บทที่ 2
ระเบียบวิธีวิจัย (Materials and Methods)

สารเคมี

Starburst PAMAM dendrimer ชั่วรุ่นที่ 3 (Aldrich Chemical, USA)

p-Aminobenzoic acid ; PABA (Merck, Germany)

p-Aminohippuric acid ; PAH (Sigma Chemical, USA)

Carbonyl diimidazole ; CDI (Fluka Chemika, Switzerland)

D(+)-Glucose-Monohydrate (Merck, Germany)

Deuterium oxide (Fluka, Switzerland)

Dimethyl sulfoxide ; DMSO (Merck, Germany)

Disodiumhydrogenphosphate ; Na_2HPO_4 (Merck, Germany)

Hydrochloric acid ; HCl (Merck, Germany)

Methanol (Merck, Germany)

Oxygen-free Nitrogen gas

Sodium hydroxide ; NaOH (Merck, Germany)

Sodium nitrite ; $NaNO_2$ (Merck, Germany)

Salicylic acid ; SA (Merck, Germany)

Sulfasalazine (Fluka, Switzerland)

Potassiumdihydrogen phosphate ; KH_2PO_4 (Merck, Germany)

Trichloroacetic acid (Merck, Germany)

เครื่องมือและอุปกรณ์

Anaerobic jar

Cartridge C_{18} ขนาด 3 มิลลิลิตร (Lida, USA) และชุด Vacuum

Dialysis membrane (Spectra/Por® MWCO 2000, USA)

Freeze dryer FD-1 (Eyela, Japan)

FTIR model 1600 (Perkin Elmer, USA)

High Performance Liquid Chromatography consisted of an LC-5000 pump (Jasco-PU-980), a gradient unit (Jasco-LG-980-025), a detector set at 240 nm (Jasco-UV-975 (UV/VIS) and an integrator (Waters, USA).

Homogenizer (V stral, X10/25, Germany)

Incubator (Heraeus, Germany)

^{1}H-Nuclear Magnetic Resonance Spectrophotometer

(Varian 500 MHz, Switzerland)

Precoated-TLC plate, Silica gel G_F254 (Merck, Germany)

Rotary evaporator (Eyela, Japan)

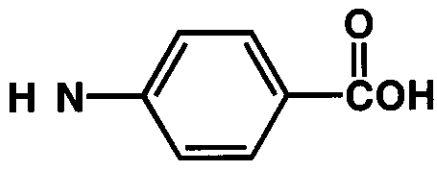
UV-visible spectrophotometer (Hewlett-Packard 8452, USA)

สัตว์ทดลอง

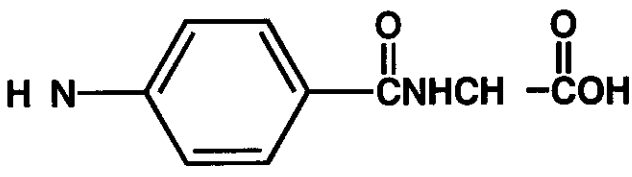
หนู Wistar น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

A. การสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างระบบนำส่งยา

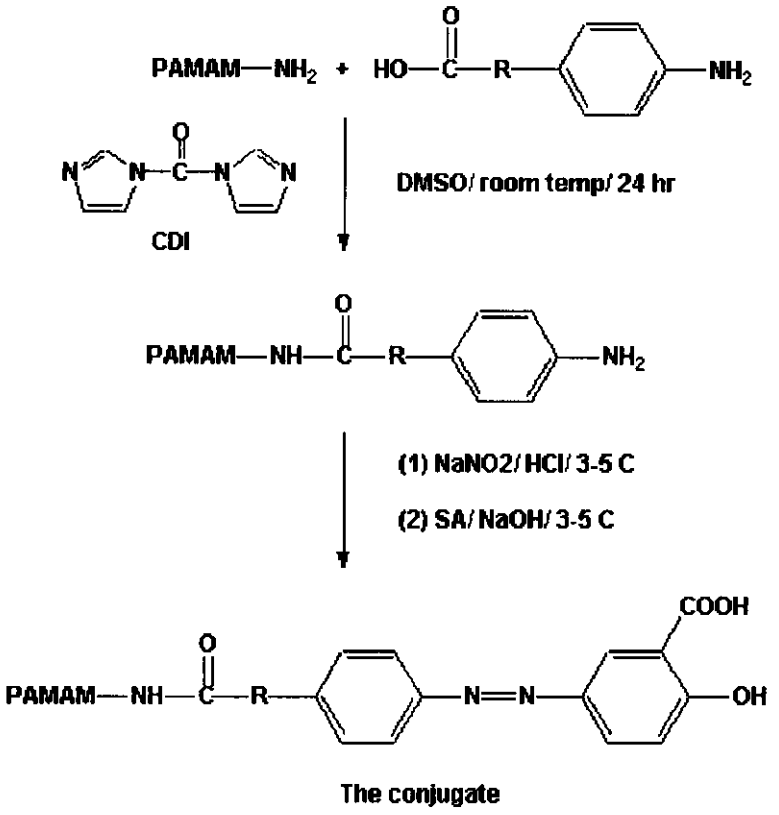
โครงสร้างของ spacer PABA และ PAH แสดงดังรูป แนวทางการสังเคราะห์ระบบนำส่งยาประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกจะเป็นการสังเคราะห์พันธะ amide ระหว่าง PAMAM-dendrimer กับ spacer (ใช้หลักการของ Bodanszky 1993)[15] จากนั้นนำสารที่สังเคราะห์ได้ไปสังเคราะห์พันธะ azo กับ Salicylic acid (SA) (ใช้หลักการของ Furniss et al1978 และ Norman & Coxon 1993)[16-17] แนวทางในการสังเคราะห์แสดงในรูปที่ 5



***p*-Aminobenzoic Acid**



***p*-Aminohippuric Acid**



(กรณีของ PAH, R = $-H_2C-HN-CO-$)

รูปที่ 5 แสดงแนวทางในการสังเคราะห์ระบบนำส่งยา

1. การสังเคราะห์ PAMAM-PABA-SA conjugates และ PAMAM-PAH-SA conjugate

1.1. การสังเคราะห์ PAMAM-PABA conjugate

นำสารละลาย PAMAM dendrimer ชั่วรุ่นที่ 3 ใน MeOHให้มี PAMAM 0.025 มิลลิโมล แล้วระเหย MeOH ออกโดยใช้ evaporator ละลาย PABA และ CDI อย่างละ 1.6 มิลลิโมล (64 เท่าของ PAMAM) ใน DMSO 5 และ 1.25 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมสารละลายของ PABA ลงไปผสมกับ PAMAM คนให้เข้ากัน แล้วจึงเติมสารละลายของ CDI ซึ่งเป็น coupling reagent ลงไป คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดสารตั้งต้นที่เหลืออยู่โดยการ dialysis ด้วย membrane (Spectra/Por® ; MWCO 2000) ในตัวกลางที่เป็นน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุดท้ายกำจัดน้ำออกโดยการ freeze dry ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายหยากไย่ มีสีขาว ซึ่งจะนำไปทำปฏิกิริยา diazotization ในขั้นถัดไป

1.2. การสังเคราะห์ PAMAM-PAH conjugate

ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ PAMAM-PABA โดยใช้ PAMAM 0.025 มิลลิโมล CDI และ PAH อย่างละ 1.6 มิลลิโมล (64 เท่าของ PAMAM) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายหยากไย่ มีสีขาว และนำไปทำปฏิกิริยา diazotization ในขั้นต่อไปเช่นกัน

