

รายงานการวิจัย (ปีที่ 1)

ชื่อโครงการ การเตรียมไบโอพอลิเมอร์นาโนพาร์ติเคิลที่บรรจุกลูโคซามีนสำหรับการรักษา...
โรคข้อเสื่อม

ชื่อโครงการ Preparation of biopolymeric nanoparticles containing glucosamine for...
treatment of Osteoarthritis

คณะผู้วิจัย

สังกัด

อาจารย์ ดร. ปราณี เลิศสุทธิวงค์

สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราวุฒิ ตั้งพสุชาติ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิถุนายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยปีที่ 1 นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการสนับสนุนทุนวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2553 จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยชีวภาพไคติน-ไคโตซาน สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือสำหรับทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและความสะดวกตลอดการวิจัย

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะกรรมการพิจารณาทุน คณะกรรมการติดตามและประเมินผลงานวิจัยที่ให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่ทำให้งานวิจัยนี้มีคุณค่ามากยิ่งขึ้น

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้เป็นการเตรียมอนุภาคขนาดนาโนที่บรรจุกลูโคซามีนจากการเกิดไอโอโนโทรปีคเจลเลชันของแคลเซียมคลอไรด์ แอลจินेट และไคโตซานหรืออนุพันธ์ที่มีหมู่แอมโมเนียมซึ่งมีประจุบวกถาวร 2 ชนิด คือ เอ็น,เอ็น,เอ็น-ไทรเมทิลแอมโมเนียมไคโตซานคลอไรด์ (TMC, %DQ=35) และเอ็น-(2-ไฮดรอกซิล-3-ไทรเมทิลแอมโมเนียม)โพรพิลไคโตซานคลอไรด์ (HTCC, %DQ=11, 33) การโซนิเคตเป็นเวลา 20 นาที เป็นผลให้ขนาดอนุภาคเล็กลง 36.8% อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างขนาดอนุภาคกับการเปลี่ยนน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน การใช้ HTCC จะให้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าการใช้ไคโตซานและ TMC ที่มีความเข้มข้นของสารละลายเท่ากัน เมื่อใช้ HTCC ที่มี DQ สูง (33%) จะให้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า HTCC ที่มี DQ ต่ำ (11%) และลักษณะของอนุภาคเป็นแบบมีชั้นหุ้มแกนกลางดังผลวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

คำสำคัญ: ไคโตซาน, แอลจินेट, กลูโคซามีน, อนุภาคนาโน

Abstract

Glucosamine-loaded nanoparticles were prepared based on ionotropic gelation method using calcium chloride, alginate, and chitosan or two chitosan derivatives that carried permanent positively charged ammonium groups. The two derivatives synthesized in this work were *N,N,N*-trimethylammonium chitosan chloride (TMC) with degree of quaternization (DQ) of 35% and *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride (HTCC) with DQ of 11 and 33%. Applying the sonication for 20 min caused the reduction of particle size by 36.8%. However no direct relationship between molecular weight of chitosan and the particle size was observed. At the same concentration of cationic polymers, the use of HTCC tended to give smaller particle size than did the chitosan or TMC. The HTCC with high DQ (33%) when incorporated with alginate gave smaller particle size than the one with lower DQ (11%). The particle had a core-shell feature as characterized by transmission electron microscope

Keywords: Chitosan, Alginate, Glucosamine, Nanoparticles

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	2
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	4
4.1 จัดเตรียม/จัดหาวัตถุดิบและทดสอบสมบัติของวัตถุดิบ	4
4.2 สังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีประจุบวกถาวรของไคโตซาน	5
4.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขึ้นรูปเป็นอนุภาคของแคลเซียมแอลจีเนต-ไคโตซาน	9
4.4 ประสิทธิภาพในการบรรจุจุลินทรีย์ในอนุภาคที่เตรียมได้	12
5 สรุปผลการทดลอง	13
6 เอกสารอ้างอิง	14
7 ผลผลิตที่ได้ในปีที่ 1	16
8 การดำเนินงานในช่วงต่อไป	16

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สมบัติของ แอลจินตและไคโตซานที่ใช้ในการศึกษา	4
2	สมบัติของกลูโคซามีน	4
3	ค่า chemical shift (δ) ของสัญญาณที่พบจากการวิเคราะห์สาร TMC ด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์	6
4	ค่า chemical shift (δ) ของสัญญาณที่พบจากการวิเคราะห์สาร HTCC ด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์	7
5	เปอร์เซ็นต์ของควอเทอโนเซชัน (%DQ) และช่วง pH ที่สารละลายได้ในน้ำของ TMC และ HTCC ที่สังเคราะห์ได้	8
6	ขนาดของอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าที่ระยะเวลาในการโซนิเคชันต่างๆ	10
7	ขนาดของอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ	10
8	ขนาดและค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคที่เตรียมจากพอลิเมอร์ประจุบวกแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	11
9	ค่า pH ของอนุภาคที่เตรียมจากพอลิเมอร์ประจุบวกที่ต่างกัน	12
10	ปริมาณกลูโคซามีนที่บรรจุอยู่ในอนุภาคด้วยวิธีการบรรจุที่แตกต่างกัน	13

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สมการการสังเคราะห์ Phenylthiocarbonyl-glucosamine จากกลูโคซามีน	3
2	ภาพแสดงโครงสร้างและโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ TMC (ในสารละลาย D ₂ O/trifluoro acetic acid) ที่สังเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาของ ไคโตซาน กับ CH ₃ I	5
3	ภาพแสดงโครงสร้างและโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของ HTCCs (ในสารละลาย D ₂ O) ที่สังเคราะห์ โดยการทำปฏิกิริยาของไคโตซาน กับ GTMAC ปริมาณ 4 และ 6 โมล	7
4	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคเคลเซียมแอลจินต-ไคโตซาน (ความเข้มข้นของแอลจินต = 0.60 mg/ml, ระยะเวลาในการโซนิเคต = 20 min, ความเข้มข้นของไคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 220 กิโลดาลตัน = 0.30 mg/ml, ย้อมด้วย 1% phosphotungstic acid)	9

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กลูโคซามีนเป็นอะมิโนโมโนแซคคาไรด์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ไคตินหรือไคโตซานซึ่งเป็นสารสกัดมาจากสัตว์ประเภทที่มีข้อ-ปล้อง อาทิ กุ้ง ปู และแกนปลาหมึก เป็นต้น [1] องค์การอาหารและยา (FDA) ได้จัดให้กลูโคซามีนอยู่ในกลุ่มอาหารเสริมที่มีศักยภาพในการบำบัดโรคข้อเสื่อม [2] นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบของไกลโคโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) โดยเฉพาะในสารพอลิแซคคาไรด์ที่มีชื่อว่ากลูโคซามิโนไกลแคน (glucosaminoglycans หรือ GAG) ที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อนในข้อต่อ [3-4] และยังพบในน้ำไขข้อกระดูกอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่ กลูโคซามีนสามารถทำหน้าที่กระตุ้นและควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ GAG ได้ด้วย [5]

Bruyere และคณะ [6] ได้รายงานถึงผลของการให้ผู้สูงอายุที่ป่วยเป็นโรคข้อเสื่อมกินกลูโคซามีนเพื่อบำบัดอาการของโรค โดยให้กินเป็นสารเสริมอาหารทุกวันปริมาณ 1500 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 1-3 ปี และ Messier และคณะ [7] ให้ผู้ป่วยกินกลูโคซามีนคู่กับคอนโดิติน (chondroitin) ในปริมาณ 1500/1200 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งได้ผลลัพธ์ตอบสนองด้านการรักษาทางคลินิกเป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามถ้าได้รับกลูโคซามีนในปริมาณ 5,000-15,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว จะทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ [8] ดังนั้นจึงมีนักวิจัยจำนวนมากพยายามคิดค้นและพัฒนาการนำกลูโคซามีนไปบรรจุในแคปซูล หรือเตรียมขึ้นในรูปแบบของไมโครอิมัลชันและครีม เพื่อที่จะสามารถให้สารดังกล่าวแก่ผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยน้อยมากที่ศึกษาการบรรจุกลูโคซามีนในอนุภาคนาโนที่เตรียมจากพอลิเมอร์ธรรมชาติ โดยเฉพาะไคโตซานและแอลจินเนต

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการบรรจุกลูโคซามีนในอนุภาคที่มีขนาดเล็กจนถึงระดับนาโนเมตร โดยใช้หลักการไอโอโนโทรปิกเจลเลชัน (ionotropic gelation) ซึ่งเป็นการจับตัวกันของสายโซ่พอลิเมอร์ 2 ชนิดที่มีประจุตรงข้ามกันคือประจุบวกและลบทำให้เกิดเป็นอนุภาคขึ้น โดยอนุภาคดังกล่าวประกอบด้วยพอลิเมอร์จากธรรมชาติ 2 ประเภทที่เข้ากับสิ่งมีชีวิตได้ คือแอลจินเนตซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกซึ่งสามารถเกิดประจุลบได้ และไคโตซานซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีหมู่อะมิโนที่สามารถเกิดเป็นหมู่ที่มีประจุบวก รวมไปถึงการวิจัยในการใช้อนุพันธ์ของไคโตซานที่มีประจุบวกถาวร 2 ชนิดคือ คือ *N,N,N*-trimethylammonium chitosan chloride (TMC) และ *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride (HTCC) แทนการใช้ไคโตซานอีกด้วย ซึ่งยังไม่มีการศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนแอลจินเนต-ไคโตซานหรืออนุพันธ์ที่บรรจุกลูโคซามีนมาก่อน ซึ่งงานนี้ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ระยะเวลาในการโซนิเคตในกระบวนการเตรียมอนุภาค น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน และความเข้มข้นของพอลิเมอร์ประจุบวก ที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของอนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีนที่พัฒนาขึ้น

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมอนุภาคขนาดเล็กจนถึงระดับนาโนเมตรของไคโตซาน และแคลเซียมแอลจิเนตที่บรรจุกลูโคซามีน โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขึ้นรูปอนุภาค และประสิทธิภาพในการบรรจุกลูโคซามีนเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสูตรตำรับที่มีส่วนผสมของอนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีนดังกล่าวที่สามารถนำไปใช้ในการบำบัดโรคข้อเสื่อมต่อไป

3. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 ค้นคว้าข้อมูล เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

3.2 วิเคราะห์สมบัติพื้นฐานของไคโตซานที่นำมาศึกษา ได้แก่ มวลโมเลกุล และ degree of deacetylation (DD) ของไคโตซาน

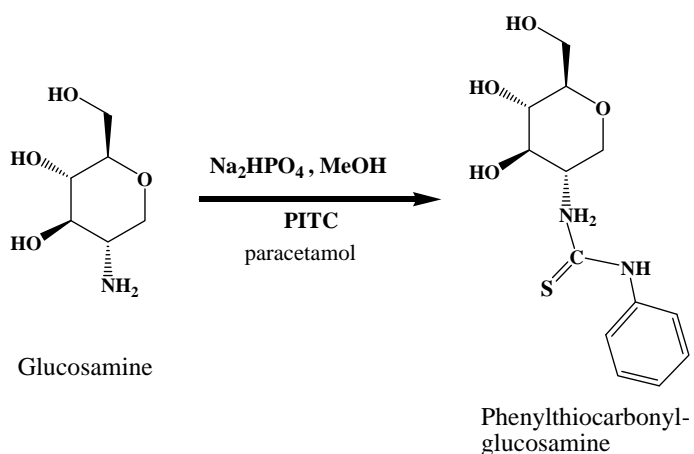
3.3 สังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีประจุบวกถาวรของไคโตซาน 2 ชนิด คือ *N,N,N*-trimethylammonium chitosan chloride (TMC) และ *N*-[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride (HTCC) ที่มีปริมาณประจุบวกต่าง ๆ กัน

3.4 เตรียมอนุภาคนาโนด้วยเทคนิคไอโอโนโทรปิกเจลเลชัน โดยหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (0.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในสารละลายแอลจิเนต (0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ภายใต้การกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที และทำการโซนิเคชันที่ระยะเวลาต่างๆ จากนั้นหยดสารละลายไคโตซานปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงในสารแขวนลอยอนุภาคนาโน โดยอนุภาคจะเกิดขึ้นในขณะที่หยดสารละลายไคโตซานลงไปของผสมและกวนอย่างต่อเนื่องอีก 30 นาที ก่อนที่จะไว้งามคืนเพื่อให้เกิดสมดุลและทำการตรวจสอบสมบัติ หลังจากนั้นแยกอนุภาคนาโนโดยใช้เครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ (ล้างด้วยน้ำ 1 ครั้ง) และทำแห้งด้วยเทคนิคทำแห้งเยือกแข็ง (สำหรับการบรรจุกลูโคซามีนนั้นจะทำการผสมกลูโคซามีนในสารละลายแอลจิเนตก่อน แล้วจึงหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายแอลจิเนตหรือผสมกลูโคซามีนลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แล้วจึงหยดสารละลายผสมลงในสารละลายแอลจิเนตตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น) โดยศึกษาตัวแปรต่อไปนี้

- เวลาของการโซนิเคตสารละลายผสมของแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายแอลจิเนต ดังนี้ 0, 10, 20, 30, และ 60 นาที
- น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน ได้แก่ 71, 180, 220, 300, และ 583 กิโลดาลตัน
- ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ประจุบวก

3.5 วิเคราะห์สมบัติของอนุภาคนาโน ดังนี้

- วิเคราะห์สัณฐานวิทยาและขนาดของอนุภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
- วิเคราะห์หาขนาดและค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคด้วยเครื่อง zeta sizer
- วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนในอนุภาคนาโน โดยนำอนุภาคที่ได้หลังการทำแห้งเยือกแข็งมาทำปฏิกิริยากับ phenylisothiocyanate เกิดเป็นอนุพันธ์ดังสมการในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สมการการสังเคราะห์ Phenylthiocarbonyl-glucosamine จากกลูโคซามีน

จากนั้นวิเคราะห์สารที่ได้ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Tekko และคณะ [9] และคำนวณประสิทธิภาพการกักเก็บกลูโคซามีนและปริมาณกลูโคซามีนต่อน้ำหนักของอนุภาคจากสูตร

$$\text{ประสิทธิภาพการกักเก็บสาร (\%)} = \frac{\text{ปริมาณกลูโคซามีนในอนุภาคที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นที่ใส่}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณกลูโคซามีนต่อน้ำหนักของอนุภาค (\%)} = \frac{\text{ปริมาณกลูโคซามีนในอนุภาคที่วิเคราะห์ได้} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของอนุภาค}}$$

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 จัดเตรียม/จัดหาวัตถุดิบและทดสอบสมบัติของวัตถุดิบ

ทำการจัดหาวัตถุดิบ ได้แก่ แอลจินเต ไคโตซาน และกลูโคซามีน ตลอดจนวิเคราะห์สมบัติของสารแต่ละตัว ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สมบัติของแอลจินเตและไคโตซานที่ใช้ในการศึกษานี้

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

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

ตารางที่ 2 สมบัติของกลูโคซามีน*

พารามิเตอร์	กลูโคซามีน
สูตรโครงสร้าง	$C_6H_{13}NO_5$
ลักษณะภายนอก	ของแข็งสีขาว
Refractive index (n _{20D})	1.330
น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมล)	179.17

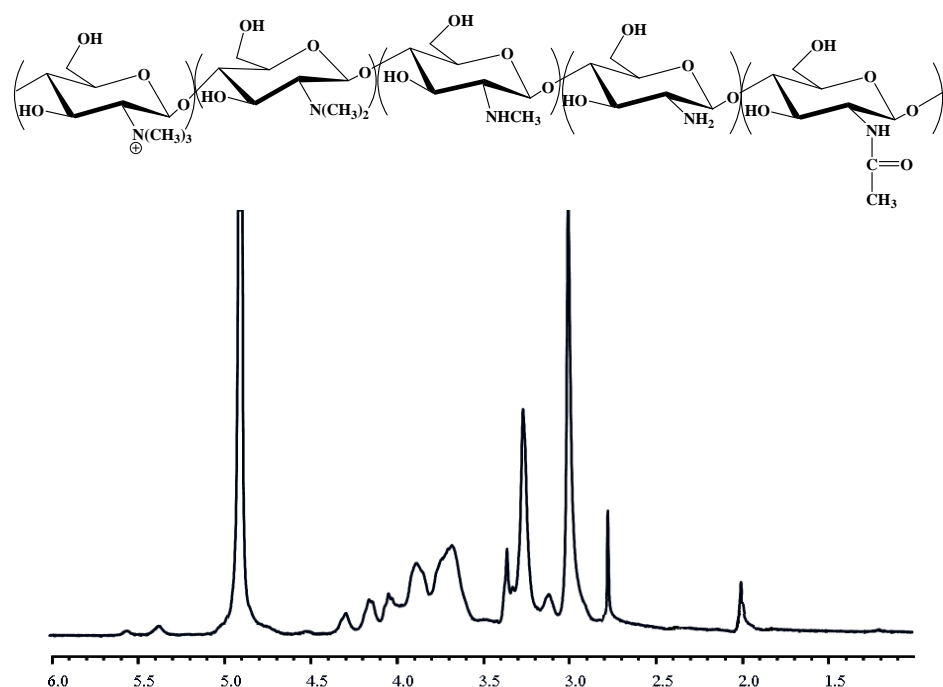
* ข้อมูลจากผู้ผลิต (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA)

4.2 สังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีประจุบวกถาวรของไคโตซาน

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

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

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



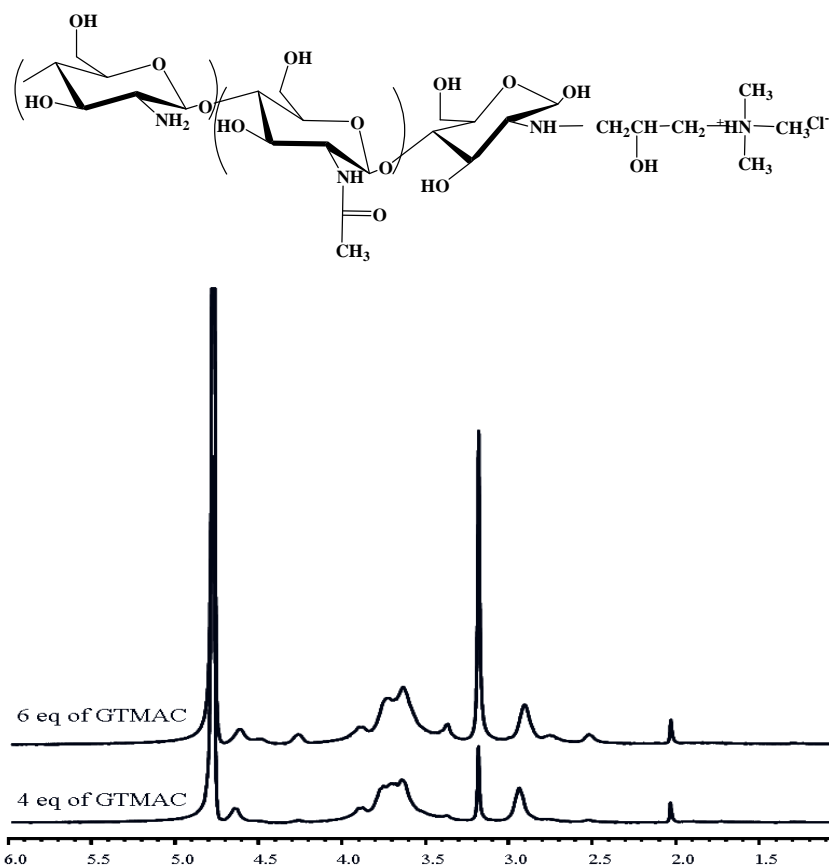
ภาพที่ 2 ภาพแสดงโครงสร้างและโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ TMC (ในสารละลาย D_2O /trifluoro acetic acid) ที่สังเคราะห์ได้โดยการทำปฏิกิริยาของไคโตซาน กับ CH_3I

ตารางที่ 3 ค่า chemical shift (δ) ของสัญญาณที่พบจากการวิเคราะห์สาร TMC ด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์

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

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

HTCC สังเคราะห์ได้จากการนำไคโตซานมาทำปฏิกิริยาการเปิดวงของสารไกลซิลิดไตรเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (GTMAC) ภายใต้สภาวะกรดตามวิธีการ Seong และคณะ [11] และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (ภาพที่ 3) โดยตำแหน่งของพิกและโครงสร้างแสดงไว้ในตารางที่ 4



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

ตารางที่ 4 ค่า chemical shift (δ) ของสัญญาณที่พบจากการวิเคราะห์สาร HTCC ด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์

Chemical shift (δ) (ppm)	สัญญาณ H ของหมู่
2.00	$-\text{COCH}_3$
2.50	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
2.90	H-2
3.20	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
3.40	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
3.50-4.40	H-2',3,4,5,6'
4.15	$-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
4.80	DOH

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

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

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

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

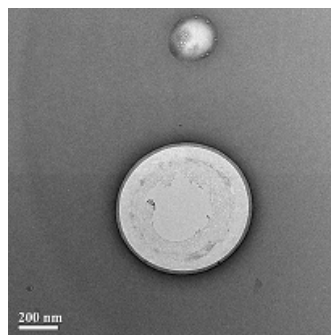
ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ของควอเทอไนเซชัน (%DQ) และช่วง pH ที่สารละลายได้ในน้ำของ TMC และ HTCC ที่สังเคราะห์ได้

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

4.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขึ้นรูปเป็นอนุภาคของแคลเซียมแอลจินेट-ไคโตซาน

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

วิธีการขึ้นรูปอนุภาคนาโนดัดแปลงมาจาก De และ Robinson [12] และ Lertsutthiwong และคณะ [13] หลักการ คือ เมื่อหยดสารละลาย $CaCl_2$ ลงในสารละลายแอลจินेटจะเกิด pre gel (สภาวะก่อนการเกิดเจล) และจะเกิดเป็นเจลสมบูรณ์เมื่อหยดสารละลายไคโตซานลงไป โดยภาพที่ 4 แสดงการเกิดอนุภาคที่มีลักษณะเป็นแบบ core and shell นั่นคือส่วนของ Ca-alginate อยู่ตรงกลางเป็นส่วนใหญ่ที่ไม่ติดสี เนื่องจากสีของ phosphotungstic acid มีประจุลบ และที่ชอบเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกคือ ไคโตซานหรืออนุพันธ์ของไคโตซานซึ่งสามารถเชื่อมติดสีของ phosphotungstic acid ได้ด้วยแรงไอออนิก จึงมีลักษณะทึบแสง



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของอนุภาคแคลเซียมแอลจินेट-ไคโตซาน (ความเข้มข้นของแอลจินेट = 0.60 mg/ml, ระยะเวลาในการ โซนิเคต = 20 min, ความเข้มข้นของไคโตซาน น้ำหนักโมเลกุล 220 กิโลดาลตัน = 0.30 mg/ml, ย้อมด้วย 1% phosphotungstic acid)

ตารางที่ 6 แสดงผลของการโซนิเคตที่ระยะเวลาต่างๆ โดยพบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการโซนิเคตจาก 0 ถึง 20 นาที ขนาดของอนุภาคลดลงจาก 750 นาโนเมตร เป็น 475 นาโนเมตร ทั้งนี้เนื่องมาจากการโซนิเคตมีผลทำให้สายโซ่พอลิเมอร์ของอัลจินेटถูกตัดขาด หรือมีการแตกออกของอนุภาค pre gel ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตามหากเพิ่มระยะเวลาในการ โซนิเคชันมากขึ้นถึง 60 นาที พบว่า ขนาดลดลงเพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการโซนิเคตสามารถตัดสายโซ่พอลิเมอร์ของอัลจินेटได้ในความยาวค่าหนึ่งเท่านั้น จึงทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดพลังงานและเวลาในการทำเตรียมอนุภาค จึงเลือกเวลาในการ โซนิเคตที่ 20 นาที สำหรับใช้ในการศึกษาในลำดับต่อไป

ตารางที่ 6 ขนาดของอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าที่ระยะเวลาในการโซนิเคชันต่างๆ

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

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

-ผลของน้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นของไคโตซาน

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

ตารางที่ 7 ขนาดของอนุภาคและค่าศักย์ซีต้าที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ

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

ในกรณีของค่าประจุที่ผิวของอนุภาคหรือค่าศักย์ซีต้า พบว่าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานเปลี่ยนไป นั่นคือน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานไม่มีผลต่อประจุที่ผิวของอนุภาคนั่นเอง

- ผลของความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก

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

ตารางที่ 8 ขนาดและค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคที่เตรียมจากพอลิเมอร์ประจุบวกแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

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

ตารางที่ 9 ค่า pH ของอนุภาคที่เตรียมจากพอลิเมอร์ประจุบวกที่ต่างกัน

Cationic polymer	pH
Chitosan	3.48
TMC	3.41
HTCC	6.33

4.4 ประสิทธิภาพในการบรรจุกลูโคซามีนในอนุภาคที่เตรียมได้

ศึกษาประสิทธิภาพในการบรรจุกลูโคซามีนโดยการนำอนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีนแล้วมาแช่ในสารละลายโซเดียมซิเตรต (sodium citrate) ข้ามคืน เพื่อให้อนุภาคแตกออกเนื่องจากซิเตรตจะเข้าไปรบกวนการจับตัวกันระหว่างพอลิเมอร์ ส่งผลให้กลูโคซามีนละลายออกมาได้หมด จึงหาปริมาณกลูโคซามีนด้วยเทคนิค HPLC ได้อย่างถูกต้องมากขึ้น โดยจะต้องทำปฏิกิริยากับ PITC ก่อนการวิเคราะห์ เพื่อให้ UV detector สามารถตรวจวัดปริมาณสารได้

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการบรรจุกลูโคซามีนด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ *วิธีที่หนึ่ง*: ละลายกลูโคซามีนลงในสารละลายแอลจินेटก่อนแล้วจึงหยดแคลเซียมคลอไรด์ลงไป ส่วนใน*วิธีที่สอง*: ละลายกลูโคซามีนลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ก่อนแล้วจึงหยดลงในสารละลายแอลจินेट ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 พบว่าการบรรจุกลูโคซามีนในอนุภาคแบบที่ 1 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บยาได้มากกว่าการบรรจุแบบที่ 2 ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่า เมื่อนำกลูโคซามีนในรูปของกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์มาละลายอยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จะเกิดแรงผลักดันกันระหว่างหมู่แอมโมเนียมของกลูโคซามีนกับ Ca^{2+} ซึ่งเมื่อนำไปหยดลงในสารละลายแอลจินेटจึงทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บกลูโคซามีนแบบนี้ดีกว่าแบบที่หนึ่ง ซึ่งประจุบวกของกลูโคซามีนเกิดแรงดึงดูดกับประจุลบบนสายโซ่แอลจินेटก่อน ทำให้กลูโคซามีนถูกกักไว้ก่อนบางส่วน เมื่อหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงไปเพื่อให้เกิดเป็น pre-gel จนเกิดเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์จึงกักเก็บกลูโคซามีนได้ในปริมาณที่มากกว่า

ตารางที่ 10 ปริมาณกลูโคซามีนที่บรรจุอยู่ในอนุภาคด้วยวิธีการบรรจุที่แตกต่างกัน

ตัวอย่าง	วิธีที่ 1:		วิธีที่ 2:	
	กลูโคซามีนผสมใน สารละลายแอลจินेट		กลูโคซามีนผสมใน สารละลายแคลเซียมคลอไรด์	
	ประสิทธิภาพใน การกักเก็บ กลูโคซามีน (%)	ปริมาณยาต่อ น้ำหนักของ อนุภาค (%)	ประสิทธิภาพ ในการกักเก็บ กลูโคซามีน (%)	ปริมาณยาต่อ น้ำหนักของ อนุภาค (%)
ACP	0.941±0.14	3.914±0.59	0.714±0.17	3.218±0.76
AH11P	0.802±0.14	5.868±1.00	0.655±0.12	4.924±0.90
AH33P	0.960±0.17	6.540±1.19	0.558±0.10	4.793±0.83
ATP	0.693±0.10	4.089±0.62	0.581±0.15	2.995±0.77

หมายเหตุ: ACP คือ alginate-chitosan nanoparticles containing glucosamine

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

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

ATP คือ alginate-TMC nanoparticles containing glucosamine

5. สรุปผลการทดลอง

อนุภาคนาโนแอลจินेट-ไคโตซาน (หรืออนุพันธ์ของไคโตซาน) สามารถใช้บรรจุกลูโคซามีนด้วยเทคนิคเจลเลชั่น ซึ่งอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดเล็กที่สุดประมาณ 300 นาโนเมตร และปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของอนุภาค ได้แก่ ระยะเวลาในการโซนิเคต ความเข้มข้นและชนิดของพอลิเมอร์ประจุบวกที่ใช้ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคที่ต้องการ นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการบรรจุขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เติมกลูโคซามีนในกระบวนการเตรียมอนุภาค

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Ronge X., Song L., Zhanyong G., Huahua Y., Cuiping L., Xia J., Jinhua F., Pengcheng L. The antioxidant activity of glucosamine hydrochloride in vitro. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14 (2005) 1706-1709.
- [2] Hawker, G. Update on the epidemiology of the rheumatic diseases. *Current Opinion in Rheumatology*. 9 (1997) 90-94.
- [3] Liang Z, Leslie, J., Adebowale, A., Ashraf, M., Eddington, N.D. Determination of the nutraceutical, glucosamine hydrochloride, in raw materials, dosage forms and plasma using pre-column derivatization with ultraviolet HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20 (1999) 807-814.
- [4] McCarty, M.F. Enhanced synovial production of hyaluronic acid may explain rapid clinical response to high-dose glucosamine in osteoarthritis. *Medical Hypotheses*. 50 (1998) 507-510.
- [5] Fenton, J. I.; Chlebek-Brown, K. A.; Peters, T. L.; Caron, J. P.; Orth, M. W., The effects of glucosamine derivatives on equine articular cartilage degradation in explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage*. 8 (6) (2000) 444-451.
- [6] Bruyere, O.; Pavelka, K.; Rovati, L. C.; Gatterová, J.; Giacovelli, G.; Olejarová, M.; Deroisy, R.; Reginster, J. Y., Total joint replacement after glucosamine sulphate treatment in knee osteoarthritis: results of a mean 8-year observation of patients from two previous 3-year, randomised, placebo-controlled trials. *Osteoarthritis and Cartilage*. 16 (2008) 254-260.
- [7] Messier, S.P., Mihalko, S., Loeser, R.F., Legault, C., Jolla, J., fruender, J.P, Prosser, B., Adrian, A., Williamson, J.D. Glucosamine/chondroitin combined with exercise for the treatment of knee osteoarthritis: a preliminary study. *Osteoarthritis and Cartilage*. 15 (2007) 1256-1266.
- [8] Thakral, R., Debnath, U.K., Dent, C. Role of glucosamine in osteoarthritis. *Current Orthopaedics*. 21 (2007) 386-389.
- [9] 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41 (2) (2006) 385-392.

- [10] Sieval, A. B.; Thanou, M.; Kotze, A. F.; Verhoef, J. C.; Brussee, J.; Junginger, H. E. Preparation and NMR characterization of highly substituted *N*-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*. 36 (2-3) (1998) 157-165.
- [11] Seong, H. S.; Whang, H. S.; Ko, S. W. Synthesis of a quaternary ammonium derivative of chito-oligosaccharide as antimicrobial agent for cellulosic fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 76 (14) (2000) 2009-2015.
- [12] De, S.; Robinson, D., Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-l-lysine-alginate nanospheres. *Journal of Controlled Release*. 89 (1) (2003) 101-112.
- [13] Lertsutthiwong, P.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U., Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*. 29 (3) (2009) 856-860.

7. ผลผลิตที่ได้ในปีที่ 1

-การประชุมวิชาการในระดับนานาชาติ:

Peng-im, P., **Lertsutthiwong, P.**, Tangpasuthadol, V. Ionic gelation of calcium alginate and quaternary ammonium chitosan to produce submicroparticles for glucosamine delivery. The 11th International Conference on Chitin and Chitosan (11th ICCC) & the 8th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium (8th APCCS), Taipei, Taiwan, 6-9 September, 2009.

-การประชุมวิชาการในระดับชาติ:

Pornphrom Peng-im, **Pranee Lertsutthiwong**, Varawut Tangpasuthadol. Preparation of calcium alginate-chitosan nanoparticles. *The 2nd Polymer Graduate Conference of Thailand*, 21-22 May, 2009, Bangkok.

-ผลิตนิสิตปริญญาโท: สาขาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ จำนวน 1 คน คือ นางสาวพรพรหม เพ็งอ้อม โดยชื่อวิทยานิพนธ์ คือ การเตรียมอนุภาคนาโนแอลจินต-ไคโทซานที่บรรจุกลูโคซามีน

8. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

- ศึกษาเสถียรภาพทั้งทางกายภาพและทางเคมีของอนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีน เช่น การคงตัวของอนุภาค และของขากลูโคซามีน รวมไปถึงการคงอยู่ของปริมาณยาในอนุภาคที่เก็บไว้ในระบบที่มีน้ำและแบบแห้ง

- ตรวจสอบประสิทธิภาพในการปลดปล่อยสารกลูโคซามีนจากอนุภาคนาโนที่เตรียมได้