บทที่ 3
การดำเนินโครงงานวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) Pluronic F-127
2) น้ำ DI (Deionized water)
3) สารละลาย PBS (Phosphate Buffer Solution, pH 7.2)
4) ยา Doxorubicin
5) ไคโตซาน (90% DD, M.W. = 5.5×10^5)
6) Succinic anhydride
7) 1-Ethyl-3-(3-dimethykaminopropyl)-carbodiimide (EDC)
8) N-Hydroxysuccinimide (NHS)
9) 4-Dimethylaminopyridine (DMAP)
10) 1,4-Dioxane
11) Triethylamine (TEA)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) เครื่อง Incubator shaker innova 4335 ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 20 °C
2) เครื่อง Magnetic stirrer Model Fisher และ Magnetic bar
3) เครื่อง Fourier Transform Infared (FTIR) Spectroscopy
4) เครื่องชั่งน้ำหนัก
5) เครื่องแก้ว

3.3 วิธีการทดลอง

<u>ส่วนที่ 1</u> ศึกษาการสังเคราะห์ Pluronic ® F-127 grafted Chitosan copolymer

1.) เตรียมสาร MP (Monocarboxy Pluronic F-127) โดยมีขั้นตอนดังนี้

— ชั่ง Pluronic® F-127 (4 mmol OH groups) แล้วนำมาผสมกับ Succinic anhydride (5mmol) โดยใช้ DMAP (4 mmol), TEA (4mmol) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และ 1,4-dioxane (30 ml) เป็นตัวทำละลาย

- กวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่งโมง จนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน
- นำสารละลายเนื้อเดียวที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออก (1,4 dioxane) ออกโดยใช้เครื่องระเหย desicator ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน

2.) เตรียมสาร AP (Activated Pluronic F-127) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- นำของแข็งสีขาว MP ที่เตรียมได้จากข้อ 1. มา (10.92 g) มาผสมกับ EDC (0.1658 g) โดยมี Acetic acid conc. เป็นตัวทำละลายปริมาณ 10 ml จากนั้นกวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 °C เป็นเวลานาน 15 นาที พอเสร็จผสม NHS ปริมาณ (0.0995 g) เพิ่มลงไปแล้วทำการกวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 °C เป็นเวลานาน 15 นาที จนกระทั่งเป็นสารละลายที่มีลักษณะใส และนำสารที่ได้ไปสังเคราะห์เป็น 5% Chitosan in copolymer ต่อไป
- นำของแข็งสีขาว MP ที่เตรียมได้จากข้อ 1. มา (10.3109 g) มาผสมกับ EDC (0.156 g) โดยมี Acetic acid conc. เป็นตัวทำละลายปริมาณ 10 ml จากนั้นกวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 °C เป็นเวลานาน 15 นาที พอเสร็จผสม NHS ปริมาณ(0.094 g) เพิ่มลงไปแล้วทำการกวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 °C เป็นเวลานาน 15 นาที จนกระทั่งเป็นสารละลายที่มีลักษณะใส และนำสารที่ได้ไปสังเคราะห์เป็น 10% Chitosan in copolymer ต่อไป
- นำของแข็งสีขาว MP ที่เตรียมได้จากข้อ 1. มา (5.2792 g) มาผสมกับ EDC (0.165 g) โดยมี Acetic acid conc. เป็นตัวทำละลายประมาณ 10 ml จากนั้นกวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 °C เป็นเวลานาน 15 นาที พอเสร็จผสม NHS ปริมาณ (0.048 g) เพิ่มลงไปแล้วทำการกวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 °C เป็นเวลานาน 15 นาที จนกระทั่งเป็นสารละลายที่มีลักษณะใส และนำสารที่ได้ไปสังเคราะห์เป็น 15% Chitosan in copolymer ต่อไป

3.) สังเคราะห์สารละลาย AP (Activated Pluronic F-127) กับไคโตซาน โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ชั่งไคโตซาน (90 %DD, 0.5747g) ผสมกับ Activated Pluronic® F-127 ตามข้อ 2.1) ที่เตรียมไว้ กวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พอเสร็จจะได้เป็น 5% Pluronic® F-127 grafted

Chitosan Copolymer ซึ่งมีลักษณะเป็นสารละลายใสและมีตะกอนสีเหลืองอยู่จำนวนมาก

- ชั่งไคโตซาน (90 %DD, 1.1456g) ผสมกับ Activated Pluronic® F-127 ตามข้อ 2.2) ที่เตรียมไว้ กวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พอเสร็จจะได้เป็น 10% Pluronic® F-127 grafted Chitosan Copolymer ซึ่งมีลักษณะเป็นสารละลายใสและมีตะกอนสีเหลืองอยู่จำนวนมาก
- ชั่งไคโตซาน (90 %DD, 0.9316g) ผสมกับ Activated Pluronic® F-127 ตามข้อ 2.1) ที่เตรียมไว้ กวนของผสมด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พอเสร็จจะได้เป็น 15% Pluronic® F-127 grafted Chitosan Copolymer ซึ่งมีลักษณะเป็นสารละลายใสและมีตะกอนสีเหลืองอยู่จำนวนมาก

4.) ทำการแยกตะกอนสีเหลืองออก โดยใช้วิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้

- นำสาร copolymer ที่ได้มาแยกตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยง Centrifuge membrane ใช้เวลาประมาณ 20 นาที ที่ความเร็วรอบประมาณ 6000 rpm
- นำสาร copolymer ที่ได้มาแยกตัวทำละลายออกโดยใช้การกรองผ่านกระดาษกรองธรรมดา
- นำสาร copolymer ที่ได้มาแยกตัวทำละลายออกโดยใช้การระเหยในระบบสุญญากาศ

<u>ส่วนที่ 2</u> การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR มีวิธีการเตรียมสารตัวอย่าง 2 แบบ ได้แก่ สารตัวอย่างที่เป็นของเหลวและของแข็ง

- สารตัวอย่างที่เป็นของเหลว สามารถเตรียมได้โดยสารตัวอย่างจะถูกหยดระหว่างแผ่นเกลือ 2 แผ่น จนเกิดเป็นฟิล์มที่มีความหนาประมาณ 0.01 มิลลิเมตรแล้วนำไปใส่ในเซลล์สำหรับใส่ของเหลว ซึ่งแผ่นเกลือนี้จะยินยอมให้อินฟาเรดทะลุผ่านแล้วจึงนำไปส่องในเครื่อง FTIR
- สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง สามารถเตรียมได้โดยการนำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อย(0.002 กรัม) ผสมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์แห้ง (0.1 กรัม) สารผสมจะ

ถูกอัดลงบนแผ่น trans parent disk ที่มีความดันสูง แล้วจึงนำไปส่องในเครื่อง FTIR

ส่วนที่ 3 ศึกษาความเป็นพิษของ copolymer ที่สังเคราะห์ได้

สำหรับการตรวจสอบค่าความเป็นพิษของสารที่สังเคราะห์ได้ ทำการตรวจสอบโดยวิธี MTT Cytotoxicity test ซึ่งเป็นวิธีใช้ terazolium-dye เป็นสีย้อมเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของตัวเซลล์ แล้วนำไปวัดค่า optical density ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยเซลล์ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือ Human demal skin fibroblast และเซลล์ 3T3 (mouse embryonic fibroblast)

ส่วนที่ 4 ศึกษาอัตราการละลาย (Dissolution rate) ของเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan

1) ชั่งน้ำหนักเจลพร้อมจานแก้วที่บรรจุ บันทึกค่าน้ำหนักเริ่มต้นของเจล (ชั่งน้ำหนักจานแก้วเปล่าก่อนนำไปบรรจุเจล pluronic)
2) นำจานแก้วที่มีเจลจุ่มลงไปในบีกเกอร์ขนาดใหญ่ที่บรรจุสารละลาย PBS ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C โดยใส่ลงไปในตู้ Incubator
3) เมื่อถึงเวลาที่กำหนด ยกจานแก้วออกจากบีกเกอร์ เทสารละลาย PBS ที่ยังเหลืออยู่ในจานแก้วออก นำจานแก้วไปชั่งน้ำหนัก (อย่างรวดเร็ว) บันทึกค่าน้ำหนักของเจลที่ชั่งได้
4) นำจานแก้วมาจุ่มลงในสารละลาย PBS และทำการทดลองซ้ำข้อ 3-4 จนกว่าเจลจะละลายหมด
5) พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักและความสูงของเจลกับเวลา
6) เปรียบเทียบผลการทดลองโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan แล้วทำการทดลองตามข้อ 1-4

ส่วนที่ 5 ศึกษาการปลดปล่อยยา Doxorubicin จากเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan ที่ความเข้มข้นของเจลต่าง ๆ

1) ผสมยา Doxorubicin กับเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan โดยผสมยาเข้ากับเจลในขณะที่เป็นของเหลว จากนั้นกวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer ใน Incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนได้สารละลายเนื้อเดียว เมื่อนำเจลมาไว้ที่ตู้ Incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C จะได้เจลที่มียาบรรจุอยู่

ความเข้มข้นของยาที่ทำการบรรจุลงไปในเจลจะอยู่ในหน่วย $\mu g / ml$ คือ น้ำหนักของยาต่อปริมาตรของน้ำที่ใช้เป็นตัวทำละลาย

2) นำสารละลายตัวอย่างไปไว้ในตู้ Incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C เพื่อให้กลายเป็นเจล จากนั้นเติมน้ำลงในภาชนะที่บรรจุเจลเพื่อเอายาที่ไม่ถูกบรรจุเข้าไปในเจลออก
3) เติมสารละลาย PBS ปริมาณ 4 ml ลงบนผิวของเจล เพื่อใช้เป็นสารละลายตัวกลางรองรับยาที่ถ่ายเทออกมาจากเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan
4) เมื่อถึงเวลาที่กำหนด นำสารละลาย PBS เก่าออกจากภาชนะ พร้อมกับใส่สารละลาย PBS ใหม่ ลงไปแทน
5) นำสารละลายเก่าในข้อ 3) ไปหาความเข้มข้นของยา Doxorubicin โดยใช้เครื่อง UV-Spectrophotometer

<u>การหาปริมาณของยา Doxorubicin</u> โดยใช้เครื่อง UV-Spectrophotometer

1. หาเส้น Calibration curve
    - เตรียมของผสมของสารละลาย PBS กับยา Doxorubicin ที่ความเข้มข้นต่างๆ
    - นำไปหาค่าความเข้มข้นของแสง (Intensity) ของยา Doxorubicin โดยใช้เครื่อง UV-Spectrophotometer ความยาวคลื่น 485 nm
    - พล็อตกราฟระหว่างค่าความเข้มแสง (I) กับความเข้มข้นของสารละลาย (C) จะได้ Calibration curve
2. นำค่าความเข้มของแสงที่ได้ไปหาความเข้มข้นของยา Doxorubicin โดยใช้ Calibration curve ที่ได้จากข้อ 1.

6) ทำการทดลองซ้ำข้อ 3) – 4) ที่เวลาต่าง ๆ จนเจลละลายหมด
7) พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยา Doxorubicin ที่ถูกปล่อยออกมาจากเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan กับเวลา
8) เปลี่ยนความเข้มข้นของเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan โดยให้ความเข้มข้นของยา Doxorubicin คงที่ ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 1) – 6) เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้