



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์ pullulan-cyclodextrin เพื่อ stabilize อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เพื่อใช้เป็นตัวนำส่งยารักษาโรคมะเร็ง
Synthesis of pullulan-cyclodextrin stabilized gold nanoparticles for cancer targeted drug delivery

ชื่อนิสิต นางสาวรณพร นันทสิทธิ์โชค

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์ pullulan-cyclodextrin เพื่อ stabilize
อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เพื่อใช้เป็นตัวนำส่งยาโรคมะเร็ง
Synthesis of pullulan-cyclodextrin stabilized gold nanoparticles
for cancer targeted drug delivery

โดย
นางสาวธนพร นันทสิทธิ์โชค

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560

โครงการ การสังเคราะห์ pullulan-cyclodextrin เพื่อ stabilize อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เพื่อ
ใช้เป็นตัวนำส่งยารักษาโรคมะเร็ง
โดย นางสาวธนพร นันทสิทธิ์โชค

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... *ธวัชชัย ตันตุลานี* ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ตันตุลานี)

..... *นงนุช เหมืองสิน* อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน)

..... *ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์* อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์)

..... *อรรณพ ชัยลภากุล* กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. อรรณพ ชัยลภากุล)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์ pullulan-cyclodextrin เพื่อ stabilize อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เพื่อใช้เป็นตัวนำส่งยารักษาโรคมะเร็ง

ชื่อนิติในโครงการ นางสาวธนพร นันทสิทธิ์โชค เลขประจำตัว 5733096823

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมเมืองสิน

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

ยาดีออกซิรูบิซิน (DOXORUBICIN) เป็นยารักษาโรคมะเร็งที่มีจัดจำหน่ายและมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดี จึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ก็ส่งผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสังเคราะห์ตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งทั้งพุลลูแลนและเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน เป็นพอลิเมอร์ที่ไม่เป็นพิษ เข้ากับเนื้อเยื่อได้ดี และทำปฏิกิริยาเคมีได้ง่าย อีกทั้ง เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน มีคุณสมบัติเป็นสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชัน ที่สามารถเก็บยาไว้ในโพรงได้ จึงปกป้องยาดีออกซิรูบิซินจากสภาพแวดล้อมภายนอก ไม่ทำให้ยาเกิดการสลายตัวก่อนที่จะเข้าสู่ตัวแทนเป้าหมาย และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีคุณสมบัติที่เด่นหลายอย่าง เช่น ควบคุมขนาดในการสังเคราะห์ได้ ไม่เป็นพิษ เข้ากับเนื้อเยื่อได้ดี เสถียร และสามารถพายาดีออกซิรูบิซิน เข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ด้วยวิธี EPR effect ซึ่งอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR, ¹H NMR, TGA, Mass spectrometry, UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, TEM และได้นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) และเซลล์ปกติที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L929) เทียบกับยาดีออกซิรูบิซิน พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซินมีประสิทธิภาพดีกว่าใช้ยาดีออกซิรูบิซินเพียงอย่างเดียว ดังนั้นอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน จึงมีคุณสมบัติเป็นตัวนำส่งยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งที่ดี

คำสำคัญ: ตัวนำส่งยา, อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร, pullulan, β -cyclodextrin, DOXORUBICIN

Project Title Synthesis of pullulan-cyclodextrin stabilized gold nanoparticles for cancer targeted drug delivery

Student Name Miss Tanaporn Nuntasitthichok Student ID 5733096823

Advisor Name Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.

Co-advisor Name Associate Professor Narong Praphairaksit, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

DOXORUBICIN is an effective and widely used medicine as a chemotherapeutic agent for cancers but it also has some severe side effects to patients. To solve this problem, a drug delivery scheme should be implemented. Therefore, this study demonstrated a facile and efficient approach to the synthesis of a drug delivery system, pullulan- β -cyclodextrin stabilized gold nanoparticles by using “green solvent” water. Pullulan and β -cyclodextrin were chosen because they were nontoxic, biocompatible, easily modified and β -cyclodextrin was reportedly an inclusion complex which can keep DOXORUBICIN in its ‘host cavity’ to protect the drug from hostile environment and minimize the degradation of medicine. Gold nanoparticles offer several advantages as they are easy to control the size, non-toxic, biocompatible, stable and they can deliver DOXORUBICIN by EPR effect. The drug carrier was characterized by FTIR, ^1H NMR, TGA, Mass spectrometry, UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy and TEM analysis. The resulting drug exhibited improved cytotoxic activities against KATO-III, SW-620 cancer cells and L929 normal cells as compared to using pure DOXO. Thus, AuNPs@P- β -cyD has the potential applications in targeted chemotherapy for the treatment of cancers.

Keywords: drug delivery, gold nanoparticle, pullulan, β -cyclodextrin, DOXORUBICIN

กิตติกรรมประกาศ

ในโครงการวิจัยครั้งนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน และรองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆตลอดเวลาที่ทำการวิจัย ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ตันทุลานี และ ศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล ที่กรุณาสละเวลาให้เกียรติเป็นกรรมการในโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ในการเรียนและการทำงานด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของฝ่ายวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาเคมีที่ได้สนับสนุนและให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณความช่วยเหลือและกำลังใจที่มาจากครอบครัวของผู้ทำการวิจัย รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ในภาควิชาเคมีทุกคนและขอบคุณที่สนับสนุนปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ให้ความรู้ต่างๆ ผู้วิจัยขอระลึกในความกรุณาช่วยเหลือและห่วงใยเสมอมาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้นและบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	4
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	6
1.4.1 Localized surface plasmon resonance	6
1.4.2 วิธีการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์มะเร็ง	7
1.4.2.1 Passive tumor targeting	7
1.4.2.2 Active tumor targeting	8
1.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT Assay	8
1.4.4 ยาดีออกโซรูบิซิน	9
บทที่ 2 การทดลอง	11
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์	11
2.2 รายการสารเคมี	11
2.3 วิธีการทดลอง	12
2.3.1 วิธีการสังเคราะห์พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	12
2.3.1.1 วิธีที่1 ตัวทำละลายเป็นน้ำปราศจากไอออน (DI Water)	13
2.3.1.1.1 ปฏิกิริยาโทซิลเลชั่นของการสังเคราะห์โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	13
2.3.1.1.2 การสังเคราะห์พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	14
2.3.1.2 วิธีที่2 ตัวทำละลายเป็นไดเมทิลอะเซตาไมด์ (DMAc)	14
2.3.1.2.1 ปฏิกิริยาโทซิลเลชั่นของการสังเคราะห์โทซิล-พอลลูแลน	15
2.3.1.2.2 การสังเคราะห์พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	15
2.3.2 วิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	16
2.3.3 การพิสูจน์หาปริมาณยาดีออกโซรูบิซินที่เข้าไปอยู่ในตัวนำส่งยา	16

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	
2.3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)	16
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	18
3.1 การสังเคราะห์พอลลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	18
3.1.1 วิธีที่ 1 ตัวทำละลายเป็นน้ำปราศจากไอออน	18
3.1.1.1 ปฏิกริยาโทซิลเลชันของการสังเคราะห์โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	18
3.1.1.1.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค FTIR	19
3.1.1.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค ¹ H NMR	19
3.1.1.1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค Mass spectrometry	20
3.1.1.2 การสังเคราะห์พอลลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	21
3.1.1.2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค FTIR	21
3.1.1.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค TGA	22
3.1.2 วิธีที่ 2 ตัวทำละลายเป็นไดเมทิลอะเซตาไมด์ (DMAc)	23
3.1.2.1 ปฏิกริยาโทซิลเลชันของการสังเคราะห์โทซิล-พอลลูลูแลน	23
3.1.2.1.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค FTIR	24
3.1.2.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค ¹ H NMR	25
3.1.2.2 การสังเคราะห์พอลลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	25
3.1.2.2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค FTIR	26
3.1.2.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค TGA	27
3.2 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	28
3.2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy	29
3.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM)	32
3.2.4 การพิสูจน์หาปริมาณยาดีออกไซรูบิซินที่อยู่ในตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (% Drug loading)	34
3.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)	36
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	43
กราฟ ¹ H NMR ของพอลลูลูแลน	43
กราฟ ¹ H NMR ของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	43
กราฟ ¹ H NMR ของพี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์	44

รูปที่ ข-1 กราฟ IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาตีออคไซรูบิซิน และยาตีออคไซรูบิซิน 44

รูปที่ ข-2 กราฟ IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาตีออคไซรูบิซิน และยาตีออคไซรูบิซิน 45

รูปที่ ข-3 กราฟ IC₅₀ ของเซลล์ปกติที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาตีออคไซรูบิซิน และยาตีออคไซรูบิซิน 45

ประวัติผู้วิจัย

46



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงค่าการสลายตัวในช่วงอุณหภูมิต่างๆของสารทั้ง 3 ชนิด	22
ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงค่าการสลายตัวในช่วงอุณหภูมิต่างๆและ Td ของสารทั้ง 3 ชนิด	27
ตารางที่ 3.3 ตารางแสดงขนาดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีการดูกลืนที่ความยาวคลื่นต่างๆ	29
ตารางที่ 3.4 ตารางแสดงค่า Absorbance ของสารในช่วงความเข้มข้น 0.25-5% w/v	31
ตารางที่ 3.5 ตารางแสดงค่า IC ₅₀ ของยาดีออกโซรูบิซิน และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วย พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซินของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด	37



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 รูปโครงสร้างพอลลูแลน	2
รูปที่ 1.2 รูปโครงสร้างแอลฟา, เบต้า, แกรมม่าไซโคลเดกซ์ตริน	3
รูปที่ 1.3 ภาพแสดงการเกิด surface plasmon resonance โดยแสดงการสั่นของกลุ่มอิเล็กตรอนในแถบ เหนี่ยวนำ เมื่อมีแสงจากภายนอกส่องผ่าน	6
รูปที่ 1.4 ค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนของทองที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางต่างกัน	7
รูปที่ 1.5 รูปแสดงผลของ EPR Effect ของเซลล์มะเร็ง	7
รูปที่ 1.6 รูปแสดงการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์มะเร็งแบบ Active tumor targeting	8
รูปที่ 1.7 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay	9
รูปที่ 1.8 แสดงโครงสร้างของยาต่อคอโรบูซิน	9
รูปที่ 2.1 วิธีการสังเคราะห์พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินด้วยวิธีที่ 1 ตัวทำละลายเป็นน้ำปราศจาก ไอออน	13
รูปที่ 2.2 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	13
รูปที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	14
รูปที่ 2.4 วิธีการสังเคราะห์พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	14
รูปที่ 2.5 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-พอลลูแลน	15
รูปที่ 2.6 วิธีการสังเคราะห์พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	15
รูปที่ 3.1 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	18
รูปที่ 3.2 Infrared spectrum ของโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	19
รูปที่ 3.3 ¹ H NMR Spectrum ของโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	20
รูปที่ 3.4 mass spectrum ของโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	21
รูปที่ 3.5 วิธีการสังเคราะห์พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	21
รูปที่ 3.6 Infrared spectrum ของพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	22
รูปที่ 3.7 Thermogram ของพอลลูแลน, พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	23
รูปที่ 3.8 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-พอลลูแลน	23
รูปที่ 3.9 สมการการเกิด deprotonate ของพอลลูแลนด้วยไตรเอทิลลามีน	24
รูปที่ 3.10 สมการการเกิดปฏิกิริยาแทนที่ของ พี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์	24
รูปที่ 3.11 Infrared spectrum ของโทซิล-พอลลูแลน	24
รูปที่ 3.12 ¹ H NMR spectrum ของโทซิล-พอลลูแลน	25
รูปที่ 3.13 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-พอลลูแลน	25
รูปที่ 3.14 Infrared spectrum ของพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	26
รูปที่ 3.15 Thermogram ของพอลลูแลน, พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	28

รูปที่ 3.16	รูปสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์ และสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้น 0.25 – 5% w/v	28
รูปที่ 3.17	รูปสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์ และสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้น 1% w/v	28
รูปที่ 3.18	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 0.25-5% w/v	30
รูปที่ 3.19	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์ และสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ที่มีความเข้มข้น พอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 0.25-5% w/v	30
รูปที่ 3.20	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า A_{520}/A_{650}	31
รูปที่ 3.21	รูปแสดง complementary color	32
รูปที่ 3.22	รูป TEM ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นของพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 3% v/w (สารละลายสีม่วง) ที่กำลังขยาย 40000x 120000x และ 300000x	33
รูปที่ 3.22	รูป TEM ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นของพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 3% v/w ที่กำลังขยาย 40000x 120000x และ 300000x	33
รูปที่ 3.23	รูป TEM ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นของพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 1% v/w ที่กำลังขยาย 40000x 120000x 300000x และ 600000x	33
รูปที่ 3.24	กราฟแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (The particle size distribution)	33
รูปที่ 3.25	รูป EDX spectrum ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นของพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 1% v/w (สารละลายสีแดง)	34
รูปที่ 3.26	กราฟ fluorescence ของสารละลายมาตรฐานยาดีออกโซรูบิซินที่มีความเข้มข้น 5-40 μ M	35
รูปที่ 3.27	กราฟ fluorescence ของสารละลายมาตรฐานยาดีออกโซรูบิซิน ที่ความเข้มข้น 500 μ M และ supernatant ของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน ที่มีความเข้มข้นยาดีออกโซรูบิซิน 500 μ M	35
รูปที่ 3.28	กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานยาดีออกโซรูบิซิน ที่ความเข้มข้น 5-40 μ M	35
รูปที่ 3.29	รูปแสดง 96 wells plate ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเมื่อทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน และยาดีออกโซรูบิซิน	36
รูปที่ 3.30	รูปแสดง 96 wells plate ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเมื่อทำปฏิกิริยากับ MTT	36

รูปที่ 3.31 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งลำไส้ และเซลล์ปกติกล้ามเนื้อหนู	38
รูปที่ ก-1 กราฟ ^1H NMR ของพุลลูแลน	44
รูปที่ ก-2 กราฟ ^1H NMR ของเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน	44
รูปที่ ก-3 กราฟ ^1H NMR ของ พี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์	45
รูปที่ ข-1 กราฟ IC_{50} ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน และยาดีออกโซรูบิซิน	45
รูปที่ ข-1 กราฟ IC_{50} ของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน และยาดีออกโซรูบิซิน	46
รูปที่ ข-1 กราฟ IC_{50} ของเซลล์ปกติที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหนูที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน และยาดีออกโซรูบิซิน	46



สัญลักษณ์และคำย่อ

ml	=	มิลลิลิตร
μ L	=	ไมโครลิตร
M	=	โมลาริตี หรือ โมลต่อลิตร
mM	=	มิลลิโมลาริตี หรือ มิลลิโมลต่อลิตร
kDa	=	กิโลดาลตัน
% w/v	=	ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร
nm	=	นาโนเมตร
rpm	=	อัตราเร็วรอบต่อนาที



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัจจุบันนี้ ได้มีสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปจากอดีตมาก ทำให้เกิดโรคร้ายใหม่ๆ ขึ้นมากตามไปด้วย ซึ่งหนึ่งในโรคร้ายที่คนในปัจจุบันเป็นมากนั้นคือ “โรคมะเร็ง” โรคมะเร็งเป็นหนึ่งในโรคร้ายที่ได้คร่าชีวิตคนไทยและคนทั่วโลกไปจำนวนมากซึ่ง WHO ได้รายงานไว้ในปี 2015 ประชากรในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกป่วยด้วยโรคมะเร็งถึง 3 ล้านคน และในจำนวนนี้มีถึง 2 ล้านคน ที่ต้องสังเวยชีวิตด้วยโรคร้ายนี้ ในปัจจุบันได้มีการใช้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapeutic agents) มาใช้รักษาโรคมะเร็ง เช่น ยาดีออกโซริบิซิน, ยาแพคลิแทกเซล และ ยาเมโทเทรกเซท เป็นต้น แม้ว่าตัวยาดังกล่าวได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration, the United States Federal Government (US FDA) แต่ตัวยาเหล่านี้ก็ส่งผลข้างเคียงที่เป็นปัญหาต่อผู้ป่วยอย่างรุนแรง เช่น มีอาการคลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วง ผื่นแดง มีภาวะซีด เซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงต่ำ ติดเชื้อหรือเกิดโรคแทรกซ้อนได้ง่าย และยาเคมีบำบัดไม่เพียงแต่ฆ่าเซลล์มะเร็ง หรือยับยั้งการเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในบริเวณอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย มันยังส่งผลข้างเคียงต่อเนื่องกันไปด้วย ทำลายเนื้อเยื่อปกติ จึงเกิดอันตรายต่อผู้ป่วยอย่างรุนแรง ดังนั้นจึงมีคณะนักวิจัยหลายๆท่านต้องการที่จะพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยที่มีผลกระทบต่อผู้ป่วยน้อยที่สุด และหนึ่งในวิธีนั้นก็คือ การใช้ระบบตัวนำส่งยา (Drug Delivery System) ไปยังตำแหน่งเป้าหมายโดยจะออกฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง

ระบบนำส่งยา (drug delivery system) คือ การเตรียมยาในรูปแบบต่างๆ ที่สามารถควบคุมให้ปลดปล่อยยาในอัตราและปริมาณที่กำหนด และสามารถนำยาไปยังอวัยวะ หรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ เพื่อทำให้เกิดผลสูงสุดในการรักษาและลดผลข้างเคียง ซึ่งพอลิเมอร์นับเป็นองค์ประกอบสำคัญอย่างหนึ่งในระบบนำส่งยาที่ช่วยควบคุมให้การปลดปล่อยยาเป็นไปตามต้องการ โดยทำหน้าที่ใน 3 ลักษณะใหญ่ๆ คือ ช่วยควบคุมการปลดปล่อยให้เกิดช้าๆ เป็นตัวช่วยป้องกันไม่ให้ยาถูกทำลาย และนำส่งยาไปยังบริเวณเป้าหมายในร่างกาย โดยไม่ทำให้ยาเกิดการปลดปล่อยหรือตัวยากลายไปก่อน ดังนั้นพอลิเมอร์ที่เลือกใช้ ต้องมีสมบัติทางชีวภาพสำคัญคือ มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatible) สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradable) และสามารถย่อยสลายในร่างกายได้เมทาโบไลต์จากการย่อยสลายที่ไปเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้ไม่เป็นพิษ

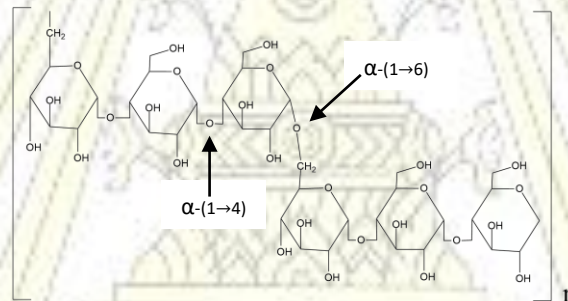
ในปัจจุบัน ระบบตัวนำส่งยานั้นได้รับความนิยมในการใช้รักษาโรคมะเร็งสูงมาก เพราะยาแบบดั้งเดิมที่ใช้รักษานั้นมีข้อจำกัดในเรื่องของประสิทธิภาพ มีการกระจายตัวยาที่ต่ำ (poor biodistribution) มีพิษต่อเซลล์ และยายังขาดความจำเพาะต่อเซลล์^[1] โดยระบบตัวนำส่งยาจะแก้ไขปัญหาดังกล่าว และใช้ปริมาณยาน้อยกว่าการรักษาแบบเคมีบำบัด ทำให้ลดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยด้วย อีกทั้งยังช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์^[2]

ซึ่งในปัจจุบันได้มีการวิจัยและพัฒนาตัวนำส่งยาในหลากหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็น polymeric micelles, dendrimers, liposome และ carbon nanotubes เป็นต้น^[3] แต่ตัวนำส่งยาระดับนาโนเมตร (Nanoparticle-based targeted drug delivery) เป็นตัวนำส่งยาที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เพราะสามารถควบคุมขนาดในการสังเคราะห์ได้ มีคุณสมบัติของพื้นที่ผิวที่เหมาะสมที่จะจับกับยา เพื่อให้ยาสามารถออกฤทธิ์รักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ^[3] และยังช่วยเพิ่มปริมาณยาที่ออกฤทธิ์ในกระแสเลือด (bioavailability) ของยาที่ไม่ละลายในร่างกาย และยังสามารถ

ปกป้องยาจากสิ่งกีดขวางทางสรีรวิทยา (physiological barrier) เช่น ระดับอุณหภูมิและ สภาวะกรดเบสต่างๆ ภายในร่างกาย เป็นต้น^[4] ระบบตัวนำส่งยาในระดับนาโนเมตร มักจะใช้โลหะมาเป็นวัสดุในการสังเคราะห์ เพราะช่วยเพิ่มขอบเขตในการรักษาของยา (therapeutic index of drugs) ผ่านพื้นที่ผิวที่เฉพาะเจาะจงกับยาตัวนั้น ป้องกันการดื้อยา และเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา^[5] ซึ่งโลหะที่นิยมนำมาใช้นั้นมีหลายชนิด เช่น Au, Ag, Se เป็นต้น แต่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้รับความนิยมมากที่สุด เพราะ เสถียร ไม่มีพิษ เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกายได้ดี (biocompatible) อีกทั้งมีคุณสมบัติเด่นในเรื่อง Localized surface plasmon resonance ที่ทำให้เกิดสีในอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และ EPR Effect (Enhanced permeability and retention effect) ที่เป็นวิธีนำพาสารเข้าสู่เซลล์มะเร็ง และเมื่อนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาเทียบกับ Polymeric Nanoparticle (micelles, vesicle) และ Liposome จะพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีขนาดที่เล็กกว่ามาก ทำให้มันสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ผนังหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งได้ ผ่าน EPR effect ได้ ในขณะที่ Polymeric Nanoparticle และ Liposome มีขนาดใหญ่กว่า ทำให้เข้าไปในผนังหลอดเลือดยากกว่า จึงมีประสิทธิภาพในการรักษาที่น้อยกว่า ดังนั้นอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจึงเป็นตัวนำส่งยาที่เหมาะสมที่จะใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง^[6]

ในการทดลองนี้จะทำการสังเคราะห์ ตัวนำส่งยารักษาโรคมะเร็ง โดยใช้พอลิเมอร์ 2 ชนิดมาดัดแปรลงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ซึ่งพอลิเมอร์ดังกล่าวก็คือพุลลูแลนและเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน

พุลลูแลน (pullulan) ผลิตจากยีสต์ *Aureobasidium pullulans* มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_{10}O_5$ และมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 45-600 kDa โดยจะมีโครงสร้างเป็นมอลโทไตรโอส (maltotriose) 3 ยูนิตซึ่งสร้างพันธะ α -(1 \rightarrow 4) ไกลโคซิดิกเชื่อมต่อกัน และแต่ละมอลโทไตรโอส 3 ยูนิตที่เชื่อมต่อกัน (consecutive maltotriose units) จะสร้างพันธะ α -(1 \rightarrow 6) ไกลโคซิดิกเชื่อมต่อกันดังรูป

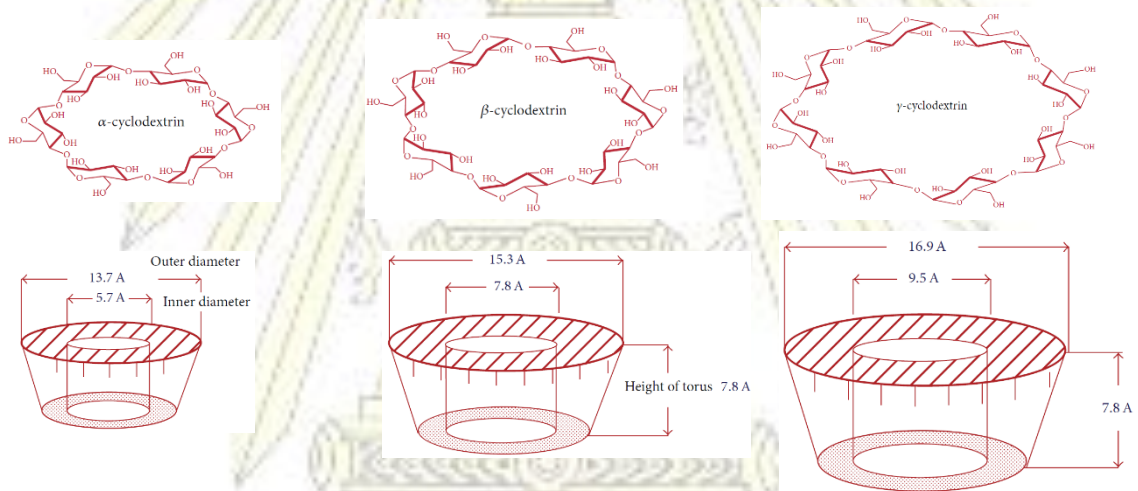


รูปที่ 1.1 รูปโครงสร้างพุลลูแลน

เมื่อพุลลูแลนอยู่ในรูปสารละลายจะมีคุณสมบัติที่ทนต่อช่วง pH ที่กว้าง และทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 250-280°C แต่จะสลายตัวที่อุณหภูมิสูง อีกทั้งพุลลูแลนยังมีคุณสมบัติเด่นในเรื่อง การละลายน้ำที่ดีมาก มีความหนืดต่ำ เมื่อเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ^[7] ไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษ ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกายได้ดี (biocompatible) สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable)^[8] ทำให้ในปัจจุบันจึงนิยมใช้พุลลูแลนในอุตสาหกรรมหลายด้าน เช่น ด้านอาหาร จะนำพุลลูแลนมาทำเป็นฟิล์มห่ออาหาร ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ และตัวปรับเสถียร (stabilizer) ในผลิตภัณฑ์อาหาร^[9] และทางการแพทย์ เพราะพุลลูแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสม ประมาณ 60 kDa และมีการกระจายตัวของโมเลกุล (M_w/M_n) เท่ากับ 1.2 จะสามารถนำไปใช้แทนของเหลวในเลือดได้ (blood plasma)^[10] และพุลลูแลนยังไปใช้ทางด้าน ตัวนำส่งยา (drug delivery) ตัวนำส่งยีน (gene delivery) วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) และ วัคซีน เป็นต้น

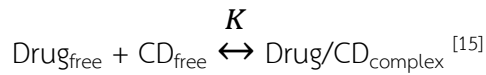
เนื่องจากพอลลูแลนมีคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษ ไม่ใช่สารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ไม่เกิดการกลายพันธุ์ ดังนั้นพอลลูแลนจึงนิยมใช้เป็นตัวนำส่งยา และมันสามารถเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ (derivatization) กับสารตัวอื่นได้ง่าย จึงเพิ่มประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้งานได้ง่าย ด้วยการเกิดสร้างพันธะกับพอลิเมอร์อื่นบริเวณแบล็คโบนของพอลลูแลนที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิลในวงไพราโนส ซึ่งในโครงสร้างของแต่ละยูนิตจะมีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 9 หมู่ ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีได้ง่าย ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์นั้นจะขึ้นอยู่กับตัวทำละลายและตัวทำปฏิกิริยา ซึ่งมักจะเกิดปฏิกิริยา esterification, etherification, chlorination, sulfonation, oxidation และ amidification เป็นต้น ทำให้มีนักวิจัยหลายท่านลองที่จะนำพอลลูแลนมาใช้เป็นตัวนำส่งยา โดยสร้างพันธะกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น ผ่านปฏิกิริยาแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิล เช่น เมทิลเมทาคริเลต, อะคริลาไมด์, แอล-แลกไทด์ และไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งถ้าสารอนุพันธ์ของพอลลูแลนนั้นมีหมู่แอลคิลจำนวนมากขึ้น จะทำให้พอลิเมอร์ทั้ง 2 ตัวเชื่อมต่อกัน เพิ่มความหนืดในน้ำมากขึ้น และสามารถบรรจุยาบนสารอนุพันธ์ของพอลลูแลนได้ จึงเหมาะกับการใช้พอลิเมอร์ดังกล่าวเป็นตัวนำส่งยา^[11] และในงานวิจัยครั้งนี้สนใจที่จะนำพอลลูแลนมาสร้างพันธะกับไซโคลเดกซ์ทริน

ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นวงแหวนคาร์โบไฮเดรต (cyclic carbohydrate) ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลเดกโทรสจำนวน 6-8 ยูนิต เรียกว่าแอลฟา, เบต้า, แกรมมาไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในเรื่องละลายน้ำได้ เข้ากันกับเนื้อเยื่อในร่างกายได้ดี (biocompatible) โดยในบรรดา 3 ชนิด เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ได้รับความนิยมที่จะนำมาประยุกต์เป็นตัวนำส่งยามากที่สุด เพราะมีขนาดหลุม (cavity size) ที่เหมาะสมกับการโหลดและปลดปล่อยยาได้ ดังรูป



รูปที่ 1.2 รูปโครงสร้างแอลฟา, เบต้า, แกรมมาไซโคลเดกซ์ทริน

โครงสร้างภายนอกของไซโคลเดกซ์ทรินจะมีคุณสมบัติแบบไฮโดรฟิลิก ในขณะที่โครงสร้างภายในจะเป็นไฮโดรโฟบิกโดยจะมีลักษณะพิเศษตรงที่บริเวณข้างในจะมีลักษณะเป็นหลุมที่เรียกว่า “host’s cavity” ซึ่งสามารถบรรจุยาหรือ “guest” ด้านในได้ ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่าสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชัน (inclusion complex) ขึ้น และเนื่องจากโครงสร้างภายในที่เป็น hydrophobic cavity ทำให้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่จะเกิดแรงอันตรกิริยาซึ่งโครงสร้างด้านนอกจะเข้ากับน้ำได้ดี ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้^[12] และด้วยคุณสมบัตินี้ไซโคลเดกซ์ทรินสามารถเกิดสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชันกับยาประเภทไฮโดรโฟบิกได้ และยังเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physicochemical) และทางชีวภาพของยาได้^[13] และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาของยาได้โดย ยาจะเข้าไปอยู่ภายในโพรง ทำให้ตัวยามีสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมด้านนอก ทำให้ลดโอกาสการสลายตัวของยาที่เกิดจากการเข้าสู่เนื้อเยื่อ^[14] และในการเกิดสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชันนั้นจะเกิดปฏิกิริยากับยาในอัตราส่วน 1:1 ดังสมการ



ยารักษาโรคมะเร็งมักจะมีข้อจำกัดทางการรักษา เนื่องจากละลายน้ำได้ไม่ดี เพราะเป็นไฮโดรโฟบิกสูง สลายตัวในทางเดินอาหาร (gastrointestinal fluids) มีชีวปริมาณออกฤทธิ์หรือปริมาณยาที่ออกฤทธิ์ (bioavailability) ต่ำและดูดซึมผ่านลำไส้เล็กได้น้อย อีกทั้งด้วยปริมาณยาที่ใช้ในการรักษามีโดสที่สูงมาก ทำให้เกิดผลข้างเคียงกับเนื้อเยื่อปกติอย่างรุนแรงด้วย และยังมีปัญหาในเรื่อง MDR (multidrug resistance) หรือการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง ที่เกิดจาก พี-ไกลโคโปรตีน และไซโตโครม พี450 ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยโปรตีนดังกล่าวจะทำให้หน้าที่ขับยาออกจากเซลล์มะเร็ง ทำให้ภายในเซลล์มะเร็งมีปริมาณยาน้อย เซลล์มะเร็งจึงไม่ถูกทำลาย และเกิดการดื้อยาขึ้นในที่สุด ด้วยเหตุผลดังกล่าว การใช้ยารักษาโรคมะเร็งในการรักษาที่กินยาเข้าไปในร่างกาย ยังคงเป็นปัญหาหลักที่ทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ไม่ดีพอ^[16] ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีนักวิจัยหลายท่านพยายามที่จะพัฒนาระบบการขนส่งยาให้ปลอดภัยต่อเซลล์ปกติและมีประสิทธิภาพในการรักษามากที่สุด ซึ่งไซโคลเดกซ์ตรินก็เป็นหนึ่งในตัวเลือกที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว เนื่องจากคุณสมบัติเด่นในเรื่องของการเกิดสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชัน ดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้น อีกทั้งยังมีงานวิจัยบอกว่าไซโคลเดกซ์ตรินมีความสามารถยับยั้งการทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน และ ไซโตโครม พี450 ที่ทำให้เกิดการดื้อยาในเซลล์มะเร็งที่อยู่บนผนังลำไส้เล็ก (enterocytes) ได้^[17]

ดังนั้นในการทดลองนี้มีความต้องการที่จะทำการสังเคราะห์ตัวนำส่งยา อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินนำส่งยาคีโอรูบิซิน เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เพราะยาคีโอรูบิซินเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในหลายๆชนิด โดยยาจะไปยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของเซลล์มะเร็ง^[18] แต่ประสิทธิภาพในการรักษาของยายังไม่ดีเท่าที่ควร เพราะยาคีโอรูบิซินนั้นมีความเป็นพิษสูง มีการกระจายตัวที่สูง สลายตัวได้เร็วในร่างกาย และเป็นยาที่ละลายน้ำได้น้อยอีกด้วย ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาของยาสามารถทำได้โดยการนำยาไปเชื่อมต่อ (conjugation) กับพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ดี เพื่อลดปริมาณความเป็นพิษของยา^[19] ดังนั้นผู้วิจัยจึงคิดว่า ในการสังเคราะห์ตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินนั้นเหมาะที่จะใช้กับยาคีโอรูบิซินเพื่อที่จะได้เพิ่มประสิทธิภาพการรักษาของยา ทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด และมีผลข้างเคียงต่ออวัยวะอื่นน้อยที่สุด

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

เพื่อสังเคราะห์และทดสอบสมบัติตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งเพื่อดูประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็ง

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2009 Park และคณะ ได้สังเคราะห์ตัวนำส่งยาไซโคลเดกซ์ตรินที่เคลือบลงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สร้างพันธะนอนโควาเลนต์ กันเพื่อห่อหุ้มยา β -Lapachone ไว้ในสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชันของไซโคลเดกซ์ตริน โดยที่บริเวณผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร จะประกอบไปด้วยไซโคลเดกซ์ตริน, anti-epidermal growth factor receptor (anti-EGFR) antibody ที่ทำหน้าที่เหมือนเป็นตัวเป้าหมาย และโพลีเอทิลีน ไกลคอล เป็นโล่ป้องกัน แล้วนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cells) และเซลล์มะเร็งปอด (A-549 cells) พบว่าตัวนำส่งยาที่

สังเคราะห์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งที่ดีมาก เพราะมี SH-CD (per-6-thio- β -cyclodextrin) เป็นตัวกักเก็บ ยา b-Lapachone และมีสาร glutathione เป็นตัวกระตุ้นให้ SH-CD หลุดออกจาก AuNPs แล้วค่อยกระตุ้นให้ cyclodextrin ปลดปล่อยยา b-Lapachone ออกมา^[20]

ในปี 2013 Shi และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์ตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ทำให้เสถียรด้วย NaBH₄ และ capping ด้วย per-6-thio- β -cyclodextrin, β SCD โดยที่ภายใน inclusion complex จะมี prodrug, adamantane อยู่ ซึ่ง prodrug ตัวนี้จะเชื่อมต่อกับ oxoplatin พบว่าเมื่อมี β SCD capping กับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรประมาณ 210 ยูนิต และมีประสิทธิภาพในการไหลดยามากกว่า β SCD ที่ไม่ได้ capping กับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เพราะ β SCD บางยูนิตบนพื้นผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้สร้างพันธะ disulfide bond ด้วยตัวเอง เนื่องจากซัลเฟอร์ใน DMSO (ตัวทำละลายในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร) สามารถทำปฏิกิริยากับ [PtMe₃(bpy)(Me₂CO)]BF₄ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า adamantane-oxoplatin ไปเชื่อมต่อกับ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ผ่าน Pt(IV)-sulfur (disulfide) bond ทำให้มีค่า K (equilibrium constant for binding) ของทั้ง 2 มาก และเมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็ง neuroblastoma SK-N-SH cells (เซลล์มะเร็งที่เกิดจากเซลล์ตัวอ่อนของระบบประสาท) จะพบคลัสเตอร์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในบริเวณนิวเคลียส หลังจาก treated กับตัวนำส่งยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะพบว่าเซลล์มะเร็งได้ตายไปจำนวนมาก และคลัสเตอร์ได้สลายตัว ไม่ได้อยู่ในเซลล์ แต่ถ้า treated 72 ชั่วโมงจะพบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งที่น้อยกว่ายา cisplatin ซึ่งอาจจะเกิดจาก Pt(IV) บางโมเลกุล ในยาไปได้ถูก reduced เป็น Pt(II) ในเซลล์ ทำให้ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้ดีเท่าที่ควร^[21]

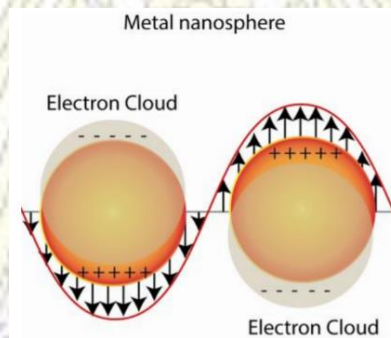
ในปี 2014 Moorthy และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์ตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ stabilized ด้วย pullulan และเชื่อมต่อกับ (conjugated) กับ 5-Fluorouracil เพื่อให้ได้เป็น 5-Fu@AuNPs และนำมาเชื่อมต่อกับ folic acid เพื่อให้ได้เป็น 5-Fu@AuNPs-Fa เพื่อที่จะทดสอบกับตัวอ่อนปลาหมึก zebrafish embryo ใน in vivo และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 cells พบว่าปริมาณตัวนำส่งยา 5-Fu@AuNPs มีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งมากที่สุด และในการสังเคราะห์ PAuNPs ด้วยวิธี microwave irradiation พบว่ามีรูปร่าง (morphologies) ของ AuNPs ที่ไม่คงที่ คือมีทั้งทรงกลม และทรงสามเหลี่ยม และยังมีความเสถียรแค่ 48 ชั่วโมง แสดงว่าในการสังเคราะห์ PAuNPs ไม่สามารถควบคุมรูปร่างของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้^[22]

ในปี 2017 Laksee และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์ตัวนำส่งยาทองคำระดับนาโนเมตรที่ทำให้เสถียรด้วย pullulan เพื่อให้ได้เป็น AuNPs@pullulan แล้วนำไปเชื่อมต่อกับยา cassiarin A chloride derivatives แล้วนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATO-III และนำค่า IC₅₀ ไปเปรียบเทียบกับยา cisplatin พบว่าตัวนำส่งยาที่สังเคราะห์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งที่ดีมาก และในการสังเคราะห์ AuNPs@pullulan พบว่ามีรูปร่าง (morphologies) ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นทรงกลม ขนาดประมาณ 11 ± 5 nm และ pullulan ทำหน้าที่เป็นทั้ง reducing stabilizing และ capping agent ให้กับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร อีกทั้งยังใช้ green solvent หรือน้ำ เป็นตัวทำละลายในการสังเคราะห์ AuNPs@pullulan^[23]

1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

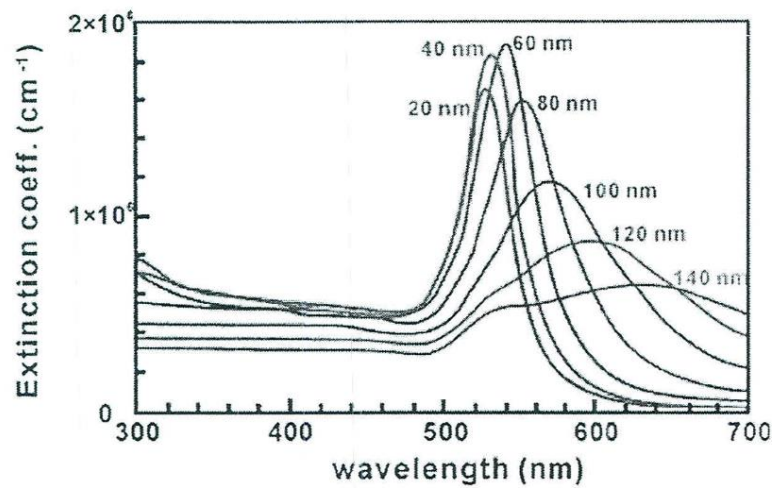
1.4.1 Localized surface plasmon resonance

คือปรากฏการณ์เชิงแสง ซึ่งเกิดจากอันตรกิริยาของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและอิเล็กตรอนที่อยู่ในโลหะระดับนาโนเมตร กล่าวคือเมื่อมีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมาตกกระทบโลหะ กลุ่มอิเล็กตรอนที่ถูกจำกัดอยู่ในอนุภาคระดับนาโนเมตรจะเกิดการสั่นรวม (collective oscillation) และเมื่อคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมีความยาวคลื่นเดียวกันกับความยาวคลื่นที่อิเล็กตรอนสั่นในอนุภาคนาโนจะทำให้เกิดการกำทอนขึ้น ซึ่งอันตรกิริยาที่แสงกระทำต่อโลหะจะเกิดได้สองแบบ คือ แสงจะตกกระทบและสะท้อนออกไปด้วยความยาวคลื่นเท่าเดิม ทุกทิศทุกทาง เรียกว่าการกระเจิง (scattering) และในขณะเดียวกัน บางโฟตอนก็จะถูกดูดกลืนและถูกเปลี่ยนไปเป็น พลังงานการสั่น ซึ่งเรียกว่าการดูดกลืนแสง (absorption) ซึ่งเมื่อแสงตกกระทบที่โครงสร้างระดับนาโนของทอง อิเล็กตรอนจะถูกกระตุ้นไปยังแถบเหนียวนำและจะเกิดการสั่น พ้องกับแสงที่มาตกกระทบ จะทำให้เกิดพลาสมอนโพลาร์อิเล็กตรอน ซึ่งจะสามารถถ่ายทอดระหว่างรอยต่อของโลหะ และไดอิเล็กทริก ซึ่งปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้จะเกิดอยู่บริเวณ เปลือกชั้นนอกของโลหะนาโนเมตร เพราะแสงจากภายนอกไม่สามารถ ส่องทะลุผ่านเข้าไปภายในวัสดุได้ โดยทั่วไปแล้ว โครงสร้างระดับนาโนเมตรของทองจะเกิดทั้งกระบวนการกระเจิงแสงและการดูดกลืนแสงซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ จะขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนเมตร^[24]



รูปที่ 1.3 ภาพแสดงการเกิด surface plasmon resonance โดยแสดงการสั่นของกลุ่มอิเล็กตรอนในแถบเหนียวนำ เมื่อมีแสงจากภายนอกส่องผ่าน

โดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร จะมีแถบเซอเฟสพลาสมอนจะปรากฏที่ช่วง 520 nm แต่ถ้าลดขนาดของแกนกลางของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรให้ลงน้อยกว่า 3 nm จะปรากฏค่า intensity ของกราฟลดลงเนื่องจากถูกรบกวนจากปรากฏการณ์ทางควอนตัม ที่แถบพลังงานมีความไม่ต่อเนื่อง ค่าเซอเฟสพลาสมอนปรากฏได้หลายความถี่ ความเข้ม และหลายความกว้าง เนื่องจากขนาดของอนุภาค รูปร่าง และดัชนีหักเหของสารละลาย ตัวอย่างเช่น อนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20, 80 และ 120 nm จะเกิดพีคการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 522, 550 และ 615 nm ดังภาพที่ 1.4.1.2 จึงกล่าวได้ว่า ค่าเซอเฟสพลาสมอนของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร จะมีการเคลื่อนที่ของกราฟไปสู่ความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น เมื่อขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น



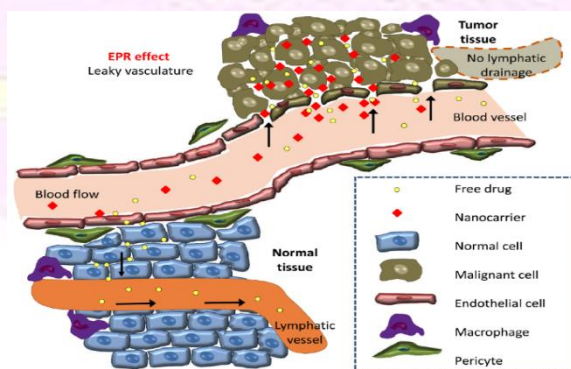
รูปที่ 1.4 ค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนของทองที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางต่างกัน

