



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินเพื่อใช้ในระบบนำส่งยาที่ไม่ละลายในน้ำ

โดย

ผศ.ดร.โสธดา กนกพานนท์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ

รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

ภาควิชาสรีระวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุมภาพันธ์ 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินเพื่อใช้ในระบบนำส่งยาที่ไม่ละลายในน้ำ

โดย

ผศ.ดร.โสธรา กนกพานนท์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ

รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

ภาควิชาสรีระวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
Executive Summary	iii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง และตรวจเอกสาร	3
1.4.1) ระบบนำส่งยา (drug delivery system)	3
1.4.2) เคอร์คูมิน (curcumin)	4
ก. องค์ประกอบทางเคมี	4
ข. คุณสมบัติของเคอร์คูมิน	8
ค. การวัดปริมาณของเคอร์คูมิน	10
ง. การใช้เคอร์คูมินรักษามะเร็ง	12
จ. ระบบนำส่งของเคอร์คูมิน	13
1.4.3) เจลาติน (gelatin)	15
ก. คุณสมบัติของเจลาติน	15
ข. การใช้เจลาตินในระบบนำส่งภายในร่างกาย	17
ค. การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาติน	18

1.4.4) คอเลสเตอรอล(cholesterol)	19
1.4.5) เอกสารสิทธิ (Patents) ที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	23
2.1 การดัดแปลงโครงสร้างเจลาติน	24
2.2 การขึ้นรูปแผ่นเจลาตินดัดแปลง	24
2.3 การศึกษาลักษณะสมบัติของเจลาตินดัดแปลงและแผ่นเจลาตินดัดแปลง	25
2.3.1) การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ	25
2.3.2) การบวมน้ำ (Water swelling)	25
2.3.3) มุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle)	25
2.3.4) อุณหภูมิในการเสถียรภาพ	25
2.3.5) การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (<i>In vitro</i> degradability)	25
2.4 การทดลองปลดปล่อยเคอร์คิวมินในห้องปฏิบัติการ (<i>In vitro</i> release)	26
2.5 การทดสอบความเป็นพิษของแผ่นเจลาตินดัดแปลง	26
2.6 ระดับเคอร์คิวมินในเลือดของสัตว์ทดลองที่มีการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงใต้ผิวหนัง	26
2.7 การทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คิวมินที่ปลดปล่อยจากแผ่นเจลาตินดัดแปลง	27
2.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	29
2.9 การทดลองในสัตว์	29
บทที่ 3 ผลการทดลองและบทวิเคราะห์	30
3.1 ความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอล	30
3.1.1) การลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ	30
3.1.2) ค่ามุมสัมผัสน้ำ (Water Contact Angle) ของฟิล์มบาง	30

3.1.3) โครงสร้างทางเคมีของแผ่นเจลาตินดัดแปลง	31
3.2 ลักษณะสมบัติของแผ่นเจลาตินดัดแปลง	32
3.2.1) ลักษณะภายนอกของแผ่นเจลาตินดัดแปลง	32
3.2.2) ระดับการเชื่อมขวาง (Degrees of crosslink)	33
3.2.3) การดูดซับน้ำ (Water swelling)	35
3.2.4) อุณหภูมิในการเสถียรภาพ (Degradation Temperature, Td)	36
3.2.5) การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (<i>In vitro</i> degradation)	36
3.3 การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลาตินดัดแปลงในห้องปฏิบัติการ (<i>In vitro</i> release experiments)	37
3.4 การทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity test) ของแผ่นเจลาตินดัดแปลง	38
3.5 การทดสอบการนำส่งเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง	40
3.6 การทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คูมินจากแผ่นเจลาตินดัดแปลงต่อก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลอง	42
บทที่ 4 บทสรุป	46
4.1 สรุปผลการทดลอง	46
4.2 ข้อเสนอแนะในการต่อยอดการวิจัยในอนาคต	48
4.3 ผลที่ได้จากโครงการวิจัย (Outputs)	
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	
เอกสารแนบผลที่ได้จากโครงการวิจัย (Outputs)	
ประวัติผู้วิจัย	

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างของ เคอร์คูมิน, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin	5
1.2 พีคของเคอร์คูมินและอนุพันธ์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	6
1.3 กราฟ HPLC ของเคอร์คูมิน	7
1.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเคอร์คูมินและหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ	7
1.5 การสลายตัวของเคอร์คูมินใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2	9
1.6 กราฟ HPLC ของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของสารละลายเคอร์คูมินใน 0.1 M phosphate buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	9
1.7 ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในพลาสมาของหนูทดลองโดยการป้อนทางปาก	10
1.8 กราฟ HPLC ของ (ก.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูก่อนป้อนเคอร์คูมินอยด์ (ข.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูหลังป้อนเคอร์คูมินอยด์ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปปฏิกิริยาด้วย b-glucuronidase (ค.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูหลังป้อนเคอร์คูมินอยด์ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปปฏิกิริยาด้วย b-glucuronidase/sulfatase	11
1.9 การปลดปล่อยของเคอร์คูมิน เปรียบเทียบกับที่ผสม PVP ที่อัตราส่วนต่างๆ	14
1.10 ขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin	16
1.11 สูตรโครงสร้างของคอเลสเตอรอล	20
1.12 การเตรียม cholesterol - conjugated PGD-G4	20
2.1 แผนผังสรุปการทดลองในงานวิจัย	23
2.2 สมการการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอล	24
2.3 ภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง	27
2.4 หนู (nude mice) ที่ใส่ dorsal chamber บริเวณหลัง	28

3.1	ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค FTIR ของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง	32
3.2	ภาพถ่ายลักษณะภายนอกและภาคตัดขวางถ่ายผ่านกล้อง Scanning electron microscope ของแผ่นเจลลาตินที่ดัดแปลงด้วยคลอเลสเตอร์รอล ปริมาณ 25-125%	33
3.3	การเชื่อมขวาง (crosslink) เจลาตินด้วยวิธีทางเคมี	34
3.4	การสูญเสียน้ำหนักของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง	37
3.5	การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง	38
3.6	ผลการทดสอบความเป็นพิษ ในรูปการยี้ดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังแท้	39
3.7	แสดงกราฟ HPLC ของ (ก.) เคอร์คูมินในสารละลายเอทานอล (ข.) พลาสมาที่แยกจากหนูที่ได้รับการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน (ค.) พลาสมาที่แยกจากหนูที่ไม่ได้ฝังแผ่นเจลลาติน	40
3.8	ปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมา	41
3.9	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ แสดงการเกิดหลอดเลือดใหม่	43
3.10	ภาพชิ้นเนื้อที่ปลูกเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 14 วัน	45

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	เปรียบเทียบสมบัติของเจลลาติน Type A และ B
1.2	แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยประมาณในเจลลาติน
3.1	สรุปลักษณะสมบัติของเจลลาตินดัดแปลง
3.2	ปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมา (วิเคราะห์โดย HPLC) หลังจากการฝังแผ่นเจลลาติน ดัดแปลงใต้แผ่นหลังของ BALBcA mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลาต่างๆ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG 5080126

ชื่อโครงการ: การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินเพื่อใช้ในระบบนำส่งยาที่ไม่ละลายในน้ำ

ชื่อนักวิจัย: ผศ. ดร.โสธรา กนกพานนท์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

e-mail address: sorada.k@chula.ac.th

ระยะเวลาของโครงการ: ธันวาคม 2549 – มกราคม 2552

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ และมีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาอย่างแพร่หลายโดยการเชื่อมพันธะกับคอลเลสเตอรอล ผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลโดยใช้ N,N'-Disuccinimidyl carbonate เป็นสารเชื่อมพันธะ (conjugating agent) การประเมินความสำเร็จของการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาติน จากปริมาณอะมิโนอิสระที่ลดลงร้อยละ 13-40% ความไม่ชอบน้ำของวัสดุที่เพิ่มขึ้น และโครงสร้างทางเคมีของเจลาตินที่เปลี่ยนไป เมื่อเพิ่มปริมาณคอลเลสเตอรอลในการดัดแปลงจาก 25 – 125 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณหมู่อะมิโนในเจลาติน เจลาตินดัดแปลงถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นและเชื่อมโยงขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าการดูดซับน้ำ, อัตราการย่อยสลาย, และอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินในห้องปฏิบัติการเป็นไปตามการปริมาณคอลเลสเตอรอลที่ใช้ในการดัดแปลง แผ่นเจลาตินที่ดัดแปลงนี้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 mouse fibroblasts ยาต้นแบบที่ใช้ในการทดสอบระบบนำส่ง คือเคอร์คูมิน (น้ำหนักโมเลกุล = 368) ซึ่งเป็นสารสกัดสมุนไพรที่ไม่ชอบน้ำที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่จะไปหล่อเลี้ยงก้อนมะเร็ง การปลดปล่อยเคอร์คูมินในร่างกายหนู BALB-c nude mice ที่วิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินในพลาสมา หลังการฝังแผ่นเคอร์คูมินใต้ผิวหนังหนูเป็นเวลา 14 วัน ด้วย High performance liquid chromatography พบลักษณะการปลดปล่อยของเคอร์คูมินแบบยั่งยืนเป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน โดยมีระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลองสูงสุดในวันที่ 6 หลังการปลูกถ่าย การทดสอบฤทธิ์ของยาที่ปลดปล่อยจากระบบนำส่งทำโดยการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงดูดซับเคอร์คูมิน 10 มิลลิกรัมเป็นเวลา 14 วัน ในบริเวณที่มีการปลูกก้อนมะเร็ง ชนิด HepG2 (มะเร็งตับ) บนผิวหนังหนูชนิดเดียวกัน พบว่าสามารถสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ถึง ประมาณ 47% และทำให้ขนาดของมะเร็งเฉลี่ยลดลง 73.18% ใช้ปริมาณเคอร์คูมินน้อยกว่าการกินถึงกว่า 80 เท่า ผลงานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ยานางานการใช้เจลาตินดัดแปลงเพื่อการนำส่งเคอร์คูมินสำเร็จในระดับสัตว์ทดลอง และแสดงให้เห็นว่าการใช้แผ่นเจลาตินดัดแปลงที่พัฒนาขึ้นดูดซับเคอร์คูมินในการบำบัดมะเร็งตับชนิด HepG-2 ให้ผลดีกว่าการใช้กินเคอร์คูมินโดยตรง

คำหลัก: เจลาตินดัดแปลง, ระบบนำส่ง, เคอร์คูมิน

Abstract

Project code: MRG 5080126

Project title: Modification of gelatin

Investigator: Sorada Kanokpanont, Ph.D.,

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

E-mail address: sorada.k@chula.ac.th

Project period: December 2006- January 2009

This research studied modification of gelatin, a soluble protein widely used in pharmaceutical applications, by conjugating with 25 -125% (mole) cholesterol using N,N'-disuccinimidyl carbonate as a conjugating agent. The success of structural modification was evaluated from the 13-40% reduction of free $-NH_2$ groups in gelatin, increasing hydrophobicities of the modified gelatin films and structural changes examined by FT-IR. Modified gelatin was fabricated into hydrogel patches and was chemical crosslinked with glutaraldehyde. Water swelling, enzymatic degradation, and rate of curcumin releases *in vitro* increased according to the amounts of cholesterol used in the modification. The modified gelatin was non-toxic to L929 mouse fibroblast cells compared to the native gelatin. Model drug used in this delivery system is curcumin (MW 368), a hydrophobic herbal extract reported to have anti-cancer effect via the inhibition of neovascularization in solid tumors. *In vivo* releases were tested using curcumin loaded modified gelatin patches subcutaneously implanted on the backs of nude mice (BALBc, male, 6-8 weeks). The results of high performance liquid chromatography analysis of plasma curcumin level revealed that the system could sustain the curcumin releases for at least 14 days, with the maximum peak at day 6 after implantation. Effectiveness of curcumin released of the modified gelatin patches was tested in nude mice bearing HepG-2 solid tumors. The system inhibited approximately 47% neovascularization and reduced the tumor sizes by 73.18%. This work was the first reports showing development of curcumin controlled release system with the safety and efficacy tests in animals. The results indicated that this sustained release system enhances curcumin effectiveness and uses 80X lower dose compared to the treatment by mouth feedings.

Keywords: Modified gelatin, delivery system, curcumin

Executive Summary

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อดัดแปลงโครงสร้างของเจลาติน (G) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี ย่อยสลายทางชีวภาพและเข้ากันได้ดีกับร่างกาย แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถสร้างพันธะกับสารประเภทไม่ละลายน้ำได้ เพื่อให้มีความไม่ชอบน้ำมากขึ้นพอนำส่งสารเคอร์คูมินซึ่งไม่ละลายน้ำ การดัดแปลงทำโดยการเชื่อมโยงหมู่ $-OH$ ใน คอลเลสเตอรอล กับหมู่ $-NH_2$ ในโครงสร้างของเจลาติน โดยใช้อัตราส่วน 25 -125% โดยโมล (CG 25 – CG 125) ผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลโดยใช้ N,N' -Disuccinimidyl carbonate เป็นสารเชื่อมพันธะ (conjugating agent) ผลการดัดแปลงโครงสร้างจาก FTIR พบว่าโครงสร้างของเจลาตินเปลี่ยนแปลงไป โดยมีหมู่ $N-H$ ลดลง และ $C-OH$ สูงขึ้นตามปริมาณคอลเลสเตอรอลที่ใช้ในการดัดแปลง โดยพบปริมาณหมู่ $-NH_2$ ลดลง 13-40 % ความไม่ชอบน้ำของเจลาตินเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยดูจากค่ามุมสัมผัสน้ำที่เพิ่มขึ้น จาก 70 องศา (G) เป็น 102 องศา (CG 125) ผลการทดสอบย่อยสลายทางชีวภาพของระบบนำส่งยาว่าสามารถควบคุมให้อยู่ในช่วงประมาณ 1-3 สัปดาห์ได้ ระดับการเชื่อมโยงพันธะของแผ่นเจลาตินดัดแปลงมีผลต่อปริมาณยาที่บรรจุ, การดูดซับน้ำ, อุณหภูมิในการย่อยสลาย, การย่อยสลายทางชีวภาพ และการปลดปล่อยเคอร์คูมินเป็นไปตามการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลง ซึ่งมีอัตราสัมพันธ์กับปริมาณคอลเลสเตอรอลที่ใช้ในการดัดแปลง เจลาตินดัดแปลงถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-drying) แล้วทำการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารละลาย glutaraldehyde ระดับการเชื่อมโยงพันธะของแผ่นเจลาตินดัดแปลงลดลงตามลำดับเมื่อเจลาตินได้รับการดัดแปลงโครงสร้างมากขึ้น เนื่องจากกระบวนการทั้งสองต้องให้หมู่ $-NH_2$ ที่มีอยู่จำกัดในโครงสร้างของเจลาติน ระดับการเชื่อมโยงพันธะส่งผลต่อการย่อยสลายและการบวมตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลง ผลการทดลองนำส่งเคอร์คูมิน ในสภาวะเลียนแบบสภาวะร่างกาย (*in vitro* release) ซึ่งให้เห็นกลไกการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลาตินดัดแปลง (ในสารละลาย PBS buffer ผสม 0.01% Tween 80) ที่เกิดขึ้นได้สองช่วง ได้แก่ การแพร่ (diffusion) ของเคอร์คูมิน ที่ดูดซับเกินในช่วงเวลา 15 ชั่วโมงแรก และการปลดปล่อยตามการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงเนื่องจากการเกิดพันธะ hydrophobic ระหว่างเคอร์คูมินกับแผ่นเจลาตินดัดแปลง ดังนั้นระบบดังกล่าวนี้จึงมีศักยภาพที่จะใช้ในการปลดปล่อยเคอร์คูมินในร่างกายอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ก่อนนำแผ่นเจลาตินดัดแปลงไปทดลองใช้จริงในสัตว์ทดลองได้มีการนำแผ่นเจลาตินไปทดสอบความเป็นพิษโดยการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์พบว่าปริมาณเซลล์ในแผ่นเจลาตินที่ดัดแปลง CG25, CG66 และ CG100 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณเซลล์ที่เลี้ยงบนแผ่นเจลาติน (G) ดังนั้นการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเตอรอลจึงไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ ผลการทดลองทั้งหมดแสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้เจลาตินดัดแปลงในการควบคุมการนำส่งยาชนิดไม่ละลายน้ำภายในร่างกาย

เมื่อนำแผ่นเจลลาตินดัดแปลงด้วยคลอเลสเทอรอล 66% (GC 66) มาดูดซับเคอร์คูมิน ปริมาณ 100 และ 400 ไมโครกรัมและฝังไว้ใต้ผิวหนังหนู BALB-c mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 20-25 กรัมเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และมีการตรวจสอบปริมาณเคอร์คูมินในเลือดของ หนูโดยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) พบว่ากลุ่มที่ฝังแผ่นเจลลาติน ดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 100 ไมโครกรัม พบปริมาณ เคอร์คูมิน ในพลาสมาสูงในวันที่ 6 ใน ปริมาณเฉลี่ย 0.04 ไมโครกรัม จนกระทั่งไม่พบเลยในวันที่ 14 ในกลุ่มที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ ดูดซับ เคอร์คูมิน 400 ไมโครกรัม พบพีคของเคอร์คูมิน ในพลาสมาสูงในวันที่ 6 เช่นเดียวกันใน ปริมาณเฉลี่ย 0.12 ไมโครกรัม และยังมีปรากฏให้เห็นอยู่ 0.05 ไมโครกรัม ในวันที่ 14 ซึ่งแสดงถึง ความสามารถในการควบคุมการส่งผ่านเคอร์คูมินแบบยั่งยืน(sustained release) ของแผ่น เจลาตินดัดแปลง และเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของ เคอร์คูมิน ที่ปลดปล่อยออกมาจากแผ่นเจลลาติน ดัดแปลง โดยการฝังในบริเวณที่มีการปลูกก้อนมะเร็ง (solid tumor) ชนิด HepG2 (มะเร็งตับ) บน ผิวหนังหนูชนิดเดียวกัน พบว่าสามารถสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ถึง ประมาณ 47 % และทำให้ขนาดของมะเร็งเฉลี่ยลดลง 73.18% ในการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงขนาด 10 มิลลิกรัม ในเวลา 14 วัน ใช้ปริมาณเคอร์คูมินน้อยกว่าการกินถึงกว่า 80 เท่าและมีผลทำให้มะเร็งมีขนาด เล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลงานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่รายงานการใช้เจลลาตินดัดแปลงเพื่อการนำส่งเคอร์คูมิน สำเร็จในระดับสัตว์ทดลอง และแสดงให้เห็นว่าการใช้แผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่พัฒนาขึ้นดูดซับเคอร์ คูมินในการบำบัดมะเร็งตับชนิด HepG-2 ให้ผลดีกว่าการใช้กินเคอร์คูมินโดยตรง

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

โรคมะเร็งสาเหตุการตายของคนในประเทศไทยที่สูงที่สุด และมากกว่า 7 ล้านคนต่อปี เมื่อเทียบกับประชากรของโลกที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากรในทวีปเอเชียมีอัตราการตาย หรือมีการเกิดโรคมะเร็งชนิดสำคัญน้อยกว่าทางทวีปอื่นๆ เช่น ในประเทศศรีลังกานั้นเพียง 1/5-7 ของประชากรในอเมริกา ดังนั้นจึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มที่หันมาสนใจในเรื่องชนิดของอาหารที่รับประทานเป็นประจำ ในปี 2001 Sharma และคณะได้ทำการวิจัยและรายงานถึงความสำคัญของสารอาหารที่ช่วยในการต้านมะเร็ง (anti-cancer agents) ที่สำคัญได้แก่ “Turmeric” ซึ่งได้จากรากของสมุนไพรชนิดหนึ่งคือ *Curcuma longa* Linn. หรือ “ขมิ้นชัน” ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น “low molecular weight polyphenol” มีรายงานจำนวนมากว่าสารสกัดจากขมิ้นชัน (curcumin: diferuloyl methane) มีฤทธิ์ เป็น anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-viral, anti-parasitic และเมื่อไม่นานมานี้พบว่า เคอร์คูมิน ยังมีฤทธิ์เป็น chemopreventive agent against cancer [Kelloff et al., 1997]. การศึกษาวิจัยจำนวนมากที่ช่วยยืนยันถึงผลของเคอร์คูมิน ว่ามีกลไกยับยั้งการเจริญของหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenesis) จึงทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ได้ โดยมีรายงานในเซลล์มะเร็งของผิวหนังและเซลล์มะเร็งของลำไส้ [Huang, et al., 1997] แต่ก็มีนักวิจัยบางกลุ่มที่เชื่อว่า เคอร์คูมินสามารถยับยั้งในกระบวนการแบ่งเซลล์ด้วย โดยผ่านทาง nuclear factor-KB and activator protein-1 (AP-1) [Huang et al., 1991] การให้หนูทดลองกินเคอร์คูมิน (Sigma Co. 95%) ในขนาด 3000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่ปลูกในหนูชนิดไมส์และลดขนาดของมะเร็งที่ 14 วันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผ่านการยับยั้งการสร้างของหลอดเลือดใหม่ [Yoysungneon et al., 2005] โดยยับยั้ง vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX-2) [Yoysungneon et al., 2006] ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ [Ferrara et al., 1995].

ปัญหาในการใช้เคอร์คูมินคือสามารถดูดซึมที่ลำไส้ได้น้อยมาก การให้เคอร์คูมินขนาด 3000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในหนูหนักประมาณ 30 กรัม หนูจะได้รับเคอร์คูมินที่ดูดซึมเข้าไปในพลาสมาเพียงประมาณ 0.00027 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรของพลาสมา และถ้าหนูได้รับ 14 วัน โดยไม่มีการขับออกรวม เคอร์คูมินที่ควรจะมีอยู่ในพลาสมาคือ $14 \times 0.00027 = 0.0038$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตรของพลาสมา [www.bioperin.com/BioWithCur.htm] ดังนั้นเพื่อให้สามารถนำเคอร์คูมินมาใช้กับผู้ป่วยมะเร็งได้สะดวกโดยที่ผู้ป่วยไม่ต้องรับประทานจำนวนมาก (high dose) ต้องมีการพัฒนาระบบการควบคุมการปลดปล่อย (controlled release or sustained release system) ยาอย่างต่อเนื่องภายในร่างกาย

เจลาติน (gelatin) เป็นโปรตีนธรรมชาติที่มีอยู่จำนวนมากใน ผิวหนัง กระดูก เอ็น เล็บ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เกิดจากกระบวนการทำให้ คอลลาเจน (collagen) เสียสภาพ ถูก เลือกใช้เป็นวัสดุหลักที่จะเป็นตัวนำเคอร์คูมินเข้าสู่เป้าหมายในร่างกายในงานวิจัยนี้เนื่องจาก เป็นวัสดุชีวภาพที่มีใช้งานทั่วไป ความปลอดภัยสูง ราคาไม่แพง ผลิตได้ในประเทศ เจลาตินที่มี โครงสร้างแบบ random coil ที่สามารถละลายได้ดีในน้ำในช่วงพีเอชที่กว้าง เจลาตินเป็น reversible thermo-set hydrogel กล่าวคือ จะเกิดเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า gel point (ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส) และผันกลับเป็นสารละลายได้ไม่จำกัดถ้าอุณหภูมิให้สูงกว่า gel point การใช้ประโยชน์จากเจลาตินในร่างกายจึงจำเป็นที่จะต้องมีการเชื่อมขวาง (crosslink) การเชื่อมพันธะระหว่างหมู่เอมีโนและหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของเจลาตินต่างสายกันอย่าง ถาวรด้วยพันธะโควาเลนต์ [Ozaki and Tabata, 2005, Tabata and Ikada, 1998] แผ่นเจลาตินที่เชื่อมขวาง (crosslinked gelatin hydrogel) จะมีความแข็งแรงทางกลสูงขึ้น ลดการ ละลายในน้ำ ทนทานต่อกระบวนการย่อยสลายโดยน้ำและเอนไซม์ภายในร่างกาย มีรายงาน การใช้แผ่นเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสาร glutaraldehyde เป็นตัวนำส่งยาและ growth factor ต่างๆ เข้าสู่ร่างกายในระดับการทดลองทางคลินิกและระดับการค้า [Tabata and Ikada, 1998]

ระบบการควบคุมการปลดปล่อย (controlled release or sustained release system) ยาวอย่างต่อเนื่อง โดยใช้ modified-hydrophilic hydrogel ของเจลาติน โดยมีการปรับปรุง พื้นผิว (surface modification) ของเจลาตินซึ่งโดยธรรมชาติสามารถละลายน้ำได้ดี ให้มีหมู่ hydrophobics เพื่อให้สามารถควบคุมการปล่อย curcuminoid อย่างต่อเนื่องโดยตรงในบริเวณที่มีเซลล์มะเร็งให้เป็นไปอย่างช้าๆตามการสลายตัวของไฮโดรเจล

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1) เพื่อดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี ให้สามารถ นำส่งยาที่ไม่ละลายในน้ำ (hydrophobic drug) แบบยั่งยืน (sustained release) ได้ โดยการเชื่อมโยง (conjugate) สารที่ไม่ละลายน้ำคือ คอลเลสเตอรอล (cholesterol) ใน โครงสร้าง
- 1.2.2) เพื่อผลิตระบบนำส่งยาที่ไม่ละลายน้ำ โดยนำเจลาตินดัดแปลงจากข้อ 1) มาขึ้น รูปเป็นแผ่น ที่สามารถควบคุมระดับการเชื่อมขวาง (degree of crosslinking) เพื่อ กำหนด ระยะเวลาในการใช้งานได้
- 1.2.3) เพื่อทดสอบระบบนำส่งยานอกร่างกายในระดับห้องปฏิบัติการ และใน สัตว์ทดลองโดยใช้เคอร์คูมินเป็นยาต้นแบบ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1) ดัดแปลงโครงสร้างของเจลาติน โดยการเชื่อมโยงคอลเลสเตอรอลปริมาณต่างๆ ในโครงสร้างของเจลาติน เพื่อให้เจลาตินดัดแปลงแสดง hydrophobicity มากขึ้นตาม

ปริมาณคลอเลสเทอรอลที่ใช้ในการดัดแปลง มีการศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีกายภาพของเจลาตินที่ดัดแปลงแล้ว

1.3.2) ขึ้นรูปเจลาตินดัดแปลงเป็นแผ่น hydrogel โดยมีการเชื่อมขวางพันธะ ทดสอบลักษณะสมบัติทางเคมีกายภาพของแผ่นเจลาตินดัดแปลง และทดสอบอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นว่าสามารถควบคุมการส่งผ่านแบบยั่งยืนได้

1.3.3) ทดสอบระบบนำส่งเคอร์คูมินนอกร่างกายในระดับห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง

1.3.4) เสนอความเป็นไปได้ในการใช้ระบบนำส่งในรูปแบบอื่นๆที่เพิ่มความสะดวกในการใช้งาน

1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง และตรวจเอกสาร

1.4.1) ระบบนำส่งยา (drug delivery system)

การให้ยาเข้าสู่ร่างกาย มีวัตถุประสงค์ให้ตัวยาเข้าสู่กระแสเลือดและกระจายไปยังตำแหน่งที่ตัวยาจะออกฤทธิ์ เพื่อให้เกิดผลในการรักษาหรือป้องกันโรคตามที่ต้องการโดยที่ยานั้นไม่ทำอันตรายต่อร่างกาย ซึ่งการที่ยาจะมีประสิทธิภาพและปลอดภัย นอกจากขึ้นกับคุณสมบัติของตัวยาแล้ว ยังขึ้นกับกระบวนการต่างๆในการผลิตยา นับตั้งแต่การตั้งสูตรตำรับ การเลือกสรรวัตถุดิบ กระบวนการผลิตและควบคุมคุณภาพ ความคงตัวของยาในภาชนะบรรจุ หรือที่จัดเก็บ การปลดปล่อยตัวยาในรูปแบบต่างๆ ณ จุดที่ดูดซึม จนกระทั่งตัวยาเข้าสู่กระแสเลือด นอกจากนี้ กระบวนการต่างๆที่ร่างกายกระทำต่อยา เช่น การจับกับโปรตีนของยาในเลือด การกระจายของยาเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆโดยเฉพาะสู่จุดที่ยาออกฤทธิ์ รวมทั้งการกำจัดยาออกจากร่างกาย ก็มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของยาด้วยเช่นกัน

การให้ยาเข้าสู่ร่างกาย ไม่ว่ายาจะอยู่ในรูปเภสัชภัณฑ์ชนิดใด ตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเภสัชภัณฑ์นั้นก่อน แล้วจึงเกิดการละลายในทางเดินอาหาร ตัวยาจะถูกดูดซึมผ่านเข้าสู่กระแสเลือด และกระจายไปตามเนื้อเยื่อต่างๆเพื่อไปออกฤทธิ์ ขณะเดียวกัน ยาจะถูกร่างกายกำจัดออกไปอาจโดยทางปัสสาวะหรือถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับโดยกระบวนการเมแทบอลิซึม [สุพงษ์, 2547]

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในพลาสมากับเวลาใช้อธิบายกระบวนการดูดซึม กระบวนการกระจายของยาไปตามเนื้อเยื่อต่างๆและกระบวนการกำจัดยาได้เป็นอย่างดี โดยจะบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของปริมาณยาในร่างกาย ลักษณะการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของระดับยาในพลาสมาแสดงให้เห็นถึงการที่ยาเข้าสู่หรือออกจากระบบไหลเวียนเลือด การเพิ่มขึ้นหรือลดลงบ่งบอกถึงอัตราเร็วที่ยาเข้าสู่หรือออกจากระบบไหลเวียนเลือด โดยทั่วไปแล้วความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในพลาสมากับเวลาที่เกิดจากการให้ยาโดยวิธีใดวิธีหนึ่งจะมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันสำหรับยาส่วนใหญ่ เช่น ถ้าเกิดจากการฉีดยาเข้าเส้นเลือดดำแบบไอยูโวลัสซึ่งเป็นการฉีดยาทั้งหมดเข้าสู่กระแสเลือดยาจะกระจายไปตามส่วนต่างๆของร่างกาย

ปริมาณยาในร่างกายจะสูงสุดหลังฉีดจากนั้นจะลดลงเนื่องจากยาถูกกำจัดโดยกลไกการกำจัดยาของร่างกาย

พื้นที่ทั้งหมดใต้เส้นโค้งของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในเลือดกับเวลา เรียกว่า ค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง (Area Under the Curve, AUC) เป็นพื้นที่ที่นับตั้งแต่เริ่มให้ยา จนถึงอนันต์ ค่า AUC จะแสดงปริมาณยาที่มีอยู่ในร่างกายทั้งหมดนับตั้งแต่เริ่มให้ยาจนกระทั่ง ยาถูกกำจัดออกจากร่างกายจนหมด เรียกว่าเป็น moment อันดับศูนย์ ของ concentration-time profile ค่านี้อาจหาโดยการ integrate ก็ได้ ถ้าทราบค่าฟังก์ชันของความเข้มข้นที่เวลาต่าง ๆ ค่านี้จะมีค่าสูงถ้าดูดซึมดี หรือสามารถปลดปล่อยอย่างเหมาะสมจนยากำจัดออกช้า ในกรณีของ ยานีด IV Bolus จะใช้การควบคุมให้ระดับความเข้มข้นของยาในเลือดอยู่ในช่วงการรักษา จำเป็นจะต้องให้ยาหลายครั้งต่อวัน เพราะตัวยาคจะถูกปลดปล่อยออกมาามากที่สุดในตอนต้นๆ และลดปริมาณลงเรื่อยๆจนหมด การให้ยาซ้ำในขนาดต่อมาจะได้ระดับยาในเลือดขึ้นๆลงๆเป็น แบบฟันเลื่อย ลักษณะเช่นนี้ทำให้เสี่ยงต่อการที่ระดับยาอาจต่ำมากจนไม่สามารถแสดงฤทธิ์ หรืออาจสูงมากจนเกิดอาการข้างเคียงหรือเป็นพิษได้ [ณรงค์ ,2535]

ดังนั้น ระบบนำส่งยา เป็นการเตรียมยาในรูปแบบต่างๆ ที่สามารถควบคุมให้ปลดปล่อย ยาในอัตราและปริมาณที่กำหนด และสามารถนำยาไปยังอวัยวะ หรือบริเวณเป้าหมายใน ร่างกายได้ตามต้องการ เพื่อทำให้เกิดผลสูงสุดในการรักษาและลดผลข้างเคียง รูปแบบของ ระบบนำส่งยาแบ่งออกเป็น 2 แบบ แบบแรก แบ่งออกได้ตามวิธีการให้ยา ได้แก่ ระบบที่ใช้ รับประทาน ระบบที่ใช้ฉีด ระบบที่ใช้ทางตา ระบบที่ใช้ทางผิวหนัง ระบบที่ใช้สอดในช่องคลอด เป็นต้น และแบบที่สอง แบ่งออกตามกลไกการปลดปล่อยตัวยา เช่น ระบบที่ใช้หลักการแพร่ ระบบที่ใช้หลักการละลาย ระบบที่ใช้แรงดันออสโมซิส ระบบแลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งระบบนำส่ง ยาในรูปแบบที่ต่างกัน จะมีกลไกและลักษณะการปลดปล่อยตัวยาที่แตกต่างกัน เช่น ยาใน รูปแบบที่ปลดปล่อยโดยวิธีการละลาย ก็จะต่างไปจากการปลดปล่อยยาโดยวิธีแลกเปลี่ยน ไอออน เป็นต้น [ณรงค์ ,2535]

ปัญหาหลักในการออกแบบและผลิตระบบนำส่งยานั้น อาจแบ่งออกได้เป็นขั้นตอนต่างๆดังนี้

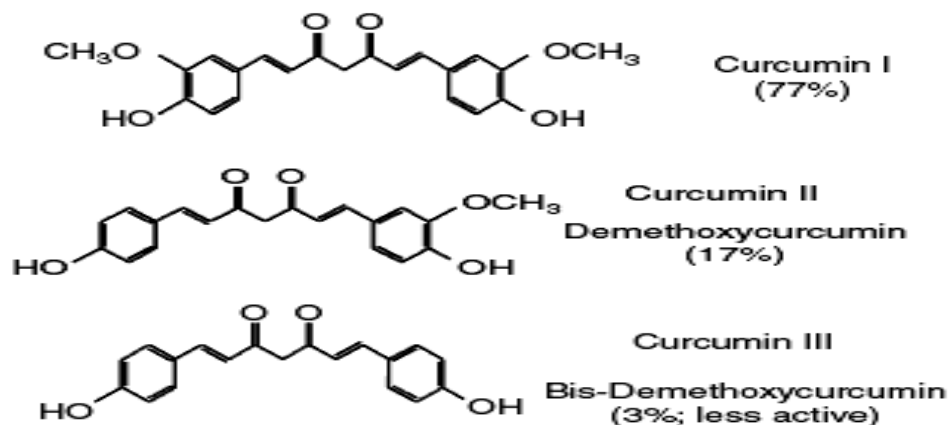
1. ทำอย่างไร ยาจึงจะไปถึงและออกฤทธิ์ยังบริเวณที่ต้องการของร่างกาย
2. ทำอย่างไรยาจึงจะถูกปลดปล่อยออกมาในรูปแบบตามต้องการ ในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง
3. ทำอย่างไรจึงจะผลิตยาในรูปแบบที่เหมาะสมโดยมีลักษณะของการปลดปล่อยยา ดังกล่าวได้

1.4.2 เคอร์คูมิน (curcumin)

ก. องค์ประกอบทางเคมี

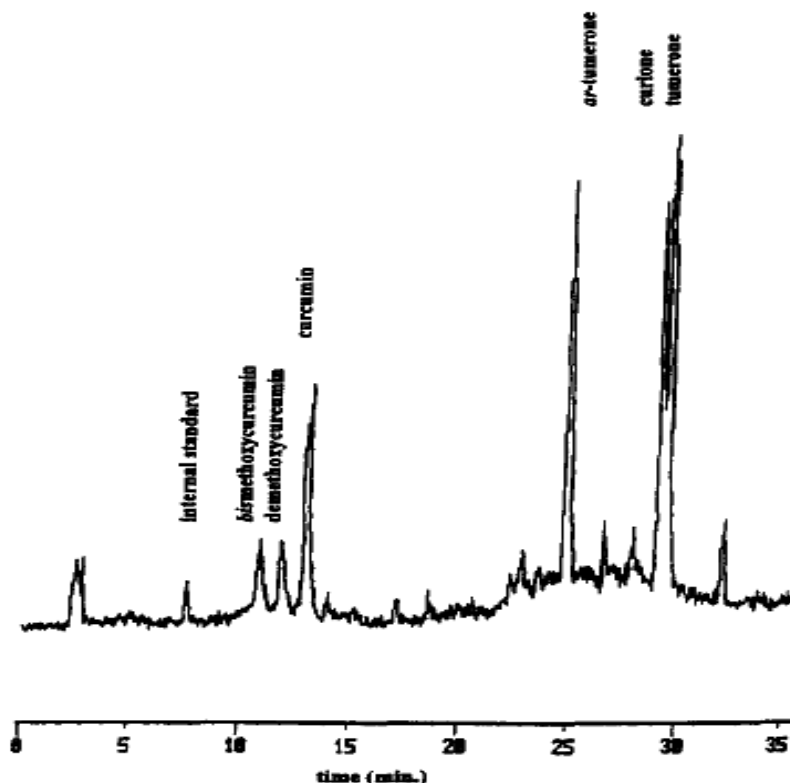
สารเคอร์คูมินอยด์เป็นรงควัตถุสีเหลืองมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenolic compound) โครงสร้างทางเคมีของสารเคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วยกรดเฟอร์ริก (ferric acid) 2 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์

ว่า diferuloylmethane สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันมีอยู่ 3 ชนิดด้วยกันคือ Bis-(feruloyl)methane หรือ 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ เคอร์คูมิน ($C_{21}H_{20}O_6$) เป็นเคอร์คูมินอยด์ที่พบมากที่สุดที่ขมิ้นชัน คือ ประมาณ 77% สำหรับ Feruloyl-(p-hydroxycinnamoyl)methane หรือ demethoxycurcumin ($C_{20}H_{18}O_5$) และ Bis(p-hydroxycinnamoyl)methane หรือ bisdemethoxycurcumin ($C_{19}H_{16}O_4$) เป็นเคอร์คูมินอยด์ที่พบในขมิ้นชันในปริมาณที่น้อยกว่า เคอร์คูมิน ดังรูปที่ 1.1



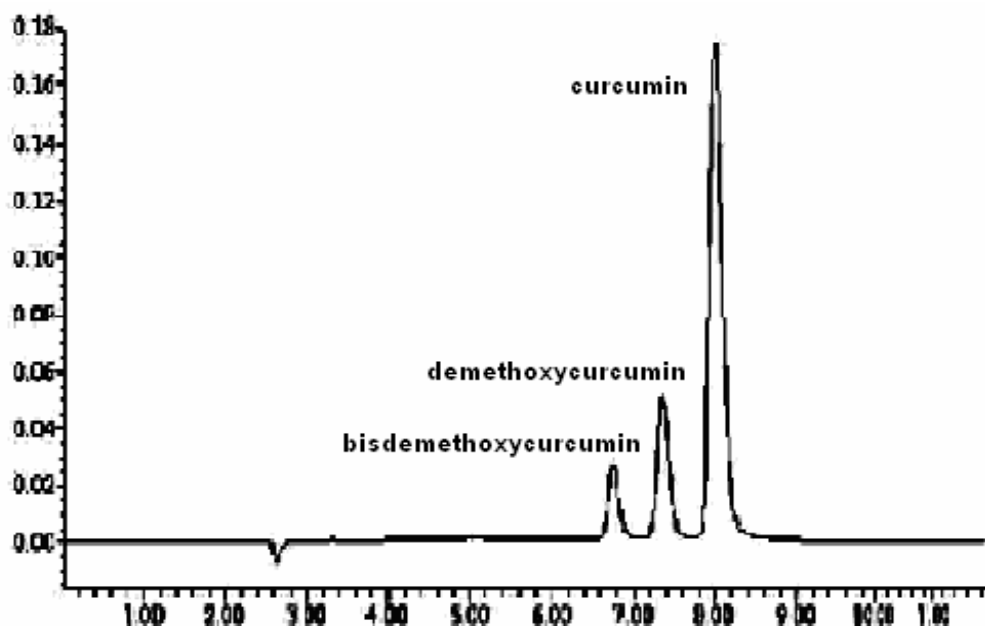
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ เคอร์คูมิน, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin
[ที่มา: Bharat B. Aggarwal และคณะ, 2005]

ในปี 1996 Richard Hiserodt และคณะ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์หาปริมาณของเคอร์คูมิน (MW 368), Demethoxycurcumin (MW 338) และ Bisdemethoxycurcumin (MW 308) โดยใช้ column LC-18 และ Mobile phase A ใช้ citric acid ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (pH 3 ใช้ NaOH ในการปรับ pH), Mobile phase B ใช้ acetonitrile ที่อุณหภูมิ 136°C และ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที จากการทดลองจะพบ Bisdemethoxycurcumin 0.57% ที่เวลา 11 นาที , demethoxycurcumin 0.64% ที่เวลา 12 นาทีและ เคอร์คูมิน 1.75% ที่เวลา 13 นาที ตามลำดับดังรูปที่ 1.2



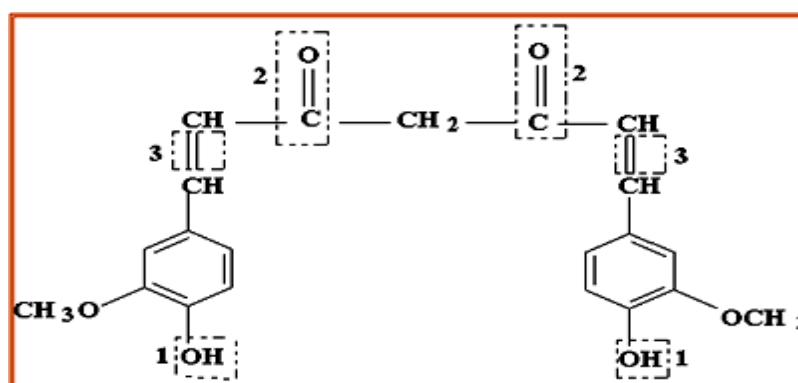
รูปที่ 1.2 พีคของเคอร์คูมิน และอนุพันธ์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ; column LC-18 และ Mobile phase A ใช้ citric acid ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (pH 3 ใช้ NaOH ในการปรับ pH), Mobile phase B ใช้ acetonitrile ที่อุณหภูมิ 136°C และ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที [ที่มา : Richard Hiserodt และคณะ, 1996]

ในปี 2006 ปรีชา บุญจูง และคณะ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์หาปริมาณของเคอร์คูมิน (MW 368), Demethoxycurcumin (MW 338) และ Bisdemethoxycurcumin (MW 308) โดยใช้ column LC-18 และ Mobile phase ที่ใช้คือ acetic acid ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, acetonitrile และ methanol โดยอัตราส่วนระหว่าง 1% acetic acid : acetonitrile คือ 45 : 55 , อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที, UV-detector วัดที่ $\lambda = 425$ nm จากการทดลองจะพบ Bisdemethoxycurcumin ที่เวลา 6.7 นาที , พบ Demethoxycurcumin ที่เวลา 7.3 นาที และ พบเคอร์คูมินที่เวลา 8.05 นาที ตามลำดับดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 กราฟ HPLC ของเคอร์คูมิน ในสภาวะ column C18 (250 x 4.6 mm.), flow rate 1 ml/min, mobile phase 1% acetic acid : acetonitrile (45:55), UV-detector วัดที่ $\lambda = 425$ nm, injection volume 20 μ l (ปรีชา และคณะ, 2549)

จากสูตรโครงสร้างทางเคมีของเคอร์คูมินจะพบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ 3 ส่วน ดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเคอร์คูมินและหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ

1. Parahydroxyl groups – มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ
2. Keto group – มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ ต่อต้านมะเร็ง ต่อต้านการเปลี่ยนแปลง
3. Double bonds - มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ ต่อต้านมะเร็ง ต่อต้านการเปลี่ยนแปลง

ข. คุณสมบัติของเคอร์คูมิน

เคอร์คูมินมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอมส้ม มีน้ำหนักโมเลกุล 368.97 ประกอบด้วย คาร์บอน 68.47% โดยน้ำหนัก, ไฮโดรเจน 5.47 % โดยน้ำหนัก, ออกซิเจน 26.02% โดยน้ำหนัก มีคุณสมบัติโดยทั่วไปดังนี้

- การละลาย

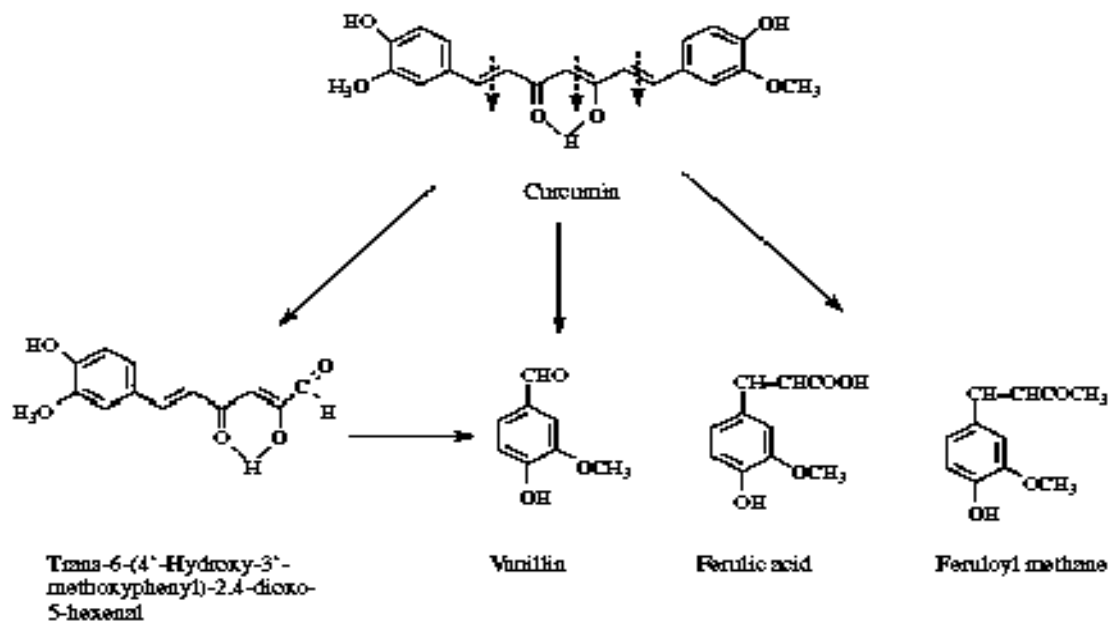
เคอร์คูมินไม่ละลายในน้ำและอีเทอร์ แต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์, กรดแกลเซียลอะซีติก (glacial acetic acid), คลอโรฟอร์ม (chloroform), คีโตน (ketone), อัลคาไลน์ (alkali) และไขมันเนื่องจากเป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว (nonpolar) [Ishita Chattopadhyay และคณะ, 2004]

- จุดหลอมเหลว(Melting point)

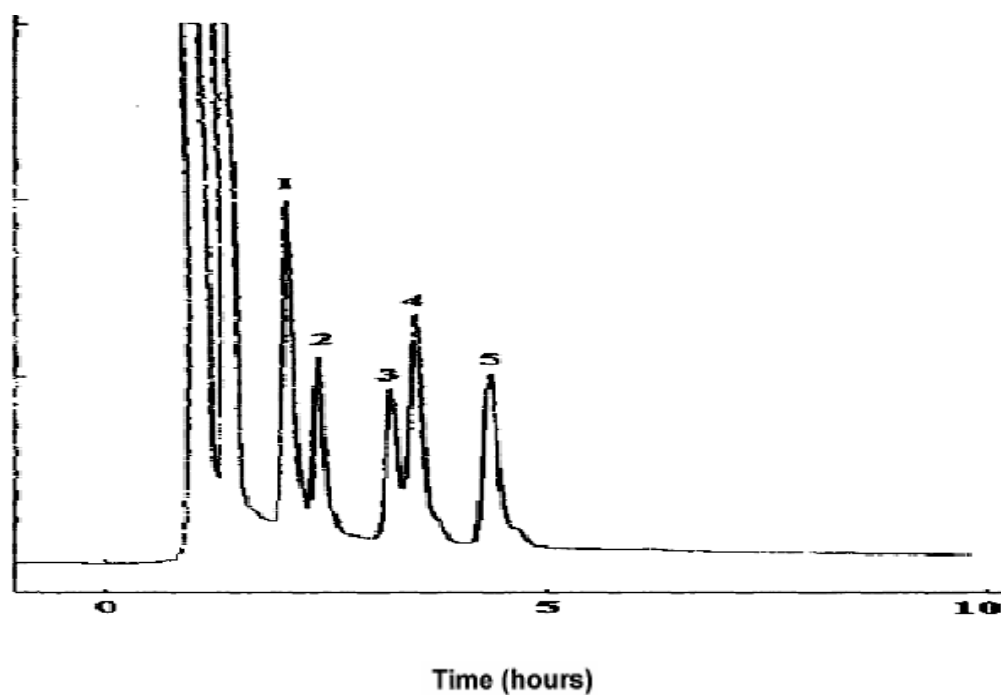
เคอร์คูมินในรูปผลึกสีเหลืองอมส้มจะมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 183-186 °C และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไปเป็นเกลืออัลคาไลน์สีน้ำตาลแดง [Ishita Chattopadhyay และคณะ, 2004]

- ความคงตัว(Stability)

การสลายตัวของเคอร์คูมิน ขึ้นกับค่า pH ของสารละลาย โดยในสภาวะที่เป็นกรด (pH<7) เคอร์คูมินจะสลายตัวช้า แต่ในสภาวะที่เป็นด่าง (pH>7) เคอร์คูมินจะสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยมีการศึกษาพบว่าเมื่อนำเคอร์คูมินไปแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.2) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เคอร์คูมินจะสลายตัวประมาณ 90 % ภายในเวลา 30 นาที และจากการวิเคราะห์ ผลิตภัณฑ์ที่สลายตัวโดยใช้เครื่อง HPLC และ GC/MS พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักของการสลายตัวของเคอร์คูมินคือ trans-6-(4'- hydroxyl-3'- methoxyphenyl)-,4-dioxo-5-hexenal (molecular weight 248) และผลิตภัณฑ์รองของการสลายตัวคือ vanillin, ferulic acid, feruloyl methane ดังรูปที่ 1.5 1.6 และพบว่า fetal calf serum (FCS), human blood หรือการเติมสาร antioxidants เช่น ascorbic acid ($C_6H_8O_6$), N-acetylcysteine ($C_5H_9NO_3S$) หรือ glutathione ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) สามารถป้องกันการสลายตัวของเคอร์คูมินในอาหารเลี้ยงเซลล์ (cell culture medium) หรือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้โดยเมื่อแช่เคอร์คูมินในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มี fetal calf serum หรือ human blood ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เคอร์คูมินจะสลายตัวประมาณ 20 % ภายใน 1 ชั่วโมง และหลังจากให้ความร้อน 8 ชั่วโมง พบว่ายังมีเคอร์คูมินเหลืออยู่อีก ดังนั้นจะเห็นว่าเมื่อเติม serum free medium ลงไปจะช่วยให้เคอร์คูมินมีความคงตัวมากขึ้น [Wang และคณะ, 1996]



รูปที่ 1.5 การสลายตัวของเคอร์คูมินใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2

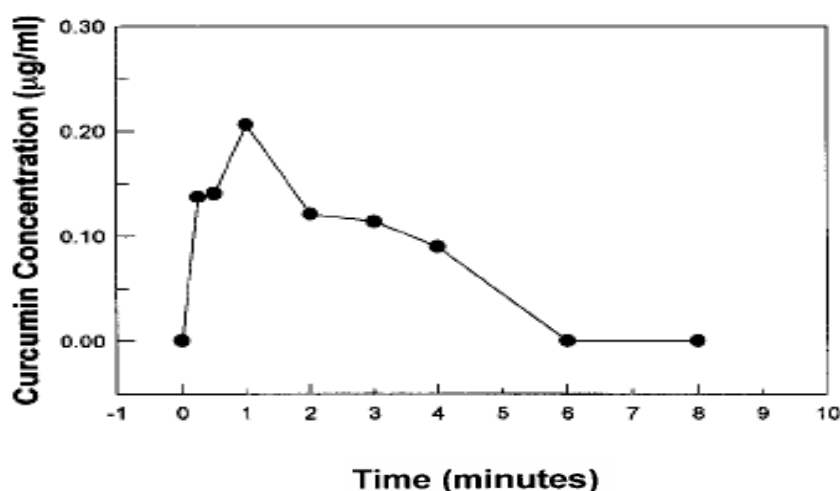


รูปที่ 1.6 กราฟ HPLC ของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของสารละลายเคอร์คูมินใน 0.1 M phosphate buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในสภาวะ column C18 (250 x 4.6 mm.), flow rate 1 ml/min, mobile phase 35% methanol และ acetic acid, UV-detector วัดที่ $\lambda = 280$ nm, injection volume 20 μ l . (1) vanillic acid, (2) vanillin, (3) ferulic acid, (4) ferulic aldehyde และ (5) feruloyl methane

ค. การวัดปริมาณของเคอร์คูมิน

การหาปริมาณของเคอร์คูมินสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น UV, HPLC, TLC และ HPTLC ซึ่งมีคณะผู้วิจัยบางกลุ่มได้ทำการศึกษาหาปริมาณของเคอร์คูมินโดยใช้วิธีต่าง ๆ กัน

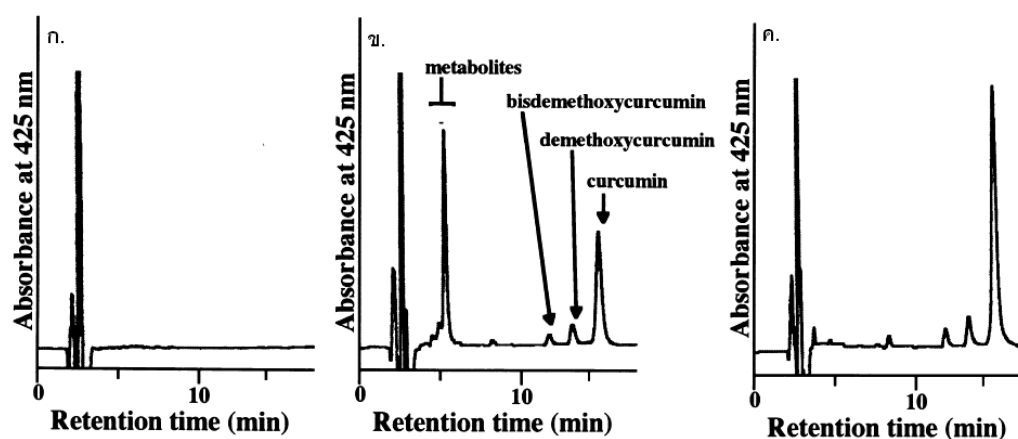
ในปี ค.ศ. 1998 Min-Hsiung Pan และคณะ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ column C-18 และ Mobile phase ใช้ 40 เปอร์เซ็นต์ ของ THF และ 60 เปอร์เซ็นต์ ของ citric acid ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (pH 3 ใช้ KOH ในการปรับ pH) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ในการวิเคราะห์เคอร์คูมินในเลือดของหนูทดลอง (BALB/c mice อายุ 6-7 สัปดาห์ น้ำหนัก 18-20 กรัม) จากการป้อนทางปาก (1 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวหนู) โดยพบเคอร์คูมินที่มีความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมาที่ 1 ชั่วโมง (0.22 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และจะลดต่ำลงเรื่อยๆ ภายใน 6 ชั่วโมง (5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ดังรูปที่ 2.8 เมื่อทดลองเติมเอนไซม์ β -glucuronidase ลงในพลาสมาจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่สภาวะเดียวกัน จะพบพีคของเคอร์คูมินและ เตตระไฮโดรเคอร์คูมิน (tetrahydrocurcumin (THC)) เกิดขึ้นพร้อมกันดังรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในพลาสมาของหนูทดลองโดยการป้อนทางปาก (1 กรัม/กิโลกรัมของหนู)

ในปี ค.ศ. 2000 Akira Asai และคณะ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ column C-18 และ Mobile phase ใช้ acetonitrile / น้ำ ในอัตราส่วน 48 : 52 (v/v) , อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที, UV-detector ที่ 425 นาโนเมตร ในการ วิเคราะห์เคอร์คูมินในเลือดของหนูทดลองเพศผู้ (Sprague-Dawley rat อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนัก 210 - 240 กรัม) โดยการป้อนทางปาก (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวหนู) แล้วเก็บผลเลือดที่เวลาต่างๆ จากนั้นทดลองเติมเอนไซม์ β -glucuronidase และ β -

glucuronidase/ sulfatase type VIII ลงในพลาสมาแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่สภาวะเดียวกัน พบว่าพลาสมา (สกัดหลังจากป้อนเคอร์คูมิน 1 ชั่วโมง) ที่เติม β -glucuronidase เกิดพีคขึ้น 3 พีคคือพีคเคอร์คูมินอยด์ 3 พีค และพีค metabolite 1 พีค ในขณะที่พลาสมาที่เติม β -glucuronidase/sulfatase type VIII ไม่ปรากฏพีคของ metabolite แต่พบพีคของเคอร์คูมินอยด์เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 กราฟ HPLC ของ (ก.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูก่อนป้อนเคอร์คูมินอยด์, (ข.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูหลังป้อนเคอร์คูมินอยด์ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปปัมด้วย β -glucuronidase และ (ค.) พลาสมาที่สกัดจากเลือดหนูหลังป้อนเคอร์คูมินอยด์ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปปัมด้วย β -glucuronidase/sulfatase

ในปี ค.ศ. 2003 Dennis D. Heath และคณะพัฒนาวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินในพลาสมา(plasma) และในปัสสาวะ(urine) โดยสกัดเคอร์คูมินจากตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ด้วย ethyl acetate ผสมกับเมทานอล internal standard คือ β -17-estradiol acetate วิเคราะห์โดยใช้ column C-18 และ Mobile phase ใช้สารผสมของ acetonitrile-methanol-water-acetic acid (ที่อัตราส่วน 41:23:36:1 โดยปริมาตร ตามลำดับ) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยพบเคอร์คูมินในพลาสมาและในปัสสาวะมากกว่า 96 % จากการทดลองแสดงว่าวิธีนี้ใช้ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำในการวัดความเข้มข้นของเคอร์คูมินในพลาสมาและปัสสาวะ

ในปีเดียวกัน M.J. Ansari และคณะ ได้หาปริมาณของเคอร์คูมินในรูปเม็ดยาและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายของเคอร์คูมิน โดยใช้วิธี high-performance thin – layer chromatographic (HPTLC) ในการวิเคราะห์โดยในการทดลองจะทำการฉีดตัวอย่างลงบน aluminium plate ด้วยอัตราคงที่ 150 μ l/s และ mobile phase ประกอบด้วย chloroform : methanol (ที่อัตราส่วน 9.25 : 0.75 v/v) จากการทดลองพบว่าเคอร์คูมินที่ถูกละลายในแอลกอฮอล์อะซิติกและโซเดียมไฮดรอกไซด์จะไม่พบเคอร์คูมินหลงเหลืออยู่เลยและเมื่อเกิดการออกซิเดชันจะได้ percent recovery เท่ากับ 19 % หลังจากนั้นเมื่อนำเคอร์คูมินไปฉายรังสี UV

ที่ 254 nm และนำไปวางไว้ให้โดนแสงอาทิตย์โดยตรงจะได้ percent recovery เท่ากับ 49 % และ 53.5 % ตามลำดับจะเห็นว่าที่ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เบส มีแสง และเกิดการออกซิเดชัน มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายของเคอร์คูมิน

จากงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาเชิงปริมาณวิเคราะห์ของสารประกอบเคอร์คูมินด้วยวิธีต่างๆที่ผ่านมา พบว่าการใช้ UV-vis spectrophotometry method จะวิเคราะห์ได้แต่ปริมาณของสารประกอบรวมเท่านั้น ไม่สามารถแยกวิเคราะห์องค์ประกอบของสารประกอบได้ การใช้ TLC- spectrophotometric Method ต้องใช้เวลามากในการวิเคราะห์ การใช้ HPLC method แม้จะสามารถแยกองค์ประกอบของสารประกอบออกมาได้ แต่ peak มักมี tailing และมี peak ที่กว้าง แต่การใช้ Thin – layer Chromatographic – Densitometry Method พบว่าสามารถแยกองค์ประกอบของสารประกอบออกจากกันได้ดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย

ง. การใช้เคอร์คูมินรักษามะเร็ง

ปัจจุบันพบว่ามีน้มน้ำมันชันมีประโยชน์สำหรับผู้ป่วยมะเร็งเนื่องจากน้ำมันสามารถยับยั้งมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งในช่องปาก มะเร็งในระบบย่อยอาหาร มะเร็งผิวหนัง มะเร็งมดลูก เป็นต้น โดยน้มน้ำมันชันจะมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ของมะเร็งที่ระยะเริ่มแรกและระยะสุดท้ายยับยั้งผลของอนุมูลอิสระ กระตุ้นเอนไซม์ที่ใช้ในการจัดการสารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ลดปฏิกิริยาของโมเลกุลที่จะกลายเป็นมะเร็งและยับยั้งผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบที่ผลิตมาโดยก้อนมะเร็งในเซลล์บางชนิดน้มน้ำมันชันยังแสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งการคัดลอกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์บางชนิด

การศึกษาในสัตว์ทดลองโดยการทดลองมีการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งหลังจากนั้นให้หนูกินเคอร์คูมินเข้าไป พบว่าหนูจะเกิดอาการเป็นโรคมะเร็งลดลงร้อยละ 25-77 ของจำนวนหนูทั้งหมด และหนูที่มีอาการรุนแรงมีเป็นส่วนน้อย โดยเคอร์คูมินจะถูกดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็กได้ไม่ดี ทำให้เข้าสู่กระแสเลือดได้น้อย เคอร์คูมินส่วนใหญ่ถูกขับถ่ายออกทางอุจจาระอย่างรวดเร็วและบางส่วนจะถูกขับออกทางปัสสาวะ แต่มีอีกส่วนหนึ่งที่ไปยังตับ และไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในการกำจัดสารก่อมะเร็ง [Ying-Jan Wang และคณะ , 1997]

การศึกษาถึงความเป็นพิษของน้มน้ำมันชันพบว่าเมื่อให้ผงน้มน้ำมันชันแก่หนูถีบจักรทางปากขนาด 10 กรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ ผลการทดสอบพิษเรื้อรังของน้มน้ำมันชันในหนูขาวโดยมีกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับน้มน้ำมันชันขนาด 0.03, 2.5 และ 5.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลานาน 6 เดือน ไม่พบว่ามีผลผิดปกติในระบบใด ๆ ของสัตว์ทดลอง นอกจากพบว่ามีน้ำหนักตัวกลุ่มที่ได้รับน้มน้ำมันชัน 2.5 และ 5.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 8 และ 12 % ตามลำดับ [Sittisomwong N , 1990]

ในปี 2001 Silvia Busquets และคณะได้ศึกษาถึงผลของเคอร์คูมินต่อเซลล์มะเร็งโดยทำการทดลองในหนูซึ่งแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมให้มีการรักษาโดยเคอร์คูมิน กลุ่มที่มีการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นมะเร็งแต่ไม่ได้รับการรักษาโดยเคอร์คูมิน และกลุ่มที่มีการเหนี่ยวนำให้

หนูเป็นมะเร็งและทำการรักษาด้วยเคอร์คูมินตามลำดับ ซึ่งเคอร์คูมินที่ถูกละลายใน DMSO:PBS ในอัตราส่วน 1/1000 จะถูกให้ในปริมาณ 250-350 μ l เป็นเวลา 6 วันติดต่อกัน หลังจากนั้นจะทำการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยวิธี Flow cytometry จากการทดลองพบว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งและมีการรักษาด้วยเคอร์คูมินจะมีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตลดลง 31% และเมื่อทำการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยการนำเซลล์มะเร็งไปให้ความร้อนที่ความเข้มข้นต่างๆของเคอร์คูมิน ดังนี้ 0.5 μ M, 25 μ M และ 100 μ M ตามลำดับ เป็นเวลา 180 นาที พบว่า ที่ความเข้มข้นต่ำๆคือ 0.5 μ M เคอร์คูมินจะลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลง 24%และที่ความเข้มข้นสูงกว่า คือ 25 μ M และ 100 μ M จะมีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันที่เวลา 30 นาที หลังจากเติมเคอร์คูมินลงไป

ในปี 2005 Yoysungneon P. และคณะได้ศึกษาถึงผลของเคอร์คูมินต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า เคอร์คูมินอยด์ (Sigma Co. 95%) ในขนาด 3000มก./กก.นน.ตัว สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่ปลูกในหนูถีบเต้านมได้โดยผ่านการยับยั้งการสร้างของหลอดเลือดใหม่ โดยคณะผู้วิจัย พบว่า เคอร์คูมินอยด์ (Sigma Co. 95%) ในขนาด 3000 มิลลิกรัม/ตัว สามารถยับยั้ง vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งมีรายงานว่าทั้ง VEGF และ COX-2 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการสร้างหลอดเลือดใหม่ [Ferrara *et al.*, 1995]

จากการศึกษาวิจัยจำนวนมากช่วยยืนยันถึงผลของเคอร์คูมินว่ามีฤทธิ์เป็น anti-angiogenesis คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของหลอดเลือดใหม่ที่มะเร็ง จึงทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ได้ โดยงานวิจัยเหล่านั้นทำการศึกษาดูด้วยเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกัน อาทิเช่น เซลล์มะเร็งของผิวหนังและ เซลล์มะเร็งของลำไส้ แต่ผลก็ตรงกันคือ เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ไม่ว่าจะเป็นเซลล์มะเร็งที่ต่างชนิดกัน ทั้งนี้เพราะกลไกที่เคอร์คูมินสามารถยับยั้งคือ การเจริญของหลอดเลือดใหม่ที่มะเร็งทุกชนิดจำเป็นต้องอาศัยกระบวนการนี้ แต่ก็มีนักวิจัยบางกลุ่มที่เชื่อว่า เคอร์คูมินสามารถยับยั้งในกระบวนการแบ่งเซลล์ด้วย โดยผ่านทาง nuclear factor-KB and activator protein-1 (AP-1)

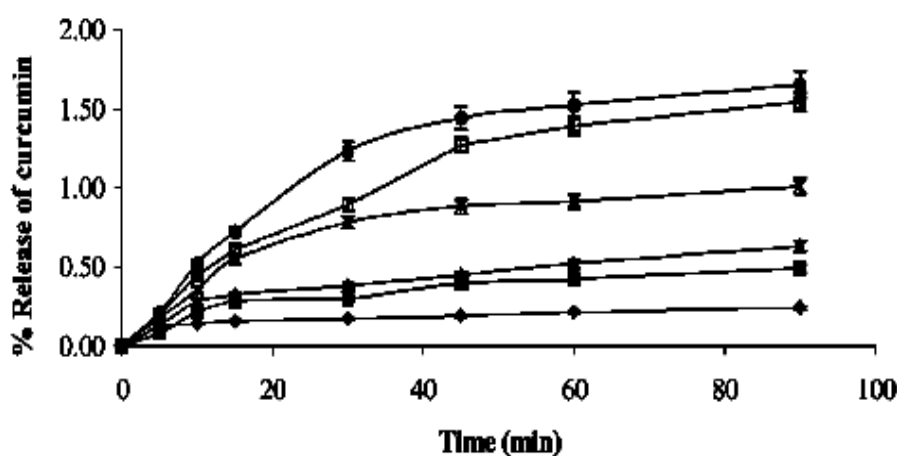
จ. ระบบนำส่งของเคอร์คูมิน

การนำส่งเคอร์คูมินในรูปแบบยา (หรือชีววัตถุอื่นๆ) ที่มีลักษณะการปลดปล่อยออกจากระบบนำส่ง (ในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาเม็ด, pellet, หรือแผ่นแปะ เป็นต้น) โดยลักษณะการปลดปล่อยนั้น จะต้องเป็นไปตามที่ได้วางแผนไว้, สามารถทำนายได้, และสามารถควบคุมได้ว่า จะให้ปลดปล่อยออกมาในช่วงใด ด้วยอัตราเร็วเท่าใด โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาการนำส่งในรูปแบบต่างๆ ดังนี้

ในปี 2003 D. Gopinatha และคณะได้พัฒนาขบวนการรักษาบาดแผลที่ผิวหนังโดยใช้เคอร์คูมินร่วมกับคอลลาเจน [curcumin incorporated collagen matrix (CICM)] เพื่อทำให้เกิดการปลดปล่อยเคอร์คูมินที่ช้าลง โดย คอลลาเจนเป็นวัตถุดิบอย่างดีสำหรับการรักษา

บาดแผล เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เข้ากันได้กับร่างกายและสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ จึงไม่เป็นพิษกับร่างกาย การทดลองในขั้นแรกเริ่มจากการนำคอลลาเจนมาผสมกับกับเคอร์คูมิน ขึ้นรูปเป็นฟิล์มแล้วนำไปทดลองรักษาบาดแผลกับสัตว์(หนู) ซึ่งจะถูกทำให้มีบาดแผลโดยแบ่ง หนูออกเป็นสามกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ได้แก่ กลุ่ม 1 control กลุ่ม 2 CFs group (collagen films group) และ กลุ่ม 3 CICM group จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยวิธี Histological analysis และ Statistical analysis จากการทดลองพบว่าบาดแผลของสัตว์จะอยู่ในรูปสะเก็ดแผลในระหว่าง วันที่ 7 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลของ Biochemical parameters และ histological analysis พบว่าจะมีการลดลงของบาดแผล และการเพิ่มขึ้นของเซลล์ ใน CICM group และ เมื่อเปรียบเทียบกัน ระหว่างสัตว์ 3 กลุ่มพบว่า CICM group จะมีการลดลงของบาดแผล, การลดลงของ antioxidant enzyme SOD, การเพิ่มขึ้นของ protein content , การเพิ่มขึ้นของ Hydroxyproline content และ อัตราของ catalase activity มากกว่า CFs และ control group แสดงว่า สามารถนำ CICM ไปประยุกต์ใช้ในการรักษาบาดแผลได้

ในปี ค.ศ. 2004 Anant Paradkar และคณะ ศึกษาการปลดปล่อยของเคอร์คูมินใน อนุภาคของ polyvinyl pyrrolidone PVP (เคอร์คูมิน - PVP solid dispersion) โดยผสมเคอร์คูมิน และ PVP ใน ตัวกลางที่เป็นกรดที่อัตราส่วนของ เคอร์คูมิน:PVP เท่ากับ 1:1, 1:3, 1:7 และ 1:10 เตรียมอนุภาคด้วยวิธี spray drying และทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมิน โดยนำไปแช่ใน กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 1.2) พบว่าการปลดปล่อยเคอร์คูมินของ อนุภาคที่อัตราส่วน 1:1, 1:3 และ 1:5 จะน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่อัตราส่วน 1:7 และ 1:10 จะมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านไป 90 นาทีดังรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 การปลดปล่อยของเคอร์คูมิน (◆) เปรียบเทียบกับที่ผสม PVP ที่อัตราส่วน 1:1 (■), 1:3 (▲), 1:5 (×), 1:7 (□) และ 1:10 (●)

1.4.3 เจลาติน (gelatin)

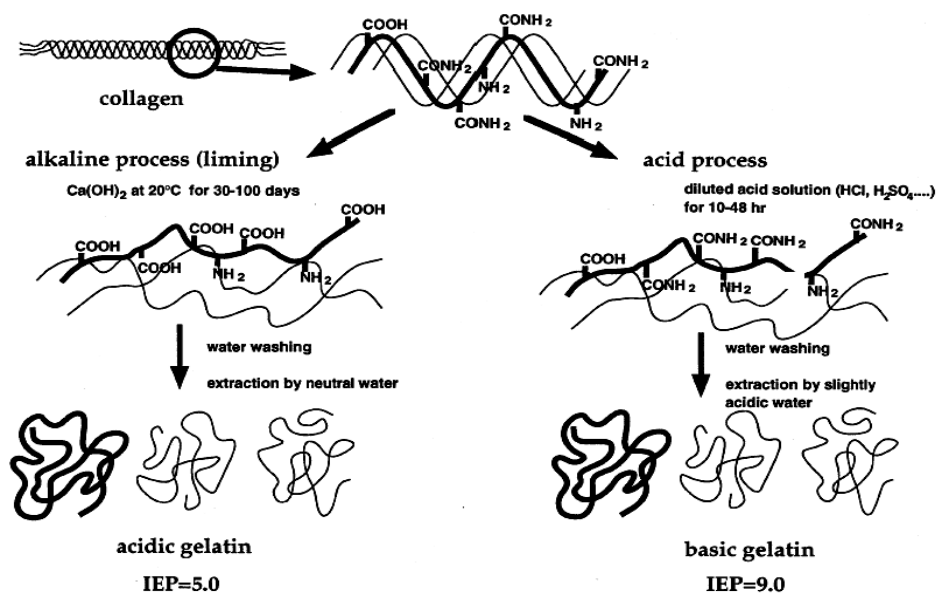
ก. คุณสมบัติของเจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนจากธรรมชาติ มีมวลโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน เกิดจากการทำให้คอลลาเจนเสียสภาพโดยขบวนการ acidic และ alkaline process และนำมาทำให้บริสุทธิ์ ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น ผ่านขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อโรค จากนั้นจึงทำให้แห้ง จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมา ซึ่งขั้นตอนการสกัดเจลาตินทั้งสองชนิดนี้ แสดงดังรูปที่ 1.10 โดยทั่วไปเจลาตินจะถูกใช้งานทางด้านเภสัชกรรม และทางการแพทย์ เนื่องจากเจลาตินมีสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ และมีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยา และอวัยวะเทียมเมื่อนำมาใช้ร่วมกับร่างกายมนุษย์ เจลาตินสามารถจะเกิดเป็นเจลใสและแผ่นฟิล์มที่ยืดหยุ่นได้ สามารถละลายในน้ำร้อน และเจลาตินประกอบด้วยโปรตีน 90-84%, แร่ธาตุ 1-2% และน้ำ 8-15% ซึ่งองค์ประกอบของเจลาตินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของคอลลาเจนที่ใช้ และกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ [Tabata, Y. 1998]

