

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 จัดเตรียม/จัดหาวัตถุดิบและทดสอบสมบัติของวัตถุดิบ

ทำการจัดหาวัตถุดิบ ได้แก่ แอลจินต ไคโตซาน และกลูโคซามีน ตลอดจนวิเคราะห์สมบัติของสารแต่ละตัว ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สมบัติของแอลจินตและไคโตซานที่ใช้ในการศึกษา

พารามิเตอร์	แอลจินต*	ไคโตซาน 1	ไคโตซาน 2	ไคโตซาน 3	ไคโตซาน 4	ไคโตซาน 5
แหล่งที่มา	สำหรับยาส น้ำตาล	เปลือกกุ้ง	เปลือกกุ้ง	เปลือกกุ้ง	เปลือกกุ้ง	เปลือกกุ้ง
ความชื้น (%)	9.12 ± 0.07	10.52 ± 0.07	10.65 ± 0.28	8.96 ± 0.24	9.72 ± 0.41	10.84 ± 1.51
น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	80-120	70	179	220	300	583
Degree of Deacetylation (DD) (%)	-	84	89	87	92	82
guluronic acid content	0.39	-	-	-	-	-

* ข้อมูลจากผู้ผลิต (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA)

ตารางที่ 2 สมบัติของกลูโคซามีน*

พารามิเตอร์	กลูโคซามีน
สูตรโครงสร้าง	C ₆ H ₁₃ NO ₅
ลักษณะภายนอก	ของแข็งสีขาว
Refractive index (n _{20D})	1.330
น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมล)	179.17

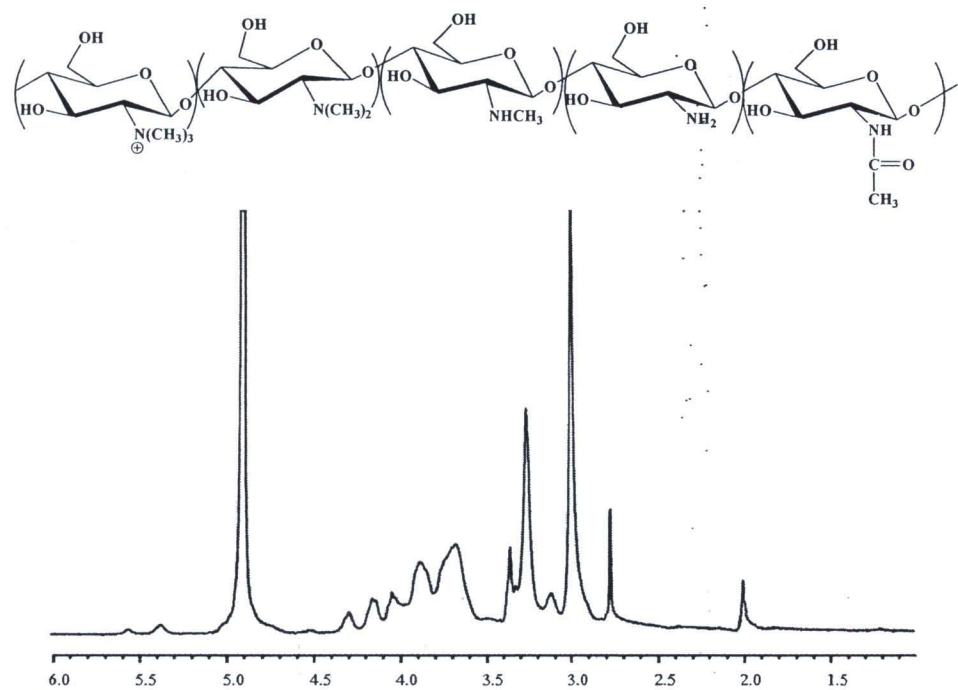
* ข้อมูลจากผู้ผลิต (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA)

4.2 สังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีประจุบวกถาวรของไคโตซาน

ในงานนี้ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีประจุบวกถาวรของไคโตซาน 2 ชนิด คือ *N,N,N*-trimethylammonium chitosan chloride (TMC) และ *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride (HTCC) โดยใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 220 กิโลดาลตัน และ DD เท่ากับ 87% มาใช้ในการสังเคราะห์

- *N,N,N*-trimethylammonium chitosan chloride (TMC)

TMC สังเคราะห์ได้จากการนำไคโตซานมาทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันกับเมทิลไอโอไดด์ (methyl iodide) ตามวิธีการ Sieval และคณะ [10] และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (ภาพที่ 2) โดยตำแหน่งของพีกและโครงสร้างแสดงไว้ในตารางที่ 3



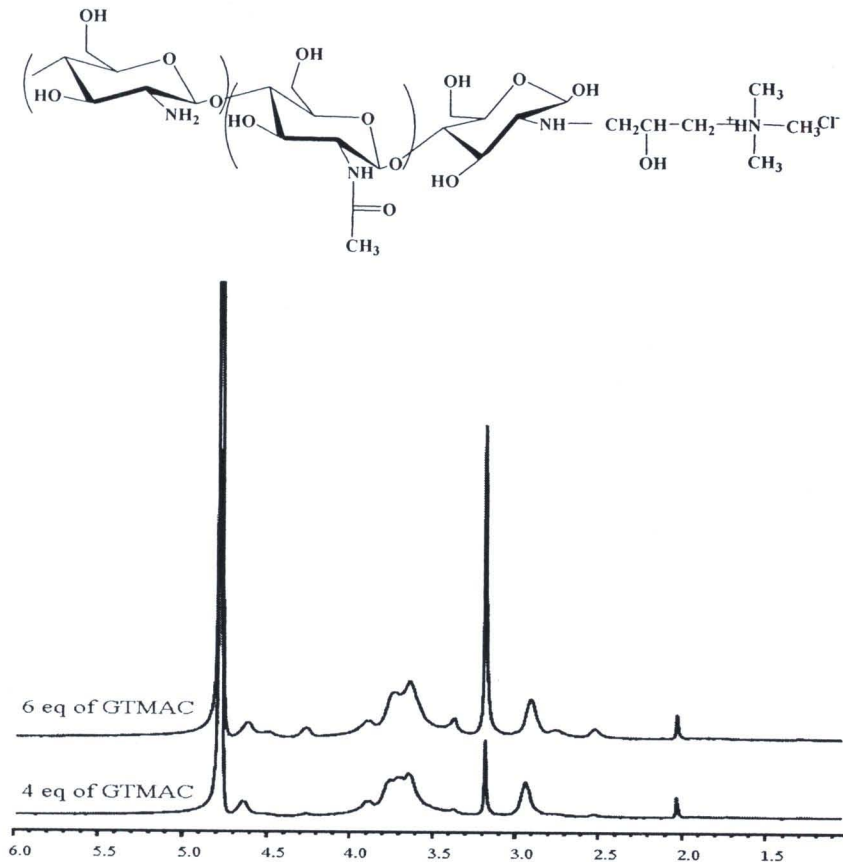
ภาพที่ 2 ภาพแสดงโครงสร้างและโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ TMC (ในสารละลาย D₂O/trifluoro acetic acid) ที่สังเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาของไคโตซาน กับ CH₃I

ตารางที่ 3 ค่า chemical shift (δ) ของสัญญาณที่พบจากการวิเคราะห์สาร TMC ด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์

Chemical shift (δ) (ppm)	สัญญาณ H ของหมู่
2.00	-COCH ₃
2.80	-NHCH ₃
3.0	-N(CH ₃) ₂
3.15	H-2
3.28	-N ⁺ (CH ₃) ₃
3.30	6-OCH ₃
3.35	3-OCH ₃
3.50-4.40	H-2',3,4,5,6'
4.55, 5.3-5.7	H-1
4.90	DOH

- *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride (HTCC)

HTCC สังเคราะห์ได้จากการนำไคโตซานมาทำปฏิกิริยาการเปิดวงของสารไกลูโคซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (GTMAC) ภายใต้สภาวะกรดตามวิธีการ Seong และคณะ [11] และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (ภาพที่ 3) โดยตำแหน่งของฟีกและโครงสร้างแสดงไว้ในตารางที่ 4



ภาพที่ 3 ภาพแสดงโครงสร้างและโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของ HTCCs (ในสารละลาย D_2O) ที่สังเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาของไคโตซาน กับ GTMAC ปริมาณ 4 และ 6 โมล

ตารางที่ 4 ค่า chemical shift (δ) ของสัญญาณที่พบจากการวิเคราะห์สาร HTCC ด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์

Chemical shift (δ) (ppm)	สัญญาณ H ของหมู่
2.00	$-COCH_3$
2.50	$-CH_2CH(OH)CH_2 N^+(CH_3)_3$
2.90	H-2
3.20	$-N^+(CH_3)_3$
3.40	$-CH_2 N^+(CH_3)_3$
3.50-4.40	H-2',3,4,5,6'
4.15	$-CH(OH)CH_2 N^+(CH_3)_3$
4.80	DOH

สามารถนำข้อมูลของการวิเคราะห์ด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์มาใช้ในการหาปริมาณของหมู่แอมโมเนียมไอออนซึ่งมีประจุเป็นบวกบนสายโซ่ (degree of quaternization) ได้โดยสามารถคำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่เมทิลบนสายโซ่ จากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์พื้นที่ใต้พีคของสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิล 3 หมู่ เทียบกับจำนวนโปรตอนในหน่วยซ้ำวงกลูโคไพราโนสทั้งหมด ดังแสดงในสมการต่อไปนี้

$$\text{Degree of quaternization (\%DQ)} = \left[\frac{\int N^+(CH_3)_3 / 9}{(\int H-2',3,4,5,6,6' / 6) \times DD} \right] \times 100$$

โดยที่ $\int N^+(CH_3)_3$ คือ พื้นที่ใต้พีคของโปรตอน 9 อะตอมของหมู่เมทิล 3 หมู่ที่ต่ออยู่กับไนโตรเจน ($\delta = 3.00$ ppm)
 $\int H-2',3,4,5,6,6'$ คือ พื้นที่ใต้พีคของโปรตอน 6 อะตอมในวงกลูโคไพราโนสที่ตำแหน่ง δ 3.50-4.40 ppm
และ DD คือ ค่า degree of deacetylation ของไคโตซานซึ่งเท่ากับ 87% หรือ 0.87

ได้ผลการคำนวณค่า DQ ดังแสดงในตารางที่ 5 นอกจากนี้ได้ศึกษาการละลายน้ำของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ได้นี้ในน้ำที่มีค่า pH ต่างๆ กัน พบว่า TMC ที่สังเคราะห์ขึ้นมี DQ เท่ากับ 35% และสามารถละลายน้ำได้ในสภาวะที่เป็นกรด ($pH = 1-6.5$) ในขณะที่ HTCC ซึ่งมี DQ เท่ากับ 11% และ 33% สามารถละลายน้ำได้ทั้งในสภาวะที่เป็นกรด กลาง และด่าง ($pH = 1-14$)

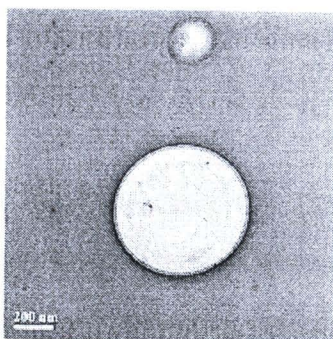
ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์ของควอเทอไนเซชัน (%DQ) และช่วง pH ที่สารละลายได้ในน้ำของ TMC และ HTCC ที่สังเคราะห์ได้

ชนิดของสารที่สังเคราะห์ได้	Degree of quaternization (%DQ)	ช่วง pH ของน้ำที่ละลายได้
TMC	35	1-6.5
HTCC1	11	1-14
HTCC2	33	1-14

4.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขึ้นรูปเป็นอนุภาคของแคลเซียมแอลจิเนต-ไคโตซาน

-ผลของการโซนิเคชันในขั้นตอนการทำ *pre-gel* (Ca^{2+} -alginate)

วิธีการขึ้นรูปอนุภาคนาโนดัดแปลงมาจาก De และ Robinson [12] และ Lertsutthiwong และคณะ [13] หลักการ คือ เมื่อหยดสารละลาย CaCl_2 ลงในสารละลายแอลจิเนตจะเกิด *pre gel* (สภาวะก่อนการเกิดเจล) และจะเกิดเป็นเจลสมบูรณ์เมื่อหยดสารละลายไคโตซานลงไป โดยภาพที่ 4 แสดงการเกิดอนุภาคที่มีลักษณะเป็นแบบ *core and shell* นั่นคือส่วนของ Ca -alginate อยู่ตรงกลางเป็นส่วนใหญ่ที่ไม่ติดสี เนื่องจากสีย้อม phosphotungstic acid มีประจุลบ และที่ขอบเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกคือ ไคโตซานหรืออนุพันธ์ของไคโตซานซึ่งสามารถย้อมติดสีของ phosphotungstic acid ได้ด้วยแรงไอออนิก จึงมีลักษณะทึบแสง



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคแคลเซียมแอลจิเนต-ไคโตซาน (ความเข้มข้นของแอลจิเนต = 0.60 mg/ml, ระยะเวลาในการโซนิเคต = 20 min, ความเข้มข้นของไคโตซาน น้ำหนักโมเลกุล 220 กิโลดาลตัน = 0.30 mg/ml, ย้อมด้วย 1% phosphotungstic acid)

ตารางที่ 6 แสดงผลของการ โซนิเคตที่ระยะเวลาต่างๆ โดยพบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการโซนิเคตจาก 0 ถึง 20 นาที ขนาดของอนุภาคลดลงจาก 750 นาโนเมตร เป็น 475 นาโนเมตร ทั้งนี้เนื่องมาจากการโซนิเคตมีผลทำให้สายโซ่พอลิเมอร์ของอัลจิเนตถูกตัดขาด หรือมีการแตกออกของอนุภาค *pre gel* ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตามหากเพิ่มระยะเวลาในการโซนิเคชันมากขึ้นถึง 60 นาที พบว่า ขนาดลดลงเพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการโซนิเคตสามารถตัดสายโซ่พอลิเมอร์ของอัลจิเนตได้ในความยาวค่าหนึ่งเท่านั้น จึงทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดพลังงานและเวลาในการทำเตรียมอนุภาค จึงเลือกเวลาในการโซนิเคตที่ 20 นาที สำหรับใช้ในการศึกษาในลำดับต่อไป

ตารางที่ 6 ขนาดของอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าที่ระยะเวลาในการโซนิเคชันต่างๆ

ระยะเวลาในการโซนิเคชัน (นาที)	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)	ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)
0	751 ± 37	-32 ± 0.6
10	515 ± 35	-31 ± 1.8
20	475 ± 30	-30 ± 1.6
30	463 ± 11	-29 ± 0.4
60	464 ± 7.0	-29 ± 1.7

ในกรณีของค่าประจุที่ผิวของอนุภาคหรือค่าศักย์ซีต้า พบว่า การโซนิเคตไม่มีผลต่อประจุที่ผิวของอนุภาค ทั้งนี้เนื่องจากอัตราส่วนโดยมวลระหว่างแอลจินตต่อแคลเซียมคลอไรด์ต่อไคโตซานเท่ากับ 10:2.33:1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแอลจินตมีปริมาณมากกว่าไคโตซานถึง 10 เท่า ดังนั้นประจุสุทธิของอนุภาคจึงแสดงประจุลบของแอลจินตที่มีมากกว่า

-ผลของน้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นของไคโตซาน

ในส่วนของการทดลองนี้ทำการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่มีต่อขนาดของอนุภาค ซึ่งจากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า ขนาดอนุภาคไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเปลี่ยนค่าน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 71-583 กิโลดาลตัน ทั้งนี้เนื่องจากแอลจินตมีปริมาณมากกว่าไคโตซานถึง 10 เท่า ดังนั้นการเปลี่ยนค่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจึงไม่น่าจะมีแนวโน้มต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาค

ตารางที่ 7 ขนาดของอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ

น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (กิโลดาลตัน)	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)	ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)
71	725 ± 31.2	-28.9 ± 0.7
180	702 ± 24.7	-29.8 ± 1.7
220	533 ± 12.5	-29.3 ± 1.1
300	709 ± 36.2	-28.7 ± 1.3
583	562 ± 7.15	-26.4 ± 4.6

ในกรณีของค่าประจุที่ผิวของอนุภาคหรือค่าศักย์ซีต้า พบว่าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานเปลี่ยนไป นั่นคือน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานไม่มีผลต่อประจุที่ผิวของอนุภาคนั่นเอง

- ผลของความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานหรือ HTCC หรือ TMC ทำให้ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น (ตารางที่ 8) ทั้งนี้เนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกของไคโตซาน หรืออนุพันธ์ของไคโตซานกับประจุลบของแอลจินต ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานหรืออนุพันธ์ทำให้มีปริมาณของประจุบวกมาเกาะที่ผิวของอนุภาคมากขึ้น ส่งผลให้ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น แต่สาเหตุที่ความเข้มข้นของ TMC เท่ากัน 0.60 mg/ml ไม่มีข้อมูลนั้น เนื่องมาจากเกิดการตกตะกอนของขนาดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า และสาเหตุที่ขนาดอนุภาคที่เตรียมจากแอลจินตกับ HTCC มีขนาดเล็กกว่าอนุภาคที่เตรียมจากแอลจินตกับ TMC หรือไคโตซาน อาจเนื่องมาจากผลของค่า pH ดังแสดงในตารางที่ 9 ที่ pH เท่ากับ 3.41 (ไคโตซาน) หรือ 3.48 (TMC) แอลจินตบางหน่วยเท่านั้นที่ให้ประจุลบจึงเกิดแรงดึงดูดกับประจุบวก (ionic attraction) ของไคโตซานหรือ TMC ได้น้อยหรือการเกิดอนุภาคเป็นการเกาะกันแบบหลวมๆ แต่ที่ pH เท่ากับ 6.33 เกือบทุกหน่วยของแอลจินตให้ประจุลบที่สามารถเกิดแรงดึงดูดกับประจุบวกของ HTCC ดังนั้นจึงเกิดแรงดึงดูดที่มากขึ้นหรือการเกิดอนุภาคเป็นการเกาะกันแน่นขึ้นมากกว่ากรณีของไคโตซานและ TMC มีผลให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า และในทำนองเดียวกัน HTCC ที่มี %DQ สูงจะมีปริมาณประจุบวกมากกว่า HTCC ที่มี %DQ ต่ำ ดังนั้นจึงสามารถเกิดแรงกระทำกับประจุลบของ COO^- ที่ผิวของอนุภาคได้มากกว่าหรือเกาะกันแน่นกว่า จึงได้ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า ดังนั้น HTCC ที่มี %DQ สูงจะให้ขนาดอนุภาคเล็กกว่า HTCC ที่มี %DQ ต่ำ ในกรณีของค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า พบว่า ค่าความเข้มข้นของพอลิเมอร์ประจุบวกไม่มีผลต่อค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า

ตารางที่ 8 ขนาดและค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคที่เตรียมจากพอลิเมอร์ประจุบวกแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Concentration (mg/ml)	CTS		11%HTCC		33%HTCC		TMC	
	Size	zeta	Size	zeta	Size	zeta	Size	zeta
	(nm)	(mV)	(nm)	(mV)	(nm)	(mV)	(nm)	(mV)
0.15	369±20	-23±1.1	317±14	-27±3.1	302±7.6	-23±2.3	401±15	-21±1.9
0.30	498±18	-23±0.5	496±35	-31±2.0	446±1.4	-29±1.1	628±58	-25±0.9
0.45	687±8.4	-23±1.3	662±35	-27±2.6	511±30	-30±1.6	931±32	-24±1.0
0.60	850±55	-21±1.6	769±35	-26±1.3	582±9.5	-29±0.9	-	-

ตารางที่ 9 ค่า pH ของอนุภาคที่เตรียมจากพอลิเมอร์ประจุบวกที่ต่างกัน

Cationic polymer	pH
Chitosan	3.48
TMC	3.41
HTCC	6.33

4.4 ประสิทธิภาพในการบรรจุกลูโคซามีนในอนุภาคที่เตรียมได้

ศึกษาประสิทธิภาพในการบรรจุกลูโคซามีนโดยการนำอนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีนแล้วมาแช่ในสารละลายโซเดียมซิเตรด (sodium citrate) ข้นขึ้น เพื่อให้อนุภาคแตกออกเนื่องจากซิเตรดจะเข้าไปรบกวนการจับตัวกันระหว่างพอลิเมอร์ ส่งผลให้กลูโคซามีนละลายออกมาได้หมด จึงหาปริมาณกลูโคซามีนด้วยเทคนิค HPLC ได้อย่างถูกต้องมากขึ้น โดยจะต้องทำปฏิกิริยากับ PITC ก่อนการวิเคราะห์เพื่อให้ UV detector สามารถตรวจวัดปริมาณสารได้

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการบรรจุกลูโคซามีนด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ วิธีที่หนึ่ง: ละลายกลูโคซามีนลงในสารละลายแอลจินเตก่อนแล้วจึงหยดเคลือบเคลือบลงไประจุลงไปในวิธีที่สอง: ละลายกลูโคซามีนลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ก่อนแล้วจึงหยดลงในสารละลายแอลจินเต ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 พบว่าการบรรจุกลูโคซามีนในอนุภาคแบบที่ 1 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บยาได้มากกว่าการบรรจุแบบที่ 2 ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่า เมื่อนำกลูโคซามีนในรูปของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาละลายอยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จะเกิดแรงผลักดันกันระหว่างหมู่แอมโมเนียมของกลูโคซามีนกับ Ca^{2+} ซึ่งเมื่อนำไปหยดลงในสารละลายแอลจินเตจึงทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บกลูโคซามีนแบบนี้ดีกว่าแบบที่หนึ่ง ซึ่งประจุบวกของกลูโคซามีนเกิดแรงดึงดูดกับประจุลบบนสายโซ่แอลจินเตก่อนทำให้กลูโคซามีนถูกกักไว้ก่อนบางส่วน เมื่อหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงไปเพื่อให้เกิดเป็น pre-gel จนเกิดเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์จึงกักเก็บกลูโคซามีนได้ในปริมาณที่มากกว่า

ตารางที่ 10 ปริมาณกลูโคซามีนที่บรรจุอยู่ในอนุภาคด้วยวิธีการบรรจุที่แตกต่างกัน

ตัวอย่าง	วิธีที่ 1:		วิธีที่ 2:	
	กลูโคซามีนผสมใน		กลูโคซามีนผสมใน	
	สารละลายแอลจินต		สารละลายแคลเซียมคลอไรด์	
	ประสิทธิภาพในการกักเก็บกลูโคซามีน (%)	ปริมาณยาต่อน้ำหนักของอนุภาค (%)	ประสิทธิภาพในการกักเก็บกลูโคซามีน (%)	ปริมาณยาต่อน้ำหนักของอนุภาค (%)
ACP	0.941±0.14	3.914±0.59	0.714±0.17	3.218±0.76
AH11P	0.802±0.14	5.868±1.00	0.655±0.12	4.924±0.90
AH33P	0.960±0.17	6.540±1.19	0.558±0.10	4.793±0.83
ATP	0.693±0.10	4.089±0.62	0.581±0.15	2.995±0.77

หมายเหตุ: ACP คือ alginate-chitosan nanoparticles containing glucosamine

AH11P คือ alginate-HTCC (DQ=11%) nanoparticles containing glucosamine

AH33P คือ alginate-HTCC (DQ=33%) nanoparticles containing glucosamine

ATP คือ alginate-TMC nanoparticles containing glucosamine

5. สรุปผลการทดลอง

อนุภาคนาโนแอลจินต-ไคโตซาน (หรืออนุพันธ์ของไคโตซาน) สามารถใช้บรรจุกลูโคซามีนด้วยเทคนิคเจลเลชัน ซึ่งอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดเล็กสุดประมาณ 300 นาโนเมตร และปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาค ได้แก่ ระยะเวลาในการโซนิเคต ความเข้มข้นและชนิดของพอลิเมอร์ประจุบวกที่ใช้ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคที่ต้องการ นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการบรรจุขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เติมกลูโคซามีนในกระบวนการเตรียมอนุภาค



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่.....0.2...ต.ค...2555
เลขทะเบียน.....249879
เลขเรียกหนังสือ.....