1.4.2 วิธีการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

วิธีการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์มะเร็งมี 2 วิธี คือ

1.4.2.1 Passive tumor targeting

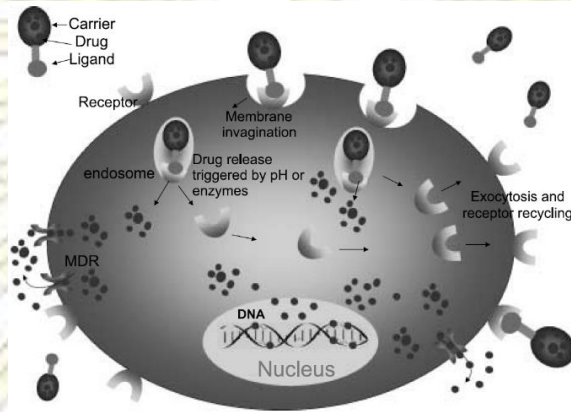
เป็นการลำเลียงโดยวิธี EPR Effect หรือ Enhanced permeability and retention effect คือ ในเนื้อเยื่อปกติจะประกอบด้วยหลอดเลือดที่มีเซลล์บุหลอดเลือดเรียงตัวเป็นระเบียบแบบชั้นเดียว และมีท่อน้ำเหลืองนำเซลล์เม็ดเลือดขาวและน้ำเหลืองไปสู่ระบบต่อมน้ำเหลือง ในขณะที่เนื้องอกมะเร็งชนิดก้อนเนื้อ จะประกอบด้วยหลอดเลือดที่มีการจัดเรียงเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดบกพร่อง ไม่ต่อเนื่อง เกิดรูรั่วของผนังหลอดเลือดขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์มีขนาดและรูปร่างที่ไม่แน่นอน เชื่อมต่อแบบหลวม ไร้ระเบียบ ซ้อนทับกันจนเกิดช่องเปิดระหว่างเซลล์ หรือมีการขาดหายของเยื่อรองรับพื้นฐาน (basement membrane) และในเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ มีเส้นใยคอลลาเจน, เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts), แมโครเฟจ (macrophages) มากกว่าในเนื้อเยื่อปกติแต่ไม่มีท่อน้ำเหลือง ทำให้ขาดแคลนระบบกำจัดที่เจ้านำสิ่งแปลกปลอมออกจากเนื้อเยื่อมะเร็ง อนุภาคนาโนเมตรจึงสามารถกระจายเข้าไปสะสมในเนื้องอกทางช่องเปิดได้โดยไม่ถูกกำจัดออกอย่างมีประสิทธิภาพ ความแตกต่างทางโครงสร้างของหลอดเลือดที่ผิดปกติของเนื้องอกมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติจึงมีบทบาทสำคัญในการคัดเลือกระบบนำส่งยาเพื่อไปสะสมที่เนื้อเยื่อมะเร็งแบบมุ่งเป้า^[25] ดังแสดงในรูป



รูปที่ 1.5 รูปแสดงผลของ EPR Effect ของเซลล์มะเร็ง

1.4.2.2 Active tumor targeting

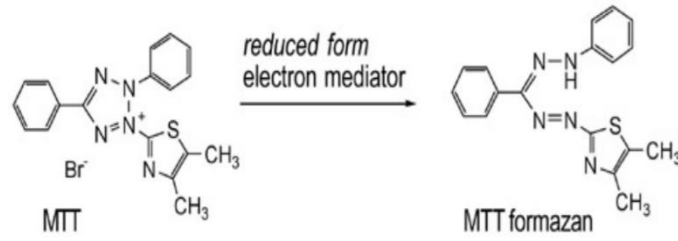
คือ การที่เยื่อหุ้มเซลล์จะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งโปรตีนเหล่านั้นจะทำหน้าที่เป็นแอนติเจนหรือเป็นตัวรับ (receptor) ที่ให้สารที่จำเพาะต่อตัวรับนั้นๆสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ เช่น การนำโฟเลทมาเชื่อมต่อกับตัวนำส่งยา เพื่อให้โฟเลทเป็นตัวพาตัวนำส่งไปยังตัวรับโฟเลท (folate receptor) เมื่อโฟเลทในตัวนำส่งยาจับกับตัวรับโฟเลทบนเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว จะเกิดการยุบตัวของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นแบบรอยบุ๋มลงไป (Invaginating) เกิดการรวมตัวเป็นเอนโดโซม ซึ่งถ้าเอนโดโซมอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด จะเกิดการกระตุ้นยาละลายถูกปลดปล่อยออกมาจากเอนโดโซม ไปทำลายเซลล์มะเร็งได้^[26]



รูปที่ 1.6 รูปแสดงการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์มะเร็งแบบ Active tumor targeting

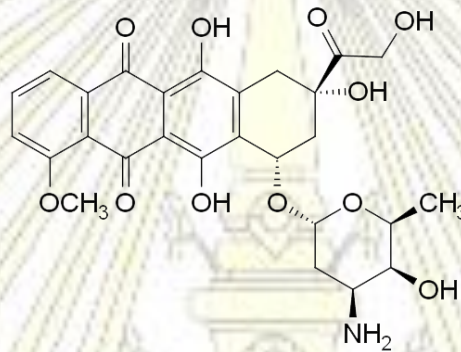
1.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT Assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt ที่ในปัจจุบันมีผู้นิยมใช้ในการทดสอบทางชีววิทยาในงานด้านต่าง ๆ มากมาย เพื่อหลีกเลี่ยงวิธีทดสอบมาตรฐานที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี หลักการทำงานของ MTT คือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ (metabolically active) เท่านั้นที่สามารถใช้เอนไซม์ ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส เปลี่ยน MTT ให้เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มazan (formazan product) โดยปฏิกิริยารีดักชัน ผลิตภัณฑ์ฟอร์มazan ที่ได้มีสีม่วงน้ำเงิน และมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 550-600 nm ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสีม่วงน้ำเงินที่เกิด แปรผันโดยตรงกับปริมาณของเอนไซม์ ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ฟอร์มazan ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง MTT ภายในเซลล์ ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ MTT colorimetric assay ในการศึกษาทางชีววิทยามีมากมาย เช่น ใช้ในการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (viability cell count) แทนการนับเซลล์โดยใช้ haemocytometer และกล้องจุลทรรศน์ การวัดปริมาณการสังเคราะห์ lymphokines การวัดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity test)^[27]



รูปที่ 1.7 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay

1.4.4 ยาต้านมะเร็งไซโททอกซิก



รูปที่ 1.8 แสดงโครงสร้างของยาต้านมะเร็งไซโททอกซิก

ยาต้านมะเร็งไซโททอกซิกเป็นยาเคมีบำบัด (Cytotoxic chemotherapy) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านโรคมะเร็ง และต้านเนื้องอก (Antitumor antibiotics) ยาชนิดนี้สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยในดินชนิดที่มีชื่อเรียกว่า Streptomyces ทางแพทย์นำยาต้านมะเร็งไซโททอกซิกมาใช้รักษาโรคมะเร็งหลายประเภทเช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ มะเร็งกระดูก มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งต่อมไทรอยด์ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น เกล็ดขนานของยาชนิดนี้เป็นแบบยาฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ตัวยาในกระแสเลือดสามารถกระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆของร่างกายได้เกือบทุกอวัยวะ เช่น ปอด ตับ หัวใจ ม้ามและไต ยาต้านมะเร็งไซโททอกซิกยังผ่านเข้ารกและน้ำนมของมารดาได้อีกด้วย และตัวยา Doxorubicin จะถูกทำลายโครงสร้างทางเคมีที่ตับ สำหรับระยะเวลาที่ร่างกายใช้กำจัดยาชนิดนี้ถูกแบ่งออกเป็น 3 ช่วง (Triphasic half life) คือ ในช่วงแรกร่างกายจะกำจัดยาได้อย่างรวดเร็ว คือในช่วง 12 นาทีแรก ช่วงที่สองประมาณ 3.8 ชั่วโมงหลังได้รับยา และในช่วงที่สามจะใช้เวลานานถึง 30 ชั่วโมง ตัวยาจะถูกกำจัดผ่านทิ้งไปกับอุจจาระและปัสสาวะ ยา Doxorubicin เป็นยาที่สามารถทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายที่สัมผัสตัวยาได้ ดังนั้นการฉีดยาเข้าหลอดเลือดดำจะต้องใช้ความระมัดระวังเป็นอย่างมาก เพื่อมิให้การแทงเข็มฉีดยาทะลุผ่านเส้นเลือด/หลอดเลือด จนทำให้ตัวยาต้านมะเร็งไซโททอกซิกรั่วและสัมผัสกับเนื้อเยื่อรอบๆหลอดเลือด ยาต้านมะเร็งไซโททอกซิกจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งชะลอการเจริญเติบโตและหยุดการแพร่กระจาย ซึ่งการใช้ยาชนิดนี้กับผู้ป่วยมะเร็ง แพทย์จะคำนวณขนาดการใช้ยาต่อพื้นที่ผิวของร่างกายมาเป็นเกณฑ์ตัดสิน ผู้ป่วยต้องรับการให้ยานี้ตามช่วงเวลาที่เหมาะสมที่แพทย์นัดหมาย

- ผู้ได้รับยาดีออกโซริบูซินในครั้งแรกจะพบอาการข้างเคียง(ผลข้างเคียง)ที่เกิดขึ้นได้บ่อยๆ เช่น
- 1) เจ็บ/ปวดบริเวณที่ได้รับการฉีดยา ซึ่งสามารถบรรเทาอาการปวดด้วยการประคบเย็น
 - 2) ภายใน 2 สัปดาห์หลังการฉีดยาดีออกโซริบูซิน ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน แพทย์สามารถให้ยาแก้คลื่นไส้ต่างๆเข้ามาช่วยเพื่อป้องกันและลดอาการเหล่านี้
 - 3) จำนวนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด จะลดลงชั่วคราว ผู้ป่วยจะเกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคประเภทต่างๆ มีภาวะโลหิตจาง และ/หรือไม่ก็มีภาวะเลือดออกง่าย ระยะเวลาที่ร่างกายเริ่มมีสภาพโลหิตจางอยู่ในช่วง 10-14 วันนับจากวันที่ได้รับยานี้ และภายในวันที่ 21-28 สภาพเลือดจางของร่างกายจึงจะ กลับมาเป็นปกติ
 - 4) ผู้ป่วยหลายรายจะประสบอาการผมร่วง อาจร่วงเป็นหย่อมๆหรือร่วงทั้งศีรษะก็ได้ อย่างไรก็ตามเส้นผมของผู้ป่วยสามารถงอกขึ้นมาใหม่และยาวได้เหมือนปกติเมื่อหมดฤทธิ์ของยาดีออกโซริบูซิน และยาเคมีบำบัดอื่นๆ
 - 5) ผู้ป่วยบางกลุ่มมีอาการข้างเคียง(ผลข้างเคียง)ที่อาจพบเห็นไม่บ่อยทีเดียวนัก เช่น ตาแฉะ มีแผลในช่องปาก และในกรณีที่เพิ่งได้รับยาดีออกโซริบูซิน 1-2 วัน อาจพบเห็นปัสสาวะมีสีแดง-น้ำตาล สีส้มหรือมีสีออกชมพู นอกจากนี้ยังอาจพบเห็นโคนเล็บมีสีคล้ำ ผิวหนังย่นร่วมด้วย
 - 6) ด้วยยาดีออกโซริบูซินจะไปลดความสามารถของหัวใจในการสูบฉีดโลหิตไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆของร่างกาย ซึ่งอาการข้างเคียงด้านพยาธิสภาพของหัวใจนี้ ถ้าเกิดขึ้นแล้วจะส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยอย่างมาก ดังนั้นแพทย์จะคอยตรวจสอบสภาพการทำงานของหัวใจผู้ป่วย ควบคู่ไปกับการใช้ยาดีออกโซริบูซิน เป็นยารักษามะเร็งก็จริง แต่ยานี้ก็สร้างความเสี่ยงให้เกิดการพัฒนาของมะเร็งเม็ดเลือดขาวตลอดจนถึงเกิดภาวะ Tumor lysis syndrome (ภาวะเกิดการตายปริมาณมากอย่างรวดเร็วและทันทีของเซลล์มะเร็ง) ซึ่งจะส่งผลให้ระดับเกลือแร่และการเผาผลาญพลังงานของร่างกายมีความผิดปกติ รวมถึงอาจเกิดไตวายเฉียบพลันจนเป็นเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ แพทย์ผู้ที่ทำการรักษาจะเป็นผู้วิเคราะห์และช่วยบำบัดสภาวะดังกล่าวได้ดีที่สุด



บทที่ 2

การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์

1. กระจกทรง
2. กระจกตวง
3. ขวดก้นกลม
4. ขวดรูปชมพู่
5. ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเซลล์
6. เครื่องวัดปฏิกิริยาของสารบนไมโครเพลท
7. เครื่องกวนสารให้ความร้อน
8. ซ้อนตักสาร
9. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
10. เทอร์โมมิเตอร์
12. ปีกเกอร์
13. ปิเปตต์แบบใช้ดวง
14. หลอดทดลอง
15. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์
16. หลอดหยด
17. ไมโครเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม

2.2 รายการสารเคมี

1. Acetone
2. β -cyclodextrin
3. Dimethylacetamide (DMAc)
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
5. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)
6. DOXORUBICIN (DOX)
7. Fetal Bovine Serum (FBS)
8. Tetrachloroauric acid (HAuCl_4)
9. Hydrochloric acid (HCl)
10. Minimum essential medium (MEM)
11. Non-essential amino acid
12. Pullulan

13. Pyruvic acid
14. Sodium Hydroxide (NaOH)
15. Triethylamine (TEA)
16. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)
17. Trypsin
18. 4-toluenesulfonyl chloride

2.3 วิธีการทดลอง

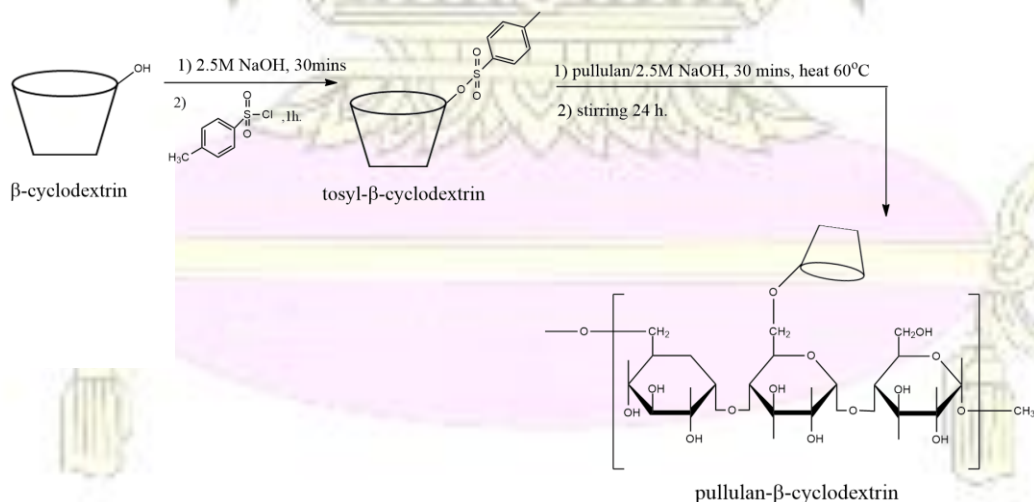
ในงานวิจัยครั้งนี้จะสังเคราะห์ตัวนำส่งยา โดยจะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ สังเคราะห์ พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (P- β -CyD), สังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (AuNPs@P- β -CyD) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)

2.3.1 วิธีการสังเคราะห์พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

พูลลูแลน และ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน เป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตซึ่งละลายได้ดีในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ไม่กี่ชนิด ซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือไดเมทิลอะเซตาไมด์ (DMAc) ดังนั้นในการทดลองนี้ได้สังเคราะห์ พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ทั้งหมดสองวิธี คือ วิธีที่ 1 จะใช้ตัวทำละลายเป็น น้ำปราศจากไอออน (DI water) และวิธีที่ 2 จะใช้ตัวทำละลายเป็นไดเมทิลอะเซตาไมด์ เพื่อที่ว่าวิธีไหนให้ผลิตภัณฑ์ปริมาณมากกว่ากัน โดยทั้งสองวิธี นั้นจะผ่านการทำปฏิกิริยา โทซิลเลชัน ได้เป็นสารประกอบโทซิล (-OTs) เป็นสารมัธยันตร์ เพราะต้องการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของพูลลูแลน และ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ให้เป็นหมู่โทซิล เนื่องจากหมู่โทซิลเป็นหมู่หลุดออกที่ดีมาก ทำให้เกิดการคอนจูเกตกับโมเลกุลอื่นได้ง่ายขึ้น

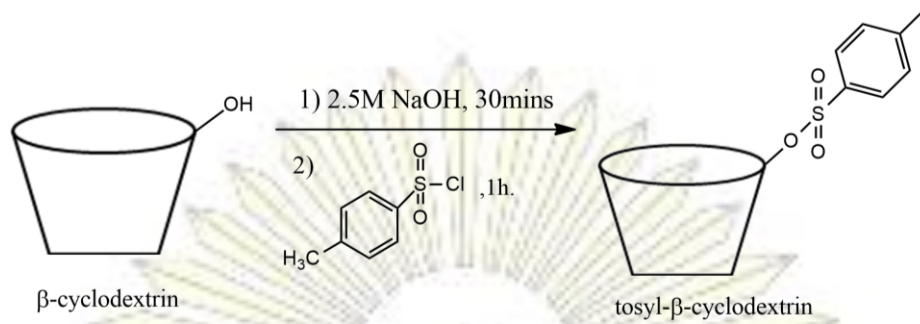
2.3.1.1 วิธีที่ 1 ตัวทำละลายเป็นน้ำปราศจากไอออน (DI Water)

ทำปฏิกิริยา โทซิลเลชัน ระหว่างเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและพี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์เพื่อให้ได้ โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน แล้วนำสารมาทำปฏิกิริยากับพูลลูแลน ได้เป็นพูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน



รูปที่ 2.1 วิธีการสังเคราะห์พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินด้วยวิธีที่ 1 ตัวทำละลายเป็นน้ำปราศจากไอออน

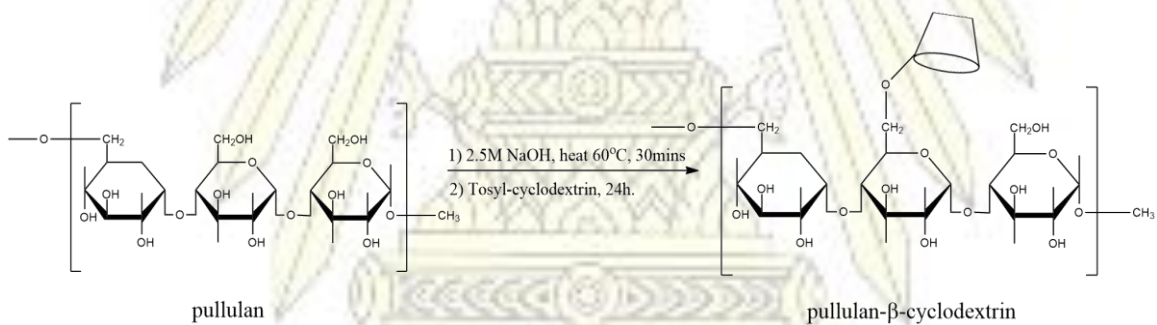
2.3.1.1.1 ปฏิกริยา โทซิลเลชั่น ของการสังเคราะห์โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน



รูปที่ 2.2 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

นำเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 10 กรัมมาละลายในน้ำปราศจากไอออน 90 ml แล้วค่อยๆเท 2.5M โซเดียมไฮดรอกไซด์ 35 ml ลงไป คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมพี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ 2.52 กรัม ลงไปในสารละลาย แล้วคนสารละลาย 60 นาที แล้วนำสารมากรองเอาตะกอนออก นำสารละลายที่ได้มาปรับค่ากรดเบสของสารละลายให้เป็นกลาง ($\text{pH} = 7$) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เพื่อให้สารตกตะกอนได้เป็นของแข็งสีขาว หลังจากนั้น นำสารมากรองเพื่อที่จะเอาไปอบให้แห้ง ซึ่งน้ำหนักตะกอนและบันทึกน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องทำการไดอะไลซิส วิเคราะห์สารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FT-IR Spectroscopy, ^1H NMR Spectroscopy และ Mass spectrometry

2.3.1.1.2 การสังเคราะห์พุลูลแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

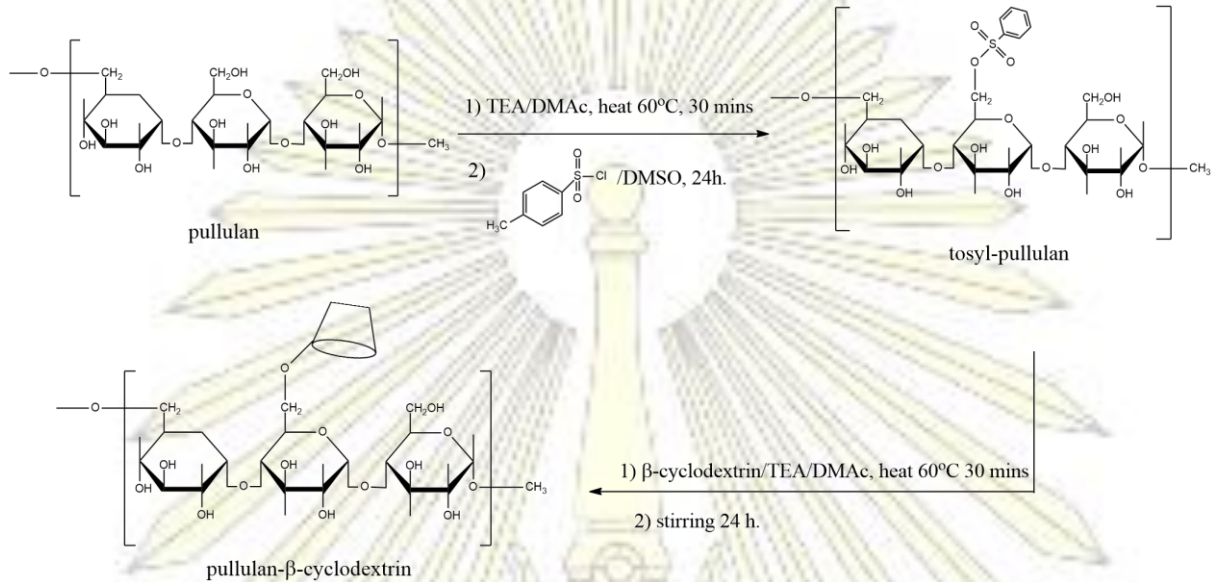


รูปที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์พุลูลแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

นำพุลูลแลน 3.4 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 30 ml แล้วค่อยๆเทโซเดียมไฮดรอกไซด์ 12 ml คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 0.88 กรัมลงในสารละลาย แล้วคน 24 ชั่วโมง ให้ความร้อนที่ 60°C แล้วนำสารละลายมาปรับค่ากรดเบสของสารละลายให้เป็นกลาง $\text{pH} = 7$ และนำไปทำไดอะไลซิสด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีค่าขนาดรูพรุน หรือค่า MWCO (Molecular Weight Cut Off) = 12-14 kDa แล้วเทสารละลายใส่ลงในถาดพลาสติก เอาสารไปอบให้แห้ง ซึ่งน้ำหนักตะกอนและบันทึกน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ วิเคราะห์สารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FT-IR Spectroscopy และ Thermogravimetric analysis

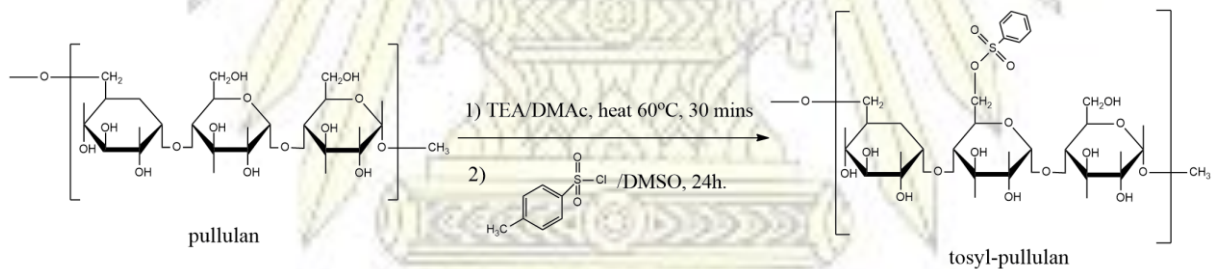
2.3.1.2 วิธีที่ 2 ตัวทำละลายเป็นไดเมทิลอะเซตาไมด์ (DMAc)

ทำปฏิกิริยา โทซิลเลชัน ระหว่างพุลลูแลนและพี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ เพื่อให้ได้โทซิล-พุลลูแลน แล้ว ค่อยนำสารมาทำปฏิกิริยากับเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน จะได้เป็นพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน



รูปที่ 2.4 วิธีการสังเคราะห์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

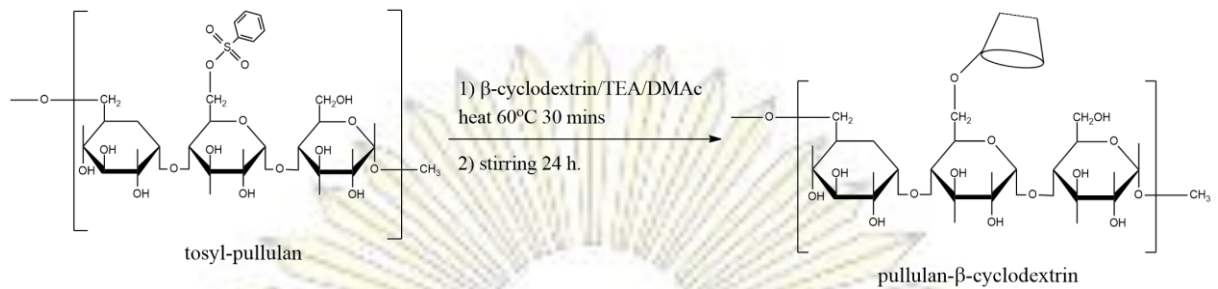
2.3.1.2.1 ปฏิกิริยา โทซิลเลชัน ของการสังเคราะห์โทซิล-พุลลูแลน



รูปที่ 2.5 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-พุลลูแลน

นำพุลลูแลน 5 กรัม ละลายในตัวทำละลายไดเมทิลอะเซตาไมด์ 300 ml ใส่ไตรเอทิลามีน 8.5 ml ให้ ความร้อนที่ 60°C คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที เตรียมเป็นสารละลาย 1 ซึ่งพี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ 5.7 กรัม ละลายในไดเมทิลซัลไฟออกไซด์ 25 ml เตรียมเป็นสารละลาย 2 แล้วนำสารละลาย 2 เทลงในสารละลาย 1 คน สารละลายผสม 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายมาตกตะกอนด้วยอะซิโตน แล้วค่อยกรองเอาตะกอนไปอบให้แห้ง ซึ่งน้ำหนักตะกอนและบันทึกน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องทำการไตอะไลซิส วิเคราะห์สารที่ สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FT-IR Spectroscopy และ ¹H NMR Spectroscopy

2.3.1.2.2 การสังเคราะห์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน



รูปที่ 2.6 วิธีการสังเคราะห์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

นำเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 3 กรัม ละลายในตัวทำละลายไดเมทิลอะเซตาไมด์ 200 ml ใส่ไตรเอทิลลามีน 5 ml ให้ความร้อนที่ 60°C คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมโทซิล-พุลลูแลน 3 กรัม คนสารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปทำไดอะไลซิสด้วยตัวทำละลายไดเมทิลอะเซตาไมด์ เป็นเวลา 1 วัน น้ำปราศจากไอออน 6 วัน โดยใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีค่าขนาดรูพรุน หรือค่า MWCO (Molecular Weight Cut Off) = 12-14 kDa แล้วเทสารละลายใส่ลงในภาชนะพลาสติก เอาสารไปอบให้แห้ง ซึ่งน้ำหนักตะกอนและบันทึกน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ วิเคราะห์สารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค FT-IR Spectroscopy และ Thermogravimetric analysis

2.3.2 วิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

นำพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินมาตัดแปรลงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้ นำสารละลายพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินความเข้มข้น 1% w/v มา 840 μ L ในน้ำปราศจากไอออน 284 μ L และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 μ L ให้ความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 30 นาที และเติมสารละลายเตตระคลอโรออร์ิก แอซิด 400 μ L แล้วคนสารละลาย 30 นาที และวิเคราะห์สารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy, Fluorescence spectroscopy และ Transmission electron microscopy (TEM)

2.3.3 การพิสูจน์หาปริมาณยา DOXORUBICIN ที่เข้าไปอยู่ในตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

ที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (AuNPs@P-β-CyD) หรือ Drug loading

เตรียมสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน (DOXO-AuNPs@P-β-CyD) ที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (AuNPs) 50 μ M และยาดีออกโซรูบิซิน 500 μ M ปริมาตร 2,000 ml จากนั้นนำคนสารละลายแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 60,000 rpm 1 ชั่วโมง โดยจะเอาสารละลายเหนือตะกอน (supernatant) ไปตรวจหาปริมาณยาดีออกโซรูบิซินที่เหลือในสารละลาย และเตรียมสารละลายมาตรฐานยาดีออกโซรูบิซินที่ความเข้มข้น 40, 30, 20, 10 และ 5 μ M แล้วนำไปพิสูจน์ด้วยเทคนิค Fluorescence spectroscopy ที่ start และ stop wavelength 490, 800 nm ความกว้างสลิต 5 nm ที่ PMT voltage 700

2.3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน (AuNPs@P-β-CyD) ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กับ เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และเซลล์ปกติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (L929) ทำโดยวิธี MTT Assay ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

- 1) ปิเปตทรูปซินไสในขวดแก้วเพาะเลี้ยงเซลล์และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นขวดแก้วเพาะเลี้ยงเซลล์
- 2) นำเซลล์มาส่งด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเซลล์มีลักษณะกลมๆ ให้ดูดทรูปซินออก ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเป่าบริเวณพื้นขวดแก้วเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้เซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์อยู่ไปใส่ในหลอดทดลอง แล้วปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์มา 10 μL เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 90 μL แล้วค่อยปิเปตมา 10 μL ใส่ในเพลท เพื่อจะทำการนับเซลล์ที่จะใส่ในไมโครเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณเซลล์ (ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้}}{4} \times 10^4 \times 10$$

- 4) ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์มาตามปริมาตรที่คำนวณได้ ใส่ในขวดแก้ว แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ml
- 5) ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในขวดแก้วใส่ในไมโครเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีปริมาตร 200 μL
- 6) นำไมโครเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 7) ปิเปตสารที่อยู่ในไมโครเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ออกมาหลุมละ 20 μL แล้วค่อยเติมสารที่จะทดสอบกับเซลล์ ปริมาตร 20 μL โดยในงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบยาดีออกโซรูบิซิน และ สารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน (DOXO-AuNPs@P-β-CyD) โดยที่มีช่วงความเข้มข้นของ ยาดีออกโซรูบิซินที่ 0.0001-100 μM และความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 50 μM
- 8) นำไมโครเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในตู้บ่มเป็นเวลา 76 ชั่วโมง
- 9) เติมสารละลาย Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) ลงไปหลุมละ 10 μL เพื่อย้อมสีเซลล์ที่รอดชีวิต แล้วเอาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ในตู้บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- 10) ดูดสารออกจากไมโครเพลทเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม แล้วเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์หลุมละ 150 μL เพื่อละลายสี MTT หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 540 nm

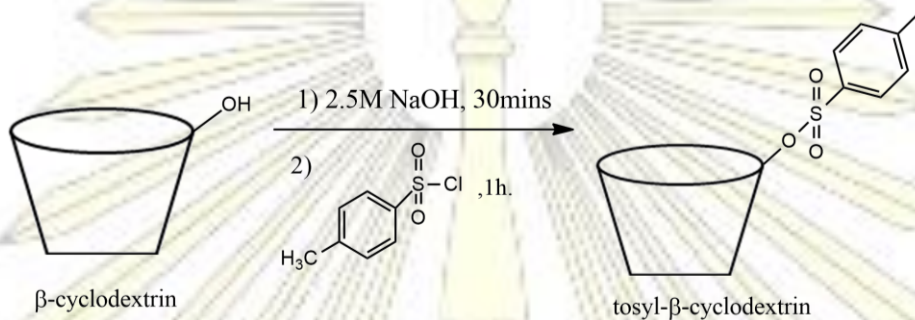
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์พอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

3.1.1 วิธีที่ 1 ตัวทำละลายเป็นน้ำปราศจากไอออน

3.1.1.1 ปฏิกิริยา โทซิลเลชัน ของการสังเคราะห์โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน



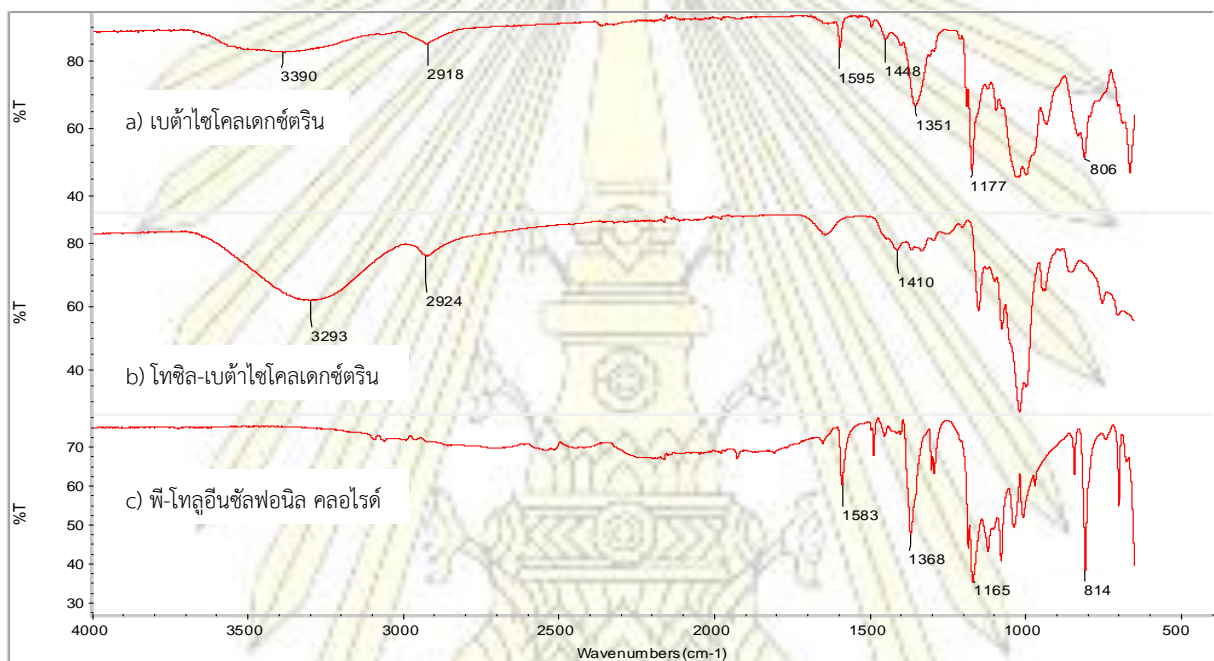
รูปที่ 3.1 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

จากผลการทดลองพบว่าเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินละลายในน้ำปราศจากไอออนไม่ค่อยดี แต่เมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป พบว่าสามารถละลายเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินได้หมด ได้สารละลายไม่มีสี เพราะว่าเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินเป็นสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชัน ซึ่งด้านนอกจะเป็นไฮโดรฟิลิก ด้านในเป็นไฮโดรโฟบิก ดังนั้นจึงละลายในน้ำได้ไม่ดีเท่าที่ควร แต่พอเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป โซเดียมไฮดรอกไซด์จะดีโปรตอนหมู่ไฮดรอกซิลของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ทำให้มีความเป็นขั้วมากขึ้น เลยละลายในน้ำได้ดีขึ้น และเมื่อเติมพี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ คนสารละลายเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำสารมารองเอาตะกอนออก แล้วนำมาปรับค่ากรดเบสของสารละลายให้เป็นกลางด้วยกรดไฮโดรคลอริก เพื่อให้สารตกตะกอนได้เป็นของแข็งสีขาว หลังจากนั้นนำสารมารองเพื่อที่จะไปอบให้แห้ง ได้เป็นตะกอนสีขาว น้ำหนัก 2.359 กรัม คิดเป็น yield = 23.6% จะพบว่า yield ที่ต่ำมาก เพราะ พี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ ทำปฏิกิริยากับน้ำองไว้มาก ได้สารที่ไม่พร้อมทำปฏิกิริยา (inactive form) ทำให้มี พี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ ที่เป็นสารที่พร้อมทำปฏิกิริยากับเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินเล็กน้อย โดยคาดว่าเมื่อเติม พี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ ลงไปในสารละลายจะมีพี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์บางส่วนที่เข้าไปอยู่ด้านในสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชัน ทำให้มันสามารถทำปฏิกิริยากับเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

3.1.1.1.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค FTIR

การใช้เทคนิค FTIR เป็นการใช้ความยาวคลื่นในช่วงอินฟราเรดส่องผ่านโมเลกุลของสาร โดยที่แสงอินฟราเรดในบางช่วงมีความถี่ตรงกันกับความถี่ของการสั่นของพันธะในโมเลกุล แสงจะถูกดูดกลืนไปจึงทำให้สามารถบอกหมู่ฟังก์ชันของสารได้ ซึ่ง IR-spectrum ของสารได้แสดงผลดังรูป 3.2

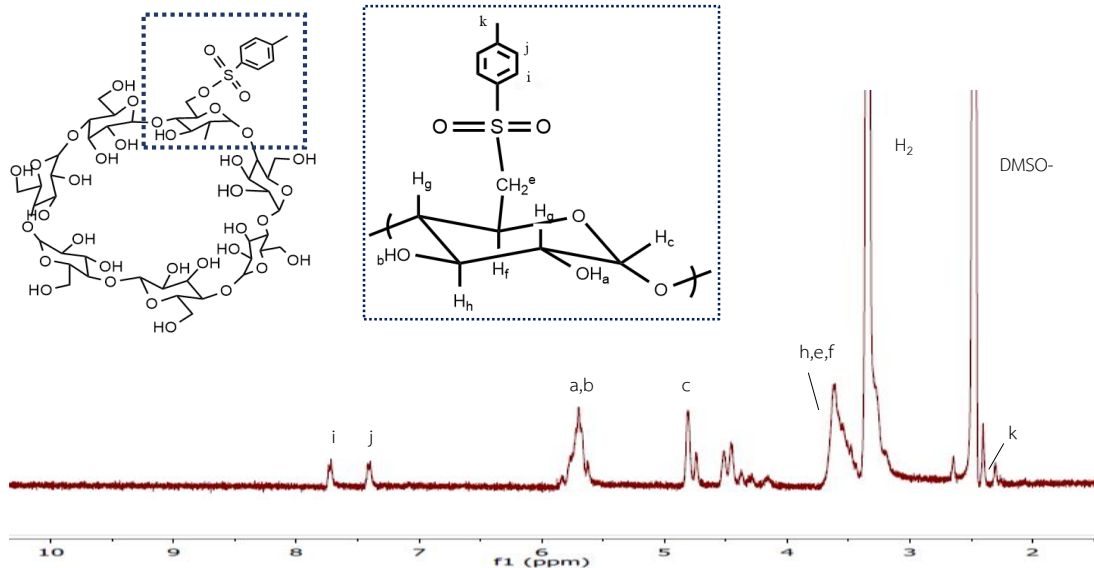
จาก IR Spectrum ของโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน แสดงในรูป 3.2(b) จะพบพีคที่ตำแหน่ง 3,390 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคเอกลักษณ์ของหมู่ไฮดรอกซิลของเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่ตำแหน่ง 2,921 cm^{-1} เป็นของ C-H stretching ของเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่ตำแหน่ง 1,595 cm^{-1} จะเป็นของหมู่อะโรมาติก C=C stretching ของ พี-โทลูอินซัลฟอนิลคลอไรด์ ที่ตำแหน่ง 1,448 cm^{-1} เป็นของ CH_2 blending ของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน และที่ตำแหน่ง 1,351 cm^{-1} และ 1117 cm^{-1} เป็นของหมู่ S=O และที่ตำแหน่ง 806 cm^{-1} เป็นของพันธะ C-O-S ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สารที่สังเคราะห์ได้คือโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน



รูปที่ 3.2 Infrared spectrum ของโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

3.1.1.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค ^1H NMR

จาก ^1H NMR Spectrum ของโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ที่ยังไม่ผ่านการไดอะไลซิส เนื่องจากต้องนำสารไปทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไป แสดงในรูป 3.3 ซึ่งการทดลองนี้ได้ใช้ตัวทำละลายเป็น DMSO-d_6 พบพีคที่ 2.5 ppm และพีคที่ 3.38 ppm เป็นพีคของน้ำ พีคที่ตำแหน่ง 7.72 และ 7.40 ppm มีลักษณะเป็น doublet ซึ่งเป็นพีคของไฮโดรเจนในวงอะโรมาติกของหมู่โทซิล และพีค 5.70 ppm มีลักษณะเป็น multiplet เป็นพีคของ $\text{OH}_{a,b}$ ของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน และพีคที่ตำแหน่ง 4.81 ppm เป็นพีคของ H_c ที่เป็น anomeric proton ของเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและพีคที่ตำแหน่ง 4.46 เป็นพีคของ H ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่โทซิล และพีคที่ตำแหน่ง 3.61 ppm เป็นพีคของ $\text{H}_{h,e,f}$ ที่ coupling กันและพีคตำแหน่ง 2.40 ppm เป็นพีคของ $\text{CH}_{3,k}$ ของหมู่โทซิล ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สารที่สังเคราะห์ได้คือโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

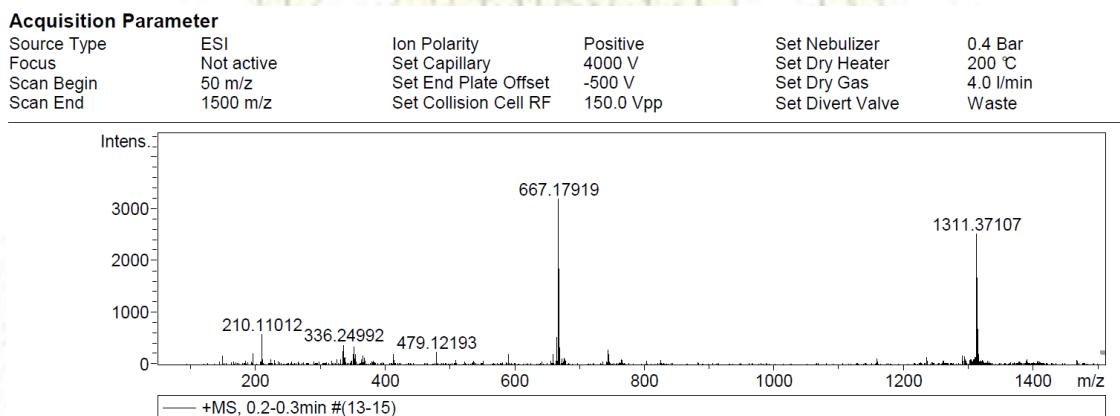


รูป 3.3 ¹H NMR Spectrum ของโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

3.1.1.1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค Mass spectrometry

จาก Mass spectrum จะพบว่า base peak มีค่า $m/z = 1311.37107$ g/mol ซึ่งเป็นน้ำหนักของไอออนโมเลกุล $[M+Na]^+$ และน้ำหนักของไอออนโมเลกุลโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน จากการคำนวณเท่ากับ 1289.377 g/mol ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry ESI โหมดประจุบวก จะมีการใช้สารให้ประจุบวก เช่น Na^+ , K^+ อยู่ในสารละลาย แล้วฉีดเข้าไปในสารที่ต้องการวิเคราะห์ เพื่อให้สารนั้นมีประจุบวกไปติดอยู่ ทำให้เกิดสัมพรรคภาพ (affinity) กับ Na^+ ดังนั้นจึงเกิดการรวมตัวของ $[\beta\text{-cyclodextrin-Na}]^+$ นั้นเอง

ซึ่งถ้าเอาค่า m/z ของ base peak - m/z ของ Na คือ $1311.37107 - 22.989769 = 1288.37107$ ซึ่งจะมีค่าใกล้เคียงกับค่า m/z ที่ได้จากการคำนวณ (1289.377 g/mol) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สารที่สังเคราะห์ได้คือ โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

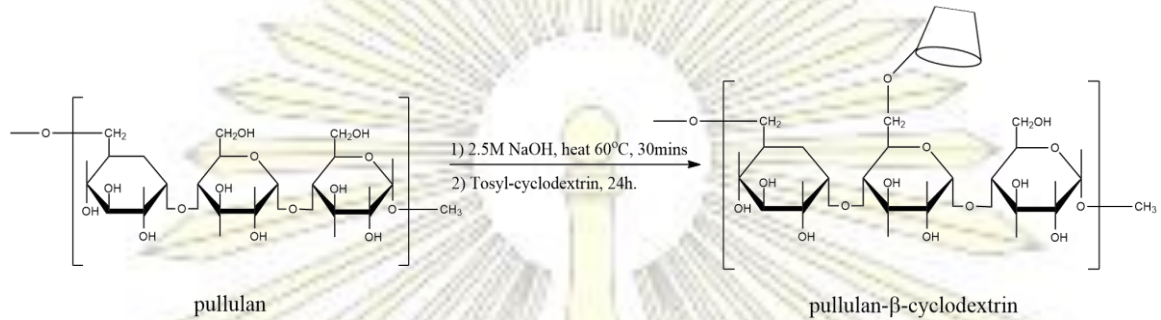


รูปที่ 3.4 mass spectrum ของโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์สารที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิค FTIR, ¹HNMR และ mass spectrometry สามารถพิสูจน์ได้ว่าสารที่สังเคราะห์ได้เป็นโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ถึงแม้ว่า พี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ จะทำปฏิกิริยา

อย่างรวดเร็วกับน้ำ จะอยู่ในรูป inactive ทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อได้ แต่จะมี พี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ บางส่วนที่เข้าไปอยู่ใน สารเชิงซ้อนแบบอินคลูชันของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก จึงทำ ปฏิกิริยากับเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินได้เป็นโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

3.1.1.2 การสังเคราะห์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน



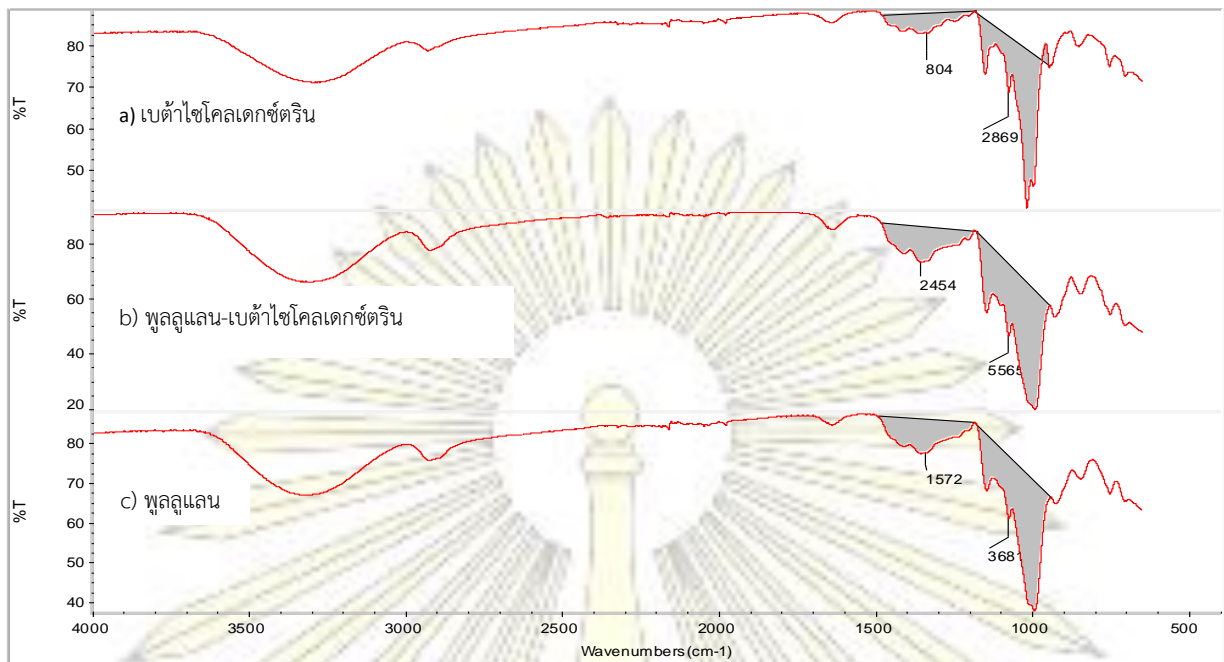
รูปที่ 3.5 วิธีการสังเคราะห์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

3.1.1.2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค FTIR

จาก IR Spectrum ของพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินแสดงในรูป 3.6(b) จะพบว่า IR spectrum ของสาร ที่สังเคราะห์ได้นั้นเหมือนกับ IR spectrum ของ สารตั้งต้นทั้ง 2 ตัว คือ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน และ พุลลูแลนเนื่องจาก ทั้งเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและพุลลูแลน ต่างก็มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมือนกัน คือ มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลที่มี CHO เป็น องค์ประกอบ ดังนั้นในเทคนิค FTIR จึงไม่สามารถพิสูจน์หมู่ฟังก์ชันที่เกิดขึ้นใหม่ได้ แต่สามารถใช้ พื้นที่ใต้พีค เป็นตัว คาดคะเนได้ว่าสารที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็น พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินหรือไม่

จาก IR Spectrum ของ พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน(b) พบว่า wavelength ช่วง $1495-1183\text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_2\text{-OH}$) ควรจะมีค่าน้อยกว่าพื้นที่ใต้พีคของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (a) เพราะเป็นตำแหน่งที่เกิดการสร้างพันธะ ระหว่างโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน และ พุลลูแลน โดยจะเปลี่ยนจากหมูโทซิล (-OTs) เป็น (-O-C) ของพุลลูแลนแต่ จากข้อมูลในกราฟพบว่ามีค่ามากกว่าถึง 3 เท่า เป็นเพราะโครงสร้างของพุลลูแลนมีพันธะ $\text{CH}_2\text{-OH}$ จำนวนมากและ พุลลูแลนไม่มี unit ที่จะสร้างพันธะกับโทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ทำให้ในโครงสร้างของ พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ ตรินมีพื้นที่ใต้พีคช่วง $1495-1183\text{ cm}^{-1}$ เยอะ และช่วง $1183-938\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C) ของพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (b) มีค่ามากกว่าพื้นที่ใต้พีคของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (a) และพุลลูแลน (c) เป็นเพราะว่าในโครงสร้างของพุลลูแลน มี พันธะ C-O-C จำนวนมาก ทำให้ในโครงสร้างของพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินมีพันธะ C-O-C จำนวนมาก

แต่จากข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปได้เลยว่าสารที่สังเคราะห์ได้เป็นพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน เนื่องจากสารที่สังเคราะห์ได้อาจจะแค่ผสมกัน ไม่ได้เกิดพันธะต่อกัน จึงต้องไปทำการพิสูจน์ด้วยวิธีอื่น



รูปที่ 3.6 Infrared spectrum ของพูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

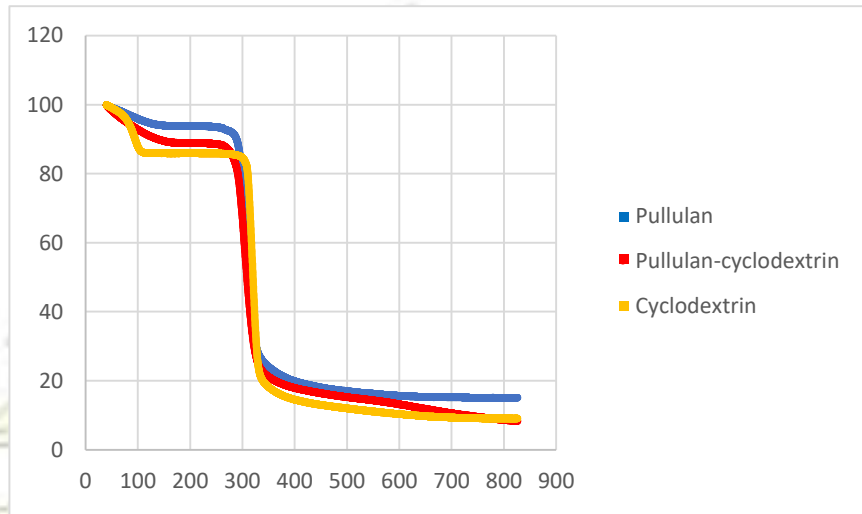
3.1.1.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค TGA

สาร	ค่าการสลายตัว (% weight loss)	
	39-120°C	120-800°C
พูลลูแลน	5.053	79.687
พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	8.851	82.403
เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	13.976	76.92

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงค่าการสลายตัวที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆของสารทั้ง 3 ชนิด

จาก Thermogram ของ สารทั้ง 3 ชนิดจะพบว่ามี การสูญเสียความร้อนที่ช่วงอุณหภูมิ 39-120°C เป็นการสูญเสียของน้ำที่เกิดจากสารได้ดูดซึมน้ำเข้าไป และเกิดการสลายพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลในพูลลูแลน, เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน และ thermogram ของพูลลูแลนพบว่ามี การสลายตัวอย่างรวดเร็วที่ช่วงอุณหภูมิ 280-330°C ค่าการสลายตัวเท่ากับ 68.63% ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของวงน้ำตาลและสายโซ่โพลิเมอร์ขนาดใหญ่ (macromolecule chain) ของพูลลูแลน และ thermogram ของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน จะพบช่วงการสลายตัวอย่างรวดเร็วที่ช่วงอุณหภูมิ 300-335°C ค่าการสลายตัวเท่ากับ 71.57% ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของวงน้ำตาล ซึ่งจะอยู่ในช่วงการหลอมเหลวของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (melting point ที่ 327°C) และ thermogram ของพูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน พบช่วงการสลายตัวอย่างรวดเร็วที่ช่วงอุณหภูมิ 260-330°C ค่าการสลายตัวเท่ากับ 73.90% ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการสลายตัวของ พูลลูแลนเพราะมีช่วงการสลายตัวที่ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สารที่สังเคราะห์ได้ไม่ใช่ พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งคาดว่าในขั้นการสังเคราะห์พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ที่ใช้โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน มาทำปฏิกิริยากับพูลลูแลน โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย ในขั้นตอนนี้

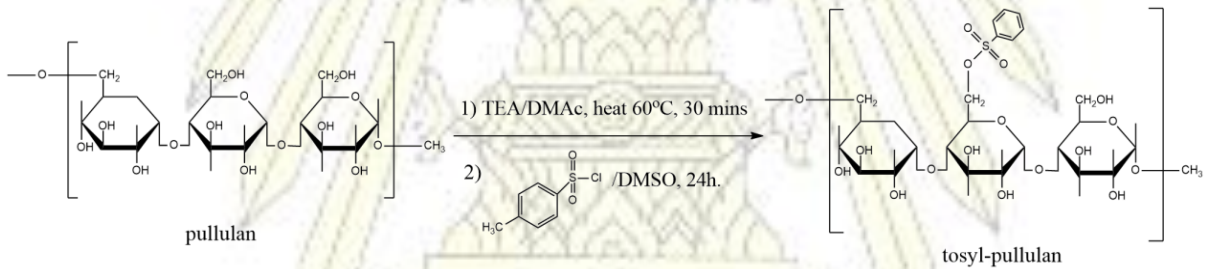
โทซิลโน โทซิล-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ทำปฏิกิริยากับน้ำ ทำให้อยู่ในรูปที่ไม่ทำปฏิกิริยา จึงไม่มี Nucleophile ที่จะทำปฏิกิริยากับพุลลูแลน ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินได้



รูปที่ 3.7 Thermogram ของ พุลลูแลน, พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน และ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

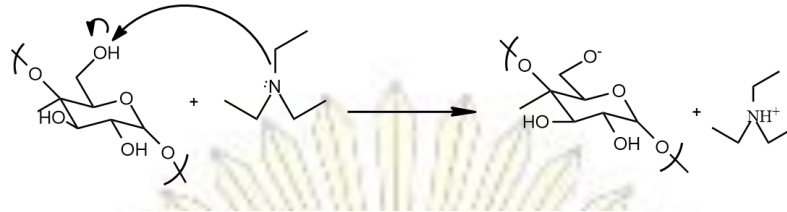
3.1.2 วิธีที่ 2 ตัวทำละลายเป็นไดเมทิลอะเซตาไมด์

3.1.2.1 ปฏิกิริยาโทซิลเลชันของการสังเคราะห์โทซิล-พุลลูแลน

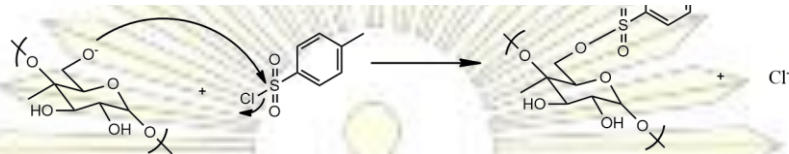


รูปที่ 3.8 วิธีการสังเคราะห์โทซิล-พุลลูแลน

จากผลการทดลองพบว่าพุลลูแลนละลายในไดเมทิลอะเซตาไมด์ได้ดี ได้สารละลายไม่มีสี และเติมไตรเอทิลลามีนลงไป เพื่อดีโปรตอนหมู่ไฮดรอกซิลของพุลลูแลน เพื่อที่จะให้เกิดเป็น nucleophile (O) พร้อมทำปฏิกิริยากับพี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ เกิดเป็นโทซิล-พุลลูแลน ดังรูปที่ 3.9 และ 3.10 โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปอบให้แห้ง ได้เป็นแผ่นฟิล์มไม่มีสี น้ำหนัก 4.8573 กรัม มี yield = 97%



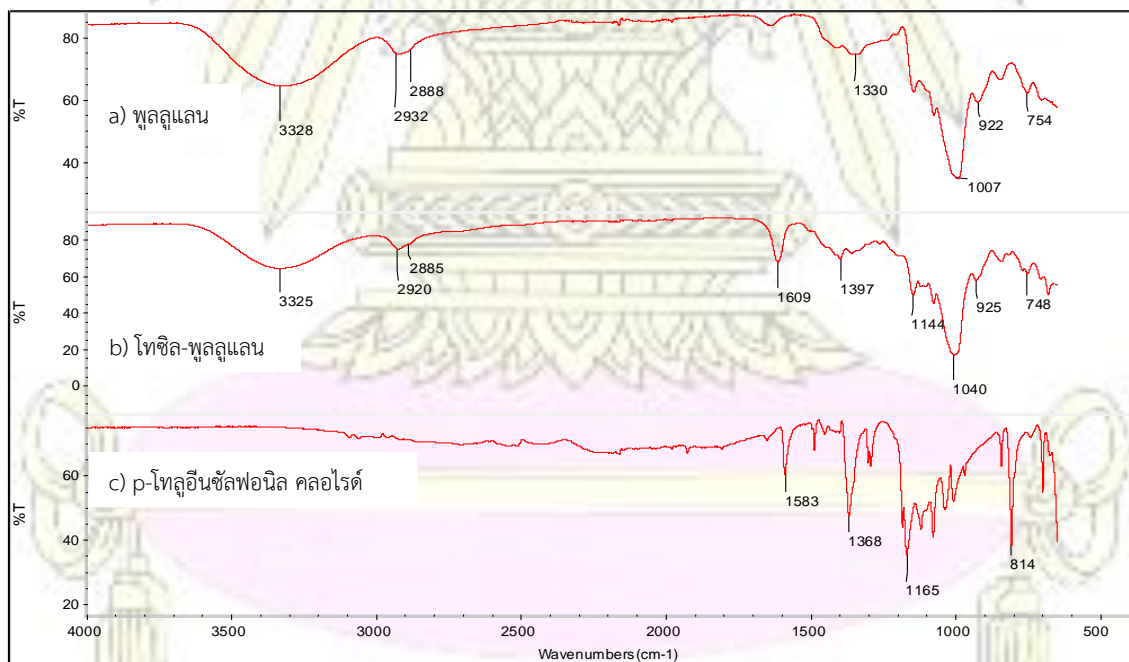
รูปที่ 3.9 สมการการเกิด deprotonate ของพอลลูแลนด้วยไตรเอทิลลามีน



รูปที่ 3.10 สมการการเกิดปฏิกิริยาแทนที่ของ p-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์

3.1.2.1.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค FTIR

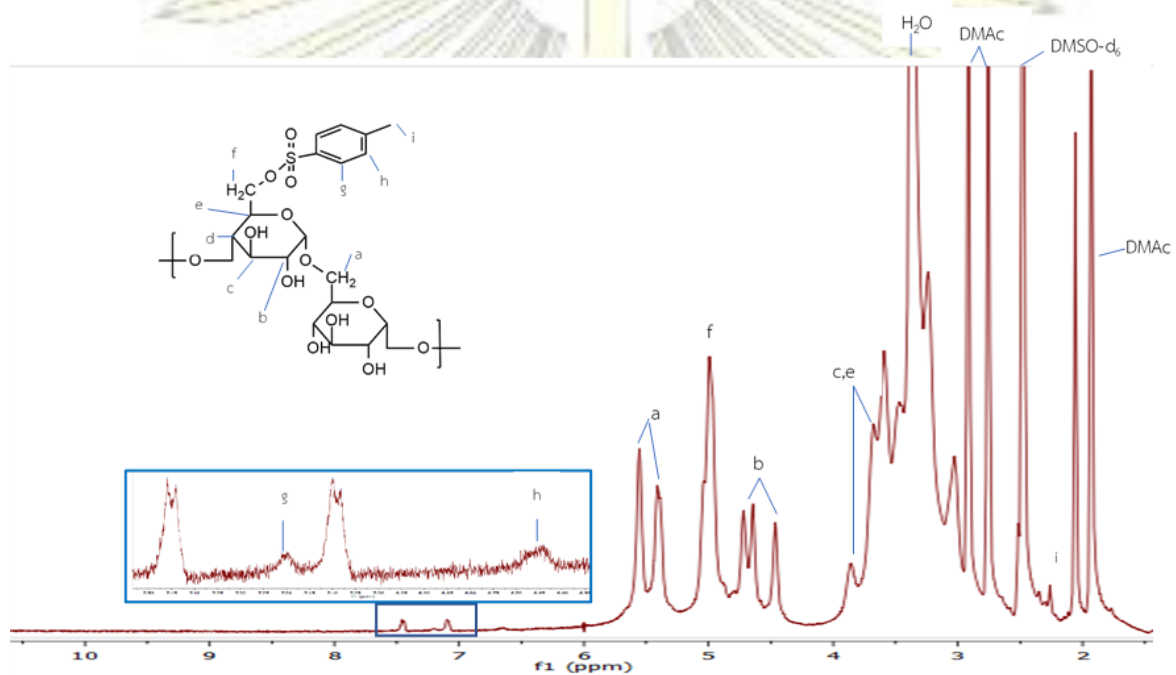
จาก IR Spectrum ของโทซิล-พอลลูแลน แสดงในรูป 3.11(b) จะพบพีคที่ตำแหน่ง 3325 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคเอกลักษณ์ของหมู่ไฮดรอกซิลของพอลลูแลน ที่ตำแหน่ง $2920, 2885\text{ cm}^{-1}$ เป็นของ C-H stretching sp^3 ของพอลลูแลน ที่ตำแหน่ง 1609 cm^{-1} จะเป็นของหมู่อะโรมาติก C=C stretching ของ p-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ที่ตำแหน่ง 1397 cm^{-1} เป็นของ C-O-H blending ของพอลลูแลน และที่ตำแหน่ง 1144 cm^{-1} เป็นของหมู่ S=O ที่ตำแหน่ง 1040 cm^{-1} เป็นของ C-H stretching sp^2 ของพอลลูแลน และที่ตำแหน่ง $925, 748\text{ cm}^{-1}$ เป็นพันธะของ α -(1,6)-D-glucosidic และ α -(1,4)-D-glucosidic ของพอลลูแลนตามลำดับ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสารที่สังเคราะห์ได้คือโทซิล-พอลลูแลน



รูปที่ 3.11 Infrared spectrum ของโทซิล-พอลลูแลน

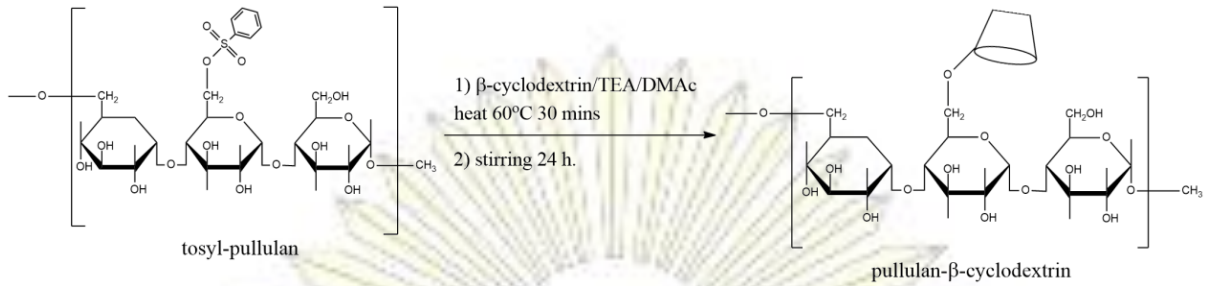
3.1.2.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค ^1H NMR

จาก ^1H NMR Spectrum ของโทซิล-พุลลูแลน ที่ยังไม่ผ่านการไดอะไลซิส เนื่องจากต้องนำสารไปทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไป แสดงในรูป 3.12 ซึ่งการทดลองนี้ใช้ตัวทำละลายเป็น DMSO-d_6 พบพีคที่ 2.5 ppm และพีคที่ 3.38 ppm เป็นพีคของน้ำ พีคที่ 2.92, 2.76 ppm เป็นพีค NCH_3 ในตัวทำละลายไดเมทิลอะเซตาไมด์ พีคที่ 1.93 ppm เป็นพีค CH_3OH ในตัวทำละลายไดเมทิลอะเซตาไมด์ และพีคที่ตำแหน่ง 7.21 และ 6.67 ppm มีลักษณะเป็น doublet ซึ่งเป็นพีคของไฮโดรเจนในวงอะโรมาติกของหมู่โทซิล และจะเห็นได้ว่ายังคงเหลือ พี-โทลูอินซัลฟอนิล คลอไรด์ ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาที่ 7.46 และ 7.10 ppm และพีค 5.55 และ 5.41 ppm เป็นพีคเอกลักษณ์ของ α -(1,4)-D-glucosidic และ พีคที่ 4.99 ppm เป็นพีคเอกลักษณ์ของ α -(1,6)-D-glucosidic ของ anomeric proton และพีคที่ 2.48 ppm เป็นพีคของ CH_3 ของหมู่โทซิล ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสารที่สังเคราะห์ได้คือโทซิล-พุลลูแลน



รูปที่ 3.12 ^1H NMR spectrum ของโทซิล-พุลลูแลน

3.1.2.2 การสังเคราะห์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน



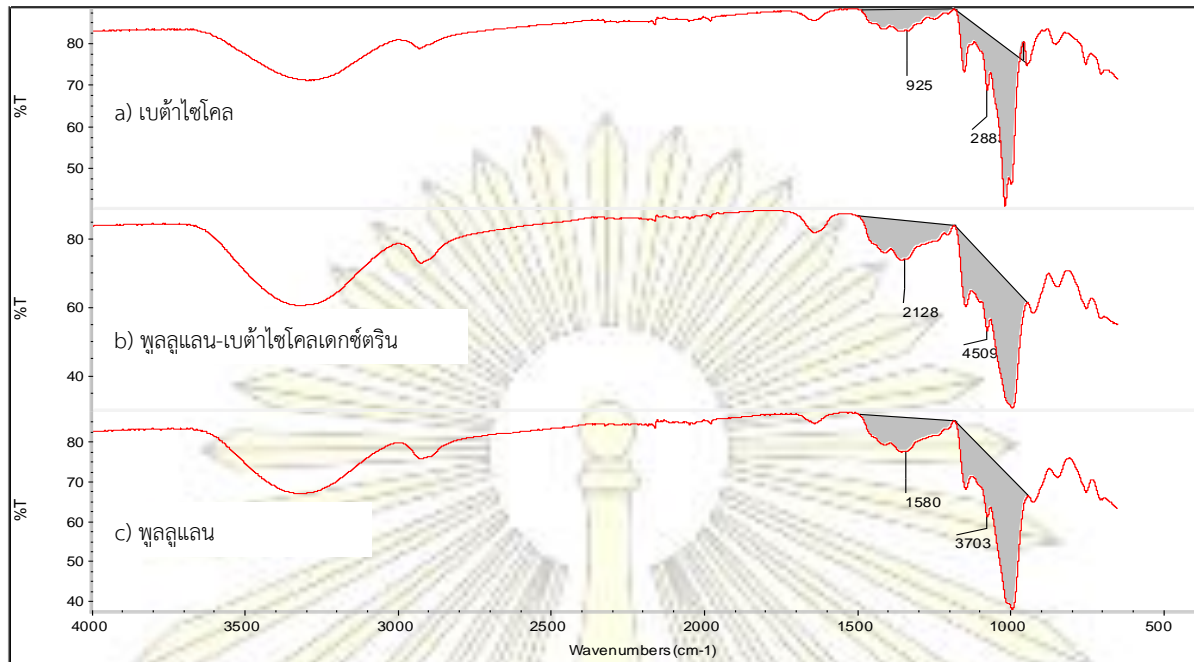
รูปที่ 3.13 วิธีการสังเคราะห์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

3.1.2.2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค FTIR

จาก IR Spectrum ของพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน แสดงในรูป 3.14(b) จะพบว่า IR spectrum ของสารที่สังเคราะห์ได้นั้นเหมือนกับ IR spectrum ของสารตั้งต้นทั้ง 2 ตัว คือ เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและพุลลูแลน เนื่องจากทั้งเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและพุลลูแลน ต่างก็มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมือนกัน คือ มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลที่มี CHO เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในเทคนิค FTIR จึงไม่สามารถพิสูจน์หมู่ฟังก์ชันที่เกิดขึ้นใหม่ได้ แต่สามารถใช้ พื้นที่ใต้พีคเป็นตัวคาดคะเนได้ว่าสารที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็น พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน หรือไม่

จาก IR Spectrum ของ พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (b) พบว่าที่ช่วง wavelength $1495-1180\text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_2\text{-OH}$) ควรจะมีค่าน้อยกว่าพื้นที่ใต้พีคของ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (a) เพราะเป็นตำแหน่งที่เกิดการสร้างพันธะระหว่าง โทซิล-พุลลูแลน และ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน โดยจะเปลี่ยนจากหมู่โทซิล (-OTs) เป็น (-O-C) ของ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน แต่จากข้อมูลในกราฟพบว่ามีค่ามากกว่าถึง 3 เท่า เป็นเพราะโครงสร้างของพุลลูแลน มีพันธะ $\text{CH}_2\text{-OH}$ จำนวนมากและเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ไม่กี่ยูนิตที่จะสร้างพันธะกับ โทซิล-พุลลูแลน ทำให้ในโครงสร้างของ พุลลูแลน -เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน มีพื้นที่ใต้พีคช่วง $1495-1183\text{ cm}^{-1}$ มาก และช่วง $1180-940\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C) ของ พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (b) มีค่ามากกว่าพื้นที่ใต้พีคของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (a) และ พุลลูแลน (c) เป็นเพราะว่าในโครงสร้างของพุลลูแลน มีพันธะ C-O-C จำนวนมาก ทำให้ในโครงสร้างของพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน มีพันธะ C-O-C จำนวนมาก

แต่จากข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปได้เลยว่าสารที่สังเคราะห์ได้เป็นพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน เนื่องจากสารที่สังเคราะห์ได้อาจจะแค่ผสมกันเฉยๆ ไม่ได้เกิดพันธะต่อกัน จึงต้องไปทำการพิสูจน์ด้วยวิธีอื่น



รูป 3.14 Infrared spectrum ของพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

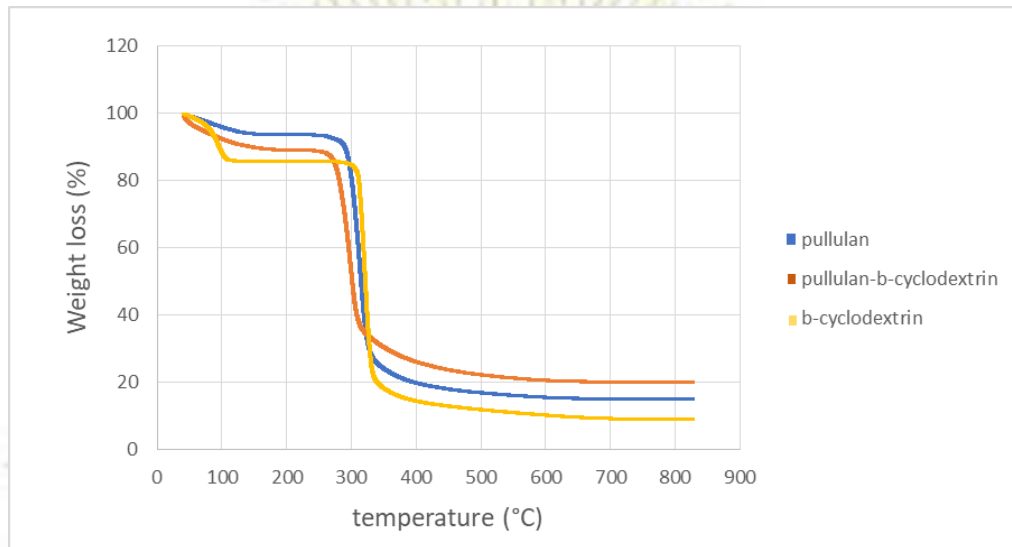
3.1.2.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค TGA

สาร	ค่าการสลายตัว (% weight loss)		Td
	39-120°C	120-800°C	
พุลลูแลน	5.053	79.687	292
พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	8.851	82.403	274
เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน	13.976	76.92	309

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงค่าการสลายตัวที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆและ Td ของสารทั้ง 3 ชนิด

จาก Thermogram ของ สารทั้ง 3 ชนิดจะพบว่ามี การสูญเสียความร้อนที่ช่วงอุณหภูมิ 39-120°C เป็นการสูญเสียของน้ำที่เกิดจากสารได้ดูดซึมน้ำเข้าไป และเกิดการสลายพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลใน พุลลูแลน, เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน และ thermogram ของพุลลูแลน พบว่ามี การสลายตัวอย่างรวดเร็วที่ช่วงอุณหภูมิ 280-330°C ค่าการสลายตัวเท่ากับ 68.63% ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของวงน้ำตาลและสายโซ่โมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule chain) ของพุลลูแลน และ thermogram ของเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินจะพบช่วงการสลายตัวอย่างรวดเร็วที่ช่วงอุณหภูมิ 300-335°C ค่าการสลายตัวเท่ากับ 71.57% ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของวงน้ำตาล ซึ่งจะอยู่ในช่วงการหลอมเหลวของเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (melting point เท่ากับ 327°C) และ thermogram ของ พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน พบช่วงการสลายตัวอย่างรวดเร็วที่ช่วงอุณหภูมิ 270-316°C ค่าการสลายตัวเท่ากับ 58.55% เกิดจากการสลายตัวของ pullulan และน่าจะมีการสลายตัวอีกช่วงอุณหภูมิหนึ่ง แต่ไม่เห็นพีกอย่างชัดเจนเพราะ พุลลูแลนและเบต้าไซโคลเดกซ์ตริน เกิดการ coupling กัน และ สารที่สังเคราะห์ได้มี เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน สร้างพันธะกับพุลลูแลนน้อย จึงไม่เห็นช่วงอุณหภูมิการสลายตัวช่วงที่ 3 อย่างชัดเจน

เมื่อวิเคราะห์ค่า T_d ที่ได้จาก thermogram ของสารทั้ง 3 ชนิดจากราย 3.2 พบว่า สารทั้ง 3 ชนิดมีค่า T_d ที่แตกต่างกัน ดังนั้นสารที่สังเคราะห์ได้มีคุณสมบัติทางความร้อน (thermal properties) ที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งค่า T_d หรือ อุณหภูมิที่สูญเสียน้ำหนักของพอลิเมอร์ไป 5% นั้นสามารถบอกถึงความเสถียรของต่อความร้อนของพอลิเมอร์ได้ แสดงว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีโมโนเมอร์เป็นองค์ประกอบที่ไม่เหมือนกัน ทำให้มีคุณสมบัติทางความร้อนที่ต่างกัน^[3]



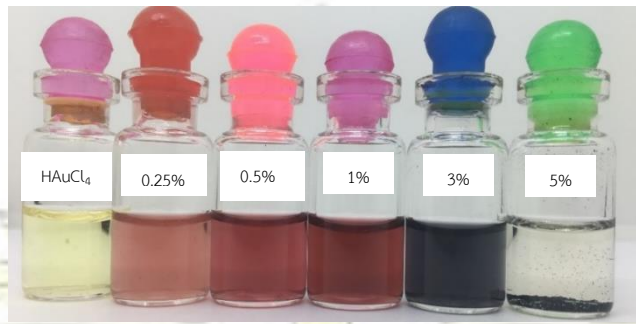
รูปที่ 3.15 Thermogram ของพุลลูแลน, พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินและ เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

3.2 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน

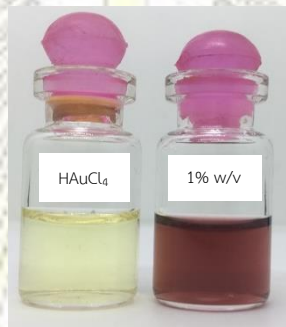
ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (AuNPs) สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยารีดักชันของ โกลด์ไอออนจาก Au^{3+} ถูกรีดิวซ์กลายเป็น Au^0 ด้วยการเติมพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ซึ่งในการควบคุมขนาด และรูปร่าง (morphology) ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรนั้น จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิเมอร์และ สารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรอเรต ($HAuCl_4$) อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยของ Laksee และคณะ^[23] ได้หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่จะสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ปรับเสถียรด้วย พุลลูแลน คือ ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรอเรต 1.0 mM โดยใช้ 0.5% (w/v) โซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 60 นาที ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการหาความเข้มข้นพอลิเมอร์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยจะทดลองที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 3 และ 5% w/v แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบ (LSPR) หรือกราฟการดูดกลืนของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 520 และ 650nm เพราะเป็นความยาวคลื่นที่ดูดกลืนมากที่สุดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (λ_{max}) และที่ความยาวคลื่น 520 nm จะสัมพันธ์กับอนุภาคอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาดเล็ก ในขณะที่ความยาวคลื่น 650 nm จะสัมพันธ์กับอนุภาคขนาดใหญ่

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำโซเดียมไฮดรอกไซด์มาทำปฏิกิริยากับพอลิเมอร์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน หมู่ไฮดรอกซิลของพอลิเมอร์จะถูกดีโพรโตนเนตได้เป็น O^- เพื่อให้พร้อมที่จะเป็น reducing agent ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และเมื่อเติมสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรอเรต พบว่าสีของสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรอเรตเปลี่ยนจากสารละลายสีทอง เป็นสารละลายสีแดงทับทิม แสดงว่าเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอโรอเรตขึ้น แต่พบว่าสีของสารละลายจะไม่เหมือนกัน คือ ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 0.25,

0.5 และ 1% w/v จะมีสีสารละลายเป็นสีแดงทับทิม ในขณะที่ที่ความเข้มข้น 3% จะเป็นสารละลายสีม่วง และที่ความเข้มข้น 5% จะเป็นสารละลายไม่มีสี มีตะกอนสีดำ ดังแสดงในรูป 3.16 และ 3.17



รูปที่ 3.16 รูปสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอูเรต และสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 0.25 – 5% w/v



รูปที่ 3.17 รูปสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอูเรต และสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่ความเข้มข้น 1% w/v

3.2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy

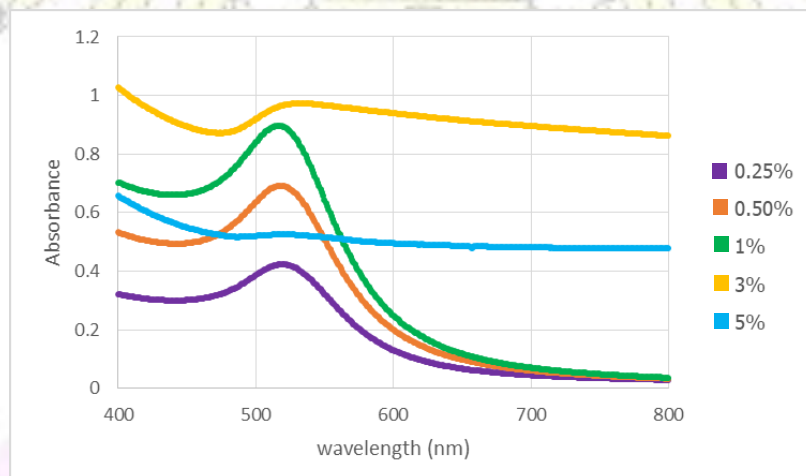
นำสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm พบว่าค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้นของพอลิเมอร์ คือ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1% w/v จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่มากขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงความยาวคลื่น 520 nm พิกมีลักษณะ sharp และไม่มีการการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 650 nm แสดงว่าอนุภาคมีขนาดเล็ก ไม่ได้เกิดการรวมตัวกัน (aggregation) ซึ่งจะสัมพันธ์กับสีของสารละลาย ได้เป็นสารละลายสีแดงทับทิม ในขณะที่ความเข้มข้น 3% w/v จะมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 531 ซึ่งเกิด red shift ขึ้นและพิกมีลักษณะ broad ที่ 650 nm แสดงว่าอนุภาคเกิดการรวมตัวกัน ได้อนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งจะสัมพันธ์กับสีของสารละลาย ได้เป็นสารละลายสีม่วง และที่ความเข้มข้น 5% w/v จะมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-800 nm พิกที่ได้มีลักษณะ broad แสดงว่าเกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคได้เป็นอนุภาคขนาดใหญ่มีน้ำหนักมาก จึงตกตะกอน ดังแสดงในรูป 3.17 และเมื่อนำสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอูเรตที่เป็นสารตั้งต้นมาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นในช่วง 300-400 nm เท่านั้น แสดงว่าสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ที่สังเคราะห์ได้เป็นอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เพราะมีการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 520 และ 650 nm ดังแสดงในรูป 3.18

ซึ่งช่วงการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นต่างๆของสารละลาย สามารถบอกขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้^[28] ดังตารางที่ 3.3 ดังนั้นสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคล

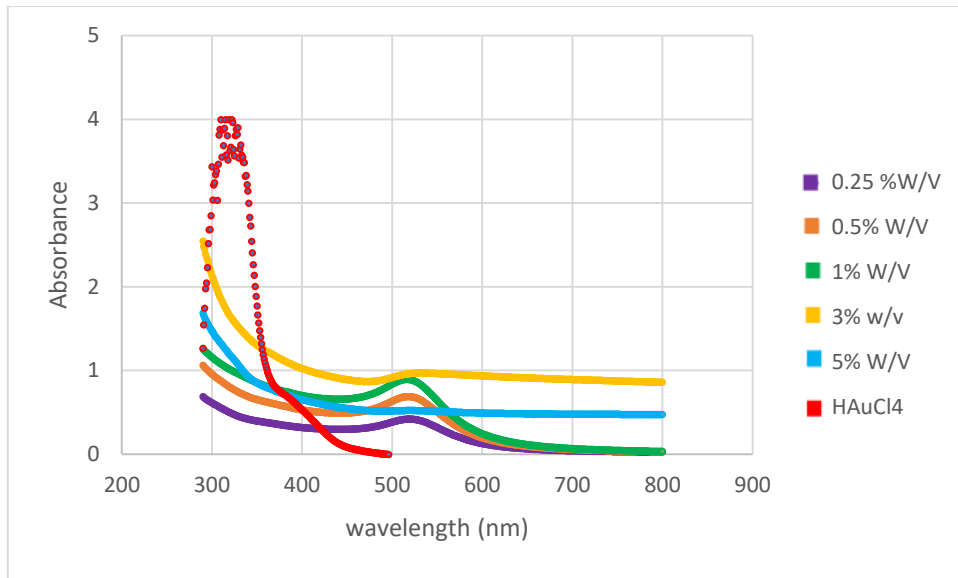
เดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้น 1% w/v ที่มีการดูดกลืนที่มีความยาวคลื่น 520 nm น่าจะมีขนาดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรประมาณ 5-15 nm

Diameter of AuNPs (nm)	Peak SPR wavelength (nm)
5	515-520
10	515-520
15	520
20	524
30	526
40	530
50	535
60	540
80	553
100	572
150	Not Measured
200	Not Measured
250	Not Measured
300	Not Measured
400	Not Measured

ตารางที่ 3.3 ตารางแสดงขนาดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีการดูดกลืนที่มีความยาวคลื่นต่างๆ



รูปที่ 3.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 0.25-5% w/v

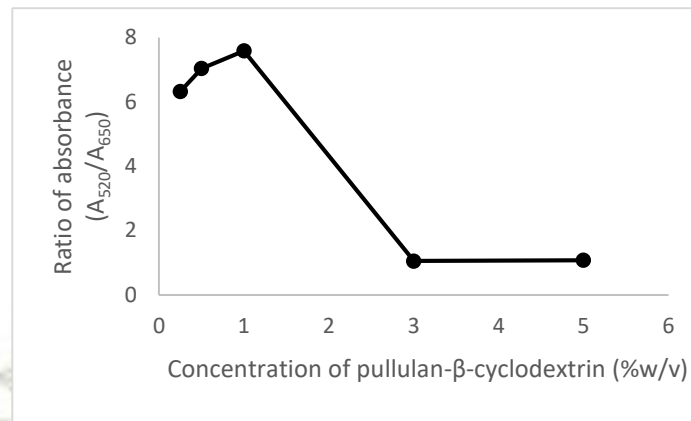


รูปที่ 3.19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอโรอูเรต และสารละลายของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วย พอลิวินิลแอลกอฮอล์-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ที่มีความเข้มข้น พอลิวินิลแอลกอฮอล์-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 0.25-5% w/v

เมื่อหาค่าอัตราส่วน A_{520}/A_{650} ของสารละลาย เพื่อที่จะเปรียบเทียบขนาด ความเสถียรของอนุภาค โดยสารละลายที่มีค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงมากที่สุด จะมีขนาดเล็กและความเสถียรมากที่สุด จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นพอลิเมอร์ 1% w/v มีค่าอัตราส่วน A_{520}/A_{650} มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.19

ความเข้มข้นพอลิวินิลแอลกอฮอล์-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (%w/v)	Absorbance ₅₂₀	Absorbance ₆₅₀	$\frac{\text{Absorbance}_{520}}{\text{Absorbance}_{650}}$
0.25	0.42345	0.066973	6.3227
0.5	0.691161	0.09818	7.0397
1	0.892687	0.117666	7.58662
3	0.966961	0.914853	1.05696
5	0.525515	0.486255	1.08074

ตารางที่ 3.4 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารในช่วงความเข้มข้น 0.25-5% w/v



รูปที่ 3.20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า A_{520}/A_{650}

ดังนั้นในการหาความเข้มข้นของพอลิเมอร์พุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร คือที่ ความเข้มข้น 1% w/v เพราะมีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 520 nm และค่า A_{520}/A_{650} สูงที่สุด อีกทั้งสารละลายที่ได้เป็นสารสีแดงทับทิม

โดยสารละลายสีแดงทับทิมของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรนั้นเกิดจาก เมื่อคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าส่องผ่านอนุภาค กลุ่มอิเล็กตรอน (electron cloud) ที่ถูกจำกัดอยู่ในอนุภาคก็จะเกิดการสั่นรวม (collective oscillation) และเมื่อคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอกมีความยาวคลื่นเดียวกับการสั่นของอิเล็กตรอนบนผิวของอนุภาค ก็จะเกิดการดูดกลืนพลังงานจากแสง และเปลี่ยนไปอยู่ในรูปพลังงานความร้อน (absorption) และในขณะเดียวกัน ก็จะเกิดการดูดกลืนและคายแสงความยาวคลื่นเดิมกลับออกมาในทิศทางแบบสุ่ม (scattering) ดังนั้น ถ้าคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ส่องผ่านมามีความยาวคลื่น 520 nm อนุภาคก็จะเกิดการดูดกลืน และคายพลังงานที่ความยาวคลื่น 520 nm เช่นเดียวกัน โดยอนุภาคจะดูดกลืนสีในช่วงความยาวคลื่น 500-560 nm ซึ่งก็คือสีเขียว ทำให้เกิดการสะท้อนสีแดงออกมา สารละลายจึงเป็นสีแดง ในขณะที่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ส่องผ่านมามีความยาวคลื่น 650 nm อนุภาคก็จะเกิดการดูดกลืน และคายพลังงานที่ความยาวคลื่น 650 nm ทำให้อนุภาคจะดูดกลืนสีในช่วงความยาวคลื่น 650-780 nm ซึ่งก็คือสีแดง ทำให้เกิดการสะท้อนเขียวอมน้ำเงินออกมา สารละลายจึงเป็นสีเขียวอมน้ำเงิน ซึ่งในบางครั้งจะเห็นเป็นสีม่วงเข้ม ดังนั้นหลักการเห็นสีของสารละลายของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรนั้นเกิดจากสมบัติ Localized surface plasmon resonance และ complementary color นั้นเอง

แต่ในบางครั้ง สารละลายสีม่วงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรก็เกิดจากการรวมตัวกัน (aggregation) ของอนุภาค เพราะพอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่ reducing stabilizing และ capping ของอนุภาค เมื่อได้รับความร้อนนานๆ พอลิเมอร์ก็จะสลายตัวทำให้พื้นที่ผิวอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และมีโอกาสชนมาเจอกัน จึงเกิดการรวมตัว ทำให้มีอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น เลยได้เป็นสารละลายสีม่วง



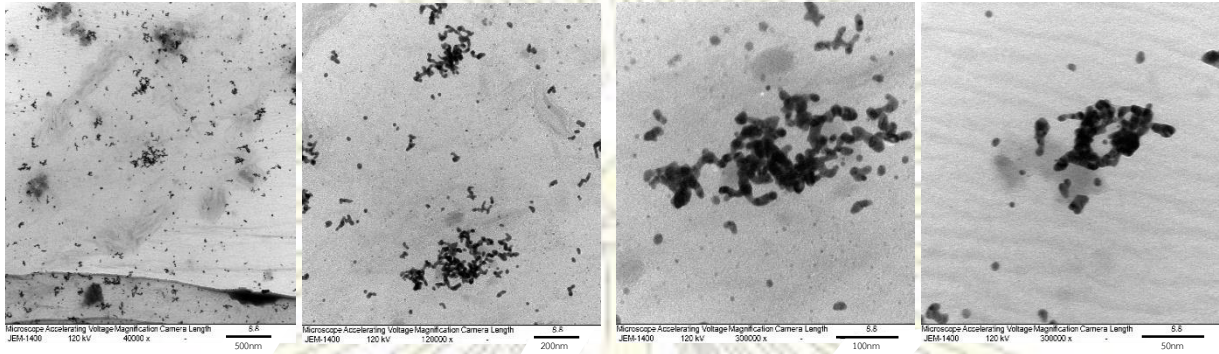
รูปที่ 3.21 รูปแสดง complementary color

3.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิค Transmission Electron Microscopy (TEM)

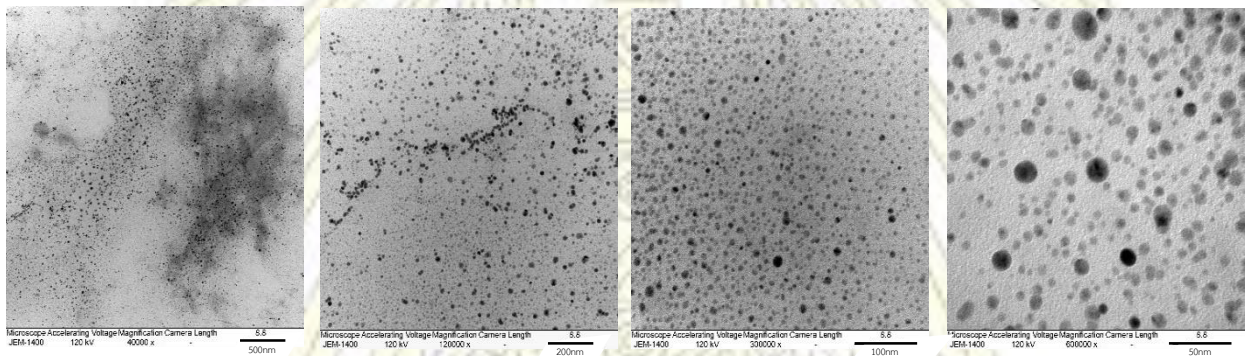
ในการพิสูจน์รูปร่างลักษณะ (morphology) และขนาดของตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ stabilized ด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค TEM ซึ่งในการทดลองได้นำสารละลายพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ที่ความเข้มข้น 1 และ 3% w/v ไปทดสอบกับเทคนิค TEM โดยรูป TEM ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินของทั้ง 2 สภาวะ โดยมีกำลังขยายที่ 40,000x (scale bar 500nm), 120,000x (scale bar 200nm), 300,000x (scale bar 100nm) และ 600,000x (scale bar 50nm) ตามลำดับ

รูป TEM ของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน (ความเข้มข้นพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน 1%w/v สารละลายสีแดง) ที่กำลังขยาย 120,000x พบว่าจะมีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอ จะมีรูปร่างของอนุภาคเป็นจุดๆขนาดเล็ก และเมื่อใช้กำลังขยายที่ใหญ่ขึ้น เช่น ที่กำลังขยาย 600,000x จะพบว่ารูปร่างของอนุภาคจะเป็นวงกลมชัดเจน ซึ่งการประมาณค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (The particle size distribution) อยู่ในช่วง 1-28 nm แต่จะพบขนาดอนุภาคในช่วง 6-22 nm มากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 3.22 ซึ่งขนาดอนุภาคปกติจะอยู่ในช่วง 11 ± 5 nm^[23] แสดงว่าในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ได้ให้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เหมาะสมที่จะเป็นตัวนำส่งยา ในขณะที่รูป TEM ของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน (ความเข้มข้นพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน 3%w/v สารละลายสีม่วง) ที่กำลังขยาย 120,000x พบว่าจะมีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอ จะมีรูปร่างของอนุภาคจะมีลักษณะเป็นเส้นตรง เกาะกลุ่มกันจำนวนมาก และเมื่อใช้กำลังขยายที่มากขึ้น เช่น ที่กำลังขยาย 600,000x จะพบว่ารูปร่างของอนุภาคจะเป็นวงกลมที่ซ้อนกันจนมีลักษณะเป็นเส้นๆ แสดงว่าอาจเกิดจากการสลายตัวของพอลิเมอร์ที่ปรับเสถียรอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ทำให้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เคลื่อนที่มาเจอกันแล้วเกิดการรวมตัวขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.23 และจาก EDX spectrum ซึ่งจะบอกธาตุที่เป็นองค์ประกอบในอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน พบว่ามีพีคของ C, O, Si, Au, Mg, Fe, Na และ Cu ซึ่งธาตุ C และ O เกิดจากพอลิเมอร์พอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน เพราะเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่มี C H O เป็นองค์ประกอบหลัก และ Au ที่พบแสดงว่าตัวนำส่งยาที่สังเคราะห์ได้มีองค์ประกอบของ Au และ Cu มาจาก copper grid ซึ่งเป็นวัสดุที่ใช้ในการตรวจวัดด้วยเทคนิค TEM และ Si, Mg, Fe

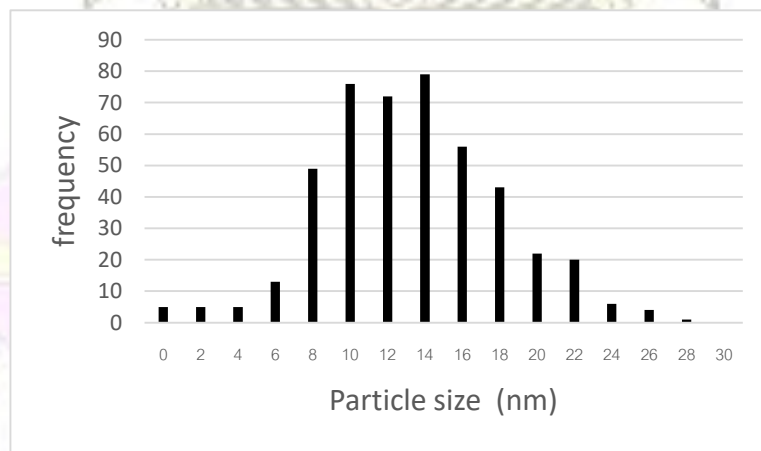
และ Na เกิดจาก impurity เป็นธาตุที่อยู่บน stage เมื่อยิงแสงลงไป ทำให้เกิดการ scattering จึงสามารถตรวจวัดเจอธาตุดังกล่าว



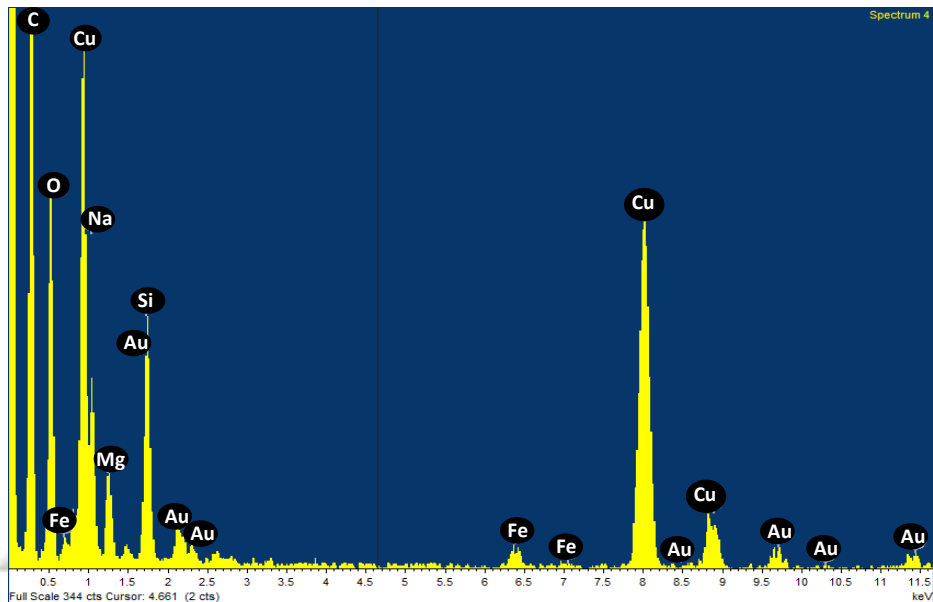
รูปที่ 3.22 รูป TEM ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นของพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 3% v/w ที่กำลังขยาย 40000x 120000x และ 300000x



รูปที่ 3.23 รูป TEM ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่มีความเข้มข้นของพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 1% v/w ที่กำลังขยาย 40000x 120000x 300000x และ 600000x



รูปที่ 3.24 กราฟแสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (The particle size distribution)



รูปที่ 3.25 รูป EDX spectrum ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ที่มีความเข้มข้นของพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน 1% v/w (สารละลายสีแดง)

3.2.4 การพิสูจน์หาปริมาณยาดีออกโซรูบิซินที่อยู่ในตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน (% Drug loading)

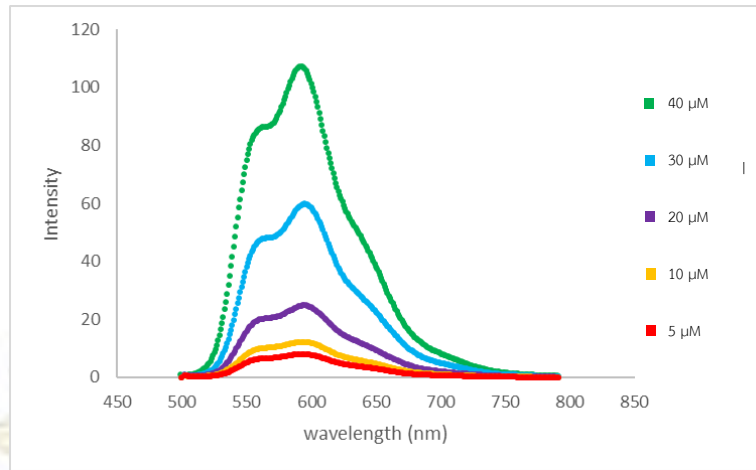
ในการหาปริมาณยาดีออกโซรูบิซิน ที่เข้าไปอยู่ในตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน สามารถทำได้โดยวัดปริมาณยาดีออกโซรูบิซินในน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอน (supernatant) ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน เพื่อหาปริมาณยาดีออกโซรูบิซิน ที่เหลืออยู่ในสารละลายด้วยเทคนิค fluorescent spectroscopy จากการทำการ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานยาดีออกโซรูบิซิน

จากกราฟ calibration curve ของสารมาตรฐานยาดีออกโซรูบิซิน ที่ความเข้มข้น 5 10 20 30 และ 40 μM พบว่าได้สมการเส้นตรงเป็น $y=2.2259x - 12.651$ และมีค่า $R^2 = 0.9258$

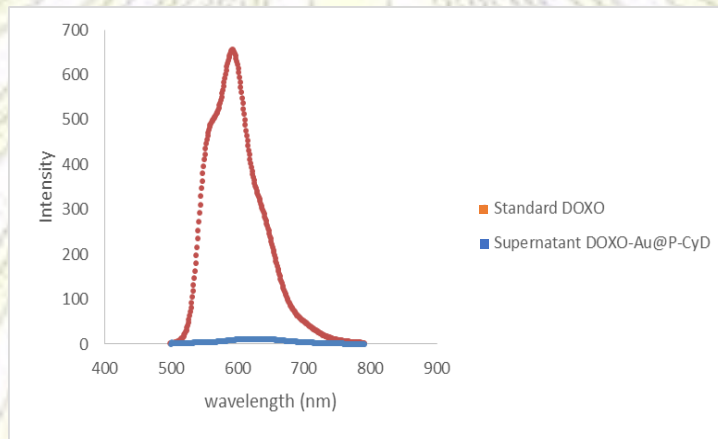
เมื่อนำค่า fluorescent intensity ของสารละลายตัวอย่างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของยาดีออกโซรูบิซินของน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนได้เท่ากับ 8.0105 และเมื่อนำไปคำนวณหาค่า % drug loading efficiency ดังสมการ

$$\% \text{ drug loading efficiency} = \frac{\text{Total amount of DOX added} - \text{amount of DOX in supernatant}}{\text{Total amount of DOX added}} \times 100$$

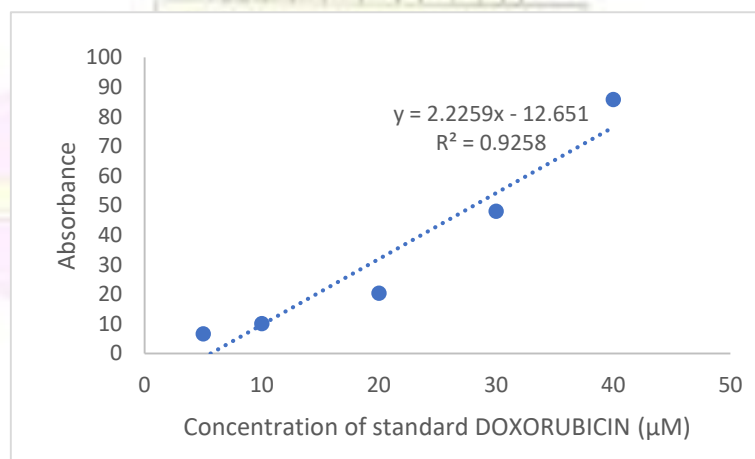
พบว่าได้เท่ากับ 98.39% แสดงว่ายาดีออกโซรูบิซิน สามารถเข้าไปอยู่ใน β -cyclodextrin ที่มีคุณสมบัติเป็นสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชันได้เป็นอย่างดี เพราะเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินมีขนาดหลุมที่พอเหมาะกับยา ทำให้ยาสามารถเข้าไปอยู่บริเวณด้านในได้ จึงมีค่า drug loading ที่สูง



รูปที่ 3.26 กราฟ fluorescence ของสารละลายมาตรฐานยาต่อซอร์ูบิซินที่ความเข้มข้น 5-40 μM



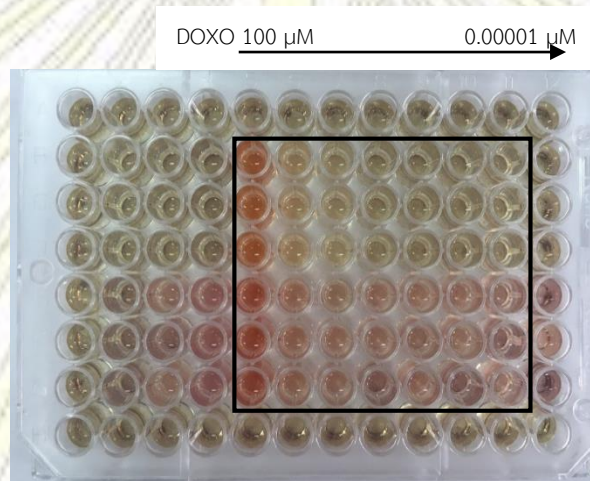
รูปที่ 3.27 กราฟ fluorescence ของสารละลายมาตรฐานยาต่อซอร์ูบิซิน ที่ความเข้มข้น 500 μM และ supernatant ของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาต่อซอร์ูบิซิน ที่มีความเข้มข้น DOXO 500 μM



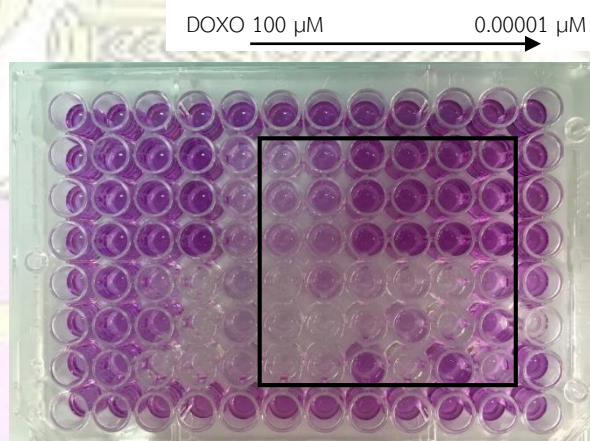
รูปที่ 3.28 กราฟ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานยาต่อซอร์ูบิซิน ที่ความเข้มข้น 5-40 μM

3.2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)

การทดสอบความเป็นพิษของตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลูลูแลน-เบต้าไฮโคลเดกซ์ทรินต่อเซลล์โดยใช้วิธี MTT Assay เป็นการศึกษาการทำงานของตัวนำส่งยาว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มากเพียงใด และมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตมากน้อยเท่าไร (% cell viability) โดยปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตจะส่งผลต่อความเข้มข้นของสีม่วงจาก formazan ซึ่งจะสัมพันธ์กับสีของเซลล์เมื่อทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลูลูแลน-เบต้าไฮโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน และ ยาดีออกซิรูบิซิน ดังรูปที่ 3.29 และ 3.30 กล่าวคือ รูปที่ 3.29 เป็นรูปเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารที่ทดสอบกับ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลูลูแลน-เบต้าไฮโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน และยาดีออกซิรูบิซิน จะเห็นได้ว่าการไล่สีของยาดีออกซิรูบิซินจากสีส้มเข้มไปยังสีส้มอ่อน ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของยาดีออกซิรูบิซิน จากความเข้มข้น 100-0.00001 μM ทำให้หลุมที่มีความเข้มข้นยาดีออกซิรูบิซินมาก จะมีเซลล์รอดชีวิตน้อย ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับ MTT เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงสีของ formazan พบว่า หลุมนั้นจะมีสีม่วงที่อ่อนที่สุด แสดงว่ามีเซลล์รอดน้อยนั่นเอง ดังรูปที่ 3.30



รูปที่ 3.29 รูปแสดง 92 wells plate ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเมื่อทดสอบกับ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลูลูแลน-เบต้าไฮโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน และ ยาดีออกซิรูบิซิน



รูปที่ 3.30 รูปแสดง 92 wells plate ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเมื่อทำปฏิกิริยากับ MTT

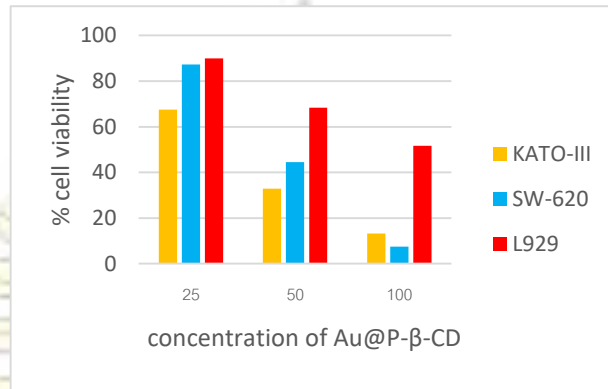
ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) และเซลล์ปกติที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (L929) โดยจะทดสอบตัวนำส่งยาที่มียา DOXO อยู่ด้านใน สารเชิงซ้อนแบบอินคลูชัน หรือ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน เทียบกับยาดีออกซิรูบิซิน แล้วนำไปหาค่า IC_{50} ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5 เพื่อดูประสิทธิภาพของตัวนำส่งยาในการฆ่าเซลล์มะเร็ง โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.5

สาร	Cytotoxicity (IC_{50} (μM))		
	KATO-III	SW-620	L929
ยาดีออกซิรูบิซิน	0.5247	0.1267	3.886
อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน	0.007074	0.1229	0.1186

ตารางที่ 3.5 ตารางแสดงค่า IC_{50} ของยาดีออกซิรูบิซิน และ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซินของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด

ค่า IC_{50} สามารถบอกได้ถึงปริมาณสารที่น้อยที่สุด ที่มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ได้ถึง 50% ดังนั้นเซลล์มะเร็งชนิดใดมีค่า IC_{50} น้อยนั้นแสดงว่า ใช้ปริมาณสารเพียงเล็กน้อยก็สามารถฆ่าเซลล์ชนิดนั้นได้ถึง 50% จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ KATO-III มีค่า IC_{50} ของยาดีออกซิรูบิซินมีค่ามากกว่าค่า IC_{50} ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน ถึง 74.17 เท่า แสดงว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินนั้น สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้ดีกว่าการใช้ยาดีออกซิรูบิซิน เพียงอย่างเดียวถึง 74.17 เท่า ในขณะที่เซลล์ SW-620 มีค่า IC_{50} ของยาดีออกซิรูบิซิน มีค่ามากกว่าค่า IC_{50} ของ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน 1.03 เท่า แสดงว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใกล้เคียงกับการใช้ยาดีออกซิรูบิซินเพียงอย่างเดียว และเซลล์ L929 (เซลล์ปกติที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ) พบว่าค่า IC_{50} ของ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิรูบิซิน มีค่าน้อยกว่าค่า IC_{50} ของยาดีออกซิรูบิซิน แสดงว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินนั้นสามารถฆ่าเซลล์ได้มากกว่ายาดีออกซิรูบิซิน 32.76 เท่า เพราะยาดีออกซิรูบิซินเป็นยาที่สามารถฆ่าได้ทุกเซลล์ ทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ และเมื่อใช้ตัวนำส่งยา หรืออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินนำส่งยาดีออกซิรูบิซิน ทำให้มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มากขึ้นนั่นเอง แต่เมื่อนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) และเซลล์ปกติที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (L929) ที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน 25, 50 และ 100 μM ดังรูปที่ 3.31 ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต (% cell viability) 60-100% เป็นค่าการรอดชีวิตที่ค่อนข้างสูง จากผลการทดลองจะพบว่า เซลล์ปกติ (L929) จะมีค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตมากกว่าเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน และในการทดลองนี้ในเลือกใช้ความเข้มข้นอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินมาที่ 50 μM มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งที่ความเข้มข้น 25 และ 50 μM จะพบว่าเซลล์ปกตินั้นมีค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต

มากกว่า 60% แสดงว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ



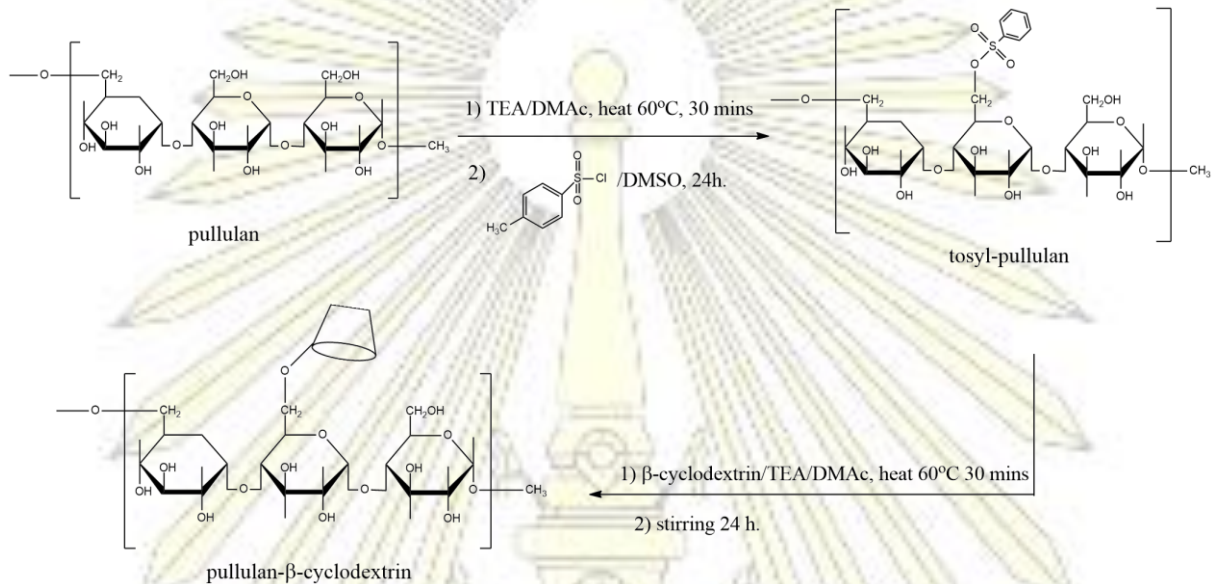
รูปที่ 3.31 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตที่ความเข้มข้นต่างๆของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งลำไส้ และเซลล์ปกติกล้ามเนื้อ

ดังนั้น จากผลการทดลองทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน มีคุณสมบัติในการเป็นตัวนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพ เพราะเมื่อเทียบค่า IC_{50} ของตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน มีค่าน้อยกว่าค่า IC_{50} ของยาดีออกโซรูบิซิน เมื่อทดสอบกับเซลล์มะเร็ง เนื่องจากตัวนำส่งยามีอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็ง เพราะอนุภาคนั้นมีขนาดเล็กเหมาะสมที่จะนำส่งยาผ่าน EPR effect เสถียรและยังมีพอลิเมอร์เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ที่มีคุณสมบัติเป็นสารเชิงซ้อนแบบอินคลูชันที่สามารถเก็บยาดีออกโซรูบิซินไว้ใน host cavity และจากผลการทดลอง % drug loading จะพบว่าสอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เพราะตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งที่ดี และยังไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติอีกด้วย ซึ่งตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) มากกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) เพราะเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน มีคุณสมบัติในการปลดปล่อยยาออกจาก host cavity ได้ดียิ่งขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด^[29] ซึ่งในเซลล์กระเพาะอาหารมีสภาวะเป็นกรด pH ประมาณ 1-2 ในขณะที่ในเซลล์ลำไส้จะมีสภาวะเป็นกลาง ทำให้เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ปลดปล่อยยาออกมาได้ดีกว่า จึงมีฤทธิ์ฆ่าที่ดีกว่านั่นเอง และจากงานวิจัยของ Rituka และคณะ ได้บอกว่าเซลล์ที่ตอบสนองต่อการรักษา จะมีระดับ nucleotide triphosphate (NTP) เพิ่มขึ้นและทำให้เกิด apoptosis แต่จากการทดสอบพบว่า เมื่อใช้ยาดีออกโซรูบิซิน กับเซลล์มะเร็งลำไส้ จะไม่พบการเพิ่มขึ้นของ NTP^[30] ดังนั้นเซลล์มะเร็งลำไส้จึงไม่ตอบสนองต่อยาดีออกโซรูบิซินได้ดีเท่าที่ควร

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ตัวนำส่งยาต้านมะเร็งอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วย พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินเพื่อนำส่งยาต้านมะเร็ง โดยในขั้นแรกจะเป็นการสังเคราะห์พอลิเมอร์พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ผ่านปฏิกิริยา โทซิลเลชัน ด้วยตัวทำละลายไดเมทิลอะซิโตน



และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR พบว่ามีพื้นที่ได้กราฟของ CH₂-OH และ C-O-C เพิ่มขึ้น และผลจาก TGA พบว่า มีช่วงการสลายตัวของพอลิเมอร์ที่ต่างกับสารตั้งต้นทั้ง 2 ชนิด ซึ่งบ่งบอกว่าพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้คือ พูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน แล้วนำพอลิเมอร์ไป reducing stabilizing กับสารละลายไฮโดรเจนเตตระคลอไรด์ เพื่อให้ได้เป็นอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน พบว่าสารละลายที่ได้มีทั้งสีแดงทึบ สีม่วง และตะกอนดำ และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค UV-Vis spectroscopy พบว่าที่สภาวะความเข้มข้นพอลิเมอร์ 1% w/v ได้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ดีที่สุด เพราะได้สารละลายสีแดงทึบ มีค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 520 nm และค่า A₅₂₀/A₆₅₀ มากที่สุด และ TEM analysis พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีขนาดช่วง 6-22 nm และเทคนิค Fluorescent spectroscopy เพื่อหา % drug loading พบว่ายาคือโคซรูบิซิน สามารถเข้าไปอยู่ใน host cavity ของเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินได้ถึง 98.39% และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) และเซลล์ปกติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (L929) พบว่าตัวนำส่งยาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตริน ที่นำส่งยาต้านมะเร็งโคซรูบิซิน ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งที่ดี เพราะมีค่า IC₅₀ ที่ต่ำกว่าค่า IC₅₀ ของยาต้านมะเร็งโคซรูบิซินโดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพูลลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ตรินที่นำส่งยาต้านมะเร็งโคซรูบิซิน จะมีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) มากกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) เพราะเบต้าไซโคลเดกซ์ตรินสามารถปลดปล่อยยาได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และยาต้านมะเร็งโคซรูบิซินออกฤทธิ์ได้ดีในกระเพาะอาหารมากกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้

เอกสารอ้างอิง

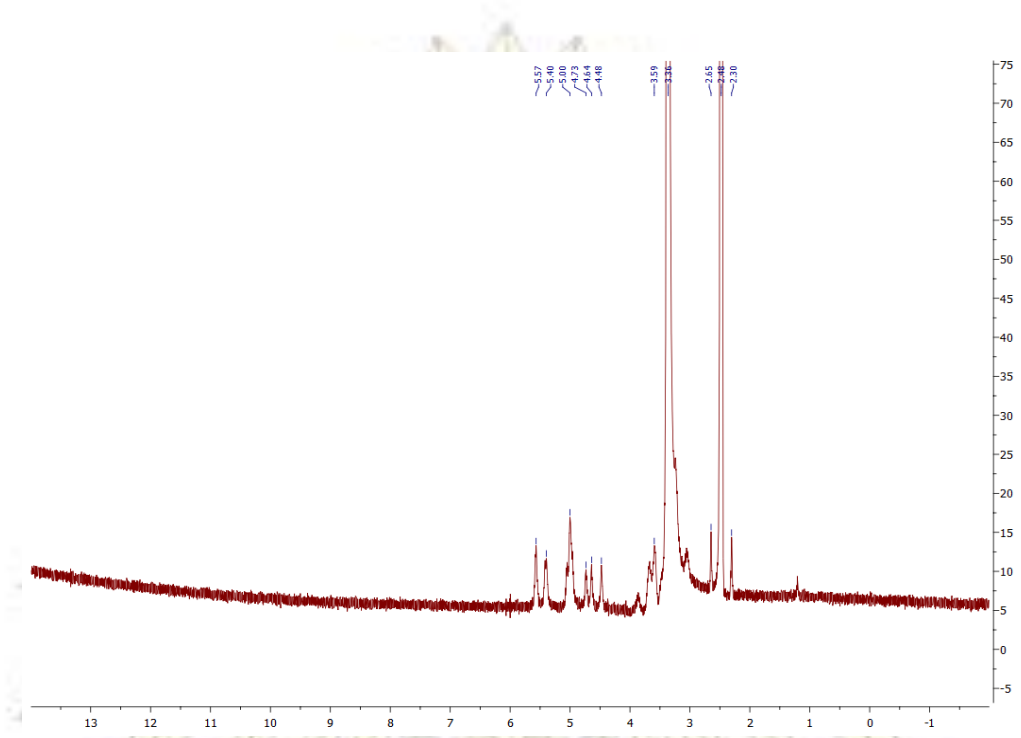
1. Nevozhay, D.; Kańska, U.; Budzyńska, R.; Boratyński, J. Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases. *Postepy Hig.* **2007**, 61, 350-360.
2. Wilczewska, A.; Markiewicz, K.; Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol.* **2012**, 64, 1020-1037.
3. Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441
3. Nagal, A.; Singla, R. Nanoparticles in different delivery systems: a brief review. *Pharm. Sci.* **2013**, 3, 96-106.
4. Kumar, B.; Jalodia, K.; Kumar, P.; Gautam, H. Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* **2017**, 41, 260-268.
5. Brannon, L.; Blanchette O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **2004**, 56, 1649-1659.
6. Dey, S.; Sherly, M.; Rekha, M.; Sreenivasan, K. Alginate stabilized gold nanoparticle as multidrug carrier: Evaluation of cellular interactions and hemolytic potential. *Carbohydrate Polymers.* **2016**, 136, 71-80.
7. Dey, S.; Sherly, M.; Rekha, M.; Sreenivasan, K. Alginate stabilized gold nanoparticle as multidrug carrier: Evaluation of cellular interactions and hemolytic potential. *Carbohydrate Polymers.* **2016**, 136, 71-80.
8. Singh, R. S.; & Saini, G. K. Pullulan-hyperproducing color variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1 newly isolated from phylloplane of *Ficus* sp. *Biore-source Technology*, **2008**, 99, 3896-3899.
9. Tsujisaka, Y.; & Mitsuhachi, M. Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives, USA: *Academic Press*, **1993**, 447-460
10. Seibutsu, H.; & Kenkyujo, M. Hayashibara Biochemical Laboratories, assignee. *UK patent GB*, **1983**, 2, 109-391.
11. Leathers, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **2003**, 62, 468-473.
12. Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech.* **2005**, 6, 329-357.

13. Denadai, A.; Santoro, M.; Lopes, P. et al. A supramolecular complex between proteinases and betacyclodextrin that preserves enzymatic activity. *BioDrugs*. **2006**, 20, 283–292.
14. Ding, Y.; Prasad, V.; Ding C.; Wang, B. Synthesis of carbohydrate conjugated 6A,6D-bifunctionalized β -cyclodextrin derivatives as potential liver cancer drug carriers. *Carbohydrate Polymers*. **2018**, 181, 957– 963.
15. STELLA, V.; HE, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, **2008**, 36, 30-42.
16. Zhang, J.; Lan, C.; Post, M.; Simard, B.; Deslandes, Y.; Hsieh, T. Design of nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. *Cancer Genomics&Proteomics*. **2006**, 3, 147–157.
17. Takara, K.; Sakaeda, T.; Okumura, K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*. **2006**, 12, 273–286.
18. Wang, C.; Huang,L.; Song, S.; Saif, B.; Zhou, Y.; Dong, C.; Shuang, S. Targeted delivery and pH-responsive release of stereoisomeric anti-cancer drugs using β -cyclodextrin assembled Fe₃O₄ nanoparticles. *Applied Surface Science*, **2015**, 357, 2077–2086.
19. Manivasagana, P.; Bharathirajaa, S.; Bui, N.; Janga, B.; Oha, Y.; Limc, I.; Oh, J. Doxorubicin-loaded fucoidan capped gold nanoparticles for drug delivery and photoacoustic imaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2016**, 91, 578–588.
20. Park, C.; Youn, H.; Kim, H.; Noh, T.; Kook, Y.; Oh, E.; Park, H.; Kim,C. Cyclodextrin-covered gold nanoparticles for targeted delivery of an anti-cancer drug. *J. Mater. Chem*. **2009**, 19, 2310–2315.
21. Shi, Y.; Goodisman, J.; Dabrowiak, J. Cyclodextrin Capped Gold Nanoparticles as a Delivery Vehicle for a Prodrug of Cisplatin. *Inorg. Chem*. **2013**, 52, 9418–9426.
22. Ganeshkumar, M.; Ponrasu, T.; Raja, M. D.; Subamekala, M. K.; Suguna, L. Green synthesis of pullulan stabilized gold nanoparticles for cancer targeted drug delivery. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014, 130, 64–71.
23. Laksee, L.; Puthong, S.; Teerawatananond, T.; Palaga, P.; Muangsin, N. Highly efficient and facile fabrication of monodispersed Au nanoparticles using pullulan and their application as anticancer drug carriers. *Carbohydrate Polymers*. **2017**, 173, 178–191.
24. Zhou, B.; Han, S.; Raja, R.; Somorja, G. A. Nanotechnology in Catalysis. *Springer. New York*. **2007**, 3, 55-68.
25. Dvorak, F.; Nagy, A.; Dvorak T. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol*. **1988**, 133, 95-109.

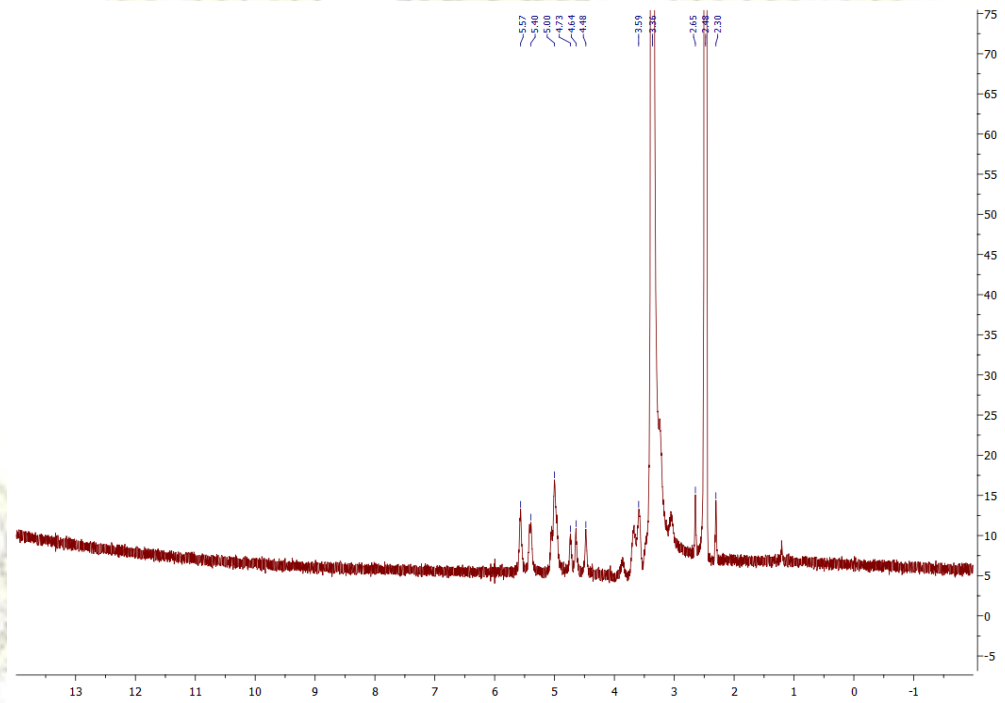
26. Leamon, CP.; Reddy, JA. Folate-targeted chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **2004**, 56, 1127-1141.
27. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์. การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกัน เพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน. *มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.* **2553**, 1-76.
28. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>
29. Yousef, T.; Hassan, N. Supramolecular encapsulation of doxorubicin with β -cyclodextrin dendrimer: in vitro evaluation of controlled release and cytotoxicity. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* **2017**, 87, 105-115.
30. Rituka, I.; Sharma, A.D.S.; Sharma, T. Colorectal Tumor Cells Treated with 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan, and Cetuximab Exhibit Changes in ^{18}F -FDG Incorporation Corresponding to Hexokinase Activity and Glucose Transport. *The journal of nuclear medicine.* **2008**, 49(8), 1386-1394.



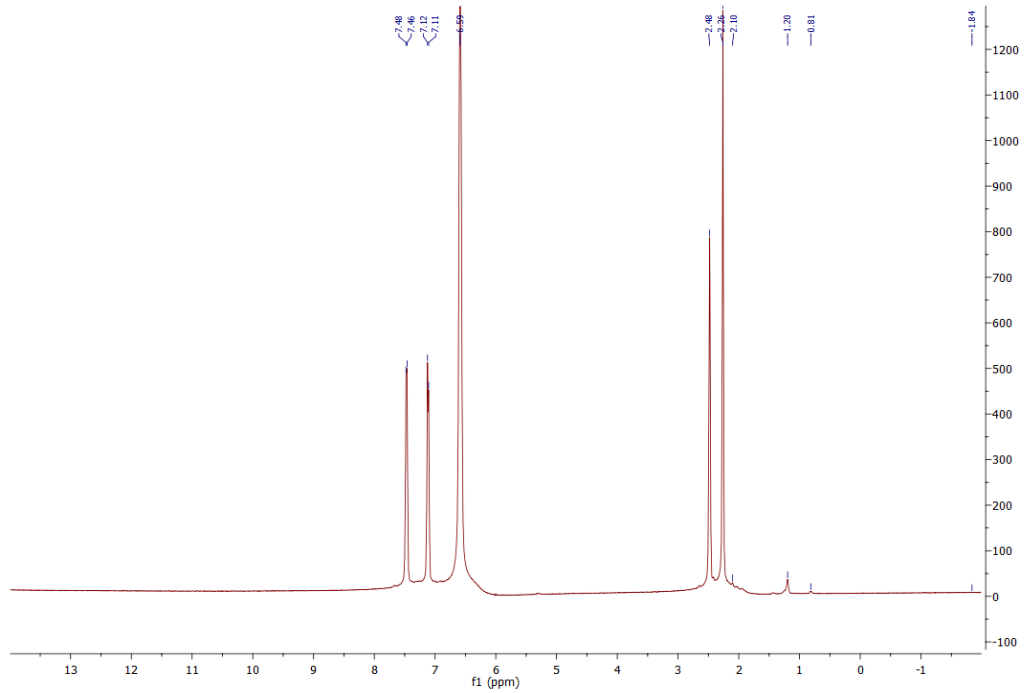
ภาคผนวก



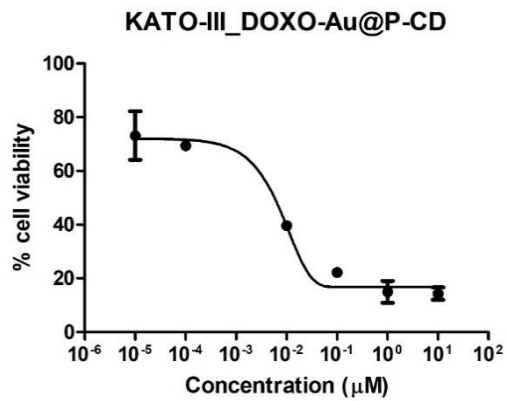
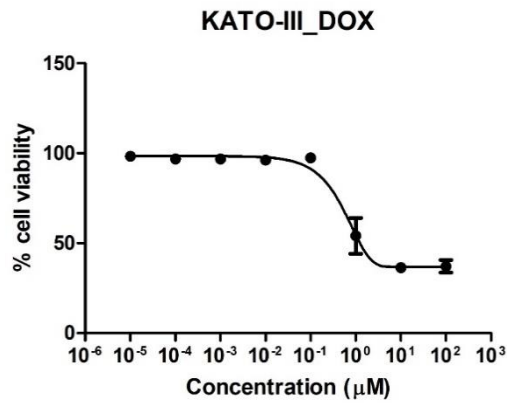
รูปที่ ก-1 กราฟ ¹H NMR ของพอลูเลท



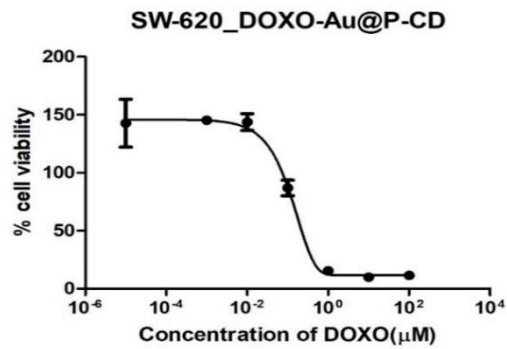
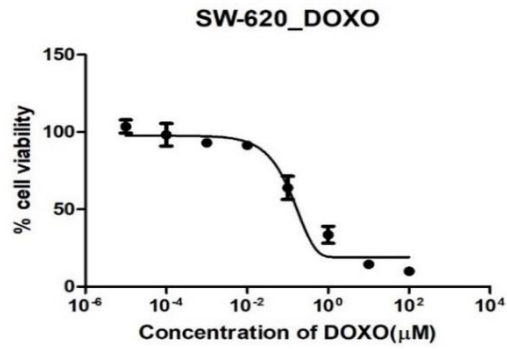
รูปที่ ก-2 กราฟ ¹H NMR ของเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน



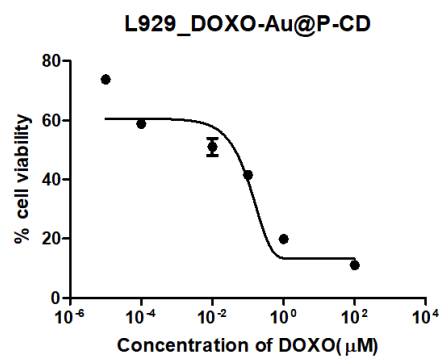
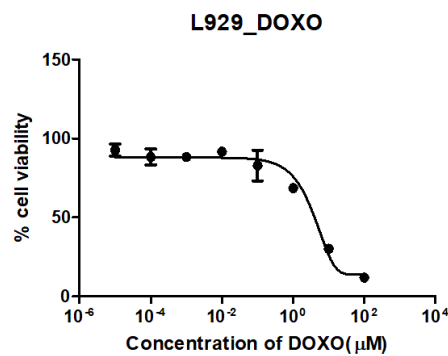
รูปที่ ก-3 กราฟ ¹H NMR ของพี-โพลีอินซัลฟอนิล คลอไรด์



รูปที่ ข-1 กราฟ IC₅₀ ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพุลูลูแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกโซรูบิซิน และยาดีออกโซรูบิซิน



รูปที่ 3.32 กราฟ IC_{50} ของเซลล์มะเร็งรังไข่ที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิโรบูซิน และยาดีออกซิโรบูซิน



รูปที่ 3.33 กราฟ IC_{50} ของเซลล์ปกติที่เป็นเซลล์กล้ามเนื้อเนื้อหนูที่ทดสอบกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ปรับเสถียรด้วยพอลิแลน-เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินที่นำส่งยาดีออกซิโรบูซิน และยาดีออกซิโรบูซิน

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวธนพร นันทสิทธิ์โชค เกิดเมื่อวันที่ 25 เดือน เมษายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียน สายปัญญาในพระบรมราชินูปถัมภ์ จังหวัด กรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 197 ตำบล/แขวง ปากคลอง อำเภอ/เขต ภาษีเจริญ จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10160 อีเมล hona_noon@outlook.com