1. Basic gelatin (เจลาติน Type A): ได้มาจาก acid process สกัดได้ยากกว่าแบบ alkaline process และเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดกับกลุ่ม amide ในคอลลาเจนมีน้อย จึงทำให้เจลาตินมีค่า Isoelectric point (pI) 9.0 ซึ่งใกล้เคียงกับคอลลาเจนและเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

Acidic gelatin (เจลาติน Type B): ได้มาจาก alkaline process เป็นขบวนการ hydrolysis กลุ่ม amide ในคอลลาเจน ซึ่งจะได้เจลาตินที่มีกลุ่ม carboxyl ปริมาณมาก ทำให้เจลาตินมีประจุลบ และมีค่า Isoelectric point (pI) 5.0 ซึ่งเหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส สมบัติของเจลาติน Type A และ B สรุปดังตารางที่ 1-1



รูปที่ 1.10 แสดงขั้นตอนการสกัด acidic gelatin และ basic gelatin

ตารางที่ 1.1 เปรียบเทียบสมบัติของเจลาติน Type A และ B

Property	Type A	Type B
pH	3.8 - 5.5	5.0 - 7.5
Isoelectric point (pI)	7.0 - 9.0	4.7 - 5.4
Gel strength (bloom)	50 - 300	50 - 300
Viscosity (cp)	15 - 75	20 - 75
Ash (%)	0.3 - 2.0	0.5 - 2.0

เจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงตัวกันคือ -Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro- กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง เช่น glycine, proline and hydroxyproline โดยรายละเอียด องค์ประกอบของเจลาตินสรุปดังตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1.2 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยประมาณในเจลาติน

กรดอะมิโน	% ในเจลาติน	กรดอะมิโน	% ในเจลาติน
Alanine	8.9%	Leucine	3.3%
Arginine	7.8%	Lysine	3.5%
Asperic acid	6.0%	Methionine	0.7%
Glutamic acid	10.0%	Phenylalanine	2.4%
Glycine	21.4%	Proline	12.4%
Histidine	0.8%	Serine	3.6%
Hydroxylysine	1.0%	Threonine	2.1%
Hydroxyproline	11.9%	Tyrosine	0.5%
Isoleucine	1.5%	Valine	2.2%

ข. การใช้เจลาตินในระบบนำส่งภายในร่างกาย

เจลาตินเป็น reversible thermo-set hydrogel กล่าวคือ เมื่อละลายน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่า gel point (ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส) จะเกิดเป็นเจล แต่เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิให้สูงกว่า gel point ก็จะสามารถเปลี่ยนสภาพกลับเป็นของเหลวได้อีก การใช้ประโยชน์จากเจลาตินในร่างกายจึงจำเป็นที่จะต้องมีการเชื่อมขวาง (crosslink) พันธะ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลให้เป็นเครือข่ายร่างแห โดยการเชื่อมหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของเจลาตินอย่างถาวร ด้วยพันธะโควาเลนต์ การเชื่อมโยงพันธะของเจลาตินสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้สารเคมี ประเภทอัลดีไฮด์ เช่น glutaraldehyde การใช้เอนไซม์ Transglutaminase การใช้ความร้อนร่วมกับกระบวนการดึงน้ำออกจากโมเลกุล (dehydrothermal crosslink) การใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และการใช้ ลำแสงอิเล็กตรอน เป็นต้น [Ozaki and Tabata, 2005, Tabata and Ikada, 1998] การเชื่อมโยงพันธะมีผลต่อสมบัติทางกายภาพ ทางกล และทางชีวภาพของแผ่นเจลาตินไฮโดรเจล (gelatin hydrogel) กล่าวคือ เจลาตินจะไม่สามารถคืนสภาพเดิมได้อีก แม้จะมีการเปลี่ยนอุณหภูมิไปยัง gel point เพิ่มความแข็งแรง ลดการละลายในน้ำ ทนทานต่อกระบวนการ hydrolyse โดยน้ำ และทนทานต่อกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในร่างกาย การเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีจะทำให้เกิดโครงสร้างเครือข่ายที่แข็งแรงที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น มีการใช้แผ่นเจลาตินที่เชื่อมโยงพันธะด้วย glutaraldehyde ในการส่งผ่านยา และ growth factor ต่างๆ เข้าสู่ร่างกายในระดับการทดลองทางคลินิกและระดับการค้า [Tabata and Ikada, 1998]

ในปี 2002 Nicole J. Einerson และคณะได้ทำการศึกษาผลทาง physicochemical ของ gelatin-based hydrogel โดยจะทำการดัดแปลง gelatin backbone เป็น 3 รูปแบบ คือ PEG-dial-modified gelatin (PG) , EDTAD modified gelatin (EG) และ PEG-dial และ EDTAD

modified gelatin (P/EG) แล้วทำการหาปริมาณ lysyl โดยใช้วิธี 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) จากนั้นนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นไฮโดรเจล ซึ่งเชื่อมขวางโดยใช้ glutaraldehyde (GA) ที่ความเข้มข้น 0.1 , 0.01 , 0.001% แล้วนำไปส่องด้วยเครื่อง scanning electron microscopy (SEM) เพื่อดูลักษณะทางกายภาพ จากนั้นทำการหาค่า surface hydrophilicity โดยใช้ contact angle พบว่า modified gelatin จะมีพื้นผิวที่ค่อนข้างเรียบกว่า unmodified gelatin และพบว่าปริมาณ GA มีผลต่อโครงสร้างของเจลาตินซึ่งถ้าความเข้มข้นของ GA ที่นำมาเชื่อมขวางลดลงจะทำให้พื้นผิวของเจลาตินมีความขรุขระเพิ่มขึ้น และจากการทดลองวัดค่ามุมสัมผัสน้ำ (contact angle) พบว่าไฮโดรเจลที่เชื่อมขวางที่มีค่ามุม contact angle สูงขึ้น ซึ่งแสดงความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เพิ่มขึ้น และพบว่าเจลาตินที่มีการดัดแปลงมีผลต่อการปลดปล่อยของยามากกว่าผลจากความเข้มข้นของ GA อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองในสัตว์ทดลองหาความเข้มข้นของ GA สูงมีผลทำให้สัตว์ทดลองเกิดการอักเสบอย่างรุนแรง

ในปี 2004 Yasuhiko Tabata และคณะได้ทำการศึกษาการนำส่งยาต่อต้านเนื้องอก 2 ชนิดใน 2 รูปแบบที่รวมกับแผ่นเจลาตินไฮโดรเจล คือ ในรูปแบบแผ่นเจลาตินไฮโดรเจลรวมกับ cisplatin (CDDP) และ รูปแบบแผ่นเจลาตินไฮโดรเจลรวมกับ adriamycin (ADM) กับรูปแบบแผ่นเจลาตินไฮโดรเจล รวมกับ CDDP+ ADM และในรูปแบบสารละลาย เพื่อทำการศึกษาการปลดปล่อยในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* release) โดยใช้เครื่อง atomic absorption spectrophotometer ในการหาค่า CDDP release และใช้เครื่อง UV/VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 495 nm ในการหาค่า ADM release จากนั้นจะทำการทดลองในสัตว์ทดลองโดยการฉีดเซลล์มะเร็งเข้าไปในหนูทดลองที่เตรียมไว้ แล้วทำการทดลองฉีดยาในรูปแบบสารละลาย และทำการฝังแผ่นเจลาตินไฮโดรเจล ทั้งสองรูปแบบในสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการปลดปล่อยของยา จากผลการทดลองพบว่าการนำส่งยาในรูปแบบแผ่นเจลาตินไฮโดรเจลรวมกับ CDDP+ADM ได้ผลได้ดีกว่าในรูปแบบสารละลายและได้ผลดีที่สุดเนื่องจากยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่ารูปแบบอื่น

ค. การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของคอลลาเจนกับกรด หรือ lime process .เจลาตินประกอบด้วยหมู่อะมิโนแบบ hydrophobic เป็นส่วนน้อยเช่น proline และ leucine และส่วนที่เป็น hydrophilic อีกหลายตัว เช่น lysine, serine, arginin, hydroxyproline, aspartic และ glutamic acids ดังนั้น เจลาตินจึงเป็น hydrophilic protein ทำให้เจลาตินละลายน้ำได้ดี [Ofer และ Shlomo ,1997] อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนที่มีหมู่ hydrophobic มากกว่าจะมีเกิดปฏิกิริยาที่พื้นผิวได้ดีกว่า (surface active) เนื่องจากการลดแรงตึงผิวระหว่างโมเลกุล [Kato และ Nakai , 1970]

ค่าความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของโปรตีนสามารถหาได้หลายวิธี เช่น SDS binding, hydrophobic chromatography และ ใช้สารเรืองแสง (fluorescence) เช่น pyrene อัตราส่วนระหว่าง peak 1 และ peak 3 ในสเปกตรัมของ pyrene นั้น สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดค่าความไม่ชอบน้ำได้ หากสารนั้นชอบน้ำ (hydrophilic) อัตราส่วนดังกล่าวจะมีค่าสูง (1.85 ใน acetonitrile) หากสารนั้นไม่ชอบน้ำอัตราส่วนดังกล่าวมีค่าต่ำ (0.61 ใน n-hexane) [Ofer และ Shlomo, 1997] การใช้สารเคมีในการดัดแปลงโปรตีนอาจนำไปสู่การเปลี่ยนโปรตีนให้ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นยิ่งไปกว่านั้นการสร้างพันธะ Covalent กับหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีโครงสร้างแบบ amphiphilic protein คือทั้งมีส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในโมเลกุลเดียวกัน เนื่องจากพื้นผิวและแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลลดลง

โดยมีคณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองดัดแปลงพื้นผิวเจลาตินด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

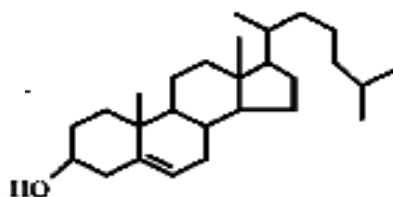
ในปี 1982 Arai และ Watanabe ได้ใช้ casein ดัดแปลง โปรตีนถั่วเหลืองและ เจลาติน โดยใช้ปฏิกิริยาของเอมไซม์แล้วตามด้วยการ hydrolysis protein พวกเขาได้เชื่อมโซ่ C₂-C₁₂ กับโมเลกุลของโปรตีน พบการเพิ่มขึ้นของ surface activity (ซึ่งประเมินจากการวัดแรงตึงผิว การเกิดโฟมและ emulsifying activity) ที่มีเมื่อสายโซ่มีขนาดยาวขึ้น ในปี เดียวกัน Haque และ Kito ได้ใช้ hydrophobic residues ที่หลายๆความยาวกับถั่วเหลือง glycinin และโปรตีนเพื่อเพิ่ม surface activity ของโปรตีน การสังเคราะห์ใช้ปฏิกิริยาของ N-hydroxysuccinimide ในกรดไขมันกับ NH₂ ของหมู่ lysine ในสารละลายซึ่งมีเอทานอลความเข้มข้นสูง หรือสารละลายยูเรีย

Ofer and Shlomo (1997) ได้ใช้วิธีที่จะเชื่อมพันธะ Covalent ระหว่าง hydrophobic group กับโมเลกุลของเจลาตินโดยใช้ N-hydroxysuccinimide fatty acid ester กับ amine ของหมู่ lysine บน เจลาตินจากนั้นวัดค่า hydrophobicity โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง peak 1(I₁) ที่ 378 nm และ peak 3(I₃) ที่ 384 nm ของค่า spectra ที่ปล่อยออกมาของ pyrene ที่ความยาวคลื่น 350 - 450 nm จากการทดลองพบว่า เมื่อเติมหมู่ที่ไม่ชอบน้ำเข้าไปในโมเลกุลของเจลาติน ทำให้ความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นแต่มีค่า surface activity มากกว่า เจลาตินที่ไม่ถูกดัดแปลง และพบว่ายิ่งจำนวนหมู่ที่ไม่ชอบน้ำสูงขึ้น (สายโซ่ของสารที่นำมาเชื่อมพันธะยาวขึ้น) ทำให้ความสามารถของโปรตีนในการลดแรงตึงผิวดีขึ้น และ surface active ยิ่งขึ้น

1.4.4 คอเลสเตอรอล(cholesterol)

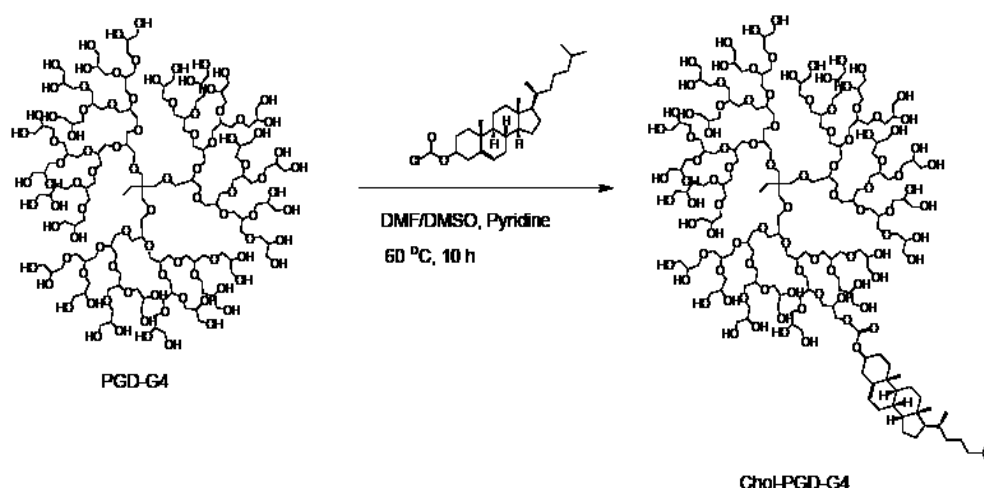
คอเลสเตอรอลเป็น steroid โมเลกุลเล็กๆซึ่งไม่สามารถละลายได้ในน้ำ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คอเลสเตอรอลจะถูกละลายพร้อมกับไขมันอื่นๆ เช่น phospholipids หรือ bile acids ดังนั้น คอเลสเตอรอลส่วนมากถูกพบใน cell membranes, plasma lipoproteins และ bile มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนไซโคลเพนทาโนฟีแนนทริน (cyclopentanophenanthrene ring) ดังแสดงในรูป 1.11 ซึ่งจะเห็นว่าคอเลสเตอรอลมีส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นหางไฮโดรคาร์บอนซึ่งประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนอะตอมเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วทำให้ละลายได้ในไขมันแต่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ, ส่วนที่เป็นวงแหวนไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว

เช่นเดียวกันทำให้ละลายได้ในไขมันแต่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ และส่วนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ซึ่งเป็นหมู่ที่มีขั้ว ทำให้สามารถละลายน้ำได้



รูปที่ 1.11 สูตรโครงสร้างของคอเลสเตอรอล($C_{27}H_{46}O$)

คอเลสเตอรอลมีน้ำหนักโมเลกุล 386.66 มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ $140^{\circ}C$ มีค่าความถ่วงจำเพาะ 1.06 - 1.07 ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในสารละลายอินทรีย์และจะเสถียรที่อุณหภูมิห้องแต่จะว่องไวต่ออนุมูล ทำให้เสียไปและไม่เสถียร มีผู้สนใจนำคอเลสเตอรอลไปทำการวิจัยดัดแปลงโพลิเมอร์ต่างๆ ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับระบบนำส่งยา โดยในปี 2005 Tooru Ooya และคณะได้ทำการวิจัยโดยนำ polyglycerol dendrimer generation 4 (PGD-G4) ซึ่งเป็นแมโครโมเลกุลชนิดใหม่ที่มีขนาดในช่วงนาโนเมตร โครงสร้างประกอบด้วยแขนงจำนวนมากจัดเรียงตัวอย่างมีระเบียบ มีกลุ่มสำหรับทำปฏิกิริยาอยู่ที่แต่ละปลายโซ่แขนง dendrimers อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการนำส่งยาได้หลายประการ รวมไปถึงการนำส่งยาอย่างจำเพาะเจาะจงไปยังตำแหน่งเป้าหมายและควบคุมการปลดปล่อยตัวยาที่เกิดพันธะหรือเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลของยารวม มาทำการ conjugate กับคอเลสเตอรอลในอัตราส่วน 1:1.3 ดังรูปที่ 1.12



รูปที่ 1.12 การเตรียม cholesterol - conjugated PGD-G4 (Chol-PGDG4).

[Tooru Ooya และคณะ, 2005]

จากนั้นโครงสร้างที่มีการจัดเรียงตัวใหม่จะถูกหาค่าโดยใช้ dynamic light scattering (DLS) และ atomic force microscopy (AFM) จากการทดลองพบว่า PGD-G4 จะมีการจัดเรียงตัวที่ดีขึ้นหลังจากนำมา conjugate และเมื่อนำ Chol-PGDG4 มาทดสอบการละลายของ paclitaxel ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งชนิดหนึ่งเปรียบเทียบกับ PGD-G4 พบว่า paclitaxel ละลายใน Chol-PGDG4 ได้ดีกว่าใน PGD-G4

1.4.5 เอกสารสิทธิ (Patents) ที่เกี่ยวข้อง

สิทธิบัตรต่างประเทศ:

ก. ระบบนำส่งยาโดยการใส่ liposome ใน hydrogel ซึ่งทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์กับพื้นผิวของของแข็ง (United States Patent 6,228,393, DiCosmo, et al. May 8, 2001)

- Claims
- gelatin hydrogel ถูกเชื่อมขวาง ด้วย polyethylene glycol
 - พื้นผิวของ hydrogel ถูกเคลือบด้วย silicon rubber (polydimethylsiloxane)
 - liposome ที่ใช้เป็นวัสดุที่ถูกเลือกมาจากกลุ่มที่ประกอบด้วย dipalmitoylphos phatidylcholine และ polyethyleneglycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine
 - ยาที่ใช้คือ fluoroquinolone เป็นยาปฏิชีวนะซึ่งถูกเลือกมาจากกลุ่มที่ประกอบด้วย ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, enoxacin, rosoxacin, amifloxacin, fleroxacin, temafloxacin และ lomefloxacin

ข. การควบคุมการปลดปล่อยของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำผ่านแผ่นไฮโดรเจลโดยการกระจายและการละลายเตรียมรูปแบบของยาที่มีการดัดแปลงความเป็น hydrophobic ในรูปของสารผสม และถูกนำไปกระจายในแผ่นไฮโดรเจลที่มีความสามารถในการดูดซับทางชีวภาพ (United States Patent 6,632,457, Sawhney, et al. October 14, 2003)

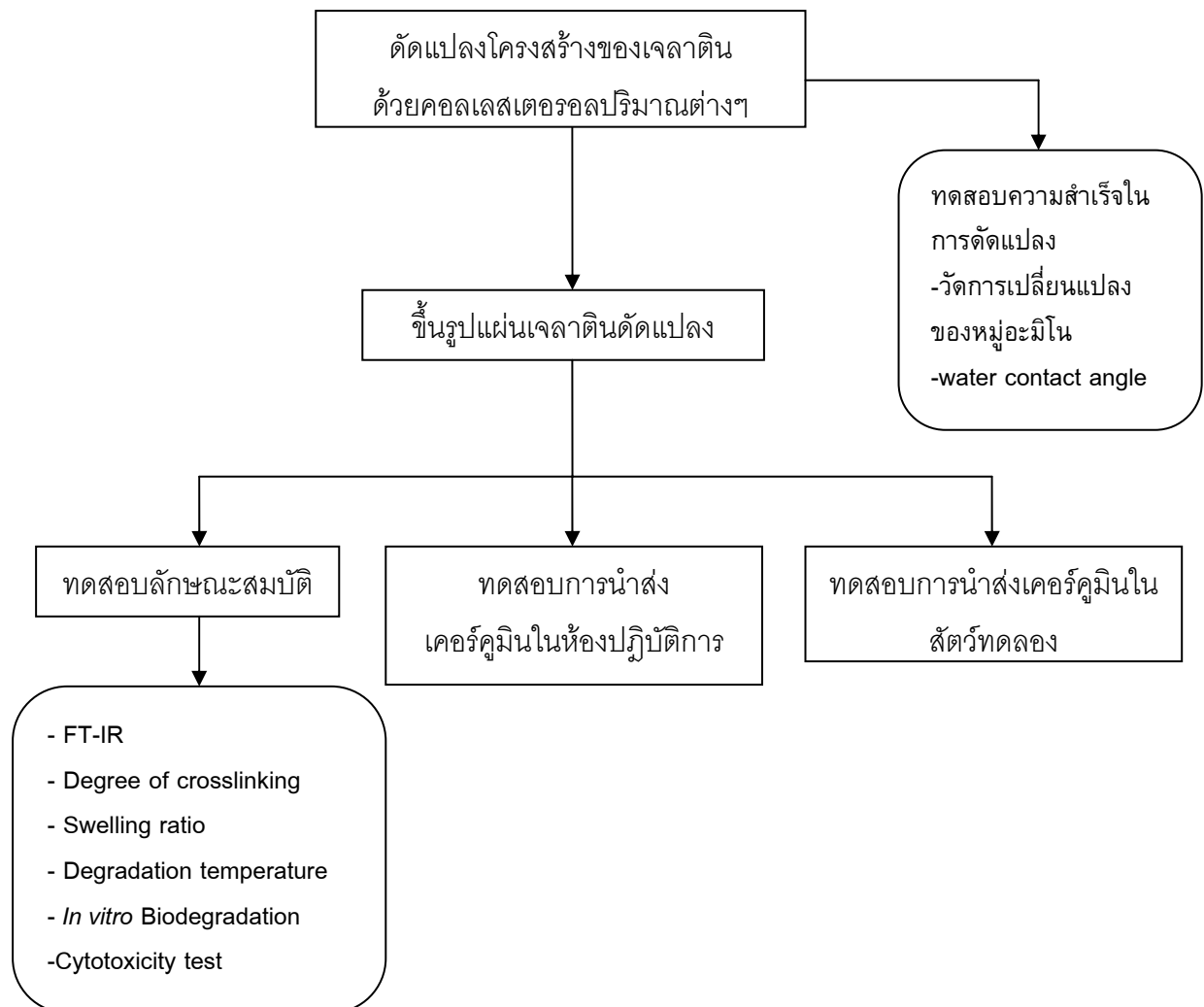
- Claims
- ตัวยาถูกละลายในสารที่ไม่ชอบน้ำที่ถูกเลือกมาจากกลุ่มที่ประกอบด้วย fatty acids และ triglycerides และมีจุดหลอมเหลวน้อยกว่า 65 °C ซึ่งจะไปควบคุมการปลดปล่อยตัวยาจากแผ่นไฮโดรเจล
 - แผ่นไฮโดรเจลขึ้นรูปมาจากโพลิเมอร์ซึ่งมีสมบัติชอบน้ำ ถูกเลือกมาจาก poly(hydroxyalkyl methacrylate), poly(electrolyte complexes) และ poly(vinylacetate)
 - ตัวยาที่ใช้มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 20,000 ดาลตัน ละลายน้ำได้มากกว่า 0.01 mg/mL

ค. เคอร์คูมินถูกพัฒนาเพื่อใช้สำหรับการรักษาโรคหรือความผิดปกติทางผิวหนังที่มี
กลไก angiogenesis โดยพบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้ง การทำงานของ basic fibroblast
growth factor (bFGF) (United State Patent 6,673,843, Arbiser, January 6, 2004)

Claims - วิธีการรักษาโดยการขึ้นรูปตัวพา (carrier) ในลักษณะเป็นขี้ผึ้งหรือในรูปแบบ
hydrogel สำหรับการฝังในร่างกายร่วมกับเคอร์คูมิน 0.5%และ5%

สิทธิบัตรในประเทศ: ไม่มี

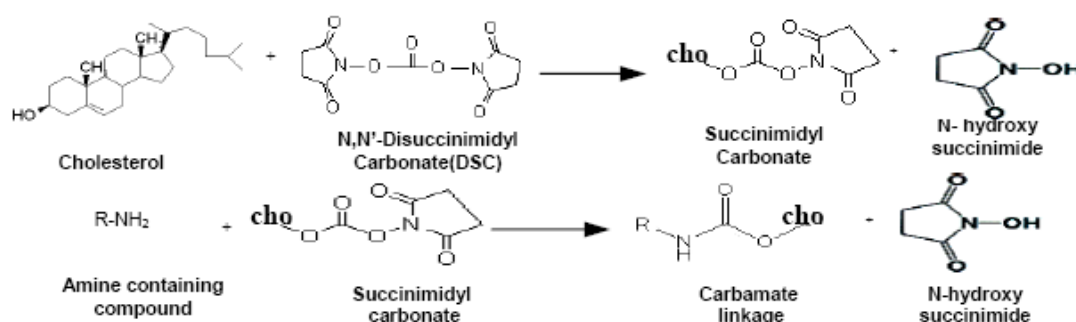
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง



รูปที่ 2.1 แผนผังสรุปการทดลองในงานวิจัย

2.1 การดัดแปลงโครงสร้างเจลาติน

วิธีการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอล ตามสมการเคมีในรูปที่ 2- ซึ่งใช้ N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC) เป็นสารเชื่อมพันธะ ระหว่างหมู่ -OH ของคอเลสเตอรอลและหมู่อะมิโน (-NH₂) ของเจลาติน [Hermanson, G 1996] มีวิธีโดยย่อคือ ผสมสารละลายเจลาติน (Nitta gelatin, Osaka, Japan, Type A, MW 990,000) คอเลสเตอรอล (ใน pyridine) และ DSC (N,N'-Disuccinimidyl carbonate, Novabiochem, Japan) ใน DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Nacalai Tesque, Japan) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการคำนวณปริมาณของคอเลสเตอรอลให้ทำปฏิกิริยาพอดีกับ -NH₂ ในเจลาติน และใช้คอเลสเตอรอลเป็นปริมาณต่างๆ คิดเป็นร้อยละเทียบกับโมลของ -NH₂ จากนั้นทำการกำจัดสารเคมีส่วนเกิน โดยไคโตะไลส์ (cellulose, MW Cutoff 30,000) แล้วแยกสารที่ตกตะกอนออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนสที่ละลายน้ำได้ในถุงคือเจลาตินที่ถูกดัดแปลงนำไปทำแห้งแข็ง ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัวอย่างแห้งจะถูกเก็บรักษาไว้เป็นเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์ ในถุงสีทึบปราศจากความชื้นเพื่อการวิเคราะห์ลักษณะ หรือนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่น hydrogel ต่อไป



รูปที่ 2.2 สมการการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอล โดยผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลโดยใช้ N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC) เป็นสารเชื่อมพันธะ [Greg T. Hermanson, 1996] ตัวย่อ cho แทน cholesterol

2.2 การขึ้นรูปแผ่นเจลาตินดัดแปลง

สารละลายของเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้ว (ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนัก) pH 3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไปขึ้นรูปในถาดพลาสติกเคลือบเทฟลอน (ขนาด 2x2 cm) ด้วยปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร/ชิ้น ถูกนำไปทำแห้งแข็งแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลายเชื่อมขวางพันธะ (25% Glutaraldehyde: GA, 2.4 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัม) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้าง GA ที่เกินพอในสารละลาย glycine 0.1 โมลาร์ และล้างต่อน้ำกลั่นปริมาณมาก (3 ครั้ง) จากนั้นนำตัวอย่างทำแห้งแข็งก่อนเก็บรักษาในที่มืดปราศจากความชื้นที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบต่อไป

ความหมายของรหัสของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้

G: เจลาตินที่ไม่ถูกดัดแปลงโครงสร้าง

CG25 – CG125: เจลาตินที่ถูกดัดแปลงโครงสร้างโดยใช้ปริมาณคอเลสเทอรอลร้อยละ 25 -125 (โดยโมล) ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน

CHO: คอเลสเทอรอล

2.3 การศึกษาลักษณะสมบัติของเจลาตินดัดแปลงและแผ่นเจลาตินดัดแปลง

2.3.1) การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

เจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างแล้วโดยใช้วิธี TNBS [Habeeb, AFSA, 1996] ทำโดยปรับ pH ของสารละลายเจลาติน (5 มิลลิกรัม) เป็น 8.5 ด้วยสารละลาย 0.4% (w/v) NaHCO_3 ผสมกับสารละลาย 0.5% (w/v) TNBS (2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid, Nacalai Tesque, Japan) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่าที่ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ β -alanine (Nacalai Tesque, Japan) ซึ่งมี NH_2 จำนวน 1 หมู่ต่อโมเลกุล

2.3.2) การบวมน้ำ (Water swelling)

แผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแล้ว ทำโดยการหาน้ำหนักที่เปลี่ยนไปของแผ่นเจลาตินดัดแปลงหลังการแช่ในสารละลาย PBS buffer (pH 7.4) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และคำนวณร้อยละของการบวมน้ำ (% swelling)

2.3.3) มุมสัมผัสน้ำ (Water contact angle)

เตรียมฟิล์มบางของเจลาตินดัดแปลงความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ (ขนาด 1 x 2 ตารางเซนติเมตร) ที่สะอาด ไล่ความชื้นในฟิล์มโดยใช้โถดูดความชื้นและ vacuum pump เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำ 5 จุดต่อตัวอย่าง (4 ซ้ำ) และใช้ค่ามุมสัมผัสของกระจกปิดสไลด์เป็นตัวอ้างอิง [Rather, BD. และคณะ, 2004]

2.3.4) อุณหภูมิในการเสถียรภาพ (Degradation temperature, T_d)

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของโครงเลี้ยงเซลล์ ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 20-600 องศาเครื่อง Thermogravimetric Analysis (TGA) อัตราการให้ความร้อน 20 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยป้อนก๊าซไนโตรเจนด้วยอัตรา 100 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที [Barreto, PLM. และคณะ, 2003]

2.3.5) การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (In vitro degradability)

แผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะแล้วถูกนำไปแช่ด้วย 70 % ethanol ตามด้วยการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) การย่อยสลายในสภาวะเลียนแบบ

ร่างกายทำโดยแช่แผ่นเจลาคตินดัดแปลง ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ที่มีเอนไซม์ bacterial collagenase ความเข้มข้น 1 ยูนิต (1 ยูนิต = 125 มิลลิกรัม) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์น้ำหนักแห้งที่เวลาต่างๆ โดยล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนจะทำให้แห้งแข็ง คำนวณอัตราการย่อยสลายของแผ่นเจลาคตินดัดแปลงจากร้อยละน้ำหนักที่หายไปเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น

2.4 การทดลองปลดปล่อยเคอร์คูมินในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* release of เคอร์คูมิน)

เคอร์คูมิน (ความบริสุทธิ์ 98%, SIGMA CHEMICAL, USA) ปริมาณ 10-40 ไมโครกรัม ถูกดูดซับบนแผ่นเจลาคตินดัดแปลงหนัก 2 มิลลิกรัม ในหลอด microcentrifugal (1.5 มิลลิลิตร) ที่บดแสง แล้ว centrifuge เป็นเวลา 2-3 นาทีเพื่อเร่งการดูดซับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยแอลกอฮอล์ออก ตัวอย่างถูกนำมาเติมสารละลาย PBS + 0.01% Tween 80 ก่อนนำไป incubate ด้วยเครื่อง shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 rpm มีการเก็บตัวอย่างสารละลายที่เวลาต่างๆไปวิเคราะห์สีของเคอร์คูมิน เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน การตรวจสอบความเข้มข้นสุดท้ายของเคอร์คูมินในแผ่นเจลาคตินดัดแปลง (100% release) ทำโดยเติม trypsin-EDTA เพื่อย่อยสลายแผ่นเจลาคตินดัดแปลงทั้งหมด แล้ววัดสีโดยใช้กราฟมาตรฐานที่มีการเติมแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ถูกย่อยสลายด้วย trypsin-EDTA ทุกหลอด

2.5 การทดสอบความเป็นพิษของแผ่นเจลาคตินดัดแปลง

วิธีทดสอบแบบ Direct Contact Cytotoxicity test (ISO10993-5, 1999) โดยการเลี้ยงเซลล์ผิวหนังแท่งหนู (L929 mouse Fibroblasts) ปริมาณเริ่มต้น 10,000 เซลล์ต่อแผ่นเจลาคตินดัดแปลงด้วยคอลเลสเตอรอล ปริมาณ 25, 66, 100% (โมล) (GC25, GC66, GC100) ของปริมาณ หมู่ -NH₂ ในโครงสร้างของเจลาคติน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่ประกอบไปด้วย 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.25 µg/ml amphotericin-B โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่มีสภาวะความดันบรรยากาศที่มี 5% CO₂ และ 95% air อุณหภูมิ 37 °C มีการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยการวัดกิจกรรมของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ด้วยวิธี MTT assay (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay [Liu, H. และคณะ 2004]

2.6 ระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลองที่มีการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงใต้ผิวหนัง

การทดลองในสัตว์ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว แผ่นเจลาคตินดัดแปลงด้วยคอลเลสเตอรอล 66% (CG66)หนัก 10 มิลลิกรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์แล้ว ถูกนำมาดูดซับเคอร์คูมิน (ละลายในเอทานอล) ถูกนำไปฝังใต้ผิวหนังบริเวณหลังของ BALB-c mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์

น้ำหนักตัว 20-25 กรัมเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 2.3) โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (ผังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน), กลุ่มที่ผังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 100 ไมโครกรัม และกลุ่มที่ผังแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน 400 ไมโครกรัม



รูปที่ 2.3 ภาพแสดงการฝังชิ้นงานบนหลังสัตว์ทดลอง

เลือดที่เก็บได้จากหัวใจหนูถูกนำมาแยกพลาสมาออกจากเลือด แล้วนำพลาสมาไปป่มด้วยเอนไซม์ β -glucuronidase ตามวิธีของ Asai, A. ซึ่งรายงานว่เมื่อ เคอร์คูมิน เข้าสู่กระแสเลือดจะเกิดการรวมตัวกับสาร glucuronide กลายเป็น เคอร์คูมิน – glucuronide จึงไม่ปรากฏพีคของเคอร์คูมิน ในการวิเคราะห์พลาสมาด้วย HPLC เอนไซม์ β -glucuronidase สามารถตัด glucuronide ออกจากเคอร์คูมิน ทำให้ปรากฏพีคของ เคอร์คูมิน จากการวิเคราะห์ปริมาณในพลาสมาได้ การวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินในเลือด (พลาสมา) ของสัตว์ทดลอง ใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) column ชนิด C18 อัตราการไหล(flow rate) 1 มิลลิลิตร/นาที, mobile phase 1% acetic acid:acetonitrile (50:50), UV-detector วัดที่ $\lambda = 425$ nm พีคของ เคอร์คูมิน ปรากฏที่ retention time ประมาณ 7.5 นาที นอกจากนั้นยังมีการสร้างกราฟมาตรฐานของ เคอร์คูมิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเคอร์คูมิน กับพื้นที่ใต้กราฟ

2.7 การทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากแผ่นเจลาตินดัดแปลง

งานวิจัยในส่วนนี้ร่วมทดสอบโดย รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้หนูหนูดไมส์ เพศผู้ (BALB/c-nude mice) อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวระหว่าง 22-25 กรัม สัตว์ทดลองจะได้รับยาสลบ คือ Sodium pentobarbital ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal; i.p) ปริมาณ 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เมื่อสัตว์ทดลองสลบทำความสะอาดบริเวณผิวหนังด้านหลังของหนูหนูดไมส์ด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วทำการตัดผิวหนังด้านหลังเป็นวงกลมให้มีขนาดเท่ากับ chamber ประกอบตัว chamber เข้ากับผิวหนังส่วนนี้โดยทำการเย็บส่วนผิวหนังให้ติดกับ chamber (รูปที่

2.4) แล้วทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ HepG-2 จำนวน 2×10^6 เซลล์ ลงใน chamber กลุ่มทดลองแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (n=6) ดังนี้

กลุ่มที่ 1: Control ไม่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง

กลุ่มที่ 2: HepG2 มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง แต่ได้รับการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline) ไม่มีเคอร์คูมิน

กลุ่มที่ 3: HepG2-Cur หนูหนูที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง และได้รับการฝังแผ่นไฮโดรเจลที่ดูดซับเคอร์คูมิน

แผ่นเจลลาตินดัดแปลงหนัก 2 มิลลิกรัม ดูดซับเคอร์คูมิน 20 มิลลิกรัม ศึกษาผลของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่บรรจุเคอร์คูมินต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และขนาดของก้อนมะเร็งที่ 7 และ 14 วัน การศึกษา angiogenesis จะศึกษาที่บริเวณผิวหนังด้านในที่ประกบกับตัว chamber ทำการฉีด FITC-dextran-250 5%(w/v) เข้าทางหลอดเลือดดำสารเรืองแสงนี้จะอยู่ในพลาสมา (plasma) ทำให้เห็นหลอดเลือดชัดเจนผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ มีการบันทึกในวิดีโอเทปแบบ real time หลังจากเสร็จการทดลองจึงนำวิดีโอของแต่ละการทดลองวิเคราะห์หาการเกิดหลอดเลือดใหม่เพื่อหาความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง (Neocapillary Density = NC) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Gobal Lab II (Datatranslation Co.) หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อบริเวณที่ได้รับการปลูกถ่าย HepG-2 ไปไปตัดย้อมสี Hematoxylin & Eosin (H&E) เพื่อประมาณขนาดของก้อนมะเร็ง แต่ละชุดการทดลองมีการทำซ้ำ 6 ครั้ง และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบที (t-test) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Minitab system for Windows version 14, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)



รูปที่ 2.4 หนู (nude mice) ที่ใส่ dorsal chamber บริเวณหลัง ซึ่งมีการปลูกเซลล์มะเร็งตับ HepG-2 ใส่แผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมินและทำการวัดความหนาแน่นของหลอดเลือดเกิดใหม่

2.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

มีการทำซ้ำอย่างน้อย 4 ซ้ำ ในทุกๆการทดลองและการเตรียมตัวอย่าง การเปรียบเทียบผลการทดลองทำโดยเปรียบเทียบความแตกต่างเป็นคู่ๆ โดยใช้ student t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.9 การทดลองในสัตว์ คณะผู้วิจัยได้รับการอนุมัติให้ทำการทดลองในสัตว์จากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ กำลังดำเนินการทดสอบการนำส่งยาในสัตว์ทดลองที่ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนการทดสอบฤทธิ์ จะทำการทดสอบในช่วงปีที่สองของการดำเนินงาน

บทที่ 3 ผลการทดลองและบทวิเคราะห์

3.1 ความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเทอรอล

3.1.1) การลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

การวัดการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระเนื่องจากปฏิกิริยาการเชื่อมระหว่างเจลาตินกับคอเลสเทอรอลจะเกิดขึ้นระหว่าง $-HN_2$ กับ หมู่ $-OH$ ของคอเลสเทอรอล ตามสมการ เจลาตินเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆตามข้อมูลในหัวข้อ 1.4.3 ก. กรดอะมิโน การตรวจสอบความสำเร็จในการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเทอรอลที่มีอัตราส่วนต่างๆกันสามารถตรวจสอบได้จากปริมาณกรดอะมิโนอิสระหรือ $-NH_2$ ในโมเลกุลซึ่งใช้ 2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid (TNBS) ในการตรวจสอบ ดังแสดงในตารางที่ 3-1 พบว่าปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอลที่มีอัตราส่วนต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G อย่างเห็นได้ชัด ปริมาณอะมิโนอิสระของเจลาตินที่ได้รับจากบริษัท มีประมาณ 180.33 ไมโครกรัม/กรัมโปรตีน ปริมาณอะมิโนอิสระมีค่าลดลงตามลำดับเมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเทอรอลในการดัดแปลงเจลาตินพบว่าการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระในช่วง 13 - 41 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า CG125 ซึ่งมีการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอลมากที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุดคือ 40.73%

3.1.2) ค่ามุมสัมผัสน้ำ (Water Contact Angle) ของฟิล์มบาง

การวิเคราะห์พื้นผิวของเจลาตินดัดแปลงด้วยวิธีวัดค่ามุมสัมผัสเพื่อความสะดวก (hydrophilicity) และความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของเจลาตินดัดแปลงได้และสามารถบ่งบอกถึงความสำเร็จในการดัดแปลงเจลาตินได้ทางอ้อม [Einerson, N.J. และคณะ, 2002] ถ้าเจลาตินดัดแปลงมีความไม่ชอบน้ำมากจึงบ่งถึงความสำเร็จในการดัดแปลงโครงสร้างได้ วิธีวัดค่ามุมสัมผัสน้ำ ใช้การหยดน้ำลงบนแผ่นฟิล์มแล้วจับภาพลักษณะของหยดน้ำโดยใช้กล้องวิดีโอและคำนวณหาค่ามุมสัมผัส จากข้อจำกัดทางการวัดนี้จึงต้องขึ้นรูปเจลาตินดัดแปลงเป็นแบบฟิล์มบางบนแผ่นกระจกสไลด์ ตารางที่ 3.1 แสดงถึงค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวของเจลาตินดัดแปลงที่ปริมาณต่างๆ ค่ามุมสัมผัสน้ำของเจลาตินที่ไม่ดัดแปลง (G) มีค่า 69.88 ในขณะที่ค่ามุมสัมผัสน้ำของเจลาตินดัดแปลงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เทียบกับ G เมื่ออัตราส่วนระหว่างการดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินเพิ่มขึ้นซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 75 - 103 องศา โดยหาค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวชิ้นงานมีค่ามากกว่า 65 องศา แสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นค่อนข้างไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) แต่ถ้าหาค่ามุมสัมผัสน้ำที่วัดได้มีค่าต่ำกว่า 65 องศาแสดงว่าพื้นผิวชิ้นงานชนิดนั้นมีความชอบน้ำ [Einerson, N.J. และคณะ, 2002] จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารเชื่อมพันธะส่งผลให้ค่ามุมสัมผัสน้ำเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปลงถูกแทนที่ด้วยคอเลสเทอรอลปริมาณมากขึ้นเป็นผลให้เจลาตินมีความไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการวัดค่ามุมสัมผัสน้ำเป็นการวัดค่าทางอ้อม ฟิล์มที่ขึ้นรูปอาจมีการดูด

ชั้นน้ำของเจลาตินได้ การวัดความไม่ชอบน้ำอาจทำได้ด้วยการวัดค่ามุมสัมผัสกับสารละลายไม่มีขั้วเช่นกลีเซอรินเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองด้วย (แต่ไม่ได้มีการทดสอบในการศึกษาครั้งนี้)

ตารางที่ 3.1 สรุปลักษณะสมบัติของเจลาตินดัดแปลง

รหัส	ลักษณะสมบัติของเจลาตินดัดแปลง			ลักษณะสมบัติของแผ่นเจลาตินดัดแปลง หลังการขึ้นรูป			
	ปริมาณคอลเลสเตอรอล (โมล/โมลอะมิโนอิสระ)	อะมิโนอิสระที่ลดลง (%)	ค่ามุมสัมผัสน้ำ (องศา)	ระดับการเชื่อมโยงพันธะ (%)	สัดส่วนการดูดซับน้ำ (เท่า)	อุณหภูมิในการย่อยสลาย (°C)	ครึ่งชีวิตของการย่อยสลาย (วัน) [§]
G	0	-	69.88 ± 0.86	78.70 ± 0.01	1.91 ± 0.43	293	n/a
CG25	25	13.06#	76.48 ± 0.63	71.39 ± 0.02	3.21 ± 0.02	290	14.68 ± 0.33
CG50	50	20.68#	88.98 ± 0.58 #	71.10 ± 0.00#	4.53 ± 1.19	287	12.32 ± 0.06
CG66	66	23.47#	86.38 ± 1.63	68.98 ± 0.01	4.74 ± 0.63	286	11.34 ± 0.23
CG75	75	28.95#	90.27 ± 0.47 #	55.54 ± 0.01	4.86 ± 0.42	285	8.63 ± 0.02
CG100	100	33.94#	93.35 ± 1.66#	43.37 ± 0.03	5.76 ± 0.77	282	4.77 ± 0.01
CG125	125	40.73#	102.08 ± 1.17 #	38.86 ± 0.01 #	6.78 ± 0.97	280	2.43 ± 0.17

หมายเหตุ ตัวอย่าง GC 25 -125 คือเจลาตินที่มีการดัดแปลงด้วยคอเลสเตอรอลปริมาณ 25-125 % โมลตามลำดับ, ตัวอย่าง G คือแผ่นเจลาตินที่ไม่มีการดัดแปลง

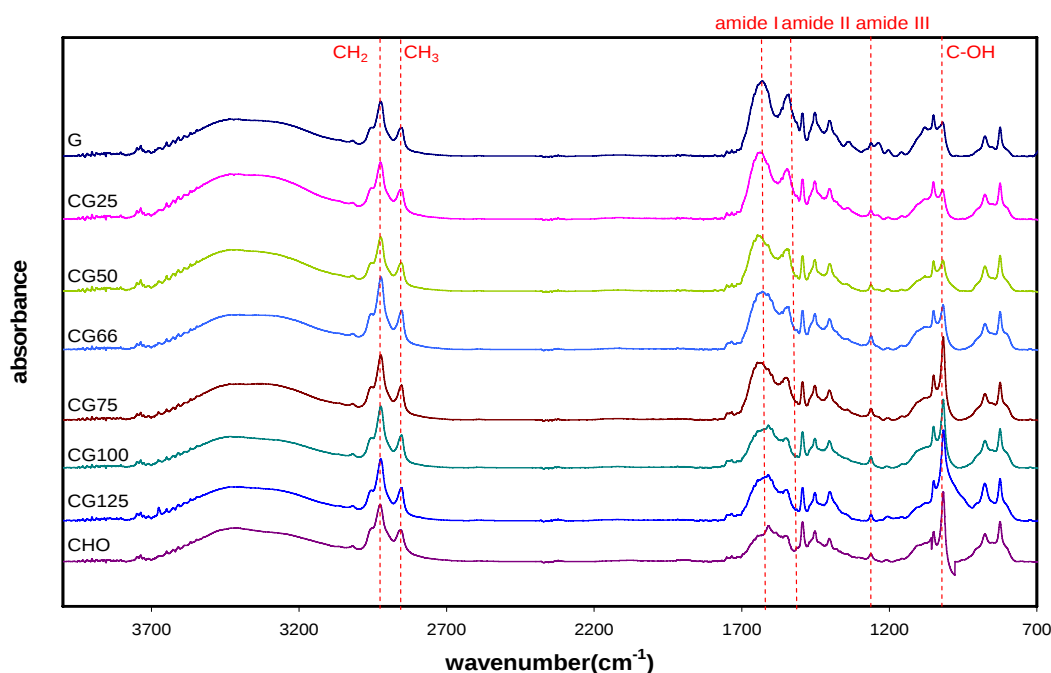
§ ทดสอบการย่อยสลายภายนอกในร่างกายในสารละลาย Collagenase ความเข้มข้น 1 ยูนิต (125 มิลลิกรัม) ที่ 37 °C, pH 7.5

แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับ G ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

3.1.3) โครงสร้างทางเคมีของแผ่นเจลาตินดัดแปลง

แผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ถูกเชื่อมขวางพันธะแล้ว (crosslinked modified gelatin เจลาตินดัดแปลง patch) ถูกวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (FT-IR spectroscopy) ในช่วงความยาวคลื่น 4000 - 800 cm^{-1} สเปกตรัมของเจลาตินแสดงดังรูปที่ 3.1 พีกในช่วงเลขคลื่น 1622 cm^{-1} จากการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O พีกนี้แสดงถึงแถบเอไมด์ I ของเจลาติน ส่วนพีกในช่วงเลขคลื่น 1536 cm^{-1} จากการสั่นแบบงอของพันธะ N-H แสดงถึงแถบเอไมด์ II ของเจลาติน และที่เลขคลื่น 1249 cm^{-1} จากการรวมพีกระหว่างการสั่นของพันธะ N-H และการสั่นแบบยืดของพันธะ C-N [Myung and Tanaka, 2002] ส่วนสเปกตรัมของคอเลสเตอรอล (CHO) เกิดพีกขึ้นในช่วงเลขคลื่น 2920 – 2847 cm^{-1} ซึ่งเป็นแถบที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของหมู่ CH_2 และ CH_3 และที่ช่วงคลื่น 1015 cm^{-1} เป็นแถบที่แสดงถึงหมู่ C-OH [Sigma-Aldrich product specification page, <http://www.sigmaaldrich.com/spectra/ftir/FTIR007602.PDF>] เมื่อดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอลแต่ละอัตราส่วน พบว่าลักษณะสเปกตรัมของเจลาตินดัดแปลงมีพีกการสั่นที่ช่วงคลื่น 1622 cm^{-1} และ 1536 cm^{-1} ซึ่ง

แสดงถึงแถบเอไมด์ I และ เอไมด์ II ลดต่ำลงในขณะที่ ช่วงคลื่น 1015 cm^{-1} ซึ่งเป็นแถบที่แสดงถึงหมู่ C-OH มีพีคการสั่นที่สูงขึ้นตามลำดับ เมื่อมีการใช้คลอเลสเทอรอลในการดัดแปลงโครงสร้างเจลาตินมากขึ้นจาก 25 – 125 % (โมล) แสดงว่าเกิดพันธะระหว่างหมู่ NH_2 ของเจลาตินกับหมู่ -OH ของคอเลสเทอรอลเป็นผลให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงตามการเพิ่มปริมาณคลอเลสเทอรอลที่ใช้



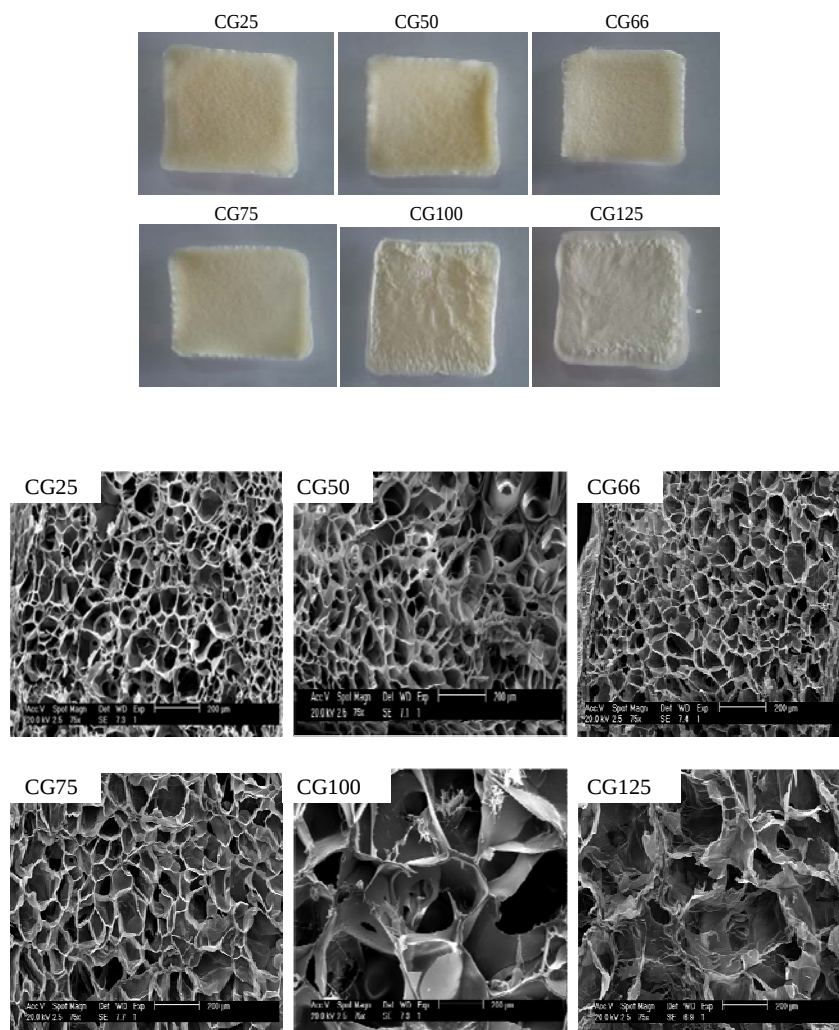
รูปที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค FTIR ของแผ่นเจลาตินดัดแปลง โดยใช้คอเลสเทอรอลปริมาณ 25-125 % โมล (GC 25 -125) ที่เชื่อมขวาง (crosslink) แล้ว ตัวอย่าง G และ CHO แทนแผ่นเจลาตินที่ไม่มีการดัดแปลง และผงคอเลสเทอรอล Characteristic peaks ของโปรตีนได้แก่ Amine I (1622 cm^{-1}), Amine II (1536 cm^{-1}) และ Amine III (1249 cm^{-1}) ส่วนช่วงคลื่น 1015 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ C-OH ในคอเลสเทอรอล

3.2 ลักษณะสมบัติของแผ่นเจลาตินดัดแปลง

3.2.1) ลักษณะภายนอกของแผ่นเจลาตินดัดแปลง

ลักษณะภายนอกและภาพถ่ายภาคตัดขวางถ่ายผ่านกล้อง Scanning electron microscope (SEM) ของแผ่นเจลาตินที่ดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลปริมาณต่างๆ แสดงดังรูปที่ 3.2 ตัวอย่างที่มีการดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลปริมาณสูงเช่น CG75-CG125 มีสีขาวกว่าตัวอย่าง CG25-CG66 ซึ่งใช้คอเลสเทอรอลน้อยกว่า สีเหลืองนวลที่เกิดขึ้นในแผ่นเจลาตินนั้นเป็นลักษณะปกติของแผ่นโปรตีนที่เชื่อมขวางโดยใช้สาร glutaraldehyde โดยคาดว่าตัวอย่าง CG125 มีปริมาณสารเชื่อมขวางน้อย และสังเกตเห็นว่าแผ่นมีความเปื่อยยุ่ยและลักษณะที่แวววาวมากกว่า ส่วนภาพพื้นผิวจากการตัดขวางแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้คอเลสเทอรอลปริมาณมาก

ขึ้นจะทำให้เกิดลักษณะที่เป็นรูพรุนขนาดใหญ่ขึ้น โดยตัวอย่าง CG25-CG75 มีขนาดรูพรุนที่ต่ำกว่า 200 ไมโครเมตร แต่ตัวอย่าง CG100 และ CG125 มีขนาดรูพรุนใหญ่ ประมาณ 500 ไมโครเมตร

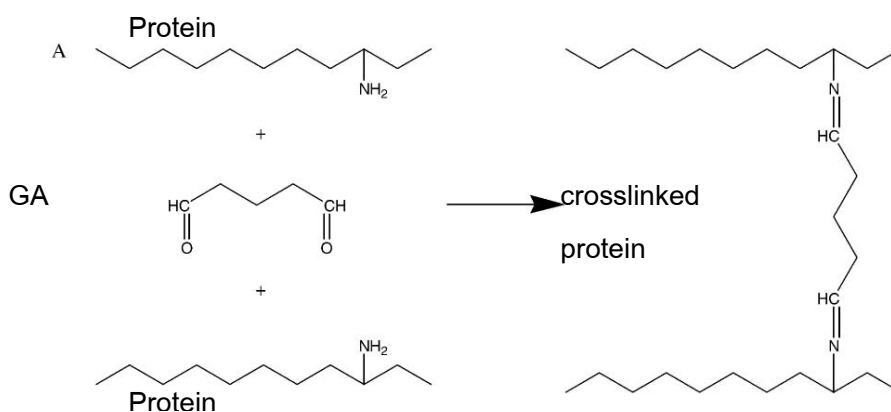


รูปที่ 3.2 ภาพถ่ายลักษณะภายนอก (บน) และภาคตัดขวาง (ล่าง) ถ่ายผ่านกล้อง Scanning electron microscope ของแผ่นเจลาตินที่ดัดแปลงด้วยคลอเลสเทอรอล ปริมาณ 25-125% (โมล)

3.2.2) ระดับการเชื่อมขวาง (Degrees of crosslink)

เจลาตินที่ดัดแปลงแล้วถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นเพื่อการใช้ประโยชน์ในร่างกายซึ่ง จำเป็นที่จะต้องมีการเชื่อมขวาง (crosslink) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลให้เป็นเครือข่ายร่างแหโดยการสร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างของเจลาติน อย่างไรก็ตาม การเชื่อมขวางมีผลต่อสมบัติทางกายภาพ ทางกล และทางชีวภาพของแผ่นเจลาติน กล่าวคือ เจลาตินจะไม่สามารถคืนสภาพเดิมได้อีกแม้จะมีการเปลี่ยนอุณหภูมิไปยัง gel point อีก

เพิ่มความแข็งแรง ลดการละลายในน้ำ ทนทานต่อกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยน้ำ และทนทานต่อกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในร่างกาย นอกจากนั้นการเชื่อมขวางยังทำให้สามารถควบคุมการปล่อยเคอร์คิวมินอย่างต่อเนื่องโดยตรงในบริเวณที่ต้องการให้เป็นไปอย่างช้าๆ ตามการย่อยสลายของแผ่นเจลาติน เราจึงสามารถดัดแปลงอัตราการส่งผ่านสารสำคัญ ได้โดยการปรับเปลี่ยนระดับการเชื่อมขวาง ในการทดลองนี้ขึ้นรูปเจลาตินดัดแปลงโดยใช้การเชื่อมขวางด้วยสารละลาย glutaraldehyde (GA) ซึ่งเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีโนอิสระ ($-NH_2$) ของเจลาตินกับหมู่แอลดีไฮด์ของ GA (ดังแสดงไว้ใน รูปที่ 3.3) ดังนั้นระดับการเชื่อมขวางจึงวัดได้จากผลต่างของปริมาณหมู่เอมีนของเจลาตินที่ดัดแปลงด้วยคลอเลสเทอรอลแล้วก่อนการเชื่อมขวาง (หลังการขึ้นรูปเป็นแผ่นด้วยวิธีทำให้แห้งแข็ง) และหลังการเชื่อมขวาง โดยใช้วิธี 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ผลของระดับการเชื่อมขวางแสดงดังตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.3 การเชื่อมขวาง (crosslink) เจลาตินด้วยวิธีทางเคมีคือใช้สาร Glutaraldehyde (GA) เพื่อให้เกิดโครงสร้างตาข่าย มีการเชื่อมพันธะแบบโคเวเลนต์ของโมเลกุล GA กับหมู่ $-NH_2$ 2 หมู่ ในโมเลกุลของโปรตีน [Lee, C R and others, 2001]

ระดับการเชื่อมขวางของเจลาตินที่ใช้ในการทดลองก่อนการดัดแปลงโครงสร้าง (G) มีค่า 78.70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณเอมีโนอิสระก่อนการเชื่อมขวาง ด้วย GA = 180.33 ไมโครกรัม และหลังการเชื่อมขวาง = 38.41 ไมโครกรัม ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) แต่สำหรับแผ่นเจลาตินดัดแปลงโครงสร้างมีระดับการเชื่อมขวางลดลงโดยเฉพาะ CG125 มีเปอร์เซ็นต์การเชื่อมขวางน้อยที่สุดคือ 38.86 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการเชื่อมพันธะของคอเลสเทอรอลบนโปรตีนต้องการหมู่ $-NH_2$ 1 หมู่ ดังนั้นถ้ามีคอเลสเทอรอลอยู่บนโปรตีนจำนวนมากจะมีหมู่ $-NH_2$ เหลือน้อยที่จะเชื่อมขวางระหว่างกัน ระดับการเชื่อมขวางมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อร้อยละของคอเลสเทอรอลในการดัดแปลงเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารเชื่อมพันธะ (conjugating agent, DSC) มีให้ระดับการเชื่อมขวางที่ยังคงเหลืออยู่ลดลง เนื่องจากปริมาณคอเลสเทอรอลที่ติดบนโมเลกุลของเจลาตินเพิ่มขึ้น (ไม่ได้แสดงข้อมูลผลการทดลองไว้ในรายงาน)

ระดับการเชื่อมขวางมีผลต่อลักษณะทั่วไปของแผ่นเจลาคินดัดแปลงที่ผ่านการเชื่อมขวางแสดงดังรูปที่ 3.3 ลักษณะของแผ่นเจลาคินดัดแปลงหลังการเชื่อมขวางมีสีเหลืองอ่อน โดยลักษณะสีของแผ่นเจลาคินดัดแปลงที่มีร้อยละของคอเลสเทอรอลน้อยมีสีเข้มกว่าแผ่นเจลาคินดัดแปลงที่มีร้อยละของคอเลสเทอรอลมากกว่า ในขณะที่แผ่นเจลาคินดัดแปลง CG100 และ CG125 มีลักษณะของแผ่นที่คล้ายฟองน้ำและมีความยืดหยุ่นมากกว่าแผ่นเจลาคินดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลในปริมาณที่น้อยกว่า รูพรุนที่เชื่อมโยงกันมีขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้นเมื่อแผ่นเจลาคินดัดแปลงมีร้อยละของคอเลสเทอรอลมากขึ้น ทั้งนี้อาจเพราะแผ่นเจลาคินที่ถูกดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลปริมาณมากจะมีหมู่ $-NH_2$ เหลือน้อย การเชื่อมขวางเกิดได้น้อยกว่าทำให้เกิดรูพรุนขนาดใหญ่และมีผนังรูพรุนที่บางดังเช่น CG100 และ CG125 ซึ่งจะมีผลกระทบต่อสมบัติด้านอื่นๆของแผ่นเจลาคินดัดแปลงดังที่จะแสดงในหัวข้อต่อไป

3.2.3) การดูดซับน้ำ (water swelling)

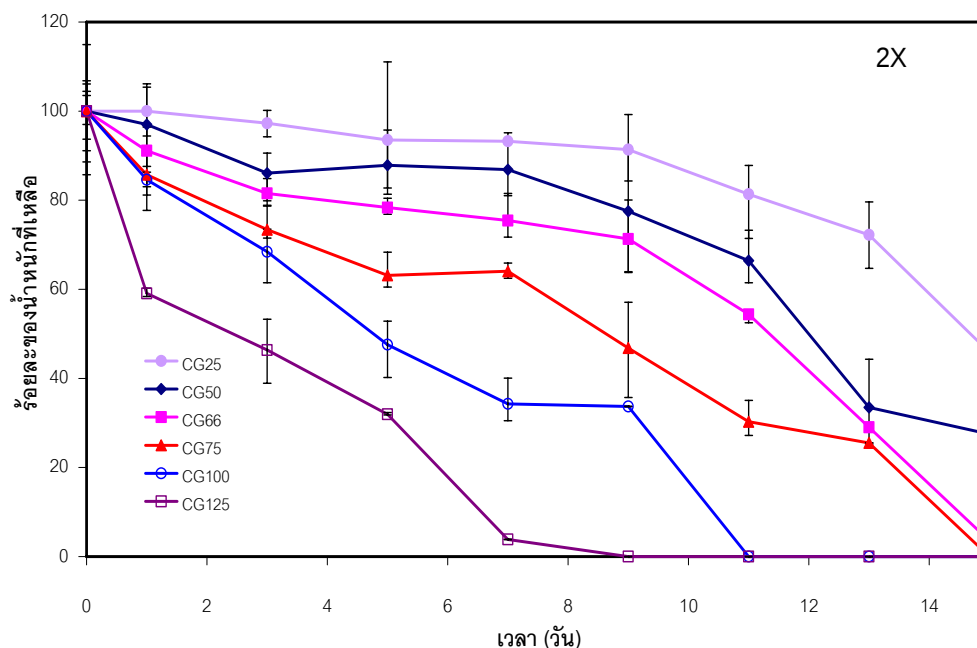
การทดสอบสมบัติการดูดซับน้ำของแผ่นเจลาคินดัดแปลงเชื่อมขวางแล้วที่ใช้คอเลสเทอรอลในการดัดแปลงปริมาณต่างๆ แสดงผลดังตารางที่ 3.1 พบว่า เมื่ออัตราส่วนของคอเลสเทอรอลที่ใช้ในการดัดแปลงเจลาคินเพิ่มมากขึ้น แผ่นเจลาคินดัดแปลงสามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น ในช่วง 3.2 - 6.8 เท่าโดยเฉพาะ CG100 -125 มีสมบัติการดูดซับเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับ G ในขณะที่ G25-G75 สามารถดูดซับน้ำได้ใกล้เคียงกัน จากผลดังกล่าวแสดงว่าการดูดซับน้ำสัมพันธ์กับโครงสร้างของแผ่นเจลาคินดัดแปลง แต่ไม่สัมพันธ์กับความชอบน้ำของตัวอย่าง กล่าวคือ ปริมาณอะมิโนอิสระมีค่าลดลงเมื่อมีการดัดแปลงโครงสร้างมากขึ้น ทำให้เจลาคินมีความสามารถในการเชื่อมขวางน้อยลง จึงมีโครงสร้างรูพรุนขนาดใหญ่ขึ้น รูพรุนมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการดูดซับน้ำมากขึ้น โดยปกติการดูดซับน้ำมีผลต่อการย่อยสลายของโครงสร้างโปรตีนในร่างกาย หากเจลาคินดัดแปลงสามารถดูดซับน้ำไว้ได้มาก เอนไซม์ที่ละลายอยู่ในน้ำก็จะสามารถเข้าไปทำลายพันธะภายในโมเลกุลของเจลาคินดัดแปลงได้ง่ายรวมทั้งบางพันธะสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยโมเลกุลของน้ำ เคมมีรายงานว่า การดูดซับน้ำของแผ่นเจลาคินเป็นตัวบ่งชี้ระดับการเชื่อมขวาง โดยหากโมเลกุลภายในเจลาคินดัดแปลงเกิดการเชื่อมขวางมากความสามารถในการดูดซับน้ำภายในเจลาคินดัดแปลงจะลดลง [Liu, H. และคณะ, 2004] แต่ในกรณีนี้โครงสร้างของรูพรุนของแผ่นมีความแตกต่างกันทำให้มีผลต่อปริมาณน้ำที่ดูดซับได้มากกว่าผลของระดับการเชื่อมขวาง ส่วนการที่สมบัติความชอบน้ำไม่มีผลต่อปริมาณดูดซับของแผ่นเจลาคินดัดแปลงเนื่องจากกลไกในการดูดซับใช้แรงแคปิลลารี

3.2.4) อุณหภูมิในการเสื่อยสภาพ (Degradation Temperature, Td)

อุณหภูมิในการสลายตัวของเจลาตินโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Thermogravimetric / Differential Analyzer (TG/DTA) โดยการหาจุดตัดจากเส้นตรงสองเส้นจากกราฟโดยใช้โปรแกรม Onset จากเครื่อง Thermogravimetric/Differential Analyzer (TG/DTA) แสดงดังตารางที่ 3.1 จากการวิเคราะห์พบว่าเจลาตินที่ไม่ได้ดัดแปลงโครงสร้างมีค่าอุณหภูมิการสลายตัวสูงที่สุด คือ 293°C แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคอเลสเทอรอล ค่าอุณหภูมิในการย่อยสลายของเจลาตินมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ โดยเฉพาะ CG125 มีค่าอุณหภูมิในการสลายตัวลดลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับ G อย่างมีนัยสำคัญโดยลดลงเหลือ 280°C เนื่องจากการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอลมากที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโมเลกุลของคอเลสเทอรอลที่แทรกเข้าไปติดอยู่บริเวณที่มีหมู่ $-NH_2$ ในสายโซ่ของเจลาตินทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับทุติยภูมิที่เดิมเป็นแบบ random coil ทำให้สื่อยสภาพทางความร้อนลดต่ำลง

3.2.5) การย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกาย (*In vitro* degradation)

การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพภายนอกร่างกายของโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้เอนไซม์ คอลลาจีเนส (collagenase) [Lee, SB. 2003] เพื่อหาการย่อยสลายในรูปของร้อยละของน้ำหนักที่หายไปเทียบกับเวลา ทำโดยการแช่แผ่นไฮโดรเจลที่มีน้ำหนัก 0.8 มิลลิกรัม ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่ความเข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร (1 มิลลิกรัม = 125 ยูนิต) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ เพื่อจำลองสภาวะของร่างกาย [Campbell, N.A. และคณะ, 1999] เจลาตินดัดแปลงมีการย่อยสลายที่เร็วเมื่อมีปริมาณคอเลสเทอรอลในโครงสร้างมากขึ้น (รูปที่ 3.4) CG125 และ CG100 ย่อยสลายหมดในเวลา 9 และ 11 วัน ในขณะที่อัตราส่วนอื่นๆของเจลาตินดัดแปลงมีระยะเวลาการย่อยสลายที่นานกว่า ซึ่งผลการย่อยสลายนี้สอดคล้องความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำ (หัวข้อที่ 3.1.2) และอุณหภูมิในการเสื่อมสภาพ (T_d) ของวัสดุ โดยมีการประมาณค่าครึ่งชีวิต (half life, $t_{1/2}$) ของเจลาตินดัดแปลงดังแสดงในตารางที่ 3.1 ครึ่งชีวิตของแผ่นเจลาตินดัดแปลงอยู่ในช่วง 2.4 - 14.7 วัน โดยมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเทอรอลในการดัดแปลง การย่อยสลายแม้จะพยายามใช้สภาวะเลียนแบบร่างกายได้ในช่วง พีเอช และอุณหภูมิร่างกาย แต่ไม่สามารถจำลองการย่อยสลายที่แท้จริงได้เนื่องจากในร่างกายมีเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้หลายชนิดที่หลั่งออกมาโดยเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน และการถ่ายเทมวลสารระหว่างการทดลองอาจมีความแตกต่างกับสภาวะจริง การทดลองนี้จึงได้ผลในเชิงเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มที่ทำการทดลองเท่านั้น การที่เราสามารถกำหนดอัตราการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินในร่างกายแสดงถึงความสามารถที่จะควบคุมการส่งผ่านสารสำคัญได้ เนื่องจากกลไกการส่งผ่านไม่ขึ้นกับการแพร่ออกจากแผ่นเจลาติน แต่เป็นการย่อยสลายองค์ประกอบของแผ่นเจลาตินแบบ bulk erosion



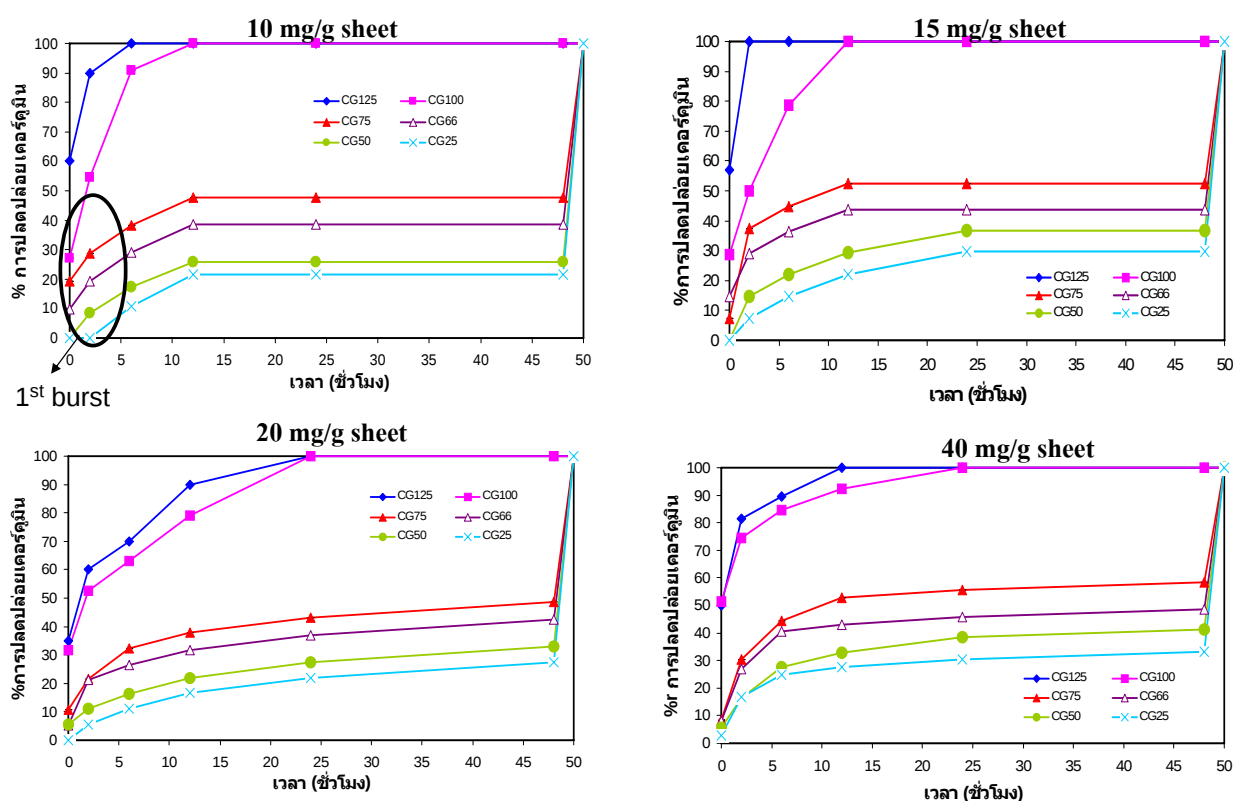
รูปที่ 3.4 การสูญเสียน้ำหนักของแผ่นเจลาตินดัดแปลง ที่แช่ในสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ที่มีเอนไซม์ bacterial collagenase ความเข้มข้น 1 ยูนิตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3 การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลาตินดัดแปลงในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* release experiments)

การทดลองนี้มีการทดสอบดูดซับยาต้นแบบ คือ เคอร์คูมิน (curcumin) ลงบนแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ถูกเชื่อมขวาง เพื่อทดสอบปริมาณยาต้นแบบที่ถูกดูดซับได้ (drug loading) และอัตราและรูปแบบปลดปล่อยยาในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro* release) เพื่อพิสูจน์ว่าระบบนำส่งจะสามารถลดการแพร่ (diffusion) ของเคอร์คูมิน และทำให้กลไกการปลดปล่อยยาร่างกายเป็นไปตามการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลงได้หรือไม่ ผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 3.5 แผ่นเจลาตินดัดแปลงทุกสูตร ยกเว้น G100 และ G125 สามารถควบคุมการปลดปล่อยของยาได้อย่างต่อเนื่องแบบช้าๆ โดยเฉพาะเมื่อมีการดูดซับยาปริมาณน้อย คือ 10 -15 มิลลิกรัม/กรัมแผ่นเจลาติน เคอร์คูมินแพร่ออกจากแผ่น G25 - G75 ช้าๆในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และการแพร่ดูเหมือนจะหยุดหลังจากนั้น แสดงว่ามีเคอร์คูมินที่ถูกกักอยู่ในแผ่นด้วยแรงทางเคมี หรือกายภาพอื่น โดยเฉพาะ hydrophobic interaction ระหว่างยากับคอเลสเตอรอล ปริมาณของเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับในแผ่นเจลาตินดัดแปลงของแต่ละสูตรมีความแตกต่างกัน โดยยิ่งเจลาตินมีองค์ประกอบของคอเลสเตอรอลมาก ยิ่งมีการแพร่ของเคอร์คูมินในช่วงแรก (first burst) สูง โดยจะเห็นว่า GC75 สามารถกักเคอร์คูมินไว้ได้ประมาณ 50% ของปริมาณตั้งต้นในทุกการทดลอง ในขณะที่สูตรที่มีการดัดแปลงด้วยเจลาตินปริมาณต่ำสุดคือ GC25 สามารถเก็บกักเคอร์คูมินไว้

ได้ประมาณ 15-20 %ของปริมาณยาเริ่มต้น ผลเช่นนี้แสดงให้เห็นว่าเคอร์คิวมินที่ดูดซับเป็นปริมาณเกินพอที่จะทำให้ hydrophobic interaction กับเจลาตินดัดแปลง จะมีการแพร่ออกมาก่อน คล้ายกับลักษณะ 1st burst ของยาในระยะแรก หลังจากนั้นคาดว่าจะมีการปลดปล่อยตามอัตราการย่อยสลายของแผ่น โดยที่เวลา 50 ชั่วโมงมีการย่อยแผ่นเจลาตินดัดแปลงด้วยเอ็นไซม์จนเกิดการปลดปล่อยเคอร์คิวมินออกมาทั้งหมดได้

ส่วนแผ่นเจลาตินดัดแปลงที่ใช้คอลเลสเตอรอลสูงมากได้แก่ CG100 และ GC125 มีการปลดปล่อยเคอร์คิวมินอย่างรวดเร็วใน 3 ชั่วโมงแรกและปลดปล่อยหมดใน 10-15 ชั่วโมง อาจมีสาเหตุที่ความไม่เสถียรของแผ่นที่เปื่อยยุ่ยและย่อยสลายอย่างรวดเร็ว

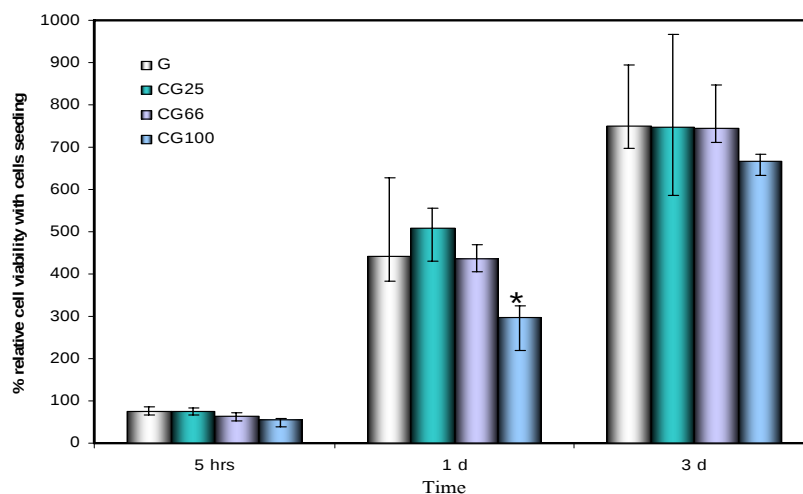


รูปที่ 3.5 การปลดปล่อยเคอร์คิวมิน จากแผ่นเจลาตินดัดแปลง ในสารละลาย Phosphate buffer saline (+ 0.1% Tween 80) ที่ pH 7, 37 °C เมื่อทำการดูดซับ เคอร์คิวมิน ความเข้มข้น 10 – 40 มิลลิกรัม ต่อกรัมของแผ่นเจลาตินที่ดัดแปลงด้วยคอลเลสเตอรอล ปริมาณ 25-125% (โมล) ของปริมาณ หมู่ -NH₂ ในโครงสร้างของเจลาติน (GC25-GC125) ที่เวลา 50 ชั่วโมงมีการย่อยแผ่นเจลาตินดัดแปลงด้วยเอ็นไซม์จนเกิดการปลดปล่อยเคอร์คิวมิน 100%

3.4 การทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity test) ของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง

การทดสอบความเป็นพิษของแผ่นเจลลาตินดัดแปลงโดยใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังหนูมาตรฐาน (L929 mouse fibroblasts) ลงบนแผ่นเจลลาตินดัดแปลงโดยตรง แล้วตรวจหาปริมาณเซลล์ที่สามารถยึดเกาะ (cell adhesion) วัสดุทั้งหมดที่เวลา 5 ชั่วโมง และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ที่เวลา 1 วัน และ 3 วัน โดยวิธีวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ใช้คือ MTT assay จะตรวจหาแต่กิจกรรมของเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น [Mosmann T., 1983]

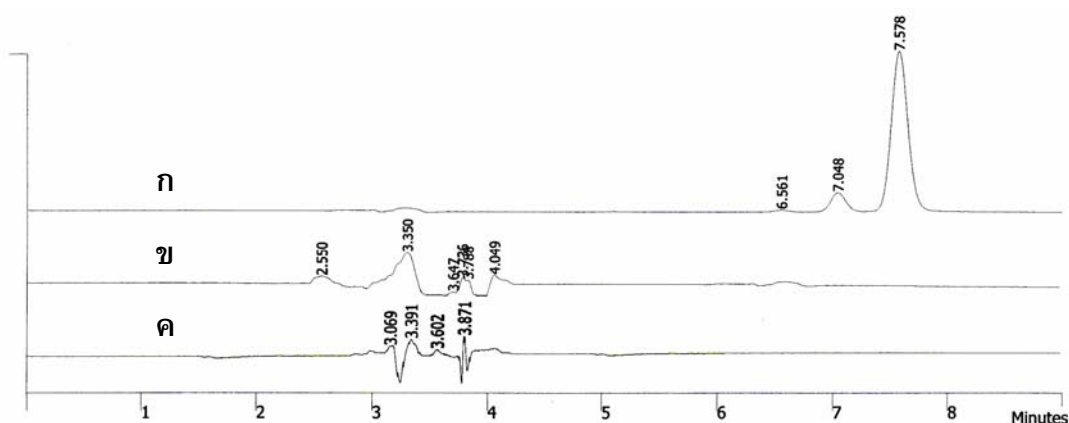
ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 3.6 การยึดเกาะของเซลล์ที่ 5 ชั่วโมง ในแผ่นเจลลาตินดัดแปลงทุกอัตราส่วนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการยึดเกาะของเซลล์บน G สามารถยึดเกาะได้ประมาณ 80 % และเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามเวลาโดยที่เวลา 1 วันมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากกว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมงเป็น 67 % และที่ 3 วัน มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 82 % การยึดเกาะของเซลล์บน CG25 และ CG66 สามารถยึดเกาะได้ต่ำกว่าเล็กน้อย แต่จำนวนเซลล์ในวันที่ 1 และ 3 ไม่แตกต่างจาก G อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ CG100 มีเซลล์สามารถยึดเกาะที่เวลา 5 ชั่วโมงได้เพียง 48 % และที่เวลา 1 วัน มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 67% แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่า G อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามเซลล์ก็สามารถกลับมาเพิ่มจำนวนจนใกล้เคียงกับกลุ่มอื่นๆได้ในวันที่ 3 แสดงว่าการเกาะติด และเจริญเติบโตของเซลล์บนแผ่นเจลลาตินดัดแปลง CG25, CG66 และ CG100 ในเวลา 3 วัน ไม่แตกต่างจากผลที่พบเมื่อใช้แผ่นเจลลาตินที่ไม่ดัดแปลง เนื่องจากการดัดแปลงเจลลาตินไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ และพร้อมในการทดสอบในสัตว์ทดลอง



รูปที่ 3.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษ ในรูปการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังแท้ของหนู L929 mouse fibroblast บนแผ่นเจลลาตินที่ไม่ถูกดัดแปลง (G) และแผ่นเจลลาตินที่ดัดแปลงด้วยคลอเลสเทอรอล ปริมาณ 25, 66, 100% (โมล) (GC25, GC66, GC100) ของปริมาณ หมู่ -NH₂ ในโครงสร้างของเจลลาติน

3.5 การทดสอบการนำส่งเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

เมื่อฝัง (implant) แผ่นเจลลาตินดัดแปลงดูดซับเคอร์คูมินใต้ผิวหนังของหนู แล้วเก็บเลือดมาวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินที่ร่างกายจะนำมาใช้ได้ (Bioavailability) โดยดูจากความเข้มข้นของเคอร์คูมินในพลาสมาในช่วงเวลาต่างๆ โดยมีการทดสอบการวิเคราะห์ปริมาณในพลาสมาด้วยวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 3.7 พบว่าพลาสมา และแผ่นเจลลาตินดัดแปลงไม่มีองค์ประกอบใดที่ทำให้เกิดพีคที่ซ้ำซ้อนกับพีคของเคอร์คูมิน ชนิดที่ 1 (curcumin I) ดังที่พบพีคที่เวลาประมาณ 7.6 นาที

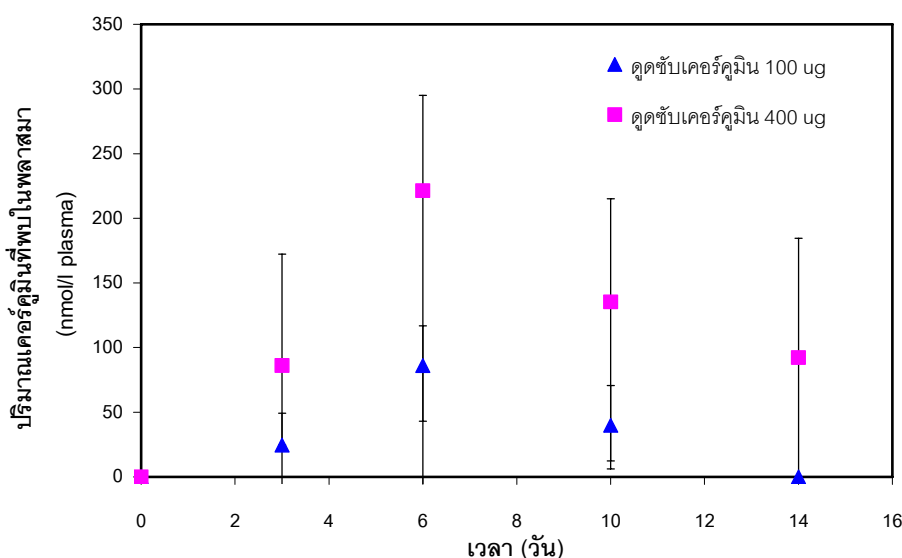


รูปที่ 3.7 กราฟ HPLC ของ (ก.) เคอร์คูมินในสารละลายเอทานอล (ข.) พลาสมาที่แยกจากหนูที่ได้รับการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน (ค.) พลาสมาที่แยกจากหนูที่ไม่ได้ฝังแผ่นเจลลาติน

ผลการทดสอบการนำส่งเคอร์คูมินในสัตว์ทดลองแสดงดังกราฟในรูปที่ 3.7 ในกลุ่มควบคุม (แผ่นเคอร์คูมินดูดซับบัพเฟอร์) ไม่พบพีคของเคอร์คูมิน กลุ่มที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมินปริมาณต่ำ (100 ไมโครกรัม) พบพีคของเคอร์คูมินในพลาสมาสูงในวันที่ 6 ในปริมาณเฉลี่ย 0.04 ไมโครกรัม จนกระทั่งไม่พบเลยในวันที่ 14 ส่วนกลุ่มที่ฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมินปริมาณสูง (400 ไมโครกรัม) พบพีคของเคอร์คูมินในพลาสมาสูงในวันที่ 6 เช่นเดียวกันในปริมาณเฉลี่ย 0.12 ไมโครกรัม และยังมีปรากฏให้เห็นอยู่ 0.05 ไมโครกรัม ในวันที่ 14 เมื่อนำค่าเฉลี่ยของปริมาณ เคอร์คูมิน ที่ปลดปล่อยจากแผ่นเจลลาตินดัดแปลง GC66 มาพลอตกราฟดังรูปที่ 3 จะเห็นว่า วันที่มีปริมาณ เคอร์คูมิน สูงสุดคือ วันที่ 6 หลังจากนั้นปริมาณ เคอร์คูมิน ในทั้งสองกลุ่มลดลงเรื่อยๆจนถึงศูนย์ในเวลาประมาณ 14 วัน เมื่อใช้แผ่นที่ดูดซับ เคอร์คูมิน 100 ไมโครกรัม สำหรับแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับ เคอร์คูมิน 400 ไมโครกรัม ยังคงปลดปล่อย เคอร์คูมิน ได้นานกว่า 14 วัน

การดัดแปลงโครงสร้างของเจลลาตินโดยการเชื่อมพันธะระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของคอลเลเจนเตอรอลกับหมู่อะมิโนของเจลลาติน ทำให้เกิดการปรับปรุงพื้นผิวของเจลลาตินซึ่งโดยธรรมชาติ

สามารถละลายน้ำได้ดี ให้มีหมู่ hydrophobic เพื่อให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้อย่างต่อเนื่องโดยตรงในบริเวณที่ต้องการให้เป็นไปอย่างช้าๆตามการสลายตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลง โดยพบว่ามีการเกิดพันธะ hydrophobic ระหว่าง เคอร์คูมิน กับแผ่นเจลาตินดัดแปลงทำให้สามารถกักเก็บเคอร์คูมินไว้ในแผ่นเจลาตินดัดแปลงได้ตั้งนั้นการปลดปล่อยเคอร์คูมินจึงเป็นไปตามการสลายตัวของแผ่นเจลาตินดัดแปลง เมื่อนำปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมาหลังจากการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลงใต้แผ่นหลังหนูที่ระยะเวลาต่างๆ มาวาดกราฟความสัมพันธ์ความเข้มข้นของยาในเลือดกับเวลา ประมาณค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Area Under Curve, AUC) จะเป็นปริมาณที่มีอยู่ในร่างกายทั้งหมดนับตั้งแต่เริ่มให้ยา พื้นที่ใต้กราฟของเคอร์คูมินที่พบในพลาสมาหนูที่ฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลง (ดูดซับเคอร์คูมิน 100 ไมโครกรัม หรือคิดเป็น 4.5 มิลลิกรัม /น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม) ในเวลา 14 วัน ประมาณค่า AUC ได้ 589 นาโนโมล/ลิตรของพลาสมา หรือคิดเป็น 0.32 % ของปริมาณเคอร์คูมินเริ่มต้น อย่างไรก็ตามค่านี้เกิดจากการเก็บตัวอย่างที่ไม่รวม 1st burst ของเคอร์คูมินในระยะแรกด้วย



รูปที่ 3.8: ปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมา (วิเคราะห์โดยใช้ HPLC) หลังจากการฝังแผ่นเจลาตินดัดแปลง (CG66, หนัก 10 มิลลิกรัม) ใต้แผ่นหลังของ BALB/c mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลาต่างๆ (mean $\pm$ SD, n=3) โดยมีการดูดซับเคอร์คูมิน 100 และ 400 ไมโครกรัม

จากรายงานวิจัยของ Asai A. ในปี 2006 ซึ่งให้หนู (Sprague-Dawley rats อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 210-240 กรัม) กินเคอร์คูมิน ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม แล้วเก็บพลาสมาที่เวลา 0.5, 1, 3, 8 และ 24 ชั่วโมง นำมาสกัดเคอร์คูมินด้วยวิธีเดียวกัน พบ เคอร์คูมิน ในเลือดมากที่สุดที่เวลา 1 ชั่วโมง โดยพบในปริมาณ 240 นาโนโมล/ลิตรของพลาสมา และเมื่อคำนวณหา AUC ที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่าปริมาณ เคอร์คูมิน ในร่างกาย

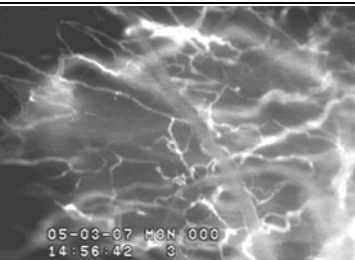
ทั้งหมดเท่ากับ 2,415 นาโนโมล/ลิตรของพลาสมา (คิดเป็น 0.004 % จากปริมาณเคอร์คูมิน เริ่มต้น) จะเห็นได้ว่าต้องให้กิน เคอร์คูมิน ในปริมาณที่สูงมากเพื่อให้ได้ระดับยาในเลือดระดับเดียวกับการใช้แผ่นเจลาคตินดัดแปลง (เนื่องจากงานวิจัยนี้มีระบบการนำส่งแตกต่างจากวิธีของ Asai A. ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์จึงไม่เหมือนกัน) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแผ่นเจลาคตินดัดแปลงสามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ได้ในลักษณะยั่งยืน (sustained release) ตามระยะเวลาในการย่อยสลายของตัวนำส่ง ซึ่งในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแผ่น GC66 สามารถควบคุมการนำส่งได้อย่างน้อย 2 สัปดาห์ การใช้แผ่นเจลาคตินสามารถเพิ่มปริมาณยาที่ร่างกายนำมาใช้ได้โดยไม่ต้องรับประทาน ซึ่งจากรายงานพบว่าต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงมากเพราะเมื่อผ่านจากกระเพาะเข้าหลอดเลือดจะเหลือปริมาณน้อย มียังแพร่ไปในอวัยวะอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย และเกิดพิษต่อระบบการขับเคอร์คูมินออกจากร่างกายได้

3.6 การทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คูมินจากแผ่นเจลาคตินดัดแปลงต่อก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คูมินที่ถูกนำส่งโดยใช้แผ่นเจลาคตินดัดแปลงในสัตว์ทดลอง คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยใช้เซลล์มะเร็งตับ (Human Hepatoma American Type; HepG-2) ปลูกใน dorsal chamber บนหลังของหนูชนิดไมส์ เพื่อศึกษาผลของขมิ้นชันต่อการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ในก้อนมะเร็ง (solid tumor) โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาของ Yoysungneon and others (2006) ที่มีการให้หนูชนิดที่มีการเพาะก้อนมะเร็งกินสารละลายเคอร์คูมิน ขนาด 3000 มก./กก.น.ตัว เป็นเวลา 14 วันแล้วสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ประมาณ 26 %) แต่เคอร์คูมินในขนาดที่น้อยกว่า 300 มก./กก.น.ตัว จะไม่สามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่และลดขนาดของมะเร็งได้ถึงแม้จะสามารถยับยั้ง vascular endothelial growth factor (VEGF) ได้ก็ตาม แสดงว่าฤทธิ์ของเคอร์คูมินเป็น “dose dependent manner”

ในการจัดการทดลองที่คล้ายกันแต่มีการฝัง (implant) แผ่นเจลาคตินดัดแปลงบริเวณก้อนมะเร็งแทนการให้กินทางปาก ผลการประมาณความหนาแน่นของหลอดเลือด 14 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง ด้วยการติดตามนับปริมาณหลอดเลือดที่เรืองแสงด้วยสาร FITC-dextran-250 ที่ฉีดเข้าไป (รูปที่ 3.9 และ ตารางที่ 3.2) พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่บรรจุเคอร์คูมิน (HepG2-cur) ภายใน 14 วันมีการเกิดหลอดเลือดใหม่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 กลุ่ม โดยกลุ่มในเนื้อเยื่อปกติ ไม่มีการเพาะก้อนมะเร็งบนผิวหนังหนู (control) มีปริมาณหลอดเลือดเกิดใหม่ประมาณ 32% หากมีการปลูกก้อนมะเร็ง และการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน มีหลอดเลือดเกิดขึ้นจำนวนประมาณ 69% เพื่อหาลู่เลียงเซลล์มะเร็งเหล่านี้ แสดงว่าแผ่นเจลาคตินดัดแปลงไม่มีความเป็นพิษต่ออาจสนับสนุนการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ กลุ่มที่มีการรักษาด้วยการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมิน พบว่าปริมาณหลอดเลือดลดลงเหลือประมาณ 21% ในเวลา 14 วัน หลังการตรวจโดยพยาธิแพทย์ยืนยันผลของการเกิดมะเร็ง เมื่อนำเลือดของหนูกลุ่ม HepG2-cur ไปวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมิน โดยใช้ HPLC ที่

เวลา 7 วันพบในปริมาณ 1678 นาโนโมล/ลิตรของพลาสมา แต่ไม่พบเคอร์คิวมินที่เวลา 14 วัน แสดงว่าระบบนำส่งมีการนำส่งเคอร์คิวมินแบบยั่งยืนจากแผ่นจริง แม้ในวันที่ 14 ปริมาณจะน้อยจนไม่สามารถตรวจพบได้

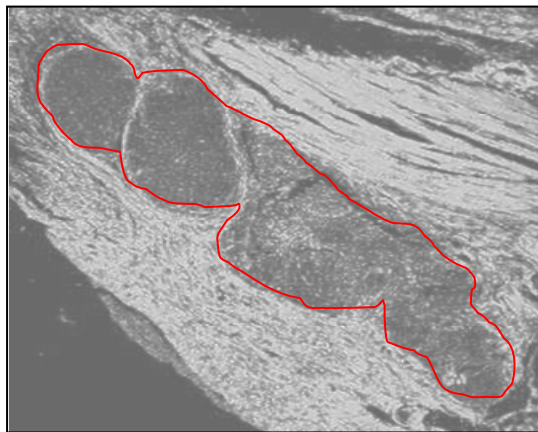
control	HepG2	HepG2-cur
		
Percentage of Capillaries Density		
32.18±3.37%	68.69±0.9%*	20.73±1.9%**

รูปที่ 3.9: ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์แสดงการเกิดหลอดเลือดใหม่ ในแต่ละกลุ่มในวันที่ 14 หลังการปลูกเซลล์มะเร็ง และผลการวิเคราะห์ปริมาณหลอดเลือดด้วยโปรแกรม Global Lab II แล้วคำนวณหา Percentage of Capillaries Density กลุ่มการทดลอง Control: ไม่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HepG2: หนูหนูได้ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง แต่ได้รับการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ไม่มีเคอร์คิวมิน และกลุ่มHepG2-Cur: มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง และได้รับการฝังแผ่นแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่มีเคอร์คิวมินปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น (* $p < 0.001$ เทียบกับ to control, ** $p < 0.001$ เทียบกับ HepG-2)

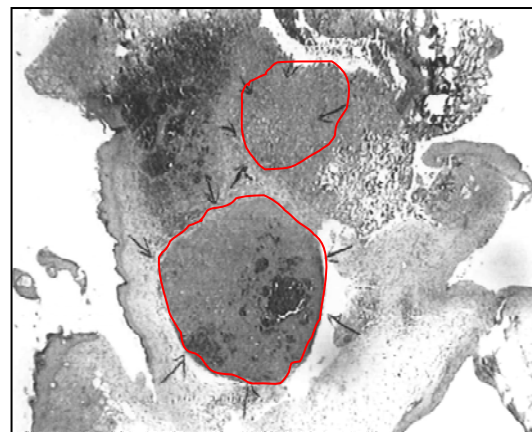
ผลการย้อมชิ้นเนื้อของแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ขนาดของก้อนมะเร็ง โดยใช้โปรแกรม Image Pro-Plus ได้ผลในเชิงคุณภาพเนื่องจากก้อนมะเร็งมีรูปร่างที่ไม่เป็นรูปทรง แต่ก้อนมะเร็งย้อมติดสีม่วงของ Hematoxylin เข้มมากกว่าส่วนของผิวหนัง จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างก้อนมะเร็งและส่วนของผิวหนังได้ การวิเคราะห์หาพื้นที่เฉลี่ยของก้อนมะเร็งเทียบแต่ละก้อน พบว่ามะเร็งมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 3.10) ก้อนที่มีการรักษาด้วยแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คิวมิน (HepG2-cur) มีขนาดเฉลี่ย $0.807 \pm 0.099 \text{ มม}^2$ ซึ่งเล็กกว่าก้อนที่มีการรักษาด้วยแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ดูดซับบัพเฟอร์ (HepG2, มีขนาดเฉลี่ย $3.018 \pm 1.531 \text{ มม}^2$) ประมาณ 3 เท่า แต่จากการใช้แผ่นเคอร์คิวมินดัดแปลงพบว่าการเกิดหลอดเลือดใหม่ถูกยับยั้งไปประมาณ 47 % ในการใช้งานครั้งเดียว (ระยะเวลา 14 วัน)

ตารางที่ 3.2 ปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมา (วิเคราะห์โดย HPLC) หลังจากการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลงใต้แผ่นหลังของ BALBcA mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลาต่างๆ

วัน ที่ เ กิ ๒ พลาสมา	ปริมาณ เคอร์คูมินที่พบในพลาสมา (ไมโครกรัม)											
	กลุ่มควบคุม				ใช้เคอร์คูมิน 100 ไมโครกรัม				ใช้เคอร์คูมิน 400 ไมโครกรัม			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
วันที่ 3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.04	ไม่พบ	ไม่พบ	0.01 ± 0.02	ไม่พบ	0.06	0.08	0.05 ± 0.04
วันที่ 6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.07	0.03	0.04	0.04 ± 0.02	0.28	0.08	ไม่พบ	0.12 ± 0.14
วันที่ 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.04	0.005	0.02	0.02 ± 0.01	0.14	0.05	0.03	0.07 ± 0.06
วันที่ 14	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.04	0.11	ไม่พบ	0.05 ± 0.06



ก) HepG2 (area 3.018 ± 1.531 มม²)



ข) HepG2-cur (area 0.807 ± 0.099 มม²)

รูปที่ 3.10: ภาพชิ้นเนื้อที่ปลูกเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 14 วัน ก) มีการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ดูดซับ Phosphate buffer saline ข) มีการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ดูดซับเคอร์คูมินหลังปลูกเซลล์มะเร็ง ภาพแสดงผลของกลุ่มการทดลอง HepG2: หนูหนูที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง แต่ได้รับการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่ไม่มีเคอร์คูมิน และกลุ่มHepG2-Cur: มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง และได้รับการฝังแผ่นแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่มีเคอร์คูมินปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กรัม แผ่น

บทที่ 4 บทสรุป

4.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาและพัฒนากระบวนการนำส่งยาแบบไม่ละลายน้ำ จากเจลาตินที่เป็นโปรตีนละลายน้ำที่ใช้ทั่วไปในงานด้านเภสัชกรรม มาดัดแปลงโครงสร้างโดยการเชื่อมพันธะกับโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของร่างกายคือ คอเลสเทอรอล โดยใช้เคอร์คูมิน (curcumin, diferuloyl methane) หรือที่รู้จักกันดีในนามสารสกัดบริสุทธิ์จากขมิ้นชันเป็นยาต้นแบบ ซึ่งมีผลการวิจัยว่ามีฤทธิ์บำบัดมะเร็งคือเป็น anti-angiogenesis สามารถยับยั้งการเจริญของหลอดเลือดใหม่ที่มะเร็งตับ (Human Hepatoma American Type; HepG-2) ที่ปลูกในหนูชนิดไม่สืบพันธุ์ไม่สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ได้ โดยการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ ที่ขนาดการรักษาคือ 3,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วัน ขนาดของยานี้ยากที่จะนำมาใช้จริงได้เนื่องจากสูงมาก และอาจมีความเสี่ยงต่อการเกิดพิษต่อตับ การพัฒนาระบบนำส่งตรงไปยังเนื้อเยื่อจึงเกิดขึ้น โดยมีการออกแบบให้เป็นแผ่น hydrogel ที่ดูดซับเคอร์คูมินด้วยปฏิกิริยาจำเพาะ เพื่อป้องกันการแพร่ตามปกติของยาในร่างกาย และเพื่อควบคุมกลไกการปลดปล่อยยาให้เป็นแบบยั่งยืน (sustained release) ตามอัตราการย่อยสลายของแผ่น hydrogel นี้

หลักฐานจากการตรวจโครงสร้างของเจลาตินที่ผ่านการดัดแปลงด้วย FT-IR, การลดลงของหมู่ $-NH_2$ อิสระในโครงสร้างของเจลาติน (น้ำหนักโมเลกุล 99,000 Da) และค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินดัดแปลง แสดงให้เห็นว่าการดัดแปลงเจลาตินด้วยคอเลสเทอรอลประสบความสำเร็จ โดยหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินถูกเชื่อมโยงพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิลของคอเลสเทอรอล ส่งผลให้เจลาตินมีความไม่ชอบน้ำมากขึ้นตามลำดับเมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเทอรอล โดยในสภาวะที่ใช้ดัดแปลงสามารถเพิ่มหมู่คอเลสเทอรอลได้สูงสุดร้อยละ 41 ของปริมาณ $-NH_2$ ที่จะดัดแปลงได้ทั้งหมด เจลาตินดัดแปลงถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง (freeze-drying) แล้วทำการเชื่อมขวาง (crosslink) ด้วยสารละลาย glutaraldehyde (GA) เพื่อชะลอการย่อยสลายในร่างกาย ระดับการเชื่อมโยงขวางเจลาตินดัดแปลงลดลงตามลำดับเมื่อเจลาตินมีการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอเลสเทอรอลปริมาณมากขึ้น ส่งผลต่อการย่อยสลายของแผ่นเจลาตินดัดแปลง คืออุณหภูมิในการเสถียรภาพของแผ่นเจลาตินดัดแปลงลดลง และอัตราการย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์สูงขึ้น

การทดสอบเกิดพันธะ hydrophobic ระหว่างเคอร์คูมินกับแผ่นเจลาตินดัดแปลงทำให้สารละลายเคอร์คูมินที่โดนดูดซับบนแผ่นเจลาตินดัดแปลงไม่แพร่ออกมาจากแผ่นเจลาตินในสารละลาย PBS buffer (ที่มีส่วนผสมของ 0.01% Tween 80) ดังนั้นระบบดังกล่าวนี้จึงมีศักยภาพที่จะใช้ในการปลดปล่อยเคอร์คูมินในร่างกาย เนื่องจากสามารถส่งผ่านเคอร์คูมินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน และมีกลไกการส่งผ่านรูปแบบผสมผสานโดยในระยะแรกจะเป็นการแพร่ออกอย่างรวดเร็ว (first burst) จากเคอร์คูมินที่เกินพอที่จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับแผ่นเจลาติน

ดัดแปลง และในระยะต่อไปการส่งผ่านเคอร์คูมินจะเป็นไปตามการสลายตัวของแผ่นเจลาคตินในร่างกาย ซึ่งสามารถที่จะดัดแปลงได้โดยการปรับเปลี่ยนระดับการเชื่อมขวางแผ่นเจลาคตินดัดแปลงก่อนนำไปทดลองใช้จริงในสัตว์ทดลองได้มีการนำแผ่นเจลาคตินไปทดสอบความเป็นพิษโดยการเลี้ยงเซลล์ L929 mouse fibroblast เป็นเวลา 3 วัน ตามมาตรฐาน ISO10993 (2003) เพื่อทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนแผ่นเจลาคตินดัดแปลง พบว่าปริมาณเซลล์ในแผ่นเจลาคตินทุกแบบที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเตอรอลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณเซลล์ที่เลี้ยงบนแผ่นเจลาคตินที่ไม่มีการดัดแปลงโครงสร้าง ดังนั้นการดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเตอรอลจึงไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์

แผ่นเจลาคตินที่ดัดแปลงโครงสร้างด้วยคอลเลสเตอรอลสามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินแบบยั่งยืนได้ โดยในการทดสอบใช้แผ่นเจลาคตินดัดแปลง ชนิด GC66 (ใช้คอลเลสเตอรอลดัดแปลงปริมาณ 66% โดยโมล) ที่ดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 100 และ 400 ไมโครกรัม แล้วฝัง (implant) ได้ผิวหนังหนู (nude mice, BALB-c, เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์, น้ำหนักตัว 20-25 กรัม) พบว่าในช่วง 3 วันแรกมีการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแผ่นเจลาคตินดัดแปลงน้อยแสดงถึงปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างโมเลกุลของเคอร์คูมินกับแผ่น GC66 การแพร่ของยาออกมาจึงต่ำ การปลดปล่อยเคอร์คูมินเพิ่มสูงขึ้นจนถึงจุดสูงสุดที่ 6 วัน และมีการปลดปล่อยออกมาเรื่อยๆ แสดงถึงการย่อยสลายของแผ่น GC66 ที่มากขึ้นตามเวลา โดยตลอดเวลาที่วิเคราะห์พบเคอร์คูมินในเลือดที่ร่างกายจะนำไปใช้งานได้น้อย 14 วัน จากรายงานการใช้เคอร์คูมินด้วยการกิน ขนาด 3,000 มก./กก.น.น.ตัว ในหนูหนักประมาณ 30 กรัม พบเคอร์คูมินที่ดูดซึมเข้าไปในพลาสมาเพียงประมาณ 0.00027 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรพลาสมา (www.bioperin.com/BioWithCur.htm) และถ้าหนูได้รับ 14 วันโดยสมมติว่ามีการขับออกน้อยมาก ดังนั้นเคอร์คูมินทั้งหมดที่ควรจะมีอยู่ในพลาสมาคือ $14 \times 0.00027 = 0.0038$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตรพลาสมา เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณ curcumin ที่สามารถบรรจุในแผ่น GC66 ที่ใส่ให้หนูหนึ่งตัวและสลายหมดในระยะเวลา 14 วัน จะเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัม หรือเท่ากับ $(0.01/0.0038) 2.63$ เท่าของการดูดซึมจากลำไส้ ในขณะที่ผลการทดลองจริงประมาณค่าเคอร์คูมิน ที่นำมาใช้ได้ในการแสเลือดที่ปล่อยจากแผ่น GC66 ที่ดูดซับ curcumin 100 ไมโครกรัม ได้ทั้งหมด 589 นาโนโมล/ลิตรพลาสมา หรือคิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อวันเท่ากับ 15.481 ไมโครกรัม/ลิตร (MW ของเคอร์คูมิน เท่ากับ 368) หรือ 0.0155 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรพลาสมา ซึ่งสูงกว่าการกินถึง 57.33 เท่า โดยประโยชน์อื่นที่จะได้คือการหลีกเลี่ยงการทำงานของระบบกำจัดเคอร์คูมิน โดยเฉพาะที่ตับ

เคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากแผ่นเคอร์คูมินดัดแปลงที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับในเวลา 14 วันได้ โดยการเกิดหลอดเลือดใหม่ถูกยับยั้งไปถึง ประมาณ 47 % โดยใช้ปริมาณเคอร์คูมินน้อยกว่าการกินถึงกว่า 80 เท่าและมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้แผ่นเจลาคตินดัดแปลงดูดซับเคอร์คูมินในการบำบัดมะเร็งตับชนิด HepG-2 ให้ผลดีกว่าการใช้กินเคอร์คูมินโดยตรง

งานวิจัยนี้มีการพัฒนาต้นแบบระบบนำส่งสารสำคัญที่ไม่ละลายน้ำ โดยใช้สารสกัดสมุนไพรเป็นต้นแบบ ยังสามารถขยายผลไปในการใช้งานกับยาชนิดอื่นๆได้อีกมาก คอเลสเทอรอลที่ใช้งานในงานวิจัยนี้ถือว่าเป็นปริมาณไม่มากที่จะทำให้เกิดพิษหรือการสะสมจำนวนมากในร่างกาย นอกจากนั้นยังมีการทดสอบความปลอดภัยในการใช้งาน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งเบื้องต้น อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ระบบนำส่งมีความพร้อมในการใช้งานจริงควรจะต้องมีการทดสอบในด้านต่างๆอีก

4.2 ข้อเสนอแนะในการต่อยอดการวิจัยในอนาคต

เพื่อให้ระบบนำส่งมีความพร้อมในการใช้งานจริงควรจะต้องมีการทดสอบในด้านต่างๆ ดังนี้

- ก) การหาขนาด (dose) ที่ต้องใช้ของยา (เคอร์คูมิน) ในการรักษามะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพที่ได้ผลโดยไม่ใช้วิธีการกิน เนื่องจากยังไม่มีรายงานการวิจัยมาก่อน อาจทำได้ในสัตว์ทดลองคล้ายกับหัวข้อ 2.7
- ข) การปรับปรุงลักษณะของระบบนำส่งเป็นรูปแบบที่ใช้งานได้สะดวก เช่น ขึ้นรูปเป็น microspheres แล้วทดสอบลักษณะสมบัติต่างๆเปรียบเทียบกับกรขึ้นรูปเป็นแผ่นเจลลาติน
- ค) การเชื่อมขวางแผ่นเจลลาตินดัดแปลงด้วยสารเคมี glutaraldehyde อาจจะใช้วิธีอื่นได้ด้วยเช่น ด้วย carbodiimine หรือใช้เอ็นไซม์ transglutaminase เพื่อลดความเป็นพิษจาก aldehyde ที่อาจเกิดขึ้นได้ แม้ว่าในการทดสอบจะไม่พบความเป็นพิษของแผ่นเจลลาตินดัดแปลง
- ง) หากต้องการปรับปรุงระยะเวลาในการใช้งานให้นานขึ้น ควรทำการดัดแปลงโครงสร้างของเจลลาตินโดยใช้โพลิเมอร์ ตัวอื่นมาช่วย เช่น เพื่อเพิ่มหมู่ $-NH_2$ ในการเชื่อมขวาง เพื่อแก้ไขปัญหาการย่อยสลายที่รวดเร็วหลังการดัดแปลงโครงสร้าง
- จ) การทดสอบในเซลล์มะเร็งและก้อนมะเร็ง ชนิดอื่นๆ ว่าให้ผลแตกต่างหรือเหมือนกันอย่างไร
- ฉ) ตัวอย่างเจลลาตินที่มีการดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลปริมาณสูง เช่น G100 และ G125 ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอาจจะเหมาะสมที่จะนำมาผลิตแผ่นเจลลาตินดัดแปลง เพราะอัตราการย่อยสลายสูงมาก อาจจะนำมาปรับรูปแบบให้นำส่งยาไม่ละลายน้ำในรูป micelles ได้ เนื่องจากมีทั้งส่วน hydrophilic และ hydrophobic ในโครงสร้างเดียวกัน

4.3 ผลที่ได้จากโครงการวิจัย (Outputs)

ก) ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ผลโดยตรงคือผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ควบคุมการปล่อยสารกลุ่ม curcuminoids ระเบียบวิธีการผลิต และข้อมูลการทดลองที่มีประโยชน์ต่อการทดลองในสัตว์ใหญ่ หรือในระดับคลินิก สำหรับบำบัดโรคมะเร็งตับต่อไป

ผลโดยอ้อมคือได้วิธีการนำเทคโนโลยีทางวิศวกรรมเคมีมาใช้ในการพัฒนาสมุนไพรไทยที่ใช้ในการรักษาโรค ที่เดิมอาจติดปัญหาในเรื่องของการที่ต้องรับประทานสมุนไพรปริมาณมากจึงจะได้ผลในการรักษา เป็นการช่วยส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยอย่างมีประสิทธิภาพ

ข) การเสนอผลงานประชุมวิชาการระดับชาติ-นานาชาติ (ดูเอกสารแนบในภาคผนวก)

-Marisa Wareechuensook¹, Yasuhiko Tabata², and Sorada Kanokpanont¹, Fabrication cholesterol grafted gelatin micelles for curcumin delivery, 1st NanoThailand Symposium (NTS) 2008 (Oral presentation), November 6-8, 2008, Bangkok, Thailand

-Kanokpanont, S*, Rujisomnana, J., Prathumraj, S., Tabata,Y., and Tanthapanichakoon, W., Sustained Releases of Curcumin from Modified Gelatin Hydrogels: *In vivo* study, 1st Asian Biomaterials Congress (Poster Presentation), December 6-8, 2007, Tsukuba, Japan

- Rujisomnana, J. , Tabata,Y., and Kanokpanont, S*, Modification of gelatin with cholesterol For delivery of curcumin, Poster Presentation Awarded, 6th Asian Bioceramics Conference, Central Sofitel Bangkok, 8-11 November 2006

-จุฑามาส รุจิสมนนา, Yasuhiko Tabata, และโสครดา กนกพานนท์ การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคลอเลสเตอรอลเพื่อนำส่งเคอร์คูมิน, การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์แห่งชาติ ครั้งที่ 5, กรุงเทพฯ, 8 กค 2550, หน้า 157-161

-ณัฏฐ์ชญา วงศ์เอกอินทร์, จุฑามาส รุจิสมนนา, โสครดา กนกพานนท์ และ สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, ผลของการควบคุมการปลดปล่อยสารเคอร์คูมินจากเจลาตินไฮโดรเจลต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจีทู, การประชุมวิชาการวิศวกรรมชีวการแพทย์แห่งชาติ ครั้งที่ 5, กรุงเทพฯ, 8 กค 2550, หน้า 214-216

ค) การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ในการเรียนการสอน การให้ความรู้แก่สาธารณะชน

- วิทยากร งานประชุมวิชาการระดับชาติ ในโครงการประชุมวิชาการ เรื่อง จับกระแส : การรักษาและยาใหม่ 3 Natural Sources & Active Compound Discovery จัดทำโดย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) วันที่ 24-25 เมษายน 2551 ณ ห้องกิ่งเพชร โรงแรมเอเชีย กรุงเทพมหานคร
- ใช้ประกอบการเรียนการสอนวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา 2105641 BIODEGRADABLE MATERIAL ENGINEERING ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยปีการศึกษา 2551
- การให้ความรู้แก่สาธารณะชนในรายการโทรทัศน์ หัวข้อ “จุฬาพัฒนารักษามะเร็งตับ” รายการข่าวกรุง วันจันทร์ที่ 27 ตุลาคม 2551 ช่องเนชั่นทีวี 1

ง) การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆ ทั้งในต่างประเทศ

- ผู้ร่วมวิจัยและร่วมทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากแผ่นเคอร์คูมินดัดแปลง คือ รศ. ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ความร่วมมือในการทำวิจัย โดย Prof. Yasuhiko Tabata, The Institute for Frontier Medical Sciences, Field of Tissue Engineering, Department of Material Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan ด้านการออกแบบและพัฒนาระบบนำส่ง

จ) การผลิตบัณฑิตและนักวิจัยที่มีความรู้ในสหสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

- นางสาวจุฑามาศ รุจิสมนภา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2550 หัวข้อวิทยานิพนธ์ “การดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินด้วยคอเลสเตอรอลเพื่อการนำส่ง เคอร์คูมิน”
- นางสาวมาริสา วาริชีนสุข กำลังศึกษาชั้นปริญญาโท วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คาดว่าจะจบการศึกษา ปี 2552 หัวข้อวิทยานิพนธ์ “ไมเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินดัดแปลงด้วยคอเลสเตอรอลสำหรับการนำส่งเคอร์คูมิน”

ฉ) การจดสิทธิบัตรในประเทศ และผลงานตีพิมพ์

- อยู่ในระหว่างแก้ไขร่างคำขอจดสิทธิบัตรในประเทศ ยื่นผ่านสำนักงานจัดการทรัพย์สินทางปัญญา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ดูร่างคำขอจดสิทธิบัตรในประเทศ ในภาคผนวก)
- จัดร่างบทความตีพิมพ์นานาชาติแล้วได้แก่

-Modification of gelatin with cholesterol: A delivery system for sustained release of curcumin *in vivo*. เพื่อส่งให้พิจารณาในวารสาร Biomaterials

-The effects of curcumin released from modified gelatin hydrogel on HepG-2 solid tumors in nude mice. เพื่อส่งให้พิจารณาในวารสาร

Journal of controlled release

(ทั้งนี้เมื่อได้รับการตอบรับจะแจ้งให้ทราบต่อไป)

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ สาริสุต, การผลิตยาออกฤทธิ์เน้นและระบบนำส่งยาแบบต่างๆ, ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2535
- ปรีชา บุญจุง และคณะ, การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในแคปซูลขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร โดยใช้โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง, 2549
- สุพงษ์ เอกศิริพงษ์, ชีวเภสัชศาสตร์, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, 2547
- Ahmed S. and others, Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells, *International Journal of Toxicology* 25: 17-23, 2006
- Anant P. and others, Characterization of curcumin-PVC solid dispersion obtained by spray drying, *Journal of Pharmaceutics* 271: 281-286, 2004.
- Ansari M.J. and others, Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39: 132–138, 2005.
- Asai A. and Miyazawa, T., Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma, *Life Sciences* 67: 2785-2793, 2000.
- Busquets S. and others, Curcumin, a natural product present in turmeric, decreases tumor growth but does not behave as an anticachectic compound in a rat model, *Cancer Letters* 16: 33-38, 2001.
- Einerson N.J. and others, Synthesis and physicochemical analysis of gelatin-based hydrogels for drug carrier matrices, *Biomaterials* 24: 509–523, 2002.
- Ferrara N. and others, Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene, *Nature* 380: 439-442, 1996.
- Habeeb AFSA, Determination of free amino group in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid, *Analytical Biochemistry* 14: 328-336, 1966.
- Health D. D. and others, Curcumin in plasma and urine: Quantitation by high performance liquid chromatography, *J. Chromatography B* 783: 287-295, 2003.
- Hermanson G T., Bioconjugate Techniques : Academic Press ISBN 0-12-342336-8, p.156
- Hiserodt R. and Rosen R. T., Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 740: 51-63, 1996.

- Huang J. and Feigenson G.W., A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers, *J. Biophys* 76: 2142-2157, 1999.
- Ishita C. and others, Curcumin: Biological actions and medicinal applications, *Current Science* 87, 2004.
- Kelloff G.J., and others, Progress in clinical chemoprevention, *Semin.Oncol.* 24: 241-252, 1997.
- Lee S. B and others, Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method, *Biomaterials* 26: 961-1968, 2005.
- Lee, C.R. and others, *Biomaterials* 22: 3145 -3154, 2001.
- Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
- Myung C.C. and Tanaka J., FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde, *Biomaterials* 23: 4811–4818, 2002.
- Ozaki M. and Tabata Y., In vivo degradability of hydrogel prepared from different gelatins by various cross-linking methods, *J. Biomater. Sci. Polymer* 16(5): 549-561, 2005.
- Pan M.S., and others, Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice, *Drug Metabolism and Disposition* 27, 1998.
- Sharma R.A., GesCher, A.J. and Steward, W.P. curcumin:The story so far, *European Journal of Cancer* 41: 1955-1968, 2005.
- Tabata Y. and Ikada Y., Protein releases from gelatin matrix, *Advanced Drug Delivery Reviews* 31: 287-301, 1998.
- Tooru O. and others, Self-assembly of cholesterol-hydrotropic dendrimer conjugates into micelle-like structure: Preparation and hydrotropic solubilization of paclitaxel, *Science and Technology of Advanced Materials* 6: 452–456, 2005.
- Wang Y.J., and others, Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15-12: 1867–1876, 1997.
- Yoyungnoen P. and others, Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX 2 and VEGF in Hep G2 implanted in nude mice model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 33: 127-136, 2005.