

การเตรียมอนุภาค แคลเซียมแอลจิเนต/เอ็น-บิวทิลไคโตซาน เพื่อควบคุมการปลดปล่อยกลูโคซามีน

Preparation of calcium alginate/*N*-butyl chitosan particles for controlled release of glucosamine



โดย

นางสาวธาราวดี ธรรมนาถ

นางสาวปิยพัชร จันทร์ชูชื่น

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

เรื่อง การเตรียมอนุภาคแคลเซียมแอลจินेट/เอ็น-บิวทิลไคโตซาน เพื่อการปลดปล่อยกลูโคซามีน

โดย นางสาวธาราวดี ธรรมนาถ และ นางสาวปิยพัชร์ จันทร์ชูชื่น


ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา


ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

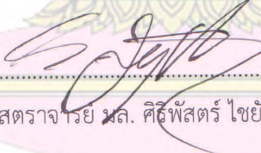
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

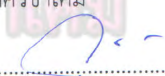

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเน่น)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณี โรจนสิทธิ์ศักดิ์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นล. ศิริพัทธ์ ไชยันต์)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี


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

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วัน 21 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ

ต่ำมาก

ดี

พอใช้

ชื่อโครงการ การเตรียมนอนุภาคแคลเซียมแอลจีเนต/เฮ็น-บิวทิลโคโตซานเพื่อควบคุมการปลดปล่อย
กลูโคซามีน

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวธารวดี ธรรมนาญ เลขประจำตัว 5433102623

นางสาวปิยพัชร์ จันทร์ชูชื่น เลขประจำตัว 5433114123

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณี โรจนสิทธิตักดิ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมนอนุภาคที่มีขนาดระดับไมโครเมตรจากกระบวนการ ionotropic gelation ระหว่าง แคลเซียมแอลจีเนต และเฮ็น-บิวทิลโคโตซาน เพื่อนำอนุภาคมาใช้ในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อย กลูโคซามีน ซึ่งสังเคราะห์เฮ็น-บิวทิลโคโตซานโดยการทำปฏิกิริยากันระหว่างโคโตซานกับบิวทิลดีไฮด์ ที่มีระดับการแทนที่ของหมู่บิวทิลที่หมู่เอมีโนบนสายโซ่โคโตซานเป็น 10, 30 และ 40% จากนั้นนำไปเตรียมนอนุภาคเฮ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต โดยศึกษาขนาดของอนุภาคและสัญญาณวิทยาของอนุภาค ประสิทธิภาพในการกักเก็บและแบบแผนในการปลดปล่อยกลูโคซามีนจากอนุภาค และการบวมตัวของอนุภาคในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 1.2 และ 7.4 วิเคราะห์ขนาด และสัญญาณวิทยาของอนุภาคเฮ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต ที่เตรียมได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า อนุภาคมีขนาดเฉลี่ยคือ 1.00 ± 0.05 มิลลิเมตร ประสิทธิภาพในการกักเก็บกลูโคซามีน (Entrapment efficiency: EE) ของอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และอนุภาคเฮ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตที่เตรียมจากเฮ็น-บิวทิลโคโตซานโดยมีระดับการแทนที่เท่ากับ 10, 30 และ 40% คือ 0.7, 0.47, 0.82, และ 0.57% ตามลำดับ โดยที่มีปริมาณกลูโคซามีนต่อน้ำหนักอนุภาค (Loading capacity: LC) คือ 0.53, 0.35, 0.43 และ 0.43% ตามลำดับ โดยค่า EE และ LC มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า นอกจากนี้การบวมของอนุภาคในน้ำที่ pH 1.2 อนุภาคไม่บวมตัว และที่ pH 7.4 พบว่าค่าดัชนีการบวมตัวมีค่าลดลง เมื่อเฮ็น-บิวทิลโคโตซานมีระดับการแทนที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งพบว่าที่ pH 7.4 อัตราการปลดปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคนั้นจะลดลง เมื่อเฮ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต ที่มีระดับการแทนที่เพิ่มขึ้นจาก 10-40%

คำสำคัญ: โคโตซาน, กลูโคซามีน, แอลจีเนต, ionotropic gelation

Title Preparation of calcium alginate/*N*-butyl chitosan particles for controlled release of glucosamine

Student names Miss Tharawadee Thammanan ID 5433102623

Miss Piyapat Chanchoochuen ID 5433114123

Advisor Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.

Co-advisor Assistant Professor Pranee Rojsitthisak, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2014



Abstract

This work covers the preparation of micron-sized particles by ionotropic gelation between calcium alginate and *N*-butyl chitosan. The obtained particles were used to entrap glucosamine with the aim to produce a controlled release system. *N*-butyl chitosan was prepared by the reaction of chitosan with butyraldehyde, resulting in butyl group substitution of 10, 30, and 40% of all amino groups on chitosan chains. Then, the particles of calcium alginate/*N*-butyl chitosan were prepared. The size of particles, morphology, entrapment efficiency, release profile of glucosamine, and particle swelling in pH 1.2 and 7.4 phosphate buffer were investigated. The size and morphology of *N*-butyl chitosan-calcium alginate and chitosan-calcium alginate particle were measured by SEM. The average particle size was 1.00 ± 0.05 μ m. Entrapment efficiencies (EE) of calcium alginate particle-chitosan or *N*-butyl chitosan with 10, 30, and 40% butyl group substitution were 0.70, 0.47, 0.82, and 0.57%, respectively. Glucosamine loading capacities (LC) were 0.53, 0.35, 0.43, and 0.43% respectively. The EE and LC were rather low compared to results reported earlier. At pH 1.2, the particles did not swell, but at pH 7.4, the swelling index decreased when degree of butyl group substitution of *N*-butyl chitosan increased. The release of glucosamine loaded particles was investigated in phosphate buffer solution at pH 7.4. The results showed that glucosamine was released decreasingly, when the degree of substitution of butyl group was increased from 10 to 40%.

Key words: chitosan, glucosamine, alginate, ionotropic gelation

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเตรียมอนุภาคแคลเซียมแอลจีเนต/เฮ็น-บิวทิลโคโตนานเพื่อควบคุมการปลดปล่อยกลูโคซามีน นั้นสำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ตั้ง พสุธาตล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณี โรจนสิทธิศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คอยให้ คำปรึกษา ดูแล สนับสนุนและช่วยเหลือตลอดระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นทำโครงการจนจบโครงการ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็น อย่างยิ่งจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น และผู้ช่วยศาสตราจารย์ มล.ศิริพัสตร์ ไชยันต์ ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการการสอบโครงการ พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศูภากุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง HPLC พร้อมทั้งคำแนะนำในการใช้เครื่อง HPLC อย่างถูกต้อง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณมณีรัตน์ วงศิริไพศาล คุณธนิน เถลิบบงกช คุณสุสิตา โนรี คุณวิทยา ภมรรานนท์ และผู้วิจัยทุกท่านในกลุ่มวิจัยของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล และรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น ที่ให้ความช่วยเหลือทุกปัญหา คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณศานิตา พัฒนถาบุตร ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่อง HPLC อย่างถูกต้อง รวมทั้งเพื่อน ในกลุ่มทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ผู้วิจัยขอขอบคุณ บิดาและมารดา ที่ให้การอบรมเลี้ยงดูและสนับสนุนด้านการศึกษามาตลอด

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตารางประกอบ	ช
สารบัญรูปภาพประกอบ	ฌ
คำอธิบายคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	4
1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 การทดลอง	8
2.1 อุปกรณ์สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	8
2.1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	8
2.1.2 สารเคมี	8
2.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	9
2.2 วิธีการทดลอง	10
2.2.1 วิธีการตกตะกอนโคโคซานให้บริสุทธิ์	10
2.2.2 วิธีการสังเคราะห์เอ็น-บิวทิลโคโคซาน	10
2.2.3 วิธีการเตรียมอนุภาคโคโคซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และ เอ็น-บิวทิลโคโคซาน-แคลเซียมแอลจีเนต	11
2.2.4 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน	12
2.2.5 การศึกษาการปลดปล่อยยาของอนุภาคที่เตรียมได้	14
2.2.6 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะการบวมตัวของอนุภาคที่เตรียมได้	14
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	15
3.1 การสังเคราะห์เอ็น-บิวทิลโคโคซาน และ เปร้เซ็นการแทนที่ของหมู่บิวทิล	15
3.2 การเตรียมอนุภาคโคโคซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลโคโคซาน- แคลเซียมแอลจีเนต	18
3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนในอนุภาคโคโคซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลโคโคซาน-แคลเซียมแอลจีเนต	20
3.4 การปลดปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคโคโคซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และ เอ็น-บิวทิลโคโคซาน-แคลเซียมแอลจีเนต	21
3.5 ศึกษาขนาด ลักษณะสัณฐาน และลักษณะการบวมของอนุภาคอนุภาคโคโคซาน- แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลโคโคซาน-แคลเซียมแอลจีเนต	22

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 4 สรุปลผลการทดลอง	25
4.1 สรุปลผลการทดลอง	25
4.2 ข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	29
ประวัติผู้วิจัย	37



ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 3.1	แสดงอัตราส่วนโดยโมลของ NH ₂ :CHO ของไคโตซาน ลักษณะทางกายภาพ และร้อยละสารที่ได้ (%yield) 15
ตารางที่ 3.2	ค่า chemical shift (δ) ของ N-butyl chitosan จากการวิเคราะห์ด้วย proton-NMR 15
ตารางที่ 3.3	แสดงเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่ butyl บนสายโซ่ไคโตซาน 17
ตารางที่ 3.4	แสดงผล Zeta potential และ pH ของสารละลายในการเตรียมอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต 18
ตารางที่ 3.5	แสดงผล Zeta potential และ pH ของสารละลายในการเตรียมอนุภาคเฮ็น-บิวทิลไคโตซาน 10% DS -แคลเซียมแอลจีเนต 19
ตารางที่ 3.6	แสดงผล Zeta potential และ pH ของสารละลายในการเตรียมอนุภาคเฮ็น-บิวทิลไคโตซาน 30% DS-แคลเซียมแอลจีเนต 19
ตารางที่ 3.7	แสดงผล Zeta potential และ pH ของสารละลายในการเตรียมอนุภาคเฮ็น-บิวทิลไคโตซาน 40% DS -แคลเซียมแอลจีเนต 19
ตารางที่ 3.8	แสดงประสิทธิภาพในการกักเก็บยา (Entrapment Efficiency:%EE) และปริมาณกลูโคซามีนต่อน้ำหนักอนุภาค (Loading Capacity:%LC) ของอนุภาคที่เตรียมได้ 21
ตารางที่ 3.9	แสดงขนาดของอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเฮ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตที่เตรียมได้ 22
ตารางที่ 3.10	แสดง Swelling index ของอนุภาคที่เตรียมได้ที่ pH 1.2 และ pH 7.4 24

สารบัญรูปภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของ (a) ไคติน (b) ไคโตซาน	4
รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของแอลจินเนต	5
รูปที่ 1.3 การเกิด egg box model	6
รูปที่ 1.4 กระบวนการ ionotropic gelation ของไคโตซาน และแอลจินเนต	6
รูปที่ 2.1 สมการแสดงการสังเคราะห์เอ็น-บิวทิลไคโตซานจากไคโตซาน	11
รูปที่ 2.2 (a) การหยด Dope ลงใน coagulation fluid (b) ลักษณะเม็ดปิดที่เตรียมได้	12
รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Phenylthiocarbonyl-glucosamine	13
รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	16
รูปที่ 3.2 โครงสร้างทางเคมีของเอ็น-บิวทิลไคโตซาน	16
รูปที่ 3.3 ¹ H NMR spectra ของเอ็น-บิวทิลไคโตซานที่มีอัตราส่วนโมลของ NH ₂ :CHO คือ (a) 1:0.25, (b) 1:1, (c) 1:1.45 และ(d) ไคโตซาน (ตัวทำละลาย: D ₂ O/TFA)	16
รูปที่ 3.4 แสดงกราฟ FT-IR ของไคโตซานและเอ็น-บิวทิลไคโตซาน ที่มี %DS แตกต่างกัน	18
รูปที่ 3.5 แสดง HPLC โครมาโทแกรมของ phenylthiocarbonyl-glucosamine ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/mL ที่ flow rate 1.5 mL/min	20
รูปที่ 3.6 แสดงการปลดปล่อยกลูโคซามีนของเอ็น-บิวทิลไคโตซานที่มี %DS แตกต่างกันที่ pH 7.4	22
รูปที่ 3.7 แสดงลักษณะและพื้นที่ผิวของอนุภาคด้วยเทคนิคSEM โดยภาพลักษณะรูปร่าง a) ไคโตซาน, c) เอ็น-บิวทิลไคโตซาน 10% DS, e) เอ็น-บิวทิลไคโตซาน 30% DS และ g) เอ็น-บิวทิลไคโตซาน 40% DS ภาพลักษณะพื้นที่ผิว b) ไคโตซาน, d) เอ็น-บิวทิลไคโตซาน 10% DS, f) เอ็น-บิวทิลไคโตซาน 30% DS และh) เอ็น-บิวทิลไคโตซาน40%DS	23

คำอธิบายคำย่อ

%DD	Percentage of degree of deacetylation
%DS	Percentage of degree of substitution
$^1\text{H-NMR}$	Proton nuclear magnetic resonance
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
HPLC	High-performance liquid chromatography
SEM	Scanning electron microscope
$^{\circ}\text{C}$	Degree Celsius
EE	Entrapment efficiency
LC	Loading capacity
PITC	Phenyl isothiocyanate
Eq	Equivalent
TFA	Trifluoroacetic acid

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่พบว่ามีอาการสึกกร่อนของกระดูกอ่อน เนื่องจากมีปริมาณของโปรตีโอไกลแคน (proteoglycans) ลดลง ทำให้ความสามารถในการรองรับการเคลื่อนไหวของกระดูกข้อต่อลดลง เกิดอาการปวดขึ้นเมื่อมีการลงน้ำหนัก หรือมีกิจกรรมบนข้อนั้นๆ จากการเปลี่ยนแปลงของกระดูกอ่อนที่พบในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมดังกล่าวนี้ จึงทำให้เกิดแนวคิดในการนำเอากลูโคซามีน (glucosamine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสร้างโปรตีโอไกลแคนที่เป็นองค์ประกอบในกระดูกอ่อนมาใช้เพื่อรักษาหรือชะลอการเสื่อมของข้อในโรคข้อเสื่อม โดยกลูโคซามีน คือ สารประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) มีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์ของสิ่งมีชีวิตโดยปกติ ถูกสร้างและพบในร่างกาย เนื่องจากกลูโคซามีนถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีโอไกลแคน (proteoglycans), ไกลโคโปรตีน (glycoprotein), ไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan), กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) โดยสารโมเลกุลขนาดใหญ่นี้พบในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดของร่างกาย แต่จะพบได้มากบริเวณกระดูกอ่อน (cartilage) ซึ่งจะอยู่ที่บริเวณส่วนปลายของกระดูกโดยเฉพาะที่ข้อต่อและมีผลยับยั้งการทำงานของสารอักเสบได้หลายชนิด จึงช่วยลดการอักเสบของข้อ¹ นอกจากนี้กลูโคซามีนยังมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีมีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างผิวข้อ เอ็น น้ำหล่อเลี้ยงข้อ ผิวหนังกระดูกและใช้รักษาโรคข้อเสื่อมได้ เมื่อนำกลูโคซามีนมาใช้รักษาหรือช่วยชะลอการเสื่อมของข้อในโรคข้อเสื่อมพบว่า มีผลข้างเคียงน้อยจากการใช้ยา มีความปลอดภัยสูง ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่สนใจนำกลูโคซามีนบรรจุใส่เข้าไปในระบบขนส่งยาเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมได้อย่างมีประสิทธิภาพในหลายรูปแบบเช่น แคปซูล อนุภาค ไมโครอิมัลชันและครีม เป็นต้น โดยมีจุดประสงค์คือ ต้องการให้กลูโคซามีนสามารถกักเก็บและถูกปลดปล่อยออกมาจากระบบนำส่งยาในอัตราที่ช้าและควบคุมได้

เพื่อให้การรักษาด้วยกลูโคซามีนมีประสิทธิภาพจึงต้องพัฒนาระบบนำส่งยาซึ่งระบบการนำส่งยา (drug delivery system) คือการเตรียมยาในรูปแบบต่างๆ เพื่อที่จะสามารถควบคุมปริมาณการปลดปล่อยยา และสามารถนำส่งยาไปยังบริเวณอวัยวะเป้าหมายที่ต้องการได้ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษา รวมทั้งยังลดผลข้างเคียงจากการใช้ยา การพัฒนาออกแบบรูปแบบและระบบนำส่งยาจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยมีการนำสารพอลิเมอร์จากธรรมชาติเข้ามาใช้ในระบบการนำส่งยา หน้าที่หลักของพอลิเมอร์ในระบบนำส่งยา คือ ช่วยควบคุมการปลดปล่อยยาให้เกิดช้าๆ และคงที่ในปริมาณที่ต้องการ เป็นตัวช่วยป้องกัน และนำส่งยาไปยังบริเวณเป้าหมายในร่างกาย โดยไม่ทำให้ยาเกิดการปลดปล่อยหรือตัวยาถูกทำลายไปก่อนพอลิเมอร์ที่เลือกนำมาใช้ในงานด้านนี้จะต้องมีคุณสมบัติ คือ มีความเข้ากันกับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatible) สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradable) และสามารถย่อยสลาย

ในร่างกายได้เมตาบอไลต์ (metabolite) จากการย่อยสลายที่ไปเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจึงทำให้ไม่เป็นพิษโดยในงานจะเลือกพอลิเมอร์ที่สกัดมาจากธรรมชาติมาใช้ในการควบคุมการนำส่งยาโดยจะใช้แอลจินेट (alginate) และไคโตซาน (chitosan) มาทำการศึกษาการเตรียมเป็นระบบนำส่งยา

ไคโตซาน (chitosan) เป็นไปโอพอลิเมอร์ประเภทพอลิแซคคาไรด์จากธรรมชาติที่ผลิตได้จากการเปลี่ยนหมู่อะเซตาไมด์ (-NHCOCH₃) ของไคตินให้เป็นหมู่เอมีน (-NH₂) หรือเรียกว่ากระบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) โดยไคติน (chitin) นั้นเป็นสารที่มีปริมาณมากในธรรมชาติ พบมากในโครงสร้างเปลือกแข็งของสัตว์พวก กุ้ง ปู แคนหมึก แมลง นอกจากนี้ยังพบในผนังเซลล์ของพวกรา ยีสต์ และจุลินทรีย์อีกหลายชนิด ดังนั้นไคโตซานจึงเป็นพอลิแซคคาไรด์มีลักษณะเป็นสายตรงที่ประกอบด้วยเอ็น-แอสติลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และเอ็น-กลูโคซามีน (N-glucosamine) ไคโตซานมีคุณสมบัติที่ตีหลายประการ ได้แก่ มีคุณสมบัติเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable) ไคโตซานจึงเป็นพอลิเมอร์ที่มีความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ไม่มีความเป็นพิษ ไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย การนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์ต้องพิจารณาเปอร์เซ็นต์ดีอะเซทิลเลชันและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน โดยประจุบวกของไคโตซาน (เมื่ออยู่ในสภาวะกรด) สามารถเกิดการเชื่อมขวางกับสารที่มีประจุลบอย่างแอลจินेटได้²

แอลจินेट (alginate) เป็นพอลิแซคคาไรด์จากธรรมชาติมีส่วนประกอบคือ กรดกลูโรนิค (guluronic) และกรดแมนูโรนิค (manuronic acid) พบมากในสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล แอลจินेटมีสมบัติเกาะติดเยื่อเมือก สามารถเข้ากันได้กับร่างกาย และมีความเป็นพิษต่ำ เป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นลบ (polyanionic polymer) สามารถเกิดการเชื่อมขวางได้โดยการเติมสารที่มีประจุบวกลงไป ทำให้สามารถก่อเจลได้อย่างรวดเร็วกับสารที่มีประจุสองบวกเช่น Ca²⁺, Ba²⁺ และ Zn²⁺ จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการเตรียมไมโครแคปซูลหรือเจลที่มีความหนืดสูง³

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการเตรียมอนุภาคไคโตซาน-แอลจินेट เพื่อใช้ในการกักเก็บและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ มีดังนี้

A. K. Anal *et al.* (2005)⁴ ทำการพัฒนา multilayer beads เพื่อปรับปรุงคุณภาพในการควบคุมการส่งยาแอมพิซิลิน มีการเตรียมปัดจากการรวมไคโตซาน Ca²⁺ หน้าที่เป็นไอออนบวก และแอลจินेटเป็นไอออนลบพบว่า multilayer beads ปลดปล่อยยาที่กักเก็บเพียงแค่ 40% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

Gazori *et al.* (2009)⁵ ได้เตรียมอนุภาคไคโตซาน-แอลจินेटโดยใช้ปลดปล่อยสารประเภทแอนติเซนซ์ซึ่งเป็นสารที่ใช้สำหรับยับยั้งการทำงานของยีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง โดยอนุภาคนั้นถูกเตรียมด้วยวิธี pre-gel โดยการหยดแคลเซียมคลอไรด์ลงในโซเดียมแอลจินेटจากนั้นเติมสารละลายไคโตซาน/แอนติเซนซ์เพื่อทำให้เกิดอนุภาคระดับนาโนพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ pH 5.3 โดยอัตราส่วนของแอลจินेटต่อไคโตซานอยู่ที่ 1:1 (w/w) และอัตราส่วนของ

แคลเซียมคลอไรด์ต่อแอลจินเนต 0.002:1 (w/w) โดยอนุภาคที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพในการบรรจุเท่ากับ 95.6% และมีขนาดเฉลี่ย 194 นาโนเมตรและค่าศักย์ซีต้าประมาณ +30 mV

Parveen *et al.* (2010)⁶ ได้เตรียมอนุภาคโคโตซาน-แอลจินเนตเพื่อใช้บรรจุคาร์โบพลาตินที่ใช้รักษาเรติโนบลาสโตมาหรือโรคมะเร็งจอประสาทตาที่พบบ่อยในทารกพบว่าอนุภาคที่บรรจุคาร์โบพลาติน (carboplatin) มีขนาดประมาณ 300 นาโนเมตรแสดงค่าศักย์ซีต้าสูงประมาณ +36 mV มีการห่อหุ้มด้วยยาประมาณ 20% โดยน้ำหนักสำหรับการศึกษาการปลดปล่อยในหลอดทดลองพบว่าการปลดปล่อยด้วยยาที่รวดเร็วประมาณ 25% ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกตามด้วยการปลดปล่อยด้วยยาช้าลงจนถึง 55% ในเวลา 15 วัน

พรพรม เพ็งอ้อม (2010)⁷ ได้ทำวิจัยเกี่ยวกับการบรรจุกลูโคซามีนคลอไรด์ลงในอนุภาค 3 ชนิดคือแอลจินเนต-โคโตซาน, แอลจินเนต-*N,N,N*-trimethylammonium chitosan chloride (TMC) และแอลจินเนต-*N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl] chitosan chloride (HTCC) อาศัยหลักการของ ionotropic gelation ซึ่งทำการเตรียมอนุภาคโดยใช้สารละลาย CaCl_2 เพื่อให้ Ca^{2+} จับกับแอลจินเนตและกลูโคซามีนก่อนจากนั้นทำการห่อหุ้มอนุภาคด้วยโคโตซานหรืออนุพันธ์ของโคโตซานโดยขนาดของอนุภาคขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้ในการโชนิเคตและพบว่าแอลจินเนต-TMC (35% degree of quaternization) จะให้ขนาดอนุภาคใหญ่สุดในขณะที่แอลจินเนต-HTCC ที่มีประจุบวกมาก (33% degree of quaternization) จะให้ขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุดเมื่อทำการบรรจุกลูโคซามีนลงในอนุภาคพบว่าสามารถบรรจุกลูโคซามีนได้ประมาณ 5% โดยน้ำหนักและขนาดอนุภาคที่ได้ไม่แตกต่างจากขนาดของอนุภาคที่ไม่ได้บรรจุกลูโคซามีนและมีประสิทธิภาพการกักเก็บกลูโคซามีนค่อนข้างต่ำ คือเพียงแค่ 0.7-1.0% หลังจากนั้น วิทยา ภูมรรานนท์ (2013)⁸ ได้เตรียมอนุภาคระดับนาโนเมตรโดยเตรียมจาก Ca^{2+} , แอลจินเนต, และโคโตซานหรือ เอ็น-บิวทิลโคโตซาน เพื่อกักเก็บกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์พบว่า เอ็น-บิวทิลโคโตซานที่มีการแทนที่ของหมู่บิวทิลสูงจะส่งผลให้การเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการกักเก็บกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นคือ 67%

เนื่องจากงานวิจัยของวิทยา ภูมรรานนท์ พบว่า เอ็น-บิวทิลโคโตซานที่มีการแทนที่ของหมู่บิวทิลเมื่อเทียบกับโคโตซานจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บกลูโคซามีนเพิ่มขึ้น แต่การสังเคราะห์เอ็น-บิวทิลโคโตซานมีอุปสรรคคือ โคโตซานที่ทำปฏิกิริยากับบิวทิลไฮดรอกไซด์ละลายไม่หมด ส่งผลให้อัตราส่วนของ โคโตซานต่อบิวทิลไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในสารละลายที่จะทำปฏิกิริยานั้นไม่เท่ากับอัตราส่วนที่กำหนดไว้ รวมทั้งกลูโคซามีนเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายได้ดีและปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้การหาค่า LE (loading efficiency) คลาดเคลื่อนอันเป็นผลสืบเนื่องมาจากขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ในงานนี้จึงต้องการศึกษาค่า LE ของระบบนี้ใหม่ โดยเตรียมอนุภาคให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อที่จะสามารถแยกอนุภาคได้ถูกต้องและนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไปได้อย่างไม่มีความคลาดเคลื่อน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการสังเคราะห์เอ็น-บิวทิลโคโตซานโดยมีระดับการแทนที่ของหมู่บิวทิลบนหมู่เอมีโนของโคโตซานจำนวน 3 ระดับ คือมีหมู่บิวทิลเท่ากับ 10, 30 และ 50 % เพื่อเตรียมอนุภาคของเอ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจินเนตที่บรรจุกลูโคซามีน โดยผู้วิจัยมุ่งหวังว่าเอ็น-บิวทิลโคโตซาน - แคลเซียมแอลจินเนต จะมี

ประสิทธิภาพในการกักเก็บและสามารถควบคุมการปลดปล่อยกลูโคซามีนออกจากระบบนำส่งยาในอัตราที่ช้าและควบคุมได้ดีกว่าอนุภาคที่เตรียมจากไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต อีกทั้งยังสนใจเกี่ยวกับการบวมตัว (swelling) ของอนุภาคเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต เปรียบเทียบกับอนุภาค ไคโตซาน - แคลเซียมแอลจีเนต โดยการศึกษาในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กที่ pH 1.2 และ pH 7.4 นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องการควบคุมของอนุภาคให้มีขนาดที่ใกล้เคียงกันคือ 1.0-2.0 มิลลิเมตร พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาค สันฐานวิทยาของอนุภาคแบบแห้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกักเก็บและปลดปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคและพิสูจน์เอกลักษณ์ของไคโตซานและเอ็น-บิวทิลไคโตซานด้วยเทคนิค HPLC, $^1\text{H-NMR}$ และ FT-IR

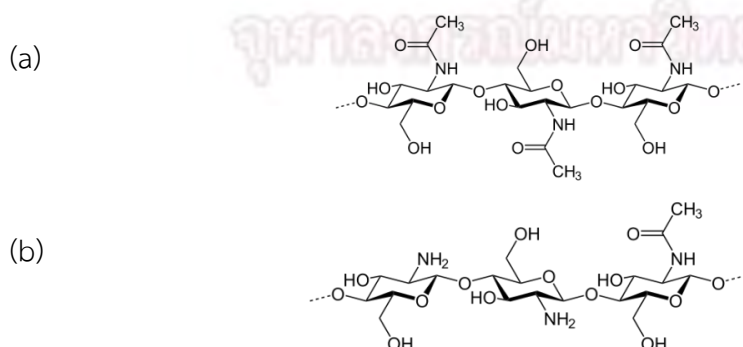
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

1. สังเคราะห์เอ็น-บิวทิลไคโตซานที่มีระดับการแทนที่ของหมู่บิวทิลเป็น 10, 30 และ 50%
2. เตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต
3. ศึกษาแบบแผนการปลดปล่อยกลูโคซามีนจากอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตที่เตรียมได้

1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.4.1 ไคโตซาน

ไคโตซาน (chitosan) คือพอลิเมอร์ประเภทพอลิแซคคาไรด์จากธรรมชาติที่ได้มาจากการบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) ของไคติน (chitin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากในธรรมชาติรองจากเซลลูโลส โดยพบในโครงสร้างเปลือกแข็งของสัตว์พวก กุ้ง ปู แคนหมึก แมลง นอกจากนี้ยังพบในผนังเซลล์ของพวกรา ยีสต์ และจุลินทรีย์อีกหลายชนิดโครงสร้างของไคตินและไคโตซานแสดงดังรูปที่ 1.1

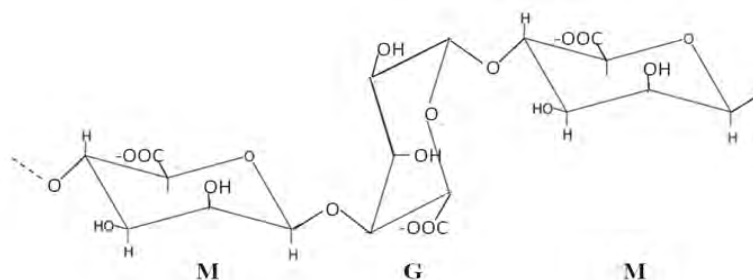


รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของ (a) ไคติน (b) ไคโตซาน

โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน คือพอลิแซคคาไรด์สายตรง ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ เอ็น-แอสติลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และเอ็น-กลูโคซามีน (N-glucosamine) จัดเรียงตัวแบบสลับในสายพอลิเมอร์ โดยจำนวน เอ็น-กลูโคซามีน ในไคโตซานแทนด้วย Degree of deacetylation (%DD) ข้อดีของไคโตซาน คือ สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เป็นพอลิเมอร์ประจุบวก (ในสภาวะกรด) จึงสามารถเกิดสารเชื่อมขวางกับพอลิเมอร์ที่มีประจุลบได้เกาะติดเยื่อเมือก จากข้อดีที่กล่าวมาจึงมีการนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้งานในหลายด้าน อาทิ เช่น ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ และด้านการนำส่งยา แต่การจะนำไคโตซานมาใช้งานนั้นต้องพิจารณาความเหมาะสมของคุณสมบัติของไคโตซานซึ่งจะขึ้นอยู่กับ มวลโมเลกุล และ %DD เช่น ด้านระบบนำส่งยา จะเลือกใช้ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุล และ %DD สูง เนื่องจากย่อยสลายได้ช้าเมื่อเทียบกับไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลและ %DD ต่ำ เพื่อปรับปรุงการกักเก็บยาและลดอัตราการปลดปล่อยยา⁹

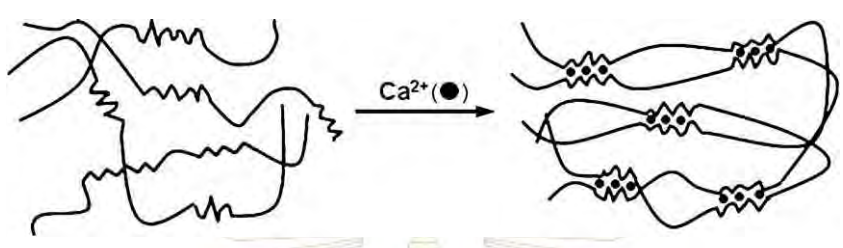
1.4.2 แอลจีเนต

แอลจีเนต (alginate) เป็นพอลิแซคคาไรด์จากธรรมชาติมีส่วนประกอบคือ กรดกลูโรนิก (guluronic, G) และกรดแมนนูโรนิก (mannuronic acid, M) ในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ G และ M ที่เรียกว่า G- และ M-blocks ดังรูปที่ 1.2 พบมากในสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล แอลจีเนตมีสมบัติเกาะติดเยื่อเมือกสามารถเข้าได้กับร่างกาย และมีความเป็นพิษต่ำ เป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นลบ (polyanionic polymer) สามารถเกิดการเชื่อมขวางได้โดยการเติมสารที่มีประจุบวกลงไป ทำให้สามารถก่อเจลได้อย่างรวดเร็วกับสารที่มีประจุสองบวก เช่น Ca^{2+} , Ba^{2+} และ Zn^{2+} จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการเตรียมไมโครแคปซูลหรือเจลที่มีความหนืดสูงในด้านการนำส่งยามีการนำแอลจีเนตมาประยุกต์ใช้งานร่วมกับไคโตซาน ซึ่งไคโตซานและแอลจีเนตจะก่อตัวเป็น polyelectrolyte complex โดย ionic interaction ระหว่างหมู่คาร์บอกซิเลตของแอลจีเนต และหมู่แอมิโนของไคโตซาน¹⁰ แอลจีเนตสามารถเกิดเป็นเจลแข็งได้ในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออนและเป็นเจลที่เสถียรต่อความร้อนนิยมใช้ CaCl_2 ซึ่ง Ca^{2+} ทำหน้าที่เป็น crosslinking agent จะจับกับ G block บนสายของแอลจีเนตจากนั้นจะเกิดการปรับตัวของสายพอลิเมอร์เกิดเป็น egg box model ทำให้เกิดโครงสร้างแบบเจล¹¹ ดังแสดงในรูปที่ 1.3 แอลจีเนตที่มีปริมาณกลูโรเนต (guluronate) สูงจะเกิดเจลแข็งที่เสถียรต่อความร้อนและแอลจีเนตที่มีปริมาณแมนนูโรเนต (mannurinate) สูงจะเกิดเจลที่อ่อนกว่านอกจากนี้การละลายของแอลจีเนตยังขึ้นอยู่กับค่า pH โดยแอลจีเนตจะตกตะกอนเมื่อ pH ต่ำกว่า 3.5 หรือสภาวะที่มีแคลเซียมไอออน

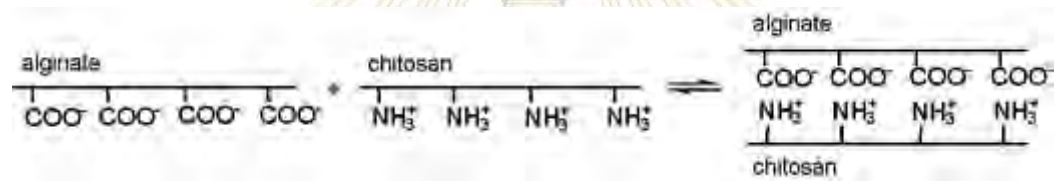


รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของแอลจีเนต

โดยกระบวนการ ionotropic gelation เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าิยมใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมโดยอาศัยหลักการเกิดเจลหรือการตกตะกอนร่วมของพอลิเมอร์สองชนิดที่มีประจุตรงข้ามกัน โดยเริ่มต้นนั้นพอลิเมอร์แต่ละชนิดจะละลายอยู่ในน้ำ เมื่อนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันจะเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุทำให้พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดยึดเกาะกันไม่ละลายน้ำอีกต่อไป ทั้งนี้ถ้าปรับสภาวะการตกตะกอนให้เหมาะสมจะสามารถทำให้ตกตะกอนออกมาเป็นอนุภาคขนาดเล็กได้¹²



รูปที่ 1.3 การเกิด egg box model¹¹

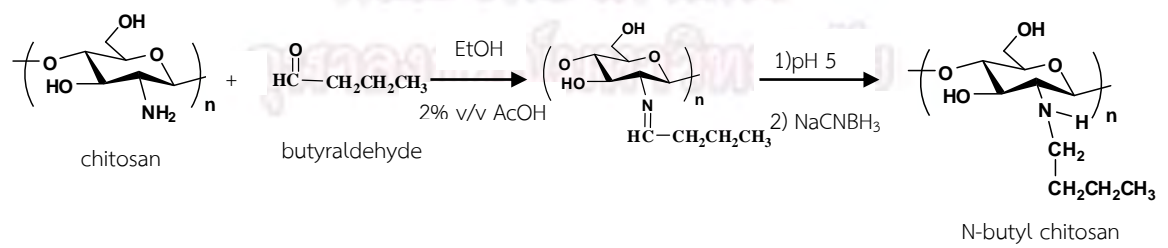


รูปที่ 1.4 กระบวนการ ionotropic gelation ของไคโตซาน และแอลจินเนต

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.5.1. ค้นคว้าเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้อง จัดหาอุปกรณ์และสารเคมี

1.5.2. สังเคราะห์ เอ็น-บิวทิลไคโตซาน ที่มีระดับการแทนที่ของหมู่บิวทิลเป็น 10% 30% และ 50% โดยแสดงปฏิกิริยาดังนี้



1.5.3. เตรียมอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจินเนต และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจินเนตที่มีขนาด 1.0-2.0 มิลลิเมตรเพื่อใช้กักเก็บและปลดปล่อยสารกลูโคซามีน ด้วยวิธี ionotropic gelation โดย coagulation

fluid ประกอบด้วย 0.80% (w/v) ไคโตซานหรือเอ็น-บิวทิลไคโตซาน และ 3.0% (w/v) CaCl_2 และใช้อัตราส่วนของไคโตซานต่อแอลจินตคือ 10: 1 (v/v) ซึ่งปริมาณยากลูโคซามีนที่ใช้คือ 2% (w/v) ในสารละลายแอลจินต

1.5.4. วิเคราะห์สมบัติอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจินต และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจินต

1.5.4.1. ขนาด, สัณฐานวิทยาของอนุภาคโดยเทคนิค SEM และประจุในสารละลายโดยเทคนิค zeta potential

1.5.4.2. การบวมตัวของอนุภาค (swelling) ในสภาวะ pH 1.2 และ pH 7.4

1.5.4.3. การกักเก็บยาและการปลดปล่อยยาโดยนำอนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีนแล้วมาแช่สารละลายโซเดียมซิติเรทและเปลี่ยนกลูโคซามีนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ phenylisothiocyanate (PITC) แล้วหาปริมาณของกลูโคซามีนด้วยเทคนิค HPLC

1.5.5. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อนุภาคเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจินตที่สามารถควบคุมขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้ และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บ และควบคุมการปลดปล่อยกลูโคซามีนที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจินต

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การทดลอง

2.1. อุปกรณ์สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 
- ขวดรูปกรวย
 - หลอดฉีดยาพร้อมเข็ม 10 มิลลิลิตร
 - ข้อนตักสาร
 - กระจกนาฬิกา
 - ยูนิเวอร์แซลอินดิเคเตอร์
 - กระจกดวง
 - ปีกเกอร์
 - ปีเปต
 - ไมโครปีเปต
 - หลอดหยด
 - หลอดทดลอง
 - ขวดกำหนดปริมาตร
 - แท่งแม่เหล็กคนสาร
 - อลูมิเนียมฟอย
 - พาราฟิล์ม
 - หลอดฉีดยา 10 มิลลิลิตร
 - Nylon filter 0.45 micron

2.1.2 สารเคมี

- Sodium Alginate น้ำหนักโมเลกุล 120,000 ดาลตัน (Sigma- Aldrich, USA)
- Chitosan น้ำหนักโมเลกุล 100,000 ดาลตัน%DD 95%
(SeafreshChitosan, Co., Ltd, Thailand)
- Glucosamine Hydrochloride, GH (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Calcium Chloride, CaCl_2 (Carlo Erba, France)

- Glacial Acetic Acid, CH_3COOH (Merck, Germany)
- Acetone, CH_3COCH_3 (Merck, Germany)
- Sodium Hydroxide, NaOH (Merck, Germany)
- Ethanol, EtOH (Carlo Erba, France)
- Butyraldehyde, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ (Merck, Germany)
- Methanol HPLC Grade, MeOH (Carlo Erba, France)
- Sodium Cyanoborohydride, NaCNBH_3 (Merck, Germany)
- Ortho-Phosphoric Acid, H_3PO_4 (Carlo Erba, France)
- Phenylisothiocyanate, PITC (Acros Organics, USA)
- n-Heptane, C_7H_{16} (Carlo Erba, France)
- Sodium acetate, CH_3COONa (Carlo Erba, France)
- Acetonitrile HPLC Grade, ACN (RCL Labscan)
- Sodium citrate, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (Sigma- Aldrich, USA)
- Deuterated oxide, D_2O (Merck, Germany)
- Trifluoroacetic acid, TFA (Acros Organics, USA)

2.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องชั่งไฟฟ้า (XT220A, Precisa, Switzerland)
- เครื่องให้ความร้อน (HS7, IKA MAG)
- Ultrasonic Bath (Elmasonic S80H, Elma, Germany)
- Vortex mixer (Vortex Genie 2, Scientific industries)
- pH Meter (Corning, USA)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (EBA20, Hettichzentrifugen, Germany)
- Freeze dryer (Labconco, USA)
- ตู้อบ (Mettmert, Germany)
- $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Varian Mercury 400 Spectrometer, USA)
- Zetasizer (Malvern, UK)
- High Performance Liquid Chromatography: HPLC (Water Cooperation, USA)
- Fourier Transform Infrared Spectrometer: FT-IR (Nicolet 6700, Thermo scientific, USA)
- Scanning Electron Microscope: SEM (JSM-6400) with EDX
- Syringe Pump (NE-1000, Single Syringe Pump)

2.2 วิธีการทดลอง

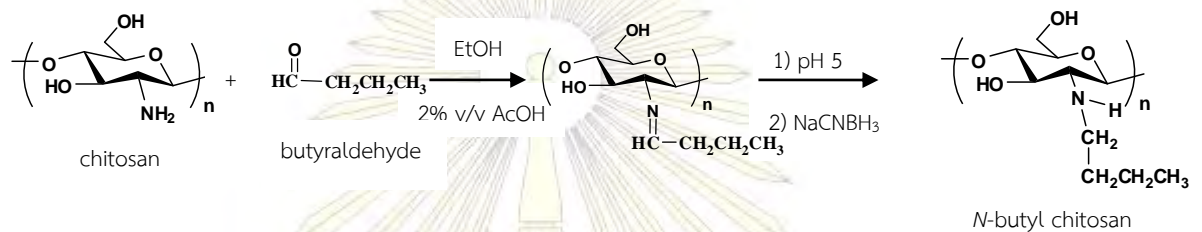
2.2.1 วิธีการตกตะกอนไคโตซานให้บริสุทธิ์

เตรียมสารละลายไคโตซาน (100,000 ดาลตัน %DD 95%) ความเข้มข้น 1% w/v ในสารละลาย 2% v/v กรดแอสติก (acetic acid) ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วัน กรองไคโตซานส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยผ้าขาวบางจากนั้นนำไคโตซานส่วนที่ละลายเป็นสารละลายใสมาทำการตกตะกอนด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 15% w/v แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำ จนกระทั่งน้ำล้างมี pH เป็น 7 จากนั้นทำให้แห้งด้วยการ freeze dry

2.2.2 วิธีการสังเคราะห์เอ็น-บิวทิลไคโตซาน (N-butyl chitosan)

เตรียมละลายไคโตซานความเข้มข้น 1% w/v (ซึ่งไคโตซาน ~0.5 g) ในสารละลาย 2% v/v กรดแอสติก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กคนสารจนสารละลายหมดจากนั้นเตรียมสารละลายบิวทิลดีไฮด์ (butyraldehyde) ในเอทานอล (EtOH) 35 มิลลิลิตรตามสัดส่วนโมลที่คำนวณเทียบกับโมลของหมู่เอมีโนไคโตซานละลาย โดยแบ่งบิวทิลดีไฮด์ที่ละลายเอทานอลออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำมาเติมลงในสารละลายไคโตซานโดยทิ้ง

ไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้วนำส่วนที่สองมาเติมลงในสารละลายไคโตซาน แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับ pH ของสารละลายเป็น 4.8-4.9 ด้วย 0.1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ วัด pH ของสารละลายด้วยเครื่อง pH meter จากนั้นเติมโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ (NaCNBH₃) มากเกินพอ (3 eq เทียบกับ mol ไคโตซาน) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนด้วย 15% w/v โซเดียมไฮดรอกไซด์พร้อมทั้งควบคุม pH ขณะตกตะกอนให้ได้ pH 10 จะได้ตะกอนขาวของเอ็น-บิวทิลไคโตซาน (N-butyl chitosan) จากนั้นล้างตะกอนเอ็น-บิวทิลไคโตซานด้วยเอทานอล, 30% v/v เอทานอลและน้ำแล้วนำตะกอนไป freeze dry เพื่อให้ตะกอนแห้งโดยปริมาณบิวทิลรัลดีไฮด์ที่ใช้ในการทดลอง เป็น 0.0658 มิลลิลิตร (0.25 eq), 0.2624 มิลลิลิตร (1.00 eq) และ 0.3791 มิลลิลิตร (1.45 eq) เพื่อให้เอ็น-บิวทิลไคโตซานมีระดับการแทนที่ ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.1 สมการแสดงการสังเคราะห์เอ็น-บิวทิลไคโตซานจากไคโตซาน

นำไปวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบโครงสร้างและเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่บิวทิลบนหมู่แอมิโนของไคโตซาน ด้วยเทคนิค ¹H-NMR โดยนำ 1% ไคโตซานละลายใน 1% TFA ใน D₂O โดย Degree of substitution (%DS) คำนวณได้จาก สมการ

$$\text{Degree of substitution (\%DS)} = \left\{ \frac{\int \text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3}{2 \times \int \text{-H}_2} \right\} \times 100 \quad (1)$$

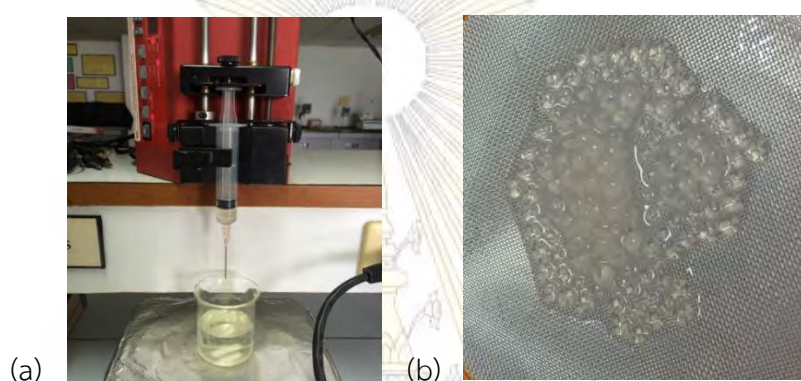
โดย $\int \text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ คือ integral peak ของ H จาก C-2 (CH₂) ใน butyl group ของไคโตซาน ($\delta=1.5$)

$\int \text{-H}_2$ คือ integral peak ของ H ที่ ตำแหน่งที่ 2 ของ glucopyranose ring ($\delta=3.0$)

2.2.3 วิธีการเตรียมอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต

การเตรียมอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตและเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต ดัดแปลงจาก Anal, A. K. *et al.* (2005)⁴ เตรียมสารละลายไคโตซาน 1% w/v ใน 1% v/v กรดแอสซิติค, เอ็น-บิวทิลไคโตซาน 1% w/v ใน 1% v/v กรดแอสซิติค ปรับ pH ของสารละลายเป็น 4.5 ± 0.1 จากนั้นเตรียม Coagulation fluid 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย เอ็น-บิวทิลไคโตซาน 1% w/v หรือไคโตซาน 1% w/v ใน 1%v/v กรดแอสซิติค 40 มิลลิลิตร + แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) 15% w/v 10 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 0.8:3 คนสารให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กคนสาร

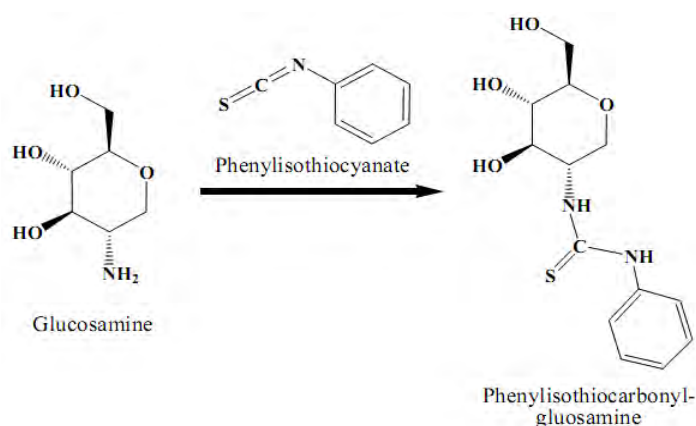
ประมาณ 5-10 นาที เตรียมกลูโคซามีน 2% w/v ในสารละลาย 2% w/v แอลจีเนตที่ปรับ pH เป็น 5.5 ± 0.1 จากนั้นบรรจุสารละลายแอลจีเนตที่มีกลูโคซามีนด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ใช้หัวเข็มเบอร์ 18 นำไปใส่เครื่อง Syringe Pump ตั้ง flow rate 40 mL/hr แล้วหยุดสารละลายแอลจีเนตที่มีกลูโคซามีน 5 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย Coagulation โดยทำการคนสารด้วยแท่งแม่เหล็กคนสารด้วยความเร็ว (stir) 200 rpm เมื่อหยุดเสร็จนำไป stir ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วกรองเม็ดปิดออกเพื่อนำไปล้างในน้ำ DI 3 ครั้ง เก็บน้ำล้างแต่ละรอบ, coagulation (สารละลายไคโตซาน/เอ็น-บิวทิลไคโตซาน + CaCl_2 ก่อนทำการหยุด สารละลายกลูโคซามีนในแอลจีเนตลงไป), post coagulation (สารละลายไคโตซาน/เอ็น-บิวทิลไคโตซาน + CaCl_2 หลังทำการหยุด สารละลายกลูโคซามีนในแอลจีเนตลงไปและทำการกรองอนุภาคแล้ว) เพื่อนำไปวัด pH และวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential)



รูปที่ 2.2 (a) การหยด Dope ลงใน coagulation fluid (b) ลักษณะเม็ดปิดที่เตรียมได้

2.2.4 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

ตามปกติแล้วหมู่เอมิโนที่อยู่ในโครงสร้างของกลูโคซามีนสามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ที่ความยาวคลื่นแสงมากที่สุด (λ_{max} 195 นาโนเมตร) ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นค่อนข้างต่ำ ในการวิเคราะห์จึงต้องนำกลูโคซามีนไปทำอนุพันธ์กับฟีนิลไอโซไทโอไซยาเนต (phenylisothiocyanate, PITC) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น phenylthio-carbonyl-glucosamine ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง ยูวีได้ที่ความยาวคลื่นแสงมากที่สุด 245 นาโนเมตร¹³



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Phenylthiocarbonyl-glucosamine

การตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีนที่อยู่ในปัด ต้องทำลายปัดก่อนเพื่อให้กลูโคซามีนออกจากปัดให้หมดโดยการนำปัดแห้งประมาณ 10 มิลลิกรัม แช่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมซิติเรตเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาสารละลายไปทำปฏิกิริยากับฟีนิลไอโซไทโอไซยาเนต (PITC) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 400 ไมโครลิตร ใส่ขวดแก้วขนาด 5 มิลลิลิตรเติม 0.3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) 250 ไมโครลิตร และเมทานอล 200 ไมโครลิตร เขย่าและทิ้งไว้ 15 นาทีแล้วเติม 1% ฟีนิลไอโซไทโอไซยาเนตในเมทานอล 250 ไมโครลิตรนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 30 วินาทีก่อนนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นเติมเฮน-เฮปแทน (n-heptane) 200 ไมโครลิตร เพื่อสกัดฟีนิลไอโซไทโอไซยาเนตผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex 1 นาที โดยแยกเอาสารละลายส่วนล่างซึ่งเป็นชั้นของน้ำ มากกรองผ่าน $0.45\ \mu\text{m}$ syringe filter membrane จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี reverse phase HPLC โดย condition HPLC ที่ใช้คือ

Column	Reversed phase C18 column (Vertical, $250 \times 4.6\ \text{mm}$)
Mobile phase	Acetonitrile: 0.1%v/v Phosphoric acid in Milli Q water (10: 90)
Flow rate	1.5 mL/min
Detector	UV-visible detector at wavelength 245 nm
Injection volume	100 μm
Run time	10 min
Retention time	5.5 min

คำนวณประสิทธิภาพการกักเก็บกลูโคซามีน (Entrapment efficiency: EE) และปริมาณกลูโคซามีนต่อน้ำหนักของอนุภาค (Loading capacity: LC) จาก

$$\text{ประสิทธิภาพการกักเก็บยา (\%)} = \frac{\text{ปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้น}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{ปริมาณกลูโคซามีนต่อน้ำหนักของอนุภาค (\%)} = \frac{\text{ปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์ได้}}{\text{น้ำหนักแห้งของบีด}} \times 100 \quad (3)$$

2.2.5 การศึกษาการปลดปล่อยยาของอนุภาคที่เตรียมได้

นำอนุภาคที่เตรียมได้ชั่งน้ำหนักมา 50 มิลลิกรัม แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 1.2 และ pH 7.4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปรวขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ จากนั้นเก็บสารละลายปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยทุกครั้งที่เก็บสารละลายต้องทำการเติมสารละลายบัฟเฟอร์กลับเข้าไปใหม่ 2 มิลลิลิตร ที่เวลา 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่เก็บไว้เพื่อหาปริมาณกลูโคซามีนที่ปลดปล่อยออกมาในแต่ละช่วงเวลามาทำเป็นอนุพันธ์ของกลูโคซามีนตามวิธีในหัวข้อ 2.2.4 แล้วหาปริมาณของกลูโคซามีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาแต่ละช่วงเวลาด้วยเทคนิค HPLC

2.2.6 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะการบวมตัว (swelling) ของอนุภาคที่เตรียมได้

ศึกษาสัณฐานวิทยาของอนุภาคที่เตรียมได้โดยการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ซึ่งตัวอย่างจะเป็นเม็ดบีด มีลักษณะกลม การเตรียมตัวอย่างก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ทำได้โดยการนำเม็ดบีดมาทำการเคลือบผิวหน้าด้วยทองและคาร์บอน ก่อนที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM

นำอนุภาคที่เตรียมได้มาศึกษาการบวมตัว (swelling) ของอนุภาค โดยชั่งน้ำหนักของอนุภาคมา 10 มิลลิกรัม นำมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.2 และ pH 7.4 โดย pH 1.2 แช่เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ส่วน pH 7.4 แช่เป็นเวลา 30 นาที ซับน้ำส่วนเกินออกหลังแช่ จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักหลังแช่ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ นำมาคำนวณค่าดัชนีการบวมตัว (swelling index) ดังสมการ

$$\text{Swelling index} = \frac{\text{น้ำหนักของอนุภาคหลังแช่ในสารละลาย} - \text{น้ำหนักของอนุภาคก่อนแช่ในสารละลาย}}{\text{น้ำหนักของอนุภาคก่อนแช่ในสารละลาย}} \quad (4)$$

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์เอ็น-บิวทิลไคโตซาน (N-butyl chitosan) และ%butyl substitution

การสังเคราะห์ เอ็น-บิวทิลไคโตซานสามารถสังเคราะห์ได้โดยกระบวนการ reductive butylation ที่หมู่แอมิโนของไคโตซาน โดยใช้เอทานอลช่วยละลายเอ็น-บิวทิลไคโตซาน เนื่องจากบิวทิลอัลดีไฮด์ไม่สามารถละลายใน 2% v/v กรดแอสติก เช่นเดียวกับที่ใช้ละลายไคโตซาน โดยหมู่แอมิโนจะเป็น nucleophile เข้าทำปฏิกิริยากับ หมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์ จะได้เป็น imine ก่อนที่จะเติม reducing agent (NaCNBH₃) ต้องปรับ pH ของสารละลายให้สูงขึ้นจาก pH 3.8-4.0 เป็น 4.8-4.9 ด้วย NaOH เนื่องจากถ้ามี H⁺ ในสารละลายมากเกินไป H⁺ จะไปทำปฏิกิริยากับ hydride ion (H⁻) ที่ได้จาก reducing agent จะทำให้ปริมาณ H⁻ มีไม่เพียงพอที่จะทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จึงต้องเติม reducing agent มากเกินพอ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันได้สมบูรณ์ ในงานนี้เลือกใช้โซเดียมไฮยาโบโรไฮไดรด์ (NaCNBH₃) เนื่องจากเป็นสารที่ทำปฏิกิริยาได้อย่างเฉพาะเจาะจงกับ imine โดยสุดท้ายจะได้เป็น secondary amine

ผลการสังเคราะห์ เอ็น-บิวทิลไคโตซาน แสดงในตารางที่ 3.1 โดยการคำนวณปริมาณร้อยละสารที่ได้จาก หมู่แอมิโน 1 หมู่ ทำปฏิกิริยากับ butyraldehyde 1 โมเลกุล

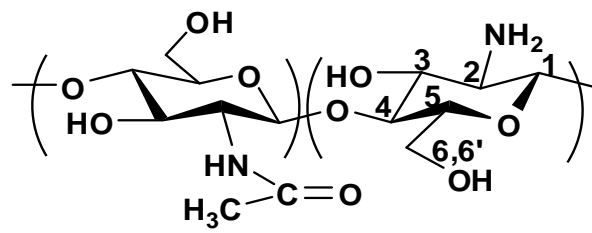
ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนโดยโมลของ NH₂: CHO ลักษณะทางกายภาพและร้อยละสารที่ได้ (%yield)

Mol ratio NH ₂ : CHO	ลักษณะทางกายภาพ	%Yield
1:0.25	ผงของแข็งสีขาวขุ่น	81
1:1	ผงของแข็งสีขาวขุ่น	80
1:1.45	ผงของแข็งสีขาวขุ่น	82

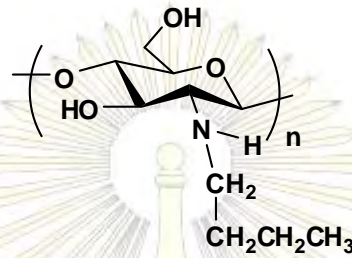
ตารางที่ 3.2 ค่า chemical shift (δ) ของ N-butyl chitosan จากการวิเคราะห์ด้วย proton-NMR

Chemical shift (δ) (ppm)	Assignment	Area integration of each equivalent of butyraldehyde		
		0.25	1	1.45
0.7	-NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ - <u>CH₃</u>	68.3	148.0	179.2
1.2	-NH-CH ₂ -CH ₂ - <u>CH₂</u> -CH ₃	34.0	95.8	104.9
1.5	-NH-CH ₂ - <u>CH₂</u> -CH ₂ -CH ₃	19.5	61	80.4
3.0	H-2 of chitosan	100	100	100

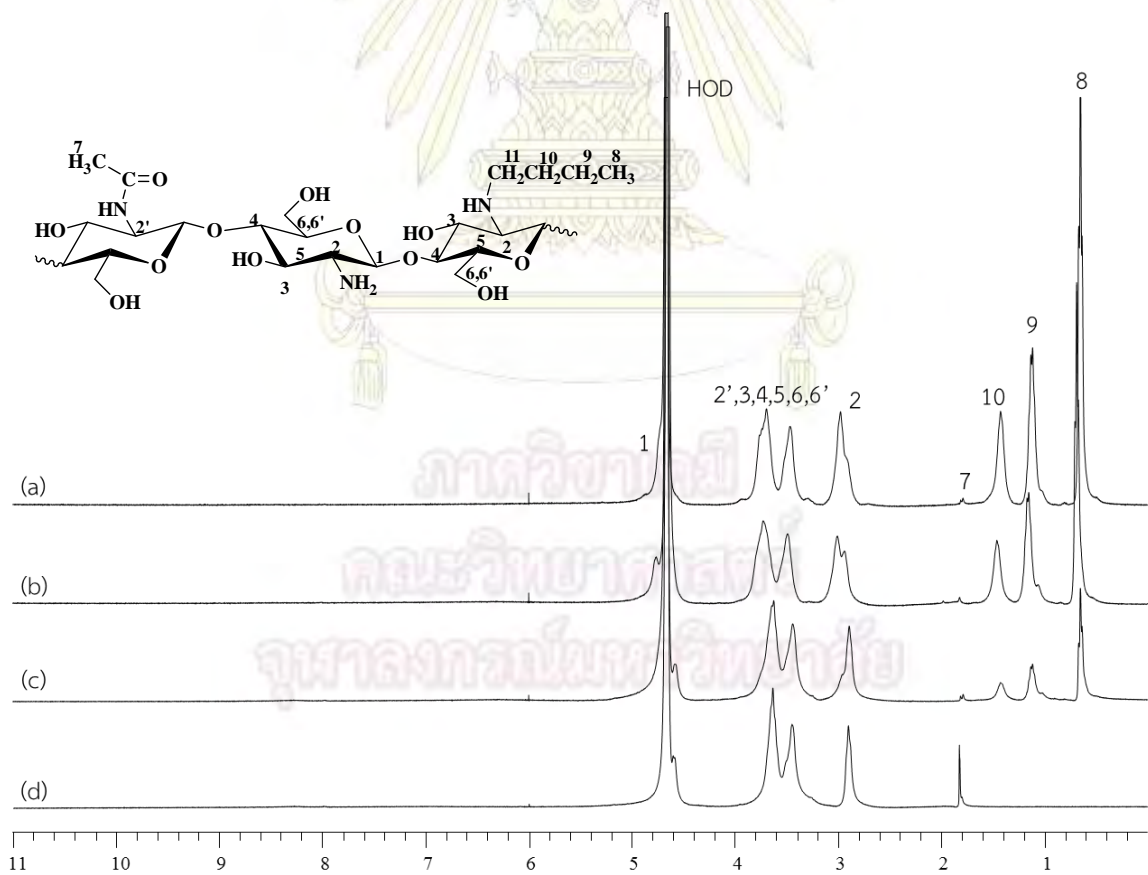
โครงสร้างของไคโตซาน(chitosan) และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน (*N*-butyl chitosan)



รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน (chitosan)



รูปที่ 3.2 โครงสร้างทางเคมีของเอ็น-บิวทิลไคโตซาน (*N*-butyl chitosan)



รูปที่ 3.3 ^1H NMR spectra ของเอ็น-บิวทิลไคโตซานที่มีอัตราส่วนโมลของ $\text{NH}_2:\text{CHO}$ คือ (a) 1:0.25, (b) 1:1, (c) 1:1.45 และ(d) ไคโตซาน (ตัวทำละลาย: $\text{D}_2\text{O}/\text{TFA}$)

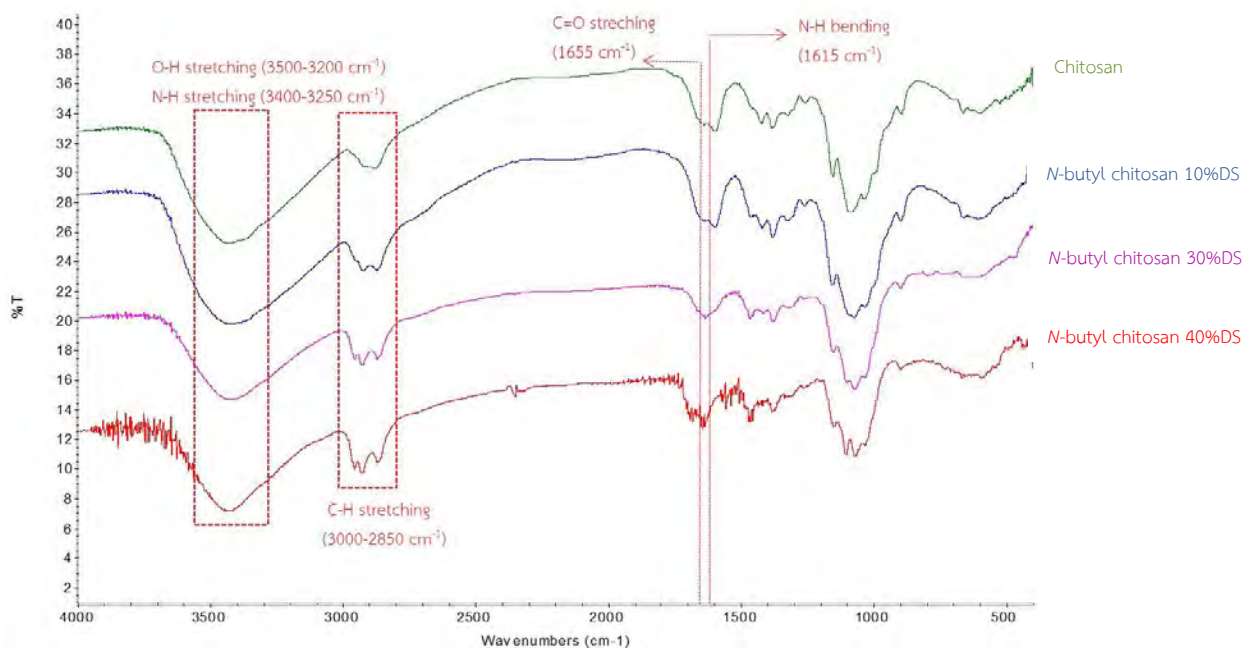
จากผล $^1\text{H-NMR}$ สามารถบอกได้ว่าในสารผลิตภัณฑ์ไม่มีแอลดีไฮด์เหลืออยู่ เนื่องจากไม่เห็นพีกของ H ที่ต่ออยู่กับหมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์ซึ่งจะขึ้นที่ ช่วง $\delta = 9.00\text{-}10.00$ ppm การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่บิวทิล (DS = degrees of substitution) บนไคโตซานที่ทำปฏิกิริยากับบิวทิลรีดิวซ์ไฮดรีดแต่ละ mole equivalent สามารถคำนวณจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ (จากรูปที่ 3.3 และตารางที่ 3.2) โดยอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีกในการคำนวณ เนื่องจาก H ตำแหน่งที่ 11 อยู่ใกล้กับ N จึงทำให้ถูก deshield ทำให้ไม่เห็นพีก พีกจะไปขึ้นที่เดียวกับพีกของ backbone ของไคโตซาน¹⁴ (ช่วง $\delta = 4.80\text{-}2.80$ ppm) ส่วน H ตำแหน่งที่ 9 และ 8 เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนของอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีก ระหว่าง H ตำแหน่งที่ 10:H ตำแหน่งที่ 9:H ตำแหน่งที่ 8 จะต้องมีความเป็น 2:2:3 จากตารางที่ 3.2 พบว่าอัตราส่วนของ อินทิเกรตพื้นที่ใต้พีก ระหว่าง H ตำแหน่งที่ 10:H ตำแหน่งที่ 9:H ตำแหน่งที่ 8 ของ เอ็น-บิวทิลไคโตซานที่มีอัตราส่วนโดยโมลของ $\text{NH}_2\text{:CHO}$ 1:0.25, 1:1 และ 1:1.45 มีอัตราส่วนอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีกมีความเป็น 1:1.74:3.50, 1:1.57:2.43 และ 1:1.3:2.23 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีกของ H ตำแหน่งที่ 9 และ 10 มีค่ามากเกินไปจริง เนื่องจากเป็นพีกของ H ของ reducing form ของบิวทิลรีดิวซ์ไฮดรีด (บิวทานอล) ที่เรากำจัดไม่หมดจากสารผลิตภัณฑ์ จากข้อมูลดังกล่าวจึงใช้พื้นที่ใต้พีกของ H ตำแหน่งที่ 10 ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่บิวทิล แสดงผลดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่ butyl บนสายโซ่ไคโตซาน

Mol ratio of -NH ₂ : CHO	Integration value		%DS
	H-2 of chitosan	H-10 of butyl group	
1:0.25	100	19.5	9.7
1:1	100	61	30.5
1:1.45	100	80.4	40.2
1:1.5	100	80.5	40.3

จากผลการทดลองจะพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโมลของบิวทิลรีดิวซ์ไฮดรีด จะส่งผลให้ DS มีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มโมลของบิวทิลรีดิวซ์ไฮดรีดมากเกินไป 1.45 โมลจะพบว่า %DS มีค่าไม่มากไปกว่า 40% เนื่องจากเมื่อมีการแทนที่ของหมู่บิวทิลเข้าไปในหมู่อะมิโนของไคโตซานมากขึ้นทำให้โครงสร้างของโมเลกุลมีความกะทัดรัดส่งผลให้หมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของไคโตซานได้ลดลง ในงานวิจัยนี้จึงศึกษา %DS ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคเอ็น/บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนตโดยใช้เอ็น-บิวทิลไคโตซานที่มี %DS คือ 10, 30 และ 40% ซึ่งจากวัตถุประสงค์ก่อนหน้านี้นี้จะทำการศึกษา %DS ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคเอ็น/บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนตคือ 10, 30 และ 50%

เมื่อพิจารณากราฟ FT-IR กับโครงสร้างของไคโตซานและเอ็น-บิวทิลไคโตซานจะพบว่าพีกของ N-H stretching อยู่ที่ประมาณ $3400\text{-}3250$ cm^{-1} , O-H stretching ของหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ที่ประมาณ $3500\text{-}3200$ cm^{-1} , C-H stretching ของแอลเคน อยู่ที่ประมาณ $3000\text{-}2850$ cm^{-1} , C=O stretching ของหมู่เอซิดิล อยู่ที่ประมาณ 1655 cm^{-1} และ N-H bending ของ 1°-NH_2 อยู่ที่ประมาณ 1615 ± 15 cm^{-1} จะสังเกตเห็นว่า NH₂ bending ของ 1°-NH_2 มีค่าลดลง เนื่องจากเกิดการแทนที่ของหมู่บิวทิลที่หมู่เอมิโนมากขึ้น



รูปที่ 3.4 แสดงกราฟ FT-IR ของไคโตซาน และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน ที่มี %DS แตกต่างกัน

3.2 การเตรียมอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต

การเตรียมอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต ดัดแปลงจาก A. K. Anal *et al.* (2005)⁴ โดยใช้วิธี ionotropic gelation ในงานนี้ทำการเปรียบเทียบระหว่างอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตและเอ็น-บิวทิลไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต ที่มี DS แตกต่างกันคือ 10, 30 และ 40%

ตารางที่ 3.4 แสดงผล Zeta potential และ pH ของสารละลายในการเตรียมอนุภาคไคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต

สารละลาย	Zeta potential (mV)	pH
Coagulation	25.90	4.38
Post Coagulation	24.03	4.46
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 1	33.04	4.73
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 2	-4.05	4.89
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 3	0.1370	4.92

ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) เป็นค่าที่วัดประจุบนพื้นผิวของอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายหรือวัดประจุของสารละลาย ซึ่งในงานนี้ใช้วัดประจุของสารละลาย จากตารางที่ 3.4 พบว่าค่าศักย์ซีต้าของสารละลาย coagulation (สารละลายไคโตซาน/เอ็น-บิวทิลไคโตซาน + CaCl_2 ก่อนทำการหยดสารละลายกลูโคซามีนในแอลจีเนตลงไป) ลดลงจาก 25.90 mV มาเป็น 24.03 mV จะบ่งบอกถึงว่ามีประจุบวกในสารละลาย coagulation fluid บางส่วนไปเกาะกับแอลจีเนตซึ่งมีประจุลบ รวมตัวเป็นอนุภาค นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าศักย์ซีต้าของน้ำล้างอนุภาค

ครั้งที่ 1 มีค่าสูงกว่า Post Coagulation (สารละลายโคโคซาน/เอ็น-บิวทิลโคโคซาน + CaCl_2 หลังทำการหยุดสารละลายกลูโคซามีนในแอลจีเนตลงไปและทำการกรองอนุภาคออกจากสารละลายแล้ว) แสดงว่าขณะล้างอนุภาคมีกลูโคซามีนถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาค โดยค่าศักย์ซีต้า ในตารางที่ 3.5-3.7 ใช้หลักการวิเคราะห์แบบเดียวกัน

ตารางที่ 3.5 แสดงผล Zeta potential และ pH ของสารละลายในการเตรียมอนุภาค เอ็น-บิวทิลโคโคซาน 10%DS-แคลเซียมแอลจีเนต

สารละลาย	Zeta potential (mV)	pH
Coagulation	29.75	4.48
Post Coagulation	43.87	4.58
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 1	17.32	4.85
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 2	8.985	4.92
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 3	1.569	5.20

ตารางที่ 3.6 แสดงผล Zeta potential และ pH ของสารละลายในการเตรียมอนุภาค เอ็น-บิวทิลโคโคซาน 30%DS-แคลเซียมแอลจีเนต

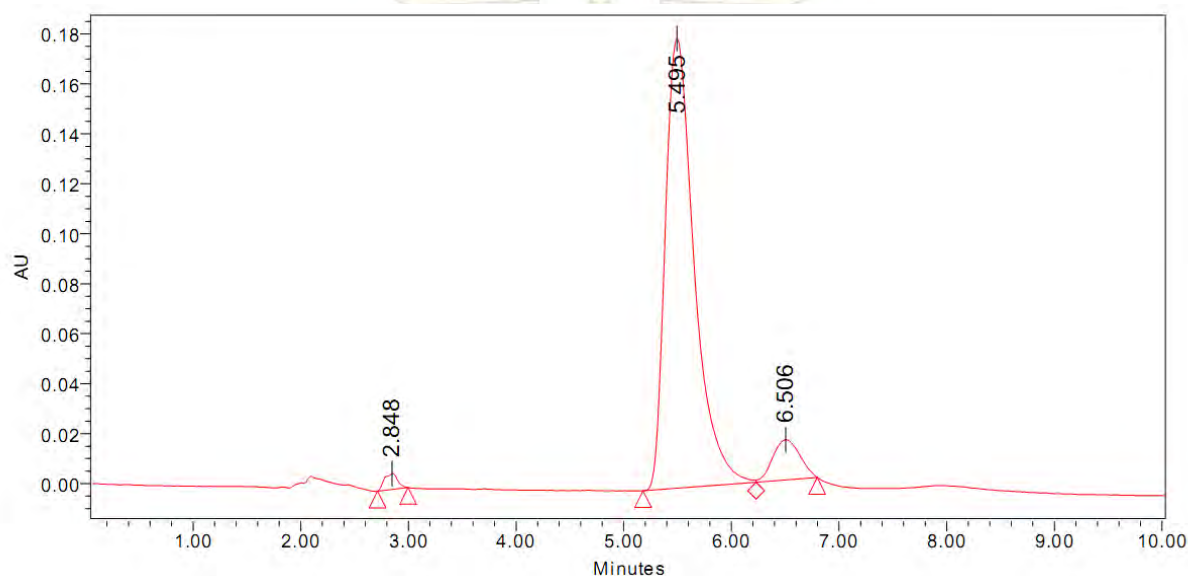
สารละลาย	Zeta potential (mV)	pH
Coagulation	18.18	4.54
Post Coagulation	18.80	4.52
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 1	22.09	4.67
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 2	3.39	5.04
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 3	0.67	5.04

ตารางที่ 3.7 แสดงผล Zeta potential และ pH ของสารละลายในการเตรียมอนุภาค เอ็น-บิวทิลโคโคซาน 40%DS-แคลเซียมแอลจีเนต

สารละลาย	Zeta potential (mV)	pH
Coagulation	15.10	4.33
Post Coagulation	16.65	4.33
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 1	17.92	4.54
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 2	11.03	4.74
น้ำล้างอนุภาคครั้งที่ 3	0.08	5.01

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนในอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และ เอ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต

เมื่อนำกลูโคซามีนไปทำปฏิกิริยากับ phenylisothiocyanate (PITC) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น phenylthiocarbonyl-glucosamine โดยมีค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่สูงที่สุดอยู่ที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 245 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนในอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต ด้วยเทคนิค HPLC ดังแสดงในโครมาโทแกรมของสาร phenylthiocarbonyl-glucosamine รูปที่ 3.5 มี retention time คือ 5.495 และ 6.506 นาที ด้วยเหตุที่สัญญาณของอนุพันธ์ที่ได้นี้ปรากฏขึ้นที่สองตำแหน่ง เพราะ glucosamine ที่ใช้น้อยอยู่ในรูปของ anomeric คือมีโครงสร้างแบบ alpha และ beta



รูปที่ 3.5 แสดง HPLC โครมาโทแกรมของ phenylthiocarbonyl-glucosamine ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/mL ที่ flow rate 1.5 mL/min

จากนั้นสร้างกราฟเพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของกลูโคซามีน เพื่อหาปริมาณกลูโคซามีนในอนุภาค ได้สมการเส้นตรง $y = 58.13 \times 10^6 X + 0.221$ ค่า $R^2 = 0.993$ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าความเข้มข้นของกลูโคซามีนมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับพื้นที่ใต้พีก

ตารางที่ 3.8 แสดงประสิทธิภาพในการกักเก็บยา (Entrapment efficiency:%EE) และ ปริมาณกลูโคซามีนต่อ น้ำหนักอนุภาค (Loading capacity:%LC) ของอนุภาคที่เตรียมได้

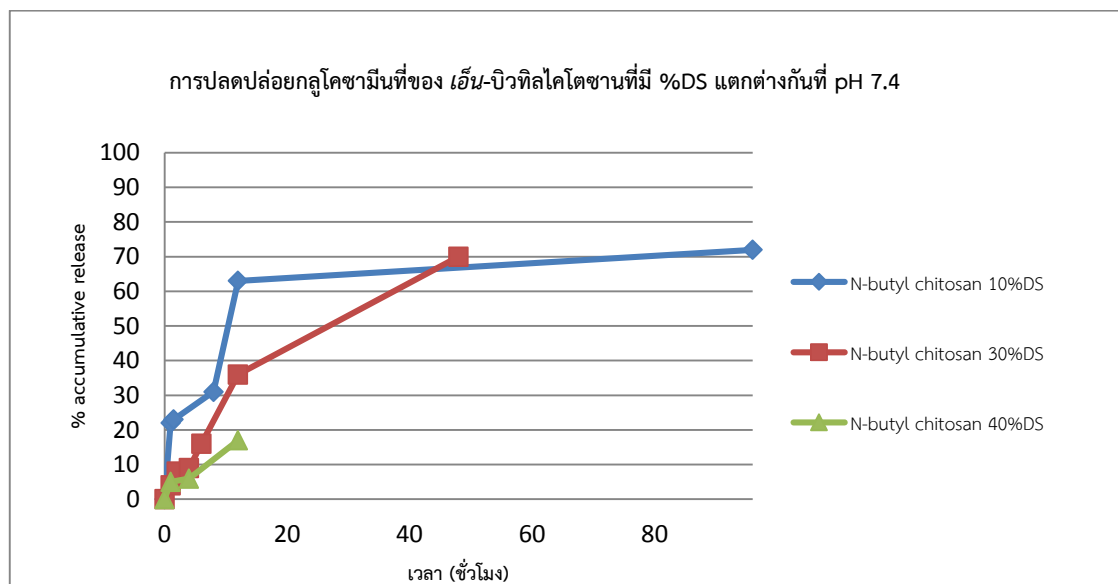
Sample	ประสิทธิภาพในการกักเก็บยา (%EE)	ปริมาณกลูโคซามีนต่อน้ำหนักอนุภาค (%LC)
Chitosan	0.70	0.53
N-butyl chitosan 10%DS	0.47	0.35
N-butyl chitosan 30%DS	0.82	0.13
N-butyl chitosan 40%DS	0.57	0.43

จากตารางที่ 3.8 จะพบว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บยา (%EE = encapsulation efficiency) จากการทดลองมีค่าที่ต่ำ เมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ Anal, A. K. *et al.* (2005)⁴ ซึ่งได้เตรียมปิดโคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนตกักเก็บแอมพิซิลินได้ค่า %EE เท่ากับ 75.7 และจากงานวิจัยของวิทยา ภมรรวานนท์ (2012)⁸ ที่เตรียมอนุภาคระดับนาโนเมตรของโคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนต และอนุพันธ์ของโคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนตได้ประสิทธิภาพในการกักเก็บยาอยู่ในช่วง 5.2-9.6% ปัจจัยที่ส่งผลให้งานนี้มีประสิทธิภาพการกักเก็บยาดำ เนื่องจากกลูโคซามีนสามารถละลายน้ำได้ดีจึงเกิดการปลดปล่อยกลูโคซามีนอย่างรวดเร็วในช่วงหลังจากที่เตรียมอนุภาคเสร็จแล้ว และในกระบวนการล้างอนุภาคด้วยน้ำดีไอออนซ์จากผลคักซ์ต้าของน้ำล้างครั้งที่ 1 จะพบว่ามีค่าเป็นบวกมากกว่า post coagulation รวมถึงขั้นตอนการทำให้อนุภาคแห้งนั้นทำด้วยการนำไปทิ้งให้แห้งเองที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งในช่วงเวลาระหว่างการทิ้งให้แห้งนั้นจะยังคงมีน้ำอยู่จำนวนหนึ่งที่จะทำให้กลูโคซามีนถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ตลอดเวลา นอกจากนี้ การใช้วิธีทิ้งให้แห้งนั้นจะยังคงมีน้ำหลงเหลืออยู่ในอนุภาค ทำให้น้ำหนักของอนุภาคที่ต้องใช้ในการคำนวณหาประสิทธิภาพการกักเก็บยามีค่าสูงเกินจริงส่งผลให้เมื่อคำนวณค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บยาของอนุภาคจะค่าลดลง ปัญหาดังกล่าวจะต้องได้รับการแก้ไขในขั้นตอนการทำให้อนุภาคแห้ง โดยต้องทำให้อนุภาคแห้งอย่างรวดเร็ว โดยใช้การอบแบบสุญญากาศ รวมทั้งในการล้างอนุภาคจะต้องล้างเพียง 1 ครั้งเพื่อลดการสูญเสียกลูโคซามีนไปในขั้นตอนการล้าง

3.4 การปลดปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนต และ เอ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนต

ทำการศึกษาการปลดปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนต และเอ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจิเนตที่ pH 1.2 และ pH 7.4 พบว่าที่ pH 1.2 ไม่มีการปลดปล่อยกลูโคซามีนออกมาจากอนุภาคที่เตรียมได้ ส่วนการศึกษาที่ pH 7.4 นั้นไม่สามารถนำข้อมูลจากโครมาโทแกรมมาใช้ได้เนื่องจาก Baseline ของโครมาโทแกรมไม่คงที่ ทำให้ผลการทดลองที่ได้บางชุดข้อมูลไม่สามารถนำมาใช้ในการรายงานผลการทดลองได้ จากกราฟแสดงการปลดปล่อยกลูโคซามีนของเอ็น-บิวทิลโคโตซานที่มี %DS แตกต่างกันที่ pH 7.4 เมื่อพิจารณาที่ 10 ชั่วโมงแรกพบว่าเอ็น-บิวทิลโคโตซานมี %DS ที่สูงขึ้นอัตราการปลดปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคนั้นจะลดลง เนื่องจากเมื่อ

เอ็น-บิวทิลโคโตซานมี %DS เพิ่มขึ้นทำให้มีสมบัติความไม่ชอบน้ำมากขึ้นจึงส่งผลให้สามารถลดอัตราการปลดปล่อยกลูโคซามีนได้



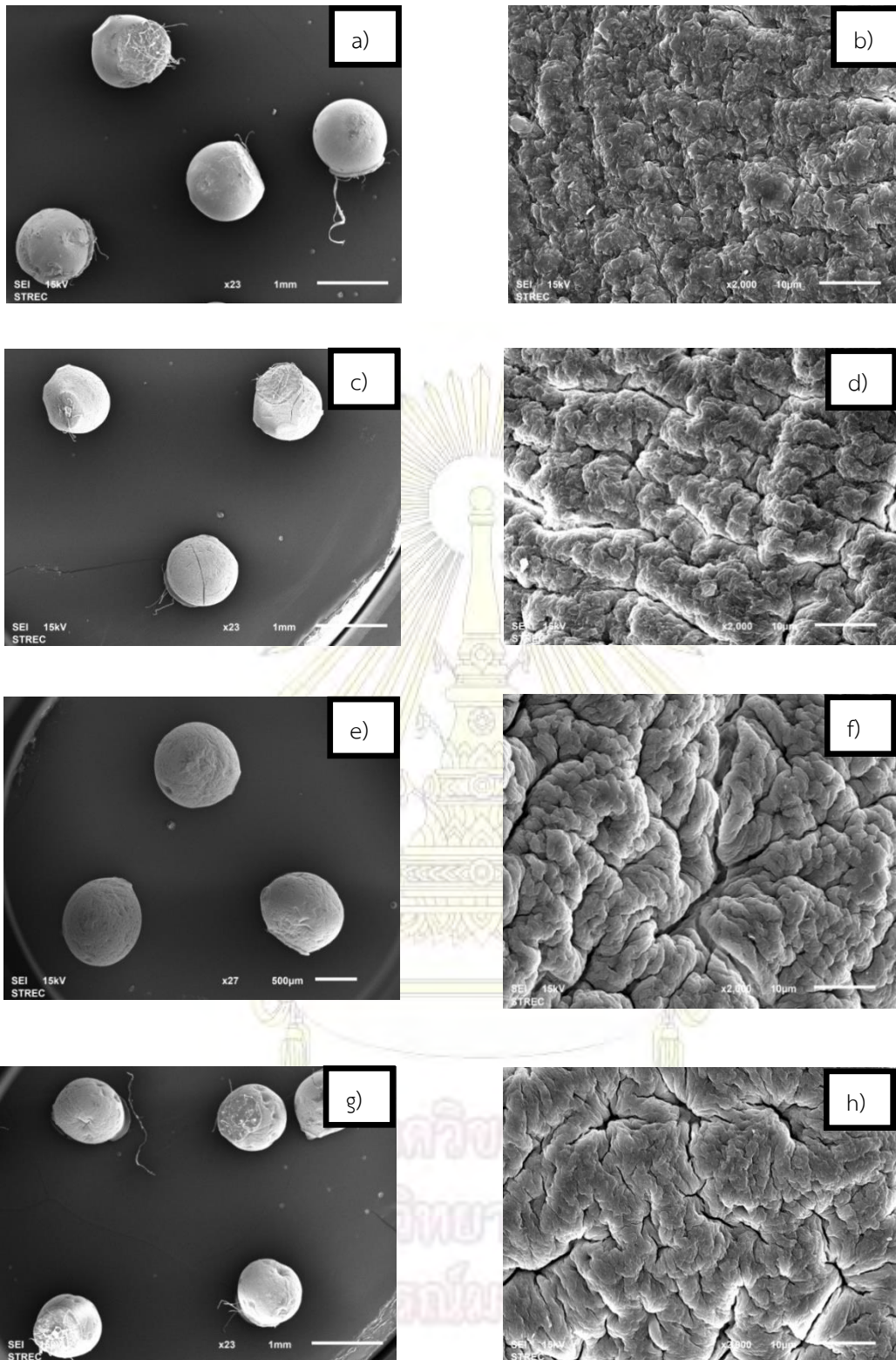
รูปที่ 3.6 แสดงการปลดปล่อยกลูโคซามีนของเอ็น-บิวทิลโคโตซานที่มี %DS ต่างกันที่ pH 7.4

3.5 การศึกษาขนาด สัณฐานวิทยาและการบวมตัวของอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต

ศึกษาสัณฐานวิทยา พื้นผิวและขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค SEM แสดงดังรูปที่ 3.8 จะพบว่าอนุภาคที่เตรียมได้มีรูปร่างเป็นทรงกลม โดยพื้นผิวมีลักษณะขรุขระ และไม่สังเกตเห็นคราบผงเกาะอยู่ที่พื้นผิว ซึ่งเส้นใยที่เห็นเกาะอยู่บนอนุภาคคือเส้นใยจากกระดาษที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการทำให้อนุภาคแห้งโดยได้มีการวางทิ้งไว้ให้แห้งบนกระดาษ จากตารางที่ 3.9 จะพบว่าสามารถควบคุมขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้โดยขนาดเฉลี่ยของอนุภาคคือ 1,000 ไมโครเมตร (1.00 ± 0.05 มิลลิเมตร) ซึ่งสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการเตรียมอนุภาคให้มีขนาด 1.0-2.0 มิลลิเมตร

ตารางที่ 3.9 แสดงขนาดของอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเอ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตที่เตรียมได้

ตัวอย่าง	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ไมโครเมตร)
chitosan	1071.70 ± 30.21
N-butyl chitosan 10%DS	970.93 ± 41.43
N-butyl chitosan 30%DS	1003.30 ± 35.58
N-butyl chitosan 40%DS	974.41 ± 31.68



รูปที่ 3.7 แสดงลักษณะและพื้นที่ผิวของอนุภาคด้วยเทคนิคSEM โดยภาพลักษณะรูปร่าง a) chitosan, c) *N*-butyl chitosan 10%DS, e) *N*-butyl chitosan 30%DS และ g) *N*-butyl chitosan 40%DS ภาพลักษณะพื้นที่ผิว b) chitosan, d) *N*-butyl chitosan 10%DS, f) *N*-butyl chitosan 30%DS และ h) *N*-butyl chitosan 40%DS

การศึกษาการบวมตัว (Swelling) ของอนุภาคนั้นทำการศึกษาที่ pH 1.2 และ pH 7.4 โดยที่ pH 1.2 ทำการทดลองเป็นเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อจำลองภาวะและเวลาที่อนุภาคที่อยู่ในกระเพาะอาหาร ส่วน pH 7.4 ทำการทดลองเป็นเวลา 30 นาที จำลองภาวะดูดซึมน้ำที่ลำไส้เล็ก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.10 ที่ pH 7.4 จะมีค่า swelling index สูง เนื่องจากแอลจินเตสามารถละลายหรือบวมตัวได้ในภาวะที่เป็นเบส

ตารางที่ 3.10 แสดง Swelling index ของอนุภาคที่เตรียมได้ที่ pH 1.2 และ pH 7.4

Sample	Swelling index	
	pH 1.2	pH 7.4
chitosan	0.465	6.06
N-butyl chitosan 10%DS	0.566	12.6
N-butyl chitosan 30%DS	0.648	11.3
N-butyl chitosan 40%DS	0.702	2.34

จากค่า Swelling index พบว่าที่ pH 1.2 อนุภาคไม่มีการบวม เนื่องจากแอลจินเตไม่บวมหรือแตกออกในสภาวะที่เป็นกรด เมื่อพิจารณาการบวมของอนุภาคในสภาวะที่มี pH 7.4 พบว่าอนุภาคมีการบวมมากภายในเวลาเพียง 30 นาที โดยค่า swelling index จะมีค่าลดลงเมื่อ %DS ของเอ็น-บิวทิลโคโตซานมีค่าเพิ่มมากขึ้นซึ่งสามารถอธิบายสมบัติในการปลดปล่อยยาได้โดย แสดงว่าเอ็น-บิวทิลโคโตซานสามารถลดการบวมตัวของอนุภาคได้ ส่งผลให้สามารถปลดปล่อยกลูโคซามีนจากอนุภาคช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการปลดปล่อยกลูโคซามีนของเอ็น-บิวทิลโคโตซานที่มี %DS ต่างกัน ที่ pH 7.4

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

4.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์เฮ็น-บิวทิลโคโตซาน ที่มีระดับการแทนที่ด้วยหมู่บิวทิลเป็น 10, 30 และ 40% และสามารถเตรียมอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต และเฮ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตด้วยกระบวนการ ionotropic gelation โดยอาศัยหลักการเกิดเจลหรืออนุภาคขนาดเล็กของพอลิเมอร์ที่มีประจุตรงกันข้ามคือ โคโตซานหรือเฮ็น-บิวทิลโคโตซานที่มีประจุบวก กับแอลจีเนตที่มีประจุลบ โดยอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดเฉลี่ย 1.00 ± 0.05 มิลลิเมตร

การเตรียมอนุภาคนั้นใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ประจุบวก/แคลเซียมคลอไรด์/แอลจีเนตเท่ากับ 0.8:3.0:2.0 โดยขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้ขึ้นกับขนาดของหัวเข็มที่เลือกใช้เพื่อหยดสารละลายในกระบวนการขึ้นอนุภาค ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้หัวเข็มเบอร์ 18 แต่จากการหาปริมาณกลูโคซามีนที่กักเก็บในอนุภาคนั้น พบว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บกลูโคซามีนมีค่าต่ำ โดยค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บยา (Entrapment Efficiency) ที่ดีที่สุดของงานวิจัยนี้คือ 0.82% ซึ่งเป็นค่าของอนุภาคเฮ็น/บิวทิลโคโตซาน (30% butyl group substitution) –แคลเซียมแอลจีเนตเมื่อเทียบกับค่าประสิทธิภาพในการกักเก็บกลูโคซามีนของอนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตรวมทั้งความสามารถในการกักเก็บยาของอนุภาคต่อน้ำหนักของอนุภาค (loading capacity) ในงานวิจัยนี้มีค่าต่ำ โดยที่อนุภาคโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนตมีความสามารถในการกักเก็บยาเท่ากับ 0.53% ซึ่งดีกว่าอนุภาคของเฮ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต นอกจากนี้เมื่อศึกษาการปลดปล่อยยาของอนุภาค พบว่าที่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.2 ไม่มีการปลดปล่อยกลูโคซามีนออกมาจากอนุภาคที่เตรียมได้ แต่เมื่อศึกษาที่ pH 7.4 เฮ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต ที่มี % DS ที่สูงขึ้นนั้นกลับมีอัตราการปลดปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคนั้นจะลดลง เนื่องจากเมื่อ เฮ็น-บิวทิลโคโตซานมี %DS เพิ่มขึ้นทำให้สายโซ่พอลิเมอร์มีสมบัติความไม่ชอบน้ำมากขึ้น จึงส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยกลูโคซามีนน้อยลง อีกทั้งยังศึกษาขนาดของอนุภาคและสัณฐานวิทยาของอนุภาคด้วยเทคนิค SEM ซึ่งผลเป็นอย่างไรที่กล่าวไว้ข้างต้นคือ เป็นอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเฉลี่ย 1.0 มิลลิเมตร พื้นผิวของอนุภาคมีลักษณะขรุขระและมีร่องหลุม รวมทั้งศึกษาการบวมตัวของอนุภาค ที่สภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหาร pH 1.2 และสภาวะลำไส้เล็ก pH 7.4 พบว่าที่ pH 7.4 พบว่าค่าดัชนีการบวมตัวมีค่าลดลงเมื่อเฮ็น-บิวทิลโคโตซานมีระดับการแทนที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งพบว่าที่ pH 7.4 อัตราการปลดปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคนั้นจะลดลง เมื่อเฮ็น-บิวทิลโคโตซาน-แคลเซียมแอลจีเนต ที่มีระดับการแทนที่เพิ่มขึ้น

4.2 ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้จากผลการทดลองพบจุดบกพร่องหลายส่วนแต่สามารถแก้ไขปรับปรุงและดำเนินการขณะทำการทดลองได้ คือ สาเหตุที่ทำให้งานวิจัยนี้มีค่าประสิทธิภาพการกักเก็บยาต่ำ อาจเกิดจากกระบวนการล้างอนุภาคหลังผลิตอนุภาคขึ้น และขั้นตอนการทำให้อนุภาคแห้งโดยการทิ้งอนุภาคให้แห้งเองที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงสามารถแก้ไขได้ด้วยการล้างอนุภาคด้วยน้ำดีไอออไนซ์เพียง 1 รอบโดยใช้เวลาน้อยที่สุดหรือไม่ต้องล้างอนุภาคเพื่อลดการสูญเสียยาไปในขั้นตอนการล้าง เพราะกลูโคซามีนสามารถละลายน้ำได้ดีมาก และถ้าจะทำอนุภาคให้แห้งคือให้ทำการอบแห้งด้วยระบบสุญญากาศทันที เพราะถ้าทิ้งอนุภาคไว้ที่อุณหภูมิห้องอนุภาคจะยังคงเปียกและมีน้ำอยู่ทำให้ยาที่บรรจุอยู่ในอนุภาคถูกปลดปล่อยออกมาได้ขณะทิ้งไว้ให้แห้ง ถ้าอนุภาคไม่แห้งดีจะยังคงมีน้ำเหลืออยู่ภายในอนุภาคทำให้น้ำหนักอนุภาคที่ต้องใช้ในการคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการกักเก็บยาและปริมาณยาต่อน้ำหนักอนุภาคนั้นมีค่าน้อย



เอกสารอ้างอิง

1. Bijlsma, J. W.; Berenbaum F.; Lafeber F. P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. **2011**, *377*, 2115-26.
2. Praphairaksit, N.; Ngamsiri, P. Preparation and study of the controlled release of amoxicillin from alginate-chitosan beads. *SWU Sci. J.* **2007**, *23*, 39-51.
3. Huanbutta, K.; Sangnim, T. Applications of polymers from marine resource in pharmaceutical aspect. *Burapha Sci. J.* **2013**, *18*, 263-273.
4. Anal, A. K.; Stevens, W. F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *Int. J. Pharm.* **2005**, *290*, 45-54.
5. Gazori, T.; Khoshayand, M.; Azizi, N.; Yazdizade, P.; Nomari, A.; Harririan, I. Evaluation of alginate/chitosan nanoparticle as antisense delivery vector: Formation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77*, 599-606.
6. Parveen, S.; Mitra, M.; Krishnakumar, S.; Sahoo, SK. Enhanced antiproliferative activity of carboplatin-loaded chitosan-alginate nanoparticles in a retinoblastoma cell line. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3102-3131.
7. Peng-im, P., Preparation of glucosamine-Loaded alginate-chitosan nanoparticles, Master's Thesis, Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2010.
8. Pamornwaranon, W., Preparation and glucosamine release studies of glucosamine-loaded calcium alginate-derivatized chitosan particles, Master's Thesis, Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2013.
9. Jiang, T.; James, R.; Kumbar, S. G.; Laurencin, C. T. Chitosan as a biomaterial: structure, properties, and applications in tissue engineering and drug delivery. In *Natural and synthetic biomedical polymers*; Elsevier: Burlington, 2014; 91-113.
10. Bhattarai, R. S.; Dhandapani, N. V.; Shrestha A. Drug delivery using alginate and chitosan beads: An Overview. *CYS*. **2011**, *2*, 192-196.
11. Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1-21.
12. Tangpasuthadol, V.; Lertsutthiwong, P. (2009). *Preparation of biopolymeric nanoparticles containing glucosamine for treatment of osteoarthritis*. Metallurgy and Materials Science Research Institute (MMRI) and Faculty of Science Chulalongkorn University.

13. Tekko, I. A.; Bonner, M. C.; Williams, A. C. An optimized reverse-phase high performance liquid chromatographic method for evaluating percutaneous absorption of glucosamine hydrochloride. *J. Pharmaceut. Biomed.* **1993**, *41*, 385-392.
14. Desbrieres, J.; Martinez, C.; Rinaudo, M.; Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behavior. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *19*, 21-28.





ภาคผนวก

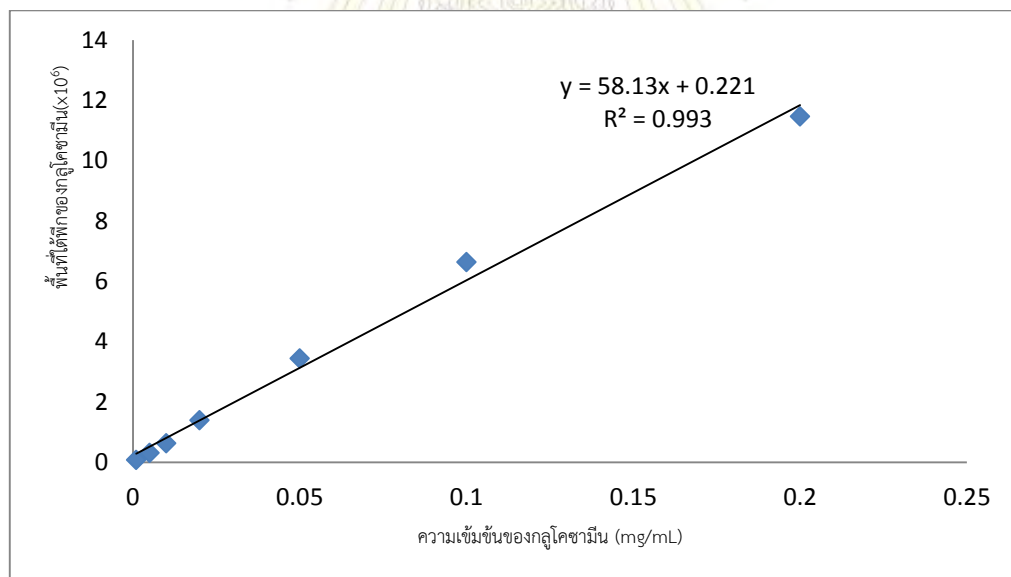
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

Calibration Curve

ตารางที่ 1ก แสดงพื้นที่ใต้ของกลูโคซามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกลูโคซามีน (mg/mL)	พื้นที่ใต้พีคของกลูโคซามีน
0.001	77132
0.005	315067
0.01	634495
0.02	1392723
0.05	3447224
0.1	6645903
0.2	1147589



รูปที่ 1ก Standard calibration curve ของกลูโคซามีน

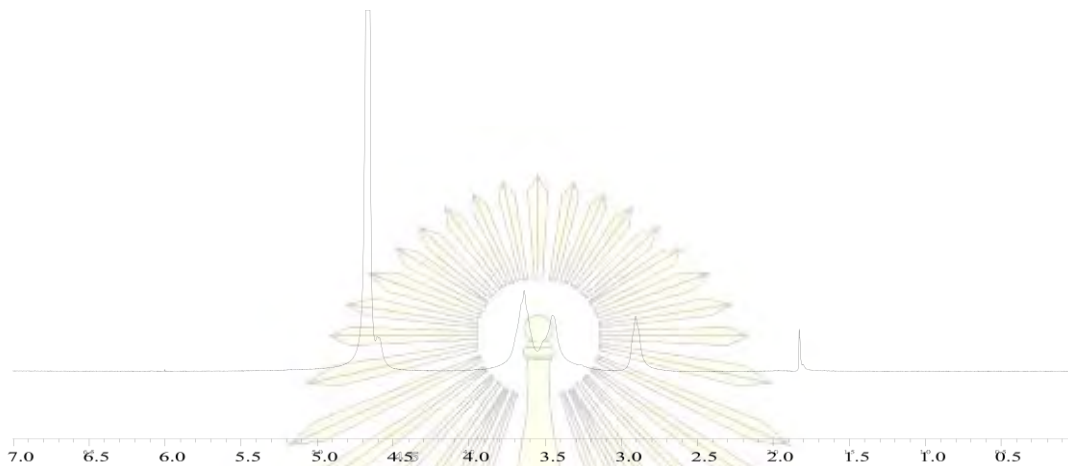
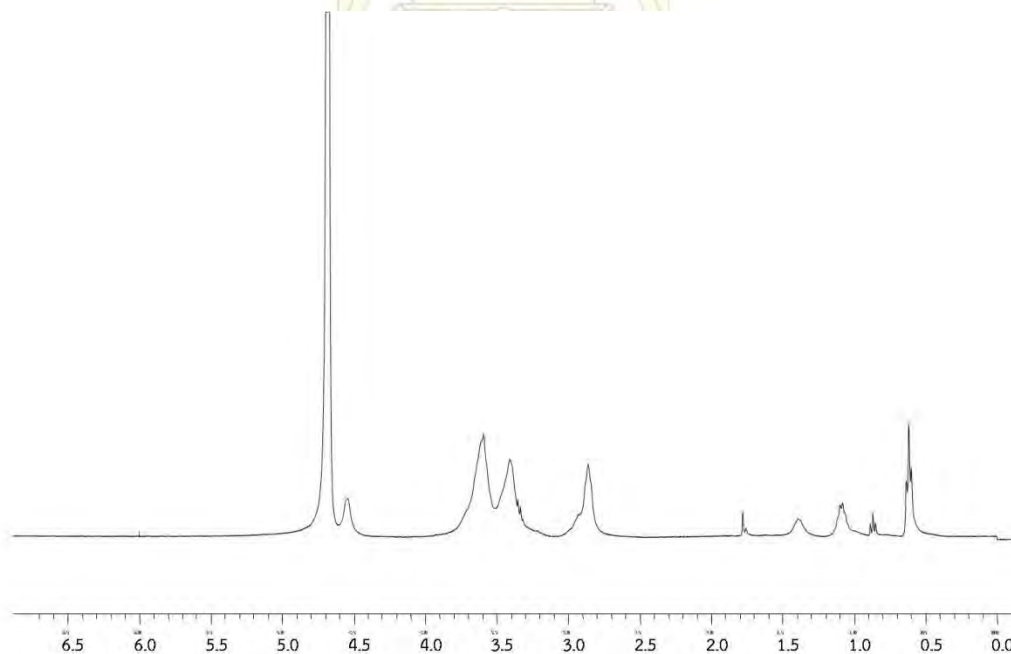
$$\text{ปริมาณกลูโคซามีน (mg)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีค} - 0.221}{58.13 \times 10^6} \times \text{ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (mL)}$$

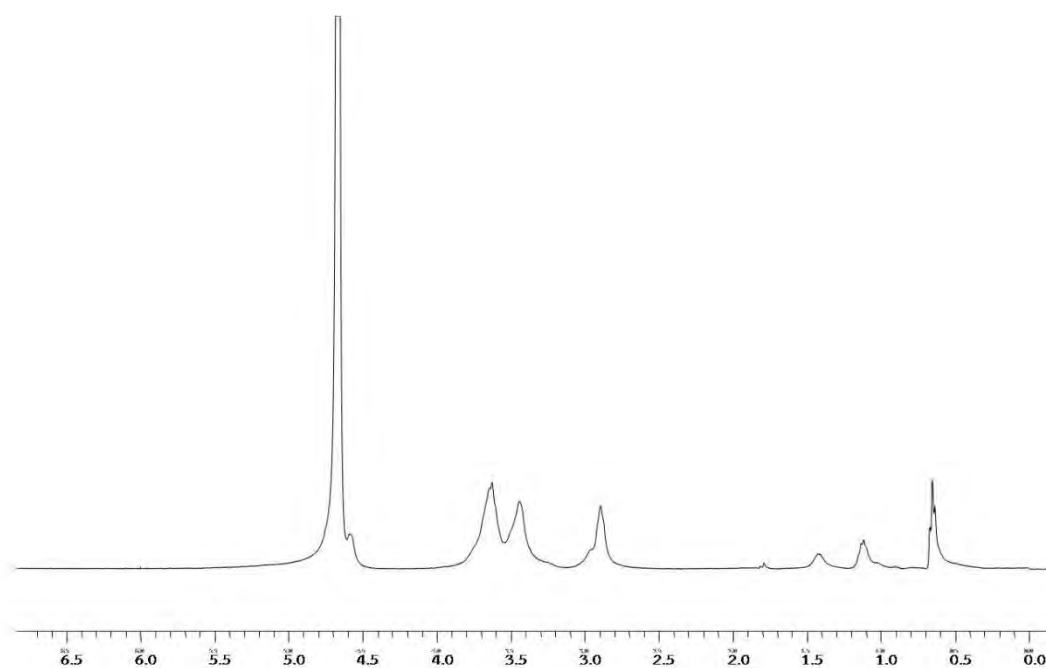
ตารางที่ 2ก แสดงพื้นที่ใต้พีคของอนุภาคที่เตรียมได้

อนุภาค	พื้นที่ใต้พีคของกลูโคซามีน
Chitosan	654478
N-butyl chitosan 10%DS	480118
N-butyl chitosan 30%DS	567596
N-butyl chitosan 40%DS	550538

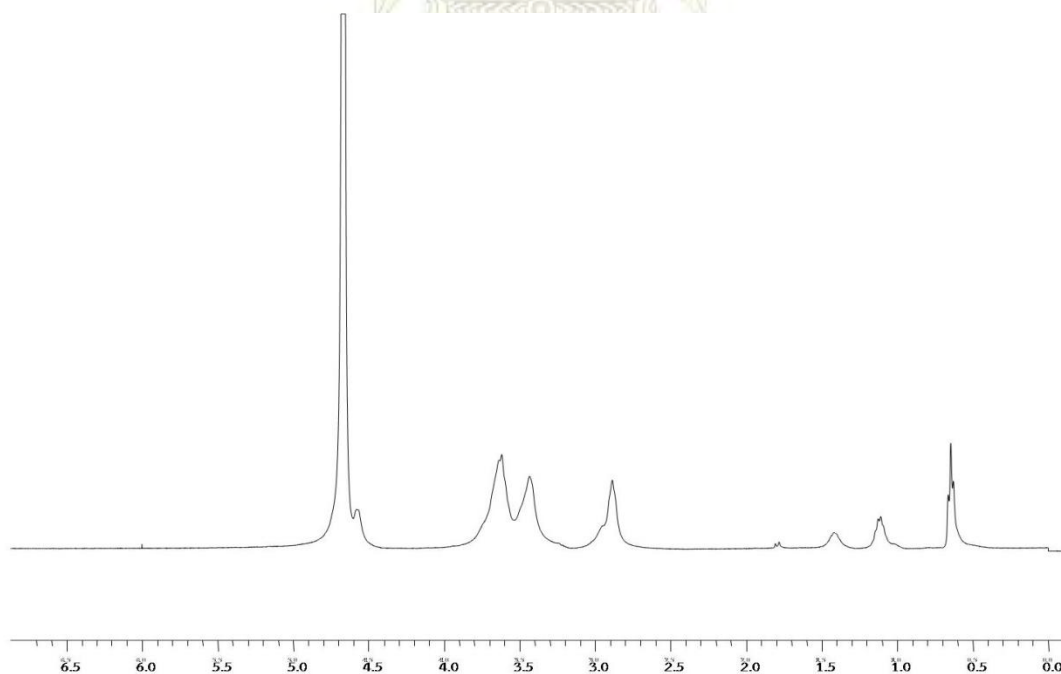


ภาคผนวก ข

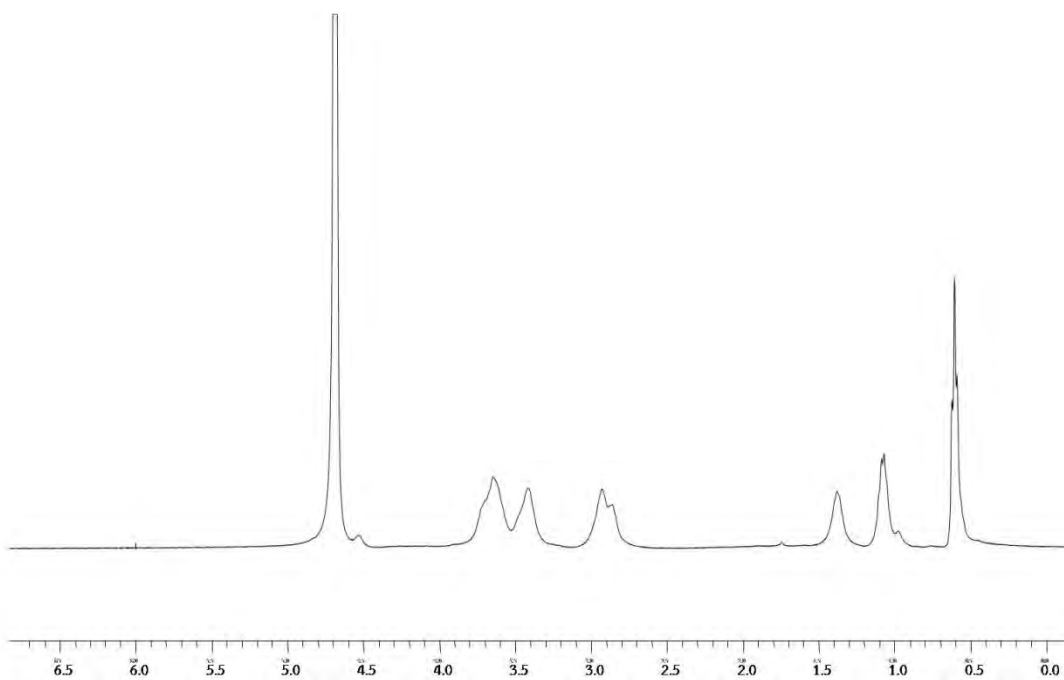
 $^1\text{H-NMR}$ รูปที่ 1ข แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของโคโคซานที่ทำการตกตะกอนให้บริสุทธิ์รูปที่ 2ข แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของเอ็น-บิวทิลโคโคซานที่มีอัตราส่วน โคโคซาน: บิวทิลลรัลดีไฮด์ เท่ากับ 1:0.25 วันที่ทำการ
สังเคราะห์ 04/12/2557



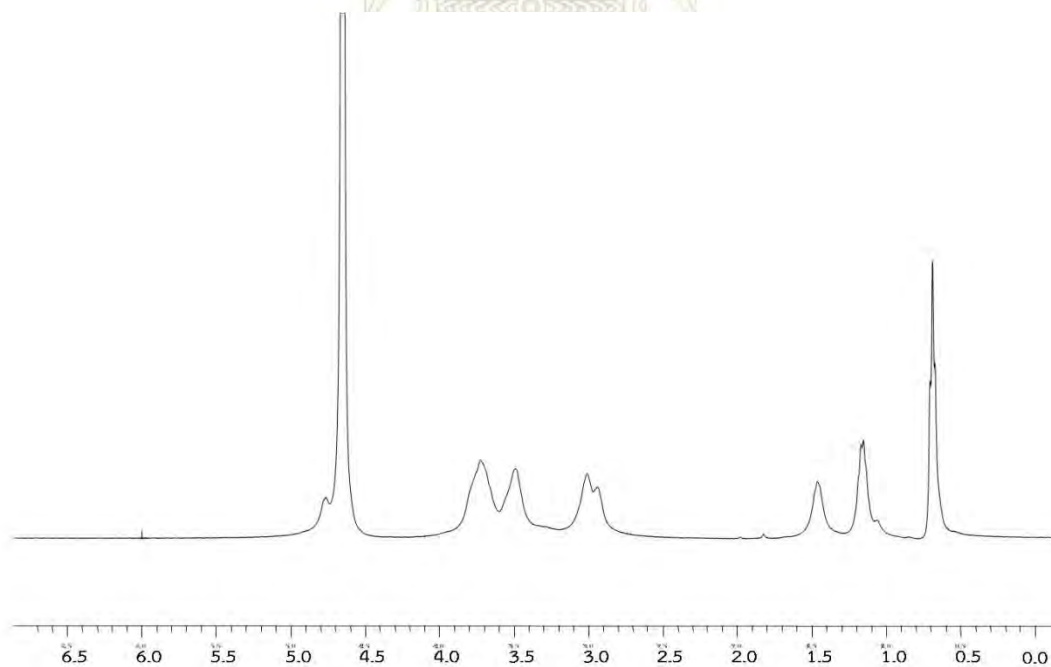
รูปที่ 3 แสดง¹H-NMR ของเอทิล-บิวทิลโคโตะซาน ที่มีอัตราส่วน โคโตะซาน: บิวทิลรลดีไฮด์ เท่ากับ 1:0.25 วันที่ทำการ
สังเคราะห์ 15/01/2558



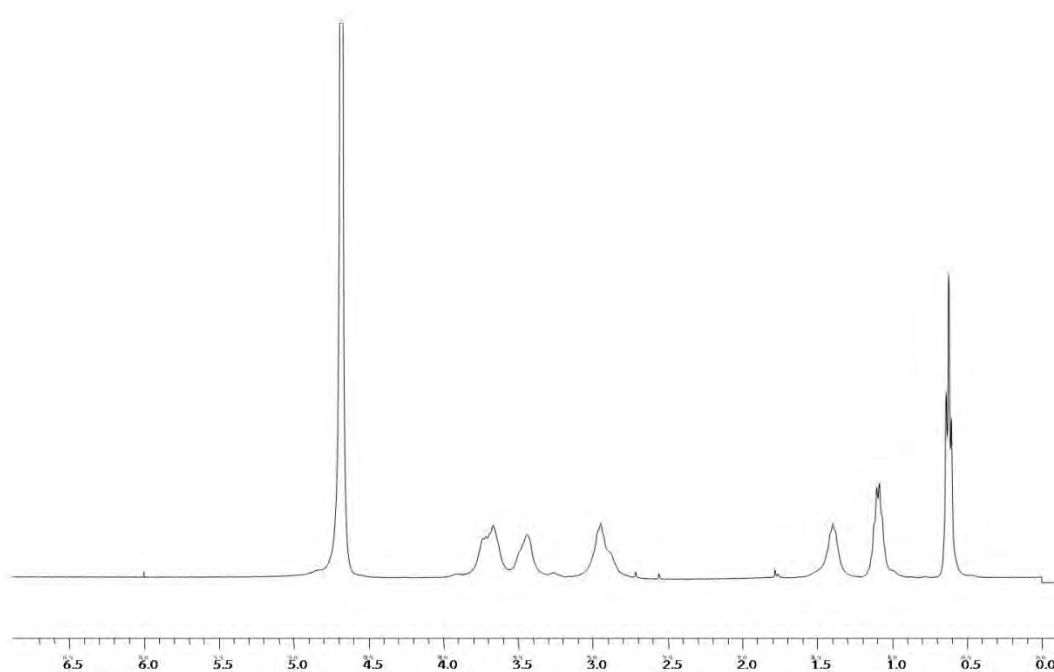
รูปที่ 4 แสดง¹H-NMR ของเอทิล-บิวทิลโคโตะซาน ที่มีอัตราส่วน โคโตะซาน: บิวทิลรลดีไฮด์ เท่ากับ 1:0.25 วันที่ทำการ
สังเคราะห์ 12/02/2558



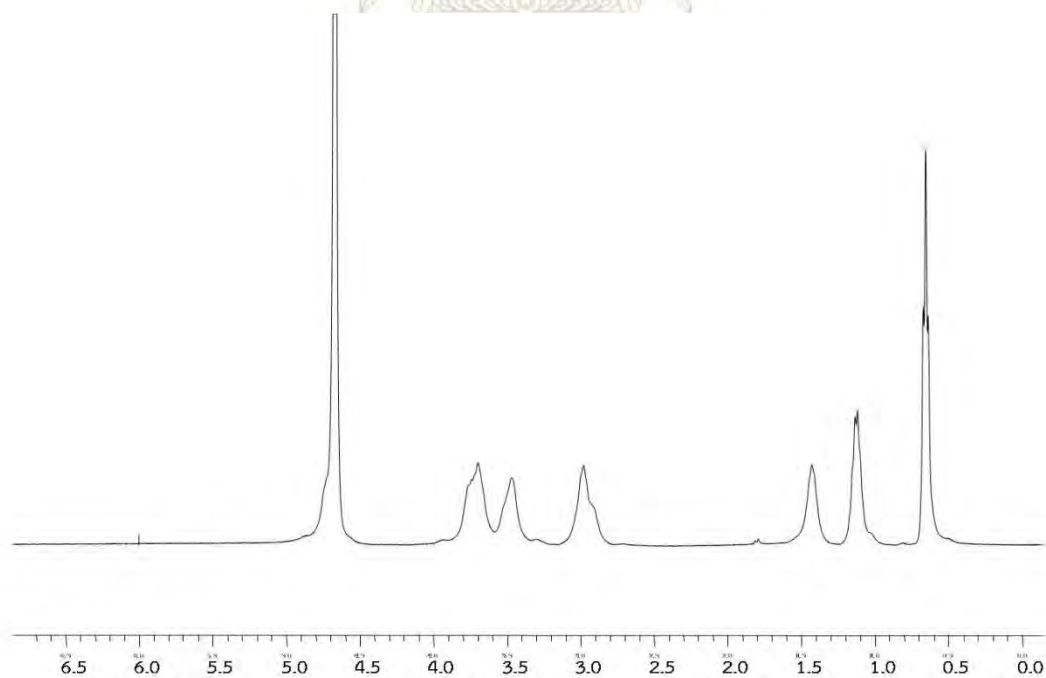
รูปที่ 5x แสดง¹H-NMR ของเอthin-บิวทิลโคโตซาน) ที่มีอัตราส่วน โคโตซาน: บิวทิลรลดีไฮด์ เท่ากับ 1:1 วันที่ทำการ
สังเคราะห์ 26/02/2558



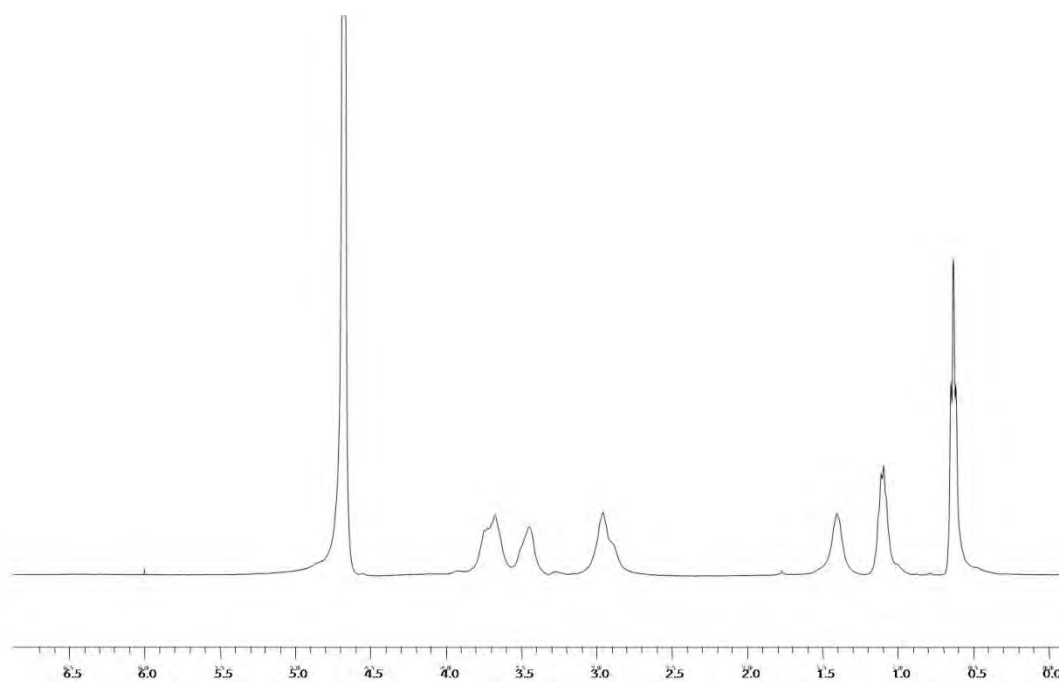
รูปที่ 6x แสดง¹H-NMR ของเอthin-บิวทิลโคโตซาน) ที่มีอัตราส่วน โคโตซาน: บิวทิลรลดีไฮด์ เท่ากับ 1:1วันที่ทำการ
สังเคราะห์ 09/03/2558



รูปที่ 7x แสดง¹H-NMR ของเอ็น-บิวทิลไคโตซาน ที่มีอัตราส่วน ไคโตซาน: บิวทิลรลตีไฮด์ เท่ากับ 1:1.45 วันที่ทำการ
สังเคราะห์ 09/02/2557



รูปที่ 8x แสดง¹H-NMR ของเอ็น-บิวทิลไคโตซาน ที่มีอัตราส่วน ไคโตซาน: บิวทิลรลตีไฮด์ เท่ากับ 1:1.45 วันที่ทำการ
สังเคราะห์ 12/02/2557



รูปที่ 9ข แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของเอ็น-บิวทิลไคโตซาน ที่มีอัตราส่วน ไคโตซาน: บิวทิลลัคไตด์ เท่ากับ 1:1.45 วันที่ทำการ
สังเคราะห์ 26/12/2557

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวธาราวดี ธรรมนาถ เกิดเมื่อวันที่ 10 เดือน เมษายน พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดสมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนก วิทย์-คณิต จากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศ เตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ จังหวัดสมุทรปราการ เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาระดับปริญญาตรี 58/88 หมู่ 5 หมู่บ้านกรุงสยามวิลล่า ถนนเทพารักษ์ ตำบลบางพลีใหญ่ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540

นางสาวปิยพัชร จันทร์ชูชื่น เกิดเมื่อวันที่ 27 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2535 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนก วิทย์-คณิต จากโรงเรียนฤทธิยะวรรณาลัย กรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาระดับปริญญาตรี 171/2062 หมู่ 2 แขวงคลองถนน เขตสายไหม กรุงเทพมหานคร 10220

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย