

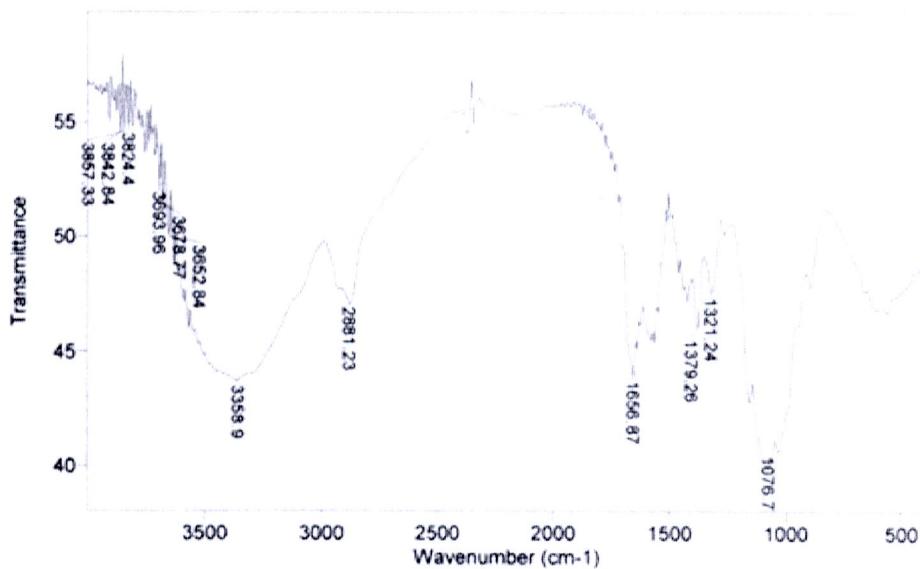
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ Functional group ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy ของสารต่าง ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์

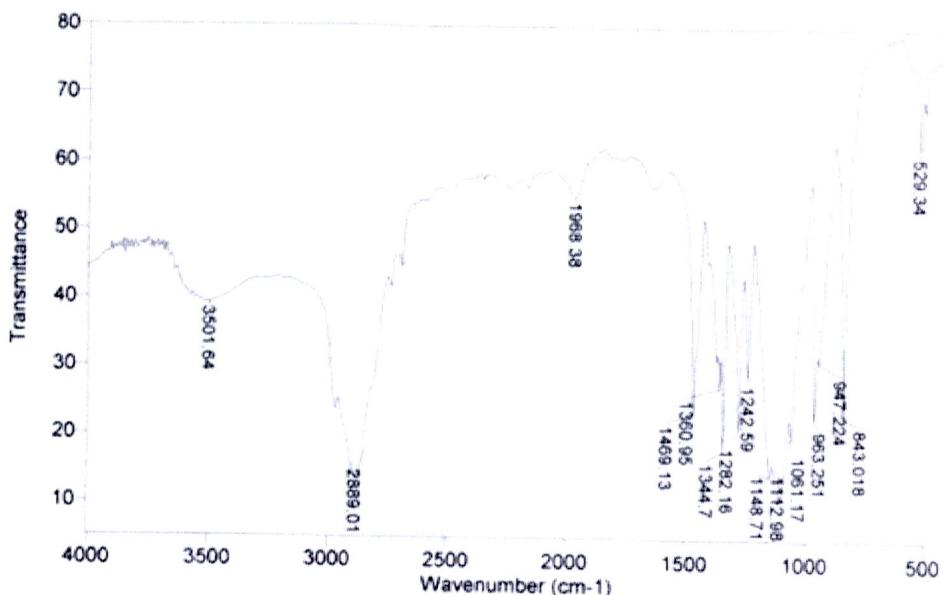
4.1.1 การวิเคราะห์ Functional group ของสารตั้งต้น

ในส่วนนี้เป็นการศึกษา Functional group ของ Chitosan และ Pluronic[®] F-127 โดยใช้เครื่อง FTIR เพื่อที่จะใช้ทำนายลักษณะของสารที่สังเคราะห์ได้ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 33 แสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Chitosan ด้วยเครื่อง FTIR

จากรูปที่ 33 ซึ่งเป็นกราฟ FTIR ของ Chitosan จะเห็นได้ว่ามี peak ช่วง wave number ประมาณ 1560-1640 cm^{-1} แสดงหมู่ amine (NH_2), peak ช่วง wave number ประมาณ 3100-3600 cm^{-1} แสดงหมู่ hydroxyl (OH) และ peak ช่วง wave number ประมาณ 1000-1300 cm^{-1} แสดงหมู่ ether (-O-) ซึ่งหมู่ functional group ที่ปรากฏทั้งหมดมีอยู่ในสูตร โครงสร้างของ chitosan

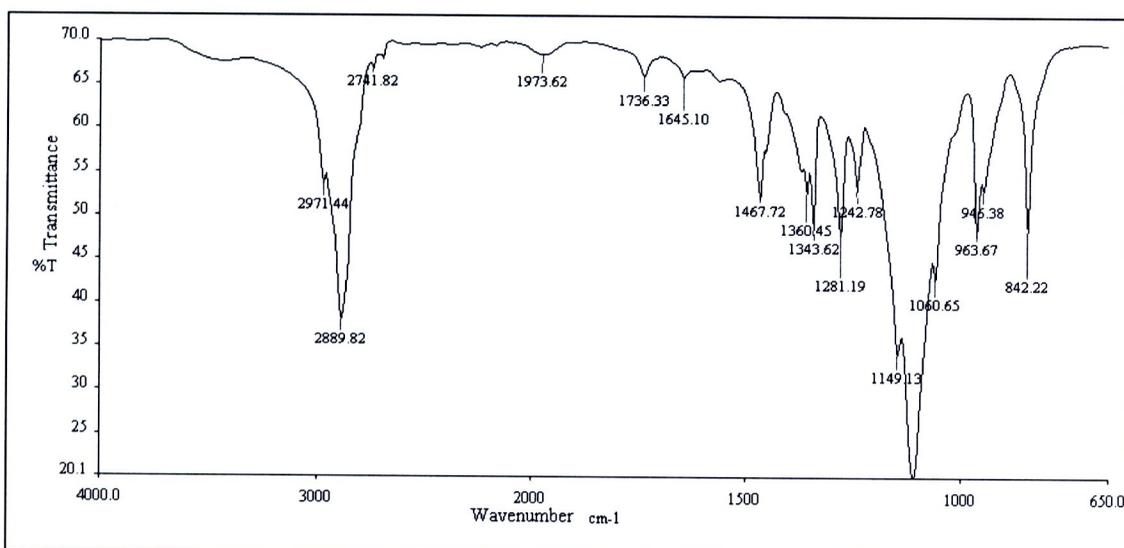


รูปที่ 34 แสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Pluronic® F-127 ด้วยเครื่อง FTIR

จากรูปที่ 34 ซึ่งเป็นกราฟ FTIR ของ Pluronic จะเห็นได้ว่ามี peak ช่วง wave number ประมาณ $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ แสดงหมู่ alkane (H-C-H) , peak ช่วง wave number ประมาณ $3100-3600\text{ cm}^{-1}$ แสดงหมู่ hydroxyl (OH) และ peak ช่วง wave number ประมาณ $1000 -1300\text{ cm}^{-1}$ แสดงหมู่ ether (-O-) ซึ่งหมู่ functional group ที่ปรากฏทั้งหมดมีอยู่ในสูตรโครงสร้างของ Pluronic® F-127

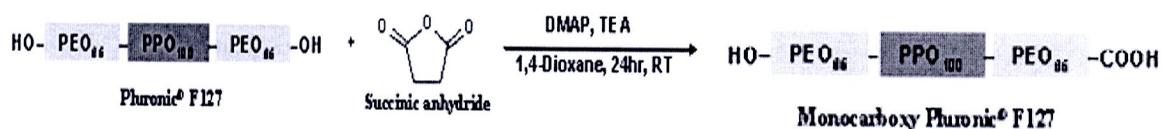
4.1.2 การวิเคราะห์ Functional group ของ Monocarboxy pluronic® F-127

ในส่วนนี้เป็นการศึกษา Functional group ของ Monocarboxy pluronic® F-127 ที่ได้จากการสังเคราะห์ Pluronic® F-127 กับ succinic anhydride โดยใช้ 1,4- dioxane เป็นตัวทำละลาย และ TEA กับ DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อต้องการให้หมู่ OH ใน Pluronic® F-127 กลายเป็นหมู่ COOH เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาต่อเป็น Activated pluronic ซึ่งจะเป็นตัวทำปฏิกิริยากับ Chitosan ต่อไป จะพบว่าสารที่ได้มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ คือมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นและเมื่อนำสารละลายที่ได้ไปประเหยตัวทำละลายออกจะได้ตะกอนสีขาวขุ่นของ Monocarboxy pluronic® F-127 (MP) นำไปตรวจสอบ functional group ด้วยเครื่อง FTIR ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 35

