

การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของ
โพลอกซาเมอร์-ไมโคฟีโนลิกแอซิด คอนจูเกตส์

นางสาวสิริลักษณ์	จินดาพล	5436586233
นางสาวจุฑารัตน์	ศศิวิชรางกูร	5436516333



โครงการปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา การค้นพบและพัฒนา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

Synthesis and Characterization of Poloxamer-Mycophenolic Acid Conjugates

Miss Sirilak	Jindapol	5436586233
Miss Jutharat	Sasiwachirangkul	5436516333



A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement
for the Bachelor of Science Program in Pharmacy
Chulalongkorn University
2015

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

สาขาการค้นพบและพัฒนายา

หัวข้อโครงการปริญญาโท	การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของ โพลอกซาเมอร์-ไมโคฟีนอลิกแอซิด คอนจูเกตส์
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาวสิริลักษณ์ จินดาพล นางสาวจุฑารัตน์ ศศิวิรางกุล
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนายา / ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท	รองศาสตราจารย์ เกสัชกร ดร.พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	เกสัชกรหญิง ดร.จิตติมา ลัคนากุล

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คนบดี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพชร สกุลบำรุงศิลป์)

..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนายา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกร สุรพงษ์ เก่งทอง)

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(เกสัชกรหญิง ดร.จิตติมา ลัคนากุล)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

คำนำ

โครงการปริญญาโทที่ได้อ่านเรื่องสารสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของโพลอกซาเมอร์-ไมโคฟีนอลิกแอซิด คอนจูเกตส์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2558 โครงการวิจัยนี้มีแนวคิดจากการที่ยาไมโคฟีนอลิกแอซิดซึ่งมีค่าการละลายต่ำและมีผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาในขนาดที่สูง ทางผู้วิจัยจึงต้องการสังเคราะห์โพลอกซาเมอร์-ไมโคฟีนอลิกแอซิด คอนจูเกตส์ เพื่อเพิ่มค่าการละลาย โดยคาดหวังว่าจะมีชีวปริมาณการออกฤทธิ์ที่สูงขึ้น ส่งผลให้ผลข้างเคียงจากการใช้ยาในขนาดที่สูงลดลง

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าปริญญาโทฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจในการศึกษาหาข้อมูล และหากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้วิจัยต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย



คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

Abstract

Senior project title : Synthesis and Characterization of Poloxamer-Mycophenolic Acid Conjugates
Students' name : Miss Sirilak Jindapol 5436586233
 : Miss Jutharat Sasiwachirangkul 5436516333
Advisor/Co-advisor : Assoc. Prof. Dr. Pornchai Rojsitthisak and Dr. Jittima Luckanakul
Field/Department : Drug Discovery and Development/Pharmaceutical Chemistry

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressant, an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH). It is widely used to prevent the renal transplant rejection. However, poor bioavailability due to its low solubility (0.0355 mg/mL) and side effects are still the major drawbacks. To improve the oral bioavailability of MPA, a commercially available mycophenolate mofetil (MMF) was developed as a morpholinoethyl ester prodrug of MPA with 1-2 g daily dose. According to the high dose administration, MMF can also cause side effects such as gastrointestinal toxicity, thrombocytopenia, weakness, myalgia and anxiety. The objective of this study is to synthesize and characterize a poloxamer407 (P407)-MPA conjugate to improve water solubility of MPA. The P407-MPA conjugate can be synthesized via 4 steps. Firstly, the terminal hydroxyl group of P407 was converted to tosylate ester using tosyl chloride (TsCl) and triethylamine (Et₃N). Secondly, tosyl groups of P407 tosylate ester intermediates (P407-OTs) were displaced by primary amine group using ammonium hydroxide (25%V/V NH₄OH) to obtain P407-NH₂. Thirdly, MPA reacted with *N*-hydroxysuccinimide (NHS) to form MPA-NHS intermediate using 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) as a catalyst. Lastly, the reaction of P407-NH₂ and MPA-NHS resulted in the P407-MPA conjugate as a final product. All synthesized compounds were structurally elucidated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The percentage of MPA after acidic hydrolysis of the synthesized P407-MPA conjugate was found to be 4.3%w/w. The critical micelle concentration (CMC) of the P407-MPA conjugate measured by fluorescence spectroscopy was 1.778x10⁻³ mM. In conclusion, the P407-MPA conjugate was successfully synthesized and could be further evaluated on its physicochemical and biological properties as a novel immunosuppressant.

Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

Student's signature *Jutharat Sasiwachirangkul, Sirilak Jindapol*
Advisor's signature *Komolai K.*

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของโพลอกซาเมอร์-ไมโคฟีนอลิกแอซิด คอนจูเกตส์
 หัวหน้าโครงการ : นางสาวสิริลักษณ์ จินดาพล 5436586233
 ผู้ร่วมโครงการ : นางสาวจุฑารัตน์ ศศิวิรางกูร 5436516333
 อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ภก.ดร.พรชัย โรจนสีทิสักดิ์, ภญ.ดร.จิตติมา ลัคนากุล
 สาขา/ภาควิชา : การค้นพบและพัฒนา ยา / ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี

Mycophenolic acid (MPA) เป็นยากดภูมิคุ้มกันโดยกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ inosine monophosphate dehydrogenase (MPDH) MPA ถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันการต่อต้านในการปลูกถ่ายไต อย่างไรก็ตาม MPA มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ต่ำเนื่องจากละลายน้ำได้น้อย (0.0355 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีผลข้างเคียงที่เป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการนำไปใช้ ในปัจจุบัน ยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดคือ mycophenolate mofetil (MMF) ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นโดยเป็นอนุพันธ์ morpholinoethyl ester prodrug ของ MPA เพื่อเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของ MPA โดยมีขนาดการใช้ 1-2 กรัมต่อวัน แต่เนื่องด้วยขนาดยาของ MMF ที่สูง จึงสามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น ความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ อ่อนแรง ปวดกล้ามเนื้อ และอาการวิตกกังวล ในงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของ poloxamer407 (P407)-MPA conjugate เพื่อเพิ่มการละลายในน้ำของ MPA การสังเคราะห์ P407-MPA conjugate ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเริ่มจากการเปลี่ยนแปลงหมู่ hydroxyl ที่ปลายของ P407 เป็นหมู่ tosylate ester โดยใช้ tosyl chloride (TsCl) และ triethylamine (Et₃N) ขั้นตอนที่สอง หมู่ tosyl ของสารมัธยันต์ P407 tosylate ester (P407-OTs) ถูกแทนที่ด้วยหมู่ primary amine โดยใช้ ammonium hydroxide (25% V/V NH₄OH) ได้ P407-NH₂ ขั้นตอนที่สาม MPA ทำปฏิกิริยากับ N-hydroxysuccinimide (NHS) เกิดเป็นสารมัธยันต์ MPA-NHS โดยใช้ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ขั้นตอนที่สุดท้าย นำ P407-NH₂ และ MPA-NHS มาทำปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย P407-MPA conjugate สารสังเคราะห์ทุกตัวถูกตรวจสอบโครงสร้างด้วย nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy ทั้งนี้ ร้อยละของ MPA ที่ตรวจพบหลังจากการไฮโดรไลซ์ P407-MPA conjugate ที่สังเคราะห์ขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด เท่ากับ 4.3%w/w ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ก่อให้เกิด micelle (critical micelle concentration, CMC) ของ P407-MPA conjugate ซึ่งวัดด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy เท่ากับ 1.778×10^{-3} mM โดยสรุป ในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ P407-MPA conjugate และสารที่สังเคราะห์ได้สามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป เพื่อพัฒนาเป็นยากดภูมิคุ้มกันตัวใหม่

คณะเภสัชศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่อนิสิต จุฑารัตน์ ศศิวิรางกูร, สิริลักษณ์ จินดาพล
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ณ โรจนสีทิสักดิ์

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เกษีชร ดร.พรชัย โรจนสีหิศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท และ เกษีชรหญิง ดร.จิตติมา ลีคนากุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษีชร ดร.เฉลิมเกียรติ สงคราม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และนายวิวัฒน์ ศุภเสนา นิสิตปริญญาเอก หลักสูตรเทคโนโลยีเกษตรกรรม (นานาชาติ) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำโครงการปริญญาโทนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและสนับสนุนคณาจารย์ในการทำโครงการปริญญาโทนี้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์ ภาษาอังกฤษ	ข
บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์ ภาษาไทย	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญแผนภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 สิ่งที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม	3
2.1 การปฏิเสธรการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ	3
2.2 Mycophenolic Acid	4
2.3 Poloxamers	7
2.4 การพัฒนาคุณสมบัติยาโดย polymer drug conjugation	8
2.5 Polymeric micelle	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	10
3.1 สารเคมีที่ใช้	10
3.2 เครื่องมือ	10
3.3 วิธีการสังเคราะห์ poloxamer-mycophenolic acid conjugates	11
3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ MPA ที่ conjugate บน poloxamer	12
3.5 การวัดค่า critical micelle concentration (CMC)	14
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย	15
4.1 การสังเคราะห์ poloxamer- mycophenolic acid conjugates	15
4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ MPA ที่ conjugate บน poloxamer	27
4.3 การหาค่า critical micelle concentration (CMC)	28
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	29
บรรณานุกรม	30

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

สารบัญญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ mycophenolic acid (MPA), mycophenolate mofetil และ mycophenolate Sodium	5
รูปที่ 2 การสังเคราะห์ purine ผ่าน de novo pathway	6
รูปที่ 3 แผนผังแสดงการสังเคราะห์ purine ผ่าน de novo pathway และ salvage pathway	7
รูปที่ 4 โครงสร้าง poloxamers	7
รูปที่ 5 พันธะระหว่างยาและโพลีเมอร์	8
รูปที่ 6 การเกิด polymeric micelle	9
รูปที่ 7 ^1H NMR in CDCl_3 ของ poloxamer 407	19
รูปที่ 8 ^1H NMR in CDCl_3 ของ mycophenolic acid	20
รูปที่ 9 ^1H NMR in CDCl_3 ของ tosyl chloride	21
รูปที่ 10 ^1H NMR in CDCl_3 ของ poloxamer 407-tosylate ester	22
รูปที่ 11 ^1H NMR in CDCl_3 ของ poloxamer 407-NH ₂	23
รูปที่ 12 ^1H NMR in DMSO-d_6 ของ <i>N</i> -hydroxysuccinimide	24
รูปที่ 13 ^1H NMR in CDCl_3 ของ mycophenolic acid- <i>N</i> -hydroxysuccinimide	25
รูปที่ 14 ^1H NMR in CDCl_3 ของ poloxamer 407-mycophenolic acid conjugate	26
รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมาตรฐานของ mycophenolic acid และพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC	27
รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ poloxamer 407- mycophenolic acid conjugate และอัตราส่วนของ intensity ที่ ความยาวคลื่น 372/384 นาโนเมตร	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 chromatographic conditions ของการวิเคราะห์หาปริมาณยา mycophenolic acid ใน acid hydrolysis	13
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมได้จาก stock solution ของ poloxamer 407-mycophenolic acid conjugate และ pyrene	14



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญแผนภาพ

	หน้า
แผนภาพที่ 1 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ poloxamer 407-tosylate ester	17
แผนภาพที่ 2 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ poloxamer 407-NH ₂	17
แผนภาพที่ 3 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ mycophenolic acid- N-hydroxysuccinimide	18
แผนภาพที่ 4 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ poloxamer 407-mycophenolic acid conjugates	18



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไมโคฟีนอลิกแอซิด (mycophenolic acid, MPA) เป็นยากดภูมิคุ้มกันที่ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) MPA ถูกใช้เพื่อป้องกันการต่อต้านการปลูกถ่ายไต อย่างไรก็ตาม MPA มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ต่ำเนื่องจากละลายน้ำได้น้อย^[1] (0.0355 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร^[2]) และมีผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากขนาดยาที่สูง ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการนำไปใช้ ปัจจุบัน ยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดคือ mycophenolate mofetil (MMF) ซึ่งเป็น ester prodrug ของ MPA^[1] สามารถเกิดไฮโดรไลซิสในร่างกายได้เป็น MPA อย่างรวดเร็ว โดยอยู่ในรูปแบบยาแคปซูล ยาเม็ด ยาน้ำแขวนตะกอน และยาฉีด ของ MMF และ MMF hydrochloride มีขนาดการใช้ 1-2 กรัมต่อวัน^[3] แต่เนื่องด้วยขนาดยาของ MMF ที่สูง จึงสามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่างๆ เช่น ความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ อ่อนแรง ปวดกล้ามเนื้อ และอาการวิตกกังวล^[4]

ทั้งนี้การพัฒนาคุณสมบัติของ MPA มีหลายวิธี เช่น prodrug, nanocarrier technology และ polymer-drug conjugates ซึ่ง polymer-drug conjugates นี้สามารถพัฒนาคุณสมบัติของยาและให้ประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่ การพัฒนาค่าการละลายของยาที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กเมื่อนำมาคอนจูเกตกับโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของชีวปริมาณออกฤทธิ์ในยาที่มีค่าการละลายต่ำ^[5-6] และยังสามารถพัฒนาการปลดปล่อยยาแบบ controlled release ได้ ช่วยควบคุมการผันผวนของระดับยาในเลือด และลดความถี่ในการให้ยา ลดการเกิดผลข้างเคียงจากระดับยาที่สูงเกินไป และลดปัญหา ระดับยาที่ต่ำซึ่งไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ นอกจากนี้ polymer-drug conjugates ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ และการกระจายตัวของยาอีกด้วย ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากต่อยาที่มีค่าครึ่งชีวิตในร่างกายสั้น^[7] เนื่องจากถูกเมทาบอลิซึม หรือถูกขจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว หรือยาที่ก่อให้เกิดพิษต่ออวัยวะอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายในการรักษา เช่น ยารักษาโรคมะเร็ง เป็นต้น

โพลิเมอร์ที่ใช้ใน polymer-drug conjugates มีหลายชนิด เช่น poly(ethylene glycol) (PEG), N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) และ poloxamers เป็นต้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับเปลี่ยนคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาต่างๆ เช่น doxorubicin, 5-fluorouracil และยาที่เป็นเปปไทด์ เช่น oxytocin เป็นต้น^[8-11] สำหรับ poloxamers เป็น non-ionic copolymer ที่มีโครงสร้างเป็น triblock copolymers ที่ประกอบด้วย poly(ethylene oxide) (PEO) และ poly(propylene oxide) (PPO)^[12] มีการใช้อย่างแพร่หลายในทางเภสัชกรรม โดยทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว สารก่ออิมัลชัน สารช่วยเพิ่มการละลาย สารช่วยกระจายตัว และสารเพิ่มการดูดซึม ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของ poloxamer-MPA conjugate เพื่อเพิ่มการละลายในน้ำของ MPA

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของ poloxamer407 (P407)-MPA conjugates

1.3 สิ่งที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เรียนรู้กระบวนการสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของยา
2. ได้เรียนรู้แนวทางในการพัฒนาคุณสมบัติของยาในเรื่องการละลาย โดยเทคนิค polymer-drug conjugation



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 การปฏิเสธการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ

การเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ (organ transplantation) เป็นการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะจากที่หนึ่งไปอีกที่หนึ่ง ซึ่งมักจะใช้ในการแก้ปัญหาเรื่องอวัยวะเดิมไม่สามารถปฏิบัติงานได้ตามปกติ การเปลี่ยนถ่ายอวัยวะที่พบได้บ่อยคือ การเปลี่ยนถ่ายไต (kidney transplantation)^[13] แต่ทั้งนี้การเปลี่ยนถ่ายอวัยวะต้องคำนึงถึงความเข้ากันได้ของอวัยวะนั้นๆกับร่างกายผู้ป่วยด้วย เนื่องจากร่างกายจะมีระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งคอยกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย ในกรณีการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะนี้ อวัยวะที่ถูกเปลี่ยนเข้าไปใหม่อาจถูกร่างกายมองว่าเป็นสิ่งแปลกปลอม ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน^[14] จึงทำให้เกิดผลเสียต่างๆตามมาได้ หรือเรียกว่าร่างกายเกิดการปฏิเสธการปลูกถ่ายอวัยวะ (reject organ transplantation)

การปฏิเสธการปลูกถ่ายอวัยวะของร่างกายที่พบได้ส่วนมาก ส่วนใหญ่เกิดจาก การเปลี่ยนถ่ายอวัยวะระหว่างสมาชิกในสปีชีส์เดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งระดับความรุนแรงในการเกิดการปฏิเสธจะขึ้นอยู่กับความเหมือนและความเข้ากันได้ของผู้ให้ และผู้รับอวัยวะ และยังขึ้นกับอวัยวะที่ได้รับการปลูกถ่าย โดยการปลูกถ่ายหัวใจ ตับ และไต ต่างก็เป็นอวัยวะที่มีเลือดมาหล่อเลี้ยงมาก จึงมีโอกาสเกิดการปฏิเสธที่รุนแรงกว่าการปลูกถ่ายผิวหนัง ตา เป็นต้น^[15]

กลไกการปฏิเสธการปลูกถ่ายอวัยวะของร่างกายเกิดจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในการปลูกถ่ายอวัยวะเกิดขึ้นทั้งใน cellular mediated (lymphocyte mediated) และ humoral (antibody) mechanism และยังเกี่ยวข้องกับเซลล์อื่น แต่ T-cells เป็นเซลล์สำคัญในการเกิดการปฏิเสธการปลูกถ่ายอวัยวะ^[16] ทั้งนี้ ยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้ป้องกันการปลูกถ่ายอวัยวะในปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้^[17]

1. ยาในกลุ่ม glucocorticoids

ยาในกลุ่ม glucocorticoids ใช้ยับยั้งการผลิต cytokines และ vasoactive substances รวมไปถึง interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, tumor necrosis factor- α , chemokines, prostaglandins, major histocompatibility class II และ proteases โดย corticosteroids จะทำหน้าที่เป็น agonist ต่อ glucocorticoid receptors แต่เมื่อใช้ที่ขนาดสูงๆ จะให้ผลเป็น receptor-independent effect

2. ยาในกลุ่ม small-molecules

ยาในกลุ่ม small-molecules นั้นนิยมใช้ในการป้องกันการปฏิเสธจากการปลูกถ่ายอวัยวะ ซึ่งยาแต่ละชนิดมีข้อดี ข้อเสีย และผลข้างเคียงแตกต่างกันออกไป โดยยาในกลุ่มนี้แบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้แก่ immunophilin binding drugs เช่น cyclosporine, tacrolimus กลุ่ม pyrimidine synthesis (DHODH) inhibitors เช่น leflunomide, azathioprine กลุ่ม purine synthesis (IMPH) inhibitors เช่น mycophenolate mofetil, mycophenolate sodium เป็นต้น

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

3. ยากลุ่ม protein

ยาในกลุ่ม protein แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยๆ ได้แก่ กลุ่ม depleting antibodies (against T cells, B cells หรือทั้งคู่) เช่น horse or rabbit antithymocyte globulin, murominab-CD3, alemtuzumab และกลุ่ม nondepleting antibodies and fusion proteins เช่น basiliximab, belatacept เป็นต้น

4. ยากลุ่ม complement component 5 (C5) inhibitors

ยาในกลุ่ม C5 inhibitors เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง complement component 5 ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ Eculizumab

5. ยากลุ่ม protease inhibitors

ยาในกลุ่ม protease inhibitors เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ protease ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ Bortezomib

2.2 Mycophenolic Acid

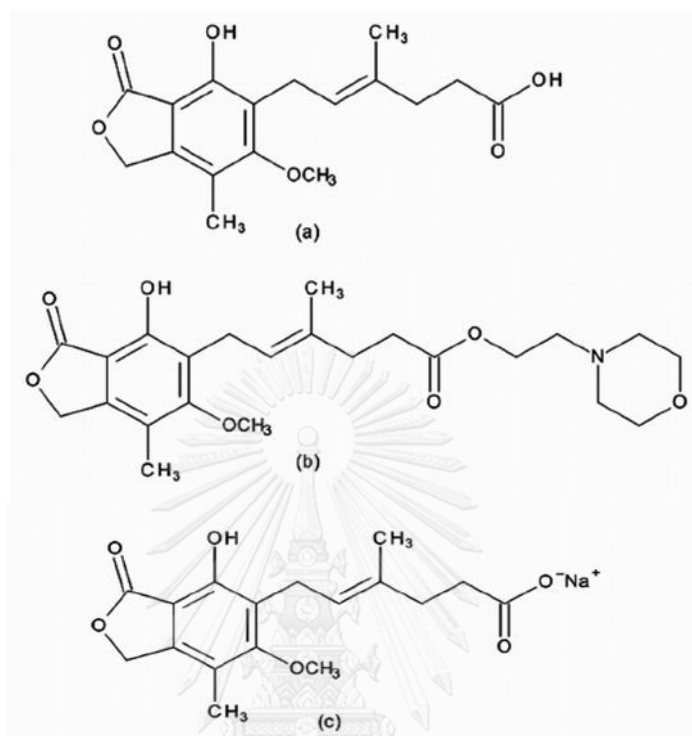
mycophenolic acid (MPA) เป็นยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการป้องกันการปฏิเสธของร่างกายในการปลูกถ่ายอวัยวะใหม่ โดยไปยับยั้งเอนไซม์ inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ purine โดย IMPDH เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน inosine monophosphate (IMP) เป็น guanosine monophosphate (GMP) ในปัจจุบันนี้มีผลิตภัณฑ์ของ MPA ออกมาในรูปแบบ ester prodrug เพื่อเพิ่มค่าชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (bioavailability) ชื่อ mycophenolate mofetil (MMF) ภายใต้ชื่อการค้าคือ CellCept[®] และในรูปแบบเกลือโซเดียม ชื่อ mycophenolate sodium ภายใต้ชื่อการค้าคือ Myfortic[®] ซึ่งเป็น delay-release tablets สำหรับโครงสร้างของ MPA, MMF และ mycophenolate sodium ได้แสดงดังรูปที่ 1^[18]

2.2.1 โครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ MPA

MPA เป็นกรดอินทรีย์อ่อน มีโครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วยวง benzene ที่มีการแทนที่ทั้ง 6 ตำแหน่ง และอยู่ติดกับวง lactone มีหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ดังนี้ hydroxyl, methoxyl, methyl และ alkyl side chain บนวง benzene มีพันธะคู่ที่มีการเรียงตัวแบบทรานส์ และมีหมู่คาร์บอกซิลิกอิสระอยู่ในโมเลกุล^[19] คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ MPA พบว่า MPA มีจุดหลอมเหลว คือ 141 °C ค่า log P ประมาณ 2.8^[20] และค่าการละลายน้ำที่ต่ำ ประมาณ 0.0355 mg/ml

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ (a) mycophenolic acid (MPA), (b) mycophenolate mofetil (2-morpholinoethyl ester prodrug of MPA, MMF) และ (c) mycophenolate sodium

2.2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา

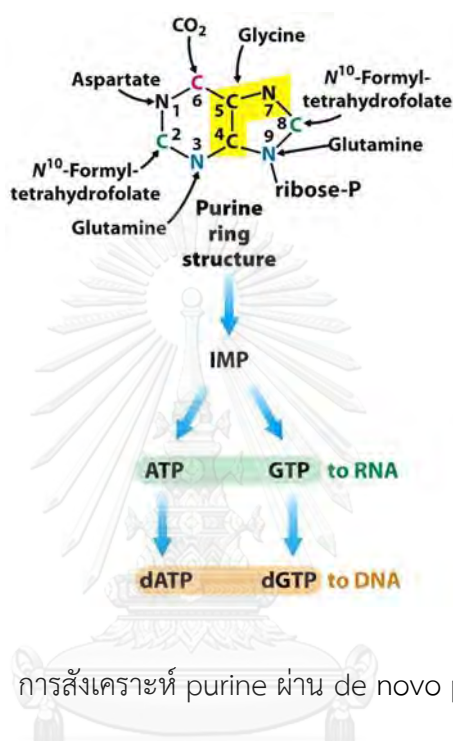
MPA จัดเป็นยาในกลุ่มกดภูมิคุ้มกันที่ยับยั้งเอนไซม์ inosine monophosphate dehydrogenase (IMP) แบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibitor) โดยเอนไซม์นี้มีความสำคัญในการสังเคราะห์ purine ซึ่ง purine จัดเป็นสารสำคัญในการสังเคราะห์ RNA และ DNA กลไกการสังเคราะห์พิวรีน แบ่งออกได้เป็น 2 pathways คือ de novo และ salvage pathways

De novo pathway การสังเคราะห์ purine ใน pathway นี้เริ่มจาก ribose-5-phosphate ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จาก pentose phosphate pathway ถูกเติมหมู่ pyrophosphate เข้าที่คาร์บอนตำแหน่งที่หนึ่ง จาก phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) และ adenosine triphosphate (ATP) จากนั้นมีการเติมอะตอมไนโตรเจนจาก glutamine ให้แก่ PRPP ได้เป็น phosphoribosylamine โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ amidophosphoribosyl transferase และได้มีการเติมอะตอมจากสารตั้งต้นต่างๆจนกระทั่งได้วงแหวน 5 เหลี่ยม ขั้นตอนต่อมาคือการได้มาซึ่ง

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

สารมัธยันต์ Inosine-5-monophosphate (IMP) โดยการเติมไนโตรเจนจาก aspartate และเติมคาร์บอนอีกหนึ่งอะตอมจาก N^{10} -formyl-tetrahydrofolate แล้วเกิดการขดม้วนเป็น 6 เหลี่ยม ซึ่ง IMP จะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ adenosine monophosphate (AMP) และ guanosine monophosphate (GMP) ต่อไป^[21] ดังแสดงในรูปที่ 2^[22] และ 3^[23]

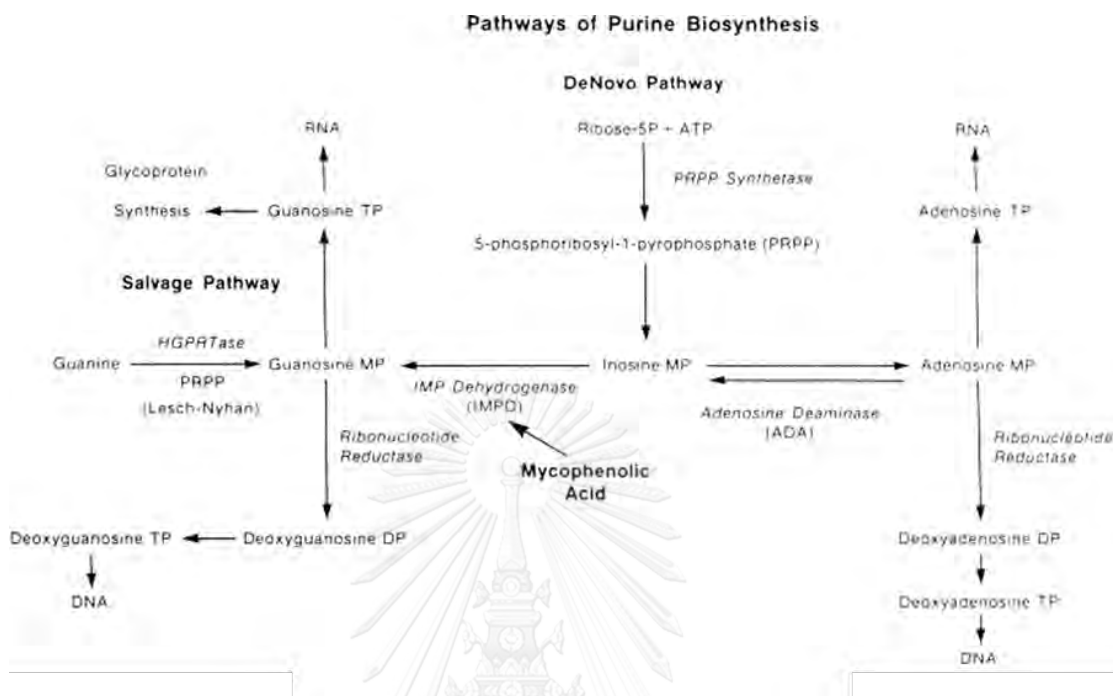


รูปที่ 2 การสังเคราะห์ purine ผ่าน de novo pathway

Savage pathway เป็นการนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย nucleotide คือ nucleoside และ เบส กลับมาสร้างเป็น purine nucleotide ใหม่ ซึ่งเกิดขึ้นน้อยกว่า de novo pathway^[21] จากรูปที่ 3 เห็นว่า MPA ไปยับยั้งการเปลี่ยน inosine-5-phosphate เป็น guanosine-5-phosphate และส่งผลให้การเพิ่มจำนวนของ T cell และ B cell ถูกยับยั้ง ก่อให้เกิดผลดีต่อการยับยั้งการปฏิเสธการปลูกถ่ายอวัยวะของร่างกาย

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

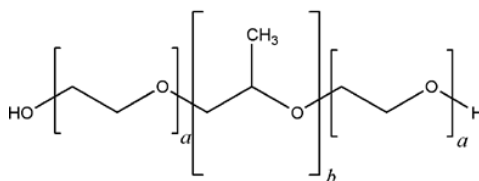
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



รูปที่ 3 แผนผังแสดงการสังเคราะห์พิวรีนผ่าน de novo pathway และ salvage pathway

2.3 Poloxamers

poloxamers เป็น non-ionic copolymer ซึ่งถูกใช้อย่างแพร่หลายในทางเภสัชกรรม โดยทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว สารก่ออิมัลชัน สารช่วยเพิ่มการละลาย สารช่วยกระจายตัว และสารเพิ่มการดูดซึม poloxamers มีโครงสร้างเป็น triblock copolymers ที่ประกอบด้วย poly(ethylene oxide) (PEO) และ poly(propylene oxide) (PPO)^[24] (รูปที่ 4) โดยในแต่ละชนิดของ poloxamers จะมีสูตรโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันที่มวลโมเลกุลและจำนวนของ PEO block (a) และ PPO block (b) โดยชนิดที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายคือ poloxamer 188 (a=80, b=27) และ poloxamer 407 (a=101, b=56)^[25]



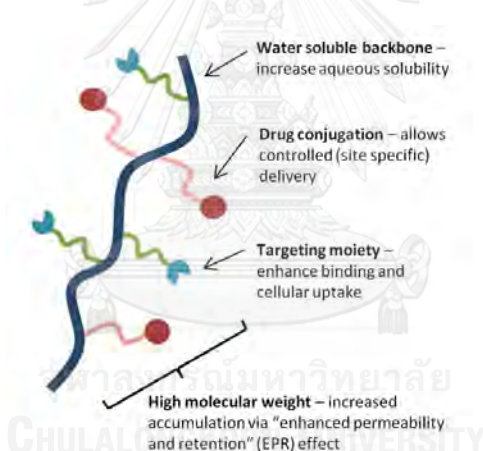
รูปที่ 4 โครงสร้าง poloxamers^[24]

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

2.4 การพัฒนาคุณสมบัติยาโดย polymer drug conjugation

polymer-drug conjugates เป็นหนึ่งในประเภทของระบบนำส่งยา (drug delivery system) ซึ่งยาที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กหรือขนาดใหญ่ เช่น เปปไทด์ โพรตีน growth factors ฮอร์โมน เอนไซม์ เป็นต้น จะเชื่อมต่อกับโพลิเมอร์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ที่บริเวณแกนหลักของโครงสร้าง การเชื่อมต่อโมเลกุลยาหรือ bioactive compound กับโพลิเมอร์ได้นั้นเป็นประโยชน์อย่างมากในด้านการนำไปใช้ ไม่เพียงแต่ในด้านการรักษาด้วยยา ยังรวมไปถึงวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ไบโอเซนเซอร์ (biosensor) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอื่นๆ^[7]

หลักการในการใช้ประโยชน์จากโพลิเมอร์ได้มีการศึกษามานานหลายทศวรรษ ในปี ค.ศ. 1975 โมเดลต้นแบบทางเภสัชวิทยาของโพลิเมอร์ได้ถูกตั้งขึ้นโดย Helmut Ringsdorf โดยมีหลักการคือ การสร้างพันธะโคเวเลนต์เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลยาและสายโพลิเมอร์ แสดงดังในรูปที่ 5 สายโพลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเข้ากันได้กับร่างกายสิ่งมีชีวิตจะเชื่อมต่อกับองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ (1) solubilizer เพื่อสร้างส่วนที่ชอบน้ำให้แก่สายโพลิเมอร์ เพื่อให้มันใจได้ว่าจะสามารถละลายน้ำได้ (2) ยา ซึ่งเชื่อมต่อผ่าน linker และ (3) targeting moiety เพื่อให้เกิดการนำส่งยาที่จำเพาะต่อบริเวณที่ต้องการ



รูปที่ 5 องค์ประกอบของ polymer-drug conjugates^[7]

จุดประสงค์หลักของโมเดลนี้คือ การนำส่งสารออกฤทธิ์ไปยังบริเวณที่ต้องการอย่างจำเพาะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดความเป็นพิษ โดย polymer-drug conjugates เหล่านี้พัฒนาคุณสมบัติและให้ประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่ การพัฒนาค่าการละลายของยาที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กเมื่อนำมาคอนจูเกตกับโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของชีวปริมาณออกฤทธิ์ในยาที่มีค่าการละลายต่ำ และยังสามารถพัฒนาการปลดปล่อยยาแบบ controlled release ได้ ช่วยควบคุมการผันผวนของระดับยาในเลือดที่อยู่ในระดับที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเกิดจากการให้ยาซ้ำ ทำให้สามารถกำหนดความถี่ในการให้ยาและระยะเวลาในการให้ยาได้อย่างเหมาะสม ลดการเกิดผลข้างเคียง และลดปัญหาาระดับยาไม่เพียงพอต่อการ

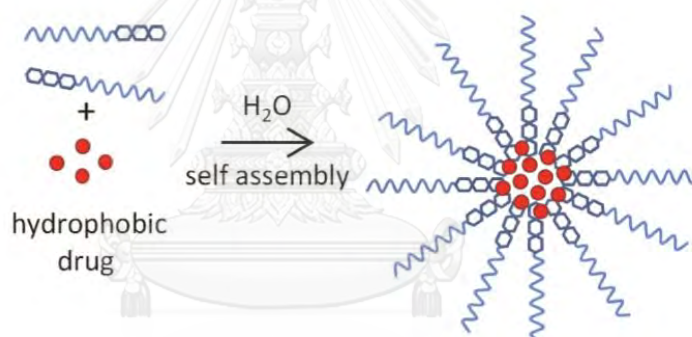
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

ออกฤทธิ์ นอกจากนี้ polymer–drug conjugates ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ และการกระจายตัวของยาอีกด้วย ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากต่อยาที่มีค่าครึ่งชีวิตในร่างกายสั้น เนื่องจากถูกเมแทบอลิซึม หรือถูกขจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว หรือยาที่ก่อให้เกิดพิษต่ออวัยวะอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายในการรักษา เช่น ยารักษาโรคมะเร็ง เป็นต้น^[7]

2.5 Polymeric micelle

ไมเซลล์จัดเป็นอนุภาคคอลลอยด์ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 5-150 nm โดยเกิดจากการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวและโมเลกุลที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ โดยการเกิดไมเซลล์จะเกิดขึ้นได้เมื่อเกิดกระบวนการทางเทอร์โมไดนามิกผลักดันให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำเรียงตัวอยู่ภายในแล้วล้อมรอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ ซึ่งจะเกิดขึ้นที่จุดที่มีความเข้มข้นสูงกว่า critical micelle concentration (CMC) polymeric micelle ที่เกิดขึ้นนั้นมักเกิดจาก block-copolymers ที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โดยมีการจัดเรียงตัวที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่เป็นจุดศูนย์กลางและล้อมรอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 การเกิด Polymeric micelle^[7]

โดยแต่ละหน่วยของไมเซลล์ที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับชนิดของโพลิเมอร์ เช่น diblock polymer, triblock polymer เป็นต้น โดยประโยชน์หลักของ polymeric micelle เมื่อเทียบกับสารก่อไมเซลล์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กคือมีความคงตัวเพิ่มขึ้น polymeric micelle ส่วนใหญ่มีค่า CMC อยู่ในช่วง 10^{-6} - 10^{-7} M ในทางทฤษฎีนั้น polymeric micelle จะสามารถบรรจุยาได้ในปริมาณสูง ให้การปลดปล่อยแบบ controlled release มีความเข้ากันได้กับร่างกายสิ่งมีชีวิต และมีความคงตัว ในด้านคุณสมบัติทางเคมี ภายภานั้นจะสัมพันธ์กับชนิดและความยาวของทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของโพลิเมอร์^[7]

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้

1. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (Merck Millipore, Germany)
2. 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) (Sigma-Aldrich, USA)
3. 4-Toluenesulfonyl chloride (TsCl) (Sigma-Aldrich, USA) MW 190.65
4. Acetone (Merck Millipore, Germany)
5. Acetonitrile (Merck Millipore, Germany)
6. Acetonitrile (HPLC grade, Thomas Baker, India)
7. Ammonium solution 25%V/V (Merck Millipore, Germany)
8. Anhydrous Na₂SO₄ (Merck Millipore, Germany)
9. Dichloromethane (RCI Labscan, Thailand)
10. Diethyl ether (RCI Labscan, Thailand)
11. Ethyl acetate (Sigma-Aldrich, USA)
12. Glacial acetic acid (Sigma-Aldrich, USA)
13. Hydrochloric acid 37%V/V (Merck Millipore, Germany)
14. Mycophenolic acid (MPA) (AK Scientific, Inc., USA) MW 320.34
15. N-Hydroxysuccinimide (NHS) MW 115.09
16. Nitrogen gas 99.99%
17. Poloxamer 407 (BASF, Germany) MW 12154
18. Pyrene (Acros, USA)
19. Sodium chloride saturated solution
20. Toluene (Merck Millipore, Germany)
21. Triethylamine (Et₃N) (Thomas Scientific, USA) MW 101.19
22. Ultra-purified water

3.2 เครื่องมือ

1. เครื่อง High-performance liquid chromatography (Ultimate3000 Dionex)
2. เครื่อง Spectrofluorometer (JASCO FP-8200)
3. เครื่อง Nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker Fourier 300)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

3.3 วิธีการสังเคราะห์ poloxamer-mycophenolic acid conjugates

3.3.1 การสังเคราะห์ poloxamer-tosylate ester (P407-OTs)

ชั่ง P407 1215.40 mg (0.050 mmol) ใน round bottom flask ขนาด 100 mL เติม dried toluene แล้วนำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ใส่ magnetic bar และเติมแก๊สไนโตรเจนลงไปแทนที่อากาศใน flask แล้วเปิดด้วยจุกยาง ต่อลูกโป่งที่มีแก๊สไนโตรเจนเข้ากับ flask โดยใช้หัวเข็มปักผ่านจุกยาง ใช้หลอดฉีดดูด dried dichloromethane ขึ้นมา 5 mL แล้วค่อยๆเติมลงใน flask เติม ปั่นผสมบน magnetic stirrer ชั่ง TsCl 571.95 mg (0.150 mmol) ใน flask ขนาด 25 mL อีกใบและเติม dried dichloromethane 5 mL ดูดสารละลาย TsCl เติมลงใน flask ที่มีสารละลาย P407 อยู่ เตรียมสารละลาย Et₃N ในอีกภาชนะหนึ่ง โดยปิเปต Et₃N 510 μ L (0.250 mmol) ลงใส่ใน flask ขนาด 25 mL และเติม dried dichloromethane 5 mL ดูดสารละลาย Et₃N ขึ้นมาแล้วเติมลงใน flask ที่มีสารผสมระหว่าง P407 และ TsCl ปั่นผสมสารทั้งหมดบน magnetic stirrer เป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองหมายเลข 1 นำ filtrate ที่ได้ไปล้างด้วยสารละลายอิ่มตัว NaCl 2 ครั้ง ครั้งละ 100 mL กำจัดน้ำออกจากชั้น dichloromethane ด้วย anhydrous Na₂SO₄ แล้วระเหย dichloromethane ออกจากโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 3-4 mL เติม diethyl ether ประมาณ 100 mL ลงใน flask จากนั้น ถ่ายของผสมลงใน conical tube แล้วนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที เก็บตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งใน vacuum oven ซึ่งตะกอนได้ประมาณ 293 mg คิดเป็น 47% yield แบ่งตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย NMR โดยใช้ CDCl₃ เป็นตัวทำละลาย

3.3.2 การสังเคราะห์ poloxamer-NH₂

ชั่ง P407-OTs 623.12 mg (0.025 mmol) ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 125 mL ละลายด้วย acetonitrile 30 mL จากนั้นเติมสารละลาย 25% NH₄OH 30 mL (0.25 mmol) ปั่นผสมด้วย magnetic stirrer นาน 24 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลาย acetonitrile และ ammonia ที่เหลืออยู่ด้วย rotary evaporator ที่ 60°C นำสารละลายที่ได้ไปสกัดด้วย dichloromethane 3 ครั้ง ครั้งละ 100 mL นำชั้น dichloromethane มากำจัดน้ำออกด้วย anhydrous Na₂SO₄ และระเหย dichloromethane ออกด้วย rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 3-4 mL เติม diethyl ether ประมาณ 100 mL ลงใน flask จากนั้น ถ่ายของผสมลงใน conical tube แล้วนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที เก็บตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งใน vacuum oven ซึ่งตะกอนได้ประมาณ 107 mg คิดเป็น 35% yield แบ่งตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย NMR โดยใช้ CDCl₃ เป็นตัวทำละลาย

3.3.3 การสังเคราะห์ mycophenolic acid- N-hydroxysuccinimide

ชั่ง MPA 1281.36 mg (1.0 mmol) และ NHS 690.54 mg (1.5 mmol) ลงใน round bottom flask ขนาด 500 mL ละลายด้วย acetonitrile 150 mL ใส่ magnetic bar ปั่นผสมด้วย magnetic stirrer บน ice bath นาน 15 นาที ชั่ง EDC 1150.20 mg (1.5 mmol) ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 mL อีกใบ ละลายด้วย acetonitrile 100 mL จนกระทั่ง EDC ละลาย ใช้หลอดหยดค่อยๆหยดสารละลาย EDC ที่เตรียมขึ้น ลงใน flask ที่มีสารละลาย MPA และ NHS อย่างช้าๆ ภายใน 60 นาที จากนั้นทำการคนต่อ

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง โดยติดตามสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ณ เวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) บน silica plate โดยใช้ mobile phase เป็น dichloromethane : ethyl acetate ในสัดส่วน 1:1 เมื่อตรวจไม่พบ MPA นำสารละลายที่ได้ไประเหยด้วย rotary evaporator จนกระทั่งเหลือประมาณ 3-4 mL เติม ethyl acetate ประมาณ 50 mL ลงใน flask จากนั้น ถ่ายของผสมลงใน conical tube แล้วนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที เพื่อแยกตะกอน EDC, EDU และ NHS ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออก เก็บสารละลายเหนือตะกอน แล้วนำไประเหยด้วย rotary evaporator จนแห้ง นำไปทำให้แห้งใน vacuum oven ได้ตะกอนประมาณ 364 mg คิดเป็น 87% yield แบ่งตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย NMR โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย

3.3.4 การสังเคราะห์ poloxamer-MPA conjugate (P407-MPA conjugate)

ชั่ง P407-NH₂ 182.28 mg (0.025 mmol) ลงใน flask ขนาด 25 mL ละลายด้วย dried dichloromethane 10 mL จากนั้น ชั่ง MPA-NHS 125.23 mg (1.0 mmol) ลงใน flask อีกใบ ละลายด้วย dried dichloromethane 10 mL ใช้หลอดดูดสารละลายทั้งสองชนิดมา ผสมกันใน erlenmeyer flask ขนาด 125 mL ที่เตรียมไว้ แยกชั่ง DMAP 54.98 mg ลงใน flask 25 mL อีกใบ ละลายด้วย dried dichloromethane 10 mL ดูดสารละลาย DMAP ใส่ใน flask ที่มีสารผสมระหว่าง P407-NH₂ และ MPA-NHS ปั่นบน magnetic stirrer อย่างน้อย 24 ชั่วโมง กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองหมายเลข 1 ล้าง filtrate ด้วยสารละลายอิ่มตัว NaCl 2 ครั้ง ครั้งละ 100 mL กำจัดน้ำออกด้วย anhydrous Na₂SO₄ ระเหย dichloromethane โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 3-4 mL เติม diethyl ether ประมาณ 100 mL ลงใน flask จากนั้น ถ่ายของผสมลงใน conical tube แล้วนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที เก็บตะกอนที่ได้ ไปทำให้แห้งใน vacuum oven ชั่งตะกอนได้ประมาณ 128 mg คิดเป็น 40% yield แบ่งตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย NMR โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ MPA ที่ conjugate บน poloxamer

3.4.1 การเตรียม standard curve ของสารมาตรฐาน MPA

ชั่ง MPA อย่างถูกต้องแม่นยำประมาณ 10 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ละลายด้วย acetonitrile และปรับปริมาตร เจือจางสารละลายที่ได้ด้วย acetonitrile ให้ได้ความเข้มข้น 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100 และ 0.125 mg/mL จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.4.2 การเตรียมสารละลาย 1N HCl

ตวง 37% hydrochloric acid 8.3 mL ใน volumetric flask ขนาด 100 mL ที่มี ultra-purified water 50 mL และปรับปริมาตรด้วย ultra-purified water ถ่ายลงในขวด 100 mL สำหรับนำไปใช้ทดสอบในข้อ 3.4.3

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

3.4.3 การเตรียมตัวอย่าง

ซึ่ง poloxamer-MPA conjugate อย่างถูกต้องแม่นยำ 10 mg ใส่ใน conical tube ขนาด 15 mL ละลายด้วย 1N HCl 1.0 mL นำสารละลายไป incubate ใน heating block ที่ 100°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สุ่มสารละลายจำนวน 100 μ L ที่เวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง มาเจือจางด้วย acetonitrile 400 μ L จากนั้น นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.4.4 สารละลาย 2% acetic acid

ตวง glacial acetic acid 10 mL ใน volumetric flask ขนาด 500 mL ที่มี ultra-purified water 250 mL และปรับปริมาตรด้วย ultra-purified water กรองสารละลายผ่านเมมเบรน ขนาด 0.22 μ m และนำไป sonicate 15 นาที เพื่อกำจัดแก๊สออก นำไปใช้เป็น mobile phase

3.4.5 HPLC condition

สภาวะของ HPLC ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ MPA แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 chromatographic conditions ของการวิเคราะห์หาปริมาณยา mycophenolic acid ใน acid hydrolysis

Components	Conditions
Mobile Phase	A:Acetonitrile; B: 2% Acetic acid (gradient) 0→4 min: A60:B40; 4 →8 min: A100:B0; 8→12 min: A60:B40; 12→15 min: A60:B40
Column	Inertsil ODS-3 4.6x150mm 5 μ m
Column Temperature	25 °C
Flow Rate	1 mL/min
Injection Volume	50 μ L
Wavelength	UV 250 nm
Retention Time of MPA	3.4 minute
Runtime	15 minutes

3.5 วิธีวัดค่า critical micelle concentration (CMC)

3.5.1 เตรียม stock solution ของ P407-MPA conjugate

ซึ่ง P407-MPA conjugate อย่างถูกต้องแม่นยำประมาณ 63.8 mg ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย purified water จนครบ 10 mL

3.5.2 เตรียมสารละลาย pyrene

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

ชั่ง pyrene ประมาณ 12 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetone ปิเปตสารละลาย pyrene 10 μ L ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ที่มี purified water 50 mL นำไประเหย acetone ออก และปรับปริมาตรด้วย purified water

3.5.3 การหาค่า CMC ของ P407-MPA conjugate

นำสารละลายในข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 มาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างของ P407-MPA conjugate และ pyrene ดังแสดงในตารางที่ 2 นำสารละลายที่เตรียมได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงของด้วยเครื่อง spectrofluorometer โดยมี excitation wavelength ที่ 334 nm และบันทึก emission spectra ในช่วง 300-500 nm คำนวณอัตราส่วนของ intensity ที่ความยาวคลื่น 372 ต่อ 384 nm นำค่าที่ได้มา สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log concentration กับ intensity ratio เพื่อนำมาคำนวณหาค่า CMC ต่อไป

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมได้จาก stock solution ของ poloxamer 407-mycophenolic acid conjugate และ pyrene

concentration of sample (mM)	pipette (μ L)	volume flask (mL)	Pyrene Volume (μ L)	Pyrene Conc. (μ g/mL)
0.00005	5	10	500	0.12
0.0001	10	10	500	0.12
0.0002	20	10	500	0.12
0.0003	30	10	500	0.12
0.0007	70	10	500	0.12
0.001	100	10	500	0.12
0.0015	150	10	500	0.12
0.0025	250	10	500	0.12
0.003	300	10	500	0.12
0.005	500	10	500	0.12
0.01	1000	10	500	0.12

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การสังเคราะห์ Poloxamer-mycophenolic acid conjugates

การสังเคราะห์ poloxamer-MPA conjugate ได้เริ่มจากการเลือกใช้ ปฏิกิริยา esterification เนื่องจาก MPA มีหมู่ฟังก์ชัน carboxyl และ poloxamer มีหมู่ฟังก์ชัน hydroxyl โดย poloxamer ที่เลือกใช้คือ P407 ซึ่งขั้นตอนการสังเคราะห์เป็นดังนี้ MPA ทำปฏิกิริยากับ coupling reagent คือ *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) ได้สารที่เกิดขึ้นคือ mycophenolate O-acyl isourea จากนั้นนำสารนี้มาทำปฏิกิริยากับ 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) ซึ่งเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา esterification จะได้สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นคือ mycophenolate-DMAP และนำ mycophenolate-DMAP นี้ทำปฏิกิริยากับ P407 จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการคือ P407-MPA conjugate แต่พบว่าเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบลักษณะโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR พบว่าไม่ปรากฏลักษณะของ P407-MPA ester conjugate จึงเป็นไปได้ว่าโครงสร้าง MPA มีหมู่ hydroxyl บน benzene ring ซึ่งหมู่นี้มีค่า pKa ประมาณ 10 ซึ่งต่ำกว่าหมู่ hydroxyl ของ P407 ที่มีค่า pKa ประมาณ 16 ทำให้หมู่ hydroxyl ของ MPA มีความไวมากกว่า จึงคาดว่าหมู่ hydroxyl ของ MPA ไปเกิดปฏิกิริยากับสารมัธยันต์ ทำให้สารมัธยันต์ไม่สามารถไปทำปฏิกิริยากับ P407 ทำให้ P407-MPA ester conjugate ไม่เกิดขึ้น

ในงานวิจัยนี้จึงทำการสังเคราะห์ P407-MPA conjugate ด้วยการเชื่อมต่อด้วย amide bond โดยขั้นตอนของการสังเคราะห์ P407-MPA conjugate แบ่งเป็นขั้นตอนย่อยๆ ได้ โดยเริ่มจากการเปลี่ยนหมู่ hydroxyl ที่ปลาย P407 ไปเป็นหมู่ tosylate ester โดยใช้ tosyl chloride (TsCl) และ trimethylamine (Et_3N) ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 ขั้นตอนต่อมาเป็นการแทนที่หมู่ tosyl ของ P407 tosylate ester (P407-OTs) ด้วยหมู่ primary amine โดยใช้ ammonium hydroxide (25%V/V NH_4OH) ได้ P407-NH₂ ดังแสดงในแผนภาพที่ 2 จากนั้น นำ MPA มาทำปฏิกิริยากับ *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ซึ่งใช้ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะได้สารมัธยันต์ MPA-NHS ดังแสดงในแผนภาพที่ 3 และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการนำ P407-NH₂ มาทำปฏิกิริยากับ MPA-NHS เกิดผลิตภัณฑ์ P407-MPA conjugate ดังแสดงในแผนภาพที่ 4 สารตั้งต้น และสารสังเคราะห์ทุกชนิดที่สังเคราะห์ มีการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy ดังแสดงในรูปที่ 7-14 ตามลำดับ

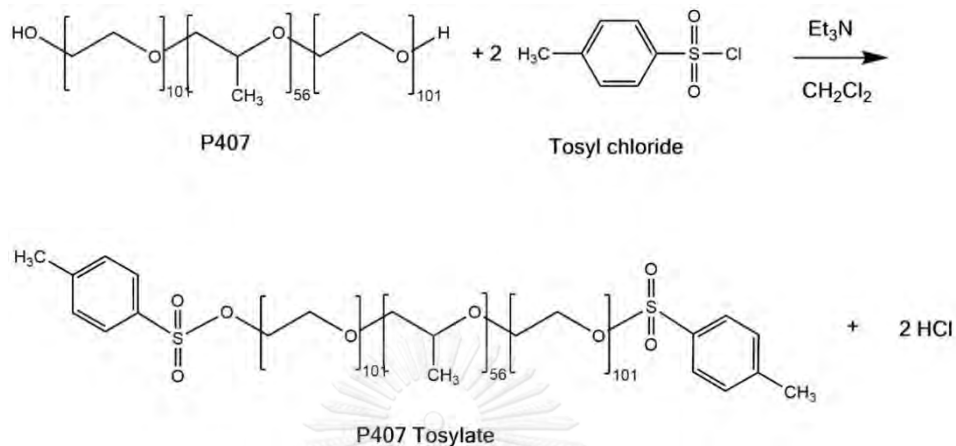
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

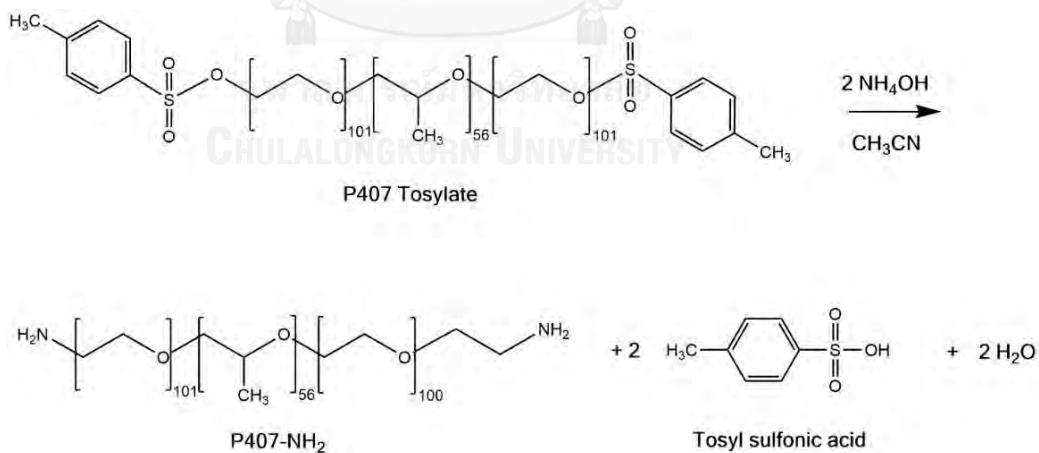
ผล NMR ของสารตั้งต้น ได้แก่ P407 MPA TsCl และ NHS แสดงในรูปที่ 7-9 และ 12 ตามลำดับ และผล NMR ของสารมัธยันต์ที่ได้จากในแต่ละขั้นตอนการสังเคราะห์คือ P407-OTs P407-NH₂ MPA-NHS และสารผลิตภัณฑ์ P407-MPA conjugate แสดงในรูปที่ 10-11 และ 13-14 ตามลำดับ โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างสารตั้งต้นและสารมัธยันต์ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- Poloxamer 407-tosylate ester (P407-OTs)
ในผล NMR ของ P407-OTs ช่วง 3.0-4.0 ppm ปรากฏ peak ตำแหน่งที่ 2 3 4 และ 6 ซึ่งแสดง H ที่อยู่บน backbone carbon ของ P407 เช่นเดียวกับผล NMR ของ P407 ที่เป็นสารตั้งต้น และปรากฏ peak ตำแหน่งที่ 8 9 10 11 12 13 14 และ 15 ซึ่งแสดง H ที่อยู่บน aromatic ring ของ TsCl ที่เข้าต่อทั้งสองด้านกับปลายสายโพลีเมอร์ ในช่วง 7.3-7.9 ppm แสดงว่าเกิดสาร P407-OTs
- Poloxamer 407-NH₂ (P407-NH₂)
เมื่อเปรียบเทียบผล NMR ของ P407-NH₂ และ P407-OTs จะพบว่า peak ตำแหน่งที่ 8 9 10 11 12 13 14 และ 15 ซึ่งแสดง H ที่อยู่บน aromatic ring ของ TsCl นั้นไม่ปรากฏในผลของ P407-NH₂ แต่ปรากฏ peak ตำแหน่งที่ 1 และ 9 ซึ่งแสดง H บน carbon atom ที่ติดอยู่กับ NH₂ แสดงว่าเกิดสาร P407-NH₂
- Mycophenolic acid-*N*-hydroxysuccinimide (MPA-NHS)
ในผล NMR ของ MPA-NHS ช่วง 2.7-2.9 ppm พบ peak ตำแหน่ง 10 และ 11 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับ peak ตำแหน่ง 1 และ 2 ในผล NMR ของ NHS ซึ่งแสดงถึง H ใน lactone ring ของ NHS และพบ peak อื่นๆที่แสดงตำแหน่งเช่นเดียวกับในผล NMR ของ MPA (ตำแหน่ง 1 2 3 4 5 6 7 และ 8) แสดงว่าเกิดสาร MPA-NHS
- Poloxamer 407-mycophenolic acid conjugate (P407-MPA conjugate)
ในผล NMR ของ P407-MPA conjugate ซึ่งเกิดจาก P407-NH₂ และ MPA-NHS พบว่า peak ที่แสดงถึง H ใน lactone ring ของ NHS ไม่ปรากฏ พบเฉพาะ peak ตำแหน่งที่ 2 3 4 7 และ 8 ซึ่งแสดง H ที่อยู่บน backbone carbon ของ P407 และ peak ตำแหน่งที่ 1' 1'' 3' 3'' 4' 4'' 5' 5'' 6' และ 6'' ที่แสดงตำแหน่งเช่นเดียวกับในผล NMR ของ MPA แสดงว่าเกิด P407-MPA conjugate

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าขั้นตอนการสังเคราะห์ P407-MPA conjugate นี้สามารถสังเคราะห์ P407-MPA conjugate ได้



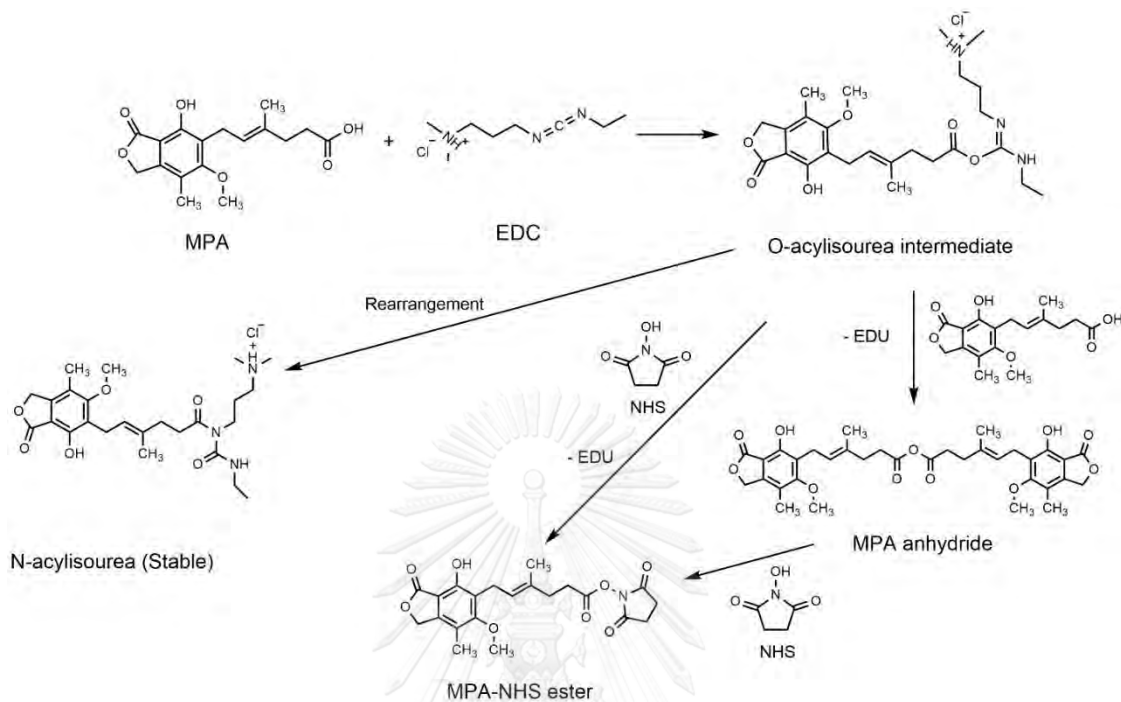
แผนภาพที่ 1 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ poloxamer 407-tosylate ester



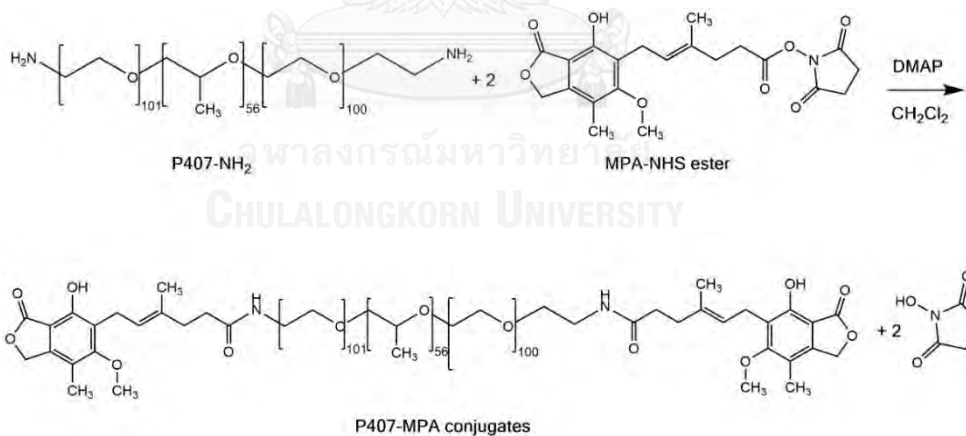
แผนภาพที่ 2 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ poloxamer 407-NH₂

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาบัตรที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาบัตรที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

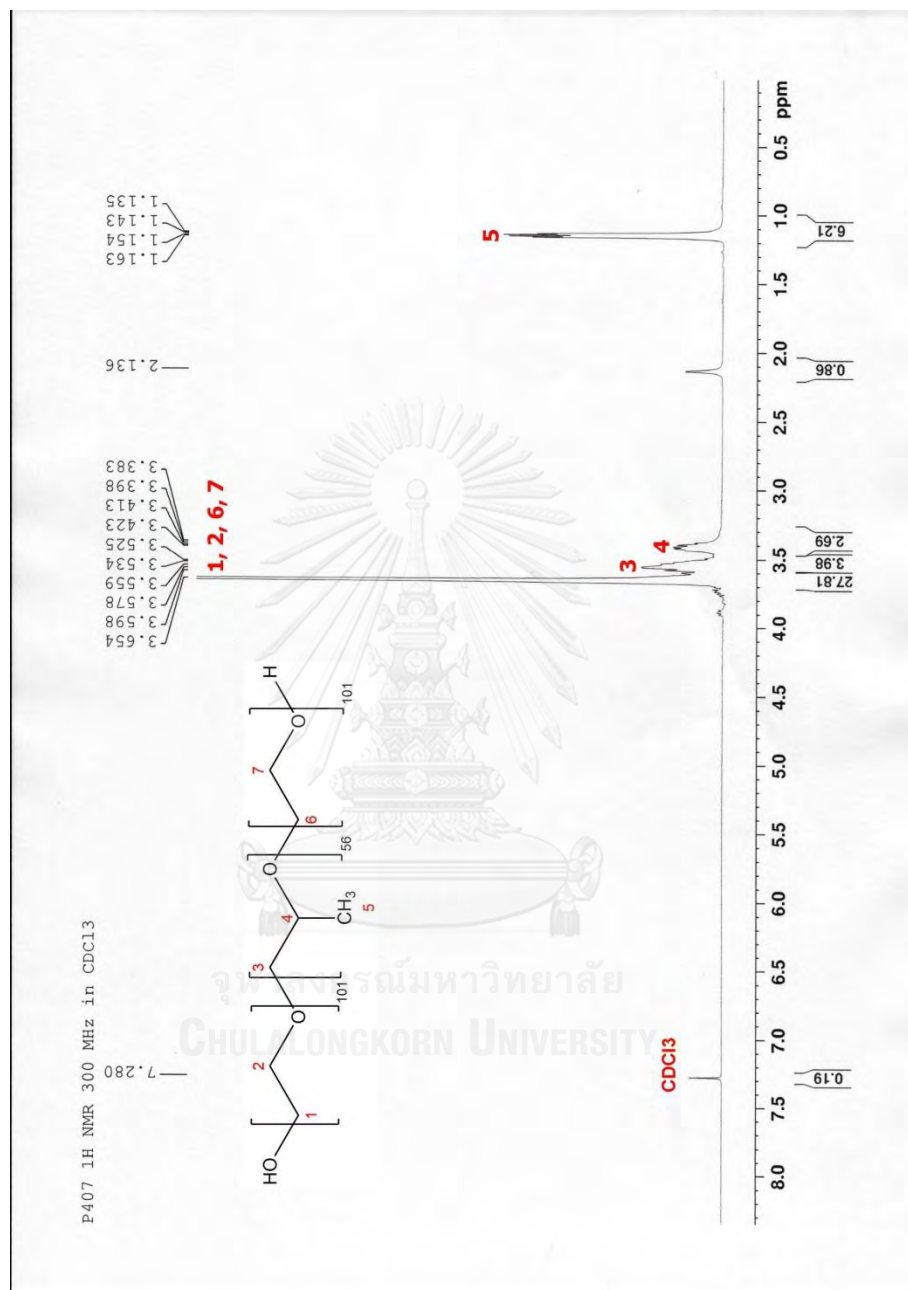


แผนภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ mycophenolic acid- *N*-hydroxysuccinimide



แผนภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ poloxamer 407-mycophenolic acid conjugates

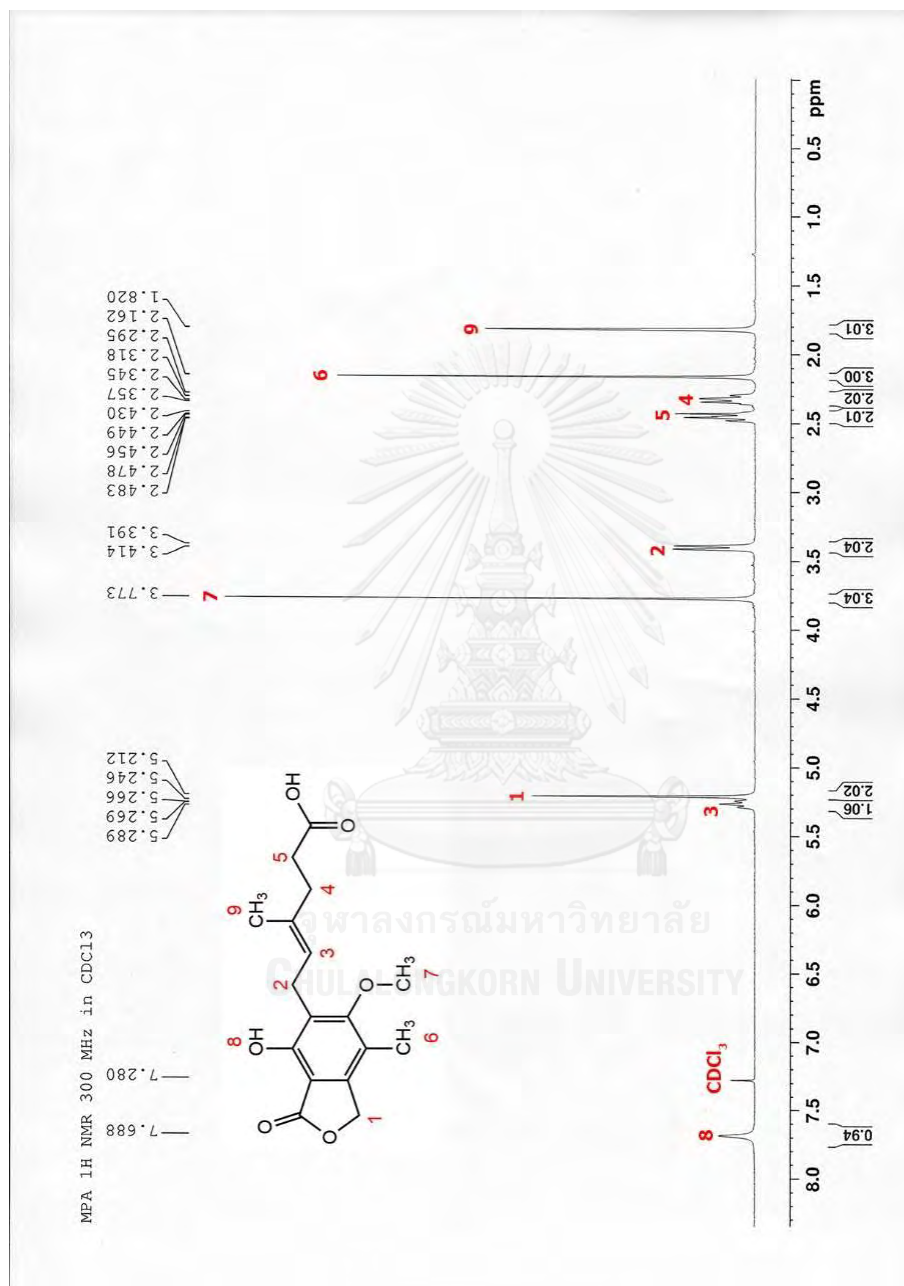
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



รูปที่ 7 ^1H NMR in CDCl_3 ของ poloxamer 407

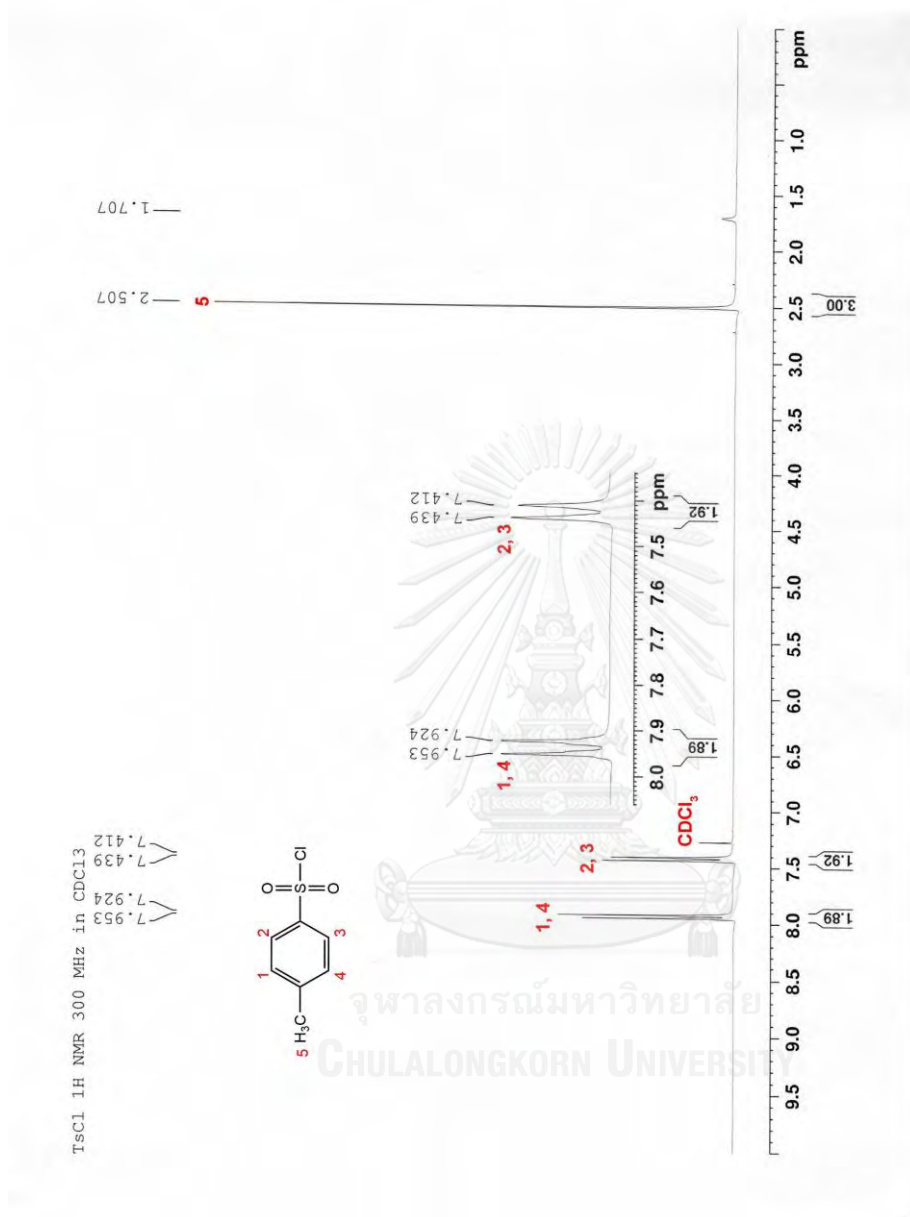
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปที่ 8 ¹H NMR in CDCl₃ ของ mycophenolic acid

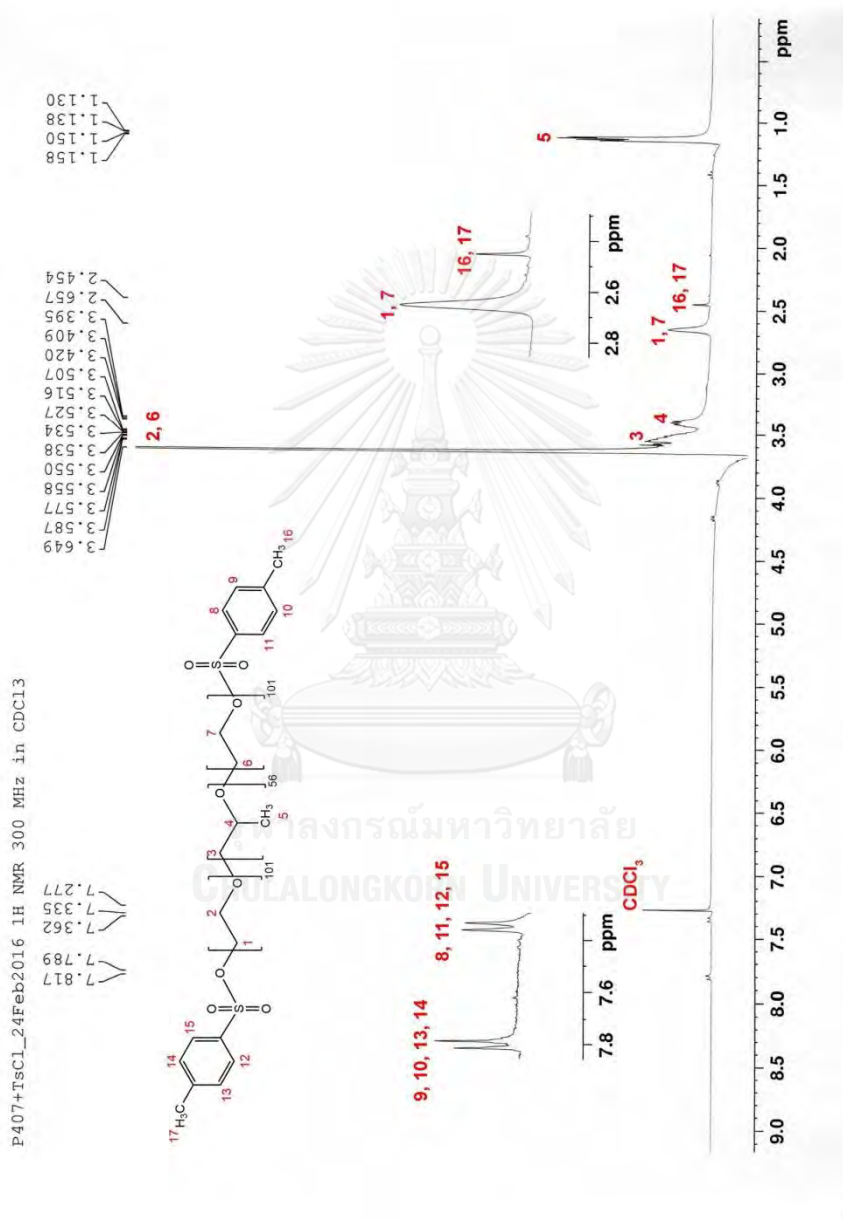
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



รูปที่ 9 ¹H NMR in CDCl₃ ของ tosyl chloride

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

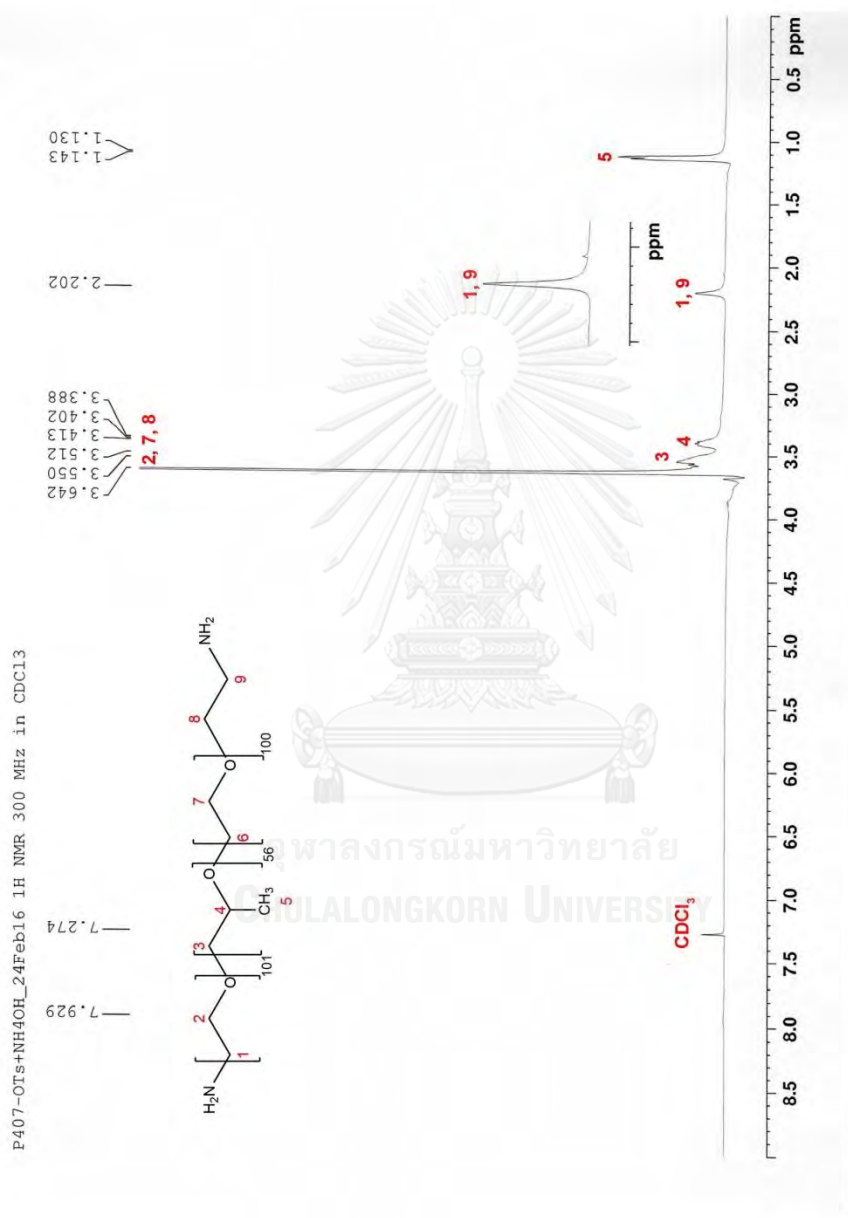


รูปที่ 10 ¹H NMR in CDCl₃ ของ poloxamer 407-tosylate ester

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

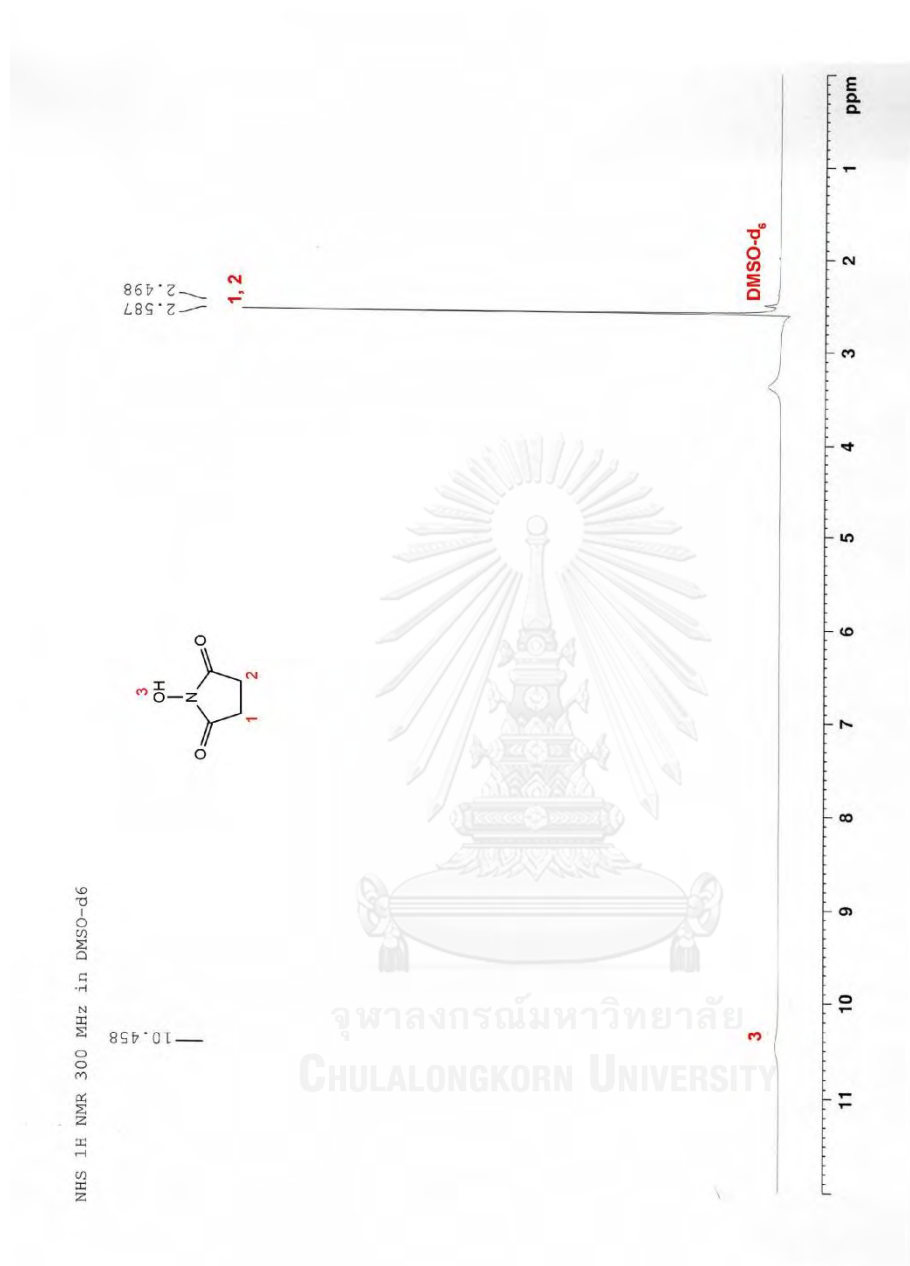
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปที่ 11 ¹H NMR in CDCl₃ ของ poloxamer 407-NH₂

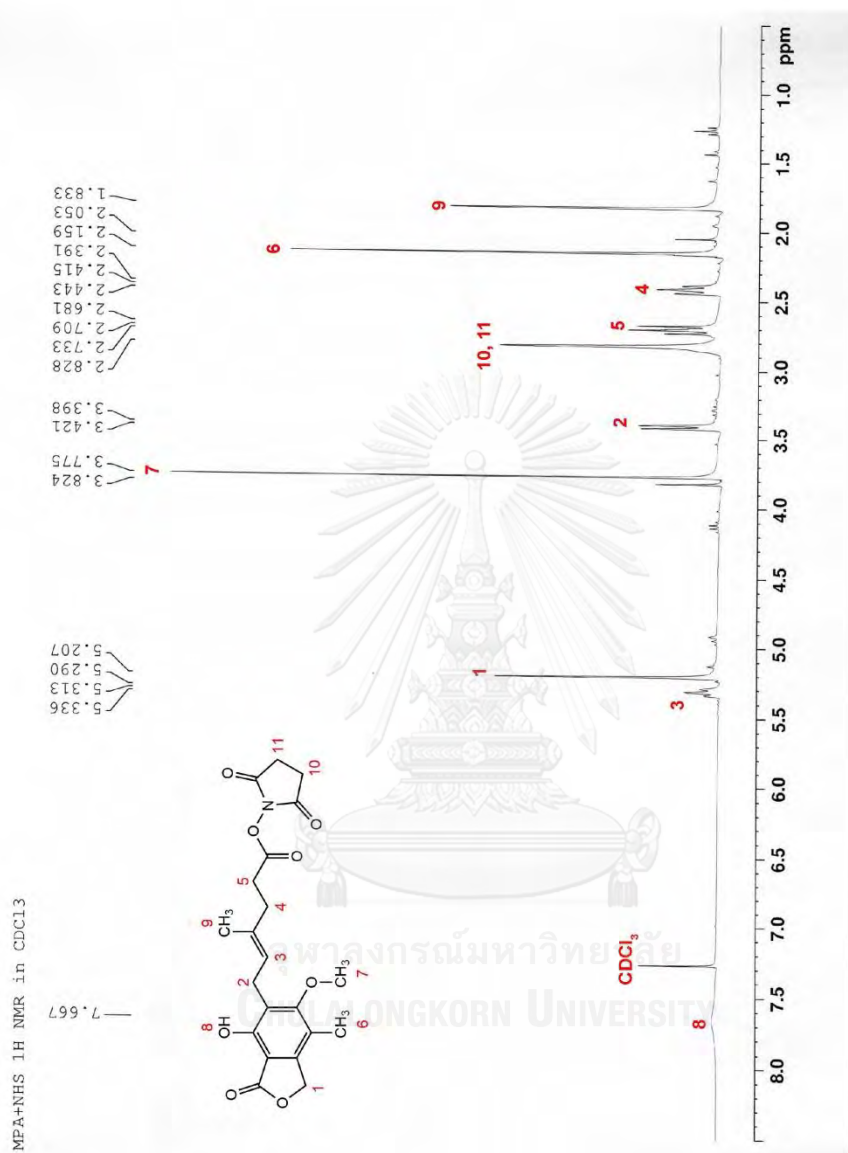
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



รูปที่ 12 ^1H NMR in DMSO- d_6 ของ *N*-hydroxysuccinimide

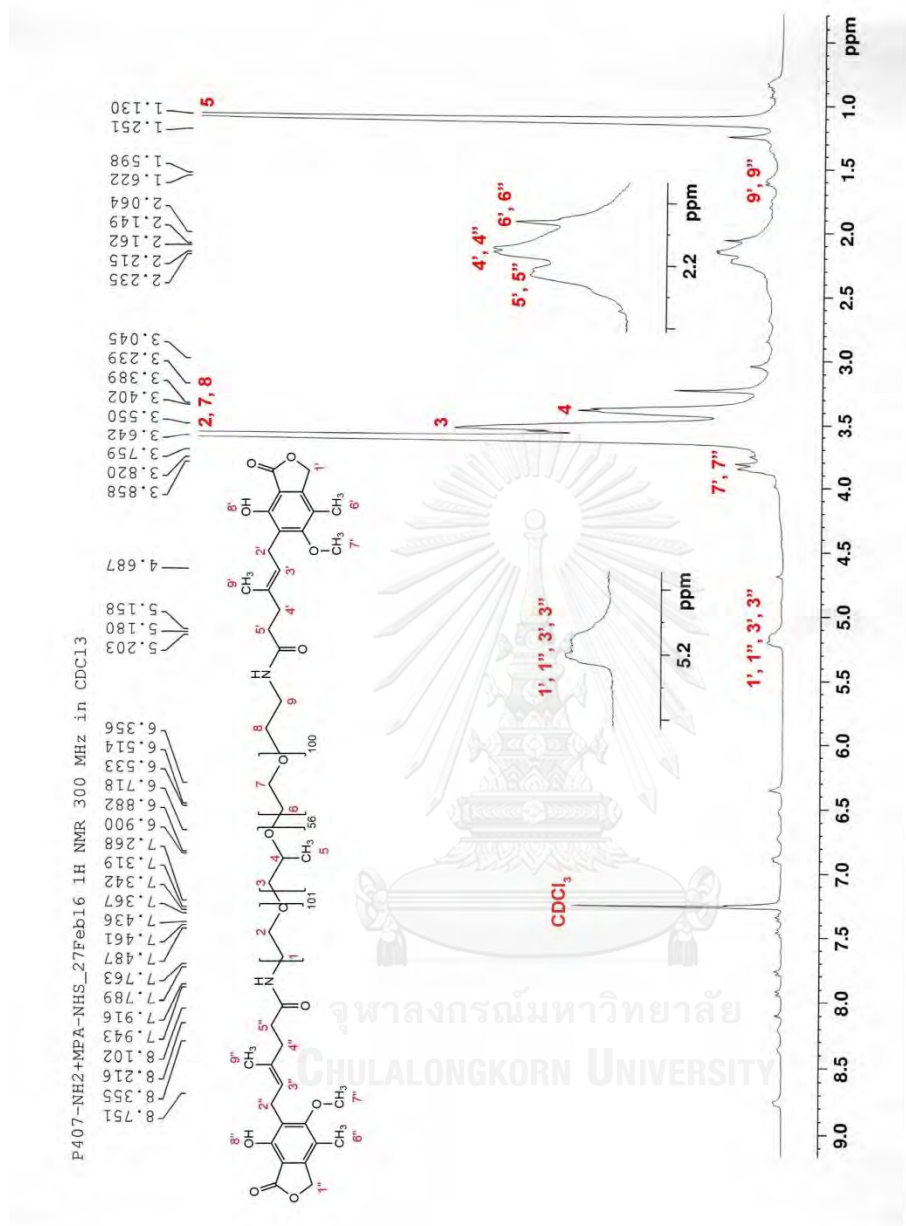
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปที่ 13 ^1H NMR in CDCl_3 ของ mycophenolic acid- *N*-hydroxysuccinimide

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

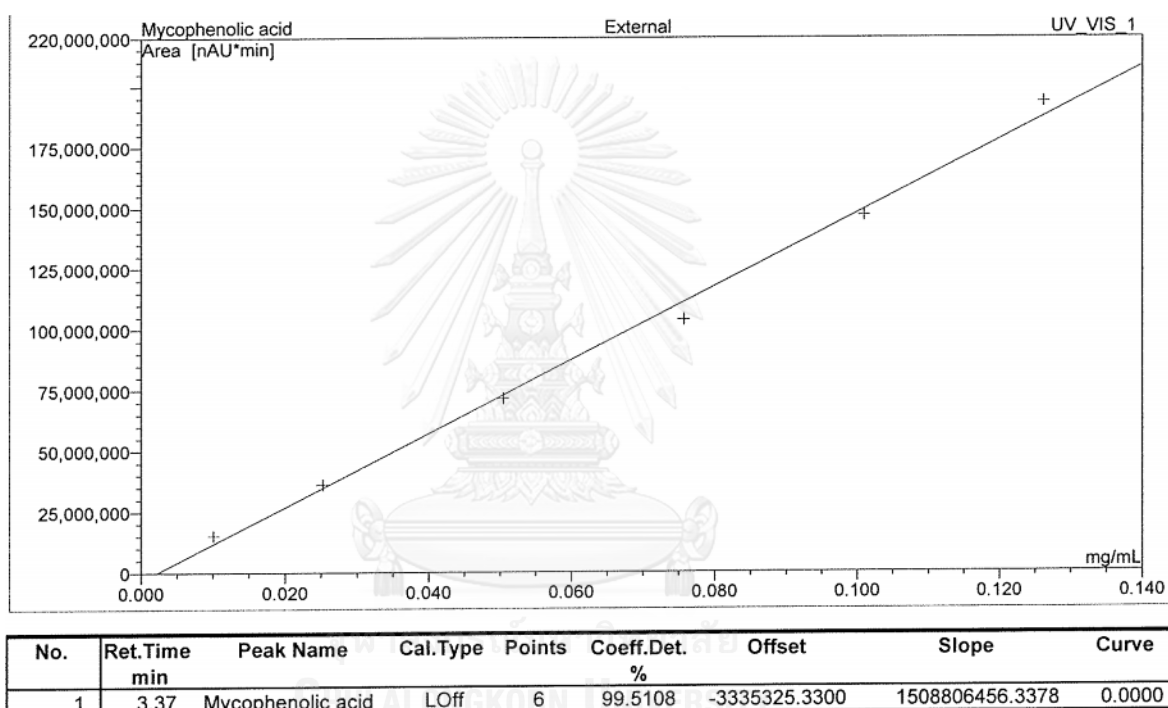


รูปที่ 14 ^1H NMR in CDCl_3 ของ poloxamer 407-mycophenolic acid conjugate

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ MPA ที่ conjugate บน poloxamer

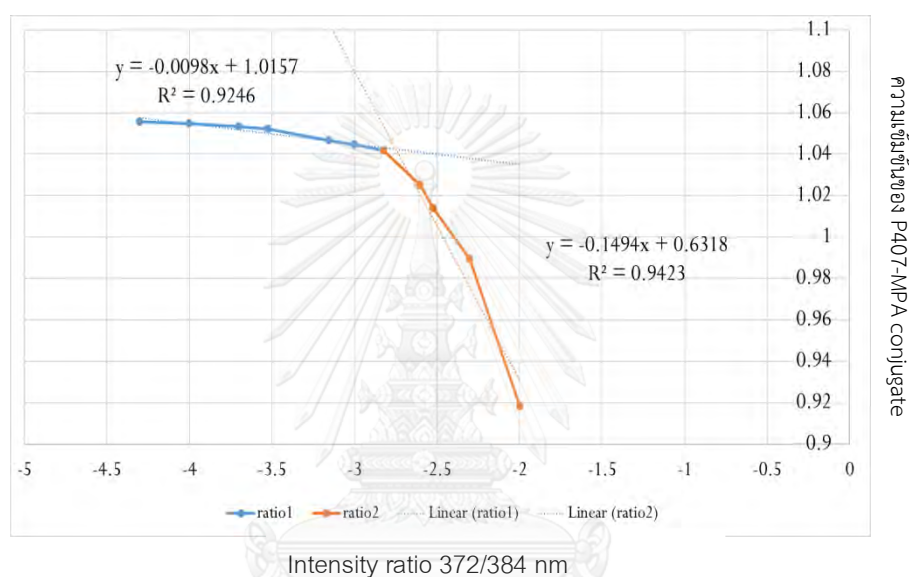
standard curve ของ MPA ที่ความเข้มข้น 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100 และ 0.125 mg/mL แสดงในรูปที่ 15 โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9951 จากการวิเคราะห์หาปริมาณ MPA ที่ conjugate อยู่บน P407 ด้วยเทคนิค HPLC โดยอาศัยการเกิด acid hydrolysis และวัดปริมาณ MPA ที่ปลดปล่อยออกมาจาก P407-MPA conjugate พบว่าที่ 1, 3 และ 6 ชั่วโมง มีปริมาณ MPA 1.83, 3.03 และ 4.30 %w/w ตามลำดับ



รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมาตรฐานของ MPA และพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

4.3 การหาค่า critical micelle concentration (CMC)

จากการทดลองหาค่า CMC ของ P407-MPA conjugates สามารถหาสมการความสัมพันธ์มาได้ 2 สมการ คือ $y = -0.0098x + 1.0157$ และ $y = -0.1494x + 0.6318$ และพบว่าจุดตัดของสองสมการนี้อยู่ที่ -2.75 ซึ่งสามารถคำนวณเป็นค่า CMC ได้ 1.8×10^{-3} mM ดังแสดงในรูปที่ 16 ทั้งนี้ ค่า CMC ของ P407 ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ พบว่ามีค่าประมาณ 2.8×10^{-3} mM ซึ่งมีค่ามากกว่า CMC จาก P407-MPA conjugates จึงสรุปได้ว่า P407-MPA conjugates สามารถเกิดไมเซลล์ได้ดีกว่า P407



รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ P407-MPA conjugate และอัตราส่วนของ intensity ที่ความยาวคลื่น 372/384 นาโนเมตร

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยนี้ สรุปได้ว่าการคอนจูเกตระหว่าง P407 และ MPA สามารถเกิดขึ้นได้ดังข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy และพบว่า มีปริมาณ MPA ในคอนจูเกตประมาณ 4.3% w/w โดย P407-MPA conjugate สามารถเกิดไมเซลล์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 1.8×10^{-3} mM ทั้งนี้ ขั้นตอนต่อไปในการพัฒนาสารที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ สามารถทำได้โดยการประเมินคุณสมบัติด้านอื่นๆ เช่น ทางเภสัชวิทยา เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาใหม่ในการช่วยกดภูมิคุ้มกันต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

บรรณานุกรม

1. Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other Effects of Mycophenolic Acid and an Ester Prodrug, Mycophenolate Mofetil. Immunological Reviews. 2006; 136(1): 5-28.
2. DrugBank[database on the internet]. Mycophenolic acid. [cited 2016 Mar 27] Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01024>.
3. Medscape[database on the internet]. Mycophenolate. [cited 2016 Mar 27] Available from: <http://reference.medscape.com/drug/cellcept-myfortic-mycophenolate-343209>.
4. Drug.com[database on the internet]. Mycophenolate mofetil side effects. [cited 2016 Mar 27]. Available from: <http://www.drugs.com/sfx/mycophenolate-mofetil-side-effects.html>.
5. Van S, Das SK, Wang X, Feng Z, Jin Y, Hou Z, Chen F, Pham A, Jiang N, Howell SB, Yu L. Synthesis, characterization, and biological evaluation of poly(L-gamma-glutamyl-glutamine)- paclitaxel nanoconjugate. Int J Nanomedicine. 2010; 5:825-837.
6. Zhou P, Li Z, Chau Y. Synthesis, characterization, and in vivo evaluation of poly(ethylene oxide-coglycidol)-platinate conjugate. Eur J Pharm Sci. 2010; 41(3-4):464-472.
7. Larson N, Ghandehari H. Polymeric conjugates for drug delivery. Chem Mater. 2012; 24(5): 840-53.
8. Sun CY, Dou S, Du JZ, Yang XZ, Li YP, Wang J. Doxorubicin conjugate of poly(ethylene glycol)-block-polyphosphoester for cancer therapy. Adv health mat. 2014; 3:261-272.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

9. Yan GP, Zhuo RX, Zheng CY. Study on the Anticancer Drug 5-Fluorouracil- Conjugated Polyaspartamide Containing Hepatocyte-Targeting Group. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2001; 16: 277-293.
10. Shu JY, Panganiban B, Xu T. Peptide-polymer conjugates: from fundamental science to application. *Annu Rev Phys Chem*. 2013; 64: 631-57.
11. Collins J, Tanaka J, Wilson P, Kempe K, Davis TP, McIntosh MP, et al. In situ conjugation of dithiophenol maleimide polymers and oxytocin for stable and reversible polymer-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem*. 2015; 26(4): 633-8.
12. Fang XB, Zhang JM, Xie X, Liuc D, Hea CW, Wana JB, et al. pH-sensitive micelles based on acid-labile pluronic F68–curcumin conjugates for improved tumor intracellular drug delivery. *IJPharm*. 2016; 502(1-2): 28-37.
13. รศ.นพ.เกรียงศักดิ์ วารีแสงทิพย์. สาระนายกสมาคมปลูกถ่ายอวัยวะแห่งประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2558 [สืบค้น 27 มี.ค. 2559]; เข้าถึงได้จาก: <http://www.transplantthai.org/newdetails>.
14. แพทย์หญิงอภิสร่า กุลวงศ์ธนโรจน์. การปลูกถ่ายอวัยวะ. [ออนไลน์]. 2557 [สืบค้น 27 มี.ค. 2559]; เข้าถึงได้จาก: <http://www.cifs.moj.go.th>.
15. นายแพทย์วรวิทย์ เจริญศิริ. Bangkok Health Research center. การปลูกถ่ายอวัยวะ. [ออนไลน์]. 2557 [สืบค้น 27 มี.ค. 2559]; เข้าถึงได้จาก: <http://www.bangkokhealth.com/index.php/health/health-general/general-health/764>.
16. Malhotra P, Malu S, Kapur S. Immunobiology of Rejection. [Online]. 2015 [cited 2016 Mar 27]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/432209-overview#a4>.
17. Pellegrino B, Schmidt RJ, Onder S. Immunosuppression. [Online]. 2016 [cited 2016 Mar 27]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/432316-overview#a1>.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

18. Lima A, Enéas PC, Miranda TA, Mingoti SA, Soares CD, Pianetti GA. In vitro dissolution kinetic for mycophenolic acid derivatives tablets. BJPS. 2013; 49(2):311-19.
19. Cholewinski G., Malachowska-Ugarte M. and Dzierzbicka K. The chemmistry of mycophenolic acid-synthesis and modifications towards desired biological activity. Curr. Med. Chem. 2010; 17:1926-41.
20. Pubchem Compound Database [database on the Internet]. National Center for Biotechnology Information. [cited 2016 Mar 27]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/446541>.
21. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เมแทบอลิซึมของเพียวรีนและไพริมิดีนนิวคลีโอไทด์. [ออนไลน์]. [สืบค้น 27 มี.ค. 2559]; เข้าถึงได้จาก: http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/veterin/vet69/NUCLEIC_DREAMMX/S-14.htm.
22. Nucleotide metabolism. Biochemistry, seventh edition. W.H. Freeman and company. 2012; [cited 2016 Mar 27]. Available from: <http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/lectures/nucmetaboutline>.
23. Allison AC, Eugui EM. Review mycophenolate mofetil and its mechanisms of Action. Immpharm. 1999; 47(2000):85-118.
24. Hitesh R, Rakwsh P. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. In Jour Pharmtech Res. 2009; 1(2): 299-303.
25. Kamboj VK, Verma PK. Poloxamers based nanocarriers for drug delivery system. Der Pharmacia Lettre. 2015; 7(2): 264-269.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด