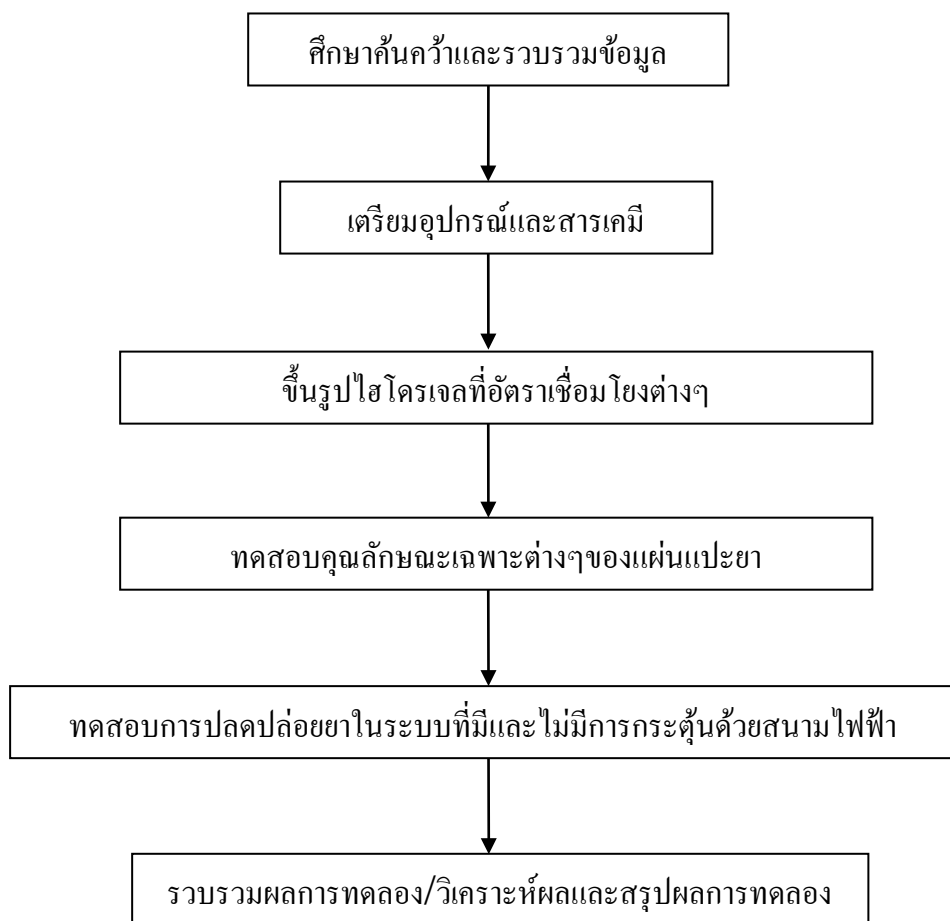


บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินการ

ขั้นตอนการทำแผ่นแปะยากรดอะโลอินและเบนโซอิกแอซิดจากพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจล

3.1 แผนการดำเนินงาน



3.1.1 รวบรวมข้อมูล

1. รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับระบบนำส่งยาผ่านผิวหนัง
2. รวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยากรดอะโลอิน และการออกฤทธิ์
3. รวบรวมข้อมูลการขึ้นรูปแผ่นแปะนำส่งยาผ่านผิวหนังพอลิอะคริลาไมด์
4. รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการคำนวณการแพร่ของระบบนำส่งยาผ่านผิวหนัง

3.1.2 เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการขึ้นรูปแผ่นนำส่งยาอุปกรณ์

1. อุปกรณ์

- ปีกเกอร์
- Modified Franz diffusion cell
- Magnetic Stirrer และ Magnetic bar
- ขวดสีชาเก็บยา ขนาด 5 mL
- แท่งแก้วกวนสาร
- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- ช้อนตักสาร
- ขวดปริมาตร

2. สารเคมี

- Aloin acid (AR grade), Sigma Aldrich
- Benzoic acid (AR grade), Sigma Aldrich
- Acrylamide monomer, (AR grade), Loba Chemie
- Methylenebisacrylamide (MBA), (AR grade), Sigma Alorich
- Tetramethylenediamine (TEMED), (AR grade), Sigma Alorich
- Ammonium peroxodisulfate, (AR grade), Analar Normapur
- Sodium acetate, (AR grade), Analytical Univer Reagent
- Acetic acid , (AR grade), Guangdong Guanghua Chemical
- Heptane (AR grade), Analytical Univer Reagent

3.2 การขึ้นรูปแผ่นแปะยาจากพอลิเมอร์พอลิอะคริลาไมด์

3.2.1 ขั้นตอนการสังเคราะห์พอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจล

ทำการสังเคราะห์โพลิเมอร์แบบร่างแหจาก Acrylamide มอนอเมอร์ ผ่านขบวนการ Free radical polymerization โดยนำ Acrylamide มอนอเมอร์ 2.32 กรัม ละลายในสารละลายยาที่เป็นกรดและเติมสาร Methylenebisacrylamide (MBA), Tetramethylenediamine (TEMED) และ Ammonium peroxodisulfate เพื่อเป็นตัวเชื่อมโยง (Cross-linker) ตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) และตัวริเริ่มปฏิกิริยา (Initiator) ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้เทลงไปในจานเพาะเชื้อ 11 เซนติเมตร เพื่อขึ้นรูปไฮโดรเจล แล้วจึงทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง โดยปริมาณของสารต่างๆที่ใช้เตรียมพอลิอะคริลาไมด์ที่อัตราการเชื่อมโยงต่างๆ เป็นไปตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์ที่อัตราการเชื่อมโยงต่างๆ

สารเคมี ตัวอย่าง	มอนอเมอร์ (Acrylamide monomer, AAM) กรัม	ตัวเชื่อมโยง (Methylenebisacrylamide, MBA) กรัม	ตัวเร่งปฏิกิริยา (Tetramethylene diamine) ไมโครลิตร	ตัวริเริ่มปฏิกิริยา (Ammonium peroxodisulfate) กรัม	สัดส่วนการ เชื่อมโยง (g MBA/g AAM)
PAAM_01	2.32	0.0116	20	0.01	0.005
PAAM_02	2.32	0.0800	20	0.01	0.035
PAAM_03	2.32	0.1856	20	0.01	0.080
PAAM_04	2.32	0.2320	20	0.01	0.100

3.3 การทดสอบ และวิเคราะห์คุณสมบัติของไฮโดรเจล

3.3.1 การหาอัตราการบวมตัว (Degree of swelling)

เป็นการวัดความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นไฮโดรเจลที่สังเคราะห์ขึ้นโดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ $37.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ซึ่งเท่ากับอุณหภูมิของร่างกาย โดยแช่ชิ้นงานไว้ในน้ำเป็นเวลา 5 วันแล้วชั่งน้ำหนักเพื่อหา ปริมาณน้ำที่สมดุล (Equilibrium water content, EWC) ส่วนการหาอัตราการบวมตัว (Degree of swelling) ดังสมการที่ 3.1

$$\text{Degree of swelling (\%)} = \frac{M - M_d}{M_d} \times 100 \quad (3.1)$$

หรือ

$$\text{Weight loss (\%)} = \frac{M_i - M_d}{M_i} \times 100 \quad (3.2)$$

โดยที่ M = น้ำหนักของไฮโดรเจลที่บวมน้ำ

M_d = น้ำหนักของไฮโดรเจลที่แห้ง

M_i = น้ำหนักของไฮโดรเจลก่อนนำไปแช่น้ำ

3.3.2 วิเคราะห์โครงสร้างของแผ่นแปะยากรดอะโลอินจากพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจล

พอลิอะคริลาไมด์บริสุทธิ์ที่อัตราการเชื่อมโยงต่างๆ ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนไปเมื่อเพิ่มอัตราการเชื่อมโยงและแผ่นแปะยากรดอะโลอินจากพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจลถูกนำมาวิเคราะห์หาพันธะเคมีระหว่างพอลิอะคริลาไมด์และยากรดอะโลอินถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR Spectroscopy (Fourier Transform Infrared spectroscopy) โดยใช้โหมดการทำงานแบบ ATR-FTIR ซึ่งเป็นโหมดการทำงานสำหรับชิ้นงานที่เป็นฟิล์มหรือเจล [3]

3.3.3 วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของแผ่นแปะสารสกัดยากรดอะโลอินจากพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจล [24]

ขนาดของรูพรุนของไฮโดรเจลถูกคำนวณจากสมการ (3.3)

$$\xi = v_{2,s}^{-\frac{1}{3}} \left[C_n \left(\frac{2M_c}{M_r} \right) \right]^{1/2} l \quad (3.3)$$

โดยที่ ξ = ขนาดรูพรุนของไฮโดรเจล

M_c = น้ำหนักโมเลกุลระหว่างสายโซ่ที่ถูกเชื่อมโยง

M_r = น้ำหนักโมเลกุลของโมโนเมอร์

C_n = Flory characteristic ratio ของพอลิอะคริลาไมด์ = 8.8

$v_{2,s}$ = สัดส่วนโดยปริมาตรของพอลิเมอร์ในสภาวะบวมน้ำ

l = ความยาวพันธะระหว่างคาร์บอน-คาร์บอน = 1.54 Å

น้ำหนักโมเลกุลระหว่างสายโซ่โดยคำนวณจากสมการ (3.4)

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\bar{v}}{\bar{V}_1} \frac{[\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2]}{v_{2,r} \left(\left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{1/3} - \frac{1}{2} \left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right) \right)} \quad (3.4)$$

M_n คือ น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ก่อนเกิดปฏิกิริยาเชื่อมโยง หาไว้ให้แล้ว (36,400 g/mol)

$\bar{v}$ คือ ปริมาตรจำเพาะของไฮโดรเจล = 0.741 mL/g

$\bar{V}_1$ คือ ปริมาตรด้วยโมลของน้ำ (18.1 mL/mol)

$v_{2,r}$ คือ อัตราส่วนของพอลิเมอร์ต่อปริมาตรก่อนทดสอบการบวม

$v_{2,s}$ คือ อัตราส่วนของพอลิเมอร์ต่อปริมาตรในขณะที่พอลิเมอร์บวม

χ คือ interaction parameter of PAAM - water, 0.48

3.4 การคำนวณค่าคงที่การแพร่ (Diffusion coefficient)

ค่าคงที่การแพร่ของระบบที่มีหนังหุ้มและไม่มีหนังหุ้มถูกคำนวณเพื่อศึกษาจลศาสตร์ของการแพร่ของยาจากพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจล

ในการศึกษาการเคลื่อนที่ของยาอะโลอินออกจากพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจลในระบบที่นั้น จำเป็นจะต้องศึกษาการแพร่ของตัวยาซึ่ง ณ จำนวนของตัวยาที่ถูกปลดปล่อยออกมานั้น (M_t) และปริมาณของยาเริ่มต้น (M_∞) นั้นจะแปรผันตรงกับเวลา (t) ที่ยาแพร่ออกมาจากพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจลยกกำลัง n ซึ่งสามารถเขียนได้ดังสมการที่ 3.5

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3.5)$$

โดยค่า n จะเป็นค่าที่บอกกลไกการเคลื่อนที่ ถ้าค่า $n \leq 0.5$ กลไกการเคลื่อนที่เป็นแบบ Fickian ถ้า $n = 0.5 < n < 1.0$ กลไกการเคลื่อนที่เป็นแบบ non-Fickian และถ้า $n > 1.0$ กลไกการเคลื่อนที่เป็นแบบ เส้นตรง ถ้ากลไกการเคลื่อนที่ของยาเป็นแบบ Fickian diffusion ซึ่งเป็นกลไกการแพร่แบบพื้นฐาน สามารถนำมาคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่การแพร่ (Diffusion coefficient) กับปริมาณยาที่ถูกนำส่งและเวลาได้ดังสมการที่

$$Q = 2C_0(Dt/\pi)^{1/2} \quad (3.6)$$

โดย Q คือ ปริมาณยาที่วิ่งผ่านพื้นที่หน้าตัดของไฮโดรเจลที่เวลา t (mg/cm^2)

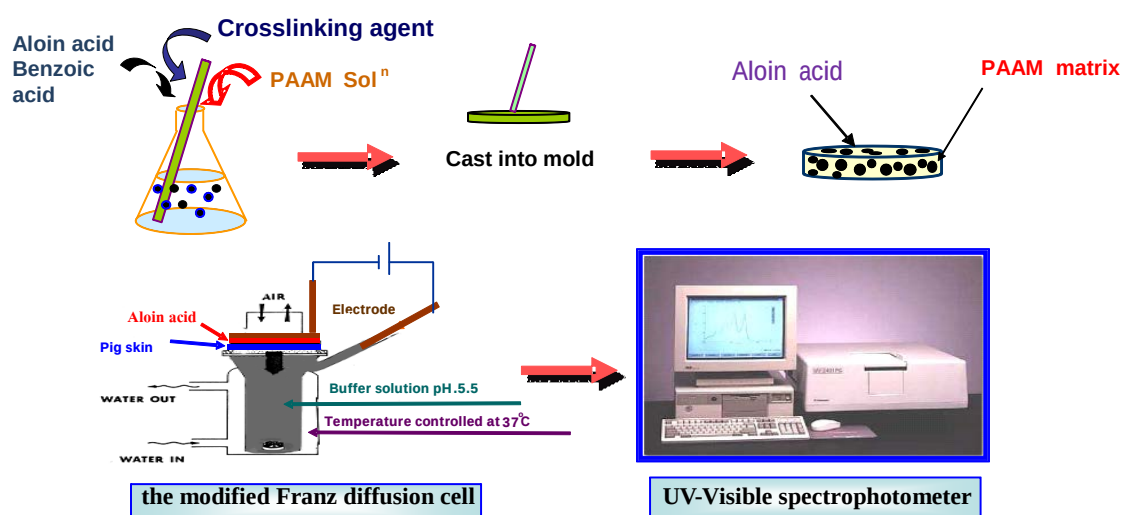
C_0 คือ ปริมาณยาที่บรรจุอยู่ในไฮโดรเจล (mg)

D คือ ค่าคงที่การแพร่ ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

3.5 การทดสอบพฤติกรรมการปลดปล่อยยาออกจากพอลิเมอร์ผสม

3.5.1 การทดสอบพฤติกรรมการปลดปล่อยยา

ทำการทดสอบโดยนำพอลิเมอร์ผสมที่เตรียมได้มาทดลองใช้กับสภาวะเลียนแบบผิวหนังมนุษย์ โดยใช้หนังหมูที่ตายแทนหนังคนที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 0 ,0.3 และ 0.5 V (เนื่องจากผลการทดลองจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าที่ความต่างศักย์มากกว่า 0.5 V นั้นรูพรุนของพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจลจะหดตัวเมื่อเพิ่มความต่างศักย์) [36] โดยจะทำการทดลองนำส่งยาที่อุณหภูมิ 37 °C และ ความเป็นกรดด่าง (pH) = 5.5 ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 วิธีทดสอบพฤติกรรมการปลดปล่อยยาจากพอลิอะคริลาไมด์ไฮโดรเจล [37]

3.5.2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

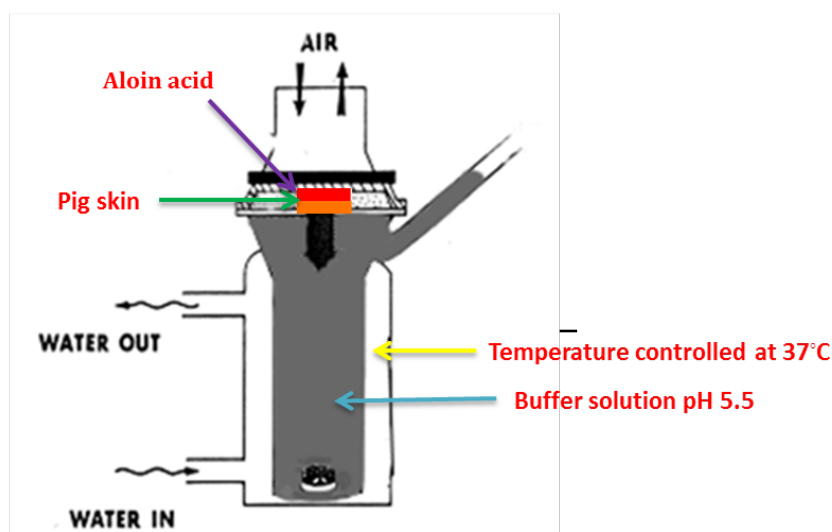
เพื่อเป็นการเตรียมสารละลายในสภาวะที่คล้ายกับผิวหนังมากที่สุด สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5.5 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด – ด่างที่ผิวหนังมนุษย์ถูกเตรียมขึ้น โดย น้ำกรดอะซิติก 7.5 มิลลิลิตร และโซเดียมอะซิเตท 75 กรัม

3.5.3 การเตรียมหนังหมูแทนผิวหนังมนุษย์

หนังหมูที่ตายแล้วถูกนำมาใช้แทนผิวหนังมนุษย์ โดยเลือกใช้หนังหมู บริเวณหน้าท้อง และควบคุมความหนาให้อยู่ประมาณ 1–1.5 มิลลิเมตร และนำมาลอกเอาเซลล์ไขมันและขนออก หลังจากนั้นนำหนังหมูที่เตรียมได้แช่ด้วยสารละลาย Normal saline, แล้วนำมา ซับน้ำออก ห่อไว้ในกระดาษฟลอยด์และเก็บไว้ในช่องแข็ง อุณหภูมิ 0 °C

3.5.4 การศึกษาการปลดปล่อยยา

การศึกษาการปลดปล่อยยาผ่านหนังหมูที่ตายแล้วนั้นทำ โดยใช้ Modified Franz diffusion cell ที่มีระบบควบคุมอุณหภูมิรอบเซลล์ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C ซึ่งเท่ากับ อุณหภูมิที่เลือดของมนุษย์ แสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 Modified Franz diffusion cell

3.5.5 วิเคราะห์และประมวลผล

นำผลการปลดปล่อยยามาประมวลผลเพื่อระบุประเภทของการแพร่และ คำนวณหาอัตราการแพร่และคำนวณค่าคงที่การแพร่ของการปลดปล่อยยาทั้งในระบบที่มีและไม่มี การกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าจากภายนอก

3.6 สรุปผลการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ของแผ่นไฮโดรเจลที่อัตราการเชื่อมโยงต่างๆ พฤติกรรมการปลดปล่อยยา ค่าคงที่การแพร่และกลไกการแพร่ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าจากภายนอก