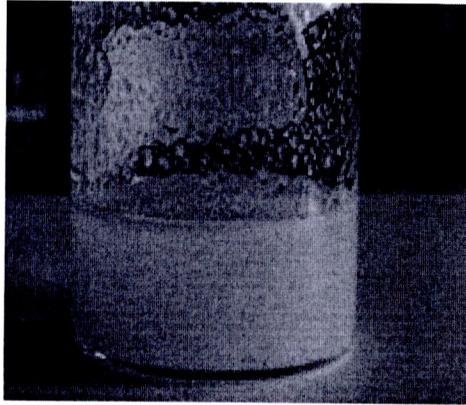


รูปที่ 35 แสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Monocarboxy pluronic® F-127 ด้วยเครื่อง FTIR

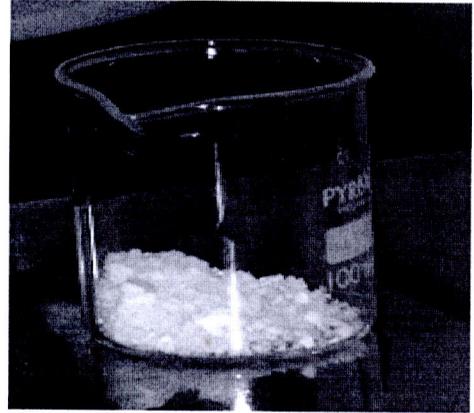
จากรูปที่ 35 ซึ่งเป็นกราฟ FTIR ของ Monocarboxy Pluronic® F-127 จะเห็นได้ว่ามี peak ช่วง wave number ประมาณ $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ได้แสดงหมู่ alkane (H-C-H) , peak ช่วง wave number ประมาณ $3100-3600 \text{ cm}^{-1}$ แสดงหมู่ hydroxyl (OH) และ peak ช่วง wave number ประมาณ $1000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ แสดงหมู่ ether (-O-) และพบว่าในช่วง wave number ประมาณ $1646 - 1730 \text{ cm}^{-1}$ แสดงหมู่ carboxylic (COOH) ซึ่งตรงกับสูตรทางโครงสร้างของ ของ Monocarboxy Pluronic® F-127 ที่ได้จากการสังเคราะห์ Pluronic® F-127 กับ Succinic anhydride โดยใช้ DMAP และ TEA เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้ 1,4-dioxane เป็นตัวทำละลาย ดังสมการ



ดังนั้น ตะกอนสีขาวขุ่นที่สังเคราะห์ได้ในขั้นตอนนี้เป็น Monocarboxy Pluronic® F-127 ซึ่งจะนำไปทำปฏิกิริยาต่อเป็น Activated pluronic® F-127 ที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Pluronic® F-127 grafted Chitosan ต่อไป



(a)

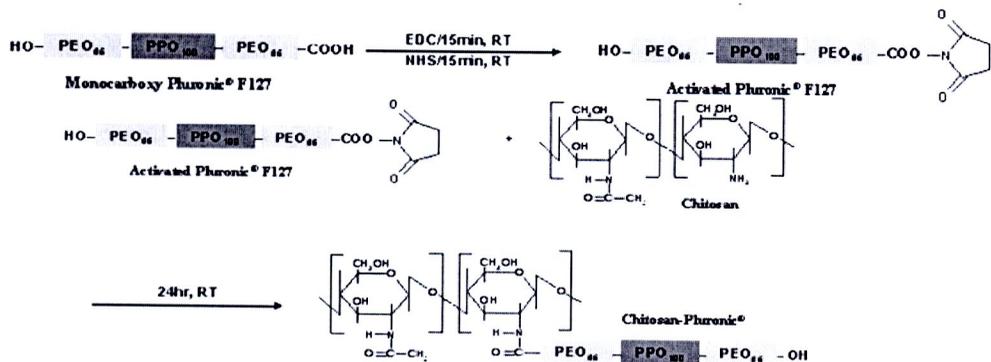


(b)

รูปที่ 36 (a) แสดงสารละลายคอลลอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ Monocarboxy Pluronic® F-127 (b) แสดงตะกอนสีขาวขุ่น Monocarboxy Pluronic® F-127 ที่ได้จากการระเหยตัวทำละลายออกไป

4.1.3 การวิเคราะห์ Functional group ของ Activated pluronic® F-127 และ Copolymer

กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการทดลองสังเคราะห์ Pluronic® F-127 grafted Chitosan copolymer โดยใช้วิธี EDC/NHS โดยนำของแข็งสีขาวคือ Monocarboxy pluronic® F-127 ที่เตรียมได้มาทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ EDC และ NHS โดยตัวทำละลายที่ใช้คือ conc. Acetic acid เพื่อเปลี่ยนหมู่ functional group จาก COOH ให้กลายเป็นหมู่ $\text{COO}-\text{N}$ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15 นาที ดังสมการ



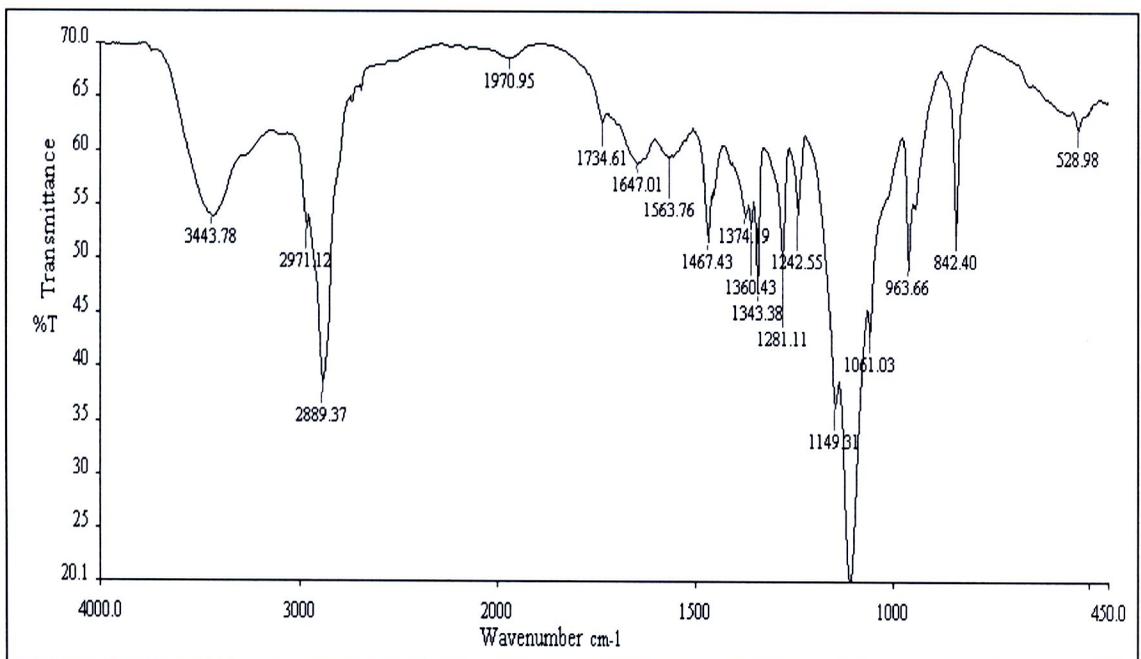
จากนั้นจึงนำ Activated pluronic® F-127 ที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อกับ Chitosan ทันทีเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง สารที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นสารละลายใสและมีตะกอนสีเหลืองอยู่เป็นจำนวนมาก ดังแสดงในรูปที่ 37 แล้วนำ Copolymer ที่สังเคราะห์ได้ไปแยกเอาตัวทำละลายออกโดยใช้วิธีการต่างๆ ดังนี้

- (a) การระเหยในระบบสุญญากาศ
- (b) กระดาษกรอง
- (c) Centrifuge membrane



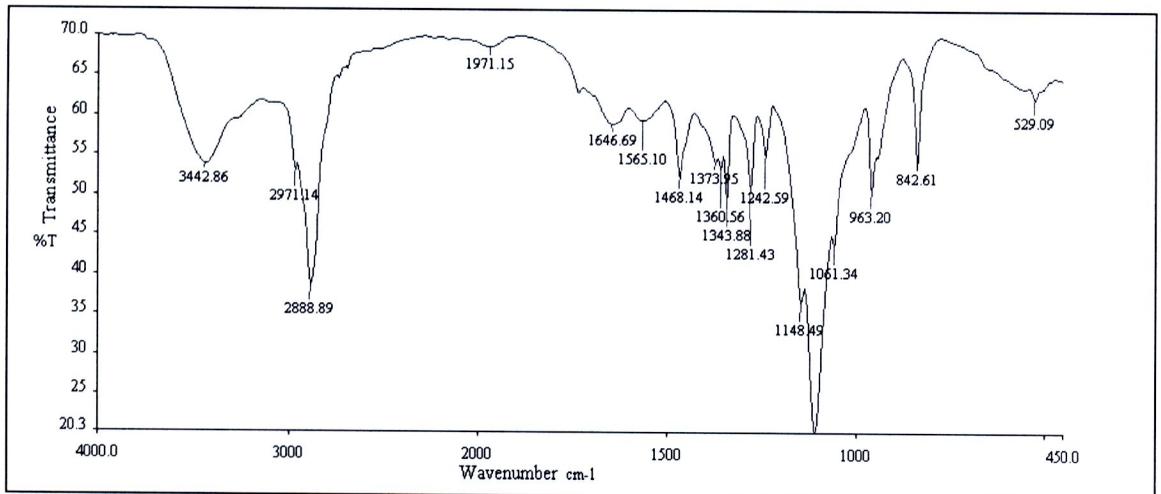
รูปที่ 37 แสดงสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์ Pluronic® F-127 grafted Chitosan copolymer

สำหรับ (a) การระเหยในระบบสุญญากาศ สารที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นสารละลายใส และมีตะกอนสีเหลือง เมื่อนำ Copolymer ที่สังเคราะห์ได้ไปแยกตัวทำละลายออกโดยการระเหยในระบบสุญญากาศจนได้ผงของแข็งสีเหลืองอ่อนจากนั้นนำไปตรวจสอบ Functional group ด้วยเครื่อง FTIR พบว่าผลที่มีลักษณะดังรูปที่ 38



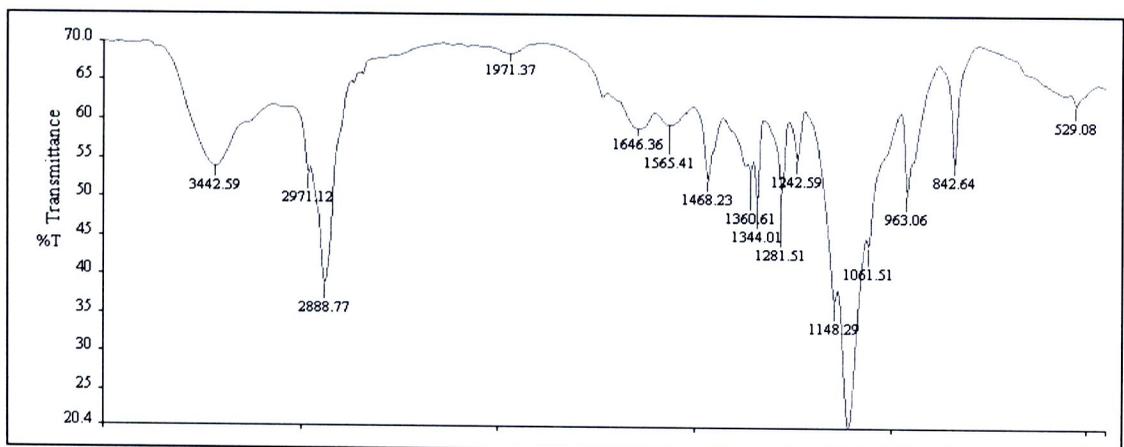
รูปที่ 38 แสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Pluronic® F-127 grafted Chitosan copolymer ที่ได้จากวิธีระเหยในระบบสุญญากาศ ด้วยเครื่อง FTIR

สำหรับ (b) การระเหยผ่านกระดาษกรอง สารที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นสารละลายใสและมีตะกอนสีเหลืองเมื่อนำ Copolymer ที่สังเคราะห์ได้ไปแยกตัวทำละลายออกโดยใช้วิธีการกรองผ่านกระดาษกรองแบบสุญญากาศจนได้ผงของแข็งสีเหลืองอ่อนจากนั้นนำไปตรวจสอบ Functional group ด้วยเครื่อง FTIR พบว่าผลที่มีลักษณะดังรูปที่ 39



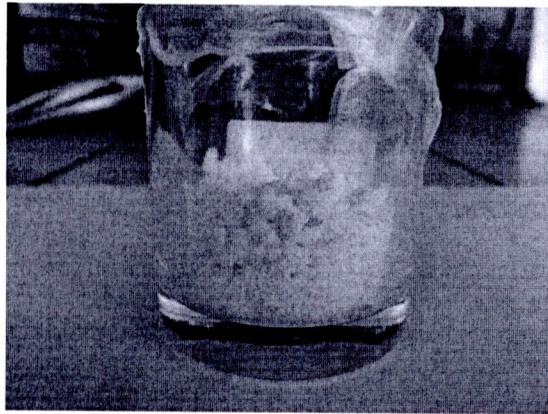
รูปที่ 39 แสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan copolymer ที่ได้จากวิธีการกรองผ่านกระดาษกรอง ด้วยเครื่อง FTIR

สำหรับ (c) Centrifuge membrane สารที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นสารละลายใสและมีตะกอนสีเหลืองเมื่อนำ Copolymer ที่สังเคราะห์ได้ไปแยกตัวทำละลายออกโดย Centrifuge membrane จนได้ผงของแข็งสีเหลืองอ่อนจากนั้นนำไปตรวจสอบ Functional group ด้วยเครื่อง FTIR พบว่าผลที่มีลักษณะดังรูปที่ 40

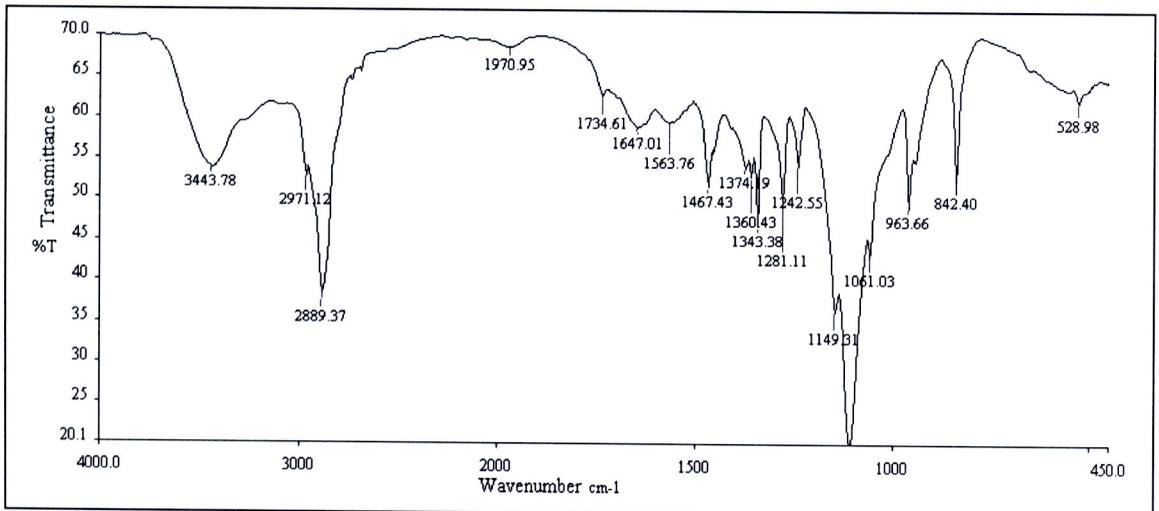


รูปที่ 40 แสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan copolymer ที่ได้จากวิธี Centrifuge membrane ด้วยเครื่อง FTIR

จากรูปซึ่งแสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Pluronic® F-127 grafted Chitosan copolymer ด้วยเครื่อง FTIR โดยรูป 38 ใช้วิธีระเหยแบบสุญญากาศ รูป 39 ใช้กระดาษกรอง และรูป 40 ใช้วิธี Centrifuge membrane จะพบว่าลักษณะของกราฟที่ได้มีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตะกอนสีเหลืองที่แยกออกจากสารละลายใส่นั้นเป็นสารชนิดเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ามีตัวทำละลาย EDC/NHS หลงเหลืออยู่น้อยมาก ดังนั้น วิธีการแยกเอาตะกอนสีเหลืองออกจากสารละลายใสไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ Pluronic® F-127 grafted Chitosan copolymer

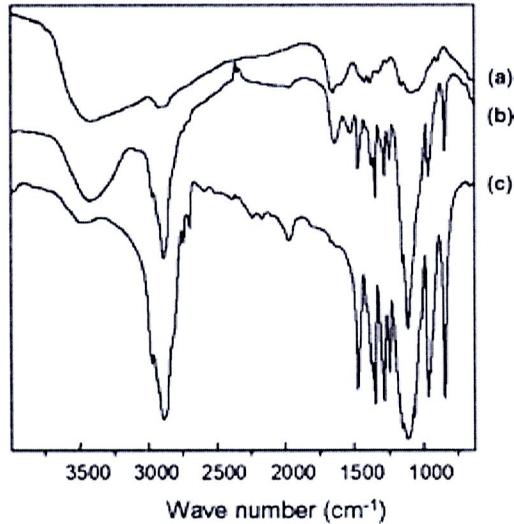


รูปที่ 41 แสดงผงโคโพลิเมอร์ที่ได้หลังจากแยกตัวทำละลายออกไป



รูปที่ 42 แสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Pluronic® F-127 grafted Chitosan copolymer ด้วยเครื่อง FTIR

จากรูปที่ 42 ซึ่งแสดงผลการตรวจสอบ functional group ของ Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan copolymer ด้วยเครื่อง FTIR จะเห็นได้ว่าลักษณะกราฟที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกันกับกราฟที่ได้จากงานวิจัยที่มีผู้ได้ทำการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้แล้วดังแสดงในรูปที่ 43 เส้นกราฟ (b.) คือมี peak เกิดขึ้นที่ตำแหน่งประมาณ wave number 1563 cm^{-1} และ 1647 cm^{-1} ซึ่งแสดงหมู่ CONH ที่มีอยู่ในโครงสร้างของ Copolymer



รูปที่ 43 แสดงผลการตรวจสอบ functional group (a) Chitosan (b) Chitosan-Pluronic (c) Pluronic ด้วยเครื่อง FTIR ของงานวิจัยที่ผ่านมา

4.2 ทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity) ของ Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan

ในส่วนนี้ได้นำผงของโคโพลิเมอร์ที่มีปริมาณโคโดซานอยู่ 15 % w/w และเจลดโคพอลิเมอร์ ความเข้มข้น 25% w/w โดยมีปริมาณของโคโดซานอยู่ 15 % w/w ไปตรวจสอบความเป็นพิษ (toxicity) กับเซลล์ 3T3 (mouse embryonic fibroblast) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ว่ามีผลข้างเคียงกับเซลล์ดังกล่าวมากน้อยเพียงใด โดยได้ส่งไปตรวจสอบที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (biotech) โดยทำการตรวจสอบความเป็นพิษ (toxicity) ด้วยวิธี MTT cytotoxicity test ซึ่งเป็นการวิเคราะห์แบบ colorimetric microtitration ที่ใช้สีย้อม tetrazolium เป็นตัวอ้างอิง โดยเซลล์ที่มีความสามารถในการเมทาบอลิซึม จะทำให้ tetrazolium (สีเหลือง) กลายเป็น formazan (สีฟ้า) ซึ่งการเปลี่ยนสีนี้จะวัดได้ด้วยวิธี spectrophotometric ที่มาพร้อมกับแผ่นอ่าน โดยสมมติให้เซลล์ที่ไม่เกิดเมทาบอลิซึมจะไม่รอดชีวิต ดังนั้นการวิเคราะห์แบบ MTT จึงเป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตแบบทางอ้อม เซลล์จะถูกเพาะในจานเลี้ยงเชื้อที่มี 96 หลุม โดยในแต่ละหลุมจะให้หมีเซลล์อยู่ 3,000 เซลล์ และบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆจะถูกใส่ลงไปในเซลล์และบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบจะถูกนำออกมาจากเซลล์เพาะเชื้อ และเซลล์จะถูกนำไปบ่มเชื้อต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ในตัวกลางใหม่ หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT โดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm ผลที่ได้จะแสดงให้เห็นในตารางที่ 5 และตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกเพาะเชื้อที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับค่าที่ควบคุมและค่า IC₅₀

Sample	Concentration (mg/ml)	Mean OD	SD	% Survival	IC ₅₀ (mg/ml)
15% copolymer	10	0.799	0.049	74	>10
	5	0.795	0.081	74	
	2.5	0.947	0.074	88	
	1.25	0.963	0.099	89	
	0.625	1.007	0.076	93	
	0.3125	0.938	0.056	87	
	0.156	0.914	0.044	85	
	0.078	0.956	0.071	89	
Negative control	Medium	1.068	0.023	100	

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นของโคโพลิเมอร์ 10 ถึง 0.078 mg/ml (น้ำหนักของผงโคพอลิเมอร์ 15 %wt Chitosan ต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากผลการทดลองแสดงให้เห็น

เห็นว่าผงโคโพลิเมอร์ 15 %wt Chitosan ไม่มีความเป็นพิษต่อเส้นเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของมนุษย์ จนกระทั่งถึง 10 mg/ml และค่า IC_{50} ของตัวอย่างมีค่ามากกว่า 10 mg/ml หมายความว่าเมื่อความเข้มข้นของผลโคโพลิเมอร์มีค่ามากกว่า 10 mg/ml จะมีเซลล์ตายไปทั้งหมด 50 % ของเซลล์ทั้งหมด

ตารางที่ 6 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ ที่ถูกเพาะเชื้อที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับค่าที่ควบคุมและค่า IC_{50}

Sample	Concentration (mg/ml)	Mean OD	SD	% Survival	IC_{50} (mg/ml)
Gel copolymer	100	0.017	0.013	1	63.3
	50	1.305	0.154	70	
	25	1.517	0.197	81	
	12.5	1.658	0.388	89	
	6.25	1.732	0.363	93	
	3.125	2.013	0.479	107	
	1.56	1.702	0.390	91	
	0.78	1.938	0.326	104	
Negative control	Medium	1.8695	0.2255	100	

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 3T3 (mouse embryonic fibroblast) ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นของเจลโคโพลิเมอร์ 100 – 0.78 mg/ml (น้ำหนักของเจลโคโพลิเมอร์ที่มีความเข้มข้น 25 %w/w (15 %wt Chitosan) ต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งจะได้ว่า IC_{50} ของโคโพลิเมอร์ คือ 63.3 mg/ml หมายความว่าความเข้มข้น 63.3 mg/ml ของเจลโคโพลิเมอร์ มีเซลล์ตายไปทั้งหมด 50 % ของเซลล์ทั้งหมด

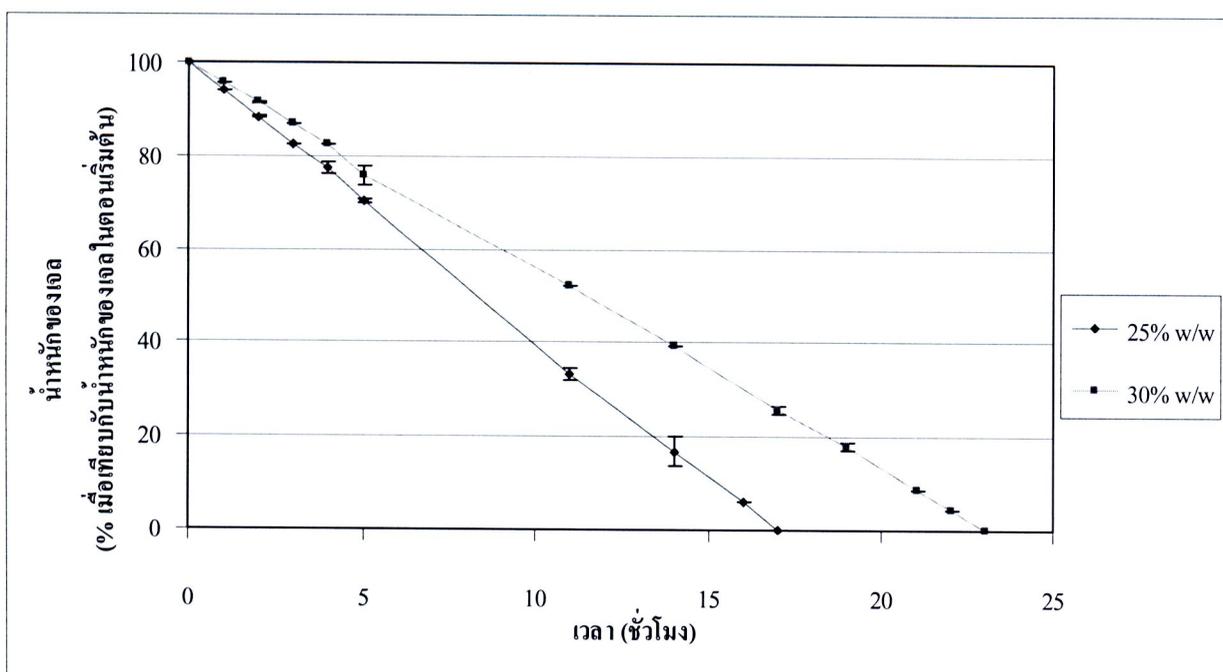
จากการตรวจสอบความเป็นพิษของโคโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้นั้นจะช่วยทำให้เลือกใช้ปริมาณของโคโพลิเมอร์ที่เหมาะสม ซึ่งจะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย โดยดูจากค่า IC_{50} เป็นหลัก ซึ่งปริมาณของโคโพลิเมอร์ที่เลือกใช้นั้นจะต้องมีปริมาณน้อยกว่าค่า IC_{50} ดังนั้นจะสามารถที่จะนำโคโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไปในการปลดปล่อยยาโรคมะเร็งได้ โดยต้องทำการเลือกใช้โคโพลิเมอร์ในปริมาณที่เหมาะสม

4.3 ลักษณะอัตราการสลายตัวของเจล Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan copolymer

ในส่วนนี้จะเป็นการศึกษาอัตราการสลายตัวของเจล Copolymer โดยยังไม่ให้ความสนใจกับอัตราการปลดปล่อยยา นั่นคือ จะคำนึงถึงเฉพาะส่วนของเจลที่มีการละลายออกสู่สารละลาย medium เท่านั้น โดยจะทำการเปรียบเทียบอัตราการสลายตัวของเจล Pluronic กับ เจล Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan copolymer ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

4.3.1 เปรียบเทียบลักษณะทางจลนศาสตร์และอัตราการลดลงของน้ำหนักของเจล Pluronic[®] F-127 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ในการทดลองส่วนนี้เป็นการศึกษาอัตราการลดลงของน้ำหนักของเจล Pluronic[®] F-127 ที่มีความเข้มข้น 25% w/w และ 30% w/w โดยใช้สารละลาย Phosphate Buffer Solution (PBS) เป็นสารละลาย Medium ผลการทดลองที่ได้จะแสดงเป็นน้ำหนักของเจลที่เวลาต่าง ๆ กัน เมื่อเทียบกับน้ำหนักของเจลในตอนเริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 44

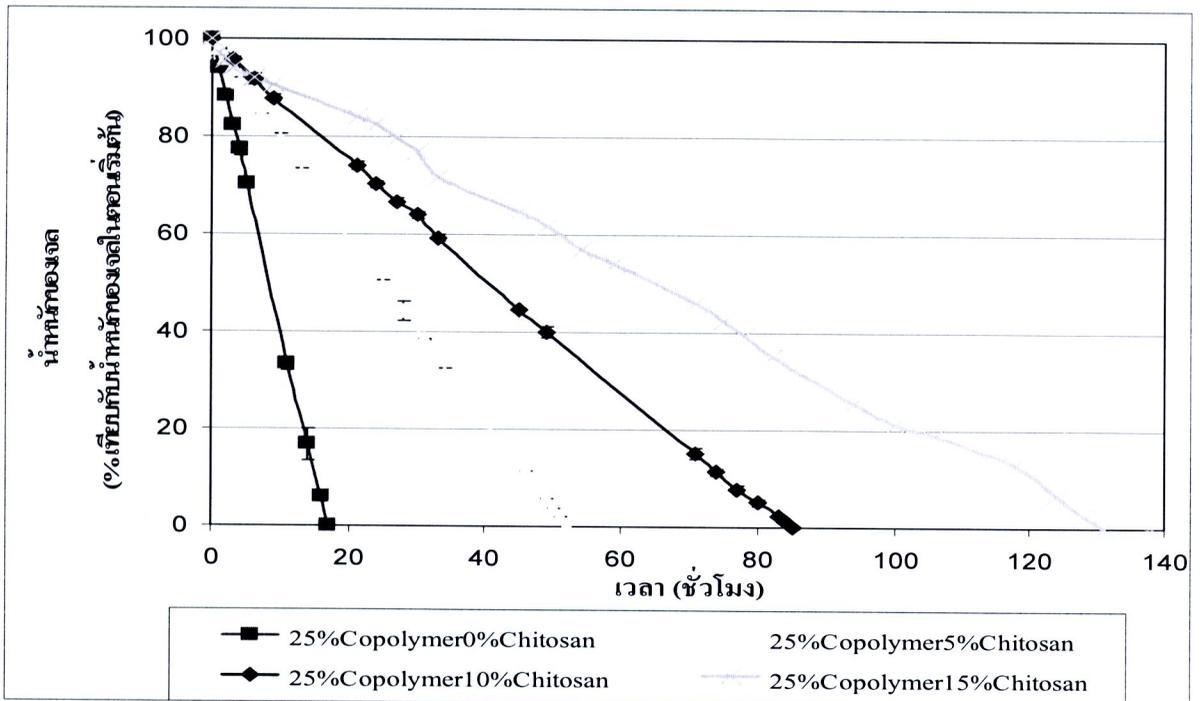


รูปที่ 44 กราฟแสดงการเปรียบเทียบลักษณะและอัตราการลดลงของน้ำหนักของเจล Pluronic[®] F-127 ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

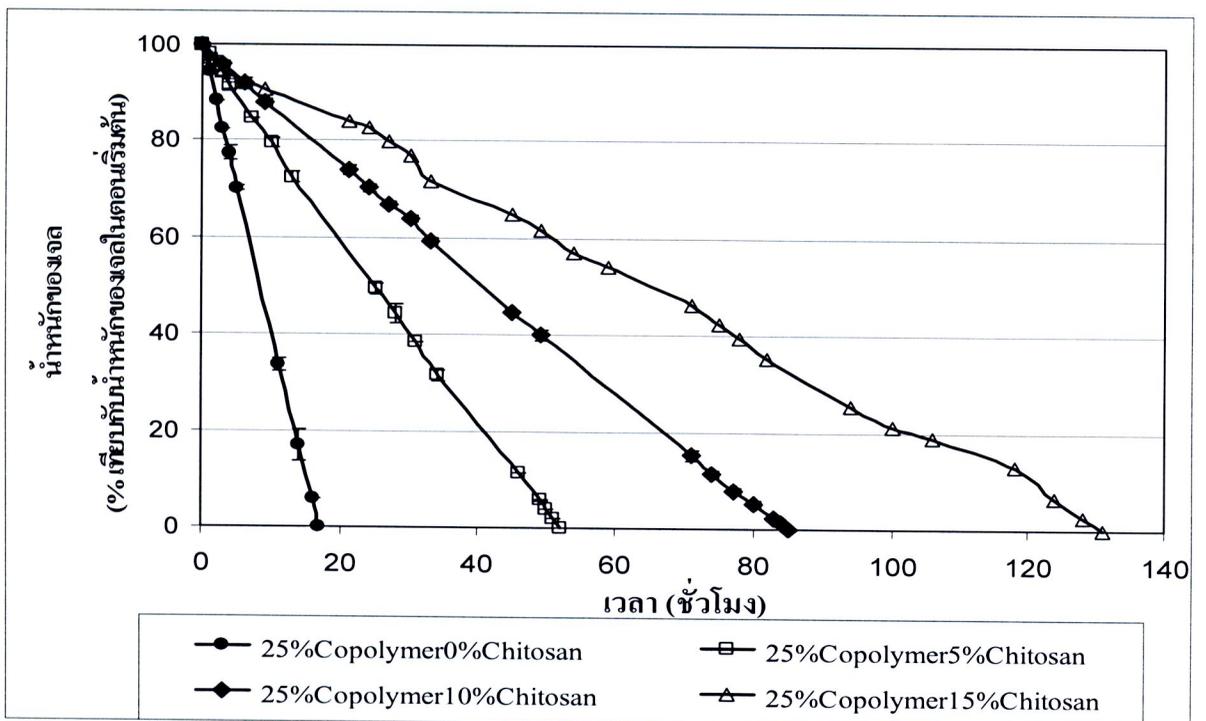
จากผลการทดลองพบว่า เจล Pluronic[®] F-127 จะมีอัตราการลดลงของน้ำหนักของเจลหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คืออัตราการละลายของเจลแปรผกผันกับความเข้มข้นของเจล นั่นคือเจลที่มีความเข้มข้นมากจะมีอัตราการละลายช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นน้อย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเจลที่มีความเข้มข้นมากจะมีไมเซลล์ที่เกาะและเกี่ยวพันกันอยู่เป็นจำนวนมากและอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น [ธีรยุทธ, 2548] การละลายของเจล Pluronic[®] F-127 จะเกิดจากการที่สารละลาย Medium ซึ่งในที่นี้ก็คือสารละลาย Phosphate Buffer Solution (PBS) ค่อย ๆ แทรกซึมเข้ามายังเจลและทำการคลายการเกี่ยวพันของไมเซลล์ให้หลุดออกจากกันและละลายออกมาสู่สารละลาย PBS ดังนั้น การที่สารละลาย PBS จะคลายเกี่ยวพันของเจลที่มีความเข้มข้นมากซึ่งจะมีจำนวนและความหนาแน่นของไมเซลล์มากนั้นเป็นไปได้ยากกว่าเจลที่มีความเข้มข้นน้อยที่มีจำนวนและความหนาแน่นของไมเซลล์น้อยกว่า ส่งผลให้อัตราการละลายของเจลที่มีความเข้มข้นสูงจะช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ในส่วนของการทดลองนี้พบว่าเจล Pluronic[®] F-127 มีการสลายตัวนานที่สุดเพียง 23 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าเป็นผลที่ยังไม่ดีมากนัก เนื่องจากการพัฒนาระบบการปลดปล่อยยามาใช้นั้นต้องการให้มีคุณสมบัติในการให้ยาได้ยาวนาน เพราะฉะนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการผสมเจล Pluronic[®] F-127 เข้ากับ Chitosan โดยให้ Chitosan เป็น Backbone เพื่อยืดระยะเวลาในการสลายตัวของเจลได้นานมากขึ้น ซึ่งผลการทดลองจะแสดงในส่วนต่อไป

4.3.2 เปรียบเทียบลักษณะทางจลนศาสตร์และอัตราการลดลงของน้ำหนักของเจล Copolymer ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางจลนศาสตร์ (Dissolution kinetic profile) และอัตราการลดลงของน้ำหนักเจล Copolymer ที่มีความเข้มข้น 25% w/w และ 30% w/w โดยใช้สารละลาย Phosphate Buffer Solution (PBS) เป็นสารละลาย Medium ผลการทดลองที่ได้จะแสดงเป็นน้ำหนักของเจล ณ จุดเวลาต่าง ๆ เมื่อเทียบกับน้ำหนักของเจลในตอนเริ่มต้น แสดงดังรูปที่ 44 และรูปที่ 45



รูปที่ 45 กราฟแสดงการเปรียบเทียบลักษณะและอัตราการลดลงของน้ำหนักรงเจลโคโพลิเมอร์ที่ความเข้มข้นของโคโพลิเมอร์ 25 %w/w ที่ปริมาณของไคโตซานในโคโพลิเมอร์ที่ต่างกัน



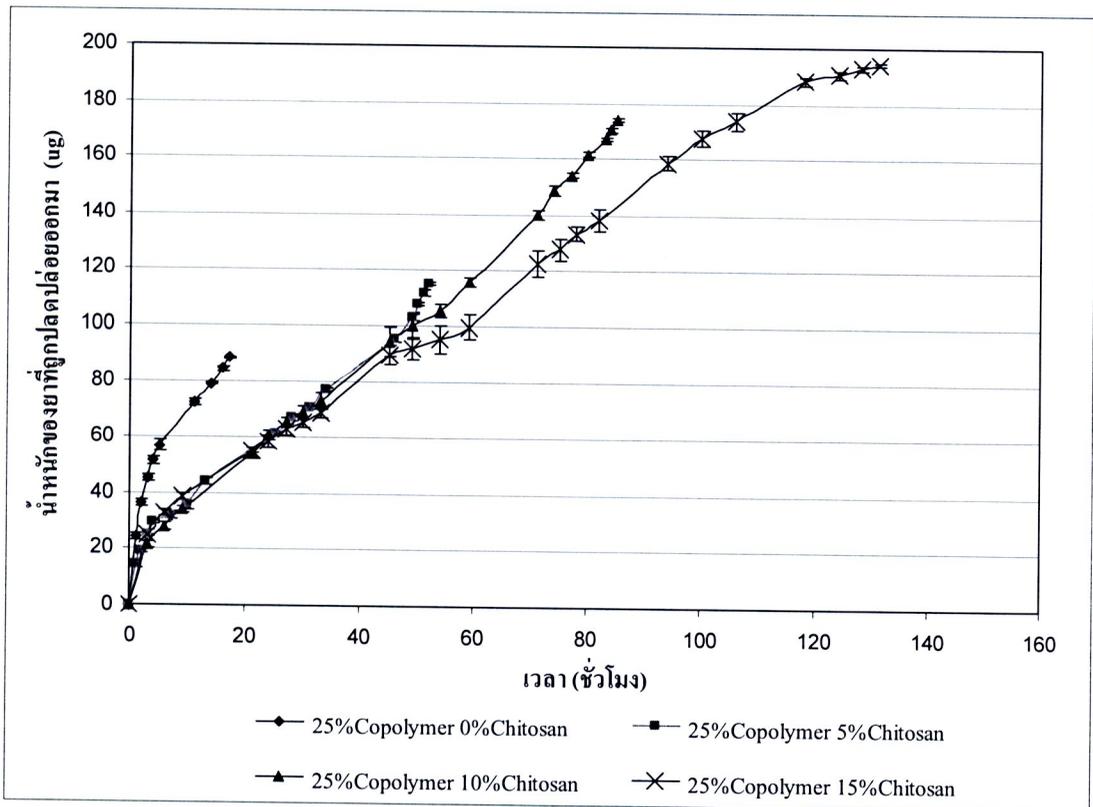
รูปที่ 46 กราฟแสดงการเปรียบเทียบลักษณะและอัตราการลดลงของน้ำหนักรงเจลโคโพลิเมอร์ที่ความเข้มข้นของโคโพลิเมอร์ 25 %w/w ที่ปริมาณของไคโตซานในโคโพลิเมอร์ที่ต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่าเจล Copolymer จะมีอัตราการละลายแปรผกผันกับความเข้มข้นของเจล กล่าวก็คือ เจลที่มีความเข้มข้นมากจะมีอัตราการละลายช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นน้อย เช่นเดียวกับเจล Pluronic[®] F-127 อธิบายได้จากการรวมตัวของไมเซลล์ของเจลโคพอลิเมอร์ [ธนา, 2549] นั่นคือ ใน Copolymer ที่มีปริมาณ Chitosan เท่ากัน ความเข้มข้นของเจลโคพอลิเมอร์ 25% w/w จะมีขนาดของไมเซลล์ใหญ่และมีความหนาแน่นน้อยกว่าเจลที่มีความเข้มข้นเจลโคพอลิเมอร์ 30 %w/w จึงทำให้สารละลาย PBS สามารถแทรกซึมเข้ามายังเจลโคพอลิเมอร์ แล้วทำการคลายการเกี่ยวพันของไมเซลล์ให้หลุดออกจากกันได้ง่ายกว่าในเจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงทำให้ระยะเวลาในการสลายตัวเร็วกว่า

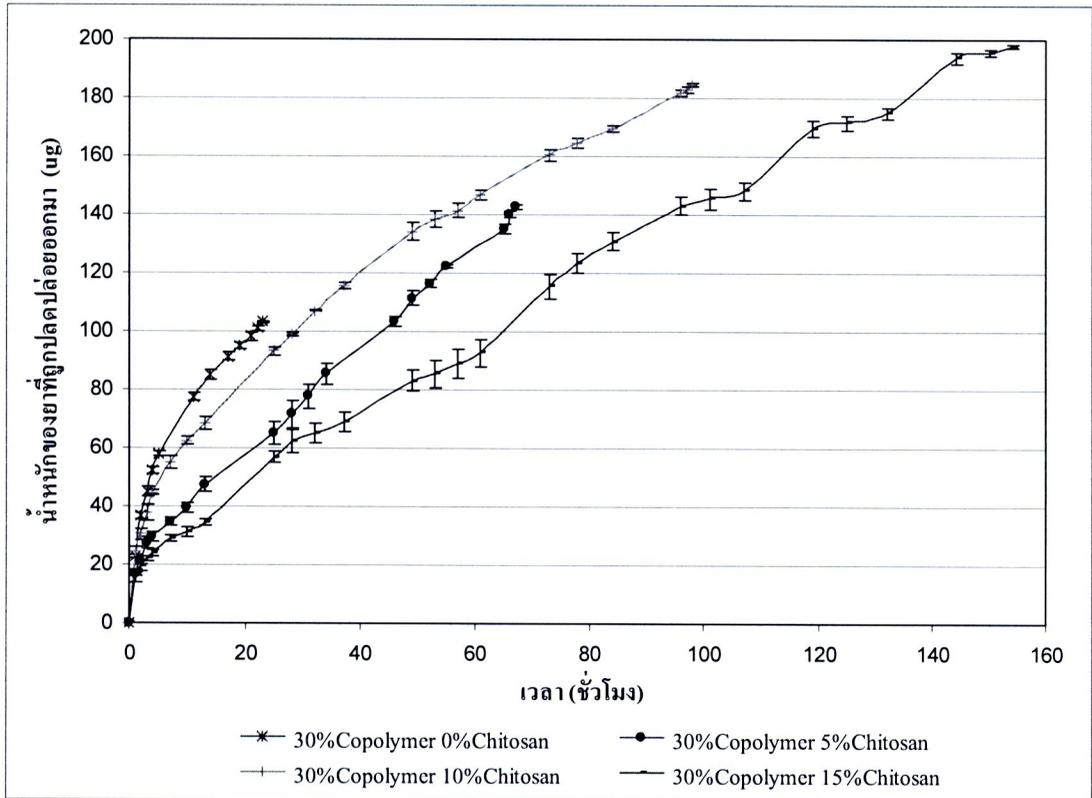
เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่าปริมาณของไคโตซานในเจลโคพอลิเมอร์จะแปรผกผันกับอัตราการละลายของเจล คือ เจลโคพอลิเมอร์ที่มีปริมาณไคโตซานเพิ่มขึ้นจะมีอัตราการละลายของเจลช้าลง และจะมีอัตราการละลายของเจลโคพอลิเมอร์ช้ากว่าอัตราการละลายของเจล Pluronic[®] F-127 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการผสม Chitosan เข้าไปกับ Pluronic[®] F-127 ทำให้ Chitosan เข้าไปเป็น Backbone ให้กับ Copolymer และจากการที่ Chitosan มีโครงสร้างที่เป็นเมทริกซ์จะช่วยให้อัตราการสลายตัวของ Pluronic[®] F-127 ช้าลง จึงช่วยยืดระยะเวลาในการสลายตัวของเจล Copolymer ได้ เมื่อปริมาณของไคโตซานเพิ่มขึ้น จะทำให้มีโครงสร้างที่เป็นเมทริกซ์เพิ่มมากขึ้นซึ่งจะทำให้อัตราการละลายของเจลช้าลงด้วย

4.4 ลักษณะอัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin จากเจล Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan Copolymer

ในส่วนนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาอัตราการปลดปล่อยยา doxorubicin ที่มีความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ หรือผสมกับยาในปริมาณ 200 μg จากเจล Copolymer ที่มีความเข้มข้น 25% w/w และ 30% w/w ซึ่งประกอบไปด้วยปริมาณของ Chitosan 5% wt, 10% wt และ 15% wt ใน Copolymer โดยใช้สารละลาย Phosphate Bufferr Solution (PBS) เป็นสารละลาย Medium ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 47 และรูปที่ 48 ซึ่งแสดงอัตราการปลดปล่อยยาจากเจลชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 47 กราฟแสดงลักษณะการปลดปล่อยยา Doxorubicin ของเจล Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan Copolymer ที่ความเข้มข้น 25% w/w ซึ่งมีปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 48 กราฟแสดงลักษณะการปลดปล่อยยา Doxorubicin ของเจล Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan Copolymer ที่ความเข้มข้น 30% w/w ซึ่งมีปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer ที่แตกต่างกัน

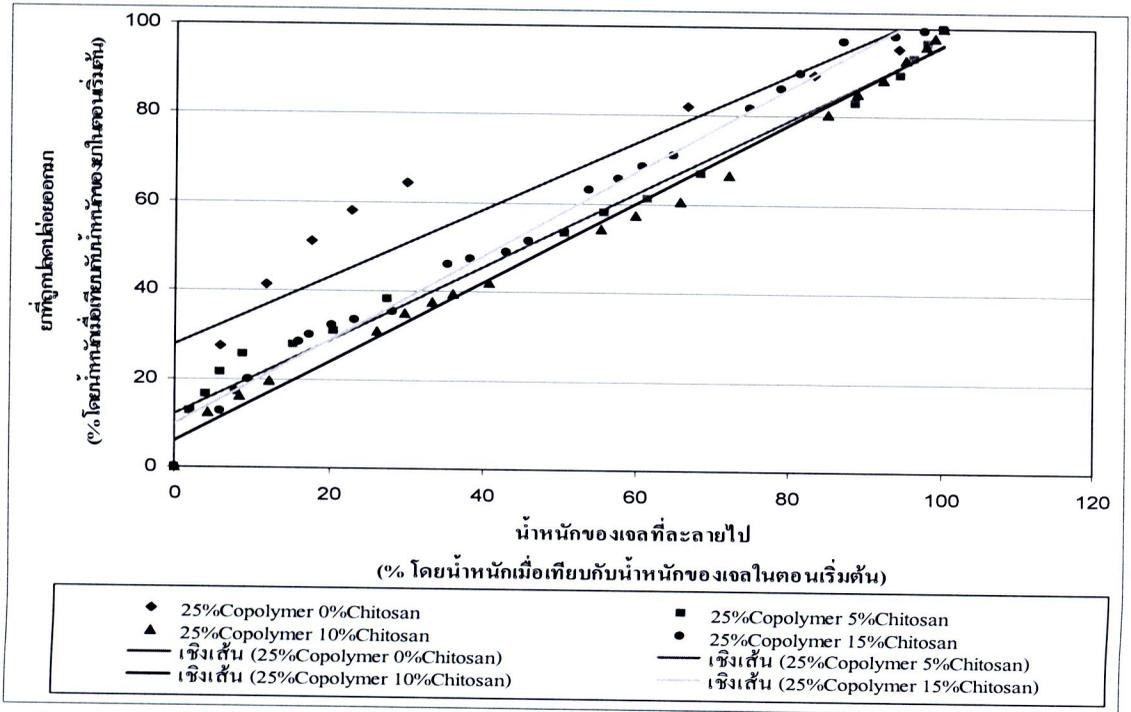
ตารางที่ 7 แสดงความสามารถในการกักเก็บยา Doxorubicin ของเจล Copolymer ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความสามารถในการกักเก็บยา (μg)		
% Copolymer ในน้ำ % Chitosan ใน Copolymer	25% w/w	30% w/w
	0% w/w	88.32
5% w/w	115.22	142.23
10% w/w	173.91	184.45
15% w/w	194.18	198.00

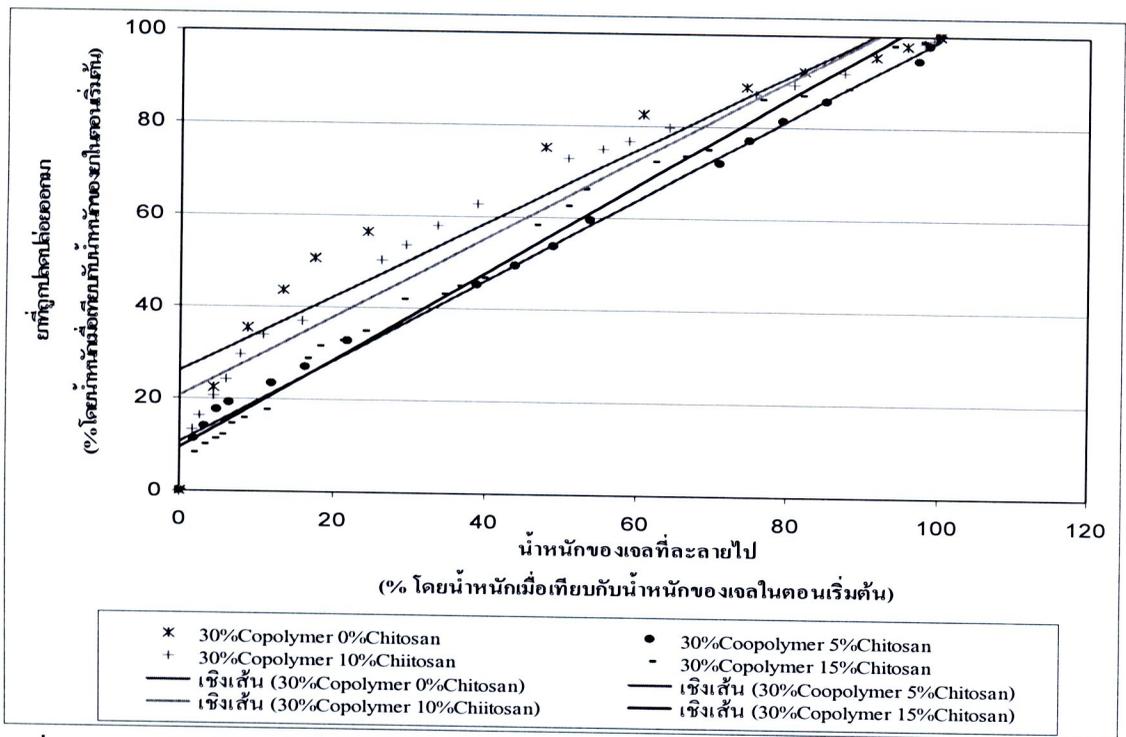
จากกราฟรูปที่ 47 และ 48 ซึ่งสามารถสรุปความสามารถในการกักเก็บยา Doxorubicin ของ เจล Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan Copolymer ได้ดังตารางที่ 7 ซึ่งจะพบว่าความสามารถในการ กักเก็บยาของเจล Copolymer จะแปรผันตรงกับปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer กล่าวคือ เมื่อ มีปริมาณของ Chitosan มากขึ้นความสามารถในการกักเก็บยาของเจล Copolymer จะมากขึ้นด้วย ที่ ความเข้มข้นของของเจล Copolymer เดียวกัน สามารถอธิบายได้จากลักษณะ โครงสร้างของเจล Copolymer ที่ได้จากเครื่อง SEM [ธนา, 2549] พบว่า เมื่อมีปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer เพิ่มขึ้นจะทำให้โครงสร้างของเจลมี Void มากขึ้น (Void คือ ส่วนของน้ำในเจล Copolymer) เมื่อ Void เพิ่มขึ้นแสดงว่าเจล Copolymer มีน้ำในโครงสร้างเพิ่มมากขึ้นด้วย สำหรับยา Doxorubicin ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นยาที่สามารถละลายได้ในน้ำ เมื่อปริมาณของน้ำในเจลเพิ่มมากขึ้น ยา Doxorubicin จะสามารถละลายได้มากขึ้น ดังนั้น เจลที่มีปริมาณ Chitosan ใน Copolymer เพิ่มขึ้นจึง สามารถกักเก็บยาได้มากขึ้น ซึ่งจากตารางจะเห็นได้ว่าเจลที่สามารถกักเก็บยาได้มากที่สุด คือ เจล Copolymer ความเข้มข้น 30% w/w โดยมีปริมาณ Chitosan อยู่ใน Copolymer 15% wt.

จากผลการทดลอง จะพบว่า อัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin จะแปรผกผันกับความ เข้มข้นของเจล กล่าวคือ เจลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีอัตราการปลดปล่อยยาช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้น ต่ำ สามารถอธิบายได้โดยอาศัยหลักการละลายของเจล นั่นคือ สารละลาย PBS จะแทรกซึมเข้าไป คลายการเกาะหรือการเกี่ยวพันของเจลที่มีความเข้มข้นสูงได้ยาก เนื่องจากมีจำนวนและความหนาแน่นของไมเซลล์สูง ทำให้อัตราการละลายของเจลต่ำ ซึ่งเป็นผลให้ยาที่ละลายอยู่ในเจลถูก ปลดปล่อยออกมาในอัตราที่ต่ำตามไปด้วย พบว่า copolymer สามารถปลดปล่อยยา doxorubicin ได้ นานถึง 150 ชั่วโมง (มากกว่า 6 วัน) ซึ่งมีอัตราการปลดปล่อยยาที่ยาวนานกว่างานวิจัยที่ผ่านมา มาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า copolymer ที่สังเคราะห์ได้มีประสิทธิภาพดีขึ้นเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของ งานวิจัย

อัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin จะแปรผกผันกับปริมาณของ Chitosan ในเจล Copolymer นั่นคือ ที่ความเข้มข้นของเจลเท่ากัน เมื่อปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer เพิ่มขึ้น พบว่าอัตราการปลดปล่อยยาจะช้าลง ทำให้ระยะเวลาในการปลดปล่อยยามากขึ้น เนื่องจากว่าเมื่อ ปริมาณของโคโตนานในเจลโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการสลายตัวของเจลช้าลงส่งผลให้ อัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin ช้าลงด้วย ที่เป็นเช่นนี้เพราะอัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin จากเจลโคพอลิเมอร์จะเป็นไปตามอัตราการละลายของเจล จะแสดงให้เห็นดังกราฟรูปที่ 48 และ รูปที่ 49 ซึ่งมีลักษณะการปลดปล่อยยาเป็นแบบ zeroth order kinetics



รูปที่ 49 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin กับอัตราการละลายของเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan Copolymer ที่ความเข้มข้นของเจลโคโพลิเมอร์ 25% w/w



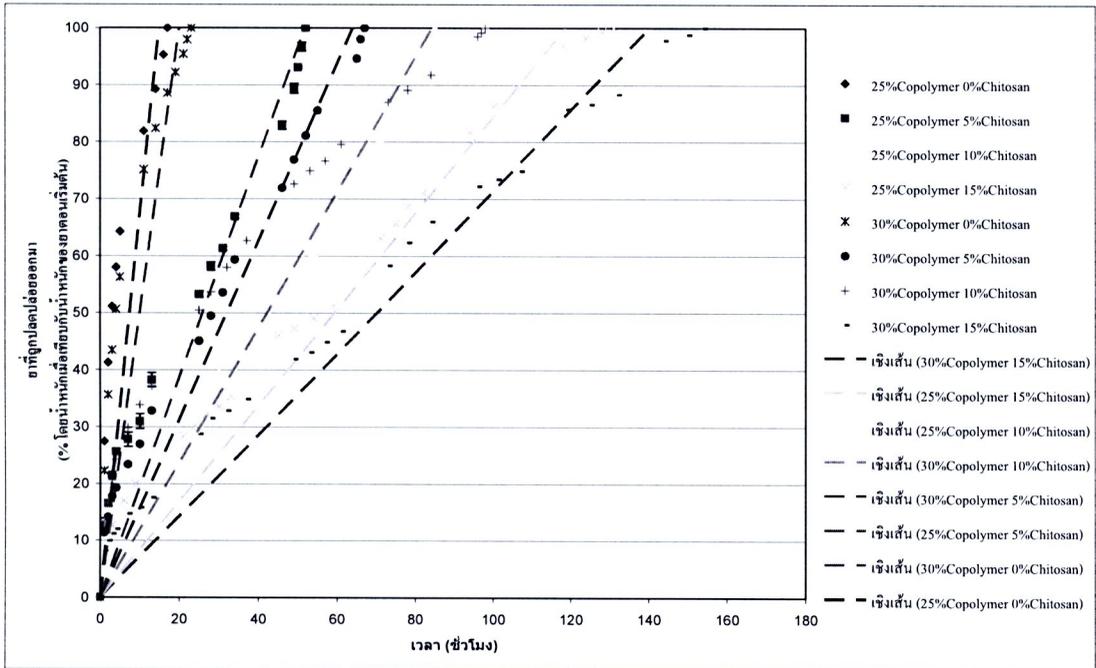
รูปที่ 50 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin กับอัตราการละลายของเจล Pluronic® F-127 grafted Chitosan Copolymer ที่ความเข้มข้นของเจลโคโพลิเมอร์ 30% w/w

ตารางที่ 8 แสดงค่า Least squares regression (R^2) ของเส้นกราฟในรูปที่ 49 และรูปที่ 50

Least squares regression (R^2)		
% Copolymer ในน้ำ % Chitosan ใน Copolymer	25% w/w	30% w/w
0% w/w	0.8583	0.8998
5% w/w	0.9837	0.9919
10% w/w	0.9921	0.9455
15% w/w	0.9893	0.9866

จากตารางที่ 8 ซึ่งแสดงค่า Least squares regression (R^2) นั้นพบว่ามีความใกล้เคียงกับ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของอัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin กับอัตราการละลายของเจลโคพอลิเมอร์มีความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าในขณะที่เจลละลายออกไปยังสารละลาย PBS ผิวหน้าของเจลก็หลุดออกไปพร้อม ๆ กัน กระบวนการปลดปล่อยยา Doxorubicin ขึ้นอยู่กับการละลายของเจลเป็นหลัก นั่นคือ เจล Pluronic[®] F-127 grafted Chitosan Copolymer ใช้กลไกการละลายหรือกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) ในการปลดปล่อยยา

ลักษณะทางจลนศาสตร์ของการปลดปล่อยยาของเจล Copolymer มีลักษณะที่เหมือนกับการสลายตัวของเจล คือ เป็นไปตามอัตราการปลดปล่อยอันดับที่ 0 (Zeroth order rate) ซึ่งเป็นไปตามสมการ $\frac{M_t}{M_0} = K_r \cdot t$ เมื่อ M_t คือ ปริมาณของยา doxorubicin ที่ถูกปลดปล่อยออกมา, M_0 คือ ปริมาณของยาเริ่มต้นที่ผสมกับเจล และ K_r คือ ค่าคงที่ของการปลดปล่อยยา ซึ่งสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 50



รูปที่ 51 กราฟแสดงลักษณะทางจลนศาสตร์ของการปลดปล่อยยา Doxorubicin ของเจล Copolymer

นอกจากนี้ เมื่อทำการหาค่าคงที่ของการปลดปล่อยยาที่เป็นไปตามความสัมพันธ์

$$\frac{M_t}{M_0} = K_r \cdot t$$

จะได้ค่าคงที่ของการปลดปล่อยยาดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่าคงที่ของการปลดปล่อยยา K_r

Copolymer gel								
ความเข้มข้นของ เจล Copolymer (%w/w)	0% wt. Chitosan		5% wt. Chitosan		10% wt. Chitosan		15% wt. Chitosan	
	K_r	R^2	K_r	R^2	K_r	R^2	K_r	R^2
25% w/w	4.554	0.8583	1.6057	0.9825	1.0599	0.9934	0.7164	0.9891
30% w/w	3.4914	0.8952	1.3247	0.9898	0.8771	0.9411	0.6143	0.9902

จากตารางที่ 9 พบว่าลักษณะทางจลนศาสตร์ของการปลดปล่อยยาของเจล Copolymer มีเป็นไปตามอัตราการปลดปล่อยอันดับที่ 0 (Zeroth order rate) สมการ $\frac{M_t}{M_0} = K_r \cdot t$ นี้สามารถที่จะนำไปใช้ในการทำนายการปลดปล่อยยา Doxorubicin จากเจล Copolymer โดยใช้ค่าคงที่ของการปลดปล่อยยา (K_r) ที่ได้จากรายการที่ 9 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของการปลดปล่อยยากับเวลา และเมื่อทราบปริมาณของยาที่ผสมเข้ากับเจลในตอนเริ่มต้น ก็จะสามารถหาปริมาณที่ถูกปลดปล่อยยาออกมาได้ ณ จุดเวลาต่างๆ ใดๆก็ได้ สมการนี้สามารถใช้ทำนายได้จนถึง 90 % ของการปลดปล่อยยาเท่านั้น ในส่วน 10% หลังจากนั้น พบว่า สัดส่วนของยาที่ถูกปล่อยออกมาจากเจลด้อยลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงหลังนี้เจลเริ่มใกล้หมดและพื้นผิวหน้าของเจลที่ละลายเริ่มไม่เรียบเหมือนตอนเริ่มต้น ทำให้อัตราการปลดปล่อยยาเริ่มลดลง เมื่อเทียบกับการปลดปล่อยยาในช่วง 90% แรก [ธีรยุทธ, 2548]