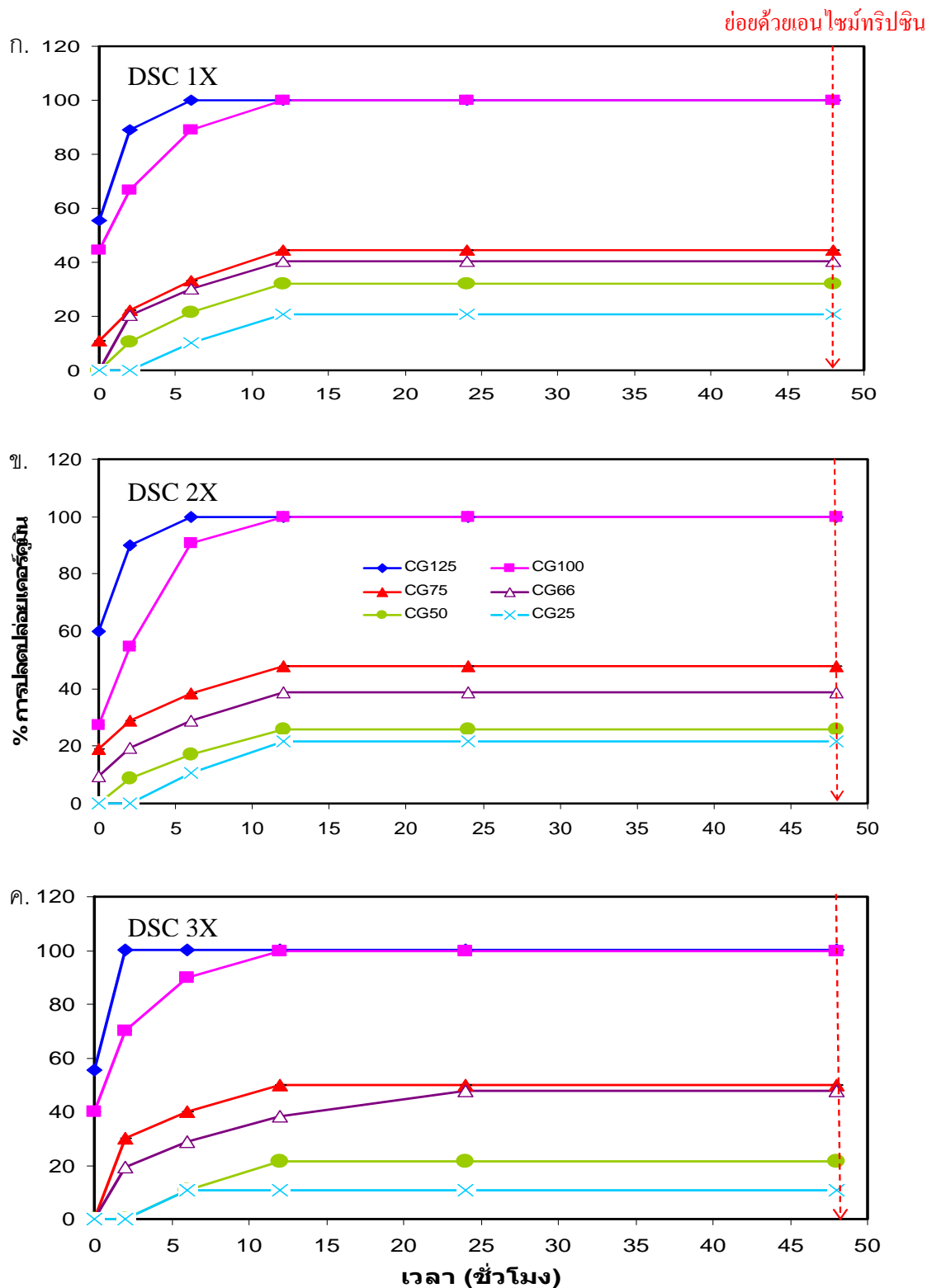
การแพร่ของเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (หนัก 2 มิลลิกรัม) โดยมีการดูดซับเคอร์คูมินความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 15, 20 และ 40 ไมโครกรัม/กรัมแผ่น นำไปแช่ในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween 80) ที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วแผ่นเจลลาตินดัดแปลงจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน เพื่อหาปริมาณเคอร์คูมินที่ยังคงเหลือในแผ่นเนื่องจาก Hydrophobic Interaction กับคอเลสเทอรอล

การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลงซึ่งดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น แสดงดังรูปที่ 4.21 ตัวอย่าง CG125 ซึ่งผ่านการดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเทอรอล มีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลงอย่างรวดเร็วจนหมดใน 6 ชั่วโมง เนื่องจากเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง ทำให้ไม่มีปริมาณเคอร์คูมินหลงเหลืออยู่ในแผ่นเจลลาตินดัดแปลง ในขณะที่ CG100 เกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 12 เช่นกัน แต่เมื่อลดปริมาณคอเลสเทอรอลในการดัดแปลงลงเป็น CG75, CG66, CG50 และ CG25 มีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลงอย่างรวดเร็วใน 2 ชั่วโมงแรก (โดยจะเรียกการแพร่ของเคอร์คูมินในช่วงนี้ว่า 1st burst ซึ่งเกิดจากการแพร่ของเคอร์คูมินที่เกินพอและไม่ทำ Hydrophobic Interaction กับคอเลสเทอรอล) หลังจากนั้นมีการปลดปล่อยอย่างช้าๆ จนกระทั่งไม่เกิดการแพร่ของเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลงในระยะเวลาต่อมา เคอร์คูมินส่วนที่เหลืออยู่ในแผ่นเจลลาตินดัดแปลงถูกกักเก็บไว้ด้วย Hydrophobic Interaction ระหว่างเคอร์คูมินกับคอเลสเทอรอลและจะถูกปลดปล่อยออกมาตามการสลายตัวของแผ่นเจลลาติน

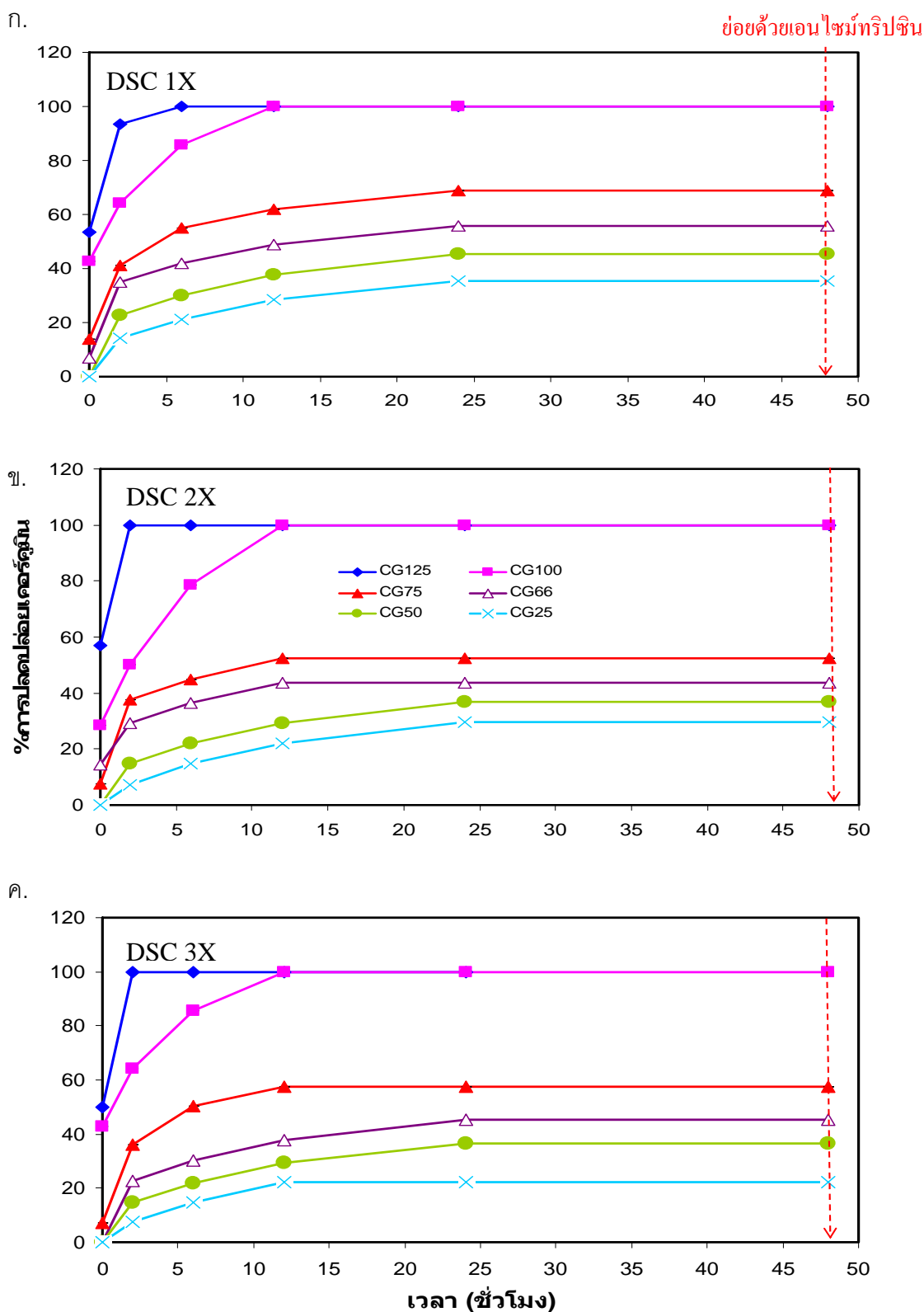
CG75 มีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมามากกว่าแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่มีร้อยละการดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลต่ำกว่าในระยะเวลาเดียวกัน แต่ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับ CG75 ซึ่งผ่านการดัดแปลงโดยเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะ ซึ่งมีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมาประมาณ 45% ที่เวลา 24 ชั่วโมงที่เหลืออีก 55% แสดงถึงความสามารถในการกักเก็บเคอร์คูมิน ของ CG75 ในขณะที่ CG25, CG50 และ CG66 มีการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง 20%, 30% และ 40% ตามลำดับ ที่เวลาเดียวกัน เมื่อดูดซับปริมาณเคอร์คูมินเพิ่มขึ้นเป็น 15 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น, 20 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น พบว่าแผ่นเจลลาตินดัดแปลงมีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมามากกว่าแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น (รูปที่ 4.22 - 4.24) โดยแผ่นเจลลาตินดัดแปลงซึ่งดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น มีการปลดปล่อยเคอร์คูมินมากที่สุด โดย CG25, CG50, CG66 และ CG75 มีเคอร์คูมินหลงเหลืออยู่ประมาณ 73%, 59%, 51% และ 39% ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากเคอร์คูมินมีปริมาณมากเกินไปทำให้แผ่นเจลลาติน

ดัดแปลงไม่สามารถดูดซับได้หมด จึงเกิดการแพร่ออกมาจากแผ่นเจลลาตินในปริมาณมาก จากรูปที่ 4.24 (ค.) สังเกตเห็นว่าเคอร์คิวมินถูกปลดปล่อยออกมาอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะ (DSC) เป็น 3 เท่าของคอเลสเตรอรอล จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 3 เท่าของคอเลสเตรอรอลเริ่มควบคุมปริมาณเคอร์คิวมินในการดูดซับไม่ได้ อาจเนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณสารเชื่อมพันธะทำให้เกิดความสำเร็จในการเชื่อมพันธะระหว่างหมู่อะมิโนอิสระกับหมู่ไฮดรอกซิลที่สูงขึ้น (ตารางที่ 4.1) ทำให้อะมิโนอิสระมีปริมาณลดลงมากส่งผลให้สามารถเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี glutaraldehyde ได้น้อยลง ทำให้โครงสร้างของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงไม่แข็งแรงเกิดการสลายตัวได้ง่ายเคอร์คิวมินจึงถูกปลดปล่อยออกมา ปริมาณเคอร์คิวมินที่ยังเหลือบนแผ่นเจลลาตินดัดแปลงภายหลังทดสอบการปลดปล่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.25 แผ่นเจลลาตินดัดแปลงเมื่อใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1 เท่าของคอเลสเตรอรอล กักเก็บเคอร์คิวมินได้น้อยลงเมื่อมีการใช้คอเลสเตรอรอลมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อแผ่นเจลลาตินดัดแปลงดูดซับเคอร์คิวมินปริมาณ 20 และ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น แสดงให้เห็นว่าสารละลายเคอร์คิวมินความเข้มข้นสูงสามารถดูดซับบนแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่มีโครงสร้างคอเลสเตรอรอลสูงได้น้อยกว่าการที่มีคอเลสเตรอรอลในโครงสร้างปริมาณมากอาจทำให้มีเคอร์คิวมินแทรกเข้าไปได้น้อยกว่า เมื่อดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 2 เท่าของคอเลสเตรอรอล แผ่นเจลลาตินดัดแปลงสามารถกักเก็บเคอร์คิวมินได้ไม่แตกต่างกับตัวอย่างที่ใช้สารเชื่อมพันธะ 1 เท่า แต่ความสามารถในการกักเก็บเคอร์คิวมินลดลงมากอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 3 เท่าของคอเลสเตรอรอลลักษณะเช่นนี้อาจแสดงถึง hydrophobic interaction ระหว่างคอเลสเตรอรอลในโครงสร้างเองมีผลให้กักเก็บเคอร์คิวมินน้อยลง ดังนั้นปริมาณคอเลสเตรอรอลจึงมีผลต่อการดูดซับเคอร์คิวมิน

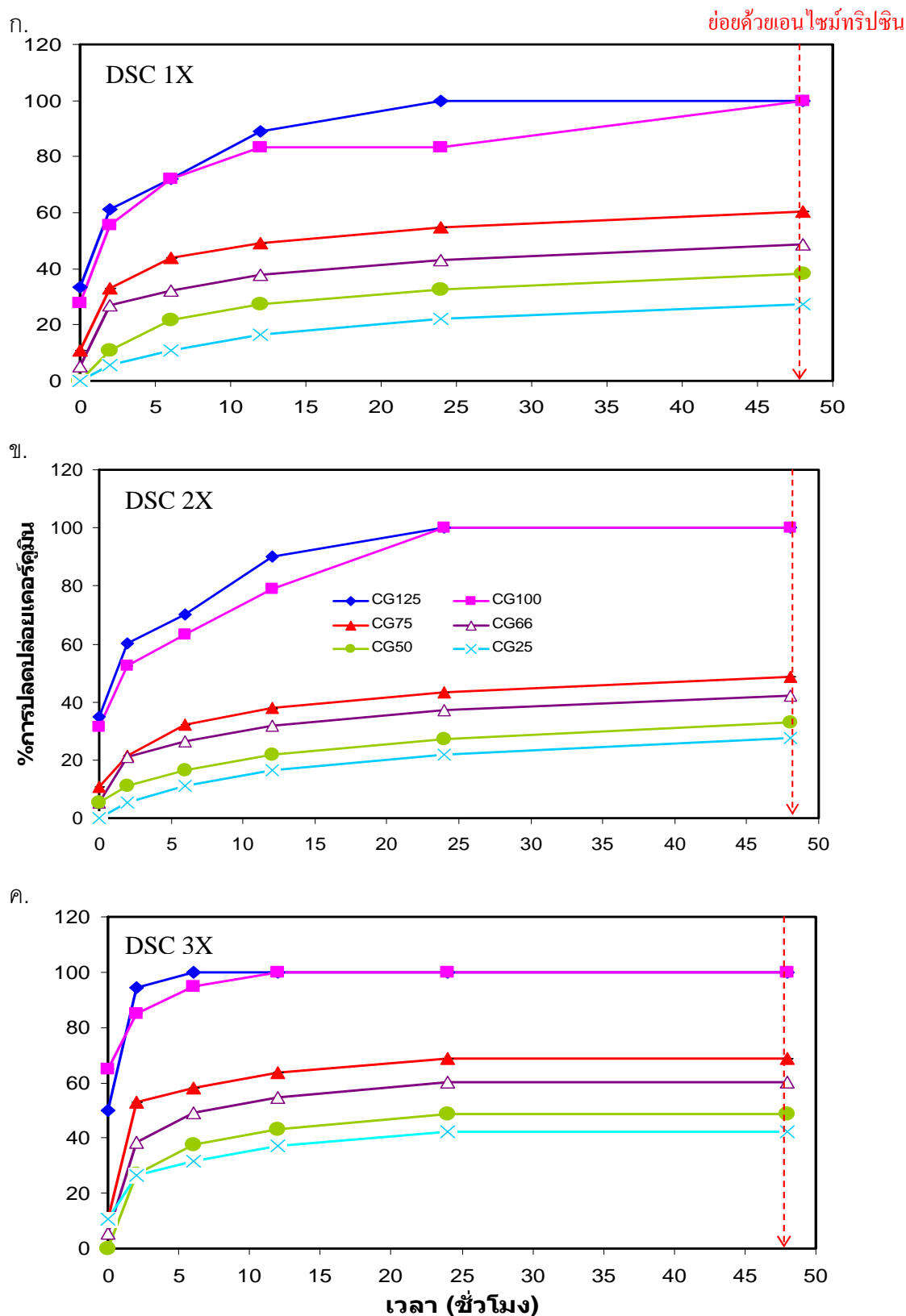
ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นความสำเร็จในการดัดแปลงโครงสร้างของเจลลาติน โดยสามารถควบคุมปริมาณคอเลสเตรอรอลและอัตราการย่อยสลาย ซึ่งจะมีผลในการควบคุมปฏิกิริยาระหว่างเจลลาตินดัดแปลงกับสารที่ไม่ละลายน้ำ (มีผลกับ dose ของสาร) และการควบคุมอัตราการปลดปล่อยสารผ่านทาง การควบคุมอัตราการย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง 1st burst ของเคอร์คิวมินก็อาจจะให้ผลดีในการทำให้มีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์สูงในระยะต้นๆ ของการย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินน้อย ซึ่งจะมีการทดสอบความสามารถในการส่งผ่านเคอร์คิวมินในร่างกายโดยใช้แผ่นเจลลาตินดัดแปลงในหัวข้อต่อไป



รูปที่ 4.21 การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลาตินดัดแปลง (หนัก 2 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และใช้ปริมาณสารเชื่อมพ่นระเป็น 1, 2 และ 3 เท่า (โดยโมล) ของคอเลสเตอรอล ในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween 80) อุณหภูมิ 37 °C



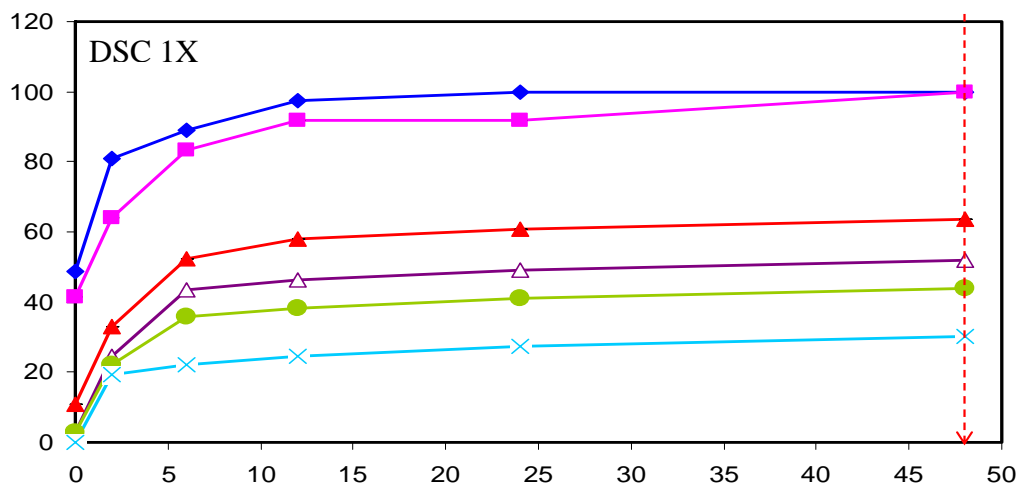
รูปที่ 4.22 การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลาตินดัดแปลง(หนัก 2 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 15 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1, 2 และ 3 เท่า (โดยโมล) ของคอเลสเตรอล ในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween 80) อุณหภูมิ 37 °C



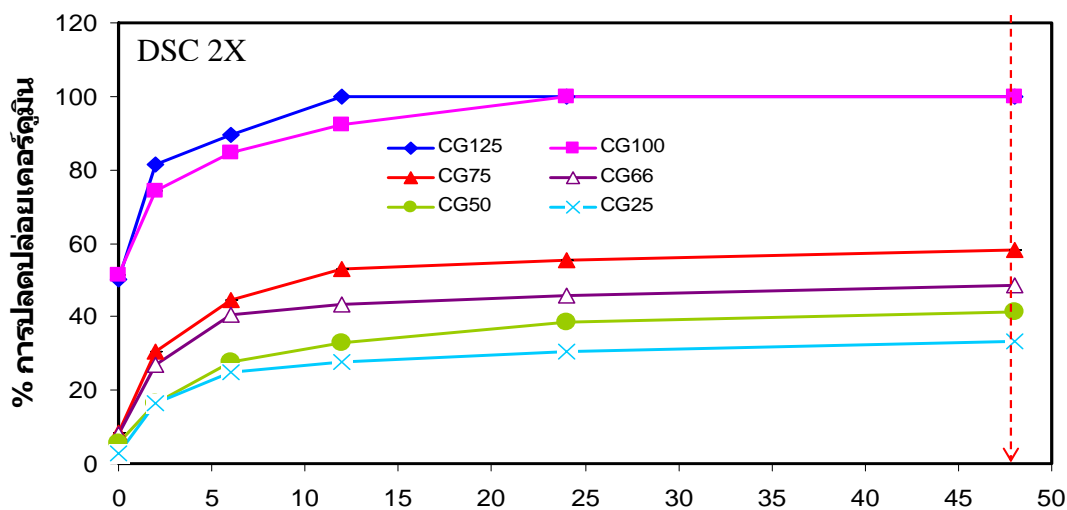
รูปที่ 4.23 การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (หนัก 2 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 20 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และใช้ปริมาณสารเชื่อมพ่นระเป็น 1, 2 และ 3 เท่า (โดยโมล) ของคอเลสเตรอล ในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween 80) อุณหภูมิ 37 °C

ก.

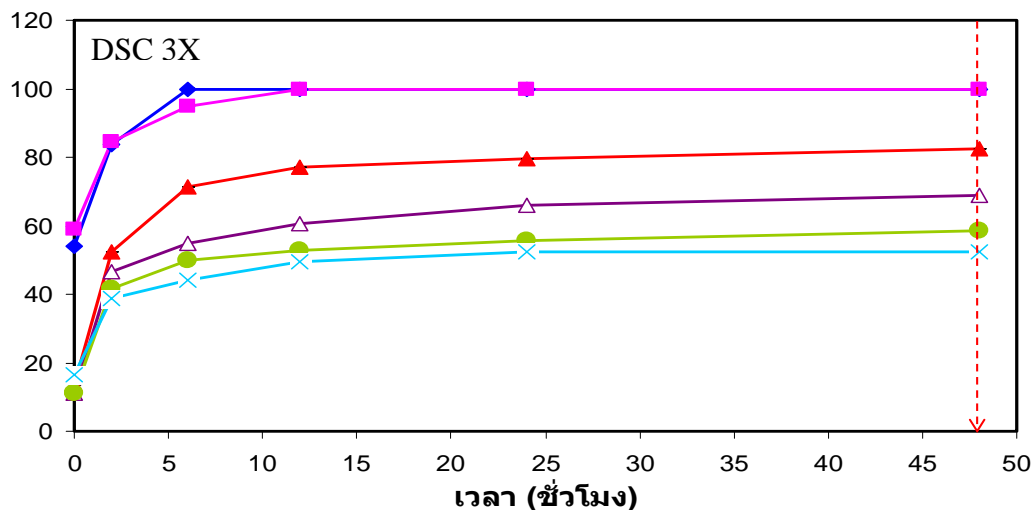
ช่วยด้วยเอนไซม์ทริปซิน



ข.



ค.

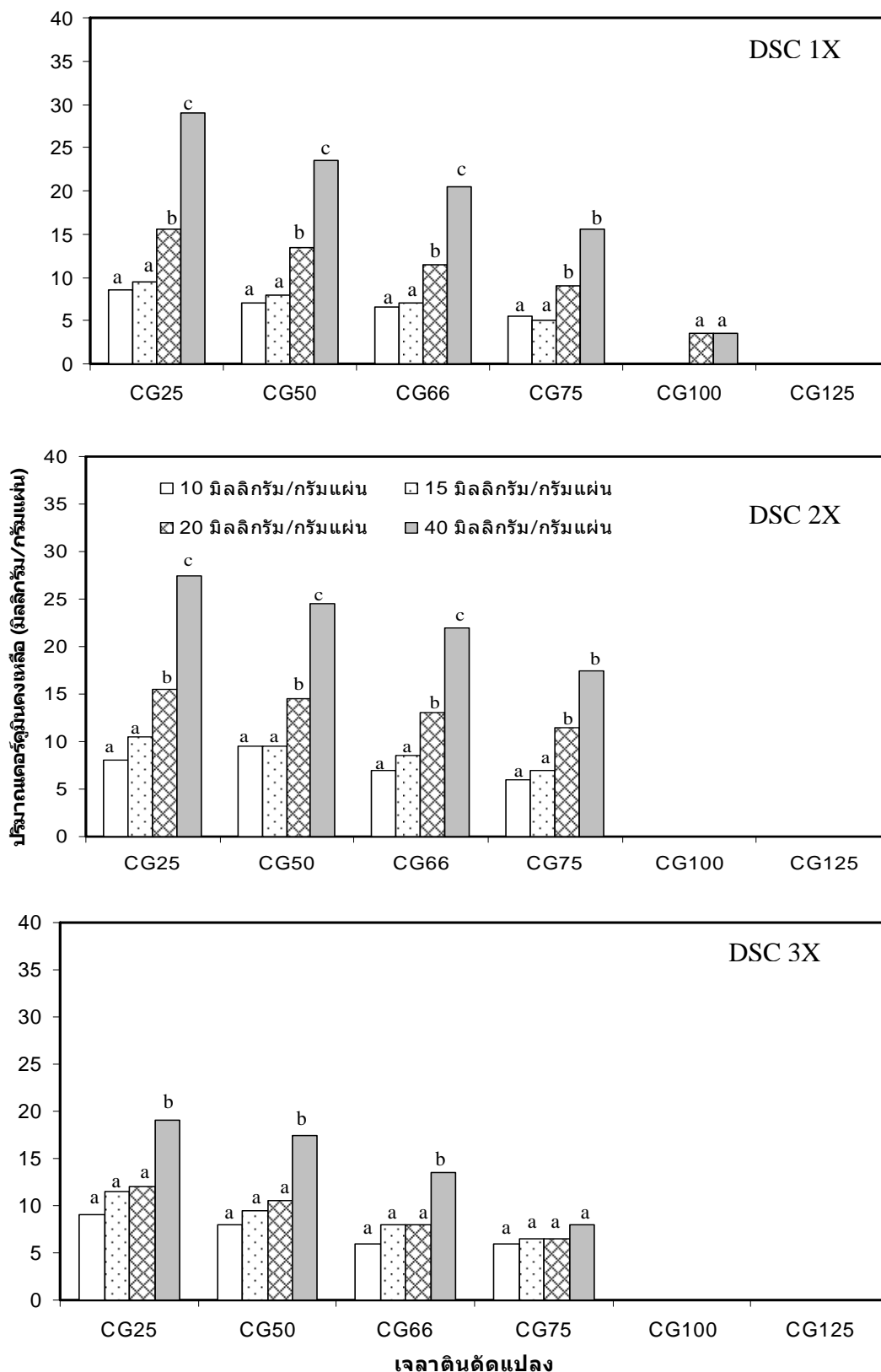


รูปที่ 4.24 การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง(หนัก 2 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 1, 2 และ 3 เท่า (โดยโมล) ของคอเลสเตรอล ในสารละลาย PBS pH 7.4 (0.01% Tween 80) อุณหภูมิ 37 °C

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์ของเคอร์คูมินที่ยังเหลือบนแผ่นเจลลาตินดัดแปลงโครงสร้างที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดลองปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกายจากรูป 4.21-4.24

ปริมาณสาร เชื่อมพันธะ (DSC)	รหัส	ปริมาณเคอร์คูมินที่ยังเหลือบนแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (%)			
		10 มิลลิกรัม/ กรัมแผ่น	15 มิลลิกรัม/ กรัมแผ่น	20 มิลลิกรัม/ กรัมแผ่น	40 มิลลิกรัม/ กรัมแผ่น
1X	CG25	79.43 ± 0.01	64.49 ± 0.01	77.99 ± 0.01	72.55 ± 0.01
	CG50	67.95 ± 0.04	54.77 ± 0.05	67.31 ± 0.02	58.83 ± 0.01
	CG66	59.61 ± 0.07	44.28 ± 0.01	56.84 ± 0.01	50.97 ± 0.05
	CG75	55.53 ± 0.07	31.23 ± 0.05	45.55 ± 0.01	39.17 ± 0.08
	CG100	Δ	Δ	16.67 ± 0.01	8.33 ± 0.01
	CG125	Δ	Δ	Δ	Δ
2X	CG25	78.42 ± 0.05	70.45 ± 0.07	77.98 ± 0.07	69.51 ± 0.01
	CG50	74.21 ± 0.08	63.32 ± 0.04	72.62 ± 0.01	61.48 ± 0.05
	CG66	61.38 ± 0.01	56.27 ± 0.01	62.96 ± 0.01	54.14 ± 0.04
	CG75	52.15 ± 0.01	47.60 ± 0.02	56.84 ± 0.03	44.42 ± 0.01
	CG100	Δ	Δ	Δ	Δ
	CG125	Δ	Δ	Δ	Δ
3X	CG25	89.10 ± 0.04	77.69 ± 0.08	57.67 ± 0.01	47.60 ± 0.02
	CG50	78.42 ± 0.08	63.31 ± 0.01	51.45 ± 0.02	44.42 ± 0.02
	CG66	52.15 ± 0.01	54.77 ± 0.05	39.78 ± 0.02	33.98 ± 0.03
	CG75	49.98 ± 0.01	42.46 ± 0.07	31.23 ± 0.01	20.24 ± 0.01
	CG100	Δ	Δ	Δ	Δ
	CG125	Δ	Δ	Δ	Δ

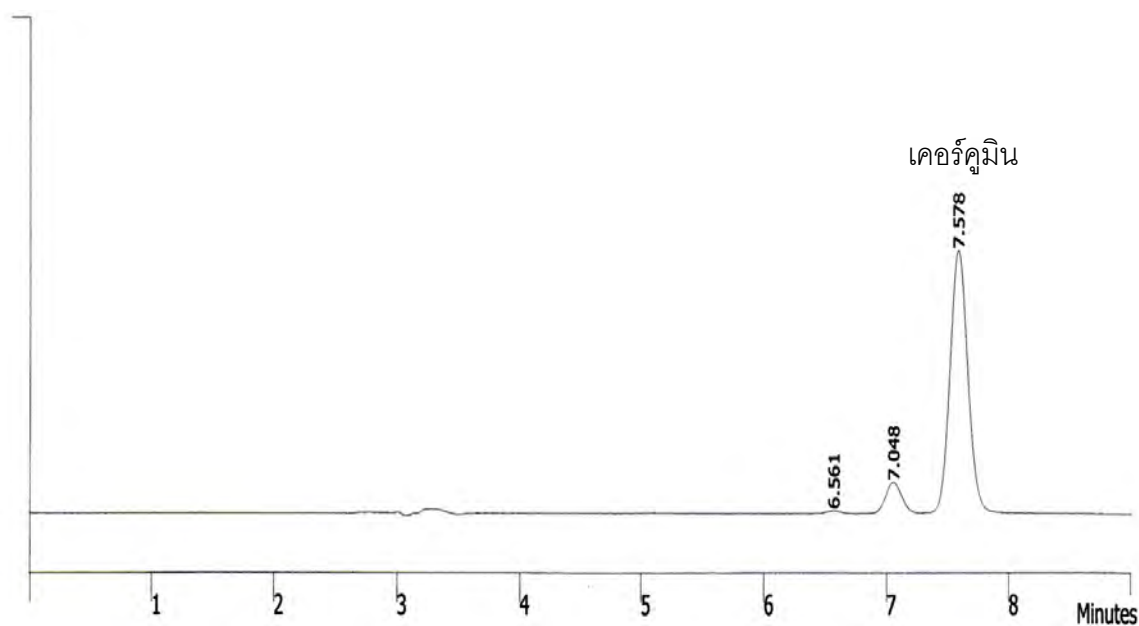
Δ แผ่นเจลลาตินดัดแปลงย่อยสลายไปหมดที่เวลา 24 ชั่วโมงจึงไม่มีการทดลอง



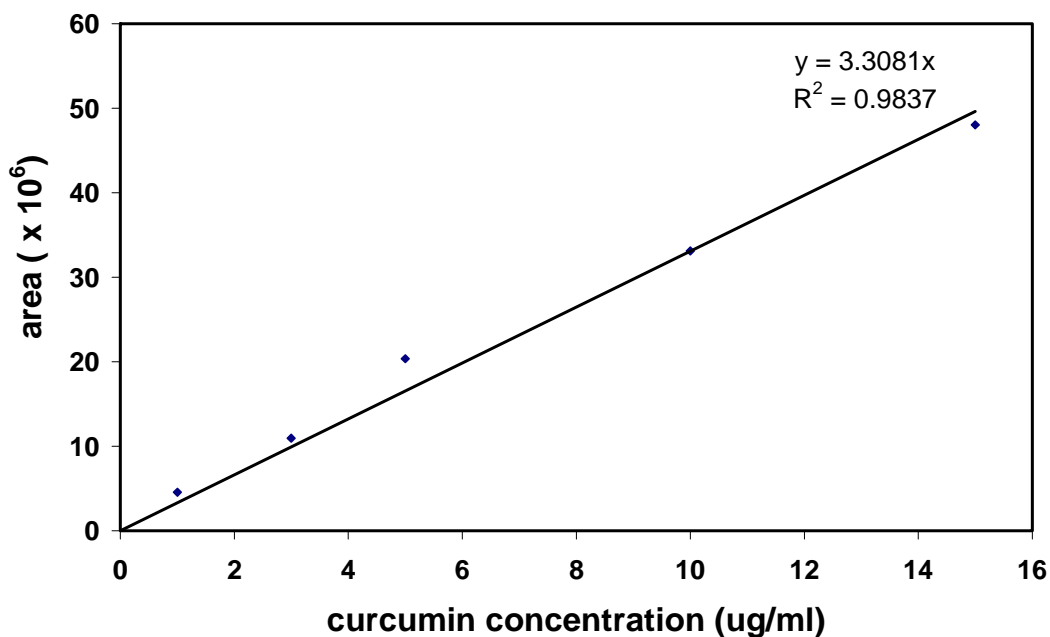
รูปที่ 4.25 ปริมาณเคอร์คูมินที่ยังเหลือบนแผ่นเจลลาดินดัดแปลงที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดลองปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกาย (a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณเคอร์คูมินที่ดูดซับบนแผ่นเจลลาดินดัดแปลง)

4.5 ระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง

การวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในเบื้องต้นได้สร้างกราฟมาตรฐานของเคอร์คูมินจากสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินความเข้มข้น 1, 3, 5, 10 และ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ใช้ column ชนิด C18 (250 x 4.6 มิลลิเมตร.), อัตราการไหล(flow rate) 1 มิลลิลิตร/นาที, mobile phase 1% acetic acid : acetonitrile (50:50), UV-detector วัดที่ $\lambda = 425$ nm, ปริมาตรที่ฉีด (injection volumn) คือ 20 μ l ผลที่ได้ปรากฏพีคของเคอร์คูมินที่ retention time ประมาณ 7.5 นาที ดังรูปที่ 4.26 ใกล้เคียงกับงานวิจัยของปรีชา และคณะ (2006) ซึ่งปรากฏพีคของเคอร์คูมินที่ retention time ประมาณ 8 นาที นำพีคเคอร์คูมินที่พบจากการฉีดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินทุกความเข้มข้นมาวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของเคอร์คูมินกับพื้นที่ใต้กราฟ จะได้กราฟมาตรฐานเคอร์คูมินดังแสดงในรูปที่ 4.27

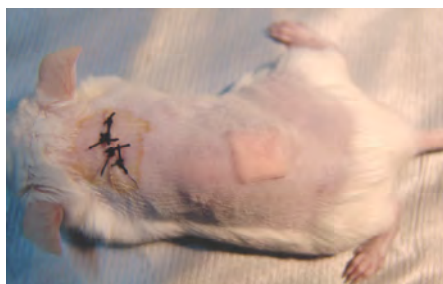


รูปที่ 4.26 แสดงกราฟ HPLC ของเคอร์คูมินในสภาวะ column C18 (250 x 4.6 mm.), flow rate 1 ml/min, mobile phase 1% acetic acid : acetonitrile (50:50), UV-detector วัดที่ $\lambda = 425$ nm, injection volumn 20 μ l



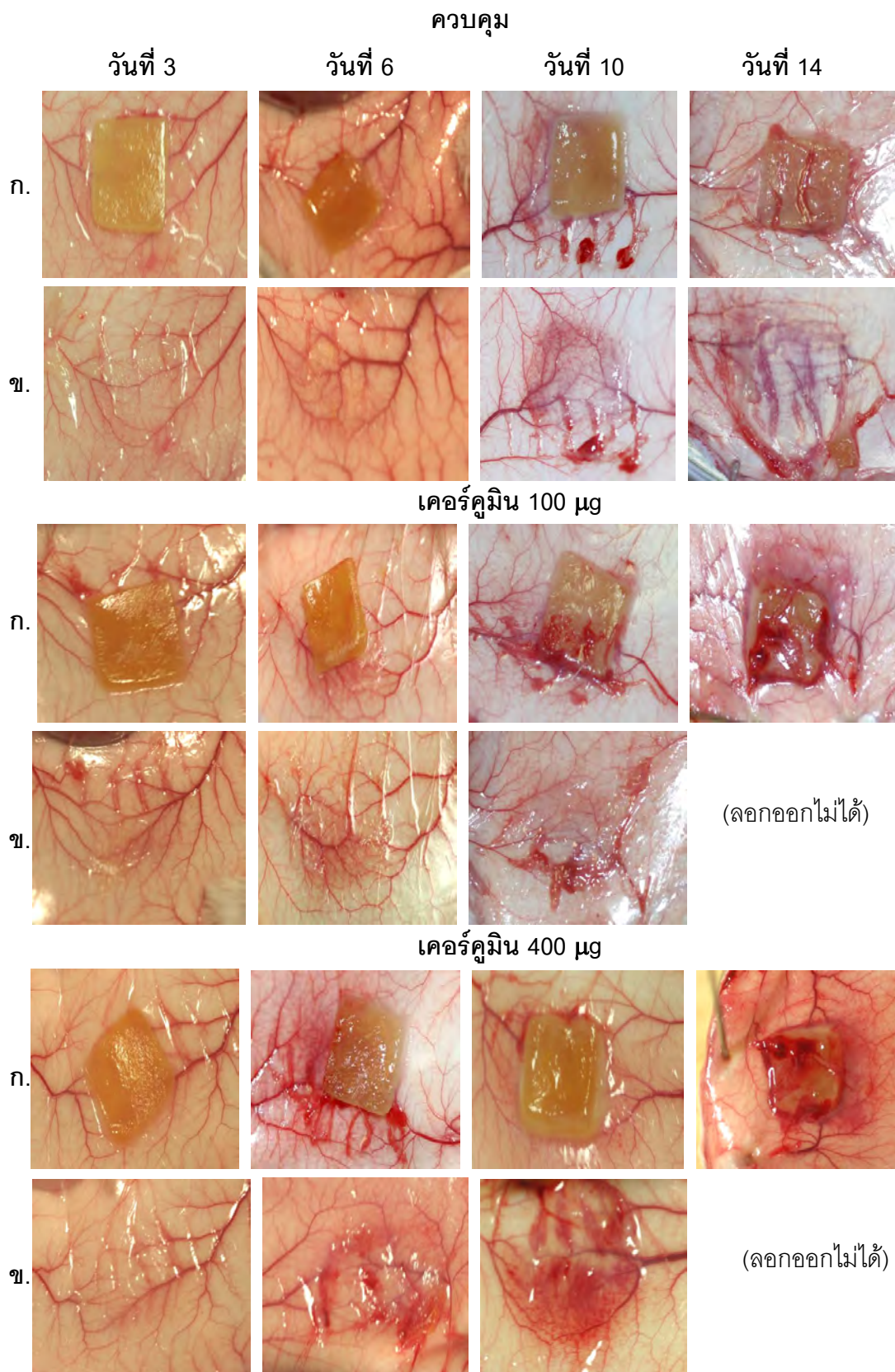
รูปที่ 4.27 แสดงกราฟมาตรฐานของเคอร์คูมินจากสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินความเข้มข้น 1, 3, 5, 10 และ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แผ่นเจลาตินดัดแปลง CG 66 (หนัก 10 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 3 เท่าของคอลเลสเตอรอล เพื่อให้มีการย่อยสลายภายในระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ แผ่นเจลาตินดัดแปลงถูกฆ่าเชื้อด้วยการอบเอริลินออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำไปดูดซับเคอร์คูมิน (ละลายในเอทานอล pH~6) จากนั้นฝังได้ผิวหนังบริเวณหลังของ BALB-c mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 20-25 กรัมเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 4.28) โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน), กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น และกลุ่มที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น (ปริมาณเคอร์คูมินที่เลือกมาใช้เป็นปริมาณเคอร์คูมินที่ต่ำที่สุดและสูงที่สุดเมื่อทดลองปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกาย) รวมปริมาณเคอร์คูมินทั้งหมด 100 μg และ 400 μg ตามลำดับ



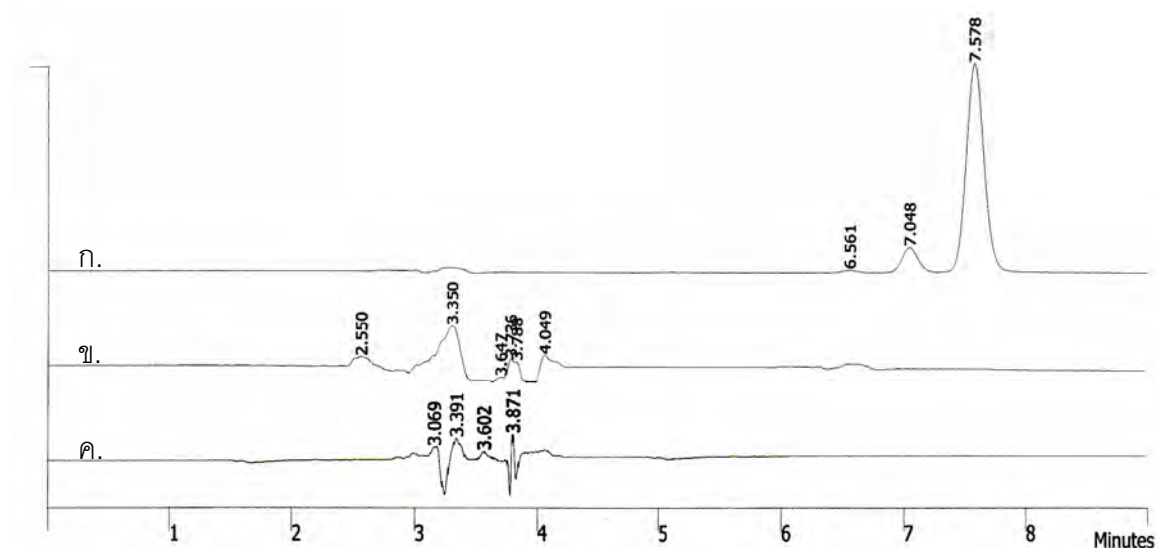
รูปที่ 4.28 ภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง

ลักษณะของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง เมื่อฝังบริเวณใต้แผ่นหลังของหนูที่เวลา 3, 6, 10 และ 14 วัน แสดงดังรูปที่ 4.29 พิจารณาที่เวลา 3 วัน แผ่นเจลลาตินดัดแปลงทุกกลุ่มมีลักษณะไม่แตกต่างจากเดิม เนื่องจากอาจยังไม่เกิดการย่อยสลายมากนัก เมื่อลอกแผ่นเจลลาตินดัดแปลงออก พบว่าบริเวณที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงเกิดเส้นเลือดฝอยใหม่ขึ้นเล็กน้อย ที่เวลา 6 วัน แผ่นเจลลาตินดัดแปลงเริ่มเกิดการย่อยสลาย สังเกตจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลงมีขนาดบางลง เมื่อลอกแผ่นเจลลาตินดัดแปลงออกพบว่าบริเวณที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงสังเกตเห็นเกิดเส้นเลือดใหม่เป็นจำนวนมาก โดยกลุ่มที่ดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 400 μg เห็นเส้นเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยงมากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ดูดซับเคอร์คูมิน 100 μg และกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ดูดซับเคอร์คูมิน 100 μg สังเกตเห็นเส้นเลือดฝอยเกิดใหม่มากกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน ที่เวลา 10 วัน เริ่มเกิดเส้นเลือดใหญ่มาหล่อเลี้ยงแผ่นเจลลาตินดัดแปลงทุกกลุ่ม เมื่อพิจารณาการย่อยสลายของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงพบว่าแผ่นเจลลาตินดัดแปลงเกิดการย่อยสลายมากขึ้น สังเกตแผ่นเจลลาตินดัดแปลงมีขนาดบางลงและเริ่มมองเห็นเส้นเลือดที่อยู่ด้านล่าง โดยแผ่นเจลลาตินดัดแปลงมีสีเหลืองของเคอร์คูมินซีดลงเมื่อเทียบกับวันที่ 3 และวันที่ 6 เนื่องจากการปลดปล่อยของเคอร์คูมิน เมื่อลอกแผ่นเจลลาตินดัดแปลงออกพบกลุ่มของเส้นเลือดฝอยเป็นจำนวนมากในบริเวณที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงอย่างเห็นได้ชัด และที่ระยะเวลา 14 วัน พบว่าแผ่นเจลลาตินดัดแปลงทุกกลุ่มเกิดเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงเป็นจำนวนมาก พิจารณากลุ่มควบคุม มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงบ้างแต่น้อยกว่ากลุ่มอื่นทำให้สามารถลอกออกได้ ในขณะที่กลุ่มฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 400 μg และ 100 μg มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงมากทำให้ไม่สามารถลอกแผ่นเจลลาตินดัดแปลงออกได้ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแผ่นเจลลาตินดัดแปลงมิได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่กลับกระตุ้นในการเกิดหลอดเลือดใหม่ แผ่นเจลลาติน CG66 มีการย่อยสลายภายในร่างกายช้ากว่าการย่อยสลายภายนอกในร่างกายดังที่ทดสอบในหัวข้อ 4.2(ง) ดังนั้นในการใช้งานจึงอาจมีการเลือกใช้แผ่นเจลลาตินที่มีการดัดแปลงโครงสร้างให้มีปริมาณคอเลสเตรอลสูงขึ้น หรือมีระดับการเชื่อมโยงพันธะที่ต่ำลง เพื่อให้มีการย่อยสลายเต็มที่และหมดไปภายในเวลา 2 สัปดาห์



รูปที่ 4.29 ภาพถ่ายหลังจากฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลง (CG66) ใต้ผิวหนังบริเวณหลัง BALB-c mice (เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์) เก็บตัวอย่างในวันที่ 3, 6, 10 และ 14 (ก.) ก่อนลอกแผ่นเจลาตินดัดแปลงออก (ข.) หลังลอกแผ่นเจลาตินดัดแปลงออก

หลังการปลูกฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลง แล้วมีการเก็บเลือดของหนูที่ได้จากหัวใจหนู จากนั้นทำการแยกพลาสมาออกจากเลือด แล้วนำพลาสมาไปป่มด้วยเอนไซม์ β -glucuronidase ตามวิธีของ Asai, A. [Asai, A. และคณะ, 2000] (ดูรายละเอียดของวิธีการได้ในบทที่ 3) ซึ่งรายงานว่เมื่อเคอร์คูมินเข้าสู่กระแสเลือดจะเกิดการรวมตัวกับสาร glucuronide กลายเป็น curcumin – glucuronide จึงไม่ปรากฏพีคของเคอร์คูมินในการวิเคราะห์พลาสมาด้วย HPLC เอนไซม์ β -glucuronidase สามารถตัด glucuronide ออกจากเคอร์คูมิน ทำให้ปรากฏพีคของเคอร์คูมินจากการวิเคราะห์ปริมาณในพลาสมาได้ รูปที่ 4.30 แสดงกราฟ HPLC ในการวิเคราะห์พลาสมาที่เก็บตัวอย่างจากหนูที่ไม่ได้ฝังแผ่นเจลลาติน และ พลาสมาหลังการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมินก่อนการทดสอบปริมาณเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง



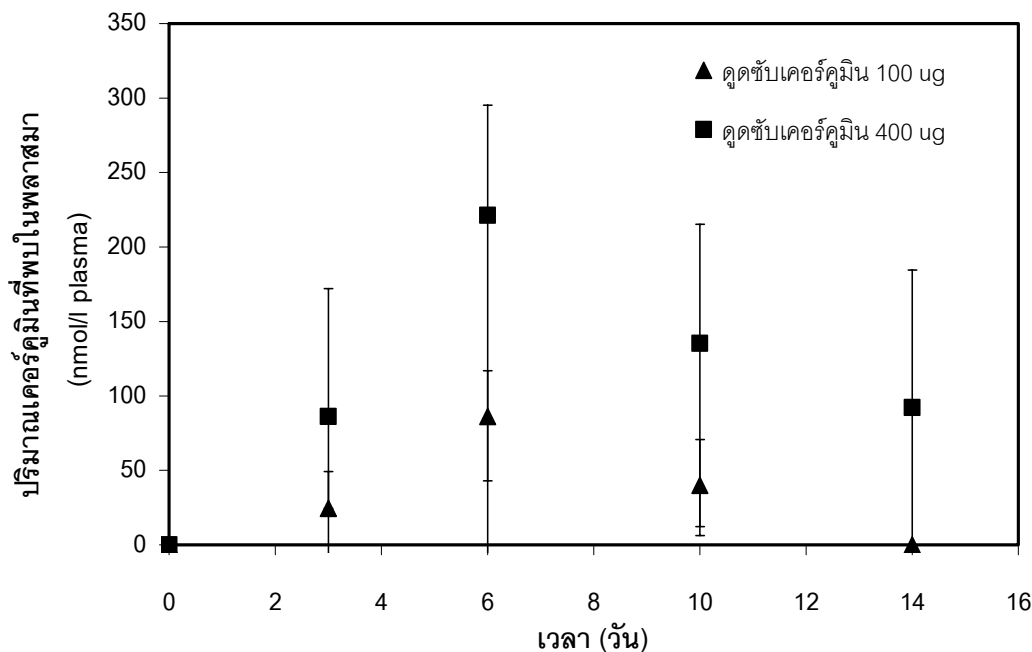
รูปที่ 4.30 แสดงกราฟ HPLC ของ (ก.) เคอร์คูมินในสารละลายเอทานอล (ข.) พลาสมาที่แยกจากหนูที่ได้รับการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน (ค.) พลาสมาที่แยกจากหนูที่ไม่ได้ฝังแผ่นเจลลาติน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยออกมาจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลงในสัตว์ทดลองในแต่ละช่วงเวลาโดยใช้เทคนิค HPLC แสดงผลดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.31 โดยมีการทำซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละกลุ่มการทดลองในทุกช่วงเวลา ในกลุ่มควบคุมไม่พบพีคของเคอร์คูมิน กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 100 μg พบพีคของเคอร์คูมินในพลาสมาสูงในวันที่ 6 ในปริมาณเฉลี่ย 0.04 μg จนกระทั่งไม่พบเลยในวันที่ 14 ในกลุ่มที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 400 μg พบพีคของเคอร์คูมินในพลาสมาสูงในวันที่ 6 เช่นเดียวกันในปริมาณเฉลี่ย 0.12 μg และยังมีปรากฏให้เห็นอยู่ 0.05 μg ในวันที่ 14

ตารางที่ 4.8 ปริมาณคอร์คูมินที่พบในพลาสมา (วิเคราะห์โดย HPLC) หลังจากการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงได้แผ่นหลังของ BALBcA mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลาต่างๆ

วันที่เก็บ พลาสมา	ปริมาณคอร์คูมินที่พบในพลาสมา (µg)											
	กลุ่มควบคุม				10 mg/g sheet (100 µg)				40 mg/g sheet (400 µg)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
วันที่ 3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.04	ไม่พบ	ไม่พบ	0.01 ± 0.02	ไม่พบ	0.06	0.08	0.05 ± 0.04
วันที่ 6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.07	0.03	0.04	0.04 ± 0.02	0.28	0.08	ไม่พบ	0.12 ± 0.14
วันที่ 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.04	0.005	0.02	0.02 ± 0.01	0.14	0.05	0.03	0.07 ± 0.06
วันที่ 14	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.04	0.11	ไม่พบ	0.05 ± 0.06

หมายเหตุ : กราฟ HPLC ของแต่ละการทดลองแสดงในภาคผนวก ซ.



รูปที่ 4.31 ปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมาหลังจากการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลง (CG66, 10 มิลลิกรัม) ใต้แผ่นหลังของ BALBcA mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลาต่างๆ (mean \pm SD, n=3)

การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินโดยการเชื่อมพันธะระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของคอเลสเตอรอลกับหมู่อะมิโนของเจลาติน ทำให้เกิดการปรับปรุงพื้นผิวของเจลาตินซึ่งโดยธรรมชาติสามารถละลายน้ำได้ดี ให้มีหมู่ hydrophobic เพื่อให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้อย่างต่อเนื่องโดยตรงในบริเวณที่ต้องการให้เป็นไปอย่างช้าๆตามการสลายตัวของแผ่นเจลาติน โดยพบว่าการเกิดพันธะ hydrophobic ระหว่างเคอร์คูมินกับแผ่นเจลาตินดัดแปลงทำให้สามารถกักเก็บเคอร์คูมินไว้ในแผ่นเจลาตินดัดแปลงได้ดังนั้นการปลดปล่อยเคอร์คูมินจึงเป็นไปตามการสลายตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลง เนื่องจากเอนไซม์ภายในร่างกายจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในช่วงแรกเคอร์คูมินยังไม่ถูกปลดปล่อยออกมามากนักอาจเนื่องจากแผ่นเจลาตินดัดแปลงไม่สลายตัวมาก และไม่พบลักษณะ 1st burst ดังที่เห็นในภาพ 4.21-4.24 เนื่องจากมีการเก็บตัวอย่างพลาสมาเริ่มในวันที่ 3 แต่ในระยะต่อมา คือในวันที่ 6 และ วันที่ 10 เคอร์คูมินมีการปลดปล่อยออกมามากขึ้นเนื่องจากแผ่นเจลาตินดัดแปลงมีการสลายตัวมากขึ้นเคอร์คูมินซึ่งถูกกักเก็บอยู่ในแผ่นจึงเกิดการปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ในขณะที่วันที่ 14 กลุ่มที่ดูดยับเคอร์คูมิน 100 µg ไม่พบเคอร์คูมินเลยในพลาสมาของหนูทดลองทั้ง 3 ตัวในขณะที่ กลุ่มที่ดูดยับเคอร์คูมิน 400 µg ยังมีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมาอยู่ อาจเป็นเพราะว่ามีเคอร์คูมินในปริมาณที่ไม่สมดุลกับแผ่นเจลาตินดัดแปลง คือ ดูดยับในปริมาณน้อยเกินไปทำให้เคอร์คูมินเกิด

การปลดปล่อยออกมาหมดก่อนที่แผ่นเจลลาตินดัดแปลงจะเกิดการสลายหมด จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดหลอดเลือดจำนวนมากมาหุ้มแผ่นเจลลาตินดัดแปลงไว้ เนื่องจากเจลลาตินเป็นวัสดุที่ส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื่องจากโมเลกุลของเจลลาตินมีส่วนประกอบของ Arg-Gly-Asp (RGD)-like sequence ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการยึดเกาะ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 4.3 [Huang, Y. และคณะ, 2005] เมื่อนำปริมาณคอร์คูมินที่พบในพลาสมาหลังจากการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงใต้แผ่นหลังของ BALBcA mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลาต่างๆ มาวาดกราฟความสัมพันธ์ความเข้มข้นของยาในเลือดกับเวลา (รูปที่ 4.31) ประเมินค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Area Under Curve, AUC) จะเป็นปริมาณที่มีอยู่ในร่างกายทั้งหมดนับตั้งแต่เริ่มให้ยา [สุพงษ์ เอกศิริพงษ์, 2547] พื้นที่ใต้กราฟของคอร์คูมินที่พบในพลาสมาหนูที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลง (ดูดซับคอร์คูมิน 100 μg หรือคิดเป็น 4.5 มิลลิกรัม / น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม) ในเวลา 14 วัน ประเมินค่า AUC ได้ 589 nmol/l plasma หรือคิดเป็น 0.32 % ของปริมาณคอร์คูมินเริ่มต้น อย่างไรก็ตามค่านี้อาจเกิดจากการเก็บตัวอย่างที่ไม่รวม 1st burst ของคอร์คูมินในระยะแรกด้วย

จากงานวิจัยของ Asai, A. [Asai, A. และคณะ, 2000] ซึ่งใช้หนู (Sprague-Dawley rats อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 210-240 กรัม) กินคอร์คูมินปริมาณ 100 มิลลิกรัม / น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม แล้วเก็บพลาสมาที่เวลา 0.5, 1, 3, 8 และ 24 ชั่วโมง นำมาสกัดคอร์คูมินด้วยวิธีเดียวกัน พบคอร์คูมินในเลือดมากที่สุดที่เวลา 1 ชั่วโมง โดยพบในปริมาณ 240 nmol/l plasma และเมื่อคำนวณหา AUC ที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่าปริมาณคอร์คูมินในร่างกายทั้งหมดเท่ากับ 2,415 nmol/l plasma (คิดเป็น 0.004 % จากปริมาณคอร์คูมินเริ่มต้น) จะเห็นได้ว่าต้องให้กินคอร์คูมินในปริมาณที่สูงมาก (เนื่องจากงานวิจัยนี้มีระบบการนำส่งแตกต่างจากวิธีของ Asai, A. ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์จึงไม่เหมือนกัน)

นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้มีการทดสอบผลของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงชนิด CG66 หนัก 2 มิลลิกรัม (ดูดซับคอร์คูมิน 20 μg) ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู [สุทธิลักษณ์ ปทุมราช และคณะ, 2550] เป็นเวลา 7 และ 14 วัน และวิเคราะห์หาการเกิดหลอดเลือดใหม่ (CD, neocapillaries density) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Goba Lab Image II Software (Datatranslation Co.) แล้วนำชิ้นเนื้อบริเวณที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู ไปศึกษาโดยวิธี hematoxylin-eosin (H&E) แล้วนำมาอ่านผลเพื่อศึกษาขนาดของเซลล์มะเร็ง ผลที่ได้พบว่าแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่บรรจุคอร์คูมินสามารถลดการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู 14 วันได้เมื่อวิเคราะห์ผลการตรวจมะเร็งใน chamber 14 วัน ด้วยวิธีการ H&E ได้ผลของการเกิดมะเร็งพบว่าหนูกลุ่มที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่บรรจุคอร์คูมินมีขนาดของก้อนมะเร็งเล็กลงเมื่อเทียบกับก้อนมะเร็งของหนูกลุ่มที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้บรรจุ

เคอร์คูมิน และเมื่อนำเลือดของหนูไปวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินที่เวลา 7 วันพบในปริมาณ 1678 nmol/l plasma แต่ไม่พบเคอร์คูมินที่เวลา 14 วัน

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแผ่นเจลาตินดัดแปลงสามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้ในลักษณะ sustained release ตามระยะเวลาในการย่อยสลายของตัวนำส่ง และได้ในปริมาณมากโดยไม่ต้องรับประทาน ซึ่งจากรายงานพบว่าต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงมากเพราะเมื่อผ่านจากกระเพาะเข้าหลอดเลือดจะเหลือปริมาณน้อยและยังแพร่ไปในอวัยวะอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอนแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินโดยใช้คอเลสเทอรอลเพื่อใช้ในระบบนำส่งยาที่ไม่ละลายน้ำโดยใช้เคอร์คูมินเป็นต้นแบบยา ความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาตินตรวจสอบจากปริมาณอะมิโนอิสระที่ถูกเชื่อมโยงพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิลของคอเลสเทอรอล ปริมาณอะมิโนของเจลาตินดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลที่ปริมาณต่างๆมีค่าลดลงตามลำดับเมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเทอรอลและปริมาณสารเชื่อมพันธะ เมื่อศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีของเจลาตินดัดแปลงด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีพบว่าพีคการสั่นในช่วงเอไมด์ I และเอไมด์ II ซึ่งเป็นพีคที่แสดงถึงหมู่อะมิโนอิสระ มีการลดลง ในขณะที่พีคซึ่งแสดงถึงหมู่ C-OH มีพีคการสั่นที่สูงขึ้น เมื่อเจลาตินมีการดัดแปลงโครงสร้างมากขึ้น ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินสามารถบ่งบอกถึงความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาตินได้เช่นกัน ค่ามุมสัมผัสน้ำของเจลาตินดัดแปลงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของคอเลสเทอรอลเพิ่มขึ้นแสดงถึงความเป็น hydrophobicity ที่เพิ่มขึ้นของเจลาตินดัดแปลง จากผลดังกล่าวพบว่าสมบัติความไม่ชอบน้ำของเจลาตินดัดแปลงควบคุมได้โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของคอเลสเทอรอลที่ใช้ในปฏิกิริยา เจลาตินที่มีการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอลมาก แสดงถึงสมบัติความไม่ชอบน้ำมากขึ้น ทำให้เกิดพันธะระหว่างเคอร์คูมินกับแผ่นเจลาตินดัดแปลง

เจลาตินดัดแปลงถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-drying) แล้วทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลาย glutaraldehyde ระดับการเชื่อมโยงพันธะของแผ่นเจลาตินดัดแปลงลดลงตามลำดับเมื่อเจลาตินมีการดัดแปลงโครงสร้างมากขึ้นสอดคล้องกับสมบัติการดูดซับน้ำของแผ่นเจลาตินดัดแปลงซึ่งสามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น ส่งผลต่อการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงเนื่องจากหากแผ่นเจลาตินดัดแปลงสามารถดูดซับน้ำไว้ได้มาก การย่อยสลายของเจลาตินมักจะเกิดขึ้นได้ง่าย เป็นผลให้เกิดการปลดปล่อยเคอร์คูมินเนื่องจากการปลดปล่อยเคอร์คูมินเป็นไปตามการสลายตัวของแผ่นเจลาติน การเกิดพันธะ hydrophobic ระหว่างเคอร์คูมินกับแผ่นเจลาตินดัดแปลง ทำให้เคอร์คูมินไม่แพร่ออกมาจากแผ่นเจลาติน ในสารละลาย PBS buffer (0.01% Tween

80) ดังนั้นระบบดังกล่าวนี้จึงมีศักยภาพที่จะใช้ในการปลดปล่อยเคอร์คูมินในร่างกาย เนื่องจากจะมีการส่งผ่าน เคอร์คูมินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานโดยในระยะแรกจะเป็นการแพร่และในระยะต่อไป การส่งผ่านเคอร์คูมินจะเป็นไปตามการสลายตัวของแผ่นเจลลาตินในร่างกาย ซึ่งสามารถที่จะตัดแปลงได้โดยการปรับเปลี่ยนสภาวะในการเชื่อมโยงพันธะ

ก่อนนำแผ่นเจลลาตินตัดแปลงไปทดลองใช้จริงในสัตว์ทดลองได้มีการนำแผ่นเจลลาตินไปทดสอบความเป็นพิษโดยการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์พบว่าปริมาณเซลล์ในแผ่นเจลลาตินทุกแบบที่ตัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณเซลล์ที่เลี้ยงบนแผ่นเจลลาติน (G) ดังนั้นการตัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอลจึงไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ เมื่อนำแผ่นเจลลาตินตัดแปลงไปทดลองใช้จริงในสัตว์ทดลองโดยการนำแผ่นเจลลาตินไปฝังใต้แผ่นหลังของหนูทดลองเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลองที่เวลาต่างๆ คือวันที่ 3, 6, 10 และ 14 พบว่าแผ่นเจลลาตินที่ดูดซับเคอร์คูมิน 100 μg พบปริมาณเคอร์คูมินมากที่สุดในวันที่ 6 และไม่พบเลยในวันที่ 14 เนื่องจากปริมาณเคอร์คูมินถูกดูดซับในปริมาณน้อยเกินไปทำให้เคอร์คูมินเกิดการปลดปล่อยออกมาหมดก่อนที่แผ่นเจลลาตินจะเกิดการสลายหมด โดยในเวลา 14 วันพบปริมาณเคอร์คูมินในร่างกายทั้งหมดเท่ากับ 0.32 % ของปริมาณเริ่มต้น ในขณะที่แผ่นเจลลาตินที่ดูดซับเคอร์คูมิน 400 μg ยังพบปริมาณเคอร์คูมินอยู่ในวันที่ 14 (ผลนี้ไม่รวม 1st burst ทำให้พบเคอร์คูมินในปริมาณต่ำ) เมื่อนำแผ่นเจลลาตินตัดแปลงไปทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ในการป้องกันการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู พบว่าสามารถลดการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู 14 วันได้ และมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กกว่า จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการตัดแปลงเจลลาตินเพื่อการนำส่งสารที่ไม่ละลายน้ำอย่างเคอร์คูมิน อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเลือกใช้ชนิดของแผ่นเจลลาตินตัดแปลงให้เหมาะสมกับเวลาที่ต้องนำส่ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ผลการวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงมีแนวทางปรับปรุงและศึกษาเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

1. การทดสอบค่ามุมสัมผัสน้ำอาจจะมีผลผิดพลาดสูงเนื่องจากฟิล์มเจลลาตินที่ทดสอบมีความชอบน้ำสูงอยู่แล้ว จึงควรปรับปรุงให้ใช้วิธีวัดค่ามุมสัมผัสกับสารละลายอื่นๆ ที่ไม่ชอบน้ำ และต้องใช้ฟิล์มที่บางมากในการทดสอบ

2. ทดลองเปลี่ยนวิธีการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี glutaraldehyde ในการขึ้นรูปแผ่นไฮโดรเจล เป็นการเชื่อมโยงพันธะด้วยวิธีอื่นเช่น ด้วย EDC เพื่อหลีกเลี่ยงความเป็นพิษที่เกิดขึ้น
3. ทดลองเปลี่ยนวิธีการขึ้นรูปเป็นลักษณะอื่นๆ เช่น ขึ้นรูปเป็น microsphere แล้วทดสอบลักษณะสมบัติต่างๆเปรียบเทียบกับวิธีการขึ้นรูปเป็นแผ่นเจลลาติน
4. ปรับปรุงการดัดแปลงโครงสร้างของเจลลาตินโดยใช้โพลิเมอร์ตัวอื่นมาช่วยเพิ่ม NH_2 ในการเชื่อมโยงพันธะ เช่น ไคโตซาน เพื่อแก้ไขปัญหาการลดลงของปริมาณอะมิโนอิสระหลังการดัดแปลงโครงสร้างของเจลลาตินที่มีการดัดแปลงสูง
5. ทดลองปรับเปลี่ยนปริมาณคอร์คิวมินให้เหมาะสมกับขนาดของแผ่นแผ่นเจลลาตินดัดแปลง ซึ่งจะสามารถดูดซับได้เพื่อให้มีการปลดปล่อยในอัตราที่เหมาะสม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชุติมา ลิ้มมัททวาริทธิ์, สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีศักยภาพเป็นยาต้านมะเร็ง, ภาควิชาเภสัชเคมี

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2004

ธวัชชัย แพชมัด, ระบบควบคุมการปลดปล่อยและนำส่งยา, ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะ

เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2546

ณรงค์ สาริสุต, การผลิตยาออกฤทธิ์เนิ่นและระบบนำส่งยาแบบต่างๆ, ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2535

สุพงษ์ เอกศิริพงษ์, ชีวเภสัชศาสตร์, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ,

2547

สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, ญัตติคุณา วงศ์เอกอินทร์, จุฑามาส รุจิสมนภา และ ไศรดา กนกพานนท์,

ผลของเจลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปลดปล่อยสารเคอร์คูมินต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ใน

หนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปโต-ทู, รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยเงินทุน

Pilot Project คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550 (อยู่ในระหว่างการ

จัดทำ)

ภาษาอังกฤษ

Ahmed, S., Ahmed, A., Schneider, B. K. and White, C. W. Cholesterol interferes with the

MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells, International Journal of Toxicology, 25 (2006): 17-23

Anant, P., Anshuman, A. A., Bhimrao, K. and Jadhav, K. R. M. Characterization of

curcumin-PVC solid dispersion obtained by spray drying, Journal of Pharmaceutics., 271 (2004): 281-286.

Ansari, M.J., Ahmad, S., Kohli, K., Ali, J. and Khar, R.K. Stability-indicating HPTLC

determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 39 (2005): 132-138.

Asai, A. and Miyazawa, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as

glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma, Life Sciences, 67 (2000): 2785-2793.

Busquets, S., Carbo, N., Almendro, V., Quiles, M. T., Soriano, F. J. L. and Argiles, J.

- M. curcumin, a natural product present in turmeric, decreases tumor growth but does not behave as an anticachectic compound in a rat model, Cancer Letters, 167 (2001): 33-38.
- Canh, L. T., Monique, L.,Pompilia, I. S. and Mircea, A. M. N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release, Journal of Controlled Release ,2003
- Chang, J. Y. and Liu, L. Z. Toxicity of cholesterol oxides on cultured neuroretinal cells, Current Eye research, 17 (1997): 95-103.
- Chang, J. Y. and Liu, L. Z. Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultered cerebellar granule cells, Neurochemistry, 32 (1998): 317-323.
- Choudhuri, T., Pala, S., Agwarwal, M. L., Das, T. and Gaurisankar, S., curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction, FEBS Letters ,512 (2002): 334-340.
- Cojazzi, G. B.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; and Roveri, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials 22 (2001):763-768.
- Daghbouche, Y., Garrigues, S. and Guardia, M. D. L. Liquid chromatography-fourier transform infared spectrometric determination of cholesterol in animal greases, Analytica Chimica Acta, 354 (1997): 97-106.
- Dennis, D. H., Milagros, A. P., Dean, E. B. and Cheryl, L. R. curcumin in plasma and urine : quantitation by high-performance liquid chromatography, Juornal of Chromatography B., 783 (2003) : 287-295.
- Einerson, N.J., Stevens, K.R. and Kao, W.J. Synthesis and physicochemical analysis of gelatin-based hydrogels for drug carrier matrices, Biomaterials ,24 (2002): 509–523.
- Erika, P., Simone, H., Aniko, M. S. and Manfred, M. Studies on the stability of turmeric constituents, Journal of Food Engineering,56 (2003): 257–259
- Gopinath, D. et al. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. Biomaterials. 25(10) (2004): 1911-1917.

- Hattab, N. E., Daghbouche, Y., Hattab, M. E., Piovetti, L., Garrigues, S. and Guardia, M. D. L. FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC, Talanta, 68 (2006): 1230-1235.
- Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, 1996.
- Hiserodt, R., Hartman, T. G., Ho, C. T. and Rosen. R. T. Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 740 (1996): 51-63.
- Ishita, C., Kaushik, B., Uday, B. and Ranajit, K. B. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications, Current Science, 87, 2004.
- Ji, B., Peacock, G. and Lu, D. R. Synthesis of cholesterol-carborane conjugate for targeted drug delivery, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12 (2002): 2455-2458.
- Kailong, Y., Qianfeng, W., Hongying, Z., Jianhui, X. and Guowang, X. Application of capillary zone electrophoresis in the separation and determination of the curcuminoids in urine, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 38 (2005): 133–138.
- Konishia, M., Tabata, Y., Kariya, M., Hosseinkhani, H., Suzukia, A., Fukuhara, K., Mandai, M., Takakura, K. and Fuji, S. In vivo anti-tumor effect of dual release of cisplatin and adriamycin from biodegradable gelatin hydrogel, Journal of Controlled Release, 103 (2005): 7 –19.
- Laugel, C., Yagoubi, N. and Baillet, A. ATR-FTIR spectroscopy: a chemometric approach for studying the lipid organisation of the stratum corneum, Chemistry and Physics of Lipid, 135 (2005): 55-68.
- Lee, S. B., Kima, Y. H., Chonga, M. S., Hongb, S. H. and Lee, Y. M. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method, Biomaterials, 26 (2005): 1961-1968.
- Margarita, B. P., Mar'ia, T. R. S., Mario, R. R., Enrique, G. V. and Alberto, R. H. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition, Spectrochimica Acta Part A, 60

(2004): 1091–1097

Ohya, S., Kidoakib, S. and Matsuda, T. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel surfaces: interrelationship between microscopic structure and mechanical property of surface regions and cell adhesiveness, Biomaterials, 26 (2005): 3105-3111.

Pan, M. S., Huang, T. M. and Lin, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice, Drug Metabolism and Disposition, 27 (1998).

Pek, Y. S., Spectorb, M., Yannasd, I. V. and Gibson, L. J. Degradation of a collagen–chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase, Biomaterials, 25 (2004): 473-482.

Sharma, R.A., GesCher, A.J. and Steward, W.P. curcumin: The story so far, European Journal of Cancer, 41 (2005): 1955-1968.

Suman, P., Tathagata, C., Sreya, C., Arindam, B., Goutam, K. D., Tanya, D. and Gaurisankar, S. Mechanisms of curcumin -Induced Apoptosis of Ehrlich's Ascites Carcinoma Cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 288 (2001): 658–665.

Toledano, O. and Magdassi, S. Formation of Surface Active Gelatin by Covalent Attachment of Hydrophobic Chains, Journal of colloid and interface science, 193 (1997): 172–177.

Tonnesen, H. H. and Karlsen, J., Studies on curcumin and curcuminoids. X. The use of curcumin as a formulation aid to protect light-sensitive drugs in soft gelatin capsules, International Journal of Pharmaceutics, 38 (1987): 247-249.

Tonnesen, H. H. and Karlsen, J. Studies on curcumin and curcuminoids. XI. Stabilization of photolabile drugs in serum samples by addition of curcumin, International Journal of Pharmaceutics, 41 (1988): 75-81

Tornnesen, H. H. Studies on curcumin and curcuminoids. XVI. Effect of curcumin analogs on hyaluronic acid degradation in vitro, International Journal of Pharmaceutics, 51 (1989): 259-261.

Tonnesen, H. H., Ma'sson, M. and Loftsson, T. Studies of curcumin and curcuminoids.

- XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability, International Journal of Pharmaceutics ,244 (2002): 127-135.
- Tooru, O., Kang. M. H., Masato, S., Eiichi, T. and Kinam, P., Self-assembly of cholesterol-hydrotropic dendrimer conjugates into micelle-like structure: Preparation and hydrotropic solubilization of paclitaxel, Science and Technology of Advanced Materials ,6 (2005): 452–456.
- Wang, Y.J., Pan, M.H., Cheng, A.L., Lin, L.I., Ho, Y.S., Hsieh, C.Y., and Lin, J.K., Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, J. Pharm. Biomed. Anal., 15 (12) (1997): 1867–1876.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการดัดแปลงโครงสร้างของ เจลาติน

การเตรียมสารละลาย 4 ชนิดที่ใช้ในการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาติน

สารละลาย ก : ละลาย 1 กรัมของเจลาตินใน 30 กรัม DMSO และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในขวดที่ปิดอย่างแน่นหนา จนกระทั่งเจลาตินละลายหมด (2-3 ชั่วโมง)

สารละลาย ข : ละลายคอเลสเตอรอลที่ปริมาณต่างๆ กันในสารละลาย pyridine 10 มิลลิลิตร และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลาย ค : ละลาย DSC (ปริมาณ 1-3 เท่าของคอเลสเตอรอล) ใน 5 กรัม DMSO ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สารละลาย ง : ละลาย DMAP (ปริมาณ 1-3 เท่าของคอเลสเตอรอล) ใน 5 กรัม DMSO ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

การคำนวณหาปริมาณของคอเลสเตอรอลที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับ NH_2 group ของเจลาติน คำนวณได้จากสมการ

$$\frac{\text{g gelatin}}{\text{MW gelatin}} \times (\text{NH}_2 \text{ group /molecule}) \times \text{graft-ratio} \times \frac{\text{MW cholesterol}}{\text{mole of cholesterol}} = \text{g cholesterol}$$

การคำนวณหาปริมาณของ DSC ที่ใช้ในปฏิกิริยา คำนวณได้จากสมการ

$$\frac{\text{g cholesterol}}{\text{MW cholesterol}} \times \text{mole equivalent of cholesterol} \times \text{MW DSC} = \text{g DSC}$$

การคำนวณหาปริมาณของ DMAP ที่ใช้ในปฏิกิริยา คำนวณได้จากสมการ

$$\frac{\text{g cholesterol}}{\text{MW cholesterol}} \times \text{mole equivalent of cholesterol} \times \text{MW DMAP} = \text{g DMAP}$$

โดยที่ MW cholesterol = 386.65

MW DSC = 256.2

MW DMAP = 122.17

ตัวอย่างการคำนวณ

CG 25 – graft 25 %

การเตรียมคอเลสเตอรอล: $\frac{1 \text{ g gelatin}}{100,000} \times 30 \times (25/100) \times \frac{386.65 \text{ g}}{1 \text{ mole of cholesterol}} = 0.029 \text{ g}$

การเตรียม DSC (ปริมาณ 1 เท่าของคอเลสเตอรอล): $(0.029/386.65) \times 1 \times 256.2 = 0.019 \text{ g}$

การเตรียม DMAP (ปริมาณ 1 เท่าของคอเลสเตอรอล): $(0.029/386.65) \times 1 \times 122.17 = 0.009 \text{ g}$

ตารางที่ ก.1 แสดงปริมาณ (กรัม) ของสารที่ใช้ในการดัดแปลงเจลาติน 1 กรัมที่อัตราส่วนต่างๆ

การดัดแปลงเจลาติน		CG 25	CG 50	CG 66	CG 75	CG 100	CG 125
ใช้สารเชื่อมพันธะใน ปริมาณ 1 เท่าของ คอเลสเตอรอล	คอเลสเตอรอล (กรัม)	0.029	0.058	0.076	0.087	0.116	0.145
	DSC (กรัม)	0.019	0.038	0.050	0.058	0.077	0.096
	DMAP (กรัม)	0.009	0.018	0.024	0.028	0.037	0.046
ใช้สารเชื่อมพันธะใน ปริมาณ 2 เท่าของ คอเลสเตอรอล	คอเลสเตอรอล (กรัม)	0.029	0.058	0.076	0.087	0.116	0.145
	DSC (กรัม)	0.038	0.076	0.101	0.115	0.153	0.192
	DMAP (กรัม)	0.018	0.036	0.048	0.055	0.073	0.092
ใช้สารเชื่อมพันธะใน ปริมาณ 3 เท่าของ คอเลสเตอรอล	คอเลสเตอรอล (กรัม)	0.029	0.058	0.076	0.087	0.116	0.145
	DSC (กรัม)	0.057	0.115	0.152	0.172	0.230	0.288
	DMAP (กรัม)	0.027	0.055	0.073	0.082	0.110	0.137

ภาคผนวก ข.

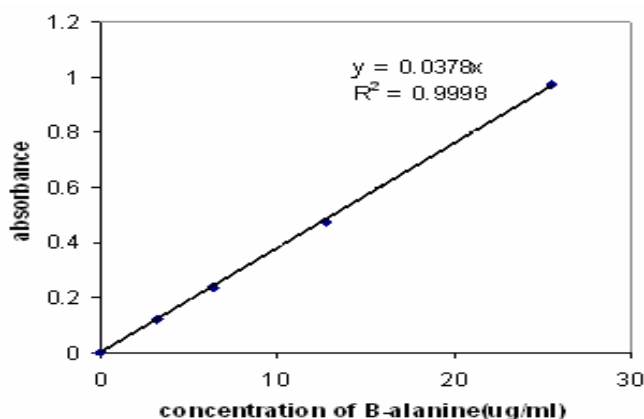
วิธี 2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS)

การหาปริมาณอะมิโนอิสระและร้อยละการเชื่อมโยงพันธะทำได้โดยใช้วิธี 2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) [Nagai, N. และคณะ, 2004] โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ใส่แผ่นเจลลาตินที่มีน้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ลงไปในสารละลาย NaHCO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่นที่ pH 8.5 และตามด้วย 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย TNBS ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น (สารละลาย TNBS นี้ไม่สามารถทำเก็บไว้ใช้ได้เนื่องจากสารประเภทนี้มีความไวต่อแสง)
2. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอ่างให้ความร้อน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. หากพบว่าแผ่นเจลลาตินยังละลายไม่หมดให้เติม กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ในแผ่นเจลลาตินร้อยละการเชื่อมโยงพันธะสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Degree of cross-linking (\%)} = \left[\frac{A - B}{A} \right] \times 100$$

โดยที่ A เป็นปริมาณอะมิโนอิสระของแผ่นเจลลาตินก่อนการเชื่อมโยงพันธะและ B เป็นปริมาณอะมิโนอิสระของแผ่นเจลลาตินหลังการเชื่อมโยงพันธะ



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของ β - alanine

ตารางที่ ข.1 แสดงปริมาณอะมิโนอิสระที่เปลี่ยนแปลงหลังการตัดแปลงโครงสร้างเจลาตินและหลังการเชื่อมโยงพันธะ (mean ± SD, n=3)

รหัส	ใช้สารเชื่อมพันธะ 1 เท่าของคอเลสเตรอล		ใช้สารเชื่อมพันธะ 2 เท่าของคอเลสเตรอล		ใช้สารเชื่อมพันธะ 3 เท่าของคอเลสเตรอล	
	หลังการตัดแปลง โครงสร้าง($\mu\text{g/g}$) $\times 10^2$	หลังการเชื่อมโยง พันธะ($\mu\text{g/g}$) $\times 10^2$	หลังการตัดแปลง โครงสร้าง($\mu\text{g/ml}$) $\times 10^2$	หลังการเชื่อมโยง พันธะ($\mu\text{g/g}$) $\times 10^2$	หลังการตัดแปลง โครงสร้าง($\mu\text{g/ml}$) $\times 10^2$	หลังการเชื่อมโยง พันธะ($\mu\text{g/g}$) $\times 10^2$
G	360.68 ± 0.04	71.04 ± 0.03	360.68 ± 0.04	-	360.68 ± 0.04	-
CG25	345.14 ± 0.02	71.95 ± 0.00	313.58 ± 0.01	86.77 ± 0.02	267.54 ± 0.01	76.89 ± 0.00
CG50	311.46 ± 0.01	72.66 ± 0.06	286.06 ± 0.01	84.47 ± 0.04	215.34 ± 0.01	76.89 ± 0.01
CG66	298.05 ± 0.01	87.12 ± 0.01	276.01 ± 0.02	87.30 ± 0.07	198.41 ± 0.01	75.30 ± 0.02
CG75	278.48 ± 0.01	121.69 ± 0.02	256.26 ± 0.01	113.93 ± 0.01	188.88 ± 0.01	96.47 ± 0.01
CG100	263.13 ± 0.01	131.74 ± 0.01	238.27 ± 0.01	134.92 ± 0.02	168.43 ± 0.02	108.11 ± 0.01
CG125	250.08 ± 0.01	144.09 ± 0.01	213.75 ± 0.01	130.68 ± 0.01	132.27 ± 0.01	95.06 ± 0.01

ภาคผนวก ค. การหาค่าอุณหภูมิในการสลายตัว (T_d)

หลักการทํางาน

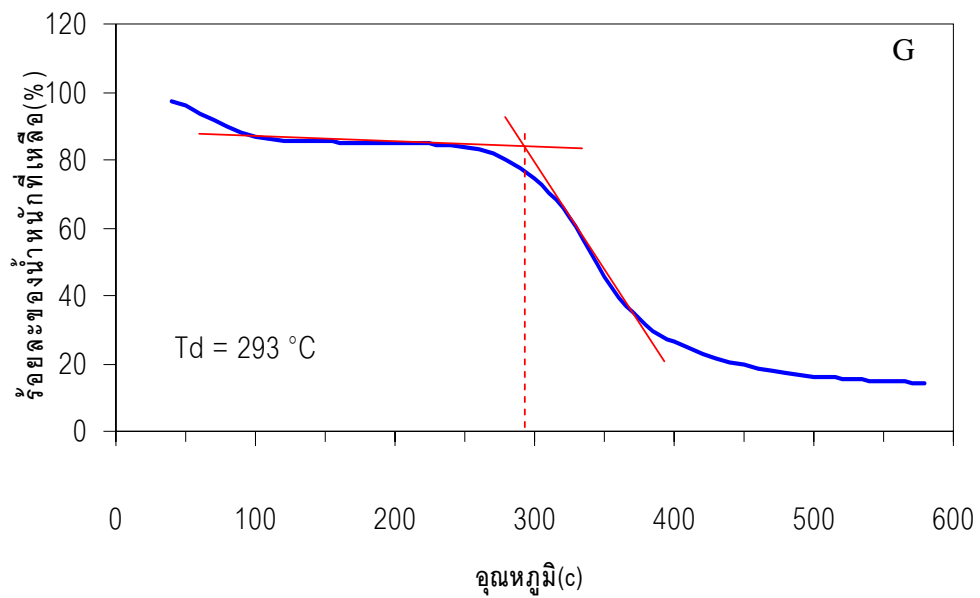
วัดค่าน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารโดยใช้เครื่อง Thermogravimetric/Differential Analyzer (TG/DTA) เช่นวัดน้ำหนักที่หายไปของสารต่อเวลาหรืออุณหภูมิ ซึ่งเกิดจากการสลายตัวหรือการเอาน้ำออก ซึ่งกราฟที่ได้ประกอบด้วย ค่าน้ำหนักที่หายไป ฟังก์ชันของอุณหภูมิ และอัตราการหายไปของน้ำหนักต่ออุณหภูมิ โดยกราฟที่ได้นั้นแสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะของสารหรือระบบหนึ่งๆ เนื่องจากลำดับของปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นที่ช่วงของอุณหภูมิที่แน่นอน การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักนี้เป็นผลมาจากการสลายตัว หรือการรวมตัวของสาร ที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น เช่นการระเหยตัวของสาร หรือการเกิดขึ้นของผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักมาก

การเตรียมตัวอย่าง

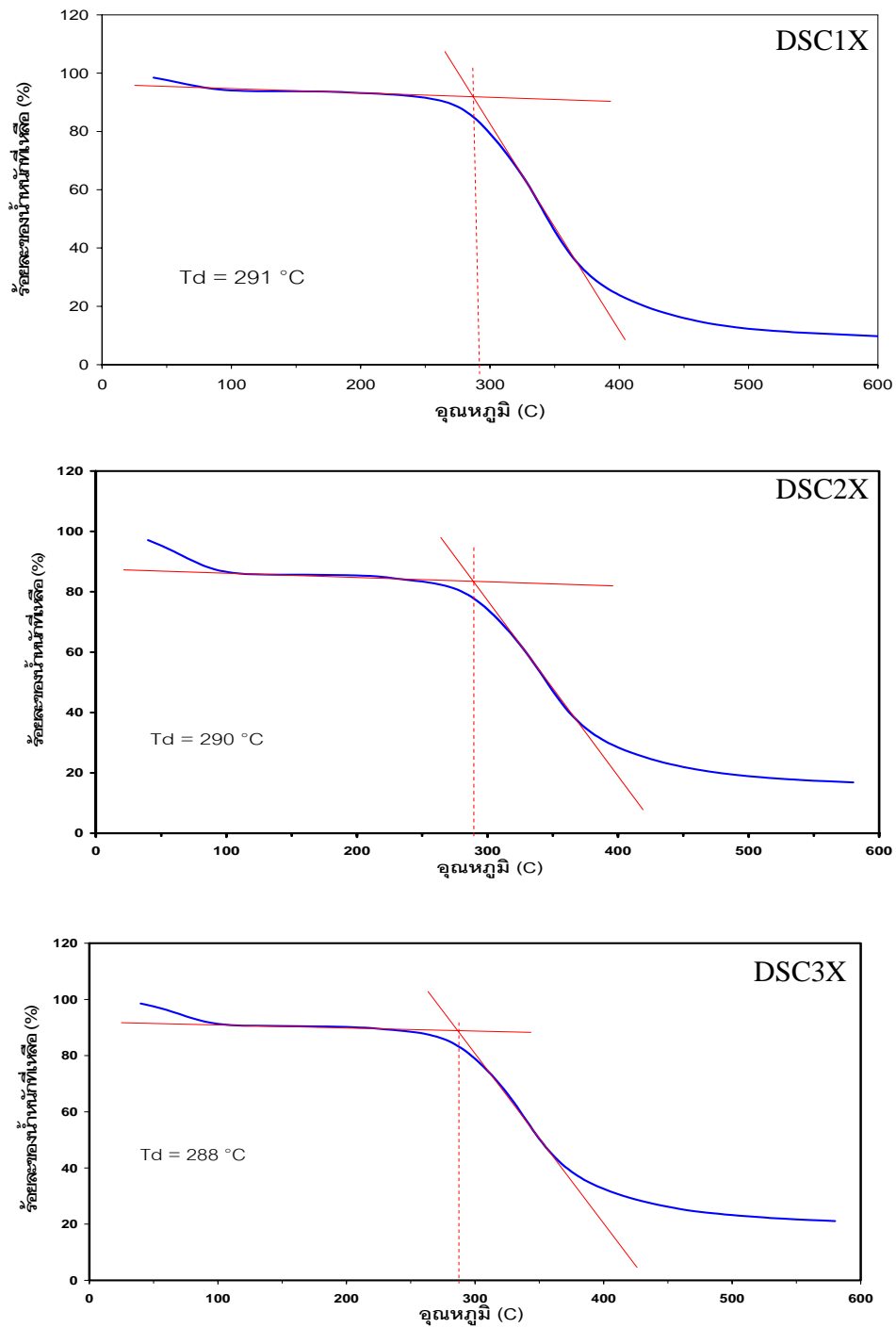
อบตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้นที่มีอยู่ในตัวอย่าง ไม่ให้การวิเคราะห์คลาดเคลื่อน ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ควรมีน้ำหนักไม่เกิน 10 มิลลิกรัม เพื่อลดผลกระทบจากความแตกต่างของอุณหภูมิ จากนั้นนำวางบนภาชนะที่ใส่ตัวอย่าง

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์

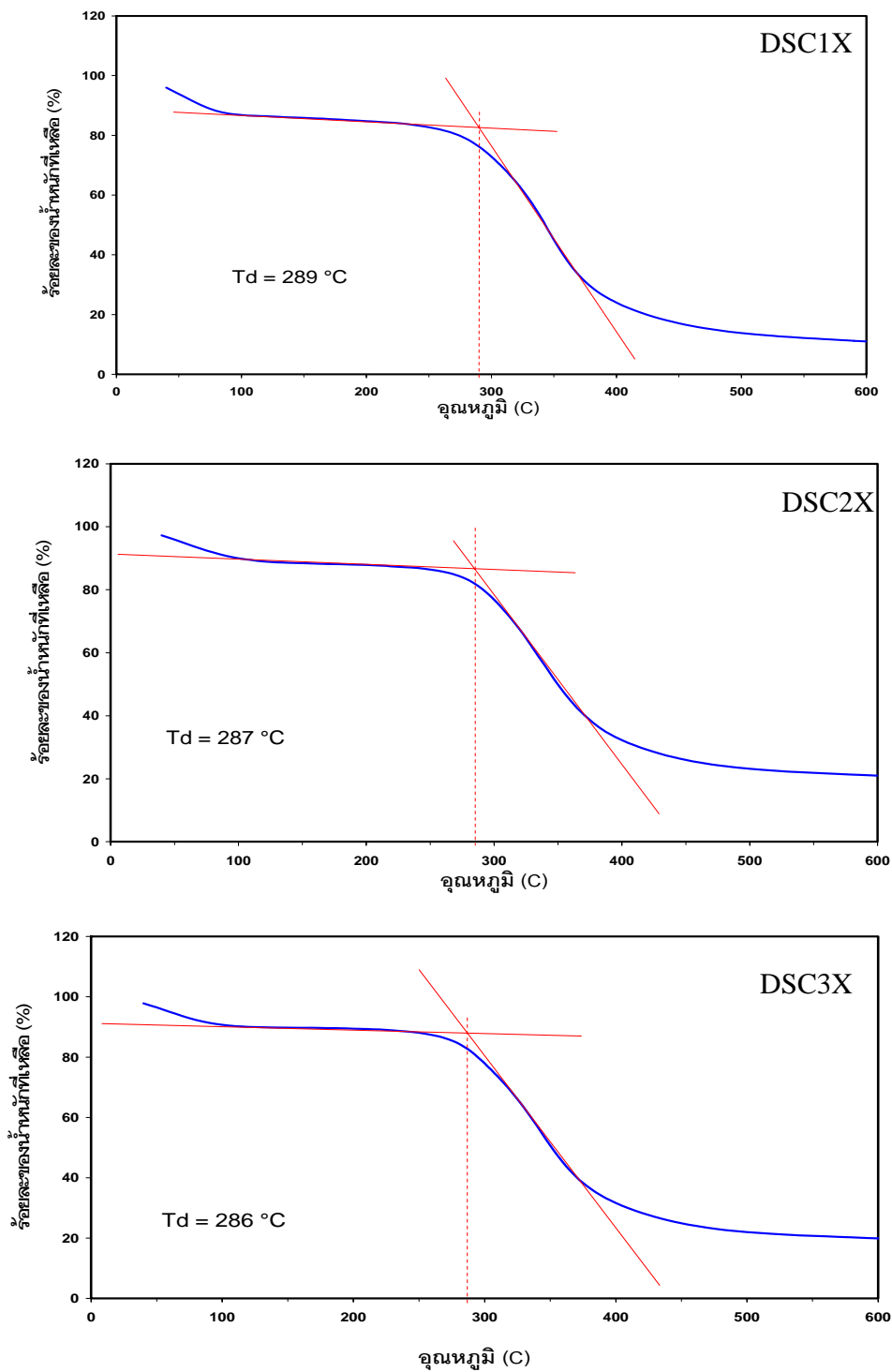
กราฟที่ได้นั้นดังที่กล่าวไว้แล้วประกอบด้วย ฟังก์ชันระหว่างอัตราการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและอุณหภูมิ และฟังก์ชันระหว่างน้ำหนักที่หายไปต่ออุณหภูมิ ซึ่งกราฟฟังก์ชันของอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก จะแสดงถึงช่วงอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก กล่าวคือในช่วงอุณหภูมินั้นมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เช่น มีการสลายตัวของสาร มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น หรือน้ำที่อยู่ในโครงสร้างมีการระเหยออก เป็นต้น ซึ่งรูปแบบของกราฟนี้จะแสดงในรูปปริมาณของน้ำหนักที่หายไปของส่วนประกอบแต่ละส่วนที่อุณหภูมิสลายตัวต่างๆ



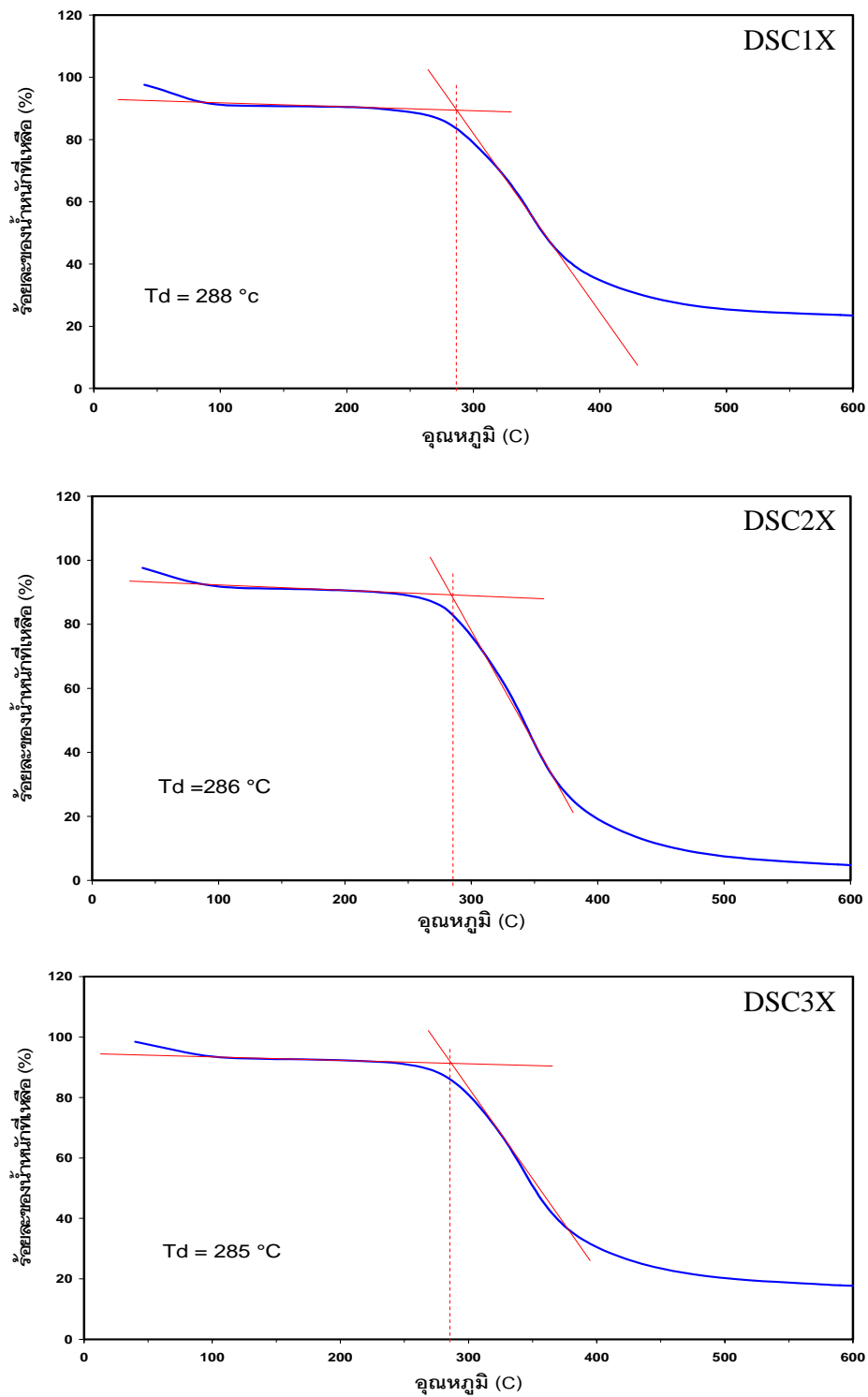
รูปที่ ค.1 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของเจลาติน (G) โดยใช้โปรแกรม Onset จากเครื่อง TG/DTA ซึ่งจะได้ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของเจลาตินเป็น 293 องศาเซลเซียส



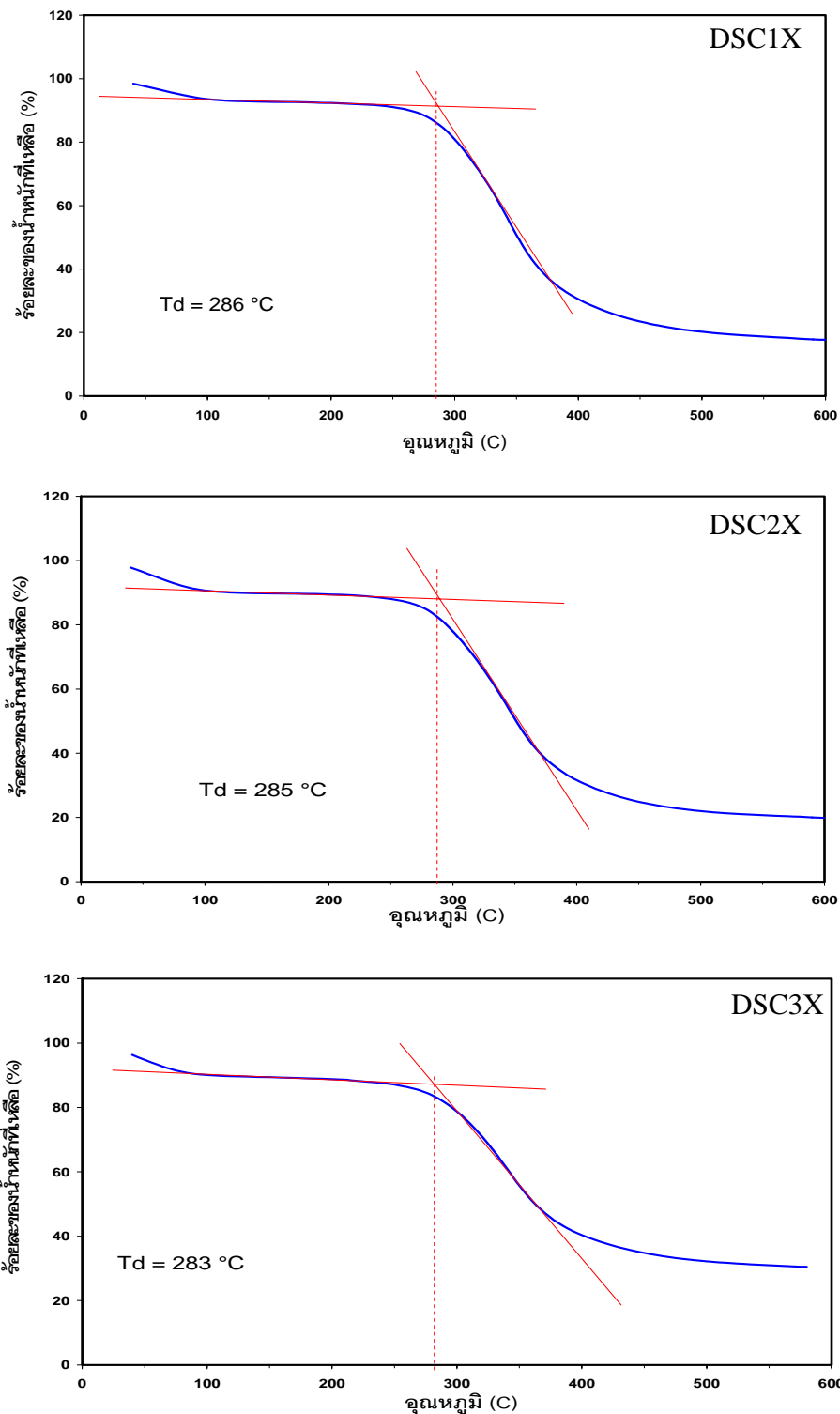
รูปที่ ค.2 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG25 ที่ผ่านการดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล



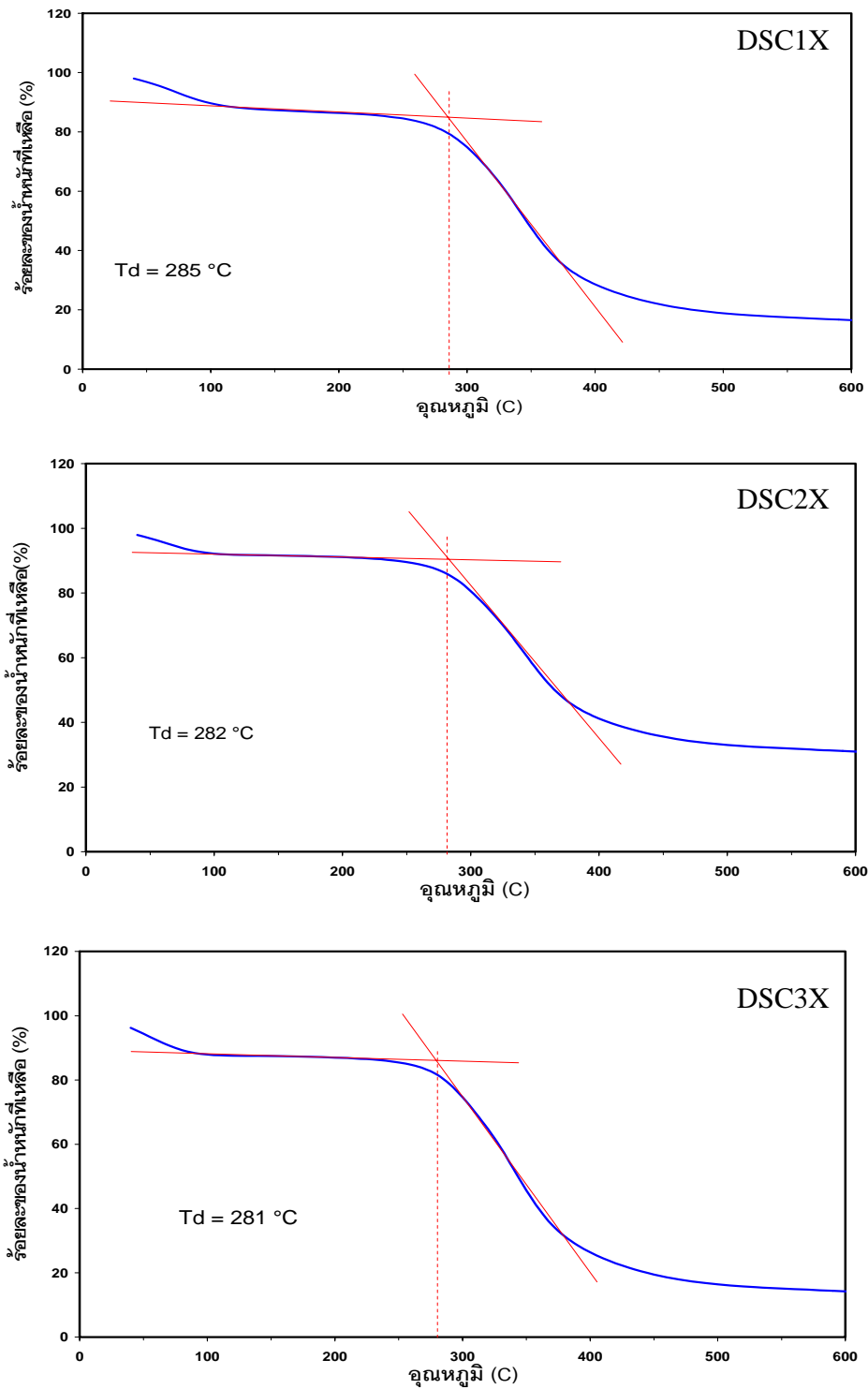
รูปที่ ค.3 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG50 ที่ผ่านการตัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอรอล



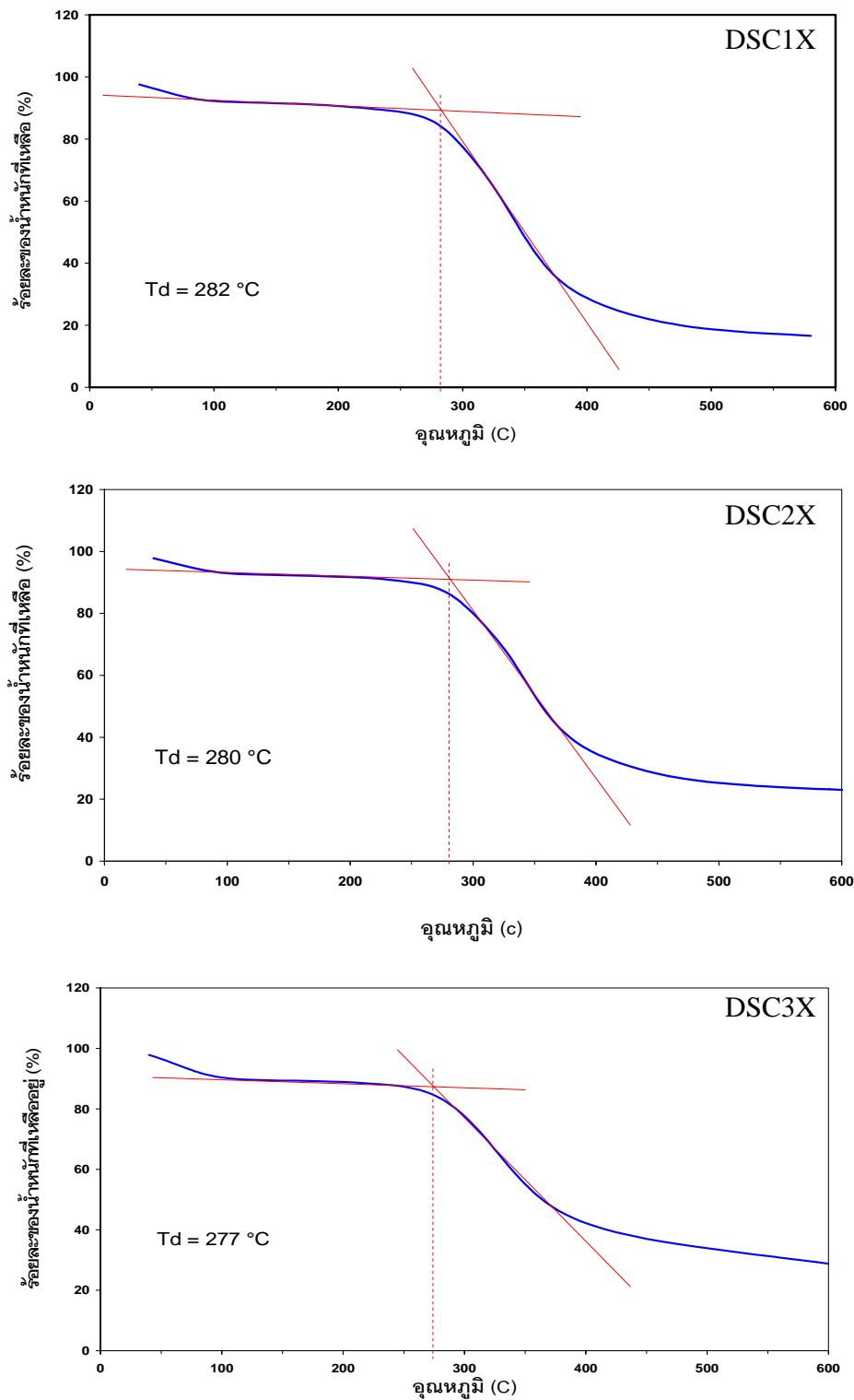
รูปที่ ค.4 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG66 ที่ผ่านการดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล



รูปที่ ค.5 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG75 ที่ผ่านการดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล



รูปที่ ค.6 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG100 ที่ผ่านการดัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะในปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอลเลสเตอรอล



รูปที่ ค.7 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของ CG125 ที่ผ่านการตัดแปลงโดยใช้สารเชื่อมพันธะไนปริมาณ 1, 2 และ 3 เท่าของคอเลสเตรอล

ภาคผนวก ง. การหาค่ามุมสัมผัสน้ำ

[Einerson, J. และคณะ, 2002]

ขั้นตอนการเตรียมฟิล์ม:

1. เตรียมสารละลายของเจลาตินที่ดัดแปลงโครงสร้างแล้ว โดยเตรียมความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร
2. หยดสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตรบน glass slide (ขนาด 1 x 2 ตารางเซนติเมตร) ที่สะอาด
3. นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ทำแห้งตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวัดค่ามุมสัมผัส:

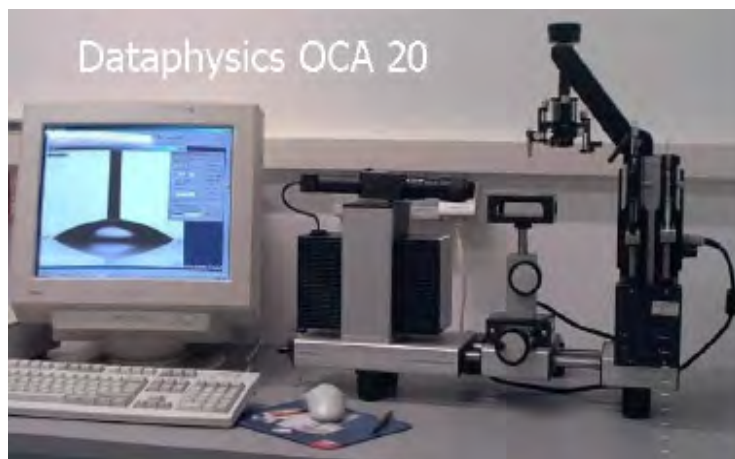
1. ทำแห้งตัวอย่างในโถดูดความชื้นโดยใช้ vacuum pump 1 ชั่วโมงก่อนทำการวัด
2. วัดค่ามุมสัมผัสที่ผิวหน้าของแผ่นฟิล์มหลังจากหยดน้ำบนตัวอย่าง 30 วินาที

หมายเหตุ:

1. วัดค่ามุมสัมผัส 5 จุดบนตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 4 ซ้ำ)
2. วัดค่ามุมสัมผัสของแผ่น glass slide เป็นตัวอ้างอิง

ขั้นตอนการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำ:

1. เตรียมสารละลายใส่ในหลอดเข็มฉีดยา (ข้อควรระวัง ในการเตรียมสารละลายใส่ในหลอดเข็มฉีดยา สารละลายต้องเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ถ้าเป็นสารที่มีความเหนียวต้องระวังเพราะทำความสะอาดยาก)
2. นำเข็มฉีดยาใส่ในชุดปรับละเอียด
3. ปรับติดตั้งในแกนใส่เข็มฉีดยา ลองปรับดูว่าหยดสารออกมาได้สะดวกหรือไม่
4. เตรียมตัวอย่างที่ต้องการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำ ให้มีพื้นผิวสะอาด วางในระดับที่แสงส่องด้านหลังของเลนส์ส่องได้ถึง
5. จัดวางตัวอย่างในที่วางบนแท่นจับยึดให้แนบกับแท่น - เปิดคอมพิวเตอร์
6. เมื่อเครื่องคอมพิวเตอร์เปิดแล้วเลือกโปรแกรม Tante Software ซึ่งหลักการวัดคือ การใช้กล้องวิดีโอ CCD ดึงภาพจริงจากบริเวณที่ต้องการวัดมาส่งผ่านแผงวงจร สร้างภาพบนจอคอมพิวเตอร์แล้วใช้โปรแกรมที่สามารถแยกแยะขอบเขตของภาพช่วยในการคำนวณค่ามุมองศาที่ต้องการ นำเสนอบนจอคอมพิวเตอร์ ซึ่งเครื่อง contact angle แสดงในรูปแบบที่ ง.1



รูปที่ ง.1 Contact angle (ที่มา: www.imtek.de)

การวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อพิจารณาความเป็น hydrophobicity และ hydrophilicity ของพื้นผิวชิ้นงาน สามารถพิจารณาจากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้โดยหากค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวชิ้นงานมีค่ามากกว่า 65 องศา แสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophobicity แต่ถ้าหากค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้มีค่าต่ำกว่า 65 องศาแสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นแสดงความเป็น hydrophilicity [Vogler, EA. 1998]

ภาคผนวก จ.

การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย [Choi, Ys และคณะ, 1998]

การทดสอบอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงด้วยวิธีการย่อยสลายในเอนไซม์ collagenase โดยดัดแปลงวิธีของ YS. Choi ในการหาอัตราการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงโดยแช่แผ่นเจลาตินดัดแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร หน้า 5 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS buffer) ที่ pH 7.4 ที่มีเอนไซม์ bacterial collagenase ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยติดตามผลทุก 24 ชั่วโมง จึงนำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะทำให้แห้งที่อุณหภูมิเยือกแข็ง

การย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเจลาตินดัดแปลงแสดงดังตาราง จ.1

ตาราง ๑.1 ร้อยละของน้ำหนักที่เหลือของแผ่นเจลาตินดัดแปลง(หนัก 5 มิลลิกรัม) ในสารละลาย PBS pH 7.4 ที่มีเอนไซม์ bacterial collagenase ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร

ปริมาณ DSC	รหัส	น้ำหนักคงเหลือของแผ่นเจลาติน (%)							
		วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 11	วันที่ 13	วันที่ 15
1X	CG25	100	97.26	95.76	95.49	91.33	82.03	72.22	45.83
	CG50	97.70	95.50	91.81	91.23	86.69	74.14	60.18	27.34
	CG66	95.69	88.63	86.31	82.21	70.12	69.45	39.79	7.79
	CG75	85.73	83.81	84.84	69.16	63.55	34.61	34.20	0.00
	CG100	76.74	71.98	67.87	47.63	39.40	20.12	0.00	0.00
	CG125	69.25	51.46	35.72	34.70	18.92	0.00	0.00	0.00
2X	CG25	100	97.26	93.50	93.22	91.33	81.35	72.22	45.83
	CG50	96.96	86.05	87.85	86.83	77.52	66.43	33.47	27.46
	CG66	91.11	81.50	78.33	75.41	71.30	54.34	29.03	3.49
	CG75	85.73	73.40	63.11	64.05	46.81	30.26	25.51	0.00
	CG100	84.59	68.40	47.58	34.28	33.70	0.00	0.00	0.00
	CG125	59.06	46.36	31.94	3.81	0.00	0.00	0.00	0.00
3X	CG25	98.19	97.26	90.05	88.62	84.77	72.25	57.57	42.97
	CG50	90.30	84.51	81.50	80.37	64.76	55.32	43.98	17.93
	CG66	86.34	81.50	64.79	60.56	56.55	30.03	20.47	0.00
	CG75	77.03	56.93	54.73	42.33	38.68	15.35	13.73	0.00
	CG100	62.01	49.51	29.56	21.82	18.49	0.00	0.00	0.00
	CG125	42.81	33.97	17.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

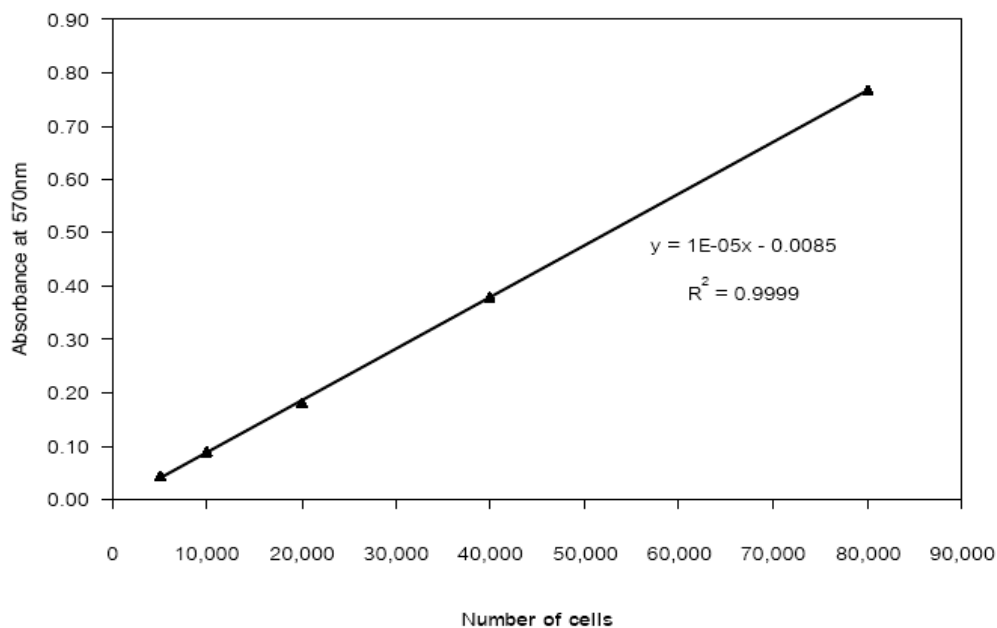
ภาคผนวก จ.

MTT assay หรือ (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay [Liu, H. และคณะ 2004]

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] มีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ tetrazolium มีสีเหลือง โดยที่ MTT ที่ถูกละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี phenol red จะถูกเปลี่ยนเป็นผลึก formazan สีม่วงที่เนื่องจากการถูกทำลายวงแหวน tetrazolium ด้วยเอนไซม์ dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ผลึกสีม่วงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้แต่สามารถละลายได้โดยใช้ตัวทำละลาย เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) สารละลายสีม่วงที่ได้จะถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณผลึก formazan ที่ถูกละลายออกมามีค่าแปรผันโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (Mosmann, 1983; Choi และคณะ, 2004)

ขั้นตอนการทดสอบ

- 1) เตรียมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5 mg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีฟีนอลเรด (phenol red)
- 2) หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 5 ชั่วโมง ให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4
- 3) เติมสารละลาย MTT จากข้อ 1) ลงในหลุมที่มีเซลล์อยู่
- 4) ทำการ incubate ใน incubator ที่มีสภาวะ CO₂ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
- 5) นำสารละลาย MTT ออกจากหลุมเลี้ยงเซลล์
- 6) เติมสารละลายผสม DMSO ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์แล้วใช้ปิเปตพ่น DMSO ขึ้น-ลงเพื่อละลายผลึก formazan
- 7) นำสารละลายจากข้อ 6) ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร



รูปที่ ๑.1 กราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 mouse fibroblast (n = 4)

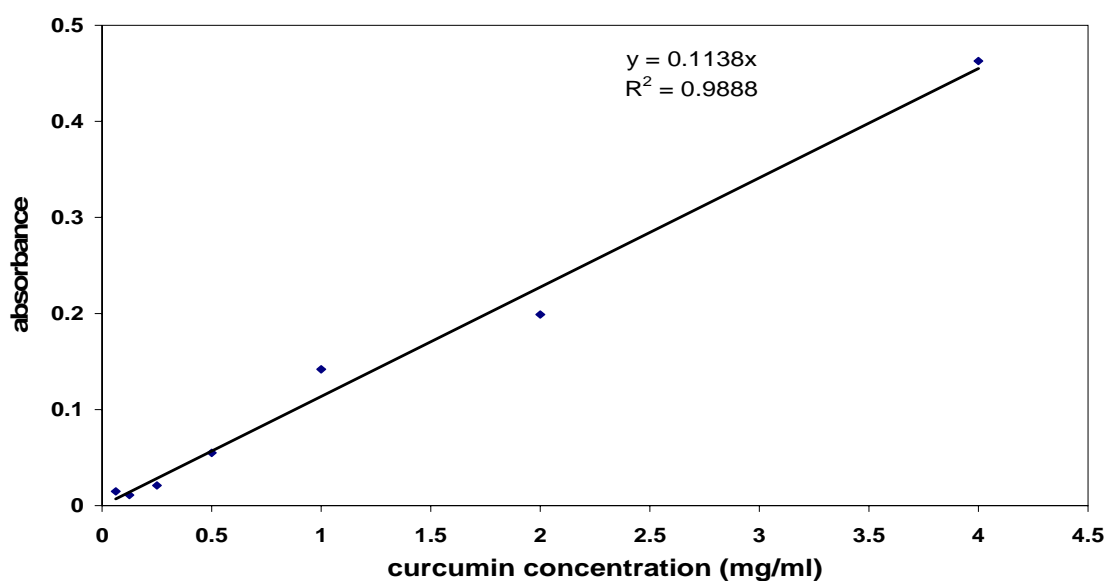
ตาราง ๑.1 จำนวนเซลล์ L929 mouse fibroblast ที่มีชีวิตบนแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่เวลาต่างๆ (จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์/แผ่นเจลาติน)

รหัส	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต		
	5 ชั่วโมง	1 วัน	3 วัน
G	7530.00	44193.00	74993.33
CG25	7363.33	50926.66	74793.33
CG66	6296.66	43526.67	74326.67
CG100	5496.66	29660.00	66660.00

ภาคผนวก ข. การปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกาย

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80 และเคอร์คูมิน

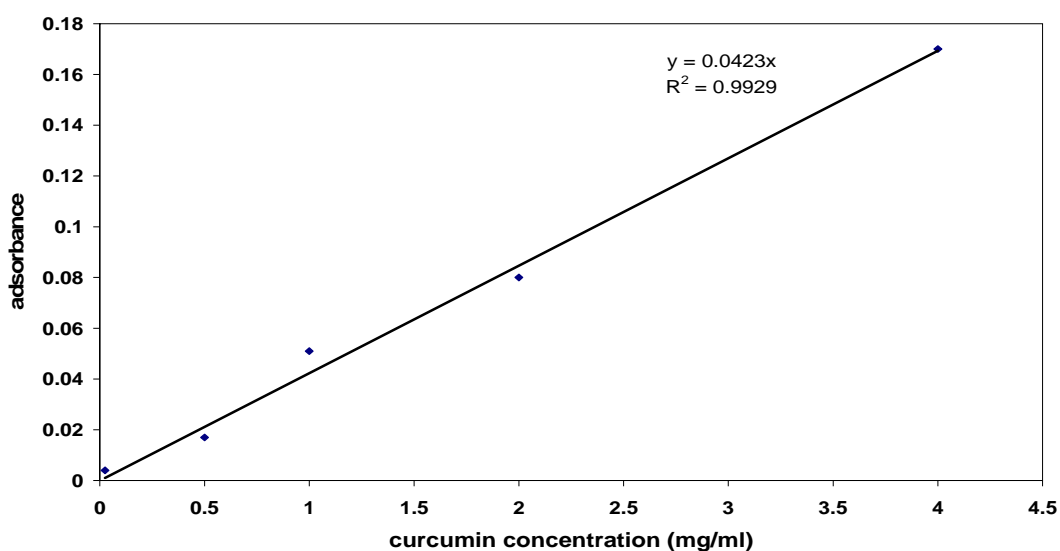
การทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกร่างกายในเบื้องต้นได้สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80 และเคอร์คูมิน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน ความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และนำไปวิเคราะห์หาค่าความยาวคลื่น (wavelenge) และค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของเคอร์คูมิน โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer จะได้ค่าความยาวคลื่นที่ 412.60 นาโนเมตร และกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80 และเคอร์คูมิน ดังแสดงในรูปที่ ข. 1



รูปที่ ข. 1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80 และเคอร์คูมิน ที่ความยาวคลื่น 412.60 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80, trypsin, แผ่นเจลลาดินดัดแปลง และเคอร์คูมิน

การทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกในร่างกายในเบื้องต้นได้สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80, trypsin, แผ่นเจลลาดินดัดแปลง และเคอร์คูมิน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน ความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายและนำไปวิเคราะห์หาค่าความยาวคลื่น (wavelength) และค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของเคอร์คูมิน โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer จะได้ค่าความยาวคลื่นที่ 285.50 นาโนเมตร และกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80, trypsin, แผ่นเจลลาดินดัดแปลง และเคอร์คูมิน ดังแสดงในรูปที่ ๒



รูปที่ ๒ แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายผสมระหว่าง PBS, 0.01% Tween 80, trypsin, แผ่นเจลลาดินดัดแปลง และเคอร์คูมิน ที่ความยาวคลื่น 285.50 นาโนเมตร

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยเคอร์คูมินภายนอกในร่างกาย คำนวณได้จากสมการ (1) และ (2)

$$(1) (C_t / C_a) \times 100 = \% \text{การปลดปล่อยเคอร์คูมิน}$$

$$(2) OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}} = \text{ปริมาณเคอร์คูมิน ณ เวลาใดๆ}$$

โดยที่ C_t คือ ปริมาณเคอร์คูมิน ณ เวลาใดๆ, C_a คือ ปริมาณเคอร์คูมินทั้งหมดหลังการย่อยสลายของแผ่นเจลลาดินดัดแปลง, control และ sample เป็นแผ่นเจลลาดินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมินและดูดซับเคอร์คูมินตามลำดับ

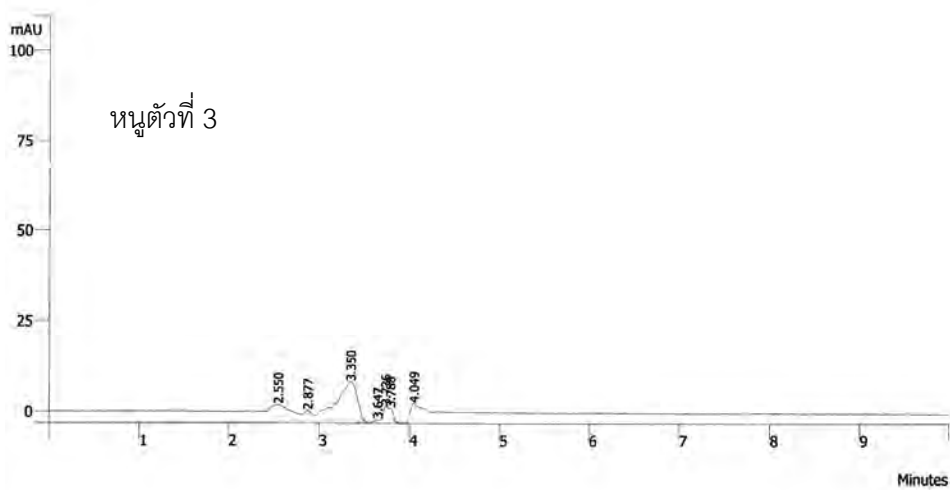
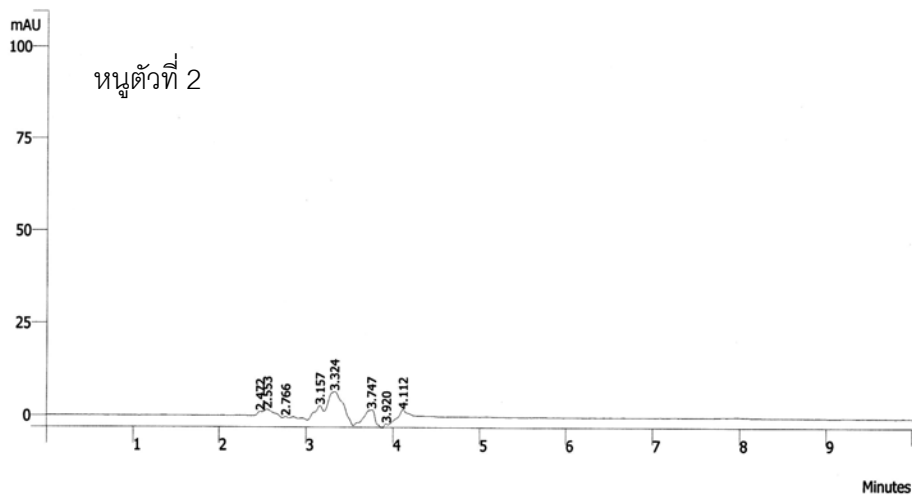
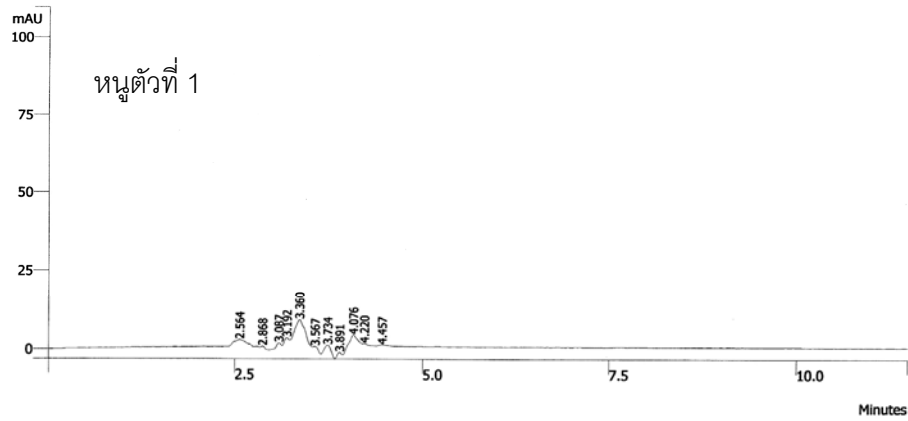
ภาคผนวก ซ. ระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง

การทดสอบปริมาณเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง

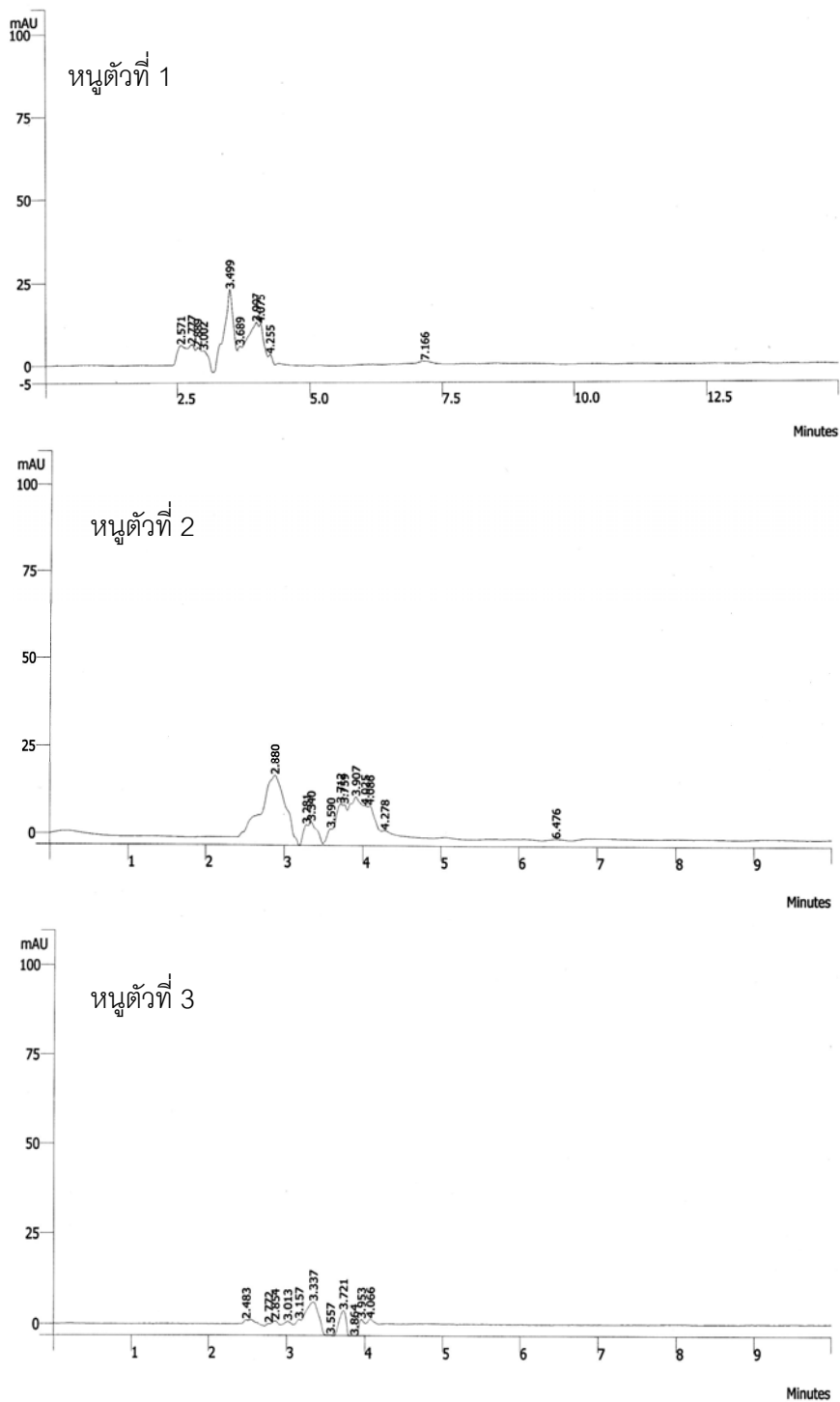
วิธีการทดสอบในสัตว์ทดลอง

1. การทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน กลุ่ม 2 คือ กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 ไมโครกรัม/กรัมแผ่น กลุ่ม 3 คือ กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 ไมโครกรัม/กรัมแผ่น ในแต่ละกลุ่มจะทำการศึกษาเป็นช่วงเวลา โดยทำการศึกษาในวันที่ 3, 6, 10 และ 14 ในแต่ละช่วงเวลาก็จะใช้นูในการปลูกถ่ายจำนวน 3 ตัว ($n=3$) ดังนั้นใช้นูในการทดสอบทั้งหมด 36 ตัว และใช้แผ่นเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเตอรอลขนาด 1×1 เซนติเมตร ความหนา 0.7 มิลลิเมตรจำนวน 36 ตัวอย่าง

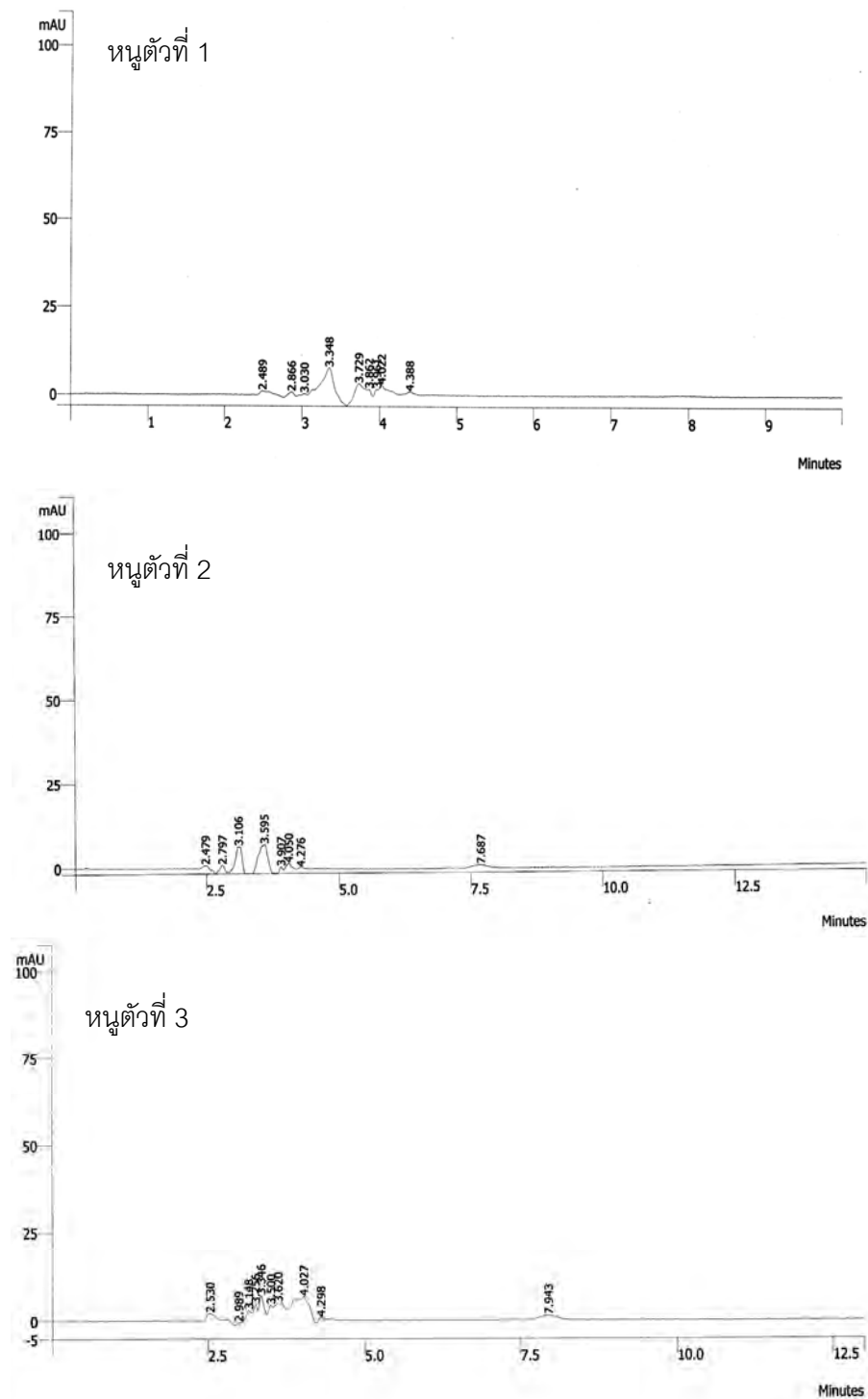
2. หลังการปลูกฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลง ทำการเก็บเลือดของหนูที่ได้จากหัวใจหนูที่เวลาต่างๆ ทำการแยกพลาสมาออกจากเลือดแล้วสกัดเอาเคอร์คูมินออกมานำไปวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินในพลาสมาด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ column C-18 Mobile phase ใช้ acetonitrile และ 10% acetic acid (50:50) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที
ได้ผลการทดลองดังนี้



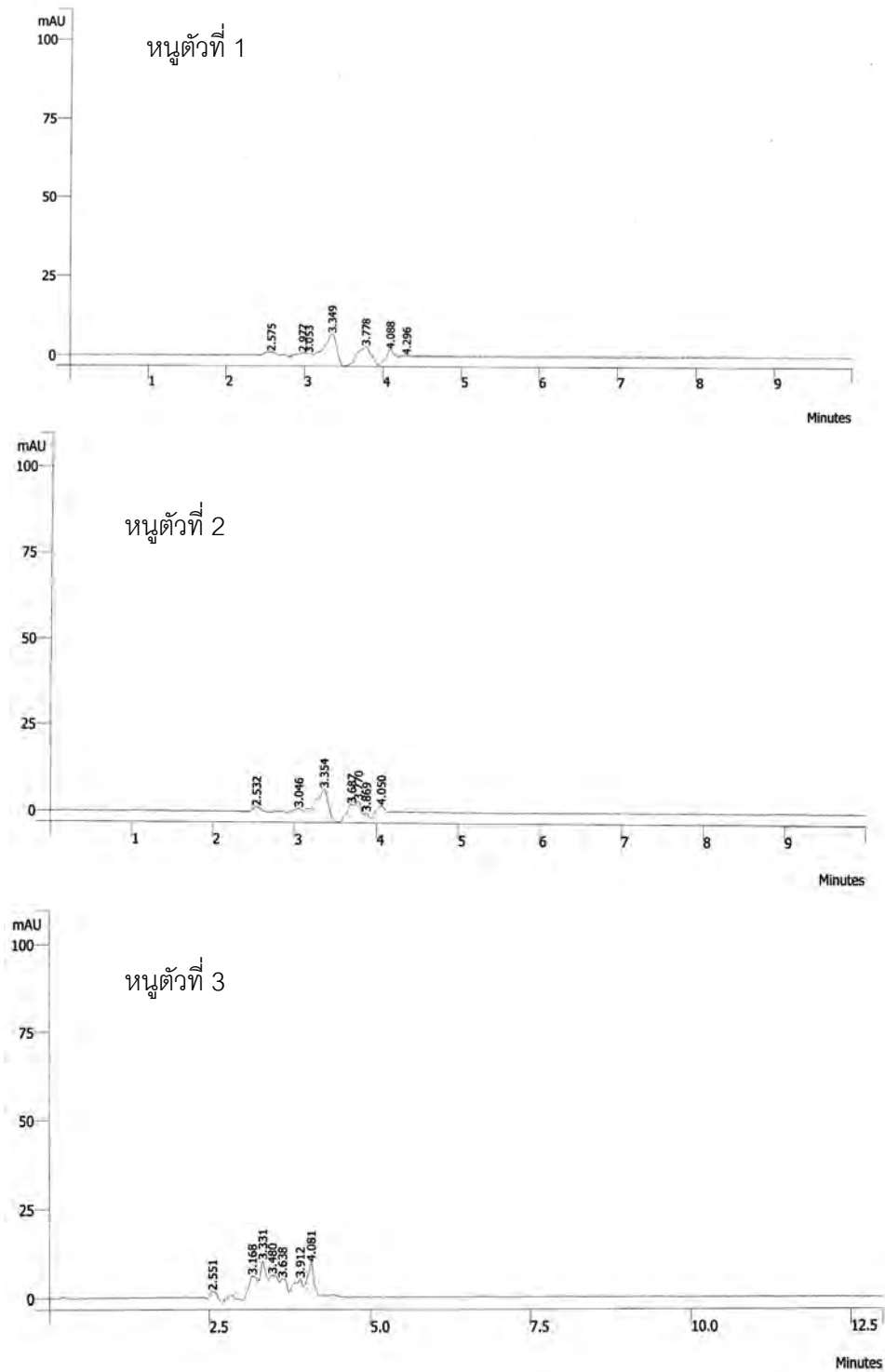
รูปที่ ๙.1 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase



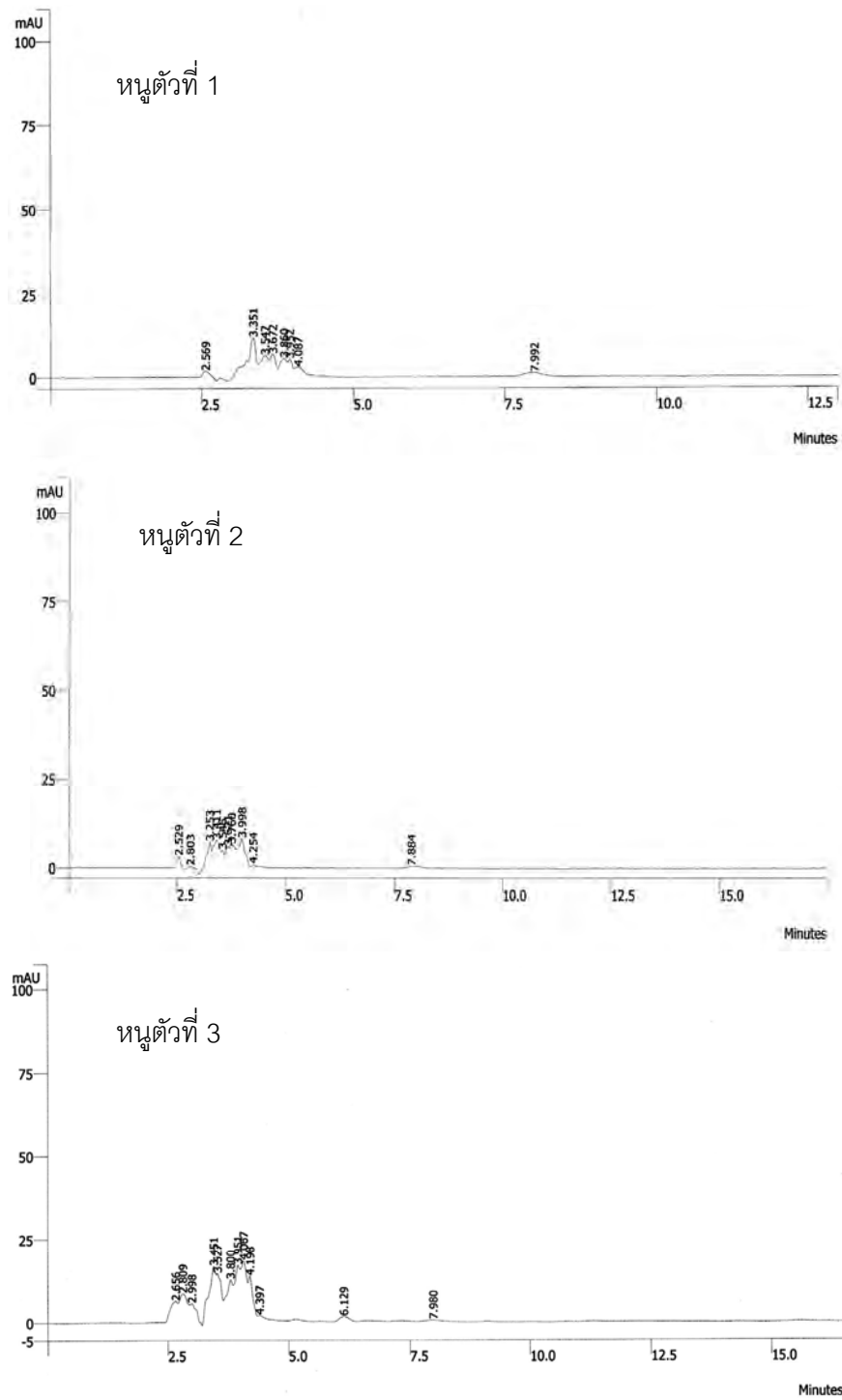
รูปที่ ๕.2 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนุ่หลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase



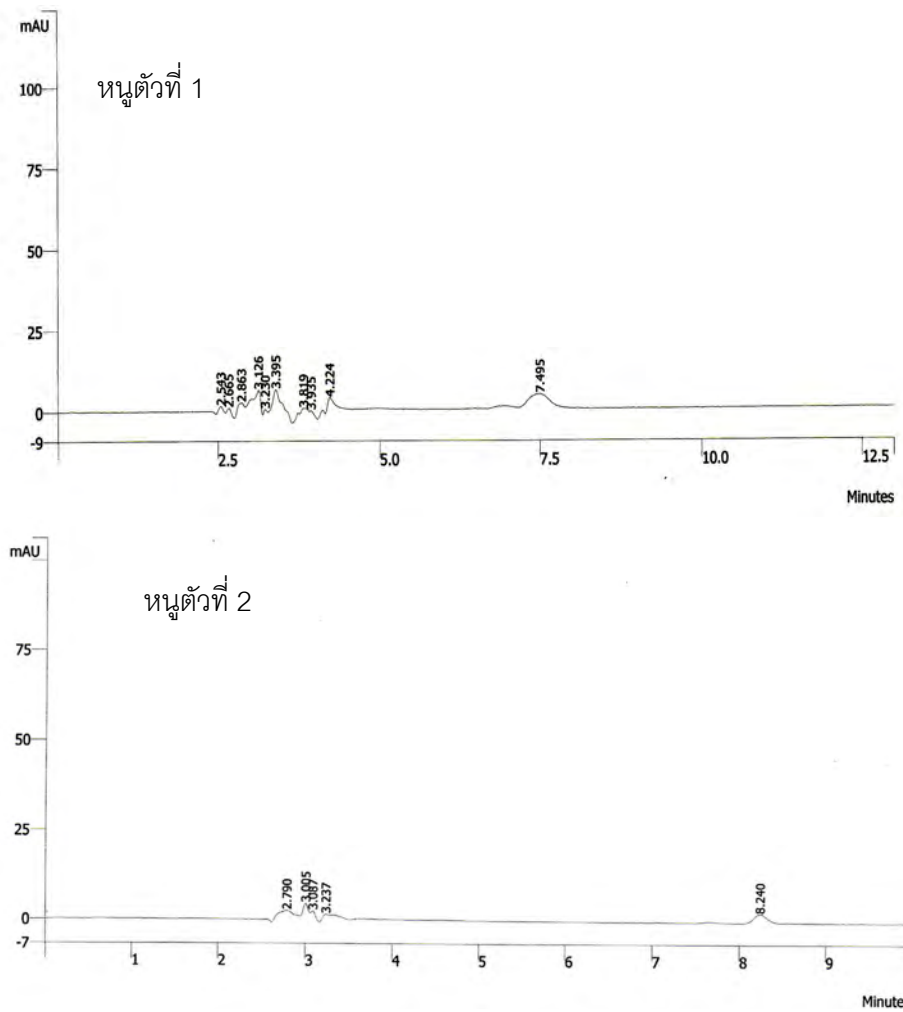
รูปที่ ๓.3 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนุ่หลังการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คิวมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase



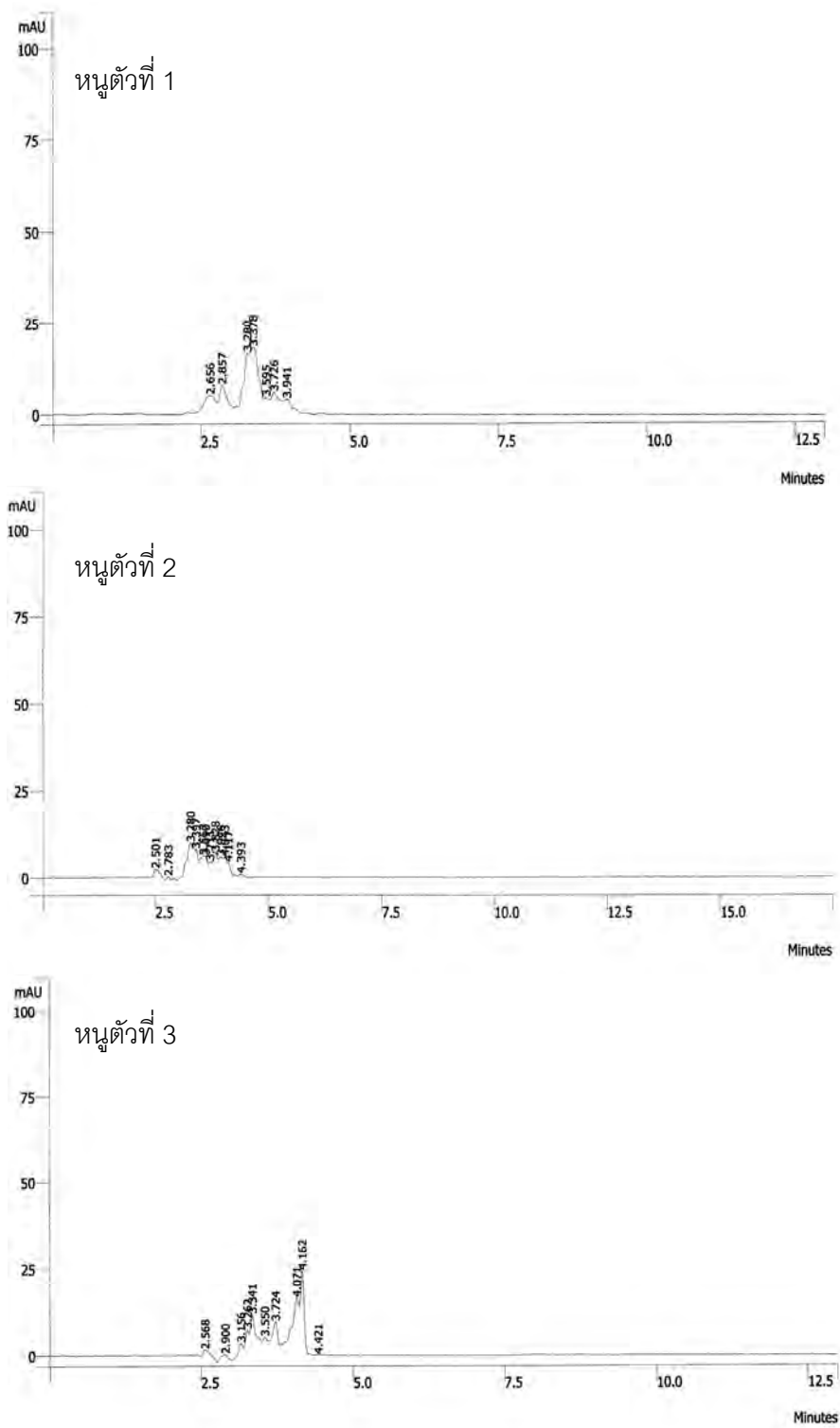
รูปที่ ๔.4 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนุ่หลังการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำไปปมเอนไซม์ β -glucuronidase



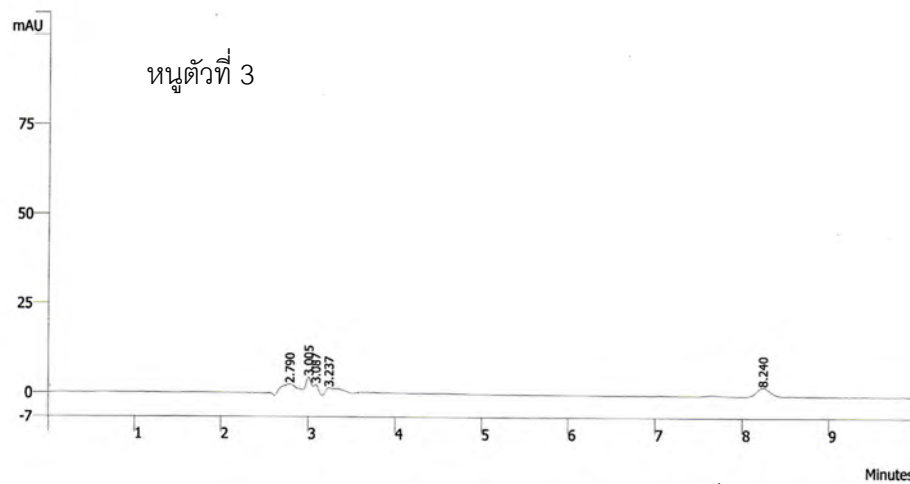
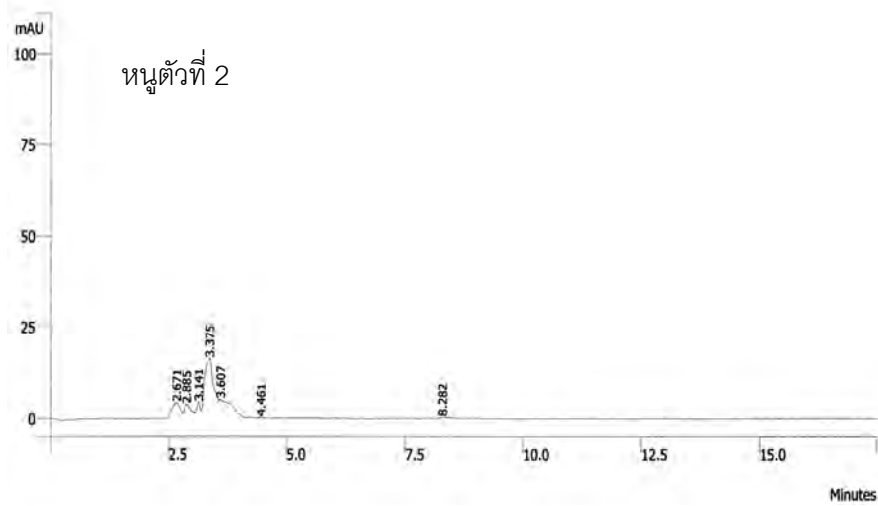
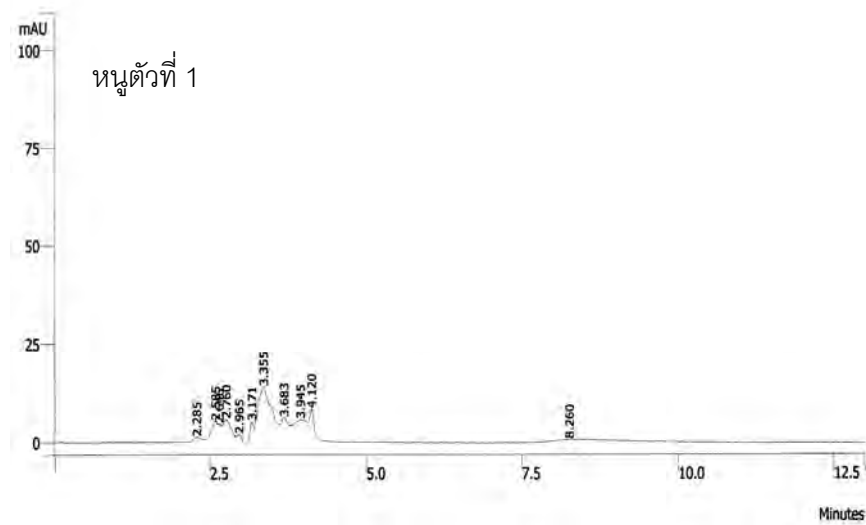
รูปที่ ๕.5 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนุ่หลังการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำไปบ่มเอนไซม์ β -glucuronidase



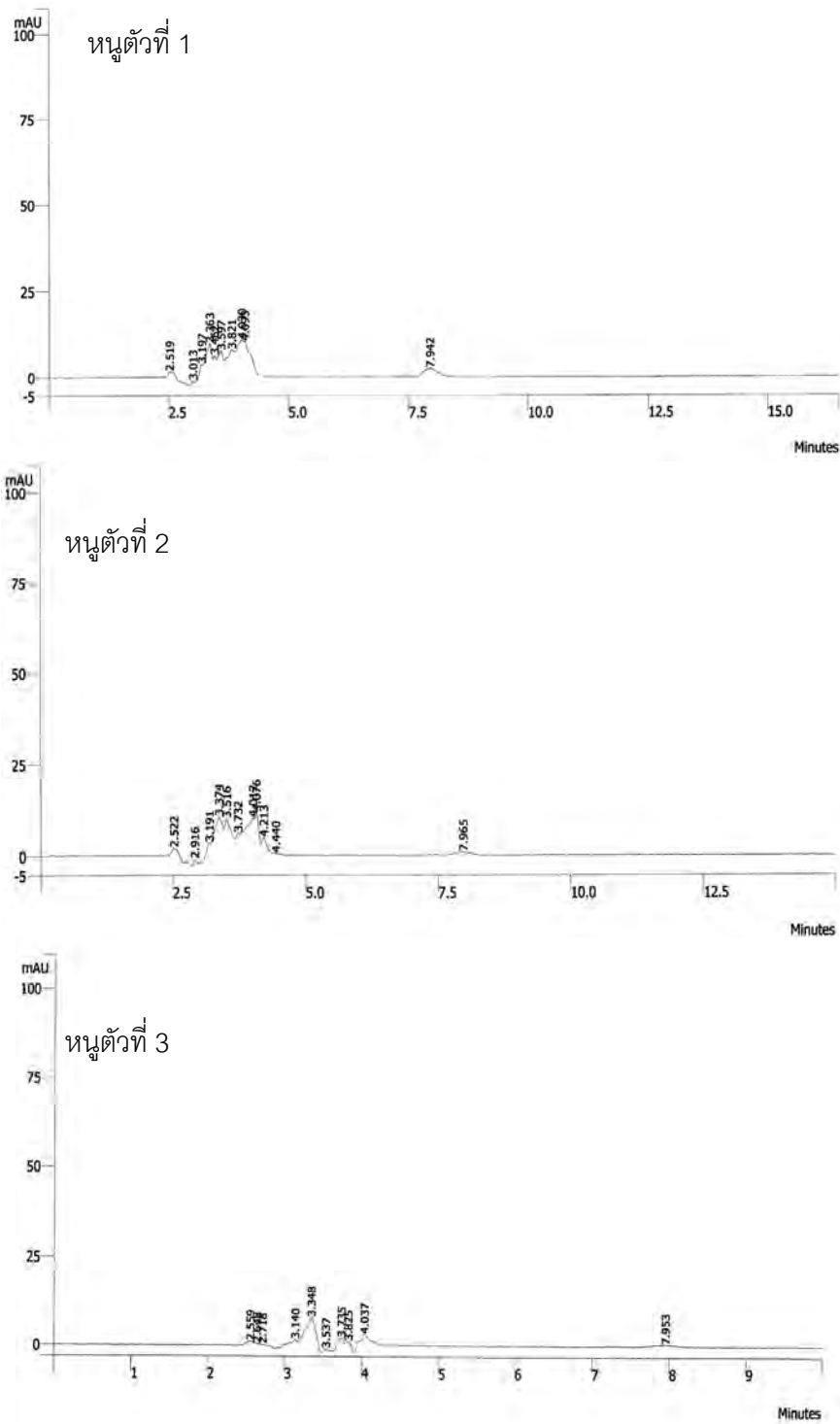
รูปที่ ๕.6 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนุ่หลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำไปปมเอนไซม์ β -glucuronidase



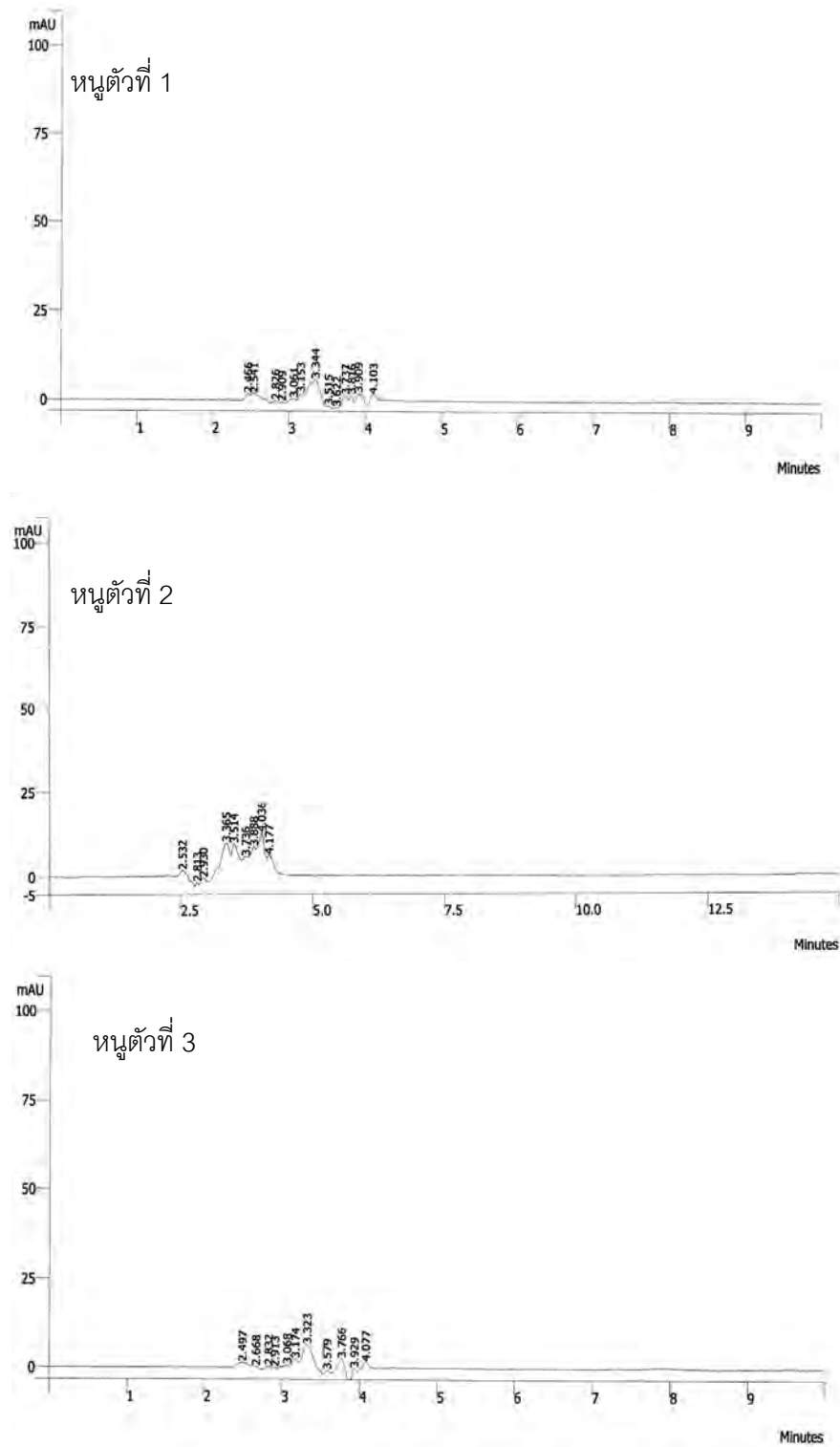
รูปที่ ๗.7 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนุ่หลังการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมินเป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปป่มเอนไซม์ β -glucuronidase



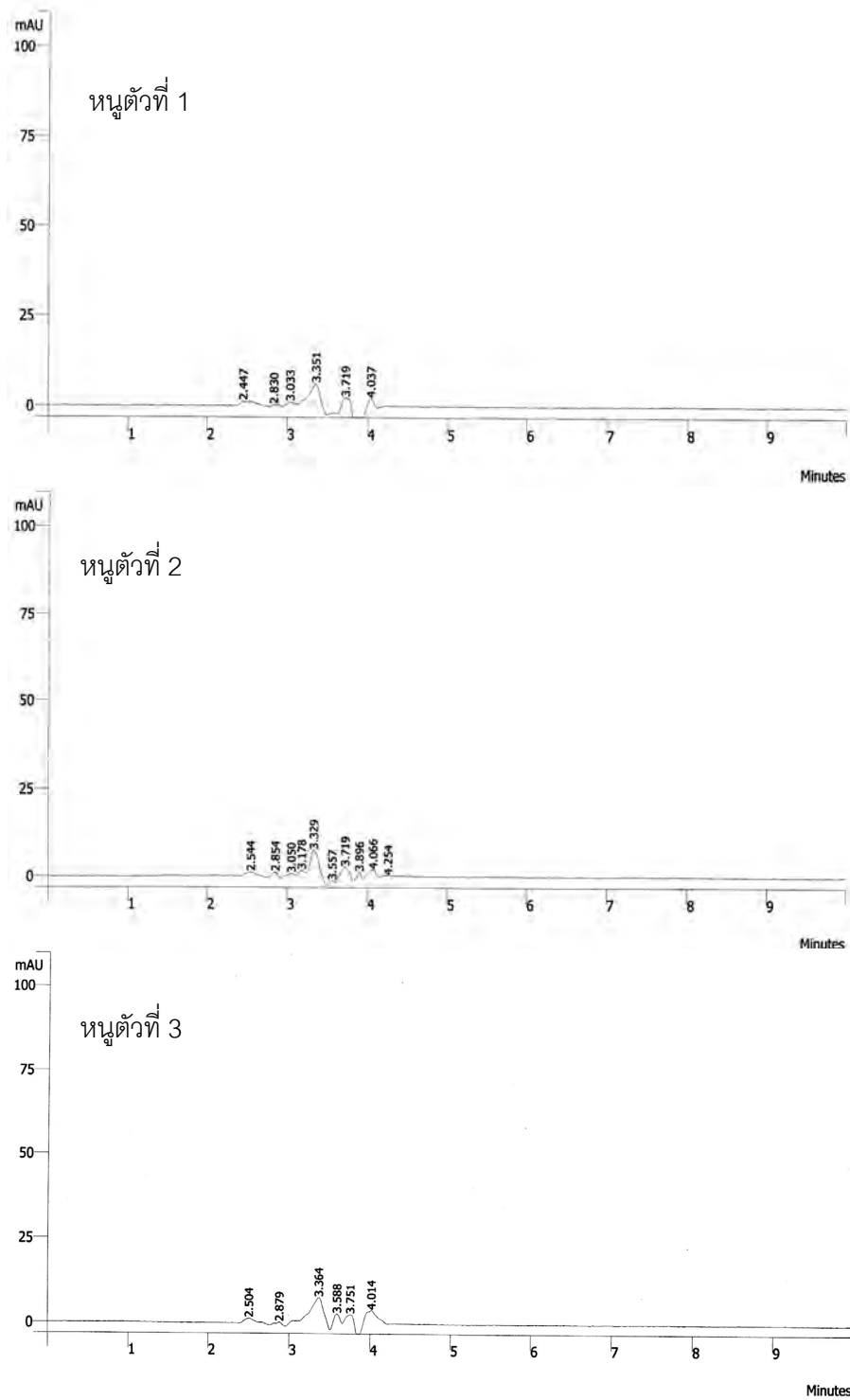
รูปที่ ๕.8 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase



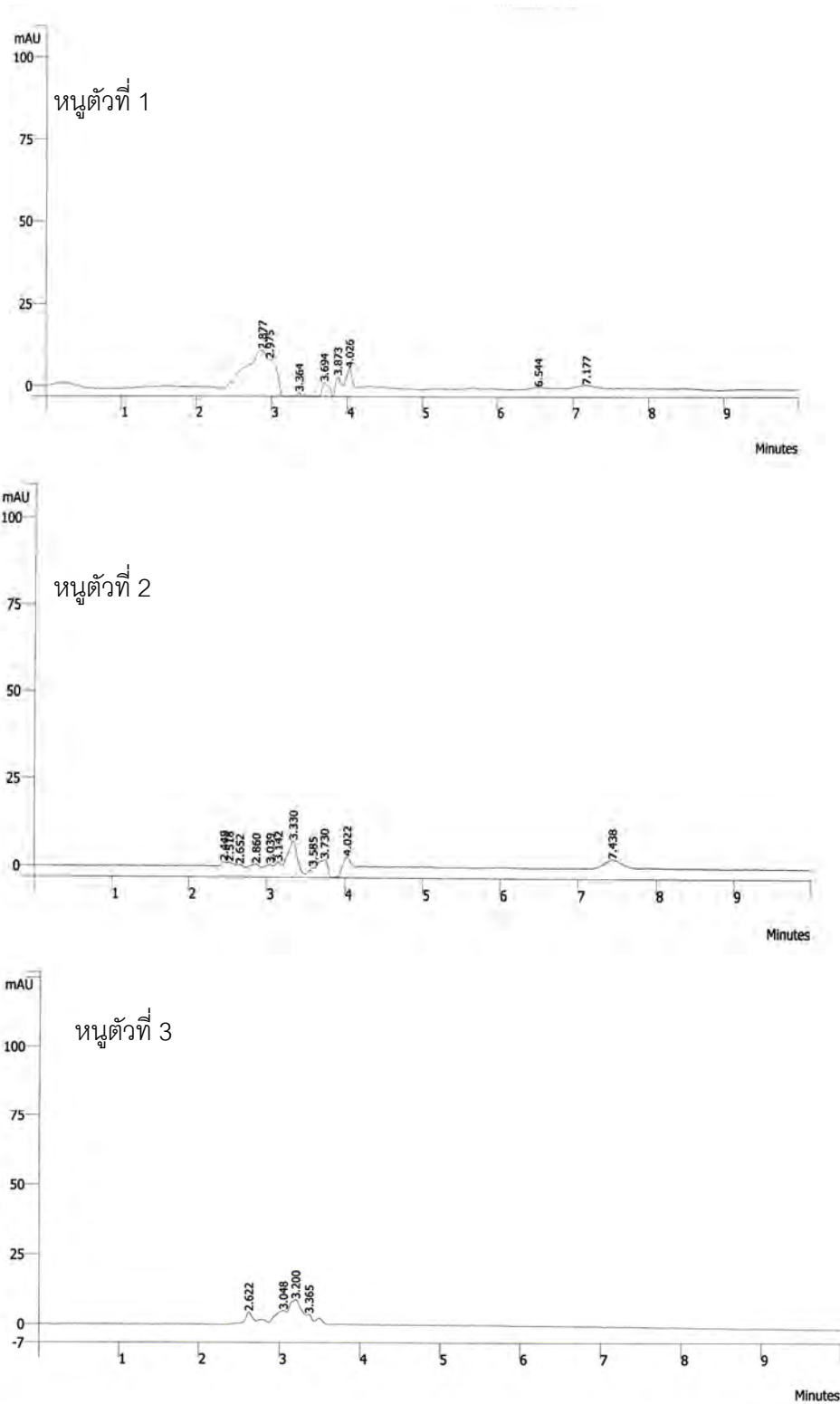
รูปที่ ๙.๙ แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนุหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปป้อนเอนไซม์ β -glucuronidase



รูปที่ ๕.10 แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนุ่หลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมินเป็นเวลา 14 วัน แล้วนำไปป๋มเอนไซม์ β -glucuronidase



รูปที่ ๑.๑๑ แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูดหลังจากการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำไปป้อนเมไซม์ β -glucuronidase



รูปที่ ๑๒ แสดงกราฟ HPLC ของเลือดหนูหลังการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำไปป้อนเมีไซม์ β -glucuronidase

ภาคผนวก ณ.

ผลการพิจารณาจริยธรรมสัตว์ทดลอง

การทดลองในสัตว์คณะผู้วิจัยได้ทำการขออนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ และปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัด สำเนาเอกสารอนุมัติแสดงในหน้า 139



No.429/2005

Study Protocol and Consent Form Approval

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand has approved the following study to be carried out according to the protocol and informed consent dated and/or amended as follows in compliance with the ICH/GCP.

Study Title : Effect of controlled release curcumin from gelatin hydrogel on tumor-angiogenesis using Hep-G2 implanted BALB/c-nude mice model

Study Code : -

Centre : Chulalongkorn University

Principle Investigator : Suthiluk Patumraj, Ph.d.

Protocol Date : 31 August 2005

Document Reviewed : -

.....
 (Professor Anek Aribarg, M.D.)
 Chairman of Ethics Committee

.....
 (Associate Professor. Vilai Chentanez, M.D.)
 Associate Dean for Research Affairs

Date of Approval : November 14, 2005

Approval Expire : November 14, 2007

* A list of the Ethics Committee members (names and positions) present at the Ethics Committee meeting on the date of approval of this study has been attached. This Study Protocol Approval Form will be forwarded to the Principal Investigator.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจุฑามาส รุจิสมนภา เกิดเมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2526 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนสตรีวัดมหาพฤฒาราม สำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2548 สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานที่นำเสนอ

- Rujisomnapa, J. , Tabata,Y. and Kanokpanont, S. Modification of gelatin with cholesterol for delivery of curcumin.The Sixth Asian BioCeramic Symposium 2006 (2006): 291-294 (Most outstanding poster presentation award)

- จุฑามาส รุจิสมนภา , Yasuhiko Tabata และ ไศรดา กนกพานนท์, การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอลเพื่อการนำส่งเคอร์คูมิน, The 5th National Conference on Biomedical Engineering 2007: 157-161