1.3. การสังเคราะห์ PAMAM-PABA-SA

เติมน้ำ 4 มิลลิลิตรลงใน PAMAM-PABA ที่ได้ จากนั้นละลาย $NaNO_2$ 6.4 มิลลิโมล (4 เท่าของ PABA หรือ PAH) ในน้ำ 4 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลายของ PAMAM-PABA หรือ PAMAM-PAH คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 3-5 องศาเซลเซียส แล้วปรับ pH ให้เป็นกรดด้วย HCl ความเข้มข้น 3 โมลาร์ จะเกิด diazonium salt และสารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองอ่อน

ละลาย SA 6.4 มิลลิโมล ในน้ำ 10 มิลลิลิตรและ NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 3-5 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายของ diazonium salt ที่เตรียมไว้ลงไป และปรับ pH ให้เป็นด่างด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนมีค่า pH ประมาณ 9-10 จะได้สารละลายสีน้ำตาลแดง แล้วทำการกำจัดสารตั้งต้นที่เหลือโดยการ dialysis ในตัวกลางที่เป็นน้ำ สุ่มตัวอย่างน้ำที่ได้จากการ dialysis นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 354 นาโนเมตร เพื่อให้แน่ใจว่าได้กำจัดสารตั้งต้นและ free drugs ออกหมดแล้ว จากนั้นนำไปกำจัดน้ำออกโดยการ freeze dry ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายหยากไย่ มีสีน้ำตาลแดง และไวต่อความชื้น น้ำหนักสารที่สังเคราะห์ได้คือ 69.4 มิลลิกรัม คิดเป็น 35.55% yield

1.4. การสังเคราะห์ PAMAM-PAH-SA

ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ PAMAM-PABA-SA โดยใช้ $NaNO_2$ และ SA 6.4 มิลลิโมล (4 เท่าของ PAH) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายหยากไย่ มีสีเหลือง และไวต่อความชื้น น้ำหนักสารที่สังเคราะห์ได้ 90.2 มิลลิกรัม คิดเป็น 36.17% yield

2. การสังเคราะห์สารมาตรฐานในการหาจำนวนโมลของ 5-ASA ที่เชื่อมต่อกับ PAMAM dendrimer

2.1. การสังเคราะห์สารมาตรฐาน PABA-SA conjugate

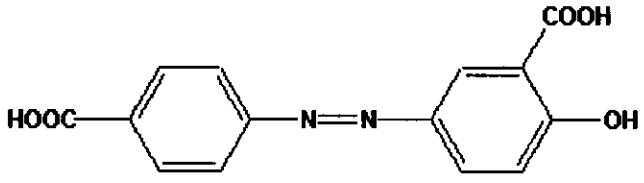
ละลาย PABA 10 มิลลิโมล ในน้ำ 5 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย $NaNO_2$ 10 มิลลิโมลในน้ำ 5 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในสารละลายของ PABA คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 3-5 องศาเซลเซียส จะเกิดตะกอนสีเหลือง ปรับ pH ให้เป็นกรดด้วย HCl ความเข้มข้น 3 โมลาร์ จะเกิดสารละลายของ diazonium salts

ละลาย SA 30 มิลลิโมล ใน NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 15 มิลลิลิตร และน้ำ 15 มิลลิลิตร คนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 3-5 องศาเซลเซียสเช่นกัน แล้วจึงเติมสารละลายของ diazonium salt ลงไป และปรับ pH ให้เป็นด่างด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะได้สารละลายสีน้ำตาลแดง จากนั้นจึงปรับ pH ให้เป็นกรดอีกครั้งด้วย HCl ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (จนกระทั่ง pH = 2) จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงของ PABA-SA กรองตะกอนและล้างตะกอนด้วยน้ำและตามด้วย 50% MeOH เพื่อกำจัด PABA และ SA ที่เหลือออก นำตะกอนที่ได้ไปเข้าตู้อบสุญญากาศเพื่อกำจัด MeOH และ

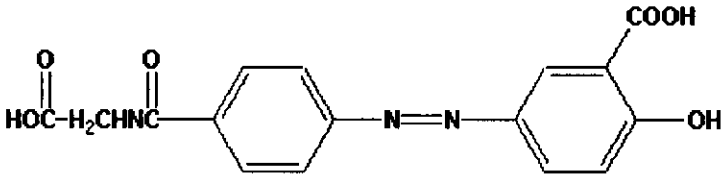
นำไปกำจัดน้ำออกโดยการ freeze dry อีกครั้ง จะได้ PABA-SA ที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดมีสีน้ำตาลแดง (รูปที่ 6)

2.2. การสังเคราะห์สารมาตรฐาน PAH-SA conjugate

ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ PABA-SA conjugate โดยใช้ PAH และ $NaNO_2$ อย่างละ 10 มิลลิโมล และใช้ SA 30 มิลลิโมล PAH-SA ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีส้มอ่อน (รูปที่ 6)



PABA-SA



PAH-SA

รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของ PABA-SA และ PAH-SA

2.3. การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน PABA-SA conjugate และ PAH-SA conjugate

วิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของ PABA-SA และ PAH-SA ด้วย HPLC โดยใช้ column ชนิด C_{18} (μBondapak 3.9X300 mm, Waters) และมี MeOH : PBS pH 4.4 (5 : 95) เป็น mobile phase และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร

3. การพิสูจน์โครงสร้างของ conjugates

การพิสูจน์โครงสร้างของ conjugate จะพิสูจน์โดยใช้ ^{1}H-NMR 500 MHz ตัวทำละลายที่ใช้จะเป็นdeuterium oxide (D_2O) สำหรับตัวอย่างที่เป็น PAMAM-PABA-SA conjugate หรือ PAMAM-PAH-SA conjugate และตัวทำละลายเป็น DMSO เมื่อตัวอย่างเป็น PABA-SA conjugate หรือ PAH-SA conjugate

4. การวิเคราะห์หาจำนวนโมลของ 5-ASA ที่เชื่อมต่อกับ PAMAM dendrimer

การวิเคราะห์หาจำนวนโมลของ 5-ASA จะใช้เทคนิค UV-visible spectroscopy โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานของ PABA-SA conjugate และ PAH-SA conjugate ใน DMSO ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.00-10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.2-0.8 จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างของ PAMAM-PABA-SA และ PAMAM-PAH-SA ใน DMSO โดยเตรียม PAMAM-PABA-SA ให้มีความเข้มข้น 18.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน PAMAM-PAH-SA จะเตรียมให้มีความเข้มข้น 8.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร แล้วจึงเทียบหาความเข้มข้นของ PABA-SA และ PAH-SA ที่อยู่ในสารละลายตัวอย่าง

B. การศึกษาการปลดปล่อย 5-ASA ในระบบทางเดินอาหาร

ในการศึกษาการปลดปล่อย 5-ASA ทำการศึกษาในระบบทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ได้แก่ กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง conjugate 2 ชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นกับ Sulfasalazine

1. การเตรียมโฮโมจีเนตและของไหลจากส่วนต่าง ๆ ของระบบทางเดินอาหาร

1.1 การเตรียมของไหลจากส่วนซีคัม (cecal content) ของหนู

ตัดลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัมของหนู Wistar (น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม) จากนั้นบีบเอาส่วนที่อยู่ภายในออกมา แล้วนำมากระจายตัวใน PBS pH 6.8 ซึ่งมี α-D-glucose monohydrate ผสมอยู่ 0.3 %W/V ที่ผ่านการกำจัดออกซิเจนออกไปแล้ว ให้ได้ความเข้มข้นของสารแขวนตะกอนประมาณ 10 %W/V แล้วนำไปกรองผ่านสำลี

1.2 การเตรียมโฮโมจีเนตของกระเพาะและลำไส้เล็ก[18]

ตัดกระเพาะหรือลำไส้เล็กของหนู Wistar นำแต่ละส่วนมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วเติม PBS ลงไป โดยส่วนของกระเพาะจะเติม PBS pH 4.5 และส่วนของลำไส้เล็กจะเติม PBS pH 6.8 ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10 %W/V จากนั้นนำไปปั่นโดยเครื่อง homogenizer จนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่างของ PAMAM-PABA-SA, PAMAM-PAH-SA และ Sulfasalazine

ชั่ง PAMAM-PABA-SA 18.3 มิลลิกรัม และ PAMAM-PAH-SA 8.1 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร ส่วน Sulfasalazine นั้นจะชั่งมา 20.9 มิลลิกรัม ละลายใน PBS pH 6.8 พร้อมกับหยด KOH 1 หยด แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรจากนั้นแบ่งมา 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย PBS pH 6.8 ให้ครบ 10 มิลลิลิตร อีกครั้ง

3. การศึกษาการปลดปล่อย 5-ASA

3.1 การศึกษาการปลดปล่อย 5-ASA ในโคลอน (รูปที่ 7)

นำสารตัวอย่างของ PAMAM-PABA-SA, PAMAM-PAH-SA หรือ Sulfasalazine มาผสมกับของไหลจากส่วนซีคัมในอัตราส่วน 1 : 1 โดยใช้สารละลายของสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารแขวนตะกอนของโคลอน 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ใน anaerobic jar และ incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างครั้งละ 450 ไมโครลิตร ที่เวลา 2, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 30%W/V Trichloroacetic acid 100 ไมโครลิตร

3.2 การศึกษาการปลดปล่อย 5-ASA ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก (รูปที่ 8)

นำสารละลายตัวอย่างของ PAMAM-PABA-SA และ PAMAM-PAH-SA มาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ผสมกับโฮโมจีเนตของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก 0.5 กรัม จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างครั้งละ 300 ไมโครลิตร ที่เวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 30% W/V trichloroacetic acid 50 ไมโครลิตร

4. การวิเคราะห์หาปริมาณ 5-ASA ที่ถูกปลดปล่อยออกมา

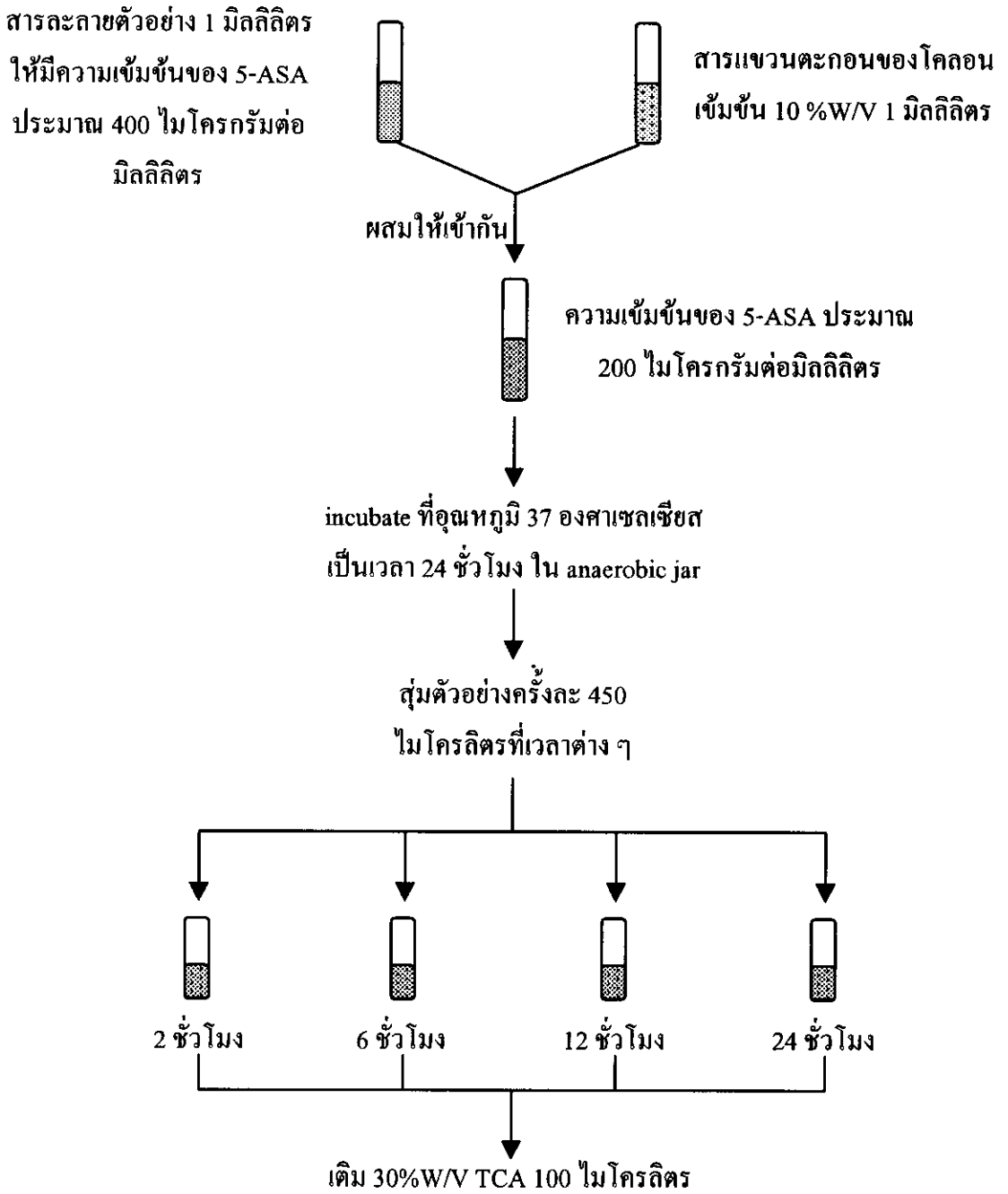
4.1 การสกัดสารตัวอย่างและการหา %Recovery

เมื่อสุ่มได้สารตัวอย่างตามเวลาต่างๆแล้วจะต้องทำการสกัดสารตัวอย่างเพื่อกำจัดตะกอนต่าง ๆออกไป โดยใช้ Solid phase extraction (SPE) ซึ่งเป็น cartridge ชนิด C_{18} ขนาด 3 มิลลิลิตร ขั้นตอนในการสกัด คือ ชะ cartridge ด้วย MeOH 2 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำ 3 มิลลิลิตร และ PBS pH 6.8 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารตัวอย่างลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วล้างด้วย PBS pH 6.8 1 มิลลิลิตร สุดท้ายชะ 5-ASA ออกด้วย PBS pH 6.8 3 มิลลิลิตร

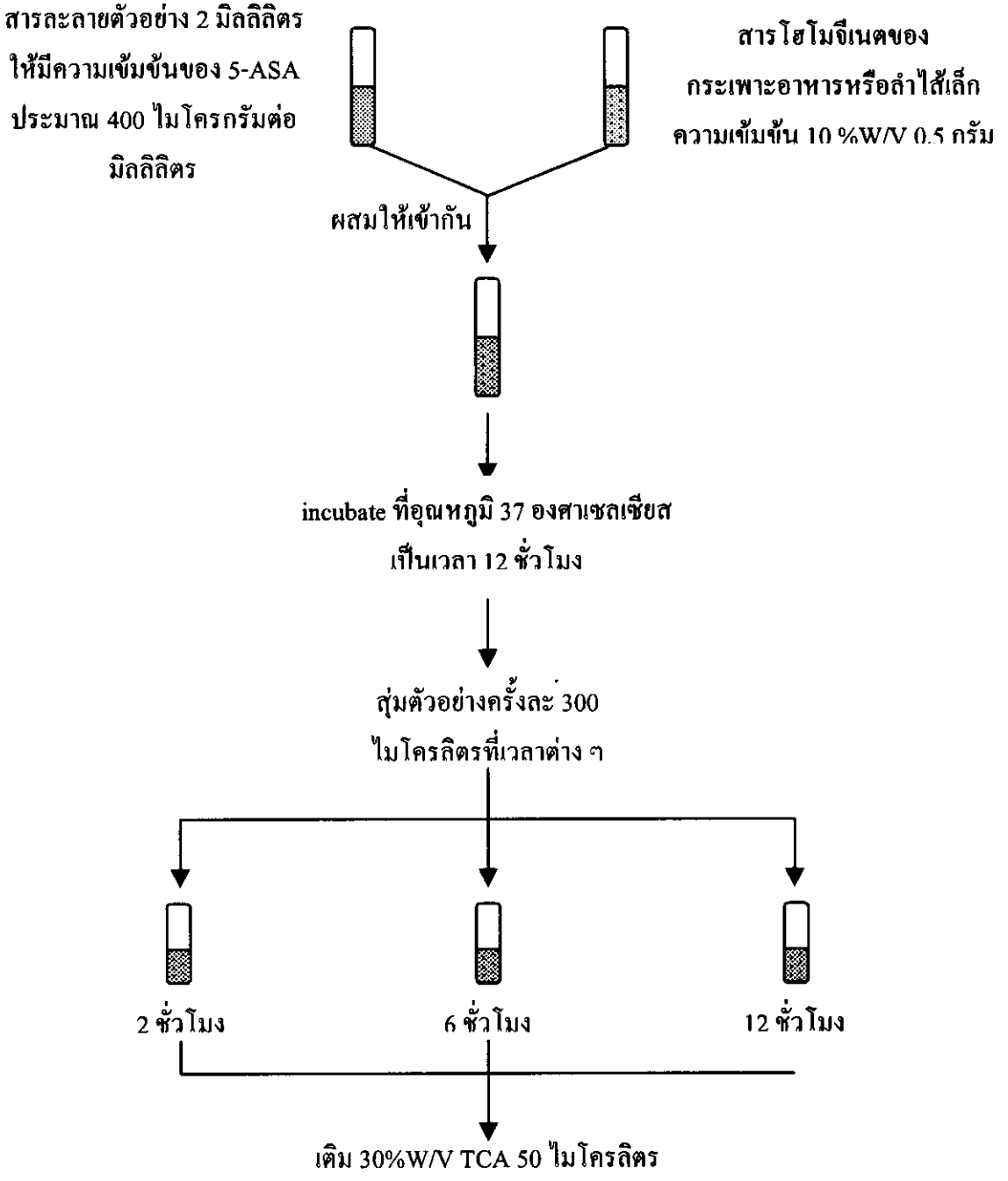
ทำการหา %Recovery โดยเตรียมสารตัวอย่างของ 5-ASA ในของไหลจากซีคัมให้มีความเข้มข้น 96 และ 28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นชะ cartridge และเติมสารตัวอย่างโดยใช้ขั้นตอนเดียวกับที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ 5-ASA

การวิเคราะห์หาปริมาณจะใช้วิธี HPLC โดยใช้ column ชนิด C_{18} (μBondapak 3.9×300 mm, Waters) และ mobile phase เป็น MeOH : PBS pH 6.0 (5 : 95) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร



รูปที่ 7 แผนภาพแสดงการศึกษาการปลดปล่อย 5-ASA ในสารแขวนตะกอนของโคลอน



รูปที่ 8 แผนภาพแสดงการศึกษาการปลดปล่อย 5-ASA ในสารแขวนตะกอน
ของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก