



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การปรับปรุงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพชนิดโพลีเอสเทอร์
เพื่อใช้เตรียมอนุภาคนาโนในการนำส่งยา

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ

พฤษภาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การปรับปรุงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพชนิดโพลีเอสเทอร์
เพื่อใช้เตรียมอนุภาคนาโนในการนำส่งยา

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ

ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การปรับปรุงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพชนิดโพลีเอสเทอร์เพื่อใช้เตรียมอนุภาคนาโนในการนำส่งยา” (RMU5180019) ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา ตามโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) กับ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณแหล่งทุนดังกล่าวมา ณ โอกาสนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ อุปกรณ์ และสถานที่ ต่อการวิจัยครั้งนี้

การวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของคณะผู้วิจัยที่ประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ หัวหน้าโครงการ และผู้ช่วยวิจัย ได้แก่ นายจิรพงศ์ สุขศิริวงษ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ศรีภา ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับปฏิกิริยาทางเคมี และขอขอบคุณ Prof. Dr. Jörg Kreuter, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Germany ต่อคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิจัย ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลจากการวิจัยที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการการศึกษาวิจัยให้นักวิจัยและผู้สนใจทั่วไป

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ RMU5180019

ชื่อโครงการ การปรับปรุงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพชนิดโพลีเอสเทอร์เพื่อใช้เตรียมอนุภาคนาโนในการนำส่งยา

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ
ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
447 ถนนศรีอยุธยา ราชเทวี กรุงเทพฯ

E-mail Address pyvbp@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี (15 พฤษภาคม 2551 ถึง 14 พฤษภาคม 2554)

การปรับปรุงสายโพลีเมอร์ที่สลายตัวทางชีวภาพเพื่อใช้ในการนำส่งยาเป็นที่น่าสนใจอย่างมากในทางเภสัชกรรม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงสายโพลีเมอร์โพลีเอสเทอร์ชนิด polycaprolactone ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ด้วยการเติมกลุ่ม polyethylene glycol (PEG 4000) ลงในสายโซ่เพื่อให้มีความเป็น hydrophilic เพิ่มขึ้น และ graft ตัวยา nicotinic acid ซึ่งเป็นสารมวลโมเลกุลเล็กลงบนสายโพลีเมอร์นี้ด้วยสภาวะที่ไม่รุนแรง ด้วยปฏิกิริยา 1,3-dipolar cycloaddition ที่รู้จักกันในชื่อ click reaction โดยการ copolymerization ของ α -chloro- ϵ -caprolactone (α Cl ϵ CL) และ ϵ -caprolactone (ϵ CL) ด้วยวิธี ring opening polymerization โดยใช้ PEG 4000 และ Tin (II) Octanoate (SnOct₂) เป็น catalysts จากนั้นปรับเปลี่ยน กลุ่มคลอไรด์บนสายโซ่ ให้เป็น azide ซึ่งจะเป็ตำแหน่งที่เชื่อมติดกับ but-3-ynyl nicotinate ด้วย click reaction จากการศึกษาโครงสร้างและการตรวจสอบสมบัติของโพลีเมอร์ที่ได้ด้วย ¹H-NMR Spectroscopy, FT-IR Spectroscopy และ Gel Permeation Chromatography พบว่าสามารถ graft ตัวยา nicotinic acid ที่สัดส่วนต่างๆ (10%, 20% และ 30%) ลงบนสายโซ่ของ poly- ϵ -caprolactone (ϵ CL) ได้สำเร็จด้วยการใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงและใช้ระยะเวลาที่สั้น จึงไม่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของโพลีเมอร์ ผลของการศึกษา thermal property พบว่าจำนวนโมลและชนิดของหมู่หรือโมเลกุลที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์นั้นมีผลต่อค่า T_g และ T_m ของโพลีเมอร์ โดยผลการทดลองระบุว่าการติดหมู่หรือโมเลกุลบนสายโซ่และการเพิ่มจำนวนโมลของหมู่ที่ติดมีผลเปลี่ยนรูปผลึกของโพลีเมอร์จาก semi-crystalline เป็น amorphous มากขึ้น ดังนั้นปริมาณ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ส่งผลต่อสมบัติเฉพาะทางกายภาพและเคมีของโพลีเมอร์

การศึกษาคือความเป็นพิษของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ต่อเซลล์ปกติ ผลการศึกษาพบว่าโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HUVECs เช่นเดียวกับโพลีเมอร์ต้นแบบ (P(ϵ CL)-co-PEG) ที่ความเข้มข้น 500 μ g/mL เมื่อนำโพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid ที่สังเคราะห์ได้ ไปเตรียมเป็นอนุภาคนาโนด้วยวิธี nanoprecipitation และศึกษา

คุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนที่ได้ พบว่าอนุภาคนาโนที่ไม่มีการบรรจุยา มีรูปร่างทรงกลม และจำนวนโมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ส่งผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคนาโน โดยที่จำนวนโมลของ nicotinic acid ที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ขนาดอนุภาคนาโนเพิ่มขึ้นเนื่องจากความเป็น hydrophobic ที่เพิ่มขึ้นและ steric hindrance ของหมู่ที่ยื่นออกจากแกนของโพลีเมอร์ที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในรูปของอนุภาคนาโนพบว่าอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.20 mg/mL ดังนั้น การติดโมเลกุล nicotinic acid มีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ และเมื่อเพิ่ม % โมลของ nicotinic acid มีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาผลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ต่อกักเก็บยาต้นแบบ 2 ชนิด คือ ibuprofen และ indomethacin พบว่าหลัง incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดมีผลทำให้อนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้น และการบรรจุยาของอนุภาคนาโนที่มีโมเลกุล nicotinic acid ติดอยู่มีประสิทธิภาพมากกว่าอนุภาคนาโนที่ไม่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid ที่เตรียมจากโพลีเมอร์ P(EGCL)-co-PEG แต่เมื่อเพิ่ม % โมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ ประสิทธิภาพในการบรรจุยาของอนุภาคนาโนไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการบรรจุยาของอนุภาคนาโนยังขึ้นอยู่กับค่าขีดการละลายของตัวยาเองด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการแบ่งภาคระหว่างอนุภาคนาโนกับวัฏภาคน้ำในขั้นตอนการ incorporate ตัวยา การศึกษาการปลดปล่อยตัวยา ibuprofen และ indomethacin จากอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid และโพลีเมอร์ต้นแบบ พบว่ามีการปลดปล่อยเป็นไปตาม Higuchi model แสดงให้เห็นว่ากลไกการปลดปล่อยยาเป็นแบบ Fickian diffusion การปลดปล่อยยา ibuprofen จากอนุภาคนาโนน้อยกว่าและช้ากว่า indomethacin ถึงแม้ว่า ibuprofen มีค่าขีดการละลายน้ำมากกว่า indomethacin เนื่องจากเกิด interaction ระหว่าง ibuprofen กับสายโซ่โพลีเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโน สรุปได้ว่า การติดโมเลกุล nicotinic acid บนสายโซ่โพลีเมอร์มีผลต่อทั้งปริมาณและอัตราการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโน เนื่องจากการติดโมเลกุล nicotinic acid ส่งผลต่อคุณสมบัติเคมีกายภาพของอนุภาคนาโน ได้แก่ ขนาดอนุภาคนาโน % drug loading ความเป็นผลึกของสายโซ่โพลีเมอร์ และการเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลยากับสายโซ่โพลีเมอร์

คำหลัก: โพลีเอสเทอร์ โพลีคาโพรเลคโตน นาโนพาร์ทิเคิล ปฏิกริยาคล็อก กรดนิโคตินิก

Abstract

Project Code RMU5180019

Project Title Structure modification of polyester biodegradable polymers for preparation of nanoparticles for drug delivery

Investigator Assoc. Prof. Varaporn Junyaprasert
Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy
Mahidol University
447 Sri-Ayutthaya Rd., Rajathavee, Bangkok 10400

E-mail Address pyvbp@mahidol.ac.th

Project Period 3 years (15 May 2008 ถึง 14 May 2011)

Modification of biodegradable polymers has been gained much attention in the field of pharmaceutical applications. This study was aimed to modify polycaprolactone polymer, one of polyester biodegradable polymers, by being conjugated with polyethylene glycol (PEG 4000) to increase the hydrophilicity and grafting with nicotinic acid, a small drug molecule, onto the polymer using mild conditions of 1,3-dipolar cycloaddition, known as click reaction. The reaction was performed by copolymerization of α -chloro- ϵ -caprolactone (α Cl ϵ CL) and ϵ -caprolactone (ϵ CL) by ring opening polymerization using PEG 4000 and Tin (II) octanoate (SnOct_2) as catalysts. Subsequently, the chloride groups on the polymer were replaced with azide at which but-3-ynyl nicotinate was conjugated using click reaction. From the characterization by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, FT-IR spectroscopy and gel permeation chromatography, the results showed that the grafting of nicotinic acid onto the poly- ϵ -caprolactone (ϵ CL) copolymer was successful at different drug to polymer ratios (10%, 20% and 30%) with the use of this mild and short time reaction so as to prevent the polymer degradation. From the study of thermal properties of the grafted copolymer, it was found that amount and type of grafting functional groups could affect T_g and T_m of the copolymer. When increasing the amount of grafting functional groups, the crystallinity of the copolymer was changed from semi-crystalline to more amorphous. As a result, grafting nicotinic acid onto the copolymer affected the physicochemical properties of the copolymer.

From the cytotoxicity study of the synthesis polymer to the normal cell lines, the results showed that the nicotinic acid grafted polymer was not toxic to HUVECs cells at 500 $\mu\text{g/mL}$, similar to P(ϵ CL)-co-PEG. Consequently, the nicotinic acid grafted

copolymer was used to prepare nanoparticles by nanoprecipitation and the physicochemical properties of the nanoparticles were studied. The results showed that the nanoparticles were spherical in shape. In addition, the amount of nicotinic acid influenced the properties of the nanoparticles. When the amount of nicotinic acid increased, the particle size increased due to the increased hydrophobicity and steric hindrance of the grafting function groups. From the cytotoxicity study, the nanoparticles did not cause toxicity to the cells at 0.20 mg/mL. However, the increased amount of nicotinic acid increased the cytotoxicity to the cells.

The effect of nicotinic acid grafted on the polymers to the entrapment of 2 model drugs, ibuprofen and indomethacin, was studied. It was found that incorporation of the drugs increased the size of the nanoparticles, and drug loaded in nicotinic acid grafted nanoparticles was higher than ungrafted nanoparticles. However, the drug loading efficiency increased insignificantly when the amount of nicotinic acid on the polymer increased. Moreover, drug loading efficiency depended on the solubility of the loaded drug which could affect the partition between the nanoparticles and water phase during drug incorporation. The release of ibuprofen and indomethacin from the nicotinic acid grafted nanoparticles was found to follow Higuchi model indicating that the release was Fickian diffusion. The release of ibuprofen from the nanoparticles was lower and slower than that of indomethacin due to the interaction between indomethacin and the polymer. In conclusion, the grafting nicotinic acid on the polymer affected both amount and rate of drug release from the nanoparticles due to the influence of nicotinic acid to the physicochemical properties of the nanoparticles including the particle size, %drug loading, crystallinity of the polymer and interaction between the drug molecule and the polymer.

Keywords: polyester, polycaprolactone, nanoparticles, click reaction, nicotinic acid

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	iii
Abstract	v
สารบัญ	vii
สารบัญรูป	ix
สารบัญตาราง	xi
สัญลักษณ์และคำย่อ	xiii
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
วิธีการทดลอง	4
สารเคมี	4
วัสดุอุปกรณ์	6
วิธีดำเนินการทดลอง	7
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	18
สรุปผลการทดลอง	56
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก	63
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว. และ สกอ.	65
ผลงานตีพิมพ์ (Reprint) และ Manuscript	67
การเสนอผลงาน (Presentation)	137
บทความสำหรับเผยแพร่	143

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	¹ H-NMR spectrum ของสารที่กลั่นได้จากการสังเคราะห์ α ClECL ตามสภาวะที่ 2 (ตารางที่ 1)	19
รูปที่ 2	¹ H-NMR spectrum ของสารที่สังเคราะห์ได้ (α ClECL) ตามสภาวะที่ 4 (ตารางที่1)	20
รูปที่ 3	¹ H-NMR spectrum ของสารที่สังเคราะห์ได้ (α ClECL) ตามสภาวะที่ 4 (ตารางที่ 1) หลังจากผ่านการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography	20
รูปที่ 4	¹ H-NMR spectra ของสาร α ClECL ที่สังเคราะห์ได้ (A) และ Reference (B)	21
รูปที่ 5	¹ H-NMR spectrum ของ poly(α ClECL-co- ϵ CL-co-PEG) ที่ประกอบด้วย $f_{\alpha\text{ClECL}} = 0.3$	23
รูปที่ 6	¹ H-NMR spectra ของ poly(α ClECL-co- ϵ CL-co-PEG) (A) และ poly(α N ₃ ϵ CL-co- ϵ CL-co-PEG) (B)	24
รูปที่ 7	¹ H-NMR spectra ของสาร by-product (A), but-3-ynyl nicotinate (B) และ intermediate (C) ในตัวทำละลาย DMSO-d ₆	25
รูปที่ 8	¹ H-NMR spectrum ของ poly((α N ₃ -g-nicotinate) ϵ CL-co- ϵ CL-co-PEG)	26
รูปที่ 9	¹ H-NMR spectrum ของ poly((Nicotinic acid-g- ϵ CL)-co- ϵ CL-co-PEG) ใน CDCl ₃	28
รูปที่ 10	FT-IR spectra ของโพลีเมอร์ที่มีหมู่ chloride, azide และ nicotinic acid	29
รูปที่ 11	กราฟ thermal gravimetric diagram ของโพลีเมอร์ที่ติดหมู่ chloride, azide และ nicotinic acid บนสายโซ่	33
รูปที่ 12	NMR spectra ของโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ที่เปอร์เซ็นต์โมลต่างๆ	35
รูปที่ 13	FTIR spectra ของโพลีเมอร์ที่ติดหมู่ Cl, N ₃ และ nicotinic acid ที่จำนวนโมล 10% ในกรณีของ 20% และ 30% ให้ spectra ที่เหมือนกันกับ 10%	36
รูปที่ 14	ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay ต่อเซลล์ HUVECs	39
รูปที่ 15	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของอนุภาคนาโนที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid จำนวนต่างๆกัน (a) 10 %โมล, (b) 20 %โมล และ (c) 30%โมล	41
รูปที่ 16	ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay ต่อเซลล์ HUVECs	42

รูปที่ 17	กราฟมาตรฐานของยา ibuprofen (a) และ indomethacin (b) จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC	44
รูปที่ 18	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Drug loading ของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา ibuprofen (a) และ indomethacin (b) กับ %โมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ 0% grafting แสดงถึงอนุภาคนาโนที่เตรียมจาก P(εCL)-co-PEG	48
รูปที่ 19	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 10% โมลหลัง incorporate ยา ibuprofen (A) และ indomethacin (B)	48
รูปที่ 20	Release profile ของยา ibuprofen จากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ภายใน 24 ชั่วโมง รูปภาพเล็กแสดง release profile ของยา ibuprofen ในช่วง 5 ชั่วโมงแรกของการทดลอง	49
รูปที่ 21	Release profile ของยา indomethacin จากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ภายใน 24 ชั่วโมง รูปภาพเล็กแสดง release profile ของยา indomethacin ในช่วง 5 ชั่วโมงแรกของการทดลอง	50
รูปที่ 22	Higuchi model fitting กราฟ release profile ของยา ibuprofen จากอนุภาคนาโนในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการทดลอง	50
รูปที่ 23	Higuchi model fitting กราฟ release profile ของยา indomethacin จากอนุภาคนาโนในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการทดลอง	51
รูปที่ 24	FT-IR spectra ของยา ibuprofen (a) สายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% โมล (b) และสารผสมระหว่างยา ibuprofen กับสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% โมล (c)	55

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ α ClECL และผลการทดลองในแต่ละสภาวะ	8
ตารางที่ 2	Characteristic peaks ของสารที่สังเคราะห์ได้	21
ตารางที่ 3	สรุปอัตราส่วนของ α ClECL บนสายโซ่โพลีเมอร์และค่าเฉลี่ย น้ำหนักโมเลกุลที่คาดว่าจะได้ตามทฤษฎี	22
ตารางที่ 4	ผลการทดลองจากการติดหมูลิแกนด์บนสายโซ่โพลีเมอร์	30
ตารางที่ 5	ผล Thermal property ของโพลีเมอร์จากการวิเคราะห์โดยวิธี DSC	31
ตารางที่ 6	สัดส่วนจำนวนโมลของ monomers และ initiator ที่ใช้ในปฏิกิริยา polymerization	34
ตารางที่ 7	ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้	37
ตารางที่ 8	การศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนจากโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้	40
ตารางที่ 9	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนที่ทำให้ %survival cells ของเซลล์ HUVECs มีค่าน้อยกว่า 80%	43
ตารางที่ 10	ผลการตรวจสอบ repeatability และ reproducibility ของวิธีวิเคราะห์ ตัวยา ibuprofen และ indomethacin	43
ตารางที่ 11	ค่า %recovery ของยา ibuprofen และ indomethacin จากการ วิเคราะห์โดย HPLC	44
ตารางที่ 12	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (z-ave), ค่าการกระจายขนาดอนุภาค (PI), ค่าประจุบนพื้นผิว (ZP) และ %entrapment efficiency (%EE) ของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา ibuprofen	46
ตารางที่ 13	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (z-ave), ค่าการกระจายขนาดอนุภาค (PI), ค่าประจุบนพื้นผิว (ZP) และ %entrapment efficiency (%EE) ของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา indomethacin	47
ตารางที่ 14	ค่า r^2 ความชันและสมการเส้นตรงจากความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ระหว่าง %cumulative amount of drug release กับ $time^{1/2}$ ของยา ibuprofen	51
ตารางที่ 15	ค่า r^2 ความชันและสมการเส้นตรงจากความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ระหว่าง %cumulative amount of drug release กับ $time^{1/2}$ ของยา indomethacin	51

ตารางที่ 16	คุณสมบัติของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา ibuprofen และ indomethacin	52
ตารางที่ 17	ค่า enthalpy of melting ของโพลีเมอร์	53

สัญลักษณ์และคำย่อ

μm	ไมโครเมตร
mm	มิลลิเมตร
m	เมตร
ppm	หนึ่งในล้าน (part per million)
min	นาที
mL	มิลลิลิตร
μg	ไมโครกรัม
g	กรัม
%	เปอร์เซ็นต์
$^{\circ}\text{C}$	องศาเซลเซียส
%CV	%Coefficient of variance
r^2	Coefficient of determination
rpm	รอบต่อนาที (round per minute)
T_g	glass transition temperature
T_m	melting temperature
N_3	azide
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GPC	Gel Permeation Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
PCS	Photon Correlation Spectroscopy
SEM	Scanning Electron Microscope
TGA	Thermo Gravimetric Analyzer
TLC	Thin Layer Chromatography
DCC	dicyclohexyl carbodinine
DMAP	dimethyl aminopyridine
DMF	dimethyl formamide
DMSO	dimthyl sulfoxide
THF	tetrahydrofuran
PLC	poly(lactic acid)
PGA	poly(glycolic acid)

PCL	poly(ϵ -caprolactone)
PEG	polyethylene glycol
PEO	polyethylene oxide
RES	reticuloendothelial system

โครงการ การปรับปรุงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพชนิดโพลีเอสเทอร์เพื่อใช้เตรียมอนุภาคนาโนในการนำส่งยา
(Structure modification of polyester biodegradable polymers for preparation of nanoparticles for drug delivery)

บทนำ

ในปัจจุบัน การศึกษาและการพัฒนาระบบนำส่งยามุ่งความสนใจไปที่การนำส่งยาโดยระบบอนุภาคนาโน (nanoparticles) ซึ่งเป็นอนุภาคขนาดเทียบเท่าคอลลอยด์ (colloids) โดยมีอนุภาคขนาดระหว่าง 10 ถึง 1000 นาโนเมตร ในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาคูณสมบัติของระบบอนุภาคนาโนในด้านต่าง ๆ เช่น การช่วยเพิ่มการดูดซึมของยาโมเลกุลใหญ่ การป้องกันการเสื่อมสลายของยาเมื่อให้เข้าสู่ร่างกายได้ และการนำส่งยาสู่เป้าหมายโดยระบบอนุภาคนาโนที่จำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งที่ต้องการรักษา (target site of action) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดผลข้างเคียงของยา (1) ระบบอนุภาคนาโนที่มีผู้ทำการศึกษาและพัฒนาเป็นระบบนำส่งยามีหลายประเภทแบ่งตามลักษณะและส่วนประกอบของระบบ เช่น Solid lipid nanoparticles (2, 3), liposome (4-6), polymeric nanoparticles (7-10), polymeric micelles (11-13) และ nanospheres (14, 15) เป็นต้น

อนุภาคนาโนสามารถเตรียมได้จากโพลีเมอร์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ได้แก่ gelatin (16), chitosan (10, 17) หรือ albumin (18) เป็นต้น หรือเตรียมโดยโพลีเมอร์สังเคราะห์ เช่น poly(phosphoester), polyanhydrides และ polyesters เป็นต้น โพลีเมอร์สังเคราะห์นี้ได้รับความนิยมในการพัฒนาเป็นระบบนำส่งยา โดยเฉพาะโพลีเมอร์ในกลุ่ม polyesters เนื่องจากโพลีเมอร์ในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติที่เข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatibility) และเสื่อมสลายทางชีวภาพได้ในร่างกาย (biodegradability) ทั้งนี้เนื่องจากมีพันธะเอสเทอร์เป็นส่วนประกอบหลักในสายโซ่โพลีเมอร์ ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์ได้ในร่างกาย นอกจากนี้โพลีเมอร์นี้ยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ตามต้องการโดยการปรับสัดส่วนของโพลีเมอร์แต่ละชนิดที่นำมาต่อกันเป็นสายโซ่ ตัวอย่างของโพลีเมอร์ในกลุ่มนี้ เช่น poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) และโพลีเมอร์ร่วมของโพลีเมอร์ดังกล่าว (copolymer) (19-23)

โพลีเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมระบบอนุภาคนาโนส่วนใหญ่มีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) สูง ดังนั้นเมื่อนำส่งเข้าสู่ร่างกายอนุภาคนาโนดังกล่าวจะถูกทำลายโดยระบบ reticuloendothelial system (RES) และถูกขับออกจากร่างกายโดยตับและไต ทำให้ระบบนำส่งดังกล่าวอยู่ในร่างกายได้ไม่นานตามที่ต้องการ การพัฒนาต่อมาของระบบอนุภาคนาโนจึงมุ่งเน้นที่การปรับปรุงคุณสมบัติของอนุภาคให้มีความชอบน้ำ (hydrophilicity) เพิ่มขึ้น การปรับปรุงคุณสมบัติดังกล่าวสามารถทำได้โดยการเคลือบผิวอนุภาคด้วย Polyethylene glycol (PEG) หรือ Polyethylene oxide (PEO) หรือ

การสังเคราะห์โพลีเมอร์ร่วมที่มี PEG (22, 24-26) หรือ PEO (27, 28) เป็นส่วนประกอบในสายโซ่ ทำให้สายโซ่โพลีเมอร์เดียวกันมีคุณสมบัติเป็นทั้งชอบน้ำจาก PEG หรือ PEO และไม่ชอบน้ำจาก polyester ซึ่งคุณสมบัตินี้เรียกว่า amphiphilic (29) จากนั้นจึงนำมาเตรียมเป็นอนุภาคนาโน ก็จะทำให้ได้อนุภาคที่สามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น และลดอัตราการกำจัดอนุภาคออกจากร่างกายโดยระบบ RES เนื่องจากความชอบน้ำที่ผิวของอนุภาค (30, 31) วิธีการพัฒนาดังกล่าว แม้ว่าจะทำให้ได้ระบบนำส่งยาที่สามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้นตามระยะเวลาที่ต้องการให้เห็นผลการรักษา แต่ส่งผลต่อคุณสมบัติในด้านอื่น ๆ ของระบบลดลง เนื่องจากประจุที่ผิวของอนุภาค มีความเป็นลบหรือลดความเป็นประจุบวกของอนุภาคจากผลของสายโซ่ PEG หรือ PEO ทำให้คุณสมบัติในการยึดเกาะเยื่อเมือกลดลง เพราะประจุที่ผิวของ mucous membrane เป็นลบ เช่นเดียวกับกับประจุที่ผิวของอนุภาค นอกจากนี้ยาส่วนใหญ่ที่ใช้ในปัจจุบันเป็นชนิดไม่ชอบน้ำ ทำให้การกักเก็บยาในแกนกลาง (core) ของอนุภาคลดลง ซึ่งเมื่อต้องการนำไปใช้จริงจำเป็นต้องใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงจึงจะทำให้ได้ผลการรักษา ดังนั้นการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของโพลีเมอร์ที่จะนำไปใช้ในการเตรียมเป็นอนุภาคนาโนจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ปรับปรุงข้อเสียดังกล่าว ได้มีผู้ทำการศึกษาการติดหมู่ thiol (-SH) บนสายโซ่ของโพลีเมอร์ พบว่า การเติมหมู่ดังกล่าวมีผลทำให้โพลีเมอร์แสดงคุณสมบัติในการยึดเกาะเยื่อเมือกและเพิ่มการซึมผ่านสูงกว่าโคโคซานมาก (32, 33) นอกจากนี้มีผู้ทำการศึกษาโดยการเติมหมู่ carboxyl บนสายโซ่ของโพลีเมอร์ พบว่า ไม่มีผลทำให้ขนาดอนุภาคเปลี่ยนแปลงและไม่มีผลต่อความคงตัวของอนุภาคที่เตรียมขึ้น แต่มีผลในการเพิ่มปริมาณยาที่ถูกกักเก็บไว้ในแกนกลาง เนื่องจากความเข้ากันได้ระหว่างสายโซ่โพลีเมอร์กับโมเลกุลยา (27) นอกจากนี้การปรับปรุงโครงสร้างของสายโซ่โพลีเมอร์เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวแล้ว ได้มีผู้ทำการศึกษาการติดหมู่ฟังก์ชันบนสายโซ่เพื่อใช้ในการเชื่อมกับโมเลกุลยา เช่น หมู่ allyl, hydroxy, และ carboxylic acid (11, 13, 34, 35) หรือ ลิแกนด์ (8, 15, 36) เพื่อให้เกิดการนำส่งยาที่จำเพาะเจาะจงมากขึ้น

แม้ว่าการวิจัยในระยะหลังนี้จะมุ่งเน้นที่การพัฒนาคุณสมบัติของโพลีเมอร์ เพื่อให้ได้โพลีเมอร์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำส่งยา แต่การวิจัยเรื่องโครงสร้างของโพลีเมอร์ที่ถูกปรับปรุงโดยการติดหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่โพลีเมอร์โดยเฉพาะโพลีเมอร์ชนิด polyester และการศึกษาในเรื่องการนำโพลีเมอร์ที่พัฒนามาเตรียมเป็นอนุภาคนาโนเพื่อนำส่งยาที่บริเวณต่าง ๆ ยังมีจำนวนไม่มาก ดังนั้นการพัฒนาโพลีเมอร์เพื่อเตรียมเป็นอนุภาคนาโนในการนำส่งยาชนิดต่าง ๆ เป็นจุดมุ่งหมายหนึ่งในการวิจัยและพัฒนาาระบบนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพ เพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพและประสิทธิผลมากขึ้น การศึกษานี้มีจุดประสงค์หลักคือ การปรับปรุงคุณสมบัติของโพลีเมอร์ชนิด polyester โดยการติดหมู่ฟังก์ชันที่ต้องการศึกษา ได้แก่ PEG และ hydroxyl บนสายโซ่ของ polyester ทำให้ได้โพลีเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็น amphiphile และศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical properties) ของโพลีเมอร์ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับโพลีเมอร์ต้นแบบที่ไม่มีการติดหมู่ฟังก์ชัน ในด้านต่าง ๆ ดังนี้ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของหมู่ฟังก์ชันที่เติมโดยวิธี Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ Fourier Transform Infrared

Spectroscopy (FTIR) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Gel permeation chromatography (GPC) การศึกษาคุณสมบัติด้านความร้อน (thermal properties) โดยวิธี Differential Scanning Calorimetry (DSC) การศึกษาความเป็นผลึก (Crystallinity) โดยวิธี X-ray diffraction และการวิเคราะห์อัตราการเสื่อมสลายของโพลีเมอร์ที่พัฒนาขึ้น โพลีเมอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้จะนำมาเตรียมเป็น จากนั้นพัฒนาอนุภาคนาโนโดยใช้ low molecular weight heparin เป็นตัวยัดแบบเพื่อใช้ศึกษา เปรียบเทียบคุณสมบัติของโพลีเมอร์ที่พัฒนาต่อการนำส่งและเก็บกักตัวยา โดยจะทำการศึกษา คุณสมบัติเคมีกายภาพ (physicochemical properties) ในด้านต่างๆ ได้แก่ ขนาดอนุภาค (particle size) การกระจายของขนาดอนุภาค (particle size distribution) ประจุที่ผิวอนุภาค (Zeta potential) ปริมาณยา (% drug loading efficiency) รูปร่างของอนุภาค (particle morphology) อัตราการปลดปล่อยยา (release study) ความเป็นพิษต่อเซลล์ และคุณสมบัติของโพลีเมอร์ต่อ เซลล์เพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบที่ไม่มีการติดหมู่ ฟังก์ชัน

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของโพลีเมอร์ชนิด polyester ให้มีคุณสมบัติในการ นำมาเตรียมเป็นระบบนำส่งยาชนิดอนุภาคนาโน โดยการติดหมู่ฟังก์ชันที่สนใจ เช่น สาร โมเลกุลเล็ก และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ความคงตัวและความเป็นพิษต่อเซลล์ ของโพลีเมอร์ที่เตรียมได้ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับโพลีเมอร์ต้นแบบที่ไม่มีการติดหมู่ ฟังก์ชัน
2. เพื่อเตรียมอนุภาคนาโนจากโพลีเมอร์ที่พัฒนาขึ้น และทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ ความคงตัว ความสามารถในการบรรจุตัวยา การปลดปล่อยตัวยาออกจาก อนุภาค และการนำยาเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโน ที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบที่ไม่มีการติดหมู่ฟังก์ชัน

3.

วิธีการทดลอง

สารเคมี

- α -Chlorocyclohexanone (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- ϵ -Caprolactone (CL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, and Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany)
- *m*-Chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA, Sigma-Aldrich, Shanghai, China)
- Sodium bicarbonate (NaHCO_3 , Merck, Damstadt, Germany)
- Sodium dithionite (Lot number 70400, Riedel-de Haën, Seelze, Germany)
- Stannous (II) 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, Batch number 036K0730, Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)
- Deuterated chloroform (CDCl_3 , Merck, Damstadt, Germany)
- Deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d_6 , Merck, Damstadt, Germany)
- Deuterium oxide (D_2O , Merck, Damstadt, Germany)
- Chloroform (CHCl_3 , RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
- Hexane (Hex, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
- Ethyl acetate (EtOAc, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
- Dichloromethane (CH_2Cl_2 , RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
- Toluene (RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
- Tetrahydrofuran (THF, reagent grade, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand, and pro analysis grade, Lot no. K35750531.919, Merck, Damstadt, Germany)

- Dimethylformamide (DMF, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
- 1,4-Butanediol (ReagentPlus™ 99%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Poly(ethylene glycol) MW 4000 g/mol (PEG₄₀₀₀, Fluka Chemie, Steinheim, Germany)
- Silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany)
- Poloxamer 188 (PL188, Pluronic® F68, BASF, Ludwigshafen, Germany)
- 100% Acetic acid (VWR International S.A.S, Darmstadt, Germany)
- 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Monobasic sodium phosphate monohydrate (Merck, Darmstadt, Germany)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Hydrochloric acid (1 N, Lot number OC128107, Merck, Darmstadt, Germany)
- Sodium hydroxide (1 N, VWR International S.A.S, Darmstadt, Germany)
- Acetonitrile (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany)
- Methanol (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany)
- L-glutamine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM, Biochrom AG, Berlin, Germany)
- 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT, Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, USA)
- Penicillin/streptomycin (Hoechst, Germany)
- Sodium-dodecyl-sulfate (SDS, MP Biochemicals, Germany)

- Trypsin (Difco, Germany)
- Fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA)
- L-tryptophan (Fluka Biochemika, Tokyo, Japan)
- 3-Butyn-1-ol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- N-Carboxyphthalimide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Copper (I) iodide (CuI, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, Fluka Chemie, Steinheim, Germany)
- 4-Dimethylaminopyridine (DMAP, Fluka Chemie, Steinheim, Germany)
- Sodium azide (NaN₃, Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, New South Wales, Australia)

วัสดุอุปกรณ์

- Three necks round bottom flask equipped with magnetic stirring thermostat
- ¹H and ¹³C Nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H and ¹³C NMR) (Bruker Avance 300 apparatus, Bruker corporation, Rheinstetten, Germany)
- Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (Nicolet 6700 FT/IR spectrophotometer Massachusetts, USA)
- TLC aluminum sheets (pre-coated silica gel 60 F254, 0.2 mm thickness, Merck, Damstadt, Germany)

- Gel permeation chromatography (GPC) equipped with refractive index detector (Waters Corporation, Massachusetts, USA)
- 2 GPC columns of PLgel 10 μm mixed B (Varian, Inc., California, USA)
- Thermo gravimetric analyzer (TGA 7, Perkin Elmer, Massachusetts, USA)
- Differential scanning calorimeter (DSC 7, Perkin Elmer, Massachusetts, USA)
- Scanning electron microscope (Hitachi S4500, Tokyo, Japan)
- Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments, Malvern, UK)
- Microcon Ultracel YM-30 tube (MW cut-off 30,000 Dalton, Millipore, Schwalbach, Germany)
- UV/Vis spectrophotometer (U-3000 spectrophotometry, Hitachi, Tokyo, Japan)
- Shimadzu HPLC machine (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) ประกอบด้วย SIL-10A Autoinjector, LC-10AD Pump, SPD-10AV UV detector
- LaChrom HPLC machine (Hitachi, Tokyo, Japan) ประกอบด้วย L-7120 pump, L-7200 Autosampler, L-7455 Diode array detector, D-7000 Interface, D-7000 HSM Program
- Hypersil ODS column, 5 μm particle size, 250 x 4.6 mm (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- Eppendorf Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- pH-meter 765 Calimatic (Knick, Germany)
- Transonic digital Elma[®] Ultrasonic bath (Germany)

- 15 positions Variomag magnetic stirrer (Komet)
- 4 digits AB204 Electrical balance (Mettler Toledo)
- VTR 5036 Heraeus Incubator (Thermo Scientific)
- Modulyo Edward High Vacuum Freeze Dryer (Britain)
- Synergy (Millipore, France) MQ 18.2 Ω 25 °C
- Infinite M200, GENios Plus micoplate reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)
- Dialysis membrane (MW cut off 6000–8000 kDa, Cellu-Sep T2, Bioron GmbH, Ludwigshafen, Germany)
- Vortex mixer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA)

วิธีดำเนินการทดลอง

(1). การติด nicotinic acid บนสายโซ่ของ poly- ϵ -caprolactone (ϵ CL) ด้วย click reaction

1.1 การสังเคราะห์ α -chloro- ϵ -caprolactone (α Cl ϵ CL)

ละลาย *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA) ในตัวทำละลาย dichloromethane ใน round bottom flask เติม α -chlorocyclohexanone (α ClCy) ผ่าน septum โดยใช้ stainless steel syringe ทำปฏิกิริยาโดยปั่นด้วย stirrer ที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบการดำเนินปฏิกิริยาโดยวิธี TLC ที่เวลาต่าง ๆ นำไปแช่ที่ -20 °C ชำมคืน แล้วกรองเอาตะกอนออก นำสารละลายที่ได้ไปล้างด้วยสารละลายอิ่มตัวของ sodium dithionite จากนั้นล้างด้วยสารละลายอิ่มตัวของ sodium bicarbonate แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นครั้งสุดท้าย เติม anhydrous magnesium sulfate เพื่อให้แห้ง กรองตะกอนออก เก็บส่วนสารละลายใส จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ทำการสกัดสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีกลั่น หรือ column chromatography ระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง แล้วเก็บที่ -20 °C ทำการวิเคราะห์เอกลักษณ์โดยวิธี ¹H-NMR spectroscopy ทำการสังเคราะห์ α Cl ϵ CL ในสภาวะต่างๆ (ตารางที่ 1) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะสังเคราะห์ α Cl ϵ CL ให้ได้ในปริมาณ (yield) สูง

ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ α ClECL และผลการทดลองในแต่ละสภาวะ

สภาวะที่	จำนวนโมล		จำนวนสมมูล [mCPBA]: [α ClCy]	จำนวน ชั่วโมงที่ใช้ ในการทำ ปฏิกิริยา	วิธีการทำให้ บริสุทธิ์	ปริมาณที่ ได้
	mCPBA	α ClCy				
1	8.15	7.54	1.08	96	สกัดและกลั่น	-
2	10.56	7.54	1.40	48	สกัดและกลั่น	-
3	10.10	7.54	1.34	48	สกัด	-
4	101.41	75.42	1.34	48	Column chromatography	-
5	101.41	75.42	1.34	48	Column chromatography	74.32%

1.2 การสังเคราะห์โคโพลีเมอร์ (poly(α ClECL-co-ECL-co-PEG))

นำ α ClECL ไปทำการกลั่นแบบ azeotropic กับ toluene เติม ϵ -Caprolactone (ECL), Tin (II) Octanoate (SnOct₂), polyethylene glycol 4000 (PEG 4000) ใส่ลงใน reaction flask ภายใต้สภาวะบรรยากาศที่มี argon ทำการ vacuum นาน 15 นาที จุ่ม reaction flask ลงใน oil bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 120 °C ทำปฏิกิริยา polymerization ที่อุณหภูมิ 120 °C นาน 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 N Hydrochloric acid ปริมาณมากเกินไป นำไปตกตะกอนใน heptane เย็น จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยการ vacuum ใน dessicator นำโพลีเมอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์เอกลักษณ์ด้วยวิธี ¹H-NMR spectroscopy

1.3 การสังเคราะห์โพลีเมอร์ (poly(α N₃ECL-co-ECL-co-PEG))

ใส่ poly(α ClECL-co-ECL-co-PEG) ลงใน round bottom flask แล้วทำละลายด้วย dry Dimethylformamide (DMF) ปริมาตร 10 ml เติม sodium azide ลงใน flask โดยใช้ปริมาณเทียบเท่ากับ 1.02 โมลของ chloride atom บนสายโซ่โพลีเมอร์ ทำปฏิกิริยาโดยการ stir ข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะบรรยากาศของแก๊สอาร์กอน ระเหย DMF โดยใช้ vacuum จนได้ crude product ที่แห้ง ละลาย crude product ด้วย toluene นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4000 rpm นาน 15 นาที นำ supernatant ที่ได้ ไประเหยเอา toluene ออกจนแห้งสนิท จะได้ poly(α N₃ECL-co-ECL-co-PEG) ตามต้องการ นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Gel permeation chromatography (GPC), Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR)

1.4 การสังเคราะห์ but-3-ynyl nicotinate

ละลาย nicotinic acid ใน dichloromethane เติม dicyclohexyl carbodimide (DCC) และ dimethyl aminopyridine (DMAP) ลงใน reaction flask ปั่นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติม 3-butyn-1-ol ผ่าน rubber septum โดยใช้ stainless steel syringe ปิดจุก flask และทำการ flow argon ปล่องให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี argon ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator จนแห้ง นำตะกอนที่ได้ละลายใน mobile phase ที่จะทำการแยกโดยวิธี column chromatography ระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเกือบหมด เพื่อให้สารที่ได้ยังคงเป็นของเหลวอยู่ ทำการแยกสารโดยวิธี column chromatography ระเหยตัวทำละลายออกจนแห้งสนิท และนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์เอกลักษณ์ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

1.5 การติดโมเลกุล nicotinic acid ด้วย click chemistry

ละลาย poly($\alpha\text{N}_3\text{ECL-co-ECL-co-PEG}$) ใน dry tetrahydrofuran (THF) เติม Cu(I) iodide, DBU และ but-3-ynyl nicotinate ลงใน reaction flask ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี argon ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40°C นาน 4 ชั่วโมง ตักตะกอนใน heptane เย็น นำโพลีเมอร์ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธีลดความดัน และวิเคราะห์เอกลักษณ์ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

(2). การวิเคราะห์คุณสมบัติของโพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid บนสายโซ่ poly- ϵ -caprolactone (ϵCL)

2.1 $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)}$

เป็นการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารเพื่อยืนยันการติดโมเลกุลของยา nicotinic acid บนสายโซ่โพลีเมอร์ โดยใช้ตัวทำละลายเป็น CDCl_3 วิเคราะห์ด้วยความถี่ 300 MHz ด้วยเครื่อง Bruker Avance 300 apparatus ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.2 Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FT-IR)

เป็นการวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันในการตรวจเอกลักษณ์โครงสร้างของสารเพื่อยืนยันการติดโมเลกุลของยา nicotinic acid โดยวิธี KBr disc วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Jasco FT-IR-4100 spectroscopy

2.3 Gel Permeation Chromatography (GPC)

เป็นการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) และเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) รวมถึงค่าการกระจายน้ำหนักโมเลกุล (M_w/M_n) ด้วยเครื่อง Water 150-CV gel permeation chromatograph และตรวจวัดความแตกต่างของค่าดัชนีหักเหของสารโดย refractive index

detector ก่อนการวิเคราะห์ได้ทำละลายสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวทำละลาย Tetrahydrofuran (THF) และกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 μm เมื่อสารถูกแยกออกจากคอลัมน์คู่ชนิด PLgel 10 μm mixed B หลังจากนั้นคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของ poly(styrene) ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ และมีค่าน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 4,490 – 1,112,000 g/mole

2.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

เป็นการวิเคราะห์ thermal property ของสารประเภทโพลีเมอร์ เพื่อวิเคราะห์หาค่า glass transition temperature (T_g) และ melting temperature (T_m) ของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยค่า T_g หาได้จากจุดกึ่งกลางของ baseline ที่ยกระดับขึ้นจากเดิมเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิ และค่า T_m หาได้จากจุดเริ่มต้นของ endothermic peak ของโพลีเมอร์ (onset) การวิเคราะห์โดยวิธีนี้ จะเริ่มต้นด้วยการลดอุณหภูมิของสารตัวอย่างอย่างรวดเร็วไปที่อุณหภูมิ $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ จากนั้นจะเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ต่อนาที (first heat) จนถึงอุณหภูมิ $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ แล้วลดอุณหภูมิด้วยอัตราเร็วเท่าเดิมจนถึง $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (first cool) จากนั้นจึงเริ่มเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกรอบด้วยอัตราเท่าเดิม (second heat) และบันทึกค่า T_g และ T_m ระหว่างที่เพิ่มอุณหภูมิในครั้งที่สอง การวิเคราะห์นี้ทำโดยใช้เครื่อง DSC 7 Perkin Elmer differential scanning calorimeter และตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องมือ (calibration) ด้วยสารมาตรฐาน indium

2.5 Thermal gravimetric analysis

ศึกษาการเสื่อมสลายของสารตัวอย่างเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในสภาวะแห้ง ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องจนถึง $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ ด้วยอัตราเร็ว $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ต่อนาที และบันทึกค่าน้ำหนักที่สูญเสียไปคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ณ อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละจุด การศึกษานี้ทำโดยใช้เครื่อง TGA 7 Perkin Elmer thermogravimetric analyzer

(3). การศึกษาการสังเคราะห์และวิเคราะห์โพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid ด้วยสัดส่วนจำนวนโมลต่าง ๆ บนสายโซ่

สังเคราะห์โพลีเมอร์ที่มีหมู่ chloride (Cl) บนสายโซ่ ($P(\alpha\text{ClECL-ran-ECL-co-PEG}$) ให้มีจำนวนโมล ของหมู่ Cl เป็น 10%, 20% และ 30% โดยให้มี chlorocaprolactone (ClCL) repeating units บนสายโซ่ โดยใช้ปริมาณโมลของ ClCL และ CL ที่แตกต่างกัน จากนั้น สังเคราะห์โพลีเมอร์ที่มีสัดส่วน nicotinic acid ต่างๆ โดยการสังเคราะห์โพลีเมอร์ที่มีหมู่ Cl แล้วเปลี่ยนหมู่ Cl เป็นหมู่ azide (N_3) และทำการติดโมเลกุล nicotinic acid บนสายโซ่โดยปฏิกิริยา click reaction ตาม condition ที่ปฏิกิริยาก่อนหน้านี้ และศึกษาสมบัติโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ดังนี้

3.1 การวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 3 series ได้แก่ โพลีเมอร์ที่มีหมู่ Cl คือ ($P(\alpha\text{ClECL-ran-ECL-co-PEG}$), โพลีเมอร์ที่มีหมู่ N_3 คือ ($P(\alpha\text{N}_3\text{ECL-ran-ECL-co-PEG}$) และ โพลีเมอร์ที่มี nicotinic acid คือ ($P(\text{Nicotinic acid-g-ECL-ran-ECL-co-}$

PEG) ด้วยการวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR และวิธี FTIR เพื่อยืนยันว่าการติดหมู่หรือโมเลกุลดังกล่าวเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์หรือไม่ และคำนวณปริมาณหมู่หรือโมเลกุลดังกล่าวบนสายโซ่โดยวิธี NMR ตามสมการก่อนหน้า

3.2 ศึกษาการเสื่อมสลายของสายโซ่โพลีเมอร์ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา โดยการแปลผลจากการทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี GPC อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสายโซ่โพลีเมอร์ที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid โดยวิธี NMR ไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจากพีคที่เกิดขึ้นหลังการติดโมเลกุล nicotinic acid ใน NMR spectrum มีการบวกรวมหรือเกิดทับที่ตำแหน่งของพีคที่ใช้เป็น marker ในการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลดังที่ได้ระบุไว้ตามการทดลองก่อนหน้า

3.3 ศึกษา Thermal property ของโพลีเมอร์ที่มีการติดหมู่หรือโมเลกุลทั้ง 3 series ด้วยวิธี DSC

(4) การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้

ศึกษาโดยวิธี MTT assay ใน 96-well plate โดยใช้เซลล์ human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) ซึ่งเป็นเซลล์ปกติที่สกัดแยกจาก umbilical cord โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางด้านล่างนี้ และเซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้อยู่ใน passage ที่ 3 – 5

ตาราง ส่วนประกอบของ culture medium ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ HUVECs

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (%v/v)
Penicillin/streptomycin	1
Glutamine	2
Bicarbonate solution	3
Fetal bovine serum	15
Fibroblast growth factor	0.1
Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM)	qs. to 100

เตรียมเซลล์ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน culture medium (cell suspension) ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ 3×10^5 cells/mL เติมน้ำ cell suspension ปริมาตร 50 μ L ลงในหลุมของ 96-well plate จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C และมี CO₂ ในบรรยากาศ 5% เติมน้ำสารละลายโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ในตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 50 μ L โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 3.9–500 μ g/mL จากนั้นจึง incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมง เติมน้ำสารละลาย MTT ในแต่ละหลุม หลุมละ 25 μ L และ incubate ต่ออีก 24 ชั่วโมง เติมน้ำสารละลาย SDS ในแต่ละหลุม ละ 100 μ L และ incubate ต่ออีก 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น

620 และ 560 nm และคำนวณหา %Survival cell โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ incubate กับ culture medium อย่างเดียวเพื่อใช้เป็น control

หมายเหตุ

- เซลล์ที่ incubate กับ DMSO อย่างเดียวใช้เป็น control ในการควบคุมผลของ DMSO ต่อเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้ความเข้มข้นของ DMSO สูงสุดที่ใช้คือ 4 %v/v
- P(CL)-co-PEG ใช้เป็นโพลีเมอร์ต้นแบบเนื่องจากเป็นโพลีเมอร์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นโพลีเมอร์ชนิด biocompatible และไม่เป็นพิษต่อเซลล์

สูตรคำนวณ %Survival cell

$$\%Survival\ cell = \frac{(A_{SC,560} - A_{SC,620}) - (A_{S,560} - A_{S,620})}{(A_{C,560} - A_{C,620})} \times 100$$

- A_{SC} = ค่า absorbance ที่วัดจากตัวอย่างที่ incubate เซลล์กับโพลีเมอร์
 A_S = ค่า absorbance ที่วัดจากตัวอย่างที่ incubate โพลีเมอร์อย่างเดียว
 A_C = ค่า absorbance ที่วัดจากตัวอย่างที่ incubate เซลล์อย่างเดียว (control)
ตัวเลข 560 และ 620 หมายถึงความยาวคลื่นที่ใช้วัดค่า absorbance

(5). การศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนโดยโพลีเมอร์ที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid

5.1 การเตรียมอนุภาคนาโนด้วยวิธี nanoprecipitation

ละลายโพลีเมอร์น้ำหนัก 50 mg ในตัวทำละลาย tetrahydrofuran (THF) จำนวน 10 mL และค่อย ๆ เติมสารละลายโพลีเมอร์ ที่ละลายลงในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 8 mL ที่กำลังปั่นด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 1000 rpm ปั่นด้วย magnetic stirrer ต่ออีก 30 นาที และนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q ให้ได้ปริมาตร 8 mL และกรองผ่าน membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 μm เพื่อกำจัดอนุภาคที่เกิด aggregate แล้วนำอนุภาคนาโนที่ได้ไปวิเคราะห์คุณสมบัติ

5.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติอนุภาคนาโนที่เตรียมได้

ศึกษาขนาดอนุภาคเฉลี่ย ค่าการกระจายของขนาดอนุภาค และค่าประจุบนพื้นผิวอนุภาค โดยวิธี Photon correlation spectroscopy (PCS) โดยใช้เครื่อง Malvern Zetasizer 3000 HSA เครื่องจะทำการวัดโดยใช้ HeNe laser ที่ความยาวคลื่น 633 nm มุม 90° อุณหภูมิ 25 °C ก่อนการวัดต้องทำการเตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ Milli-Q เพื่อให้ได้ค่าการกระเจิงแสงของตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการวัด

5.3 การศึกษารูปร่างของอนุภาคนาโนที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid

5.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

เจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยน้ำ Milli-Q หยดตัวอย่างที่เจือจางลงบน cover slide จำนวน 1–2 หยด แล้วเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายให้ทั่ว cover slide ทำให้แห้งโดยการเก็บใน dessicator ข้ามคืน ติด cover slide ที่มีตัวอย่างที่แห้งลงบน stub เคลือบผิวตัวอย่างด้วย gold เป็นระยะเวลา 45 วินาที

5.3.2 วิเคราะห์รูปร่างของอนุภาคนาโน

วิเคราะห์รูปร่างของอนุภาคนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ที่ต่อกับ field-emission-cathode และใช้ upper detector ในการตรวจจับสัญญาณภาพ จากนั้นจึง capture ภาพด้วยโปรแกรม Digital Image Processing System 2.6

5.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ HUVECs ของอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid

ศึกษาโดยวิธี MTT assay ใน 96-well plate โดยใช้เซลล์ human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) ซึ่งเป็นเซลล์ปกติที่สกัดแยกจาก umbilical cord โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางด้านล่างนี้ เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้อยู่ใน passage ที่ 3 – 5

ตาราง ส่วนประกอบของ culture medium ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ HUVECs

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (%v/v)
Penicillin/streptomycin	1
Glutamine	2
Bicarbonate solution	3
Fetal bovine serum	15
Fibroblast growth factor	0.1
Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM)	qs. to 100

(6) การวิเคราะห์ ibuprofen และ indomethacin โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการสืบค้นข้อมูล พบว่ามีผู้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ไว้จำนวนมากและค่อนข้างหลากหลาย เนื่องจากยาทั้งสองตัวนี้มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ของยาทั้งสองตัวนี้ จึงเลือกพัฒนาจากวิธีวิเคราะห์ที่เคยใช้อยู่แล้ว โดยปรับปรุงวิธีวิเคราะห์เพื่อให้ใช้ได้กับระบบที่ทำการศึกษา (48, 49) ระบบ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ยาทั้งสอง แสดงให้เห็นในตารางต่อไปนี้

ตาราง ระบบ HPLC ในการวิเคราะห์ยา ibuprofen และ indomethacin

	Ibuprofen	Indomethacin
HPLC machine	LaChrome, Hitachi, Tokyo, Japan	
Pump	Model L-7120	
Autosampler	Model L-7200	
Diode Array detector	Model L-7455	
Interface Controller	Model D-7000	
Program	D-7000 HSM	
Stationary phase	Reverse phase Hypersil ODS column, 5 µm particle size, 250 × 4.6 mm methanol:acetonitrile:water:acetic acid	
Mobile phase	(55:35:10:1)	
Flow rate (mL/min)	1.4	1.2
UV detector (nm)	264	254
Injection volume (µL)	20	20
Calibration curve (µg/mL)	2.5 – 40	0.25 – 40
Retention time (min)	15	16

การตรวจสอบวิธีวิเคราะห์

1. Precision

เป็นการศึกษาเพื่อดู repeatability และ reproducibility ของวิธีวิเคราะห์ การตรวจสอบ repeatability โดยการหา %Coefficient of variance (%CV) ของ peak area ของสารมาตรฐานยา จำนวน 3 ความเข้มข้น และวิเคราะห์ซ้ำจากการฉีด 5 ครั้งต่อหนึ่งความเข้มข้นภายใน 1 วัน ส่วน การตรวจสอบ reproducibility ทำได้โดยวิธีเดียวกันกับการตรวจสอบ repeatability แต่วิเคราะห์ในวันที่แตกต่างกันเป็นเวลา 5 วัน

2. Accuracy

ตรวจสอบโดยการหา %recovery ของยาจากการเติมเพิ่มเติมลงในสารละลายมาตรฐาน ยา วิเคราะห์จำนวน 3 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานยาและทำการวิเคราะห์ซ้ำจากการฉีด 3 ครั้ง ต่อหนึ่งความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ค่า %recovery ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 90–110%

3. Linearity

ตรวจสอบโดยการสร้างกราฟของสารมาตรฐานระหว่าง peak area และความเข้มข้นของสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น แล้วทำการหาค่า slope, y-intercept และค่า coefficient of regression line (r^2) ซึ่งค่า r^2 ที่ยอมรับได้คือค่าที่มากกว่า 0.9995

(7) การศึกษาจำนวนโมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ต่อการ incorporate ยาในอนุภาคนาโน

ในการศึกษานี้ใช้อนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ปริมาณ 10, 20 และ 30 %โมล และ incorporate ตัวยา ibuprofen และ indomethacin โดยใช้อัตราส่วนระหว่างยาต่อโพลีเมอร์ (D:P ratio) คือ 2:10 และ 3:10 ละลายโพลีเมอร์น้ำหนัก 50 mg และยาน้ำหนัก 10 และ 15 mg สำหรับตำรับที่มี D:P ratio 2:10 และ 3:10 ตามลำดับ ในตัวทำละลาย tetrahydrofuran (THF) 10 mL ค่อย ๆ เติมสารละลายโพลีเมอร์ในข้อ 1 ที่ละลายลงในน้ำ Milli-Q ปริมาตร 8 mL ที่กำลังปั่นด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 1000 rpm ปั่นด้วย magnetic stirrer ต่ออีก 30 นาที นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q ให้ได้ปริมาตร 8 mL กรองผ่าน membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 μm เพื่อกำจัดอนุภาคที่เกิด aggregate จากนั้นนำอนุภาคนาโนที่ได้ไปประเมินคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

7.1 การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพอนุภาคนาโนที่เตรียมได้

ศึกษาขนาดอนุภาคเฉลี่ย ค่าการกระจายของขนาดอนุภาค และค่าประจุบนพื้นผิวอนุภาค โดยวิธี photon correlation spectroscopy (PCS) โดยใช้เครื่อง Malvern Zetasizer 3000 HSA เครื่องจะทำการวัดโดยใช้ HeNe laser ที่ความยาวคลื่น 633 nm มุม 90° อุณหภูมิ 25°C ก่อนการวัดต้องทำการเตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ Milli-Q เพื่อให้ได้ค่าการกระเจิงแสง (scattering) ของตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการวัด

7.2 การวิเคราะห์ปริมาณยาที่ถูก incorporate ในอนุภาคนาโนที่เตรียมได้

วิเคราะห์ปริมาณยาโดยวิธี HPLC โดยแบ่งวิเคราะห์เป็น 2 ส่วนซึ่งผลต่างของปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้จาก 2 ส่วนนี้มีค่าเท่ากับปริมาณยาที่ถูก incorporate ในอนุภาคนาโน (Amount of drug in nanoparticles) นอกจากนี้นำอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ไปทำ lyophilization และนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของ total solid content หลังการเตรียมอนุภาคนาโน

ส่วนที่ 1 Filtrate

การเตรียมตัวอย่าง

ปิเปตสารแขวนลอยอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ปริมาตร 1 mL ใส่ใน Microcon Ultracel YM-30 tube (MW cut-off 30,000 Dalton) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 rpm นาน 10 นาที และนำ filtrate ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ส่วนที่ 2 Nanoparticle dispersion

การเตรียมตัวอย่าง

ปิเปตสารแขวนลอยอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ปริมาตร 0.5 mL ใส่ใน microtube เติมน้ำ mobile phase ปริมาตร 0.5 mL จากนั้นนำไปปั่นผสมโดยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที นำไป sonicate นาน 30 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นนำ supernatant

ที่ได้ไปเจือจางด้วย mobile phase จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จึงนำผลที่ได้มาประเมินประสิทธิภาพในการบรรจุยาของอนุภาคนาโนที่พัฒนาขึ้น โดยประเมินจากค่า %drug loading และ %entrapment efficiency ซึ่งสามารถคำนวณได้ตามสมการต่อไปนี้

วิธีคำนวณ %Drug loading (%DL) และ %Entrapment efficiency (%EE)

$$\% \text{ Drug Loading} = \frac{\text{Amount of drug in nanoparticles}}{\text{Amount of lyophilized nanoparticles}} \times 100$$

$$\% \text{ Entrapment Efficiency} = \frac{\text{Amount of drug in nanoparticles}}{\text{Initial amount of drug added}} \times 100$$

โดยที่:

Amount of lyophilized nanoparticles คือ น้ำหนักของอนุภาคนาโนที่เตรียมได้หาได้จากผลต่างของน้ำหนักระหว่างอนุภาคนาโนที่เตรียมได้หลังผ่านกระบวนการ lyophilization กับปริมาณยาที่ไม่ถูก incorporate ในอนุภาคนาโนที่วิเคราะห์ได้ในส่วนของ filtrate

Initial amount of drug added คือน้ำหนักของยาที่ใส่ในตอนเริ่มต้น

Amount of drug in nanoparticles คือปริมาณยาที่ถูก incorporate ในอนุภาคนาโนที่วิเคราะห์ได้ซึ่งหาได้จากผลต่างระหว่างปริมาณยาที่พบในส่วนที่ 1 (Filtrate) และส่วนที่ 2 (Nanoparticle dispersion)

7.3 การศึกษารูปร่างของอนุภาคนาโนกักเก็บ ibuprofen และ indomethacin

เตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยน้ำ Milli-Q หยดตัวอย่างที่เจือจางลงบน cover slide จำนวน 1 – 2 หยด แล้วเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายให้ทั่ว cover slide ทำให้แห้งโดยการเก็บใน dessicator ข้ามคืน ติด cover slide ที่มีตัวอย่างที่แห้งลงบน stub เคลือบผิวตัวอย่างด้วย gold เป็นระยะเวลา 45 วินาที วิเคราะห์รูปร่างของอนุภาคนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ที่ต่อกับ field-emission-cathode และใช้ upper detector ในการตรวจจับสัญญาณภาพ จากนั้นจึง capture ภาพด้วยโปรแกรม Digital Image Processing System 2.6

(8) การศึกษาผลของจำนวนโมลของ nicotinic acid ต่อการปลดปล่อย Ibuprofen และ Indomethacin

การศึกษากการปลดปล่อยตัวยาจากอนุภาคนาโนโดยวิธี dialysis ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป นำอนุภาคนาโนที่ incorporate ยา ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุง dialysis membrane จากนั้นจึงผูกถุงให้แน่น นำถุง dialysis ที่ได้จุ่มลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ใช้เป็น receptor medium ในขวดแก้วใส จากนั้นจึง incubate ถุง dialysis ที่จุ่มในสารละลายในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมกับปั่นด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 130 rpm สุ่มตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

จากสารละลายนอกถุง dialysis ที่อยู่ขวดแก้วที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90 นาที 2, 3, 4, 5, 6 และ 24 ชั่วโมง เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใหม่ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทันทีหลังจากสูมตัวอย่าง นำตัวอย่างที่สูมได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ผ่านการทำ validation แล้ว จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา %cumulative amount of drug release ตามสมการต่อไปนี้

$$\%Q_t = \frac{V_r C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s C_i}{Q_0} \times 100$$

Q_0 คือ ปริมาณยาในอนุภาคนาโนเริ่มต้น

C_t คือ ความเข้มข้นของยาใน receptor medium ที่วิเคราะห์ได้ ณ เวลาที่สูมตัวอย่าง

C_i คือ ความเข้มข้นของยาใน receptor medium จากการสูมตัวอย่างที่ i

V_r คือ ปริมาตรของ receptor medium ทั้งหมดที่อยู่ในขวดแก้ว

V_s คือ ปริมาตรของ receptor medium ที่สูมแต่ละครั้ง

นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟ release profile ระหว่าง %cumulative amount of drug release กับเวลา

(9) การศึกษาการเกิด interaction ระหว่างยา ibuprofen กับสายโซ่โพลีเมอร์โดยวิธี FT-IR

แยกละลายโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% โมล ยา ibuprofen และสารผสมระหว่างโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% โมลกับยา ibuprofen ในตัวทำละลาย tetrahydrofuran หยดสารละลายในข้อ 1 ลงบนแผ่น KBr 1 หยด ตั้งทิ้งไว้ใน dessicator จนแห้งนำไปวัด absorption ด้วยเครื่อง Nicolet 6700 FT/IR spectrophotometer

(10) การแปลผลทางสถิติ

การแปลผลทางสถิติโดยใช้ค่าเฉลี่ยจากการวัดอย่างน้อย 3 ครั้ง เปรียบเทียบตัวแปรแต่ละกลุ่มทางสถิติโดยวิธี student t-test หรือ one way ANOVA จากโปรแกรม SPSS 13.0 for windows เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงความเชื่อมั่น 95% เมื่อค่า p-value น้อยกว่า 0.05

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

(1). การติด nicotinic acid บนสายโซ่ของ poly- ϵ -caprolactone (ϵ CL) ด้วย click reaction

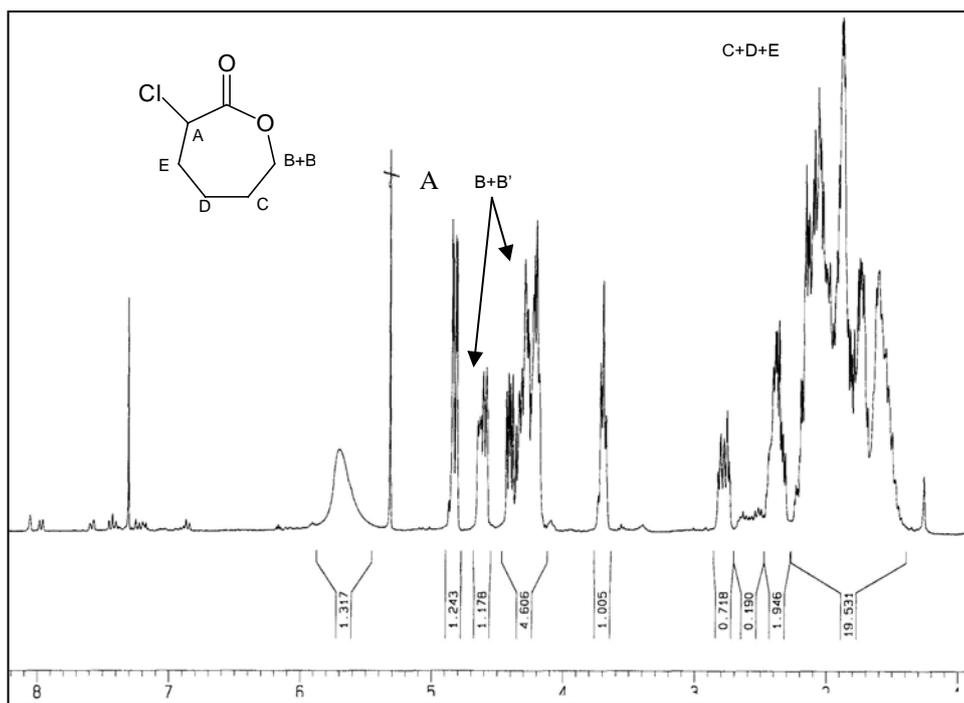
1.1 การสังเคราะห์ α -chloro- ϵ -caprolactone

จากการสืบค้นข้อมูล พบว่า การเตรียมโพลีเอสเตอร์ได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาพัฒนาเป็นระบบนำส่งยา เนื่องจากเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยเฉพาะ polycaprolactone และ polylactide ซึ่งเป็นตัวแทนของโพลีเอสเตอร์ที่ได้รับความนิยมอย่างสูง polycaprolactone เป็น linear aliphatic polyester ที่มีลักษณะกึ่งผลึก สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการ ring-opening polymerization ของ epsilon-caprolactone แต่การติดหมู่ฟังก์ชันลงบนโพลีเมอร์นี้อาจต้องทำการสังเคราะห์ α -chloro- ϵ -caprolactone (α Cl ϵ CL) เพื่อ polymerization กับ epsilon-caprolactone ให้ได้เป็นโคโพลีเมอร์ของ poly(α Cl ϵ CL-co- ϵ CL) แล้วจึงเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่กลุ่ม chloride ด้วยกลุ่มสารที่ต้องการในสายโซ่โคโพลีเมอร์นี้

α -chloro- ϵ -caprolactone (α Cl ϵ CL) เป็น monomer ซึ่งไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด จึงจำเป็นต้องสังเคราะห์สารนี้ขึ้นโดยใช้ปฏิกิริยา Baeyer-Villiger oxidation (37) ด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่าง α -chlorocyclohexanone (α ClCy) กับ *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA)

จากข้อมูลที่สืบค้นได้ (37) พบว่ามีสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์คือใช้จำนวนสมมูล *m*CPBA ต่อ α ClCy เป็น 1.08 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 96 ชั่วโมง ทำการสกัดด้วย sodium dithionite และ sodium bicarbonate อย่างละ 3 ครั้ง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการกลั่น (สภาวะที่ 1 ในตารางที่ 1) แต่จากการทดลองนี้ พบว่า เมื่อใช้จำนวนสมมูลของ *m*CPBA เท่ากับ 1.08 ทำปฏิกิริยานาน 96 ชั่วโมง และติดตามปฏิกิริยาโดยวิธี TLC พบว่า spot ของ α ClCy ที่ย้อมด้วย iodine มีปริมาณความเข้มของ spot ลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งครบ 96 ชั่วโมง เมื่อทำการสกัดด้วย sodium dithionite และ sodium bicarbonate อย่างละ 3 ครั้ง และทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการกลั่น พบว่าสารที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี 1 H-NMR spectroscopy พบว่า สารที่ได้เกิดการสลายตัวและได้สารที่ไม่บริสุทธิ์

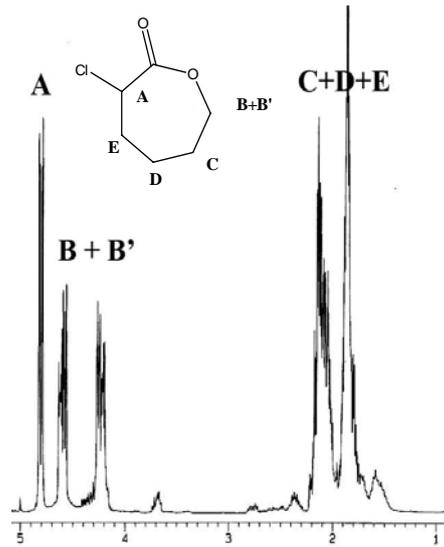
จากการทดลองตามสภาวะที่ 2 ด้วยการเพิ่มจำนวนสมมูลของ *m*CPBA ต่อ α ClCy เป็น 1.40 และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง พบว่า α Cl ϵ CL มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงหยุดปฏิกิริยา และทำการสกัดและกลั่น เพื่อทำให้สารบริสุทธิ์ พบว่า การกลั่นยังไม่สามารถทำให้สารที่ได้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากการกลั่นต้องใช้ความร้อนและสารที่ได้มีความไม่เสถียรเมื่อสัมผัสความร้อน ดังเห็นได้จาก 1 H-NMR spectrum ของสารที่ได้จากการกลั่น (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารที่กลั่นได้จากการสังเคราะห์ αClECL ตามสภาวะที่ 2 (ตารางที่ 1)

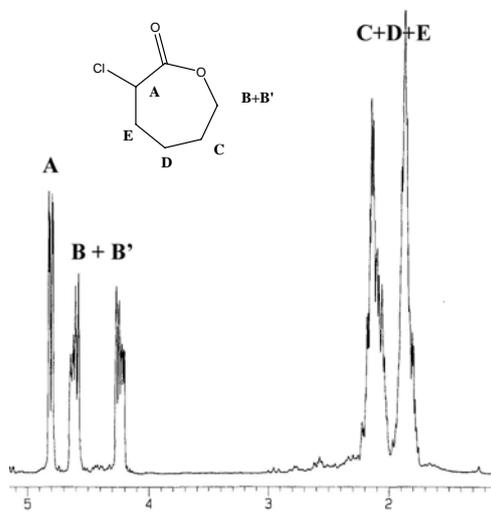
เมื่อทดลองลดจำนวนสมมูลของ $m\text{CPBA}$ ต่อ αClCy เป็น 1.34 (สภาวะที่ 3 ในตารางที่ 1) พบว่า การเกิดปฏิกิริยาไม่แตกต่างจากสภาวะที่ 2 และเมื่อทดสอบความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาจาก TLC พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง αClCy มีค่าน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในขณะที่ αClECL มีปริมาณมาก หลังการหยุดปฏิกิริยาและทำการสกัดด้วย sodium dithionite และ sodium bicarbonate จนไม่พบการเกิดฟองอากาศ (สกัด 2 ครั้ง) และตรวจสอบด้วยวิธี TLC เพื่อยืนยันว่าไม่เหลือสารตั้งต้นที่อาจจะมีผลรบกวนหรือปนเปื้อนสารที่ต้องการ พบว่า จำนวนสมมูลของ $m\text{CPBA}$ ต่อ αClCy (1.34) ระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (48 ชั่วโมง) และจำนวนครั้งของการสกัดด้วย sodium dithionite และ sodium bicarbonate (สกัด 2 ครั้ง) เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสภาวะการสังเคราะห์เพื่อทำการสังเคราะห์ αClEC แต่อย่างไรก็ตามสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอที่จะใช้ในการสังเคราะห์โพลีเมอร์ต่อไป อีกทั้งสารตั้งต้นที่ทำการทดลองใน 3 สภาวะที่ผ่านมาใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยทำให้ได้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ดังนั้น จึงทดสอบหาวิธีแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการอื่น และเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มผลผลิต

เมื่อทำการทดลองโดยการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ αClCy จาก 7.54 mmole เป็น 75.4 mmole (สภาวะที่ 4 ในตารางที่ 1) หลังจากทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง และตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy พบว่า สารที่สังเคราะห์ได้คือ αClECL ซึ่งมีโครงสร้างและโปรตอนดังแสดงในรูปที่ 2 แต่จาก spectrum พบว่ายังคงมีสารปนเปื้อนเหลืออยู่ จึงต้องทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ ด้วยการทดลองแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี column chromatography และใช้ mobile phase ชนิดเดียวกับที่ได้ใช้กับ TLC



รูปที่ 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารที่สังเคราะห์ได้ ($\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$) ตามสภาวะที่ 4 (ตารางที่ 1)

การทดลองแยกสารให้บริสุทธิ์ทำโดยวิธี column chromatography และใช้ mobile phase เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ ethyl acetate ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 และระเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้ง และนำไปตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy พบว่าได้ผลดังรูปที่ 3

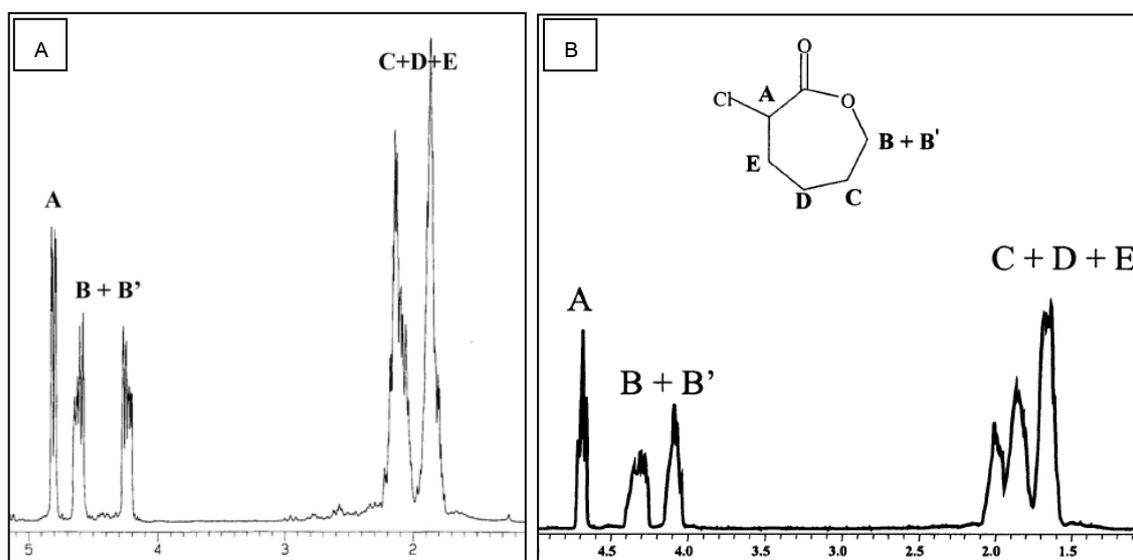


รูปที่ 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารที่สังเคราะห์ได้ ($\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$) ตามสภาวะที่ 4 (ตารางที่ 1) หลังจากผ่านการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography

การทดลองแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ทำให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นพร้อมที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนการสังเคราะห์โพลีเมอร์ในลำดับต่อไป แต่เนื่องจากการสังเคราะห์ครั้งนี้ มีการแบ่งสารออกไปในระหว่างการสังเคราะห์ ทำให้ไม่สามารถหาปริมาณที่ได้สุทธิจากการสังเคราะห์ครั้งนี้ได้ ดังนั้นจึงทำการทดสอบซ้ำที่สภาวะที่ 4 และควบคุมความชื้นในการสังเคราะห์โดยการนำ *m*CPBA ไป vacuum ก่อนใช้ประมาณ 10 ชั่วโมง และทำให้ dichloromethane ไปทำให้ปราศจากน้ำโดยการแช่กับ molecular sieve ข้ามคืนก่อนนำไปใช้ โดยที่ระหว่างการทำปฏิกิริยาต้องมีการบรรจุก๊าซ argon เพื่อให้สภาพบรรยากาศเหนือสารละลายปราศจากความชื้นตลอดของปฏิกิริยาสังเคราะห์ จากการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมนี้ ทำให้สามารถสังเคราะห์ α ClECL จนได้ปริมาณสุทธิสูงถึง 75% โดยประมาณ (สภาวะการทดลองที่ 5) โดยเมื่อนำสารที่ได้ไปตรวจสอบเอกลักษณ์ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy พบว่าสารที่ได้มี spectrum สอดคล้องกับ reference spectrum ที่มีรายงานไว้ (37) ตามที่สรุปไว้ในตารางที่ 2 และรูปที่ 4

ตารางที่ 2 Characteristic peaks ของสารที่สังเคราะห์ได้

Position	δ (ppm)
A	4.78-4.82 dd, 7.77-8.47, 2.03-2.53 Hz
B+B'	4.54-4.68 m
B+B'	4.18-4.30 m
C,D,E	1.70-2.25 m



รูปที่ 4 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของสาร α ClECL ที่สังเคราะห์ได้ (A) และ Reference (B) (37)

1.2 การสังเคราะห์โคโพลีเมอร์ (poly(α ClECL-co-ECL-co-PEG))

การสังเคราะห์โพลีเมอร์ทำโดยใช้วิธี ring-opening polymerization และจากการสืบค้นข้อมูลพบว่า มีผู้ที่ศึกษาการสังเคราะห์โพลีเมอร์ poly(α ClECL-co-ECL) โดยใช้ 2,2-Dibutyl-2-stanna-1,3-dioxepane (DSDOP) เป็น initiator (37) สำหรับการทดลองนี้ ได้มีการปรับเปลี่ยนวิธีสังเคราะห์และ initiator ที่ใช้ในปฏิกิริยา โดยใช้ polyethylene glycol 4000 (PEG 4000) (MW = 4000) เป็น macromolecular initiator ทำให้โพลีเมอร์ที่ได้มีโมเลกุลของ PEG 4000 อยู่ในสายโซ่ และทำให้คุณสมบัติของโพลีเมอร์เปลี่ยนจากโพลีเมอร์ที่มีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic polymer) เป็นโพลีเมอร์ชนิดที่มีความชอบทั้งน้ำและน้ำมัน (amphiphilic polymer) นอกจากนี้ยังทำให้โพลีเมอร์ที่ได้มีหมู่ฟังก์ชันที่พร้อมจะเปลี่ยน หรือ แทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันที่ต้องการอื่นอีกด้วย และในปฏิกิริยา polymerization ได้มีการใช้ Tin (II) Octanoate (SnOct₂) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ร่วมด้วย

จากการทดลองได้ทำการทดลองสังเคราะห์โคโพลีเมอร์ (copolymer) ระหว่าง α ClECL กับ ECL โดยใช้ PEG 4000 เป็น initiator ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กันจำนวน 3 อัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 3 จากการตรวจเอกลักษณ์ของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์โดยวิธี ¹H-NMR spectroscopy พบว่ามี α ClECL unit คิดเป็น 27% เมื่อเปรียบเทียบกับ ECL unit และคิดเป็น 13% ของทั้งสายโซ่ โครงสร้างของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้และ ¹H-NMR spectrum แสดงในรูปที่ 5

ตารางที่ 3 สรุปอัตราส่วนของ α ClECL บนสายโซ่โพลีเมอร์และค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลที่คาดว่าจะได้ตามทฤษฎี

$f^a_{\alpha\text{ClECL}}$	$F^b_{\alpha\text{ClECL}}$	$F^c_{\alpha\text{ClECL}}$	$M^d_{n,\text{theo}}$
0.30	0.27	0.13	15,740

$f_{\alpha\text{ClECL}}$ = อัตราส่วนระหว่าง α ClECL ต่อ ECL ที่ใส่ตอนเริ่มต้น

$F^b_{\alpha\text{ClECL}}$ = อัตราส่วนระหว่าง α ClECL ต่อ ECL ในสายโซ่ที่วิเคราะห์ได้โดยวิธี ¹H-NMR spectroscopy

$F^c_{\alpha\text{ClECL}}$ = อัตราส่วนระหว่าง α ClECL ต่อ ECL และ PEG 4000 ในสายโซ่ที่วิเคราะห์ได้โดยวิธี ¹H-NMR spectroscopy

$M^d_{n,\text{theo}}$ = ค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลโดยจำนวนของสายโซ่โพลีเมอร์ตามทฤษฎี

วิธีคำนวณ

$$f_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}} = \frac{[\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}]_0}{[\varepsilon\text{CL}]_0 + [\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}]_0}$$

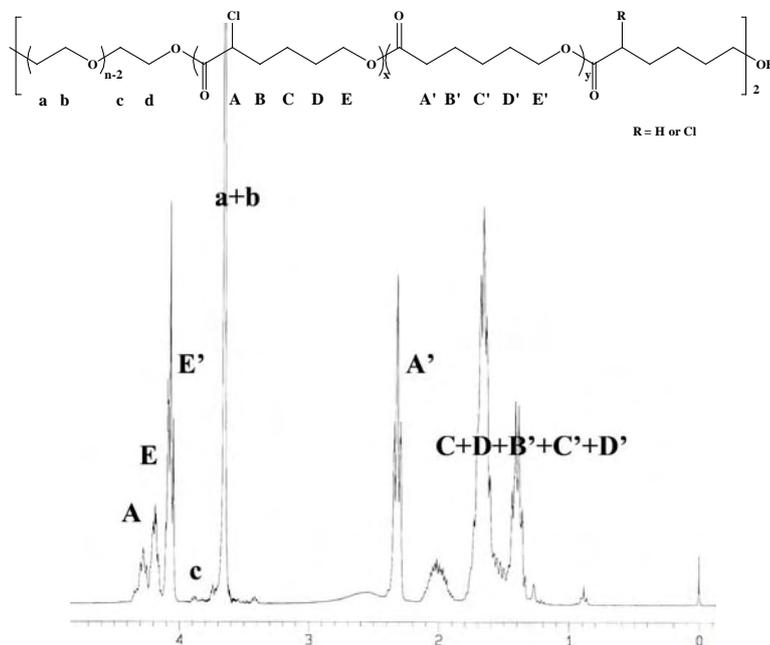
$$F^b_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}} = \frac{\frac{1}{3}[I_{AEE'} - I_{A'}]}{\left(\frac{1}{3}[I_{AEE'} - I_{A'}]\right) + \frac{1}{2}I_{A'}}$$

$$F^c_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}} = \frac{\frac{1}{3}[I_{AEE'} - I_{A'}]}{\left(\frac{1}{3}[I_{AEE'} - I_{A'}]\right) + \frac{1}{2}I_{A'} + \frac{1}{4}I_{a+b}}$$

$$M_{n,theo} = [n_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}} \times 148] + [n_{\varepsilon\text{CL}} \times 114] + M_{n,PEG}$$

$n_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}}$ = อัตราส่วนโมลของ $\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}$ ที่ใช้ในปฏิกิริยาต่ออัตราส่วนโมลของ initiator

$n_{\varepsilon\text{CL}}$ = อัตราส่วนโมลของ εCL ที่ใช้ในปฏิกิริยาต่ออัตราส่วนโมลของ initiator

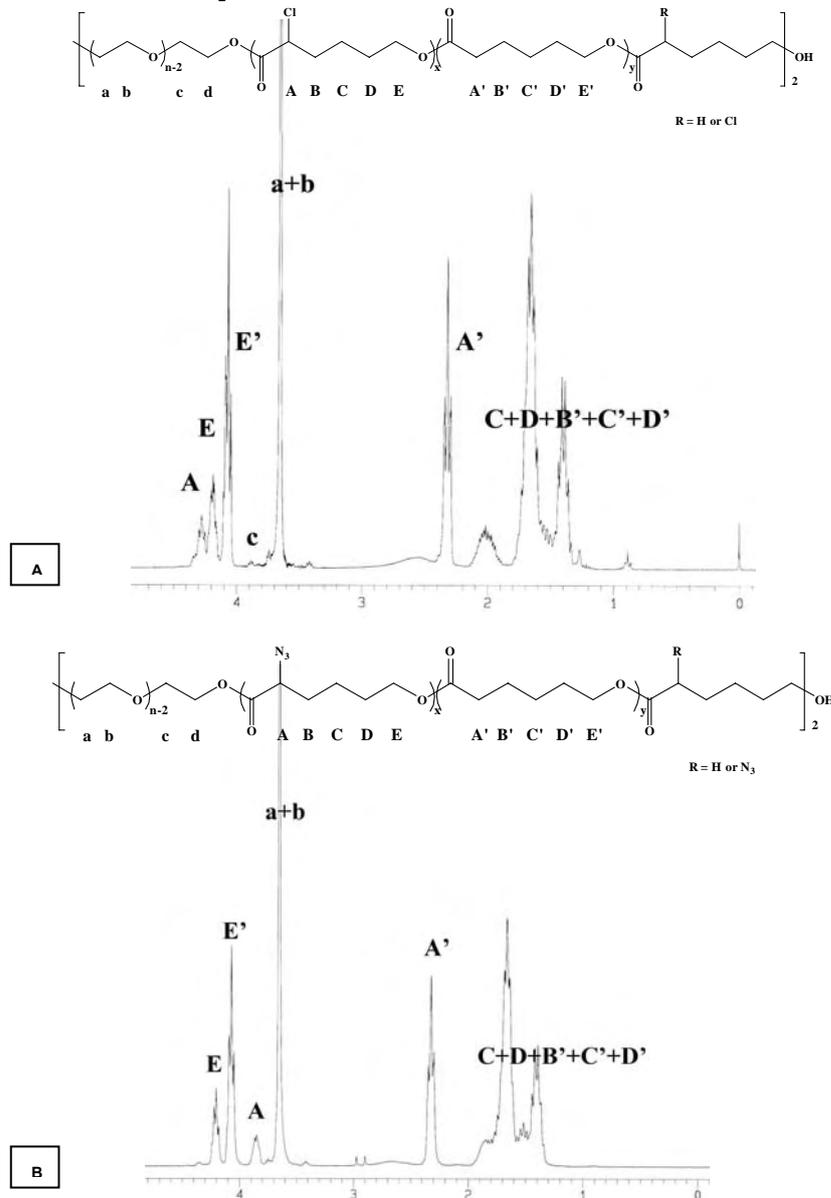


รูปที่ 5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ $\text{poly}(\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL-co-}\varepsilon\text{CL-co-PEG})$ ที่ประกอบด้วย $f_{\alpha\text{Cl}\varepsilon\text{CL}} = 0.3$

1.3 การสังเคราะห์ Poly(α N₃εCL-co- εCL-co-PEG)

หลังจากทำการสังเคราะห์ poly(α ClεCL-co-εCL-co-PEG) แล้ว จึงทดลองเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันเพื่อเตรียมพร้อมในการติดหมู่ฟังก์ชันอื่นบนสายโซ่โพลีเมอร์ โดยการเปลี่ยนหมู่ chloride เป็นหมู่ azide โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง poly(α ClεCL-co-εCL) กับ sodium azide

จากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนหมู่ chloride เป็น azide โดยปฏิกิริยาระหว่าง poly(α ClεCL-co-εCL-co-PEG) กับ sodium azide สามารถเปลี่ยนได้อย่างสมบูรณ์ (100%) ผลจากการวิเคราะห์โดยวิธี ¹H-NMR spectroscopy พบว่า characteristic peak ของ chloride ที่ตำแหน่ง 4.25 ppm หายไป และเกิด peak ใหม่ที่ 3.85 ppm ซึ่งเป็น characteristic peak ของ azide ดังแสดงในรูปที่ 6

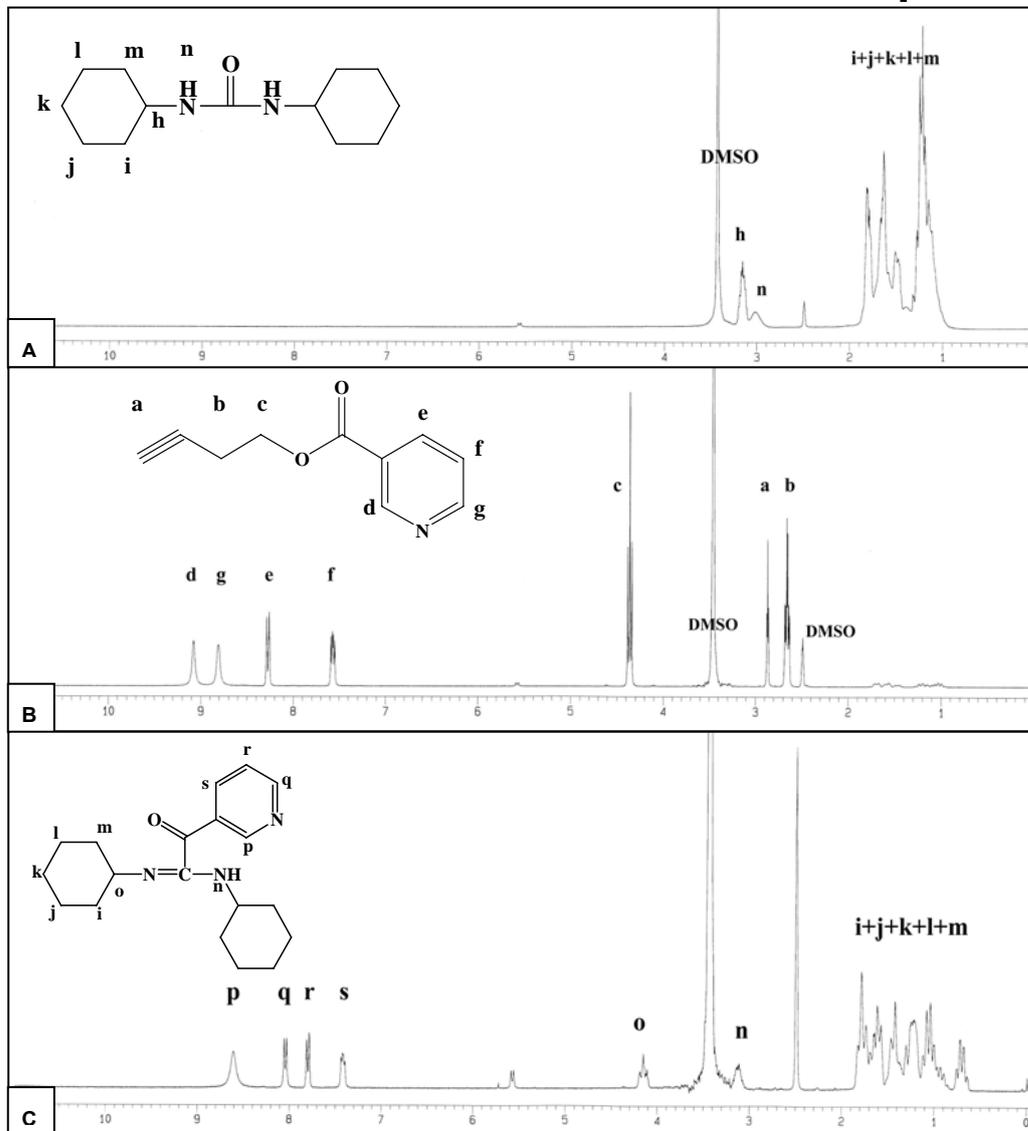


รูปที่ 6 ¹H-NMR spectra ของ poly(α ClεCL-co-εCL-co-PEG) (A) และ poly(α N₃εCL-co-εCL-co-PEG) (B)

1.4 การสังเคราะห์ but-3-ynyl nicotinate

ในขั้นตอนการทำ click reaction โมเลกุลที่จะนำมาติดที่สายโซ่โพลีเมอร์ จะต้องมีหมู่ alkyne ที่ปลายโมเลกุลของ nicotinic acid (but-3-ynyl nicotinate) ดังนั้นจึงต้องทำการ esterification ระหว่าง nicotinic acid กับ 3-butyn-1-ol

จากการทดลองสมภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ but-3-ynyl nicotinate พบว่าต้องใช้ DCC และ DMAP 2.0 equivalent กับ nicotinic acid และต้องใช้ 3-butyn-1-ol จำนวน 1.0 equivalent กับ nicotinic acid สำหรับขั้นตอนของการแยกสกัดสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี column chromatography ได้ใช้ mobile phase เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane, ethyl acetate และ dichloromethane ในอัตราส่วน 1:2:2 ผลการแยกสาร พบว่าได้ but-3-ynyl nicotinate ประมาณ 53% นอกจากนี้ในระหว่างการทำปฏิกิริยายังเกิดสารที่เป็น by-product และ intermediate ด้วย เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารดังแสดงในรูปที่ 7

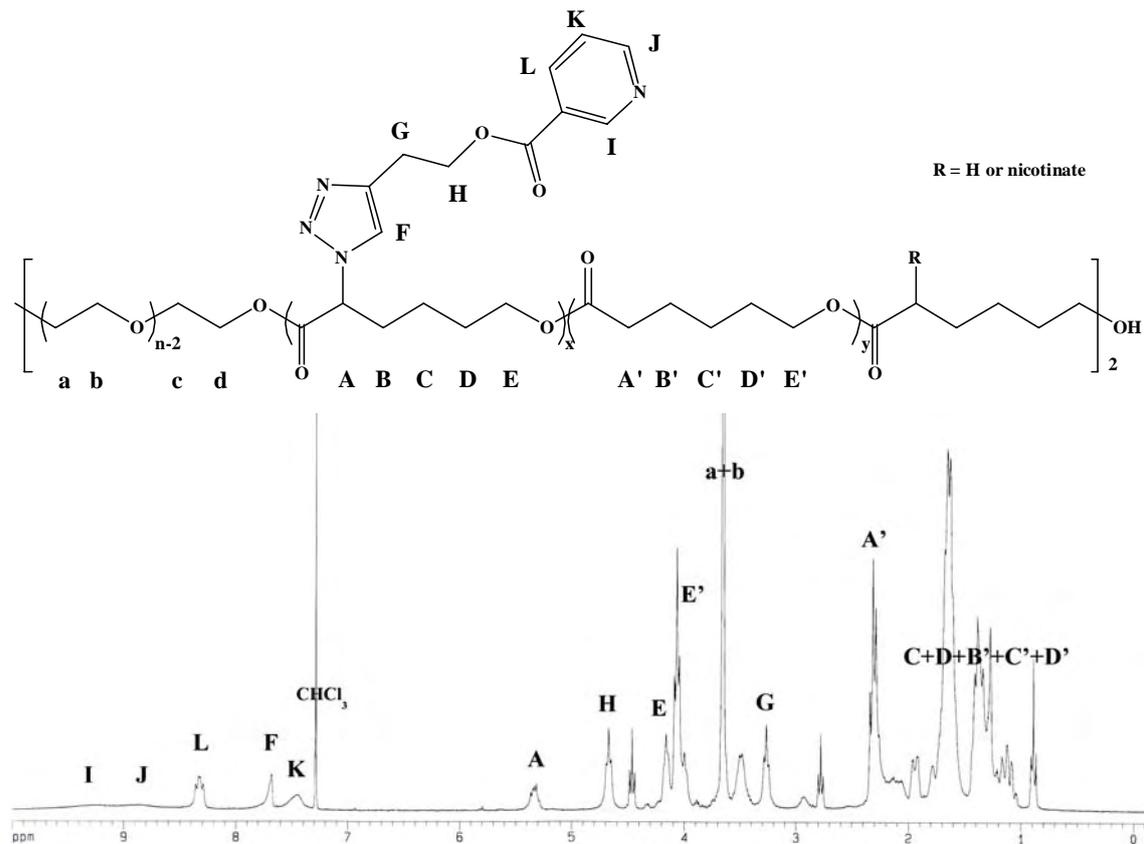


รูปที่ 7 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของสาร by-product (A), but-3-ynyl nicotinate (B) และ intermediate (C) ในตัวทำละลาย DMSO-d_6

1.5 การติดโมเลกุล nicotinic acid ด้วย click chemistry

ปฏิกิริยา click chemistry ที่ใช้ในการติดโมเลกุลของยาที่แกนหลักของสายโซ่โพลีเมอร์เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่าง azide กับโมเลกุลของยาที่มีปลายโมเลกุลเป็น alkyne และใช้ Cu (I) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็น 1,2,3-triazole โดยปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นี้มีชื่อเฉพาะว่า Huisgen's cycloaddition

จากการทดลองติดโมเลกุลของ nicotinic acid บนแกนหลักของสายโซ่โพลีเมอร์พบว่า เมื่อใช้สภาวะตามที่สืบค้นข้อมูล (38) คือ 0.1 equivalent ของ Cu (I) iodide และ DBU และ 1.2 equivalent ของ but-3-ynyl nicotinate ต่อ 1 equivalent ของ $\alpha\text{N}_3\text{ECL}$ unit ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 35°C พบว่าการเกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์แม้ว่าเวลาจะผ่านไปนานถึง 8 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์โดยวิธี $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy พบว่ายังมี peak ของ azide เหลือที่ตำแหน่ง 3.85 ppm เมื่อทดลองเพิ่มจำนวนสมมูลของ Cu (I) iodide, DBU และ but-3-ynyl nicotinate และเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็น 40°C พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยานาน 4 ชั่วโมง peak ที่ตำแหน่ง 3.85 ppm หายไปหมดและเกิด peak ใหม่ที่ตำแหน่ง 5.5 ppm ซึ่งเป็น peak ของ methyne proton บนสายโซ่ที่ติดกับหมู่ triazole นอกจากนี้ยังพบ peak ที่ตำแหน่ง 7.7 ppm ซึ่งเป็น characteristic peak ของ triazole ring ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ poly($(\alpha\text{N}_3\text{-g-nicotinate})\text{ECL-co-ECL-co-PEG}$)

(2). การวิเคราะห์คุณสมบัติของโพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid บนสายโซ่ poly-ε-caprolactone (εCL)

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้นั้นพบว่า ใน ¹H-NMR spectrum ตำแหน่งที่เป็น peak ของ azide ที่ตำแหน่ง 3.85 ppm หายไปหมด และเกิด peak ใหม่ที่ตำแหน่ง 5.3 ppm ซึ่งเป็น peak ของ methyne proton ตำแหน่งที่ติดกับ triazole ring และเกิด peak ที่ตำแหน่ง 7.6 ppm ซึ่งเป็น peak ของ methyne proton ของ triazole ring นอกจากนี้ยังพบ peak ของ proton ใน pyridine ring ของโมเลกุล nicotinic acid ที่ chemical shift ประมาณ 7.45, 8.3, 8.7 และ 9.25 ppm ร่วมด้วย (รูปที่ 9)

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์เพิ่มเติมโดยวิธี FT-IR พบว่า peak ของ azide ที่ wave number 2100 cm⁻¹ หายไปหมด และเกิด peak ใหม่ที่ตำแหน่ง 1600 cm⁻¹ ซึ่งเป็น characteristic peak ของ triazole ring และยังพบ peak ของ C=C stretching ที่ตำแหน่ง 1590 cm⁻¹ และ C=N stretching ที่ตำแหน่ง 1625 cm⁻¹ ซึ่งเป็นตำแหน่ง peak ของ pyridine ring (รูปที่ 10)

จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ¹H-NMR สามารถนำค่า integration ของ peak มาหาสัดส่วนโมลของลิแกนด์ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ด้วยสมการที่ 1 และ 2 ดังแสดงไว้ข้างล่าง นอกจากนี้การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) และโดยจำนวน (M_n) และค่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (M_w/M_n) สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี GPC โดยผลการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 จากผลการทดลองพบว่า โพลีเมอร์ที่ได้ติดลิแกนด์บนสายโซ่โพลีเมอร์นั้นมีสัดส่วนของลิแกนด์ที่ติดเมื่อคำนวณจาก ¹H-NMR สอดคล้องกับสัดส่วนที่คำนวณได้ตามทฤษฎี

สมการที่ 1 สัดส่วนโมลของ nicotinic acid ที่ติดอยู่บนสายโซ่โพลีเมอร์โดยคิดเฉพาะหน่วยของ εCL และ grafted-εCL

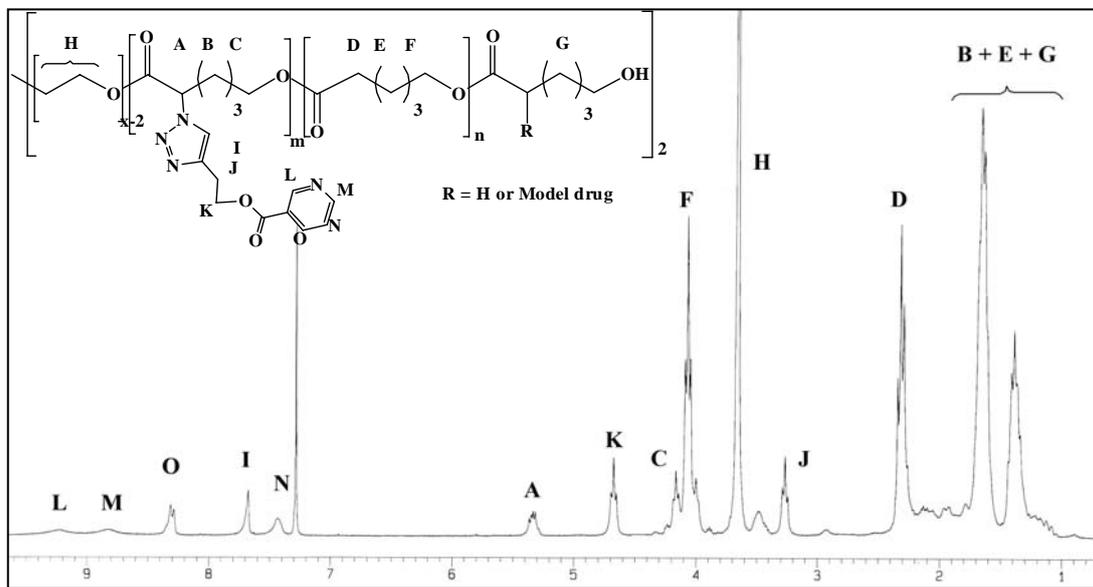
$$F^a_{\text{grafted-CL}} = \frac{I_{5.3\text{ppm}}}{\frac{1}{2}I_{2.3\text{ppm}} + I_{5.3\text{ppm}}} \quad (1)$$

สมการที่ 2 สัดส่วนโมลของหมู่ nicotinic acid ที่ติดอยู่บนสายโซ่โพลีเมอร์โดยคิดรวมทุกหน่วยที่อยู่บนสายโซ่ได้แก่ εCL, grafted-εCL และ PEG

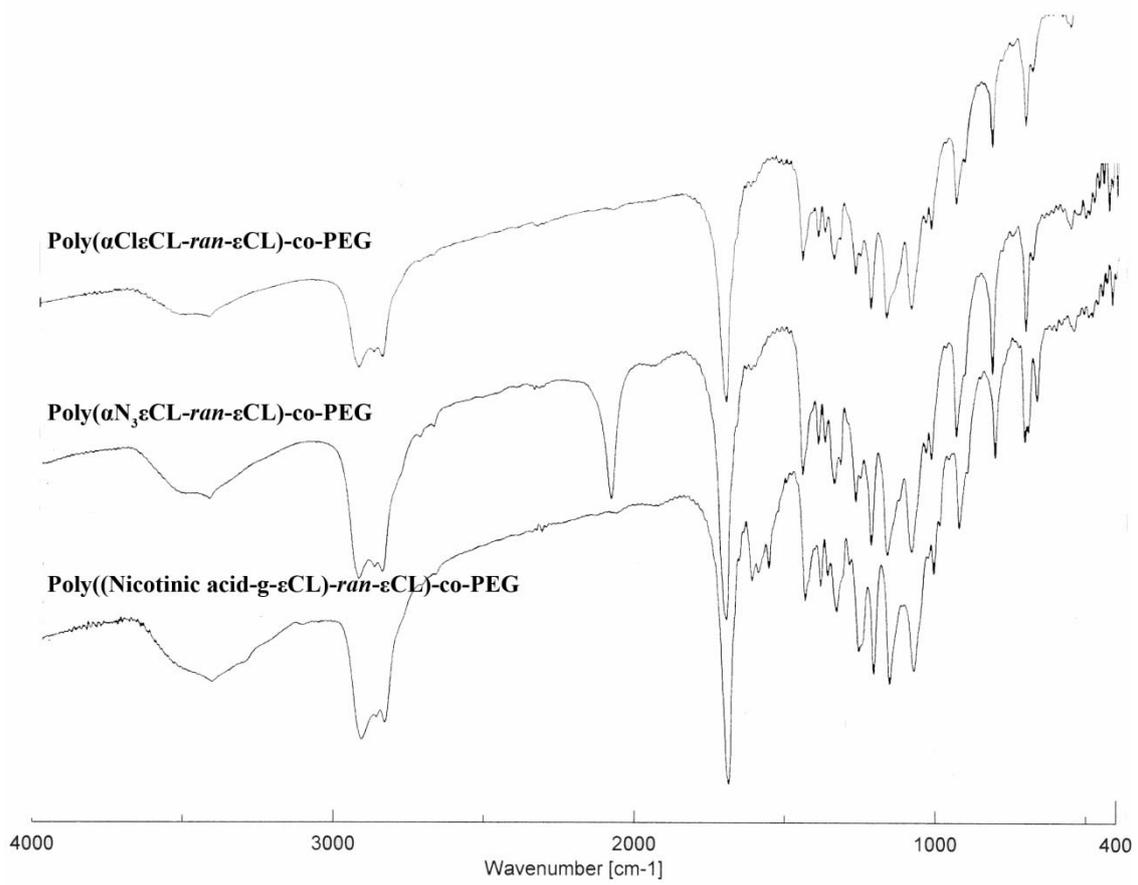
$$F^b_{\text{grafted-CL}} = \frac{I_{5.3\text{ppm}}}{\frac{1}{2}I_{2.3\text{ppm}} + I_{5.3\text{ppm}} + \frac{1}{4}I_{3.65\text{ppm}}} \quad (2)$$

จากผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลพบว่า น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนของ poly(αCIεCL-ran-εCL)-co-PEG และ poly(αN₃εCL-ran-εCL)-co-PEG เมื่อคำนวณจาก NMR พบว่า มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้จากทฤษฎี แต่ค่าที่วิเคราะห์โดยใช้วิธี GPC พบว่า M_n มีค่าน้อยกว่าค่าที่คำนวณตามทฤษฎีและจาก NMR ผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้โดยเกิดเนื่องจากการวิเคราะห์โดยวิธี GPC ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้เป็นค่าเชิงเปรียบเทียบซึ่งได้จากการเปรียบเทียบกับ

น้ำหนักโมเลกุลของ poly(styrene) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลและมีความแตกต่างของ intrinsic viscosity ระหว่างโพลีเมอร์ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานและโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ นอกจากนี้โพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นโพลีเมอร์ชนิดที่ชอบทั้งน้ำและน้ำมัน (amphiphilic polymer) ซึ่งมีผลของการเปลี่ยนแปลง hydrodynamic volume ร่วมด้วย (39, 40) ทำให้การวิเคราะห์โดยวิธี GPC ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าค่าที่คำนวณจากวิธี NMR นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลของ poly(α -N₃- ϵ -CL-*ran*- ϵ -CL)-*co*-PEG มีค่าน้อยกว่า poly(α -Cl- ϵ -CL-*ran*- ϵ -CL)-*co*-PEG เนื่องจากผลของการแทนที่หมู่ chloride ด้วย azide และทำให้เกิด การเปลี่ยนแปลง hydrodynamic volume (38)



รูปที่ 9 ¹H-NMR spectrum ของ poly((Nicotinic acid-*g*- ϵ -CL)-*co*- ϵ -CL-*co*-PEG) ใน CDCl₃



รูปที่ 10 FT-IR spectra ของโพลีเมอร์ที่มีหมู่ chloride, azide และ nicotinic acid

ตารางที่ 4 ผลการทดลองจากการติดหมู่ลิแกนด์บนสายโซ่โพลีเมอร์

Copolymers	$F^a_{gCL,theo}$	$F^b_{gCL,theo}$	$F^a_{gCL,NMR}$	$F^b_{gCL,NMR}$	$M_{n,theo}$	$M_{n,NMR}$	$M_{n,GPC}$	$M_{w,GPC}$	M_w/M_n
P(30 α ClECL- <i>ran</i> -70 ϵ CL)-co-PEG	0.30	0.25	0.15	0.14	16,435	15,000	6,748	12,435	1.84
P(30 α N ₃ ϵ CL- <i>ran</i> -70 ϵ CL)-co-PEG	0.30	0.30	0.15	0.15	16,630	12,160	5,721	10,325	1.81
P((30Nicotinic acid-g- ϵ CL)- <i>ran</i> -70 ϵ CL)-co-PEG	0.30	0.28	0.15	0.13	21,880	ND	5,807	9,037	1.56

$F^a_{gCL,theo}$, $F^a_{gCL,NMR}$ = สัดส่วนโมลของหมู่ chloride, azide และ nicotinic acid ที่ติดอยู่บนสายโซ่โพลีเมอร์ตามทฤษฎีและที่คำนวณจาก NMR ตามลำดับ โดยคิดเฉพาะหน่วยของ ϵ CL และ α N₃ ϵ CL

$F^b_{gCL,theo}$, $F^b_{gCL,NMR}$ = สัดส่วนโมลของหมู่ chloride, azide และ nicotinic acid ที่ติดอยู่บนสายโซ่โพลีเมอร์ตามทฤษฎีและที่คำนวณจาก NMR ตามลำดับ โดยคิดรวมทุกหน่วยที่ติดอยู่บนสายโซ่ได้แก่ ϵ CL, α N₃ ϵ CL และ PEG

$$M_{n,theo} = \left(\frac{[\epsilon CL]}{[I]} \times 114 \right) + \left(\frac{[\alpha N_3 \epsilon CL]}{[I]} \times MW_{grafted-CL} \right) + 4000, [\epsilon CL], [\alpha N_3 \epsilon CL] \text{ และ } [I] \text{ คือจำนวนโมลของ } \epsilon CL, \alpha N_3 \epsilon CL \text{ และ initiator (PEG 4000) ตามลำดับ}$$

จากข้อมูลการกระจายน้ำหนักโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ GPC พบว่าหลังการแทนที่หมู่ chloride ด้วย azide แล้วการกระจายน้ำหนักโมเลกุลไม่เปลี่ยนแปลง และหลังการติด nicotinic acid บนสายโซ่โพลีเมอร์พบว่าการกระจายน้ำหนักโมเลกุลไม่เพิ่มขึ้นและ chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์มีลักษณะเป็น unimodal จึงสามารถสรุปได้ว่าการติด nicotinic acid ลงบนสายโซ่โพลีเมอร์ชนิด amphiphilic สามารถทำได้โดยปฏิกิริยา Click reaction ภายใต้สภาวะที่ใช้คือ 40 °C 4 ชั่วโมง โพลีเมอร์ที่ได้ไม่มีการเสื่อมสลายของโพลีเมอร์หลังการทำปฏิกิริยาดังกล่าว

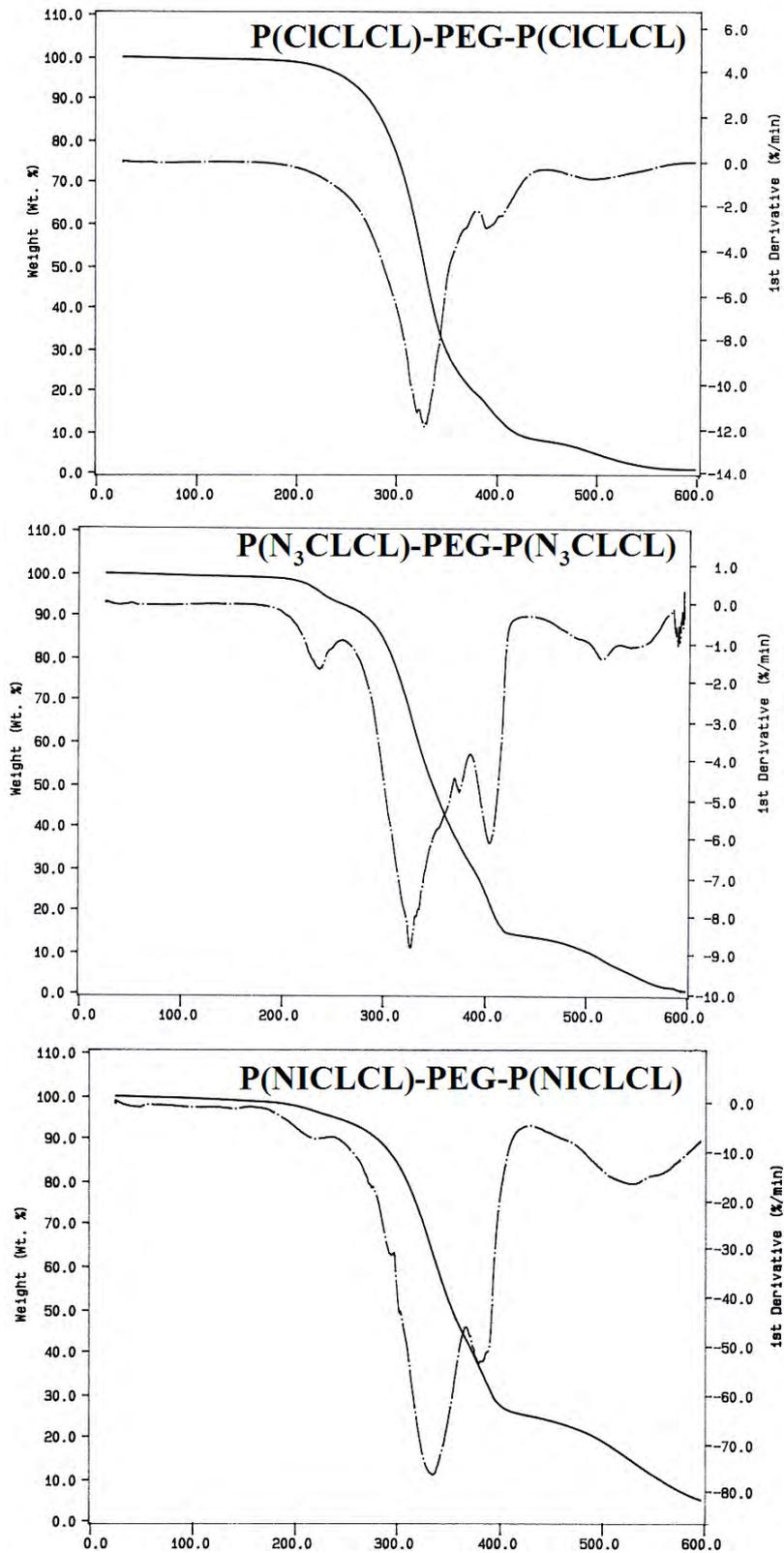
จากผลการวิเคราะห์ thermal property ของโพลีเมอร์ (ตารางที่ 5) พบว่า T_g ของโพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับโพลีเมอร์เริ่มต้น (P(α ClECL-*ran*-ECL)-co-PEG) เมื่อพิจารณาถึง T_m พบว่า ค่าดังกล่าวของโพลีเมอร์ที่มีการติด chloride, azide และ nicotinic acid ลดลงจากค่าของโพลีเมอร์ที่ไม่มีการติดหมู่ใดๆ (poly(ECL)-co-PEG-co-poly(ECL), $T_m \approx 50$ °C (41)) นอกจากนี้ยังพบว่า การติด nicotinic acid บนสายโซ่ มีผลทำให้ความเป็น crystalline ของโพลีเมอร์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ poly(α N₃ECL-*ran*-ECL)-co-PEG และ poly(α ClECL-*ran*-ECL)-co-PEG โดยดูจากค่า ΔH ที่ได้จาก thermogram

ตารางที่ 5 ผล Thermal property ของโพลีเมอร์จากการวิเคราะห์โดยวิธี DSC

Copolymers	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH (J/g)
P(30 α ClECL- <i>ran</i> -70ECL)-co-PEG	-60	30	26.32
P(30 α N ₃ ECL- <i>ran</i> -70ECL)-co-PEG	-51	38	25.22
P((30Nicotinic acid-g-ECL)- <i>ran</i> -70ECL)-co-PEG	-52	32	5.54

จากการวิเคราะห์การเสื่อมสลายของโพลีเมอร์โดยวิธี TGA (รูปที่ 11) พบว่า poly(α ClECL-*ran*-ECL)-co-PEG มีรูปแบบการเสื่อมสลายแบบสามขั้น โดยสองขั้นแรกมีลักษณะเหมือนรูปแบบการเสื่อมสลายของ poly(α ClECL-*ran*-ECL) (38) และขั้นสุดท้ายเหมือนส่วนของ PEG ในสายโซ่โพลีเมอร์ และรูปแบบโดยรวมเหมือน poly(ECL)-co-PEG-co-poly(ECL) (42) ส่วนกรณีของ poly(α N₃ECL-*ran*-ECL)-co-PEG พบว่ามีการเสื่อมสลายเริ่มตั้งแต่อุณหภูมิประมาณ 200 °C เนื่องจากมีการแตกสลายของพันธะ N-N₂ ของหมู่ azide ที่ติดอยู่บนสายโซ่โพลีเมอร์ (43, 44) ส่วนรูปแบบการเสื่อมสลายที่เหลือเหมือนกับที่พบในกรณีของ poly(α ClECL-*ran*-ECL)-co-PEG กรณีของโพลีเมอร์ที่มีการติด nicotinic acid บนสายโซ่พบว่า ในช่วงอุณหภูมิประมาณ 200 °C จึงเริ่มมีการสูญเสียน้ำหนักของสารตัวอย่างจากการเพิ่มอุณหภูมิ สันนิษฐานว่าเกิดการเสื่อมสลายของหมู่ที่ติดบนสายโซ่

จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า การติดตัวยานสายโซ่โพลีเมอร์ชนิดเชื่อมสลายได้ทางชีวภาพสามารถติดได้โดยปฏิกิริยา Click chemistry โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4 ชั่วโมง จากสภาวะดังกล่าวจะทำให้ได้โพลีเมอร์ที่มีการติดตัวยานสายโซ่ได้โดยไม่เกิดการเชื่อมสลายของโพลีเมอร์ในระหว่างทำปฏิกิริยา จากการศึกษาคุณสมบัติทาง thermal พบว่าการติดหมู่ลิแกนด์หรือตัวยาลงบนสายโซ่มีผลต่อคุณสมบัติทาง thermal ของโพลีเมอร์ทั้งในด้านการเชื่อมสลายของโพลีเมอร์และด้านความเป็น crystalline ของโพลีเมอร์เอง โดยหมู่ที่มีการติดลงบนสายโซ่ถ้าหากเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่และมีความเป็น steric ค่อนข้างมาก จะทำให้การจัดเรียงตัวของสายโซ่เป็นไปได้ยาก ทำให้ความเป็น crystalline ของโพลีเมอร์ลดลง



รูปที่ 11 กราฟ thermal gravimetric diagram ของโพลีเมอร์ที่ติดหมู่ chloride, azide และ nicotinic acid บนสายโซ่

(3). การศึกษาการสังเคราะห์และวิเคราะห์โพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid ด้วยสัดส่วนจำนวนโมลต่าง ๆ บนสายโซ่

การสังเคราะห์โพลีเมอร์ที่มีสัดส่วน nicotinic acid ต่างๆ ทำโดยการเริ่มทำการสังเคราะห์โพลีเมอร์ที่มีหมู่ CI โซ่ เป็น 10%, 20% และ 30% เทียบกับจำนวนโมลของ caprolactone (CL) repeating units บนสายโซ่ โดยใช้ปริมาณโมลของ CICL และ CL ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นเปลี่ยนหมู่ CI เป็นหมู่ azide (N_3) และทำการติดโมเลกุล nicotinic acid บนสายโซ่โดยปฏิกิริยา click reaction ตาม condition ที่ปฏิกิริยาก่อนหน้านี้ และทำการศึกษาสมบัติโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้

ตารางที่ 6 สัดส่วนจำนวนโมลของ monomers และ initiator ที่ใช้ในปฏิกิริยา polymerization

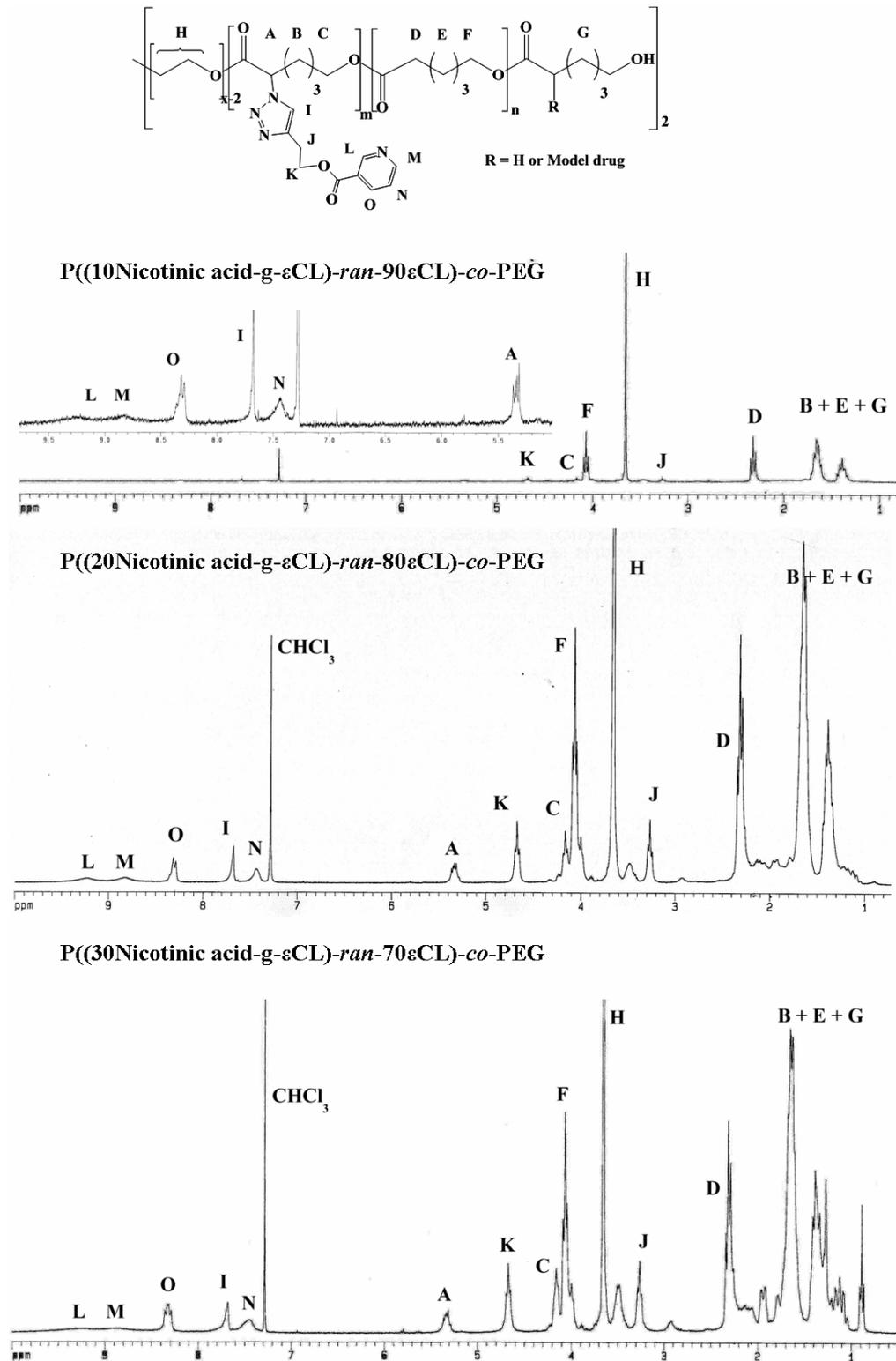
Copolymers	Fed Mole (mmol)		
	CICL	CL	PEG
P(10%CI&ECL-ran-90%ECL)-co-PEG	2	18	0.2
P(20%CI&ECL-ran-80%ECL)-co-PEG	4	16	0.2
P(30%CI&ECL-ran-70%ECL)-co-PEG	6	14	0.2

3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์โพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี NMR, FTIR และ GPC

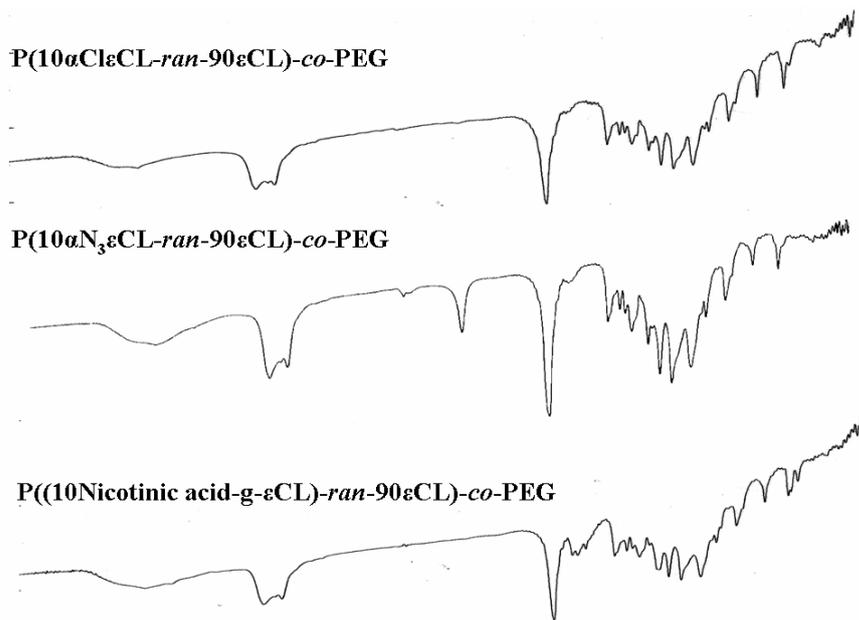
จากการวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของโพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid ในสัดส่วนต่างๆ ด้วยวิธี NMR และ FTIR ได้ผลการทดลองดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 12 และ 13 ตามลำดับ ตารางที่ 7 แสดงให้เห็นถึงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR, FTIR และ GPC จากผลการศึกษาพบว่า สามารถสังเคราะห์โพลีเมอร์ที่มีหมู่ CI ที่มีจำนวนโมลแตกต่างกันคือ 10%, 20% และ 30% ได้สำเร็จ โดยน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากการคำนวณโดยวิธี NMR ($M_{n,NMR}$) มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณตามทฤษฎี ($M_{n,theo}$) นอกจากนี้จำนวนโมลของ CICL repeating units ที่คำนวณได้จาก NMR spectrum มีค่าที่สอดคล้องกับค่าที่คำนวณได้ตามทฤษฎี แต่ในกรณีของน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GPC ($M_{n,GPC}$) พบว่ามีค่าค่อนข้างแตกต่างจากค่าตามทฤษฎี เนื่องจากเหตุผลดังต่อไปนี้

- 1) สารมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลในการทดลองได้ใช้ poly(styrene) ในการคำนวณ ซึ่งสารมาตรฐานนี้เป็นโพลีเมอร์ต่างชนิดกับโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ และมีค่า intrinsic viscosity ที่แตกต่างกัน
- 2) โพลีเมอร์ที่สังเคราะห์นั้นเป็นโพลีเมอร์ชนิด amphiphile แต่ poly(styrene) เป็นโพลีเมอร์ชนิด hydrophobic จึงมีความแตกต่างของ hydrodynamic volume
- 3) โพลีเมอร์ชนิด amphiphile นี้มีการเปลี่ยนแปลง hydrodynamic volume ในตัวทำละลายแต่ละชนิด

ซึ่งค่าความผิดพลาดดังที่กล่าวที่เกิเกิดขึ้นนี้ เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปในกรณีที่ใช้เทคนิค GPC ในการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเมอร์และมีการใช้โพลีเมอร์ที่เป็นสารมาตรฐานต่างชนิดกัน (39, 40)



รูปที่ 12 NMR spectra ของโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ที่เปอร์เซ็นต์โมลต่าง ๆ



รูปที่ 13 FTIR spectra ของโพลีเมอร์ที่ติดหมู่ Cl, N₃ และ nicotinic acid ที่จำนวนโมล 10% ในกรณีของ 20% และ 30% ให้ spectra ที่เหมือนกันกับ 10%

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้

Copolymers	$F^a_{gCL,theo}$	$F^a_{gCL,NMR}$	$F^b_{gCL,theo}$	$F^b_{gCL,NMR}$	$M_{n,theo}^b$	$M_{n,NMR}^a$	$M_{n,GPC}^c$	M_w/M_n^c	$T_g(^{\circ}C)$	$T_m(^{\circ}C)$
P(αCLϵCL-<i>ran</i>-ϵCL)-co-PEG										
P(10 α CL ϵ CL- <i>ran</i> - 90 ϵ CL)-co-PEG	0.1	0.07	0.05	0.04	15,745	16,300	7,437	1.77	-	34
P(20 α CL ϵ CL- <i>ran</i> - 80 ϵ CL)-co-PEG	0.2	0.17	0.1	0.09	16,090	15,800	6,466	2.03	-55	31
P(30 α CL ϵ CL- <i>ran</i> - 70 ϵ CL)-co-PEG	0.3	0.25	0.15	0.14	16,435	15,000	6,748	1.84	-59	30
P(αN₃ϵCL-<i>ran</i>-ϵCL)-co-PEG										
P(10 α N ₃ ϵ CL- <i>ran</i> - 90 ϵ CL)-co-PEG	0.1	0.12	0.05	0.06	15,810	15,458	7,014	1.76	-	42
P(20 α N ₃ ϵ CL- <i>ran</i> - 80 ϵ CL)-co-PEG	0.2	0.21	0.1	0.11	16,200	14,200	5,612	1.94	-51	42
P(30 α N ₃ ϵ CL- <i>ran</i> - 70 ϵ CL)-co-PEG	0.3	0.3	0.15	0.15	16,630	12,160	5,721	1.81	-52	38
P((Nicotinic acid-g-ϵCL)-<i>ran</i>-ϵCL)-co-PEG										
P((10 Nicotinic acid-g- ϵ CL)- <i>ran</i> - 90 ϵ CL)-co-PEG	0.1	0.09	0.05	0.04	ND	ND	11,981	1.64	-49.5	39.5
P((20 Nicotinic acid-g- ϵ CL)- <i>ran</i> - 80 ϵ CL)-co-PEG	0.2	0.17	0.1	0.09	ND	ND	6,435	1.70	-47.2	38.9
P((30 Nicotinic acid-g- ϵ CL)- <i>ran</i> - 70 ϵ CL)-co-PEG	0.3	0.25	0.15	0.12	ND	ND	5,807	1.56	-43.2	32.1

$F^a_{gCL,theo}$, $F^a_{gCL,NMR}$ = สัดส่วนโมลของหมู่ chloride, azide และ nicotinic acid ที่ติดอยู่บนสายโซ่โพลีเมอร์ตามทฤษฎีและที่คำนวณจาก NMR ตามลำดับ โดยคิดเฉพาะหน่วยของ ϵ CL และ α N₃ ϵ CL

$F^b_{gCL,theo}$, $F^b_{gCL,NMR}$ = สัดส่วนโมลของหมู่ chloride, azide และ nicotinic acid ที่ติดอยู่บนสายโซ่โพลีเมอร์ตามทฤษฎีและที่คำนวณจาก NMR ตามลำดับ โดยคิดรวมทุกหน่วยที่ติดอยู่บนสายโซ่ได้แก่ ϵ CL, α N₃ ϵ CL และ PEG

$M_{n,theo} = \left(\frac{[\epsilon CL]}{[I]} \times 114 \right) + \left(\frac{[\alpha N_3 \epsilon CL]}{[I]} \times MW_{grafted-CL} \right) + 4000$, $[\epsilon CL]$, $[\alpha N_3 \epsilon CL]$ และ $[I]$ คือจำนวนโมลของ ϵ CL, $\alpha N_3 \epsilon CL$ และ initiator (PEG 4000) ตามลำดับ

ในกรณีของโพลีเมอร์ที่มีหมู่ N_3 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเมอร์มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าของโพลีเมอร์ที่มีหมู่ Cl เนื่องจากการเปลี่ยนแปลง hydrodynamic volume ของหมู่ N_3 แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับค่าตามทฤษฎีพบว่า มีค่าที่สอดคล้องกันทั้งค่าน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณจาก NMR ($M_{n,NMR}$) และค่าจำนวนโมลของหมู่ N_3 ที่คำนวณได้ เมื่อพิจารณาค่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (M_w/M_n) ที่ได้จาก GPC chromatogram พบว่าหลังการเปลี่ยนหมู่จาก Cl เป็น N_3 มีค่าลดลงจากเดิม แสดงถึงโพลีเมอร์ไม่เกิดการเสื่อมสลายหลังการเปลี่ยนหมู่

สำหรับกรณีของโพลีเมอร์ที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเมอร์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโพลีเมอร์ที่ติดหมู่ N_3 จำนวนโมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่มีค่าสอดคล้องกับค่าตามทฤษฎี และ M_w/M_n มีค่าใกล้เคียงกับค่าของโพลีเมอร์ที่มีหมู่ N_3 จากการทดลองจึงสรุปได้ว่าสามารถปรับเปลี่ยนจำนวนโมเลกุล nicotinic acid (10%, 20% และ 30%) บนสายโซ่ caprolactone ได้สำเร็จ

3.2 การศึกษา Thermal property ของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้

จากตารางที่ 4 ผลการศึกษา Thermal property โดยวิธี DSC พบว่า กรณีโพลีเมอร์ที่มีหมู่ Cl เมื่อเพิ่มปริมาณหมู่ Cl บนสายโซ่โพลีเมอร์พบว่า ค่า T_m มีค่าลดลง ส่วนค่า T_g มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเปลี่ยนหมู่เป็น N_3 พบว่าค่า T_m เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าของโพลีเมอร์ที่มีหมู่ Cl ที่มีจำนวนโมลที่เท่ากัน ส่วนค่า T_g มีค่าเพิ่มขึ้นจากค่าของโพลีเมอร์ที่มีหมู่ Cl แต่ค่ายังคงใกล้เคียงกันดังเดิมเมื่อมีการเพิ่มจำนวนโมลของหมู่ N_3 และเมื่อมีการติดโมเลกุล nicotinic acid พบว่าค่า T_g มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าของโพลีเมอร์ที่มีหมู่ N_3 และเมื่อเพิ่มจำนวนโมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่ พบว่าค่า T_g เพิ่มขึ้นตามจำนวนโมลที่เพิ่มขึ้น ซึ่งกลับกับค่า T_m คือมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนโมลของ nicotinic acid บนสายโซ่ และมีค่าลดลงในทุก ๆ เปอร์เซ็นต์โมลของการติดโมเลกุล nicotinic acid เมื่อเปรียบเทียบกับค่า T_m ของโพลีเมอร์ที่ติดหมู่ N_3

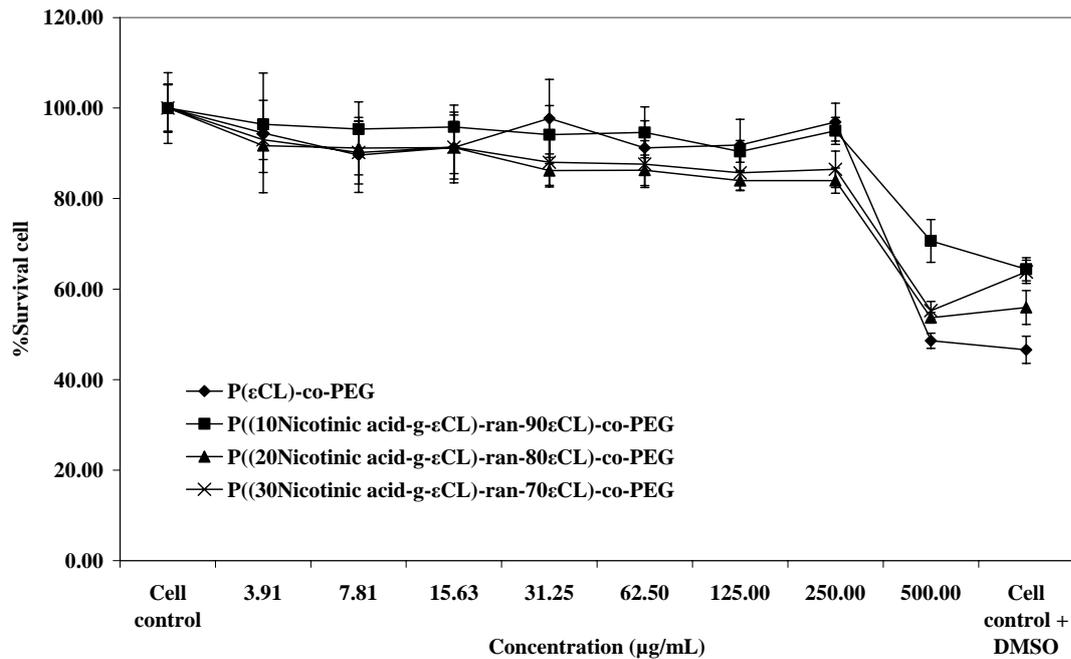
จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มจำนวนโมลของของหมู่หรือโมเลกุลบนสายโซ่ มีผลลดความเป็นผลึกของสายโซ่โพลีเมอร์ เนื่องจากหมู่ที่ติดบนสายโซ่มีผลให้เกิดการขัดขวางการจัดเรียงสายโซ่ภายในโมเลกุลของโพลีเมอร์เอง จึงทำให้โพลีเมอร์มีความเป็น amorphous มากขึ้น แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลที่ติดบนสายโซ่และ steric hindrance ของโมเลกุลต่อการจัดเรียงสายโซ่ของโพลีเมอร์ด้วย รวมถึงความสามารถในการเกิดหรือสร้างพันธะระหว่างสายโซ่ของโพลีเมอร์เนื่องจากหมู่ที่ติดบนสายโซ่ร่วมด้วย

(4) การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้

เมื่อทำการสังเคราะห์โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid บนสายโซ่แล้วจึงทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโพลีเมอร์ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับโพลีเมอร์ต้นแบบที่ไม่มีการติดหมู่หรือโมเลกุลใด ๆ บนสายโซ่นั้น (P(ECL)-co-PEG)

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโพลีเมอร์สังเคราะห์ แสดงให้เห็นในรูปที่ 14 พบว่าโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ทุกเปอร์เซ็นต์โมลไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HUVECs ที่ความเข้มข้นสูงสุด

คือ 250 µg/mL แต่ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL พบว่า %Survival cell มีค่าเทียบเท่ากับเซลล์ที่ incubate กับ DMSO อย่างเดียว รวมถึงกรณีของ P(CL)-co-PEG ซึ่งให้ผล %Survival cell ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นที่ความเข้มข้น 500 µg/mL ค่า %Survival cell ที่ลดลงเหลือประมาณ 50–60% มีผลมาจาก DMSO ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุลของ nicotinic acid ไม่มี ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL



รูปที่ 14 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay ต่อเซลล์ HUVECs

(5). การศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนโดยโพลีเมอร์ที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าวิธีการเตรียมอนุภาคนาโนจากโพลีเมอร์ชนิดเอสเทอร์และมีความเป็น amphiphile ที่เป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายและขั้นตอนไม่ซับซ้อนคือ วิธี nanoprecipitation (45, 46)

5.1 การศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนที่เตรียมได้

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid ที่สัดส่วนต่าง ๆ

ตารางที่ 8 การศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนจากโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้

Copolymers/ Grafted copolymers	Size (nm)	PDI	Zeta(mV)
P(εCL)-co-PEG	123.4±26.2	0.473±0.101	-3.7±3.1
P((10Nicotinic acid-g-εCL)-ran-90εCL)-co-PEG	77.4±9.8	0.192±0.032	-9.6±1.3
P((20Nicotinic acid-g-εCL)-ran-80εCL)-co-PEG	81.7±7.6	0.104±0.024	-5.9±1.4
P((30Nicotinic acid-g-εCL)-ran-70εCL)-co-PEG	120.3±24.9	0.099±0.023	-17.3±2.0

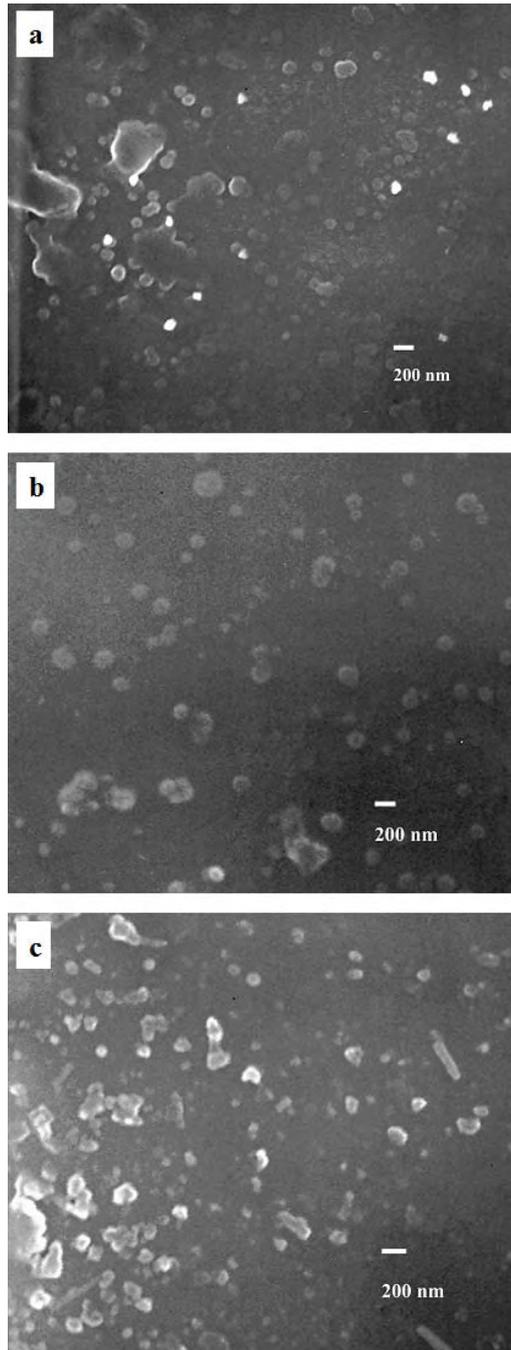
จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มจำนวนโมล nicotinic acid บนสายโซ่ พบว่าอนุภาคนาโนที่เตรียมได้มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากความเป็น hydrophobic บนสายโซ่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ (14, 47) โดยอนุภาคที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 10% และ 20% มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 100 nm และมีการกระจายของขนาดอนุภาคน้อยกว่าอนุภาคที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ในกรณีของอนุภาคที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกับอนุภาคที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบ (P(εCL)-co-PEG) (p -value > 0.05) แต่มีค่าการกระจายขนาดอนุภาคน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)

กรณีของประจุบนผิวอนุภาคพบว่า มีแนวโน้มค่าความเป็นลบเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การติดโมเลกุล nicotinic acid เมื่อเปรียบเทียบกับค่าประจุบนพื้นผิวอนุภาคที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบ (P(εCL)-co-PEG) ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 0 ผลที่ได้ อาจเกิดจากมีโมเลกุลของ nicotinic acid บนพื้นผิวของอนุภาคนาโนที่เตรียม

อย่างไรก็ตาม nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่อาจทำให้เกิด steric hindrance ในการเกิดอนุภาคนาโน การเพิ่มจำนวนโมลของ nicotinic acid มีผลเพิ่ม steric hindrance ทำให้ได้อนุภาคนาโนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของนักวิจัยกลุ่มอื่นเกี่ยวกับ steric hindrance ของหมู่ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ต่อการเกิดอนุภาคนาโน (47) และผลจาก steric hindrance ดังกล่าวอาจมีผลทำให้ nicotinic acid ที่ถูกติดอยู่กับแกนของสายโซ่โพลีเมอร์ถูกผลักออกจากแกนกลางของอนุภาคนาโนมาอยู่ที่ผิว ดังนั้นการเพิ่มปริมาณของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่ ทำให้ประจุบนพื้นผิวมีค่าเป็นลบมากขึ้นเนื่องจาก nicotinic acid ซึ่งคำอธิบายของเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ยังอยู่ในระหว่างการศึกษาต่อไป

5.2 การศึกษารูปร่างของอนุภาคนาโนที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid

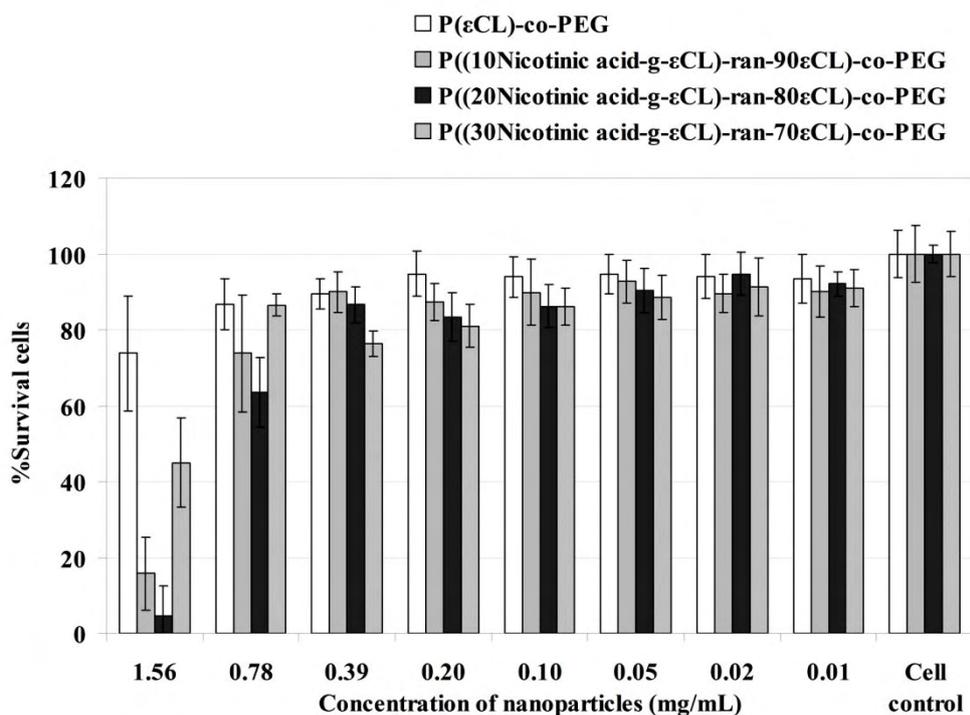
จากผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 15 พบว่า อนุภาคนาโนที่ไม่มียาบรรจุอยู่ มีรูปร่างเป็นทรงกลม และพบการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคนาโนบ้าง ซึ่งอาจเกิดจากการเกาะกลุ่มกันในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง



รูปที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของอนุภาคนาโนที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid จำนวนต่าง ๆ กัน (a) 10 %โมล, (b) 20 %โมล และ (c) 30%โมล

5.3 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ HUVECs ของอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 16 พบว่าอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ทุกเปอร์เซ็นต์โมลไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HUVECs ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 0.20 mg/mL ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารละลายโพลีเมอร์ในตัวทำละลาย DMSO ตามที่ได้รายงานไปแล้ว และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคนาโนมีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ รวมถึงเมื่อเพิ่ม %โมล ของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ มีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นกัน โดยดูจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนที่ทำให้ %survival cells ของเซลล์ HUVECs มีค่าน้อยกว่า 80% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าสารหรือตัวอย่างนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยค่าความเข้มข้นดังกล่าวนั้นสามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 9 ในกรณีของ %survival cells ของอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ปริมาณ 30 %โมล ที่ความเข้มข้นของอนุภาคนาโน 0.78 mg/mL มีค่าเกิน 80% เนื่องจากความแปรปรวนของเซลล์ในช่วงของการทดลอง



รูปที่ 16 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay ต่อเซลล์ HUVECs

ตารางที่ 9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนที่ทำให้ %survival cells ของเซลล์ HUVECs มีค่าน้อยกว่า 80%

ชนิดของอนุภาคนาโน	ความเข้มข้น (mg/mL)
P(εCL)-co-PEG	1.56
P((10Nicotinic acid-g-εCL)-ran-90εCL)-co-PEG	0.78
P((20Nicotinic acid-g-εCL)-ran-80εCL)-co-PEG	0.78
P((30Nicotinic acid-g-εCL)-ran-70εCL)-co-PEG	0.39

(6) การวิเคราะห์ ibuprofen และ indomethacin โดย High-Performance Liquid Chromatography

ในการศึกษานี้ได้ทำการเลือกโมเลกุลยาต้นแบบจำนวน 2 ตัวยา คือ ibuprofen และ indomethacin เพื่อใช้ในการศึกษา เนื่องจากตัวยาทั้ง 2 นี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันเช่น ค่าขีดการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกันโดยเฉพาะในน้ำ นอกจากนี้ขนาดโมเลกุลของยาทั้งสองที่ต่างกัน และจำนวนหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกันซึ่งมีผลต่อการสร้างพันธะกับโพลีเมอร์ได้แก่ หมู่อะโรมาติก หมู่อัลคิล และหมู่ที่มีความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ จากคุณสมบัติที่ต่างกันนั้นอาจส่งผลต่อคุณสมบัติในการ incorporate ตัวยาในอนุภาคนาโน และการปลดปล่อยตัวยาจากอนุภาคนาโนได้

จากการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่พัฒนาได้ผลดังนี้

1. Precision

จากผลการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์พบว่าระบบที่ใช้วิเคราะห์ตัวยาทั้งสองนั้นมีค่า %CV อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้ง repeatability และ reproducibility ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการตรวจสอบ repeatability และ reproducibility ของวิธีวิเคราะห์ด้วยยา ibuprofen และ indomethacin

ยา	Repeatability		Reproducibility	
	Concentration (µg/mL)	%CV	Concentration (µg/mL)	%CV
ibuprofen	2.5	0.91	2.5	0.91
	10	1.36	10	1.32
	40	0.49	40	0.71
Indomethacin	0.25	0.63	0.25	0.63
	10	1.64	10	1.00
	40	0.54	40	0.53

2. Accuracy

จากผลการตรวจสอบพบว่าระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวยาทั้งสองมีความถูกต้องในการวิเคราะห์โดยดูจากค่า %recovery มีค่าอยู่ในช่วง 90–110 % ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 11

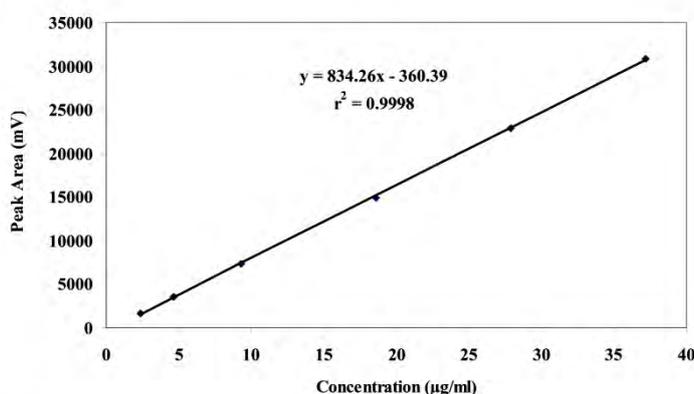
ตารางที่ 11 ค่า %recovery ของยา ibuprofen และ indomethacin จากการวิเคราะห์โดย HPLC

ยา	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	%Recovery
ibuprofen	2.5	101.3
	10	100.9
	40	100.1
Indomethacin	0.25	101.4
	10	99.8
	40	100.5

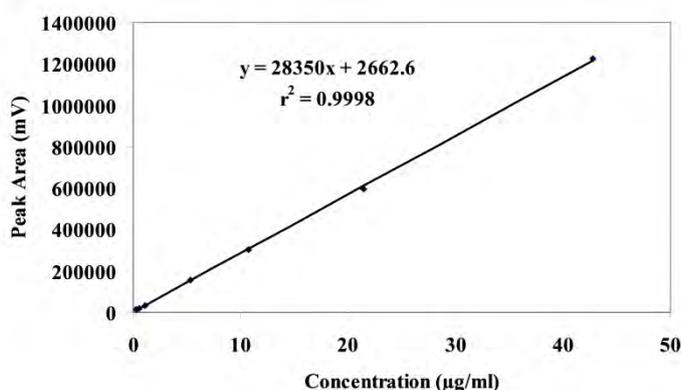
3. Linearity

จากผลการตรวจสอบพบว่าระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวยาทั้งสองเมื่อนำมาสร้างกราฟจะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่า r^2 มากกว่า 0.9995 ดังแสดงในรูปที่ 17

a



b



รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของยา ibuprofen (a) และ indomethacin (b) จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ดังนั้นจากผลการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ จึงสรุปได้ว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาเพิ่มเติมนี้ เหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ ibuprofen และ indomethacin ที่จะทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

(7) การศึกษาจำนวนโมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ต่อการ incorporate ยาในอนุภาคนาโน

ในการศึกษานี้ใช้อนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ปริมาณ 10, 20 และ 30 %โมล และ incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนที่ไม่มียาบรรจุอยู่ (D:P ratio = 0:10) และเมื่อเพิ่ม D:P ratio ยังพบว่าอนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้นและสัมพันธ์กับ %DL ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 18) บ่งชี้ว่าระบบนั้น ๆ สามารถบรรจุยาได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม D:P ratio ยกเว้นในบางกรณีที่อนุภาคนาโนมีขนาดเล็กลงซึ่งเมื่อพิจารณาควบคู่กับ %DL ดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่าขนาดของอนุภาคนาโนที่เล็กลงนั้นสัมพันธ์กับ %DL ที่ลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากขีดจำกัดในการบรรจุยาของระบบนั้นๆ สำหรับบางกรณีที่อนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา มีขนาดเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคนาโนที่ไม่มียาบรรจุอยู่ ขนาดอนุภาคที่เล็กลงอาจเกิดจากแกนกลางของอนุภาคมีการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบมากขึ้นและอัดแน่นมากขึ้นเมื่อมีโมเลกุลของยาแทรกอยู่ในแกนกลางของอนุภาค ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง (50, 51)

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 และ 13 พบว่าเมื่อพิจารณาขนาดอนุภาคนาโน หลัง incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนที่ไม่มียาบรรจุอยู่ (D:P ratio = 0:10) และเมื่อเพิ่ม D:P ratio ยังพบว่าอนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้นและสัมพันธ์กับ %DL ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 18) บ่งชี้ว่าระบบนั้น ๆ สามารถบรรจุยาได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม D:P ratio ยกเว้นในบางกรณีที่อนุภาคนาโนมีขนาดเล็กลงซึ่งเมื่อพิจารณาควบคู่กับ %DL ดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่าขนาดของอนุภาคนาโนที่เล็กลงนั้นสัมพันธ์กับ %DL ที่ลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากขีดจำกัดในการบรรจุยาของระบบนั้นๆ สำหรับบางกรณีที่อนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา มีขนาดเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคนาโนที่ไม่มียาบรรจุอยู่ ขนาดอนุภาคที่เล็กลงอาจเกิดจากแกนกลางของอนุภาคมีการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบมากขึ้นและอัดแน่นมากขึ้นเมื่อมีโมเลกุลของยาแทรกอยู่ในแกนกลางของอนุภาค ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง (50, 51)

เมื่อพิจารณาค่าประจุบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา พบว่า กรณียา ibuprofen เมื่อ incorporate ยา จะทำให้ประจุบนพื้นผิวของอนุภาคมีค่าศักย์ไฟฟ้าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าประจุบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนที่ไม่มียาบรรจุอยู่ แต่ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าประจุบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนที่ลดลงกับ D:P ratio และ %โมลของ nicotinic acid ที่ติดอยู่บนสายโซ่โพลีเมอร์ได้ สำหรับกรณีของยา indomethacin ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าประจุบนพื้นผิว กับทั้ง D:P ratio หรือ %โมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ได้ แต่จากการ incorporate ยาทั้ง 2 ชนิด พบว่าค่าประจุบนพื้นผิวมีค่าแตกต่างกันไปจากค่าที่ได้จากอนุภาคนาโนชนิดที่ไม่มียาบรรจุอยู่ จึงสรุปได้ว่า อาจมีโมเลกุลของยาแทรกอยู่หรือถูกดูดซับอยู่ที่พื้นผิวของอนุภาคนาโน

เมื่อพิจารณาความสามารถในการบรรจุยาของอนุภาคนาโนโดยพิจารณาจาก %EE (ตารางที่ 12 และ 3) และ %DL (รูปที่ 18) พบว่า %EE ของอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid มีค่ามากกว่า %EE ของอนุภาคนาโนที่เตรียมจาก P(εCL)-co-PEG ที่ไม่มีโมเลกุล nicotinic acid ติดอยู่ ซึ่งผลดังกล่าวเมื่อ incorporate ยาทั้งสองชนิดมีความสอดคล้องกัน อย่างไรก็ตาม %EE จากการ incorporate ยาทั้งสองชนิดนั้นไม่สอดคล้องกับการเพิ่ม D:P ratio เนื่องมาจากปริมาณยาที่ถูกบรรจุอยู่ในอนุภาคนาโนที่เพิ่มขึ้นไม่สัมพันธ์กันเป็นเส้นตรงกับค่า D:P ratio ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณา %DL พบว่าค่า %DL ของอนุภาคนาโนที่มีโมเลกุล nicotinic acid ติดอยู่มีค่ามากกว่าค่า %DL ของอนุภาคนาโน

โนที่ไม่มีโมเลกุลของ nicotinic acid ติดอยู่ ยกเว้นกรณีของยา indomethacin ที่ D:P ratio เท่ากับ 2:10 อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่ม %โมลของ nicotinic acid ไม่ได้ส่งผลให้ค่า %DL เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองเป็นที่สังเกตว่า %EE และ %DL ของอนุภาคนาโนเมื่อทำการ incorporate ยา indomethacin แล้ว มีค่า %EE และ %DL มากกว่าระบบที่ทำการ incorporate ยา ibuprofen เมื่อเปรียบเทียบที่ D:P ratio และ %โมลของ nicotinic acid ที่เท่ากัน ผลดังกล่าวเกิดจากค่าซีดการละลายของยา ibuprofen ในน้ำที่มีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยา indomethacin (ibuprofen = 0.23 mg/mL (52) และ indomethacin = 0.016 mg/mL(53)) ทำให้ในระหว่างกระบวนการ incorporation ตัวยาในอนุภาคนาโน ยาที่มีค่าซีดการละลายในน้ำที่สูงกว่า เกิดการแบ่งภาคจากอนุภาคนาโนเข้าสู่วัฏภาคน้ำ ทำให้บรรจุยาได้ลดลง

การศึกษารูปร่างของอนุภาคนาโนที่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid หลัง incorporate ยา ibuprofen และ indomethacin ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอยแบบส่องกราดได้ผลตามที่แสดงให้เห็นในรูปที่ 19 พบว่า อนุภาคนาโนที่เตรียมได้หลัง incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดมีรูปร่างเป็นทรงกลมและมีการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคนาโนบ้างซึ่งอาจเกิดจากการเกาะกลุ่มกันในระหว่างการเตรียมตัวอย่างได้

ตารางที่ 12 ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (z-ave), ค่าการกระจายขนาดอนุภาค (PI), ค่าประจุบนพื้นผิว (ZP) และ %entrapment efficiency (%EE) ของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา ibuprofen

Formulation	D:P ratio ^a	z-ave (nm)	PI	ZP (mV)	%EE
P(ϵ CL)-co-PEG					
	0:10	123±26	0.473±0.101	-3.7±3.1	-
	2:10	96±15	0.396±0.121	-5.1±3.8	67.4±11.4
	3:10	92±10	0.366±0.075	-3.6±1.5	69.9±14.8 [*]
P((10Nicotinic acid-g- ϵ CL)-ran-90 ϵ CL)-co-PEG					
	0:10	77±10	0.192±0.032	-9.6±1.3	-
	2:10	130±13	0.319±0.111	-3.3±2.7	73.2±2.1
	3:10	110±1	0.250±0.133	-2.5±1.2	79.7±2.2 [*]
P((20Nicotinic acid-g- ϵ CL)-ran-80 ϵ CL)-co-PEG					
	0:10	82±8	0.104±0.024	-5.9±1.4	-
	2:10	98±3	0.104±0.031	-5.1±2.8	83.7±2.1
	3:10	112±1	0.077±0.011	-1.6±1.4	78.2±1.2 [*]
P((30Nicotinic acid-g- ϵ CL)-ran-70 ϵ CL)-co-PEG					
	0:10	120±25	0.099±0.023	-17.3±2.0	-
	2:10	120±1	0.086±0.018	-8.2±2.2	78.2±2.2
	3:10	148±1	0.079±0.024	-9.5±1.6	81.2±1.7 [*]

^a D:P ratio คืออัตราส่วนระหว่างยากับโพลีเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอนแรกของการเตรียมอนุภาคนาโน

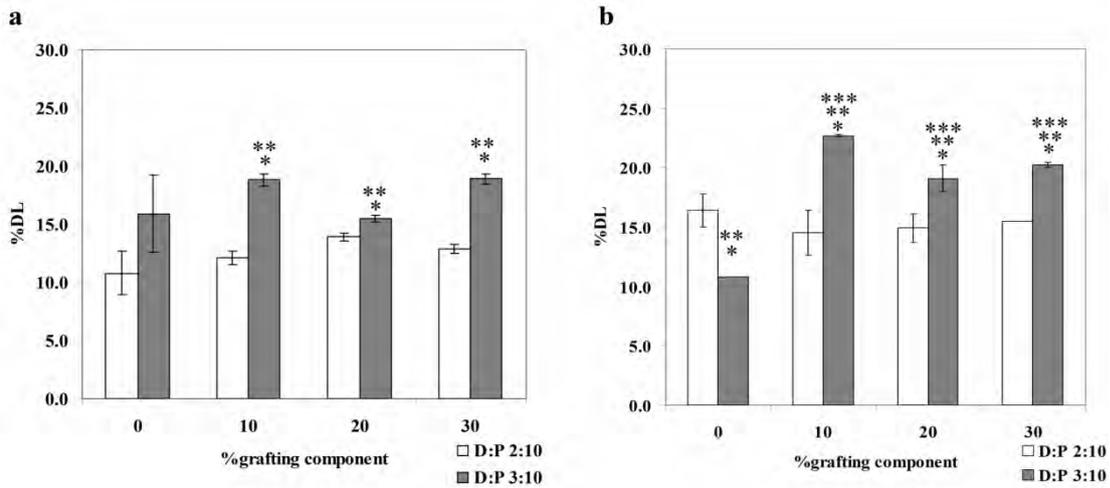
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 13 ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (z-ave), ค่าการกระจายขนาดอนุภาค (PI), ค่าประจุบนพื้นผิว (ZP) และ %entrapment efficiency (%EE) ของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา indomethacin

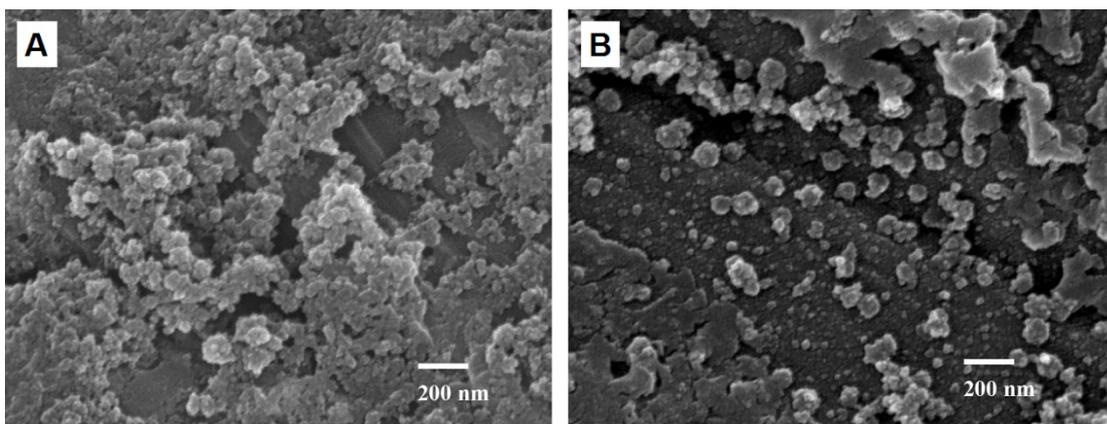
Formulation	D:P ratio ^a	z-ave (nm)	PI	ZP (mV)	%EE
P(εCL)-co-PEG					
	0:10	123±26	0.473±0.101	-3.7±3.1	-
	2:10	97±15	0.443±0.065	-5.1±2.8	97.4±14.7
				-	
	3:10	89±12	0.395±0.016	12.1±5.8	47.2±0.1*
P((10Nicotinic acid-g-εCL)-ran-90εCL)-co-PEG					
	0:10	77±10	0.192±0.032	-9.6±1.3	-
	2:10	101±30	0.264±0.077	-5.6±4.0	87.6±11.6
				-	
	3:10	89±1	0.212±0.027	11.1±4.0	100.1±0.2*
P((20Nicotinic acid-g-εCL)-ran-80εCL)-co-PEG					
	0:10	82±8	0.104±0.024	-5.9±1.4	-
	2:10	100±0	0.123±0.010	-6.1±3.6	85.9±10.0
				-	
	3:10	108±1	0.112±0.005	15.3±1.1	82.5±0.6
P((30Nicotinic acid-g-εCL)-ran-70εCL)-co-PEG					
				-	
	0:10	120±25	0.099±0.023	17.3±2.0	-
				-	
	2:10	133±2	0.088±0.025	21.9±3.0	93.1±0.2
				-	
	3:10	141±1	0.116±0.015	16.2±2.8	88.5±0.7*

^a D:P ratio คืออัตราส่วนระหว่างยากับโพลีเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอนแรกของการเตรียมอนุภาคนาโน

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



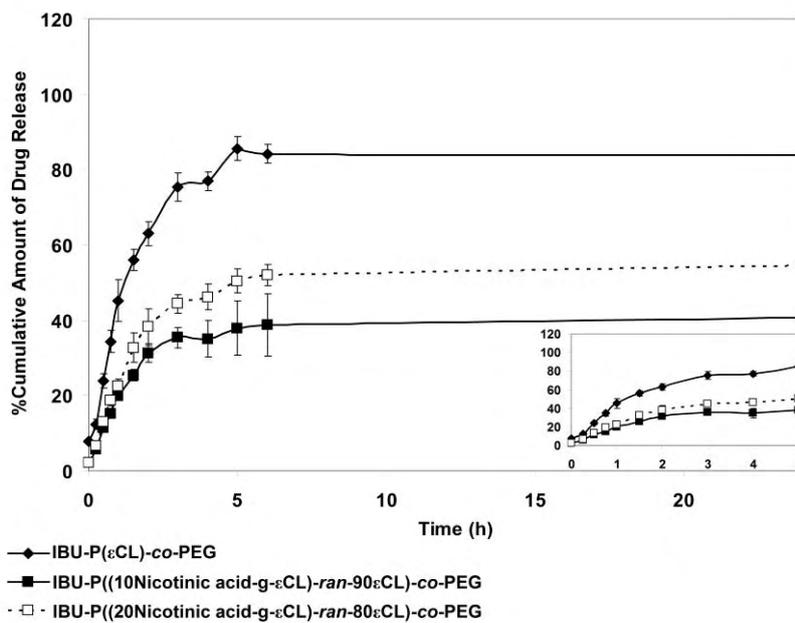
รูปที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Drug loading ของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา ibuprofen (a) และ indomethacin (b) กับ %โมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ 0% grafting แสดงถึงอนุภาคนาโนที่เตรียมจาก P(ϵ CL)-co-PEG (* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง D:P ratio ที่แตกต่างกันแต่ที่ %โมลของ nicotinic acid เท่ากัน (p -value of paired t-test < 0.05), ** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง%โมลของ nicotinic acid ที่แตกต่างกันแต่ที่ D:P ratio เท่ากัน (p -value of ANOVA test < 0.05), *** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากอนุภาคนาโนที่เตรียมจาก P(ϵ CL)-co-PEG (p -value of ANOVA test < 0.05))



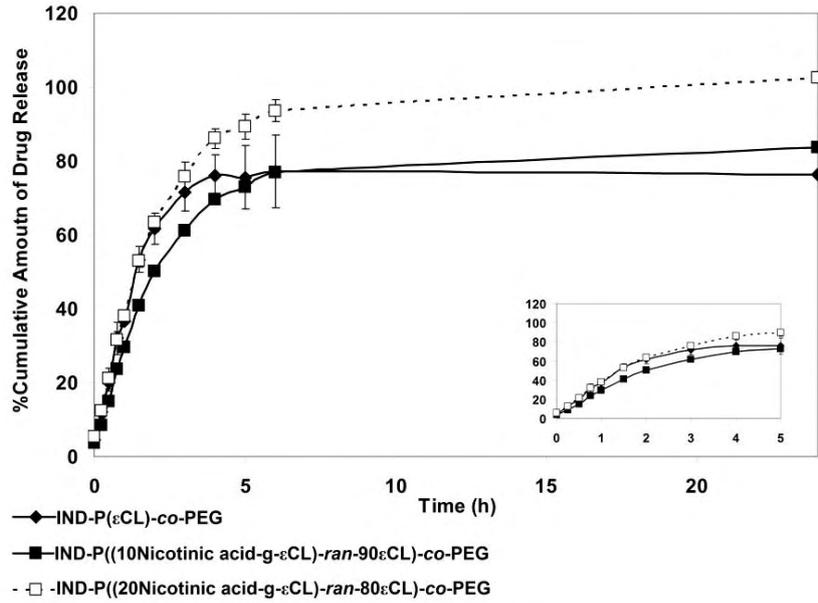
รูปที่ 19 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 10% โมลหลัง incorporate ยา ibuprofen (A) และ indomethacin (B)

(8) การศึกษาผลของจำนวนโมลของ nicotinic acid ต่อการปลดปล่อย Ibuprofen และ Indomethacin

จากการศึกษาผลของจำนวนโมลของ nicotinic acid ต่อการ incorporate ยาในอนุภาคนาโน พบว่าเมื่อจำนวนโมลของ nicotinic acid แตกต่างกันมีผลให้เกิดความแตกต่างทางคุณสมบัติเคมีกายภาพของอนุภาคนาโน ได้แก่ ขนาดอนุภาคและค่าประจุบนพื้นผิวของอนุภาคนาโน ปริมาณยาที่ถูก incorporate อยู่ในอนุภาคนาโนหรือ %drug loading ดังนั้นในการศึกษาผลของจำนวนโมลของ nicotinic acid ต่อการปลดปล่อยยาจึงเลือกอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุลของ nicotinic acid จำนวน 10 และ 20% โมล และ incorporate ยา ibuprofen หรือ indomethacin ในอัตราส่วนระหว่างยาต่อโพลีเมอร์ คือ 2:10 เพื่อใช้ในการศึกษาและเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบคือ P(ϵ CL)-co-PEG จากการทดลองเมื่อนำค่าที่คำนวณได้มาสร้างกราฟ release profile ได้ดังรูปที่ 20 และ 21

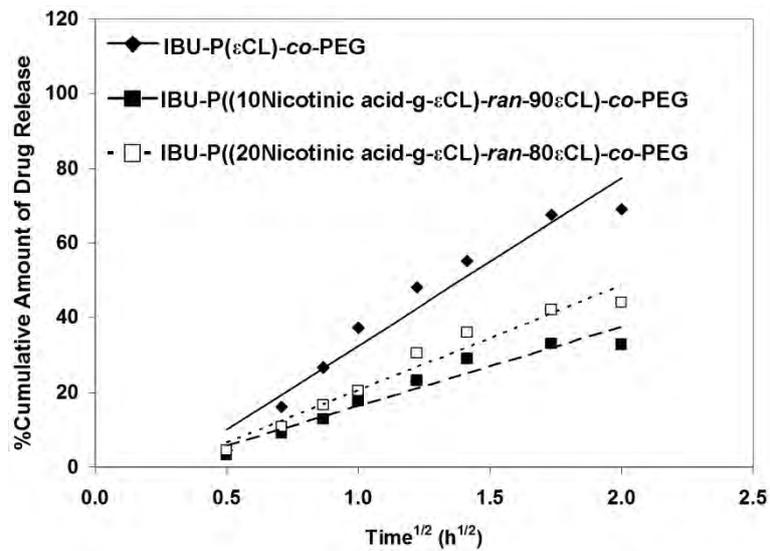


รูปที่ 20 Release profile ของยา ibuprofen จากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ภายใน 24 ชั่วโมง รูปภาพเล็กแสดง release profile ของยา ibuprofen ในช่วง 5 ชั่วโมงแรกของการทดลอง

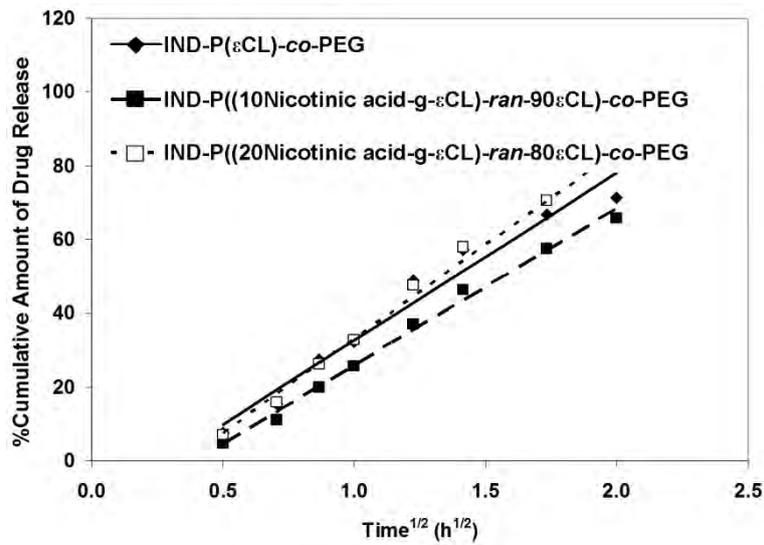


รูปที่ 21 Release profile ของยา indomethacin จากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ภายใน 24 ชั่วโมง รูปภาพเล็กแสดง release profile ของยา indomethacin ในช่วง 5 ชั่วโมงแรกของการทดลอง

เมื่อทำการสร้างกราฟระหว่าง %cumulative amount of drug release กับ $time^{1/2}$ พบว่าได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 22 และ 23 และมีค่า r^2 ตั้งแต่ 0.941 ขึ้นไป (ตารางที่ 14 และ 15)



รูปที่ 22 Higuchi model fitting กราฟ release profile ของยา ibuprofen จากอนุภาคนาโนในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการทดลอง



รูปที่ 23 Higuchi model fitting กราฟ release profile ของยา indomethacin จากอนุภาคนาโนในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการทดลอง

จากกราฟความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่าง %cumulative amount of drug release กับ $time^{1/2}$ สามารถคำนวณหาค่า r^2 ความชันและสมการเส้นตรงได้ดังแสดงในตารางที่ 14 และ 15

ตารางที่ 14 ค่า r^2 ความชันและสมการเส้นตรงจากความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่าง %cumulative amount of drug release กับ $time^{1/2}$ ของยา ibuprofen

โพลีเมอร์	Ibuprofen		
	r^2	ความชัน	สมการเส้นตรง
P(εCL)-co-PEG	0.953	44.910	$y = 44.910x - 12.383$
P((10Nicotinic acid-g-εCL)-ran-90εCL)-co-PEG	0.941	21.142	$y = 21.142x - 4.827$
P((20Nicotinic acid-g-εCL)-ran-80εCL)-co-PEG	0.962	28.058	$y = 28.058x - 7.464$

ตารางที่ 15 ค่า r^2 ความชันและสมการเส้นตรงจากความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่าง %cumulative amount of drug release กับ $time^{1/2}$ ของยา indomethacin

โพลีเมอร์	Indomethacin		
	r^2	ความชัน	สมการเส้นตรง
P(εCL)-co-PEG	0.966	45.397	$y = 45.397x - 12.746$
P((10Nicotinic acid-g-εCL)-ran-90εCL)-co-PEG	0.993	42.501	$y = 42.501x - 16.676$
P((20Nicotinic acid-g-εCL)-ran-80εCL)-co-PEG	0.992	50.921	$y = 50.921x - 17.788$

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการปลดปล่อยยาต้นแบบทั้ง ibuprofen และ indomethacin จากอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid และโพลีเมอร์ต้นแบบเป็นไปตาม Higuchi model (48) แสดงให้เห็นว่ากลไกการปลดปล่อยยาเป็นแบบ Fickian diffusion นอกจากนี้สามารถหาอัตราการปลดปล่อยยาได้จากค่าความชันของสมการเส้นตรงดังกล่าวเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบได้

การเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบ (P(ϵ CL)-co-PEG)

พบว่าปริมาณยา ibuprofen และ indomethacin ประมาณ 80% ปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนภายใน 24 ชั่วโมง (รูปที่ 20 และ 21) ปริมาณและอัตราการปลดปล่อยยา indomethacin ไม่มีความแตกต่างจากการปลดปล่อยยา ibuprofen (ตารางที่ 14 และ 15) ซึ่งไม่สอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่ายาที่มีค่าขีดการละลายน้ำน้อยกว่ามีปริมาณและอัตราการปลดปล่อยยาที่น้อยกว่ายาที่มีค่าขีดการละลายน้ำสูงมากกว่า (ยา indomethacin มีค่าขีดการละลายน้ำน้อยกว่ายา ibuprofen) (49, 50)

ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่ออัตราและปริมาณการปลดปล่อยยาได้แก่ พื้นที่ผิวของอนุภาคนาโน ความเข้มข้นเริ่มต้นของยาในระบบ เป็นต้น จากผลการศึกษาปริมาณยาที่ถูก incorporate ในอนุภาคนาโน (ตารางที่ 16) พบว่า ขนาดของอนุภาคนาโนเมื่อ incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญซึ่งบ่งบอกว่าพื้นที่ผิวของอนุภาคนาโนที่ incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกัน แต่ %drug loading ของยา indomethacin มากกว่า %drug loading ของยา ibuprofen จึงมีผลเพิ่มการปลดปล่อยยา indomethacin จากอนุภาคนาโน

ตารางที่ 16 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา ibuprofen และ indomethacin

โพลีเมอร์	Ibuprofen		Indomethacin	
	z-ave (nm)	%Drug loading	z-ave (nm)	%Drug loading
P(ϵ CL)-co-PEG	96±15	10.8±1.9	97±15	16.4±1.4
P((10Nicotinic acid-g- ϵ CL)-ran-90 ϵ CL)-co-PEG	130±13	12.1±0.6	101±30	14.5±1.9
P((20Nicotinic acid-g- ϵ CL)-ran-80 ϵ CL)-co-PEG	98±3	13.9±0.3	100±0	14.9±1.2

การเปรียบเทียบผลของจำนวนโมลของ *nicotinic acid* ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ต่อการปลดปล่อยยาแต่ละชนิด

กรณียา ibuprofen

การปลดปล่อยยา ibuprofen จากอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* 20% โมล มีค่าปริมาณ (รูปที่ 20) และอัตรา (ตารางที่ 14) การปลดปล่อยยาสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* เพียง 10% โมล เนื่องจาก

1. ขนาดอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* 20% โมล มีขนาดเล็กกว่าอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* เพียง 10% โมล (ตารางที่ 16) ทำให้มีพื้นที่ผิวในการปลดปล่อยยาสูงกว่า (51)
2. %Drug loading ของยา ibuprofen ในอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* 20% โมล มีค่าสูงกว่า %drug loading ในอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* เพียง 10% โมล (ตารางที่ 16) ทำให้เพิ่มการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโน (52)
3. ความเป็นผลึกของโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* 20% โมล น้อยกว่าความเป็นผลึกของโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* เพียง 10% โมล โดยดูจากค่า enthalpy of melting ดังแสดงในตารางที่ 17 ค่า enthalpy of melting ของโพลีเมอร์ ที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* 20% โมล มีค่าน้อยกว่าค่าของโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* เพียง 10% โมล ทำให้ยาสามารถ diffuse ออกจาก polymer matrix ได้ดีกว่า จึงเพิ่มการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโน (53)

ตารางที่ 17 ค่า enthalpy of melting ของโพลีเมอร์

โพลีเมอร์	Enthalpy of melting (ΔH_m , J/g)
P(ϵ CL)-co-PEG	47.7
P((10Nicotinic acid-g- ϵ CL)-ran-90 ϵ CL)-co-PEG	45.8
P((20Nicotinic acid-g- ϵ CL)-ran-80 ϵ CL)-co-PEG	17.6

กรณียา indomethacin

ปริมาณ (รูปที่ 21) และอัตรา (ตารางที่ 15) การปลดปล่อยยา indomethacin จากอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* 20% โมล มีค่ามากกว่าปริมาณและอัตราการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* เพียง 10% โมล เนื่องจากความเป็นผลึกของสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* 20% โมล น้อยกว่าความเป็นผลึกของสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล *nicotinic acid* เพียง 10% โมล โดยดูจากค่า enthalpy of melting ในตารางที่ 17 มีผลเพิ่มการ diffuse ของยาออกจาก polymer matrix จึงเพิ่มการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโน

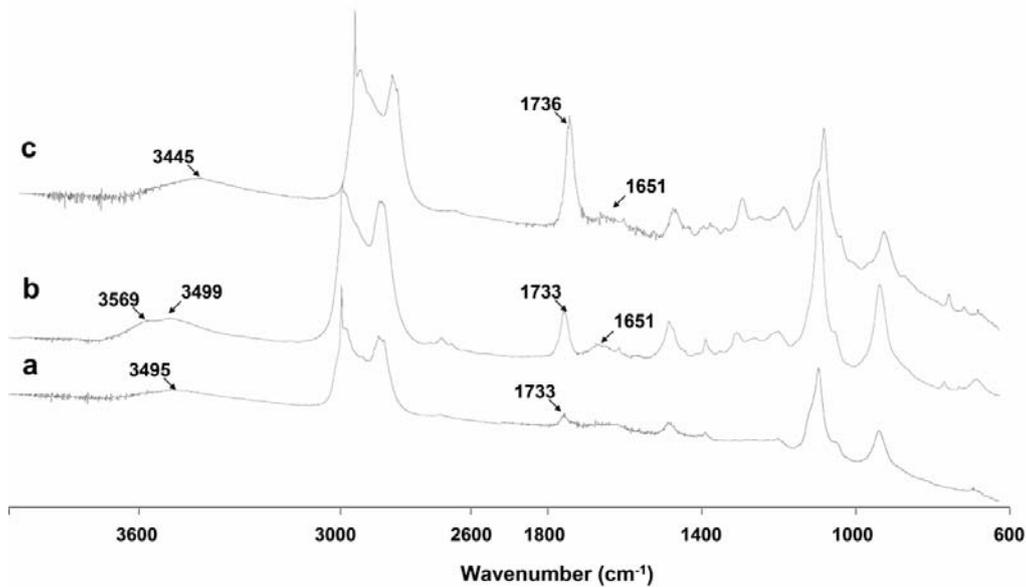
การเปรียบเทียบ *release profile* ของยา *ibuprofen* และ *indomethacin*

ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบนี้ จะทำการเปรียบเทียบ *release profile* ของยาทั้ง 2 ชนิด จากอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 20% โมล เนื่องจากอนุภาคนาโนที่เตรียมได้หลัง incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ขนาดอนุภาคนาโนหลัง incorporate ยา %drug loading และความเป็นผลึกของโพลีเมอร์ จากการเปรียบเทียบพบว่า ปริมาณ (รูปที่ 20) และอัตรา (ตารางที่ 14) การปลดปล่อยยา *ibuprofen* จากอนุภาคนาโนน้อยกว่าและช้ากว่าปริมาณ (รูปที่ 21) และอัตรา (ตารางที่ 15) การปลดปล่อยยา *indomethacin* จากอนุภาคนาโน ชนิดเดียวกันถึงแม้ว่า *ibuprofen* มีค่าชี้การละลายน้ำมากกว่า *indomethacin* (49, 50) จึงคาดว่าน่าจะเกิด *interaction* ระหว่างยากับสายโซ่โพลีเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโน ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยวิธี Fourier-transformed infrared spectrophotometry (FT-IR)

(9) การศึกษาการเกิด *interaction* ระหว่างยา *ibuprofen* กับสายโซ่โพลีเมอร์โดยวิธี FT-IR

จากการศึกษาได้ผลดังแสดงในรูปที่ 24 จาก spectrum ของยา *ibuprofen* (รูปที่ 24a) พบพีดที่ตำแหน่ง 3495 cm^{-1} แสดงถึงการ stretching ของหมู่ O-H และพีดที่ตำแหน่ง 1733 cm^{-1} แสดงถึงการ stretching ของหมู่ C=O ในโมเลกุลยา *ibuprofen* ส่วนกรณีของสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% โมล (รูปที่ 24b) พบพีดที่ตำแหน่ง 3499 และ 3569 cm^{-1} แสดงถึงการ stretching ของหมู่ O-H ที่ปลายสายโซ่ ตำแหน่ง 1733 cm^{-1} แสดงถึงการ stretching ของหมู่ C=O และตำแหน่ง 1651 cm^{-1} แสดงถึงการ stretching ของหมู่ C=N บนสายโซ่โพลีเมอร์ แต่ในกรณีของสารผสมระหว่างยา *ibuprofen* กับสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% โมล (รูปที่ 24c) พบตำแหน่งของพีดที่แสดงถึงการ stretching ของหมู่ O-H ในโมเลกุลของยาและโพลีเมอร์ที่ 3445 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เปลี่ยนไปจากเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับพีดของยาและโพลีเมอร์เดี่ยวๆ นอกจากนี้ยังไม่พบพีดที่ตำแหน่ง 1651 cm^{-1} ที่แสดงถึงการ stretching ของหมู่ C=N บนสายโซ่โพลีเมอร์ และพบพีดใหม่ที่ตำแหน่ง 1736 cm^{-1} จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงรูปแบบและความถี่ของพีดที่พบใน FT-IR spectrum บ่งบอกถึงการเกิด hydrogen bonding ระหว่างหมู่ O-H ของยา *ibuprofen* กับหมู่ใดหมู่หนึ่งต่อไปนี้ในส่วนของโมเลกุล nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ได้แก่ หมู่ pyridinyl หมู่ triazolyl หรือหมู่ carbonyl

ในกรณีของยา *indomethacin* กับสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวใน FT-IR spectrum



รูปที่ 24 FT-IR spectra ของยา ibuprofen (a) สายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% โมล (b) และสารผสมระหว่างยา ibuprofen กับสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 30% โมล (c)

การเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 20% โมล กับอนุภาคนาโนที่เตรียมได้จากโพลีเมอร์ต้นแบบ

ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบนี้ ทำการเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนระหว่างอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 20% โมลกับโพลีเมอร์ต้นแบบเนื่องจากขนาดอนุภาคนาโนและ %drug loading ที่ได้หลัง incorporate ยาไม่แตกต่างกัน และจากการเปรียบเทียบพบว่า

กรณียา ibuprofen

อัตรา (ตารางที่ 14) และปริมาณ (รูปที่ 20) การปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 20% โมล ต่ำกว่าอัตราและปริมาณการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบอย่างมาก เนื่องจากยา ibuprofen เกิด interaction กับสายโซ่โพลีเมอร์ในส่วนของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ ถึงแม้ว่าสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 20% โมล จะมีความเป็นผลึกน้อยกว่าสายโซ่โพลีเมอร์ต้นแบบ จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าการเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลยากับสายโซ่โพลีเมอร์มีผลต่อการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนมากกว่าผลจากความแตกต่างที่ต่างกันของสายโซ่โพลีเมอร์

กรณียา indomethacin

พบว่าอัตราการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 20% โมล (ตารางที่ 15) มากกว่าอัตราการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ต้นแบบเนื่องจากความเป็นผลึกของสายโซ่โพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid 20% โมลน้อยกว่าความเป็นผลึกของสายโซ่โพลีเมอร์ต้นแบบ และไม่เกิด interaction ระหว่างโมเลกุลยากับหมู่ใด ๆ ของสายโซ่โพลีเมอร์

สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงสายโพลีเมอร์ที่สลายตัวทางชีวภาพเพื่อใช้ในการนำส่งยาเป็นที่น่าสนใจอย่างมากในทางเภสัชกรรม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงสายโพลีเมอร์โพลีเอสเทอร์ชนิด polycaprolactone ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ด้วยการเติมกลุ่ม polyethylene glycol (PEG 4000) ลงในสายโพลีเพื่อให้มีความเป็น hydrophilic เพิ่มขึ้น และ graft ตัวยา nicotinic acid ซึ่งเป็นสารมวลโมเลกุลเล็กลงบนสายโพลีเมอร์นี้ด้วยสภาวะที่ไม่รุนแรง ด้วยปฏิกิริยา 1,3-dipolar cycloaddition ที่รู้จักกันในชื่อ click reaction โดยการ copolymerization ของ α -chloro- ϵ -caprolactone (α ClECL) และ ϵ -caprolactone (ϵ CL) ด้วยวิธี ring opening polymerization โดยใช้ PEG 4000 และ Tin (II) Octanoate (SnOct_2) เป็น catalyst จากนั้นปรับเปลี่ยน กลุ่มคลอไรด์บนสายโพลี ให้เป็น azide ซึ่งจะเป็นตำแหน่งที่เชื่อมติดกับ but-3-ynyl nicotinate ด้วย click reaction จากการศึกษาโครงสร้างและการตรวจสอบสมบัติของโพลีเมอร์ที่ได้ด้วย $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy, FT-IR Spectroscopy และ Gel Permeation Chromatography พบว่าสามารถ graft ตัวยา nicotinic acid ที่สัดส่วนต่างๆ (10%, 20% และ 30%) ลงบนสายโพลีของ poly- ϵ -caprolactone (ϵ CL) ได้สำเร็จด้วยการใช้สภาวะไม่รุนแรงและใช้ระยะเวลาที่สั้น จึงไม่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของโพลีเมอร์ ผลของการศึกษา thermal property พบว่าจำนวนโมลและชนิดของหมู่หรือโมเลกุลที่ติดบนสายโพลีเมอร์นั้นมีผลต่อค่า T_g และ T_m ของโพลีเมอร์ โดยผลการทดลองระบุว่า การติดหมู่หรือโมเลกุลบนสายโพลีและการเพิ่มจำนวนโมลของหมู่ที่ติดมีผลเปลี่ยนรูปผลึกของโพลีเมอร์จาก semi-crystalline เป็น amorphous มากขึ้น ดังนั้นปริมาณ nicotinic acid ที่ติดบนสายโพลีเมอร์ส่งผลต่อสมบัติเฉพาะทางกายภาพและเคมีของโพลีเมอร์

การศึกษาความเป็นพิษของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ต่อเซลล์ปกติ ผลการศึกษาพบว่าโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HUVECs เช่นเดียวกับโพลีเมอร์ต้นแบบ (P(ϵ CL)-co-PEG) ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เมื่อนำโพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid ที่สังเคราะห์ได้ ไปเตรียมเป็นอนุภาคนาโนด้วยวิธี nanoprecipitation และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนที่ได้ พบว่าอนุภาคนาโนที่ไม่มีการบรรจุยามีรูปร่างทรงกลม และจำนวนโมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโพลีเมอร์ส่งผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคนาโน โดยที่จำนวนโมลของ nicotinic acid ที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ขนาดอนุภาคนาโนเพิ่มขึ้นเนื่องจากความเป็น hydrophobic ที่เพิ่มขึ้นและ steric hindrance ของหมู่ที่ยื่นออกจากแกนของโพลีเมอร์ที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในรูปของอนุภาคนาโนพบว่าอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.20 mg/mL ดังนั้น การติดโมเลกุล nicotinic acid มีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ และเมื่อเพิ่ม % โมลของ nicotinic acid มีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาผลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโพลีเมอร์ต่อกักเก็บยาต้นแบบ 2 ชนิดคือ ibuprofen และ indomethacin พบว่าหลัง incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดมีผลทำให้อนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่

ขึ้น และการบรรจุยาของอนุภาคนาโนที่มีโมเลกุล nicotinic acid ติดอยู่มีประสิทธิภาพมากกว่าอนุภาคนาโนที่ไม่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid ที่เตรียมจากโพลีเมอร์ P(εCL)-co-PEG แต่เมื่อเพิ่ม %โมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ ประสิทธิภาพในการบรรจุยาของอนุภาคนาโนไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการบรรจุยาของอนุภาคนาโนยังขึ้นอยู่กับค่าขีดการละลายของตัวเองด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการแบ่งภาคระหว่างอนุภาคนาโนกับวัฏภาคน้ำในขั้นตอนการ incorporate ตัวยา การศึกษาการปลดปล่อยตัวยา ibuprofen และ indomethacin จากอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid และโพลีเมอร์ต้นแบบ พบว่ามีการปลดปล่อยเป็นไปตาม Higuchi model แสดงให้เห็นว่ากลไกการปลดปล่อยยาเป็นแบบ Fickian diffusion การปลดปล่อยยา ibuprofen จากอนุภาคนาโนน้อยกว่าและช้ากว่า indomethacin ถึงแม้ว่า ibuprofen มีค่าขีดการละลายน้ำมากกว่า indomethacin เนื่องจากเกิด interaction ระหว่าง ibuprofen กับสายโซ่โพลีเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโน สรุปได้ว่า การติดโมเลกุล nicotinic acid บนสายโซ่โพลีเมอร์มีผลต่อทั้งปริมาณและอัตราการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโน เนื่องจากการติดโมเลกุล nicotinic acid ส่งผลต่อคุณสมบัติเคมีกายภาพของอนุภาคนาโน ได้แก่ ขนาดอนุภาคนาโน %drug loading ความเป็นผลึกของสายโซ่โพลีเมอร์ และการเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลยากับสายโซ่โพลีเมอร์

เอกสารอ้างอิง

1. Sahoo SK, Labhassetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today* 2003;8(24):1112-1120.
2. Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis TB Research in India - International Symposium on Emerging Trends in Tuberculosis Research* 2005;85(5-6):415-420.
3. Tabatt K, Sameti M, Olbrich C, Muller RH, Lehr C-M. Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;57(2):155-162.
4. Kajiwara E, Kawano K, Hattori Y, Fukushima M, Hayashi K, Maitani Y. Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy. *Journal of Controlled Release* 2007;120(1-2):104-110.
5. Nagae I, Koyanagi Y, Ito S, Tanabe Y, Unezaki S. Liposome drug delivery system for murine neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* 1998;33(10):1521-1525.
6. Vermette P, Meagher L, Gagnon E, Griesser HJ, Doillon CJ. Immobilized liposome layers for drug delivery applications: inhibition of angiogenesis. *Journal of Controlled Release* 2002;80(1-3):179-195.
7. Kim IS, Jeong YI, Cho CS, Kim SH. Core-shell type polymeric nanoparticles composed of poly(-lactic acid) and poly(N-isopropylacrylamide). *International Journal of Pharmaceutics* 2000;211(1-2):1-8.
8. Kim IS, Kim SH. Development of a polymeric nanoparticulate drug delivery system: In vitro characterization of nanoparticles based on sugar-containing conjugates. *International Journal of Pharmaceutics* 2002;245(1-2):67-73.
9. Kim IS, Kim SH. Development of polymeric nanoparticulate drug delivery systems: evaluation of nanoparticles based on biotinylated poly(ethylene glycol) with sugar moiety. *International Journal of Pharmaceutics* 2003;257(1-2):195-203.
10. Jintapattanakit A, Junyaprasert VB, Mao S, Sitterberg J, Bakowsky U, Kissel T. Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2007;342(1-2):240-249.
11. Hruby M, Konak C, Ulbrich K. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *Journal of Controlled Release* 2005;103(1):137-148.

12. Zhang Y, Jin T, Zhuo R-X. Methotrexate-loaded biodegradable polymeric micelles: Preparation, physicochemical properties and in vitro drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2005;44(2-3):104-109.
13. Yoo HS, Lee EA, Park TG. Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages. *Journal of Controlled Release* 2002;82(1):17-27.
14. Kim SY, Lee YM. Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(ϵ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials* 2001;22(13):1697-1704.
15. Park EK, Lee SB, Lee YM. Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005;26(9):1053-1061.
16. Leo E, Angela Vandelli M, Cameroni R, Forni F. Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process. *International Journal of Pharmaceutics* 1997;155(1):75-82.
17. Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007;59(1):24-34.
18. Lu W, Zhang Y, Tan Y-Z, Hu K-L, Jiang X-G, Fu S-K. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery. *Journal of Controlled Release* 2005;107(3):428-448.
19. Li Y, Zhu KJ, Zhang JX, Jiang HL, Liu JH, Hao YL, et al. In vitro and in vivo studies of cyclosporin A-loaded microspheres based on copolymers of lactide and ϵ -caprolactone: Comparison with conventional PLGA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 2005;295(1-2):67-76.
20. Ge H, Hu Y, Yang S, Jiang X, Yang C. Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug-loaded ϵ -caprolactone/L-lactide copolymer nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* 2000;75(7):874-882.
21. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm* 2004;278(1):1-23.
22. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2002;6(4):319-327.
23. Jagur-Grodzinski J. Biomedical application of functional polymers. *Reactive and Functional Polymers* 1999;39(2):99-138.

24. Zhang Y, Zhuo R. Synthesis and in vitro drug release behavior of amphiphilic triblock copolymer nanoparticles based on poly (ethylene glycol) and polycaprolactone. *Biomaterials* 2005;26(33):6736-6742.
25. Yasugi K, Nagasaki Y, Kato M, Kataoka K. Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(,-lactide) block copolymers as potential drug carrier. *Journal of Controlled Release* 1999;62(1-2):89-100.
26. Cho H, Chung D, Jeongho A. Poly(-lactide-ran-[var epsilon]-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(-lactide-ran-[var epsilon]-caprolactone) as parenteral drug-delivery systems. *Biomaterials* 2004;25(17):3733-3742.
27. Lee J, Cho EC, Cho K. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(,-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles. *Journal of Controlled Release* 2004;94(2-3):323-335.
28. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007;65(3):259-269.
29. Liggins RT, Burt HM. Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002;54(2):191-202.
30. Moghimi SM, Hedeman H, Muir IS, Illum L, Davis SS. An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1993;1157(2):233-240.
31. Jones MC, Leroux JC. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1999;48(2):101-111.
32. Bernkop-Schnurch A, Hornof M, Guggi D. Thiolated chitosans. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;57(1):9-17.
33. Bernkop-Schnurch A, Guggi D, Pinter Y. Thiolated chitosans: development and in vitro evaluation of a mucoadhesive, permeation enhancing oral drug delivery system. *Journal of Controlled Release* 2004;94(1):177-186.
34. Nadeau V, Leclair G, Sant S, Rabanel J-M, Quesnel R, Hildgen P. Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications. *Polymer* 2005;46(25):11263-11272.
35. Lou X, Detrembleur C, Lecomte P, Jerome R. Controlled synthesis and chemical modification of unsaturated aliphatic (Co)polyesters based on 6,7-dihydro-2(3H)-

- oxepinone. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2002;40(14):2286-2297.
36. Yoo HS, Park TG. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *Journal of Controlled Release* 2004;96(2):273-283.
 37. Lenoir S, Riva R, Lou X, Detrembleur C, Jerome R, Lecomte P. Ring-Opening Polymerization of α -Chloro- ϵ -caprolactone and Chemical Modification of Poly(α -chloro- ϵ -caprolactone) by Atom Transfer Radical Processes. *Macromolecules*. 2004;37(11):4055-61.
 38. Riva R, Schmeits S, Jérôme C, Jérôme R, Lecomte P. Combination of Ring-Opening Polymerization and "Click Chemistry": Toward Functionalization and Grafting of Poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecules*. 2007;40(4):796-803.
 - 39 Lucke A, Teßmar J, Schnell E, Schmeer G, Göpferich A. Biodegradable poly(ϵ -lactid acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. *Biomaterials*. 2000;21(23):2361-70.
 - 40 Zhang Y, Wang C, Yang W, Shi B, Fu S. Tri-component diblock copolymers of poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone-co-lactide): synthesis, characterization and loading camptothecin. *Colloid & Polymer Science*. 2005;283(11):1246-52.
 - 41 Zhu W, Xie W, Tong X, Shen Z. Amphiphilic biodegradable poly(CL-b-PEG-b-CL) triblock copolymers prepared by novel rare earth complex: Synthesis and crystallization properties. *European Polymer Journal*. 2007;43(8):3522-30.
 - 42 Gou M, Qian Z, Wang H, Tang Y, Huang M, Kan B, et al. Preparation and characterization of magnetic poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19(3):1033-41.
 - 43 Ero MS, Güven O. Thermal decomposition of poly(glycidyl azide) as studied by high-temperature FTIR and thermogravimetry. *Journal of Applied Polymer Science* 1996;61(2):201-6.
 - 44 Fazlloglu H, Hacaloglu J. Thermal decomposition of glycidyl azide polymer by direct insertion probe mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2002;63(2):327-38.
 - 45 Chang, YC., and Chu, I. M. Methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(valerolactone) diblock polymeric micelles for enhanced encapsulation and protection of camptothecin. *European Polymer Journal*. 2008;44:3922-3930.

- 46 Sun TM, Du JZ, Yan LF, Mao HQ, Wang J. Self-assembled biodegradable micellar nanoparticles of amphiphilic and cationic block copolymer for siRNA delivery. *Biomaterials* 2008;29:4348-4355.
- 47 Lee RS Huang YT. Synthesis and characterization of amphiphilic block-graft MPEG-*b*-(PAN₃CL-*g*-alkyne) degradable copolymers by ring-opening polymerization and click chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2008;46:4320-4331.
48. Fernández-Carballido A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT, Pastoriza P. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: Effect of Labrafil addition on release in vitro. *Int. J. Pharm.* 2004;279(1-2):33-41.
49. Kwong E, Pillai GK, McErlane KM. HPLC analysis of indomethacin and its impurities in capsule and suppository formulations. *J. Pharm. Sci.* 1982;71(7):828-830.
50. Giacomelli C, Schmidt V, Borsali R. Specific interactions improve the loading capacity of block copolymer micelles in aqueous media. *Langmuir* 2007;23(13):6947-6955.
51. Michailova V, Berlinova I, Iliev P, Ivanov L, Titeva S, Momekov G, et al. Nanoparticles formed from PNIPAM-*g*-PEO copolymers in the presence of indomethacin. *Int. J. Pharm.* 2010;384(1-2):154-164.
52. Jiang B, Hu L, Gao C, Shen J. Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a co-precipitation method and their release properties. *Int. J. Pharm.* 2005;304(1-2):220-230.
53. Zhang JX, Li XJ, Qiu LY, Li XH, Yan MQ, Yi J, et al. Indomethacin-loaded polymeric nanocarriers based on amphiphilic polyphosphazenes with poly (N-isopropylacrylamide) and ethyl tryptophan as side groups: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *J. Control. Release* 2006;116(3):322-329.

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว. และ สกอ.

ผลงานตีพิมพ์ (Reprint)

- S
uksiriworapong J, Sripha K, Kreuter J, **Junyaprasert VB***. Investigation of polymer and nanoparticle properties with nicotinic acid and p-aminobenzoic acid grafted on poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) via click chemistry. Bioconjugate Chem 2011, 22: 582-594. (JCR Impact factor 2009 = 4.350)
- S
uksiriworapong J, Sripha K, and **Junyaprasert VB**. Synthesis and characterization of bioactive molecules grafted on poly(ϵ -caprolactone) by “click” chemistry. Polymer 2010; 51: 2286-2295. (JCR Impact factor 2009 = 3.573)
- S
uksiriworapong J, Sripha K, Kreuter J, **Junyaprasert VB***. Comparative study of ibuprofen and indomethacin loaded poly(caprolactone) nanoparticles: Physicochemical properties. Mahidol J Pharm Sci 2010; 37(1-2): 17-27.

Manuscript

- Suksiriworapong J, Sripha K, Kreuter J, **Junyaprasert VB***. Functionalized (poly(ϵ -caprolactone))₂-poly(ethylene glycol) nanoparticles with grafting nicotinic acid as drug carriers Eur J Pharm Sci [Submitted] (JCR Impact factor 2009 = 2.608)

การเสนอผลงาน (Presentation)

- **Junyaprasert VB**, Suksiriworapong J, Sripha K. Synthesis of PEG-Polycaprolactone Grafted with Nicotinic Acid for Drug Delivery. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9, โรงแรมฮอติเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี, 15-17 ตุลาคม 2552.
- **Junyaprasert VB**, Suksiriworapong J, Sripha K. Study of (Poly(caprolactone))₂-PEG Grafted with Nicotinic Acid for Drug Delivery: Characterization and Nanoparticle Formation. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 10, โรงแรมฮอติเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี, 14-16 ตุลาคม 2553.

ผลงานตีพิมพ์ (Reprint) และ Manuscript

ผลงานตีพิมพ์ (Reprint)

- S
uksiriworapong J, Sripha K, Kreuter J, **Junyaprasert VB***. Investigation of polymer and nanoparticle properties with nicotinic acid and p-aminobenzoic acid grafted on poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) via click chemistry. *Bioconjugate Chem* 2011, 22: 582-594. (JCR Impact factor 2009 = 4.350)
- S
uksiriworapong J, Sripha K, and **Junyaprasert VB**. Synthesis and characterization of bioactive molecules grafted on poly(ϵ -caprolactone) by “click” chemistry. *Polymer* 2010; 51: 2286-2295. (JCR Impact factor 2009 = 3.573)
- S
uksiriworapong J, Sripha K, Kreuter J, **Junyaprasert VB***. Comparative study of ibuprofen and indomethacin loaded poly(caprolactone) nanoparticles: Physicochemical properties. *Mahidol J Pharm Sci* 2010; 37(1-2): 17-27.

Manuscript

- Suksiriworapong J, Sripha K, Kreuter J, **Junyaprasert VB***. Functionalized (poly(ϵ -caprolactone))₂-poly(ethylene glycol) nanoparticles with grafting nicotinic acid as drug carriers *Eur J Pharm Sci* [Submitted] (JCR Impact factor 2009 = 2.608)

Investigation of Polymer and Nanoparticle Properties with Nicotinic Acid and *p*-Aminobenzoic Acid Grafted on Poly(ϵ -caprolactone)-Poly(ethylene glycol)-Poly(ϵ -caprolactone) via Click Chemistry

 Jiraphong Suksiriworapong,[†] Kittisak Sripha,[‡] Jörg Kreuter,[§] and Varaporn Buraphacheep Junyaprasert^{*,†}
[†]Department of Pharmacy

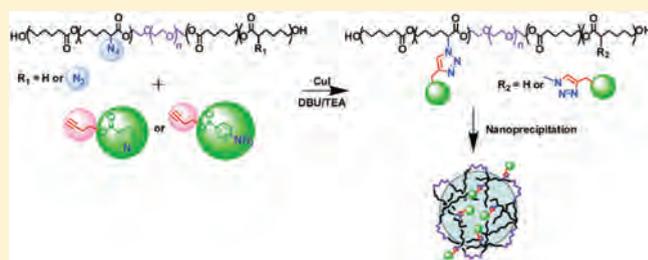
[‡]Department of Pharmaceutical Chemistry

Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

[§]Institute of Pharmaceutical Technology, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 9 (Biozentrum), D-60438 Frankfurt am Main, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: In this study, the grafting of nicotinic acid and *p*-aminobenzoic acid (PABA) onto poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) was performed by Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition, also known as click chemistry. Concentrations used for grafting were 0.10, 0.20, and 0.30 molar ratios with respect to caproyl units. The grafted copolymers were successfully obtained at all ratios as confirmed by NMR, GPC, and FT-IR. According to the DSC results, the polymorphisms of these grafted copolymers were mostly changed from semicrystalline to amorphous depending on the type and the amount of grafting compounds. TGA thermograms showed different thermal stabilities of the grafted copolymers compared to the original copolymers. Cytotoxicity results from HUVEC models suggested that the toxicity of grafted nanoparticles increased with the molar ratios of grafting units. Due to differences in molecular structure between nicotinic acid and PABA, physicochemical properties (particle size and surface charge) of grafted copolymer nanoparticles were substantially different. With increasing molar ratio of the grafting units, the particle size of blank nanoparticles tended to increase, resulting from an increase in the hydrophobic fragments of the grafted copolymer. Ibuprofen was chosen as a model drug to evaluate the interaction between grafted copolymers and loaded drug. After ibuprofen loading, the particle size of the loaded nanoparticles of both grafted copolymers increased compared to that of the blank nanoparticles. Significant differences in loading capacity between nicotinic acid and PABA grafted copolymer nanoparticles were clearly shown. This is most likely a result of different compatibility between each grafting compound and ibuprofen, including hydrogen bond interaction, π - π stacking interaction, and steric hindrance.



INTRODUCTION

Over the past decades, the fabrication of copolymers of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(ethylene glycol) (PEG) has been extensively developed to adapt their physicochemical and mechanical properties to much wider applications in pharmaceutical and medical fields.^{1–12} PCL is a semicrystalline, hydrophobic, and biodegradable polymer, while PEG exhibits hydrophilic, crystalline, nontoxic, and biocompatible polymer properties.¹³ The copolymer of these two materials can overcome the limitation of PCL after administration into the body by the stealth properties of the hydrophilic segment of PEG.¹⁴ Therefore, this copolymer contributes to improvement of both properties and applications. To develop biomaterials for their use for novel drug delivery systems, one of the methods involves modification of the polymers by the attachment of attractive functional groups. Several reports have established the attachment of various functional groups such as hydroxyl, amino, and carboxylic acid groups onto the main polymer chain by different

methods.¹⁵ However, the aforementioned processes frequently exhibit several drawbacks such as incomplete conversion,¹⁶ multiple synthesis steps,^{17,18} and intra- and intermolecular transesterifications during the process of attachment.¹⁹ Recently, the straightforward reaction for the grafting of functional groups along PCL has been successfully performed through “click chemistry” using versatile, easy, and mild conditions.^{20–22} Riva et al.²³ reported successful grafting of benzoate, triethyl ammonium bromide, and poly(ethylene oxide) on PCL backbone by this reaction. In addition, Lee et al.^{24,25} demonstrated the grafting of hexyne and proline to the methoxyPEG-*co*-PCL backbone and, recently, grafting of hexyne, decyne, and benzoate to the PEG-*co*-(PCL)₂ backbone. However, to the best of our knowledge, the grafting of pharmacologically active molecules along

Received: June 14, 2010

Revised: January 20, 2011

Published: March 04, 2011

the PCL-PEG-PCL backbone with various amounts of grafting units has not been established.

Most drugs on the market are sparingly water soluble principally due to the presence of heterocyclic and aromatic rings in their structures. Nicotinic acid and *p*-aminobenzoic acid (PABA) are two examples of sparingly water soluble drugs which have been investigated for their pharmacological actions and safety in biological systems.^{26–31} As per consideration of the structure of these two compounds, the *para*-amino group on the aromatic benzene ring of PABA contributes to the acidic, protic, and hydrogen bonding donor properties.^{32,33} The nitrogen atom in the pyridine ring of nicotinic acid, on the other hand, will serve as base and hydrogen bond acceptor. Previously, it was found that the different structures and properties of these two drugs affected the ease of the grafting reaction onto the PCL backbone and the properties of grafted copolymer.³⁴ From this finding, it is expected that similar effects would occur in the case of the amphiphilic PCL-PEG-PCL copolymer. Furthermore, the grafting compounds (herein referred to nicotinic acid and PABA) on the polymer may potentially influence nanoparticle formation and their properties, especially drug loading capacity and entrapment efficiency. In addition, it is of interest to investigate the contribution of interaction between the grafted copolymer and encapsulated drugs on drug loading capacity and entrapment efficiency.

Ibuprofen (IBU) is a common nonsteroidal anti-inflammatory drug that is being used worldwide. Its molecular structure consists of a phenyl ring, an alkyl group, and a carboxylic acid group. With the availability of its phenyl ring, IBU may form π – π bonds with other aromatic rings. In addition, a carboxylic group may form hydrogen bonds with both hydrogen bond donors and acceptors presented on the polymer backbone. Such properties make this drug suitable as a model drug for our investigation.

Therefore, this study aimed toward synthesizing the randomly grafted PCL-PEG-PCL with nicotinic acid and PABA by Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition reaction, also known as "click chemistry". The reaction was performed according to our previously published method.³⁴ The effects of varied concentrations of the grafting compounds on physicochemical and thermal properties of the copolymer backbone were also investigated. After synthesis, all grafted copolymers were used to prepare nanoparticles. To ascertain its potential use in humans, all nanoparticle preparations were tested for their cytotoxicity. Subsequently, the effects of the grafting compounds on nanoparticle formation and properties including particle size, zeta potential, and drug loading capacity were evaluated.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. ϵ -Caprolactone (CL; Aldrich, USA) was dried over calcium hydride for 48 h followed by distillation prior to use. *p*-Aminobenzoic acid (PABA) (Aldrich, USA) and nicotinic acid (Ajax Finechem, Australia) were used without purification. 3-Butyn-1-ol, copper (I) iodide (CuI), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), stannous (II) octanoate (Sn(Oct)₂), dimethylsulfoxide (DMSO), L-glutamine, and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals, USA. *N*, *N*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), and MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) were purchased from Fluka Chemie, Germany. α -Chloro- ϵ -caprolactone (CICL) was synthesized

according to the previous report.³⁴ Poly(ethylene glycol) (M_w 4000 g/mol, PEG₄₀₀₀) from Fluka Chemie, Germany, was purified by precipitation from chloroform solution with diethyl ether. Sodium azide was purchased from Fisher Scientific UK Limited, United Kingdom. Dichloromethane (CH₂Cl₂), diethyl ether, dimethylformamide (DMF), and tetrahydrofuran (THF) were dried over molecular sieve 4 Å. Milli-Q water was used by purification with a Synergy (Millipore, France). Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM) was obtained from Biochrom AG, Germany. Penicillin/streptomycin (Hoechst, Germany), sodium dodecyl sulfate (SDS) (MP Biochemicals, Germany), trypsin (Difco, Germany) and other organic solvents were used as received. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from human umbilical cord donated from Nord-west Krankenhaus (Nordwest Hospital, Germany). Acetonitrile and methanol were of HPLC grade from Merck, Germany. Glacial acetic acid (100%) was purchased from VWR International S.A.S., France.

Synthesis of PCL-co-PEG₄₀₀₀-co-PCL Grafted with Nicotinic Acid and PABA. *Synthesis of Nicotinic Acid and PABA, 3-Butynyl Esters.* Prior to the Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition, azide pendants on polymer and terminal alkyne derivatives of model compounds are generally required for functionalization. Thus, but-3-ynyl nicotinate and but-3-ynyl-4-aminobenzoate were synthesized by esterification of acidic model compounds, nicotinic acid and PABA, and 3-butyn-1-ol using DCC and DMAP as catalysts as previously reported.³⁴ Briefly, known amounts of DCC and DMAP were dissolved in CH₂Cl₂ followed by the addition of an acidic compound. After stirring at room temperature for 30 min, 3-butyn-1-ol was introduced, and the reaction was conducted under argon atmosphere at room temperature for 24 h. The precipitate was filtered out, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel with the mobile of hexane (Hex), ethyle acetate (EtOAc), and CH₂Cl₂ (1:2:2) for but-3-ynyl nicotinate and Hex and EtOAc (1:1) for but-3-ynyl-4-aminobenzoate. The characteristics of the synthesized derivatives were assigned to their structures and agreed well with the previous report.³⁴

But-3-ynyl nicotinate (1). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 2.65 (m, 2H, CH₂C≡CH), 2.86 (t, *J* = 2.61 Hz, 1H, C≡CH), 4.35 (t, *J* = 6.48 Hz, 2H, COCH₂), 7.57 (m, 1H, pyridine), 8.28 (td, *J* = 7.96 Hz, 1H, pyridine), 8.80 (s, 1H, pyridine), 9.08 (s, 1H, pyridine).

But-3-ynyl-4-aminobenzoate (2). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.04 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, C≡CH), 2.65 (td, *J* = 6.8, 2.6 Hz, 2H, CH₂C≡CH), 4.09 (s, 2H, NH₂), 4.38 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, COCH₂), 6.6 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, benzene), 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, benzene).

*Synthesis of P(CICL-*ran*-CL)-co-PEG₄₀₀₀-co-P(CICL-*ran*-CL) (P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL)).* The required amounts of CICL and CL (Table 1) were added to the mixture of PEG₄₀₀₀ (0.8 g, 0.2 mmol) and Sn(Oct)₂ (81 mg, 0.2 mmol) in a dried round-bottom flask. The mixture was melted at room temperature under vacuum for 15 min. The reaction was initiated in an oil bath at 120 °C under argon atmosphere and conducted for 24 h. The copolymer was collected and dried under vacuum after precipitation of chloroform solution in cold Hex.

*Synthesis of P(N₃CL-*ran*-CL)-co-PEG₄₀₀₀-co-P(N₃CL-*ran*-CL) (P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL)).* The substitution reaction of chloride pendant by sodium azide was performed as reported elsewhere.²³ Briefly, 5 mL of copolymer solution in dry DMF

Table 1. Fed Composition of Copolymerization of ClCL and CL

copolymers	fed molar ratio of [ClCL]	fed weight (g)	
		ClCL	CL
0.10 P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL)	0.10	0.29	2.05
0.20 P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL)	0.20	0.59	1.82
0.30 P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL)	0.30	0.89	1.60

containing 2.0 g of copolymer (1 equiv of chloride pendant) was stirred with sodium azide (1.02 equiv) overnight under argon atmosphere at room temperature in the dried flask. The mixture was dried under reduced pressure and redissolved in toluene to precipitate the coincident salt. The remaining precipitate was centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The collected supernatant was evaporated under reduced pressure to collect the purified copolymer.

Typical Click Chemistry Reaction. Using the reaction of copper-catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition, the 3-butyryl ester derivatives of nicotinic acid and PABA were grafted onto the P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) backbone at 0.10, 0.20, and 0.30 molar ratios based on caprolactone repeating units. The reaction was conducted according to our previous experiment.³⁴ Briefly, azide tethered amphiphilic copolymer solution (1.2 g, 1 equiv of azide) in 10 mL of dry THF was transferred into dried reaction flask followed by the ordered addition of butyryl ester derivative of model compound (1.5 equiv), CuI (0.2 equiv), and base (0.2 equiv). Under atmospheric argon, the reaction was stirred in a thermostated bath under temperature controlled at 40 °C. After 4 h reaction, the solution was precipitated in cold Hex and the collected copolymer was dried in a vacuum desiccator for another 24 h.

Polymer Characterization. *Typical Characterization Methods for Synthesis of Grafted Copolymers.* ¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ or DMSO-*d*₆ at 300 or 500 MHz in the FT mode with Bruker Avance 300 apparatus at 25 °C. Infrared spectra were recorded with Jasco FT-IR-4100 spectroscopy. Number- and weight-average molecular weights (*M*_n and *M*_w, respectively) were measured by a Waters 150-CV gel permeation chromatograph equipped with refractive index detector. THF was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. Two columns of PLgel 10 μm mixed B were calibrated with polystyrene standards in the MW range 4490–1 112 000 g/mol.

Thermal Property Analysis by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermal Gravimetric Analysis (TGA). TGA was carried out with a TGA 7 Perkin-Elmer thermogravimetric analyzer at 10 °C/min. DSC was performed using a DSC 7 Perkin-Elmer differential scanning calorimeter calibrated with indium. Glass transition and melting temperatures (*T*_g and *T*_m, respectively) were measured according to running conditions: the sample was quenched to -80 °C, heated to 100 °C (first heating), cooled down to -80 °C, and heated again to 100 °C (second heating). Thermograms were recorded during the second heating cycle at 20 °C/min.

Formation of Nanoparticles. Fifty milligrams of grafted copolymer were dissolved in 5 mL of THF. The polymer solution was added dropwise to 8 mL of Milli-Q water under magnetic stirring (1000 rpm) at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure. The final volume was adjusted by Milli-Q water to the initial volume. The nanoparticle suspension was filtered through a cellulose acetate membrane with a

pore size of 0.45 μm to eliminate any aggregates. One milliliter of nanoparticle suspension was poured into 2 mL vials. After lyophilization for 48 h, the weight of the lyophilized powder was recorded. In the case of IBU-loaded nanoparticles, 10 mg of drug was initially added with the copolymers in the THF solution, and the nanoparticles were prepared as previously described.

Characterization of Nanoparticles. *Particle Size and Zeta Potential Analysis.* The average particle diameter and size distribution of particles were analyzed by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Zetasizer 3000 HSA (Malvern, UK). The samples were measured after dilution with Milli-Q water. The surface charge of the nanoparticles was determined by zeta potential analysis with a Zetasizer 3000 HSA (Malvern, UK) after dilution in Milli-Q water. All measurements were performed with a HeNe laser at the wavelength of 633 nm, a 90° angle, and a temperature of 25 °C.

Cytotoxicity Testing of Nanoparticles. The cytotoxicity of grafted amphiphilic nanoparticles was evaluated by the MTT assay. HUVECs at passage 3–5 were cultured in IMDM solution supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 2% glutamine, 3% bicarbonate solution, 15% FBS, and 0.1% fibroblast growth factor. A 50 μL of cells suspension at a density of 3 × 10⁵ cells/mL was seeded in a 96-well plate and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. Afterward, 50 μL of culture medium containing the nanoparticle dispersion was added to yield the final concentration of nanoparticles in the range 0.01–1.56 mg/mL, and the cells were then incubated for another 24 h. Subsequently, the cells were incubated with MTT solution (25 μL) for 24 h. After an SDS solution was added and incubated for 6 h to dissolve the metabolized formazan crystal, the absorbance of solution was measured and recorded at 560 and 620 nm. The difference in absorbance was calculated and expressed as % cell viability. The cells incubated with only medium were used as cell control and defined as 100% cell viability.

Drug Loading and Entrapment Efficiency Evaluation. The nanoparticle suspension was centrifugally filtered at 16 000 rpm for 10 min through Microcon Ultracel YM-30 tube (MW cutoff 30 000 Da) (Millipore, USA). The amount of drug in the filtrate was analyzed by HPLC. The lyophilized powder was dissolved in the mobile phase and ultrasonicated for 30 min. The precipitate was centrifuged at 16 000 rpm for 10 min. The supernatant was collected for quantitative analysis by HPLC. The amount of drug entrapped in nanoparticles was calculated from the different amounts of drug found in the lyophilized powder and that in the filtrate. Drug loading (% DL) and entrapment efficiency (% EE) were calculated according to eqs 1 and 2 as follows:

$$\% \text{ Drug Loading} = \frac{\text{Amount of drug in lyophilized nanoparticles}}{\text{Amount of lyophilized nanoparticles}} \times 100 \quad (1)$$

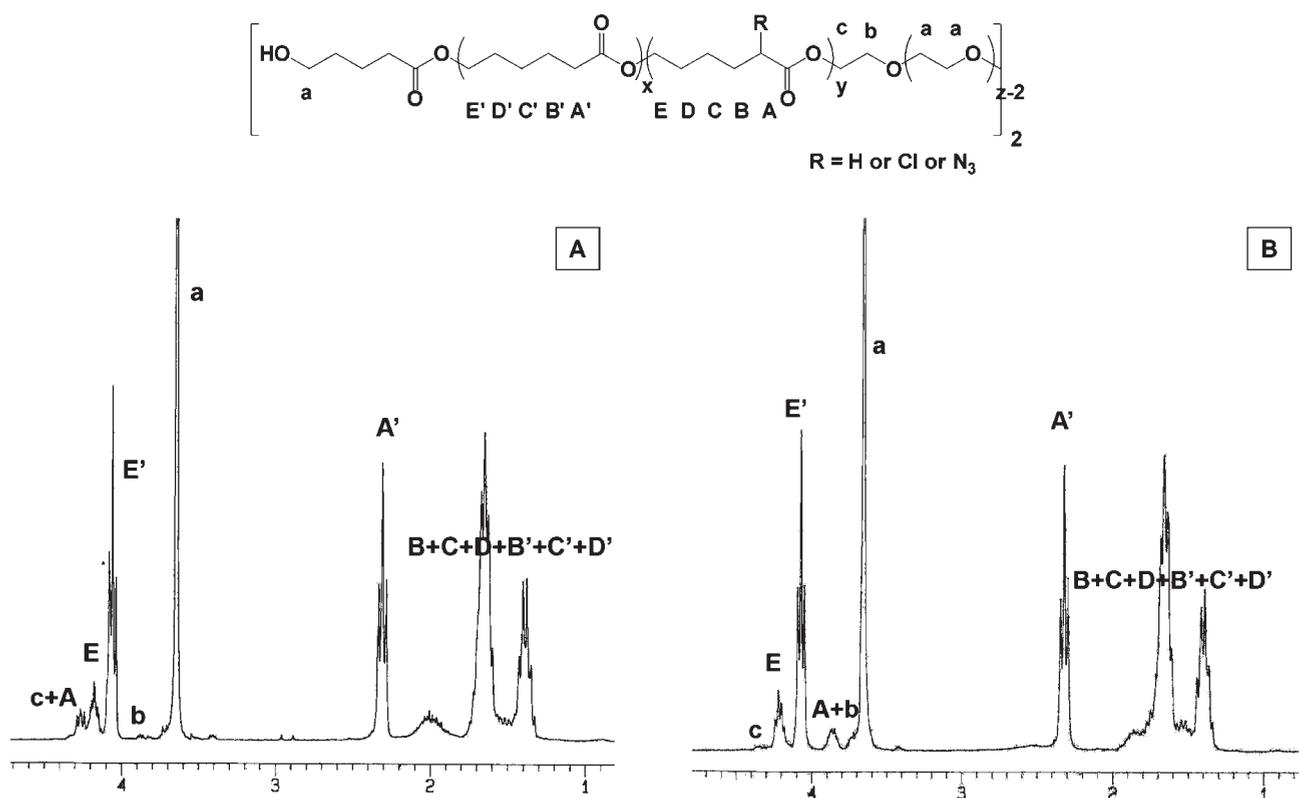


Figure 1. ^1H NMR spectra of P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL) (A) and P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) (B), respectively.

$$\begin{aligned} & \% \text{ Entrapment Efficiency} \\ &= \frac{\text{Amount of drug in lyophilized nanoparticles}}{\text{Initial amount of drug added}} \times 100 \end{aligned} \quad (2)$$

HPLC Measurement for Quantitative Analysis of Drug Loaded. IBU was quantitatively analyzed by HPLC (Shimadzu, Japan) consisting of an autoinjector SIL-10A (Shimadzu), a pump (Shimadzu LC-10AD), and a UV detector (Shimadzu SPD-10AV). This drug was eluted through a reverse-phase Hypersil ODS column, 5 μm particle size, 250 \times 4.6 mm (Thermo Scientific, USA) using the mixture of methanol: water: acetonitrile: acetic acid (35:55:10:1) as a mobile phase at a flow rate of 1.4 mL/min. The peak area was calculated at wavelength of 264 nm using a calibration curve over the range 2.5–40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Statistical Analysis. Results were recorded as mean \pm SD of at least three measurements. The one way ANOVA with the Scheffe test applied post hoc for paired comparisons was performed to compare multiple groups. All analyses were performed using the SPSS program (SPSS 13.0 for Windows), and differences were considered to be significant at a level of p -value < 0.05 .

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of P(CICLCL-*ran*-CL)-*co*-PEG₄₀₀₀-*co*-P(CICLCL-*ran*-CL) (P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL)). In order to graft the desired compounds on the PCL-PEG-PCL backbone, the chloride pending PCL-PEG-PCL was initially fabricated at the various ratios and further converted to the azide pending copolymer. P(CICLCL)-

PEG-P(CICLCL) at molar ratios of 0.10, 0.20, and 0.30 relative to caproyl unit was successfully fabricated by ring-opening polymerization using PEG₄₀₀₀ as an initiator and Sn(Oct)₂ as a catalyst (Scheme 1). The yield of all copolymers was higher than 80%. The M_n of the synthesized copolymers was calculated from the NMR spectrum (Figure 1A) according to eqs 3–6 as previously reported with some modification.^{5,55} The molar ratios of CICL units with respect to caproyl unit (F_{CICL}^a) and polymer chain (F_{CICL}^b) were calculated using eqs 7 and 8, respectively. All molecular parameters are listed in Table 2.

$$\begin{aligned} M_{n,\text{NMR}} &= M_{n,\text{CL}} + M_{n,\text{CICL}} + M_{n,\text{PEG}} \\ &= 114x + 148.5y + 44z \end{aligned} \quad (3)$$

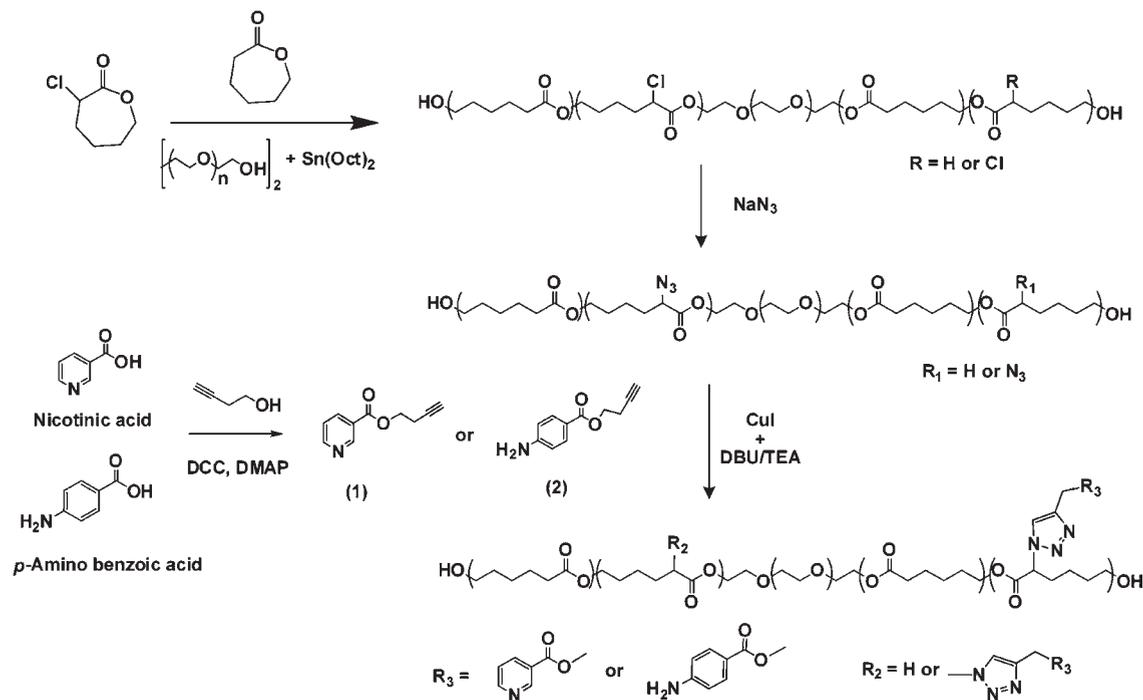
$$\frac{2(x-1)}{I_{A'}} = \frac{4}{I_b} \quad (4)$$

$$\frac{3(y-1) + 4}{(I_A + cEE' - I_{A'})} = \frac{4}{I_b} \quad (5)$$

$$\frac{4(z-2) + 4}{I_a} = \frac{4}{I_b} \quad (6)$$

$$F_{\text{CICL}}^a = \frac{\frac{1}{3} [I_A + cEE' - I_{A'} - I_b]}{\frac{1}{3} [I_A + cEE' - I_{A'} - I_b] + \frac{1}{2} I_{A'}} \quad (7)$$

Scheme 1. Typical Procedure for Grafting of Heterocyclic and Aromatic Model Drugs along PCL-PEG-PCL

Table 2. Molecular Characteristic Results of P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL) and P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) Copolymers

copolymers	$F^a_{\text{ClCL}} \text{ or } F^a_{\text{N}_3\text{CL}}$		$F^b_{\text{ClCL}} \text{ or } F^b_{\text{N}_3\text{CL}}$		% yield	$M_{n,\text{theo}}^d$	$M_{n,\text{NMR}}^c$	$M_{n,\text{GPC}}^e$	M_w/M_n^e	T_g (°C)	T_m (°C)
	calculated ^c	theoretical	calculated ^c	theoretical							
P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL)											
0.10P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL)	0.07	0.10	0.04	0.05	88.66	15745	16300	7437	1.8	- ^f	34
0.20P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL)	0.17	0.20	0.09	0.10	83.62	16090	15800	6466	2.0	-59	31
0.30P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL)	0.25	0.30	0.14	0.15	87.64	16435	15000	6748	1.8	-55	30
P(N ₃ CLCL)-PEG-P(N ₃ CLCL)											
0.10P(N ₃ CLCL)-PEG-P(N ₃ CLCL)	0.12	0.10	0.06	0.05	84.14	15810	15458	7014	1.8	- ^f	42
0.20P(N ₃ CLCL)-PEG-P(N ₃ CLCL)	0.21	0.20	0.11	0.10	78.78	16200	14200	5612	1.9	-51	42
0.30P(N ₃ CLCL)-PEG-P(N ₃ CLCL)	0.30	0.30	0.15	0.15	73.33	16630	12160	5721	1.8	-52	38

^a Molar ratio of ClCL or N₃CL units calculated based on caproyl unit. ^b Molar ratio of ClCL or N₃CL units calculated based on polymer backbone. ^c Determined by ¹H NMR spectroscopy. ^d $M_{n,\text{theo}} = \{([\text{CL}]/[\text{PEG}_{4000}]) \times 114\} + \{([\text{ClCL} \text{ or } \text{N}_3\text{CL}]/[\text{PEG}_{4000}]) \times M_{\text{ClCL} \text{ or } \text{N}_3\text{CL}}\} + M_{n,\text{PEG}_{4000}}$ (where [CL] and [ClCL or N₃CL] are the molar concentration of CL and ClCL or N₃CL, respectively. [PEG₄₀₀₀] is the molar concentration of PEG₄₀₀₀ (initiator), $M_{\text{ClCL} \text{ or } \text{N}_3\text{CL}}$ is the molecular weight of ClCL or N₃CL, respectively, and $M_{n,\text{PEG}_{4000}}$ is the number-average molecular weight of PEG₄₀₀₀). ^e Determined by GPC. ^f No peak observed.

$$F^b_{\text{ClCL}} = \frac{\frac{1}{3} [I_{A+cEE'} - I_{A'} - I_b]}{\frac{1}{3} [I_{A+cEE'} - I_{A'} - I_b] + \frac{1}{2} I_{A'} + \frac{1}{4} I_a} \quad (8)$$

where $I_{A'}$ is the integral of methylene proton of CL unit at 2.30 ppm, $I_{A+cEE'}$ is the integral of protons of ClCL unit in the range 4.00–4.25 ppm and methylene proton in PEG end unit at 4.23 ppm, I_a is the integral of methylene proton in PEG unit at 3.65 ppm, I_b is the integral of methylene proton in PEG end unit at 3.90 ppm, and x , y , and z are the corresponding repeating number of CL, ClCL, and PEG units, respectively.

From Table 2, the $M_{n,\text{NMR}}$ values of P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL) were in agreement with the theoretical values.

However, the $M_{n,\text{GPC}}$ values of the copolymers from GPC results were less than those from NMR. It could be attributed to the change in hydrodynamic volume of P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL) bearing hydrophilic and hydrophobic segments. Another reasonable explanation is that the molecular weight of this amphiphilic copolymer was calculated relative to the hydrophobic poly(styrene) standard whose intrinsic viscosity is tremendously different from that of this copolymer.^{36,37} However, the values of the molar ratios of substituted chloride (F^a_{ClCL} and F^b_{ClCL}) were consistent with the theoretical values (Table 2).

Synthesis of P(N₃CL-*ran*-CL)-*co*-PEG₄₀₀₀-*co*-P(N₃CL-*ran*-CL) (P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL)). P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) was obtained by the substitution reaction between P(ClCLCL)-PEG-P(ClCLCL) and sodium azide at room temperature prior to

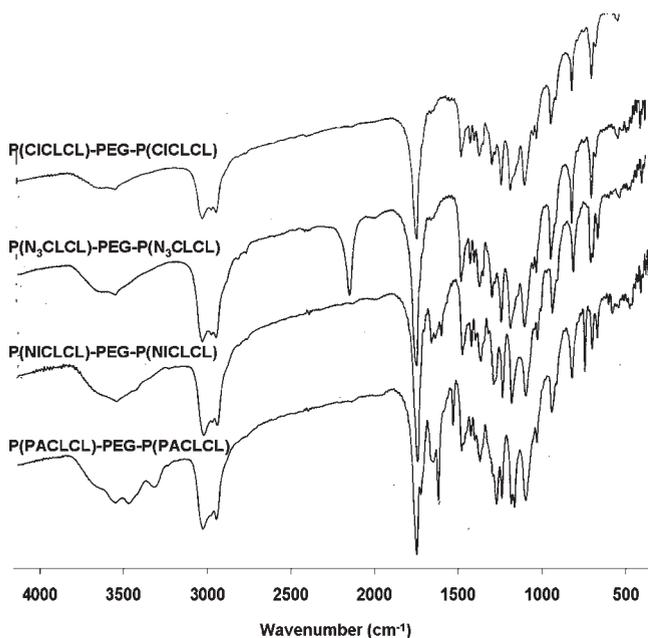


Figure 2. FT-IR spectra of P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) in the presence of DBU and P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) in the presence of TEA in comparison with P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL) and P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL).

grafting the selected molecules (Scheme 1). The conversion was complete after overnight reaction. As monitored by FT-IR, the characteristic peak of azide at 2100 cm⁻¹ was apparent (Figure 2). ¹H NMR spectrum (Figure 1B) confirmed the complete conversion as seen by the entire disappearance of methyne proton peak (CHCl) at 4.25 ppm and the presence of azide peak (CHN₃) at 3.85 ppm. The M_n of P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) was calculated from the NMR spectrum (Figure 1B) according to eqs 9–12 as previously reported with some modification.^{5,23,35} The molar ratios relative to caproyl unit ($F^a_{N_3CL}$) and polymer backbone ($F^b_{N_3CL}$) were calculated according to eqs 13 and 14, respectively. The other molecular parameters are illustrated in Table 2.

$$\begin{aligned} M_{n,NMR} &= M_{n,CL} + M_{n,N_3CL} + M_{n,PEG} \\ &= 114x + 155y + 44z \end{aligned} \quad (9)$$

$$\frac{2(x-1)}{I_{A'}} = \frac{4}{I_c} \quad (10)$$

$$\frac{(y-1) + 4}{I_{A+b}} = \frac{4}{I_c} \quad (11)$$

$$\frac{4(z-2) + 4}{I_a} = \frac{4}{I_c} \quad (12)$$

$$F^a_{N_3CL} = \frac{(I_{A+b} - I_c)}{(I_{A+b} - I_c) + \frac{1}{2}I_{A'}} \quad (13)$$

$$F^b_{N_3CL} = \frac{(I_{A+b} - I_c)}{(I_{A+b} - I_c) + \frac{1}{2}I_{A'} + \frac{1}{4}I_a} \quad (14)$$

where $I_{A'}$ is the integral of methylene proton of CL unit at 2.30 ppm, I_{A+b} is the integral of methyne proton of N₃CL unit at 3.85 ppm and methylene proton in PEG end unit at 3.90 ppm, I_a is the integral of methylene proton in PEG unit at 3.65 ppm, I_c is the integral of methylene proton in PEG end unit at 4.23 ppm, and x , y , and z are the corresponding repeating number of CL, N₃CL, and PEG units, respectively.

The $M_{n,NMR}$ values of P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) were in agreement with the theoretical values. However, $M_{n,GPC}$ was lower than $M_{n,NMR}$ as previously discussed for P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL). The molecular weight of P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) was decreased as compared to P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL) due to a consequence of the hydrodynamic volume change in the substitution of chloride by azide.²³ The molar ratios of substituted azide ($F^a_{N_3CL}$ and $F^b_{N_3CL}$) agreed well with the theoretical values. The % conversion of chloride to azide was almost 100% indicating the completeness and feasibility of the reaction.

Grafting of Model Compounds along P(N₃CL-*ran*-CL)-*co*-PEG₄₀₀₀-*co*-P(N₃CL-*ran*-CL) by Click Reaction. The 3-butynyl ester derivatives of two model compounds (nicotinic acid and PABA) were attached onto the backbone through copper-catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition reaction using CuI and DBU as catalysts at 40 °C for 4 h (Scheme 1). The FT-IR spectra confirmed the conversion as the azide peak at 2100 cm⁻¹ completely disappeared, while the presence of triazole peak at 1610 cm⁻¹ was observed (Figure 2). Additionally, the characteristic peak of azide (CHN₃) at 3.85 ppm in NMR spectrum also disappeared and the methyne proton peak of triazole ring was observed at 7.70 ppm (Figure 3). From the NMR spectrum, the molar ratios of the grafting model compound based on the caproyl unit and polymer chain ($F^a_{\text{grafted-CL}}$ and $F^b_{\text{grafted-CL}}$, respectively) were calculated from the integration of the methyne proton of the grafted CL unit at 5.30 ppm (I_A , Figure 3) and the methylene proton of CL unit at 2.30 ppm (I_D , Figure 3) according to eqs 15 and 16, respectively.

$$F^a_{\text{grafted-CL}} = \frac{I_A}{\frac{1}{2}I_D + I_A} \quad (15)$$

$$F^b_{\text{grafted-CL}} = \frac{I_A}{\frac{1}{2}I_D + I_A + \frac{1}{4}I_H} \quad (16)$$

The calculation of grafting efficiency was made by the molar ratios of N₃CL unit and grafting unit using the characteristic methyne protons close to azide at 3.85 ppm and triazole ring at 5.30 ppm in the NMR spectra, respectively. Under this condition, the grafting efficiency of all copolymers was in the range 73–85%, depending on the type and amount of grafting compounds. In addition, the grafting molar ratios ($F^a_{\text{grafted-CL}}$ and $F^b_{\text{grafted-CL}}$) were in agreement with the theoretical values (Table 3).

Nicotinic Acid (P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL)). The grafting of nicotinic acid (heterocyclic model compound) also was achieved. In addition to the apparent characteristic peak of triazole (Figure 3A), the peak of methyne proton close to azide at 3.85 ppm disappeared totally, and a peak at 5.30 ppm corresponding to the peak of methyne proton of caproyl unit adjacent to triazole ring was observed. The peaks at 7.45, 8.30, 8.70, and 9.25 ppm were assigned as the characteristic peaks of the proton in the pyridine ring of the

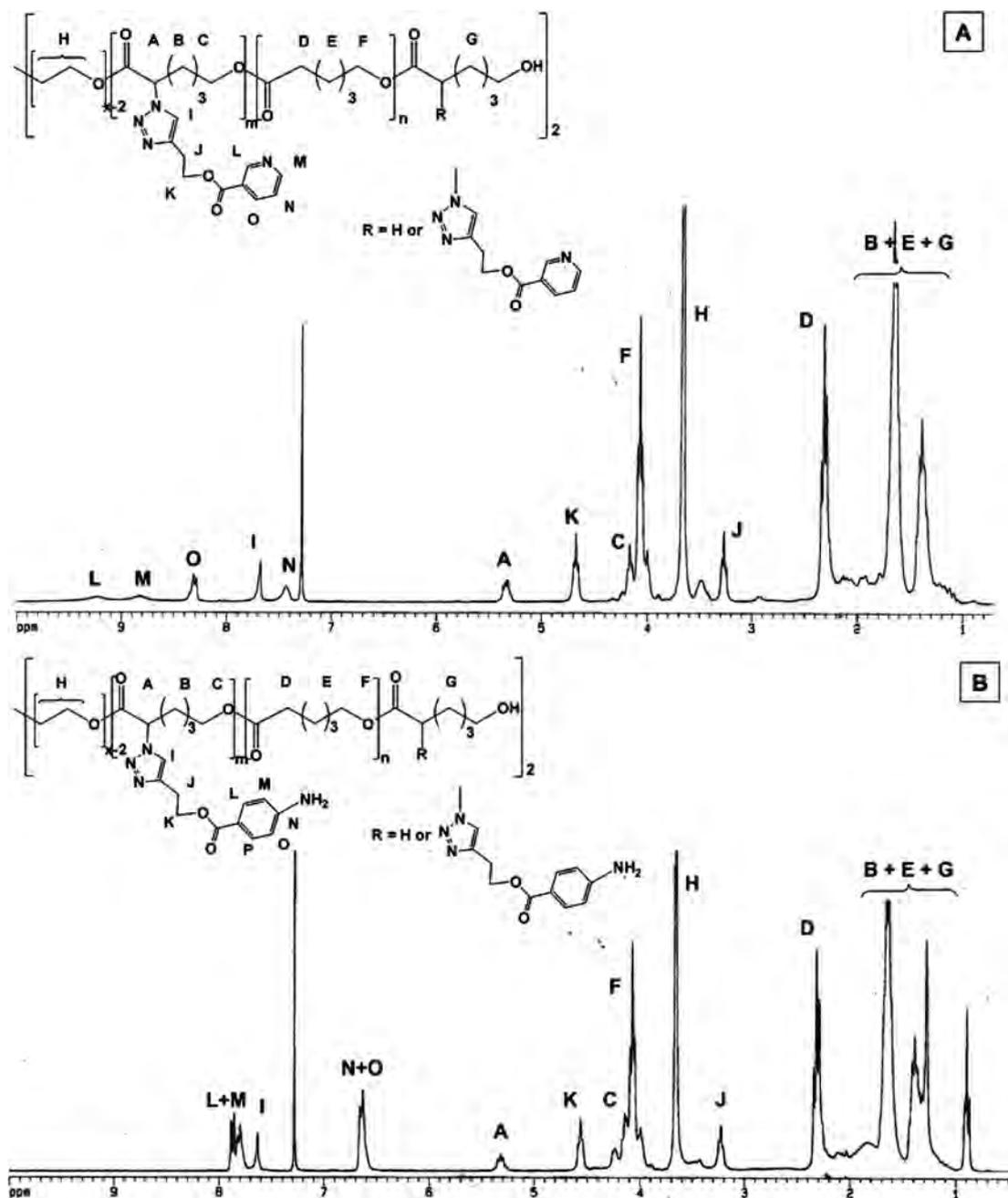


Figure 3. ^1H NMR spectra of P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) (A) and P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) (B) using DBU and TEA as base, respectively.

nicotinic acid molecule. Moreover, $\text{C}=\text{C}$ stretching at 1590 cm^{-1} and $\text{C}=\text{N}$ stretching at 1625 cm^{-1} were observed and contributed to the overlapping between the triazole and the pyridine ring of nicotinic acid (Figure 2). From $M_{n,\text{GPC}}$ values (Table 3), the molecular weight of the grafted copolymers was increased as compared to those of P(N_3CLCL)-PEG-P(N_3CLCL) (Table 2). The molecular weight distribution was narrower than those of the original polymers. The GPC chromatograms of most grafted copolymers (Figure 4A) revealed a unimodal peak indicating no degradation of the polymer chain. However, the GPC chromatogram of **0.30P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL)** showed a small shoulder peak which may suggest slight degradation.

PABA (P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL)). On the basis of our previous study,³⁴ it was notable that the aniline group induces the

chain degradation under this condition, particularly that in presence of the strong base, DBU, leading to an occurrence of intra- and intermolecular transesterifications. In addition, in the case of hydroxyl group of propargyl alcohol,²³ the resulting grafted copolymers underwent a chain degradation when using DBU as base in the reaction. The extent of degradation appeared to be less with the use of triethylamine (TEA) instead of DBU. Therefore, TEA was used in this study for the grafting of PABA. Similarly to the grafting of nicotinic acid, the reaction was complete after 4 h under this condition. This successful approach could be visualized by the presence of the characteristic methyne proton of the triazole ring at 7.65 ppm and the benzene ring of PABA at 6.65 and 7.85 ppm, respectively (Figure 3B). In addition, the FT-IR spectrum showed the peaks of N–H

Table 3. Molecular Characteristic Results of P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) and P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) Copolymers and Nanoparticles

grafted copolymers ^a	$F^b_{\text{grafted-CL}}$		$F^c_{\text{grafted-CL}}$		$M^e_{n, \text{GPC}}$	M_n/M_w^e	T_g (°C)	T_m (°C)	size (nm)	polydispersity index (PDI)	zeta potential (mV)	
	calculated ^d	theoretical	calculated ^d	theoretical								
P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL)												
0.10P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL)	0.09	0.10	0.04	0.05	11981	1.6	-50	40	77 ± 10	0.192 ± 0.032	-9.6 ± 1.3	
0.20P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL)	0.17	0.20	0.09	0.10	6435	1.7	-47	39	82 ± 8	0.104 ± 0.024	-5.9 ± 1.4	
0.30P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL)	0.25	0.30	0.12	0.15	5807	1.6	-43	32	120 ± 25	0.099 ± 0.023	-17.3 ± 2.0	
P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL)												
0.10P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL)	0.08	0.10	0.04	0.05	10211	1.5	-34	37	194 ± 37	0.208 ± 0.075	-12.3 ± 1.5	
0.20P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL)	0.16	0.20	0.09	0.10	9948	1.7	-25	^f	129 ± 2	0.276 ± 0.006	-11.8 ± 1.4	
0.30P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL)	0.28	0.30	0.13	0.15	9269	1.4	-22	^f	148 ± 27	0.210 ± 0.009	-10.8 ± 0.8	

^a Abbreviations: NI = nicotinic acid, PA = PABA. ^b Molar ratio of grafting unit calculated based on carboxyl unit. ^c Molar ratio of grafting unit calculated based on polymer backbone. ^d Determined by ¹H NMR spectroscopy. ^e Determined by GPC. ^f No peak observed.

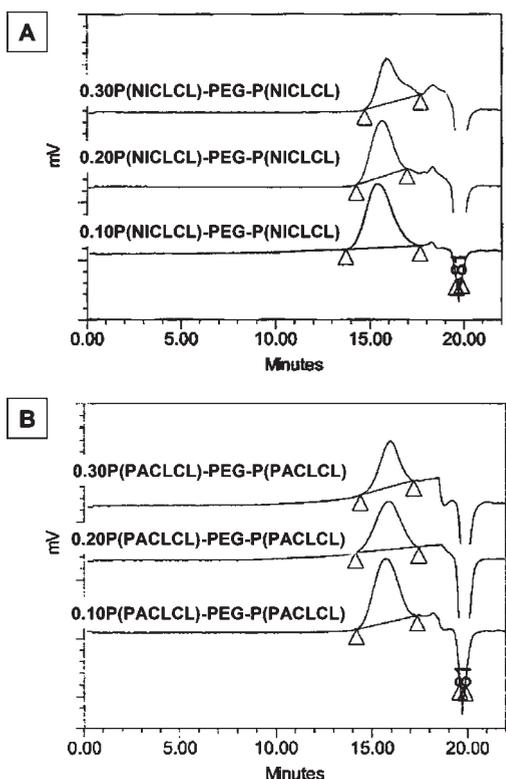


Figure 4. GPC chromatograms of P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) (A) using DBU as base and P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) (B) using TEA as base, respectively.

stretching at 3400 cm^{-1} and $\text{C}=\text{O}$ stretching at 1725 cm^{-1} of PABA. The peaks of $\text{C}=\text{N}$ stretching at 1626 cm^{-1} of the triazole ring and $\text{C}=\text{O}$ stretching at 1725 cm^{-1} of the polyester polymer were also observed (Figure 2). At 0.10 and 0.20 molar ratios, the PABA grafted copolymers showed no degradation similar to the

nicotinic acid grafted copolymers as supported by increasing $M_{n, \text{GPC}}$ values and narrowing molecular weight distribution (Table 3). Unlike the nicotinic acid grafted copolymers at 0.30 molar ratios, the PABA grafted copolymers showed no degradation as seen from the unimodal peak in the GPC chromatogram (Figure 4B).

Thermal Properties of Copolymers and Grafted Copolymers. The thermal properties of the grafted copolymers were evaluated by DSC and TGA because these properties may affect the rate of drug release from the polymeric carriers. The T_g and T_m values of all copolymers are illustrated in Tables 2 and 3. As shown in Table 2, the T_g values of P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) and P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL) tended to increase as compared to those of the unsubstituted copolymer (PCL-PEG-PCL, $T_g \approx -60\text{ }^\circ\text{C}$ ³⁸). In the case of T_m , both chloride- and azide-substituted copolymers revealed a lower T_m than that of the unsubstituted material (PCL-PEG-PCL, $T_m \approx 55\text{ }^\circ\text{C}$ ³⁸). With increasing percent substitution, a trend in reduction of T_m values was observed. However, P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL) provided a higher melting temperature than those of P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL) at all ratios.

In the case of grafting nicotinic acid (heterocyclic model) and PABA (aromatic model) (Table 3), T_g was also recorded for all grafted copolymers. Both grafting model compounds showed an effect on thermal properties. Particularly with the grafting PABA, this effect was more pronounced than the grafting with nicotinic acid at all ratios. The heterocyclic compound yielded a lower T_g than the aromatic model, and T_g increased when the number of grafting units increased in both cases. In the case of the melting point, T_m of the nicotinic acid grafted copolymers decreased gradually with increasing number of grafting units. On the contrary, at 0.20 and 0.30 molar ratios of PABA, it did not yield a T_m indicating that PABA had more influence on crystallinity of the polymer backbone than the nicotinic acid at the same ratio. From the results, it can be concluded that grafting heterocyclic and aromatic models reduced the crystallinity of polymer. This might

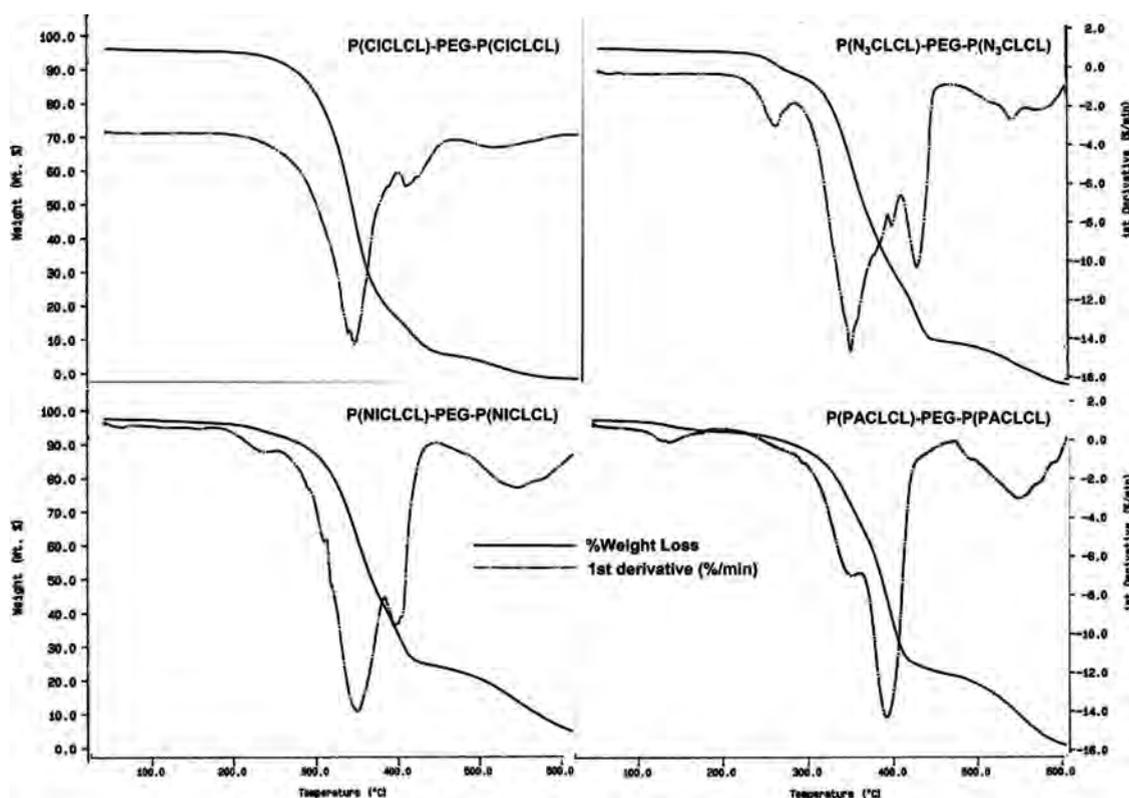


Figure 5. Thermal gravimetric diagrams of P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL), P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL), and P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) using DBU as base, and P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) using TEA as base, respectively.

be due to the fact that the sterically hindered molecule interrupted the orientation of the polymer chain and thus restricted the crystallization of polymer chain. The reduction of the crystallinity may affect the permeability of drug through the matrix of copolymer when forming the micro- and nanoparticulate systems.

The thermal stability of the grafted amphiphilic copolymers depends on the intrinsic properties of the materials, which is essential for practical use. To investigate the thermal degradation of the grafted copolymers, a TGA analysis was performed (Figure 5). It was found that P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL) initially underwent thermal degradation at 250 °C similar to the degradation of poly(CICL)³⁹ and had the inflection point at around 330 °C. The main degradation pattern was similar to PCL-PEG-PCL as previously reported by Gou et al.¹ However, a small peak of degradation at 400 °C was observed which may be attributed to the decomposition of the PEG segment at this high temperature.³⁷ Therefore, CICL and CL were randomly copolymerized, since only one inflection point was detected in the main degradation curve. In the case of P(N₃CLCL)-PEG-P(N₃CLCL), the first step was attributed to the initial rupture of azide (N–N₂) starting at the temperature around 200 °C.^{40,41} The last two steps of thermal decomposition were observed similar to those of P(CICLCL)-PEG-P(CICLCL). According to the thermograms of heterocyclic and aromatic grafted PCL-PEG-PCL, the small degradation peaks were observed at 240 °C for P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) and 140 °C for P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) with respect to about 9.4% and 6.5%, respectively. These results were consistent with the molar ratio of grafting unit along the whole polymer backbone. The first step degradation was supposed to be a consequence of the

decomposition of grafting units. The main degradation peaks of grafted copolymers were observed at different temperatures, which were around 340 and 490 °C for P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) and P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL), respectively, depending on the composition of copolymer. The last pattern of thermal degradation was typically detected corresponding to the degradation of PEG segment. However, further details are required to ascertain the underlying mechanism.

From these results, it can be concluded that grafting could change the polymer backbone from the semicrystalline to amorphous form, thus altering the thermal properties. With an increase in the molar ratios of grafting units, the copolymers became more amorphous. In addition, the grafting molecules affected the thermal stability of the copolymer.

Nanoparticle Formation with Grafted Amphiphilic Copolymers. Nanoparticles were prepared from heterocyclic and aromatic models grafted copolymers, and the effect of the different properties of the grafted copolymer on nanoparticle formation was studied. It was found that all nanoparticles prepared from P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) were significantly smaller than those from P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) (Table 3 and Figure 6). With both grafting compounds, the particle size of nanoparticles increased with increasing amounts of grafting units (p -value < 0.05) except for 0.10P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL), whereas the size distribution tended to be smaller for P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) (p -value > 0.05). Indeed, it has been stated in general that the hydrophobic domain of amphiphilic copolymers has an effect on the formation of nanoparticles and micelles.^{42–44} As the hydrophobic portion of the polymer chain increased, the size of particles became larger. In this study, the grafting heterocyclic ring of nicotinic acid

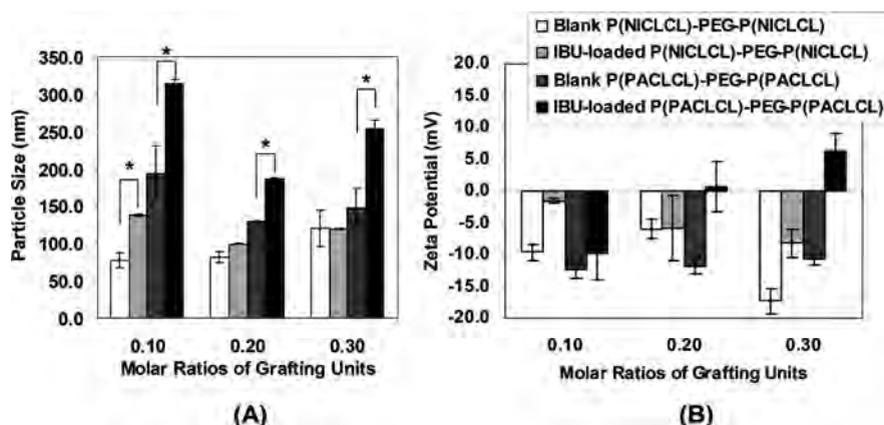


Figure 6. Particle size (A) and zeta potential (B) of blank and IBU-loaded nanoparticles ($*p$ -value < 0.05).

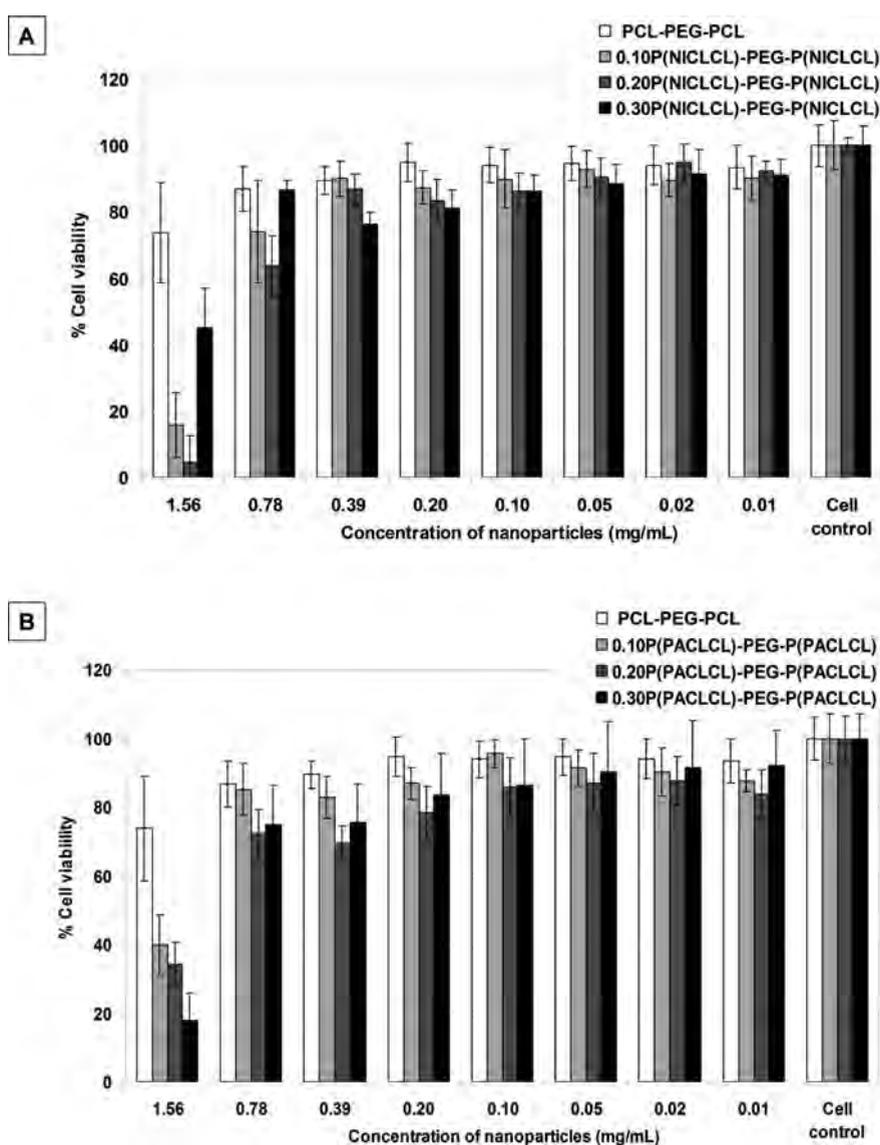


Figure 7. Cytotoxicity results of P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) and P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) nanoparticles at all molar ratios of grafting units compared to PCL-PEG-PCL nanoparticles.

and aromatic ring of PABA increased hydrophobicity of the polymer chain. In the case of 0.10P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL),

the larger particles were observed owing to secondary aggregation. It has been stated that the secondary aggregates were a

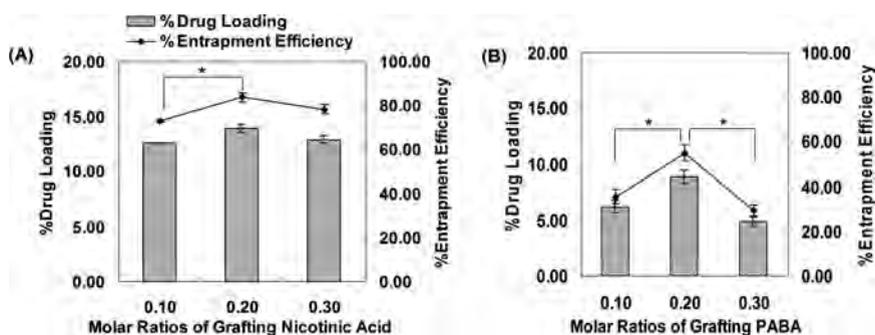


Figure 8. % Drug loading (column) and % entrapment efficiency (diamond) after incorporation with IBU into P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) (A) and P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) (B) nanoparticles (**p*-value < 0.05).

consequence of hydrophobic–hydrophobic or van der Waals interactions between exposed cores from hydrophobic fragments of randomly grafted copolymer. Once the exposed cores are in close contact with water, they aggregate to large particles.^{45,46} This could be confirmed by the bimodal peak observed in the PCS size distribution curve based on volume, whereas a unimodal peak was observed in the PCS size distribution curve based on intensity. The particle size shown in Table 3 was based on the intensity of the scattering light; therefore, the particle size of 0.10P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) was the average diameter of two groups referring to individual nanoparticles and the secondary aggregates.

Considering the surface charge of nanoparticles (Table 3 and Figure 6), all nanoparticles of grafted copolymers showed more negative charge on their surface compared to the PCL-PEG-PCL nanoparticles which had a charge of almost zero (data not shown). This could be due to some grafted material present on the outer surface of the nanoparticles.

Cytotoxicity of Nanoparticles. To ascertain the safety of the grafted copolymers, all grafted copolymers were tested for their cytotoxicity using HUVECs. In order to avoid the use of organic solvents, the self-assembled nanoparticles were prepared and tested for their toxicity. These results are presented in Figure 7. It was observed that the PCL-PEG-PCL nanoparticles were toxic to HUVECs at the concentration of 1.56 mg/mL. The cytotoxic concentrations of 0.10P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) and 0.10P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) nanoparticles were found at 0.78 and 1.56 mg/mL, respectively. The increasing molar ratios of grafting nicotinic acid and PABA decreased the toxic concentration. The percent cell viability of 0.30P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) at 0.78 mg/mL was higher than that at 0.39 mg/mL probably due to the variations in cells. From the results, it can be deduced that 0.10P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) nanoparticles showed a similar toxicity compared to the PCL-PEG-PCL nanoparticles, whereas 0.10P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL) nanoparticles showed a higher toxicity to HUVECs. In addition, the toxicity of the grafted nanoparticles increased when the molar ratios of grafting units increased.

IBU-Loaded Grafted Amphiphilic Nanoparticles. As stated earlier, the different structure between heterocyclic and aromatic models may affect the drug entrapment efficacy of the nanoparticles. In the present study, IBU was chosen as a model drug to investigate the effect of different structures and amount of grafting compounds on the loading efficiency of these nanoparticles. After encapsulation of drug in nanoparticles, the particle sizes of all grafted nanoparticles became larger as compared to the blank nanoparticles except for 0.30P(NICLCL)-PEG-

P(NICLCL) nanoparticles, for which the change in particle size was not significant (*p*-value > 0.05) (Figure 6A).

Concerning the efficiency of these carriers (Figure 8), the percentages of drug loading (% DL) and drug-entrapment (% EE) were evaluated. At all ratios of P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL), the amount of IBU loaded into the nanoparticles was significantly higher than that into the nanoparticles prepared from P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) (*p*-value < 0.05). This result could be explained by the interaction between drug and grafting compounds of polymer. As mentioned previously, both nicotinic acid and PABA possibly interact with loaded drug by either π – π stacking interaction or hydrogen bonding. In the case of π – π stacking interaction from the aromatic ring, the extent of electron delocalization in the aromatic ring is in the following order: aniline of PABA > benzene of IBU > pyridine of nicotinic acid. The amino group of PABA mesomerically donates electrons to benzene ring, which is more predominant than electron withdrawal by the inductive effect of the nitrogen atom. Meanwhile, the nitrogen atom in the pyridine ring of nicotinic acid profoundly withdraws electrons leading to the localization of the electron in the pyridine ring and then showing a stronger basic effect. According to this fact, this π – π stacking interaction in terms of electron charge transfer may be slightly involved because the benzene ring of IBU acts as an electron donor to the pyridine ring of nicotinic acid but as an electron acceptor for the aniline ring of PABA. Finally, the benzene ring of IBU can likely be in contact in planar formation with the aromatic ring of each compound.⁴⁷ In the case of hydrogen bonding, a hydroxyl group of carboxylic acid of IBU is more active than a carbonyl group due to the electron resonance between both groups of carboxylic acid of IBU. Thus, the carboxylic acid of IBU acts as a hydrogen bond donor rather than as an acceptor. By comparison of the pyridine ring of nicotinic acid and the aniline group of PABA with regard to the carboxylic acid of IBU, the hydrogen bonding thus predominantly occurs between the hydrogen bond donor of carboxylic acid of IBU and the hydrogen bond acceptor of the nitrogen atom in the pyridine. From the FT-IR results, it indicated that IBU formed hydrogen bonds with the pyridine ring of nicotinic acid grafted on the copolymer (data not shown). On the other hand, this bonding between IBU and PABA did not occur, since the amino group of PABA could donate electrons to the benzene ring indicating that it acted as a hydrogen bond donor. According to the proposed interaction between drug and copolymer, it was expected that % DL and % EE should increase with the molar ratios of grafting units. From the results, it was found that % DL and % EE increased with the increasing molar ratios of grafting units (*p*-value < 0.05) except for 0.30 molar

ratios of grafting units. The similar reduction in % DL and % EE of both nicotinic acid and PABA grafting at 0.30 molar ratios was observed probably because the steric hindrance of the grafting unit at 0.30 molar ratio might limit the drug encapsulation.

Regarding the zeta potential of the prepared nanoparticles (Figure 6B), it was found that the loaded nanoparticles displayed smaller zeta potential values to those of the blank nanoparticles. For all grafting of P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL), increasing the molar ratios of grafting units led to less negative zeta potentials of the loaded nanoparticles. In contrast, at 0.20 and 0.30 molar ratios of P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL), the reversal of the charges to positive was observed. It is well-known that the zeta potential can be employed as an overall charge measured at the shear plane of the particles. It is affected by the molecules surrounding the surface of particles, which may deposit directly on the outer particle surface or be present in the water closely to this surface. Therefore, the decrease in zeta potential might be caused by solubilized IBU in water, since the solubility of IBU is pH-dependent.⁴⁸ At the pH of Milli-Q water (~6.0–6.5), IBU dissolves in ionized form (solubility at pH 6.0 = 0.23 mg/mL⁴⁸) in the dispersion medium. Due to the lower drug encapsulation of the drug-loaded P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) nanoparticles, the ionized IBU might be more available in the dispersion medium compared to that of P(NICLCL)-PEG-P(NICLCL). Therefore, more ionized molecules, especially protons of ionized IBU, might surround the surface of P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) nanoparticles and consequently led to the positive charge of the loaded nanoparticles at 0.30 molar ratio of grafting units.

CONCLUSIONS

The modification of grafting heterocyclic and aromatic models (nicotinic acid and PABA) along PCL-PEG-PCL with various molar ratios of grafting units was successfully achieved through copper-catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition. The difference in the molecular structure of grafting compounds influenced the feasibility of the grafting reaction and the physicochemical and thermal properties of the copolymers. In addition, the nanoparticles prepared from the grafting compounds exhibited different characteristics in terms of particle size, surface charge, drug loading capacity, and entrapment efficiency depending on the different interaction between the grafting compounds and drug molecules. The toxicity study of grafted nanoparticles demonstrated the safety of the grafted nanoparticles at 0.10 molar ratios of grafting units up to the concentration of 0.78 mg/mL. The toxicity of grafted nanoparticles increased with the molar ratios of grafting units. According to the present study, it can be concluded that the grafting of interesting compounds onto biodegradable polymers could modify the physicochemical and thermal properties of the copolymer and also the characteristics of nanoparticles including particle size, surface properties, and drug loading capacity.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. PCS size distribution curves of blank and IBU-loaded P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) nanoparticles based on intensity and volume. Scanning electron microscopy photograph of blank 0.10P(PACLCL)-PEG-P(PACLCL) nanoparticles. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*To whom correspondence should be addressed. Tel/Fax: +66-2-644-8694, E-mail: pyvbp@mahidol.ac.th (Varaporn Buraphacheep Junyaprasert).

ACKNOWLEDGMENT

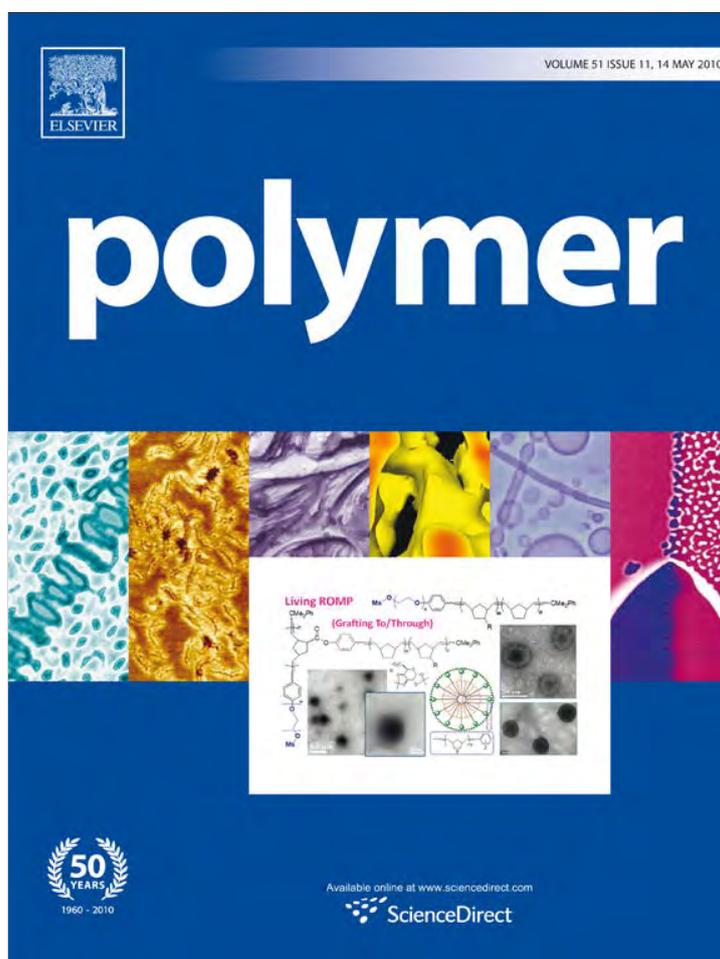
Financial supports from the Thailand Research Fund (TRF) through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (grant no. PHD/0189/2547) and the Thai Research Fund and Commission of Higher Education, Thailand, for the research funding (RMU5180019) are gratefully acknowledged. The authors are very pleased to acknowledge the National Metal and Materials Technology Center (MTEC, Pathumthani, Thailand) for the GPC experiment. The authors thank Denise Klassert, Ph.D. student, Frankfurter Stiftung für Krebskranke Kinder, Frankfurt am Main, Germany, for assistance with the cytotoxicity study and Assist. Prof. Dr. Surakit Nathisuwan, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Thailand, for his useful suggestions.

REFERENCES

- (1) Gou, M.; Qian, Z.; Wang, H.; Tang, Y.; Huang, M.; Kan, B.; Wen, Y.; Dai, M.; Li, X.; Gong, C.; and Tu, M. (2008) Preparation and characterization of magnetic poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19, 1033–1041.
- (2) Vroman, B.; Mazza, M.; Fernandez, M. R.; Jerome, R.; and Preat, V. (2007) Copolymers of ϵ -caprolactone and quaternized ϵ -caprolactone as gene carriers. *J. Controlled Release* 118, 136–44.
- (3) Park, E. K.; Kim, S. Y.; Lee, S. B.; and Lee, Y. M. (2005) Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *J. Controlled Release* 109, 158–168.
- (4) Huang, M. J.; Gou, M. L.; Qian, Z. Y.; Dai, M.; Li, X. Y.; Cao, M.; Wang, K.; Zhao, J.; Yang, J. L.; Lu, Y.; Tu, M. J.; and Wei, Y. Q. (2008) One-step preparation of poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for plasmid DNA delivery. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 86A, 979–986.
- (5) Liu, C. B.; Gong, C. Y.; Huang, M. J.; Wang, J. W.; Pan, Y. F.; Zhang, Y. D.; Li, G. Z.; Gou, M. L.; Wang, K.; Tu, M. J.; Wei, Y. Q.; and Qian, Z. Y. (2008) Thermoreversible gel-sol behavior of biodegradable PCL-PEG-PCL triblock copolymer in aqueous solutions. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 84, 165–75.
- (6) Vroman, B.; Ferreira, I.; Jerome, C.; Jerome, R.; and Preat, V. (2007) PEGylated quaternized copolymer/DNA complexes for gene delivery. *Int. J. Pharm.* 344, 88–95.
- (7) Li, R.; Li, X.; Xie, L.; Ding, D.; Hu, Y.; Qian, X.; Yu, L.; Ding, Y.; Jiang, X.; and Liu, B. (2009) Preparation and evaluation of PEG-PCL nanoparticles for local tetradrine delivery. *Int. J. Pharm.* 379, 158–166.
- (8) Lee, J. S.; Go, D. H.; Bae, J. W.; Jung, I. K.; Lee, J. W.; and Park, K. D. (2007) Synthesis and characterization of heparin conjugated Tetricon-PCL copolymer for protein drug delivery. *Curr. Appl. Phys.* 7S1, e49–52.
- (9) Remant Bahadur, K.; Bhattarai, S.; Aryal, S.; Khil, M.; Dharmaraj, N.; and Kim, H. (2007) Novel amphiphilic triblock copolymer based on PPDO, PCL, and PEG: Synthesis, characterization, and aqueous dispersion. *Colloids Surf., A* 292, 69–78.
- (10) Zhou, S.; Deng, X.; and Yang, H. (2003) Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system. *Biomaterials* 24, 3563–3570.

- (11) Peng, C.-L., Shieh, M.-J., Tsai, M.-H., Chang, C.-C., and Lai, P.-S. (2008) Self-assembled star-shaped chlorin-core poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) diblock copolymer micelles for dual chemo-photodynamic therapies. *Biomaterials* 29, 3599–3608.
- (12) Zhang, Y., Tang, L., Sun, L., Bao, J., Song, C., Huang, L., Liu, K., Tian, Y., Tian, G., Li, Z., Sun, H., and Mei, L. (2010) A novel paclitaxel-loaded poly(ϵ -caprolactone)/Ploxamer 188 blend nanoparticle overcoming multidrug resistance for cancer treatment. *Acta Biomater.* 6, 2045–2052.
- (13) Wei, X., Gong, C., Gou, M., Fu, S., Guo, Q., Shi, S., Luo, F., Guo, G., Qiu, L., and Qian, Z. (2009) Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 381, 1–18.
- (14) Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., and Benoit, J.-P. (2006) Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27, 4356–4373.
- (15) Trollsas, M., Lee, V. Y., Mecerreyes, D., Lowenhielm, P., Moller, M., Miller, R. D., and Hedrick, J. (2000) Hydrophilic aliphatic polyesters: Design, synthesis, and ring-opening polymerization of functional cyclic esters. *Macromolecules* 33, 4619–4627.
- (16) Rieger, J., Bustele, K. V., Lecomte, P., Detrembleur, C., Jérôme, R., and Jérôme, C. (2005) Versatile functionalization and grafting of poly(ϵ -caprolactone) by Michael-type addition. *Chem. Commun.* 274–276.
- (17) Lecomte, P., Riva, R., Schmeits, S., Rieger, J., Butsele, K. V., Jérôme, C., and Jérôme, R. (2006) New prospects for the grafting of functional groups onto aliphatic polyesters. Ring-opening polymerization of α - or γ -substituted ϵ -caprolactone followed by chemical derivatization of the substituents. *Macromol. Symp.* 240, 157–165.
- (18) Pitt, C. G., Gu, Z.-W., Ingram, P., and Hendren, R. W. (1987) The synthesis of biodegradable polymers with functional side chains. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 25, 955–966.
- (19) Riva, R., Lenoir, S., Jérôme, R., and Lecomte, P. (2005) Functionalization of poly(ϵ -caprolactone) by pendant hydroxyl, carboxylic acid and epoxide groups by atom transfer radical addition. *Polymer* 46, 8511–8518.
- (20) Lutz, J.-F., and Zarafshani, Z. (2008) Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne “click” chemistry. *Adv. Drug Delivery Rev.* 60, 958–970.
- (21) Vsevolod, V. R., Luke, G. G., Valery, V. F., and Sharpless, K. B. (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 41, 2596–2599.
- (22) Hein, C. D., Liu, X. M., and Wang, D. (2008) Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm. Res.* 25, 2216–30.
- (23) Riva, R., Schmeits, S., Jérôme, C., Jérôme, R., and Lecomte, P. (2007) Combination of ring-opening polymerization and “Click Chemistry”: Toward functionalization and grafting of poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecules* 40, 796–803.
- (24) Lee, R.-S., and Huang, Y.-T. (2008) Synthesis and characterization of amphiphilic block-graft MPEG-*b*-(P α N₃CL-*g*-alkyne) degradable copolymers by ring-opening polymerization and click chemistry. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 46, 4320–4331.
- (25) Lee, R.-S., and Huang, Y.-T. (2009) Synthesis and characterization of amphiphilic triblock-graft PEG-(*b*-P α N₃CL-*g*-Alkyne)₂ degradable copolymers. *J. Polym. Res.*
- (26) Safeer, R. S., and Lacivita, C. L. (2000) Choosing drug therapy for patients with hyperlipidemia. *Am. Fam. Physician* 61, 3371–3382.
- (27) Pahan, K. (2006) Lipid-lowering drugs. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1165–1178.
- (28) Farmer, J. (2009) Nicotinic acid: A new look at an old drug. *Curr. Arterioscler. Rep* 11, 87–92.
- (29) Iinuma, I., Uyama, S., Uenoyama, K., and Sakaguchi, T. (1961) PABA (*p*-aminobenzoic acid) as a possible therapeutic agent for glaucoma. I. *Nippon Ganka Gakkaizasshi* 65, 1463–1467.
- (30) Jakobsen, J., Pedersen, A. N., and Ovesen, L. (2003) Para-aminobenzoic acid (PABA) used as a marker for completeness of 24 h urine: effects of age and dosage scheduling. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 138–142.
- (31) Bingham, S., and Cummings, J. H. (1983) The use of 4-aminobenzoic acid as a marker to validate the completeness of 24 h urine collections in man. *Clin. Sci. (London)* 64, 629–35.
- (32) (1983) *p*-Aminobenzoic acid, in *The Merck Index* (Windholz, M., and Budavari, S., Eds.) pp 62–3, Merck & Co., Inc., New Jersey.
- (33) Kern, C. J., Antoshkiv, T., and Maiese, M. R. (2002) *p*-Aminobenzoic acid and its sodium salt. *Anal. Chem.* 20, 919–922.
- (34) Suksiriworapong, J., Sripha, K., and Junyaprasert, V. B. (2010) Synthesis and characterization of bioactive molecules grafted on poly(ϵ -caprolactone) by “click” chemistry. *Polymer* 51, 2286–2295.
- (35) Huang, M. J., Gou, M. L., Qian, Z. Y., Dai, M., Li, X. Y., Cao, M., Wang, K., Zhao, J., Yang, J. L., Lu, Y., Tu, M. J., and Wei, Y. Q. (2007) One-step preparation of poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for plasmid DNA delivery. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 86A, 979–986.
- (36) Lucke, A., Teßmar, J., Schnell, E., Schmeer, G., and Göpferich, A. (2000) Biodegradable poly(D,L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. *Biomaterials* 21, 2361–2370.
- (37) Zhang, Y., Wang, C., Yang, W., Shi, B., and Fu, S. (2005) Tri-component diblock copolymers of poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone-co-lactide): Synthesis, characterization and loading camptothecin. *Colloid Polym. Sci.* 283, 1246–1252.
- (38) Bogdanov, B., Vidts, A., Van Den Buicke, A., Verbeeck, R., and Schacht, E. (1998) Synthesis and thermal properties of poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) copolymers. *Polymer* 39, 1631–1636.
- (39) Lenoir, S., Riva, R., Lou, X., Detrembleur, C., Jérôme, R., and Lecomte, P. (2004) Ring-opening polymerization of α -chloro- ϵ -caprolactone and chemical modification of poly(α -chloro- ϵ -caprolactone) by atom transfer radical processes. *Macromolecules* 37, 4055–4061.
- (40) Fazlİoglu, H., and Hacaloglu, J. (2002) Thermal decomposition of glycidyl azide polymer by direct insertion probe mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 63, 327–338.
- (41) Ero, M. S., and Güven, O. (1996) Thermal decomposition of poly(glycidyl azide) as studied by high-temperature FTIR and thermogravimetry. *J. Appl. Polym. Sci.* 61, 201–206.
- (42) Jones, M.-C., and Leroux, J.-C. (1999) Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48, 101–111.
- (43) Zhang, N., Guo, S. R., Li, H. Q., Liu, L., Li, Z. H., and Gu, J. R. (2006) Synthesis of three types of amphiphilic poly(ethylene glycol)-*block*-poly(sebacic anhydride) copolymers and studies of their micellar solutions. *Macromol. Chem. Phys.* 207, 1359–1367.
- (44) Shin, G. I., Kim, Y. S., Lee, M. Y., Cho, S. C., and Kiel, Y. S. (1998) Methoxy poly(ethylene glycol)/ ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin.: I. Preparation and characterization. *J. Controlled Release* 51, 1–11.
- (45) Allen, C., Maysinger, D., and Eisenberg, A. (1999) Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surf., B* 16, 3–27.
- (46) La, S. B., Okano, T., and Kataoka, K. (1996) Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(β -benzyl L-aspartate) block copolymer micelles. *J. Pharm. Sci.* 85, 85–90.
- (47) Gung, B. W., Wekesa, F., and Barnes, C. L. (2008) Stacking interactions between nitrogen-containing six-membered heterocyclic aromatic rings and substituted benzene: Studies in solution and in the solid state. *J. Org. Chem.* 73, 1803–1808.
- (48) Jiang, B., Hu, L., Gao, C., and Shen, J. (2005) Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a co-precipitation method and their release properties. *Int. J. Pharm.* 304, 220–230.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

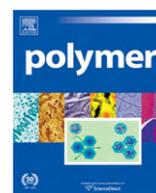


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Synthesis and characterization of bioactive molecules grafted on poly(ϵ -caprolactone) by “click” chemistry

Jiraphong Suksiriworapong^a, Kittisak Sripha^{b,*}, Varaporn Buraphacheep Junyaprasert^a

^a Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^b Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2009

Received in revised form

18 March 2010

Accepted 21 March 2010

Available online 27 March 2010

Keywords:

Bioactive molecules

Poly(ϵ -caprolactone)

Click chemistry

ABSTRACT

A facile and efficient strategy to graft bioactive molecules (nicotinic acid, *p*-aminobenzoic acid, and phthaloyltryptophan) onto poly(ϵ -caprolactone) (P(ϵ CL)) was achieved by copper-catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition known as click reaction. P(α Cl ϵ CL), with 10, 20, and 30% of α -chloro- ϵ -caprolactone (α Cl ϵ CL) units were copolymerized by ring opening polymerization using ϵ CL and α Cl ϵ CL as starting materials in the presence of 1,4-butanediol and Sn(Oct)₂. Subsequently, the chloride pendent was converted to azide followed by cycloaddition with terminal alkyne derivatives of the aforementioned bioactive molecules. The complete addition was accomplished at all ratios. The characteristic molecular features of these copolymers were evaluated by FTIR, NMR, and GPC. Thermal analysis data indicated that the grafted compounds led to polymorphic alteration and different pattern of thermal degradation depending on the molecular structure and the size of the grafted compounds. They are the basis for further development of grafted copolymer as drug delivery carriers.

Crown Copyright © 2010 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past decades, research on grafting bioactive molecules onto biodegradable polymer backbones has gained much interest to augment the efficacy of medical and pharmaceutical applications including drug delivery systems, tissue engineering, and medical devices. Various methods have been used to modify biomaterials for drug delivery. In general, drugs or attractive functional groups may be conjugated to polymers [1–6]. But the amount of the conjugated drug is limited since only one drug molecule or group can adhere at one-side of the polymer chain. The other approach is accomplished by substitution of functional groups such as hydroxyl, amino, and carboxylic acid along the polymer backbone. Although this method seems promising, the protic functional groups lead to intra- and intermolecular transesterification resulting in chain degradation and uncontrolled molecular weight [7].

The polyesters poly(lactide), poly(glycolide), and poly(ϵ -caprolactone) are considered polymers with attractive properties, i.e., biodegradable, biocompatible and environmental friendly properties. Poly(ϵ -caprolactone) (P(ϵ CL)) has been synthesized and functionalized to enhance its attractive properties. Several methods have been proposed to graft functional groups along the P(ϵ CL)

backbone; however, they often encountered limitations such as incomplete conversion [8] or multiple step synthesis [9,10]. Recently, it was reported on the possibility of grafting of functional groups along the P(ϵ CL) through Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition, known as “click chemistry” [11]. This reaction has gained much attention due to its feasible, easy, and mild conditions. Riva et al. [12–14] and Lee et al. [15] demonstrated that small functional groups (i.e., benzoate, triethyl ammonium bromide, hexyne, and proline) and macromolecules (such as Poly(ethylene oxide) (PEO)) could be successfully grafted onto the polymer backbone by the click reaction. In addition, the ligands could be easily conjugated along the polymer backbone with various amounts of grafting units. Although a number of attempts have been made to attach either functional groups or drug molecules on polymer backbones, only a few studies are found concerned with the attachment of drugs onto polyester backbones, in particular onto P(ϵ CL) [16,17].

Therefore the pharmacologically bioactive compounds nicotinic acid, *p*-aminobenzoic acid (PABA) and phthaloyltryptophan [18–25], shown in Fig. 1, were chosen as model compounds for grafting on P(ϵ CL) to evaluate possible interactions between drug molecule and the polymer during the grafting reaction and to compare the physicochemical properties of the resulting copolymers. Contrasting PABA with nicotinic acid, the pendent amino group of PABA in para position is a protic functional group with basic character acting as hydrogen bond donor; however, it exhibits an acidic property according to its pKa (4.65 and 4.8) [26,27]. The

* Corresponding author. Tel./fax: +66 2 644 8677.
E-mail address: pyksp@mahidol.ac.th (K. Sripha).

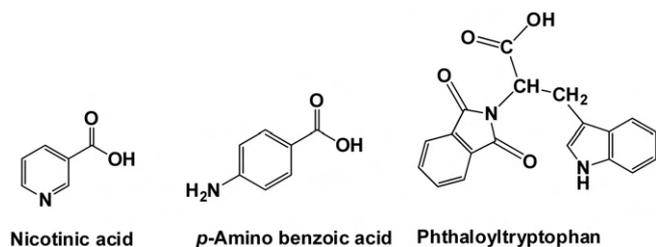


Fig. 1. Structure of bioactive model compounds used in the current study.

nitrogen atom of the nicotinic pyridine ring on the contrary is solely a hydrogen bond acceptor providing a pair of unshared electrons with basic character. These differences in molecular properties may influence the grafting reaction and affect drug loading and the release characteristic. In addition, the homo- and heteroaromatic rings of these two molecules can display aromatic π -stacking interaction with other loaded drugs in nanoparticles made of these copolymers. The third model drug, phthaloyltryptophan, was selected as an example of a large bioactive compound the bulky structure of which may have steric effects in contrast to the former two drugs.

To the best of our knowledge, there is so far no report on the engrafting of these three bioactive molecules (nicotinic acid, PABA, and phthaloyltryptophan) on P(ϵ CL) by click reaction. Therefore, the aim of this work was to study the synthesis of novel engrafted P(ϵ CL) with these compounds by Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition, and to evaluate its limitation as well as to compare the differing molecular properties of the grafted copolymers including their thermal properties in ratio to their composition.

2. Experimental section

2.1. Materials

ϵ -Caprolactone (ϵ CL; Aldrich) was dried over CaH_2 for 48 h followed by distillation prior to use. PABA (Aldrich), nicotinic acid (Ajax Finechem), and L-tryptophan (Fluka) were used without any purification. 1,4-Butanediol, 3-butyne-1-ol, α -chlorocyclohexanone, *N*-carboxyphthalimide, copper (I) iodide (CuI), 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-ene (DBU), and stannous (II) octanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) were obtained from Aldrich Chemicals. *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), and *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA, 70%) were purchased from Fluka. Sodium azide was purchased from Asia Pacific Specialty Chemicals Limited. Dichloromethane (CH_2Cl_2), dimethylformamide (DMF), and tetrahydrofuran (THF) were dried over molecular sieve 4 Å overnight. All other organic solvents were used as received.

2.2. Phthaloylation of tryptophan

The amino group of tryptophan was reacted with *N*-carboxyphthalimide according to [28,29]. Briefly, to anhydrous sodium carbonate (0.52 g, 4.90 mmol) dissolved in 10 mL of water was added tryptophan (0.50 g, 2.45 mmol) under stirring. After complete dissolution, *N*-carboxyphthalimide (0.59 g, 2.69 mmol) was introduced into the reaction flask. The reaction mixture was further stirred for 2 h at room temperature and then extracted twice with ethyl acetate. The aqueous layer was acidified to pH 2–3 with 1 N hydrochloric acid solution and extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over anhydrous magnesium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure after filtration. The residue is then purified

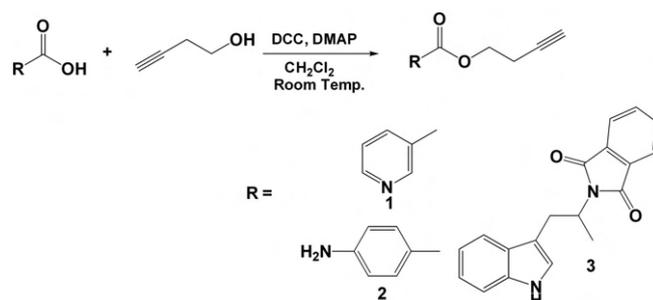


Fig. 2. Esterification of bioactive molecules with 3-butyne-1-ol using coupling reaction (1 = but-3-ynyl nicotinate, 2 = but-3-ynyl 4-aminobenzoate, and 3 = 3-(2-*N*-phthalimido-2-(prop-2-ynyl acetyl)ethyl)indole).

by column chromatography on silica gel using a mixture of ethyl acetate (EtOAc), hexane (Hex), and glacial acetic acid (CH_3COOH) (4:1:0.01) as mobile phase. The collected fraction was twice extracted with purified water to eliminate residual acetic acid. The organic layer was then dried again over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and evaporated under reduced pressure to yield a yellow solid (0.8 g, 98%); m.p. 172.3 °C; TLC R_f = 0.13 (silica gel, EtOAc:Hex: CH_3COOH /4:1:0.01); FTIR (KBr) ν (cm^{-1}) 3408, 3056, 2928, 1774, 1710, 1391, 1104, 1071, 718; ^1H NMR (CDCl_3): δ = 3.80 (m, 2H, CH_2CH), 5.35 (m, 1H, CH_2CH), 7.02 (s, 1H, indole), 7.17 (m, 1H, indole), 7.27 (d, 1H, indole), 7.62 (s, 1H, indole), 7.65 (m, 2H, phthaloyl), 7.75 (m, 2H, phthaloyl), 8.03 (s, 1H, NH); MS (EI, 70 eV) m/z (rel int) 335 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ and 357 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; Anal. Calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 68.26; H, 4.22; N, 8.38; O, 19.14. Found: C, 68.03; H, 4.18; N, 8.29; O, 19.50.

2.3. General procedure for esterification with 3-butyne-1-ol (Fig. 2)

The required amounts of DCC and DMAP were dissolved in (CH_2Cl_2) in a reaction flask. An acidic model compound was added and stirred at room temperature for 30 min 3-Butyn-1-ol was charged through a dried stainless steel syringe under argon atmosphere. The reaction was conducted at room temperature for 24 h. After filtration of the precipitate, the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was then purified by column chromatography on silica gel.

2.3.1. Synthesis of but-3-ynyl nicotinate (1)

Nicotinic acid (5.0 g, 40.6 mmol), 3.4 g (48.8 mmol) of 3-butyne-1-ol, 12.6 g (61.0 mmol) of DCC, and 7.4 g (61.0 mmol) of DMAP gave according to 2.3 an off-white solid. Purified compound 1 (5.9 g, 83%) was obtained through column chromatography on silica gel with the mobile phase of Hex, EtOAc, and CH_2Cl_2 (1:2:2); m.p. 46.43 °C TLC with R_f = 0.50, FTIR (KBr) ν (cm^{-1}): 3264, 2926, 2850, 2119, 1718;

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 2.65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.86 (t, J = 2.61 Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.35 (t, J = 6.48 Hz, 2H, COCH_2), 7.57 (m, 1H, pyridine), 8.28 (td, J = 7.96 Hz, 1H, pyridine), 8.80 (s, 1H, pyridine), 9.08 (s, 1H, pyridine);

Table 1
Fed compositions of copolymerization of $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ and ϵCL .

Copolymers	Fed Weight (g)		Fed Mole (mmol)	
	$\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$	ϵCL	$\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$	ϵCL
P(ϵCL)	–	2.28	–	20
P(10 $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ -90 ϵCL)	0.29	2.05	2	18
P(20 $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ -80 ϵCL)	0.59	1.82	4	16
P(30 $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ -70 ϵCL)	0.89	1.60	6	14

^{13}C NMR (DMSO- d_6): $\delta = 18.3$ ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 62.8 (OCH_2C), 72.5 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 80.6 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 123.9 (CHCHCHCCO in pyridine), 125.5 (pyridine-CO), 136.8 (CHCHCHCCO in pyridine), 149.9 (NCHCCO in pyridine), 153.7 (CHNCHCCO in pyridine), 164.5 ($\text{C}=\text{O}$).

2.3.2. Synthesis of but-3-ynyl 4-aminobenzoate (2)

PABA (5 g, 36.5 mmol), 3.1 g (43.8 mmol) of 3-butyne-1-ol, 9.0 g (43.8 mmol) of DCC, and 5.3 g (43.8 mmol) of DMAP gave according to 2.3 an off-white solid. Purified compound 2 (4.5 g, 65%) was obtained through column chromatography on silica gel with the mobile phase of Hex and EtOAc (1:1) still as an off-white solid, m.p. 82.34 °C, TLC with $R_f = 0.326$, FTIR (KBr) ν (cm^{-1}): 3398, 3336, 3288, 1685, 1599;

^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.04$ (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.65 (td, $J = 6.8, 2.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.09 (s, 2H, NH_2), 4.38 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, COCH_2), 6.6 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, benzene), 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, benzene);

^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 19.1$ ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 62.0 (OCH_2C), 69.8 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 80.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 113.7 (2C, benzene), 119.2 (benzene-CO), 131.6 (2C, benzene), 151.0 (benzene- NH_2), 166.3 ($\text{C}=\text{O}$).

2.3.3. Synthesis of 3(2-N-phthalimido-2-(prop-2-ynyl acetyl) ethyl)indole (3)

Phthalyltryptophan (4.7 g, 14.0 mmol), 1.2 g (16.9 mmol) of 3-butyne-1-ol, 4.4 g (21.1 mmol) of DCC, and 2.6 g (21.1 mmol) of DMAP gave according to 2.3 compound 3 (3.8 g, 70%) as a yellow solid after column chromatography on silica gel with the mobile phase of EtOAc, Hex and CH_2Cl_2 (1:2:3), m.p. 97.17 °C, TLC with $R_f = 0.60$, FTIR (KBr) ν (cm^{-1}): 3411, 3270, 2120, 1777, 1738, 1714;

^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 1.85$ (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, CHCH_2 -indole), 4.70 (m, 2H, OCH_2CH_2), 5.30 (m, 1H, Phthaloyl- CHCH_2 -indole), 7.00 (s, 1H, CHNH in indole), 7.07 (td, $J = 7.04, 1.06$ Hz, 1H, indole), 7.14 (td, $J = 8.07, 1.1$ Hz, 1H, indole), 7.27 (dd, $J = 8.09, 0.68$ Hz, 1H, indole), 7.62 (s, 1H, indole), 7.64 (m, 2H, phthaloyl), 7.75 (m, 2H, phthaloyl), 8.12 (s, 1H, NH);

^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 18.8$ ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 24.7 (CHCH_2 -indole), 52.6 (phthaloyl- CHCOO), 63.2 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2$), 70.0 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 79.5 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 110.8 (indole), 111.1 (indole), 118.4 (indole), 119.4 (indole), 122.0 (indole), 122.6 (indole), 123.3 (2C, phthaloyl), 127.1 (indole),

131.6 (2C, phthaloyl), 134.0 (2C, phthaloyl), 136.0 (indole), 167.5 (2C, phthaloyl), 168.9 (CHCOO).

2.4. Synthesis of α -chloro- ϵ -caprolactone ($\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$)

The $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ monomer was synthesized according to the method of Lenoir et al. [30] with modification. Briefly, to 12.5 g of *m*CPBA (50.7 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 were added 5 g of α -chlorocyclohexanone (37.7 mmol) into the reaction flask. The reaction was conducted at room temperature for 48 h and then cooled down to -20 °C to precipitate the white by-product which was removed by filtration. The filtrate was washed twice both with saturated sodium dithionite solution and with saturated sodium bicarbonate solution, and finally with water. Subsequently, the filtrate was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. Finally, the concentrated organic layer was purified by column chromatography on silica gel with the mobile phase Hex and EtOAc (1:3) yielding $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ (3.9 g, 70%); TLC $R_f = 0.35$;

^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 1.85$ (m, 3H), 2.15 (m, 3H), 4.25 (m, 1H, COOCH_2), 4.65 (m, 1H, COOCH_2), 4.80 (dd, $J_d = 2.03$ and 7.77 Hz, 1H, CHCl).

2.5. Synthesis of $P(\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}-ran-\epsilon\text{CL})$

All glassware was dried in an oven overnight before use. The amounts of $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$, and ϵCL (see Table 1), 18 mg of 1,4-butanediol (0.2 mmol), and 81 mg of $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (0.2 mmol) were weighed into the reaction flask, which was evacuated for 15 min followed by purging with argon gas. Then the flask was immersed in an oil bath at 120 °C. After 6 h of polymerization, the copolymer was recovered by precipitation in cold Hex and finally dried in vacuo for 24 h.

In case of $P(\epsilon\text{CL})$ synthesis according 2.5, the homopolymerization of ϵCL (2.28 g) was initiated with 18 mg of 1,4-butanediol and catalyzed by 81 mg of $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

2.6. Synthesis of $P(\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}-ran-\epsilon\text{CL})$

The azide substitution to $P(\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}-ran-\epsilon\text{CL})$ was performed according to Riva et al. [12]. Briefly, to 2 g of $P(\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}-ran-\epsilon\text{CL})$ (1

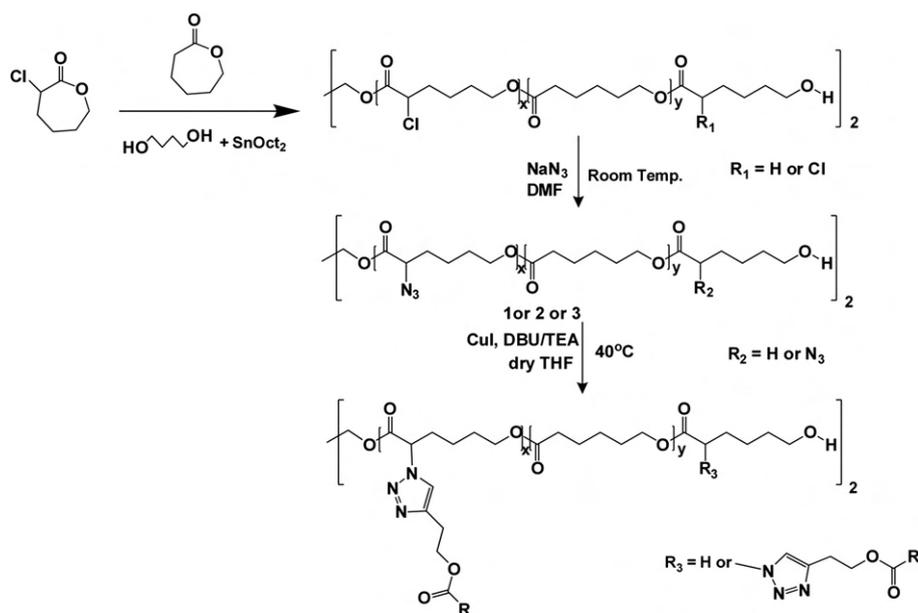


Fig. 3. General scheme for the synthesis of bioactive molecules grafted $P(\epsilon\text{CL})$. TEA as base was used for the synthesis of $P(\text{PABA-g-}\epsilon\text{CL})\text{-ran-}\epsilon\text{CL}$.

equiv of $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ dissolved in 5 mL DMF in a flask was added sodium azide (1.02 equiv). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. DMF was then completely evaporated under reduced pressure and the polymeric residue dissolved in toluene. The insoluble salt was centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The clear supernatant was evaporated under reduced pressure resulting in the dry copolymer $P(\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}\text{-ran-}\epsilon\text{CL})$.

2.7. Typical click chemistry reaction

Grafting of bioactive model compounds to $P(\epsilon\text{CL})$ backbone was carried out according to literature [12] with some modification. Briefly, 200 mg of $P(\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}\text{-ran-}\epsilon\text{CL})$ (1 equiv of azide) was weighed into a reaction flask containing 5 mL of dry THF. Butynyl-ester derivative of model compound (1, 2, or 3) (1.5 equiv), CuI (0.2 equiv), and base (0.2 equiv) were then loaded into the flask. Under atmospheric argon, the reaction was conducted at 40 °C in a thermostatic bath for 4 h. The grafted copolymer was precipitated in cold Hex and dried in vacuo overnight before characterization.

2.8. Characterizations

^1H NMR spectra were recorded in CDCl_3 or $\text{DMSO-}d_6$ at 300 or 500 MHz, ^{13}C NMR spectra in CDCl_3 or $\text{DMSO-}d_6$ at 75.45 MHz in the FT mode with Bruker Avance 300 apparatus at 25 °C. Infrared spectra were recorded with Jasco FT/IR-4100 spectrophotometer. Number- and weight-average molecular weights (M_n and M_w , respectively) were measured by a Waters 150-CV gel-permeation chromatograph equipped with refractive index detector. THF was used as a mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. Two columns of PLgel 10 μm mixed B were calibrated with polystyrene standards in the range of MW between 4490 and 1,112,000 g/mol. Thermal gravimetric analysis (TGA) was carried out with TGA 7 Perkin Elmer thermogravimetric analyzer at 10 °C/min. Differential scanning calorimetry (DSC) was performed using DSC 7 Perkin Elmer

differential scanning calorimeter calibrated with indium. Glass transition and melting temperatures (T_g and T_m , respectively) were measured according to running condition: the sample was quenched to -80 °C, heated to 100 °C (first heating), cooled down to -80 °C, and heated again (second heating). Thermograms were recorded during the second heating cycle at 20 °C/min. Mass spectrum was recorded in electron ionization mode at an ion source temperature of 150 °C and an electron energy of 70 eV. Mass spectrum was scanned from 50 to 2000 m/z .

3. Results and discussion

3.1. Phthaloylation of tryptophan

Tryptophan was phthaloylated prior to conversion to compound 3 through the reaction between tryptophan and *N*-carbethoxyphthalimide under basic condition in high product yield of 98%. ^1H and ^{13}C NMR data agreed with those of the literature [31,32]. The melting point was checked by DSC and the onset of T_m was found to be 172.83 °C. CHN elemental analysis and mass spectrum agreed with the theoretical structure. In FTIR spectrum, the phthaloylation of amino group was characterized by disappearance of the strong primary N–H stretching peak of tryptophan at 3400 cm^{-1} ; however, the weak secondary N–H stretching peak of indole was still observed. The two bands of C=O stretching at 1710 and 1774 cm^{-1} confirmed the two carbonyls of phthaloyl group. The peak of C=O stretching of the carboxylic acid at 1710 cm^{-1} was overlapped by that of the phthaloyl group.

3.2. Synthesis of esterified model compounds

Typically, highly regioselective copper-mediated 1,3-dipolar cycloaddition between an azide group and a terminal alkyne requires an access of 1,2,3 triazoles [33]. Thus, in this study the feasible pathway was to fix the azido group onto the polymer

Table 2
Molecular characteristic results of copolymers and grafted copolymers.

Copolymers/Grafted copolymers ^a	$\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ or αN_3 or R–C \equiv CH]/ [ϵCL] Molar Ratio in Feed	[$\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ or αN_3 or R–C \equiv CH]/ [ϵCL] Calculated Molar Ratio ^b (F_{grafted})	% Yield	$M_{n,\text{theo}}^c$	$M_{n,\text{NMR}}^b$	$M_{n,\text{GPC}}^d$	M_w/M_n^d
$P(\epsilon\text{CL})$	–	–	95.43	11,400	7737	9396	1.90
$P(\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}\text{-ran-}\epsilon\text{CL})$							
$P(\mathbf{10}\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}\text{-}\mathbf{90}\epsilon\text{CL})$	0.1	0.07	93.83	11,745	8902	10,805	1.96
$P(\mathbf{20}\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}\text{-}\mathbf{80}\epsilon\text{CL})$	0.2	0.17	76.66	12,090	9085	9927	2.24
$P(\mathbf{30}\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}\text{-}\mathbf{70}\epsilon\text{CL})$	0.3	0.25	88.89	12,435	6684	7550	2.20
$P(\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}\text{-ran-}\epsilon\text{CL})$							
$P(\mathbf{10}\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}\text{-}\mathbf{90}\epsilon\text{CL})$	0.1	0.09	87.53	11,810	9258	9869	2.09
$P(\mathbf{20}\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}\text{-}\mathbf{80}\epsilon\text{CL})$	0.2	0.18	78.78	12,220	10,226	9266	2.29
$P(\mathbf{30}\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}\text{-}\mathbf{70}\epsilon\text{CL})$	0.3	0.28	73.33	12,630	8852	7133	2.27
$P(\text{Nico-g-}\epsilon\text{CL})\text{-ran-}\epsilon\text{CL}$							
$P(\mathbf{10}\text{Nico-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{90}\epsilon\text{CL})$	0.1	0.07	80.84	13,185	8034	11,246	1.70
$P(\mathbf{20}\text{Nico-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{80}\epsilon\text{CL})$	0.2	0.14	98.25	17,450	8731	7960	1.83
$P(\mathbf{30}\text{Nico-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{70}\epsilon\text{CL})$	0.3	0.24	98.11	17,059	5155	5675	1.62
$P(\text{PABA-g-}\epsilon\text{CL})\text{-ran-}\epsilon\text{CL}$							
$P(\mathbf{10}\text{PABA-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{90}\epsilon\text{CL})$	0.1	0.06	98.56	13,321	12,533	10,455	1.88
$P(\mathbf{20}\text{PABA-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{80}\epsilon\text{CL})$	0.2	0.15	97.55	17,863	13,098	19,663	1.53
$P(\mathbf{30}\text{PABA-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{70}\epsilon\text{CL})$	0.3	0.25	96.34	17,460	11,052	18,047	1.75
$P(\text{Phatryp-g-}\epsilon\text{CL})\text{-ran-}\epsilon\text{CL}$							
$P(\mathbf{10}\text{Phatryp-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{90}\epsilon\text{CL})$	0.1	0.07	94.70	15,237	19,789	13,982	1.56
$P(\mathbf{20}\text{Phatryp-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{80}\epsilon\text{CL})$	0.2	0.17	93.12	22,262	21,708	15,858	1.87
$P(\mathbf{30}\text{Phatryp-g-}\epsilon\text{CL})\text{-}\mathbf{70}\epsilon\text{CL})$	0.3	0.27	95.14	23,099	24,788	12,029	1.88

^a Abbreviations: Nico = nicotinic acid, PABA = *p*-aminobenzoic acid, Phatryp = phthaloyltryptophan.

^b Determined by ^1H NMR spectroscopy.

^c $M_{n,\text{theo}} = \left(\frac{[\epsilon\text{CL}]}{[\text{I}]}\right) \times 114 + \left(\frac{[\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}] \text{ or } [\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}] \text{ or } [\text{Alkyne}]}{[\text{I}]}\right) \times M_{n,\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}} \text{ or } M_{n,\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}} \text{ or } M_{n,\text{Alkyne}}$. This value was calculated based on 100% conversion of monomer; where [ϵCL] is the molar concentration of ϵCL , [$\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$] or [$\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}$] or [alkyne] is the molar concentration of $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ and $\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}$ and alkyne, respectively. [I] is the molar concentration of the initiator (1,4-butanediol), and $M_{n,\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}}$ or $M_{n,\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}}$ or $M_{n,\text{alkyne}}$ is the molecular weight of $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ and $\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}$ and alkyne, respectively.

^d Determined by GPC.

backbone (Fig. 3) and to esterify the model compound acids with 3-butyn-1-ol using the coupling reaction with DCC and DMAP as coupling reagents (Fig. 2) to provide terminal alkynyl ester derivatives, which were characterized by NMR and FTIR spectroscopy as described below.

3.2.1. Synthesis of but-3-ynyl nicotinate (1)

Under aforementioned conditions, but-3-ynyl nicotinate was obtained in 83% yield. Compound 1 was identified by ^1H NMR using $\text{DMSO-}d_6$ as solvent. The presence of the methyne proton signal of the terminal alkyne at 2.86 ppm and signal group of the methylene protons adjacent to the oxygen atom of ester group at 4.35 ppm in the spectrum confirmed the structure of but-3-ynyl nicotinate. This result was further verified by a FTIR spectrum. The C–H stretching peak of the terminal alkyne and C=O stretching band of ester carbonyl were identified at 3264 and 1718 cm^{-1} , respectively. Also a weak signal of the C=C stretching was observed at 2119 cm^{-1} .

3.2.2. Synthesis of but-3-ynyl 4-aminobenzoate (2)

The coupling reaction according to 3.2 between PABA and 3-butyn-1-ol gave but-3-ynyl 4-aminobenzoate in 65% yield. Compound 2 was identified by ^1H NMR in CDCl_3 . The spectrum showed again the typical signal groups for the methylene protons (COOCH_2) at 4.38 ppm and the methyne proton ($\text{C}\equiv\text{CH}$) at 2.04 ppm. The FTIR spectrum recorded in the KBr disc mode showed also the C–H stretching of the terminal alkyne at 3288 cm^{-1} and, in addition, the N–H stretching of the anilino group around 3400 cm^{-1} . The peaks at 1685 and 1599 cm^{-1} were assigned to the C=O stretching and N–H bending, respectively.

3.2.3. Synthesis of 3(2-N-phthalimido-2-(prop-2-ynyl acetyl)ethyl)indole (3)

Phthaloyltryptophan (see 3.1) was esterified with 3-butyn-1-ol to provide the terminal alkyne functional group according to 3.2 in 70% yield. Compound 3 was identified by ^1H NMR in CDCl_3 . The spectrum exhibited the characteristic signal group for the methylene protons (COOCH_2) at 4.70 ppm of the ester linkage and that of the alkyne proton at 1.85 ppm. The FTIR spectrum showed the corresponding C–H stretching of the $\text{C}\equiv\text{CH}$ group at 3270 cm^{-1} and the C=O stretching peak at 1738 cm^{-1} .

3.3. Synthesis of $P(\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL})$

The $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ unit was copolymerized at various molar ratios (0.10, 0.20, and 0.30) with ϵCL monomer by ring opening polymerization in the presence of the initiator 1,4-butanediol and the catalyst $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (Fig. 3). The molar ratio of monomer to initiator and to catalyst, respectively, was set to 100 each. The yield of the copolymers was in each case higher than 70% with molar ratios of the $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ units calculated from ^1H NMR which were in agreement with the theoretical values.

The $M_{n,\text{theo}}$ values were calculated based on 100% conversion of the monomer, the $M_{n,\text{NMR}}$ values in Table 2 according to [30] with some modification. Both sets differ to a large extent from each other. This fact might be explained by the electron withdrawing property of the chloride atom in $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ leading to a higher reactivity of its lactone moiety in comparison to that of ϵCL . This caused additional inter- and intramolecular transesterifications during the optimized polymerization process at the high temperature of 120 $^\circ\text{C}$, which were particularly inevitable at the high 0.3 ratio of $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ versus ϵCL . The complete molecular parameter set of the copolymers and grafted copolymers are compiled in Table 2.

3.4. Synthesis of $P(\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL})$

Conversion of the chloride pendants to azides was done prior to grafting the model compounds along the polymer chain. $P(\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL})$ was substituted with sodium azide in DMF at room temperature (Fig. 3) in an overnight reaction. The ^1H NMR spectrum confirmed the complete conversion by means of the azide methine signal (CHN_3) at 3.85 ppm and the entire disappearance of methyne proton signal (CHCl) at 4.25 ppm. The azide group was also monitored by FTIR by means of the characteristic band at 2100 cm^{-1} . The molecular weight of $P(\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL})$ was slightly increased due to the azide substitution compared to that of $P(\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL})$ (Table 2).

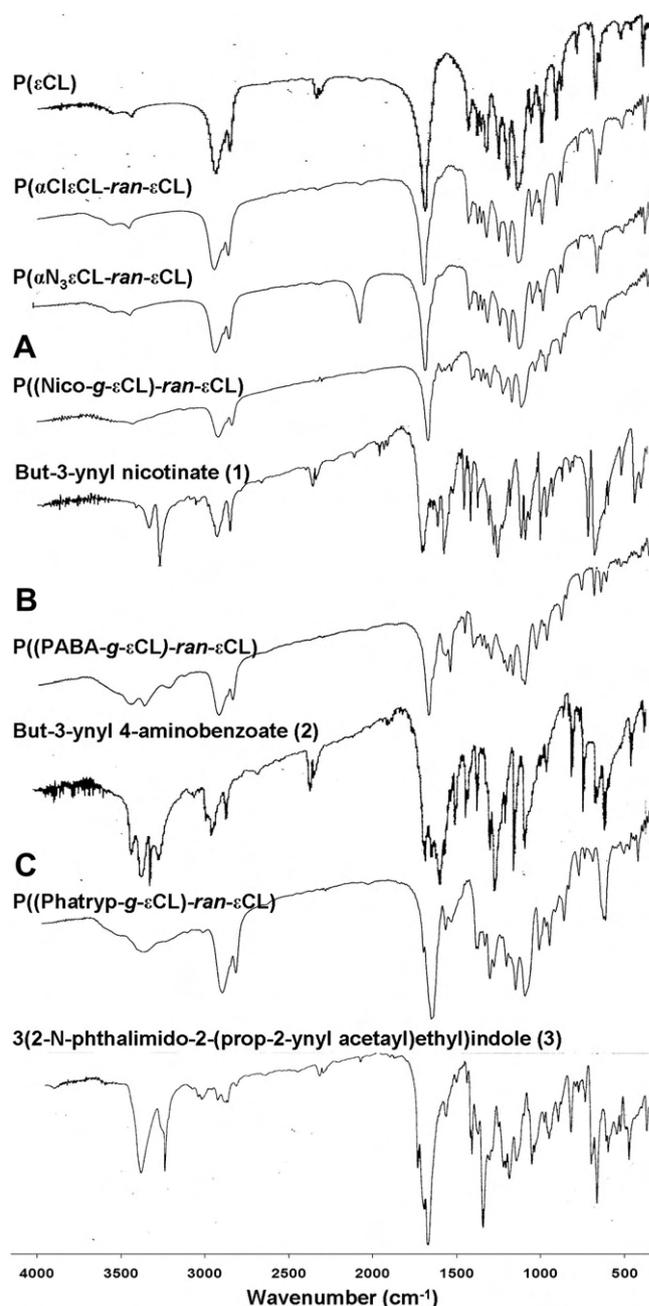


Fig. 4. FTIR spectra of $P((\text{Nico-g-}\epsilon\text{CL})\text{-ran-}\epsilon\text{CL})$ (A), $P((\text{PABA-g-}\epsilon\text{CL})\text{-ran-}\epsilon\text{CL})$ (B), and $P((\text{Phatryp-g-}\epsilon\text{CL})\text{-ran-}\epsilon\text{CL})$ (C), respectively, in comparison with $P(\epsilon\text{CL})$ homopolymer, $P(\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL})$, $P(\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL})$, and alkyne terminated drug molecules. DBU as base was used for the syntheses of (A) and (C), respectively, whereas TEA for that of (B).

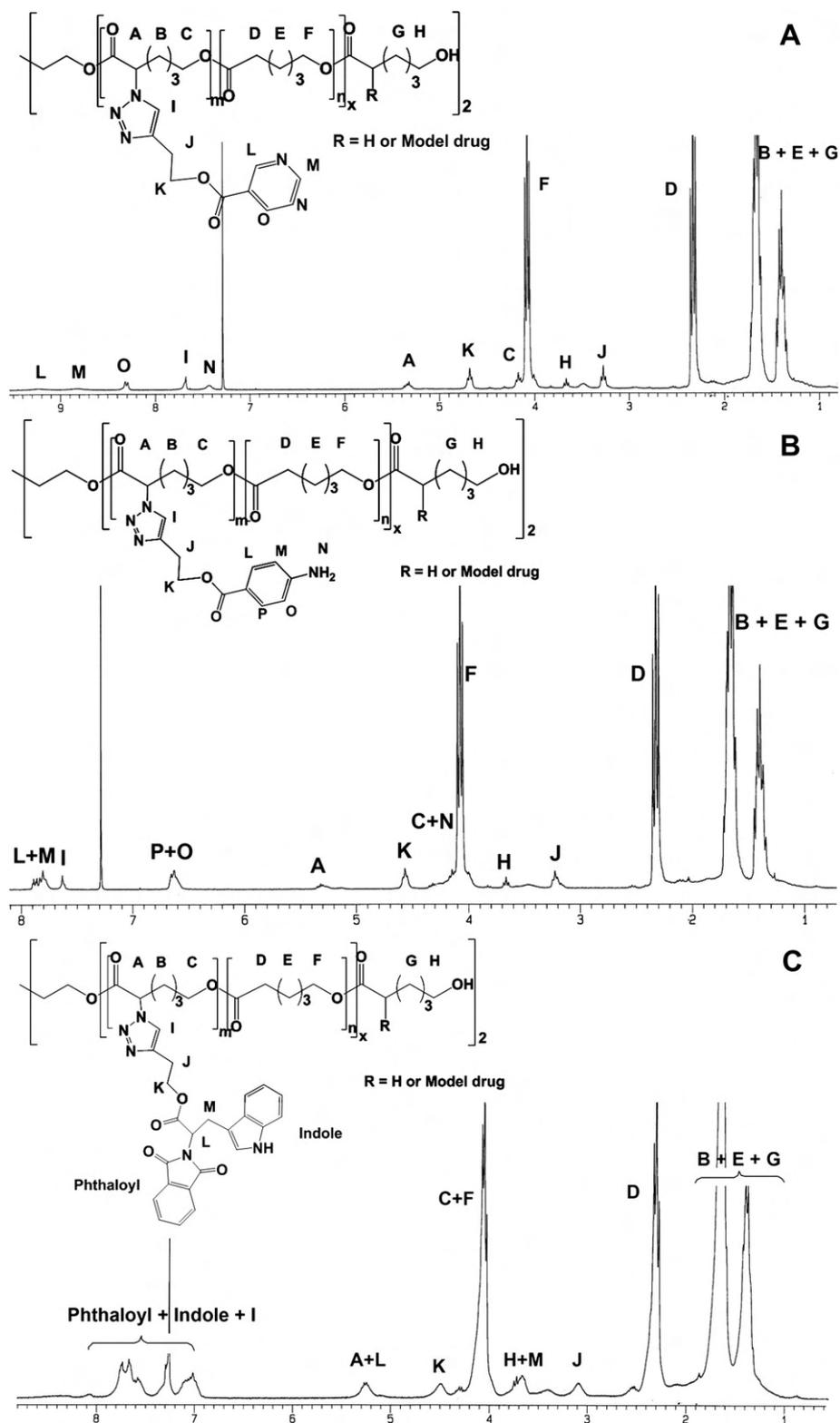


Fig. 5. ^1H NMR spectra of P((Nico-g- ϵ CL)-ran- ϵ CL) (A), P((PABA-g- ϵ CL)-ran- ϵ CL) (B), and P((Phatryp-g- ϵ CL)-ran- ϵ CL) (C), respectively. DBU as base was used for the syntheses of (A) and (C), respectively, whereas TEA for that of (B).

3.5. Engrafting of model compounds along P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}$ -ran- ϵCL) by click reaction

The 3-butyryl ester derivatives of the three model compounds nicotinic acid, PABA, and phthaloyltryptophan were engrafted onto

P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL}$ -ran- ϵCL) backbone through copper-catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition reaction at 40 °C using CuI as catalyst and DBU as base (Fig. 3). Under monitoring by FTIR, the reaction was completed after 4 h with the complete disappearance of azide peak at 2100 cm^{-1} indicating the entire conversion of the pendent azide

to the triazole ring which showed the characteristic peak at 1610 cm^{-1} . Fig. 4 illustrates the FTIR spectra of all grafted copolymers. In addition, the ^1H NMR spectrum confirmed the cycloaddition by the methyne proton signal of the triazole ring at 7.7 ppm and the disappearance of the methyne proton signal of azide (CHN_3) at 3.85 ppm.

The average molecular weight ($M_{n,\text{NMR}}$) of the grafted copolymers and the molar fraction (F_{grafted}) of the engrafted model compounds were calculated according to equation (1) and 2, where I represents the integration of the respective ^1H NMR peaks assigned in Fig. 5, and M the molecular weight of compound 1, 2, 3 (M_{alkyne}), and the caprolactone unit ($M_{\text{εCL}}$), respectively. All values are summarized in Table 2 together with the calculated grafting efficiencies (F_{grafted}) which were higher than 80%.

Equation (1)

For nicotinic acid and PABA grafted P(εCL)

$$M_{n,\text{NMR}} = \frac{[I_A \times M_{\text{alkyne}}] + [\frac{1}{2}I_D \times M_{\text{εCL}}]}{\frac{1}{4}I_H}$$

For phthaloyltryptophan grafted P(εCL)

$$M_{n,\text{NMR}} = 2 \times \left(\frac{[I_{A+L} \times M_{\text{alkyne}}] + [I_D \times M_{\text{εCL}}]}{I_{H+M} - I_{A+L}} \right)$$

Equation (2)

For nicotinic acid and PABA grafted P(εCL)

$$F_{\text{grafted-CL}} = \frac{I_A}{\frac{1}{2}I_D + I_A}$$

For phthaloyltryptophan grafted P(εCL)

$$F_{\text{grafted-CL}} = \frac{I_{A+L}}{I_D + I_{A+L}}$$

3.5.1. Grafting of but-3-ynyl nicotinate (1) along the P(εCL) backbone

But-3-ynyl nicotinate (1) was successfully grafted onto the polymer backbone. Fig. 5A shows the ^1H NMR spectrum of nicotinic acid grafted P(εCL) with the characteristic peak of methyne proton of caproyl unit adjacent to the triazole ring at 5.30 ppm (peak A), while the former signal of the methyne proton adjacent to the azide at 3.85 ppm was missing. Further new peaks at 7.45, 8.30, 8.70 and 9.25 ppm were assigned to the protons of nicotinic pyridine ring. These results were confirmed by characteristic peaks of C=C stretching at 1590 cm^{-1} , and of C=N stretching at 1625 cm^{-1} in the FTIR spectrum originating from the overlapping vibrations of the C=N bonds of the triazole and pyridine rings (Fig. 4A).

The molecular weights of the grafted polymers declined only to a minor extent as compared to those of P(αN₃εCL-*ran*-εCL) and P(αClεCL-*ran*-εCL) (Table 2). In case of the grafted nicotinic acid, at low percent grafting, the M_n value was remarkably lower for 30% grafting. However, the molecular weight distribution was narrower than those of the original polymers and the value of M_w/M_n and GPC chromatogram showed a unimodal peak (data not shown). If one considers the difference of $M_{n,\text{theo}}$ and $M_{n,\text{NMR}}$, degradation must have occurred. The nitrogen atom of the nicotinic pyridine ring acts as an intramolecular nucleophile with its localized lone pair electron, cleaving the ester bond by attacking the carbonyl group during the grafting step independent of the strength of the base used. Therefore the extent of polymer degradation could not be minimized, yielding short polymer units which could not be precipitated by cold hexane. This, finally, explains the unimodal GPC peak.

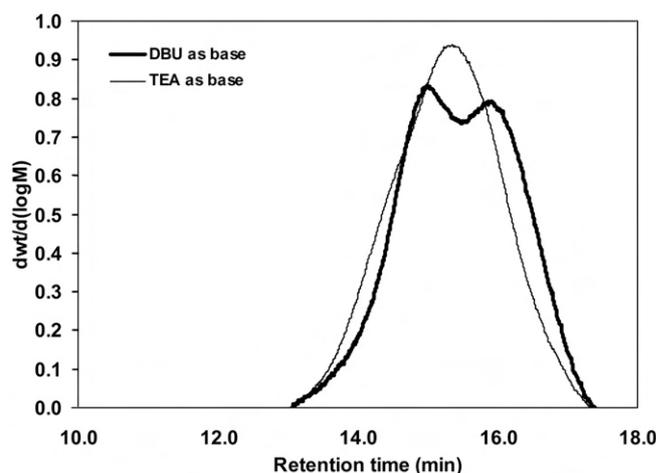


Fig. 6. GPC chromatograms of P((PABA-g-εCL)-co-εCL) at 30% mole of PABA representing the products of the cycloaddition with TEA and DBU (—, - -), respectively, as base.

3.5.2. Grafting of but-3-ynyl 4-aminobenzoate (2) along the P(εCL) backbone

For grafting but-3-ynyl 4-aminobenzoate (2) onto the polymer backbone, DBU was initially used and acted as a base in the cycloaddition reaction. Similar to grafting of nicotinic acid, the reaction was complete after 4 h. At 10% grafting, the corresponding grafted copolymer was attainable without degradation as seen by an increase in $M_{n,\text{GPC}}$ without broadening the polydispersity index of molecular weight (PDI) compared to that of P(10αN₃εCL-*ran*-εCL). Once the percent grafting of but-3-ynyl 4-aminobenzoate (2) was increased to 20 and 30% in the presence of the strong non-nucleophilic, sterically hindered base DBU [34,35], the PDI grew dependently, only slightly raised for the 20% grafting copolymer (data not shown). In contrast, for 30% grafting the GPC chromatogram showed a bimodal peak (Fig. 6), indicating a heterodispersed molecular weight arising from polymer degradation by DBU base

Table 3

Thermal parameters of copolymers and grafted copolymers determined by DSC thermograms.

Copolymers/Grafted copolymers ^a	T _g (°C)	T _m (°C)
P(εCL)	Nd ^b	50.9
P(αClεCL-<i>ran</i>-εCL)		
P(10αClεCL-90εCL)	-74.7	35.2
P(20αClεCL-80εCL)	-52.6	36.4
P(30αClεCL-70εCL)	-55.9	12.1
P(αN₃εCL-<i>ran</i>-εCL)		
P(10αN ₃ εCL-90εCL)	-58.1	37.8
P(20αN ₃ εCL-80εCL)	-46.8	17.6
P(30αN ₃ εCL-70εCL)	-49.9	19.7
P((Nico-g-εCL)-<i>ran</i>-εCL)		
P((10Nico-g-εCL)-90εCL)	-30.1	38.6
P((20Nico-g-εCL)-80εCL)	-27.5	- ^c
P((30Nico-g-εCL)-70εCL)	-13.6	-
P((PABA-g-εCL)-<i>ran</i>-εCL)		
P((10PABA-g-εCL)-90εCL)	-41.0	37.1
P((20PABA-g-εCL)-80εCL)	-13.2	-
P((30PABA-g-εCL)-70εCL)	-5.6	-
P((Phatryp-g-εCL)-<i>ran</i>-εCL)		
P((10Phatryp-g-εCL)-90εCL)	-15.1	-
P((20Phatryp-g-εCL)-80εCL)	-	-
P((30Phatryp-g-εCL)-70εCL)	-	-

T_g and T_m stand for glass transition and melting temperatures, respectively.

^a Abbreviations: Nico = nicotinic acid, PABA = *p*-aminobenzoic acid, Phatryp = phthaloyltryptophan.

^b Nd = Not determined.

^c - = no peak observed.

catalyzed nucleophilic ester cleavage in the polymer backbone caused by the deprotonated amino group of the PABA aniline fragment. This is leading to intra- and intermolecular transesterifications.

When the milder base triethylamine (TEA) was used instead of DBU, the extent of degradation of the easily degraded polymer backbone was diminished. Therefore, TEA was further on used in this study, leading to successful grafting PABA onto the polymer

chain. Under this modified condition the grafted copolymers at 20 and 30% showed molecular weights which increased with the same molecular weight distribution as compared to $P(\alpha N_3\epsilon CL-ran-\epsilon CL)$ (Table 2). The GPC chromatogram confirmed this result with a unimodal instead of the bimodal peak.

The grafted copolymer was characterized by the 1H NMR signal of the methyne proton of the triazole ring at 7.65 ppm and those of the benzene protons of PABA at 6.65 and 7.85 ppm (Fig. 5B). The

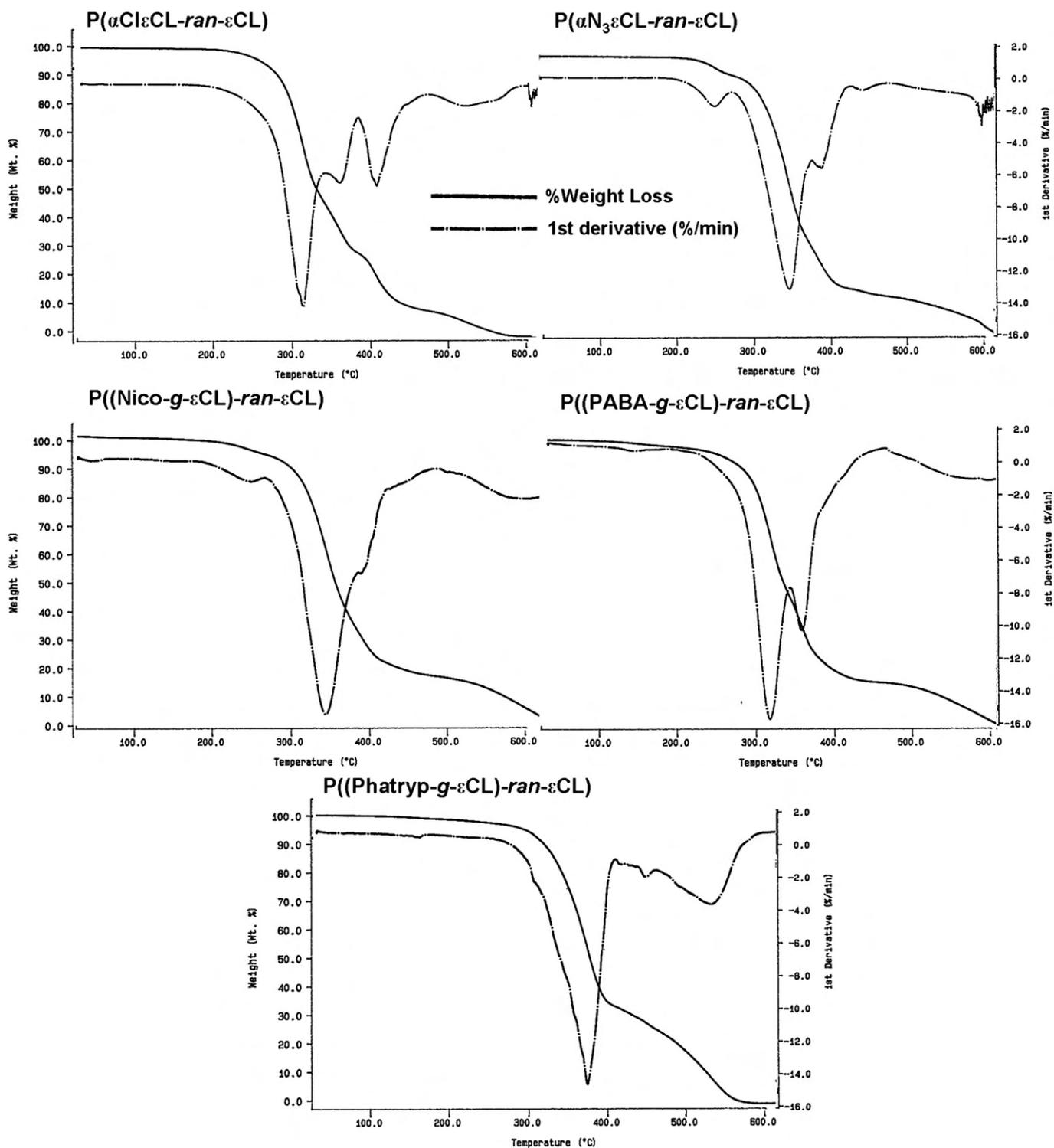


Fig. 7. TGA profiles of copolymers and grafted copolymers at 20% molar ratio (— = %weight loss; - - - = 1st derivative).

grafting was also confirmed by the FTIR spectrum with bands for N–H stretching at 3400 cm^{-1} , C=N stretching of the triazole ring at 1626 cm^{-1} , and C=O stretching of the polyester polymer and ester bond of the pendent PABA, at 1700 and 1725 cm^{-1} , respectively (Fig. 4B).

3.5.3. Grafting of phthaloyltryptophan by means of 3(2-N-phthalimido-2-(prop-2-ynyl acetayl)ethyl)indole (3) along the P(ϵ CL) backbone

The phthaloyltryptophan by means of 3(2-N-phthalimido-2-(prop-2-ynyl acetayl)ethyl)indole (3) was used as a large and bulky representative to investigate the limitation of grafting onto P(ϵ CL) backbone through click reaction. However, this compound could be completely attached along P(ϵ CL) after 4 h using the same conditions as for engrafting of nicotinic acid. The ^1H NMR spectrum showed the characteristic signal of triazole proton (Fig. 5C), together with the typical set of signal groups of phthaloyltryptophan between 6.9 and 8.0 ppm coinciding with the absence of methyne proton signal of the former azide (CH–N₃) at 3.85 ppm. The FTIR spectrum (Fig. 4C) also confirmed the successful click reaction by means of the N–H stretching peak at 3400 cm^{-1} and the two C=O stretching bands at 1710 and 1774 cm^{-1} of the phthaloyl group.

The molecular weight of the grafted copolymer calculated from ^1H NMR and GPC gradually increased according to the increasing number of grafted units. Its distribution was narrower than that of P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) (Table 2). Unlike to the grafted PABA, DBU did not cause any severe chain degradation according to GPC results, since the indole ring proton is less acidic and sterically hindered by the phenyl ring and hardly converted to the nucleophilic species. However, this steric effect did not disturb the completeness of grafting reaction. In contrast, Riva et al. [12] were only able to engraft a linear macromolecule, PEO, on the P(ϵ CL) backbone to just 40% probably due to stronger sterical interaction between two macromolecules than in the case of phthaloyltryptophan with complete of engrafting.

3.6. Thermal properties of the copolymers and grafted copolymers

The thermal properties of the grafted copolymers were measured with DSC and TGA and compared to those of the original P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) and P($\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$). The glass transition temperature T_g and melting temperature T_m values characterizing the polymorphic properties of the copolymers are summarized in Table 3 indicating their semisolid form. In case of an undetectable T_m s the polymer is amorphous. In some cases of destructible polymers T_g s cannot be detected. The T_g s values of P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) and of P($\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) tend to increase with increasing molar ratio of substituted units, meanwhile their T_m s tend to decline.

The increase of grafted units in the copolymer resulted in the change of the polymorphic form from semi-crystalline to amorphous, altering their thermal properties. At 10% grafting of nicotinic acid and PABA, respectively, the T_m was observable while at higher ratios it was undetectable. In case of grafting phthaloyltryptophan, T_m was not detected at all grafting ratios. Thus, conversion from polymorphic to amorphous form of these kinds of copolymers goes with their size and/or with the increasing number of substituted units.

To investigate the thermal degradation of the copolymers in comparison with the grafted copolymers, TGA profiles were recorded. Fig. 7 illustrates TGA profiles of copolymers and grafted copolymers at 20% molar ratio. The thermograms of P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) and P($\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) show different thermal degradation pattern. Although, the starting degrading temperature of both copolymers at around $200\text{ }^\circ\text{C}$ was similar, in case of P($\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) the main

degradation peak appeared at around $335\text{ }^\circ\text{C}$ followed by a small degradation peak, a moderate degradation peak at $370\text{ }^\circ\text{C}$, and by a small broad degradation peak starting at $460\text{ }^\circ\text{C}$. In contrast, P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) showed a small degradation peak at $270\text{ }^\circ\text{C}$ attributed to the initial rupture of azide (N–N₂) [36,37] and an extensive weight loss was found at $350\text{ }^\circ\text{C}$ followed by moderate degradation peaks at $400\text{ }^\circ\text{C}$. In case of the grafted copolymers, the thermal degradation pattern of P((Nico-g- ϵCL)-*ran- ϵCL*) was the same as that of P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$). The thermogram of P((PABA-g- ϵCL)-*ran- ϵCL*) exhibited only two main degradation peaks, an extensive at $320\text{ }^\circ\text{C}$ and a moderate one at $370\text{ }^\circ\text{C}$. the latter one being stronger than that of P($\alpha\text{N}_3\epsilon\text{CL-ran-}\epsilon\text{CL}$) at comparable temperature. For P((Phatryp-g- ϵCL)-*ran- ϵCL*), the extensive degradation started at $370\text{ }^\circ\text{C}$ while the second degradation step was shifted to about $550\text{ }^\circ\text{C}$. According to these results all copolymers and grafted copolymers are thermally stable to about $200\text{ }^\circ\text{C}$ in dried state.

From these combined results it can be concluded that the thermal properties of the grafted copolymers are largely governed by the type of grafted bioactive model compound at the polymer backbone. The larger bioactive molecule altered the thermal properties stronger than the smaller type. In addition, an increasing amount of grafted model compound changed the structure of the grafted copolymer to the amorphous form.

4. Conclusion

Three bioactive model compounds (nicotinic acid, PABA, and phthaloyltryptophan) were successively grafted onto the P(ϵ CL) backbone through copper-catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition or the "click reaction". Under very mild conditions, the reaction could preserve the length of the polymer backbone. However, reflecting the type of the model compound containing either a protic or a nucleophilic group the type of base used in the reaction is the critical issue since in combination they may possibly lead to intra- or intermolecular transesterification and thus induce the polymer chain degradation. Several types of model compounds could be grafted along the polymer backbone by varying amounts of the $\alpha\text{Cl}\epsilon\text{CL}$ units on the backbone. The molecular size of the compounds modified the physicochemical and thermal properties of the grafted copolymers compared to the copolymer. The grafted copolymers could be identified by FTIR, NMR, and GPC analysis. Derived from this accomplishment, various kinds of drugs including cytotoxic drugs, peptides and proteins, could probably be grafted along the polymer backbone in ongoing research in order to modify the physicochemical properties of drugs and also of macromolecular carriers to be more suitable for drug delivery applications. The conjugation of these grafted copolymers with other polymeric carriers such as PEG and nanoparticles prepared from these grafted copolymers are being under investigation to gain more efficient drug delivery systems.

Acknowledgements

Financial support from the Thailand Research Fund (TRF) through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0189/2547) and the Thai Research Fund and Commission of Higher Education, Thailand for the research funding (RMU5180019) is gratefully acknowledged. The authors are very pleased to acknowledge the National Metal and Materials Technology Center (MTEC, Pathumthani, Thailand) for GPC experiment. The authors thank Professor Dr. AW Frahm, Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Institute of Pharmaceutical Sciences, Freiburg University, Freiburg, Germany, for language and writing approval.

Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.polymer.2010.03.034.

References

- [1] Lee JS, Go DH, Bae JW, Lee SJ, Park KD. *J Control Release* 2007;117(2):204–9.
- [2] Park EK, Kim SY, Lee SB, Lee YM. *J Control Release* 2005;109(1–3):158–68.
- [3] Jubo L, Payam Z, Faquan Z, Christine A. *J Pharm Sci* 2008;97(8):3274–90.
- [4] Shi Q, Chen X, Lu T, Jing X. *Biomaterials* 2008;29(8):1118–26.
- [5] Kulbokaite R, Ciuta G, Netopilik M, Makuska R. *Reactive Funct Polym* 2009;69(10):771–8.
- [6] Börner HG. *Prog Polym Sci* 2009;34(9):811–51.
- [7] Trollsas M, Lee VY, Mecerreyes D, Lowenhielm P, Moller M, Miller RD, et al. *Macromolecules* 2000;33(13):4619–27.
- [8] Rieger J, Bustele KV, Lecomte P, Detrembleur C, Jérôme R, Jérôme C. *Chem Commun (Camb)* 2005;2:274–6.
- [9] Lecomte P, Riva R, Schmeits S, Rieger J, Butsele KV, Jérôme C, et al. *Macromol Symp* 2006;240:157–65.
- [10] Pitt CG, Gu Z-W, Ingram P, Hendren RW. *J Polym Sci A Polym Chem* 1987;25(4):955–66.
- [11] Lutz J-F, Zarafshani Z. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(9):958–70.
- [12] Riva R, Schmeits S, Jérôme C, Jérôme R, Lecomte P. *Macromolecules* 2007;40(4):796–803.
- [13] Riva R, Lussis P, Lenoir S, Jérôme C, Jérôme R, Lecomte P. *Polymer* 2008;49(8):2023–8.
- [14] Zednik J, Riva R, Lussis P, Jérôme C, Jérôme R, Lecomte P. *Polymer* 2008;49(3):697–702.
- [15] Lee R-S, Huang Y-T. *J Polym Sci A Polym Chem* 2008;46(13):4320–31.
- [16] Chen A-L, Ni H-C, Wang L-F, Chen J-S. *Biomacromolecules* 2008;9(9):2447–57.
- [17] Pertuit D, Moulari B, Betz T, Nadaradjane A, Neumann D, Ismaïli L, et al. *J Control Release* 2007;123(3):211–8.
- [18] Bingham S, Cummings JH. *Clin Sci (Lond)* 1983;64(6):629–35.
- [19] Brueckner B, Boy RG, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, et al. *Cancer Res* 2005;65(14):6305–11.
- [20] Guo B, Zhou X, Xiao X, Li J, Li L. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2001;19(5):315–7.
- [21] Iinuma I, Uyama S, Uenoyama K, Sakaguchi T. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1961;65:1463–7.
- [22] Jakobsen J, Pedersen AN, Ovesen L. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(1):138–42.
- [23] Pahan K. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(10):1165–78.
- [24] Safeer RS, Lacivita CL. *Am Fam Physician* 2000;61(11):3371–82.
- [25] Siedlecki P, Boy RG, Musch T, Brueckner B, Suhai S, Lyko F, et al. *J Med Chem* 2006;49(2):678–83.
- [26] p-Aminobenzoic acid. In: Windholz M, Budavari S, editors. *The Merck index*. 10th ed. New Jersey: Merck & Co., Inc.; 1983. p. 62–3.
- [27] Kern CJ, Antoshkiw T, Maiese MR. *Anal Chem* 2002;20(10):919–22.
- [28] Nefkens GHL. *Nature* 1960;185(4709):309.
- [29] Nefkens GHL, Tesser GI, Nivard RJF. *Recl Trav Chim Pays Bas* 1960;79:688–98.
- [30] Lenoir S, Riva R, Lou X, Detrembleur C, Jérôme R, Lecomte P. *Macromolecules* 2004;37(11):4055–61.
- [31] Mizrahi DM, Waner T, Segall Y. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem* 2001;173(1):1–25.
- [32] Zeng Q, Liu Z, Li B, Wang F. *Amino Acids* 2004;27(2):183–6.
- [33] Gil MV, Are'valo MJ, Lopez O. *Synthesis* 2007;2007(11):1589–620.
- [34] Im YJ, Gong iH, Kim HJ, Kim JN. *Bull Korean Chem Soc* 2001;22(9):1053–5.
- [35] Oediger H, Möller F, Eiter K. *Synthesis* 1972;1972(11):591–7.
- [36] Ero MS, Güven O. *J Appl Polym Sci* 1996;61(2):201–6.
- [37] Fazlloglu H, Hacıaloglu J. *J Anal Appl Pyrol* 2002;63(2):327–38.

Comparative Study of Ibuprofen and Indomethacin Loaded Poly(caprolactone) Nanoparticles : Physicochemical Properties

J. Suksiriworpong^a, K. Sripha^b, J. Kreuter^c and V. B. Junyaprasert^{a*}

^aDepartment of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand

^bDepartment of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand

^cInstitute of Pharmaceutical Technology, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 9 (Biozentrum), D-60438 Frankfurt am Main, Germany

Abstract

Nanotechnology is a straightforward strategy for the development of drug delivery systems. Poly(caprolactone) (PCL) has been used as a hydrophobic biodegradable polymeric core of nanoparticles for encapsulation of various kinds of self-problematic drugs. In this study, PCL was fabricated by ring opening polymerization and the nanoparticles were then obtained by solvent diffusion and evaporation method using Tween 80 and Span 80 as surfactants and Poloxamer 188 as a stabilizer. Ibuprofen and indomethacin were encapsulated into the PCL nanoparticles to observe the effect of molecular characteristics on the physicochemical properties of the nanoparticles. The results showed that the characteristics of encapsulated drugs profoundly affected the physicochemical properties of the nanoparticles. After incorporation of drug, indomethacin provided smaller particle size, less size distribution, and more negative surface charge as compared to ibuprofen, probably due to the individual effect on the polymer and surfactant during nanoprecipitation. Also, %yield, %entrapment efficiency and %drug loading of indomethacin-loaded nanoparticles were higher than those of ibuprofen-loaded nanoparticles at all drug:polymer ratios. The result indicated that the hydrophilic small molecular drug, ibuprofen, was less efficiently entrapped in the system than the hydrophobic larger molecular drug, indomethacin, due to the drug leakage during incorporation process by nanoprecipitation method. Thus, it can be concluded that the different physicochemical properties of drug profoundly have individual effect on the drug-loaded PCL nanoparticles.

Key words: indomethacin, ibuprofen, poly(caprolactone), nanoparticle

*Corresponding author: Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Road., Bangkok 10400, Thailand.

E-mail: pyvbp@mahidol.ac.th

INTRODUCTION

Over the past periods, nanotechnology has been enormously gained an attention in the field of drug delivery system. Stemming from the extremely small size of this system, the therapeutic efficiency of drug loaded in this system is enormously improved. Many attempts have been considerably utilized to fabricate the nanoparticles as effective and efficient nano-carriers to overcome the limitation of drug administration; for instances, to surpass the physiological barrier, to precisely deliver to the targeted tissue or organ, to controllably extend the desired residence time, to enhance the therapeutic benefit, and to minimize the undesirable side effect¹. Several kinds of core shell particles have been fabricated to incorporate the drugs such as solid lipid, natural, and synthetic polymers²⁻¹¹ by the different methods developed for the achievement of highly effective carriers for each kind of drug. Among the synthetic polymers, polyester is one of interest for medical and pharmaceutical purposes due to its biodegradable and biocompatible properties. Poly(caprolactone) (PCL) is a good candidate in this group and has been remarkably applied for the development of carriers since it shows semi-crystalline, highly permeable, and slowly degradable both *in vitro* and *in vivo* properties¹²⁻¹⁴. The characteristics of carriers made from PCL can be desirably modulated by, for examples, covalently bonding or physically blending with other polymer etc. Up to present, the PCL carriers have been developed to deliver various kinds of pharmacological actives, including antibiotics¹⁵, antifungals¹⁶, vaccines¹⁷, anticancer drugs^{18,19}, sunscreen agents²⁰, anticonvulsants²¹, and DNA²².

Ibuprofen (IB) and indomethacin (IN) (Figure 1) are weak acid non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) available in the market. Typically, these drugs are orally effective in medical treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis, inflammations, and a variety of pains²³. Nevertheless, the major side effect of such drug is known to irritate the GI tract. These drugs are classified according to

their structure, into the different group. IB is classified in propionic acid derivatives and IN is acetic acid derivatives^{24,25}. Regarding their structures, IN contains methylated indole ring which is not found in IB. This distinguished structure results in the different characteristics in molecular volume and numbers of functional group to form bonding²⁶.

In general, one consideration concerning the development of nanocarrier is the compatibility between incorporated drug and polymeric core referring to miscibility and/or interaction without alteration in chemical structure. Not only the nature of nanostructure core but also the molecular characteristic of drug can affect the properties of the system, such as stability, drug loading capacity, drug entrapment efficiency, and drug release profiles, proceeding through the interaction between drug and polymeric core involving van der Waals force, dipole-dipole interaction, and hydrogen bonding²⁷⁻²⁹. Therefore, it is in consideration that various characteristics of drugs and polymers can possess the interaction that leads to differences in the characteristics of the carriers including micro- and nanoparticles. To the best of our knowledge, the comparison between different structure of these two NSAIDs (IB and IN) affected the characteristics of PCL nanoparticles has not been studied. Therefore, the present study aimed to investigate the structural effect of these two drugs on the physicochemical characteristics of PCL nanoparticles after drug-incorporation. In this study, PCL was synthesized by ring opening polymerization (ROP) and its characteristic was then evaluated by NMR spectroscopy and gel permeation chromatography (GPC). The PCL nanoparticulate dispersion was prepared by solvent diffusion and evaporation technique using Tween 80 and Span 80 as a pair of surfactants, and Poloxamer 188 as a stabilizer. Subsequently, IB and IN at the various drug and polymer ratios were loaded into the PCL nanoparticles to study the effect of their molecular structures on the physicochemical properties of the nanoparticles.

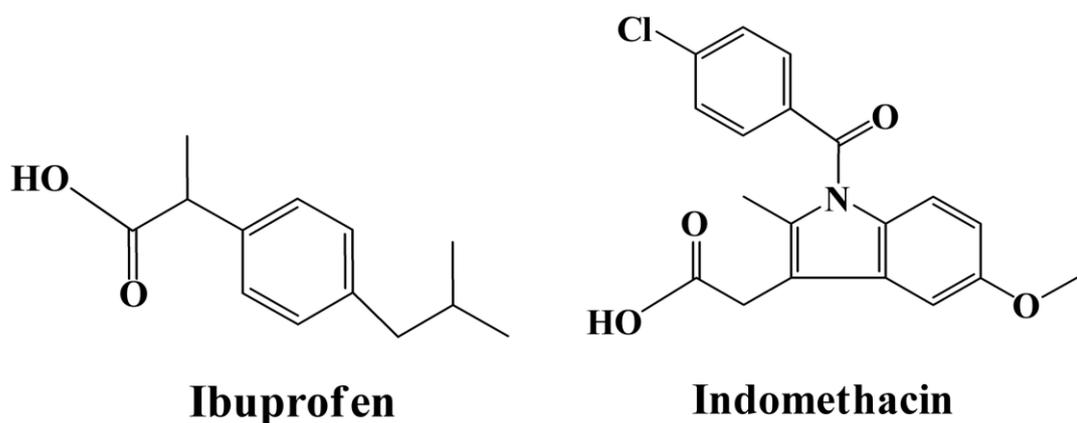


Figure 1. Structure of ibuprofen and indomethacin.

MATERIALS AND METHODS

Materials

ϵ -Caprolactone monomer (CL; Aldrich, Steinheim, Germany) was stirred over calcium hydride for 48 h and distilled prior to use. 1,4-Butanediol, poloxamer 188 (PL188), polysorbate 80 (Tween 80, TW80), and stannous (II) octanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) were obtained from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Sorbitan oleate (Span 80, SP80) was purchased from Croda Iberica SA, Barcelona, Spain. Milli-Q water was used by purification with a Synergy[®] (Millipore, Molsheim, France). Other organic solvents were used as received. Acetonitrile and methanol were of HPLC grade from Merck (Damstadt, Germany). Glacial acetic acid (100%) was purchased from VWR International S.A.S, Damstadt, Germany. Ibuprofen and indomethacin were kindly gifted from Vita Co. Ltd, Bangkok, Thailand, and Government Pharmaceutical Organization (GPO), Bangkok, Thailand, respectively.

Polymerization

CL monomer (1.14 g, 10 mmole) was polymerized by ROP using one-tenth molar equivalence (compared to mole of monomer) of 1,4-butanediol as an initiator and $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ as a catalyst³⁰⁻³². The mixture in the reaction flask was evacuated for 15 min and the reaction was processed in an oil bath at 120°C for 6 h under argon atmosphere. The crude polymer was purified by precipitation in cold hexane and dried in vacuo overnight.

Polymer characterization

¹H-NMR spectrum was recorded in FT-mode with Bruker Avance 300 apparatus (Bruker corporation, Rheinstetten, Germany) using CDCl_3 as a solvent. Number- and weight-average molecular weights (M_n and M_w , respectively) of polymer were evaluated by a Water 150-CV GPC (Waters Corporation, Massachusetts, USA) equipped with refractive index detector. The polymer was eluted from 2 columns of PLgel 10 μm mixed B (Varian, Inc., California, USA) using tetrahydrofuran (THF) as a solvent. The molecular weight values were calculated relative to those values of polystyrene standards calibrated in the range of 4,490–1,112,000 g/mole.

Nanoparticle preparation

Fifty milligrams of PCL was dissolved in THF containing SP80. An organic solution was gently added to an aqueous phase containing TW80 and PL188 under magnetic stirring. The solvent was removed under reduced pressure. The final volume of dispersion was adjusted to the initial volume. The aggregates were filtered out through 0.45 μm cellulose acetate membrane filter (Millipore, Schwalbach, Germany). The lyophilized powder was obtained after freeze drying process. In case of drug loaded nanoparticles, an accurate amount of drug (Table 1) was initially added into polymer solution, and the loaded nanoparticles were prepared as previously described.

Table 1. Compositions of the preparation of the nanoparticles

Formulations	D:P Ratio ^a	Weight (mg)				
		PCL	TW80	SP80	PL188	Drug
Blank	0:10	50	25	25	25	-
IB/IN-NP-2	2:10	50	25	25	25	10
IB/IN-NP-3	3:10	50	25	25	25	15
IB/IN-NP-4	4:10	50	25	25	25	20
IB/IN-NP-5	5:10	50	25	25	25	25

^aDrug:PCL polymer ratio

Nanoparticle characterization

The particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of the obtained nanoparticles were measured by Photon Correlation Spectroscopy (PCS) using Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments, Malvern, UK). The measurements were analyzed with HeNe laser (633 nm, 90° angle) at 25°C.

Drug loading and entrapment efficiency

The nanoparticle dispersion was transferred into Microcon Ultracel YM-30 tube (MW cut-off 30,000 Dalton) (Millipore, Schwalbach, Germany) and centrifugally filtered at 16,000 rpm for 10 min. The amounts of drug in the lyophilized powder and in the filtrate were analyzed by HPLC method. The difference of the amount of drug between in lyophilized powder and in filtrate was used to calculate the amount of drug incorporated in the nanoparticles. The yield, drug loading and entrapment efficiency were calculated according to the following equations (eq. 1-3):

$$\% \text{Yield} = \frac{\text{Amount of lyophilized nanoparticles}}{\text{Initial amount of total solid content}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{Drug Loading} = \frac{\text{Amount of drug in nanoparticles}}{\text{Amount of lyophilized nanoparticles}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{Entrapment Efficiency} = \frac{\text{Amount of drug in nanoparticles}}{\text{Amount of drug fed initially}} \times 100 \quad (3)$$

Quantitative analysis of drug

The amount of drug was quantitatively analyzed by HPLC assay using HPLC spectroscopy (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) consisting of an autoinjector SIL-10A and a pump LC-10AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The quantity of eluted drug through a reverse phase Hypersil ODS column, 5 µm particle size, 250×4.6 mm (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) was detected at 264 nm for IB and 254 nm for IN using a UV detector (Shimadzu SPD-10AV, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The mixture of methanol: water: acetonitrile: acetic acid (35:55:10:1) was used as a mobile phase at the flow rate of 1.4 and 1.2 ml/min for IB and IN, respectively.

Data analysis

The data are present mean values ± standard deviation (SD). Significance of difference was evaluated using Student's t-test and one-way ANOVA at the probability level of 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of poly(caprolactone)

PCL was synthesized by ROP method using 1,4-butanediol and Sn(Oct)₂ as an initiator and a catalyst, respectively. Figure 2 demonstrates NMR spectrum of the synthesized PCL. The $M_{n,theo}$ and $M_{n,NMR}$ were calculated based on theory and ¹H-NMR integral value according to the eq. 4 and 5, respectively, as shown belows:

$$M_{n,theo} = \frac{[CL]}{[I]} \times 114 \quad (4)$$

$$M_{n,NMR} = \frac{2 \times I_A}{I_F} \times 114 \quad (5)$$

where [CL] and [I] are the molar concentrations of CL monomer and initiator, respectively. I_A and I_F are the integrals of methylene proton at 2.30 ppm (peak A, Figure 2) and 3.65 ppm (peak F, Figure 2),

respectively. A factor of 114 refers to the molecular weight of CL monomer.

The molecular weight value was well agreed with the theoretical value as shown in Table 2. The value of $M_{n,GPC}$ was the highest among the other molecular weights due to the fact that this value was relatively calculated using polystyrene as a calibration standard. In general, the molecular weight determined from polystyrene calibration by GPC technique according to Mark-Houwink equation is approximately two times the actual molecular weight as previously reported^{32,33}. The M_w/M_n indicated the broad molecular weight distribution of the synthesized polymer due to the transesterification during the polymerization at high temperature and such broad value was generally obtained when using Sn(Oct)₂ and bi-functional alcohol as a catalyst and an initiator, respectively^{31,32}.

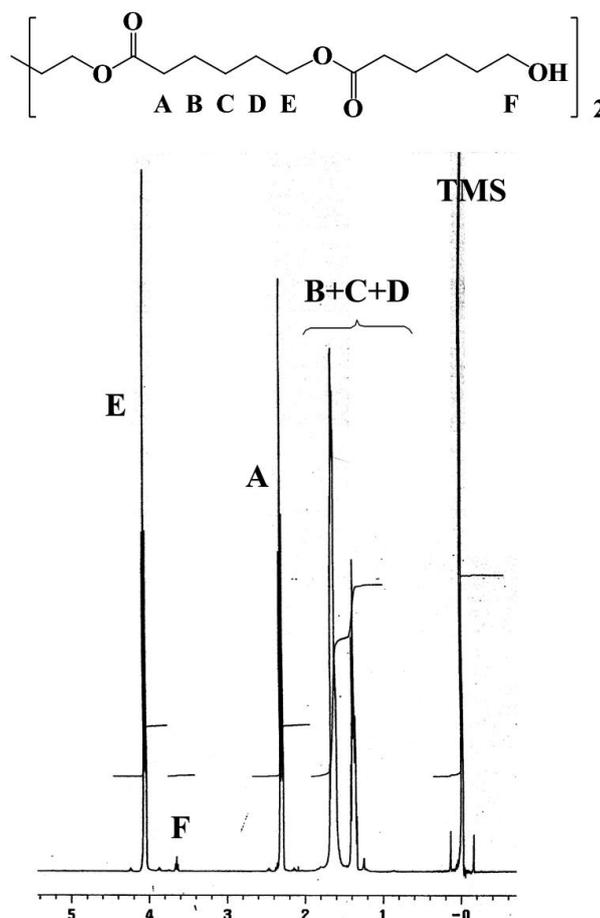


Figure 2. ¹H-NMR spectrum of the synthesized PCL

Table 2. The molecular characteristics of the synthesized PCL

Composition	$M_{n,theo}$	$M_{n,NMR}^a$	$M_{n,GPC}^b$	$M_{w,GPC}^b$	M_w/M_n^b
PCL	11,400	10,643	14,369	9,934	1.45

^adetermined by ¹H-NMR spectroscopy

^bdetermined by GPC

Nanoparticle formation

To prepare nanoparticles of PCL having hydrophobic core, the stabilizer was essentially involved in the formulation. Typically, TW80 and SP80 have been used to stabilize emulsion in topical medication. In our preliminary study, it was found that the use of this pair of surfactants could not stabilize PCL nanoparticles in an aqueous dispersion. PL188, which is widely used as a steric stabilizer in the formation of polyester nanoparticles, was added in the formulation to additionally stabilize the PCL nanoparticles. The particle size of the blank nanoparticles was found to be 219 nm with negative surface charge (approx. -16 mV) (Table 3). Figure 3 illustrates the effect of D:P ratio on the particle size and zeta potential of the nanoparticles. After incorporation of IB, the particle size and PDI gradually increased when D:P ratio increased. In the meantime, increasing D:P ratio tentatively increased the particle size of the IN-loaded nanoparticles and the PDI increased with the increasing particle size. This might be due to the fact that increasing D:P ratio led to more amount of drug incorporated into the polymeric core of the nanoparticles as can be seen from %DL that at the constant amount of solid content, increasing the drug added resulted in the increase in %DL (Figure 4B). The particle size of IB-loaded nanoparticles was significantly larger than that of IN-loaded nanoparticles although IN displays the higher molar volume than IB indicating the bigger molecular size of IN (209.8 mL/mole for IN and 195.5 mL/mole for IB³⁴). According to the molar volume, it was anticipated that the particle size of IN-loaded nanoparticles would be larger than IB-loaded nanoparticles. However, the

opposite result was obtained probably due to the fact that the different characteristic of drug may have an individual effect on the polymer and SP80 during the incorporation process, based on the nanoprecipitation method, resulting in the slightly compacted polymeric core^{35,36}.

As compared to the surface charge of the blank nanoparticles, after loading IB, the surface charge of the IB-loaded nanoparticles was not affected by the presence of IB. On the contrary, IN suppressed the surface charge of the nanoparticles to be more negative than that of the blank nanoparticles and also IB-loaded nanoparticles (Table 3). The more negative charge of IN-loaded nanoparticles was presumably contributed to some extent of IN molecules which deposited nearby the surface of nanoparticles. Since a pair of surfactants was used to stabilize the nanoparticles during the nanoparticle formation, the molecule of IN might be inserted between the interface of nanoparticles thereby affecting the surface charge of particle. The more negative charge of drug-loaded nanoparticles has been previously reported with increasing D:P ratio and %DL, unfortunately no explanation has been stated^{37,38}. From the results, the higher %DL of IN than IB at all D:P ratios led to the more negative charge of IN- than IB-loaded nanoparticles. Nonetheless, the more negative charge of nanoparticles did not correlate to the increasing %DL of both loaded drugs in nanoparticles which may be due to the increment in size distribution as particle size increased. Thus, it may be deduced that the characteristics of entrapped drug independently affected the surface charge of nanoparticles depending on amount of drug deposited on the surface of particle.

Table 3. The physicochemical characteristics of nanoparticles

Formulations	D:P Ratio ^a	Size ^b (nm)	PDI ^b	Zeta Potential ^b (mV)
Blank	0:10	219± 5	0.071±0.030	-16.2±6.4
IB				
IB-NP-2	2:10	257±9	0.036±0.009	-19.5±6.5
IB-NP-3	3:10	312±10	0.162±0.034	-14.3±6.4
IB-NP-4	4:10	391±4	0.453±0.040	-19.1±6.4
IB-NP-5	5:10	421±7	0.358±0.037	-17.3±6.5
IN				
IN-NP-2	2:10	278±8	0.035±0.019	-25.9±6.4
IN-NP-3	3:10	260±11	0.036±0.017	-27.6±6.5
IN-NP-4	4:10	309±10	0.198±0.037	-25.1±6.5
IN-NP-5	5:10	293±10	0.119±0.017	-24.1±6.5

^a Drug:PCL polymer ratio

^bThe experiments were performed in triplicate and the values are expressed as mean±SD.

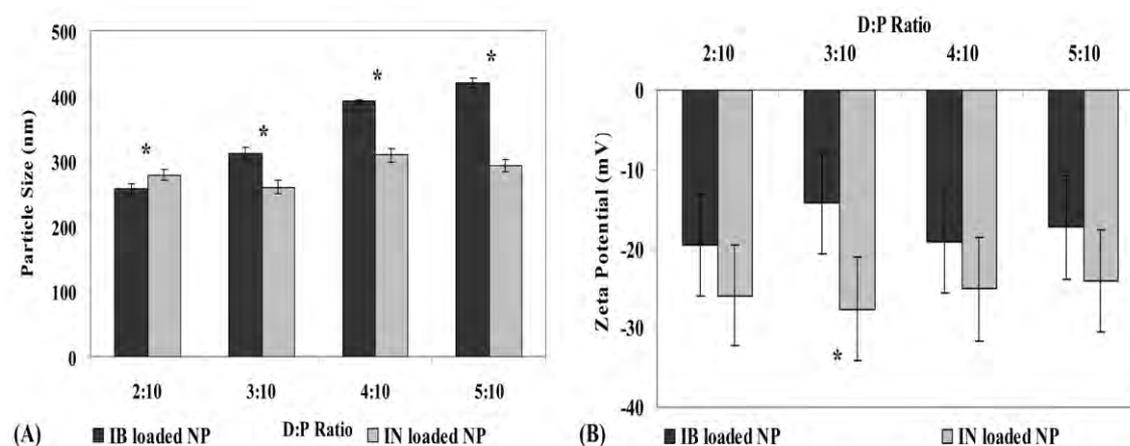


Figure 3. The effect of drug:PCL polymer ratio (D:P ratio) on the particle size (A) and zeta potential (B) of the ibuprofen- and indomethacin-loaded nanoparticles. *Statistically significant different comparing between the different drug at the same D:P ratio (n=3).

Drug loading and entrapment efficiency

Figure 4 shows the effect of D:P ratio on %yield, %DL, and %EE of the drug-loaded nanoparticles. From Figure 4B, it was found that the values of %DL of the two drugs loaded nanoparticles significantly increased when increasing the D:P ratio (p -value < 0.05) indicating the increase in the amount of drugs incorporated into the nanoparticles. However, %yield (Figure 4A) and %EE (Figure 4C) of the IB-loaded nanoparticles gradually decreased

(p -value < 0.05) while these values of the IN-loaded nanoparticles increased and reached the maximum values at 3:10 ratio (p -value < 0.05). The decreases in %yield and %EE were due to the calculation of both values based on the total solid content at initial feeding. Increasing D:P ratio increased the total solid content, whereas the amount of drug entrapped was not linearly increased with D:P ratio. From the results, the D:P ratios of IB- and IN-loaded nanoparticles, at which the highest %EE

and % yield were obtained, were found to be 2:10 and 3:10, respectively. The significant difference in loading capacity and entrapment efficiency between IB and IN could be explained by the great difference in an aqueous solubility of both drugs. Due to the higher solubility of IB in water (approx. 0.23 mg/mL⁵), the IB molecules were preferable more dissolved in water during the nanoparticle formation and less partitioned into hydrophobic core resulting in the less amounts entrapped in hydrophobic core. In contrast, IN showed the higher entrapment in hydrophobic core due to the less solubility in water (~ 0.016 mg/mL³⁹). The obtained result is consistent with the previous report on the lower drug loading and entrapment efficiency of the hydrophilic drug, such as ibuprofen and ketoprofen, in nanoparticles using nanoprecipitation method as compared to the lipophilic drug, i.e. indomethacin and cyclosporine^{40,41}. Therefore, it can be deduced that the solubility of drug greatly affected the loading capacity and entrapment efficiency rather

than the other characteristics when the preparation of drug-loaded nanoparticles based on the nanoprecipitation technique.

In the current work, the nanoprecipitation method was applied to prepare the nanoparticles. With this technique, it has been well-documented that it is basically based on the interfacial turbulence and the diffusion process of organic phase into water phase^{42,43}. Once the polymeric solution gently added into aqueous phase, the solvent diffuses to aqueous medium taking together with the dissolved polymer and then the hydrophobic polymer solidifies leading to the hydrophobic polymeric core of nanoparticles. Therefore, the solvent-water, solvent-polymer, and water-polymer interactions have to be taken into account for the determining factors of the characteristic of nanoparticles⁴⁴⁻⁴⁶. Also, the possible interaction of loaded drug to the other components occurring during the nanoprecipitation can affect the characteristic of drug-loaded nanoparticles as described earlier in each section.

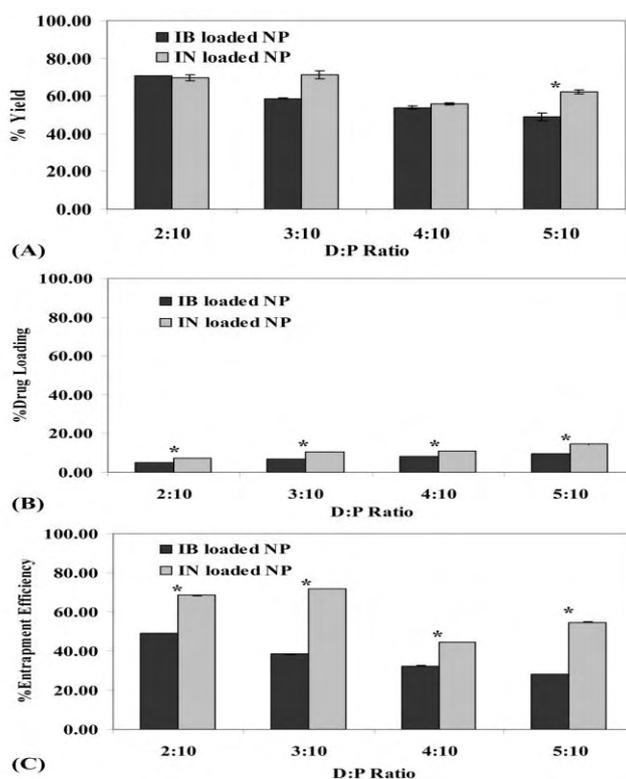


Figure 4. The relationship between drug:PCL polymer ratio (D:P ratio) with % yield, % drug loading, and % entrapment efficiency. *Statistically significant different comparing between the different drug at the same D:P ratio (n=3).

CONCLUSION

PCL polymer synthesized by ROP could be formulated as the nanoparticles using TW80 and SP80 as surfactants and PL188 as a steric stabilizer with the particle size as small as 219 nm. After drug loading, the physicochemical properties of drug-loaded nanoparticles, namely particles size, size distribution, and zeta potential, did greatly depended on the different characteristics of incorporated drug. Besides, the different aqueous solubility of both drugs affected the entrapment efficiency and loading capacity of the PCL nanoparticles. The less soluble drug, IN, was higher entrapped in the hydrophobic core of the PCL nanoparticles as compared to IB. The results showed that the highest %EE and %yield were obtained at drug to PCL polymer ratio of 2:10 and 3:10 for IB and IN, respectively, and the highest loading capacity was attained at 5:10 for both drugs. It can be concluded that the physicochemical property of drug individually affects the characteristics of drug-loaded nanoparticles and should be concerned for the development of drug-loaded nanoparticles.

ACKNOWLEDGEMENT

Financial supports from the Thailand Research Fund (TRF) through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0189/2547) and the Thai Research Fund and Commission of Higher Education, Thailand for the research funding (RMU 5180019) are gratefully acknowledged. The authors are very pleased to acknowledge the National Metal and Materials Technology Center (MTEC, Pathumthani, Thailand) for GPC experiment.

REFERENCES

1. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001; 70:1-20.
2. Al-Saidan SM. Transdermal self-permeation enhancement of ibuprofen. *J Control Release* 2004; 100:199-209.
3. Castelli F, Puglia C, Sarpietro MG, Rizza L, Bonina F. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *Int J Pharm* 2005; 304:231-8.
4. Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, Ghazouani FE, Sapin A, Hoffman M, et al. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *Int J Pharm* 2007; 344:53-61.
5. Jiang B, Hu L, Gao C, Shen J. Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a coprecipitation method and their release properties. *Int J Pharm* 2005; 304:220-30.
6. Kim IS, Jeong YI, Cho CS, Kim SH. Core-shell type polymeric nanoparticles composed of poly(L-lactic acid) and poly(N-isopropylacrylamide). *Int J Pharm* 2000; 211:1-8.
7. Kim SY, Lee YM, Shin HJ, Kang JS. Indomethacin-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymeric nanosphere: pharmacokinetic characteristics of indomethacin in the normal Sprague-Dawley rats. *Biomaterials* 2001; 22:2049-56.
8. Kim SY, Shin IG, Lee YM, Cho CS, Sung YK. Methoxy poly(ethylene glycol) and ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin.: II. Micelle formation and drug release behaviours. *J Control Release* 1998; 51:13-22.
9. Pathak P, Mezziani MJ, Desai T, Sun YP. Formation and stabilization of ibuprofen nanoparticles in supercritical fluid processing. *J Supercrit Fluids* 2006; 37: 279-86.
10. Thompson CJ, Hansford D, Higgins S, Rostron C, Hutcheon GA, Munday DL. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. *Int J Pharm* 2007; 329:53-61.
11. Shin IG, Kim SY, Lee YM, Cho CS, Kiel SY. Methoxy poly(ethylene glycol)/ ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin.: I. Preparation and characterization. *J Control Release* 1998; 51:1-11.
12. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm* 2004; 278:1-23.
13. Yavuz H, Babaç C, Tuzlakoglu K, Pişkin E. Preparation and degradation of L-lactide and ϵ -caprolactone homo and copolymer films. *Polym Degrad Stab* 2002; 75:431-7.
14. Qian H, Bei J, Wang S. Synthesis, characterization and degradation of ABA block copolymer of L-lactide and ϵ -caprolactone. *Polym Degrad Stab* 2000; 68:423-9.
15. Espuelas MS, Legrand P, Irache JM, Gamazo C, Orecchioni AM, Devissaguet JP, et al. Poly(ϵ -caprolactone) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. *Int J Pharm* 1997; 158:19-27.

16. Zili Z, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int J Pharm* 2005; 294:261-7.
17. Singh J, Pandit S, Bramwell VW, Alpar HO. Diphtheria toxoid loaded poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods* 2006; 38:96-105.
18. Chawla JS, Amiji MM. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm* 2002; 249:127-38.
19. Park EK, Lee SB, Lee YM. Preparation and characterization of methoxy poly (ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005; 26:1053-61.
20. Alvarez-Román R, Barré G, Guy RH, Fessi H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur J Pharm Biopharm* 2001; 52:191-5.
21. Ferranti V, Marchais H, Chabenat C, Orecchioni AM, Lafont O. Primidone-loaded poly- ϵ -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. *Int J Pharm* 1999; 193:107-11.
22. Huang MJ, Gou ML, Qian ZY, Dai M, Li XY, Cao M, et al. One-step preparation of poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for plasmid DNA delivery. *J Biomed Mater Res* 2008; 86A:979-86.
23. Simon LS. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective inhibitors. In: Smith HS, ed. *Drugs for pain*. Philadelphia: Hanley & Belfus, Inc. 2002:41-54.
24. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Anti-inflammatory and immunosuppressant drugs. In: Dimock K, McGrath S, Cook L, eds. *Rang and Dale's pharmacology*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier 2007:226-47.
25. Burke A, Smyth E, FitzGerald GA. Analgesic-antipyretic agents; Pharmacotherapy of gout. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed. New York: McGraw-Hill 2006:671-716.
26. Branchu S, Rogueda PG, Plumb AP, Cook WG. A decision-support tool for the formulation of orally active, poorly soluble compounds. *Eur J Pharm Sci* 2007; 32:128-39.
27. Sarisuta N, Kumpugdee M, Müller BW, Puttipipatkachorn S. Physico-chemical characterization of interactions between erythromycin and various film polymers. *Int J Pharm* 1999; 186:109-18.
28. Liu J, Xiao Y, Allen C. Polymer-drug compatibility: A guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine. *J Pharm Sci* 2004; 93:132-43.
29. Nair R, Nyamweya N, Gönen S, Martínez-Miranda LJ, Hoag SW. Influence of various drugs on the glass transition temperature of poly(vinylpyrrolidone): a thermodynamic and spectroscopic investigation. *Int J Pharm* 2001; 225:83-96.
30. Suksiriworapong J, Sripa K, Junyaprasert VB. Synthesis and characterization of bioactive molecules grafted on poly(ϵ -caprolactone) by "click" chemistry. *Polymer* 2010; 51:2286-95.
31. Kricheldorf HR, Bornhorst K, Hachmann-Thiessen H. Bismuth(III) n-hexanoate and tin(II) 2-ethylhexanoate initiated copolymerizations of ϵ -caprolactone and L-lactide. *Macromolecules* 2005; 38:5017-24.
32. Schindler A, Hibionada YM, Pitt CG. Aliphatic polyesters. III. Molecular weight and molecular weight distribution in alcohol-initiated polymerizations of ϵ -caprolactone. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* 1982; 20:319-26.
33. Gautier S, D'Aloia V, Halleux O, Mazza M, Lecomte P, Jérôme R. Amphiphilic copolymers of ϵ -caprolactone and γ -substituted ϵ -caprolactone. Synthesis and functionalization of poly(D,L-lactide) nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003; 14:63-85.
34. Zhang J, Li S, Li X, Li X, Zhu K. Morphology modulation of polymeric assemblies by guest drug molecules: TEM study and compatibility evaluation. *Polymer* 2009; 50:1778-89.
35. Michailova V, Berlinova I, Iliev P, Ivanov L, Titeva S, Momekov G, et al. Nanoparticles formed from PNIPAM-g-PEO copolymers in the presence of indomethacin. *Int J Pharm* 2010; 384:154-64.
36. Giacomelli C, Schmidt V, Borsali R. Specific interactions improve the loading capacity of block copolymer micelles in aqueous media. *Langmuir* 2007; 23:6947-55.
37. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release* 1999; 57:171-85.

38. Redhead HM. Drug loading of biodegradable nanoparticles for site specific drug delivery. Nottingham: University of Nottingham; 1997.
39. Zhang JX, Li XJ, Qiu LY, Li XH, Yan MQ, Yi J, et al. Indomethacin-loaded polymeric nanocarriers based on amphiphilic polyphosphazenes with poly (N-isopropylacrylamide) and ethyl tryptophan as side groups: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release* 2006; 116:322-9.
40. Corrigan OI, Li X. Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. *Eur J Pharm Sci* 2009; 37:477-85.
41. Barichell JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25:471-6.
42. Miller CA. Spontaneous emulsification produced by diffusion:A Review. *Colloids Surf* 1988; 29:89-102.
43. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989; 55:R1-R4.
44. Nguyen THA, Nguyen VC. Formation of nanoparticles in aqueous solution from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone). *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* 2010; 1:025012.
45. Legrand P, Lesieur S, Bochot A, Gref R, Raatjes W, Barratt G, et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int J Pharm* 2007; 344:33-43.
46. Lee JS, Hwang SJ, Lee DS. Formation of poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles via nanoprecipitation. *Macromol Res* 2009; 17:72-8.

Functionalized (poly(ϵ -caprolactone))₂-poly(ethylene glycol) nanoparticles with grafting nicotinic acid as drug carriers

Jiraphong Suksiriworapong^a, Kittisak Sripha^b, Jörg Kreuter^c, Varaporn Buraphacheep
Junyaprasert^{a*}

^a Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok
10400, Thailand

^b Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol
University, Bangkok 10400, Thailand

^c Institute of Pharmaceutical Technology, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 9
(Biozentrum), D-60438 Frankfurt am Main, Germany

* Corresponding author: Tel/Fax: +66-2-644-8694, E-mail: pyvbp@mahidol.ac.th

Abstract

This study aimed to investigate the effect of various amount of nicotinic acid grafted along (poly(ϵ -caprolactone))₂-poly(ethylene glycol) copolymer on nanoparticle characteristics. Ibuprofen and indomethacin represented two different molecular characteristics which were chosen as model drugs to incorporate to the nanoparticles. The grafting nicotinic acid potentially influenced the physicochemical properties of the nanoparticles in terms of particle size, drug loading capacity, and release profile. The increasing amount of grafting nicotinic acid increased the particle size as a consequence of an increase in hydrophobic property of copolymer. The enhancement of loading capacity of both drugs was contributed to the presence of grafting nicotinic acid as compared to the nanoparticles without grafting nicotinic acid. However, no correlation of amount of grafting nicotinic acid and loading capacity was observed. The release characteristic of both drugs was fitted to Higuchi model indicating Fickian's diffusion. The release characteristic of indomethacin was mainly depended on the crystalline property of copolymer whereas that of ibuprofen was additionally contributed to the hydrogen bonding between drug and the grafted copolymer. These contributing factors were resulted from the presence of grafting nicotinic acid along the copolymer backbone.

Keywords

Ibuprofen, indomethacin, nanoparticle, nicotinic acid, poly(ϵ -caprolactone), poly(ethylene glycol)

1. Introduction

Poly(ϵ -caprolactone)-co-poly(ethylene glycol) copolymer (PCL-PEG) has been extensively studied and developed as drug delivery systems including microparticles and nanoparticles (Gou et al. 2009; Huang et al. 2008; Lee et al. 2009; Nguyen and Nguyen 2010; Vroman et al. 2007a; Zhang et al. 2004a; Zhou et al. 2003). Owing to the amphiphilic property of this copolymer, it showed advantages over PCL polymer such as self-assembly forming particulate carriers, decreased uptake by the liver and kidney, and prolonged retention in the blood (Alexis et al. 2008; Chausson et al. 2008; Gou et al. 2009; Hu et al. 2003; Peng et al. 2008; Shenoy and Amiji 2005; Wei et al. 2009b; Zhang et al. 2004b; Zhang and Zhuo 2005). As a result, they have been used to encapsulate various kinds of drug to overcome the drawback of drug, to bypass the limitation of conventional dosage form, or to offer controlled release action (Wei et al. 2009a).

To increase efficacy for drug delivery, the functionalized polymers have been substantially synthesized (Lou et al. 2003; Riva et al. 2008; Trollsas et al. 2000; Vroman et al. 2007b). Their physicochemical properties in terms of polymer behaviors and colloidal characteristics have been investigated to augment the efficiency of drug delivery carrier. It is widely known that any functional groups attaching along polymer backbone influence directly on the polymer property and indirectly on the nanoparticle property (Sinko 2006). Hence, all attaching functional groups may provide the unique polymer characteristics and play an important role in drug delivery systems. A few reports have established the effect of copolymer composition on drug loading capacity and release profile, for example pegylated

poly(lactide) functionalized with carboxylic group (Lee et al. 2004) and polyphosphazenes attached with ethyl tryptophan (Zhang et al. 2006a) etc. Therefore, it led to an interest to modify PCL-PEG copolymer by attachment of a functional group, which could affect the properties of the nanoparticles formed by this modified copolymer.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is one of the most widely used medicines for the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis, inflammations, and a variety of pains (Simon 2002). Among many NSAIDs, ibuprofen (IBU) and indomethacin (IND) are commonly used which have the different physicochemical characteristics in terms of molecular size, water-solubility, and molecular structure. These two drugs with different properties were chosen to investigate the compatibility and interaction with the copolymers which may be ultimately responsible for the drug loading and release characteristics. The interaction may involve Van der waal force, dipole-dipole interaction, and hydrogen bonding (Van Krevelen and Te Nijehuis 2009). Not only the nature of carrier but also the molecular characteristic of drug can affect the properties of carriers, such as stability, drug loading capacity, drug entrapment efficiency, and drug release profile (Liu et al. 2004; Nair et al. 2001; Sarisuta et al. 1999). Therefore, various characteristics of drugs and polymers can possess the interactions that lead to differences in the characteristics of carriers. Our previous reports have demonstrated the effect of the different characteristics of grafting pharmacologically active compounds (nicotinic acid (NI) and *p*-aminobenzoic acid) on the feasibility of grafting reaction on (poly(ϵ -caprolactone))₂-co-poly(ethylene glycol) copolymer ((PCL)₂-PEG) (Suksiriworapong et al. 2011). It was reported that the properties of NI grafted copolymer ((P(NICL))₂-PEG) depended on the amounts of grafting NI on the copolymer. Therefore, it is of interest to

investigate an influence of the grafted copolymer on the physicochemical properties of the nanoparticles.

In this study, we aimed to investigate the effect of grafting NI along (PCL)₂-PEG copolymer on nanoparticle formation and characteristics. (PCL)₂-PEG copolymers containing various amount of grafting NI were used to prepare the nanoparticles. The physicochemical properties of (P(NICL))₂-PEG nanoparticles in terms of particle size, morphology, surface charge, and toxicity were evaluated in comparison with (PCL)₂-PEG nanoparticles. Subsequently, IBU and IND were chosen as model drugs and loaded at various drug to polymer ratios. The effect of characteristics of drug and the grafted copolymer on physicochemical properties of drug loaded nanoparticles was investigated in terms of drug loading capacity, release characteristic, and possible interaction between the drug and the grafted copolymer.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

NI (Ajax Finechem, New south wales, Australia) was used without purification. But-3-ynyl nicotinate was synthesized as previously reported (Suksiriworapong et al. 2010a). Azide pending (PCL)₂-PEG copolymer ((P(N₃CL))₂-PEG) was fabricated according to our reported procedure (Suksiriworapong et al. 2011). Copper (I) iodide (CuI), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), L-glutamine, fetal bovines serum (FBS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (Steinheim, Germany). MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) was obtained from Fluka Chemie (Steinheim, Germany). Milli-Q water was used by purification with a Synergy[®] (Millipore, Molsheim, France). IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium) was obtained from Biochrom AG (Berlin, Germany). Penicillin/streptomycin (Hoechst, Germany), sodium-dodecyl-sulfate (SDS) (MP

Biochemicals, LLC, Heidelberg, Germany), trypsin (Difco, Germany), 100 % Acetic acid (VWR International S.A.S, Darmstadt, Germany), and other organic solvents were used as received. HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) were isolated from human umbilical cord donated from Nordwest Krankenhaus (Nordwest Hospital, Frankfurt, Germany). Acetonitrile and Methanol from Merck (Darmstadt, Germany) were of HPLC grade. IBU and IND were kindly gifted from Vita Co.Ltd. and Government of Pharmaceutical Organization (GPO) (Bangkok, Thailand).

2.2 Preparation and characterization of preformed pegylated copolymers

NI was grafted along $(P(N_3CL))_2$ -PEG backbone by “click reaction” according to our published method (Suksiriworapong et al. 2010a; Suksiriworapong et al. 2011). But-3-ynyl nicotinate was grafted at azide position using CuI as a catalyst and DBU as a base. The grafting reaction was conducted at 40 °C for 4 h. The % molar grafting was varied at 10, 20, and 30 % based on hydrophobic segments. $(PCL)_2$ -PEG was synthesized by ring-opening polymerization at 120 °C for 24 h and used as a template copolymer in comparison. The obtained copolymers were characterized by gel permeation chromatography (GPC) using a Water 150-CV gel permeation chromatograph for the number- and weight-average molecular weights (M_n and M_w , respectively). The copolymer was eluted through PLgel 10 μ m mixed B column at a flow rate of 1 ml/min using tetrahydrofuran (THF) as a mobile phase. The M_n and M_w values were evaluated from the standard curve calibrated with polystyrene standard. 1H -NMR spectroscopy was applied for the calculation of % molar grafting using Bruker Avance 300 apparatus. Deuterated chloroform was used as a solvent and the % molar grafting was calculated by the integrals of characteristic peaks in 1H -NMR spectrum according to the published calculation method (Suksiriworapong et al. 2011). To investigate the polymorphism of pegylated copolymers, differential

scanning calorimetry (DSC) was performed and the DSC thermograms were recorded at the second heating run cycle at 20 °C/min over the temperature range of -80 °C to 100 °C.

2.3 Nanoparticle preparation of preformed pegylated copolymers

The nanoparticles were prepared by solvent diffusion and evaporation technique as reported elsewhere (Espuelas et al. 1997; Khoee et al. 2007). Firstly, a known amount of the preformed pegylated copolymer was dissolved in 10 ml of THF. The polymeric solution (10 mg/ml) was then gently added into 16 ml of Milli-Q water under stirring at 1000 rpm. THF was evaporated under reduced pressure and the final volume was readjusted to 16 ml. The obtained dispersion was filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore, Schwalbach, Germany) to get rid of aggregates. Finally, a milliliter of the nanoparticles was added into 2-ml vials and then frozen prior to freeze drying process. The freeze dried powder of the nanoparticles was attained after 48 h of freeze drying process. The actual weight of the obtained powder was recorded. In case of drug loading, a preset amount of drug was initially dissolved together with the copolymer. The drug to polymer mass ratios (D:P) were set at 2:10 and 3:10. The drug-loaded nanoparticles were prepared as previously described.

2.4 Toxicity assay of pegylated nanoparticles

The pegylated nanoparticles were assessed their toxicity by MTT assay using HUVECs models. Cells were grown in IMDM culture medium containing 1 % penicillin/streptomycin, 2 % glutamine, 3 % bicarbonate solution, 15 % FBS and 0.1 % fibroblast growth factor. Cells (50 µl) at the density of 3×10^5 cells/ml were seeded in a 96-well plate and incubated in a 5 % CO₂ atmosphere at 37 °C. After 24 h of incubation, cells were incubated for another 24 h with an equal volume of the pegylated nanoparticles dispersed in culture medium. The final concentrations of the

nanoparticles were varied in the range of 0.01 – 1.56 µg/ml. Subsequently, a 25 µl of MTT solution was added to each well. After 6 h of incubation, cells were finally incubated with an SDS solution for 6 h. % Cell viability was calculated according to equation (1) and the cells incubated without the nanoparticles was used as control.

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{(A_{S,560} - A_{S,620})}{(A_{C,560} - A_{C,620})} \times 100 \quad (1)$$

where A_S and A_C denote the absorbance measured from the sample incubated with and without the nanoparticles, respectively. The numeric subscripts denote the measuring wavelength.

2.5 Particle size and zeta potential measurement

The determination of mean particle size (z-ave) and zeta potential (ZP) was performed by Photon Correlation Spectroscopy (PCS) by means of Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments, Malvern, UK). All samples were diluted with Milli-Q water prior to measurement and measured with HeNe laser at the wavelength of 633 nm, a 90° angle, and a temperature of 25 °C. All measurements were performed in triplicate.

2.6 Particle morphology observation

The samples were sputtered with gold (Agar Sputter Coater) for 45 s prior to measurement. The morphology of the nanoparticles was observed by scanning electron microscope (Hitachi S4500, Tokyo, Japan) equipped with field-emissions-cathode using 15 kV upper detector. The photograph was operated by Digital Image Processing System 2.6 (Firma Point Electronic, Halle, Germany).

2.7 Drug loading and entrapment efficiency evaluation

The drug loading (% DL) and entrapment efficiency (% EE) were evaluated by direct and indirect methods as reported earlier (Avgoustakis et al. 2002; Kisich et al. 2007).

For the indirect procedure, the amount of drug in the filtrate was analyzed after

centrifugal filtration at 16000 rpm using Microcon Ultracel YM-30 tube (MWCO 30,000 Da) (Millipore, Schwalbach, Germany). For the direct method, the amount of drug in the dispersion was directly analyzed after fresh preparation. The nanoparticles were dissolved in a mobile phase and sonicated for 30 min. Then the precipitate was centrifuged at 16,000 rpm for 10 min. The supernatant was collected and analyzed by HPLC. The amount of drug entrapped in the nanoparticles was calculated from the different amount of drug obtained from the direct and the indirect methods. Yield, drug loading and entrapment efficiency were calculated according to equations below.

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{Weight of freeze dried nanoparticles}}{\text{Initial weight of solid content}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Amount of entrapped drug in nanoparticles}}{\text{Amount of drug fed initially}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ DL} = \frac{\text{Amount of entrapped drug in nanoparticles}}{\text{Weight of freeze dried nanoparticles}} \times 100 \quad (4)$$

The weight of freeze dried nanoparticles in equation (4) was the difference between the actual weight of freeze dried powder and the amount of non-entrapped drug presented in the filtrate as determined by the indirect method.

2.8 *In vitro* drug release study

The release study was performed by dialysis method as reported elsewhere (Avgoustakis et al. 2002; Zhang and Zhuo 2005). Briefly, 2.0 ml of the drug loaded nanoparticles were enclosed in dialysis membrane (MWCO, 6000 – 8000 Da, Bioron GmbH, Ludwigschafen, Germany). It was then immersed in phosphate buffered solution pH 7.4 used as a receptor medium. The experiment was performed at 37 °C under magnetic stirring at 130 rpm. At predetermined time, 0.5 ml of aliquot was withdrawn and then the amount of drug released was analyzed by HPLC method as

described below. After sampling, an equal volume of fresh medium was added immediately.

2.9 HPLC analysis

The quantitative analysis of drug was conducted by HPLC (LaChrom, Tokyo, Japan) equipped with diode array detector (LaChrom model L-7455). IBU and IND were eluted through a reverse phase Hypersil ODS column, 5 μm particle size, 250 \times 4.6 mm (Thermo Scientific, USA) at flow rates of 1.4 and 1.2 ml/min, respectively. The mixture of methanol: water: acetonitrile: acetic acid (55:35:10:1) was used as a mobile phase. The amount of IBU was calculated at wave length of 264 nm using a standard curve over the range of 2.5 – 40 $\mu\text{g/ml}$, while that of IND was done at 254 nm using a standard curve over the range of 0.25 – 40 $\mu\text{g/ml}$. The injection volume was 20 μl .

2.10 FT-IR measurement

The interaction between drug and pegylated copolymer was evaluated by FT-IR spectroscopy. The sample was prepared by dissolving the sample in THF. One drop of sample solution was spread on KBr disc and allowed to dry in desicator. The measurement was conducted by Nicolet 6700 FT/IR spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA). The absorption spectra of drug, NI grafted copolymer, and the mixture between drug and NI grafted copolymer were recorded.

2.11 Statistical analysis

Results are depicted as mean \pm S.D. at least three measurements. The t-test or one way ANOVA applied post hoc for paired comparisons were performed to compare two or multiple groups, respectively. All analyses were determined using the SPSS

program (SPSS 13.0 for windows) and differences were considered to be significant at a level of p -value < 0.05 .

3. Results and discussion

3.1 Preformed pegylated copolymers

According to our published method, NI grafted (PCL)₂-PEG copolymers were achieved by “click reaction”. All molecular characteristics of pegylated copolymers are compiled in Table 1. The molecular weight of pegylated copolymers decreased with increasing % molar grafting while the M_w/M_n values were not different among all pegylated copolymers. The T_g of pegylated copolymers tended to increase, whereas the T_m and enthalpy of melting (ΔH_m) decreased with the increasing % molar grafting. According to the DSC results, it was suggested that the grafting with NI trended to reduce crystalline property of pegylated copolymers.

3.2 Unloaded nanoparticles of preformed pegylated copolymers

All (P(NICL))₂-PEG copolymers were further used in nanoparticle preparation. The (PCL)₂-PEG nanoparticles were used in comparison. The characteristics of unloaded nanoparticles are shown in Table 2. Using solvent diffusion and evaporation method, % yield of all unloaded nanoparticles was higher than 78%. All (P(NICL))₂-PEG nanoparticles were smaller than (P(CL))₂-PEG nanoparticles and their particle size increased with the increasing % molar grafting. The increasing % molar grafting increased the hydrophobic property of pegylated copolymers and thus increased the particle size of nanoparticles (Jones and Leroux 1999; Shin et al. 1998; Zhang et al. 2006b). The ZP of (P(NICL))₂-PEG nanoparticles was higher than that of (PCL)₂-PEG nanoparticles suggesting that the grafting NI component may be presented on the surface of nanoparticles. The unloaded (P(NICL))₂-PEG nanoparticles showed almost spherical in shape as observed in Fig. 1.

3.3 Toxicity assay of pegylated nanoparticles

The toxicity results are illustrated in Table 2 and expressed as TC_{80} representing the toxic concentration of nanoparticles of less than 80 % of cell viability. As illustrated, the TC_{80} values decreased with the increasing % molar grafting. From the results, it was notable that the increasing % molar grafting NI increased toxicity of pegylated copolymer in form of nanoparticles.

3.4 Drug loaded nanoparticles of preformed pegylated copolymers

IBU and IND were chosen as model drugs to investigate the effect of grafting NI on the drug loading capacity. Table 3 combines % yield and % EE of IBU and IND loaded nanoparticles. The yield of all drug loaded nanoparticles was higher than 70 %. At least 67 % of IBU was entrapped in the nanoparticles. IND was significantly higher entrapped in $(PCL)_2$ -PEG and $(P(NICL))_2$ -PEG nanoparticles than IBU (p -value < 0.05) except for $(PCL)_2$ -PEG nanoparticles loaded at 3:10. The higher % EE of IND was attributed to the lower water-solubility of IND as compared to that of IBU (Jiang et al. 2005; Zhang et al. 2006a). During the nanoparticle formation, the IND molecules were less dissolved in water and more partitioned into hydrophobic core. This result is consistent with the previous report on the comparison of entrapment efficiency of loaded drugs having the different water-solubility (Barichell et al. 1999; Corrigan and Li 2009; Suksiriworapong et al. 2010b). In case of IND loaded $(PCL)_2$ -PEG nanoparticles at 3:10, the dramatic reduction of % EE could be due to the limitation of the system. % EE of both drugs increased when incorporated to the NI grafted copolymer nanoparticles in particular at D:P of 3:10 (p -value < 0.05) probably resulted from the increase in the hydrophobicity of the grafted copolymer. Fig. 2 demonstrates z-ave and ZP values of drug loaded nanoparticles. After incorporation of both drugs in $(P(NICL))_2$ -PEG nanoparticles, most formulations showed larger

particle size as compared to the unloaded nanoparticles. The ZP of IBU loaded (P(NICL))₂-PEG nanoparticles tended to increase while that of IND loaded nanoparticles showed the opposite result. However, no relation of ZP and amount of loaded drug was evidently found. In Fig. 3, the increasing amount of loaded drug increased % DL of both drugs in (P(NICL))₂-PEG nanoparticles. In addition, the nanoparticles containing grafting NI revealed the higher % DL as compared to those without grafting except for IND loaded at 2:10. However, the increasing % molar grafting did not significantly correlate to % DL. It could be deduced that the presence of grafting NI enhanced the loading capacity of (PCL)₂-PEG nanoparticles presumably owing to the enhancing hydrophobic property of grafted copolymer. The drug loaded (P(NICL))₂-PEG nanoparticles remained spherical in shape as exemplified in Fig. 4.

3.5 In vitro drug release

In the present experiment, the nanoparticles containing 10 % and 20 % molar grafting NI and loading with drug at D:P of 2:10 were chosen for the release study in comparison with (PCL)₂-PEG nanoparticles. Fig. 5 displays the release profiles of drug loaded nanoparticles. The data from the release curves of all nanoparticles indicated the linear relationship following the Higuchi model (Higuchi 1963), as seen in Fig. 6. The slope and r^2 of the fitted linear curves of all formulations are listed in Table 4. All release profiles were fitted to the Higuchi model over the initial 4 h of the release with $r^2 > 0.941$ indicating the Fickian diffusion. In case of (PCL)₂-PEG nanoparticles, about 80 % of both drugs was released over 24 h (Fig. 5). The release profile and release rate of IND were not different to those of IBU. However, it was expected that the less water-soluble drug, IND, would be released lower and slower than the higher water-soluble drug, IBU, from the same nanocarrier. Indeed, the release rate and amount of drug release depended on the surface area and the initial drug concentration in the system. From the result, the particle size of both drugs loaded (PCL)₂-PEG nanoparticles were not significantly different referring the indifferent surface area. The insignificant difference in the release rate and profile of IND and IBU were probably attributed to the significantly higher % DL of IND. The higher % DL thus enhanced the drug released from the carrier although the water-solubility of IBU was higher than that of IND

บทความสำหรับเผยแพร่

การปรับปรุงสายโพลีเมอร์ที่สลายตัวทางชีวภาพเพื่อใช้ในการนำส่งยาเป็นที่น่าสนใจอย่างมากในทางเภสัชกรรม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงสายโพลีเอสเตอร์ชนิด polycaprolactone ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ด้วยการเติมกลุ่ม polyethylene glycol (PEG 4000) ลงในสายโซ่เพื่อให้มีความเป็น hydrophilic เพิ่มขึ้น และ graft ด้วยยา nicotinic acid ซึ่งเป็นสารมวลโมเลกุลเล็กลงบนสายโพลีเมอร์นี้ด้วยสภาวะที่ไม่รุนแรง ด้วยปฏิกิริยา 1,3-dipolar cycloaddition ที่รู้จักกันในชื่อ click reaction โดยการ copolymerization ของ α -chloro- ϵ -caprolactone (α ClECL) และ ϵ -caprolactone (ϵ CL) ด้วยวิธี ring opening polymerization โดยใช้ PEG 4000 และ Tin (II) Octanoate (SnOct_2) เป็น catalyst จากนั้นปรับเปลี่ยน กลุ่มคลอไรด์บนสายโซ่ ให้เป็น azide ซึ่งจะเป็นตำแหน่งที่เชื่อมติดกับ but-3-ynyl nicotinate ด้วย click reaction จากการศึกษาโครงสร้างและการตรวจสอบสมบัติของโพลีเมอร์ที่ได้ด้วย $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy, FT-IR Spectroscopy และ Gel Permeation Chromatography พบว่าสามารถ graft ด้วยยา nicotinic acid ที่สัดส่วนต่างๆ (10%, 20% และ 30%) ลงบนสายโซ่ของ poly- ϵ -caprolactone (ϵ CL) ได้สำเร็จด้วยการใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงและใช้ระยะเวลาที่สั้น จึงไม่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของโพลีเมอร์ ผลของการศึกษา thermal property พบว่าจำนวนโมลและชนิดของหมู่หรือโมเลกุลที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์นั้นมีผลต่อค่า T_g และ T_m ของโพลีเมอร์ โดยผลการทดลองระบุว่า การติดหมู่หรือโมเลกุลบนสายโซ่และการเพิ่มจำนวนโมลของหมู่ที่ติดมีผลเปลี่ยนรูปผลึกของโพลีเมอร์จาก semi-crystalline เป็น amorphous มากขึ้น ดังนั้นปริมาณ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ส่งผลต่อสมบัติเฉพาะทางกายภาพและเคมีของโพลีเมอร์

การศึกษาความเป็นพิษของโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ต่อเซลล์ปกติ ผลการศึกษาพบว่าโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HUVECs เช่นเดียวกับโพลีเมอร์ต้นแบบ (P(ϵ CL)-co-PEG) ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เมื่อนำโพลีเมอร์ที่ติด nicotinic acid ที่สังเคราะห์ได้ ไปเตรียมเป็นอนุภาคนาโนด้วยวิธี nanoprecipitation และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนที่ได้ พบว่าอนุภาคนาโนที่ไม่มีการบรรจุยามีรูปร่างทรงกลม และจำนวนโมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ส่งผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคนาโน โดยที่จำนวนโมลของ nicotinic acid ที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ขนาดอนุภาคนาโนเพิ่มขึ้นเนื่องจากความเป็น hydrophobic ที่เพิ่มขึ้นและ steric hindrance ของหมู่ที่ยื่นออกจากแกนของโพลีเมอร์ที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในรูปของอนุภาคนาโนพบว่าอนุภาคนาโนที่ติดโมเลกุล nicotinic acid ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.20 mg/mL ดังนั้น การติดโมเลกุล nicotinic acid มีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ และเมื่อเพิ่ม % โมลของ nicotinic acid มีผลเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาผลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ต่อกักเก็บยาต้นแบบ 2 ชนิดคือ ibuprofen และ indomethacin พบว่าหลัง incorporate ยาทั้ง 2 ชนิดมีผลทำให้อนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่

ขึ้น และการบรรจุยาของอนุภาคนาโนที่มีโมเลกุล nicotinic acid ติดอยู่มีประสิทธิภาพมากกว่าอนุภาคนาโนที่ไม่มีการติดโมเลกุล nicotinic acid ที่เตรียมจากโพลีเมอร์ P(ECL)-co-PEG แต่เมื่อเพิ่ม %โมลของ nicotinic acid ที่ติดบนสายโซ่โพลีเมอร์ ประสิทธิภาพในการบรรจุยาของอนุภาคนาโนไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการบรรจุยาของอนุภาคนาโนยังขึ้นอยู่กับค่าขีดการละลายของตัวเองด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการแบ่งภาคระหว่างอนุภาคนาโนกับวัฏภาคน้ำในขั้นตอนการ incorporate ตัวยา การศึกษาการปลดปล่อยตัวยา ibuprofen และ indomethacin จากอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโพลีเมอร์ที่ติดโมเลกุล nicotinic acid และโพลีเมอร์ต้นแบบ พบว่ามีการปลดปล่อยเป็นไปตาม Higuchi model แสดงให้เห็นว่ากลไกการปลดปล่อยยาเป็นแบบ Fickian diffusion การปลดปล่อยยา ibuprofen จากอนุภาคนาโนน้อยกว่าและช้ากว่า indomethacin ถึงแม้ว่า ibuprofen มีค่าขีดการละลายน้ำมากกว่า indomethacin เนื่องจากเกิด interaction ระหว่าง ibuprofen กับสายโซ่โพลีเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโน สรุปได้ว่า การติดโมเลกุล nicotinic acid บนสายโซ่โพลีเมอร์มีผลต่อทั้งปริมาณและอัตราการปลดปล่อยยาจากอนุภาคนาโน เนื่องจากการติดโมเลกุล nicotinic acid ส่งผลต่อคุณสมบัติเคมีกายภาพของอนุภาคนาโน ได้แก่ ขนาดอนุภาคนาโน %drug loading ความเป็นผลึกของสายโซ่โพลีเมอร์ และการเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลยากับสายโซ่โพลีเมอร์