

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ผลการสังเคราะห์และการพิสูจน์โครงสร้าง

1.1 สารมาตรฐาน PABA-SA conjugate

IR (KBr) : 3500-2500 cm⁻¹ (OH stretching)
(รูปที่ 9) 1758 cm⁻¹ (C=O stretching)

¹H-NMR (DMSO): 7.12-7.18 ppm (1H, multiplet, aromatic proton of SA)
(รูปที่ 10) 7.90-7.94 ppm (2H, multiplet, aromatic proton of PABA)
8.08-8.14 ppm (3H, multiplet, aromatic proton of PABA and SA)
8.34-8.36 ppm (1H, multiplet, aromatic proton of SA)

Purity (HPLC) : 98.37%

1.2 สารมาตรฐาน PAH-SA conjugate

IR (KBr) : 3500-2300 cm⁻¹ (OH stretching)
(รูปที่ 11) 3675 cm⁻¹ (NH stretching)
1690 cm⁻¹ (C=O stretching of aliphatic acid, aromatic acid, amide)

¹H-NMR (DMSO) : 3.90-4.00 ppm (2H, multiplet, CH₂ proton of PAH)
(รูปที่ 12) 7.10-7.20 ppm (1H, multiplet, aromatic proton of SA)
7.90-7.99 ppm (2H, multiplet, aromatic proton of PAH)
8.99-8.13 ppm (3H, multiplet, aromatic proton of PAH and SA)
8.34-8.46 ppm (1H, doublet, aromatic proton of SA)
8.86-9.02 ppm (1H, triplet, NH proton of PAH)

Purity (HPLC) : 99.65%

1.3 PAMAM-PABA-SA conjugate

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) :	2.02-3.44 ppm (484H, multiplet, CH proton of PAMAM)
(รูปที่ 13)	6.88-6.94 ppm (1H, multiplet, aromatic proton of SA)
	7.54-7.68 ppm (2H, doublet, aromatic proton of PABA)
	7.66-7.80 ppm (1H, doublet, aromatic proton of SA)
	7.82-7.99 ppm (2H, doublet, aromatic proton of PABA)
	8.13-8.24 ppm (1H, singlet, aromatic proton of SA)

1.4 PAMAM-PAH-SA conjugate

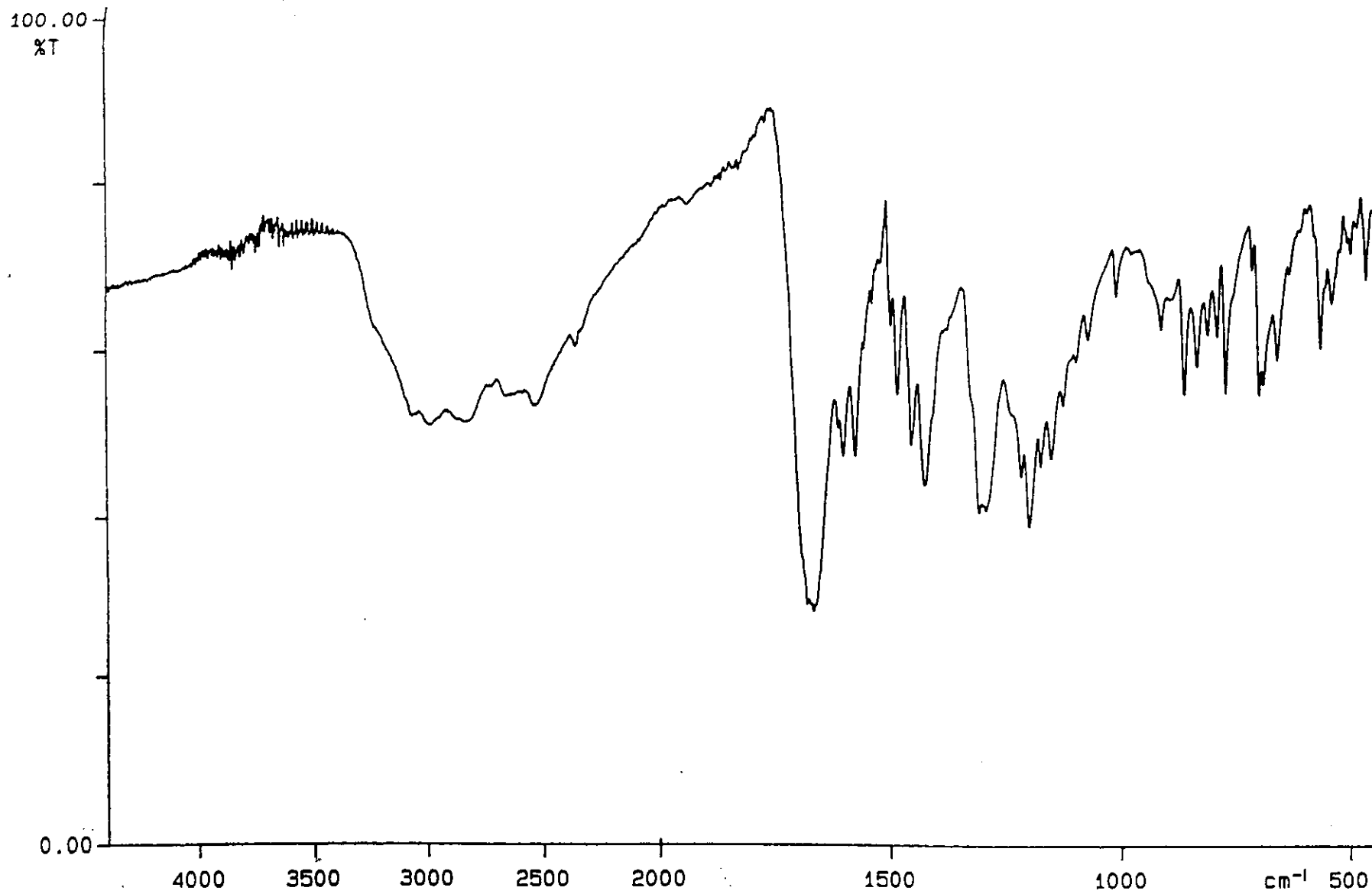
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) :	1.99-3.92 ppm (484H, multiplet, CH proton of PAMAM)
(รูปที่ 14)	3.75-3.80 ppm (2H, singlet, CH_2 proton of PAH)
	6.78-6.88 ppm (1H, multiplet, aromatic proton of SA)
	7.36-7.62 ppm (3H, multiplet, aromatic proton of PAH and SA)
	7.63-7.92 ppm (2H, singlet, aromatic proton of PAH)
	7.95-8.19 ppm (1H, singlet, aromatic proton of SA)

1.5 ผลการวิเคราะห์หาจำนวนโมลของ 5-ASA ที่เชื่อมต่อกับ PAMAM dendrimer ด้วยเทคนิค UV-visible spectroscopy

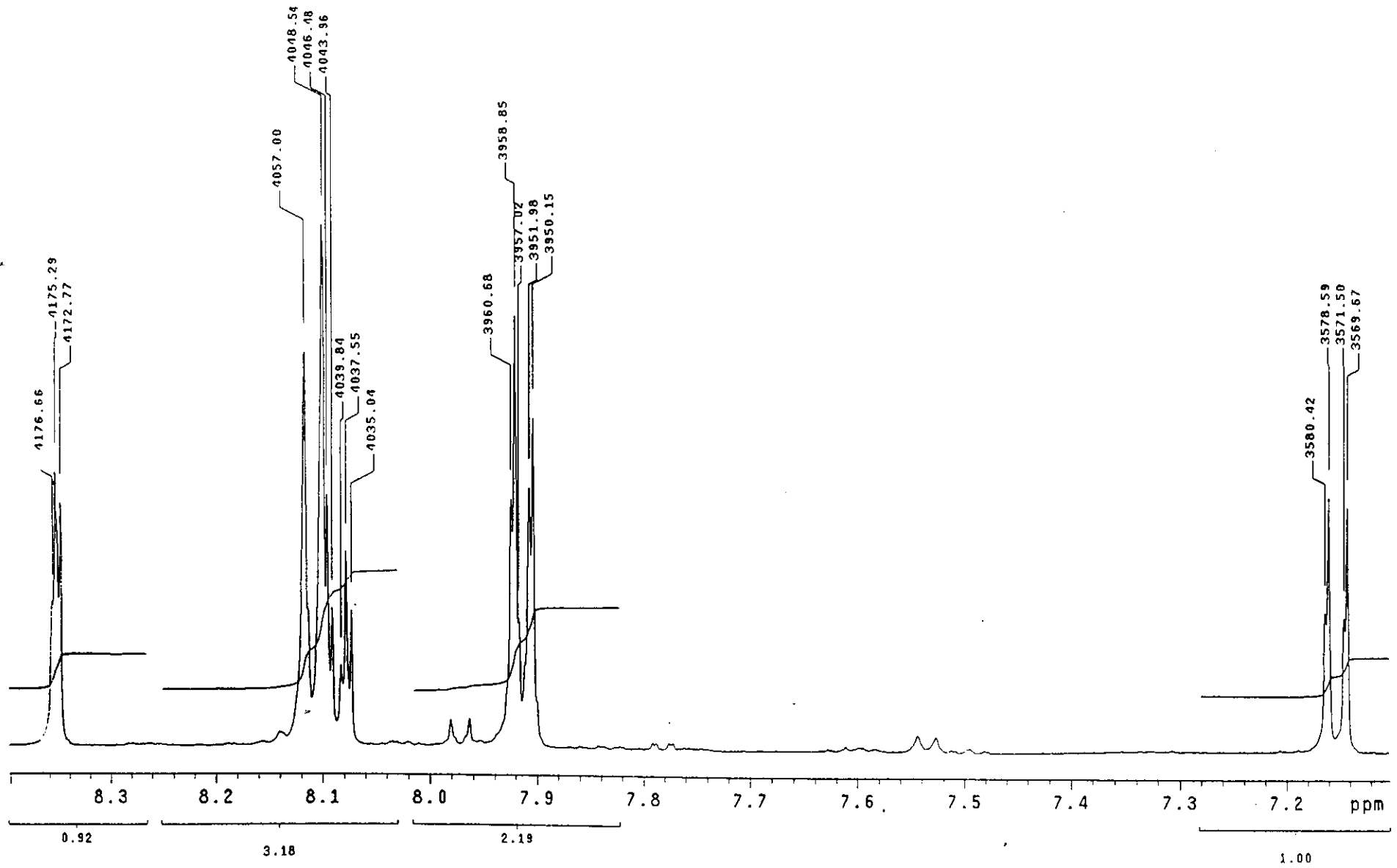
เนื่องจาก PAMAM-PABA-SA conjugate และ PAMAM-PAH-SA conjugate นั้นเป็นพาหะในการนำส่ง 5-ASA โดยการเชื่อมต่อโมเลกุลด้วย spacer และพันธะ diazo ซึ่ง spacer 1 โมเลกุลจะต่อกับ 5-ASA 1 โมเลกุล และเนื่องจากพันธะ diazo ทำให้ conjugate ที่สังเคราะห์ขึ้นเกิดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่สูงขึ้น และไม่ถูกรบกวนจากการดูดกลืนแสงของ PAMAM ดังนั้นจึงใช้สารมาตรฐานของ spacer-SA ซึ่งก็คือ PABA-SA และ PAH-SA ในการวิเคราะห์

จากการทำ Standard curve ของ PABA-SA และ PAH-SA (R-square เท่ากับ 0.9995 และ 0.9997 ตามลำดับ) และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ conjugate ทั้งสองชนิด (รูปที่ 15 และ 16) พบว่า PAMAM-PABA-SA conjugate และ PAMAM-PAH-SA conjugate สามารถเชื่อมต่อกับ 5-ASA ได้ 3.31 และ 9.80 โมเลกุลตามลำดับ (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เนื่องจากมาจากผลทาง steric ที่แตกต่างกันของ spacer โดย PABA นั้นมีลักษณะโมเลกุลที่สั้นกว่า PAH ทำให้ในขณะที่ถูกกระตุ้นด้วยสารช่วยในการเกิดปฏิกิริยา คือ carbonyldiimidazole จะเกิดผลทาง steric มากกว่า ทำให้การทำปฏิกิริยาเกิดได้ยาก ส่วน PAH ซึ่งมีลักษณะโมเลกุลที่ยาวกว่า ทำให้การเกิด diazo bond กับ SA ง่ายกว่า

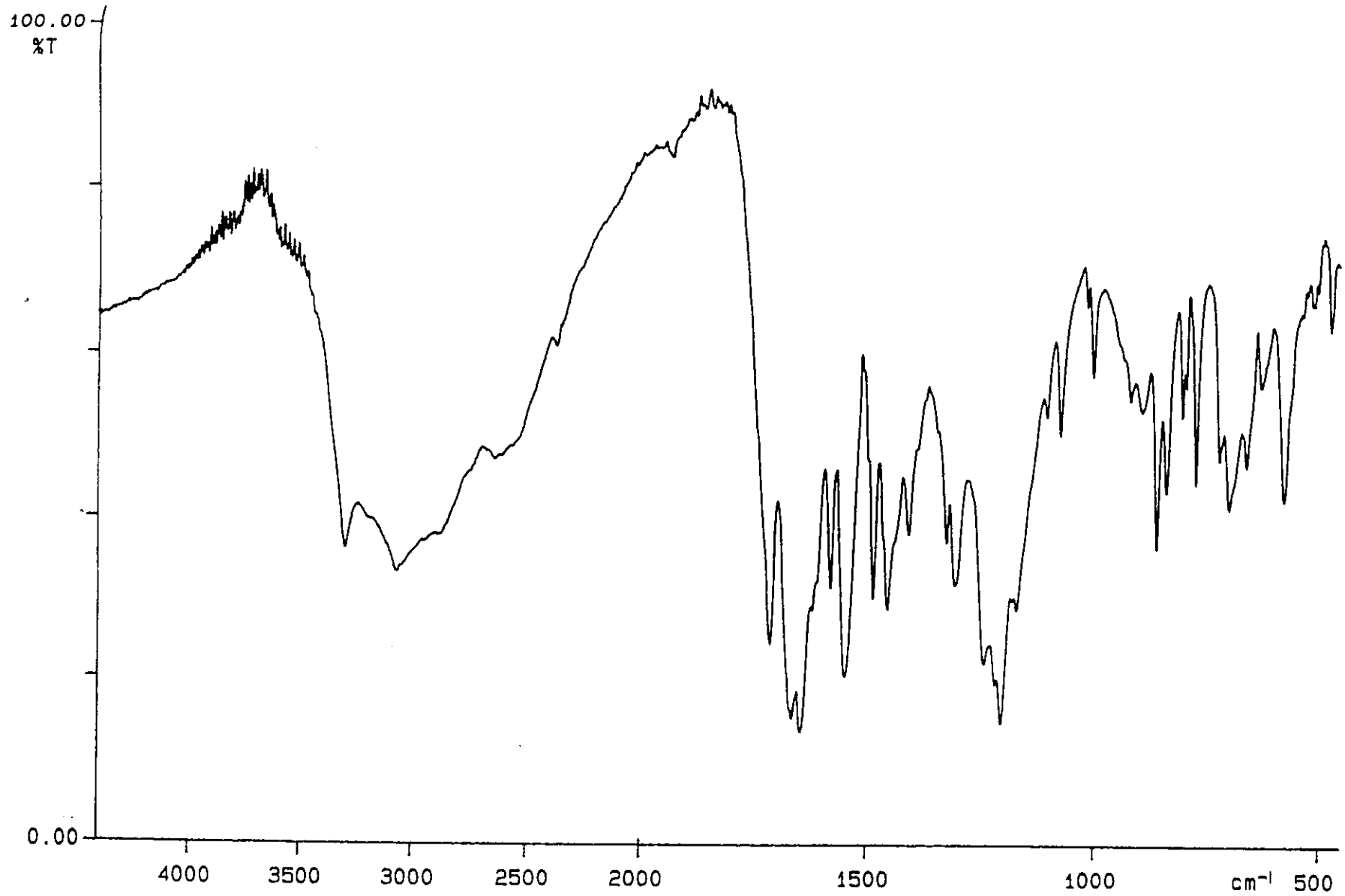
แม้ว่าโมเลกุลของ PAMAM dendrimer จะมีหมู่ amino สำหรับทำปฏิกิริยาถึง 32 หมู่ จำนวนโมเลกุลของยาที่สามารถเชื่อมต่อกันได้สูงสุดโดยที่ conjugate ยังละลายน้ำได้ดี (1 mg/ml) ในการทดลองนี้ คือ 3.31 และ 9.80 โมเลกุลสำหรับ PABA และ PAH ตามลำดับดังที่ได้กล่าวไปแล้ว มีรายงานการวิจัยของการ conjugate ยา doxorubicin 2 โมเลกุลกับ PAMAM dendrimer ชั่วรุ่นที่ 4 (amino 64 หมู่)¹⁹ และการ conjugate ยา ibuprofen 3 โมเลกุลกับ PAMAM dendrimer ชั่วรุ่นที่ 4 (amino 64 หมู่)²⁰ เช่นกัน แสดงให้เห็นว่า จำนวน terminal group ที่มากไม่ได้หมายถึงความสามารถในการ conjugate กับยาได้มากด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ โครงสร้างทางเคมีของตัวยา spacer และ dendrimer รวมทั้งปฏิกิริยาที่ใช้



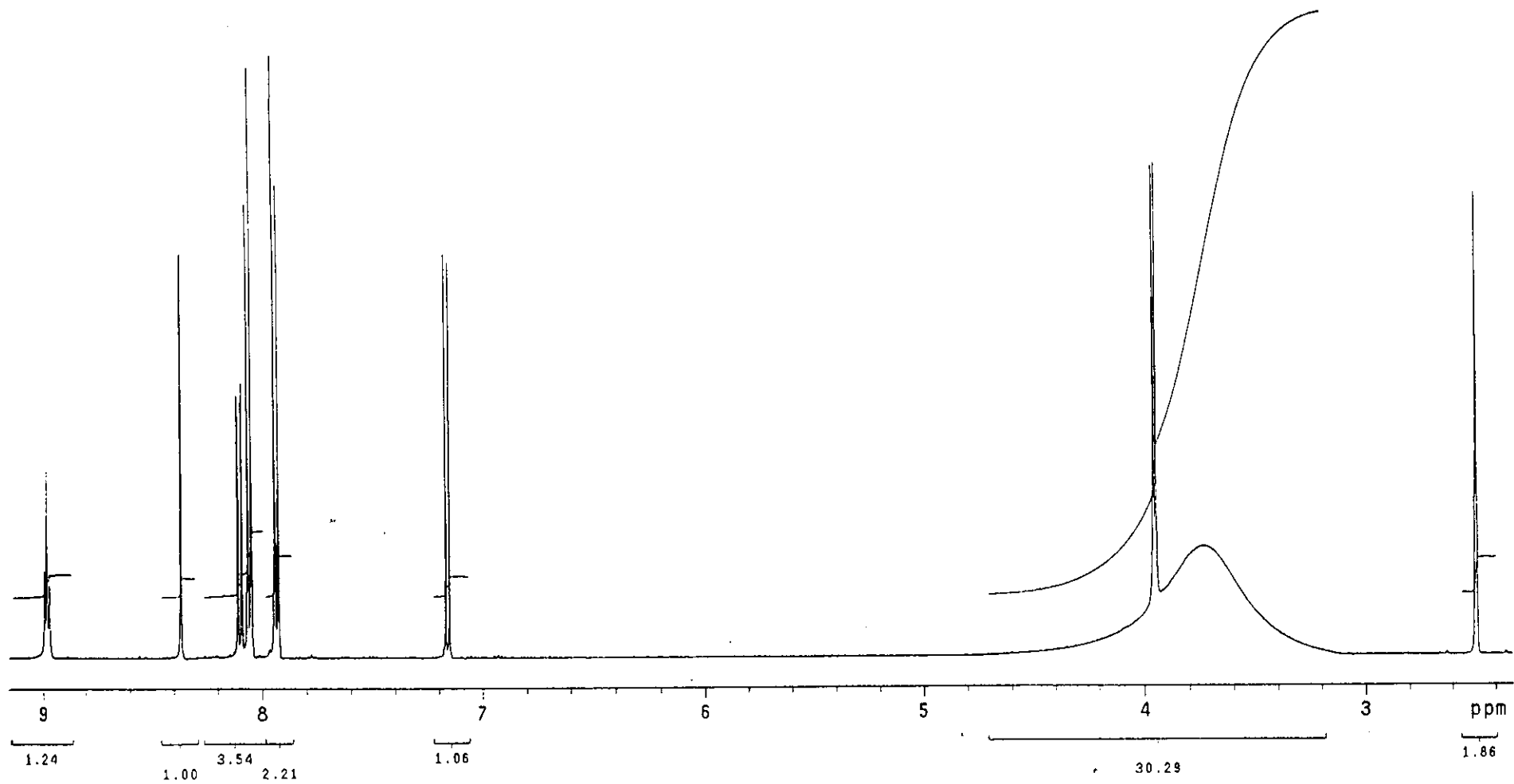
รูปที่ 9 แสดง IR-spectrum ของสารมาตรฐาน PABA-SA



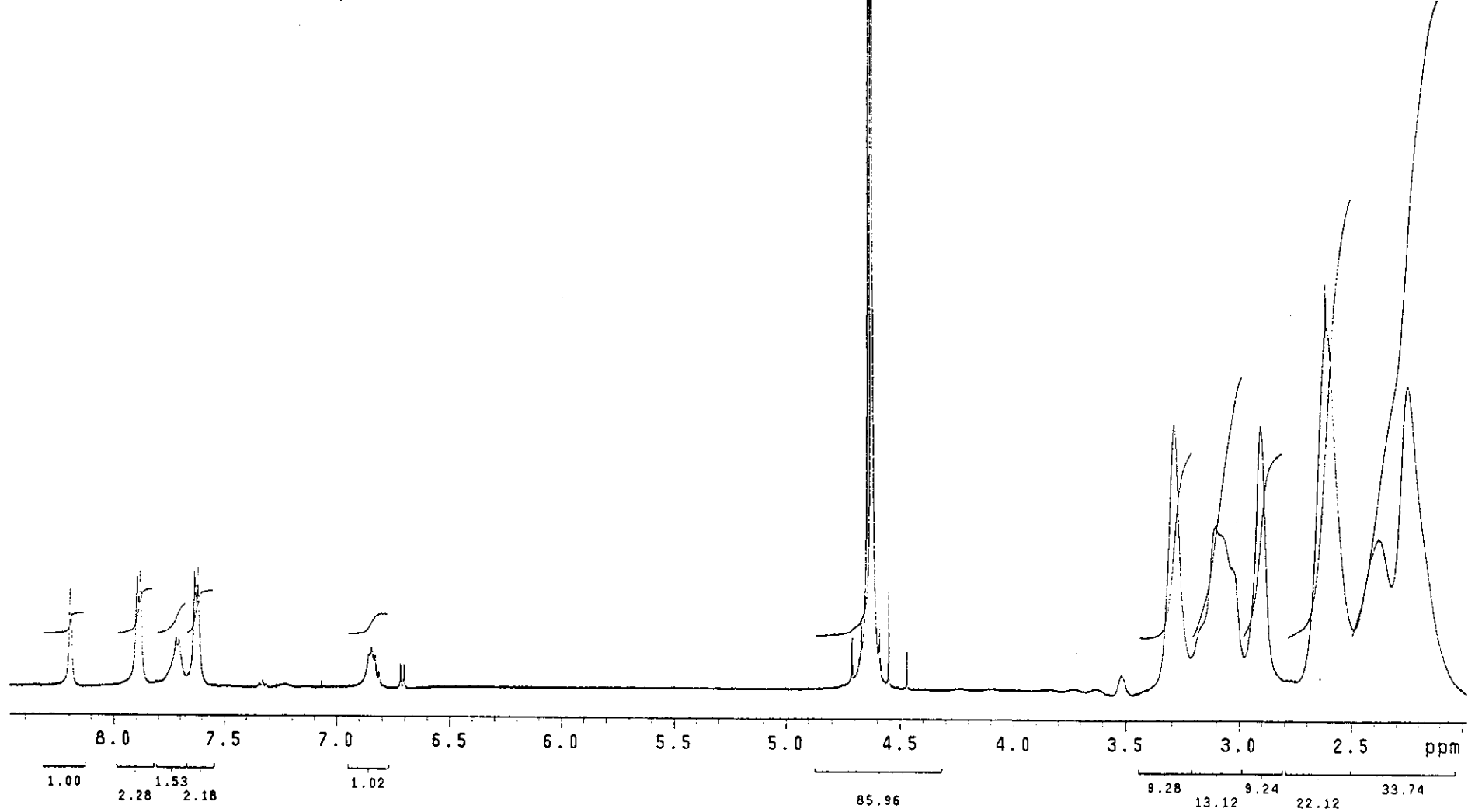
รูปที่ 10 แสดง NMR-spectrum ของสารมาตรฐาน PABA-SA



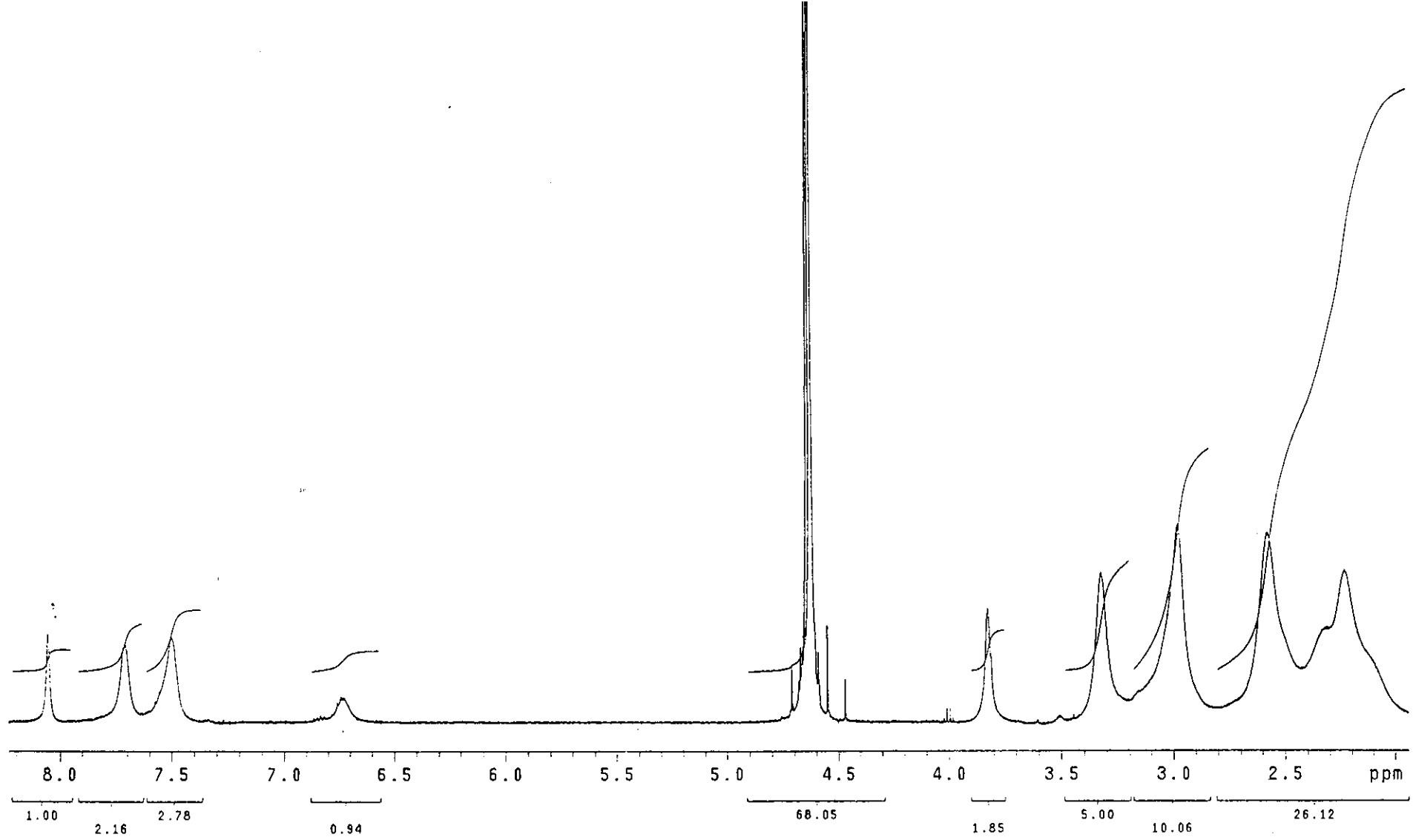
รูปที่ 11 แสดง IR-spectrum ของสารมาตรฐาน PAH-SA



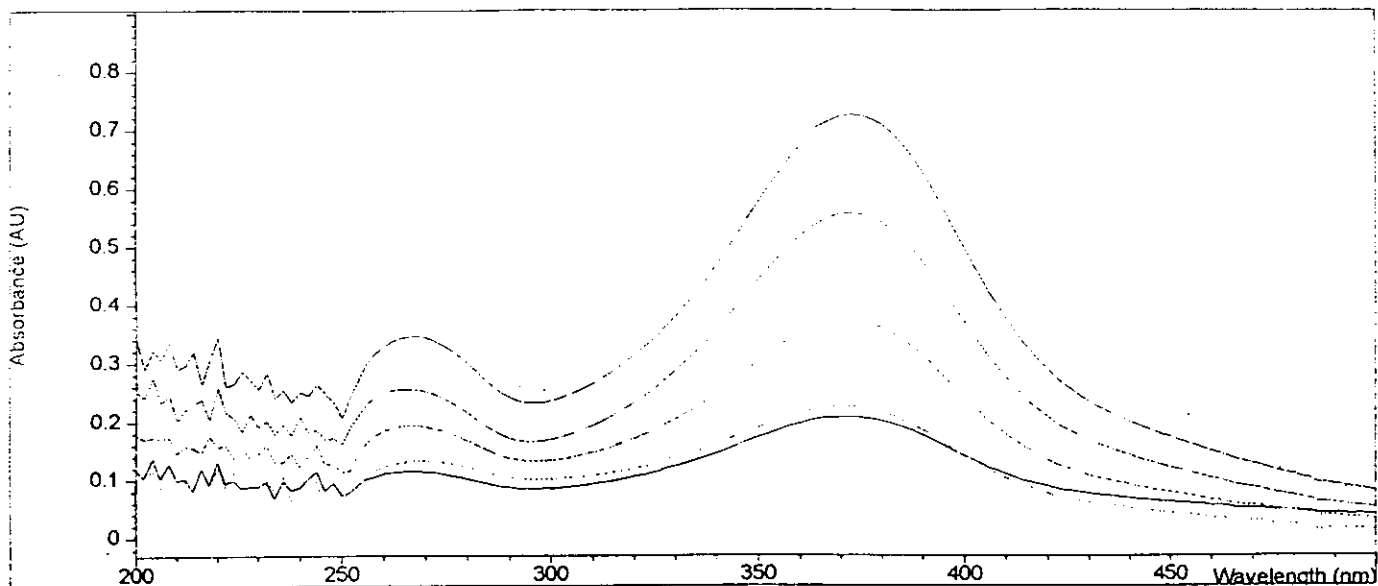
รูปที่ 12 แสดง NMR-spectrum ของสารมาตรฐาน PAH-SA



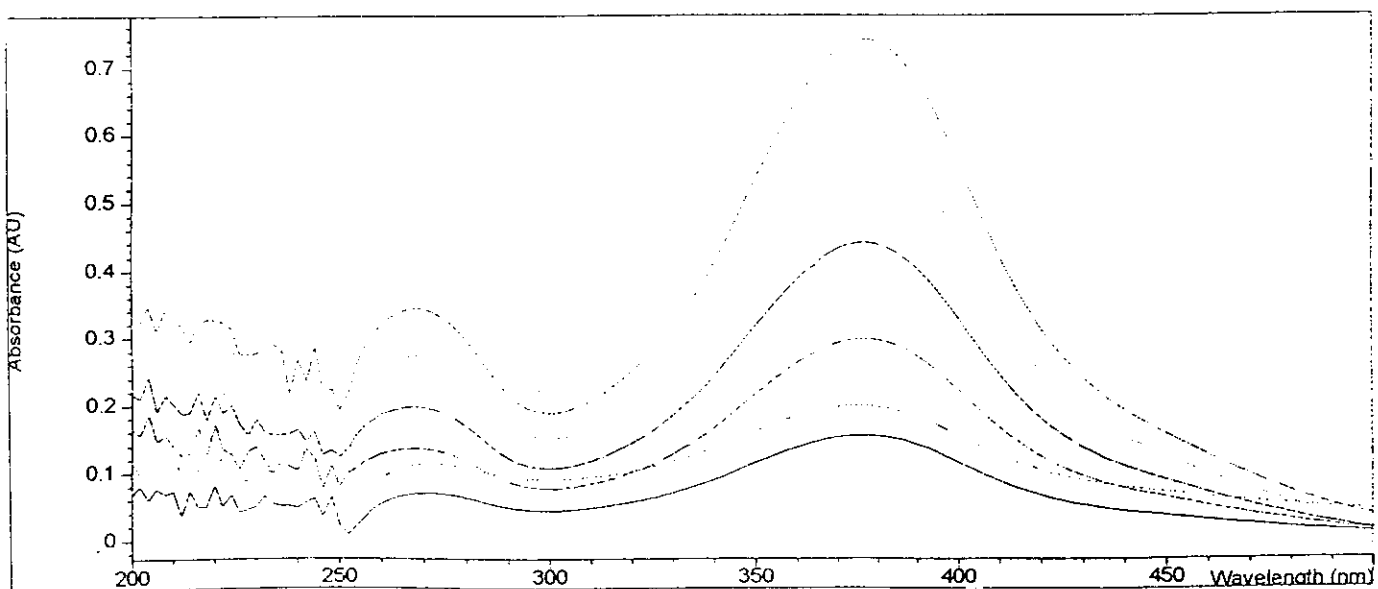
รูปที่ 13 แสดง NMR-spectrum ของ PAMAM-PABA-SA conjugate



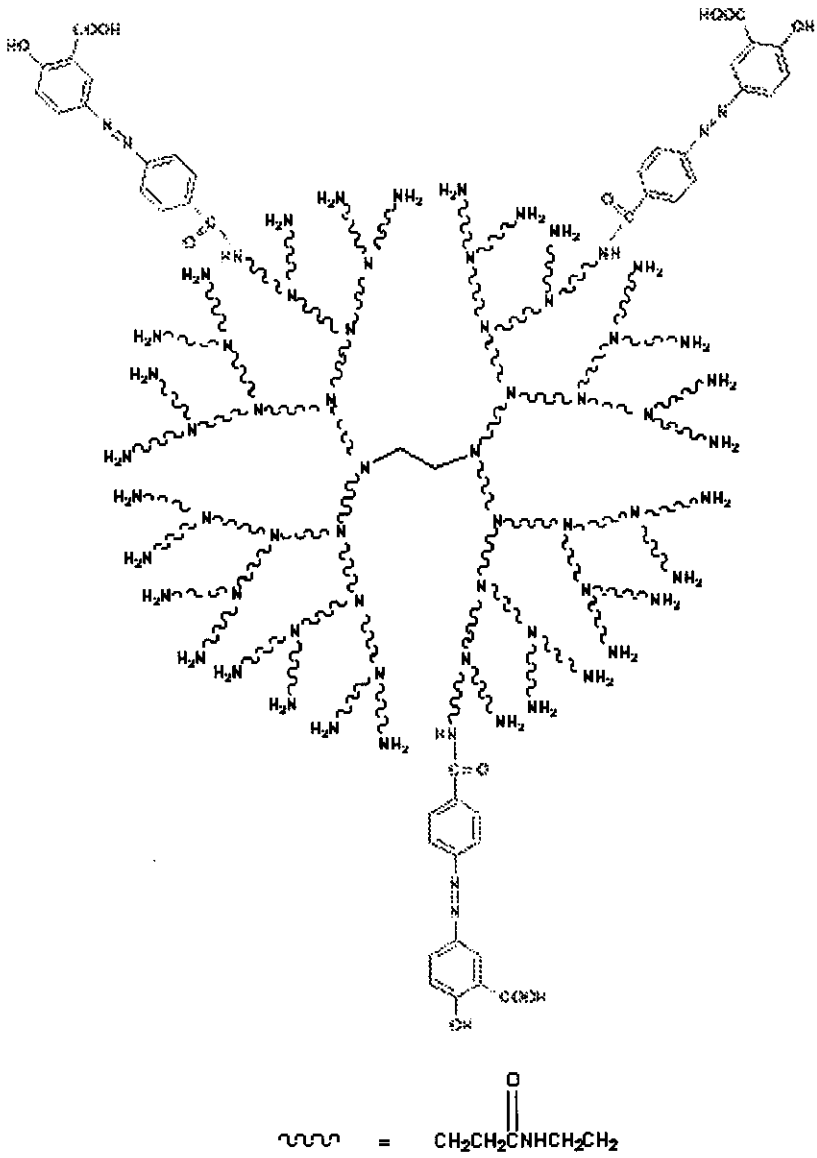
รูปที่ 14 แสดง NMR-spectrum ของ PAMAM-PAH-SA conjugate



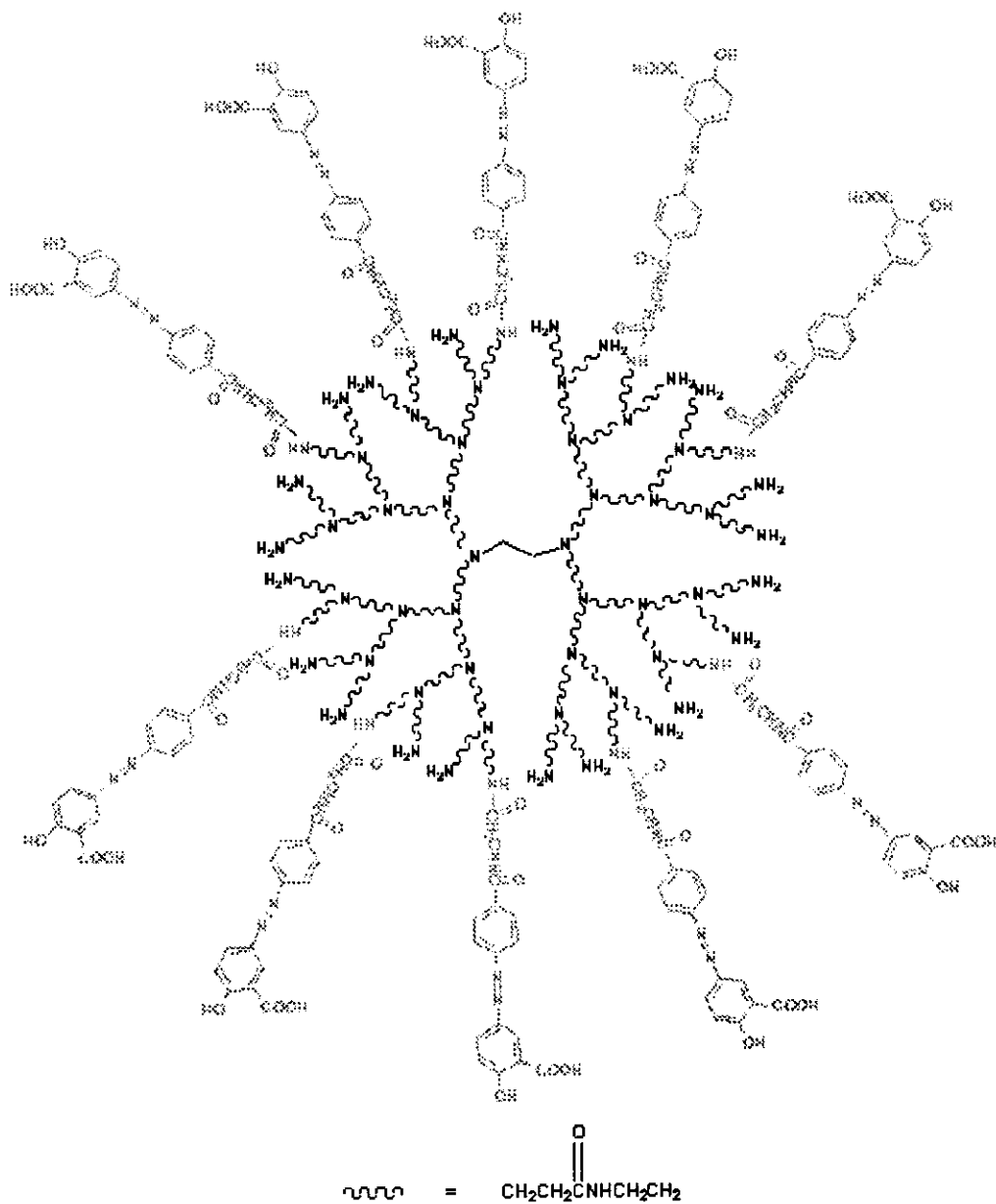
รูปที่ 15 แสดง UV-spectrum ของสารมาตรฐาน PABA-SA และ PAMAM-PABA-SA conjugate



รูปที่ 16 แสดง UV-spectrum ของสารมาตรฐาน PAH-SA และ PAMAM-PAH-SA conjugate



รูปที่ 17 แสดงโครงสร้างของ PAMAM-PABA-SA conjugate



รูปที่ 18 แสดงโครงสร้างของ PAMAM-PAH-SA conjugate

ตารางที่ 1 จำนวนโมลและปริมาณโดยน้ำหนัก (wt%) ของ SA ใน conjugate

Spacers	No. of SA residues in drug conjugate (mol/mol)*	Equivalent wt% of 5-ASA in the conjugates*
PABA	1: 3.4	6.64
PAH	1: 9.8	14.58

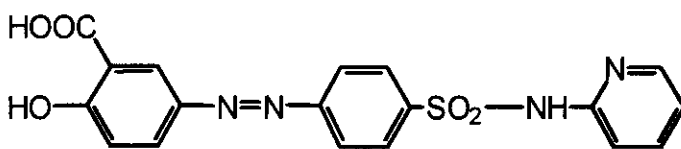
* ตัวอย่างการคำนวณอยู่ในภาคผนวก

2. ผลการศึกษาการปลดปล่อย 5-ASA ในระบบทางเดินอาหาร

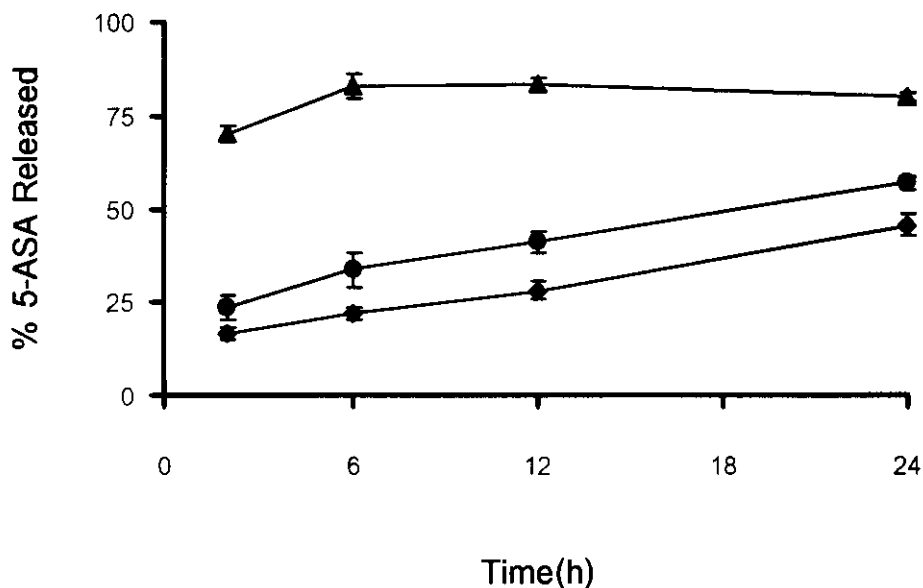
2.1. ผลการศึกษาในของไหลจากซีคัม

เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าโคลอนเป็นแหล่งของเอนไซม์ Azoreductase เอนไซม์ชนิดนี้ถูกสร้างโดยแบคทีเรียที่อยู่ในโคลอน เช่น *Clostridium perfringens*⁽⁶⁾ จะรีดิวซ์พันธะ diazo ของ conjugate และปลดปล่อย 5-ASA ออกมา แบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นเชื้อกลุ่ม anaerobic ดังนั้นในกระบวนการทดลองจึงต้องควบคุมสภาวะให้เป็น anaerobic การทดลองนี้ใช้ของไหลจากซีคัมของหนูซึ่งเป็นแหล่งที่มีแบคทีเรียจำนวนมากเช่นเดียวกับในโคลอนของคน

จากการทดลองหา %Recovery ของวิธีการสกัดสารตัวอย่างโดย Solid Phase Extraction ด้วย cartridge ชนิด C₁₈ แล้วพบว่ามี % Recovery เท่ากับ 83.76 % ผลการศึกษาพบว่า การปลดปล่อย 5-ASA เป็นไปดังรูปที่ 18 สังเกตเห็นว่าการปลดปล่อย 5-ASA ออกจาก conjugate เป็นไปอย่างช้าๆและเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามเวลาที่เปลี่ยนไป โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่า PAMAM-PABA-SA conjugate และ PAMAM-PAH-SA conjugate สามารถปลดปล่อย 5-ASA คิดเป็น 45.7% และ 57.0% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การปลดปล่อย 5-ASA ของ Sulfasalazine (รูปที่ 19) แล้วพบว่า Sulfasalazine นั้นมีอัตราการปลดปล่อยที่ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรก โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงสามารถปลดปล่อย 5-ASA ได้ 80.22%



รูปที่ 19 โครงสร้างของ Sulfasalazine



- รูปที่ 20 แสดงการปลดปล่อย 5-ASA ออกจาก PAMAM-PABA-SA conjugate (◆) PAMAM-PAH-SA conjugate (●) และ Sulfasalazine (▲) ในของไหลจากซีคัม

ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก conjugate มีโครงสร้างที่ใหญ่ มีโซ่แขนจำนวนมาก เกิดผลทาง steric ทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เพื่อปลดปล่อย 5-ASA จะค่อนข้างยากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Sulfasalazine ซึ่งเป็น carrier ที่มีโมเลกุลเล็ก และเมื่อเปรียบเทียบผลระหว่าง conjugate ซึ่งมี spacer ต่างกัน 2 ชนิด พบว่าเมื่อใช้ spacer เป็น PABA จะมีอัตราการปลดปล่อย 5-ASA ที่ช้ากว่า spacer ที่เป็น PAH เมื่อดูจากโครงสร้างของ spacer ทั้งสองชนิดแล้วจะเห็นว่ามี ความยาวของโมเลกุลต่างกัน โดย PAH ที่มีความยาวของโมเลกุลมากกว่าจึงมีผลของ steric น้อยกว่า อาจทำให้ถูกரிติวซ์โดยเอนไซม์ได้ง่ายกว่า PABA

2.2. ผลการศึกษาในสารไฮโมจินेटของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก

จากผลการศึกษาในกระเพาะอาหารพบว่า PAMAM-PABA-SA conjugate และ PAMAM-PAH-SA conjugate ไม่มีการปลดปล่อย 5-ASA หลังจาก incubate ในสารไฮโมจินेटของกระเพาะอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนในลำไส้เล็กพบมีการปลดปล่อย 5-ASA ออกมาจาก conjugate ทั้งสองชนิด คือ 4.5 และ 7.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งพบว่าการปลดปล่อย 5-ASA ออกจาก PAMAM-PABA-SA conjugate และ PAMAM-PAH-SA conjugate มีความจำเพาะเจาะจงต่อโคโลนอนมากกว่า คือ ปลดปล่อยด้วยยา 23.5 และ 38.2% ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมง

นอกจากนี้ ในส่วนของลำไส้เล็กยังพบมีการปลดปล่อย PABA-SA (3.8%) หรือ PAH-SA (12.5%) ออกมาจำนวนหนึ่ง (ตารางที่ 2) เนื่องจากโมเลกุลของ dendrimer conjugates ประกอบ

ด้วยพันธะทางเคมี 2 ชนิดที่สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในทางเดินอาหาร ได้แก่ พันธะamide ที่เชื่อมระหว่าง dendrimer กับ spacer และพันธะ azo ที่เชื่อมระหว่าง spacer และ SA จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าพันธะ amide (peptide) bonds amide ที่เชื่อมระหว่าง dendrimer กับ spacer จำนวนหนึ่งมีการสลายตัวเป็นผลให้เกิด prodrug ของ 5-ASA ขนาดเล็กขึ้น (PABA-SA and PAH-SA) มีรายงานว่า N-acyl amide bond ที่เกิดจาก aromatic carboxylic acid และ amino acid มีความคงตัวในทางเดินอาหารส่วนบน อย่างไรก็ตาม การสลายตัวของพันธะนี้อาจเกิดขึ้นได้จากเอนไซม์ peptidase ที่มีใน brush border ของลำไส้เล็ก

การทดสอบความคงตัวของ dendrimer conjugate ทั้งสองในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.2 และ 6.8 พบว่า conjugates ทั้งสองมีความคงตัวทางเคมีต่อ pH ในทางเดินอาหาร แต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ในลำไส้เล็ก

ตารางที่ 2 แสดงการปลดปล่อยยา 5-ASA ในโฮโมจีเนตของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และของไหลจากซีคัม ที่เวลา 12 ชั่วโมง

Incubation medium	PAMAM-PABA-SA		PAMAM-PAH-SA	
	5-ASA	PABA-SA	5-ASA	PAH-SA
Gastric homogenates	ND	ND	ND	ND
Small intestine Homogenates	4.5 ± 1.2	3.8 ± 0.5	7.2 ± 1.8	12.5 ± 3.2
Colonic contents	23.5 ± 3.7	0.2 ± 0.2	38.2 ± 5.1	0.4 ± 0.1
Buffer pH 1.2	ND	ND	ND	ND
Buffer pH 6.8	ND	ND	ND	ND

Data shown are the mean ± SD (n = 5)

Percent of drug released after incubation of each solution at 37°C for 12h.

ND=not detectable

จากผลการทดลองนอกร่างกายก่อนหน้านี พบว่า cationic PAMAM dendrimer สามารถยึดจับกับเนื้อเยื่อได้ดีซึ่งอาจเป็นผลจากแรงดึงดูดที่เกิดขึ้นระหว่างเซลเมมเบรนที่มีประจุลบกับ dendrimer ที่มีประจุบวก ซึ่งคุณสมบัตินี้น่าจะเป็นข้อดีในการทำให้ dendrimer อยู่ในทางเดินอาหารได้นาน อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ของ dendrimer conjugate ซึ่งมีการแทนที่หมู่ amino จำนวนหนึ่งด้วย PABA-SA หรือ PAH-SA และโมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้น อาจทำให้ bioadhesion property ของ dendrimer เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ biodistribution หรือ GI transit time ของ dendrimer conjugate ต่อไป