

การพัฒนาอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่บรรจุโพรตีนซีรัมอัลบูมิน

สำหรับรับประทาน

นางสาวรัชชา กิตติอมรัตน์	513 65658 33
นางสาวลดาวัลย์ กิตติพัฒน์วงศ์	513 66504 33
นางสาวหนึ่งฤทัย ไจวงค์เพ็ญ	513 66911 33

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

Development of Alginate/Chitosan Microparticles Containing

Bovine Serum Albumin (BSA) for Oral Administration

Thanutcha Kittiamornrat 513 65658 33

Ladawan Kittipatwong 513 66504 33

Nuengruetai Jaiwongphen 513 66911 33

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

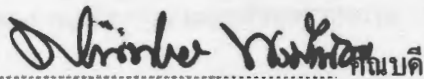
for The Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

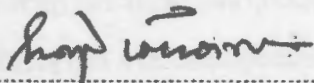
2012

หัวข้อโครงการปริญญาโท การพัฒนาอนาคตไมโครอิเล็กทรอนิกส์/ไอทีเซนที่
บรรจุใบวิเศษรับอัตรานามสำหรับรับประทาน
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ 1. นางสาวรัชชา กิตติอมรัตน์
2. นางสาวลดาวัลย์ กิตติพัฒน์วงศ์
3. นางสาวหนึ่งฤทัย ใจวงศ์เพ็ญ
สาขาวิชา ภาสัษกรรมผลิตภัณฑ์แขนงเทคโนโลยีภาสัษกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาสัษกรหญิง ดร. อังคณา คันดิฐวานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ภาสัษกรหญิง ดร. คุณฎี ชาญวานิช

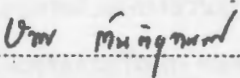
คณะภาสัษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาภาสัษศาสตรบัณฑิต



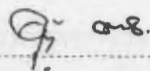
(รองศาสตราจารย์ ภาสัษกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)



ประธานแขนงเทคโนโลยีภาสัษกรรม
(รองศาสตราจารย์.ดร.ภาคภูมิ เต็งอำนาจ)



อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาสัษกรหญิง ดร. อังคณา คันดิฐวานนท์)



อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ภาสัษกรหญิง ดร. คุณฎี ชาญวานิช)



โครงการลำดับที่

วันที่

บทคัดย่อปริญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การพัฒนาอนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวีนซีรัมอัลบูมินสำหรับ
รับประทาน

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Development of Alginate/Chitosan Microparticles Containing Bovine Serum
Albumin (BSA) for Oral Administration

หัวหน้าโครงการ : นสภ.ถาวรวัลย์ กิตติพัฒน์วงศ์ 513 66504 33

ผู้ร่วมโครงการ : นสภ.ธนัชชา กิตติอมรรรัตน์ 513 65658 33

นสภ.หนึ่งฤทัย โจวงศ์เพ็ญ 513 66911 33

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. อังคณา คันทิวานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. ศุภฉวี ชาญวามิช

ภาควิชา : วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) สำหรับรับประทาน ในการทดลองได้เตรียมอนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซนด้วยเทคนิค Emulsifying-gelatinization โดยศึกษาผลของชนิดของน้ำมัน ผลของอัตราส่วนระหว่างอัลจินเนตต่อไคโตแซน และความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโครที่บรรจุ BSA การประเมินคุณสมบัติของอนุภาคไมโครได้แก่ ปริมาณอนุภาคไมโครที่เตรียมได้ ประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ในอนุภาคไมโคร และความสามารถในการชะลอการปลดปล่อย BSA ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 พีเอช 1.2 และในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ผลการทดลองพบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA ในการศึกษาครั้งนี้คือการใช้ isooctane เป็นน้ำมันสำหรับการเตรียมอิมัลชัน การเตรียมเปลือกของอนุภาคด้วยอัตราส่วนระหว่างอัลจินเนตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร ขนาดอนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซนที่เตรียมได้มีค่าเฉลี่ย 14.46 ไมครอน มีประสิทธิภาพในการกักเก็บ BSA ร้อยละ 74.67 ± 8.87 และสามารถชะลอการปลดปล่อย BSA ในสภาวะกรดได้เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยปลดปล่อย BSA ประมาณร้อยละ 20 ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ พีเอช 1.2 และปลดปล่อย BSA ประมาณร้อยละ 44 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 เมื่อศึกษาความคงตัวโดยการเก็บรักษาอนุภาคไมโครไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าอนุภาคไมโครมีการพองตัว และแตก จึงส่งผลให้ความสามารถในการชะลอการปลดปล่อยโบวีนซีรัมอัลบูมินในสภาวะกรดลดลง

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

คำนำ

ไมโครเอนแคปซูเลชันเป็นกระบวนการที่ใช้ในการเตรียมระบบนำส่งยาทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน สามารถใช้นำส่งด้วยยาที่มีคุณสมบัติหลากหลายไปยังเป้าหมายได้ รวมทั้งด้วยที่เป็นสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน

โครงการปริญญาโทฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาปัจจัยในการเตรียมอนุภาคไมโครจากออลิโกแซคคาไรด์และโพลีเอทิลีนไกลคอลเพื่อใช้เป็นระบบในการนำส่งยาโปรตีนซึ่งเป็นสารที่ถูกทำลายได้ด้วยกรดและเอนไซม์ในทางเดินอาหาร ทางคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ปริญญาโทฉบับนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการพัฒนาการนำส่งวัคซีนโดยการรับประทานต่อไปในอนาคต หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้วิจัยขออภัยมา ณ ที่นี้

คณะผู้จัดทำ

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทขั้นนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษียร หอญิง คร. อังคณา คันดิชวานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และ อาจารย์ เกษียรหอญิง คร. คุณฉวี ชาญวามิช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาการเกษตรกรรมและเกษตรอุตสาหกรรม คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับทุนและสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบคุณ นางสาว ตุลยา พิงไชยพัฒน์ นิสิตปริญญาโทภาควิชาวิทยาการเกษตรกรรมและเกษตรอุตสาหกรรม และ นิสิตปริญญาโททุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิทยาการเกษตรกรรมและเกษตรอุตสาหกรรม ที่คอยให้คำแนะนำเกี่ยวกับเครื่องมือและสารเคมีต่างๆ รวมทั้งให้ความสะดวกในการทำโครงการนี้ และทุกท่านที่เป็นส่วนหนึ่งของโครงการปริญญาโทขั้นนี้

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

บทคัดย่อปริยญาณิพนธ์.....	ง
คำนำ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ปรีทรรคนัวรรณกรรม.....	4
โปรตีนแอนติเจน.....	4
การนำส่งสารกลุ่มโปรตีนแอนติเจน โดยการรับประทาน.....	5
ระบบอนุภาคไมโครอัลจินตที่เคลือบด้วยโคโคแซน.....	11
บทที่ 3 สารเคมี เครื่องมือ และวิธีการวิจัย.....	15
การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่บรรจุโพรตีนซีรัมอัลบูมิน.....	17
การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของอนุภาคอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่บรรจุโพรตีนซีรัมอัลบูมิน	
• ผลของชนิดของน้ำมัน.....	18
• ผลของสัดส่วนของอัลจินต และ โคโคแซน.....	19

สารบัญ (ต่อ)

• ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มีต่อการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมิน ออกจากอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน.....	19
การประเมินคุณสมบัติของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน	
• ปริมาณอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมินที่เตรียมได้ (% yield)	20
• ขนาดและการกระจายของขนาด.....	20
• ประสิทธิภาพการกักเก็บโบวินซีรัมอัลบูมินในอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน (% Entrapment efficiency).....	20
• ปริมาณโบวินซีรัมอัลบูมินในอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน (% Drug Content)	21
การศึกษาการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมินจากอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน	21
การศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของอนุภาคอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่ บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมินที่สภาวะเร่ง	22
สถิติ.....	23
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลการวิจัย.....	24
การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบู มิน	
• ผลของชนิดของน้ำมัน.....	27
• ผลของสัดส่วนความเข้มข้นระหว่างอัลจิเนต และไคโตแซน	30
• ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์	32
ผลของกระบวนการ freeze drying ต่อขนาดอนุภาค	34
การศึกษาการปลดปล่อยของโบวินซีรัมอัลบูมินของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน.....	37

สารบัญ (ต่อ)

การศึกษาความคงตัวของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุ โปวีนซีรัมอัลบูมิน 38

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 41

เอกสารอ้างอิง..... 43

ภาคผนวก ก 49

ภาคผนวก ข 52

ภาคผนวก ค 58

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ปริมาณของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน	18
ตารางที่ 2 ปริมาณ Span 80 และ Tween 80 ที่ใช้ในการเตรียมอิมัลชันที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ	19
ตารางที่ 3 สรุปปัจจัยที่ศึกษาผลต่อลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน.....	19
ตารางที่ 4 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมินมาตรฐานด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	52
ตารางที่ 5 ปริมาณของ BSA ในอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน (Drug content)	53
ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ในอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน (% Entrapment efficiency, %EE)	54
ตารางที่ 7 ปริมาณอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่เตรียมได้ (%yield).....	55
ตารางที่ 8 ปริมาณ BSA สะสมที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วย สัดส่วน 1:2 และใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร.....	56
ตารางที่ 9 ปริมาณ BSA สะสมที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วย สัดส่วน 1:2 และใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร.....	57

สารบัญรูปลูกภาพ

รูปที่ 1 หลักการในการทำไมโครเอนแคปซูลเลขชั้น	9
รูปที่ 2 กลไกการเกิดเจลของอัลจินตกับ Ca^{2+} เกิดเป็น egg-box model	12
รูปที่ 3 ลักษณะของอิมัลชันที่เตรียมได้ในระหว่างการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่บรรจุ โบวินซีรัมอัลบูมิน โดยใช้ mineral oil, soybean oil และ isooctane	29
รูปที่ 4 ลักษณะของอนุภาคไมโครหลังการเติม isopropyl alcohol ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเมื่อ เตรียม โดยใช้ soybean oil	29
รูปที่ 5 ลักษณะของอนุภาคไมโครผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเมื่อเตรียมโดยใช้ mineral oil ใน ขั้นตอนก่อนนำไปทำแห้งเยือกแข็ง	30
รูปที่ 6 ลักษณะของอนุภาคผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเมื่อเตรียมโดยใช้ isooctane ในขั้นตอน ก่อนนำไปทำแห้งเยือกแข็ง	30
รูปที่ 7 ลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมินที่เตรียม โดยใช้ isooctane ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ในขั้นตอนหลังการล้างอนุภาคด้วยน้ำกลั่น	32
รูปที่ 8 ลักษณะอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียม โดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตรผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	33
รูปที่ 9 กราฟเปรียบเทียบการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมินสะสมจากอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซน ในช่วงเวลาต่างๆ ระหว่างอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วยสารละลายแคลเซียม เข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร และร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตรคลอไรด์	34
รูปที่ 10 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคของอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วย สัดส่วนอัลจินตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตรก่อนนำไปเข้ากระบวนการ Freeze drying	35
รูปที่ 11 อนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมินที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อไค โตแซนเท่ากับ 1:2 และความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร หลังจากกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	36
รูปที่ 12 กราฟแสดงการกระจายขนาดอนุภาคของอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วย สัดส่วนอัลจินตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร หลังเข้ากระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง	36

สารบัญรูปรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 13 ลักษณะของอนุภาคไมโครที่กระจายตัวในน้ำกลั่นผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเมื่อเตรียมโดยใช้ isooctane ในขั้นตอนหลังทำแห้งเยือกแข็ง.....	37
รูปที่ 14 กราฟแสดงการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมินสะสมจากอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนในช่วงเวลาต่างๆ.....	38
รูปที่ 15 กราฟเปรียบเทียบการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมินสะสมจากอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนในช่วงเวลาต่างๆ ระหว่างอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่เตรียมใหม่ กับที่เก็บศึกษาความคงตัวที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน.....	39
รูปที่ 16 อนุภาคไมโครอัลจินตโคโคแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อโคโคแซนเท่ากับ 1:2 และความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร หลังจากเตรียมใหม่ และหลังจากการเก็บศึกษาความคงตัวเป็นระยะเวลา 3 เดือน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ...	40
รูปที่ 17 อนุภาคไมโครอัลจินตโคโคแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อโคโคแซนเท่ากับ 1:2 และความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 หลังจากการศึกษาความคงตัวเป็นระยะเวลา 3 เดือนถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	40
รูปที่ 18 โครงสร้างของอัลจินต.....	50
รูปที่ 19 โครงสร้างของโบวินซีรัมอัลบูมิน	49
รูปที่ 20 โครงสร้างของโคโคแซน	51
รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมินมาตรฐาน	52

บทที่ 1

บทนำ

ยาโปรตีนแอนติเจนที่ใช้เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย หากให้โดยวิธีรับประทาน โปรตีนจะถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร จึงจำเป็นต้องบริหารยาด้วยวิธีการฉีด ซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บปวด หรืออาจทำให้เกิดอาการแทรกซ้อนจากการฉีดยา เช่น การอักเสบของหลอดเลือดดำ (thrombophlebitis) และเนื้อเยื่อตาย (tissue necrosis) (Zhou, 1994: 239-252) นอกจากนี้ยังต้องใ้บุคลากรทางการแพทย์ที่มีความชำนาญในการบริหารยา ดังนั้น การพัฒนารูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสมสำหรับนำส่งยากุ่มโปรตีนโดยการรับประทาน จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาจากการบริหารยาโดยวิธีการฉีดได้

เทคนิคไมโครเอนแคปซูลชัน (microencapsulation) เป็นกระบวนการที่ของเหลวหรืออนุภาคถูกห่อหุ้มให้อยู่ในรูปของแคปซูลด้วยพอลิเมอร์ชั้นบางๆ เกิดเป็นแคปซูลขนาดเล็กมีขนาดตั้งแต่ 1 ไมครอนจนถึง 1000 ไมครอน (Ghosh, 2006) และเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการเตรียมระบบนำส่งยา เพื่อไปปลดปล่อยยาซึ่งเป้าหมายหรือสถานะที่ต้องการ

การนำส่งโปรตีนแอนติเจนเพื่อไปยังเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองในทางเดินอาหารหรือ Peyer's patch ที่พบในลำไส้เล็ก (Van Kruiningen และคณะ, 2002: 180-185) ซึ่งมี Intestinal membranous microfold cell (M cell) ทำหน้าที่ในการดักจับแอนติเจน เพื่อไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Hathaway, 2000: 323-332) ขนาดของแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับการดักจับของ M cell ควรมีขนาด 1-10 ไมครอน (Rajapaksa และคณะ, 2010: 196-205) ดังนั้นในการเตรียมอนุภาคไมโคร จำเป็นต้องออกแบบให้อนุภาคมีขนาดระหว่าง 1-10 ไมครอน และใช้เปลือกหุ้มที่สามารถทนกรดในกระเพาะอาหาร เข้ากับร่างกายมนุษย์ได้ และสามารถยึดเกาะกับผนังของทางเดินอาหารได้เพื่อเพิ่มโอกาสในการดักจับของ M cell (Conradi, 1992: 435-439; Li, 2008: 1-11) ซึ่งอัลจินตเป็นหนึ่งในสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ในการเตรียมอนุภาคไมโครของอัลจินตจำเป็นต้องใช้ cationic polyvalent (Lee, 2004: 7300-7305) เพื่อทำให้เกิด ionic interaction ซึ่งจะทำให้ได้อนุภาคที่แข็งแรง และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า cationic polyvalent ที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมมากที่สุดคือ แคลเซียมคลอไรด์ (Carpov และคณะ, 1999: 1427-1435) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาวิจัยพบว่าการใส่โคโคแซนซึ่งเป็น polycation อีกตัวหนึ่งลงไป ในกระบวนการเตรียมอนุภาคไมโครของอัลจินตสามารถช่วยลดการถูกทำลายของโปรตีนแอนติเจนที่

อยู่ในอนุภาคไมโครในสภาวะกรด และช่วยยืดระยะเวลาในการปลดปล่อยสารได้ (Charalampopoulos และคณะ, 2011: 2834-2840) เนื่องจากโคโคแซนช่วยทำให้เปลือกอนุภาคไมโครที่เกิดขึ้นมีความเสถียร และลดความพรุนของเปลือก (Ermak, 1998: 261-283) เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอัลจินตและโคโคแซน ซึ่งมีความเสถียรอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดได้ โดยมีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างอัลจินตและโคโคแซน รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ ในการเตรียมต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโคร (Li, 2008: 1-11, Jin, 2009: 215-220) และวิธีนี้มีการใช้ชนิดของน้ำมันที่หลากหลายในขั้นตอนการเตรียมอิมัลชัน เช่น isooctane (Jin, 2009: 215-220), mineral oil (Ye และคณะ, 2010: 241-260) และ soybean oil (Kofuji และคณะ, 2005: 77-83) แต่ยังไม่มีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบชนิดของน้ำมันที่ใช้ในการเตรียมอิมัลชัน

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำขึ้นเพื่อพัฒนาอนุภาคไมโครของอัลจินตที่เคลือบด้วยโคโคแซนเพื่อใช้ในการนำส่งโปรตีนแอนติเจนไปยัง M cell โดยการรับประทานโดยใช้โปรตีนโบวินซีรัมอัลบูมิน (BSA) เป็นต้นแบบ โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของอนุภาคไมโครซึ่งเตรียมด้วยวิธี emulsification/ionic gelation ได้แก่ ผลของน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอิมัลชันต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่ได้ ศึกษาผลของสัดส่วนระหว่างอัลจินตต่อโคโคแซน ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ ซึ่งจะได้อนุภาคไมโครของโปรตีนโบวินซีรัมอัลบูมิน ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นอนุภาคไมโครของโปรตีนแอนติเจน เพื่อนำส่งไปยังเซลล์เยื่อบุต่อน้ำเหลืองที่ลำไส้เล็กโดยการรับประทานได้ ซึ่งจะช่วยเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วย

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อพัฒนาอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่บรรจุ โบวินซีรัมอัลบูมินสำหรับรับประทาน

วัตถุประสงค์เฉพาะ

1. เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างอัลจินตต่อโคโคแซนต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน
2. เพื่อศึกษาผลของชนิดน้ำมันต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน

- 3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน
- 4. เพื่อประเมินคุณสมบัติของอนุภาคไมโครอัลจินेट/โคโคแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน
- 5. เพื่อศึกษาความคงตัวของอนุภาคไมโครอัลจินेट/โคโคแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน โดยที่งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน โดยที่งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคไมโครที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

1. โพรตีนแอนติเจน

แอนติเจนเป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยการสร้างแอนติบอดี โดยแอนติเจนอาจเป็นโปรตีน โพลีแซคคาไรด์ หรือกรดอะมิโน สามารถแบ่งชนิดของแอนติเจนได้เป็น แอนติเจนที่ไม่ต้องกระตุ้นผ่าน T cells โดยสามารถกระตุ้น B cells ให้ผลิตแอนติบอดีได้โดยตรง แอนติเจนที่มีคุณสมบัตินี้คือ โพลีแซคคาไรด์แอนติเจน และแอนติเจนที่ต้องกระตุ้นผ่าน T cells เพื่อให้เกิดการสร้างแอนติเจนแอนติเจนที่มีคุณสมบัตินี้คือ โปรตีนแอนติเจน โดยในที่นี้จะขอกล่าวถึงแต่แอนติเจนที่เป็น โปรตีน

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ความเป็นสิ่งแปลกปลอมของตัวโปรตีนแอนติเจน เพราะโดยปกติระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งที่เป็นปกติอยู่ในร่างกายและสิ่งแปลกปลอมนอกร่างกายได้ และจะเกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อเมื่อเป็นสิ่งแปลกปลอมนอกร่างกายเท่านั้น, ขนาดของโปรตีนแอนติเจน โดยทั่วไปยิ่งขนาดของโปรตีนแอนติเจนใหญ่จะยิ่งกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้มาก, องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนแอนติเจน พบว่าโครงสร้างองค์ประกอบตั้งแต่โครงสร้างปฐมภูมิ ทติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิล้วนมีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งสิ้นและยิ่งโปรตีนแอนติเจนมีโครงสร้างองค์ประกอบที่ซับซ้อนจะยิ่งกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้มาก, ลักษณะทางกายภาพ พบว่าโปรตีนแอนติเจนที่ละลายน้ำจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าโปรตีนแอนติเจนที่ละลายน้ำไม่ได้หรืออยู่ในรูปของแข็ง และพบว่าโปรตีนแอนติเจนที่เสียดสภาพไปจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้มากกว่ารูปเดิม, ความสามารถในการถูกกลืนกินของโปรตีนแอนติเจน ยิ่งโปรตีนแอนติเจนถูกกลืนกินได้ง่ายจะยิ่งกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าเพราะโปรตีนแอนติเจนส่วนมากจะต้องถูกกลืนกิน ผ่านกระบวนการต่างๆ แล้วนำไปเสนอต่อ T cells โดย antigen presenting cell ขนาดที่ได้รับและทางที่ได้รับโปรตีนแอนติเจน พบว่าการให้ทางใต้ผิวหนังดีกว่าการให้ทางหลอดเลือดดำและทางการรับประทาน นอกจากนี้ทางที่ได้รับโปรตีนแอนติเจนยังอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนแอนติเจนได้ (Mayer G, 2011)



2. การนำส่งสารกลุ่มโปรตีนแอนติเจนโดยการรับประทาน

การนำส่งสารกลุ่มโปรตีนแอนติเจนเพื่อไปออกฤทธิ์โดยการรับประทานนั้นจะต้องสามารถนำส่งไปยัง peyer's patches ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองซึ่งถูกล้อมรอบด้วย particular epithelium และ follicle-associated epithelium (FAE) ประกอบกัน เรียงตัวอยู่ที่พื้นผิวของ gut-associated lymphoid tissue peyer's patches อาศัยอยู่ที่ชั้น mucosa และ submucosa ของลำไส้เล็ก โดยเฉพาะตรงบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย ประกอบด้วย 3 ส่วนหลักๆ คือ follicular area, interfollicular area และ follicle-associated epithelium ซึ่งที่บริเวณ follicle-associated epithelium (FAE) จะมีเซลล์ชนิดพิเศษคือ microfold cells (M cells) ที่สามารถนำส่งแอนติเจนและแบคทีเรียที่เข้ามาในช่องท้องไปสู่เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองได้ ซึ่งจะทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไป พบว่าจำนวนของ M-cells จะเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับเชื้อ เช่น *Streptococcus pneumoniae* หรือ *Salmonella typhimurium* (Jung และคณะ, 2010: 1-12) และได้มีการศึกษาการกลืนกินอนุภาคของ M cells ใน Peyer's patches ของกระต่าย พบว่า อนุภาคจะต้องมีขนาดประมาณ 1 ถึง 10 ไมครอน จึงจะถูกกลืนกินโดย M cells ได้ (Ermak และคณะ, 1995: 433-436) โดย M-cells สามารถนำส่งโปรตีน แอนติเจน แบคทีเรีย และไวรัส ไปสู่เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองได้โดยกระบวนการ transcytosis และทำการย่อยสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ endocytosis, phagocytosis, pinocytosis และ macropinocytosis กลไกของ M-cells ในการรับเอาสิ่งแปลกปลอมเข้าไปขึ้นอยู่กับลักษณะของสารหรือสิ่งมีชีวิตนั้น พบว่าสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่และเชื้อแบคทีเรียจะเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ phagocytosis ส่วนเชื้อไวรัสและอนุภาคอื่นๆ จะถูกรับเข้าไปโดยกระบวนการ endocytosis (Jung และคณะ, 2010: 1-12) แล้วส่งต่อไปยัง dendritic cells และแมโครฟาจ เมื่อ dendritic cells และแมโครฟาจได้รับแอนติเจนจาก M cells จะเกิดการนำเสนอแอนติเจนต่อ T cells ที่อยู่ใน GALT ทำให้เกิดการหลั่ง immunoglobulin A จาก mucosa ซึ่งจะถูกส่งผ่าน epithelial cells ออกสู่ lumen ช่วยขัดขวางการเกาะติดและรุกรานของเชื้อแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ T cells ที่เจอกับแอนติเจนอาจเคลื่อนตัวไปยังชั้น lamina propria และชั้น epithelium แล้วพัฒนาต่อไปเป็น cytotoxic T cells ซึ่งจะมีกลไกอื่นในการกำจัดเชื้อที่ต่างออกไป (Bowen R, 2004)

ปัจจุบัน การนำส่งสารกลุ่มโปรตีนแอนติเจนโดยการรับประทานยังมีข้อจำกัดอยู่มากในด้านคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของตัวโปรตีนเองที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่, สามารถเสื่อมสลายได้ด้วยเอนไซม์ในร่างกาย, มีค่าครึ่งชีวิตในพลาสมาสั้น, ปัญหาในด้านการถูกดูดซึมผ่านของโปรตีน, ความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการแพ้ และแนวโน้มในการที่จะเกิดการเกาะกลุ่มกันและ

เสียดสภาพไป เป็นผลให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของโปรตีนนั้นต่ำกว่า 1% จึงได้มีความพยายามในการพัฒนาปรับปรุงชีวปริมาณออกฤทธิ์ของโปรตีนเมื่อให้โดยการรับประทานให้ได้อย่างน้อย 30-50% ดังนั้น ในการออกแบบการนำส่งโปรตีนแอนติเจนโดยการรับประทานจึงต้องใช้เทคนิคมากมาย ได้แก่

- การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโปรตีนให้ทนต่อเอนไซม์และ/หรือเพื่อให้ซึมผ่านเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังอาจใช้เพื่อลดความเป็นพิษลงด้วย ทำโดยการเปลี่ยนแปลงที่สายของกรดอะมิโนของโปรตีนโดยตรงหรือเปลี่ยนแปลงที่ส่วนคาร์โบไฮเดรตของไกลโคโปรตีน เช่น การแทนที่ L-amino acid ด้วย D-amino acid, การตัดหมู่เอมีนของกรดอะมิโนตัวแรกและแทนที่ L-arginine ด้วย D-arginine เป็นต้น หรือการเพิ่มส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าไปที่ผิวของโปรตีนโดยใช้ lipophilic moieties จะช่วยในเรื่องการเพิ่มการซึมผ่านของโปรตีนหรือช่วยเพิ่มความคงตัวของโปรตีนได้ หรือการนำพอลิเมอร์สายสั้นๆมาต่อเข้ากับโปรตีนเพื่อช่วยให้โปรตีนทนต่อเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารมากขึ้น

- การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของตัวโปรตีนเองและความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อตัวโปรตีนนั้น โดยปริมาณของสารที่จะให้ร่วมเข้าไปเพื่อไปยับยั้งเอนไซม์นั้นต้องคำนึงถึงผลต่อการซึมผ่านของโปรตีนด้วย ตัวอย่างของสารเหล่านี้ เช่น 1,10-phenanthroline, p-chloromeribenzoate, bacitracin, thiomers, polycarbophil และ carbopol 934P หรืออาจใช้การควบคุม pH เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร โดยจากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ในปริมาณที่เพียงพอที่จะลด pH ของลำไส้เล็กเหลือ 4.5 ได้ จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin, chymotrypsin และ elastase

- สารที่ช่วยเพิ่มการซึมผ่าน เป็นสารที่ใส่ลงไปในสูตรตำรับเพื่อทำลายผนังของลำไส้เล็กชั่วคราวเพื่อให้โปรตีนสามารถซึมผ่านเข้าไปได้ดีขึ้น โดยสารเหล่านี้จะต้องสามารถออกฤทธิ์ได้ทันทีและมีผลอยู่แค่ชั่วคราวเท่านั้น ตัวอย่างของสารเหล่านี้ เช่น detergents, surfactants, bile salts, Ca^{2+} chelating agents, fatty acids, medium chain glycerides, acyl carnitine, alkanoyl cholines, N-acetylated α -amino acids, N-acetylated non- α -amino acids, chitosans, mucoadhesive polymers, และ phospholipids โดยสารที่เป็น detergents / surfactants จะช่วยเพิ่มการซึมผ่านแบบ transcellular จากการทำลายโครงสร้างของ lipid bilayer ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยอมให้สารผ่านไปได้ดีขึ้น นอกจากนี้ ยังอาจช่วยเพิ่มการละลายในโปรตีนที่ละลายไม่ดีได้อีกด้วย (Dong และคณะ, 1999: 1161-1168) สารที่เป็น chelators ช่วยเพิ่มการซึมผ่านโดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ calcium ions ทำให้เกิดการทำลาย tight junctions (TJs) และช่วยเพิ่มการซึมผ่านแบบ paracellular ของโปรตีนที่ชอบน้ำได้ ส่วนสาร

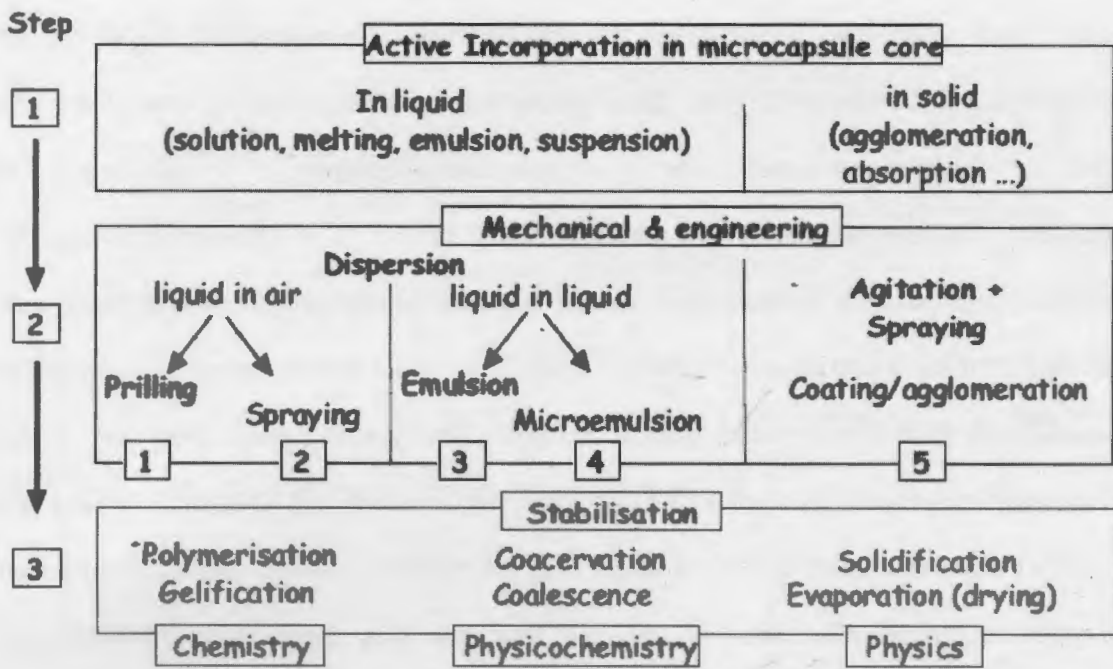
sodium dodecyl sulfate, sodium caprate และ long-chain acylcarnitines จะช่วยเพิ่มการซึมผ่านทาง paracellular (Hochman และคณะ, 1994: 253-267) โดยการกระตุ้น phospholipase C และทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ นำไปสู่การหดตัวของ calmodulin dependent actin-myosin filaments ทำให้เกิดการเปิดออกของ Tight junction ในที่สุด ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาสารใหม่ๆขึ้นมาเรียกว่า transport carriers โดยให้สารเหล่านี้ไปเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนให้อยู่ในรูปที่ซึมผ่านและถูกดูดซึมได้ดีขึ้น โดยไปทำให้โปรตีนเกิดความคงตัวในรูป partially unfolded conformations ชั่วคราว ทำให้โปรตีนเศษส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกมาจึงซึมผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อร่างกายได้ดีขึ้น (Milstein และคณะ, 1998: 259-267) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้เกลือของโคโตแซนในการเพิ่มการซึมผ่าน โดยใช้ chitosan hydrochloride, chitosan glutamate (1.5% w/v) และ partially quaternized chitosan derivative, N-trimethyl chitosan chloride (TMC) (1.5 and 2.5% w/v) ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารกลุ่ม chitosans ดังกล่าว 1.5% จะช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารกลุ่มโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยประสิทธิภาพของสารแต่ละตัวเป็นดังนี้ chitosan hydrochloride > chitosan glutamate > TMC และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TMC จาก 1.5% w/v เป็น 2.5% w/v จะช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารกลุ่มโปรตีนได้ดีขึ้น (Kotze และคณะ, 1997: 243-253)

การใช้ระบบนำส่งยาเพื่อช่วยป้องกันกรดและเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น การทำเป็น enteric-coated dry emulsions, microspheres, liposomes และ nanoparticles โดยเมื่อทำเป็นระบบอิมัลชันจะช่วยป้องกันโปรตีนจากการเสื่อมสลายทางเคมีและจากเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร ส่วนการช่วยเพิ่มการดูดซึมนั้นขึ้นกับชนิดของระบบอิมัลชัน ขนาดของอนุภาคที่เป็นเฟสกระจายตัว pH ค่าการละลายของโปรตีน และชนิดของน้ำมันที่ใช้ ซึ่งการนำไปทำให้อยู่ในรูปผงแห้งจะช่วยเพิ่มความสะดวกในการพกพาและสามารถที่จะนำไปทำเป็นรูปแบบยาเม็ดหรือแคปซูลต่อไปได้

การทำอนุภาคไมโครโดยกระบวนการไมโครเอนแคปซูลชัน ทำโดยการล้อมหรือห่อหุ้มอนุภาคของสารหนึ่งไว้ภายในสารอีกชนิดหนึ่งเกิดเป็นอนุภาคขนาดเล็ก ซึ่งขนาดอนุภาคนี้มีตั้งแต่ขนาดเล็กกว่า 1 ไมครอน ถึง หลายร้อยไมครอน ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างกลม แต่อาจมีรูปร่างแตกต่างกันได้หลากหลาย ขึ้นกับหดยของสารที่อยู่ภายใน สารที่จะถูกห่อหุ้มอาจอยู่ในสถานะของแข็ง ของเหลว หรือแก๊ส ก็ได้ ไมโครเอนแคปซูลชันสามารถเตรียมได้จากหลายวิธีและสามารถควบคุมการปลดปล่อยของสารออกจากอนุภาคไมโครได้ โดยอาจให้ค่อยๆปลดปล่อยออกจากอนุภาคไมโครอย่างช้าๆต่อเนื่อง หรืออาจให้ปลดปล่อยเฉพาะเมื่อไปเจอสภาวะแวดล้อมภายนอกที่กระตุ้นให้เกิดการแตก การหลอม

หรือการละลายของเปลือกอนุภาค โดยเปลือกอนุภาคนี้อาจทำเป็นแบบห่อหุ้มชั้นเดียวหรือห่อหุ้มหลายชั้นก็ได้ขึ้นกับความหนาของเปลือกและการควบคุมการปลดปล่อยที่ต้องการ (microtek laboratories, 2010) การทำเป็นไมโครเอนแคปซูลชั้นมีประโยชน์ดังนี้คือ ช่วยลดการสัมผัสกันระหว่างอนุภาคที่ไม่เข้ากัน, ป้องกันสารภายในอนุภาค ในกรณีที่สารนั้นไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น วิตามิน กรดไขมัน ไม่อึดตัวที่จะเสื่อมสลายได้เมื่อเจอกับออกซิเจน หรือใช้ป้องกันยาและโพรไบโอติกจากกรดในกระเพาะอาหาร, ควบคุมการปลดปล่อยสารในอัตราที่ต้องการ หรือบริเวณที่เฉพาะเจาะจง, ใช้ในการปรับปรุงโครงสร้าง เช่น การเคลือบน้ำตาลทรายแดงที่มักเกิดการเกาะติดกันด้วยน้ำตาลกรวดเพื่อให้คุณสมบัติในการไหลดีขึ้น หรือการทำให้สารละลายถูกห่อหุ้มเป็นอนุภาคไมโครแล้วไปทำให้แห้งเพื่อให้ขนส่งและพกพาไปใช้สะดวกมากขึ้น, เพิ่มประโยชน์การใช้งานใหม่ๆ เช่น ในการนำอาหารหรือสารอาหารชนิดใด ๆ ที่อยู่ในรูปแบบธรรมชาติ มาแปรรูปไปเพื่อให้ประโยชน์ต่อสุขภาพนอกเหนือจากประโยชน์ที่ได้รับจากสารอาหารที่รับประทานกันในชีวิตประจำวัน หรือใช้ในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น โดยหลักการในการทำไมโครเอนแคปซูลชั้นมี 3 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนี้

ขั้นตอนแรกคือการทำให้สารสำคัญที่ต้องการอยู่ในรูประบบกระจายตัวของของแข็งหรือทำเป็นของเหลว เช่นทำเป็นสารละลาย อิมัลชัน หรือสารแขวนตะกอน เพื่อใส่เข้าไปในแกนกลางของอนุภาคไมโคร ขั้นที่สองคือการดำเนินการเชิงกล โดยในระบบของเหลวอาจทำ liquid-in-air (dropping หรือ spraying) หรือทำ liquid dispersion (emulsification หรือ micro-emulsification) ส่วนระบบของแข็งอาจทำการพ่นสารละลายลงบนอนุภาค (fluid bed หรือ pan coating หรือ agglomeration) ขั้นสุดท้ายคือการทำให้อนุภาคที่ได้คงตัวหรือเกิดการแข็งตัว โดยอาจใช้กระบวนการทางเคมี (polymerization), กระบวนการทางฟิสิกส์เคมี (gelation หรือ coacervation) หรือกระบวนการทางกายภาพ (drying หรือ solidification) กระบวนการทั้ง 3 ขั้นตอนนี้สามารถทำซ้ำได้เพื่อให้ได้คุณสมบัติของอนุภาคสุดท้ายตามต้องการ เช่น อนุภาคไมโครที่ได้จากการพ่นแห้งของพอลิเมอร์กับสารละลายของสารสำคัญ อาจนำมาเคลือบด้วยสารอีกชนิดหนึ่งที่ทำให้ห่อหุ้ม ซึ่งการทำไมโครเอนแคปซูลชั้นครั้งแรกเพื่อห่อหุ้มอนุภาคของสารเอาไว้ภายใน ในขณะที่การเคลือบครั้งหลังเพื่อช่วยปกป้องและควบคุมการปลดปล่อยของสารออกจากอนุภาค (Blitz, 2006: 23-34)



รูปที่ 1 หลักการในการทำไมโครเอนแคปซูล (Blitz, 2006: 23-34)

การทำเป็นอนุภาคนาโนเพื่อนำส่งโปรตีน มีข้อดีคือสามารถถูกดูดซึมผ่านผนังของลำไส้เล็ก และ peyer's patches ได้ทั้งอนุภาคโดยไม่ต้องผ่านการย่อยให้มีขนาดเล็กลงก่อน ซึ่งความสามารถในการป้องกันโปรตีนจากการถูกทำลายของอนุภาคนาโนนี้จะขึ้นกับพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ทำเป็นเปลือกหุ้ม และได้มีการศึกษาพบว่าทำให้การดูดซึมโดยรวมทั้งหมดดีขึ้นด้วย ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการดูดซึมได้แก่ขนาดของอนุภาค ประจุที่ผิวของอนุภาค ผลของ surface ligands และพลศาสตร์ของปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคและผนังของระบบทางเดินอาหาร (Sakuma และคณะ, 2001: 21-37)

ระบบ Liposomes ได้มีการนำมาใช้เพื่อนำส่งโปรตีนทางการรับประทาน แต่ยังมีข้อเสียที่ยังไม่ทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร, เกลือน้ำดี, ไลเปสจากตับอ่อน จึงได้มีความพยายามปรับปรุงความคงตัวของ liposomes โดยการใส่พอลิเมอร์ เช่น mucin หรือ polyethylene glycol เข้าไปที่ผิวของ liposomes หรือโดยการใช้ไขมันที่ทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร (Rick, 2005: 189)

การใช้ระบบ Mucoadhesive polymeric เป็นระบบที่สามารถจะไปยึดติดกับ mucin ที่ชั้น mucosa ที่บริเวณที่จะถูกดูดซึม ลดการขจัดยาจากบริเวณที่ถูกดูดซึม ช่วยเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยา และยังสามารถช่วยป้องกันโปรตีนจากการถูกทำลายได้ (Ram และคณะ, 2003: 153-264) พอลิเมอร์ที่

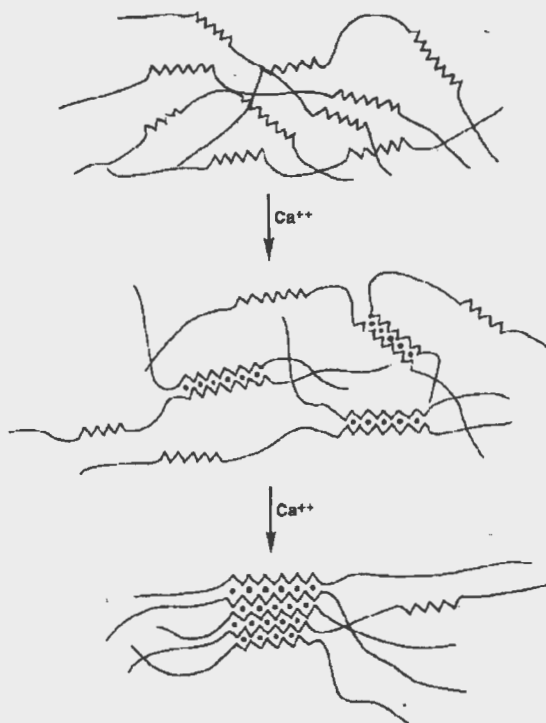
นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ polyacrylic acid เช่น carbopol, polycarbophil, polyacrylic acid (PAAc), polyacrylate, poly (methylvinylether-co-methacrylic acid), poly (2-hydroxyethyl methacrylate), poly(methacrylate), poly(alkylcyanoacrylate), poly(isohexylcyanoacrylate) และ poly(isobutylcyanoacrylate) หรือ โฉนวนพืชน์ของเซลลูโลส เช่น carboxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, methylcellulose และ methylhydroxyethyl cellulose นอกจากนี้ยังมีการใช้สารพวก chitosan และ gums หลายชนิด เช่น guar, xanthan, poly(vinylpyrrolidone) และ poly(vinyl alcohol) ได้มีการทำเป็นระบบ mucoadhesive patch system (GI-MAPS) เพื่อให้นำส่งโปรตีนโดยทำเป็นฟิล์ม 4 ชั้นบรรจุในแคปซูลแบบเอนเทอริก โดยชั้นในสุดจะใช้พอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ethyl cellulose (EC) ส่วนชั้นกลางจะเป็นชั้นที่บรรจุโปรตีนและสารช่วยพวก organic acid, citric acid, non-ionic surfactant, polyoxyethylated castor oil derivative โดยใช้พอลิเมอร์กลุ่มเซลลูโลสโดยทำให้ยึดติดกับชั้นของ ethyl cellulose (EC) ด้านในสุดด้วยวิธี heating press ที่ผิวหนังจะใช้พอลิเมอร์ที่จะปลดปล่อยเมื่อเจอสภาวะต่างเท่านั้น เช่น hydroxypropylmethylcellulose phthalate, Eudragit L100 หรือ S100 และเคลือบด้วย adhesive layer โดยจะทำให้ยึดติดกับผิวชั้นกลางโดยใช้ carboxyvinyl polymer เมื่อรับประทานยาเข้าไปผิวชั้นนอกสุดจะละลายที่ลำไส้เล็กและเกาะติดกับผนังของลำไส้เล็กทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นอย่างมากที่ผิวด้านในและด้านนอกของผนังลำไส้เล็ก ทำให้เกิดการดูดซึมได้ดีขึ้น (Eiamtrakarn และคณะ, 2002: 145-152) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าการใช้ Carbopol ในการนำส่งยาสามารถยับยั้ง trypsin และ chymotrypsin (Bai และคณะ, 1996: 17-21) ได้ แม้ว่าจะเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุลบที่ดูเหมือนว่าน่าจะเกิดการผลักกันทางประจุไฟฟ้ากับ mucin ที่ผนังลำไส้เล็กที่เป็นประจุลบเหมือนกัน แต่ความจริงแล้ว hydrogen bonding, van der Waal's interactions และการเกิด chain entanglement กับ mucus (Gu และคณะ, 1988: 21-67) นั้นแข็งแกร่งกว่าแรงผลักทางประจุไฟฟ้า ส่วนพอลิเมอร์พวก thiomers นั้นก็สามารถยึดติดกับเยื่อเมือกของทางเดินอาหารได้ดีมาจากพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ thiol ของ thioemer กับ หมู่ cysteine ซึ่งมีมากที่ส่วน glycoproteins ของ mucus และพบว่ายังมีหมู่ thiol มาก ยังยึดติดกับระบบทางเดินอาหารได้ดีมากขึ้น (Shaji J, 2008; 269-277)

3. ระบบอนุภาคไมโครอัลจินตที่เคลือบด้วยไคโตแซน

อัลจินตเป็นสารที่ใช้ในการนำส่งยามานานหลายปี เช่น ใช้เป็นสารปรุงแต่งในระบบนำส่งยา, ใช้ในสูตรตำรับสำหรับป้องกันการไหลย้อนกลับของกรดในกระเพาะ เพราะ อัลจินตมีคุณสมบัติเป็น solid-like attribute (gel) ในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารเนื่องจากเกิดเป็นเจลของกรดอัลจินิก และยังมีคุณสมบัติในการช่วยป้องกันยาจากกรดในกระเพาะอาหารได้อีกด้วย ในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อใช้ในการนำส่งยา โดยการนำ cell suspension มาผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจินต แล้วทำการหยดลงในสารละลายของ Ca^{2+} ซึ่งจะเกิดเป็นเจลทรงกลมห่อหุ้มเซลล์เอาไว้ภายใน ซึ่งขนาดของหยดสารละลายที่หยดลงไปจะส่งผลต่อขนาดอนุภาคที่ได้ อัลจินตจะเกิด strong complexes กับ polycations เช่น chitosan, polypeptides หรือพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น polyethylenimine ซึ่งการเคลือบด้วยสารเหล่านี้จะช่วยให้เจลที่เกิดมีความคงตัวมากขึ้น ช่วยลดครุพุนท์ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ เจลของอัลจินตมีความคงตัวดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด ซึ่งเป็นข้อดีกว่าพอลิเมอร์อื่น มีประโยชน์อย่างมากในการใช้ห่อหุ้มเอนไซม์ในระบบที่ไม่ได้ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (Draget, 2011: 251-256)

การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินตนั้นสามารถเตรียมได้ด้วยวิธี Ionotropic gelation ซึ่งเกิดจากความสามารถในการเชื่อมต่อกันเป็นร่างแหของพอลิเมอร์ที่มีประจุเมื่อมีไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับพอลิเมอร์แล้วเกิดเป็นเจลห่อหุ้มสารเอาไว้ภายใน ซึ่งสามารถใช้ควบคุมอัตราการปลดปล่อยสารได้ สามารถเตรียมได้โดยการหยดสารละลายของพอลิเมอร์ที่มียาหรือสารสำคัญที่ต้องการห่อหุ้มอยู่ ลงในสารละลายที่มีไอออนประจุตรงข้ามกับพอลิเมอร์ ไอออนที่มีประจุตรงข้ามจะแพร่เข้าไปในหยดของสารละลายของพอลิเมอร์ที่มีสารสำคัญอยู่ เกิดการจัดเรียงทางโครงสร้างสามมิติจากการเชื่อมกันด้วยพันธะไอออนิก (Patil และคณะ, 2010: 241-248) โดยอัลจินตจะเกิดเจลกับ di- และ multivalent cations แต่จะไม่เกิดเจลกับ monovalent cations และ Mg^{2+} ions ในขณะที่ Ba^{2+} และ Sr^{2+} จะทำให้เกิดเจลที่แข็งแรงกว่า Ca^{2+} แต่ที่นิยมใช้ Ca^{2+} มากที่สุดเพราะราคาถูก หาได้ง่าย และไม่เป็นพิษ ซึ่งความแข็งแรงของเจลจะขึ้นอยู่กับปริมาณ guluronic และจำนวนเฉลี่ยของ G-units ใน G-blocks การเกิดเจลจะเกิดเมื่อ divalent cations เข้าไปอยู่ระหว่างสาย ของ G-blocks และทำให้เกิดการจับกันเป็นโครงสร้าง egg-box model ขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2 ความเข้มข้นของ divalent cations มีผลอย่างมากต่อการสร้างโครงข่ายของเจลและความเป็นเนื้อเดียวกันของเจลอัลจินตที่ห่อหุ้มอนุภาค แต่ยังมีข้อเสียของอนุภาคไมโครอัลจิ

เนตที่ไม่คงตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่า pH สูงกว่า 5 จึงไม่ช่วยปกป้องตัวยาในสภาวะของลำไส้เล็ก (Ribeiro และคณะ, 2005: 31-40)



รูปที่ 2 กลไกการเกิดเจลของอัลจินตกับ Ca^{2+} เกิดเป็น egg-box model

(FAO corporate document repository, 1987)

ไคโตแซน เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติที่สามารถเข้ากับร่างกายมนุษย์ได้ ย่อยสลายในร่างกายได้ และรับประทานได้อย่างปลอดภัย ไม่เป็นพิษ (Kumar M, 2000) มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราและหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ ใช้ในระบบการนำส่งยาที่ควบคุมการปลดปล่อย ใช้เป็นสารปรุงแต่งทางเภสัชกรรม เกิดเจลได้ที่ช่วง pH ต่ำ (Knapczyk J, 1993) ในกระเพาะอาหารไคโตแซนจะรับโปรตอนเข้ามาทำให้มีประจุบวก สามารถยึดเกาะกับเยื่อเมือกในร่างกายได้ดีมาก เนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรเจนและพันธะไอออนิกจากประจุบวกของหมู่อะมิโนของไคโตแซน กับประจุลบของชั้นเยื่อเมือกของผิวผนัง เนื่องจากที่ผิวผนังประกอบด้วย glycoprotein ที่เรียกว่า mucin ซึ่งมีประจุลบจำนวนมากจากหมู่ sialic

acid (Illum และคณะ, 1998) จึงสามารถนำประโยชน์นี้มาใช้ในการนำส่งยาได้ เช่น การใช้โคโตแซนในการนำส่งยาเข้าทางช่องจมูกจะช่วยลดการขจัดยาออกและเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยาได้

โคโตแซนสามารถเตรียมเป็นอนุภาคไมโครได้โดยใช้วิธี Ionotropic gelation กับสารธรรมชาติที่มีประจุลบได้มากมาย เช่น xanthan gum, alginate และ carrageenan โดยนิยมใช้อัลจินตมากที่สุดในการนำส่งยา, โพรตีน และการปลูกถ่ายเซลล์ เป็นต้น เนื่องจากการเกิดพันธะที่แข็งแรงระหว่างประจุบวกของหมู่อะมิโนของโคโตแซนกับประจุลบของหมู่คาร์บอกซิลของอัลจินต พบว่าโคโตแซนจะเกิดการจับกับผิวของอนุภาคอัลจินตอย่างรวดเร็ว แต่จะไม่เกิดการแพร่ผ่านเข้าไปสู่แกนกลาง ซึ่งความคงตัวจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมด้วย เช่น pH และ ionic strength พบว่าสามารถเพิ่มความคงตัวได้โดยการใส่แคลเซียมคลอไรด์ลงในสารละลายโคโตแซน ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกันของโคโตแซนกับผิวของอนุภาคอัลจินตได้มากขึ้นตามความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มากขึ้น (Patil และคณะ, 2010: 241-248) เมื่อนำอนุภาคไมโครอัลจินตมาเคลือบด้วยโคโตแซน เปลือกของอนุภาคไมโครจะไม่ละลายที่ pH สูงกว่า 6.5 ขึ้นไป จึงช่วยปกป้องยาในทางเดินอาหารส่วน jejunum และ ileum ได้ดี (Abraham และคณะ, 2006) โดยเปลือกจะค่อยๆ กร่อนอย่างช้าๆ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์และช่วยป้องกันการสั่นสะเทือนของยาออกจากอนุภาคไมโครในส่วนต้นของระบบทางเดินอาหาร (Sinha และคณะ, 2001) และพบว่าเปลือกของอนุภาคไมโครที่เตรียมจากโคโตแซนยอมให้ยาที่เป็นกรดซึมผ่านออกมาได้ดีกว่ายาที่เป็นด่าง (Sawayanagi และคณะ, 1982)

การศึกษาการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโตแซน โดยใช้โพรตีนฮีโมโกลบินเป็นต้นแบบของโพรตีน พบว่าอนุภาคอัลจินตที่เคลือบด้วยโคโตแซนจะช่วยทำให้เปลือกของอนุภาคมีความแข็งแรงขึ้น ป้องกันการสูญเสียโพรตีนที่บรรจุอยู่ภายในได้มากขึ้น เนื่องจากอนุภาคไมโครอัลจินตจะไม่คงตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่า pH สูงกว่า 5 โดยพบว่าโพรตีนฮีโมโกลบินที่ถูกปลดปล่อยออกมาในสถานะจำลองของกรดในกระเพาะอาหารเมื่อเคลือบด้วยโคโตแซน 1 รอบ ลดลงเหลือ 68% เมื่อเคลือบด้วยโคโตแซน 2 รอบ ลดลงเหลือ 28% เมื่อเทียบกับอนุภาคที่ไม่ได้เคลือบด้วยโคโตแซน และพบว่าที่ pH 6.8 โพรตีนฮีโมโกลบินถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโตแซนที่จะกร่อนไปอย่างช้าๆ แสดงให้เห็นว่าอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโตแซนช่วยปกป้องโพรตีนจากสภาวะกรดได้และจะค่อยๆ ปลดปล่อยยาออกมาอย่างสมบูรณ์ที่ลำไส้เล็ก อนุภาคไมโครอัลจินตทั้งที่เคลือบและไม่ได้เคลือบด้วยโคโตแซนมีค่า encapsulation efficiency ของโพรตีนฮีโมโกลบินเท่ากันคือประมาณ 89% แต่อาจ

พบว่าอนุภาคไมโครอัลจินเตที่เคลือบด้วยไคโตแซนอาจเกาะกันเป็นก้อนในขั้นตอนการเคลือบได้ ซึ่งจะส่งผลให้อนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น (Ribeiro และคณะ, 2005: 31-40)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินเต/ไคโตแซน ได้แก่ pH ในระหว่างขั้นตอนการเตรียมและการเก็บรักษา เพราะ pH จะส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไอออนของแคลเซียมกับอัลจินเต และอัลจินเตกับไคโตแซน รวมทั้งยังส่งผลต่อการแตกตัวของโปรตีนและการเกิดพันธะระหว่างโปรตีนกับอัลจินเตด้วย (Huguete, 1996: 745-751) ความเข้มข้นของอัลจินเตและไคโตแซน ที่ใช้ ความเข้มข้นของ calcium chloride (CaCl₂) ใน gelation medium, เวลาในการบรรจุสาร, น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน โดยจะส่งผลต่อการกักเก็บและขนาดของอนุภาค นอกจากนี้ยังพบว่าขั้นตอนการล้างมีผลต่ออนุภาคไมโครด้วย โดยอนุภาคไมโครที่ล้างด้วย acetone จะเพิ่มการกักเก็บโปรตีนในระหว่างที่อยู่ในสภาวะกรดได้ จากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2009) พบว่าการล้างอนุภาคด้วย acetone ก่อนทำให้แห้งจะสามารถกักเก็บโปรตีนได้ถึง 80% เทียบกับที่ไม่ได้ล้างด้วย acetone ที่จะกักเก็บได้แค่ 20% (Vandenberg และคณะ, 2001: 297-307)

มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้อนุภาคไมโครอัลจินเต/ไคโตแซน ในการนำส่งยาไปยังเป้าหมายที่จำเพาะที่บริเวณลำไส้ใหญ่ซึ่งมีช่วง pH ประมาณ 6.5-7.0 รวมทั้งการใช้ไคโตแซน ในระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย เช่น ยาปฏิชีวนะ ยารักษามะเร็ง ยาโปรตีน ยาเปปไทด์ และวัคซีน เป็นต้น พบว่าการใช้ไมโครอัลจินเตไคโตแซน ในการนำส่งยาพวกโปรตีน เปปไทด์ และวัคซีนสามารถช่วยเพิ่มปริมาณของยาที่ไปถึงเป้าหมายได้อีกด้วย จากการที่ไคโตแซน ช่วยยับยั้งเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารที่จะมาทำลายยา เช่น pancreatic serine-proteases และ metallo-proteases เป็นต้น และคุณสมบัติในการเกาะติดเยื่อเมือกที่ดีของไคโตแซน จึงช่วยเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยาได้ การที่ไคโตแซนยับยั้งเอนไซม์ metallo-proteases ได้นั้นเนื่องมาจากไคโตแซน มีความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะที่ดีจากการที่มีหมู่ hydroxyl ที่มีความมีขั้วสูง มีหมู่อะมิโนปฐมภูมิจำนวนมาก และความยืดหยุ่นของสายพอลิเมอร์ในโครงสร้าง (Inoue และคณะ, 1996)

บทที่ 3

สารเคมี เครื่องมือ และวิธีการวิจัย

สารเคมีที่ใช้

1. Acetic acid (Lot No. A405201, บริษัท MERCK, เยอรมันนี)
2. Acetone (Lot No. C141025, บริษัท MERCK, เยอรมันนี)
3. Calcium chloride dihydrate (Lot No. 218789, บริษัท Fluka-Garantie, สวิตเซอร์แลนด์)
4. Chitosan มวลโมเลกุล 50,000 (Lot No. MKBD3830, บริษัท SIGMA – ALDRICH, สหรัฐอเมริกา)
5. Commassie brilliant blue (Lot No. 159665, บริษัท THERMO Co Ltd, ไทย)
6. Disodium hydrogen phosphate (Lot No. F2F136, บริษัท UNIVAR, ออสเตรเลีย)
7. Ethanol (Lot No. A121120, บริษัท MERCK, เยอรมันนี)
8. Hydrochloric acid (Lot No. A281701, บริษัท MERCK, เยอรมันนี)
9. Isooctane (Lot No. 2A35412, บริษัท AJAX FINECHEM PTY Ltd, ไทย)
10. Isopropyl alcohol (Lot No. A457621, บริษัท MERCK, เยอรมันนี)
11. Mineral oil (Lot No. 1049011230, บริษัท ศรีจันทร์สห โอสถ จำกัด, ไทย)
12. Phosphoric acid (Lot No. A525015, บริษัท MERCK, เยอรมันนี)
13. Polyoxyethylene_sorbitan_monooleate (Tween 80) (Lot No. 809861, บริษัท ศรีจันทร์สห โอสถ จำกัด, ไทย)
14. Potassium chloride (Lot No. 1203050140, บริษัท ศรีจันทร์สห โอสถ จำกัด, ไทย)
15. Sodium alginate (Lot No. 1166078, บริษัท FLUKA CHEMIE GmbH, สหราชอาณาจักร)
16. Sodium chloride (Lot No. 080929, บริษัท ศรีจันทร์สห โอสถ จำกัด, ไทย)
17. Sorbitan_monooleate (Span 80) (Lot No. 005746, บริษัท ศรีจันทร์สห โอสถ จำกัด, ไทย)
18. Soybean oil (บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด มหาชน, ไทย)

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (รุ่น IX51, OLYMPUS[®], สหรัฐอเมริกา)
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง(METTLER TOLEDO[®], ไทย)
3. เครื่องชั่งน้ำหนัก 3 ตำแหน่ง(รุ่น AG 285, METTLER TOLEDO[®], ไทย)
4. เครื่องชั่งน้ำหนัก 5 ตำแหน่ง(รุ่น PG 403-S, METTLER TOLEDO[®], ไทย)
5. เครื่องทำแห้งเยือกแข็งชนิดเสียบ(DURA-DRY MP[®], ไทย)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน (ABBOTT[®], สหรัฐอเมริกา)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน (รุ่น Z383K9, HERMLE[®], สหรัฐอเมริกา)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน (รุ่น Centrifugette 4206, ALC[®], สหราชอาณาจักร)
9. เครื่องวัดขนาดอนุภาค Mastersizer (รุ่น 2000, MALVERN[®], สหรัฐอเมริกา)
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (รุ่น 420A, ORION[®], เซอร์มันนี)
11. Homogenizer (รุ่น DI18 basic, YELLOW LINE[®], สหรัฐอเมริกา)
12. Magnetic stirrer (รุ่น basic M6 CAT, KIKA SCHOTT WERKE RCT[®], มาเลเซีย)
13. Microplate reader (รุ่น Wallac 1420, PERKIN ELMER[®], สหรัฐอเมริกา)
14. Sonicator (รุ่น 275DAE, CREST ULTRASONIC, สหรัฐอเมริกา)
15. Vortex-2 (รุ่น G-560E, GENIE[®], อังกฤษ)

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินेट/ไคโตแซนที่บรรจุโพรตีนซีรัมอัลบูมิน(BSA)

การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินेट/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA ด้วยวิธี Emulsifying-gelatinization (Meixia, 2009) ส่วนประกอบและปริมาณที่ใช้ในการเตรียมแสดงดังตารางที่ ... โดยแยกเตรียมสารละลายไคโตแซนให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร โดยละลายในน้ำกลั่นที่ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 4 นำไปปั่นบนเครื่อง Magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 500 รอบ/นาที จนได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อน เตรียมสารละลายอัลจินेटให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยมวลต่อปริมาตรและเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6 % w/v โดยละลายในน้ำกลั่นที่ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 4 จากนั้น เทสารละลายโพรตีนซีรัมอัลบูมินลงในสารละลายอัลจินेट คนจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และเตรียมเป็นอิมัลชัน โดยค่อยๆเทส่วนผสมของอัลจินेटและ BSA ลงในน้ำมันที่มี Span 80 ปริมาณตามที่คำนวณให้เหมาะสมกับค่า HLB ของสูตรตำรับ ปริมาณของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินेट/ไคโตแซน แสดงในตารางที่... นำส่วนผสมไปปั่นโดยใช้เครื่อง Homogenizer ความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เติม Tween 80 ปริมาณตามที่คำนวณให้เหมาะสมกับค่า HLB ของสูตรตำรับลงไป และนำส่วนผสมไปปั่นโดยใช้เครื่อง Homogenizer ด้วยความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ค่อยๆหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในอิมัลชันที่เตรียมได้ ผ่านเข็มฉีดยาเบอร์ 22 ขณะที่หยดคนอิมัลชันตลอดเวลาด้วยเครื่อง Magnetic stirrer ความเร็ว 500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากหยดเสร็จ ปั่นต่อไปอีก 10 นาทีเพื่อให้เกิดกระบวนการ cross-linking อย่างสมบูรณ์ระหว่างโครงสร้างของอัลจินेटและแคลเซียมคลอไรด์ เติม Isopropyl alcohol ลงไปเพื่อทำให้อนุภาคไมโครมีความแข็งแรงมากขึ้นและเพื่อแยกอนุภาคไมโครออกจากชั้นน้ำมันโดยเติมลงไปในขณะที่ปั่นตลอดเวลา ปั่นต่ออีก 3 นาที จากนั้นเก็บอนุภาคไมโครอัลจินेटโดยวิธีการหมุนเหวี่ยง (Centrifugation) ใช้ความเร็ว 3000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้น เติมสารละลายไคโตแซนลงไปกระจายอนุภาคไมโครด้วยเครื่อง vortex และนำไปปั่นต่อด้วย Magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที เก็บอนุภาคไมโครอัลจินेट/ไคโตแซนโดยวิธีการหมุนเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส และล้างอนุภาคครั้งแรกด้วย acetone และล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น แล้วนำอนุภาคไปทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง (freeze drying) และเก็บอนุภาคในที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปประเมินคุณสมบัติของอนุภาคไมโครต่อไป

ตารางที่ 1 ปริมาณของส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ในการเตรียม
สารละลาย BSA %w/v	6 mg
สารละลายอัลจิเนต 1.5 %w/v	30 mL
สารละลายไคโตแซน 2 %w/v	30 mL
สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 6 %w/v	18 mL
น้ำมัน	60 mL
Span 80	
Tween 80	
Isopropyl alcohol	60 mL
Acetone	10 mL
น้ำกลั่นที่ใช้ในการล้างอนุภาคครั้งสุดท้าย	10 mL

2. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน

2.1 ผลของชนิดของน้ำมัน

เตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA ตามวิธีในข้อ 1 โดยศึกษาผลของการใช้น้ำมัน 3 ชนิด ได้แก่ mineral oil, soybean oil และ isooctane ทั้งนี้ในการเปลี่ยนชนิดของน้ำมันจะมีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของ Span 80 และ Tween 80 ให้มีปริมาณที่เหมาะสมกับค่า HLB ของวัฏภาคน้ำมัน ปริมาณ Span 80 และ Tween 80 ที่ใช้แสดงในตารางที่...) ชนิดของน้ำมันที่เหมาะสมในการนำมาเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน จะต้องทำให้ได้อิมัลชันที่มีความคงตัว ขนาดอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน อนุภาคมีการกระจายตัวออกจากกันได้ดี ไม่เกาะติดกัน



ตารางที่ 2 ปริมาณ Span 80 และ Tween 80 ที่ใช้ในการเตรียมอิมัลชันที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดของน้ำมัน	ปริมาณ Span 80 (g)	ปริมาณ Tween 80 (g)
Mineral oil	1.22	0.03
Soybean oil	0.93	0.032
Isooctane	0.80	0.45

2.2 ผลของสัดส่วนของอัลจินเตและโคโคแซน

เตรียมอนุภาคไมโครอัลจินเต/โคโคแซนที่บรรจุ BSA ตามวิธีในข้อ 1 โดยใช้ชนิดของน้ำมันที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.1 และปรับเปลี่ยนสัดส่วนความเข้มข้นระหว่างอัลจินเตต่อโคโคแซน ดังนี้ 1:1, 1:2, 1.5:1 และ 1.5:2 (%w/v : %w/v) สัดส่วนระหว่างอัลจินเตและโคโคแซนที่มีความเหมาะสมจะต้องทำให้ได้อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน มีการกระจายตัวออกจากกันได้ดี ไม่เกาะติดกัน และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บ โบวินซีรัมอัลบูมินได้ดี

2.3 ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการปลดปล่อย BSA ออกจากอนุภาคไมโครอัลจินเต/โคโคแซน

เตรียมอนุภาคไมโครอัลจินเต/โคโคแซนที่บรรจุ โบวินซีรัมอัลบูมิน โดยใช้ชนิดของน้ำมันที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.1 และด้วยอัตราส่วนระหว่างอัลจินเตต่อโคโคแซนจากการศึกษาในข้อ 2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 และ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกักเก็บ โบวินซีรัมอัลบูมิน และความสามารถในการป้องกันการปลดปล่อยของโปรตีนในสภาวะกรด

สรุป การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจินเต/โคโคแซนที่บรรจุ โบวินซีรัมอัลบูมินแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 3 สรุปปัจจัยที่ศึกษาผลต่อลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจินเต/โคโคแซน

สูตรตำรับที่	ชนิดน้ำมัน	สัดส่วนระหว่างอัลจินเตต่อโคโคแซน	ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์
1	Mineral oil	1.5 : 2	6 % w/v
2	Soybean oil	1.5 : 2	6 % w/v
3	Isooctane	1.5 : 2	6 % w/v

4	Isooctane	1 : 1	6 % w/v
5	Isooctane	1 : 2	6 % w/v
6	Isooctane	1.5 : 1	6 % w/v
7	Isooctane	1.5 : 2	6 % w/v
8	Isooctane	1 : 2	8 % w/v

3. การประเมินคุณสมบัติของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบรินซีรัมอัลบูมิน

3.1 ปริมาณอนุภาคไมโครที่เตรียมได้ (% yield)

นำอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุโบรินซีรัมอัลบูมินที่ทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็งแล้วทั้งหมดมาชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบกับน้ำหนักของสารตอนเริ่มต้น (sodium alginate, Chitosan และBSA) แล้วนำมาคำนวณหา % yield ตามสมการ (1) คำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 รุ่นการผลิต

$$\% \text{ yield} = \frac{M}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

โดย M คือ น้ำหนักอนุภาคไมโครที่เตรียมได้ (มิลลิกรัม)

M_0 คือ น้ำหนักของสารที่เป็นของแข็งในสูตรตำรับตอนเริ่มต้น (มิลลิกรัม)

3.2 ขนาดและการกระจายของขนาด และการกระจายตัวของอนุภาค

วัดขนาดโดยประมาณด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเพื่อศึกษาขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค เพื่อคัดเลือกอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนและมีการกระจายตัวของอนุภาคดี เมื่อได้สูตรตำรับที่เหมาะสมแล้วจึงนำไปวัดขนาดด้วยเครื่อง mastersizer

3.3 ประสิทธิภาพการกักเก็บโบรินซีรัมอัลบูมินในอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน

(% Entrapment efficiency)

ชั่งอนุภาคไมโครที่ทำให้แห้งแล้วอย่างถูกต้องปริมาณ 30 มิลลิกรัม และนำอนุภาคมาละลายใน Phosphate buffered solution (PBS) pH 7.4 จำนวน 10 มิลลิลิตร sonicate เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารผสมที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมา 120 ไมโครลิตรเติมลงใน 96 well plate เติม

Bradford's reagent 120 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณปริมาณ BSA จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA (ภาคผนวก ข) และคำนวณ % Encapsulation efficiency ตามสมการ (2) (Zhang และคณะ, 2009) คำนวณหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 รุ่นการผลิตซึ่งในแต่ละรุ่นการผลิตทำซ้ำ 3 ครั้ง

$$\% \text{ Encapsulation efficiency} = \frac{D}{D_0} \times 100 \quad (2)$$

โดย D คือ Drug content ที่ได้จริง (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) (ได้จากข้อ 3.4)

D_0 คือ Drug content ตามทฤษฎี (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) คำนวณได้จากสมการ (3)

$$D_0 = \frac{\text{น้ำหนัก BSA ที่ใช้ในตำรับ (ไมโครกรัม)}}{\text{น้ำหนักของสารที่เป็นของแข็งในสูตรตำรับตอนเริ่มต้น (มิลลิกรัม)}} \quad (3)$$

3.4 ปริมาณ BSA ในอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซน (% Drug Content)

วิเคราะห์หาปริมาณ BSA ในอนุภาคไมโครตามข้อ 3.3 คำนวณหา drug content ตามสมการ (4) คำนวณหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 รุ่นการผลิตซึ่งในแต่ละรุ่นการผลิตทำซ้ำ 3 ครั้ง

$$\% \text{ Drug content} = \frac{W}{W_0} \times 100 \quad (4)$$

โดย W คือ น้ำหนักโบวินซีรัมอัลบูมินที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัม)

W_0 คือ น้ำหนักอนุภาคไมโครที่นำมาวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)

4. การศึกษาการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมินจากอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซน

ศึกษาการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมินจากอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วยชนิดของน้ำมัน และสัดส่วนของอัลจินตต่อไคโตแซนที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 และ 2.3

ตามลำดับ เปรียบเทียบการปลดปล่อย BSA ระหว่างอนุภาคที่เตรียมโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 และร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร

วิธีการทดลอง ซั่งอนุภาคไมโครอย่างถูกต้องประมาณ 30 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิตร ปิด 0.1 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก จำนวน 5 มิลลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอนุภาคไมโคร นำไปแช่ใน water bath ด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที และควบคุม อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส หาปริมาณ BSA ที่ปลดปล่อยออกมาที่เวลาทุก 30 นาที โดยนำ หลอดทดลองไปหมุนเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ปิดส่วนใสม่า 120 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณโบวินซีรัมอัลบูมิน นำไป ทดสอบด้วย Bradford's reagent ปริมาณ 120 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโน เมตร คำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของโบวินซีรัมอัลบูมินจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) และนำมาคิดเป็นร้อยละการปลดปล่อย BSA สะสม ตามสมการ (5) หลังจากนั้น เติมน้ำ 0.1 โม ลาร์ของกรดไฮโดรคลอริกใหม่ลงไปทดแทนในปริมาณ 120 ไมโครลิตร เมื่อ incubate ใน สารละลายกรดครบ 2 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนตัวกลางในหลอดทดลองเป็นสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์พีเอช 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิตร และวิเคราะห์หาปริมาณ BSA ที่ปลดปล่อยตามขั้นตอน เช่นเดียวกับที่ศึกษาในสารละลายกรด จน incubate ครบอีก 5 ชั่วโมง คำนวณค่าเฉลี่ย และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 รุ่นการผลิตซึ่งในแต่ละรุ่นการผลิตทำซ้ำ 3 ครั้ง

$$\% \text{ การปลดปล่อย BSA สะสม} = \frac{(C_t \times 5) + 0.24 \times \sum C_{t-30n}}{D \times W} \times 100 \quad (5)$$

โดย C_t	คือ ความเข้มข้นของ BSA ณ เวลาใดๆ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
n	คือ ครั้งที่เก็บตัวอย่าง
D	คือ Drug content (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม)
W	คือ น้ำหนักอนุภาคไมโครที่นำมาวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)

5. การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมิน

อนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่ทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็งที่เตรียมจาก สูตรตำรับที่ให้อนุภาคขนาดเล็กกว่า 10 ไมโครเมตร และมี % Encapsulation efficiency มากที่สุด นำมาศึกษาความคงตัวทางกายภาพโดยเก็บอนุภาคไมโครไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 3 เดือน ประเมินลักษณะของอนุภาค ขนาด รูปร่าง การเกาะกลุ่มกันของอนุภาค โดย

ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และประเมินการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมินจากอนุภาคไมโคร

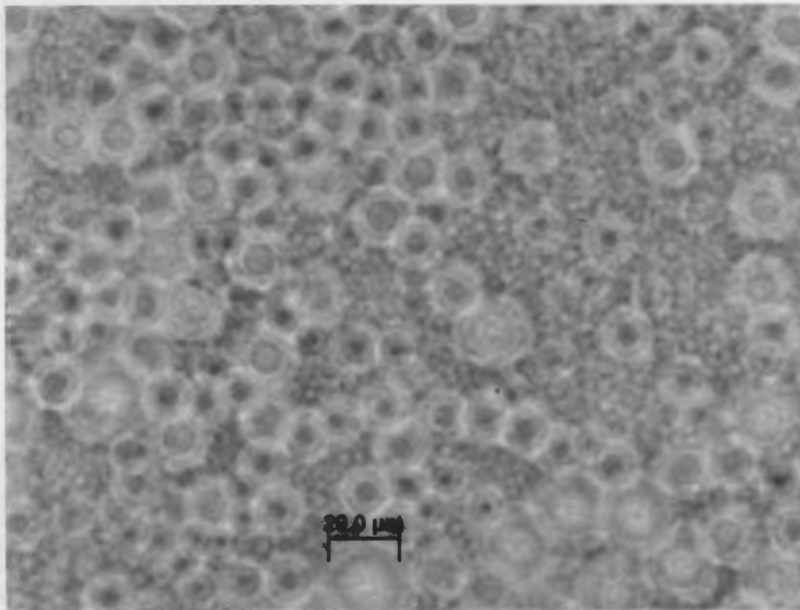
6. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าพารามิเตอร์ที่วิเคราะห์ได้ซึ่งได้แก่ % entrapment efficiency และ dissolution profile มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ paired T-test

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

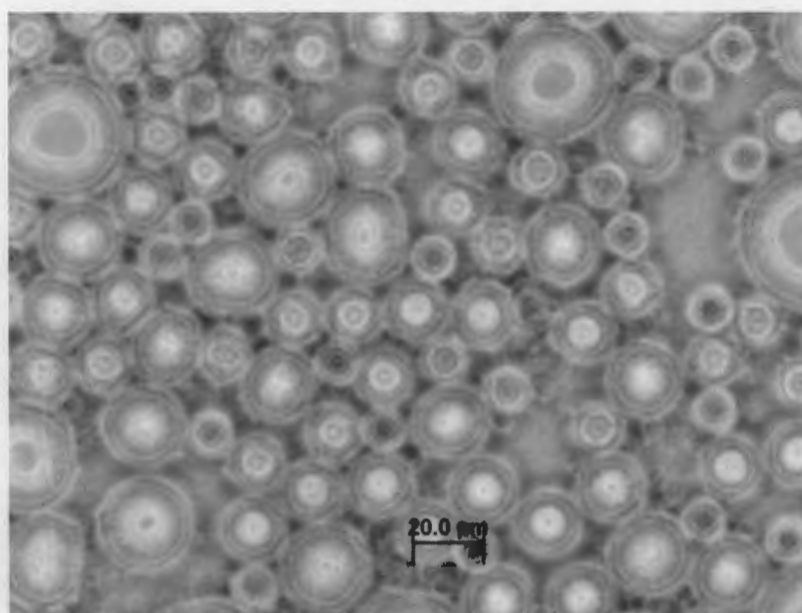
การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตเซนที่บรรจุ BSA โดยวิธี emulsifying-gelatinization มีขั้นตอนในการเกิดอนุภาคได้โดยเริ่มต้นกระจายสารละลายอัลจิเนตที่มี BSA ในเฟสน้ำมันเพื่อทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน โดยมี Span 80 และ Tween 80 เป็นสารทำอิมัลชันเมื่อนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ แสดงผลดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะของหยดเฟสภายในที่กระจายตัวใน Isooctane ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ
กำลังขยาย 200 เท่า

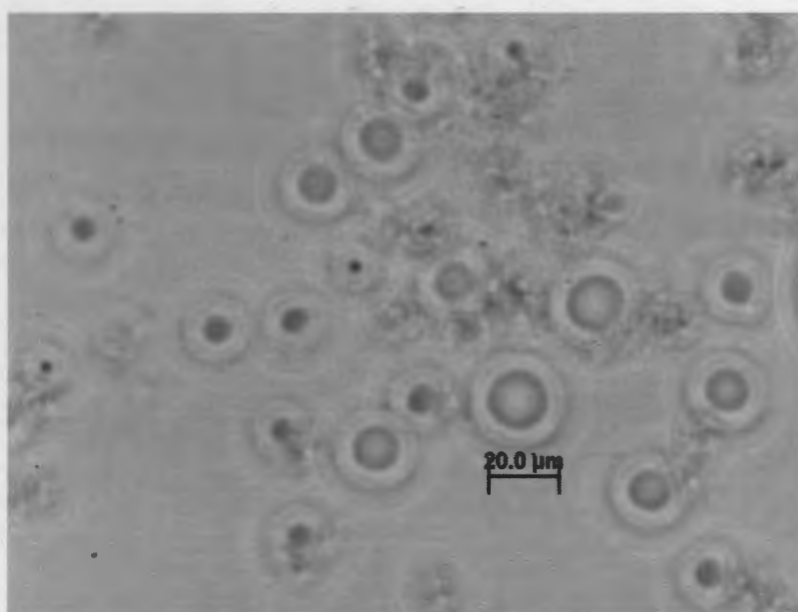
จากรูปที่ 1 จะเห็นหยดเฟสภายในกระจายอยู่ในเฟสภายนอก โดยหยดเฟสภายในประกอบไปด้วยสารละลาย BSA และอัลจิเนต เมื่อเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงไปจะเกิดกระบวนการ cross-linking ระหว่างโครงสร้างของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ ส่งผลให้เกิดโครงสร้างของเปลือกของ

อนุภาคที่มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น เมื่อนำไปส่องกล้องแสดงผลดังรูปที่ 2



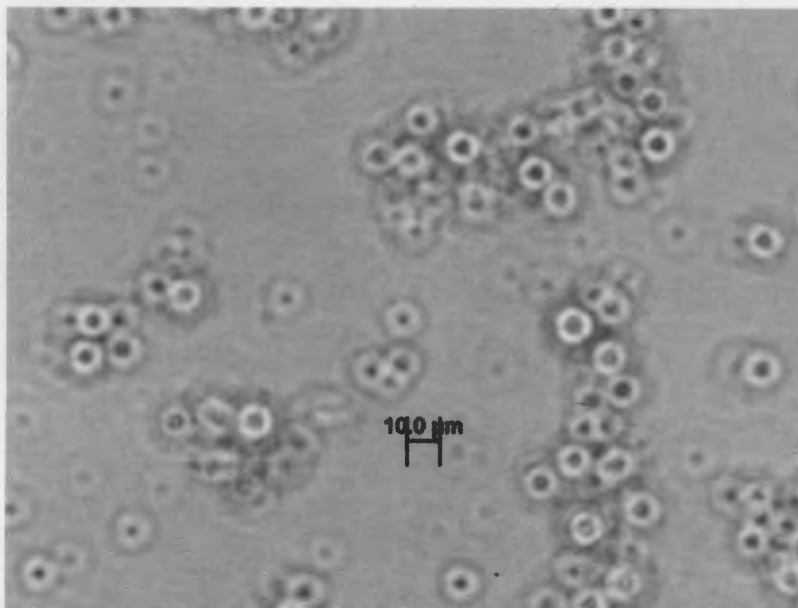
รูปที่ 2 ลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจินेटที่ได้หลังจากเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า

จากนั้นเติม isopropyl alcohol เพื่อแยกอนุภาคไมโครอัลจินेटออกจากเฟสน้ำมัน นำไปส่องกล้อง แสดงผลดังรูปที่ 3



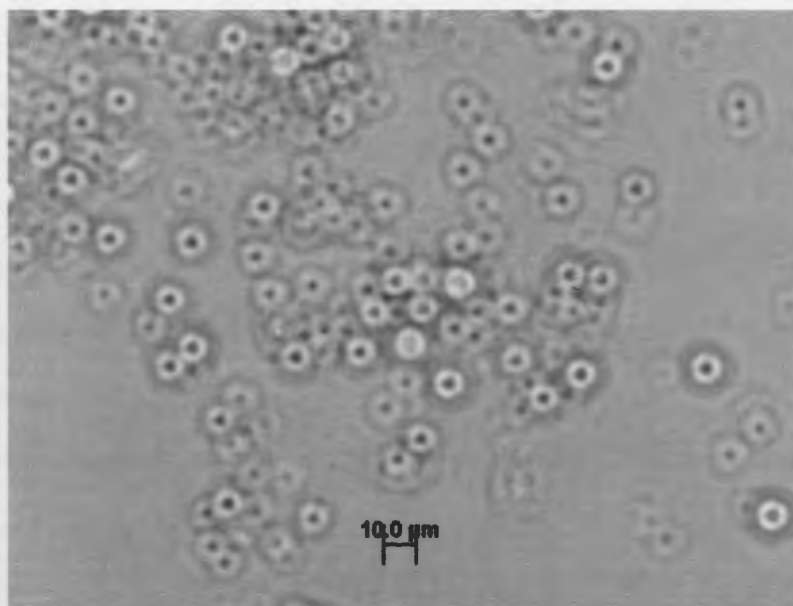
รูปที่ 3 ลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจิเนต ในขั้นตอนหลังการเติม isopropyl alcohol ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลีบกำลังขยาย 200 เท่า

เมื่อนำอนุภาคไมโครอัลจิเนตไปกระจายและปั่นผสมในสารละลายไคโตแซนเพื่อให้โมเลกุลของไคโตแซนเข้าไปแทรกระหว่างรูพรุนของเปลือก เกิดอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซน นำไปส่องกล้อง แสดงผลดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA หลังการ incubate กับสารละลายไคโตแซน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลีบกำลังขยาย 200 เท่า

จากนั้น นำไปแยกอนุภาคโดยการหมุนเหวี่ยง ล้างอนุภาคครั้งแรกด้วย acetone และครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นนำไปส่องกล้อง แสดงผลดังรูปที่.5



รูปที่ 5 ลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/โคโคแซนที่บรรจุ BSA หลังจากล้างอนุภาคด้วยน้ำกลั่น ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ชนิดหัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า

1. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/โคโคแซนที่บรรจุ BSA

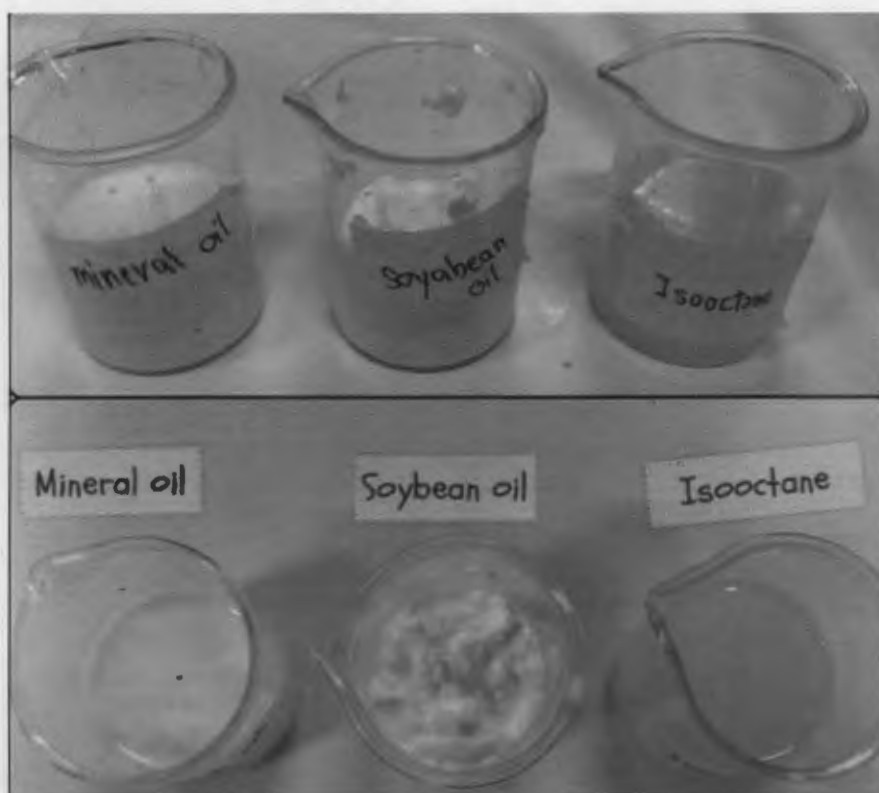
1.1 ผลของชนิดของน้ำมัน

ชนิดของน้ำมันที่ใช้เป็นวัสดุภาวภายนอกในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/โคโคแซนที่บรรจุ โปวีนีลพิไรโรลีนด้วยวิธี Emulsifying-gelatinization (Zhang และคณะ, 2009) มีความสำคัญต่อการเกิด อิมัลชันคือมีผลต่อลักษณะของหุควัสดุภาวภายในซึ่งประกอบด้วยอัลจิเนตและ โปวีนีลพิไรโรลีน ซึ่ง ส่งผลต่อลักษณะของอนุภาคไมโครที่เตรียมได้ ในการศึกษานี้ได้ทดลองโดยเปลี่ยนแปลงชนิดของ น้ำมัน ได้แก่ soybean oil, mineral oil และ isooctane พบว่าอิมัลชันที่เตรียมจาก soybean oil มีลักษณะ เป็นลิ่มสีขาวทึบและเหนียว แสดงถึงความไม่คงตัวของอิมัลชัน ดังรูปที่ 3 และเมื่อนำอิมัลชันไป ตรวจสอบลักษณะของวัสดุภาวภายในผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าวัสดุภาวภายในของอิมัลชันมี ลักษณะไม่เป็นทรงกลม มีขนาดใหญ่ เห็นขอบเขตไม่ชัดเจน และมีการเกาะกลุ่มกันดังรูปที่ 4 ส่วน อิมัลชันที่เตรียมจาก mineral oil มีเนื้อสีขาวครีมเนียนทึบ และมีลักษณะชั้นหนืดมากที่สุดเมื่อเทียบกับ soybean oil และ isooctane เมื่อนำไปตรวจสอบลักษณะของวัสดุภาวภายในผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าหุคเฟสวัสดุภาวภายในมีขนาดเล็กและเกิดการเกาะกลุ่มกันมากเป็นปื้นใหญ่ดังรูปที่ 5 ในขณะที่ อิมัลชันที่เตรียมจาก isooctane มีเนื้อสีขาวเนียนทึบ และมีความหนืดน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันชนิด

อื่นๆ ลักษณะของหยดเฟสวัฏภาคภายในที่ได้เมื่อนำไปตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพบว่า หยดเฟสภายในมีลักษณะกลม เกาะกลุ่มกันน้อย มีการกระจายขนาดกว้างซึ่งส่วนใหญ่มีขนาดไม่เกิน 10 ไมครอน ดังรูปที่ 6

จากการสังเกตคุณสมบัติของน้ำมันแต่ละชนิดพบว่าความหนืดของน้ำมันที่นำมาใช้ศึกษาสามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ mineral oil, soybean oil และ isooctane ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องกับลักษณะความหนืดของอิมัลชันที่ได้ นอกจากนี้ความหนืดของระบบอิมัลชันยังส่งผลต่อการกระจายตัวของวัฏภาคภายในอีกด้วย กล่าวคือ เมื่อใช้อัตราเร็วการปั่นเท่ากัน ระบบอิมัลชันที่มีความหนืดสูงจะทำให้การกระจายของวัฏภาคภายในเกิดได้ยากกว่าเมื่อเทียบกับระบบอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าขนาดของวัฏภาคภายในที่ได้จากการเตรียมอิมัลชัน โดยใช้ isooctane มีขนาดเล็ก และมีการเกาะกลุ่มของอนุภาคน้อยกว่าน้ำมันชนิดอื่นๆ

สรุปได้ว่า isooctane เป็นน้ำมันชนิดที่ทำให้อิมัลชันมีความคงตัวและได้อนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมินที่มีลักษณะกลม ไม่เกาะกลุ่มกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ isooctane ในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมินสำหรับการศึกษาต่อไป



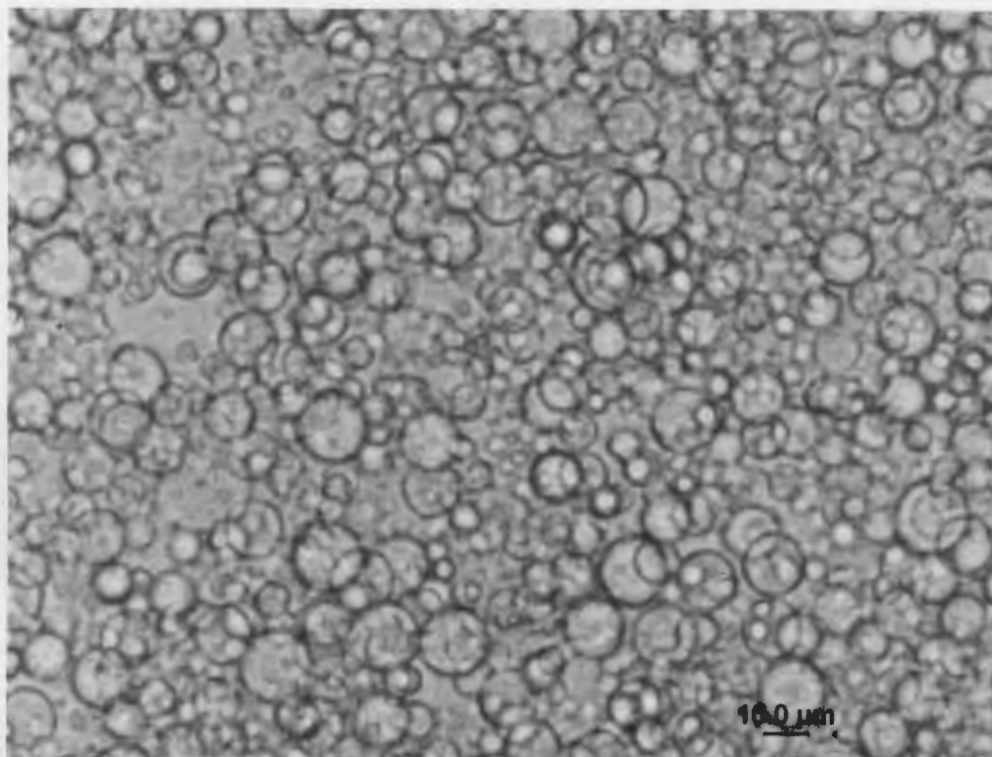
รูปที่ 3 ลักษณะของอิมัลชันที่เตรียมได้ในระหว่างการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA โดยใช้น้ำมันชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 4 ลักษณะของอนุภาคไมโครหลังการเติม isopropyl alcohol ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเมื่อเตรียมโดยใช้ soybean oil กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 5 ลักษณะของอนุภาคไมโครผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเมื่อเตรียม โดยใช้ mineral oil ในขั้นตอนก่อนนำไปทำแห้งเยือกแข็ง กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 6 ลักษณะของอนุภาคผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเมื่อเตรียม โดยใช้ isooctane ในขั้นตอนก่อนนำไปทำแห้งเยือกแข็ง กำลังขยาย 400 เท่า

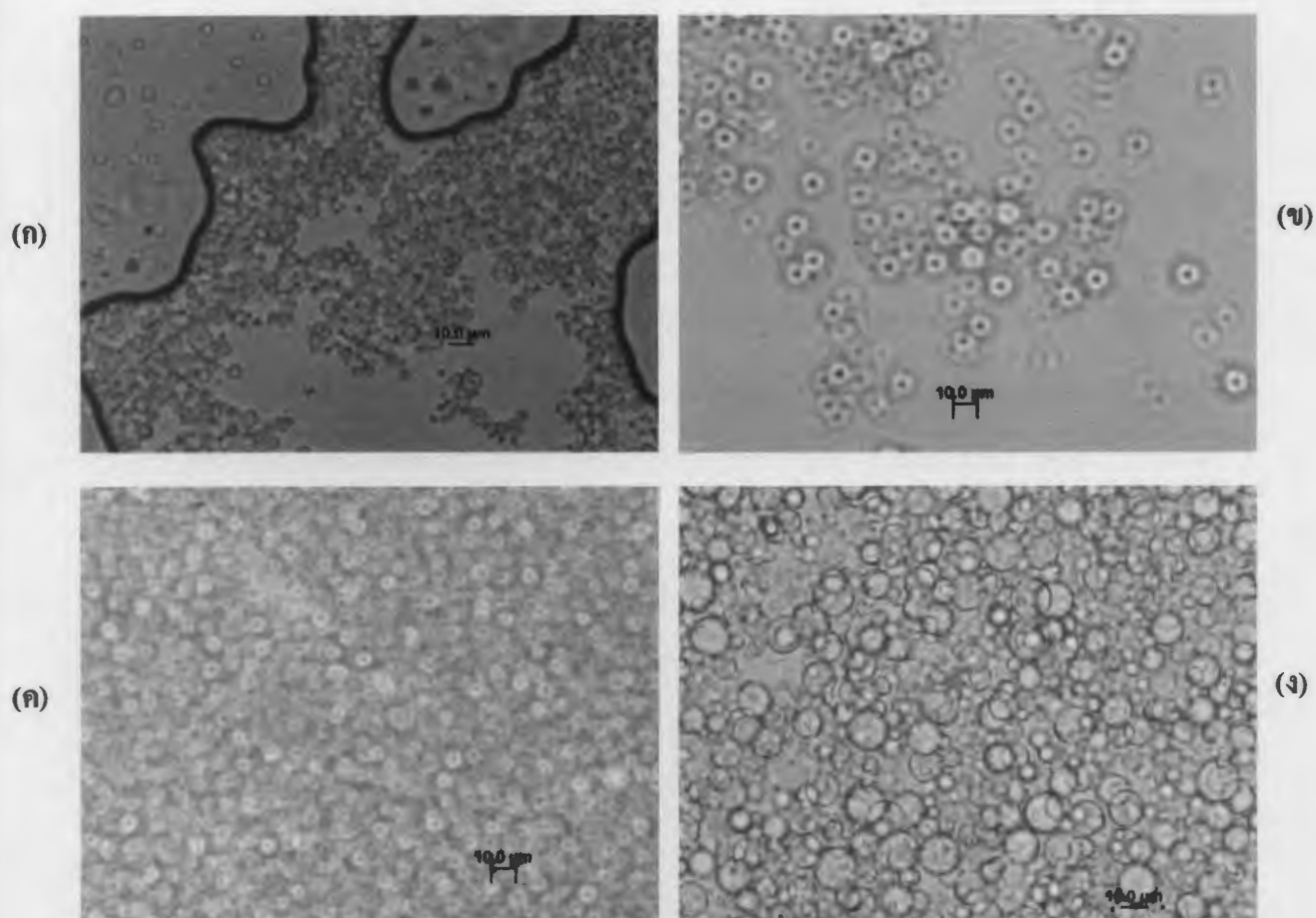
1.2 ผลของสัดส่วนความเข้มข้นระหว่างอัลจินตและโคโคแซน

รูปแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial design) 2 ปัจจัย 2 ระดับ ถูกนำมาศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของอัลจินตและโคโคแซนที่มีต่อคุณลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่บรรจุโบวินซีรัมอัลบูมินซึ่งเตรียม โดยใช้ isooctane พบว่า ความเข้มข้นของโคโคแซนไม่มีผลต่อขนาดและรูปร่างของอนุภาคไมโคร ในขณะที่ความเข้มข้นของอัลจินตมีผลต่อขนาดและรูปร่าง โดยพบว่า สัดส่วนอัลจินตต่อโคโคแซน 1:1 ให้อนุภาคที่มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมเห็นขอบเขตชัดเจน มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน และมีการเกาะกลุ่มเล็กน้อยดังรูปที่ 7 (ก) ส่วนอนุภาคที่เตรียมจากสัดส่วน 1.5:1 จะมีลักษณะเกาะติดกันเป็นป็นจนเห็นขอบเขตของอนุภาคไม่ชัดเจน ดังรูปที่ 7 (ค) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากสัดส่วน 1:2 และ 1.5:2 กล่าวคืออนุภาคไมโครสัดส่วน 1:2 มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมเห็นขอบเขต

ชัดเจน มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน และมีการเกาะกลุ่มกันน้อยกว่าสัดส่วน 1:1 ดังรูปที่ 7 (ข) แต่ในขณะที่สัดส่วน 1.5:2 จะให้ขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 10 ไมครอน และมีการเกาะกลุ่มกัน ดังรูปที่ 7 (ง) จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของอัลจินตที่สูงขึ้นทำให้อนุภาคไมโครมีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดการเกาะติดกัน เนื่องจากอนุภาคมีขนาดเล็ก และมีเปลือกที่หุ้มที่ประกอบด้วยอัลจินต และไคโตแซน ซึ่งมีความสามารถในการยึดเกาะดี ดังนั้นเมื่อกระจายอยู่ในตัวกลางเปลือกจึงเกิดการพองตัว และเกาะติดกันของอนุภาคจนกระจายตัวออกจากกัน ได้ยาก และเมื่อนำไปทำแห้งเยือกแข็งอนุภาคจึงมีลักษณะเกาะกลุ่มเช่นเดียวกับในช่วงก่อนทำให้แห้งเยือกแข็ง

ในการศึกษาผลของปริมาณไคโตแซนต่อลักษณะทางกายภาพของอนุภาคไมโคร พบว่าปริมาณของไคโตแซนมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของอนุภาคไมโครค่อนข้างน้อย แต่ไคโตแซนจะมีผลต่อการกักเก็บโบวินซีรัมอัลบูมินไว้ในอนุภาคมากกว่า เนื่องจากไคโตแซนจะทำหน้าที่แทรกซึมเข้าไปภายในอนุภาคไมโคร และจับกับอัลจินต เพื่อป้องกันการรั่วไหลของสารที่ถูกกักเก็บอยู่ภายในอนุภาค ความเข้มข้นของไคโตแซนที่น้อยจะทำให้เมมเบรนของไคโตแซนที่อยู่พื้นผิวของอนุภาคไมโครบาง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารของอนุภาคไมโครน้อยกว่าอนุภาคที่เตรียมด้วยไคโตแซนที่มีความเข้มข้นสูงกว่า (Zhang และคณะ, 2009) ดังจะเห็นได้จากผลการวิเคราะห์ปริมาณการกักเก็บโบวินซีรัมอัลบูมิน (ภาคผนวก ข) โดยประสิทธิภาพการกักเก็บโบวินซีรัมอัลบูมินของสัดส่วน 1:1 เท่ากับร้อยละ 30.76 ± 6.44 ในขณะที่สัดส่วน 1:2 เท่ากับร้อยละ 74.67 ± 8.87 ซึ่งมากกว่าสัดส่วนแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกันกับสัดส่วน 1.5:1 ที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บโบวินซีรัมอัลบูมินเท่ากับร้อยละ 17.49 ± 13.29 ในขณะที่สัดส่วน 1.5: 2 เท่ากับร้อยละ 46.78 ± 10.75 ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ดังนั้น จึงเลือกสัดส่วนความเข้มข้นระหว่างอัลจินตและไคโตแซน เท่ากับ 1:2 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป เนื่องจากให้ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า 10 ไมครอน อนุภาคมีการเกาะติดกันน้อยที่สุด และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บโบวินซีรัมอัลบูมินได้ดีที่สุด



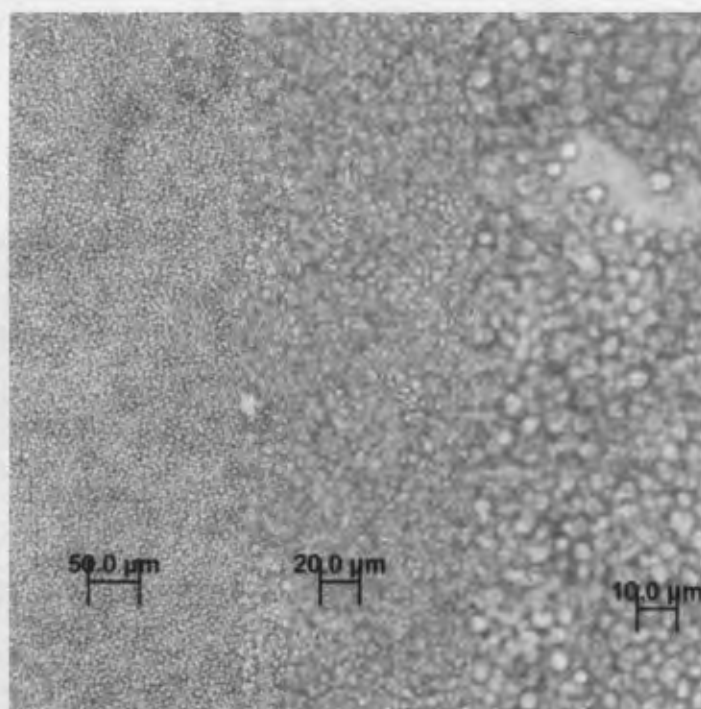
รูปที่ 7 ลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA ที่เตรียมโดยใช้ isooctane และมีสัดส่วนอัลจิเนตต่อไคโตแซน (ก) 1:1 (ข) 1:2 (ค) 1.5:1 และ (ง) 1.5:2 ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ กำลังขยาย 400x ในขั้นตอนหลังการล้างอนุภาคด้วยน้ำกลั่น

1.3 ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

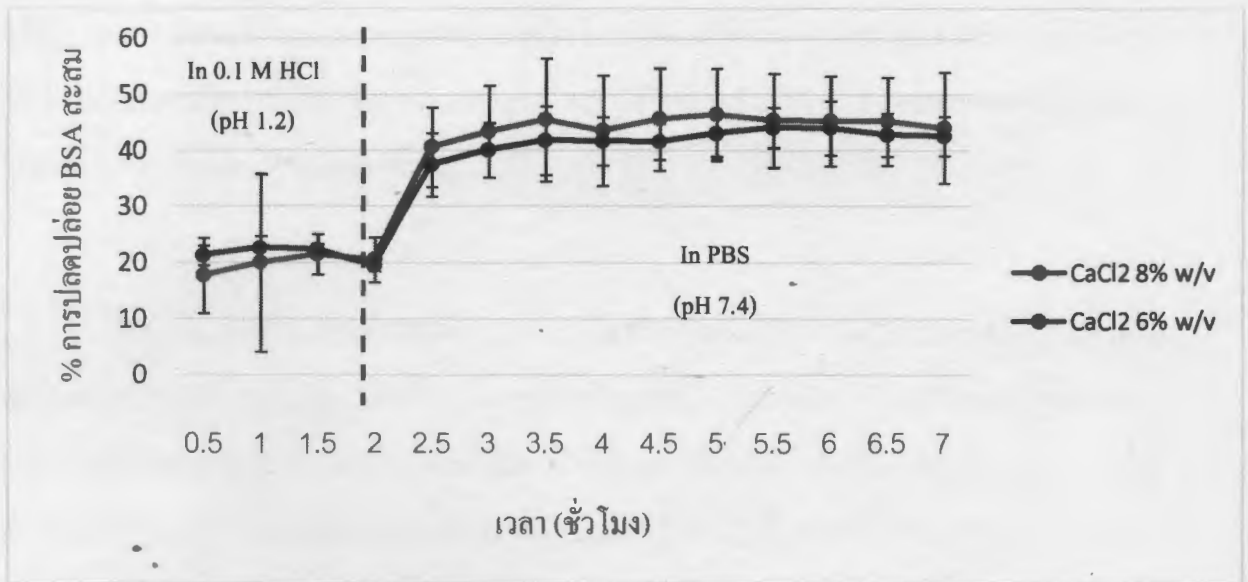
แคลเซียมไอออนมีความสำคัญต่อการเกิด cross-linking กับอัลจิเนต โดยแคลเซียมไอออนจะจับกับกรดโพลีกลูคูโรนิกบนอัลจิเนต ทำให้ได้อนุภาคที่แข็งแรง (Yin และคณะ, 2005) ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคไมโครที่เตรียมได้ พบว่า อนุภาคที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจิเนตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 10 ไมครอน มีการกระจายขนาดแคบ ดังรูปที่ 7 ข ส่วนที่เตรียมด้วยความเข้มข้นร้อยละ 8 พบว่า อนุภาคมีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน แต่มีการเกาะกลุ่มกันระหว่างอนุภาคมาก ดังแสดงในรูปที่ 8 เนื่องจากเกิดการ cross-linking ที่มากเกินไประหว่างแคลเซียมไอออนกับอัลจิเนตจนทำให้เปลือกที่เกิดขึ้นมีการ

เชื่อมติดกัน (Yu และคณะ, 2005) ในด้านการปลดปล่อยโปรตีนซีรัมอัลบูมินออกจากอนุภาคไมโครในสภาวะกรดและด่าง พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอนุภาคที่เตรียมโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ทั้งสองความเข้มข้น ดังรูปที่ 9 และในด้านประสิทธิภาพการกักเก็บโปรตีนซีรัมอัลบูมิน (EE) (ภาคผนวก ค) พบว่าอนุภาคที่เตรียมโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตรมีค่า EE เท่ากับร้อยละ 74.67 ± 8.87 ในขณะที่การเตรียมโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตรมีค่า EE เท่ากับร้อยละ 52.81 ± 17.05 ซึ่งต่ำกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการปลดปล่อยด้วยจากอนุภาคในสภาวะกรดและด่าง และไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ของอนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซน

ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร ในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซนของ BSA ในการศึกษาขั้นต่อไป



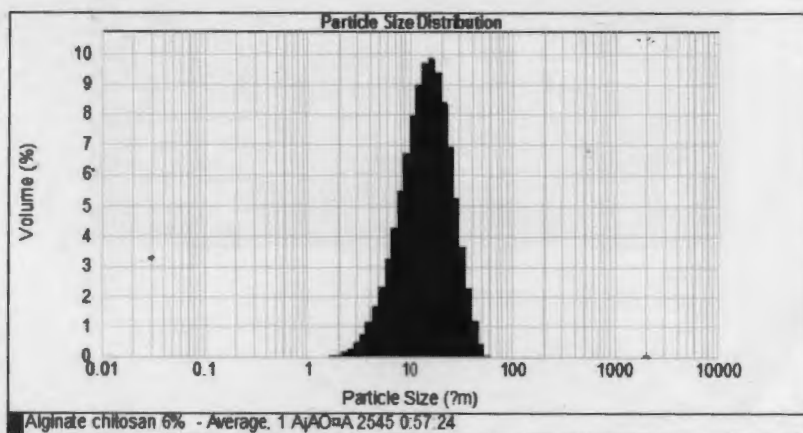
รูปที่ 8 ลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซนที่เตรียมโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตรผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ กำลังขยาย 100, 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ



รูปที่ 9 การปลดปล่อย BSA สะสมจากอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตเซนที่เตรียมด้วยแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใน 2 ชั่วโมงแรกเป็นการปลดปล่อยในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 1.2) และตั้งแต่ชั่วโมงที่สองเป็นต้นไปเป็นการปลดปล่อยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

1.4 ผลของกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง (freeze drying) ต่อคุณลักษณะของอนุภาค

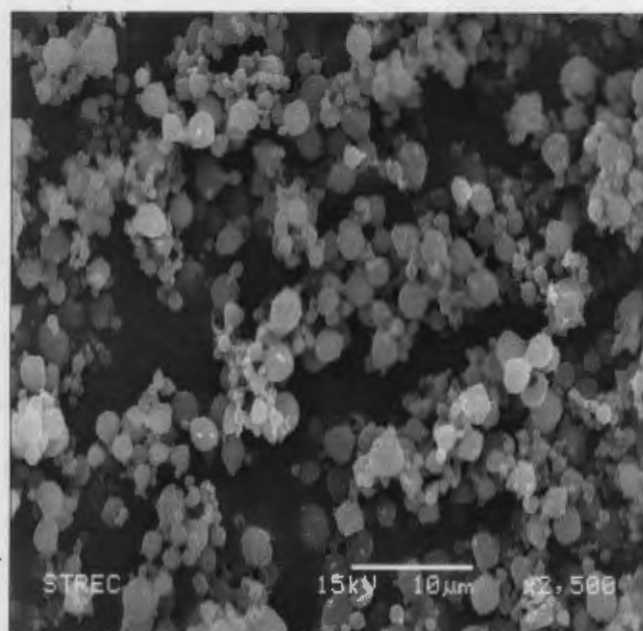
เมื่อนำอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตเซนที่บรรจุ BSA ซึ่งเตรียมโดยใช้สัดส่วนอัลจินตต่อไคโตเซนเท่ากับ 1:2 และใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยมีผลต่อปริมาตรมาวัดขนาดด้วยเครื่อง Mastersizer ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง พบว่า อนุภาคมีขนาดเฉลี่ย 14.46 ไมครอน และมีการกระจายขนาดดังรูปที่ 10 ซึ่งขนาดที่วัดได้มีค่ามากกว่าขนาดเมื่ออนุภาคผ่านกล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากอนุภาคเกิดการพองตัวในตัวกลางที่เป็นน้ำ และเกิดการเกาะกลุ่มกันขึ้น



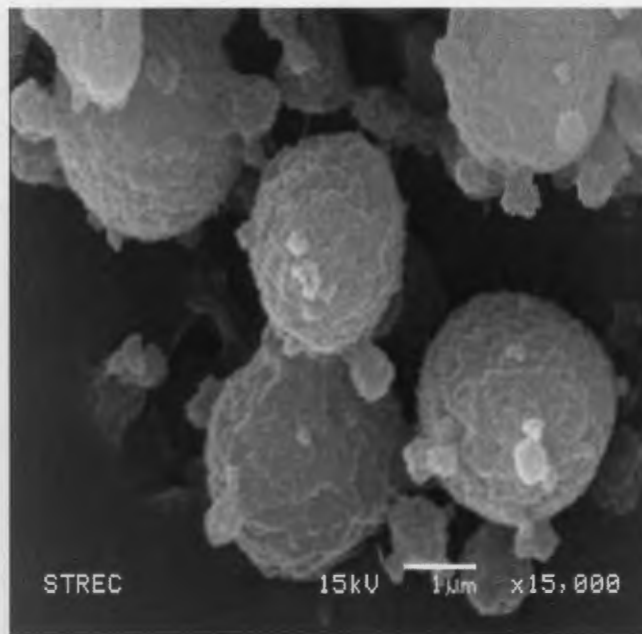
รูปที่ 10 การกระจายขนาดอนุภาคของอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจิเนตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตรก่อนนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

เมื่อนำอนุภาคไมโครหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) พบว่า อนุภาคไมโครมีขนาดเล็กประมาณ 3 ไมครอนและมีการเชื่อมติดกันระหว่างอนุภาคเล็กน้อยดังรูปที่ 11 แต่เมื่อนำไปกระจายในน้ำเพื่อวัดขนาดด้วยเครื่อง mastersizer พบว่าได้ขนาดเฉลี่ย 112.75 ไมครอน และมีการกระจายขนาดดังรูปที่ 12 ซึ่งสอดคล้องกับภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่พบว่าอนุภาคไมโครเกิดการพองตัว และเกาะติดกันมาก ดังรูปที่ 13 ทำให้ค่าที่วัดได้จากเครื่องมีขนาดใหญ่ขึ้นหลายเท่า ดังนั้น จะเห็นได้ว่าเมื่อนำอนุภาคไมโครที่เตรียมขึ้นไปผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง อนุภาคจะเกิดการเกาะกลุ่มกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้น อาจเนื่องจากในกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง อนุภาคไมโครจะเกิดการแข็งตัว และแห้งติดกันอย่างรวดเร็ว เมื่อนำไปกระจายตัวในน้ำจึงทำให้เกิดการพองตัว และเชื่อมติดกันของเปลือกอนุภาคไมโคร

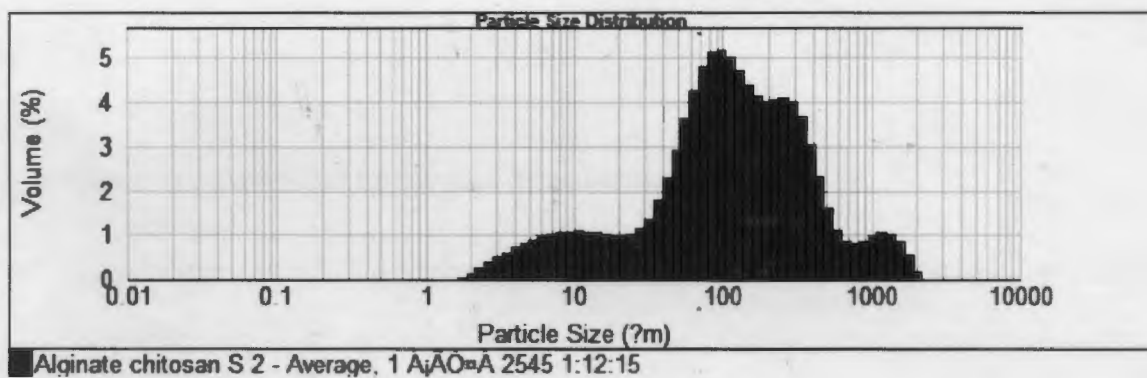
(ก)



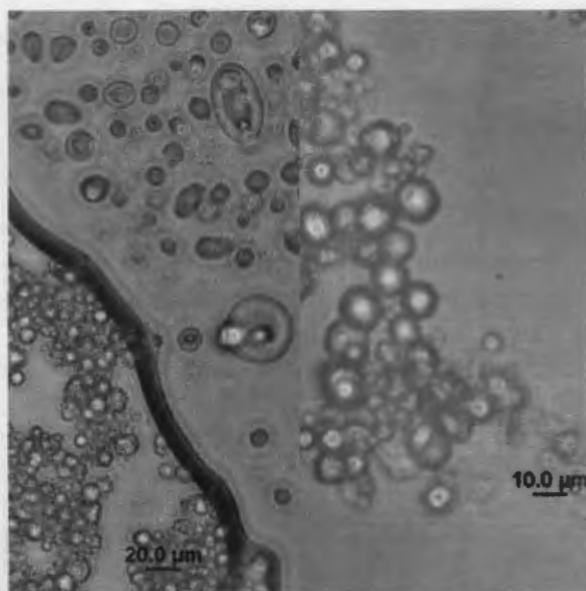
(ข)



รูปที่ 11 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA ซึ่งเตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตรหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง กำลังขยาย (ก) 2,500 เท่า และ (ข) 15,000 เท่า



รูปที่ 12 การกระจายขนาดอนุภาคของอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร หลังผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง

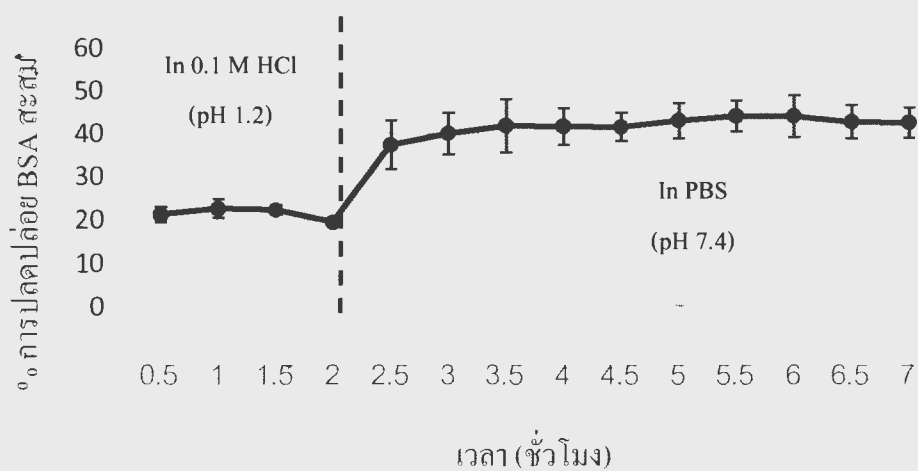


รูปที่ 13 ลักษณะของอนุภาคไมโครอัลจีนา/ไคโตแซนหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็ง และนำมากระจายตัวในน้ำกลั่น ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับกำลังขยาย 200x และ 400x ตามลำดับ

2. การศึกษาการปลดปล่อย BSA จากอนุภาคไมโครอัลจีนา/ไคโตแซน

อนุภาคไมโครอัลจีนา/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA ที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจีนาต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตรสามารถชะลอการปลดปล่อยโปรตีนในสภาวะกรดได้ โดยปลดปล่อย BSA ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ (พีเอช 1.2) ประมาณร้อยละ 20 หลังจาก incubate นาน 2 ชั่วโมงดังรูปที่ 14 หลังจากนั้นอนุภาคไมโครได้ถูกนำไป incubate ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) อีก 5 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า BSA ถูกปลดปล่อยออกมาประมาณร้อยละ 44 เหตุผลที่ BSA ถูกปลดปล่อยออกมาได้น้อยที่พีเอช 1.2 เนื่องจากในพีเอชต่ำจะเกิดคุณสมบัติร่างแหของเปลือกแคลเซียมอัลจีนาที่แน่นและแข็งแรง (Coppi และคณะ, 2001) และการไม่ละลายในสารละลายกรดของแคลเซียมอัลจีนา (Meixia และคณะ, 2009) จึงทำให้เปลือกของอนุภาคไมโครสามารถกักเก็บ และป้องกันการปลดปล่อย BSA ในสภาวะกรดได้ ส่วนในพีเอช 7.4 BSA ถูกปลดปล่อยออกมาเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับในสภาวะกรด เนื่องจากเปลือกแคลเซียมอัลจีนาเกิดการ

สลายตัวในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำให้เกิดการเสียหายของโครงสร้างของอนุภาคไมโคร (Meixia และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตาม BSA ไม่ได้ถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคไมโครจนหมด ทั้งนี้เนื่องมาจากไคโตแซนที่หุ้มรอบอนุภาคสามารถเกิด cross-linking กับอัลจินตด้วย ionic interaction ทำให้ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นด่าง จึงช่วยเป็นเกราะป้องกันการปลดปล่อย BSA ได้อีกระดับหนึ่ง (Zhang และคณะ, 2009) อนุภาคที่กักเก็บโปรตีนไว้และมีขนาดอยู่ระหว่าง 1-10 ไมครอนสามารถเข้าสู่ M-cell ที่เยื่อลำไส้ได้โดยกระบวนการ endocytosis ซึ่งจะช่วยให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ (Jung และคณะ, 2010: 1-12)

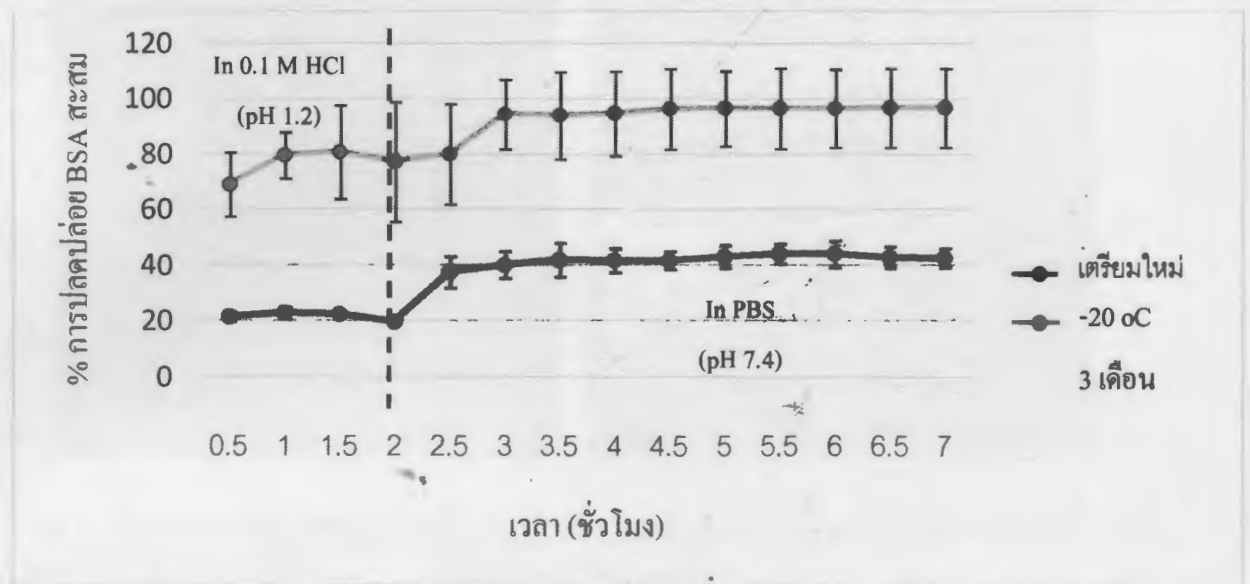


รูปที่ 14 กราฟแสดงการปลดปล่อย BSA สะสมจากอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เวลาต่างๆ โดยใน 2 ชั่วโมงแรกเป็นการปลดปล่อยในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 1.2) และตั้งแต่ชั่วโมงที่สองเป็นต้นไปเป็นการปลดปล่อยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)

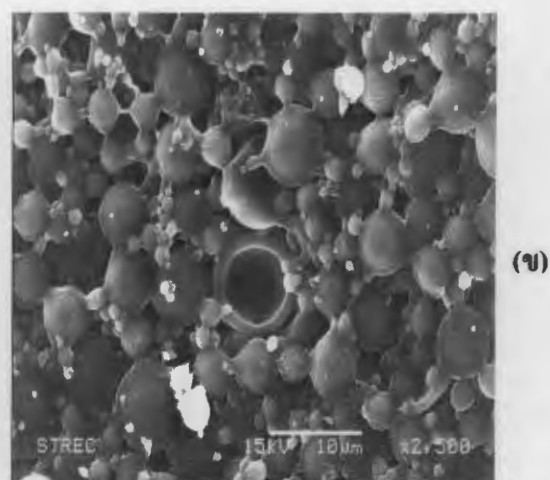
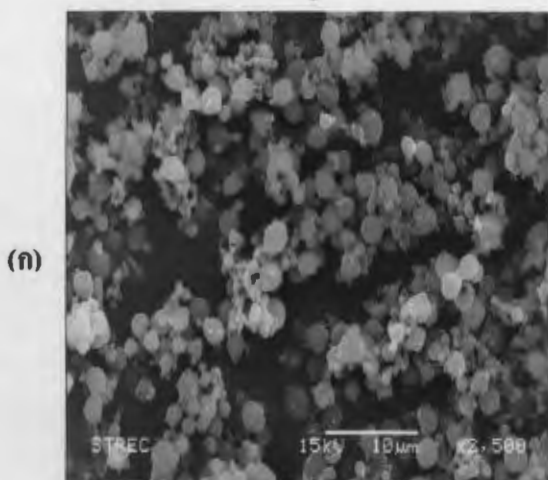
3. การศึกษาความคงตัวทางเคมีกายภาพของอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA

อนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่บรรจุ BSA ที่เลือกนำไปศึกษาความคงตัวทางเคมีกายภาพ ที่สภาวะอุณหภูมิ -20°C คือ อนุภาคที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร โดยศึกษาถึงขนาด รูปร่างของอนุภาคและการปลดปล่อย BSA พบว่าความสามารถในการชะลอการปลดปล่อย BSA ของอนุภาคลดลงทั้งในสภาวะกรดและด่าง (รูปที่ 15) เนื่องจากเปลือกของอนุภาคเกิดการเปราะแตกในระหว่างการเก็บ และเกิดการเกาะติดกันของอนุภาคมาก (รูปที่ 16 (ข) และ 17) เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคที่เตรียมเสร็จใหม่ (รูปที่ 16 (ก)) ทำให้เกิดการปลดปล่อย BSA อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ที่เวลา 3 ชั่วโมง ส่วนการเกาะ

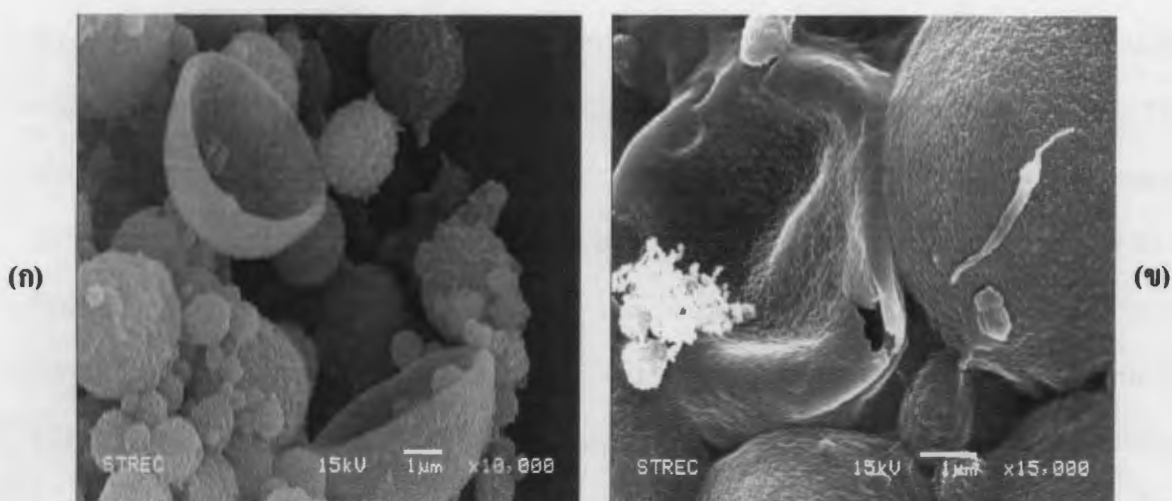
คิดกันที่มากขึ้นอาจเกิดจากความชื้นที่แทรกซึมเข้าสู่ภาชนะบรรจุระหว่างการเก็บรักษา ทำให้อนุภาคพองตัวใหญ่ขึ้นและเชื่อมติดกัน และผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นอาจทำลายอนุภาคหรือทำให้เกิดแรงดันภายในอนุภาคซึ่งเป็นผลให้อนุภาคแตกออก ดังนั้น สภาวะอุณหภูมิต่ำ -20°C เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาอนุภาคไมโครอัลจินेट/โคโคแซนที่บรรจุ BSA



รูปที่ 15 กราฟเปรียบเทียบการปลดปล่อย BSA สะสมจากอนุภาคไมโครอัลจินेट/โคโคแซนที่เวลาต่างๆ ระหว่างอนุภาคที่เตรียมใหม่กับอนุภาคที่เก็บไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 3 เดือน โดยใน 2 ชั่วโมงแรกเป็นการปลดปล่อยในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 1.2) และตั้งแต่ชั่วโมงที่สอง เป็นต้นไปเป็นการปลดปล่อยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4)



รูปที่ 16 ลักษณะของอนุภาค ไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจิเนตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร (ก) หลังจากเตรียมใหม่ และ (ข) หลังจากเก็บที่ -20°C เป็นเวลา 3 เดือน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กำลังขยาย 2,500 เท่า



รูปที่ 17 ลักษณะของอนุภาค ไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจิเนตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร (ก) หลังจากเตรียมใหม่ และ (ข) หลังจากเก็บที่ -20°C เป็นเวลา 3 เดือน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กำลังขยาย (ก) 10,000 เท่า และ (ข) 15,000 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

น้ำมันที่เหมาะสมในการทำอิมัลชันสำหรับการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต/ไคโตแซนคือ isooctane เนื่องจากทำให้ได้วัฏภาคภายในมีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน และมีการกระจายตัวดี ไม่เกาะกลุ่มกัน และอนุภาคไมโครที่เตรียมด้วยสัดส่วนระหว่างอัลจิเนตต่อไคโตแซนเท่ากับ 1:2 และความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร ก่อนทำให้แห้ง มีขนาดประมาณ 14.46 ไมครอน มีการกระจายขนาดแคบ เกาะกลุ่มกันเล็กน้อย มีประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ร้อยละ 74.67 ± 8.87 และ ร้อยละของ drug content เท่ากับ 0.49 ± 0.06 และสามารถชะลอการปลดปล่อยโบวินซีรัมอัลบูมินในกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ได้ แต่พบว่าหลังทำให้แห้งเยือกแข็งอนุภาคมีขนาด 112.75 ไมครอน มีการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคมาก และอนุภาคที่เตรียมได้มีความไม่คงตัวเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยซึ่งพบปัญหาการพองตัวของอนุภาคไมโครในน้ำซึ่งทำให้ขนาดใหญ่ขึ้น ผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรทำการทดลองหาสารที่เหมาะสมในการป้องกันการเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคไมโคร เช่น เดิมสารที่ช่วยทำให้เปลือกของอนุภาคแข็งขึ้น หรือพัฒนากระบวนการเตรียมอนุภาคไมโครที่ช่วยลดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค

ในด้านการปลดปล่อย BSA ออกจากอนุภาคไมโครพบว่า BSA ถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคได้ทั้งสิ้นร้อยละ 45 ในสภาวะที่ทำการศึกษา และเนื่องจากต้องการให้ M cell กัดกินเข้าไปทั้งอนุภาคไมโคร ดังนั้น จึงควรศึกษาปัจจัยที่ช่วยชะลอการปลดปล่อย BSA ออกจากอนุภาคเพิ่มเติม เช่น มวลโมเลกุลของไคโตแซน หรือระยะเวลาในการ incubate อนุภาค นอกจากนี้จากการวิจัยจะเห็นว่าอนุภาคเกิดการเปราะแตกเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ทั้งนี้ผู้วิจัยมีความเห็นว่า อุณหภูมิที่เย็นจัดอาจทำให้เปลือกของอนุภาคไมโครมีความเปราะ และผนวกกับความชื้นที่มีในภาชนะบรรจุซึ่งมาจากการเปิดปิดภาชนะเพื่อแบ่งตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ในระหว่างการศึกษาคงตัว จึงทำให้เกิดไอน้ำเกาะ

รวมอยู่กับเปลือกอนุภาคและเกิดการแข็งตัวเป็นผลึกน้ำแข็งซึ่งอาจทำให้เปลือกของอนุภาคที่มีความเปราะเกิดการแตกออกจากกันได้ง่าย ส่งผลให้เกิดการรั่วของสารที่บรรจุอยู่ภายใน ดังนั้น แนวทางในการพัฒนาต่อไป ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะว่าควรเก็บรักษาอนุภาคไมโครเพื่อศึกษาความคงตัวไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทป้องกันความชื้น และควรแบ่งตัวอย่างใส่ขวดขนาดเล็กในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง เพื่อป้องกันไอน้ำเข้าไปมีผลต่อความคงตัวของอนุภาค และควรมีการศึกษาความคงตัวของอนุภาคไมโครที่อุณหภูมิ 5 °C (ตู้เย็น) เพิ่มเติมด้วย

เอกสารอ้างอิง

Bai JP, Chang LL, Guo JH. Effects of polyacrylic polymers on the degradation of insulin and peptide drugs by chymotrypsin and trypsin. *J Pharm Pharmacol.* 1996; 48: 17-21.

Blitz JP, Gun'ko VM. MICROENCAPSULATION: FUNDAMENTALS, METHODS AND APPLICATIONS. *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science.* 2006; 23 34.

Bowen R [homepage on the Internet]. [updated 2004 March 19; cited 2012 oct 8]. The Gastrointestinal Immune System; [about 1 screens]. Available from:

http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/basics/gi_immune.html

Carpov A, Nastruzzi C, Fundueanu G, Desbrieres J, Rinaudo M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *J APPL BIOMATER.* 1999 March; 20: 1427-1435.

Cell Signaling Technology. MATERIAL SAFETY DATA SHEET for BSA [internet]. [cited 2012 oct 20]. Available from: www.cellsignal.com/pdf/9998.pdf

Charalampopoulos D, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Tzortzis G. Production and Evaluation of Dry Alginate-Chitosan Microcapsules as an Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. *Biomacromolecules.* 2011 May; 12(7): 2834-40.

Conradi RA, Hilgers AR, Ho NFH, Burton PS. The Influence of Peptide Structure on Transport Across Caco-2 Cells. II. Peptide Bond Modification Which Results in Improved Permeability. *PHARMACEUT RES.* 1992; 9(3): 435-439.

Coppi G, Lannuccelli V, Leo E, Bernabei M.T, Camerani R. Chitosan-alginate microparticles as a protein carrier, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2011; 27: 393-400.

Dong ZL, Lecluyse EL, Thakker DR. Dodecylphosphocholine-mediated enhancement of paracellular permeability and cytotoxicity in Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci.* 1999; 88: 1161-1168.

Draget KI, Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll.* 2009 Oct 12; 251-256.

Ermak TH, Dougherty EP, Bhagat HR, Kabok Z, Pappo J. Uptake and transport of copolymer biodegradable microspheres by rabbit Peyer's patch M cells. *Cell Tissue Res.* 1995 Feb; 279(2): 433-436.

Ermak TH, Giannasca PJ. Microparticle targeting to M Cells. *ADV DRUG DELIVER REV.* 1998 Dec; 34(2-3): 261-283.

FAO corporate document repository [homepage on the Internet]. [updated 1987 ; cited 2012 oct 10]. PRODUCTION, PROPERTIES AND USES OF ALGINATES; [about 51 screens].

Available from: <http://www.fao.org/docrep/X5822E/x5822e04.htm>

Eiamtrakarn S, Itoh Y, Kishimoto J, Yoshikawa Y, Shibata N, Murakami, Takada K.

Gastrointestinal mucoadhesive patch system (GI-MAPS) for oral administration of G-CSF, a model protein. *Biomaterials.* 2002; 23: 145-152.

Ghosh SK. *Functional Coatings: by Polymer Microencapsulation.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2006.

Gu JM, Robinson JR, Leung SH. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surface: Structure-property relationships. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1988; 5: 21-67.

Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP. The role of M cells in mucosal immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000; 57(2): 323-32.

Hochman J, Artursson P. Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J Control Release*. 1994; 29: 253–267.

Huguet ML, Dellacherie E. Calcium alginate beads coated with chitosan: Effect of the structure of encapsulated materials on their release. *Process Biochemistry*. 1996; 31(8): 745–751.

Jin M, Zheng Y, Hu Q. Preparation and characterization of bovine serum albumin alginate/chitosan microspheres for oral administration. *Asian J Pharm*. 2009; 4(4): 215–220.

Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *J INFLAMM*. 2010; 1–12.

Kofuji K, Qian CJ, Murata Y, Kawashima S. Preparation of chitosan microparticles by water-in-vegetable oil emulsion coalescence technique. *REACT FUNCT POLYM*. 2005; 62: 77–83.

Kotze AF, de Leeuw BJ, Lueben HL, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: *In vitro* evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*. 1997; 159: 243–253.

Lee JS, Cha DS and Park HJ. Survival of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* KfRI 673 in Chitosan-coated Calcium Alginate Microparticles. *Agric Food Chem*. 2004 Nov; 52(24): 7300–7305.

Li XY, Kong XY, Shi S, Zheng XL, Guo G, Wei YQ, Qian ZY. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnology*. 2008 Nov 19; 89(8): 1–11.

Mayer G [homepage on the Internet]. South carolina: Microbiology and Immunology On-line [updated 2011 May 4; cited 2012 Dec 10]. Antigen; [about 4 screens]. Available from: <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/antigens2000.htm>

Microtek laboratories. Technical Overview: Microencapsulation. 2010.

- Milstein SJ, Leipold H, Sarubbi D, Leone-Bay A, Mlynek GM, Robinson JR. Partially unfolded proteins efficiently penetrate cell membranes: Implications for oral drug delivery. *J Control Release*. 1998; 53: 259-267.
- Paños I, Acosta N, Heras A. New Drug Delivery Systems Based on Chitosan. *Curr Drug Discov Tech*. 2008; 5: 333-341.
- Patil JS, Kamalapur MV, Marapur SC, Kadam DV. IONOTROPIC GELATION AND POLYELECTROLYTE COMPLEXATION: THE NOVEL TECHNIQUES TO DESIGN HYDROGEL PARTICULATE SUSTAINED, MODULATED DRUG DELIVERY SYSTEM: A REVIEW. *DIG J NANOMATER BIOS*. March 2010; 5(1): 241 - 248.
- Rajapaksa TE, Stover-Hamer M, Fernandez X, Eckelhoefer HA, David DL. Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *J CONTROL RELEASE*. 2010 March; 142(2) :196-205.
- Ram IM, Ajit SN, Laura T, Duane DM. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2003; 20: 153-214.
- Ribeiro AJ, Silva C, Ferreira D, Veiga F. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *Eur J Pharm*. 2005; 31-40.
- Rick S. Oral protein and peptide drug delivery. In: Binghe W, Teruna S, Richard S, editors. *Drug delivery: Principles and applications*. New Jersey: Wiley Interscience; 2005. 189.
- Sakuma S, Hayashi M, Akashi M. Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 47: 21-37.
- Science lab chemical and laboratory equipment. Chitosan MATERIAL SAFETY DATA SHEET [internet]. [cited 2012 oct 20]. Available from: www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927494

Science lab chemical and laboratory equipment. Sodium alginate MATERIAL SAFETY DATA SHEET [internet]. [cited 2012 oct 20]. Available from:

<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924955>

Shaji J and Patole V. Protein and Peptide Drug Delivery: Oral Approaches. *Indian J Pharm Sci.* 2008 May-Jun; 70(3): 269–277.

Sigma-aldrich. ALBUMIN FROM BOVINE SERUM Product information [internet]. [cited 2012 oct 20]. Available from:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9418?lang=en®ion=TH>

Sigma-aldrich. Product specification [internet]. [cited 2012 oct 20]. Available from:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448877?lang=en®ion=TH>

Vandenberg GW, Drolet C, Scott SL, Noüe J. Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. *J CONTROL RELEASE.* 2001; 77 (3): 297–307.

Van Kruiningen HJ, West AB, Freda BJ, Holmes KA. Distribution of Peyer's patches in the distal ileum. *INFLAMM BOWEL DIS.* 2002 May; 8(3): 180-185.

Ye M, Kim S, Park K. Issue in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *J CONTROL RELEASE.* 2010; 146: 241-260.

Yu Y.C, Yao Y.Q, Zhang Y.Q, et al. Preparation and release behavior of chitosan/calcium-alginate nanoparticles encapsulating bovine serum albumin. *Journal of Functional Polymers.* 2005; 18: 598-601.

Zhang Y, Wei W, Wang L, Piping L, Ma G. Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin. *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2011; 77: 11-19.

Zhou XH. Overcoming enzymatic and absorption barriers to non-parenterally administered protein and peptide drugs. J CONTROL RELEASE. 1994 March; 29(3): 239-252.

ภาคผนวก ก

1. โบวีนซีรัมอัลบูมิน

โบวีนซีรัมอัลบูมินเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 583 ตัวมาต่อกัน ที่ pH 5-7 จะมีการเกิดพันธะ disulfide bridges 17 พันธะภายในโครงสร้างของโมเลกุล และมี 1 sulfhydryl group (Cell Signaling Technology, 2007)

ชื่อสาร: Bovine serum albumin

น้ำหนักโมเลกุล: 66 กิโลดาลตัน

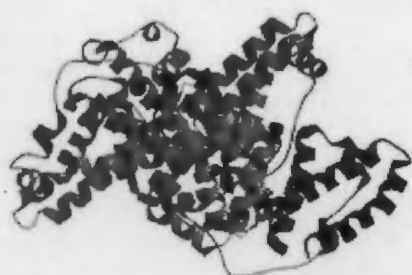
pH: สารละลาย 1% มี pH 5.2-7

ค่า isoelectric point: pH 4.7 ในน้ำอุณหภูมิ 25 °C

ลักษณะทางกายภาพ: ผงผลึกสีขาวหรือสีใส

การละลาย: ละลายน้ำ 40 mg/mL แต่จะเกิดการตกตะกอนเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือ เช่น ammonium sulfate ในปริมาณสูง

การเก็บรักษา: เก็บในภาชนะปิดสนิทในที่แห้งและเย็น (2-8 °C) หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับ oxidizing agents ที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 50°C โบวีนซีรัมอัลบูมินจะเกิดการหลอมรวมเกาะตัวกันเป็นก้อนแข็ง ซึ่งจะไม่สามารถทำให้กลับมาเป็นอนุภาคเดี่ยวๆ ได้เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลง (Sigma-aldrich, 2000)



รูปที่ 18 โครงสร้างของโบวีนซีรัมอัลบูมิน

2. อัลจิเนต

ชื่อสาร: Sodium alginate

สูตรเคมี: $(C_6H_7O_6Na)_n$

น้ำหนักโมเลกุล: 216

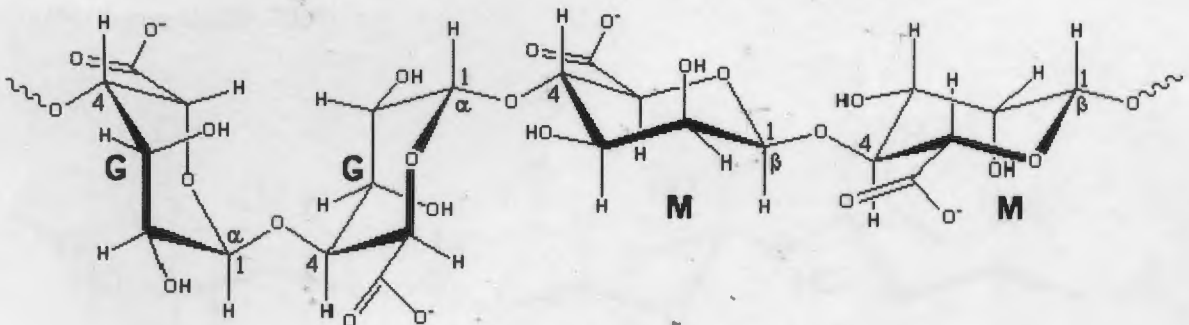
แหล่งที่มา: สาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) (Draget, 2011: 251-256)

ลักษณะทางกายภาพ: ผงสีขาวหรือขาวขุ่น ไม่มีกลิ่น ไม่มีรสชาติ

จุดหลอมเหลว: $>300^{\circ}C$ ($572^{\circ}F$)

การละลาย: ละลายทั้งในน้ำเย็นและน้ำร้อน แต่ไม่ละลายน้ำที่ pH ต่ำกว่า 3.7 ไม่ละลายใน diethyl ether

การเก็บรักษา: เก็บในภาชนะปิดสนิท ป้องกันจากแสง ความชื้น ความร้อน หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับกรด ด่าง และ oxidizing agents (Science lab chemical and laboratory equipment, 2005)



รูปที่ 19 โครงสร้างของอัลจิเนต

3. ไคโตแซน

ชื่อสาร: Chitosan

สูตรเคมี: $(C_6H_{11}O_4N)_n$

น้ำหนักโมเลกุล: 50,000 ดาลตัน

แหล่งที่มา: ได้จากเปลือกของสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง ปู แล้วนำมาผ่านกระบวนการ alkaline deacetylation (Science lab chemical and laboratory equipment, 2005)

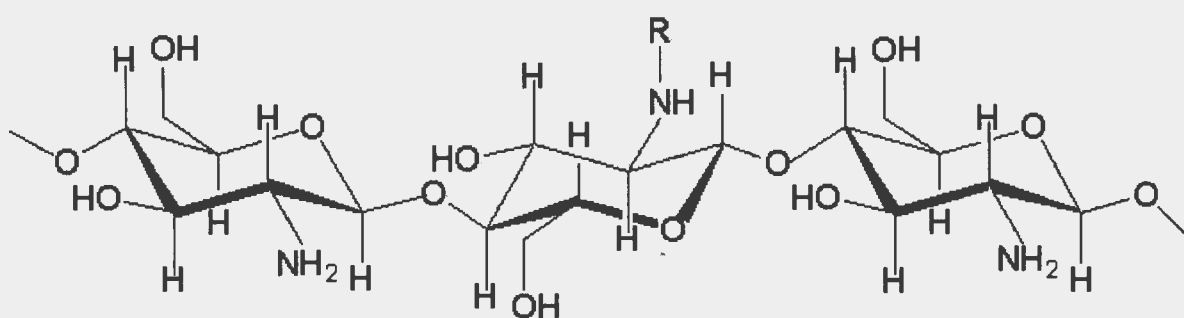
ลักษณะทางกายภาพ: ผงสีขาวขุ่น หรือ สีเบจ

ความถ่วงจำเพาะ: 1.4

pKa : 6.3

การละลาย: ละลายน้ำที่มี pH ต่ำกว่า 7

การเก็บรักษา: เก็บในภาชนะที่แห้ง ปิดสนิท ในที่เย็น หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับ oxidizing agents ที่แรง (Sigma-aldrich, 2007)



R = H or COCH₃

รูปที่ 20 โครงสร้างของไคโตแซน



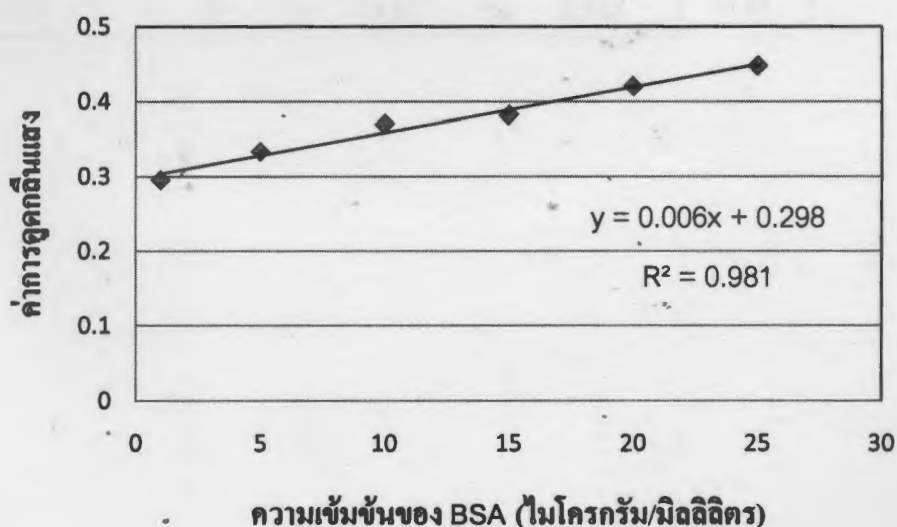
ห้องสมุดคณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ในน้ำ ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ตารางที่ 4 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย โบวีนซีรัมอัลบูมินมาตรฐานด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลาย โบวีนซีรัมอัลบูมินมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการ ดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ค่าการ ดูดกลืนแสง ครั้งที่ 2	ค่าการ ดูดกลืนแสง ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ยการ ดูดกลืนแสง
1	0.298	0.306	0.283	0.296
5	0.331	0.339	0.33	0.333
10	0.366	0.399	0.346	0.370
15	0.391	0.39	0.366	0.382
20	0.408	0.422	0.431	0.420
25	0.431	0.446	0.466	0.448



รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของสารละลาย โบวีนซีรัมอัลบูมินมาตรฐาน

ตารางที่ 5 ปริมาณของ BSA ในอนุภาคไมโครอัลจินेट/ไคโตแซน (Drug content)

สัดส่วน อัลจินेटต่อ ไคโตแซน	CaCl ₂ % w/v	รุ่นการผลิตที่	น้ำหนักอนุภาค ไมโครที่ซั่ง (มิลลิกรัม)	น้ำหนัก BSA ที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัม)	% drug content	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
1:1	6	1	39.18	0.12	0.30	0.30 ± 0.06
		2	32.02	0.12	0.37	
		3	37.17	0.09	0.24	
1:2	6	1	32.90	0.15	0.45	0.49 ± 0.06
		2	32.66	0.183	0.56	
		3	35.36	0.17	0.47	
1.5:1	6	1	31.70	0.12	0.38	0.21 ± 0.16
		2	51.40	0.06	0.13	
		3	54.73	0.06	0.11	
1.5:2	6	1	39.21	0.17	0.433	0.40 ± 0.09
		2	34.74	0.16	0.46	
		3	41.43	0.12	0.29	
1:2	8	1	31.38	0.13	0.41	0.35 ± 0.11
		2	35.68	0.08	0.22	
		3	34.86	0.15	0.42	

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ในอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซน (% Entrapment efficiency, %EE)

สัดส่วนอัลจินตต่อไคโตแซน	CaCl ₂ % w/v	รุ่นการผลิตที่	น้ำหนักอนุภาคไมโครที่ซั่ง (mg)	Drug content จริง (µg/mg)	Drug content ตามทฤษฎี (µg/mg)	% EE	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1:1	6	1	39.18	3.02	9.90	30.50	30.76 ± 6.44
		2	32.02	3.69		37.32	
		3	37.17	2.42		24.46	
1:2	6	1	32.9	4.51	6.62	68.08	74.67 ± 8.87
		2	32.66	5.61		84.76	
		3	35.36	4.71		71.17	
1.5:1	6	1	31.7	3.89	11.86	32.81	17.49±13.29
		2	51.4	1.26		10.66	
		3	54.73	1.06		8.99	
1.5:2	6	1	39.21	4.34	8.50	51.02	46.78±10.75
		2	34.74	4.65		54.76	
		3	41.43	2.94		34.55	
1:2	8	1	31.38	4.09	6.62	61.75	52.81±17.05
		2	35.68	2.20		33.15	
		3	34.86	4.21		63.53	

ตารางที่ 7 ปริมาณอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียมได้ (%yield)

สัดส่วน อัลจินต ต่อไคโต แซน	CaCl ₂ % w/v	รุ่นการ ผลิตที่	M ₀	M	% Yield	ค่าเฉลี่ย ± ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน
1:1	6	1	606	120	19.80	23.10 ± 3.30
		2		160	26.40	
		3		140	23.10	
1:2	6	1	906	270	29.80	24.65 ± 4.98
		2		180	19.87	
		3		220	24.28	
1.5:1	6	1	759	370	48.75	39.09 ± 8.37
		2		260	34.26	
		3		260	34.26	
1.5:2	6	1	1059	270	25.50	29.90 ± 4.75
		2		310	29.27	
		3		370	34.94	
1:2	8	1	906	250	27.59	27.22 ± 0.64
		2		250	27.59	
		3		240	26.49	

หมายเหตุ M คือ น้ำหนักอนุภาคไมโครที่เตรียมได้ (มิลลิกรัม)

M₀ คือ น้ำหนักของสารที่เป็นของแข็งในสูตรตำรับตอนเริ่มต้น (มิลลิกรัม)

ตารางที่ 8 ปริมาณ BSA สะสมที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคไมโครอัลจินต/โคโตเซนที่เตรียมด้วย สัดส่วน 1:2 และใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	ตัวกลาง*	% การปลดปล่อย สะสม (1)	% การปลดปล่อย สะสม (2)	% การปลดปล่อย สะสม (3)	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0.5	HCl	22.19	19.28	22.46	21.31 \pm 1.76
1	HCl	20.65	22.40	24.94	22.66 \pm 2.16
1.5	HCl	21.83	21.62	23.60	22.35 \pm 1.09
2	HCl	18.41	19.83	20.26	19.50 \pm 0.97
2.5	PBS	31.46	38.24	42.71	37.47 \pm 5.66
3	PBS	35.57	39.56	45.20	40.11 \pm 4.83
3.5	PBS	35.74	41.77	48.07	41.86 \pm 6.16
4	PBS	37.04	42.75	45.40	41.73 \pm 4.27
4.5	PBS	37.98	43.23	43.86	41.69 \pm 3.22
5	PBS	38.90	43.25	47.07	43.07 \pm 4.09
5.5	PBS	40.24	45.00	47.22	44.16 \pm 3.57
6	PBS	39.00	44.65	48.63	44.10 \pm 4.84
6.5	PBS	38.50	44.19	45.89	42.86 \pm 3.87
7	PBS	38.91	43.30	45.75	42.65 \pm 3.50

* HCl คือ 0.1 M hydrochloric acid; PBS คือ phosphate buffer solution (pH 7.4)

ตารางที่ 9 ปริมาณ BSA สะสมที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วย สัดส่วน 1:2 และใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร

เวลา (ชม.)	ตัวกลาง*	% การปลดปล่อยสะสม (1)	% การปลดปล่อยสะสม (2)	% การปลดปล่อยสะสม (3)	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0.5	HCl	25.04	11.90	16.18	17.71 \pm 6.70
1	HCl	35.64	3.92	20.45	20.00 \pm 15.86
1.5	HCl	25.65	18.76	20.18	21.53 \pm 3.64
2	HCl	25.15	17.63	18.85	20.54 \pm 4.04
2.5	PBS	48.11	34.00	39.84	40.65 \pm 7.09
3	PBS	52.34	36.27	41.72	43.45 \pm 8.17
3.5	PBS	57.71	36.34	42.64	45.56 \pm 10.98
4	PBS	54.83	36.34	39.62	43.60 \pm 9.86
4.5	PBS	55.72	37.83	43.41	45.66 \pm 9.16
5	PBS	55.77	40.13	43.60	46.50 \pm 8.21
5.5	PBS	54.73	38.38	43.16	45.42 \pm 8.41
6	PBS	54.16	38.29	43.58	45.34 \pm 8.08
6.5	PBS	54.13	39.04	42.72	45.30 \pm 7.87
7	PBS	54.66	34.98	42.68	44.11 \pm 9.91

* HCl คือ 0.1 M hydrochloric acid; PBS คือ phosphate buffer solution (pH 7.4)

ภาคผนวก ค

ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ในอนุภาคไมโครที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อไคโตแซน 1:1, 1:2, 1.5:1 และ 1.5:2 และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตร ($\alpha = 0.05$)

รุ่นการผลิตที่	% EE ของสัดส่วน	
	1:1	1:2
1	30.5045091	68.08004053
2	37.32562981	84.76219637
3	24.45520581	71.17269985

t-Test: Paired Two Sample for Means

	% entrapment efficiency 1:1	% entrapment efficiency 1:2
Mean	30.76178	74.67165
Variance	41.4616	78.75555
Observations	3	3
Pearson Correlation	0.787454	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	-13.8344	
P(T<=t) one-tail	0.002592	
t Critical one-tail	2.919986	

สรุปผล

อนุภาคไมโครอัลจินต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อไคโตแซน 1:1 มีประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ต่ำกว่าสัดส่วน 1:2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

รุ่นการผลิตที่	% EE ของสัดส่วน	
	1.5:1	1.5:2
1	32.81107606	51.01589731
2	10.66472114	54.75756413
3	8.988570152	34.55493872

t-Test: Paired Two Sample for Means

	<i>% entrapment efficiency 1.5:1</i>	<i>% entrapment efficiency 1.5:2</i>
Mean	17.48812	46.77613
Variance	176.7971	115.5182
Observations	3	3
Pearson Correlation	0.400181	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	-3.80294	
P(T<=t) one-tail	0.031356	
t Critical one-tail	2.919986	

สรุปผล

อนุภาคไมโครอัลจินเนต/ไคโตแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินเนตต่อไคโตแซน 1.5:1 มีประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ต่ำกว่าสัดส่วน 1.5:2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

รุ่นการผลิตที่	% EE ของสัดส่วน	
	1:1	1.5:1
1	30.5045091	32.81107606
2	37.32562981	10.66472114
3	24.45520581	8.988570152

t-Test: Paired Two Sample for Means

	<i>% entrapment efficiency 1:1</i>	<i>% entrapment efficiency 1.5:1</i>
Mean	30.76178	17.48812
Variance	41.4616	176.7971
Observations	3	3
Pearson Correlation	0.028459	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	1.57387	
P(T<=t) one-tail	0.128086	
t Critical one-tail	2.919986	

สรุปผล

อนุภาคไมโครอัลจินเนต/โกลโดเซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินเนตต่อโกลโดเซน 1:1 มีประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA สูงกว่าสัดส่วน 1.5:1 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

รุ่นการผลิตที่	% EE ของสัดส่วน	
	1:2	1.5:2
1	68.08004053	51.01589731
2	84.76219637	54.75756413
3	71.17269985	34.55493872

t-Test: Paired Two Sample for Means

	% entrapment efficiency 1:2	% entrapment efficiency 1.5:2
Mean	74.67165	46.77613
Variance	78.75555	115.5182
Observations	3	3
Pearson Correlation	0.499841	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	4.857893	
P(T<=t) one-tail	0.019929	
t Critical one-tail	2.919986	

สรุปผล

อนุภาคไมโครอัลจิเนต/โกลโดแซนที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจิเนตต่อโกลโดแซน 1:2 มีประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA สูงกว่าสัดส่วน 1.5:2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการเปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA ที่เตรียมด้วยสัดส่วนอัลจินตต่อโคโคแซน 1:2 และใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 และ 8 โดยมวลต่อปริมาตร ($\alpha = 0.05$)

รุ่นการผลิตที่	% EE ของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์	
	6	8
1	68.08004053	61.75377098
2	84.76219637	33.15115845
3	71.17269985	63.53031172

t-Test: Paired Two Sample for Means

	% entrapment efficiency (6%)	% entrapment efficiency (8%)
Mean	74.67165	52.81175
Variance	78.75555	290.6931
Observations	3	3
Pearson Correlation	-0.97429	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	-1.469038	
P(T<=t) one-tail	0.139789	
t Critical one-tail	2.919986	

สรุปผล

อนุภาคไมโครอัลจินต/โคโคแซนที่เตรียมด้วยแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยมวลต่อปริมาตรมีประสิทธิภาพการกักเก็บ BSA สูงกว่าความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตรอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

