

การเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากไฟโบรอินไหมไทยผสมกรดไฮยาลูรอนิก
เพื่อใช้ในการนำส่งยา

นางสาวปิยะรัตน์ สังข์พันธุ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF MICROSPHERES FROM THAI SILK FIBROIN BLENDED WITH
HYALURONIC ACID FOR DRUG DELIVERY

Miss Piyarat Sungkhaphan



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากไฟโบรอิน
	ไหมไทยผสมกรดไฮยาลูรอนิคเพื่อใช้ในการนำส่งยา
โดย	นางสาวปิยะรัตน์ สังข์พันธุ์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ ริมดุสิต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ณัฐพร พิมพ์ะ)

ปิยะรัตน์ สังข์พันธุ์ : การเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากไฟโบรอินไหมไทยผสมกรดไฮยาลูรอนิกเพื่อใช้ในการนำส่งยา (PREPARATION OF MICROSPHERES FROM THAI SILK FIBROIN BLENDED WITH HYALURONIC ACID FOR DRUG DELIVERY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, 163 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทย (SF) ผสมกรดไฮยาลูรอนิก (HA) เพื่อประยุกต์ใช้ในการนำส่งยา ซึ่งเตรียมอนุภาคทรงกลมในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 ด้วยเทคนิคอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยใช้สารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีค่าความกรดต่างเท่ากับ 6 เป็นวัฏภาคน้ำ และใช้น้ำมันถั่วเหลืองผสม Tween 80 เป็นวัฏภาคน้ำมัน จากผลการศึกษาพบว่า กระบวนการขึ้นรูปที่เริ่มปั่นกวนอิมัลชันด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วปรับลดเป็น 4 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันเท่ากับ 1:16 พร้อมทั้งทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้อนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมตัน ผิวค่อนข้างเรียบ กระจายตัวดี ส่วนใหญ่มีขนาดในช่วง 32-85 ไมครอน และมีผลได้ทั้งหมดประมาณ 63-75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของสารพบว่า กรดไฮยาลูรอนิกมีการเชื่อมขวางได้ค่อนข้างยาก จึงทำให้กรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่ถูกเชื่อมขวางละลายน้ำหายไป ส่งผลให้อนุภาคทรงกลมมีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยมีปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกคงเหลือในอนุภาคประมาณเป็นสัดส่วน 9-27 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อทดสอบความเสถียรของอนุภาคทรงกลมโดยการแช่น้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อแช่อนุภาคทรงกลมในน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง น้ำหนักแห้งของอนุภาคทรงกลมไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อแช่อนุภาคทรงกลมในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง น้ำหนักแห้งของอนุภาคทรงกลมเริ่มลดลง และลดลงมากขึ้นเมื่อแช่นานขึ้น โดยพบว่าน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมมีค่าใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำ แสดงให้เห็นว่า องค์ประกอบของสารที่ไม่คงตัวคือส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกที่เชื่อมขวางไม่สมบูรณ์ ผลการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า อนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยมากจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV ซ้ำกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมาก เมื่อนำอนุภาคทรงกลมไปดูดซับเคอร์คูมินพบว่า อนุภาคทรงกลมมีประสิทธิภาพในการดูดซับเคอร์คูมินประมาณ 30-33 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมประมาณ 7.1-7.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเคอร์คูมินถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมได้ด้วยอันตรกิริยาที่แข็งแรงของส่วนไม่ชอบน้ำ อนุภาคทรงกลมนี้สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีและมีเอนไซม์โปรติเอส XIV เป็นองค์ประกอบ โดยอาศัยกลไกการปลดปล่อยแบบการแพร่และการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลม ซึ่งอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยมากสามารถชะลอการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้มากกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมาก

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557

5570292221 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: THAI SILK FIBROIN, HYALURONIC ACID, 163 CURCUMIN

PIYARAT SUNGKHAPHAN: PREPARATION OF MICROSPHERES FROM THAI SILK FIBROIN BLENDED WITH HYALURONIC ACID FOR DRUG DELIVERY. ADVISOR: ASSOC. PROF.SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., pp.

This research aimed to fabricate microspheres from Thai silk fibroin (SF) blended with hyaluronic acid (HA) for drug delivery applications. The microspheres at different weight blending ratios SF30HA70, SF50HA50 and SF70HA30 were fabricated by water in oil (w/o) emulsion method. The mixture of SF and HA at pH 6 and the mixture of soy bean oil and Tween 80 were used as water and oil phases, respectively. The microspheres could be obtained when the stirring speed was 300 rpm, w/o ratio was 1:16 and the temperature was 25°C for 20 min. Then the temperature was decreased to 4°C and 3%(w/v) glutaraldehyde was added to crosslink microspheres for 6 h. Obtained microspheres were round shape with smooth surface. The size and yield of obtained microspheres were 32-85 μm and 63-75%wt, respectively. The analysis of HA content in microspheres showed that there were uncrosslinked HA molecules which were dissolved out, resulting in less HA contents in microspheres (about 9-27%wt). The stability test of microspheres by incubating in DI water at 37°C showed that the weight of microspheres was not changed after 2 h of incubating, but it was decreased after 24 h of incubating and continuously decreased when increasing incubating time. The decreased weight of microspheres was found to be similar to the HA contents found in incubating water, indicating that the instability part of microsphere that was dissolved out was incompletely crosslinked HA. It was found that the microspheres could be gradually degraded in protease XIV solution and the microspheres with high SF content were degraded slower than the ones with high HA content. When the microspheres were used to adsorb curcumin, it observed that curcumin could be adsorbed on microspheres by hydrophobic interaction with the entrapment efficiency of 30-33% and the drug loading of 7.1-7.7%. When the release of curcumin from microspheres in PBS, with and without protease XIV, was tested, it was found that the microspheres with high SF content could prolong the release of curcumin more than ones with high HA content. The release kinetics were governed by diffusion and degradation mechanism.

Department: Chemical Engineering

Student's Signature

Field of Study: Chemical Engineering

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงการวางแผนการวิจัย แนวทางการดำเนินการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และการอบรมให้ความรู้ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศราวุธ ริมดุสิต ประธาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ และ ดร.ณัฐพร พิมพะ กรรมการ ที่สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำต่าง ๆ มากมาย

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ ที่อนุเคราะห์รังไหมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินการทดลอง รวมทั้งเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร. จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ คุณกัณษรรัตน์ เลิศไชย คุณรุ่งนภา แยมเดช และคุณกัญญาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์ รวมถึงพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ สำหรับกำลังใจ คำแนะนำ และการให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านสำหรับการดำเนินการวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจ คำปรึกษา และสนับสนุนการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา ทำให้ผู้วิจัยก้าวผ่านอุปสรรคต่าง ๆ และดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 มุลเหตุจูงใจและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ชีววัสดุ (Biomaterials)	6
2.1.1 ไหมจากหนอนไหม (Silkworm silk).....	6
2.1.1.1 โครงสร้างและสมบัติของไหม (Structure and properties of silk)	6
2.1.1.2 การย่อยสลายของไหมไฟโบรอิน (Degradation of silk fibroin)	14
2.1.1.3 กระทบยุกต์ใช้งานของไหมไฟโบรอิน (Applications of silk fibroin).....	15
2.1.2 กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid).....	16
2.1.2.1 โครงสร้างและสมบัติของกรดไฮยาลูรอนิก (Structure and properties of Hyaluronic acid).....	16
2.1.2.2 แหล่งที่พบและการสกัด (Sources and Extraction)	19
2.1.2.3 การประยุกต์ใช้งานกรดไฮยาลูรอนิก (Applications of hyaluronic acid).....	20
2.1.2.4 การปรับปรุงทางเคมี (Chemical modification).....	21
2.1.2.4.1 การปรับปรุงหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group modification)..	23

2.1.2.4.2 การปรับปรุงหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group modification)...	24
2.1.2.5 การย่อยสลายของกรดไฮยาลูรอนิก (Degradations of hyaluronic acid).....	24
2.2 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Microspheres)	27
2.2.1 การประยุกต์ใช้งานอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Applications of microsphere).....	28
2.2.2 เทคนิคการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Fabrications of microsphere) .	28
2.3 เทคนิคการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (Water in oil emulsion technique)	30
2.4 ระบบควบคุมการปลดปล่อยยา (Controlled Drug Release System)	33
2.4.1 ระบบควบคุมการปลดปล่อยยาผ่านพอลิเมอร์เมทริกซ์ (Polymer matrix controlled drug release)	35
2.4.1.1 การแพร่ผ่านพอลิเมอร์เมทริกซ์ (Polymer matrix diffusion– Controlled release drug delivery systems).....	35
2.4.1.2 การละลายของพอลิเมอร์เมทริกซ์ (Polymer matrix dissolution - Controlled release drug delivery systems).....	36
2.4.1.3 การละลายจากส่วนกักเก็บยา (Microreservoir dissolution - Controlled release drug delivery systems).....	36
2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการปลดปล่อยยาจากเมทริกซ์.....	37
2.5 เคอร์คูมิน (Curcumin).....	38
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	44
2.6.1 ระบบที่ประกอบด้วยไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิก.....	44
2.6.2 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอิน	45
2.6.3 อนุภาคนาโนของกรดไฮยาลูรอนิก	47
2.6.4 ระบบที่ประกอบด้วยไฟโบรอินร่วมกับสารอื่นสำหรับการปลดปล่อยสาร	49

2.6.5 ระบบที่ประกอบด้วยกรดไฮยาลูรอนิคร่วมกับสารอื่น.....	50
2.6.6 การพัฒนาชีววัสดุเพื่อใช้ในระบบนำส่งเคอร์คูมิน	52
บทที่ 3 วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย	58
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	58
3.2 อุปกรณ์.....	59
3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย	60
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	61
3.4.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายกรดไฮยาลูรอนิค	61
3.4.2 ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลาย กรดไฮยาลูรอนิคและสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิค	64
3.4.3 การเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและ กรดไฮยาลูรอนิค	64
3.4.4 การวิเคราะห์ลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาด ไมครอน	65
3.4.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) และขนาดของอนุภาคโดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Mastersizer)	65
3.4.4.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิคที่เหลืออยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาด ไมครอนด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay	66
3.4.4.3 การวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคทรงกลมเมื่อทดสอบกับน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	68
3.4.4.4 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (In Vitro Biodegradation).....	69
3.4.5 การศึกษาสมบัติการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรง กลมขนาดไมครอน	69

3.4.5.1 การศึกษาความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน.....	69
3.4.5.2 การศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ.....	71
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	72
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	73
4.1 ผลของค่าความเป็นกรดต่างต่อลักษณะสารละลายที่ได้.....	73
4.1.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA100) และสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก (SF/HA).....	73
4.2 ผลของสภาวะการขึ้นรูปต่อลักษณะอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้	78
4.2.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	78
4.2.2 อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	80
4.2.3 เวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางทางเคมีของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	82
4.2.3.1 โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน.....	82
4.2.3.2 ร้อยละผลได้ทั้งหมดและขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	90
4.2.3.3 ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลืออยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	97
4.2.3.4 ความเสถียรของอนุภาคทรงกลมเมื่อทดสอบกับน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	100
4.3 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (<i>In vitro</i> biodegradability)	106
4.4 ความสามารถในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ	109
4.4.1 ความสามารถในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ	109

4.4.2 ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ	111
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	122
5.1 สรุปผลการทดลอง	122
5.2 ข้อเสนอแนะ	126
รายการอ้างอิง	127
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิค	142
ภาคผนวก ข ค่าศักย์เซต้าของสารละลาย	146
ภาคผนวก ค การเชื่อมขวางฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิคด้วยกลูตารัลดีไฮด์	147
ภาคผนวก ง กราฟแสดงขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลม	150
ภาคผนวก จ กราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine	153
ภาคผนวก ฉ การทดสอบความเสถียรของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	155
ภาคผนวก ช กราฟมาตรฐานของเคอร์คูมินในสารละลายชนิดต่าง ๆ	157
ภาคผนวก ซ กราฟการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินที่เวลาใด ๆ	158
ภาคผนวก ฌ การคำนวณปริมาณกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิค .	160
ภาคผนวก ญ การคำนวณปริมาณกรดไฮยาลูรอนิคที่มีอยู่จริงในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	162
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	163

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	องค์ประกอบของไหมบ้าน <i>Bombyx mori</i>	7
ตารางที่ 2.2	องค์ประกอบของกรดอะมิโนในไหมบ้าน <i>Bombyx mori</i>	8
ตารางที่ 2.3	สมบัติทางกลของไหมไฟโบรอินเปรียบเทียบกับวัสดุอื่น	13
ตารางที่ 2.4	ปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิกที่อวัยวะต่างๆ	19
ตารางที่ 2.5	สรุปการปรับปรุงทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิก	26
ตารางที่ 2.6	หลักการพิจารณาลักษณะสมบัติต่างๆ ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน.....	27
ตารางที่ 2.7	ค่า Hydrophile-lipophile balance ของตัวทำอิมัลชันบางชนิด	31
ตารางที่ 2.8	แสดงสมบัติของตัวทำอิมัลชันที่ค่า Hydrophile-lipophile balance ต่าง ๆ	31
ตารางที่ 4.1	ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและ กรดไฮยาลูรอนิกภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร ในระยะเวลาต่าง ๆ.....	91
ตารางที่ 4.2	ร้อยละผลได้ภายหลังการคัดแยกขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบ รอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวาง อนุภาคด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็น เวลาต่าง ๆ	94
ตารางที่ 4.3	ขนาดอนุภาคทรงกลมเฉลี่ยของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ใน อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลาต่าง ๆ วิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัด ขนาดอนุภาค (Mastersizer).....	96
ตารางที่ 4.4	อัตราส่วนของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่จริงในอนุภาคทรงกลม ขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วย สารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลาต่าง ๆ	99
ตารางที่ 4.5	ปริมาณสุทธิของน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมและปริมาณสุทธิของกรด ไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูร อนิกที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ในน้ำเป็นเวลา 144 ชั่วโมง (6 วัน).....	105

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง..... 111

ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินในระดับห้องปฏิบัติการ 118

ตารางที่ 4.8 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Release constant; k) ตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlarion coefficient; R^2) ภายใต้สภาวะการควบคุมการปลดปล่อยที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ..... 120

ตารางที่ 4.9 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Release constant; k) ตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlarion coefficient; R^2) ภายใต้สภาวะการควบคุมการปลดปล่อยที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรเป็นองค์ประกอบ 121

ตารางที่ ข. 1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ความเข้มข้นของของแข็งรวม 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ 146

ตารางที่ ค. 1 ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิกภายหลังการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ..... 149

ตารางที่ ฉ. 1 น้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลาต่าง ๆ ภายหลังการแช่ในน้ำปราศจากไอออน ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..... 155

ตารางที่ ฉ. 2 ปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลาต่าง ๆ ในน้ำปราศจากไอออน ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในแต่ละช่วงเวลา 156

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	โครงสร้างของไหม	7
รูปที่ 2.2	โครงสร้างทุติยภูมิของไหมไฟโบรอินแบบแผ่นพับเบต้าแบบสวนขนาน	10
รูปที่ 2.3	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นของไหมไฟโบรอินที่มีผลต่อการจัดเรียงตัวของโครงสร้างไหมไฟโบรอิน	11
รูปที่ 2.4	ลักษณะรูปร่างโมเลกุลและการจัดเรียงตัวของไหมไฟโบรอินเมื่อมีการปรับปรุงด้วยเมทานอล	12
รูปที่ 2.5	โครงสร้างทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิค	17
รูปที่ 2.6	ที่อยู่ของกรดไฮยาลูรอนิคในชั้นผิวหนัง	20
รูปที่ 2.7	ลักษณะการคอนจูเกตและการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิค	22
รูปที่ 2.8	กรดไฮยาลูรอนิคที่แสดงหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของไดแซ็กคาไรด์และตำแหน่งสำหรับการปรับปรุงทางเคมี	22
รูปที่ 2.9	การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิคด้วย EDC ร่วมกับ NHS หรือ HOBt	23
รูปที่ 2.10	การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิคด้วยกลูตารัลดีไฮด์	24
รูปที่ 2.11	ลักษณะอิมัลชันเดี่ยว	30
รูปที่ 2.12	ความเข้มข้นของยาในกระแสเลือดของระบบนำส่งยา	33
รูปที่ 2.13	ลักษณะการปลดปล่อยแบบแพร่ผ่านเมทริกซ์	35
รูปที่ 2.14	ระบบที่ควบคุมการปลดปล่อยยาโดยใช้หลักการละลาย	36
รูปที่ 2.15	ระบบนำส่งยาที่การปลดปล่อยยาถูกควบคุมโดยการละลายของยาในส่วนกักเก็บยา	37
รูปที่ 2.16	โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญในโมเลกุลเคอร์คูมิน	39
รูปที่ 2.17	โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเคอร์คูมิน	41
รูปที่ 3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัย	60
รูปที่ 3.2	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน	63
รูปที่ 3.3	การเกิดปฏิกิริยาของ Elson-Morgan assay	68

รูปที่ 4.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA100) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก สารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ สารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 โดยมีความเข้มข้นของของแข็งรวม 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ 74

รูปที่ 4.2 ลักษณะสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 และมีความเข้มข้นของของแข็งรวม 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ..... 76

รูปที่ 4.3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงลักษณะอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ภายหลังจากขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันและการล้างน้ำมันที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยอะซิโตน โดยเปรียบเทียบอนุภาคที่ใช้ในกระบวนการปั่นขึ้นรูปต่าง ๆ (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอนเมตร)... 79

รูปที่ 4.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงลักษณะอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ภายหลังจากขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันและล้างน้ำมันที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยอะซิโตน โดยเปรียบเทียบอนุภาคที่ใช้ในกระบวนการปั่นขึ้นรูปต่าง ๆ (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอนเมตร)..... 81

รูปที่ 4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงลักษณะอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ยังไม่ผ่านการคัดแยกขนาด ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ภายหลังจากกระบวนการขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอนเมตร) 85

รูปที่ 4.6 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 32-85 ไมครอน ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมครอนเมตร) 86

รูปที่ 4.7 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 32-85 ไมครอน อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก

ต่าง ๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง กราด ขนาดกำลังขยาย 5,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)..... 87

รูปที่ 4.8 ลักษณะสัณฐานภายในของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดย น้ำหนักของไฟโบรอินใหม่ไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF50HA50 ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาค ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 2,000 เท่า (สเกล บาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)..... 88

รูปที่ 4.9 ร้อยละโดยน้ำหนักของปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่จริงในอนุภาคทรงกลมขนาด ไมครอนของไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่าน การเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง..... 98

รูปที่ 4.10 ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินใหม่ไทย และกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วย สารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ภายหลังจากแช่ในน้ำปราศจากไอออน ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในแต่ละช่วงเวลา (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกันที่เวลาเชื่อมขวาง อนุภาคและระยะเวลาการแช่น้ำเท่ากัน)..... 103

รูปที่ 4.11 ปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำภายหลังจากแช่อนุภาคทรงกลมขนาด ไมครอนของไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตรเป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ในน้ำปราศจากไอออน ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในแต่ละช่วงเวลา (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกันที่ เวลาเชื่อมขวางอนุภาคและระยะเวลาการแช่น้ำเท่ากัน) 104

รูปที่ 4.12 ร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินใหม่ ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (เชื่อมขวางอนุภาคด้วย สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง)

ภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์ โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาในการแช่ต่าง ๆ..... 108

รูปที่ 4.13 ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภายหลังการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต และ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ 112

รูปที่ 4.14 ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภายหลังการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต และ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ 113

รูปที่ ก. 1 กราฟแสดงความหนืดตามแบบจำลองของ Huggins และแบบจำลองของ Kramer..... 144

รูปที่ ก. 2 กราฟแสดงความหนืดตามแบบจำลองของ Huggins และแบบจำลองของ Kramer..... 145

รูปที่ ค. 1 ลักษณะฟิล์มของกรดไฮยาลูรอนิกก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (ก และ ข) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ (ค และ ง) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 149

รูปที่ ง. 1 กราฟขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง..... 150

รูปที่ ง. 2 กราฟขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง..... 151

รูปที่ ง. 3 กราฟขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก . 152

รูปที่ จ. 1 กราฟสแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดของสารละลาย N-acetyl-D-glucosamine..... 153

รูปที่ จ. 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetyl-D-glucosamine ที่ความยาวคลื่น 528 นาโนเมตร 154

รูปที่ ข. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยเอทานอล ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ก่อนการละลายในตัวทำละลาย ไดมethylซัลฟอกไซด์ (DMSO) 157

รูปที่ ข. 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยเอทานอล ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ก่อนการละลายในสารละลายผสมของบัฟเฟอร์ฟอสเฟตและ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร.. 157

รูปที่ ข. 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t (M_t) หารด้วยปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_∞) เทียบกับเวลาในการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ของอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ..... 158

รูปที่ ข. 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t (M_t) หารด้วยปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_∞) เทียบกับเวลาในการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ของอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ..... 159

รูปที่ ฉ. 1 ปฏิริยาการเชื่อมขวางโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิคด้วยกลูตารัลดีไฮด์..... 161

บทที่ 1

บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันวัสดุทางการแพทย์ที่ผลิตจากพอลิเมอร์ธรรมชาติได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างมากมา เนื่องด้วยสมบัติเด่นทางชีวภาพ คือ ความสามารถในการเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษต่อเซลล์ในร่างกาย แต่ความแข็งแรงหรือสมบัติทางกลของพอลิเมอร์ธรรมชาติจะไม่สูงมากนัก จึงมีการคิดค้นและพัฒนานำพอลิเมอร์มาผสมเข้าด้วยกัน เพื่อปรับปรุงสมบัติบางประการให้ดียิ่งขึ้น พอลิเมอร์ธรรมชาติที่ได้รับความสนใจตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคือ ไหมไฟโบรอิน ซึ่งเป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติที่มีสมบัติทางกลค่อนข้างดี มีความแข็งแรงสูง ย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยไม่เกิดสารพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันมีรายงานผลการวิจัยเพื่อนำไหมไฟโบรอินมาประยุกต์ใช้ในการด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและระบบนำส่งยาต่าง ๆ มากมาย [1-8] พอลิเมอร์ธรรมชาติที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งคือ กรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งเป็นสารประเภทมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ ละลายน้ำและอุ้มน้ำได้ดี มีความยืดหยุ่นดีมาก แต่โมเลกุลมีความแข็งแรงต่ำ กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารที่ร่างกายสามารถผลิตขึ้นเองได้ จึงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ พบมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สายสะดือของทารกแรกเกิด วุ้นในโพรงลูกตา และน้ำเลี้ยงไขข้อต่าง ๆ เป็นต้น แต่เมื่ออายุมากขึ้นกรดไฮยาลูรอนิกจะเสื่อมสลายไป ทำให้เกิดอาการบาดเจ็บขณะเคลื่อนไหวร่างกายตามข้อต่อ ข้อเข่าต่าง ๆ ในปัจจุบันจึงมีการรักษาโดยการฉีดกรดไฮยาลูรอนิกเข้าสู่ร่างกายโดยตรงเพื่อรักษาระดับน้ำเลี้ยงไขข้อในผู้สูงอายุหรือเต็มวัย ร้อยเหี่ยวบนใบหน้า [9-12] นอกจากนี้ กรดไฮยาลูรอนิกยังส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีอีกด้วย [13-16] และเนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกมีสมบัติทางกลค่อนข้างต่ำ ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายได้ง่าย ดังนั้น การนำไหมไฟโบรอินมาผสมกับกรดไฮยาลูรอนิกจึงเป็นการปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ผสมให้ดียิ่งขึ้น โดยไหมไฟโบรอินเป็นโมเลกุลที่มีความแข็งแรงสูง มีการย่อยสลายได้ช้าเมื่อเทียบกับพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดอื่น ดังนั้น พอลิเมอร์ผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิกจึงมีสมบัติที่ดี เหมาะแก่การนำไปใช้ในการกักเก็บตัวยาหรือสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ เช่น ใช้ในการกักเก็บยารักษาโรคมะเร็ง หรือยาบรรเทาอาการอักเสบของโรคข้อเข่าเสื่อม เป็นต้น

เคอร์คูมินเป็นสารประกอบพอลิฟีนอลที่พบได้ทั่วไปในพืชตระกูลขมิ้นชัน จัดเป็นสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่พืชสร้างขึ้น โมเลกุลของเคอร์คูมินมีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) จึงไม่ละลายในน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอล (Ethanol) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide) เป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำเคอร์คูมินมาใช้ในการงานด้านการแพทย์และเภสัชกรรมมากมาย เนื่องจากเคอร์คูมินมีฤทธิ์ในการรักษาที่มีประสิทธิภาพ เช่น ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ใช้บรรเทาอาการอักเสบหรือการติดเชื้อ [17-19] ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง [20-23] เป็นต้น แต่ด้วยข้อจำกัดของเคอร์คูมินซึ่งมีความไม่ชอบน้ำสูง และมีความเสถียรค่อนข้างต่ำ ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึมอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้การออกฤทธิ์ในบริเวณที่รักษา (Bioavailability) ลดลง ปัจจุบันมีรายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการรักษาความเสถียรของเคอร์คูมินมากมาย โดยใช้พอลิเมอร์เป็นตัวกักเก็บยาเพื่อป้องกันไม่ให้โมเลกุลเคอร์คูมินถูกทำลาย [24-28] .

ทั้งนี้ รูปแบบของวัสดุทางการแพทย์ที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการปลดปล่อยสารที่สามารถกักเก็บและควบคุมการปล่อยสารได้อย่างมีประสิทธิภาพรูปแบบหนึ่ง คือ อนุภาคทรงกลม (Microspheres) เนื่องจากเป็นอนุภาคขนาดเล็ก พื้นที่ผิวสัมผัสต่อปริมาตรสูง ทำให้ดูดซึมตัวยาได้ดี อีกทั้งขนาดของอนุภาคสามารถควบคุมได้ตามต้องการ การเตรียมอนุภาคทรงกลมมีหลายวิธี แต่วิธีที่ง่ายและสะดวก คือ วิธีอิมัลชันเดี่ยว สามารถแบ่งได้เป็น อิมัลชันน้ำมันในน้ำและอิมัลชันน้ำในน้ำมัน การเลือกใช้เทคนิคการเตรียมอนุภาคทรงกลมจะขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์ เช่น กรดไฮยาลูรอนิกมีความชอบน้ำสูง สามารถละลายน้ำได้ดี เทคนิคที่เหมาะสมคือ เทคนิคอิมัลชันน้ำในน้ำมัน ในทางกลับกัน พอลิเมอร์ที่มีความไม่ชอบน้ำหรือละลายน้ำได้ไม่ดีจะเหมาะกับเทคนิคอิมัลชันน้ำมันในน้ำ [29].

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะพัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก โดยใช้เทคนิคอิมัลชันน้ำในน้ำมัน และทำให้อนุภาคเสถียรด้วยการเชื่อมขวางทางเคมี โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ อาทิ อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก อุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาค ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง และเวลาที่ใช้เชื่อมขวาง อนุภาคที่มีต่อลักษณะสัณฐานและสมบัติในด้านต่าง ๆ ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้นอกจากนี้ยังศึกษาความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินในระดับ

ห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นองค์ความรู้ในการประยุกต์ใช้อุณหภูมิของไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินเพื่อการรักษาทางการแพทย์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อหาสภาวะในการเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก

1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก

1.2.3 เพื่อศึกษาความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย พันธุนางน้อย ศรีสะเกษ 1 สารละลายกรดไฮยาลูรอนิกและสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก

1.3.2 เตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ให้มีความเข้มข้นของของแข็งรวมคงที่ที่ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

1.3.3 ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ด้วยกระบวนการอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (Water in Oil emulsion method) โดยมีตัวแปรที่จะศึกษาได้แก่

- ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ได้แก่ 2, 3, 4.5, 6 และ 7
- อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก ได้แก่ SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30
- อุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ได้แก่ 4, 25 และ 50 องศาเซลเซียส

- อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ได้แก่ 1:8 และ 1:16
- เวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางทางเคมีของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ได้แก่ 4, 6 และ 24 ชั่วโมง

1.3.4 วิเคราะห์ลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก

- โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ และขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค (Mastersizer)
- ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลืออยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยใช้เทคนิค Elson-Morgan Assay
- ความเสถียรของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเมื่อแช่น้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (*In Vitro* biodegradation) โดยใช้สารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV (Protease XIV) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.3.5 ศึกษาสมบัติการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

- ศึกษาความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Drug Loading และ Entrapment Efficiency)
- ศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* controlled release)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการพัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพื่อให้อนุภาคมีความเสถียรและคงตัวมากยิ่งขึ้น และสามารถนำไปใช้เป็นระบบควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน เพื่อประยุกต์ใช้ในการรักษาโรค เช่น โรคมะเร็ง และโรคข้อเสื่อม



บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

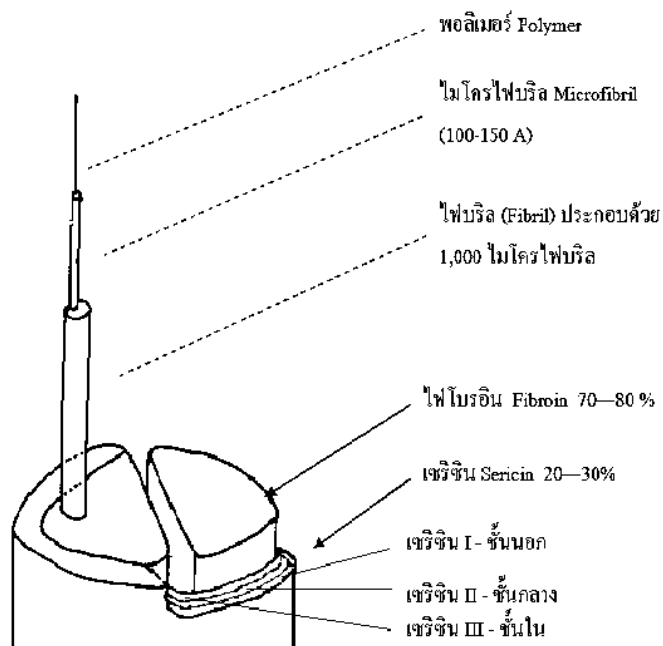
2.1 ชีววัสดุ (Biomaterials)

2.1.1 ไหมจากหนอนไหม (Silkworm silk)

หนอนไหมเป็นแมลงที่มีการเจริญเติบโตแบบวงจรชีวิตสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) โดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และระยะผีเสื้อไหม (ในวิทยานิพนธ์นี้ หมายถึง ไหมจากหนอนไหม) เป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติผลิตจากต่อมไหมของหนอนไหม โดยการพันเส้นใยออกจากท่อพัน (Spinneret) ที่อยู่ด้านข้างของปากหนอนไหม และเกิดการตกผลึกแห้งกลายเป็นเส้นใย เพื่อใช้ในการทอหุ้มตัวในระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นดักแด้ [30] โดยทั่วไปไหมถูกจำแนกออกเป็น 2 ประเภท คือ ไหมบ้านหรือไหมเลี้ยง (Domesticated mulberry silk) ไหมประเภทนี้ได้จากหนอนไหมเลี้ยงที่กินใบหม่อนเป็นอาหาร มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bombyx mori* จัดอยู่ในวงศ์ *Bombycidae* อีกประเภทหนึ่งคือ ไหมป่า (Wild silk or non-mulberry silk) จัดอยู่ในวงศ์ *Saturniidae* ได้จากหนอนไหมที่ไม่กินใบหม่อนแต่จะกินใบไม้จำพวกใบมันสำปะหลัง ใบคาหลา และใบละหุ่ง เป็นต้น

2.1.1.1 โครงสร้างและสมบัติของไหม (Structure and properties of silk)

ไหมเป็นโปรตีนธรรมชาติซึ่งโมเลกุลมีการบิดม้วนตัวเพื่อให้เกิดโครงสร้างที่เสถียรโดยอาศัยอันตรกิริยาทางเคมีระหว่างสายพอลิเปปไทด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนสองตัวเกิดปฏิกิริยาแบบรวมตัว (Condensation reaction) โดยมีพันธะเปปไทด์เชื่อมอยู่ ไหมมีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วนคือ ไฟโบรอิน (Fibroin) และเซรีซิน (Sericin) และมีส่วนประกอบอื่นเพียงเล็กน้อย เช่น น้ำมัน ไขมัน ซัลเฟอร์ คาร์โบไฮเดรต วัตถุสีและสารอินทรีย์ เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างไหมแสดงได้ดังรูปที่ 2.1 โปรตีนทั้งสองส่วนนี้ประกอบด้วย กลุ่มของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 18 ชนิด โดยในไฟโบรอินมีกรดอะมิโนชนิดไกลซีน (Glycine) อยู่มากที่สุด พบประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ และเซรีซินมีกรดอะมิโนชนิดเซอรีน (Serine) อยู่มากที่สุด พบประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบของกรดอะมิโนในรังไหมบ้าน สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไหม [31]

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของไหมบ้าน *Bombyx mori*. [32].

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
ไฟโบรอิน	70-80
เซรีซิน	20-30
ไขมันและซีผึ้ง	0.4-0.8
คาร์โบไฮเดรต	1.2-1.6
สารอินทรีย์	0.7
วัตถุมีสี	0.2
รวมทั้งสิ้น	100

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในไหมบ้าน *Bombyx mori* [33].

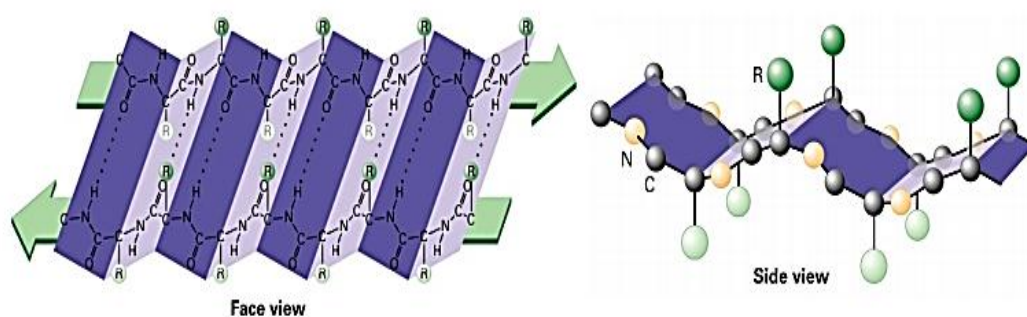
ชนิดของกรดอะมิโน	น้ำหนักโมเลกุล	ปริมาณไฟโบรอิน (เปอร์เซ็นต์โดยมวล)	ปริมาณเซรีซิน (เปอร์เซ็นต์โดยมวล)
Glycine, Gly	75.06	44.60	13.49
Alanine, Ala	89.09	29.40	5.97
Valine, Val	117.15	2.20	2.75
Leucine, Leu	131.17	0.53	1.14
Isoleucine, Ile	131.17	0.66	0.72
Phenylalanine, Phe	165.19	0.63	0.53
Methionine, Met	149.21	0.10	0.04
Tryptophane, Trp	204.23	0.11	0.21
Proline, Pro	115.13	0.36	0.68
Tyrosine, Tyr	181.19	5.17	2.61
Cystine, Cys	240.30	0.20	0.15
Serine, Ser	105.09	12.10	33.43
Threonine, Thr	119.12	0.91	9.74
Aspartic acid, Asp	133.10	1.30	16.71
Glutamic acid, Glu	147.13	1.02	4.42
Histidine, His	155.16	0.14	1.30
Lysine, Lys	146.19	0.32	3.30
Arginine, Arg	174.20	0.47	3.10

ไฟโบรอิน (Fibroin)

ไฟโบรอินเป็นโปรตีนธรรมชาติ โมเลกุลไฟโบรอินประกอบด้วยสายโซ่โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy chain) ที่เชื่อมต่อกับสายโซ่โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Light chain) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide linkage) และไกลโคโปรตีน (P25) [34] สายโซ่น้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของกรดอะมิโน 12 หน่วย มีการจัดเรียงตัวเป็นผลึก (Crystalline) เพราะโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนขนาดเล็กที่มีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบเรียงต่อกันเป็นโอลิโกเปปไทด์ (Oligopeptides) คือ $(\text{Gly-Ala})_n\text{-Gly-Ser}$, $(\text{Gly-Ala})_n\text{-Gly-Tyr}$ และ $(\text{Gly-Val})_n\text{-Gly-Ala}$ โดยที่ n มีค่าในช่วง 1-8 รายงานส่วนใหญ่พบว่า โครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure) ของไหมไฟโบรอินประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนที่แสดงความเป็นผลึก และมีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบจำนวน 6 ตัวคือ $(\text{Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser})_n$ ซึ่งพบประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดในโมเลกุล สายโซ่น้ำหนักโมเลกุลสูงของไฟโบรอินส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำเป็นจำนวนมาก บริเวณปลายสายโซ่ทั้งสองข้างจะแสดงส่วนอสัญฐาน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีหมู่ข้างเคียงขนาดใหญ่ จึงไม่สามารถจัดเรียงตัวเป็นระเบียบได้ เช่น Serine และ Tyrosine กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้มีหมู่ไฮดรอกซิลที่แสดงส่วนชอบน้ำ นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนชนิด Glutamic acid และ Aspartic acid ที่มีประจุคงเหลือในโมเลกุล ทำให้สายโซ่น้ำหนักโมเลกุลสูงของไหมไฟโบรอินแสดงสมบัติเป็นพอลิอิเล็กโทรไลต์ [35] ส่วนสายโซ่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน สายโซ่ส่วนนี้มีความชอบน้ำ ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ไม่ซ้ำกันของกรดอะมิโนที่แสดงประจุ และส่วนสุดท้ายคือ P25 เป็นไกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน สายโซ่ถูกเชื่อมด้วยอันตรกิริยาของส่วนไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) [35]

โครงสร้างทุติยภูมิของไหมไฟโบรอิน มีการจัดเรียงตัว 3 แบบ คือ ไหม I ไหม II และไหม III โดยที่ ไหม I มีโครงสร้างแบบเกลียว α -helix หรือ Random coil สามารถละลายน้ำได้ ส่วนไหม II มีการจัดเรียงตัวเป็นแผ่นพับเบต้าแบบสวนขนาน (Anti-parallel β -pleated sheet) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 แผ่นพับนี้จะซ้อนกันหลายชั้น โดยหันด้านที่มีกรดอะมิโนที่เหมือนกันไว้ด้านเดียวกัน ซึ่งจะแทรกตัวเข้ามาชิดกัน หมู่ข้างเคียงของกรดอะมิโนบนแผ่นพับจะมีอันตรกิริยาแบบแรงแวนเดอร์วาลส์ [30] สายโซ่โมเลกุลของพอลิเปปไทด์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเป็นอันตรกิริยาภายในโมเลกุลที่

แข็งแรงมากพอสามารถป้องกันการแยกของโมเลกุล ทำให้โครงสร้างของไหม II ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือเข้มข้นสูงของลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) และลิเทียมไรโอไซยานาต (LiSCN) เนื่องจาก ที่ความเข้มข้นของเกลือสูง แรงอันตรกิริยาภายในโมเลกุลจะลดลงเพราะถูกบดบังด้วยไอออนของเกลือที่อยู่ในสารละลาย ทำให้ไหมไฟโบรอินสามารถละลายได้ [35] ส่วนไหม III จะมีโครงสร้างแบบเกลียว (Helical structure) เป็นส่วนเชื่อมต่อระหว่างน้ำและอากาศของไหมไฟโบรอิน (Air-water assembled interfacial silk) [36].

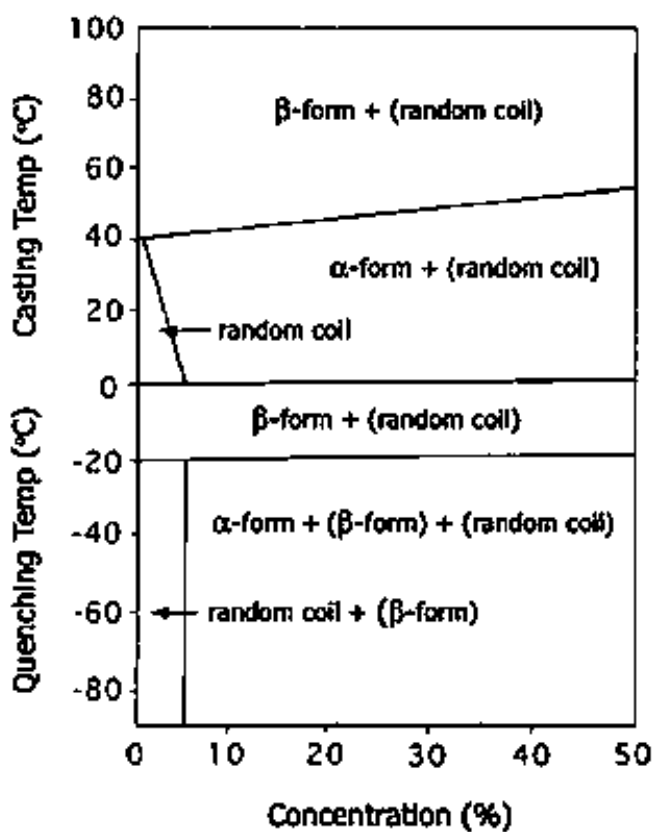


รูปที่ 2.2 โครงสร้างทุติยภูมิของไหมไฟโบรอินแบบแผ่นพับเบต้าแบบสวนขนาน [37].

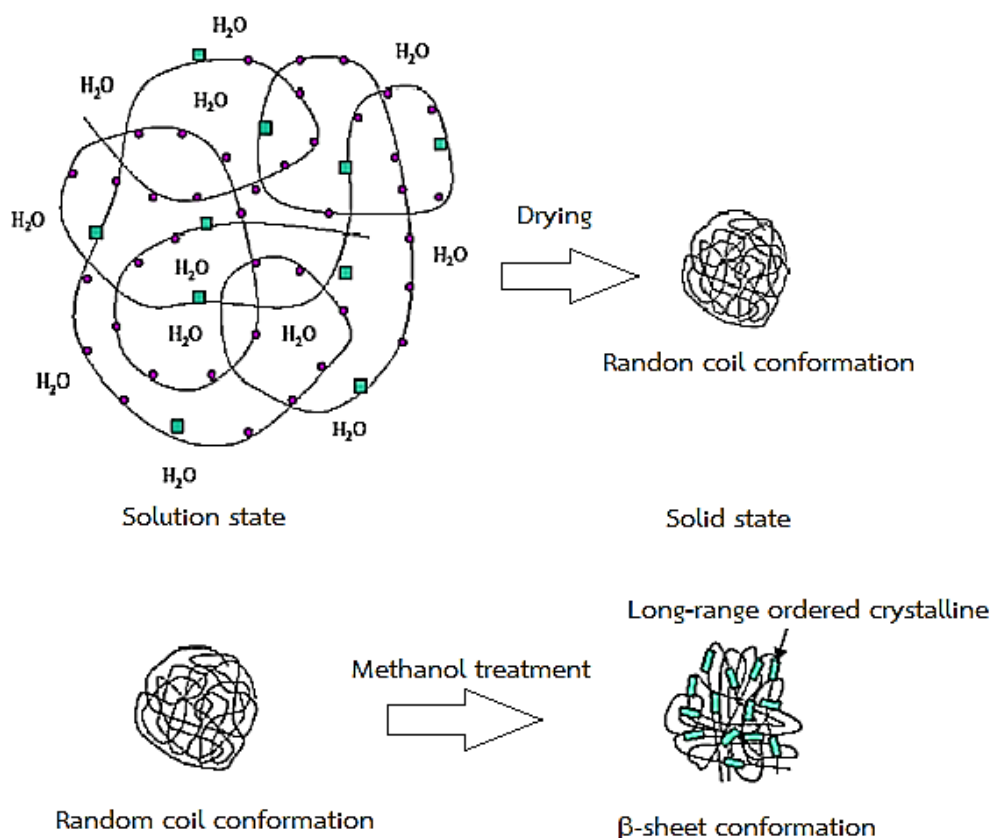
โครงสร้างไหม I เป็นโครงสร้างกึ่งเสถียร (Metastable) สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นไหม II ได้ง่าย ดังนั้น ความสามารถในการละลายและลักษณะสมบัติทางกลของวัสดุที่ผลิตจากไหมไฟโบรอินสามารถควบคุมได้จากการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของไหมไฟโบรอิน ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายไหมไฟโบรอิน อุณหภูมิในการเย็นตัว (Quenching temperature) อุณหภูมิในการทำแห้ง (Drying temperature) ระยะเวลาในการทำแห้ง สนามไฟฟ้า ค่าความเป็นกรดต่างแรงเฉือน เอนไซม์ และสารเคมีบางชนิด [35] ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการจัดเรียงตัวของไหมไฟโบรอินที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงได้ดังรูปที่ 2.3

โครงสร้างของไหม I หรือ Random coil จะเกิดขึ้นเมื่อสารละลายไหมไฟโบรอินมีค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่า 6 ซึ่งโครงสร้างจะแสดงประจุลบ เกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน ทำให้โครงสร้างเกิดแรงผลักดันที่แข็งแรง ส่งผลให้สายโซ่โมเลกุลห่างกัน แต่ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่ำ แรงผลักดันของโมเลกุลจะลดลง ส่งผลให้โมเลกุลเข้าใกล้กันมากขึ้น เกิดอันตรกิริยาของส่วนไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น โมเลกุลจะมีโครงสร้างแบบ

β -sheet และที่ค่าความเป็นกรดต่างเข้าใกล้จุดที่สารมีประจุสุทธิเป็นกลาง (Isoelectric point; IEP~3.8-4.2) สารละลายของไหมไฟโบรอินจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก Random coil เป็น β -sheet ส่งผลให้สารละลายไหมไฟโบรอินเกิดเป็นเจล (Gelation) เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการรวมกลุ่มกันใกล้จุดที่สารมีประจุสุทธิเป็นกลาง เมื่อความเข้มข้นและอุณหภูมิของสารละลายเพิ่มขึ้น การเกิดเจลของไหมไฟโบรอินจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน [35] นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก Random coil เป็น β -sheet นั้นจะทำให้ความเป็นผลึกของไหมไฟโบรอินเพิ่มขึ้น สามารถเกิดได้โดยทำการปรับปรุงด้วยสารละลายเอทานอลหรือเมทานอล [37] แสดงได้ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นของไหมไฟโบรอินที่มีผลต่อการจัดเรียงตัวของโครงสร้างไหมไฟโบรอิน [35]



รูปที่ 2.4 ลักษณะรูปร่างโมเลกุลและการจัดเรียงตัวของไหมไฟโบรอินเมื่อมีการปรับปรุงด้วยเมทานอล [37]

การละลายของไหมไฟโบรอินขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่น ความดัน อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ไหมจะมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากองค์ประกอบของไหมที่เป็นโปรตีน เมื่อโปรตีนถูกความร้อนจะเกิดการคลายตัวและเมื่อให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องพันธะโคเวเลนต์ที่เชื่อมระหว่างสายโปรตีนหรือพันธะเปปไทด์ในสายโปรตีนจะถูกทำลาย นอกจากนี้ เมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น การละลายของไหมจะเพิ่มขึ้น เพราะสายโซ่โมเลกุลของไหมถูกตัดให้สั้นลง ไหมจึงสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น

ไหมไฟโบรอินเป็นเส้นใยโปรตีน มีสมบัติทางกลที่ดี มีความแข็งแรงสูง มีความเหนียวและยืดหยุ่นสูง เข้ากันได้ดีทางชีวภาพ ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ มีความสามารถในการให้ออกซิเจนและไอน้ำผ่านได้ ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 250 องศาเซลเซียส ไม่นำไฟฟ้าและความร้อน [37] ทนต่อการขีดถูและการยืดหดได้ดี เมื่อติดไฟจะลุกไหม้อย่างช้าๆ และจะดับเองเมื่อนำออกจากแหล่งให้ความ

ร้อน นอกจากนี้ยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เนื่องจากเส้นใยไหมส่วนใหญ่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนที่พบในร่างกายมนุษย์ จึงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ [30] สมบัติทางกลบางประการของไหมไฟโบรอิน สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกลของไหมไฟโบรอินเปรียบเทียบกับวัสดุอื่น [38]

Materials	Ultimate Tensile Strength (MPa)	Modulus (GPa)	%Strain at break
<i>B. mori</i> silk (with sericin)	500	5-12	19
<i>B. mori</i> silk (without sericin)	610-690	15-17	4-16
Spider silk	875-972	11-13	17-18
Collagen	0.9-7.4	0.0018-0.046	24-68
Collagen X-linked	47-72	0.4-0.8	12-16
PLA	28-50	1.2-3.0	2-6
Tendon (comprised of mainly collagen)	150	1.5	12
Bone	160	20	3
Kevlar (49 fiber)	3,600	130	2.7
Synthetic Rubber	50	0.001	850

เซรีซิน (Sericin)

เซรีซินเป็นโปรตีนก้อนกลม (Globular protein) ผลิตขึ้นจากต่อมไหมส่วนหน้า (Anterior division) โดยมีน้ำเป็นองค์ประกอบประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่เป็นกาวไหมเคลือบเส้นใยไฟโบรอินเข้าด้วยกันให้เป็นมัดเส้นใยขนาดใหญ่ขึ้น และเป็นสารหล่อลื่นให้กับการเคลื่อนที่ของสารละลายไฟโบรอินจากต่อมไหมของหนอนไหมระยะสุดท้ายพันเส้นใยออกมาเพื่อลดการเสียดสีของไฟโบรอินกับต่อมไหม เนื่องจากไฟโบรอินมีลักษณะค่อนข้างแข็งและมีความหนืดสูง [30] นอกจากนี้เซรีซินยังเป็นส่วนที่ทำให้ไหมมีสีต่างๆ เช่น สีเหลือง สีเหลืองอมน้ำตาล และสีเหลืองอมเขียว ขึ้นกับชนิดพันธุ์ของไหม เซรีซินสามารถแบ่งออกได้ 3 ส่วน คือ เซรีซินชนิดเอ เป็นส่วนชั้นนอกสุดที่ไม่ละลายในน้ำร้อน ประกอบด้วยไนโตรเจนและกรดอะมิโน พบประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ เซรีซินชนิดบี เป็นส่วนเซรีซินชั้นกลาง สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยกรด และเซรีซินชนิดซี เป็นส่วนชั้นในสุดติดกับไฟโบรอิน ในส่วนนี้จะไม่ละลายในน้ำร้อนแต่สามารถแยกจากไฟโบรอินได้โดยละลายในสารละลายกรดหรือด่างอ่อนที่อุณหภูมิสูง หรือที่เรียกว่า การกำจัดกาวไหม (Degumming process) นอกจากนี้เซรีซินยังมีสมบัติเป็นโซลเจล (Sol-gel) คือ สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส และสามารถเปลี่ยนรูปเป็นเจลได้เมื่ออุณหภูมิลดลง และความสามารถในการละลายของเซรีซินจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมสารประกอบประเภทพอลิโซเดียมอะคริเลต (Poly sodium acrylate) และความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อเติมสารประกอบประเภทอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) ฟอรัมาดีไฮด์ (Formaldehyde) หรือเรซินบางชนิด เป็นต้น [39] อีกทั้งเซรีซินยังมีสมบัติในการต้านทานปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต้านทานเชื้อแบคทีเรีย ป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต ดูดซับความชื้นและระบายความชื้นได้ดี [32]

2.1.1.2 การย่อยสลายของไหมไฟโบรอิน (Degradation of silk fibroin)

โดยธรรมชาติแล้ว ไหมไฟโบรอินจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง การย่อยสลายไหมไฟโบรอินจะทำให้ น้ำหนักโมเลกุลของไหมลดลง และในกระบวนการกำจัดกาวไหมออกจากเส้นใยไฟโบรอินด้วยวิธีการต้มรังไหมในสารละลายต่างอ่อน เช่น โซเดียมคาร์บอเนต เป็นเวลานานนั้น จะทำให้เกิดการย่อยสลายแบบไฮโดรไลติก (Hydrolytic degradation) ของโปรตีนไฟโบรอิน อาจส่งผลให้มีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลในช่วงกว้าง [40] นอกจากนี้ การสลายตัวของไหมไฟโบรอินสามารถเกิดได้โดยใช้ เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสารประกอบประเภทโปรตีน เช่น เอนไซม์โปรติเอส

(Protease) ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) และเปปซิน (Pepsin) เป็นต้น ในร่างกายมนุษย์ วัสดุทดแทนที่ผลิตจากไหมไฟโบรอินจะมีการย่อยสลายแบบ Proteolytic degradation อันเกิดจากการตอบสนองของร่างกายที่มีผลต่อสิ่งแปลกปลอม (Foreign body response) นอกจากนี้ ผลของการย่อยสลายของไหมไฟโบรอินในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า เส้นใยไฟโบรอินสูญเสียความแข็งแรงต่อการดึงยึด (Tensile strength) ภายในระยะเวลา 1 ปี [38]

2.1.1.3 กระทบยุคที่ใช้งานของไหมไฟโบรอิน (Applications of silk fibroin)

ไหมเป็นที่รู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมสิ่งทอมาเป็นเวลาหลายศตวรรษ เนื่องจากไหมมีลักษณะมันเงา ดูดซับความชื้นได้ดี มีความคงทนและเป็นเส้นใยธรรมชาติที่ผลิตได้จากสัตว์ จึงมีสมบัติบางประการที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่ได้จากพืช เช่น ฝ้าย หรือเส้นใยสังเคราะห์บางชนิด เสื้อผ้าที่ผลิตจากไหมจะมีสมบัติเด่นในเรื่องการระบายอากาศ ดูดซับความร้อน ระบายความชื้นได้ดี และเมื่อเปรียบเทียบกับผ้าที่ผลิตจากฝ้ายพบว่า ผ้าไหมจะสามารถดูดซับน้ำได้มากกว่าผ้าฝ้าย 1.5 เท่า ระบายความชื้นได้เร็วกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และดูดซับความร้อนไว้ที่เนื้อผ้าได้สูงกว่า 13-21 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผู้สวมใส่รู้สึกสบาย นอกจากนี้ มีการใช้ผ้าไหมในการผลิตเป็นผ้าคลุมเฟอร์นิเจอร์ต่างๆ มากมาย

ในปัจจุบันมีการนำไหมมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์มากขึ้น เนื่องจากไหมไฟโบรอินสามารถผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์ได้ง่ายและหลายรูปแบบ เช่น แผ่นฟิล์ม เส้นใย อนุภาคทรงกลมขนาดเล็ก เมมเบรน และไฮโดรเจล เป็นต้น [34] และเนื่องจากไหมไฟโบรอินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อมนุษย์ จึงทำให้ปัจจุบันมีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากมาย เช่น โครงเลี้ยงเซลล์ของไหมไฟโบรอินสามารถใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูก ส่งเสริมให้เซลล์ข้างเคียงมายึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี เมมเบรนจากไหมไฟโบรอินและวัสดุผสมของไฟโบรอินและพอลิไวนิลแอลกอฮอล์สามารถใช้เป็นเมทริกซ์ในการตรึงเอนไซม์สำหรับงานด้านไบโอเซนเซอร์ [35] หรือใช้ตรวจจับแอนติบอดีซึ่งใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งและโรคเอดส์ได้ [30] ในสภาวะเปียก เมมเบรนจากไหมไฟโบรอินมีความสามารถในการซึมผ่านของออกซิเจนและไอน้ำสูง มีความสามารถในการเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อส่วนอ่อนในร่างกาย จึงมีการประยุกต์ใช้เป็นแผ่นผิวหนังเทียม คอนแทคเลนส์ และกระจกตาเทียม เป็นต้น [35] นอกจากนี้ มีการนำไหมไฟโบรอินมาใช้เป็น

วัสดุทดแทนในงานด้านศัลยกรรมหลอดเลือดและเส้นประสาท โดยใช้ไหมไฟโบรอินเป็นวัสดุทดแทนหลอดเลือด หรือใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์เพื่อกระตุ้นและปรับปรุงการทำงานของเซลล์ประสาทขั้นต้นให้ทำงานดีขึ้น [34] ไหมไฟโบรอินยังสามารถใช้ในงานด้านการนำส่งยาได้ดีอีกด้วย เช่น เจลไฟโบรอินใช้ผลิตเป็นตัวนำส่งยาผ่านทางช่องปากได้ เมมเบรนไฟโบรอินใช้เป็นตัวนำส่งยาและควบคุมการปลดปล่อยยาผ่านผิวหนัง อนุภาคทรงกลมขนาดเล็กจากไฟโบรอินสามารถใช้นำส่งยาผ่านกระเพาะอาหารและลำไส้ เป็นต้น [40]

นอกจากงานด้านสิ่งทอและการแพทย์แล้ว ไฟโบรอินยังสามารถใช้เป็นส่วนผสมในผงซักฟอก เนื่องจากสามารถเคลื่อนย้ายสิ่งสกปรกได้ดี ไซจากดักแต่สามารถผลิตเป็นสบู่และเทียนไขที่มีคุณภาพสูงได้อีกด้วย [30]

2.1.2 กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid)

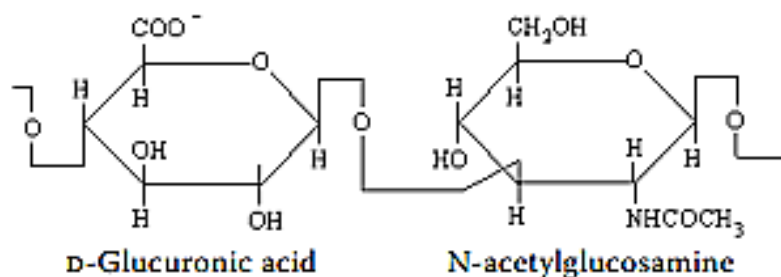
กรดไฮยาลูรอนิก ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1934 โดยนักวิจัยชาวกรีกชื่อ Karl Meyer และ John Palmer ที่มาของชื่อ Hyaluronic acid มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก Hyaloid แปลว่า แก้วหรือใส (glass or vitreous) ร่วมกับ Uronic acid ต่อมามีการเรียกชื่อกรดไฮยาลูรอนิกแตกต่างกันไป เช่น Hyaluronan, Hyaluron และ Hyaluronate เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1942 มีการใช้กรดไฮยาลูรอนิกทางการค้าเป็นครั้งแรกโดย Endre Balaz โดยใช้แทนไขขาวในการทำเบเกอรี่ และในช่วงปลาย ค.ศ. 1950 มีการประยุกต์ใช้กรดไฮยาลูรอนิกทางการแพทย์มากขึ้น

2.1.2.1 โครงสร้างและสมบัติของกรดไฮยาลูรอนิก (Structure and properties of Hyaluronic acid)

กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตชนิด Mucopolysaccharides หรือ Glycosaminoglycan (GAG) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในสิ่งมีชีวิต โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharides) ชนิด N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) และ D-glucuronic acid (GlcA) ที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกันแบบสลับด้วยพันธะ β -(1-3) glucuronidic และพันธะ β -(1-4) glucosaminidic ได้เป็นโครงสร้าง Poly[(1--

>3)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyluronic acid]

[41] ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิก [42]

สมบัติทางกายภาพของกรดไฮยาลูรอนิก

กรดไฮยาลูรอนิกเป็นโมเลกุลที่มีความหนาแน่นสูง มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10^4 - 10^7 ดาลตัน เป็นสารประเภทกรดอ่อนเพราะในโครงสร้างโมเลกุลมีหมู่คาร์บอกซิลที่แสดงความเป็นกรดเพียงหมู่เดียวเท่านั้น กรณีที่เป็นสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก สายโซ่หลักของโมเลกุลจะมีความแข็งแรงมากเนื่องจากโมเลกุลประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีของไดแซคคาไรด์ที่มีพันธะไฮโดรเจนอยู่ภายในโมเลกุลมากมาย สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารอื่นได้ง่าย อะตอมของไฮโดรเจนที่ตั้งฉากกับระนาบของสายโซ่ (Axial) จะอยู่ในรูปโมเลกุลไม่มีขั้ว สัมพันธ์กับส่วนไม่ชอบน้ำของโมเลกุล ส่วนอะตอมของไฮโดรเจนที่ขนานกับระนาบของสายโซ่ (Equatorial) จะอยู่ในรูปโมเลกุลมีขั้วและสายโซ่มีความชอบน้ำมากกว่า ด้วยโครงสร้างลักษณะนี้ทำให้กรดไฮยาลูรอนิกมีการจัดเรียงตัวแบบ twisting ribbon structure และสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมีการจัดเรียงตัวแบบ random coil นอกจากนี้ กรดไฮยาลูรอนิกยังมีสมบัติเป็นสารหล่อลื่น อุ้มน้ำได้ดีเนื่องจากในโมเลกุลมีการจัดเรียงตัวเป็นขดที่แข็งแรง (Stiffened helical structure) ทำให้โครงสร้างมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลตลอดความยาวของสายโซ่โมเลกุล มีผลทำให้โครงสร้างสามารถดูดซับน้ำได้มากกว่าน้ำหนักโมเลกุลของตัวเองถึง 1,000 เท่าโดยประมาณ [41]

สมบัติการไหลของกรดไฮยาลูรอนิก

พฤติกรรมทางพลศาสตร์ (Hydrodynamics behavior) ของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถอธิบายได้จากสมบัติการไหลของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก คือ ความหนืดของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกจะเป็นฟังก์ชันเชิงซ้อน (Complex functions) ขึ้นกับ ความเข้มข้นของเกลือ ค่าความเป็นกรดต่างและอัตราเฉือน (Shear rate) โดยพบว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลายต่ำ เมื่อเพิ่มอัตราเฉือนจะทำให้กรดไฮยาลูรอนิกแสดงพฤติกรรมการไหลแบบซูโดพลาสติก (Pseudoplastic or shear thinning fluid) ส่งผลให้ความหนืดของสารละลายลดลง ไหลได้ง่ายขึ้น ลักษณะพฤติกรรมเช่นนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในกรณีการให้แรงกระทำต่อสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกภายใต้ความดัน เช่น การฉีดสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ [43] และที่ความเข้มข้นของสารละลายสูงขึ้น ความหนืดจะเป็นตัวกำหนดสมบัติการไหลของพอลิเมอร์ กรดไฮยาลูรอนิกที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะมีลักษณะคล้ายเจล (Jelly) ไหลได้ยาก [42] และที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2.5 สารละลายกรดไฮยาลูรอนิกจะแสดงพฤติกรรมการไหลที่แตกต่างจากค่าความเป็นกรดต่าง 1.5 และ 7 โดยที่ค่าความเป็นกรดต่าง 2.5 สารละลายกรดไฮยาลูรอนิกจะมีความยืดหยุ่นมากกว่า และจะแสดงพฤติกรรมแบบ Paste-like behavior คือสารจะมีลักษณะกึ่งของแข็งกึ่งของเหลว พฤติกรรมเช่นนี้ไม่ได้เกิดจากการเชื่อมขวางภายในโมเลกุลด้วยพันธะโคเวเลนต์หรือเกิดการเกี่ยวพันของสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก แต่อาจเกิดจากความสมดุลวิกฤติ (Critical balance) ของแรงผลักที่เกิดจากหมู่คาร์บอกซิลที่แสดงประจุ (Still-ionized carboxyl group) กับแรงดึงดูดที่เกิดจากแรงทางไฟฟ้าสถิตย์หรือพันธะไฮโดรเจนบนสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกเอง [43]

ความเป็นพิษต่อเซลล์

รายงานวิจัยที่ศึกษาผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ของกรดไฮยาลูรอนิกพบว่า กรดไฮยาลูรอนิกมีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากภายในร่างกายสิ่งมีชีวิตมีกรดไฮยาลูรอนิกที่มีโครงสร้างเหมือนกัน (Structural homology across species) และมีอันตรกิริยากับองค์ประกอบของเลือดต่ำ [42]

2.1.2.2 แหล่งที่พบและการสกัด (Sources and Extraction)

กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารที่ร่างกายมนุษย์สามารถผลิตขึ้นได้เอง พบทั่วไปในบริเวณจุดเชื่อมต่อของอวัยวะและเซลล์ เช่น จุดเชื่อมต่อบริเวณหัวเข่า กระดูกอ่อน ผิวหนัง หรือพบในสายสะดือของทารกแรกเกิด น้ำไขข้อ วุ้นในโพรงลูกตา ตับ ไต สมอง และเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เป็นต้น ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกในสิ่งมีชีวิตแสดงได้ดังตารางที่ 2.4

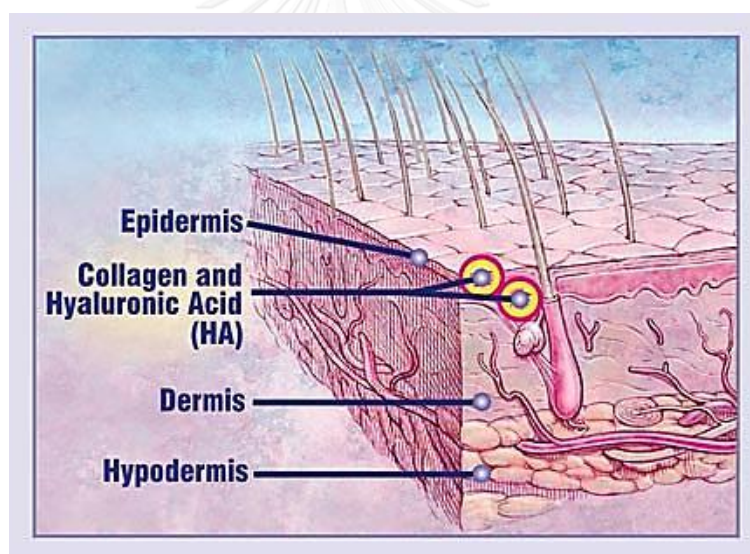
ตารางที่ 2.4 ปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิกที่อวัยวะต่างๆ [44]

Organ system	Total hyaluronic acid, mg.	Percentage
Whole rat	60.5	100.0
Skin	33.8	55.9
Muscles	4.69	7.8
Skeleton and supporting structure	16.2	26.8
Intestines and stomach	0.50	0.8
Remaining internal organ	5.25	8.7

การสกัดกรดไฮยาลูรอนิกจะสกัดมาจากสายสะดือของมนุษย์ (Umbilical cord) ภายหลังมีการสกัดกรดไฮยาลูรอนิกจากหงอนไก่ (Rooster combs) ซึ่งมีความบริสุทธิ์และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง [42] การสกัดกรดไฮยาลูรอนิกทำได้โดยแช่แข็งสายสะดือมนุษย์และหงอนไก่เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นจะสกัดกรดไฮยาลูรอนิกโดยใช้น้ำร่วมกับการตกตะกอนของตัวทำละลายบางชนิด เช่น คลอโรฟอร์ม เอทานอล และ cetylpyridinium chloride เป็นต้น นอกจากนี้ กรดไฮยาลูรอนิกยังสามารถสกัดได้จากแบคทีเรียชนิด *Streptococcus equi* และ *Streptococcus zooepidemicus* ผ่านกระบวนการหมัก กรดไฮยาลูรอนิกที่ได้จากแบคทีเรียชนิด *Streptococcus equi* จะมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่ได้จากแบคทีเรียชนิด *Streptococcus zooepidemicus* และกรดไฮยาลูรอนิกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียจะมีปริมาณผลได้มากกว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่สกัดจากสิ่งมีชีวิตโดยตรง [43]

2.1.2.3 การประยุกต์ใช้งานกรดไฮยาลูรอนิก (Applications of hyaluronic acid)

เนื่องจากสมบัติเด่นของกรดไฮยาลูรอนิก คือ ความสามารถในการอุ้มน้ำ จึงทำให้กรดไฮยาลูรอนิกเป็นสารลดความต้านทานต่อการเสียดสี เพิ่มความยืดหยุ่นในร่างกายมนุษย์ กรดไฮยาลูรอนิกบริเวณผิวหนังจะถูกผลิตขึ้นที่ผิวหนังชั้นล่าง (Dermis) และกระจายตัวไปถึงผิวหนังชั้นบน (Epidermis) แสดงในรูปที่ 2.6 มีข้อดีคือ ช่วยกักเก็บน้ำและความชุ่มชื้นได้มาก ทำให้ผิวหนังแลดูอ่อนเยาว์ เรียบเนียน แต่เมื่ออายุประมาณ 30-40 ปี ร่างกายจะผลิตกรดไฮยาลูรอนิกลดลง จึงอาจทำให้เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่น หรือผิวขาดความชุ่มชื้นได้ ในปัจจุบันจึงมีการนำกรดไฮยาลูรอนิกมาใช้เป็นสารตัวเติมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง



รูปที่ 2.6 ที่อยู่ของกรดไฮยาลูรอนิกในชั้นผิวหนัง [45]

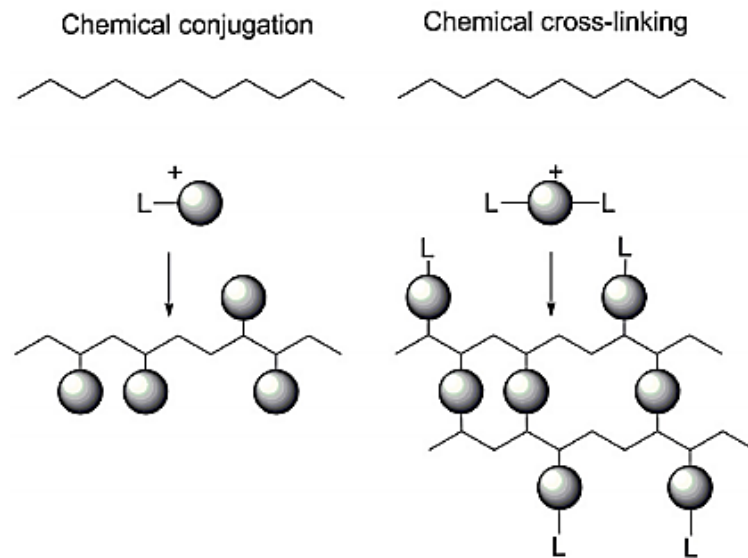
ในทางการแพทย์ กรดไฮยาลูรอนิกเป็นตัวเลือกที่ดีมากในการใช้เป็นวัสดุที่ช่วยในการสร้างเซลล์ผิวหนัง รักษารอยแผลเป็น หรือใช้เป็นวัสดุทดแทนผิวหนัง กรดไฮยาลูรอนิกสามารถใช้เป็นตัวสมานแผล สามารถรักษาอาการบาดเจ็บของเซลล์ผิวหนังได้เร็วขึ้นถึง 80 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติการไหลเวียนของเลือดจะเป็นตัวนำของเสียออกจากเซลล์ แต่สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้ต่อกับเส้นเลือดโดยตรง กรดไฮยาลูรอนิกจะช่วยเพิ่มการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์และยังช่วยกำจัดของเสียออกจากเซลล์เหล่านั้นได้ดีอีกด้วย นอกจากนี้ มีการประยุกต์ใช้กรดไฮยาลูรอนิกในงานด้านการรักษาโรคกระดูก

และกล้ามเนื้อ เช่น โรคไขข้อเสื่อม เป็นต้น กรดไฮยาลูรอนิกมีบทบาทสำคัญในการพัฒนากระดูกอ่อน และรักษาระดับน้ำไขข้อ สร้างเนื้อเยื่อเอ็นกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาและปรับปรุงสมบัติด้านการไหลของกรดไฮยาลูรอนิกให้ดียิ่งขึ้น เพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านการแพทย์มากขึ้น โดยใช้รักษาและบรรเทาอาการบาดเจ็บของกระดูกข้อต่อต่างๆ อันเนื่องมาจากการเสียดสี ซึ่งประโยชน์ในระยะยาวคือ ช่วยฟื้นฟูการไหลของน้ำไขข้อ (Transsynovial flow) ทำให้เกิดภาวะสมดุลของระดับน้ำไขข้อในข้อต่อต่าง ๆ กรดไฮยาลูรอนิกมีความชอบน้ำสูง จึงมีการประยุกต์ใช้ในงานด้านศัลยกรรม โดยใช้เป็นตัวต่อต้านการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดภายหลังการผ่าตัด มีผลทำให้บาดแผลฟื้นตัวช้า อาจเกิดการติดเชื้อ ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อคนไข้ ในปัจจุบันมีการใช้กรดไฮยาลูรอนิกในการป้องกันการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียในวัสดุทางด้านทันตกรรม เลนส์สายตา หรือท่อที่สอดเข้าไปในร่างกายมนุษย์ เป็นต้น ในงานด้านศัลยกรรมดวงตาจะนิยมฉีดกรดไฮยาลูรอนิกเพื่อใช้ในการรักษารูปร่างของพื้นที่ของของเหลวที่อยู่ในดวงตา (Anterior chamber) ใช้เป็นตัวเพิ่มความหนืดของน้ำตา และช่วยซ่อมแซมฟื้นฟูเนื้อเยื่อในดวงตา เป็นต้น

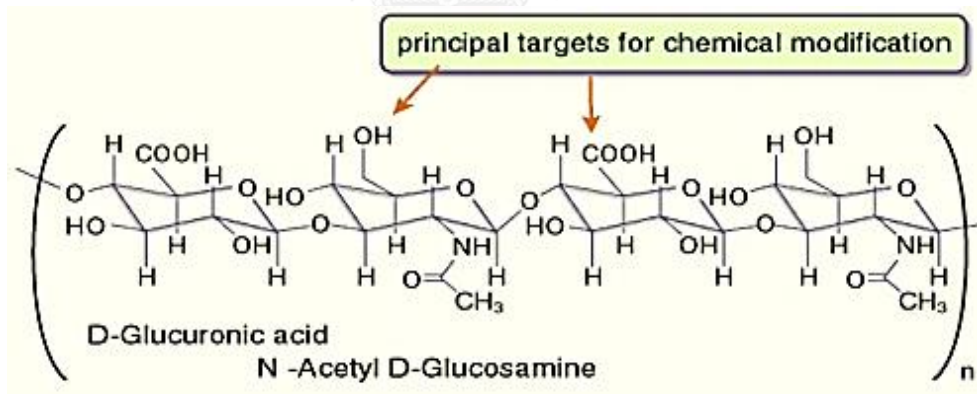
2.1.2.4 การปรับปรุงทางเคมี (Chemical modification)

การปรับปรุงทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การคอนจูเกต (Conjugation) และการเชื่อมขวาง (Crosslinking) สำหรับการคอนจูเกต สารประกอบจะถูกเชื่อมต่อบนสายโซ่โมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิกเพียงพันธะเดียวเท่านั้น ส่วนการเชื่อมขวางจะเกิดขึ้นเมื่อสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกแต่ละสายมาเชื่อมต่อกันอย่างน้อย 2 พันธะ ดังแสดงในรูปที่ 2.7

การปรับปรุงสมบัติทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิกจะเกิดผ่านหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ คือ หมู่คาร์บอกซิลและหมู่ไฮดรอกซิล ดังแสดงในรูปที่ 2.8 การเชื่อมขวางและการคอนจูเกตกรดไฮยาลูรอนิกสามารถทำได้หลายวิธี บางวิธีอาจต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เช่น ไดเมทิลฟอร์มมาเมต (Dimethyl formamate; DMF) หรือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide; DMSO) เป็นต้น เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกสามารถละลายน้ำได้ดี วิธีที่ง่ายที่สุดในการปรับปรุงสมบัติทางเคมีที่ใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำ คือ การควบคุมค่าความเป็นกรดต่างให้อยู่ในช่วงที่มีความเป็นกรดหรือด่างที่เหมาะสม จะส่งผลให้สายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดปฏิกิริยาได้ดี [46] สารเชื่อมขวางที่ใช้จะแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงสมบัติทางเคมีของโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิก



รูปที่ 2.7 ลักษณะการคอนจูเกตและการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิก [46]

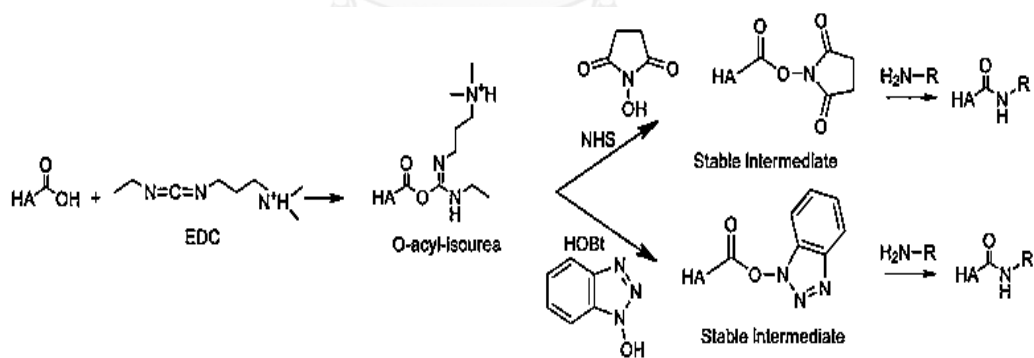


รูปที่ 2.8 กรดไฮยาลูรอนิกที่แสดงหน่วยย่อยที่ซ้ำกันของไดแซ็กคาไรด์ และตำแหน่งสำหรับการปรับปรุงทางเคมี [47]

2.1.2.4.1 การปรับปรุงหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group modification)

การปรับปรุงหมู่คาร์บอกซิล สามารถเกิดผ่านปฏิกิริยา Amidation โดยใช้สารเชื่อมขวางประเภท Carbodiimides เช่น 1-ethyl-3-[3-dimethylamino-propyl]-carbodiimides (EDC) ซึ่งเป็นสารเชื่อมขวางที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยโมเลกุลของ EDC จะเกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่บนสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดเป็นหมู่เอไมด์ และการใช้สารอื่นร่วมกับ EDC จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์มากขึ้น เช่น N-hydroxy succinimide (NHS) และ 1-hydroxybenzo triazole (HOBt) ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ปฏิกิริยา Amidation ยังสามารถเกิดได้โดยใช้สารเชื่อมขวางชนิดอื่น เช่น 2-chloro-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT), 2-chloro-1-methylpyridinium iodide (CMPI) และ Carbonyl diimidazole เป็นต้น นอกจากนี้ การปรับปรุงหมู่คาร์บอกซิลสามารถเกิดผ่านปฏิกิริยา Ugi condensation โดยใช้ Diamine เป็นสารเชื่อมขวาง เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป จะเกิดเป็นพันธะ diamide เชื่อมต่อกันระหว่างสายโซ่โมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ [46]

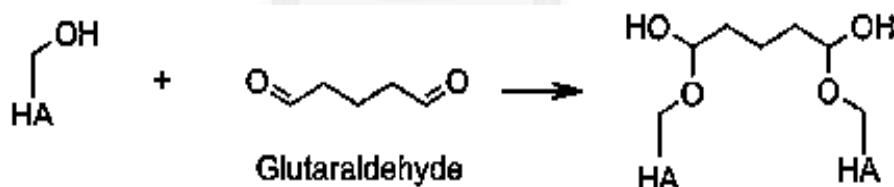
การปรับปรุงหมู่คาร์บอกซิลยังสามารถเกิดเป็นพันธะเอสเทอร์ได้โดยผ่านปฏิกิริยา Alkylation ซึ่งใช้สารเชื่อมขวางประเภท Alkyl halides เช่น Alkyl iodide และ Alkyl bromide เป็นต้น หรือใช้สารเชื่อมขวางประเภท Epoxides และ Diazomethane เป็นต้น



รูปที่ 2.9 การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกด้วย EDC ร่วมกับ NHS หรือ HOBt [46]

2.1.2.4.2 การปรับปรุงหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group modification)

การปรับปรุงหมู่ไฮดรอกซิลสามารถเกิดเป็นพันธะอีเทอร์ โดยใช้สารประเภทอีพอกไซด์ (Epoxides) เช่น Butanediol-diglycidyl ether (BDDE) ในตัวกลางที่เป็นต่าง โดยใช้ปฏิกิริยาการเปิดวงของอีพอกไซด์ เพื่อสร้างพันธะอีเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก หรือใช้สารเชื่อมขวางประเภทไดไวนิลซัลโฟน (Divinyl sulfone; DVS) ในตัวกลางที่เป็นต่าง โดยปฏิกิริยาจะเกิดการสร้างพันธะ Sulfonyl bis-ethyl ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก นอกจากนี้ การปรับปรุงหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลยังสามารถเกิดเป็น Hemiacetal ได้ โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวางในตัวกลางที่เป็นอะซิโตนและน้ำ ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมขวางได้โดยทำในตัวกลางที่เป็นกรด (pH ~ 2) เพื่อเป็นการกระตุ้นหมู่แอลดีไฮด์ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.10 การปรับปรุงหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลยังสามารถเกิดเป็นพันธะเอสเทอร์ได้ โดยใช้สารเชื่อมขวางประเภทแอนไฮไดรด์ (Anhydrides) เช่น Octenyl succinic anhydride (OSA) ในตัวกลางที่เป็นต่าง โดยหมู่ไฮดรอกซิลในสายโซ่โมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิกจะเกิดปฏิกิริยากับหมู่แอนไฮไดรด์ เกิดเป็นพันธะเอสเทอร์ [46] การปรับปรุงสมบัติทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิก สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.5



รูปที่ 2.10 การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [46]

2.1.2.5 การย่อยสลายของกรดไฮยาลูรอนิก (Degradations of hyaluronic acid)

การย่อยสลายของกรดไฮยาลูรอนิกจะทำให้สายโซ่โมเลกุลมีขนาดเล็กและน้ำหนักโมเลกุลลดลง การย่อยสลายสามารถเกิดขึ้นได้หลายวิธี เช่น การใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (Ultrasonication) วิธีนี้เป็นการให้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงกว่า 20 kHz แก่สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ยิ่งเวลาในการให้

คลื่นเสียงความถี่สูงมากขึ้น การย่อยสลายของกรดไฮยาลูรอนิกจะเกิดได้มากขึ้น การย่อยสลายวิธีนี้จะเกิดแบบเจาะจง (Nonrandom fashion) มีผลทำให้การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลมีค่าคงที่ โดยกรดไฮยาลูรอนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกย่อยสลายช้ากว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และการย่อยสลายจะเกิดแบบไม่สมบูรณ์ คือ สายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกจะไม่ถูกย่อยสลายจนกลายเป็นมอนอเมอร์

นอกจากนี้ กรดไฮยาลูรอนิกสามารถย่อยสลายได้โดยใช้ความร้อนและการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างคือ ในช่วงค่าความเป็นกรดต่างสูง (Alkaline) พันธะไฮโดรเจนที่อยู่ในสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกจะถูกทำลาย ส่งผลให้เกิดการสูญเสียความแข็งแกร่งภายในโครงสร้าง (Intrinsic stiffness) การวัดสมบัติการไหลของกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่นพบว่าเมื่อให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้น ความหนืดของสารละลายจะลดลงเป็นฟังก์ชันของเวลา มีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกลดลง การสลายตัวของพอลิเมอร์แบบเรดิคัลอิสระ (Free radical depolymerization) ของโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิกสามารถเกิดขึ้นได้โดยผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของไฮยาลูรอนิกลดลงอย่างรวดเร็ว ในทางกลับกันกระบวนการแช่แข็งสลับการละลาย (Freeze-thaw cycles) จะไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก การสลายตัวของกรดไฮยาลูรอนิกแบบเรดิคัลอิสระจะเกิดไฮดรอกซีเรดิคัลที่มีความว่องไวสูง ซึ่งเรดิคัลอิสระนี้จะทำลายหมู่ข้างเคียงของสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกอย่างอิสระ ส่งผลให้สายโซ่หลักของโมเลกุลถูกทำลายเมื่อระยะเวลาการสลายตัวเพิ่มขึ้น อีกทั้ง กรดไฮยาลูรอนิกสามารถย่อยสลายได้โดยใช้รังสีบางชนิด เช่น การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV irradiation) โอโซนภายใต้ชั้นบรรยากาศ (Ozone-air atmosphere) จะทำให้ความหนืดของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกลดลง ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของสารลดลงเช่นกัน เช่น เมื่อดวงตาคนเราเจอกับหมอกควันและแสงแดดจัด จะเกิดการระคายเคืองตา สามารถอธิบายได้ว่า กรดไฮยาลูรอนิกที่อยู่ในวุ้นในโพรงลูกตาเกิดการสลายตัว เป็นต้น กรดไฮยาลูรอนิกยังสามารถสลายตัวได้ด้วยเอนไซม์ Hyaluronases หรือ Hyases ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ Testicular Lysosomal และ Venom hyases โดยการสลายตัวสามารถเกิดขึ้นได้อย่างอิสระผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส [43]

ตารางที่ 2.5 สรุปการปรับปรุงทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิก [46]

HA target site	Reaction type	Activator	Reagents	Solvent
-COOH	Amidation	- Carbodiimides - CMPI - CDMP	- EDC, NHS - CMPI - CDMT, NMM	- Water (pH 4.8-7.5) - DMSO - Water/acetonitrile
	Ugi condensation		- Formadehyde - Diamines	- Water (pH 3)
	Esterification	- Diazomethane Alkyl halides	- Trimethylsilyl acetic acid - Alkyl iodides	- DMSO - DMSO - DMSO
		- Tetraethylene glycol tosylate - Bisepoxides	- Tetraethylene glycol tosylate - Butanediol- diglycidylether	- DMSO - Water (pH 2-5)
Oxidation		- Sodium periodate	- Sodium periodate	- Water
-OH	Ether formation	- Bisepoxides	- Diepoxybutane - Epichlorohydrin	- Water(0.2M NaOH - Water (pH10, 9))
	Hemiacetal formation	- Divinylsulfone - Ethylenesulfide	- Divinylsulfone - DTT	- Water(1M NaOH) - Water (pH8.5-10)
	Esterification	- Glutaraldehyde	- Glutaraldehyde	- Water (pH 2)
	Carbamate formation	- A kyl succinic anhydride - Acyl chloride activatedcaboxylate	- Octenylsuccinic anhydride	- Water (pH 9) - DMSO
-NHCOCH ₃	Deacetylation/a midation	Hydrazide sulfate		Water followed by DMSO

2.2 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Microspheres)

อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนสามารถผลิตได้จากวัสดุธรรมชาติและวัสดุสังเคราะห์ ลักษณะของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีทั้งแบบอนุภาคตัน (Solid microsphere) และแบบอนุภาคกลวงที่มีโพรงภายใน (Hollow microsphere) ซึ่งทั้งสองแบบนี้มีการนำไปประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ มากมาย ขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการใช้งาน เช่น ในงานที่ต้องการความหนาแน่นต่ำ จะเลือกใช้อุภาคทรงกลมขนาดไมครอนแบบกลวงเป็นตัวเติมในวัสดุ ในงานทางด้านการนำส่งยา จะเลือกใช้อุภาคทรงกลมขนาดไมครอนแบบอนุภาคตันเป็นตัววัสดุให้ตัวยาคูดซึมเข้ามาในอนุภาค กระบวนการขึ้นรูปหรือการผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่แตกต่างกัน จะมีผลต่อขนาดและลักษณะสมบัติของอนุภาค สรุปได้ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 หลักการพิจารณาลักษณะสมบัติต่างๆ ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน [48]

No.	Properties	Consideration
1	Size	Diameter Uniformly / distribution
2	Composition	Density Refractive index Hydrophobicity / hydrophilicity Nonspecific binding Autofluorescence
3	Surface chemistry	Reactive groups Level of functionalization Charge
4	Special properties	Visible dye / fluorophore Super-paramagnetic

2.2.1 การประยุกต์ใช้งานอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Applications of microsphere)

การนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมาใช้ในงานด้านการแพทย์ ส่วนมากจะใช้เป็นวัสดุนำส่งยา โดยมีข้อดีคือ ช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญ อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจะให้ผลการรักษาในระยะยาวที่คงที่เพราะอนุภาคมีขนาดเล็ก พื้นที่ผิวสัมผัสมาก สามารถดูดซึมตัวยามาก สามารถให้การรักษาแบบฉีดเข้าสู่ร่างกายได้โดยตรงเพราะอนุภาคมีขนาดเล็กสามารถผ่านรูหัวเข็มฉีดยาได้ ในงานด้านการนำส่งยา มีการใช้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเป็นวัสดุนำส่งยาเข้าสู่ดวงตา (Ophthalmic drug delivery) เพื่อรักษาอาการอักเสบของดวงตาเนื่องจากแบคทีเรียหรือฝุ่นละออง นอกจากนี้ยังสามารถนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนนำส่งยาผ่านจมูก (Nasal drug delivery) โดยภายในจมูกจะมีเยื่อเมือก โพลีเมอร์ที่ใช้ผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนต้องมีสมบัติการยึดเกาะทางชีวภาพที่ดี สามารถบวมตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสกับเยื่อเมือก ตัวยาก็สามารถถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งมีการนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนนำส่งยาผ่านช่องคลอดเพื่อใช้ในการรักษาอาการอักเสบเนื่องจากเชื้อราในระบบทางเดินปัสสาวะได้

นอกจากนี้ ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง มีการนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมาใช้ในการกักเก็บ (Encapsulation) สารที่ให้กลิ่นรสและสารเติมแต่งต่าง ๆ เช่น น้ำมันหอมระเหย อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจะช่วยลดการระเหยของสารที่ระเหยง่ายได้ หรือใช้กักเก็บวิตามินหรือสารสำคัญบางชนิดในเครื่องสำอาง เพื่อให้สารสำคัญคงอยู่ได้นาน ไม่ถูกย่อยสลายก่อนการใช้งาน เป็นต้น

2.2.2 เทคนิคการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Fabrications of microsphere)

วิธีการผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีหลายวิธี เช่น

1. **วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying)** วิธีนี้โพลีเมอร์จะถูกละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยได้ ตัวยาหรือสารสำคัญจะอยู่ในรูปของแข็งที่กระจายตัวอยู่ในสารละลายโพลีเมอร์ ภายใต้การปั่นกววนที่ความเร็วรอบสูง สารละลายโพลีเมอร์จะถูกพ่นฝอยออกมาเป็นหยดเล็กๆ เมื่อตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยออกไปก็จะได้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ข้อดีของวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการผลิตเร็วและขั้นตอนการผลิตสามารถทำในสภาวะปลอดเชื้อได้ แต่ค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง อีกทั้งตัวยา

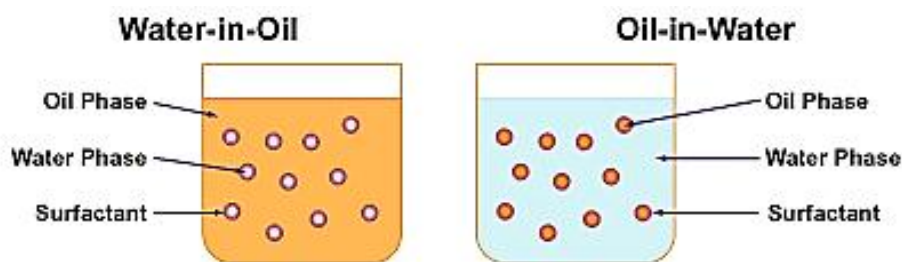
หรือพอลิเมอร์ที่มีจุดเดือดต่ำมีโอกาสเกิดการย่อยสลายเนื่องจากความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิต

2. วิธีการสกัดตัวทำละลายออก (Solvent extraction) วิธีนี้ใช้พอลิเมอร์ผสมกับตัวยาหรือสารสำคัญที่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นทำการปั่นกวนที่ความเร็วรอบสูงให้สารเกิดเป็นหยดเล็กๆ อาจมีการเติมตัวทำอิมัลชันลงไปเพื่อให้หยดเล็กๆ เกิดเป็นอนุภาคทรงกลมที่เสถียรยิ่งขึ้น จากนั้นทำให้สารละลายพอลิเมอร์ที่มีตัวยาหรือสารสำคัญแข็งตัว แล้วสกัดตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยการให้ความร้อน อัตราที่ตัวทำละลายถูกสกัดออกไปจะขึ้นกับอุณหภูมิของน้ำ อัตราส่วนของอิมัลชันต่อน้ำ และค่าการละลายของพอลิเมอร์ เป็นต้น

3. เทคนิคการแยกวัฏภาคแบบ Coacervation วิธีนี้จะใช้หลักการของการลดลงของค่าการละลายของพอลิเมอร์ที่อยู่ในวัฏภาคอินทรีย์ (Organic phase) มีผลทำให้เกิดวัฏภาคที่มีพอลิเมอร์อยู่มาก (Polymer rich phase) เรียกว่า Coacervate โดยกระบวนการจะเกี่ยวข้องกับการปรับสภาพของพอลิเมอร์ 2 ชนิด ที่มีประจุตรงข้ามกันให้อยู่ในสภาวะที่มีประจุเป็นกลาง ทำได้โดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ การเปลี่ยนค่าความเป็นกรดต่าง และการเติมเกลือไอออนิกคลงในสารละลายผสม ซึ่งอนุภาคที่ได้จากวิธีนี้จะมีโอกาสเกิดการเกาะรวมกลุ่มกัน (Agglomeration) ดังนั้น ต้องควบคุมอัตราการปั่นกวนสารแขวนลอยหรือ Coacervate ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม

4. เทคนิคอิมัลชัน เทคนิคนี้จะแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ อิมัลชันเดี่ยว (Single emulsion) และอิมัลชันเชิงซ้อน (Multiple emulsions) สำหรับระบบที่เป็นอิมัลชันเดี่ยวจะประกอบด้วยของเหลว 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคภายใน (Internal phase or disperse phase) และวัฏภาคภายนอก (External or continuous phase) วัฏภาคภายในจะกระจายตัวแทรกอยู่ในวัฏภาคภายนอกโดยมีตัวทำอิมัลชัน (Emulsifier) เป็นตัวผสมผสานวัฏภาคทั้งสองเข้าด้วยกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.11 ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันจะส่งผลต่อขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน อิมัลชันเดี่ยวจะมีทั้งชนิดอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (Oil-in-Water) และอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (Water-in-Oil) ข้อดีของระบบนี้คือ ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานหรือเครื่องมือที่ซับซ้อน สามารถใช้กับสารได้หลากหลาย ทั้งสารที่ขอบน้ำมันและสารที่ขอบน้ำ แต่ความคงตัวของอิมัลชันจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดต่างของสาร เป็นต้น ส่วนระบบที่เป็นอิมัลชันเชิงซ้อน หรือระบบอิมัลชันคู่ (Double emulsion) ระบบนี้จะเป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ ซึ่งเป็น

ของเหลวต่างชนิดกัน เช่น อิมัลชันน้ำในน้ำมันในน้ำ (Water-in-Oil-in-Water) หรือ อิมัลชันน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (Oil-in-Water-in-Oil) และมีการเติมตัวทำอิมัลชันลงไปเพื่อทำให้อนุภาคเสถียรยิ่งขึ้น ซึ่งปริมาณตัวทำอิมัลชันที่เติมลงไปนั้นจะใช้ปริมาณมากกว่าเทคนิคอิมัลชันเดี่ยว อีกทั้งกระบวนการผลิตค่อนข้างซับซ้อนกว่า



รูปที่ 2.11 ลักษณะอิมัลชันเดี่ยว [49]

2.3 เทคนิคการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (Water in oil emulsion technique)

ระบบนี้จะประกอบด้วยของเหลว 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคน้ำที่กระจายตัวแทรกอยู่ในวัฏภาคน้ำมัน ส่วนประกอบของอิมัลชันมีดังนี้

1. วัฏภาคน้ำ (Water phase or disperse phase) ได้แก่ น้ำหรือสารสำคัญต่างๆ ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ละลายได้ในน้ำ เช่น Veegum, Methylcellulose, Propylene glycol, Glycerin, Carbopol และสีที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น หรืออาจเป็นสารออกฤทธิ์อื่นที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น Cetyl pyridinium chloride, Benzalkonium chloride เป็นต้น

2. วัฏภาคน้ำมัน (Oil phase or continuous phase) ได้แก่ น้ำมันหรือไขมันต่างๆ เช่น Olive oil, Mineral oil, Castor oil , Stearyl alcohol, Stearic acid, สีที่ละลายในน้ำมัน น้ำหอม หรือสารออกฤทธิ์ต่างๆ เช่น ฮอร์โมน วิตามิน เป็นต้น

3. ตัวทำอิมัลชัน (Emulsifier) ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวเช่น Tween, Span, Sodium lauryl sulfate (SDS) หรือเป็นสารธรรมชาติที่มีสมบัติเป็นตัวทำอิมัลชัน เช่น Acacia และเจลาติน เป็นต้น ตัวทำอิมัลชันเป็นสารสำคัญในการผสมผสานให้วัฏภาคน้ำและน้ำมันเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้ ช่วยให้อิมัลชันที่ได้มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น ชนิดของอิมัลชันที่ใช้ในระบบอิมัลชันน้ำในน้ำมัน จะมีหลักพิจารณาตามค่า Hydrophile-lipophile balance (HLB) ดังแสดงในตารางที่ 2.7 ค่า HLB จะแสดง

ถึงสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 20 โดยที่สารที่มีค่า HLB เท่ากับ 0 คือสารที่โมเลกุลมีแต่ส่วนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ทั้งหมด และที่ค่า HLB สูงขึ้น โมเลกุลจะมีส่วนชอบน้ำมากขึ้น สามารถกระจายในน้ำได้ดีขึ้นดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.7 ค่า Hydrophile-lipophile balance ของตัวทำอิมัลชันบางชนิด [50]

Surfactants	Hydrophile-lipophile balance (HLB)
Sorbitan trioleate (Span 85)	1.8
Sorbitan monooleate (Span 80)	4.3
Sorbitan sesquioleate (Arlacel 83)	3.7
Polyoxyethylene sorbitan tristearate (Tween 65)	10.5
Polyoxyethylene sorbitan trioleate (Tween 85)	11.0
Polysorbate 80,NF (Tween 80)	15.0
Polyoxyethylene monostearate (Myrj 49)	15.0

ตารางที่ 2.8 แสดงสมบัติของตัวทำอิมัลชันที่ค่า Hydrophile-lipophile balanceต่าง ๆ [51]

Hydrophile-lipophile balance (HLB) value	Surfactant properties
0-3	Anti foaming agent
4-6	Water in Oil emulsifier
7-9	Wetting agent
8-18	Oil in water emulsifier
13-15	Detergents
>15	Solubilizer or hydrotrope

กลไกการเกิดอิมัลชัน

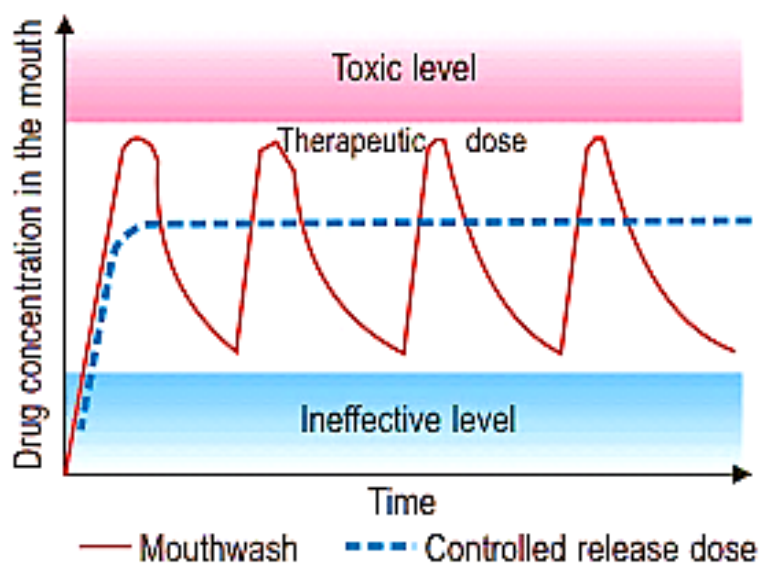
กลไกการเกิดอิมัลชัน จะอาศัยกระบวนการ 2 ขั้นตอน คือ

1. การทำให้วัฏภาคภายในกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคภายนอก ทำได้โดยเพิ่มพลังงานหรือแรงเฉือนแก่ของเหลว ทำให้ของเหลวเกิดเป็นลักษณะหยดเล็ก ๆ กระจายตัวอยู่ พลังงานที่ใช้อาจเป็นพลังงานความร้อน (Heat) การคนหรือเขย่า (Mechanical agitation) การสั่นสะเทือนโดยใช้คลื่นเสียง (Ultrasonic vibration) หรือไฟฟ้า (Electricity) เป็นต้น โดยปกติแล้ว เมื่อนำของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายเข้าด้วยกันมารวมหรือผสมกัน ของเหลวทั้งสองชนิดจะแยกกันอยู่เป็น 2 ชั้น เนื่องจากเกิดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวทั้งสอง แต่เมื่อให้พลังงาน เช่น การปั่นกวนของเหลวทั้งสองชนิด การปั่นกวนจะเป็นการเพิ่มพลังงานอิสระที่พื้นผิว (Surface free energy) เสมือนเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวทั้งสองชนิด มีผลทำให้ของเหลวสามารถกระจายตัวเป็นหยดเล็ก ๆ ในกันและกันได้ ของเหลวจึงเข้ากันได้ชั่วคราว ไม่คงตัวเพราะเมื่อหยุดให้พลังงานหรือหยุดปั่นกวนของเหลวทั้งสองชนิดก็จะพยายามกลับมารวมตัวกันและแยกชั้นดังเดิม เนื่องจากการปรับสภาวะให้เข้าสู่จุดคงสภาพโดยลดพื้นที่ผิวการสัมผัสระหว่างกันน้อยที่สุด

2. การทำให้หยดของเหลวคงตัว ทำได้โดยใช้ตัวทำอิมัลชัน ซึ่งจะช่วยลดแรงตึงผิวหรือลดพลังงานอิสระที่พื้นผิวระหว่างของเหลววัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน ทำให้หยดของเหลวที่กระจายตัวอยู่ รวมกันได้น้อยลง อิมัลชันจึงมีความคงตัวมากขึ้น โดยลักษณะของหยดของเหลวในอิมัลชันจะมีชั้นฟิล์มของตัวทำอิมัลชันที่แข็งแรงและยืดหยุ่นล้อมรอบวัฏภาคน้ำอยู่ ความแข็งแรงและลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลของฟิล์มจะแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน โดยทั่วไป ชั้นฟิล์มอิมัลชันอาจมีการจัดเรียงตัวเป็นชั้นฟิล์มโมเลกุลเดี่ยว (Monomolecular film) โดยหันด้านที่มีประจุหรือด้านที่มีความชอบน้ำเข้าหาวัฏภาคน้ำ และหันด้านที่ไม่มีประจุหรือด้านที่มีความไม่ชอบน้ำเข้าหาวัฏภาคน้ำมัน นอกจากนี้ ชั้นฟิล์มอาจมีการจัดเรียงตัวเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (Multimolecular film) ที่มีความแข็งแรง ฟิล์มชนิดนี้เกิดจากการใช้ตัวทำอิมัลชันชนิดคอลลอยด์ที่ชอบน้ำ เช่น Acacia และเจลาติน เป็นต้น [52]

2.4 ระบบควบคุมการปลดปล่อยยา (Controlled Drug Release System)

ในปัจจุบัน วิธีการให้ยาแก่คนไข้แบบปกติ เช่น ยาฉีด ยาเม็ด ยาแคปซูล ยาน้ำยาพ่น และครีม มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งในการรักษาผู้ป่วยจะได้รับยาหลายครั้งต่อวัน ขึ้นกับค่าครึ่งชีวิตของตัวยาในร่างกาย (Biological half-life) ทำให้ระดับยาในกระแสเลือดไม่คงที่ การให้ยาแบบปกตินั้นระดับยาในกระแสเลือดอาจต่ำเกินไปจนทำให้การรักษาไม่ได้ผลสำหรับการให้ยาในครั้งแรก ต่อมาเมื่อผู้ป่วยได้รับยาซ้ำ ระดับยาในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นหรืออาจเพิ่มมากเกินไปทำให้เกิดความเสี่ยงหรืออันตรายต่อผู้ป่วยได้ ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาระบบนำส่งยาที่อยู่ในช่วงการรักษา โดยสามารถควบคุมความเข้มข้นของระดับยาและปลดปล่อยตัวยาด้วยอัตราคงที่ในช่วงเวลาที่ต้องการ เพื่อนำส่งยาสู่อวัยวะเป้าหมายได้ (Controlled release drug delivery systems) อัตราเร็วของปริมาณตัวยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาต้องมีค่าเท่ากับอัตราที่ยาถูกทำลายและขับออกจากร่างกาย จึงจะทำให้ระดับยาในกระแสเลือดคงที่ ดังแสดงได้ในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ความเข้มข้นของยาในกระแสเลือดของระบบนำส่งยา [53]

ข้อดีของระบบนำส่งยาที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยตัวยาได้ [54-56]

1. สามารถแก้ปัญหาเรื่องความร่วมมือของผู้ป่วยในการใช้ยาได้ ซึ่งบางครั้งผู้ป่วยลืมรับประทานยา หรือลืมใช้ยาตามกำหนดเวลา ทำให้ผลการรักษาไม่ดีเท่าที่ควร
2. ปริมาณยาที่ใช้ทั้งหมดต่อวันลดลง ทำให้อาการข้างเคียงทั้งทางระบบและเฉพาะที่ลดลง และช่วยให้ระดับยาในกระแสเลือดคงที่
3. สามารถให้ยาสู่อวัยวะเป้าหมายได้โดยตรง ทำให้ผลการรักษามีประสิทธิภาพ
4. ลดจำนวนครั้งในการให้ยาต่อวันได้
5. ลดความเสี่ยงในกรณีระดับยาในกระแสเลือดสูงหรือต่ำเกินไป เพราะระบบนำส่งยาที่สามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยา จะทำให้ระดับยาในกระแสเลือดมีความแปรปรวนน้อยกว่ายาในรูปแบบปกติทั่วไป
6. เกิดผลดีสำหรับผู้ป่วยบางรายที่ต้องได้รับยาอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอเป็นเวลานาน เช่น โรคเบาหวาน หัวใจ มะเร็ง หอบหืด ไช้ข้ออักเสบ และการคุมกำเนิด เป็นต้น

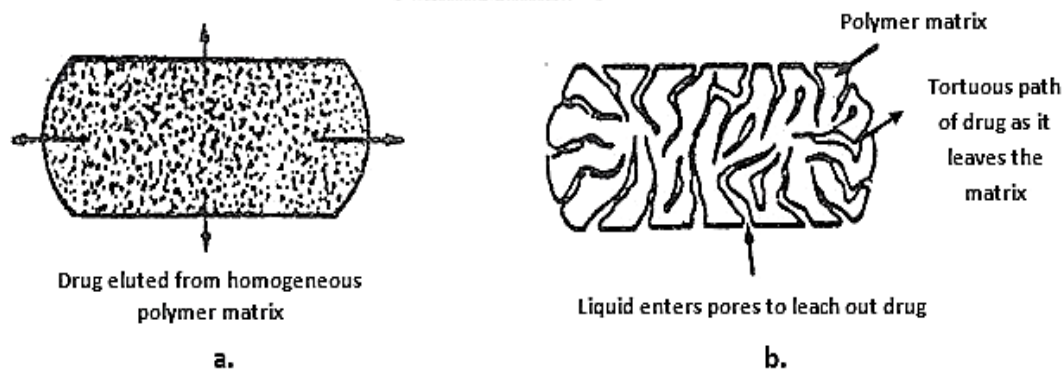
ข้อเสียของระบบนำส่งยาที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยตัวยาได้ [55, 56]

1. การระงับหรือหยุดยั้งการออกฤทธิ์ของยาจะไม่สามารถกระทำได้นทันทีหรือกระทำได้ยากกว่ายาในรูปแบบธรรมดา อาจเป็นผลเสียต่อผู้ป่วยที่แพ้ยาได้
2. ลักษณะการปลดปล่อยยาถูกกำหนดโดยรูปแบบของผลิตภัณฑ์ จึงปรับขนาดของยาได้ยาก
3. ลักษณะของการปลดปล่อยยาจะแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะในร่างกายของผู้ป่วยแต่ละคน ผลการใช้ยาในผู้ป่วยแต่ละคนจึงแตกต่างกัน
4. ต้นทุนในการรักษาด้วยวิธีการใช้ระบบนำส่งยาที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยตัวยา ค่อนข้างสูงกว่าการรักษาแบบให้ยาโดยวิธีปกติ

2.4.1 ระบบควบคุมการปลดปล่อยยาผ่านพอลิเมอร์เมทริกซ์ (Polymer matrix controlled drug release)

2.4.1.1 การแพร่ผ่านพอลิเมอร์เมทริกซ์ (Polymer matrix diffusion-Controlled release drug delivery systems)

ระบบนำส่งยาแบบนี้ ส่วนกักเก็บยาจะประกอบด้วยตัวยาในรูปของแข็งที่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในเมทริกซ์พอลิเมอร์ โดยพอลิเมอร์ที่ใช้อาจเป็นชนิดชอบน้ำ (Hydrophilic) หรือไม่ชอบน้ำ (Lipophilic) การปลดปล่อยยาอาจเกิดจากตัวยาถูกละลายและแพร่ผ่านร่างแหของพอลิเมอร์ หรือแพร่ออกมาตามรูพรุนภายในเมทริกซ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.13 สารที่นิยมนำมาทำเป็นเมทริกซ์มี 3 ประเภท คือ พอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น methacrylate-methylmethacrylate copolymer เป็นต้น พอลิเมอร์ที่สามารถบวมตัวได้ในน้ำ เช่น methylcellulose, hydroxypropyl methyl cellulose และ sodium carboxyl methylcellulose เป็นต้น หรือพอลิเมอร์ที่เป็นสารประกอบไขมัน เช่น carnauba wax และ glyceryl tristearate เป็นต้น [57]

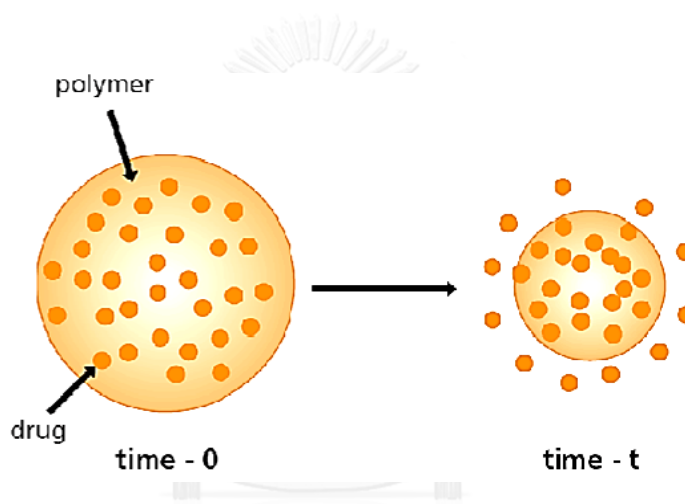


รูปที่ 2.13 ลักษณะการปลดปล่อยแบบแพร่ผ่านเมทริกซ์

(a) ตัวยาถูกละลายและแพร่ผ่านร่างแหพอลิเมอร์ (b) ตัวยาถูกละลายและแพร่ออกมาตามรูพรุนหรือช่องว่างคานัลภายในเมทริกซ์ [57]

2.4.1.2 การละลายของพอลิเมอร์เมทริกซ์ (Polymer matrix dissolution - Controlled release drug delivery systems)

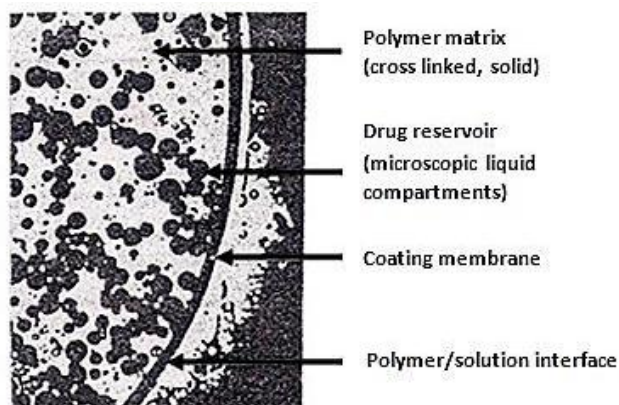
ระบบนำส่งยาแบบนี้สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาโดยการละลายของเมทริกซ์ ตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างช้า ๆ ทำให้ตัวยาออกฤทธิ์ได้นานขึ้น โดยที่ตัวยาถูกผสมหรือฝัง (embedded or impregnated) ลงในสารพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ และจะละลายออกมาอย่างช้า ๆ พร้อมกับการกร่อนละลาย (Erosion) ของพอลิเมอร์ ทำให้พื้นที่ผิวลดลงเรื่อย ๆ [58] ดังแสดงในรูปที่ 2.14 ตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกมาในลักษณะที่ต่อเนื่องและยาวนาน (Sustained dosing) มากกว่าจะออกมาเป็นช่วง ๆ (Pulsed dosing) [57]



รูปที่ 2.14 ระบบที่ควบคุมการปลดปล่อยยาโดยใช้หลักการละลาย หรือการกร่อนละลาย (Erosion) ของเมทริกซ์ [59]

2.4.1.3 การละลายจากส่วนกักเก็บยา (Microreservoir dissolution - Controlled release drug delivery systems)

ระบบนำส่งยาแบบนี้จะมีส่วนกักเก็บยาที่ประกอบด้วยตัวยาที่เป็นอนุภาคของแข็งแขวนลอยอยู่ในสารละลายพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ ส่วนกักเก็บยานี้จะอยู่ในรูปหยดของเหลวขนาดเล็กมาก กระจายอยู่ทั่วไปอย่างสม่ำเสมอในเมทริกซ์ (microdispersion) ซึ่งอาศัยเทคนิคพลังงานสูงช่วยในการกระจายตัวยา โดยพอลิเมอร์เมทริกซ์ที่มีหยดของเหลวขนาดเล็กกระจายตัวอยู่นี้จะมีลักษณะเป็นของแข็งที่ไม่ละลายตัวยาในส่วนกักเก็บยา [57] ดังแสดงในรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 ระบบนำส่งยาที่การปลดปล่อยยาถูกควบคุมโดยการละลายของยาในส่วนกักเก็บยาขนาดเล็ก (microreservoir compartment) [57]

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการปลดปล่อยยาจากเมทริกซ์

1) อัตราการบวมตัวของพอลิเมอร์

การเกิดเป็นชั้นเจลของพอลิเมอร์เมื่อสัมผัสกับน้ำมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการควบคุมการปลดปล่อยยา สำหรับเมทริกซ์ที่มีความชอบน้ำ ชั้นเจลต้องสามารถเกิดได้เร็วกว่าการละลายของยา การปลดปล่อยยาจึงจะมีประสิทธิภาพ

2) ความหนืดของพอลิเมอร์

โดยปกติความหนืดของพอลิเมอร์จะสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสามารถเกิดเป็นชั้นเจลที่มีความหนืดและความแข็งแรงมากกว่าพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่งผลให้เกิดการแพร่ของยาช้ากว่า นอกจากนี้ พอลิเมอร์ที่มีความหนืดสูง จะเหมาะกับการใช้ปลดปล่อยยาที่ละลายน้ำได้ดี กลไกในการปลดปล่อยยาจะถูกควบคุมด้วยกระบวนการแพร่ (Diffusion) เป็นหลัก ส่วนพอลิเมอร์ที่มีความหนืดต่ำจะเหมาะกับการใช้ปลดปล่อยยาที่ละลายน้ำได้เล็กน้อย กลไกการปลดปล่อยยาจะถูกควบคุมด้วยกระบวนการกร่อนละลาย (Erosion) เป็นหลัก

3) ปริมาณของพอลิเมอร์

เมื่อเมทริกซ์มีปริมาณพอลิเมอร์มากขึ้น ความพรุนของเมทริกซ์จะลดลง และเมทริกซ์ที่มีความชอบน้ำจะเกิดเป็นชั้นเจลที่หนาและหนืดมากขึ้น ทำให้เกิดความต้านทานต่อการแพร่ของยาและเกิดความต้านทานต่อการกัดกร่อนของเมทริกซ์ ส่งผลให้การปลดปล่อยยาช้าลง

4) หมู่แทนทีในสายโซ่พอลิเมอร์

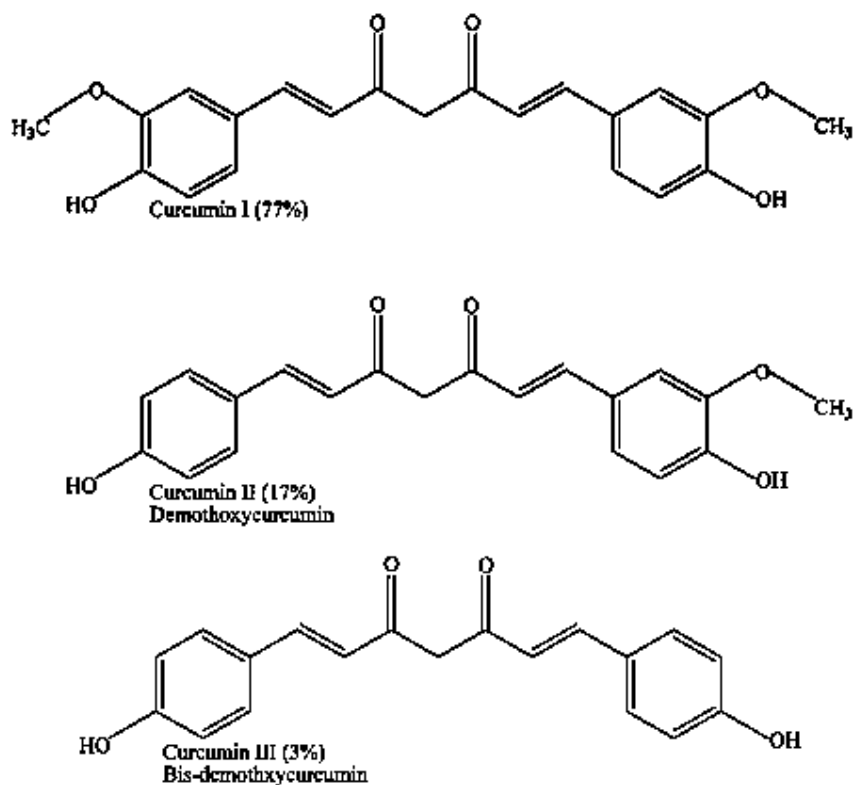
เมื่อเมทริกซ์มีปริมาณพอลิเมอร์ต่ำ อัตราการปลดปล่อยยาจะขึ้นกับหมู่แทนทีในสายโซ่พอลิเมอร์ ถ้าหมู่แทนทีมีความไม่ชอบน้ำ จะทำให้อัตราการบวมตัวของพอลิเมอร์ลดลง ส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยของยาลดลงด้วย

5) ขนาดของเมทริกซ์พอลิเมอร์

อนุภาคขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับตัวกลาง (medium) ได้มาก เมื่อเมทริกซ์ที่มีความชอบน้ำสัมผัสกับน้ำที่อยู่ในตัวกลาง จะทำให้เกิดเป็นชั้นเจลอย่างรวดเร็ว การควบคุมการปลดปล่อยจะดีกว่าเมื่อเทียบกับอนุภาคขนาดใหญ่ ถ้าอนุภาคขนาดใหญ่มาก จะเกิดการปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว (Burst release) เนื่องจากความแข็งแรงต่อการกดอัดลดลง ความสามารถในการดูดซับน้ำลดลง ความหนืดและอัตราการเกิดเจลลดลง

2.5 เคอร์คูมิน (Curcumin)

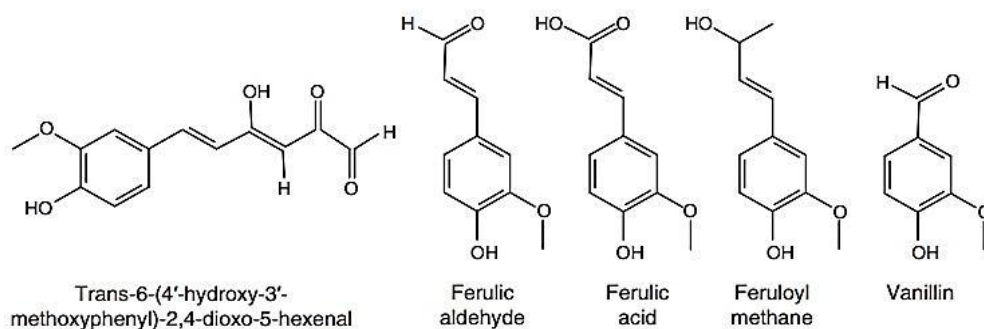
เคอร์คูมิน (Curcumin) ถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1815 โดย Vogel และ Pelletier ต่อมาในปี ค.ศ. 1870 มีการสกัดเคอร์คูมินออกมาในรูปของผลึก มีสีเหลือง พบได้ทั่วไปในพืชตระกูลขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae [60] องค์ประกอบหลักของเคอร์คูมิน ประกอบด้วยสารสำคัญ 3 ชนิด คือ เคอร์คูมิน I หรือ ไดเฟอรูโลอิลมีเทน (Diferuloylmethane) ปริมาณ 77 เปอร์เซ็นต์ เคอร์คูมิน II หรือ ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (Demethoxycurcumin) ปริมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ และเคอร์คูมิน III หรือ บิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (Bisdemethoxycurcumin) ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญในโมเลกุลเคอร์คูมิน [23]

เคอร์คูมิน เป็นสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoids) ที่เป็นสารประกอบพอลิฟีนอล (Polyphenolic compound) โมเลกุลมีการจัดเรียงตัวแบบโครงสร้างสมมาตรของเบต้าไดคีโตน (β -diketone) ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 2 วง ที่มีกลุ่มฟีนอลิก 2 กลุ่ม เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,β -unsaturated ที่ตำแหน่งของหมู่คาร์บอนิล (Carbonyl group) [61] โดยปกติการจัดเรียงตัวของเคอร์คูมินในรูปแบบสารละลายนั้น เคอร์คูมินสามารถจัดเรียงตัวอยู่ในรูปของ คีโต-อินอล ทัวโทเมอร์ริก (Keto-Enol tautomeric form) กล่าวคือ โมเลกุลของเคอร์คูมินสามารถจัดเรียงตัวได้ 2 แบบ คือ แบบคีโต และแบบอินอล ซึ่งสามารถเปลี่ยนโครงสร้างกลับไปมาได้ ขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย โดยสารละลายเคอร์คูมินที่มีสภาวะเป็นกรดหรือเป็นกลาง จะแสดงโครงสร้างการจัดเรียงตัวแบบคีโต แต่เมื่อเคอร์คูมินอยู่ในสภาวะของแข็งหรือสภาวะสารละลายที่เป็นเบส เคอร์คูมินจะแสดงโครงสร้างการจัดเรียงตัวแบบอินอล [62]

เคอร์คูมินจัดเป็นสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) คือ สารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น [61] มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{20}O_6$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.37 กรัมต่อโมล มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 183 องศาเซลเซียส เคอร์คูมินมีความไม่ชอบน้ำสูง จึงไม่ละลายในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอล (Ethanol) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide) อะซิโตน (Acetone) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เฮกเซน (Hexane) เป็นต้น นอกจากนี้ เมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเคอร์คูมินแตกต่างกันจะส่งผลให้ลักษณะสีของสารละลายเคอร์คูมินแตกต่างกันด้วย กล่าวคือ เมื่อสารละลายเคอร์คูมินมีค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 1 สารละลายเคอร์คูมินจะมีสีแดง แสดงถึงการจัดเรียงตัวของโมเลกุลรูปแบบ Protonated form และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเคอร์คูมินอยู่ในช่วง 1-7 การจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลจะอยู่ในรูปแบบที่เป็นกลาง (Neutral form) สารละลายที่ได้จะมีสีเหลือง และสารละลายเคอร์คูมินจะมีสีแดงอีกครั้งเมื่อค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่า 7.5 [63] นอกจากนี้ มีการรายงานเกี่ยวกับความเสถียรของเคอร์คูมินที่ค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ พบว่า เคอร์คูมินจะมีความเสถียรที่สภาวะเป็นกรดมากกว่าสภาวะเบส กล่าวคือ เมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายอยู่ในช่วง 7-10 โอกาสที่โมเลกุลของเคอร์คูมินจะถูกทำลายมีมาก สามารถเกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีสีน้ำตาลอมเหลือง คือ กรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid) และเฟอร์ูโลอิลมีเทน (Feruloylmethane) ซึ่งการย่อยสลายของเคอร์คูมิน สามารถเกิดผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเฟอร์ูโลอิลมีเทนได้เป็นสารวานิลลิน (Vanillin) และอะซิโตน (Acetone) และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น [63] และเมื่อนำสารละลายเคอร์คูมินมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Phosphate buffer saline; PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เคอร์คูมินถูกย่อยสลายไป 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 30 นาที ได้ผลิตภัณฑ์หลักภายหลังการย่อยสลาย (Major degradation product) คือ Tran-6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal และได้ผลิตภัณฑ์รอง (Minor degradation product) คือ วานิลลิน (Vanillin) เฟอร์ูลิก แอลดีไฮด์ (Ferulic aldehyde) และกรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid) [64] ซึ่งโครงสร้างทางเคมีสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเคอร์คูมิน [65]

นอกจากนี้ เคอร์คูมินยังมีความไวต่อแสง กล่าวคือ เคอร์คูมินจะเกิดการย่อยสลายเมื่อได้รับแสง หรือรังสี (Photo-irradiation) โครงสร้างโมเลกุลจะเกิดการย่อยสลายกลายเป็น กรดวานิลลิก (Vanillic acid) วานิลลิน (Vanillin) และกรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid) [66]

สมบัติของเคอร์คูมิน

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและลดการอักเสบ

มีการรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเคอร์คูมิน ตั้งแต่ปี ค.ศ.1975 โดยโมเลกุลเคอร์คูมินจะทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ไม่เสถียร และไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Scavenger of oxygen free radicals) [60, 67] ซึ่งโมเลกุลหรืออนุมูลอิสระนี้จะเป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย เป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของร่างกายเอง ถ้าร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไป จะเกิดภาวะ Oxidative stress และส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ หรือโปรตีน เกิดการทำลายกลุ่มของโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของความแก่ชรา (Aging) และอาจรุนแรงไปถึงการเกิดโรคมะเร็งได้ เคอร์คูมินจะเป็นตัวป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฮีโมโกลบิน สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวทำลายเซลล์ผิวหนัง เป็นต้น อนุมูลอิสระอีกประเภทหนึ่ง คือ อนุมูลอิสระจากภายนอกในร่างกาย เกิดได้จากการติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส การอักเสบของข้อต่อ อันเนื่องมาจากโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์และโรคเก๊าท์ มีการรายงานว่า เคอร์คูมินสามารถบรรเทาและ

ยับยั้งความรุนแรงของโรครูมาตอยด์และข้ออักเสบได้เป็นอย่างดี [17, 19, 67-71] ฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระของเคอร์คูมินจะคล้ายกับสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทส (Superoxide dismutase) คาตาเลส (Catalase) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) เป็นต้น โดยเคอร์คูมินจะเป็นตัวยับยั้งการสร้างกลุ่มของอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Reactive oxygen species; ROS) เช่น สารจำพวกซูเปอร์ออกไซด์ที่มีประจุลบ (Superoxide anion) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) อนุมูลอิสระของไนเตรตที่เกิดขึ้นโดยแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น (Activated macrophage) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบ [64, 67, 72, 73] อนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกายยังสามารถเกิดขึ้นได้จากรังสีสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ หรือการออกกำลังอย่างหักโหมอีกด้วย นอกจากนี้ อนุพันธ์ของเคอร์คูมิน ได้แก่ ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (Demethoxycurcumin) และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (Bisdemethoxy curcumin) ยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน [60, 67]

ความสามารถในการต้านมะเร็ง

มีการรายงานว่ เคอร์คูมินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด และชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ได้ โดยมีกลไกผ่านกระบวนการของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) กล่าวคือ เคอร์คูมินสามารถลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียของเซลล์ได้ ทำให้เกิดการปลดปล่อยสารไซโตโครมซี (Cytochrome-c) เข้าสู่ไซโตซอล (Cytosol) กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคสเปส 3 (Caspase-3) และเอนไซม์แคสเปส 9 (Caspase-9) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ [22, 74, 75] นอกจากนี้ มีการรายงานว่ เซลล์มะเร็งเกิดจากเซลล์ที่มีความผิดปกติในระดับโมเลกุลเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเนื่องจากปัจจัยหลัก คือ สารไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) และสารอนุพันธ์ของไนตริกออกไซด์ ซึ่งในส่วนนี้เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเกิดเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส 2 (Cyclooxygenase 2; COX-2) และไนตริกออกไซด์ซินเทส (Nitric oxide synthase; iNOS) [60] ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และถ้ามีเอนไซม์ชนิดนี้มากเกินไป จะส่งผลทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปอด และมะเร็งเต้านม [22, 23, 60, 76, 77] เป็นต้น

เคอร์คูมินยังสามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอโทซิสผ่านการทำงานของยีนต้านมะเร็ง (Tumor-suppressing gene) หรือ p53 อาทิ การติดเชื้อไวรัส Papillomavirus ยีนที่อยู่ในไวรัสจะเข้าแทรกตัวในโปรตีน p53 ของเซลล์ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก เคอร์คูมินสามารถกระตุ้นการทำงานของ p53 ได้ และในยีนของ p53 นั้น จะประกอบด้วย ยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Growth arrest and DNA damage genes) ส่งผลให้เกิดการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอโทซิสขึ้น [23, 77]

นอกจากนี้ กรดเพอรูลิกและวานิลลิน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการย่อยสลายเคอร์คูมินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน เช่น มะเร็งเต้านม และมะเร็งตับ โดยโมเลกุลจะสามารถยับยั้งการทำงานของ Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น COX-2 เป็นต้น อีกทั้งสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) และการทำลายสายดีเอ็นเอของเซลล์ (DNA single-strand breakage) ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็ง [65, 78]

ในปัจจุบันมีการใช้เคอร์คูมินในงานด้านการแพทย์และเภสัชกรรมมากมาย แต่ด้วยข้อจำกัดของเคอร์คูมินที่มีความไม่ชอบน้ำสูง และมีความเสถียรค่อนข้างต่ำ ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึมอย่างรวดเร็ว ทำให้มีปริมาณเคอร์คูมินในกระแสเลือดต่ำ ส่งผลให้การออกฤทธิ์ในบริเวณที่รักษา (Bioavailability) ลดลง นอกจากนี้ มีการรายงานเกี่ยวกับปริมาณเคอร์คูมินที่ใช้ในการรักษาพบว่า ปริมาณของเคอร์คูมิน (Dose) มากที่สุดที่ร่างกายสามารถรับได้ และไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือเป็นพิษต่อร่างกายนั้น มีค่าเท่ากับ 12 กรัมต่อวัน [79] และเมื่อทำการทดสอบการให้เคอร์คูมินโดยการรับประทานกับอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ผลการทดสอบสามารถตรวจพบปริมาณเคอร์คูมินในกระแสเลือดเพียง 57 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร [80] ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาและการวิจัยเกี่ยวกับการรักษาเสถียรภาพของเคอร์คูมินให้คงฤทธิ์ในการรักษาได้ในบริเวณที่ต้องการรักษา โดยการประยุกต์ใช้พอลิเมอร์เป็นตัวกักเก็บเคอร์คูมินไว้ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น อนุภาคนาโน (Nanoparticles) ไมเซลล์ (Micelles) ลิโปโซม (Liposomes) และอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Microspheres) เพื่อเป็นตัวช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาของเคอร์คูมิน [81-84]

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 ระบบที่ประกอบด้วยไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิก

Malay O. และคณะ (2007) [85] ได้ศึกษาช่วงของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผสมกันจนเกิดเป็นสารผสมเชิงซ้อน (Complex coacervation) ของไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิก จากผลงานวิจัยพบว่า ในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 2.5-3.9 สารทั้งสองชนิดจะมีประจุตรงข้ามกัน โดยที่ไหมไฟโบรอินจะอยู่ในรูปโมเลกุลประจุบวกและกรดไฮยาลูรอนิกจะอยู่ในรูปโมเลกุลประจุลบ สารทั้งสองสามารถรวมตัวกันได้โดยอาศัยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ และในช่วงของค่าความเป็นกรดต่างดังกล่าว ความขุ่นของสารละลายผสมจะเพิ่มขึ้น ในทางกลับกันช่วงที่ค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 3.9 ทั้งไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิกจะอยู่ในรูปโมเลกุลประจุลบ เกิดแรงผลักต่อกัน ทำให้ไม่เกิดเป็นสารผสมเชิงซ้อน ดังนั้น ค่าความขุ่นจึงลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า เพอร์เซ็นต์ผลได้ของการเกิดสารผสมเชิงซ้อนมีค่า 30 เพอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และปริมาณและขนาดของการเกิดสารผสมเชิงซ้อนจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิก

Garcia-Fuentes M. และคณะ (2008) [86] ได้ศึกษาอิทธิพลของกรดไฮยาลูรอนิกที่มีผลต่อการจัดเรียงตัวของไหมไฟโบรอินในรูปผลึก β -sheet โดยทำการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุนด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และบ่มโครงเลี้ยงเซลล์ในเมทานอล ความเข้มข้น 90 เพอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อทำการทดสอบความแข็งแรงทางกล จะบ่มโครงเลี้ยงเซลล์ผสมของไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิกในน้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อกำจัดกรดไฮยาลูรอนิก ผลการวิเคราะห์ธาตุพบว่า กรดไฮยาลูรอนิกคงเหลือในโครงเลี้ยงเซลล์น้อยกว่า 2.2 เพอร์เซ็นต์ จากผลงานวิจัยพบว่า กรดไฮยาลูรอนิกสามารถเหนี่ยวนำให้ไหมไฟโบรอินเกิดโครงสร้างผลึก β -sheet ได้ ซึ่งทำให้สมบัติทางกลของโครงเลี้ยงเซลล์ดีขึ้น โดยมีค่ามอดูลัสของแรงกดอัด (Compressive moduli) และความแข็งแรงของการแตกหัก (Breaking strength) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ของไหมไฟโบรอินบริสุทธิ์

Malay O. และคณะ (2009) [87] ได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะเมมเบรนของสารผสมเชิงซ้อนระหว่างไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิก ด้วยการทดสอบตอบสนองทางไฟฟ้า โดยเตรียมสารผสมในช่วงค่าความเป็นกรดต่างที่ 3.0-3.5 จากผลงานวิจัยพบว่า เมมเบรนของสารผสมเชิงซ้อนไหมไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิกสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานเกี่ยวกับการปลดปล่อยยา

ได้จริง โดยสังเกตจากผลทดสอบการบวมน้ำของเมมเบรน พบว่าเมมเบรนบวมน้ำได้ดีในสถานะที่เป็นต่าง แต่ในสถานะที่เป็นกรด เมมเบรนจะเกิดการหดตัว นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อให้กระแสไฟฟ้าแก่ระบบเมมเบรนสามารถปลดปล่อยตัวยา Timolol Maleate ได้ และอัตราการแพร่ผ่านของตัวยามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบ

2.6.2 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอิน

Imsumbut T. และคณะ (2010) [29] ได้ทำการผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอินด้วยวิธีการแพร่ของตัวทำละลายอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยใช้ตัวทำอิมัลชันที่ละลายได้ดีในน้ำมัน (Span 80) และใช้ Genipin เป็นสารเชื่อมขวาง โดยระบบมีวัฏภาคน้ำคือ สารละลายไหมไฟโบรอิน วัฏภาคน้ำมันคือ เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) จากนั้นทำการวิเคราะห์ถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อลักษณะรูปร่างของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน จากผลงานวิจัยพบว่า ขนาดและรูปร่างของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนขึ้นกับความเร็วยรอบในการปั่นกวนและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน โดยที่ความเร็วยรอบในการปั่นกวน 900 รอบต่อนาที และใช้ตัวทำอิมัลชัน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อนุภาคจะมีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวดี พื้นผิวอนุภาคเรียบ ไม่เกิดรอยแตก แต่เมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่ใช้ตัวทำอิมัลชัน อนุภาคที่ได้จะเกาะติดกัน รูปร่างไม่เป็นทรงกลม พื้นผิวไม่เรียบ นอกจากนี้ ผลจากการเชื่อมขวางด้วย Genipin พบว่า Genipin ทำให้โครงสร้างของไหมไฟโบรอินเปลี่ยนจากโครงสร้างแบบ Random coil เป็นโครงสร้างแบบ β -sheet และเมื่อระยะเวลาในการเชื่อมขวางและความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การสลายตัวในน้ำของอนุภาคจะลดลง

Srihanam P. และคณะ (2011) [88] ได้ผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอินด้วยวิธีการแพร่ของตัวทำละลายของอิมัลชันน้ำในน้ำมันโดยไม่ใช้ตัวทำอิมัลชัน (Water in oil emulsion solvent diffusion method) โดยวัฏภาคน้ำ คือ สารละลายไหมไฟโบรอิน วัฏภาคน้ำมันคือ Dichloromethane ใช้ความเร็วยรอบในการปั่นกวน 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนออกโดยการนำไปปั่นเหวี่ยง และนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากผลงานวิจัยพบว่า ขนาดอนุภาคเฉลี่ยมีค่าอยู่ในช่วง 45-92 ไมโครเมตร พื้นผิวทรงกลมบางอนุภาคมีลักษณะแปบหรือยุบตัว ไม่กลมเรียบมากนัก ผลการทดสอบการตรึงโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ด้วยอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอินพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาด

ไมครอนของไหมไฟโบรอินที่ตรึงโปรตีน BSA มีขนาดใหญ่กว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอินบริสุทธิ์ อีกทั้งผลการทดสอบการปลดปล่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการพบว่า เมื่อนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอินที่ตรึงด้วย BSA มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Phosphate buffer saline ; PBS) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โปรตีน BSA จะถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอินได้ และเมื่อปริมาณ BSA เพิ่มขึ้น อัตราการปลดปล่อย BSA จะเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ

Numata K. และคณะ (2012) [89] ได้ศึกษาและผลิตไฮโดรเจลไฟโบรอินที่บรรจุอนุภาคนาโนไฟโบรอินด้วยวิธีการทำให้เกิดเจลด้วยสารละลายเอทานอล เพื่อใช้ในระบบการควบคุมการปลดปล่อยยาแบบควบคุมกันไป (Dual-Drug release system) ไฮโดรเจลไฟโบรอินสามารถเตรียมได้โดยการทรีตสารละลายไฟโบรอินด้วยความร้อน อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายส่วนใสมาผสมกับเอทานอล และใช้สียฟลูออเรสเซนต์ ชนิด Rhodamine B (RhB), Texas Red (TR) และ Fluorescein isothiocyanate (FITC) เป็นตัวต้นแบบยา ไฮโดรเจลไฟโบรอินที่บรรจุอนุภาคนาโนของไฟโบรอินสามารถทำได้โดยผสมสารละลายไฟโบรอินและอนุภาคนาโนของไฟโบรอิน ปั่นกวนกับเอทานอลเข้าด้วยกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากผลงานวิจัยพบว่า ขนาดอนุภาคนาโนของไฟโบรอินที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Dynamic light scattering (DLS) มีค่า 175 ± 3 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าขนาดอนุภาคนาโนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Atomic force microscopy (AFM) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนไฟโบรอินเกิดการบวมตัวในน้ำได้ ผลการวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายทั้งก่อนและหลังการทรีตด้วยเอทานอลพบว่า ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายภายหลังการทรีตด้วยเอทานอลมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินเพิ่มขึ้น และอนุภาคนาโนไฟโบรอินที่มีขนาดเฉลี่ย 175 นาโนเมตร มีค่าศักย์ゼต้า -12.5 ± 0.8 มิลลิโวลต์ แสดงให้เห็นว่า พื้นผิวอนุภาคมีความไม่ชอบน้ำ ส่งผลให้อนุภาคมีประจุลบมากขึ้น ซึ่งประจุลบนี้แสดงถึงโครงสร้างทุติยภูมิหรือโครงสร้างของไฟโบรอินแบบแผ่นพับเบต้า (β -sheet) ผลการควบคุมการปลดปล่อยยาแบบควบคุมกันของสาร RhB ที่ถูกกักเก็บในไฮโดรเจลไฟโบรอิน และสาร FITC ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนาโนไฟโบรอินโดยทดสอบในสภาวะเร่งการย่อยสลายของชีววัสดุด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินมีการปลดปล่อย RhB อย่างรวดเร็ว (Burst release) สามารถปลดปล่อย RhB ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง ในขณะที่เดียวกันอนุภาคนาโนของไฟโบรอินมีการ

ปลดปล่อย FITC ในอัตราที่ช้าอย่างคงที่ และอนุภาคนาโนสามารถปลดปล่อย FITC ได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 5 วัน และ RhB มีอัตราการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วออกจากไฮโดรเจลโฟโบรินเนื่องจากเอนไซม์โปรติเอส XIV ทำให้เกิดการย่อยสลายโมเลกุลโพลีเมอร์อสัณฐาน (Noncrystalline) ที่อยู่ในไฮโดรเจลโฟโบรินอย่างรวดเร็ว อีกทั้งขนาดรูพรุนของไฮโดรเจลมีค่าอยู่ในช่วง 5-50 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่มากพอสำหรับเอนไซม์โปรติเอส XIV ที่จะทำการย่อยสลายได้ ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยสารขึ้น นอกจากนี้ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกพบว่าไฮโดรเจลโฟโบรินที่บรรจุอนุภาคนาโนโฟโบรินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

2.6.3 อนุภาคนาโนของกรดไฮยาลูรอนิก

Huh Y. และคณะ (2010) [90] ได้ทำการผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย เพื่อใช้ในการนำส่งยา Fexofenadine hydrochloride ผ่านการสูดดมทางจมูก และทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมสารพอลิเอทิลีนไกลคอล 6000 (Polyethylene glycol 6000; PEG 6000) และโซเดียมทอโรโคเลต (Sodiumtaurocholate ; NaTC) ซึ่งใช้เป็นตัวทำอิมัลชันและตัวช่วยเพิ่มการดูดซึมของสารผ่านเซลล์เยื่อบุผิว จากผลงานวิจัยพบว่า อนุภาคทรงกลมของกรดไฮยาลูรอนิกที่มีตัวยา Fexofenadine hydrochloride มีลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวเรียบ โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 20–30 ไมโครเมตร มีประสิทธิภาพในการกักเก็บยา 95 เปอร์เซ็นต์ และผลการปลดปล่อยยา Fexofenadine hydrochloride ของอนุภาคทรงกลมในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า อนุภาคทรงกลมของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถปลดปล่อยยา Fexofenadine hydrochloride ได้มากขึ้น เมื่อปริมาณ PEG 6000 เพิ่มขึ้น เนื่องจาก PEG 6000 เป็นตัวช่วยทำให้สายโซ่พอลิเมอร์มีความยืดหยุ่นมากขึ้น สายโซ่จึงสามารถเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของยาได้ดี ส่งผลให้อนุภาคทรงกลมสามารถกักเก็บและปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้ง PEG 6000 เป็นตัวทำให้อนุภาคมีพื้นผิวเรียบมากยิ่งขึ้น แต่ผลของการเติม NaTC ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแง่ของการควบคุมการปลดปล่อยยา แต่สาร NaTC จะมีผลโดยตรงต่อการซึมผ่านของยา Fexofenadine hydrochloride ผ่านเซลล์เยื่อบุผิวของกระต่าย กล่าวคือ เมื่อมีปริมาณ NaTC เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การซึมผ่านของยาเพิ่มขึ้น เนื่องจาก ในกระบวนการซึมผ่านของโมเลกุลของยาผ่านเซลล์นั้น โมเลกุลของยาจะซึมผ่านบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ และ NaTC จะเป็นตัวช่วยทำให้เยื่อเลือกผ่านบริเวณเซลล์มีการเคลื่อนที่ ส่งผลให้ช่องว่างระหว่างเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจึงทำให้

โมเลกุลของยาสามารถเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้ ความสามารถของยาที่สามารถออกฤทธิ์ได้ในบริเวณรักษา (Bioavailability) มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ การให้ยาในรูปแบบของสารละลายโดยตรง อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกจึงมีประสิทธิภาพในการนำส่งยา Fexofenadine hydrochloride ผ่านเซลล์ได้ดี

Maroda M. และคณะ (2011) [91] ได้ศึกษาและผลิตอนุภาคขนาดนาโนของกรดไฮยาลูรอนิก โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.5 และทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วย 2,2-(ethylenedioxy) bis(ethylamine) ร่วมกับ 1-[3-(dimethylamino) propyl]-3-ethyl carbodiimide methiodide (CDI) จากนั้นนำอนุภาคไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการไดอะไลซิส และนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากผลงานวิจัยพบว่า ร้อยละผลได้ของอนุภาคนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกมีค่าเท่ากับ 76-94 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการส่องผ่าน (Transmittance values) 91-99 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าการส่องผ่านจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิก นอกจากนี้พบว่า ค่าความเป็นกรดต่างไม่ส่งผลต่อค่าการส่องผ่านของสารในระบบ แต่จะส่งผลต่อขนาดอนุภาค คือ เมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้น ขนาดอนุภาคเฉลี่ยจะมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดแรงผลักกันระหว่างโมเลกุลที่มีประจุลบของกรดไฮยาลูรอนิกมีผลทำให้ขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้น ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของขนาดอนุภาคพบว่า เมื่อใช้ปริมาณสารเชื่อมขวางต่ำ อนุภาคจะมีช่วงของการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่แคบ และขนาดของอนุภาคนาโนที่ได้มีค่าต่ำกว่า 10 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของอนุภาคพบว่า อนุภาคนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกที่ทำการเชื่อมขวาง มีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวดี และอนุภาคที่ได้มีขนาดไม่เกิน 110 นาโนเมตร

Han L. และคณะ (2012) [92] ได้พัฒนาอนุภาคขนาดนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกที่มีความไวต่อค่าความเป็นกรดต่าง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งของอิมัลชันแบบผันกลับ (Reverse emulsion freeze drying) โดยทำการเชื่อมขวางด้วย Adipic acid dihydrazide (ADH) ร่วมกับ 1-[3-(dimethyl amino propyl)-3-ethyl carbodiimide (EDC) เพื่อใช้ในการนำส่งยาอินซูลิน (Insulin) ผ่านเซลล์ (Transcellular Delivery) จากผลงานวิจัยพบว่า อนุภาคของกรดไฮยาลูรอนิกมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 182.2 นาโนเมตร โดยมีประสิทธิภาพในการกักเก็บยาอินซูลิน 95 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณ อนุภาคนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถป้องกันตัวยาอินซูลินในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารได้ ผลการศึกษาการขนส่งอนุภาคนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกที่มี

ตัวยาอินซูลินผ่านเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) พบว่า หลังจากการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณยาอินซูลินที่อยู่ในอนุภาคขนาดนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถผ่านเซลล์ Caco-2 ได้มากกว่า สารละลายอินซูลินบริสุทธิ์ถึง 3 เท่า ผลการทดลองในลำไส้เล็กของหนูที่ตัดแบ่งเป็น 3 ส่วนคือ Duodenum, Jejunum และ Ileum พบว่า ปริมาณอินซูลินที่อยู่ในอนุภาคขนาดนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถผ่านไปยังลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วนได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายอินซูลินบริสุทธิ์ นอกจากนี้ จากการทดลองให้หนูที่เป็นโรคเบาหวานกินอนุภาคขนาดนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกที่มีตัวยาอินซูลิน และทำการวัดระดับกลูโคสในกระแสเลือดของหนูพบว่า ระดับกลูโคสในกระแสเลือดของหนูที่เป็นโรคเบาหวานลดลง 24 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง และลดลง 32-39 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3-8 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดอินซูลินโดยตรงให้แก่หนูที่เป็นโรคเบาหวานซึ่งพบว่า ในช่วงเวลาเดียวกัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคสในกระแสเลือดของหนู ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่า อนุภาคขนาดนาโนของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถใช้เป็นตัวนำส่งยาอินซูลินโดยการกินได้ (Oral Insulin delivery system)

2.6.4 ระบบที่ประกอบด้วยไฟโบรอินร่วมกับสารอื่นสำหรับการปลดปล่อยสาร

Mandal B. B. และคณะ (2009) [93] ได้ศึกษาและผลิตโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติของไหมไฟโบรอินที่มีอนุภาคทรงกลมของแคลเซียมอัลจิเนตฝังอยู่ในด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีลักษณะเป็นแซนด์วิชสองชั้น (Two sandwich layers) เพื่อประยุกต์ใช้ในการปลดปล่อยยาแบบควบคู่กันไป (Dual drug delivery system) ซึ่งใช้ Bovine serum albumin (BSA) และ FITC-insulin เป็นตัวยาต้นแบบ จากนั้นนำไปปรับปรุงด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จากผลงานวิจัยพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของไหมไฟโบรอินที่ใช้เป็นตัวเมทริกซ์ในการฝังอนุภาคทรงกลมของแคลเซียมอัลจิเนต อัตราการปลดปล่อย BSA และ FITC-insulin จะเกิดช้าลง เนื่องจากการปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเอทานอลจะทำให้ไหมไฟโบรอินเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น β -sheet ทำให้ความเป็นผลึกของไหมไฟโบรอินเพิ่มขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น ตัวยาต้นแบบที่อยู่ในอนุภาคทรงกลมของแคลเซียมอัลจิเนตจึงแพร่ออกมาได้ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคทรงกลมของแคลเซียมอัลจิเนตบริสุทธิ์ที่ไม่ได้ฝังอยู่ในเมทริกซ์ไหมไฟโบรอิน ผลการเปรียบเทียบอัตราการปลดปล่อยตัวแบบยาพบว่า ภายในระยะเวลา 35 วัน โครงเลี้ยงเซลล์สามารถปลดปล่อย FITC-

insulin ออกมาได้เร็วกว่า BSA เนื่องจาก โมเลกุลของ FITC-insulin มีความชอบน้ำมากกว่าและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า BSA

Ratanavaraporn J. และคณะ (2014) [7] ได้พัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไหมไฟโบรอิน เพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านการนำส่งยาแบบควบคู่กันไปของเคอร์คูมินและไฟเพอริน โดยใช้เทคนิคอิมัลชันน้ำในน้ำมัน และทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยกลูตารัลดีไฮด์ จากผลงานวิจัยพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ในสภาวะแห้ง อนุภาคมีขนาดอยู่ในช่วง 194-217 ไมโครเมตร และในสภาวะที่อนุภาคบวมตัวด้วยน้ำ อนุภาคจะมีขนาดอยู่ในช่วง 297-367 ไมโครเมตร ซึ่งขนาดของอนุภาคทรงกลมที่ได้มีความเหมาะสมในการฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ ผลการทดสอบการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสพบว่า เมื่อปริมาณไฟโบรอินเพิ่มมากขึ้น การย่อยสลายของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจะเกิดช้าลง โดยพบว่า ที่อัตราส่วนเจลาตินต่อไฟโบรอิน (G/SF) เท่ากับ 50/50 และ 30/70 ไม่สามารถย่อยสลายได้สมบูรณ์ภายในระยะเวลา 14 วัน ผลทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินพบว่า ไฟโบรอินสามารถเกิดอันตรกิริยากับส่วนไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ของโมเลกุลเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้ จึงทำให้เมื่อเพิ่มปริมาณของไฟโบรอิน อนุภาคทรงกลมสามารถกักเก็บเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้มากขึ้น และที่อัตราส่วน (G/SF) เท่ากับ 50/50 และ 30/70 อนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้คงที่และยาวนาน อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินจึงมีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้งานด้วยการฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ในงานด้านการนำส่งยาแบบควบคู่กัน (Dual Drug Delivery systems)

2.6.5 ระบบที่ประกอบด้วยกรดไฮยาลูรอนิคร่วมกับสารอื่น

Lim S. T. และคณะ (2000) [94] ได้ทำการผลิตและวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกและไคโตซาน โดยใช้วิธีการระเหยตัวทำละลายในอิมัลชันน้ำในน้ำมัน เพื่อใช้ในการปลดปล่อยยา Gentamicin Sulphate และเปรียบเทียบกับอนุภาคแคปซูลขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกและเจลาตินที่เตรียมด้วยวิธี Complex coacervation จากผลงานวิจัยพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกและไคโตซานมีขนาดอยู่ในช่วง 19-30 ไมโครเมตร และอนุภาคแคปซูลของกรดไฮยาลูรอนิกและเจลาตินมีขนาดอยู่ในช่วง 10-15 ไมโครเมตร ซึ่งอนุภาคทั้งสองชนิดมีขนาดที่เหมาะสมในการนำส่งยาผ่านระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี

พ่นหรือสเปรย์ผงอนุภาคเข้าไปในระบบทางเดินหายใจ (Insufflation) ผลการทดสอบการกักเก็บตัวยาคพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของโคโตซานบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการกักเก็บยาต่ำที่สุด เนื่องจากโมเลกุลโคโตซานและโมเลกุลของยา Gentamicin Sulphate มีประจุเป็นบวกจึงเกิดแรงผลักรัน ทำให้อนุภาคกักเก็บตัวยาคได้น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกที่โมเลกุลมีประจุเป็นลบพบว่าสามารถกักเก็บตัวยาค Gentamicin Sulphate ที่มีประจุบวกได้ดี นอกจากนี้ อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกบริสุทธิ์และอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมของกรดไฮยาลูรอนิกและโคโตซานสามารถปลดปล่อยตัวยาคออกมาได้มากกว่า 3 ชั่วโมง ผลทดสอบอันดับของการเกิดการยึดติดเยื่อเมือก (degree of mucoadhesion) พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกมีอันดับการยึดติดกับเยื่อเมือกมากที่สุด เนื่องจากโมเลกุลมีความชอบน้ำสูงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไกลโคโปรตีนในเยื่อเมือกได้ดี ดังนั้น อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมของกรดไฮยาลูรอนิกและโคโตซานจึงมีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยาผ่านระบบทางเดินหายใจ

Park S. N. และคณะ (2002) [95] ได้ศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของโครงข่ายเซลล์ที่มีรูพรุนของคอลลาเจนและกรดไฮยาลูรอนิก โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20, -70 และ -196 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเชื่อมขวางโครงข่ายเซลล์ด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl) carbodiimide (EDC) เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกลของโครงข่ายเซลล์ จากผลงานวิจัยพบว่าโครงข่ายเซลล์ก่อนการเชื่อมขวางที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20, -70 และ -196 องศาเซลเซียส มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 230, 90 และ 40 ไมโครเมตร ตามลำดับ และมีความพรุน 58-66 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างที่เป็นรูพรุนภายหลังการเชื่อมขวางด้วย EDC ขนาดรูพรุนจะขึ้นกับอัตราการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freezing rate) โดยเมื่ออัตราการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งลดลงขนาดรูพรุนจะลดลง ผลทดสอบการบวมน้ำพบว่า ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางไม่มีผลต่อการบวมน้ำของโครงข่ายเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ โดยโครงข่ายเซลล์ที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วย EDC และโครงข่ายเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย EDC มีอัตราส่วนการบวมน้ำ (Swelling ratio) เท่ากับ 94 และ 97-98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเชื่อมขวางด้วย EDC จะทำให้โครงข่ายเซลล์มีความต้านทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส และผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังหนู (L929) พบว่าโครงข่ายเซลล์ที่เชื่อมขวางด้วย EDC ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์

Zhou Z. และคณะ (2012) [96] ได้ทำการผลิตและวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ไฮโดรเจลผสมของกรดไฮยาลูรอนิกและเจลาติน โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และทำการเชื่อมขวางไฮโดรเจลผสมด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกลและความเสถียรทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ จากผลงานวิจัยพบว่า การเชื่อมขวางทางเคมีจะทำให้ไฮโดรเจลผสมมีผิวเรียบเป็นเนื้อเดียวกันและมีรูพรุนขนาดเล็ก ไฮโดรเจลผสมที่ได้มีความหนาแน่นมากกว่าไฮโดรเจลที่ไม่ได้ทำการเชื่อมขวาง และเมื่อปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น โครงเลี้ยงเซลล์จะมีลักษณะโครงสร้างคล้ายเส้นใย (Fiber-like structure) ผลการทดสอบการบวมตัวของไฮโดรเจลพบว่า เมื่อปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น ไฮโดรเจลจะบวมน้ำได้มากขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมีหมู่ที่มีความชอบน้ำสูง จึงทำให้โมเลกุลสร้างพันธะกับน้ำได้ดี และเมื่อความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางเพิ่มมากขึ้น ไฮโดรเจลจะบวมน้ำได้น้อยลง เนื่องจากการเชื่อมขวางจะทำให้หมู่ที่มีความชอบน้ำในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกและเจลาตินลดลง โครงสร้างมีความหนาแน่นมากขึ้น รูพรุนมีขนาดเล็กลง จึงทำให้การแพร่ของน้ำเข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ลดลง ผลการทดสอบสมบัติทางกลพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิก จะทำให้ความแข็งแรงต่อการกดอัดของโครงเลี้ยงเซลล์ลดลง เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกมีความยืดหยุ่นมากกว่าเจลาติน โครงเลี้ยงเซลล์จึงมีความยืดหยุ่นมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของสารเชื่อมขวางจะทำให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความแข็งแรงต่อการกดอัดเพิ่มขึ้น ดังนั้น ไฮโดรเจลผสมของกรดไฮยาลูรอนิกและเจลาตินจึงสามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ดี

2.6.6 การพัฒนาชีววัสดุเพื่อใช้ในระบบนำส่งเคอร์คูมิน

Gupta V. และคณะ (2009) [25] ได้ศึกษาและผลิตอนุภาคนาโนผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและไคโตซาน โดยใช้เทคนิค Capillary microdot เพื่อใช้นำส่งเคอร์คูมินผ่านเซลล์มะเร็งเต้านม ผลการวิจัยพบว่า อนุภาคนาโนมีขนาดอนุภาคต่ำกว่า 100 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่มีความเหมาะสมในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์ อนุภาคนาโนของไหมไฟโบรอินบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินสูงกว่าอนุภาคนาโนผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและไคโตซาน โดยมีค่าเท่ากับ 96 และ 64-73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ภายในระยะเวลา 8 วัน เคอร์คูมินสามารถปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคนาโนผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและไคโตซานได้ 0.09-0.13 ไมโครกรัม ซึ่งมีค่าน้อยกว่าปริมาณเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคนาโนของไหมไฟโบรอินบริสุทธิ์ ที่มีค่าเท่ากับ 0.32-

0.68 ไมโครกรัม ซึ่งสอดคล้องกับผลของการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคนาโน เนื่องจากโมเลกุลของไหมไฟโบรอินมีความไม่ชอบน้ำสูงเช่นเดียวกับโมเลกุลของเคอร์คูมิน สามารถเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำได้ดี ตรงข้ามกับโมเลกุลของโคโตซานที่มีหมู่กลูโคซามีนที่มีความชอบน้ำสูง สามารถเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลเคอร์คูมินได้น้อย ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการดูดซับเคอร์คูมินและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคนาโนผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและโคโตซานมีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนจากไหมไฟโบรอินบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการนำส่งเคอร์คูมินผ่านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) กล่าวคือ อนุภาคนาโนของไหมไฟโบรอินสามารถนำส่งเคอร์คูมินผ่านเซลล์มะเร็งเต้านมได้มากกว่าอนุภาคนาโนผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและโคโตซาน อีกทั้งเปอร์เซ็นต์ของการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งยังลดลงเมื่อปริมาณของเคอร์คูมินเพิ่มขึ้น

Yu H. และคณะ (2010) [28] ได้ศึกษาและพัฒนาารูปแบบการกักเก็บเคอร์คูมินบนแป้งที่ถูกดัดแปร (Modified starch) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีทั้งส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดยพัฒนาเป็นรูปแบบไมเซลล์ที่มีเคอร์คูมินอยู่ด้านในโมเลกุล จากผลงานวิจัยพบว่า เมื่อพิจารณาจากผล FTIR ของสารจะพบตำแหน่งพิกเชลของโมเซลล์แป้งที่กักเก็บเคอร์คูมินมีการเคลื่อนไปจากตำแหน่งเดิม คือ จากตำแหน่งเลขคลื่น 3300 เคลื่อนไปยังตำแหน่งเลขคลื่น 3316 ต่อตารางเซนติเมตร แสดงให้เห็นถึงเกิดการอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างเคอร์คูมินและแป้งที่ถูกดัดแปร และเมื่อพิจารณาสเปกตรัมของการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ของเคอร์คูมินในไมเซลล์เทียบกับสเปกตรัมของการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ของเคอร์คูมินในน้ำ พบว่า ตำแหน่งความยาวคลื่นของสเปกตรัมฟลูออเรสเซนส์ของเคอร์คูมินในไมเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจากตำแหน่งความยาวคลื่นของสเปกตรัมฟลูออเรสเซนส์เคอร์คูมินในน้ำจากตำแหน่ง 530 เคลื่อนไปยัง 542 นาโนเมตร แสดงว่าลักษณะ Microenvironment ของเคอร์คูมินมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเคอร์คูมินถูกกักเก็บในไมเซลล์ นอกจากนี้ ผลการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เกิดอะพอพโทซิส (Apoptosis) พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ไมเซลล์ของแป้งที่ถูกดัดแปรที่กักเก็บเคอร์คูมินไว้สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตับเกิดการอะพอพโทซิสได้ดีกว่าการทรีตเซลล์มะเร็งตับด้วยสารละลายเคอร์คูมินโดยตรง

Das R. K. และคณะ (2010) [81] ได้ทำการผลิตและศึกษาอนุภาคนาโนผสมระหว่างอัลจินตโคโตซาน และพลูโรนิค (Pluronic F127) ด้วยวิธี Iontropic pre-gelation เพื่อใช้ในการนำส่งเคอร์คูมินผ่านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) จากผลงานวิจัยพบว่า อนุภาคนาโนที่ได้มีลักษณะเป็นทรง

กลมที่มีผิวเรียบ โดยมีขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 100 นาโนเมตร อนุภาคนาโนผสมของอัลจินตและไคโตซานมีความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมินได้ต่ำกว่าอนุภาคนาโนผสมระหว่างอัลจินต ไคโตซาน และพลูโรนิค เนื่องจากพลูโรนิคเป็นสารลดแรงตึงผิวที่สามารถช่วยให้เคอร์คูมินซึ่งเป็นโมเลกุลไม่ชอบน้ำสามารถละลายเข้ากับโมเลกุลที่ชอบน้ำของอัลจินตและไคโตซานได้ดียิ่งขึ้น โมเลกุลของพลูโรนิคในส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเกิดอันตรกิริยากับส่วนไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของเคอร์คูมิน ขณะเดียวกันโมเลกุลส่วนที่ชอบน้ำของพลูโรนิคจะเกิดอันตรกิริยากับส่วนชอบน้ำในโมเลกุลของอัลจินตและไคโตซาน ส่งผลให้ความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคนาโนมีค่าเพิ่มขึ้น และเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง เคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมา 36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เคอร์คูมินสามารถปลดปล่อยออกมาได้ 51 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง เคอร์คูมินสามารถปลดปล่อยออกมาได้ทั้งหมด 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาถึงจลนศาสตร์ของการปลดปล่อย (Release kinetics) เคอร์คูมินในระบบ พบว่าแบบจำลองการปลดปล่อยสารแบบ Power law มีความเหมาะสมในการอธิบายกลไกของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินในระบบได้ดีที่สุด โดยมีค่ายกกำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) เท่ากับ 0.84 แสดงให้เห็นถึงกลไกการควบคุมการปลดปล่อยสารทั้งแบบการแพร่และการบวมตัวของอนุภาค กล่าวคือ เมื่ออนุภาคนาโนอยู่ในตัวกลางที่เป็นสารละลายจะเกิดการแพร่ของน้ำเข้าสู่ตัวอนุภาค ทำให้เกิดเจลรอบผิวอนุภาค อีกทั้งอัลจินตและไคโตซานเป็นโมเลกุลที่มีความชอบน้ำ จึงสามารถเกิดการบวมตัวได้ดี และเมื่อเวลาผ่านไป ตัวยาหรือสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในอนุภาคก็สามารถแพร่ออกจากอนุภาคได้โดยอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้น การควบคุมการปลดปล่อยสารจึงเกิดขึ้น นอกจากนี้ อนุภาคนาโนที่ไม่ดูดซับเคอร์คูมินจะไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของเซลล์จะลดลงเมื่อปริมาณเคอร์คูมินเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า อนุภาคนาโนสามารถนำส่งเคอร์คูมินผ่านเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้

Manju S. และคณะ (2011) [97] ได้ศึกษาและพัฒนาไมเซลล์ที่ได้จากการคอนจูเกตเคอร์คูมิน บนกรดไฮยาลูรอนิก เพื่อปรับปรุงสมบัติการละลายน้ำและความเสถียรของสารละลายเคอร์คูมิน โดยเตรียมกรดไฮยาลูรอนิกในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์เจือจาง (Dimethyl Sulfoxide; DMSO) จากนั้นเติมสาร 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และ 4-dimethylamino pyridine (DMAP) เพื่อกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก และเตรียมสารละลายเคอร์คูมินในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ จากนั้นนำสารละลายทั้งสองชนิดมาคอนจูเกตกัน

โดยตรงผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification reaction) ซึ่งเกิดขึ้นโดยหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกเกิดการคอนจูเกตกับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของเคอร์คูมิน จากผลงานวิจัยพบว่า ลักษณะการจัดเรียงตัวของไมเซลล์ที่ได้มีลักษณะเป็นรูปร่างทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยในสภาวะบวมตัว 577 นาโนเมตร ไมเซลล์ที่เกิดขึ้นจะมีทั้งส่วนที่ละลายน้ำได้และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ โดยกรดไฮยาลูรอนิกซึ่งเป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ จะจัดเรียงตัวล้อมรอบโมเลกุลของเคอร์คูมินซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ส่งผลทำให้เกิดโครงสร้างแบบ Core-Shell micelle ไมเซลล์ที่ได้มีความเสถียรค่อนข้างสูง โดยทดสอบการย่อยสลายของไมเซลล์ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Phosphate buffer saline; PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเคอร์คูมินบริสุทธิ์ที่มีการย่อยสลายภายใน 25 นาที ไมเซลล์ที่คอนจูเกตกับเคอร์คูมินมีความเสถียรและคงตัวมากกว่า กล่าวคือ การย่อยสลายจะใช้เวลามากกว่า 8 ชั่วโมง และผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังหนู พบว่าเมื่อไมเซลล์มีความเข้มข้นของเคอร์คูมินมากขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้มากขึ้น

Zhu M. และคณะ (2013) [98] ได้ทำการศึกษาและผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของแป้งที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน และทำการเชื่อมขวางอนุภาคขณะกระบวนการขึ้นรูปด้วยสาร N,N-methylene bisacrylamide (MBAA) ที่มีโพแทสเซียมไธโอซัลไฟต์ (Potassium Thiosulfite; $K_2S_2O_2$) เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา และศึกษาความสามารถในการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน จากผลงานวิจัยพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีการกระจายตัวของขนาดในช่วงแคบ โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4-10 ไมโครเมตร อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีประสิทธิภาพในการดูดซับเคอร์คูมินในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ 48.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกักเก็บเคอร์คูมินไว้ในอนุภาคได้ 9.61 มิลลิกรัมต่อกรัมอนุภาค เมื่อความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางเพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้ความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมินและปริมาณเคอร์คูมินที่กักเก็บได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลเคอร์คูมินและหมู่เอไมต์ในโมเลกุลของสารเชื่อมขวาง MBAA ส่งผลให้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนดูดซับเคอร์คูมินได้มากขึ้น อนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมาได้ 80 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของการปลดปล่อยเคอร์คูมินในระบบพบว่า แบบจำลองจลนศาสตร์การควบคุมการ

ปลดปล่อยแบบ Power law มีความเหมาะสมในการอธิบายกลไกการควบคุมการปลดปล่อยคอร์คิวมินบน อนุภาคทรงกลมมากที่สุด โดยมีค่ายกกำลังการปลดปล่อย (Release kinetics; n) เท่ากับ 0.266 และสามารถทำนายกลไกการควบคุมการปลดปล่อยของคอร์คิวมินได้ว่า กลไกการควบคุมการปลดปล่อยคอร์คิวมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีเฉพาะกลไกการแพร่เพียงอย่างเดียว (Fickian diffusion) หรือสามารถมีได้ทั้งกลไกการแพร่ร่วมกับกลไกการบวมตัวของอนุภาค (Anomalous transport)

Pereira A. G. B. และคณะ (2013) [99] ได้ผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีด้วยสาร Glycidyl methacrylate (GMA) เพื่อใช้ในการนำส่งคอร์คิวมินผ่านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2) โดยผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน ใช้ N,N-methylenebisacrylamide (MBA) และโซเดียมเปอร์ซัลเฟต (Sodium persulfate; SPS) เป็นสารเชื่อมขวาง จากผลการวิจัยพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีพื้นผิวขรุขระ อาจเกิดขึ้นจากกระบวนการขึ้นรูปและการทำแห้ง ขนาดอนุภาคเฉลี่ยมีค่าในช่วง 400-500 ไมโครเมตร ผลการวิเคราะห์การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังด้วย GMA ด้วยเทคนิค FTIR พบว่า สเปกตรัมของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกปรับปรุงโครงสร้างแล้ว มีลักษณะแตกต่างจากสเปกตรัมของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ถูกปรับปรุงโครงสร้าง กล่าวคือ เกิดพีคสูงสุดที่ตำแหน่งเลขคลื่นที่ 1718 ต่อตารางเซนติเมตร แสดงถึงพันธะ C=O ของโมเลกุล GMA และผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค H-NMR พบว่า เกิดสัญญาณเรโซแนนซ์ (Resonance signal) ที่ตำแหน่งการเคลื่อนที่ทางเคมี (Chemical shift; δ) 6.16 และ 5.71 ส่วนในล้านส่วน (ppm) แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนในโมเลกุลของแป้งกับหมู่ไวนิลในโมเลกุลของ GMA และพบสัญญาณเรโซแนนซ์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง 1.96 ส่วนในล้านส่วน (ppm) แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอะตอมไฮโดรเจนในโมเลกุลของแป้งกับหมู่เมทิลในโมเลกุลของ GMA อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจะดูดซับคอร์คิวมินในสารละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (Tetrahydrofuran; THF) โดยทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของคอร์คิวมินเท่ากับ 1 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่า อนุภาคทรงกลมสามารถดูดซับคอร์คิวมินได้ 0.085 และ 8.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บคอร์คิวมิน 80.54 และ 82.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในระบบที่จำลองสภาวะของกระเพาะอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 1.2 คอร์คิวมินถูกปลดปล่อยออกมาเพียง 18

เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง และจะปลดปล่อยออกมาสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง แต่ในระบบที่จำลองสภาวะของลำไส้เล็กที่มีค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่า 7 เคอร์คูมินจะถูกปลดปล่อยออกมา 14 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง และจะปลดปล่อยออกมา 38 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง และผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของแป้งที่ดูดซับเคอร์คูมินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด



บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 ไหมไทย (พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1, ศูนย์หม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ)
- 3.1.2 กรดไฮยาลูรอนิก (Tersohyal; Sodium Hyaluronate, Namsiang Co. Ltd, ไทย)
- 3.1.3 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr; Sigma-Aldrich Laborchemikalien, เยอรมัน)
- 3.1.4 น้ำมันถั่วเหลือง (Thanakorn Vegetable Oil Products Co.,Ltd, ไทย)
- 3.1.5 อะซิโตน (Acetone, Qrec , นิวซีแลนด์)
- 3.1.6 กลูตารัลดีไฮด์ (25%, Fluka, Buchs, เยอรมัน)
- 3.1.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl 36.5-38%, J.T. Baker, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.8 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Ajax Finechem, Pty, Ltd, ออสเตรเลีย)
- 3.1.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, Ajax Finechem, Pty, Ltd, ออสเตรเลีย)
- 3.1.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, Ajax Finechem, Pty, Ltd ออสเตรเลีย)
- 3.1.11 ไกลซีน (Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.12 โปรตีเอส XIV (Protease = 3.5 units/mg, Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.13 โซเดียมเอไซด์ (Labchem, APS, ออสเตรเลีย)
- 3.1.14 ตัวทำอิมัลชัน (Tween 80, Labchem, APS, ออสเตรเลีย)
- 3.1.15 เอทานอล (99.7-100%, VWR International Ltd, อังกฤษ)
- 3.1.16 บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS, pH 7.3-7.5, Bio basic Inc., แคนาดา)
- 3.1.17 อะซิทิลอะซิโตน (Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.18 เคอร์คูมิน (Curcumin; $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6 = 368.38 \text{ g/mol}$, Sigma Co., สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.19 ถุงไดอะไลซิส (MWCO 12,000-16,000, Viskase Company Inc, ญี่ปุ่น)
- 3.1.20 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- 3.1.21 p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB ,Sigma-Aldrich, เยอรมัน)

3.1.22 N-acetyl-D-glucosamine (Sigma-Aldrich, เยอรมัน)

3.1.23 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide (DMSO), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ = 78.13 g/mol, Riedel-de Haen®, Sigma-Aldrich Laborchemikaline, สหรัฐอเมริกา)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Universal 320R, Hettich, เยอรมัน)

3.2.2 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (CHRIST®, เยอรมัน)

3.2.3 UV-Vis spectrophotometer (UV -2450, Shimudzu, ญี่ปุ่น)

3.2.4 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope Nikon, Eclipse 80i, ญี่ปุ่น)

3.2.5 กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JSM-5410LV, JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)

3.2.6 เครื่อง microplate reader (FLUOstar, Omega, BGM LABTECH, เยอรมัน)

3.2.7 ตู้เย็น -4°C (NR-BU343, Panasonic, ไทย)

3.2.8 ตู้เย็น -20 °C (Sandenintercool, ไทย)

3.2.9 ตู้เย็น -40 °C (Haier, จีน)

3.2.10 เครื่องย่อยสลายโดยใช้พลังงานเสียงความถี่สูง (Sonicator)

3.2.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter, professional meter, pp-50, เยอรมัน)

3.2.12 Hotplate Stirrer (Cimarac 3, Thermolyne, สหรัฐอเมริกา)

3.2.13 ขวดแก้วก้นกลม (Becthai, ไทย)

3.2.14 Overhead stirrer (IKA Labortechnik, เยอรมัน)

3.2.15 เครื่อง Zetasizer (650, Malvern, อังกฤษ)

3.2.16 ไบพัต

3.2.17 Capillar viscometer (No.II 50120)

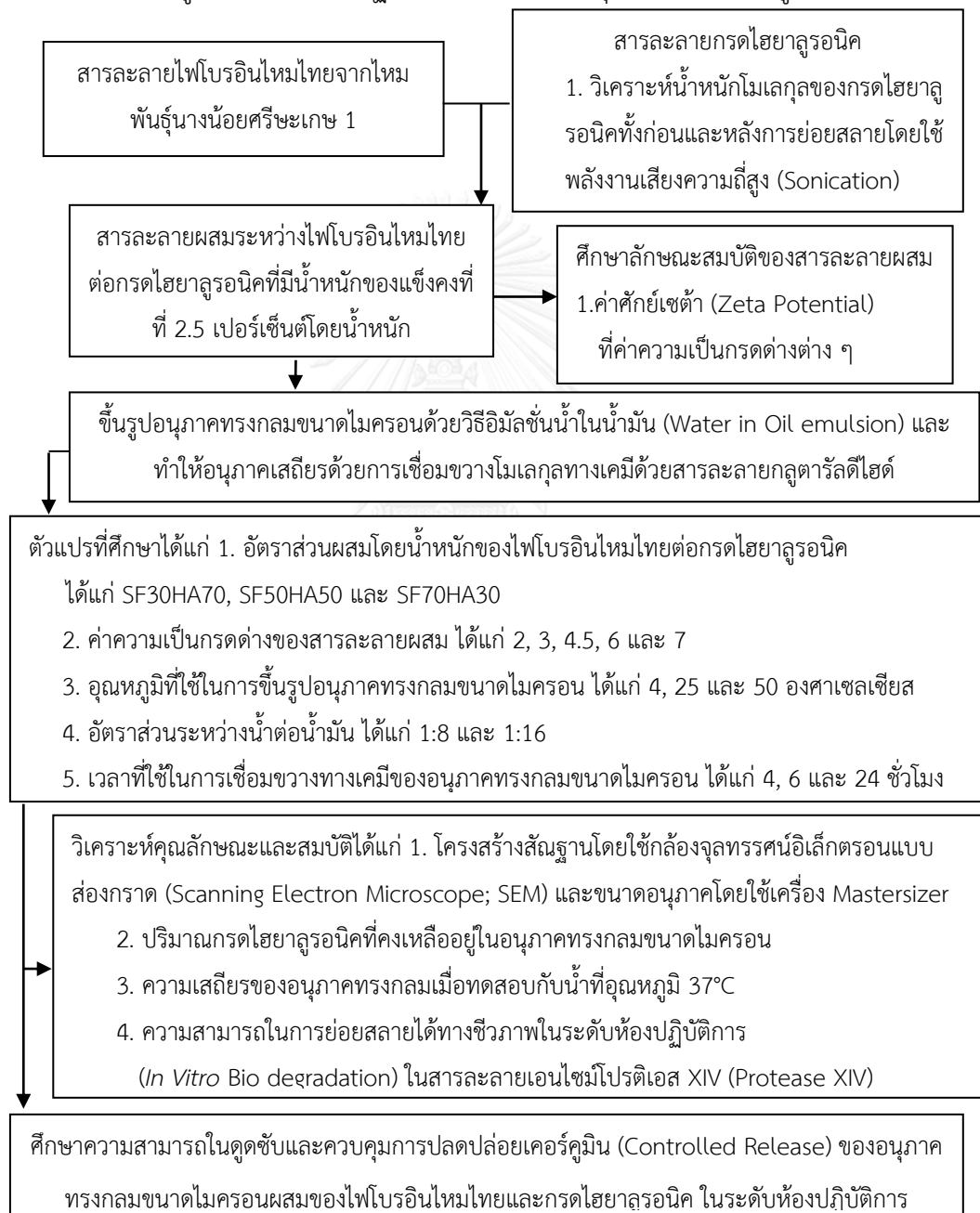
3.2.18 Autopipette (Eppendorf, เยอรมัน)

3.2.19 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (1235 PC, Shel-Lab, สหรัฐอเมริกา)

3.2.20 ตะแกรงคัดแยกขนาด (Sieve OSAKA IIDA, Co. Ltd, ญี่ปุ่น)

3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์และการศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางชีวภาพ ตลอดจนความสามารถในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังแผนผังในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายกรดไฮยาโลรอนิค

การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน [100] ดังแสดงในรูปที่ 3.2

การกำจัดกาวไหม

1. ชั่งรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 จำนวน 40 กรัม
2. ต้มรังไหมในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที
3. นำไหมที่ต้มแล้วมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water; DI) ประมาณ 3-4 รอบ เพื่อกำจัดกาวไหมเซรีซินออก
4. ทำซ้ำข้อ 2-3 อีก 1 ครั้ง
5. นำไหมที่ผ่านการกำจัดกาวไหมมาผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณของเซรีซินที่ถูกกำจัดออกไป
6. ฉีกไหมให้ฟูเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

1. นำไหมที่ลอกกาวไหมเรียบร้อยแล้วมาละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร ในอัตราส่วนไหม 8 กรัมต่อลิเทียมโบรไมด์ 24 กรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง
2. นำไหมที่ละลายเรียบร้อยแล้วมาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ออก โดยเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนที่เวลาทุก ๆ 15 นาทีในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนวันละ 3 ครั้ง (เช้า กลางวัน เย็น)
3. นำสารละลายไหมไฟโบรอินที่ไดอะไลซ์เสร็จเรียบร้อยแล้วมาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อกำจัดฝุ่นหรือสิ่งเจือปนต่าง ๆ
4. สารละลายไฟโบรอินที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 6.5-8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเก็บสารละลายไฟโบรอินที่ได้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก

1. เตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน
2. ลดความหนืดของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกด้วยวิธีการย่อยสลายโดยใช้พลังงานเสียงความถี่สูง (Sonication) เป็นเวลา 20 นาที ใช้พลังงาน (Amplitude) ในการย่อยสลาย 40 เปอร์เซ็นต์ ใช้รอบในการปล่อยคลื่นเสียงในแต่ละวินาที (Cycle) 30 เปอร์เซ็นต์
3. นำสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่ได้มาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก [101]

การหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก จะวิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารออกมาในรูปของน้ำหนักโมเลกุลจากค่าความหนืดเฉลี่ย (Viscosity average molecular weight, \overline{M}_v) โดยเตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่ถูกย่อยสลายด้วยพลังงานเสียงความถี่สูง และสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่ถูกย่อยสลายด้วยพลังงานเสียงความถี่สูง ที่ความเข้มข้นต่ำ อย่างน้อย 4 ค่า ซึ่งในการวิเคราะห์นี้เตรียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นวัดความหนืดด้วยเครื่อง Ubbelodhe viscometer โดยการจับเวลาที่สารละลายไหลผ่านหลอดคาปิลลารี จากนั้นคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารได้ดังสูตร

$$[\eta] = K \overline{M}_v^a \quad (3.1)$$

โดยที่

$[\eta]$ = Intrinsic viscosity

K, a คือ Mark-Houwink coefficients ขึ้นกับตัวทำละลาย ซึ่งในการวิเคราะห์นี้อ้างอิงจากรายงานของ Cleland R. L. และคณะ (1970) [101] ใช้ตัวทำละลาย คือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ซึ่งมีค่า K เท่ากับ 0.0228 มิลลิลิตรต่อกรัม และค่า a เท่ากับ 0.816

\overline{M}_v = Viscosity average molecular weight



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

3.4.2 ค่าศักย์ゼต้า (Zeta potential) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายกรดไฮยาลูรอนิกและสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก

การวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้า (Zeta potential) ของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายกรดไฮยาลูรอนิกและสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ในงานวิจัยนี้จะศึกษาค่าศักย์ゼต้าของสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน โดยเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายกรดไฮยาลูรอนิกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีความเข้มข้นของของแข็งรวม 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 มาปรับค่าความเป็นกรดต่างให้มีค่าเท่ากับ 2, 3, 4.5, 6, และ 7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้าด้วยเครื่อง Zeta sizer (650, Malvern, ประเทศอังกฤษ)

3.4.3 การเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก

1. เตรียมวัฏภาคน้ำ (Aqueous phase or Disperse phase) โดยเตรียมสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 และมีความเข้มข้นของของแข็งรวมที่ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 ปั่นกวนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที

2. เตรียมวัฏภาคน้ำมัน (Oil phase or Continuoue phase) โดยเตรียมน้ำมันถั่วเหลืองผสมกับตัวทำอิมัลชัน (Tween 80) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปั่นกวนให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 นาที

3. หยดวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำมัน ปั่นกวนอิมัลชันด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

4. ลดอุณหภูมิของสารละลายอิมัลชันลงเป็น 4 องศาเซลเซียส โดยการใช้น้ำแข็งอังรอบภาชนะ เพื่อให้อนุภาคมีความคงตัวมากขึ้น ปั่นกวน 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. เชื่อมขวางอนุภาคทางเคมีโดยการเติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ลงในสารละลายอิมัลชัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ให้เท่ากับ 3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นเชื่อมขวางอนุภาคในที่มีด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และลดความเร็วรอบในการปั่นกวนลงให้เหลือ 150 รอบต่อนาที
6. เติมอะซิโตนลงในสารละลายอิมัลชันที่เชื่อมขวางอนุภาคเรียบร้อยแล้ว เพื่อล้างน้ำมันออกจากผิวอนุภาค ปั่นกวนต่อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
7. แยกอนุภาคออกจากน้ำมันโดยใช้ตะแกรงคัดแยกขนาด พร้อมทั้งล้างน้ำมันส่วนเกินออกจากอนุภาคด้วยอะซิโตนหลาย ๆ ครั้ง
8. ล้างอนุภาคด้วยสารละลายไกลซีน ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที เพื่อกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับอนุภาคออก
9. ล้างอนุภาคด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที เพื่อกำจัดกลูตารัลดีไฮด์และไกลซีนที่ตกค้างออก แล้วนำอนุภาคที่ได้มาทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.4.4 การวิเคราะห์ลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

3.4.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) และขนาดของอนุภาคโดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Mastersizer)

ศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนขณะอนุภาคบวมตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM, JSM-5410LV, JEOL Ltd, ญี่ปุ่น) โดยนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมาแช่ในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคทรงกลมบวมตัวอย่างเต็มที่ แล้วนำอนุภาคมาผ่านกระบวนการการรักษาสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตนหรือแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 30, 50 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้นใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวแทนที่สารละลายอินทรีย์ แล้วทำให้

คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นแก๊ส ภายใต้อุณหภูมิและความดันวิกฤต (Critical point) ซึ่งเป็นจุดที่ของเหลวและแก๊สมีความหนาแน่นเท่ากัน โดยค่าอุณหภูมิวิกฤตมีค่าเท่ากับ 31 องศาเซลเซียส และค่าความดันวิกฤตมีค่าเท่ากับ 1,072 psi. วิธีนี้จะทำให้ตัวอย่างแห้งและคงรูปเดิม โดยที่พื้นผิวและโครงสร้างของตัวอย่างไม่ถูกทำลาย จากนั้นนำอนุภาคที่ได้มาวางบนแท่นเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปเคลือบด้วยทองเพื่อให้ชิ้นงานเกิดการนำไฟฟ้า แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1,000 และ 5,000 เท่า เพื่อคุณลักษณะพื้นผิวภายนอกของชิ้นงาน สำหรับกรณีการศึกษาลักษณะภายในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เนื่องจากอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กสามารถเตรียมได้โดยการสับอนุภาคให้ละเอียดแล้วนำมาวางบนแท่นเตรียมตัวอย่าง และนำไปเคลือบทองเพื่อให้ชิ้นงานเกิดการนำไฟฟ้า แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดเพื่อคุณภาพตัดขวางอนุภาคด้วยกำลังขยายเท่าเดิม

การวัดขนาดอนุภาคทรงกลมโดยเครื่อง Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd สามารถวัดอนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วง 0.2-2000 ไมโครเมตร โดยทำการวัดขนาดอนุภาคขณะแขวนลอยอยู่ในน้ำ โดยใช้ความเร็วของปั๊ม (Pump speed) เท่ากับ 3550 รอบต่อนาที ระบบจะแสดงผลในรูปของขนาดอนุภาคเฉลี่ย และกราฟการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่วัดได้ และเพื่อความแม่นยำในการวัด ระบบจะทำการปล่อยคลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (Sonication) ทำให้อนุภาคที่แขวนลอยในน้ำกระจายตัวอย่างอิสระมากขึ้น

3.4.4.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่เหลือยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay [102, 103]

การหาปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลืออยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยวิเคราะห์ปริมาณ N-acetyl-D-glucosamine ที่อยู่ในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก ทำได้โดย

1. ไฮโดรไลซ์อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน 10 มิลลิกรัม ในน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง
2. ปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายที่ไฮโดรไลซ์เรียบร้อยแล้วให้มีความค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4 N

3. เตรียมสารละลายอะซีติลอะซีโตน โดยนำสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.25 N ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับอะซีติลอะซีโตน ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ปั่นกวนให้เข้ากัน แล้วนำสารละลาย อะซีติลอะซีโตนที่ได้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายที่ไฮโดรไลซ์แล้ว ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สารละลายอะซีติลอะซีโตนจะเกิดปฏิกิริยา Acetylation กับสารละลายที่ไฮโดรไลซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Pyrrole intermediate

4. นำสารละลายที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ได้จากการผสมระหว่าง *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) 1.6 กรัม กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้หลังจากเติม Ehrlich's reagent จะเปลี่ยนเป็นสีแดง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Pyrrole intermediate และ *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) และมีฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45-60 นาที สารละลายที่ได้จะเป็นสีม่วงอมแดง (Reddish-Purple color) การเกิดปฏิกิริยาของ Elson Morgan assay สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.3 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 528 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine เพื่อหาปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลืออยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยคิดเทียบสัดส่วนโมลระหว่างโมลของ N-acetyl-D-glucosamine ต่อโมลของกรดไฮยาลูรอนิก ดังแสดงในสมการ

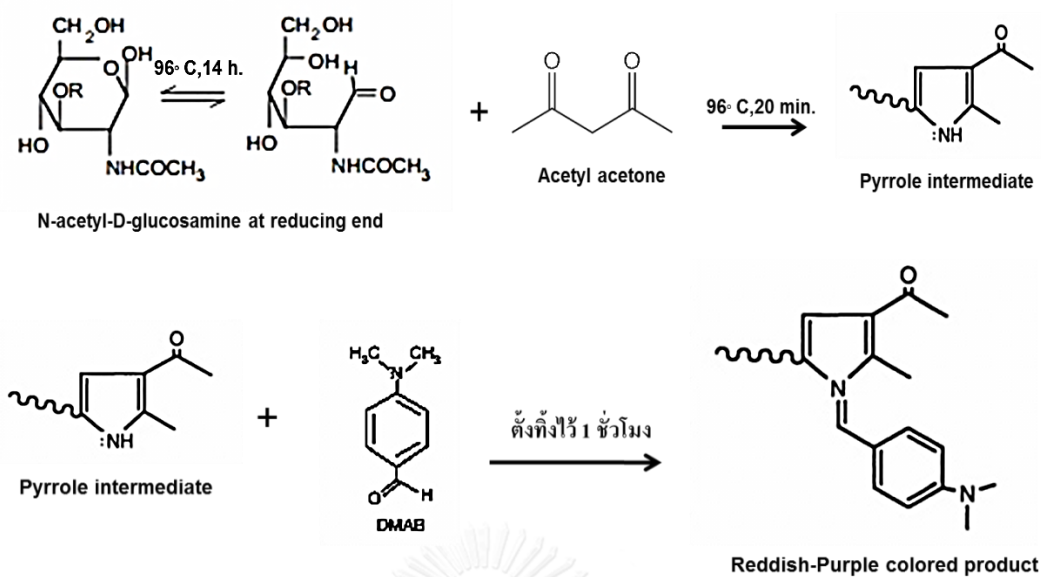
$$\frac{\text{น้ำหนักของ N-acetyl-D-glucosamine ที่วัดได้}}{M_w \text{ ของ N-acetyl-D-glucosamine 1 หน่วยย่อย}} = \frac{\text{น้ำหนักของกรดไฮยาลูรอนิก}}{M_w \text{ ของกรดไฮยาลูรอนิก 1 หน่วยย่อย}} \quad (3.2)$$

$$\text{น้ำหนักของกรดไฮยาลูรอนิก} = \text{น้ำหนักของ N-acetyl-D-glucosamine ที่วัดได้} \times 1.7 \quad (3.3)$$

โดยที่

M_w ของ N-acetyl-D-glucosamine 1 หน่วยย่อย มีค่าเท่ากับ 221.21 กรัมต่อโมล

M_w ของกรดไฮยาลูรอนิก 1 หน่วยย่อย มีค่าเท่ากับ 379 กรัมต่อโมล



รูปที่ 3.3 การเกิดปฏิกิริยาของ Elson-Morgan assay [103]

3.4.4.3 การวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคทรงกลมเมื่อทดสอบกับน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก สามารถทำได้โดย

1. ชั่งน้ำหนักอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน 5 มิลลิกรัม เติมน้ำปราศจากไอออนที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บผลตามช่วงเวลา คือ 2, 24, 72 และ 144 ชั่วโมง
2. ดูดน้ำปราศจากไอออนออกเพื่อนำไปวัดปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay แล้วนำอนุภาคทรงกลมที่เหลืออยู่ไปทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักอนุภาคทรงกลมที่คงเหลือภายหลังการทำแห้ง

3.4.4.4 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (*In Vitro* Biodegradation) [104]

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนทำได้โดย

1. ชั่งน้ำหนักอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน 5 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนสารละลายเอนไซม์ทุก ๆ 2 วัน เก็บผลตามช่วงเวลา คือ 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน

2. ล้างอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง และนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น ชั่งน้ำหนักแห้งภายหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และคำนวณร้อยละของน้ำหนักคงเหลือได้ดังสูตร

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือ} = \frac{W_f}{W_i} \times 100 \quad (3.4)$$

โดยที่

W_f = น้ำหนักแห้งของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน หลังแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV

W_i = น้ำหนักแห้งของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ก่อนแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV

3.4.5 การศึกษาสมบัติการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน [6, 105]

3.4.5.1 การศึกษาความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

1. เตรียมสารละลายเคอร์คูมิน โดยละลายเคอร์คูมินในเอทานอลบริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ชั่งน้ำหนักอนุภาคทรงกลม 20 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายเคอร์คูมินที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ในที่มืด เพื่อให้สารละลายเคอร์คูมินถูกดูดซับอย่างเต็มที่
3. ดูดสารละลายเคอร์คูมินออก แล้วนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนไปประเหยแห้งเป็นเวลา 1 วัน
4. แบ่งอนุภาคทรงกลมที่ดูดซับเคอร์คูมินเรียบร้อยแล้ว 4 หลอด หลอดละ 5 มิลลิกรัม เติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ลงไป เพื่อละลายเคอร์คูมินออก แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร
5. เปลี่ยนสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ใหม่ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของเคอร์คูมินเช่นเดิม
6. ทำซ้ำข้อ 5 จนกว่าสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์จะละลายเคอร์คูมินออกมาจนหมด
7. คำนวณหาประสิทธิภาพในการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Entrapment efficiency) และร้อยละน้ำหนักเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (%Drug loading) ได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละน้ำหนักเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (\%Drug loading)} = \frac{\text{น้ำหนักเคอร์คูมินทั้งหมดที่ตรวจวัดได้}}{\text{น้ำหนักเคอร์คูมินทั้งหมดที่ตรวจวัดได้} + \text{น้ำหนักอนุภาคทรงกลม}} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\text{ประสิทธิภาพในการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Entrapment efficiency)} = \frac{\text{น้ำหนักเคอร์คูมินทั้งหมดที่ตรวจวัดได้}}{\text{น้ำหนักเคอร์คูมินเริ่มต้นที่ใช้ในการดูดซับ}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.4.5.2 การศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ

1. นำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ดูดซับเคอร์คูมิน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เรียบร้อยแล้ว ปริมาณ 5 มิลลิกรัม แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลาย Fetal Bovine Serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อช่วยรักษาความเสถียรของเคอร์คูมิน และโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

2. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บผลตามช่วงเวลา คือ 1, 2, 3, 4, 6, 10, 16, 24, 32, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของเคอร์คูมิน ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และดูดสารละลายที่เหลือออกให้หมดแล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลาย Fetal Bovine Serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงไปใหม่ จากนั้นคำนวณหาปริมาณร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมิน จากสูตร

$$C_i = \sum_{i=0}^t M_i \quad (3.7)$$

$$\text{ร้อยละการปลดปล่อยสะสม} = \frac{C_i}{C_T} \times 100 \quad (3.8)$$

โดยที่

C_i = ปริมาณของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมในแต่ละช่วงเวลา

M_i = ปริมาณของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยที่ช่วงเวลา i

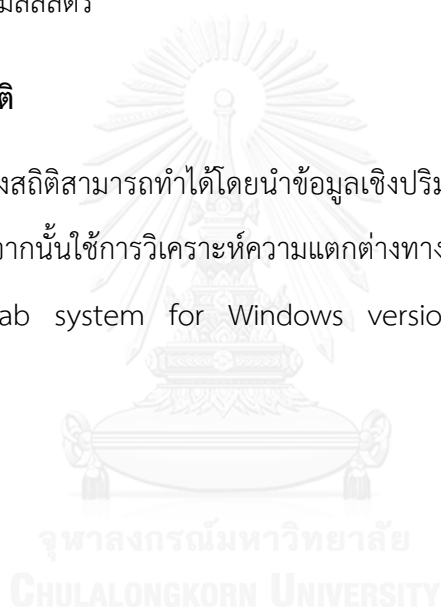
C_T = ปริมาณของเคอร์คูมินทั้งหมดที่ถูกดูดซับโดยอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

การทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ

ขั้นตอนการทดสอบเหมือนกับขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ แต่เปลี่ยนสารละลายที่ใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 ที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร สารละลาย Fetal Bovine Serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติสามารถทำได้โดยนำข้อมูลเชิงปริมาณที่ได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลแบบ ANOVA ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} < 0.05$)



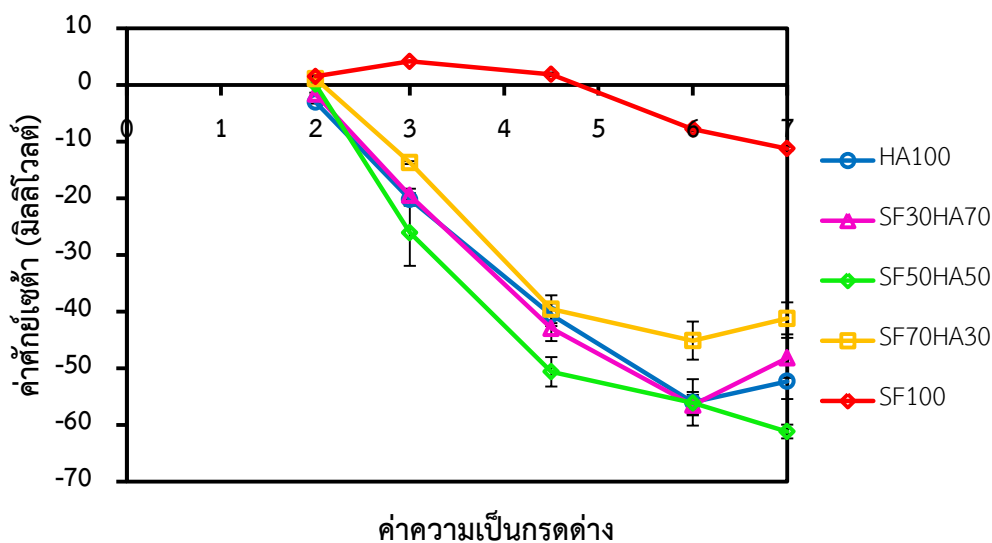
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ผลของค่าความเป็นกรดต่างต่อลักษณะสารละลายที่ได้

4.1.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA100) และสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก (SF/HA)

การศึกษาค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทย สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก และสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก จะแสดงถึงค่าประจุทางไฟฟ้าบริเวณระนาบเฉือนของอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายโดยวัดออกมาในรูปของค่าความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวอนุภาคกับศักย์ไฟฟ้าในสารละลาย ผลการวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าของสารละลายที่มีความเป็นกรดต่างแตกต่างกันแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเท่ากับ 2 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยมีค่าเท่ากับ +1.53 มิลลิโวลต์ และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้นเป็น 3, 4.5, 6 และ 7 ค่าศักย์เซต้าที่ได้มีค่าเท่ากับ +4.18, +1.90, -7.78 และ -11.23 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ซึ่งประมาณค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินเท่ากับ 0 ได้ที่ค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.5-4.7 มิลลิโวลต์ แสดงถึงค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point; pI) ของสารละลายไฟโบรอิน การเปลี่ยนแปลงค่าศักย์เซต้าหรือค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายจะขึ้นกับความสมดุลของประจุบวกและประจุลบ (Charge balance) ที่อยู่ในโมเลกุลไฟโบรอิน [85] อีกทั้งในขั้นตอนการวิเคราะห์หาค่าศักย์เซต้าของสารละลาย ซึ่งจะทำให้การปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ต่ำลงด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl) เมื่อโมเลกุลของกรดไฮโดรคลอริกอยู่ในสถานะสารละลาย โมเลกุลสามารถแตกตัวให้โปรตอน (Proton; H^+) ที่แสดงประจุบวก ทำให้ค่าศักย์เซต้าที่ได้เมื่อค่าความเป็นกรดต่างต่ำลงมีค่าเป็นบวก นอกจากนี้เมื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างให้สูงขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NaOH) อิทธิพลของประจุลบจากหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) ในโมเลกุลของโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ค่าศักย์เซต้าที่ได้มีค่าเป็นลบ



รูปที่ 4.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก (HA100) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 โดยมีความเข้มข้นของของแข็งรวม 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ

สำหรับค่าศักย์เซต้าของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่ค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ มีค่าเป็นลบทั้งหมด เนื่องจากในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมีทั้งหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ไฮดรอกซิลที่แสดงประจุลบเป็นจำนวนมาก ถึงแม้ว่าจะทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ต่ำลงด้วยกรดไฮโดรคลอริกประจุลบจำนวนมากในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกยังคงบดบังประจุบวกจากโปรตอนในโมเลกุลของกรดไฮโดรคลอริก ค่าศักย์เซต้าที่ได้จึงมีค่าเป็นลบ และสามารถประมาณค่าไอโซอิเล็กทริกของกรดไฮยาลูรอนิกได้เท่ากับ 2 เมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าศักย์เซต้าของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีแนวโน้มเป็นลบมากขึ้น

เมื่อพิจารณาค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก จะเห็นว่าค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักมีแนวโน้มใกล้เคียงกับค่าศักย์เซต้าของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก เนื่องจากอิทธิพลของประจุลบจำนวนมากจากหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมีมากกว่าประจุบวกจากหมู่อะมิโนใน
















โมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทย ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมที่ได้จึงใกล้เคียงกับค่าศักย์เซต้าของกรดไฮยาลูรอนิก และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายผสมสูงขึ้น ค่าศักย์เซต้าที่ได้มีแนวโน้มเป็นลบมากขึ้น

เมื่อพิจารณาลักษณะสารละลายผสมในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักจะพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างช่วง 2-4.5 สารละลายไฟโบรอินไหมไทยมีค่าศักย์เซต้าหรือค่าประจุทางไฟฟ้าเป็นบวก แสดงถึงการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลแบบ Protonated form ของหมู่อะมิโนในโมเลกุลโปรตีน และเมื่อพิจารณาค่าประจุทางไฟฟ้าของกรดไฮยาลูรอนิกที่ค่าความเป็นกรดต่างช่วงเดียวกัน จะพบว่าสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีค่าศักย์เซต้าหรือค่าประจุทางไฟฟ้าเป็นลบ แสดงถึงลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้างโมเลกุลแบบ Deprotonated form ของหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลพอลิแซ็กคาไรด์ [87] ส่งผลให้สารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักที่มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 2-4.5 เกิดแรงดึงดูดแบบแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (Electrostatically attraction) สารละลายผสมที่ได้มีลักษณะขุ่น ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งน่าจะเกิดจากการก่อตัวของสารประกอบของโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ (Complex coacervate) [85, 106-109] แสดงได้ดังสมการ



เมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายผสมเข้าใกล้จุดไอโซอิเล็กทริกของไหมไฟโบรอิน ซึ่งเป็นจุดที่ไฟโบรอินเกิดการตกตะกอนจะสังเกตเห็นว่า สารละลายขุ่นมากขึ้น [110]

นอกจากนี้ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6 และ 7 สารละลายไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีค่าศักย์เซต้าหรือค่าประจุไฟฟ้าเป็นลบ โมเลกุลของสารทั้งสองชนิดเกิดแรงผลักรัน สารละลายผสมที่ได้จึงมีลักษณะใส เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นผลจากอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ของโมเลกุลทั้งสองชนิด

ตัวอย่าง สารละลายผสม	pH = 2	pH = 3	pH = 4.5	pH = 6	pH = 7
SF30HA70					
SF50HA50					
SF70HA30					

รูปที่ 4.2 ลักษณะสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสม โดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 และมีความเข้มข้นของของแข็งรวม 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ

Malay O. และคณะ (2007) [85] ได้ทำการศึกษาค่า Electrophoretic mobility ของสารละลายไหมไฟโบรอินและสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งค่านี้มีความสัมพันธ์กับค่าศักย์เซต้าของสารละลาย โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางทฤษฎีตามสมการของเฮนรี (Henry's law) ซึ่งขึ้นอยู่กับค่าคงที่ทางไดอิเล็กตริก (Dielectric constant) และค่าความหนืดของของเหลวที่อุณหภูมินั้น แขนงลอย ผลการศึกษาพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่า 3.9 ค่า Electrophoretic mobility ของสารละลายไหมไฟโบรอินมีค่าเป็นบวก และมีค่าไอโซอิเล็กตริกอยู่ในช่วง 3.8-4.2 ส่วนค่า Electrophoretic mobility ของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีค่าเป็นลบเมื่อค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 2.5 และเมื่อนำสารละลายทั้งสองชนิดมาผสมกันที่ค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 2.5-3.9 สารละลายผสมมีลักษณะขุ่น แสดงถึงการเกิด Complex coacervation ของสารทั้งสองชนิดและ

เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง สารละลายเกิดการแยกชั้น โดยมีชั้นของตะกอน Coacervate อยู่ด้านล่าง และมีส่วนสารละลายใสอยู่ด้านบน แสดงถึงการมีสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมากเกินไป หากเพิ่มสารละลายไฟโบรอินเข้าไปในระบบ จะทำให้ชั้นของตะกอน Coacervate มีมากขึ้น เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถเกิดอันตรกิริยากับหมู่อะมิโนในโมเลกุลของไหมไฟโบรอินได้มากขึ้น นอกจากนี้ Lenormand H และคณะ (2011) [109] ได้ศึกษาอันตรกิริยาแบบแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างกรดไฮยาลูรอนิกและซีรัมอัลบูมินพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 3.2-2.3 เป็นจุดที่สารทั้งสองชนิดมีประจุตรงข้ามกัน สามารถเกิดเป็น complex coacervation และที่ค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 5.3-6 สารทั้งสองชนิดสามารถละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว ไม่เกิดตะกอน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น

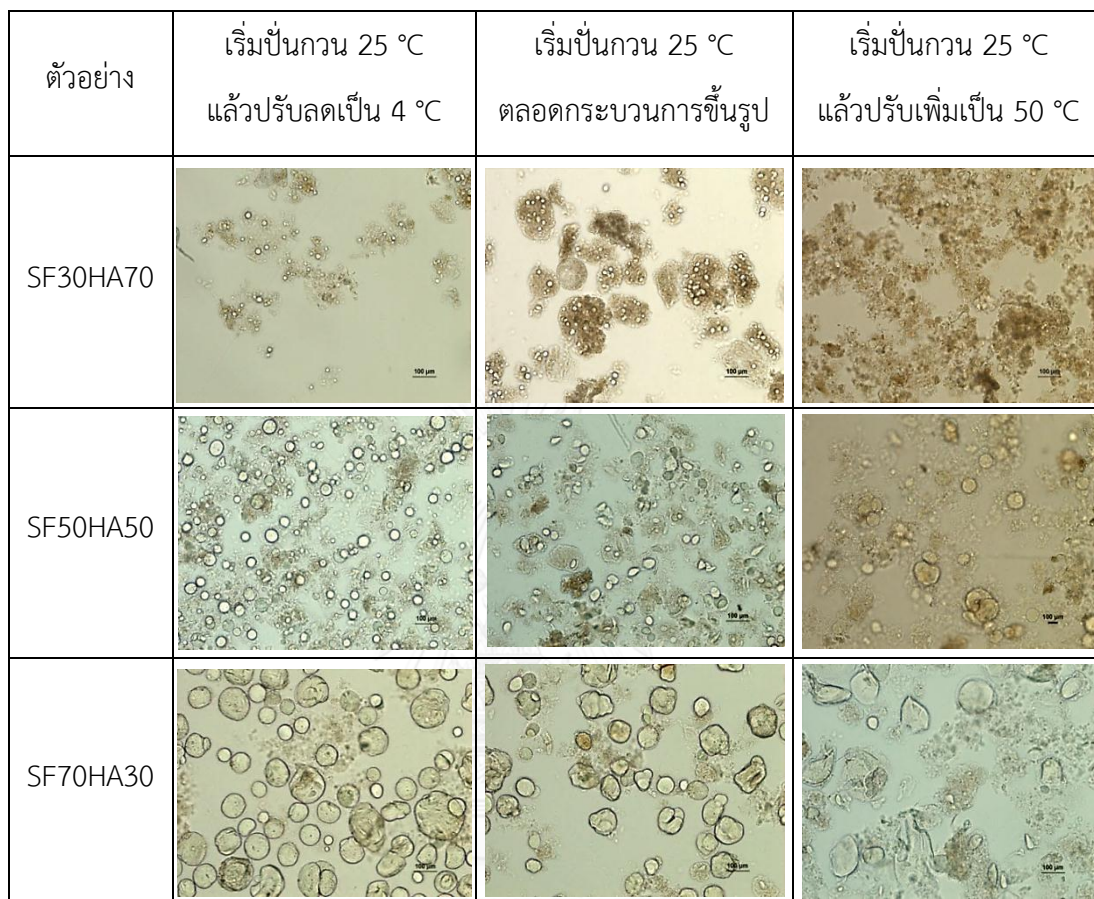
ในงานวิจัยนี้ สารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ได้จากกระบวนการไดอะไลซ์ และสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่เตรียมได้จากการละลายในน้ำปราศจากไอออน สารละลายทั้งสองชนิดมีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 6 เมื่อนำมาผสมกันในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ สารละลายผสมที่ได้สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ ไม่เกิดตะกอน ลักษณะของสารละลายที่ได้มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้งานในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอีมีลชันน้ำในน้ำมัน ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายผสมของ ไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนต่อไป

4.2 ผลของสภาวะการขึ้นรูปต่อลักษณะอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้

4.2.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ สารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกสามารถผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายเท่ากับ 6 ในงานวิจัยนี้ได้ทำศึกษาการขึ้นรูปอนุภาคด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันเท่ากับ 25:200 (1:8) เริ่มปั่นกวนอิมัลชันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ใช้ความเร็วรอบในการปั่นกวน 300 รอบต่อนาที ตลอดกระบวนการขึ้นรูป จากนั้นศึกษาผลของการปรับอุณหภูมิในระหว่างการขึ้นรูปเพื่อให้อนุภาคมีความคงตัวยิ่งขึ้นโดยยังไม่ทำการเชื่อมขวางอนุภาค สังเกตลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ภายหลังการล้างน้ำมันที่เคลือบผิวอนุภาคออกด้วยอะซิโตน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า จากผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่า เมื่อเริ่มปั่นกวนอิมัลชันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วปรับลดอุณหภูมิขณะปั่นกวนอิมัลชันเป็น 4 องศาเซลเซียส อนุภาคทรงกลมที่ได้ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก มีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวดี เนื่องจากการปรับลดอุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส จะทำให้สารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกมีความหนืดมากขึ้น อนุภาคทรงกลมที่ได้จะมีลักษณะคล้ายเจลที่มีความคงตัว แต่เมื่อเริ่มปั่นกวนอิมัลชันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และรักษาระดับอุณหภูมิขณะปั่นกวนอิมัลชันเป็น 25 องศาเซลเซียส ตลอดกระบวนการขึ้นรูปจะพบว่า อนุภาคทรงกลมที่สังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก มีลักษณะคล้ายเจลที่มีความคงตัว แต่มีบางส่วนที่ไม่เป็นทรงกลม รูปทรงบิดเบี้ยว อนุภาคที่ผลิตได้มีความคงตัวไม่มากพอที่รักษาภาพทรงกลมไว้ได้ และเมื่อพิจารณาสภาวะที่เริ่มปั่นกวนอิมัลชันอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วปรับอุณหภูมิขณะปั่นกวนอิมัลชันให้สูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส โดยคาดหวังให้ไฟโบรอินไหมไทยเกิดการเจลมากขึ้นหรือเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างเป็น β -sheet แต่ผลการศึกษาพบว่า อนุภาคทรงกลมที่สังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ไม่เป็นทรงกลม รูปทรงบิดเบี้ยว บางอนุภาคเกิดการแตกจนไม่สามารถรักษารูปทรงไว้ได้ อาจเนื่องมาจากการปรับอุณหภูมิให้สูงขึ้น มีผลทำให้ความหนืดของสารละลายลดลง อนุภาคที่

คงตัวจึงเกิดขึ้นได้ยาก อีกทั้งอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้สารละลายไฟโบรอินไหมไทยเกิดเป็นเจลก่อนการเกิดเป็นอนุภาคทรงกลม



รูปที่ 4.3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงลักษณะอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก (ยังไม่ผ่านการคัดแยกขนาด) ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ภายหลังจากขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันและการล้างน้ำมันที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยอะซิโตน โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการปั่นขึ้นรูปต่าง ๆ (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

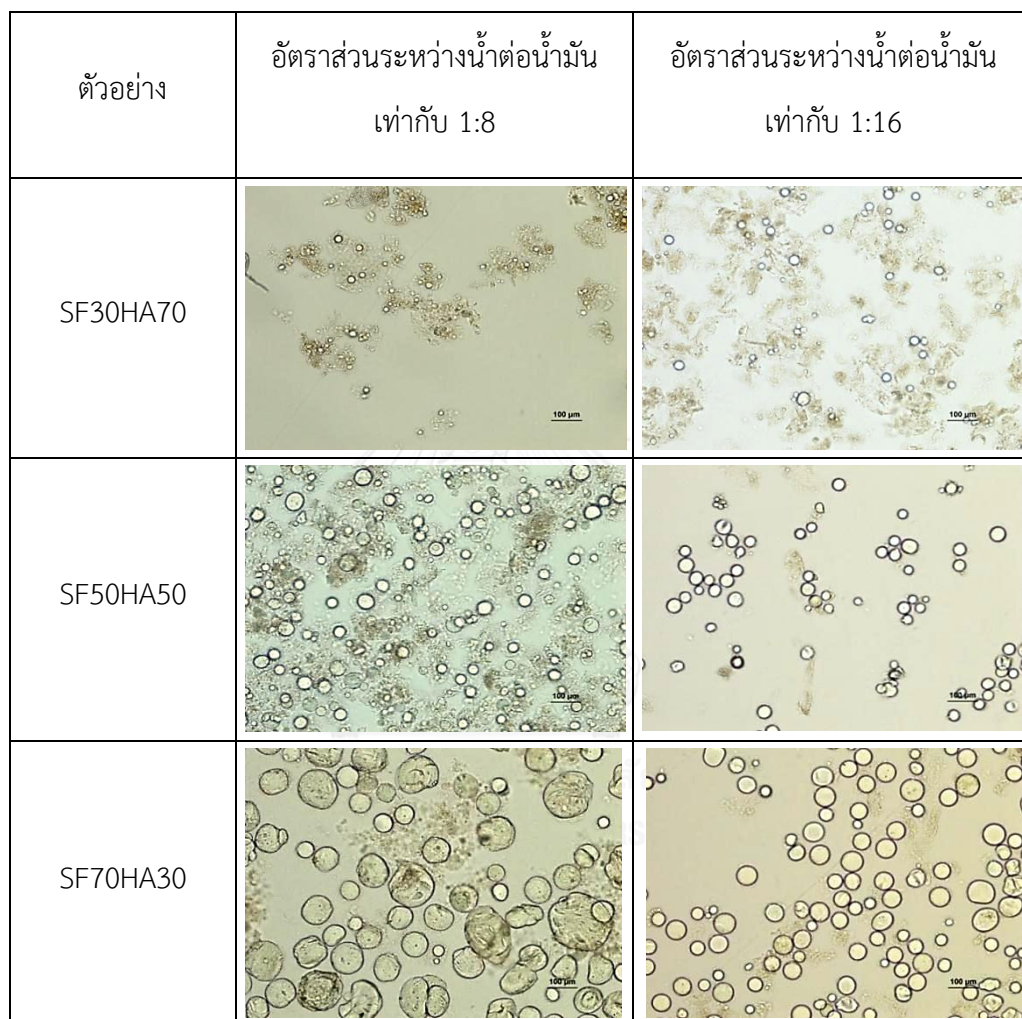
จากผลการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการขึ้นรูปมีผลต่อลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้อย่างมาก ในงานวิจัยนี้จึงเลือกการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันโดยเริ่มปั่นกวนอิมัลชันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับลดอุณหภูมิในการขึ้นรูปเป็น 4 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะในการศึกษาลักษณะอนุภาคที่ผลิตได้ต่อไป

4.2.2 อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อขนาดและลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษ้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก โดยวิภูภาคน้ำที่ใช้คือ สารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก วิภูภาคน้ำมันที่ใช้คือ น้ำมันถั่วเหลืองผสมกับตัวทำอิมัลชัน ชนิด Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้อุณหภูมิในการเริ่มปั่นกวนอิมัลชัน 25 องศาเซลเซียส ปั่นกวนเป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับลดอุณหภูมิในการขึ้นรูปเป็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้อนุภาคคงตัวยิ่งขึ้น (จากผลการศึกษาในหัวข้อ 4.2.1) และปั่นกวนที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที จากนั้นสังเกตลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ที่ยังไม่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคภายหลังการล้างน้ำมันออกจากผิวอนุภาคด้วยอะซิโตนด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า จากผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปจาก 1:8 เป็น 1:16 ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ได้เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวดี ขนาดอนุภาคเล็กลง พื้นผิวอนุภาคทรงกลมที่ได้มีแนวโน้มขรุขระน้อยลง เนื่องจากการเพิ่มปริมาณของวิภูภาคน้ำมันเข้าไปในระบบอิมัลชัน เสมือนเป็นการเพิ่มโมเลกุลส่วนไม่ชอบน้ำเข้าไปในระบบ ทำให้วิภูภาคน้ำซึ่งประกอบด้วยไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลส่วนไม่ชอบน้ำจำนวนมากในวิภูภาคน้ำมัน เมื่อระบบเกิดเป็นอิมัลชันที่มีอนุภาคทรงกลม โมเลกุลของอนุภาคทรงกลมจึงพยายามอยู่ใกล้กันมากที่สุดเพื่อลดพื้นที่ผิวสัมผัสกับส่วนไม่ชอบน้ำในวิภูภาคของน้ำมัน ส่งผลให้ขนาดของอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กลง และพื้นผิวของอนุภาคทรงกลมมีความขรุขระน้อยลง เมื่อปริมาณของวิภูภาคน้ำมันเพิ่มขึ้น

Imsombut T. และคณะ (2010) [29] ได้ศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไหมไฟโบรอินด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยศึกษาเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมัน 0.5:200, 1:200 และ 2:200 พบว่า เมื่อปริมาณของไหมไฟโบรอินเพิ่มขึ้น ขนาดของอนุภาคไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะมีผลต่อลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ได้ กล่าวคือ อนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลมมากขึ้น กระจายตัวดีขึ้น และที่อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมัน เท่ากับ 2:200 อนุภาคมีขนาดการกระจายตัวอยู่ในช่วงกว้างที่สุด และมีพื้นผิว

ขรุขระมากขึ้น เนื่องจากเมื่อปริมาณของสารละลายใหม่ไฟโบรอินเพิ่มขึ้น เสมือนวฏภาคน้ำซึ่งเป็นโมเลกุลชอบน้ำมีปริมาณมากขึ้น โมเลกุลส่วนไม่ชอบน้ำในวฏภาคของน้ำมันมีไม่เพียงพอที่จะล้อมรอบวฏภาคน้ำได้ เมื่อวฏภาคของน้ำก่อตัวเป็นอนุภาคทรงกลม น้ำที่อยู่ในอนุภาคจึงมีโอกาสแพร่ออกมา ส่งผลให้พื้นผิวอนุภาคที่ได้มีความขรุขระ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น



รูปที่ 4.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงลักษณะอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก (ยังไม่ผ่านการคัดแยกขนาด) ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ภายหลังจากขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันและล้างน้ำมันที่เคลือบผิวอนุภาคด้วยอะซิโตน โดยเปรียบเทียบอนุภาคที่ใช้ในกระบวนการปั่นขึ้นรูปต่าง ๆ (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

จากผลการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันที่ใช้ในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชัน น้ำในน้ำมันมีผลต่อลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันเท่ากับ 1:16 สำหรับกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนต่อไป

4.2.3 เวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางทางเคมีของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

4.2.3.1 โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

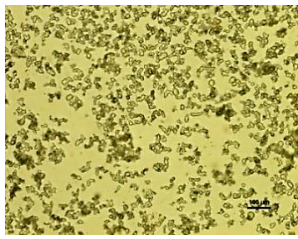
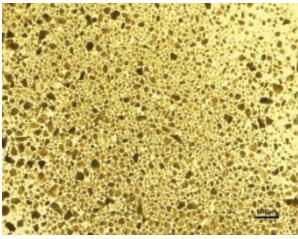

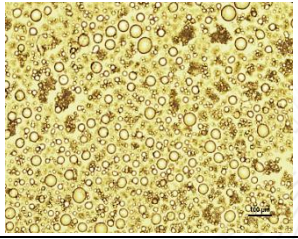
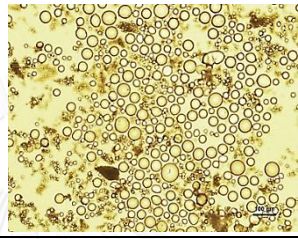
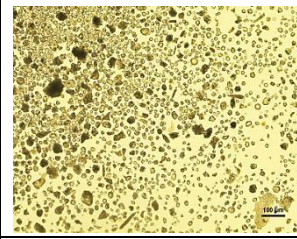
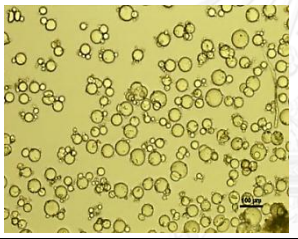
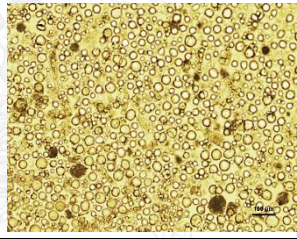
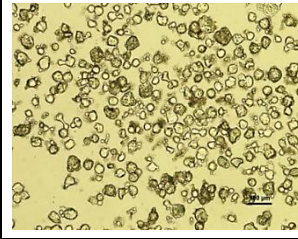
ในงานวิจัยนี้จะศึกษาเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ โดยทำการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารเชื่อมขวางที่มีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางหมู่อะมิโนในโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทย และหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกจะใช้สภาวะการขึ้นรูปที่คัดเลือกจากผลการศึกษาในหัวข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 คือ เริ่มปั่นกวนอิมัลชันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับลดอุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้อนุภาคคงตัวพร้อมกับปั่นกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันเท่ากับ 1:16 จากนั้นทำการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขณะปั่นกวนอิมัลชันด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายที่ใช้เชื่อมขวางเท่ากับ 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ทำการเชื่อมขวางอนุภาคในที่มีด (รายละเอียดเกี่ยวกับสภาวะการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกด้วยกลูตารัลดีไฮด์แสดงในภาคผนวก) โดยศึกษาเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางอนุภาค 3 ช่วง คือ เชื่อมขวางเป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ภายหลังการเชื่อมขวางด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 10 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.5 เพื่อดูลักษณะโดยรวมของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ จากนั้นวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานอนุภาคที่ผลิตได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังแสดงในรูปที่ 4.6-4.7 ในสภาวะที่อนุภาคบวมตัวอย่างเต็มที่โดยผ่านกระบวนการรักษาสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์ แล้วทำแห้งอนุภาคทรงกลมด้วยกระบวนการแทนที่สารละลายอินทรีย์ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวภายใต้อุณหภูมิต่ำและความดันวิกฤติ (Critical point drying)

เมื่อพิจารณารูปที่ 4.5-4.7 พบว่า ที่เวลาในการเชื่อมขวาง 4 ชั่วโมง อนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF50HA50 และ SF70HA30 มีลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวค่อนข้างเรียบ บางอนุภาคมีการเกาะรวมกลุ่มกัน ทำให้กระจายตัวได้ไม่ดี อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคน้อยเกินไป เกิดการเชื่อมขวางได้ไม่สมบูรณ์ อนุภาคที่ได้จึงไม่คงตัว อีกทั้งเมื่อระยะเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคหรือระยะเวลาในการปั่นกววนอิมัลชันในระบบน้อยเกินไป อิมัลชันที่ได้อาจมีความคงตัวไม่เพียงพอในการเกิดเป็นอนุภาคทรงกลมที่สมบูรณ์ จึงทำให้อนุภาคที่ได้มีการเกาะรวมกลุ่มกัน และเมื่ออนุภาคทรงกลมมีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF30HA70 สัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลต่อลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ กล่าวคือ อนุภาคที่ได้มีลักษณะไม่เป็นทรงกลม เนื่องจากมีระยะเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคน้อยเกินไป ทำให้ระบบอิมัลชันที่มีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบอยู่มากเกิดเป็นอนุภาคทรงกลมที่ไม่คงตัว บางส่วนเกิดการเกาะรวมกลุ่มกันจนกลายเป็นอนุภาคใหญ่

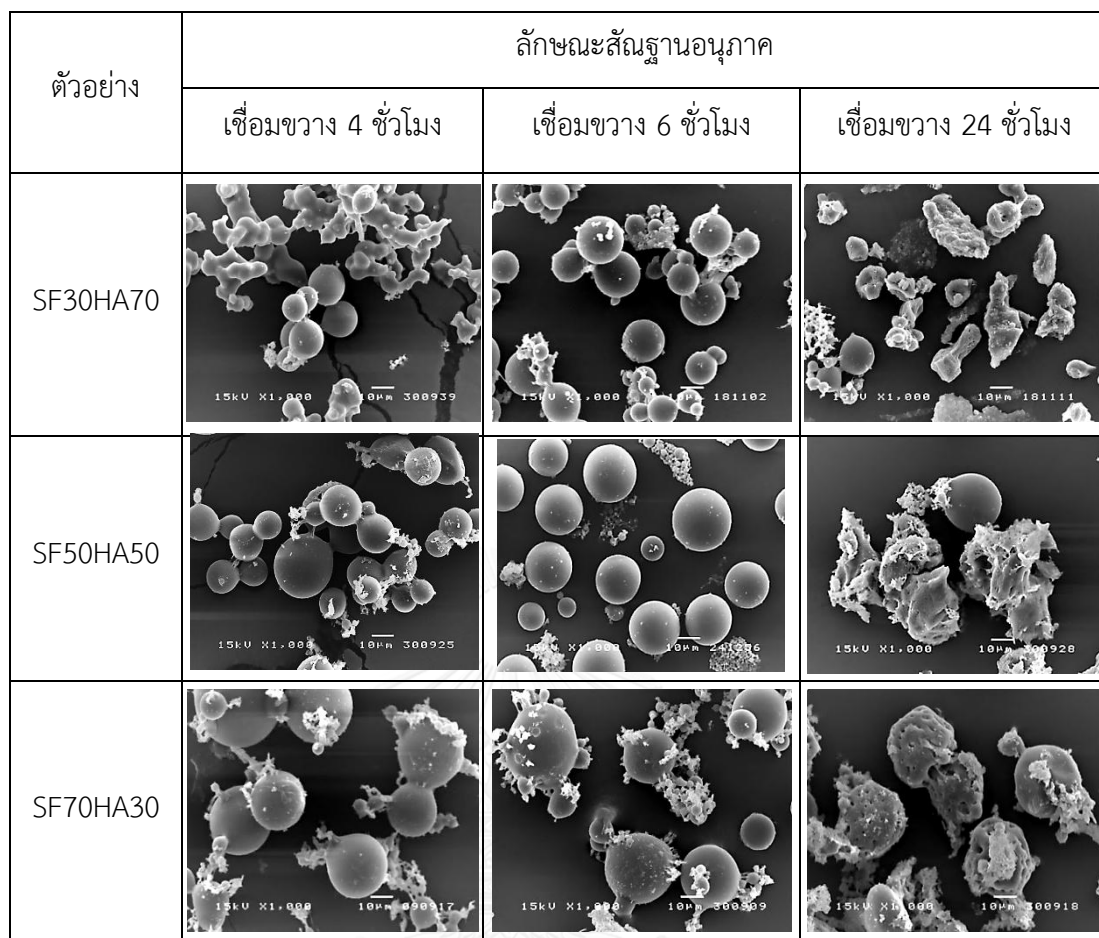
เมื่อพิจารณาลักษณะอนุภาคที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า อนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF50HA50 และ SF70HA30 มีลักษณะเป็นทรงกลม กระจายตัวดี พื้นผิวค่อนข้างเรียบ ขนาดอนุภาคมีความสม่ำเสมอ เนื่องจากเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปั่นกววนอิมัลชันหรือระยะเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาค จะทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น เกิดการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ได้ดี อนุภาคสามารถก่อตัวเป็นทรงกลมที่คงตัวมากขึ้น และในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลม จะใช้ความเร็วรอบในการปั่นกววนอิมัลชันเท่ากับ 300 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นแรงกระทำที่มากพอในการทำให้ไฟโบรอินไหมไทยเกิดเจล ลักษณะอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินในปริมาณมากจึงมีแนวโน้มคงตัวมากกว่าอนุภาคที่มีกรดไฮยาลูรอนิกมาก อีกทั้งในกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน ระบบจะมีการเติมตัวทำอิมัลชัน (Tween 80) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงในวัฏภาคน้ำมัน ซึ่งตัวทำอิมัลชันนี้มีอิทธิพลต่อลักษณะพื้นผิวอนุภาค กล่าวคือ ตัวทำอิมัลชันเป็นตัวเพิ่มความหนืดให้กับวัฏภาคน้ำมัน เมื่อกระบวนการปั่นกววนอิมัลชันเริ่มต้นขึ้น ตัวทำอิมัลชันจะถูกดูดซึมลงบนพื้นผิวอนุภาค ทำให้อัตราการแพร่ของน้ำที่อยู่ในอนุภาคลดลง ส่งผลให้อนุภาคไม่เหี่ยว และมีพื้นผิวเรียบขึ้น [29] อีกทั้งการเติมตัวทำอิมัลชันยังสามารถ

ป้องกันการเกาะรวมกลุ่มกันของอนุภาคทรงกลมได้ อนุภาคที่ผลิตได้จึงมีขนาดเล็ก กระจายตัวดี แต่เมื่อระบบมีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิค เท่ากับ SF30HA70 อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กลง อนุภาคบางส่วนมีการกระจายตัวออกเป็นอนุภาคทรงกลมเดี่ยว และมีบางส่วนเกิดการเกาะรวมกลุ่มกันเป็นอนุภาคใหญ่ขึ้น เนื่องจากเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาค อิมัลชันจะมีความเสถียรยิ่งขึ้น อนุภาคเกิดการเชื่อมขวางได้ดีขึ้น แต่สัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิคที่เพิ่มขึ้นถึง 70 เปอร์เซ็นต์นั้น มีอิทธิพลโดยตรงกับลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ กล่าวคือ อิมัลชันอาจมีความเสถียรไม่เพียงพอที่จะทำให้ระบบที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิคปริมาณมากเกิดเป็นอนุภาคทรงกลมที่สมบูรณ์ได้

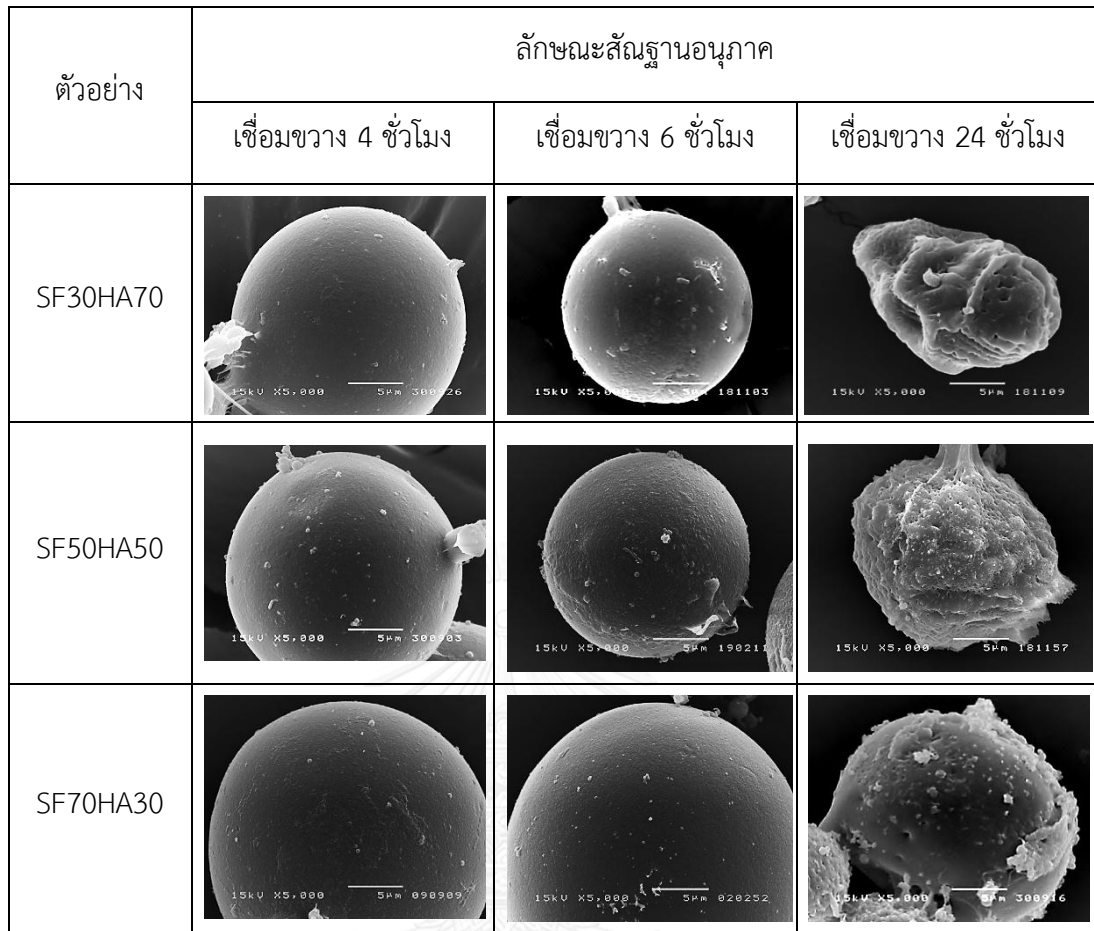
นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยกลูตารัลดีไฮด์เป็น 24 ชั่วโมง อนุภาคที่ได้ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ส่วนมากจะไม่เป็นทรงกลม พื้นผิวขรุขระ มีการเกาะรวมกลุ่มกัน มีส่วนน้อยที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ถึงแม้ว่าระยะเวลาในการเชื่อมขวางจะเพิ่มขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง ซึ่งน่าจะทำให้การเชื่อมขวางอนุภาคเกิดขึ้นได้ดียิ่งขึ้นนั้น แต่ในขณะเดียวกัน ระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นกวนอิมัลชันในระบบเพิ่มขึ้นเป็น 24 ชั่วโมงด้วยเช่นกัน อาจส่งผลต่อลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้คือ อิมัลชันในระบบมีแรงกระทำเป็นเวลานานเกินไป จนทำให้อนุภาคเกิดการเสีรูปร่างไปจากเดิม หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่า ระบบอิมัลชันเกิดการสูญเสียความเสถียรเมื่อมีการปั่นกวนอิมัลชันนานถึง 24 ชั่วโมง ลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ได้จึงเกิดการเสีรูปร่าง

ตัวอย่าง	ลักษณะอนุภาคที่ได้ภายหลังการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์		
	เชื่อมขวาง 4 ชั่วโมง	เชื่อมขวาง 6 ชั่วโมง	เชื่อมขวาง 24 ชั่วโมง
SF30HA70			
SF50HA50			
SF70HA30			

รูปที่ 4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงลักษณะอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก (ยังไม่ผ่านการคัดแยกขนาด) ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ภายหลังจากกระบวนการขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

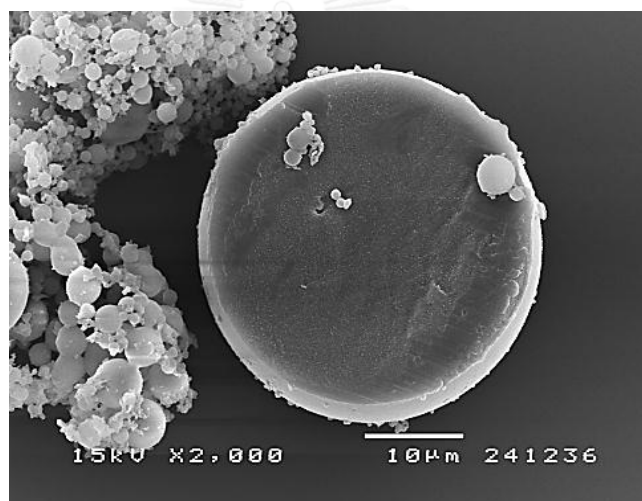


รูปที่ 4.6 ลักษณะโครงสร้างสัณฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 32-85 ไมครอน ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)



รูปที่ 4.7 ลักษณะโครงสร้างสัณฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 32-85 ไมครอน อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 5,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)

นอกจากนี้ จากภาพตัดขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผลิตได้ แสดงในรูปที่ 4.8 จะพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมตัน ซึ่งมีข้อดีในการนำไปประยุกต์ใช้งานด้านการควบคุมการปลดปล่อยยาหรือสารออกฤทธิ์ คือ อนุภาคจะเกิดการย่อยสลายได้ช้ากว่าอนุภาคที่มีรูพรุนสูง ยาหรือสารออกฤทธิ์จะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างต่อเนื่องและยาวนาน เนื่องจากการปลดปล่อยสารออกจากเมทริกซ์หรืออนุภาคทรงกลม นอกจากจะเกิดผ่านกลไกการแพร่ของสารแล้ว ยังสามารถเกิดขึ้นโดยอาศัยกลไกการย่อยสลายของเมทริกซ์หรืออนุภาคทรงกลม ซึ่งอาจเกิดจากเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจง ค่าประจุทางไฟฟ้า อุณหภูมิ หรือค่าความเป็นกรดต่างของตัวกลางที่สัมผัสกับเมทริกซ์หรืออนุภาคทรงกลม ส่งผลให้ยาหรือสารออกฤทธิ์ถูกปลดปล่อยออกมาจากเมทริกซ์หรืออนุภาคทรงกลมได้



รูปที่ 4.8 ลักษณะสัณฐานภายในของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF50HA50 ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 2,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร)

Imsombut T. และคณะ (2010) [29] ได้ศึกษาการผลิตอนุภาคทรงกลมของโพลิเมอร์อินทรีย์ด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยใช้วัฏภาคน้ำมันที่ผสมระหว่างเอทิลอะซิเตตและตัวทำอิมัลชัน (Span 80) เชื่อมขวางอนุภาคขณะทำการปั่นกวนอิมัลชันด้วย Ginipin พบว่า ระบบอิมัลชันที่ไม่ใช้ตัวทำอิมัลชัน จะทำให้ได้อนุภาคที่มีลักษณะเหี่ยว เกาะรวมกันจนเสียรูป อนุภาคไม่เป็นทรงกลม มีผิวขรุขระ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับระบบอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชันจะพบว่า อนุภาคที่ได้มีผิวเรียบอย่างเห็นได้ชัด ไม่เกาะรวมกัน กระจายตัวดี มีขนาดเล็กกว่า และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันในระบบ จะทำให้ขนาดอนุภาคและการกระจายตัวลดลง เมื่อพิจารณาภาพตัดขวางของอนุภาคทรงกลมโพลิเมอร์อินทรีย์ที่เชื่อมขวางด้วย Ginipin ขณะกระบวนการปั่นกวนอิมัลชันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า อนุภาคทรงกลมโพลิเมอร์อินทรีย์ได้มีโครงสร้างเป็นรูพรุน ลักษณะรูพรุนมีความหนาแน่นมากกว่าอนุภาคทรงกลมโพลิเมอร์อินทรีย์ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง และรายงานของ Yun Y. H. และคณะ (2004) [111] ซึ่งได้ศึกษาการผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของกรดไฮยาลูรอนิกด้วยวิธีการปรับปรุงการเชื่อมขวางในระบบอิมัลชัน (Modified in-emulsion crosslinking technique) โดยใช้วัฏภาคน้ำมันที่ผสมระหว่างแก๊ซเฮลวและ Adipic dihydrazide (ADH) เป็นตัวปรับปรุงโครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิก และใช้ Span 80 เป็นตัวทำอิมัลชัน ใช้ Ethyl-3-[3-dimethyl amino] propyl carbodiimide (EDCI) เป็นสารเชื่อมขวาง โดยเชื่อมขวางอนุภาค 2 ครั้ง คือ เชื่อมขวางอนุภาคขณะกระบวนการขึ้นรูปโดยเติมสารเชื่อมขวางลงในอิมัลชัน จากนั้นนำอนุภาคทรงกลมที่ได้มาเชื่อมขวางอีก 1 ครั้ง ด้วยสารละลายผสมของ EDCI และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ พบว่า อนุภาคทรงกลมของกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์และการกำจัดน้ำออก (Critical point drying) มีลักษณะเป็นทรงกลม ผิวเรียบ กระจายตัวดี แต่มีบางส่วนเกาะติดกัน โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยในช่วง 6-20 ไมโครเมตร นอกจากนี้ ในระบบอิมัลชันมีการเติมตัวทำอิมัลชัน (Span 80) อนุภาคทรงกลมที่เกิดขึ้นในระบบอิมัลชันจึงมีความคงตัวเช่นกัน ประกอบกับระบบมีการเติมสารเชื่อมขวางลงในอิมัลชัน เพื่อเชื่อมขวางอนุภาคขณะขึ้นรูป ทำให้อนุภาคทรงกลมที่ได้มีความเสถียรมากยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น

การพิจารณาลักษณะอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้จากกล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นเพียงวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการวิเคราะห์หาสภาวะที่ใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมของโพลิเมอร์อินทรีย์และกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งสังเกตเห็นได้เฉพาะลักษณะสัญญาณโดยรวม

ของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้เท่านั้น จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ร้อยละผลได้ของอนุภาค ปริมาณองค์ประกอบของสารที่มีอยู่จริงในอนุภาค รวมถึงสมบัติในด้านต่าง ๆ ของอนุภาคทรงกลม เพื่อเป็นตัวช่วยในการตัดสินใจเลือกใช้ออนุภาคทรงกลมในงานระบบนำส่งยา ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อต่อไป

4.2.3.2 ร้อยละผลได้ทั้งหมดและขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

สำหรับร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นปัจจัยหนึ่งในการเลือกอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมาใช้งาน โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกในสัดส่วนต่างๆ และผลของเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีต่อร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ ผลการศึกษาแสดงได้ในตารางที่ 4.1 พบว่าร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF30HA70 มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 6 ชั่วโมง แต่เมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมเพิ่มขึ้นจาก 6 เป็น 24 ชั่วโมง ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพิจารณาที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF50HA50 พบว่า เมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF70HA30 ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีค่าเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาผลของอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลาต่างกัน พบว่า เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยในระบบมีค่าเพิ่มขึ้น ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเชื่อมขวางอนุภาคทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัล

ดีไฮด์สามารถเชื่อมขวางโพรตีนไฟโบรอินใหม่ไทยได้ดี แม้ใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นต่ำ ในงานวิจัยนี้ ระบบประกอบด้วยไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งกรดไฮยาลูรอนิกเป็น สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกเชื่อมขวางได้ค่อนข้างยาก จำเป็นต้องใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นสูง (3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จึงเป็นผลทำให้การเชื่อมขวางโพรตีนไฟโบรอินใหม่ไทยเกิดได้ดียิ่งขึ้น ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยปริมาณมากจึงมีค่าเพิ่มขึ้น อีกทั้งเมื่อเวลาในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ระยะเวลาที่ สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับอนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ในระบบอิมัลชันมีมากขึ้น การเชื่อมขวางทางเคมีเกิดได้ดีขึ้น ถึงแม้ว่าเวลาในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นจะทำให้ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นนั้น แต่เมื่อระบบมีระยะเวลาการเชื่อม ขวางหรือระยะเวลาการปั่นกวนอิมัลชันนานถึง 24 ชั่วโมง จะส่งผลโดยตรงกับลักษณะอนุภาคที่ได้ คือ อนุภาคไม่เป็นทรงกลม และเกิดการเสีรูปร่าง (ผลการศึกษแสดงในหัวข้อ 4.2.3.1)

ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินใหม่ไทยและ กรดไฮยาลูรอนิกภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่าน การเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร ในระยะเวลาต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน		
	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
SF30HA70	48.2 ± 3.0 ^{a,c}	62.7 ± 1.7 ^{b,c}	65.0 ± 0.9 ^{b,c}
SF50HA50	62.4 ± 2.0 ^{a,d}	73.1 ± 1.8 ^{b,d}	79.8 ± 1.0 ^{c,d}
SF70HA30	67.2 ± 4.2 ^{a,d}	74.5 ± 1.7 ^{a,d}	80.7 ± 0.8 ^{a,d}

(a,b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละ ผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ โดยเปรียบเทียบอนุภาคทรงกลมมีอัตราส่วน การผสมโดยน้ำหนักเหมือนกันที่เวลาในการเชื่อมขวางแตกต่างกัน)

(c,d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ โดยเปรียบเทียบเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคเท่ากันที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกัน)

สำหรับการเลือกอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกขนาดของอนุภาคทรงกลมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการนำอนุภาคทรงกลมไปใช้งาน ซึ่งอนุภาคทรงกลมควรมีขนาดสม่ำเสมอและมีการกระจายตัวของขนาดในช่วงแคบ ในงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกขนาดของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งออกเป็น 4 ขนาด คือ ขนาดใหญ่กว่า 212 ไมครอน, 85-212 ไมครอน, 32-85 ไมครอน และขนาดเล็กกว่า 32 ไมครอน จากนั้นคำนวณหาร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนทั้ง 4 ขนาด ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เวลาต่าง ๆ ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่า ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลาต่าง ๆ มีร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 32-85 ไมครอนมากที่สุด โดยมีค่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของอนุภาคทั้งหมด รองลงมาคือ อนุภาคทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 85-212 ไมครอน, ขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 212 ไมครอน และขนาดอนุภาคเล็กกว่า 32 ไมครอน ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลของเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกพบว่า เมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมเพิ่มขึ้น ร้อยละผลได้ส่วนใหญ่ของอนุภาคทรงกลมในแต่ละช่วงขนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมบางอัตราส่วนที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 212 ไมครอน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคลดลง อาจเป็นผลมาจาก ระยะเวลาในการปั่นกวอนอิมัลชันหรือเวลาในการเชื่อมขวางน้อยเกินไปที่จะทำให้อนุภาคทรงกลมที่มีไฟโบรอินไหมไทยเป็นองค์ประกอบปริมาณมากมีความคงตัว อนุภาคทรงกลมที่ได้จึงเกาะรวมกลุ่มกันจนกลายเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ ทำให้ร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 212 ไมครอน มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการเชื่อมขวางลดลง

Esposito E. และคณะ (2005) [112] ได้ศึกษาการผลิตอนุภาคทรงกลมของกรดไฮยาลูรอนิก ด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยใช้วัฏภาคน้ำมันที่ผสมระหว่างแวกซ์เหลวและตัวทำอิมัลชัน (Span 85) พบว่า ระบบอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชันในปริมาณน้อย (0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ระบบอิมัลชันไม่เสถียรพอที่ทำให้อนุภาคทรงกลมมีความคงตัว ส่งผลให้ผลได้ของอนุภาคทรงกลมเหลือเพียง 43 เปอร์เซ็นต์ อนุภาคที่ได้ไม่เป็นทรงกลม มีบางส่วนเกาะรวมกันจนเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 15 ไมโครเมตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำอิมัลชันเป็น 0.1, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ผลได้ของอนุภาคทรงกลมมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 90, 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีผิวเรียบ กระจายตัวดี ขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 6.5, 5.0 และ 2.6 ไมโครเมตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มปริมาณตัวทำอิมัลชันในระบบจะทำให้มีอิมัลชันมีความเสถียรมากขึ้น ขนาดอนุภาคเล็กลง ร้อยละผลได้เพิ่มขึ้น และสามารถป้องกันการเกาะรวมกันของอนุภาคได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคแตกต่างกัน อนุภาคทรงกลมที่มีขนาดในช่วง 32-85 ไมครอน ยังคงมีร้อยละผลได้ของอนุภาคมากที่สุด และในงานวิจัยนี้ คาดหวังที่จะนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกมาใช้เป็นระบบนำส่งยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อม อนุภาคทรงกลมควรมีขนาดที่สามารถฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ได้ ขนาดของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลาต่าง ๆ สามารถฉีดผ่านหัวเข็มฉีดยาขนาด 26G (0.45×25 มิลลิเมตร) ได้เป็นอย่างดี ในงานวิจัยนี้จึงเลือกอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดช่วง 32-85 ไมครอน ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นขนาดที่มีร้อยละผลได้ของอนุภาคมากที่สุด มาใช้ในการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคเฉลี่ย ปริมาณองค์ประกอบของสารที่มีอยู่จริงในอนุภาค ความเสถียรของอนุภาค รวมถึงสมบัติต่าง ๆ ของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ต่อไป

ตารางที่ 4.2 ร้อยละผลได้ภายหลังการคัดแยกขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอิน ไทเมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาค ด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลาต่าง ๆ

ตัวอย่าง	เวลาในการเชื่อมขวางอนุภาค (ชั่วโมง)	ร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาดอนุภาคต่าง ๆ			
		ขนาดใหญ่กว่า 212 μm .	ขนาด 85-212 μm .	ขนาด 32-85 μm .	ขนาดเล็กกว่า 32 μm .
SF30HA70	4	14.5 \pm 0.9 ^{a,d}	25.6 \pm 1.1 ^{a,d}	51.8 \pm 1.9 ^{a,d}	8.2 \pm 1.9 ^{a,d}
	6	9.2 \pm 0.5 ^{a,e}	17.1 \pm 1.1 ^{a,c,e}	63.8 \pm 1.3 ^{a,e}	9.8 \pm 0.2 ^{a,d}
	24	11.1 \pm 1.4 ^e	24.3 \pm 0.3 ^d	56.5 \pm 5.9 ^{d,e}	8.1 \pm 2.2 ^d
SF50HA50	4	11.1 \pm 2.8 ^{a,d}	23.9 \pm 3.3 ^{a,d}	56.5 \pm 5.9 ^{a,d}	8.6 \pm 1.2 ^{a,d}
	6	9.1 \pm 1.0 ^{a,d}	15.1 \pm 4.9 ^{b,d}	67.5 \pm 5.5 ^{a,d}	8.3 \pm 1.6 ^{a,d}
	24	8.6 \pm 1.7 ^d	22.3 \pm 9.6 ^d	56.5 \pm 9.3 ^d	12.6 \pm 0.8 ^e
SF70HA30	4	30.5 \pm 3.4 ^{b,d}	12.3 \pm 1.7 ^{b,d}	56.6 \pm 3.2 ^{a,d}	0.6 \pm 1.0 ^{b,d}
	6	9.4 \pm 4.6 ^{a,e}	25.4 \pm 2.8 ^{c,e}	57.5 \pm 5.6 ^{a,d}	7.7 \pm 2.2 ^{a,e}
	24	9.1 \pm 4.9 ^e	20.6 \pm 3.0 ^e	58.5 \pm 6.1 ^d	11.8 \pm 1.8 ^e

(a,b,c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาดต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบอนุภาคทรงกลมมีขนาดและเวลาในการเชื่อมขวางเท่ากันที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกัน)

(d,e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาดต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบอนุภาคทรงกลมมีขนาดและอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเหมือนกันที่เวลาในการเชื่อมขวางแตกต่างกัน)

การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคเฉลี่ยจะดำเนินการโดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Mastersizer) ซึ่งทำการวัดขนาดอนุภาคขณะแขวนลอยในน้ำที่มีการปั่นกวตลอดเวลา และเพื่อความแม่นยำในการวัด ระบบจะทำการปล่อยคลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (Sonication) มากระทำกับอนุภาคที่แขวนลอย เพื่อให้อนุภาคทรงกลมกระจายตัวอย่างอิสระมากขึ้น ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF30HA70 และ SF50HA50 มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเชื่อมขวางหรือระยะเวลาในการปั่นกวอิมัลชันในระบบที่มีตัวทำอิมัลชัน (Tween 80) อนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกจะสามารถเชื่อมขวางกับกลูตารัลดีไฮด์ได้มากขึ้น และไม่เกาะรวมกลุ่มกันจนเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ แต่เมื่อเวลาในการปั่นกวเพิ่มขึ้นถึง 24 ชั่วโมง อนุภาคที่ได้ยังคงมีขนาดเล็ก แต่มีลักษณะไม่เป็นทรงกลมเพราะระบบมีแรงกระทำเป็นเวลานานเกินไปจนทำให้อนุภาคที่เกิดการเสียรูป (ผลการศึกษาแสดงในหัวข้อ 4.2.3.1) ซึ่งข้อมูลและลักษณะการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักจะแสดงในภาคผนวก แต่เมื่ออัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก เท่ากับ SF70HA30 อนุภาคทรงกลมที่ได้มีขนาดไม่แตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 4.3 ขนาดอนุภาคทรงกลมเฉลี่ยของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลาต่าง ๆ วิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Mastersizer)

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคทรงกลมเฉลี่ย (ไมครอน)		
	4 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
SF30HA70	57.6 ± 3.1 ^{a,d}	44.9 ± 2.2 ^{a,e}	34.4 ± 2.8 ^{a,f}
SF50HA50	57.0 ± 2.3 ^{a,d}	48.7 ± 2.6 ^{a,e}	39.8 ± 0.4 ^{b,f}
SF70HA30	63.2 ± 2.9 ^{a,d,f}	68.0 ± 2.1 ^{b,e}	61.4 ± 0.1 ^{c,f}

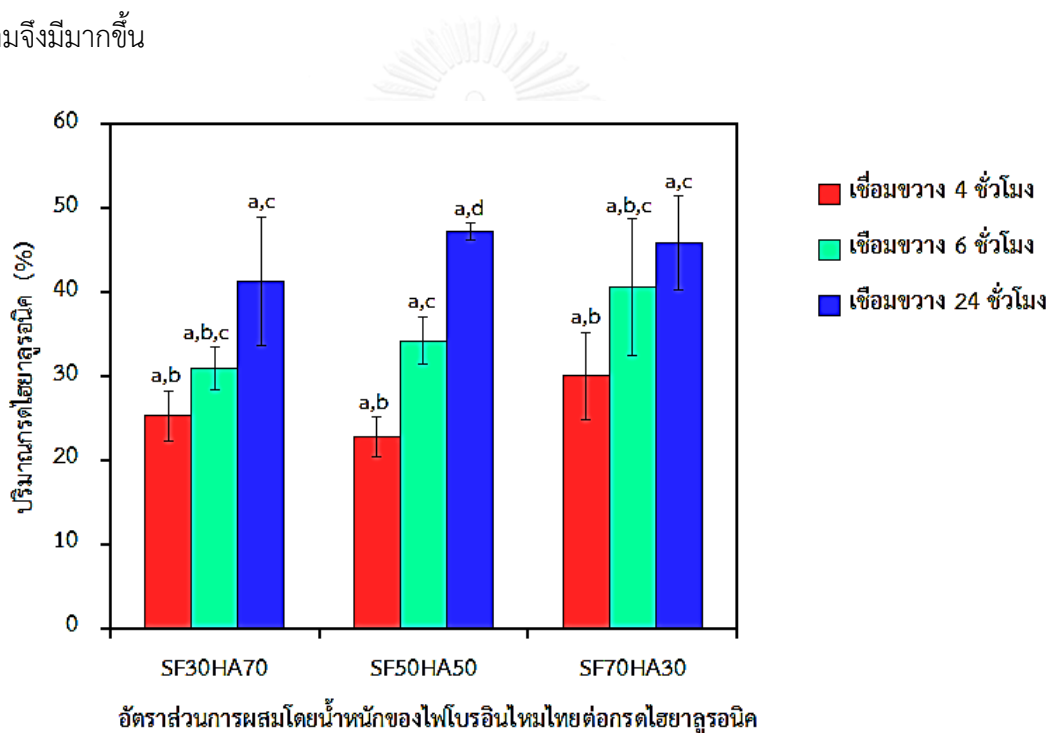
(a,b,c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลขนาดอนุภาคทรงกลมเฉลี่ย โดยเปรียบเทียบเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคเท่ากันที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกัน)

(d,e,f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลขนาดอนุภาคทรงกลมเฉลี่ย โดยเปรียบเทียบอนุภาคทรงกลมมีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเหมือนกันที่เวลาในการเชื่อมขวางแตกต่างกัน)

4.2.3.3 ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลืออยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

การเชื่อมขวางทางเคมีของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ขณะกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันเป็นการทำให้อนุภาคทรงกลมมีความคงตัวมากยิ่งขึ้น สารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวางที่มีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางโมเลกุลโปรตีนไฟโบรอินไหมไทยได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุลพอลิแซ็กคาไรด์ของกรดไฮยาลูรอนิก ในงานวิจัยนี้จึงจำเป็นต้องศึกษาหาปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้มีปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ถูกเชื่อมขวางสมบูรณ์มากน้อยเพียงใด และมีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกที่แท้จริงเท่าใด โดยวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay [102, 103] ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่า การเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไม่สามารถเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการเตรียมได้ทั้งหมด เนื่องจากปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลือในอนุภาคทรงกลมภายหลังการเชื่อมขวางมีค่าน้อยกว่าปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้เริ่มต้น สังเกตได้จากข้อมูลอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักระหว่างไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้มีค่าไม่เท่ากับอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักระหว่างไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกเริ่มต้น ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเพราะโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกถูกเชื่อมขวางได้ค่อนข้างยาก ทำให้โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกบางส่วนไม่ถูกเชื่อมขวางหรือเชื่อมขวางได้ไม่สมบูรณ์จึงเกิดการละลายน้ำหายไปในช่วงขั้นตอนการล้างอนุภาคด้วยน้ำปราศจากไอออนเพื่อกำจัดสารตกค้างในกระบวนการขึ้นรูป ส่งผลให้อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกที่แท้จริงมีการเปลี่ยนแปลง

เมื่อพิจารณาอนุภาคทรงกลมทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลาต่าง ๆ พบว่า ที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเหมือนกัน เมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคเพิ่มขึ้น สัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่ในอนุภาคจะเพิ่มขึ้น แสดงว่าปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ถูกเชื่อมขวางสมบูรณ์มีปริมาณมากขึ้น ถึงแม้ว่ากรดไฮยาลูรอนิกเป็นโมเลกุลที่ถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ได้ค่อนข้างยาก แต่เมื่อระบบมีเวลาในการเชื่อมขวางหรือเวลาในการปั่นกววนอิมัลชันเพิ่มขึ้น โอกาสที่หมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) ในโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิกจะถูกเชื่อมขวางด้วยหมู่แอลดีไฮด์ ($-\text{CHO}$) ในโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์มีมากขึ้น ทำให้การเชื่อมขวางเกิดได้ดี ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลือในอนุภาคทรงกลมจึงมีมากขึ้น



รูปที่ 4.9 ร้อยละโดยน้ำหนักของปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่จริงในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง (a แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกันที่เวลาเชื่อมขวางอนุภาคเท่ากัน และ b, c, d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบเวลาเชื่อมขวางอนุภาคแตกต่างกันที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเหมือนกัน)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ สามารถสรุปอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกที่แท้จริงได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เตรียมได้มีปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกคิดเป็นสัดส่วนประมาณ 9-29 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ส่วนที่เหลือจะเป็นปริมาณของไฟโบรอินไหมไทย คิดเป็นสัดส่วนได้ประมาณ 71-91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากสัดส่วนดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการสูญเสียกรดไฮยาลูรอนิกระหว่างกระบวนการขึ้นรูปอนุภาคเป็นจำนวนมาก

ทั้งนี้ การศึกษาในส่วนต่อไปจะใช้อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักที่มีอยู่จริงในอนุภาค (ตารางที่ 4.4) แทนอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการเตรียม

ตารางที่ 4.4 อัตราส่วนของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่จริงในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลาต่าง ๆ

ตัวอย่าง	อัตราส่วนของไฟโบรอินต่อกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่จริง ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน		
	เชื่อมขวาง 4 ชั่วโมง	เชื่อมขวาง 6 ชั่วโมง	เชื่อมขวาง 24 ชั่วโมง
SF30HA70	SF82HA18	SF78HA22	SF71HA29
SF50HA50	SF89HA11	SF83HA17	SF76HA24
SF70HA30	SF91HA9	SF88HA12	SF86HA14

4.2.3.4 ความเสถียรของอนุภาคทรงกลมเมื่อทดสอบกับน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส

การศึกษาความเสถียรของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกซึ่งทดสอบโดยการแช่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในน้ำปราศจากไอออนที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาความเสถียรของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้จากร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมและปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่พบในน้ำปราศจากไอออนภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค Elson-Morgan assay [102, 103] ความเสถียรของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนนี้จะแสดงถึงความสามารถในการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ โดยปกติโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยมีความไม่ชอบน้ำ แต่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมีความชอบน้ำสูง เมื่อทดสอบความเสถียรโดยการแช่น้ำ โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกที่ไม่ถูกเชื่อมขวางหรือเชื่อมขวางไม่สมบูรณ์จะเกิดการละลายน้ำ ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของอนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกลดลง ซึ่งการศึกษาความเสถียรด้วยวิธีนี้เสมือนเป็นการยืนยันผลของการเชื่อมขวางโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.10 ซึ่งพบว่า เมื่อเวลาในการแช่อนุภาคทรงกลมในน้ำเพิ่มขึ้น ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพิจารณาเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมจะพบว่า เมื่อเวลาในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปเมื่อแช่น้ำในระยะเวลาเท่ากันจะมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากเมื่อเวลาในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ความสามารถที่กลูตารัลดีไฮด์จะเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกมีมากขึ้น ทำให้การเชื่อมขวางเกิดได้สมบูรณ์มากขึ้น อนุภาคทรงกลมที่ได้จึงมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อทำการทดสอบโดยการแช่น้ำ โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกที่เชื่อมขวางสมบูรณ์จึงไม่ละลายน้ำ

เมื่อพิจารณาผลของอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของอนุภาคทรงกลมจะพบว่า เมื่ออนุภาคทรงกลมมีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมภายหลังการแช่น้ำเป็นเวลา 2, 24 และ 72 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเวลาในการแช่น้ำเพิ่มขึ้นเป็น 144 ชั่วโมง (6 วัน) ร้อยละของน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก SF82HA18, SF78HA22 และ SF71HA29 มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมี

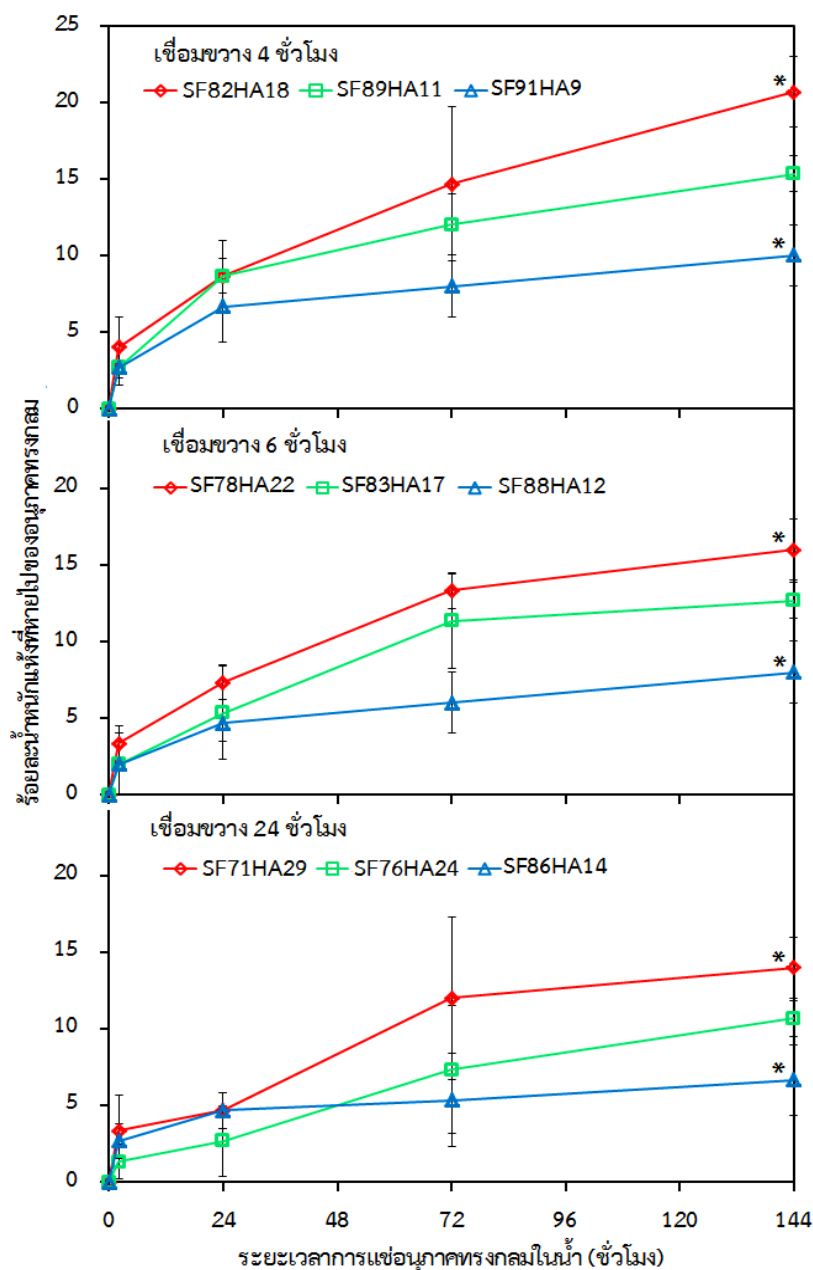
นัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเท่ากับ SF91HA9, SF88HA12 และ SF86HA14 ตามลำดับ เนื่องจากที่ระยะเวลาการแช่น้ำนานขึ้นเป็น 144 ชั่วโมง เป็นเวลานานมากพอในการทำให้โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกที่เชื่อมขวางไม่สมบูรณ์เกิดการละลาย น้ำ ซึ่งโมเลกุลของไฟโบรอินและกรดไฮยาลูรอนิกที่เชื่อมขวางสมบูรณ์จะมีพันธะที่แข็งแรง โมเลกุลของน้ำที่แทรกตัวเข้าสู่อนุภาคทรงกลมจะทำให้เกิดเพียงการบวมตัว แต่ไม่ละลายน้ำ อีกทั้ง การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์จะเกิดที่ตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก เมื่ออนุภาคทรงกลมมีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมาก ปริมาณของหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถเกิดการเชื่อมขวางจึงมีมากขึ้น ในกรณีที่กลูตารัลดีไฮด์เกิดการเชื่อมขวางกับกรดไฮยาลูรอนิกไม่สมบูรณ์ โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกอาจเหลือหมู่ไฮดรอกซิลที่ไม่ถูกเชื่อมขวางอยู่บางส่วน ทำให้เมื่อแช่น้ำเป็นเวลานานขึ้น กรดไฮยาลูรอนิกจึงละลายน้ำ ส่งผลให้ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมมีค่าเพิ่มขึ้น

เมื่อทำการตรวจวัดน้ำหนักภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเป็นเวลาต่าง ๆ สามารถวัดปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ละลายน้ำได้ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่า อนุภาคทรงกลมที่แช่น้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่พบปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ละลายอยู่ในน้ำ และเมื่อวิเคราะห์ผลของเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยกลูตารัลดีไฮด์พบว่า ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมลดลง และเมื่อวิเคราะห์ผลของอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินต่อกรดไฮยาลูรอนิกในอนุภาคทรงกลม จะพบว่า เมื่อแช่อนุภาคทรงกลมที่เชื่อมขวาง 4 ชั่วโมง ในน้ำเป็นเวลา 72 และ 144 ชั่วโมง ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเท่ากับ SF82HA18 มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักเท่ากับ SF91HA9

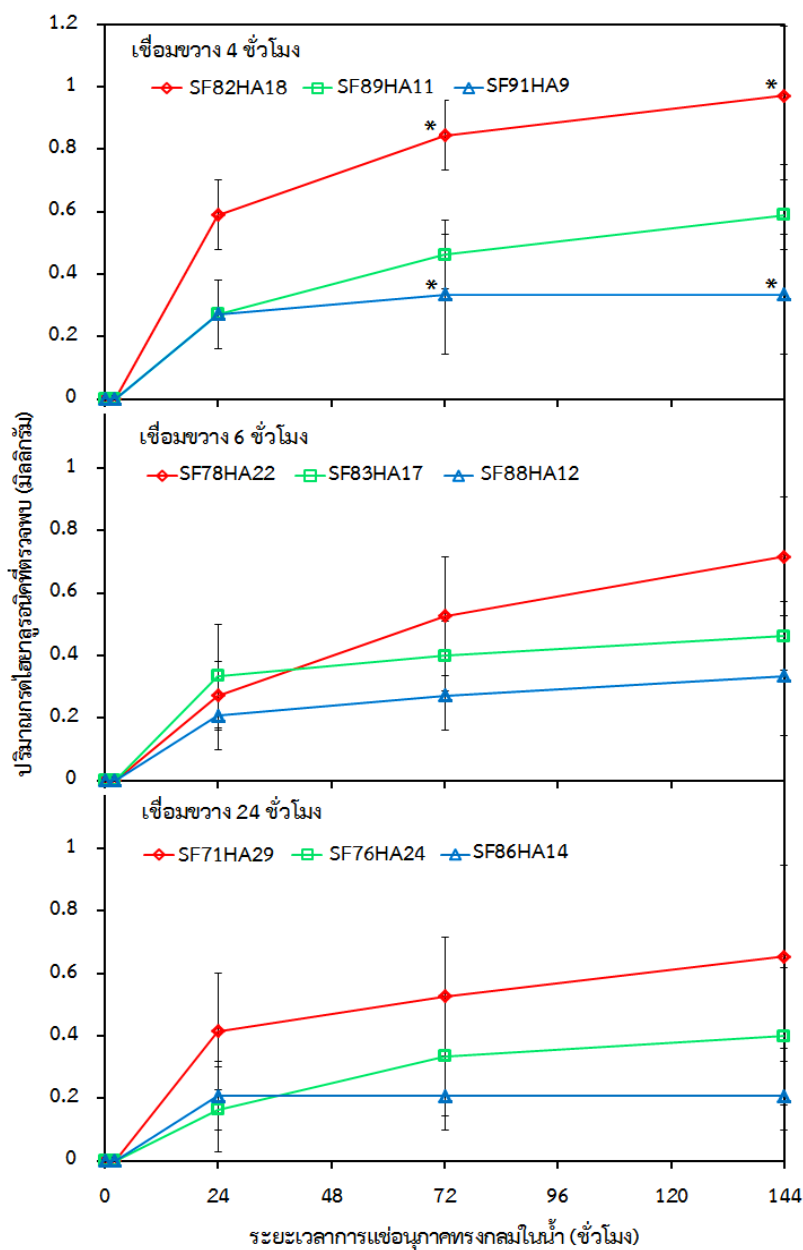
เมื่อพิจารณาปริมาณสุทธิของน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมและปริมาณสุทธิของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลม เป็นเวลา 144 ชั่วโมง (6 วัน) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า ปริมาณสุทธิของน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักมีแนวโน้มใกล้เคียงกับปริมาณสุทธิของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำ จึงเป็นการยืนยันได้ว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกสามารถเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น

3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้บางส่วน โดยส่วนที่เกิดการเชื่อมขวางไม่สมบูรณ์น่าจะเป็น ส่วนของกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งกรดไฮยาลูรอนิกที่เชื่อมขวางไม่สมบูรณ์จะเกิดการละลายน้ำเมื่ออนุภาค ทรงกลมถูกแช่น้ำเป็นเวลานานขึ้น ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของอนุภาคทรงกลมมีค่าลดลง อาจกล่าวได้ว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยผสมกรดไฮยาลูรอนิกที่เตรียมได้สามารถ ปลดปล่อยกรดไฮยาลูรอนิกได้ในสถานะที่ไม่ใช้เอนไซม์เป็นตัวกระตุ้น

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการเลือกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยและกรด ไฮยาลูรอนิกเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนใน ระดับห้องปฏิบัติการ โดยพิจารณาข้อมูลจากรูปที่ 4.6-4.7 ที่แสดงโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรง กลมขนาดไมครอนในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ และผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคเป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง และพิจารณาข้อมูลจากตารางที่ 4.1-4.3 ที่แสดงร้อยละผลได้ทั้งหมดและขนาดของ อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ และผ่านการเชื่อม ขวางอนุภาคเป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งสังเกตเห็นว่า อนุภาคทรงกลมในทุกอัตราส่วนการผสม โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีลักษณะ เป็นทรงกลม ผิวค่อนข้างเรียบ กระจายตัวดี มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงที่สามารถฉีดผ่านหัวเข็มทาง การแพทย์ได้ดี มีร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมค่อนข้างสูง ประกอบกับผลการศึกษาจากรูปที่ 4.10-4.11 ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมและปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบ ในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมในน้ำมีค่าไม่สูงมากนัก อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีความคง ตัวพอสมควร จากผลการศึกษาดังกล่าว อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนน่าจะมีลักษณะสมบัติที่ เหมาะสมในการนำมาใช้งานด้านระบบควบคุมการปลดปล่อยยา ดังนั้น เมื่อพิจารณาสัดส่วนของไฟ โบรอินต่อกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลือในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่แท้จริงแล้ว ในงานวิจัยนี้จึง เลือกอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ เป็น เวลา 6 ชั่วโมง และมีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกที่ แท้จริง เท่ากับ SF78HA22, SF83HA17 และ SF88HA12 มาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.10 ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ภายหลังจากแช่ในน้ำปราศจากไอออน ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในแต่ละช่วงเวลา (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกันที่เวลาเชื่อมขวางอนุภาคและระยะเวลาการแช่น้ำเท่ากัน)



รูปที่ 4.11 ปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิคที่ตรวจพบในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิคในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ในน้ำปราศจากไอออน ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในแต่ละช่วงเวลา (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกันที่เวลาเชื่อมขวางอนุภาคและระยะเวลาการแช่น้ำเท่ากัน)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสุทธิของน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมและปริมาณสุทธิของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ในน้ำเป็นเวลา 144 ชั่วโมง (6 วัน)

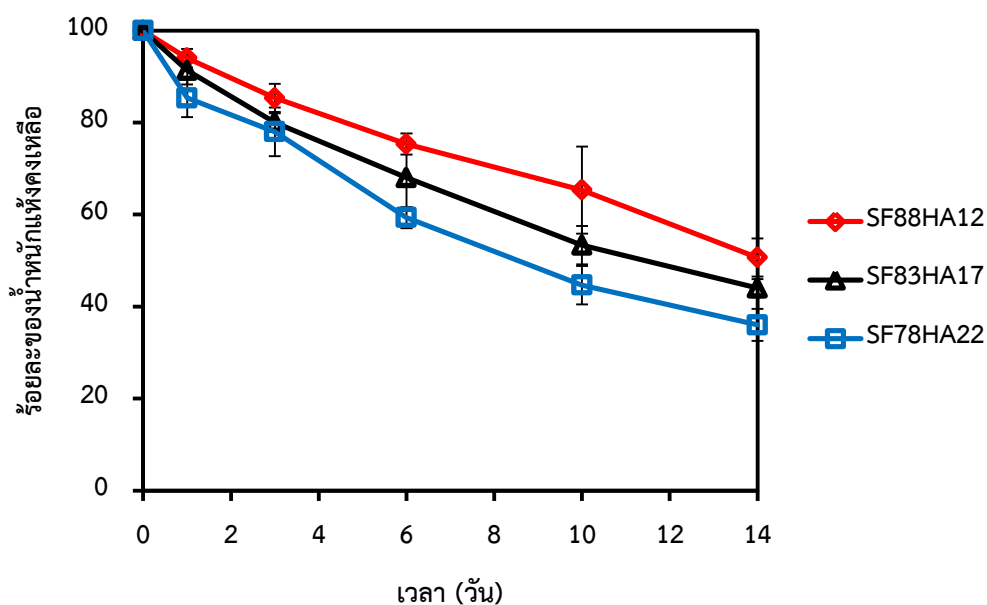
เวลาในการเชื่อมขวาง (ชั่วโมง)	ตัวอย่าง	ปริมาณสุทธิของน้ำหนักแห้งที่หายไป (มิลลิกรัม)	ปริมาณสุทธิของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำ (มิลลิกรัม)
4	SF82HA18	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
	SF88HA12	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	SF91HA9	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.2
6	SF78HA22	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1
	SF83HA17	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
	SF88HA12	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.2
24	SF71HA29	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
	SF76HA24	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2
	SF86HA14	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1

4.3 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* biodegradability)

ไฟโบรอินไหมไทยเป็นโปรตีนธรรมชาติที่มีสมบัติทางกลที่ดี โมเลกุลมีความแข็งแรงสูงกว่าเมื่อเทียบกับโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความชอบน้ำสูง กรดไฮยาลูรอนิกจึงเกิดการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกจึงเน้นศึกษาการย่อยสลายของโมเลกุลไฟโบรอินไหมไทย โดยเลือกใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายโปรตีนไฟโบรอิน จากรายงานการเปรียบเทียบการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นไฟโบรอินโดยใช้เอนไซม์ต่างชนิดกัน ของ Li M. และคณะ (2002) [113] พบว่า ภายในระยะเวลา 15 วัน น้ำหนักคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินที่ทำการแช่ในสารละลายเอนไซม์ α -Chymotrypsin, คอลลาจีเนส IA, โปรติเอส XIV และสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ไม่มีเอนไซม์ มีค่าเท่ากับ 68, 48, 30, และ 68 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ α -Chymotrypsin ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนไฟโบรอิน เนื่องจากน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินในสารละลายเอนไซม์ α -Chymotrypsin มีค่าเท่ากับน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินที่อยู่ในสถานะไม่มีเอนไซม์ แต่เมื่อพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนไฟโบรอินของเอนไซม์คอลลาจีเนส IA และเอนไซม์โปรติเอส XIV พบว่า เอนไซม์โปรติเอส XIV มีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนไฟโบรอินมากกว่าเอนไซม์คอลลาจีเนส IA สังเกตจากน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV มีค่าน้อยกว่าน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินในสารละลายคอลลาจีเนส IA นอกจากนี้ รายงานของ Wongnarat C. และคณะ (2013) [114] ได้ศึกษาการย่อยสลายของเส้นใยไฟโบรอินของไหมไทยสายพันธุ์สำโรง และสายพันธุ์นางลาย โดยเปรียบเทียบการย่อยสลายทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส XIV และเอนไซม์โปรติเอส XXIII ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบว่า ภายในระยะเวลา 49 วัน เส้นใยไฟโบรอินของไหมทั้งสองสายพันธุ์ที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV มีร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปมากกว่าเส้นใยไฟโบรอินที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XXIII โดยร้อยละของน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฟโบรอินสายพันธุ์สำโรงที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV และแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XXIII มีค่าเท่ากับ 27.5 และ 17.5 ตามลำดับ และร้อยละของน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฟโบรอินสายพันธุ์นางลายที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV และแช่ในสารละลายเอนไซม์

โปรติเอส XXIII มีค่าน้อยกว่าเล็กน้อย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25 และ 13 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์โปรติเอส XIV มีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนไฟโบรอินมากกว่าเอนไซม์โปรติเอส XXIII ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกเอนไซม์โปรติเอส XIV มาใช้ในการย่อยสลายอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักที่แท้จริง เท่ากับ SF78HA22, SF83HA17 และ SF88HA12 และผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคขณะกระบวนการขึ้นรูปด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณหาร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาแสดงได้ในรูปที่ 4.12 พบว่า ภายในระยะเวลา 14 วัน อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยในปริมาณมากที่สุด (SF88HA12) มีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมากที่สุด ซึ่งมีค่าประมาณ 50 รองลงมาคือ อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินต่อกรดไฮยาลูรอนิกเท่ากับ SF83HA17 และ SF78HA22 โดยมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมประมาณ 44 และ 36 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยในปริมาณมากจะมีร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังการแช่ในสารละลายที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรมาก แสดงถึงการเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมที่ช้า สอดคล้องกับรายงานของ Jo Y. Y. และคณะ (2011) [115] ซึ่งพบว่า ภายในระยะเวลา 15 วัน โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีความหนาแน่นสูงถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักแห้งที่หายไปมีค่าประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และโครงเลี้ยงเซลล์ถูกย่อยสลายสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 60 วัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีความหนาแน่นต่ำพบว่า ภายในระยะเวลา 7 วัน น้ำหนักแห้งที่หายไปของโครงเลี้ยงเซลล์มีค่าประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และโครงเลี้ยงเซลล์ถูกย่อยสลายสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 15 วัน แสดงให้เห็นว่า เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์มีปริมาณไฟโบรอินมากและมีความหนาแน่นสูง จะเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพที่ช้า

แต่ทั้งนี้ อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เลือกมาทำการศึกษาในงานนี้มีอัตราส่วนของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกไม่แตกต่างกันมากนัก ร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่คำนวณได้จึงมีค่าไม่แตกต่างกันนัก



รูปที่ 4.12 ร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (เชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง) ภายหลังจากแช่ในสารละลายเอนไซม์ โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาในการแช่ต่าง ๆ

4.4 ความสามารถในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

4.4.1 ความสามารถในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาความสามารถในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก SF78HA22, SF83HA17 และ SF88HA12 ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคขณะกระบวนการขึ้นรูปด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แสดงได้ในตารางที่ 4.5 พบว่า ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Entrapment efficiency) ในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักมีค่าอยู่ในช่วง 30.8-33.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมากมีแนวโน้มสูงกว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยมาก ซึ่งเมื่อพิจารณาความชอบน้ำของโมเลกุลจะพบว่า กรดไฮยาลูรอนิกมีโครงสร้างโมเลกุลของกลูโคซามีน (Glucosamine) ที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH) จำนวนมาก ส่งผลให้กรดไฮยาลูรอนิกมีความชอบน้ำสูง แต่โครงสร้างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เป็นระเบียบที่แสดงความไม่ชอบน้ำเป็นจำนวนมาก [35] ส่งผลให้ไฟโบรอินไหมไทยมีความไม่ชอบน้ำสูง และเคอร์คูมินเป็นยาที่ไม่ละลายน้ำ มีความไม่ชอบน้ำสูงเช่นกัน ดังนั้น เมื่อพิจารณาความสามารถในการดูดซับแล้วจะพบว่าเคอร์คูมินเกิดอันตรกิริยากับส่วนไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยได้ดีกว่ากรดไฮยาลูรอนิก ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยมากกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมไฟโบรอินและเจลาตินของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) [7] พบว่า ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมเจลาตินมีค่า 20.1 เปอร์เซ็นต์ เคอร์คูมินถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมได้ 4 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณเคอร์คูมินเริ่มต้น และประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมไฟโบรอินและเจลาตินมีค่าประมาณ 24.9-30.0 เปอร์เซ็นต์ เคอร์คูมินถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมได้ประมาณ 4.9-

6.0 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณเคอร์คูมินเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่า ระบบที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้สูงขึ้นเนื่องจากอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างส่วนไม่ชอบน้ำของเคอร์คูมินและไฟโบรอิน นอกจากนี้ รายงานของ Gupta V. และคณะ (2009) [25] พบว่า ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคนาโนไฟโบรอินมีค่าสูงกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ แต่ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคนาโนไฟโบรอินและโคโตซานมีค่าน้อยกว่า ซึ่งมีค่าประมาณ 64-73 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากโมเลกุลโคโตซานมีหมู่กลูโคซามีนที่แสดงความสามารถในการชอบน้ำทำให้อนุภาคนาโนไฟโบรอินและโคโตซานมีความชอบน้ำมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินซึ่งเป็นโมเลกุลไม่ชอบน้ำมีค่าลดลง

แต่จากผลการศึกษาที่ได้มานี้ เมื่อพิจารณาขนาดของอนุภาคทรงกลมไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้พบว่า อนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมากมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยน้อยกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยมากอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเล็กกว่าจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสต่อปริมาตรสูงกว่าสามารถดูดซับสารได้ดีกว่า ดังนั้น จากการศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้นี้พบว่า อิทธิพลของขนาดอนุภาคทรงกลมมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินมากกว่าอิทธิพลของโครงสร้างที่มีความไม่ชอบน้ำเล็กน้อย ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมากมีแนวโน้มสูงกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินมาก

นอกจากนี้ ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเทียบกับปริมาณเคอร์คูมินเริ่มต้น (Drug loading) พบว่า เคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่าประมาณ 7.1-7.7 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมากมีแนวโน้มสูงกว่าปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Entrapment efficiency) ที่ผลิตได้

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน (เปอร์เซ็นต์) (Entrapment efficiency)	ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลม (เปอร์เซ็นต์) (Drug loading)
SF78HA22	^a 33.2 ± 1.1	^b 7.7 ± 0.2
SF83HA17	^a 32.7 ± 5.3	^b 7.5 ± 1.1
SF88HA12	^a 30.8 ± 1.7	^b 7.1 ± 0.4

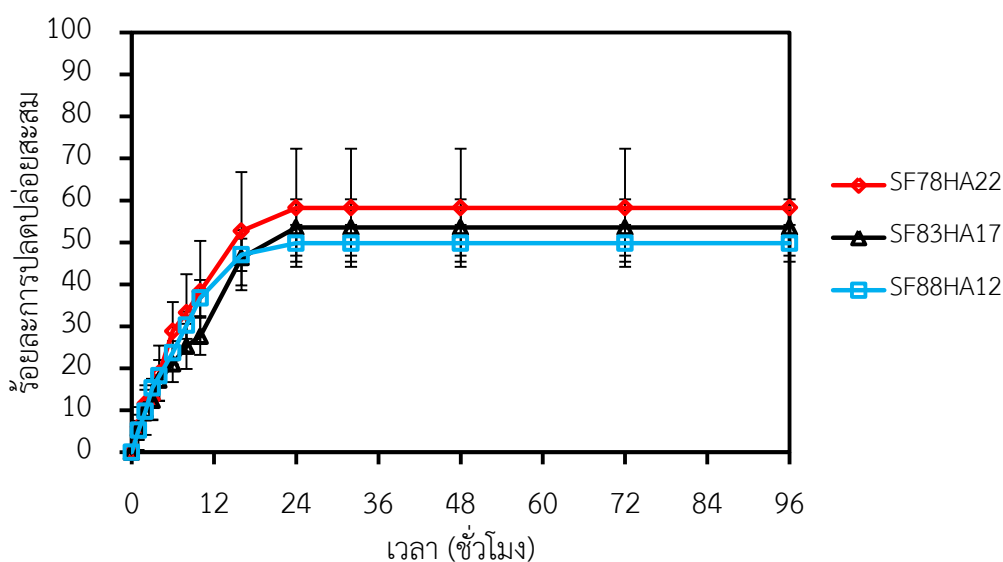
(a แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน)

(b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลม)

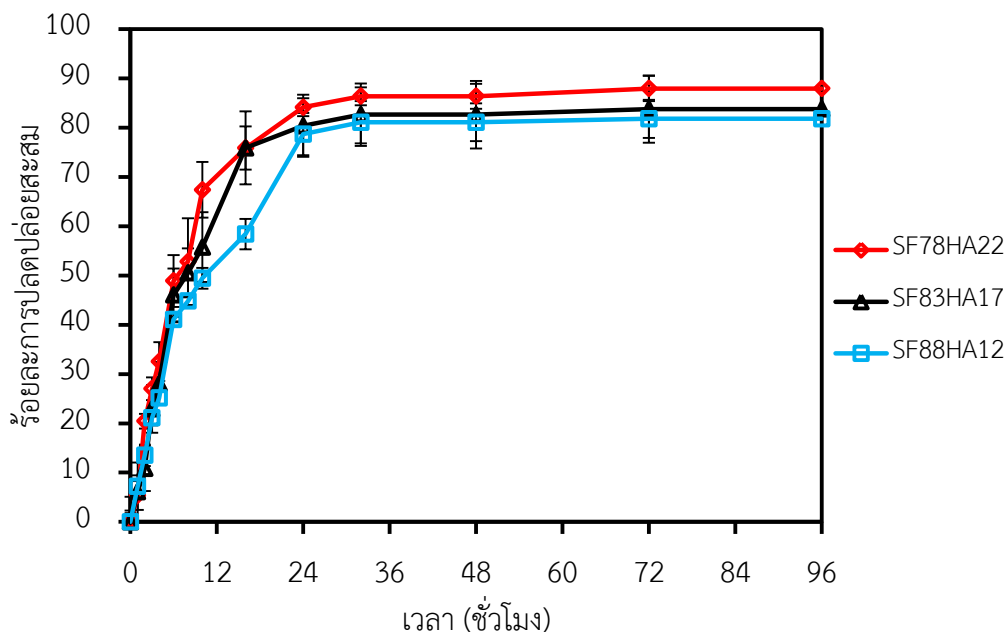
4.4.2 ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก SF78HA22, SF83HA17 และ SF88HA12 ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยแช่อนุภาคทรงกลมในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตและ Fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์และสภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่า ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ อนุภาคทรงกลมในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก SF78HA22, SF83HA17

และ SF88HA12 สามารถปลดปล่อยคอร์คูมินได้อย่างต่อเนื่อง และเริ่มปลดปล่อยคงที่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมของคอร์คูมินเท่ากับ 58, 53 และ 49 ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง อนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยคอร์คูมินได้สูงสุดเท่ากับ 58, 53 และ 49 เปอร์เซ็นต์เช่นเดิม ซึ่งสังเกตได้ว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักสามารถปลดปล่อยคอร์คูมินได้ใกล้เคียงกัน โดยอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนไฟโบรอินมากมีแนวโน้มปลดปล่อยคอร์คูมินได้น้อยกว่ากว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนกรดไฮยาลูรอนิกมาก เนื่องจากอันตรกิริยาของส่วนไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของคอร์คูมินและไฟโบรอินมีความแข็งแรงมากกว่าอันตรกิริยาระหว่างคอร์คูมินและกรดไฮยาลูรอนิก การปลดปล่อยคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินมากจึงเกิดน้อยกว่า



รูปที่ 4.13 ร้อยละการปลดปล่อยสะสมคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภายหลังการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต และ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 4.14 ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภายหลังจากแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต และ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ

เมื่อพิจารณาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่า อนุภาคทรงกลมไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก SF78HA22, SF83HA17 และ SF88HA12 สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมาอย่างต่อเนื่อง และเริ่มปลดปล่อยช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินเท่ากับ 83, 80 และ 78 ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง อนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินเพิ่มขึ้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 88, 84 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบว่าร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก อนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยมากสามารถ

ปลดปล่อยเคอร์คูมินได้ช้ากว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมาก เนื่องจากไฟโบรอินใหม่ไทยเป็นโมเลกุลที่มีสมบัติทางกลที่ดี ย่อยสลายทางชีวภาพได้ช้ากว่ากรดไฮยาลูรอนิก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากายการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ในหัวข้อ 4.3.4 และเมื่อระบบอยู่ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ ภายในระยะเวลาที่เท่ากัน การปลดปล่อยเคอร์คูมินผ่านกลไกการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนไฟโบรอินใหม่ไทยมากเกิดได้ช้ากว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมาก ประกอบกับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างส่วนไม่ชอบน้ำของโมเลกุลเคอร์คูมินและไฟโบรอินใหม่ไทยมีความแข็งแรงมากกว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของเคอร์คูมินและกรดไฮยาลูรอนิก ส่งผลให้การปลดปล่อยเคอร์คูมินออกจากอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยมากเกิดได้ช้า

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษากายการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ และสภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบพบว่า ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินทั้งสองสภาวะมีความแตกต่างกันใน 24 ชั่วโมงแรก คือ อนุภาคทรงกลมที่อยู่ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้มากกว่าอนุภาคทรงกลมที่อยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ ประมาณ 26-29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการปลดปล่อยเคอร์คูมินจะเพิ่มขึ้นเมื่ออนุภาคทรงกลมเกิดการย่อยสลาย แต่เมื่อพิจารณาที่ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินสูงสุดของอนุภาคทรงกลมในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก จะพบว่าอนุภาคทรงกลมยังเหลือเคอร์คูมินที่ยังไม่ถูกปลดปล่อยออกมาประมาณ 12-18 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเอนไซม์โปรติเอส XIV เพียง 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ไม่เพียงพอที่จะย่อยสลายอนุภาคทรงกลมได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้เคอร์คูมินที่ถูกดูดซับในอนุภาคทรงกลมด้วยอันตรกิริยาที่มีความแข็งแรงไม่ถูกปลดปล่อยออกมาทั้งหมดภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kasoju N. และคณะ (2012) [116] ได้ศึกษากายการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน โดยขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยการ Freeze-Thaw สารละลายผสมของไฟโบรอินและเคอร์คูมินในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) จากนั้นศึกษากายการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ โดยแช่โครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายผสมของบัฟเฟอร์ฟอสเฟต,

Tween 80 ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเมทานอล ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.2-7.4 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าอย่างต่อเนื่อง พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้อย่างต่อเนื่อง (Sustained release) และเมื่อเวลาผ่านไป 150 ชั่วโมง โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้สูงสุดประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และจากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR พบว่า มีพีคการดูดกลืนแสงของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ตำแหน่งเอไมด์ I, เอไมด์ II, เอไมด์ III, และเอไมด์ IV แต่เมื่อวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและเคอร์คูมิน พบว่าความเข้มของพีคเอไมด์ทั้งสี่ชนิดลดลงอีกทั้งเมื่อวิเคราะห์โครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิค XRD พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินแสดงตำแหน่งสัญญาณที่ 2 θ มีค่าเท่ากับ 20-21 องศา และ 24-25 องศา ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งที่แสดงความเป็นผลึก (Crystalline) และตำแหน่งแสดงส่วนอสัณฐาน (Amorphous) ของโมเลกุลไฟโบรอินตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินและเคอร์คูมิน พบว่าความเข้มของสัญญาณที่ 2 θ มีค่าน้อยกว่า จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR และ XRD ที่ได้แสดงให้เห็นว่าเคอร์คูมินเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพันธะเอไมด์ (Amide moieties) หรือส่วนที่มีโครงสร้างเป็น β -sheet ในโมเลกุลของไฟโบรอิน ซึ่งเกิดเป็นพันธะที่ไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์ (Noncovalent bonds) และไม่ทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของโมเลกุลไฟโบรอิน นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์รายละเอียดเกี่ยวกับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลายไฟโบรอินและเคอร์คูมินโดยใช้เทคนิคการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนส์ (Fluorescence quenching) พบว่า ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่กลุ่มของกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน (Tyr) และทริปโตเฟน (Trp) ซึ่งเป็นโมเลกุลส่วนไม่ชอบน้ำ มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของเคอร์คูมินในระบบเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเคอร์คูมินเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่เป็นกรดอะมิโนชนิดไทโรซีนและทริปโตเฟนในสารละลายไฟโบรอิน ส่งผลให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ลดลง

นอกจากนี้ รายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) [7] ที่ศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมเจลาตินและไฟโบรอินในแต่ละอัตราส่วนการผลิตโดยน้ำหนัก โดยแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต และ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน อนุภาคทรงกลมเจลาตินมีร้อยละการ

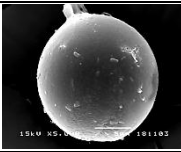
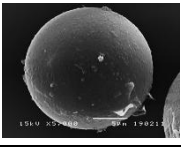
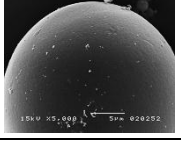
ปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินสูงสุดประมาณ 30 และเมื่ออนุภาคทรงกลมมีสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น 30-70 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินจะมีค่าลดลง ซึ่งมีค่าประมาณ 10-20 แสดงให้เห็นว่า เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินในระบบเพิ่มขึ้น เคอร์คูมินซึ่งเป็นโมเลกุลไม่ชอบน้ำสามารถเกิดอันตรกิริยากับส่วนไม่ชอบน้ำในโมเลกุลไฟโบรอินได้มากขึ้น อีกทั้งอันตรกิริยานี้มีความแข็งแรงมาก จึงส่งผลให้การปลดปล่อยเคอร์คูมินออกจากอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนไฟโบรอินมากมีค่าลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมเจลาตินและไฟโบรอินเกิดผ่านกลไกการแพร่และการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลม โดยในช่วงแรก เคอร์คูมินที่ถูกดูดซับอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยออกมาได้ด้วยกลไกการแพร่ และเมื่อเวลาผ่านไปเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับในโมเลกุลจะถูกปลดปล่อยออกมาด้วยกลไกการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลม ซึ่งพบว่าอนุภาคทรงกลมเจลาตินมีการสลายตัวเร็วกว่าอนุภาคทรงกลมเจลาตินและไฟโบรอิน จึงทำให้ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมเจลาตินมีค่าสูงกว่า

รายงานของ Lian Y. และคณะ (2014) [117] ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่เป็นเส้นใยนาโนผสมของไฟโบรอินและ Poly(L-lactic acid-co-capolactone) (SF/P(LLA-CL)) พบว่า เมื่อปริมาณเคอร์คูมินในระบบเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเส้นใยนาโนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยลดลงจาก 461 นาโนเมตร เป็น 293 นาโนเมตร แต่เมื่อปริมาณเคอร์คูมินเพิ่มขึ้นเป็น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยนาโนเพิ่มขึ้นเป็น 497 นาโนเมตร อาจเนื่องมาจากโมเลกุลเคอร์คูมินประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) และหมู่คาร์บอนิล (-C=O) ส่วนโมเลกุลไฟโบรอินประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) หมู่อะมิโน (-NH_2) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) สารสองชนิดนี้สามารถเกิดอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลได้ ส่งผลให้ความหนืดของสารละลายผสมมีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนเพิ่มขึ้น แต่เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน (Entrapment efficiency) ของเส้นใยไฟโบรอิน พบว่า เมื่อปริมาณเคอร์คูมินในระบบเพิ่มขึ้นเป็น 2, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินมีค่า 70.23, 73.36 และ 75.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และผลการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของเส้นใยไฟโบรอินที่ใช้เคอร์คูมินความเข้มข้นต่าง ๆ ภายหลังจากแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่มี Tween 80 ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีการเขย่าอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญ โดยพบว่า เส้นใยไฟโบรอินปลดปล่อยคอร์คูมินออกมาอย่างรวดเร็ว (Burst release) ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นมีการปลดปล่อยคอร์คูมินออกมาอย่างต่อเนื่อง (Sustained release) และเส้นใยไฟโบรอินที่มีปริมาณคอร์คูมิน 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถปลดปล่อยคอร์คูมินได้สูงสุดประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์เมื่อระยะเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง แต่เส้นใยไฟโบรอินที่มีปริมาณคอร์คูมิน 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถปลดปล่อยคอร์คูมินได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าประมาณ 76-78 เปอร์เซ็นต์ โดยเส้นใยไฟโบรอินที่มีปริมาณคอร์คูมิน 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักมีขนาดเล็กกว่าเส้นใยไฟโบรอินที่มีปริมาณคอร์คูมิน 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเส้นใยที่มีขนาดเล็กจะถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้เร็วกว่าเส้นใยที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลให้การปลดปล่อยคอร์คูมินเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ร้อยละการปลดปล่อยสะสมจึงมีค่าใกล้เคียงกัน

และเมื่อพิจารณาผลการดูดซับและผลการควบคุมการปลดปล่อยคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า ผลการดูดซับและผลการควบคุมการปลดปล่อยคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องจากระบบที่ใช้มีอัตราส่วนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกโดยน้ำหนักต่างกันไม่มาก (10 เปอร์เซ็นต์) เป็นผลให้ไม่เห็นอิทธิพลของสัดส่วนการผสมในอนุภาคทรงกลมที่มีต่อความสามารถในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยคอร์คูมิน แต่อนุภาคทรงกลมที่มีปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกมากมีแนวโน้มกักเก็บคอร์คูมินได้ดีกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีไฟโบรอินมาก อาจเนื่องจากอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมากมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนไฟโบรอินมากอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอนุภาคที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง เป็นผลทำให้มีพื้นที่ผิวในการดูดซับคอร์คูมินได้มากกว่า อีกทั้งเมื่อพิจารณาการปลดปล่อยคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมในสภาวะที่ใช้เอนไซม์โปรติเอส XIV 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า อนุภาคทรงกลมในแต่ละอัตราส่วนผสมมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมไม่ต่างกันมากนัก แต่อนุภาคที่มีกรดไฮยาลูรอนิกมากสามารถปลดปล่อยคอร์คูมินได้มากกว่าอนุภาคที่มีไฟโบรอินมาก เนื่องจากอันตรกิริยาที่แข็งแรงระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินและคอร์คูมิน อีกทั้งอนุภาคทรงกลมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกมากมีขนาดเล็กกว่าจึงเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพได้เร็วกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลทำให้สามารถปลดปล่อยคอร์คูมินออกมาได้มากกว่า

ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินในระดับห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคทรงกลมเฉลี่ย (μm)	ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน (เปอร์เซ็นต์) (Entrapment efficiency)	ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลม (เปอร์เซ็นต์) (Drug loading)	ร้อยละการปลดปล่อยสะสม 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV 1U/ml	โครงสร้างสัณฐานภายนอกของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน
SF78HA22	44.9 ± 2.2^a	33.2 ± 1.1^a	7.7 ± 0.2^b	84.2 ± 4.4^a	
SF83HA17	48.7 ± 2.6^a	32.7 ± 5.3^a	7.5 ± 1.1^b	80.4 ± 7.4^b	
SF88HA12	68.0 ± 2.1^b	30.8 ± 1.7^a	7.1 ± 0.4^b	78.7 ± 3.1^b	

(a,b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลขนาดอนุภาคทรงกลมเฉลี่ย ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลม และร้อยละการปลดปล่อยสะสมในสภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV 1U/ml เป็นองค์ประกอบ)

นอกจากนี้ กลไกการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิคสามารถประเมินได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ Power law ดังแสดงในสมการที่ 4.1-4.2 โดยอาศัยการคำนวณแบบการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) ซึ่งคำนวณหาค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Release constant; k) และตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) เทียบกับเวลา (t) [58, 118, 119] ซึ่งรายละเอียดแสดงในภาคผนวก

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (4.1)$$

$$\log(M_t/M_\infty) = n \log t + \log k \quad (4.2)$$

โดยที่ M_t คือ ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t
 M_∞ คือ ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้น
 k คือ ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยของแบบจำลอง Power law
 n คือ ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent)

กรณีตัวอย่างเป็นทรงกลม (Spherical sample) เมื่อ

$n = 0.43$ จะแสดงลักษณะการปลดปล่อยสารแบบ Fickian diffusion

$0.43 < n < 0.85$ จะแสดงลักษณะการปลดปล่อยสารแบบ Anomalous transport (non-Fickian diffusion)

$n = 0.85$ จะแสดงลักษณะการปลดปล่อยสารแบบ Case II-transport (relaxation)

$n > 0.85$ จะแสดงลักษณะการปลดปล่อยสารแบบ Super case II-transport

จากการคำนวณค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (k) ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก แสดงได้ในตารางที่ 4.6-4.7 โดยเปรียบเทียบการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์และสภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ พบว่า ค่าตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (n) สำหรับอนุภาคทรงกลมในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์และสภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV เป็นองค์ประกอบ มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง $0.43 < n < 0.85$ แสดงถึงลักษณะการปลดปล่อยเคอร์คูมินแบบ Anomalous transport (non-Fickian diffusion) คือ ลักษณะการควบคุมการปลดปล่อยสารที่มีทั้งกลไกการแพร่เป็นตัวกำหนดปฏิกิริยา (Diffusion-controlled) และการบวมหรือย่อยสลายเป็น

ตัวกำหนดปฏิกิริยา (Swelling or erosion-controlled) โดยเมื่ออนุภาคทรงกลมสัมผัสกับตัวกลางที่เป็นน้ำ ยาหรือสารออกฤทธิ์ที่อยู่บริเวณผิวของอนุภาคจะเกิดการแพร่ออกมา และเมื่อน้ำแพร่เข้าสู่อนุภาคทรงกลม อนุภาคทรงกลมจะเกิดการบวมตัวเกิดขึ้นจนรอบผิวอนุภาค ซึ่งอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกมีความชอบน้ำจึงทำให้อนุภาคทรงกลมบวมตัวได้ดี อีกทั้งเมื่ออนุภาคทรงกลมอยู่ในสภาวะที่มีเอนไซม์ อุณหภูมิ ค่าประจุทางไฟฟ้า หรือค่าความเป็นกรดต่างที่มีความเหมาะสม อนุภาคทรงกลมจะถูกละลาย ทำให้ยาหรือสารออกฤทธิ์จะสามารถแพร่ออกมาได้ สอดคล้องกับรายงานของ Gupta V. และคณะ (2009) [25] ที่ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคนาโนไฟโบรอินพบว่า อนุภาคนาโนไฟโบรอินที่ใช้ความเข้มข้นไฟโบรอินในการเตรียมเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้อย่างต่อเนื่อง (Sustained release) ซึ่งประเมิณกลไกที่ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคนาโนไฟโบรอินได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Power law โดยพบว่า ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) มีค่าเท่ากับ 0.55 และมีค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อย (k) เท่ากับ 0.9 เมื่อพิจารณาค่าตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อยจะพบว่า อนุภาคนาโนไฟโบรอิน มีค่าตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อยอยู่ในช่วง $0.43 < n < 0.85$ แสดงถึงลักษณะการปลดปล่อยเคอร์คูมินแบบ Anomalous transport (non-Fickian diffusion) คือ ลักษณะการควบคุมการปลดปล่อยสารที่มีทั้งกลไกการแพร่และกลไกการย่อยสลาย

ตารางที่ 4.8 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Release constant; k) ตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) ภายใต้สภาวะการควบคุมการปลดปล่อยที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ

ตัวอย่าง	ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (k)	ตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
SF78HA22	0.16 ± 0.07	0.50 ± 0.06	0.78
SF83HA17	0.14 ± 0.06	0.51 ± 0.05	0.82
SF88HA12	0.17 ± 0.07	0.48 ± 0.06	0.88

ตารางที่ 4.9 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Release constant; k) ตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) ภายใต้สภาวะการควบคุมการปลดปล่อยที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ

ตัวอย่าง	ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (k)	ตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
SF78HA22	0.16 ± 0.09	0.51 ± 0.08	0.87
SF83HA17	0.14 ± 0.09	0.55 ± 0.07	0.91
SF88HA12	0.14 ± 0.07	0.52 ± 0.06	0.85

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก SF30HA70, SF50HA50 และ SF70HA30 ด้วยเทคนิคอิมัลชันน้ำในน้ำมัน และทำให้อนุภาคมีความคงตัวมากขึ้นโดยการเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายไกลูตาร์ดีไฮด์ในระหว่างการขึ้นรูป ผลการศึกษาลักษณะของสารละลายผสม สรุปได้ว่า ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยมีแนวโน้มเป็นลบในช่วงที่มีค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 4.5 และสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีค่าศักย์ゼต้าเป็นลบในช่วงที่มีค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 2 และมีแนวโน้มเป็นลบมากขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสูงขึ้น แต่สำหรับค่าศักย์ゼต้าของสารละลายผสมพบว่า มีค่าใกล้เคียงกับค่าศักย์ゼต้าของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก เนื่องจากประจุลบจำนวนมากของหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกดบังประจุบวกของหมู่อะมิโนในโมเลกุลไฟโบรอินไหมไทย ส่งผลให้สารละลายผสมมีประจุเป็นลบ นอกจากนี้ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 ทั้งไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกมีประจุเป็นลบ เกิดแรงผลักกัน ไม่เกิดเป็นสารประกอบของโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ คาดว่าสารทั้งสองชนิดสามารถละลายเข้ากันได้เป็นเนื้อเดียวโดยอาศัยอันตรกิริยาของส่วนไม่ชอบน้ำ สารละลายผสมที่ได้จึงมีลักษณะใสเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ขึ้นรูปอนุภาคด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน

จากการศึกษาผลของสภาวะการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมัน สามารถสรุปได้ว่า เมื่อเริ่มปั่นกวนอิมัลชันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับลดอุณหภูมิในการขึ้นรูปเป็น 4 องศาเซลเซียส อนุภาคที่ได้ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักมีลักษณะคล้ายเจลทรงกลม กระจายตัวดี เนื่องจากการปรับลดอุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส จะทำให้อิมัลชันในระบบมีความหนืดมากขึ้น อนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกสามารถคงรูปทรงกลมได้มากขึ้น นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมันเท่ากับ 1:16 อนุภาคที่ได้ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักมีลักษณะคล้ายเจลทรงกลมที่มีความคงตัวมากขึ้น

ขนาดอนุภาคมีแนวโน้มเล็กลง กระจายตัวดี และพื้นผิวอนุภาคมีแนวโน้มเรียบขึ้น เนื่องจากการเพิ่ม ปริมาณน้ำมันเข้าไปในระบบ จะทำให้วัฏภาคน้ำถูกรอบล้อมด้วยวัฏภาคน้ำมันเป็นจำนวนมาก อนุภาคทรงกลมส่วนที่ขอบน้ำจึงพยายามลดพื้นที่ผิวสัมผัสกับส่วนไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของน้ำมัน ส่งผลให้ขนาดอนุภาคเล็กลง และมีพื้นผิวเรียบขึ้น อีกทั้ง การเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขณะการขึ้น รูปในระบบที่มีตัวทำอิมัลชัน (Tween 80) ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้ได้อนุภาคที่มีลักษณะเป็นทรงกลมตัน ไม่เสียรูป พื้นผิวค่อนข้างเรียบ และขนาดอนุภาคมีความสม่ำเสมอ

เมื่อคำนวณร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลม จะพบว่า ร้อยละผลได้ทั้งหมดของ อนุภาคทรงกลมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีโอกาสที่หมู่แอลดี ไฮด์ในโมเลกุลกลูตารัลดีไฮด์เกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนในโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยและ เกิดปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิคได้มากขึ้น โดยพบว่า ที่เวลาการเชื่อม ขวาง 6 และ 24 ชั่วโมง ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญ แต่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคทรงกลมที่ผ่านการเชื่อมขวาง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเมื่ออนุภาคทรงกลมมีส่วนของไฟโบรอินไหมไทยเพิ่มขึ้น ร้อยละผลได้ ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมจะมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากไฟโบรอินถูกเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ได้ ดีกว่ากรดไฮยาลูรอนิค อีกทั้ง อนุภาคทรงกลมในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักที่ผ่านการเชื่อม ขวางเป็นเวลาต่างๆ มีร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดในช่วง 32-85 ไมครอนมากที่สุด ซึ่ง สามารถฉีดผ่านเข็มฉีดยาขนาด 26G (0.45×25 มิลลิเมตร) ได้ดี มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น ระบบนำส่งยาเพื่อรักษาโรคข้อเสื่อมได้ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดในช่วงดังกล่าว มาศึกษาสมบัติด้านอื่น ๆ

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิคที่คงเหลือในอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ พบว่า ปริมาณ กรดไฮยาลูรอนิคที่คงเหลือในอนุภาคทรงกลมภายหลังการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีค่าน้อยกว่า ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิคที่ใช้ในการเตรียมเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่าการเชื่อมขวางอนุภาคด้วย สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรไม่สามารถเชื่อมขวาง กรดไฮยาลูรอนิคได้ทั้งหมด การศึกษาความเสถียรของอนุภาคทรงกลมภายหลังการแช่น้ำ พบว่า ปริมาณน้ำหนักแห้งสุทธิภายหลังการแช่น้ำจะมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดไฮยาลูรอนิคที่ตรวจพบใน

น้ำที่ได้ภายหลังจากแช่อนุภาคทรงกลม ซึ่ให้เห็นว่า โมเลกุลส่วนที่เป็นกรดไฮยาลูรอนิกถูกเชื่อมขวางด้วยกอลลูตารัลดีไฮด์ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของอนุภาคไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่แท้จริงมีการเปลี่ยนแปลง

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะอนุภาคที่ได้พบว่า อนุภาคที่ได้เป็นทรงกลม กระจายตัวดี ผิวค่อนข้างเรียบ มีร้อยละผลได้และความเสถียรค่อนข้างสูง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกอนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักที่แท้จริง SF78HA22, SF83HA17 และ SF88HA12 ซึ่งผ่านการเชื่อมขวางด้วยกอลลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ และความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ภายหลังจากแช่อนุภาคทรงกลมในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน อนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วน SF88HA12 จะมีร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือมากที่สุด เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอส XIV มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายโปรตีน ประกอบกับกรดไฮยาลูรอนิกเป็นโมเลกุลที่เกิดการย่อยสลายได้ง่าย อนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินมากจึงเกิดการย่อยสลายช้ากว่าอนุภาคทรงกลมที่มีกรดไฮยาลูรอนิกมาก และประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก มีค่าประมาณ 30.8-33.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้ประมาณ 7.1-7.7 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติเคอร์คูมินถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมได้ด้วยอันตรกิริยาของส่วนไม่ชอบน้ำ ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยที่มีความไม่ชอบน้ำสามารถเกิดอันตรกิริยากับส่วนไม่ชอบน้ำของเคอร์คูมินได้ดีกว่ากรดไฮยาลูรอนิกที่มีความชอบน้ำสูง แต่การศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมากมีแนวโน้มสูงกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยมาก อาจเนื่องมาจากอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมากมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินมากอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้มีพื้นที่ผิวในการดูดซับสารมากกว่า นอกจากนี้ อนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้อย่างต่อเนื่อง โดยอนุภาคทรงกลมที่อยู่ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอสเป็นองค์ประกอบสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้มากขึ้น เนื่องจากเกิดการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลม โดยกลไกการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมประกอบด้วย 2 กลไก คือ กลไกการแพร่และกลไกการย่อยสลาย ในช่วงแรกเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับ

บนผิวอนุภาคจะถูกปลดปล่อยออกมาด้วยกลไกการแพร่ และเมื่อเวลาผ่านไปอนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยคอร์คิวมินได้ด้วยกลไกการย่อยสลายของอนุภาคเมื่อมีเอนไซม์ ค่าความเป็นกรดต่าง หรือ อุณหภูมิที่เหมาะสม อีกทั้งยังพบว่า อนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยมากขึ้นสามารถชะลอการปลดปล่อยคอร์คิวมินได้นานขึ้น เนื่องจากเกิดอันตรกิริยาที่มีความแข็งแรงของส่วนไม่ชอบน้ำระหว่างโมเลกุลคอร์คิวมินและไฟโบรอิน

จากผลการวิจัย สามารถสรุปได้ว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานเป็นระบบนำส่งคอร์คิวมินได้



5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงวิธีการเชื่อมขวางอนุภาค เพื่อแก้ปัญหการเชื่อมขวางโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิค และด้วยข้อจำกัดของกรดไฮยาลูรอนิคที่เชื่อมขวางได้ค่อนข้างยาก จึงจำเป็นต้องเชื่อมขวางอนุภาคในระหว่างกระบวนการขึ้นรูป ซึ่งอาจปรับปรุงการเชื่อมขวางโดยเปลี่ยนชนิดของสารเชื่อมขวางที่ใช้ เช่น EDC/NHS หรือ Ginipin เป็นต้น หรือทำการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลม 2 ครั้ง คือ เชื่อมขวางในระหว่างกระบวนการขึ้นรูป และเชื่อมขวางอีกครั้งภายหลังการขึ้นรูป

2. ปรับปรุงวิธีการดูดซับเคอร์คูมิน เพื่อให้ได้ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมมากขึ้น โดยอาจทำการดูดซับเคอร์คูมิน 2 ครั้ง (หรือมากกว่า) หรือดูดซับเคอร์คูมินในสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำลง เช่น เอทานอลความเข้มข้น 80-90 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้โมเลกุลส่วนของชอบน้ำของกรดไฮยาลูรอนิคดูดซับสารได้มากขึ้น

3. หากสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนได้สูงขึ้นแล้ว ควรมีการศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิคในทางการแพทย์ เช่น การต้านการอักเสบของข้อ

รายการอ้างอิง

1. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications*. Carbohydrate Polymers, 2011. **85**(2): p. 325-333.
2. Cilurzo, F., C.G. Gennari, F. Selmin, L.A. Marotta, P. Minghetti, et al., *An investigation into silk fibroin conformation in composite materials intended for drug delivery*. Int J Pharm, 2011. **414**(1-2): p. 218-24.
3. Dyakonov, T., C.H. Yang, D. Bush, S. Gosangari, S. Majuru, et al., *Design and characterization of a silk-fibroin-based drug delivery platform using naproxen as a model drug*. J Drug Deliv, 2012. **2012**: p. 490514.
4. Kundu, J., Y.I. Chung, Y.H. Kim, G. Tae and S.C. Kundu, *Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release*. Int J Pharm, 2010. **388**(1-2): p. 242-50.
5. Mandal, B.B., S. Kapoor and S.C. Kundu, *Silk fibroin/polyacrylamide semi-interpenetrating network hydrogels for controlled drug release*. Biomaterials, 2009. **30**(14): p. 2826-36.
6. Okhawilai, M., R. Rangkupan, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul, *Preparation of Thai silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications*. Int J Biol Macromol, 2010. **46**(5): p. 544-50.
7. Ratanavaraporn, J., S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul, *The development of injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine*. J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(2): p. 401-10.
8. Wang, X., T. Yucel, Q. Lu, X. Hu and D.L. Kaplan, *Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery*. Biomaterials, 2010. **31**(6): p. 1025-35.

9. Berenbaum, F., *Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. **21**(1): p. 16-21.
10. Felson, D.T., *Osteoarthritis as a disease of mechanics*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. **21**(1): p. 10-5.
11. Gong, C., Q. Wu, Y. Wang, D. Zhang, F. Luo, et al., *A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing*. *Biomaterials*, 2013. **34**(27): p. 6377-87.
12. Lorenz, H. and W. Richter, *Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage*. *Prog Histochem Cytochem*, 2006. **40**(3): p. 135-63.
13. Choi, K.Y., K.H. Min, H.Y. Yoon, K. Kim, J.H. Park, et al., *PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo*. *Biomaterials*, 2011. **32**(7): p. 1880-9.
14. Lei, Y., S. Gojgini, J. Lam and T. Segura, *The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels*. *Biomaterials*, 2011. **32**(1): p. 39-47.
15. Li, L., Y. Qian, C. Jiang, Y. Lv, W. Liu, et al., *The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds*. *Biomaterials*, 2012. **33**(12): p. 3428-45.
16. Yang, J.A., E.S. Kim, J.H. Kwon, H. Kim, J.H. Shin, et al., *Transdermal delivery of hyaluronic acid -- human growth hormone conjugate*. *Biomaterials*, 2012. **33**(25): p. 5947-54.
17. Henrotin, Y., M. Gharbi, Y. Dierckxsens, F. Priem, M. Marty, et al., *Decrease of a specific biomarker of collagen degradation in osteoarthritis, Coll2-1, by treatment with highly bioavailable curcumin during an exploratory clinical trial*. *BMC Complement Altern Med*, 2014. **14**: p. 159.

18. Ruby, A.J., G. Kuttan, K.D. Babu, K.N. Rajasekharan and R. Kuttan, *Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids*. *Cancer Lett*, 1995. **94**(1): p. 79-83.
19. Shakibaei, M., T. John, G. Schulze-Tanzil, I. Lehmann and A. Mobasher, *Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis*. *Biochem Pharmacol*, 2007. **73**(9): p. 1434-45.
20. Johnson, J.J. and H. Mukhtar, *Curcumin for chemoprevention of colon cancer*. *Cancer Lett*, 2007. **255**(2): p. 170-81.
21. Jutooru, I., G. Chadalapaka, P. Lei and S. Safe, *Inhibition of NFkappaB and pancreatic cancer cell and tumor growth by curcumin is dependent on specificity protein down-regulation*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(33): p. 25332-44.
22. Shao, Z.M., Z.Z. Shen, C.H. Liu, M.R. Sartippour, V.L. Go, et al., *Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells*. *Int J Cancer*, 2002. **98**(2): p. 234-40.
23. Shehzad, A., F. Wahid and Y.S. Lee, *Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials*. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2010. **343**(9): p. 489-99.
24. Bansal, S.S., H. Kausar, M.V. Vadhanam, S. Ravoori and R.C. Gupta, *Controlled systemic delivery by polymeric implants enhances tissue and plasma curcumin levels compared with oral administration*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012. **80**(3): p. 571-7.
25. Gupta, V., A. Aseh, C.N. Rios, B.B. Aggarwal and A.B. Mathur, *Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy*. *International Journal of Nanomedicine*, 2009. **4**: p. 115-122.

26. Manju, S. and K. Sreenivasan, *Hollow microcapsules built by layer by layer assembly for the encapsulation and sustained release of curcumin*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. **82**(2): p. 588-93.
27. Ratanajajaroen, P. and M. Ohshima, *Synthesis, release ability and bioactivity evaluation of chitin beads incorporated with curcumin for drug delivery applications*. J Microencapsul, 2012. **29**(6): p. 549-58.
28. Yu, H. and Q. Huang, *Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch*. Food Chemistry, 2010. **119**(2): p. 669-674.
29. Imsombut, T., Y. Srisuwan, P. Srihanam and Y. Baimark, *Genipin-cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method*. Powder Technology, 2010. **203**(3): p. 603-608.
30. กะรัต พันธุ์ธนุสร และ พงษ์พิสิฐ คุณยศยิ่ง, ผลของไฟโบรอินในอาหารต่อภูมิคุ้มกันของไก่เนื้อ. ปัญหาพิเศษ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2551.
31. โครงสร้างใหม่ [Online]. Available from:<http://www.fao.org/docrep/x2099E/x2099e03.htm> (2013, September 20).
32. Mondal, M., K. Trivedy and S. Nirmal Kumar, *The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori*. Caspian Journal of Environmental Sciences, 2007. **5**(2): p. 63-76.
33. Lee, Y.-w., *Silk reeling and testing manual*. 2011.
34. Kasoju, N. and U. Bora, *Silk fibroin in tissue engineering*. Adv Healthc Mater, 2012. **1**(4): p. 393-412.
35. Malay, O., D. Yaln, A. Batgün and O. Bayraktar, *Characterization of Silk Fibroin-Hyaluronic acid film*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2008. **94**(3): p. 749-755.

36. Vepari, C. and D.L. Kaplan, *Silk as a Biomaterial*. Prog Polym Sci, 2007. **32**(8-9): p. 991-1007.
37. Kudug, E., *Use of Fibroin/Hyaluronic Acid Matrices as a Drug Reservoir in Iontophoretic Transdermal Delivery*, in *Chemical Engineering*. 2004, Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey. p. 67.
38. Altman, G.H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, et al., *Silk-based biomaterials*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 401-416.
39. Padamwar, M.N. and A.P. Pawar, *Silk sericin and its applications: A review*. Journal of Scientific & Industrial Research, 2004. **63**: p. 323-329.
40. Wenk, E., H.P. Merkle and L. Meinel, *Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications*. J Control Release, 2011. **150**(2): p. 128-41.
41. Cowman, M.K. and S. Matsuoka, *Experimental approaches to hyaluronan structure*. Carbohydrate Research, 2005. **340**(5): p. 791-809.
42. Necas, J., L. Bartosikova, P. Brauner and J. Kolar, *Hyaluronic acid (hyaluronan) a review*. Veterinarni Medicina, 2008. **53**(8): p. 397-411.
43. Lapcik, L.J.a.L.L., *Hyaluronan Preparation, Structure, Properties, and Applications*. Chemical Reviews, 1998. **98**(8): p. 2663-2681.
44. Teco medical group, *S. Hyaluronic acid [Online]*. Available from:<http://www.tecomedical.com/downloads/pdf/Hyaluron.pdf> (2013, September 15).
45. *Hyaluron [online]*. Available from:<http://www.beautyhealthy4you.com> (2013, September 13).
46. Schanté, C.E., G. Zuber, C. Herlin and T.F. Vandamme, *Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications*. Carbohydrate Polymers, 2011. **85**(3): p. 469-489.
47. Collins, M.N. and C. Birkinshaw, *Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review*. Carbohydrate Polymers, 2013. **92**(2): p. 1262-1279.

48. Sahil, K., M. Akanksha, S. Premjeet, A. Bilandi and B. Kapoor, *Microspheres : a review*. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry, 2011. 1(4): p. 1184-1198.
49. *Water in Oil emulsion [Online]. Available from: <http://www.dowcorning.com/content/discover/discoverchem/forms-mixtures-surfactants.aspx>. (2013, November 18).*
50. *HLB surfactant value [Online]. Available from: <http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/0315.html> (2013, November 18)*
51. *HLB value [Online]. Available from: <http://www.elementis.com/esweb/esweb.nsf/pages/surfactants-nonionicsurfactants> (2013, November 18).*
52. พิมพ์ ลิลาพิสิทธิ์, เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, สนพ. 264 หน้า 2008: p. 264
53. *Controlled release [Online]. Available from: <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=745> (2013, November 18).*
54. ประณีต โอปณะโสภิต, ระบบนำส่งยา (*Drug delivery systems*). ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์. โรงพิมพ์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 325 หน้า. 2556.
55. จอมใจ พีรพัฒนา, ระบบนำส่งยาแบบมาทริกซ์ (*Matrix Drug Delivery Systems*). คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 113 หน้า. 2555.
56. ณรงค์ สารีสุด, การผลิตยาออกฤทธิ์เนิ่นและระบบนำส่งยาแบบต่าง ๆ. ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล. โรงพิมพ์ หจก. ไทยมิตรการพิมพ์. 293 หน้า. 2535.
57. ภาควิชา เติ่งอำนาจ, การดูดซึมของยาจากทางเดินอาหารและการเอื้อประโยชน์ในร่างกาย (*Gastrointestinal Drug Absorption and Bioavailability*). จัดพิมพ์โดย ภาควิชา

วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
156 หน้า. 2540.

58. Dash, A.K. and G.C. Cudworth, *Therapeutic applications of implantable drug delivery systems*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1998. **40**(1): p. 1-12.
59. *drug delivery*. [online]. Available from:<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/biomaterials/tutorial.html> (2013, October 24).
60. Chattopadhyay, I., K. Biswas, U. Bandyopadhyay and K.B. Ranajit, *Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications*. Current Science, 2004. **87**(1): p. 44-53.
61. Padhye, S., D. Chavan, S. Pandey, J. Deshpande, K.V. Swamy , et al., *Perspectives on Chemopreventive and Therapeutic Potential of Curcumin Analogs in Medicinal Chemistry*. Mini Review Medical Chemistry, 2010. **10**(5): p. 372-387.
62. Anand, P., S.G. Thomas, A.B. Kunnumakkara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, et al., *Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1590-611.
63. Tonnesen, H.H. and J. Karlsen, *Studies on Curcumin and Curcuminoids VI. Kinetics of Curcumin Degradation in Aqueous Solution*. Z Lebensm Unters Forsch, 1985. **180**: p. 402-404.
64. Wang, Y.J., M.H. Pan, A.L. Cheng, L.I. Lin, Y.S. Ho, et al., *Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997. **15**: p. 1867-1876.
65. Shen, L. and H.F. Ji, *Theoretical study on physicochemical properties of curcumin*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2007. **67**(3-4): p. 619-23.
66. Stankovic, I., *CURCUMIN : Chemical and Technical Assessment (CTA)*. 2004.

67. Jayaprakasha, G.K., L. Jaganmohan Rao and K.K. Sakariah, *Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin*. Food Chemistry, 2006. **98**(4): p. 720-724.
68. Henrotin, Y., A.L. Clutterbuck, D. Allaway, E.M. Lodwig, P. Harris, et al., *Biological actions of curcumin on articular chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(2): p. 141-9.
69. Henrotin, Y., F. Priem and A. Mobasheri, *Curcumin: a new paradigm and therapeutic opportunity for the treatment of osteoarthritis: curcumin for osteoarthritis management*. Springer Plus, 2013. **2**(56): p. 1-9.
70. Joe, B. and R. Lokesh Belur, *Prophylactic and therapeutic effects of n-3 polyunsaturated capsaicin, and curcumin on adjuvant induced arthritis in rats*. Nitritional Biochemistry, 1997. **8**: p. 397-407.
71. Weber, W.M., L.A. Hunsaker, S.F. Abcouwer, L.M. Deck and D.L. Vander Jagt, *Anti-oxidant activities of curcumin and related enones*. Bioorg Med Chem, 2005. **13**(11): p. 3811-20.
72. Jacob, A., R. Wu, M. Zhou and P. Wang, *Mechanism of the Anti-inflammatory Effect of Curcumin: PPAR-gamma Activation*. PPAR Res, 2007. **2007**: p. 89369.
73. Katsori, A.M., M. Chatzopoulou, K. Dimas, C. Kontogiorgis, A. Patsilnakos, et al., *Curcumin analogues as possible anti-proliferative & anti-inflammatory agents*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(7): p. 2722-35.
74. Duvoix, A., R. Blasius, S. Delhalle, M. Schnekenburger, F. Morceau, et al., *Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin*. Cancer Lett, 2005. **223**(2): p. 181-90.
75. Jana, N.R., P. Dikshit, A. Goswami and N. Nukina, *Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(12): p. 11680-5.

76. Milacic, V., S. Banerjee, K.R. Landis-Piwowar, F.H. Sarkar, A.P. Majumdar, et al., *Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo*. *Cancer Res*, 2008. **68**(18): p. 7283-92.
77. Wilken, R., M.S. Veena, M.B. Wang and E.S. Srivatsan, *Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 12.
78. Ravindran, J., S. Prasad and B.B. Aggarwal, *Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?* *AAPS J*, 2009. **11**(3): p. 495-510.
79. Sharma, R.A., S.A. Euden, S.L. Platton, D.N. Cooke, A. Shafayat, et al., *Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(20): p. 6847-54.
80. Lao, C.D., M.T.t. Ruffin, D. Normolle, D.D. Heath, S.I. Murray, et al., *Dose escalation of a curcuminoid formulation*. *BMC Complement Altern Med*, 2006. **6**: p. 10.
81. Das, R.K., N. Kasoju and U. Bora, *Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells*. *Nanomedicine*, 2010. **6**(1): p. 153-60.
82. Mohanty, C. and S.K. Sahoo, *The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation*. *Biomaterials*, 2010. **31**(25): p. 6597-611.
83. Shaikh, J., D.D. Ankola, V. Beniwal, D. Singh and M.N. Kumar, *Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer*. *Eur J Pharm Sci*, 2009. **37**(3-4): p. 223-30.

84. Suwantong, O., P. Opanasopit, U. Ruktanonchai and P. Supaphol, *Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance*. *Polymer*, 2007. **48**(26): p. 7546-7557.
85. Malay, O., O. Bayraktar and A. Batigun, *Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid*. *Int J Biol Macromol*, 2007. **40**(4): p. 387-93.
86. Garcia-Fuentes, M., E. Giger, L. Meinel and H.P. Merkle, *The effect of hyaluronic acid on silk fibroin conformation*. *Biomaterials*, 2008. **29**(6): p. 633-42.
87. Malay, O., A. Batigun and O. Bayraktar, *pH- and electro-responsive characteristics of silk fibroin-hyaluronic acid polyelectrolyte complex membranes*. *Int J Pharm*, 2009. **380**(1-2): p. 120-6.
88. Srihanam, P., Y. Srisuwan, T. Imsombut and Y. Baimark, *Silk fibroin microspheres prepared by the water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2010. **28**(1): p. 293-297.
89. Numata, K., S. Yamazaki and N. Naga, *Biocompatible and biodegradable dual-drug release system based on silk hydrogel containing silk nanoparticles*. *Biomacromolecules*, 2012. **13**(5): p. 1383-9.
90. Huh, Y., H.J. Cho, I.S. Yoon, M.K. Choi, J.S. Kim, et al., *Preparation and evaluation of spray-dried hyaluronic acid microspheres for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride*. *Eur J Pharm Sci*, 2010. **40**(1): p. 9-15.
91. Maroda, M., M. Bodnár, S. Berkó, J. Bakó, G. Erő, et al., *Preparation and investigation of a cross-linked hyaluronan nanoparticles system*. *Carbohydrate Polymers*, 2011. **83**(3): p. 1322-1329.
92. Han, L., Y. Zhao, L. Yin, R. Li, Y. Liang, et al., *Insulin-loaded pH-sensitive hyaluronic acid nanoparticles enhance transcellular delivery*. *AAPS PharmSciTech*, 2012. **13**(3): p. 836-45.

93. Mandal, B.B. and S.C. Kundu, *Calcium alginate beads embedded in silk fibroin as 3D dual drug releasing scaffolds*. *Biomaterials*, 2009. **30**(28): p. 5170-7.
94. Lim, S.T., G.P. Martin, D.J. Berry and M.B. Brown, *Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan*. *Journal of Controlled Release*, 2000. **66**: p. 281-292.
95. Park, S.N., J.C. Park, H.O. Kim, M.J. Song and H. Suh, *Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking*. *Biomaterials*, 2002. **23**: p. 1205-1212.
96. Zhou, Z.Y., Z. Yang, L. Kong, L. Liu, Q. Liu, et al., *Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Hydrogel Blends with Gelatin*. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 2012. **51**(12): p. 2392-2400.
97. Manju, S. and K. Sreenivasan, *Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability*. *J Colloid Interface Sci*, 2011. **359**(1): p. 318-25.
98. Zhu, M. and S. Li, *Preparation, characterization and in vitro drug release studies of curcumin loaded crosslinked starch microspheres*. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2013. **11**(2): p. 258-262.
99. Pereira, A.G., A.R. Fajardo, S. Nocchi, C.V. Nakamura, A.F. Rubira, et al., *Starch-based microspheres for sustained-release of curcumin: preparation and cytotoxic effect on tumor cells*. *Carbohydr Polym*, 2013. **98**(1): p. 711-20.
100. Kim, U.J., J. Park, H.J. Kim, M. Wada and D.L. Kaplan, *Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin*. *Biomaterials*, 2005. **26**(15): p. 2775-85.
101. Cleland, R.L. and J.L. Wang, *Ionic Polysaccharides. III. Dilute Solution Properties of Hyaluronic Acid Fractions*. *Biopolymers*, 1970. **9**: p. 799-810.

102. G., B., *Determination of Hexosamines According to Elson and Morgan*. Acta Chemica Scandinavica, 1948. **2**: p. 467-473.
103. Takahashi, T., M. Ikegami-Kawai, R. Okuda and K. Suzuki, *A fluorimetric Morgan–Elson assay method for hyaluronidase activity*. Analytical Biochemistry, 2003. **322**(2): p. 257-263.
104. Gil, E.S., S.H. Park, X. Hu, P. Cebe and D.L. Kaplan, *Impact of sterilization on the enzymatic degradation and mechanical properties of silk biomaterials*. Macromol Biosci, 2014. **14**(2): p. 257-69.
105. Shahani, K. and J. Panyam, *Highly loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention*. J Pharm Sci, 2011. **100**(7): p. 2599-609.
106. Lenormand, H., B. Deschrevel, F. Tranchepain and J.C. Vincent, *Electrostatic interactions between hyaluronan and proteins at pH 4: how do they modulate hyaluronidase activity*. Biopolymers, 2008. **89**(12): p. 1088-103.
107. Lenormand, H., B. Deschrevel and J.C. Vincent, *pH effects on the hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase in the presence of proteins: Part I. Dual aspect of the pH-dependence*. Matrix Biol, 2010. **29**(4): p. 330-7.
108. Lenormand, H., F. Tranchepain, B. Deschrevel and J.C. Vincent, *The hyaluronan-protein complexes at low ionic strength: how the hyaluronidase activity is controlled by the bovine serum albumin*. Matrix Biol, 2009. **28**(6): p. 365-72.
109. Lenormand, H. and J.-C. Vincent, *pH effects on the hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase in the presence of proteins: Part II. The electrostatic hyaluronan – Protein complexes*. Carbohydrate Polymers, 2011. **85**(2): p. 303-311.
110. Doublier, J.L., C. Garnier, D. Renarda and C. Sanchez, *Protein-polysaccharide interactions*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2000. **5**: p. 202-214.

111. Yun, Y.H., D.J. Goetz, P. Yellen and W. Chen, *Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting*. *Biomaterials*, 2004. **25**(1): p. 147-57.
112. Esposito, E., E. Menegatti and R. Cortesi, *Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study*. *Int J Pharm*, 2005. **288**(1): p. 35-49.
113. Li, M., M. Ogisob and N. Minourab, *Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets*. *Biomaterials*, 2003. **24**.
114. Wongnarat, C. and P. Srihanam, *Degradation Behaviors of Thai Bombyx mori Silk Fibroins Exposure to Protease Enzymes*. *Engineering*, 2013. **05**(01): p. 61-66.
115. Jo, Y.-Y., H.Y. Kweon, Y. Koh, H.D. Kang, J.-H. Yeo, et al., *Characteristics and Degradability of Silk Scaffold Fabricated by Press Method*. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2011. **8**(1): p. 42-46.
116. Kasoju, N. and U. Bora, *Fabrication and characterization of curcumin-releasing silk fibroin scaffold*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012. **100**(7): p. 1854-66.
117. Lian, Y., J.-C. Zhan, K.-H. Zhang and X.-M. Mo, *Fabrication and characterization of curcumin-loaded silk fibroin/P(LLA-CL) nanofibrous scaffold*. *Frontiers of Materials Science*, 2014. **8**(4): p. 354-362.
118. Ritger, P.L. and N.A. Peppas, *A SIMPLE EQUATION FOR DESCRIPTION OF SOLUTE RELEASE II. FICKIAN AND ANOMALOUS RELEASE FROM SWELLABLE DEVICES*. *Journal of Controlled Release*, 1987. **5**: p. 37-42.
119. Siepmann, J. and N.A. Peppas, *Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. **48**: p. 139-157.

120. Tomihita, K. and Y. Ikada, *Crosslinking of hyaluronic acid with glutaraldehyde*.
Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 1997. **35**: p. 3553–
3559.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกด้วยทั้งก่อนและหลังการย่อยสลายด้วยพลังงานเสียงความถี่สูง (Sonication) โดยอาศัยเทคนิคการไหลของสารผ่านหลอดคาปิลลารี

น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกสามารถวิเคราะห์ได้โดยแสดงในรูปของน้ำหนักโมเลกุลจากค่าความหนืดเฉลี่ย (Viscosity average molecular weight, \overline{M}_v) โดยการใช้เครื่อง Ubbelodhe viscometer (No.II 50120) ที่มีค่าคงที่ของคาปิลลารี (Capillary constant) เท่ากับ 0.1 โดยวัดความหนืดของกรดไฮยาลูรอนิกในตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นใช้แบบจำลองของ Huggins หรือแบบจำลองของ Kramer สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Reduced viscosity หรือ Inherent viscosity เทียบกับความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิก และสามารถคำนวณ Intrinsic viscosity เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกได้ดังสมการ

$$\text{สมการ Huggins ; } \frac{\eta_{sp}}{C} = k'[\eta]^2 C + [\eta] \quad (\text{ก.1})$$

$$\text{สมการ Kramer ; } \frac{\ln \eta_{rel}}{C} = k''[\eta]^2 C + [\eta] \quad (\text{ก.2})$$

โดยคำนวณค่าความหนืดชนิดต่าง ๆ ได้ดังนี้

$$\eta_{rel} = t_{\text{Sample}} \times t_{\text{NaCl}} \quad (\text{ก.3})$$

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (\text{ก.4})$$

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / [\text{HA}] \quad (\text{ก.5})$$

$$\eta_{inh} = \ln(\eta_{rel}) / [\text{HA}] \quad (\text{ก.6})$$

$$\text{สมการ Mark-Houwink ; } [\eta] = K \overline{M}_v^a \quad (\text{ก.7})$$

โดยที่

η_{rel} คือ Relative viscosity

η_{sp} คือ Specific viscosity

η_{red} คือ Reduced viscosity

η_{inh} คือ Inherent viscosity

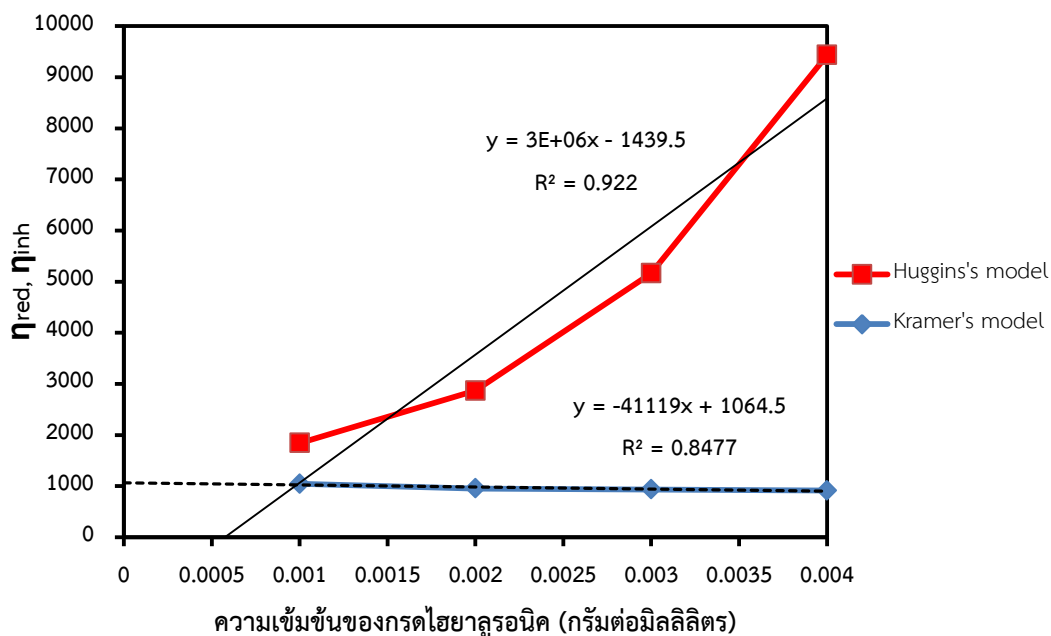
$[\eta]$ คือ Intrinsic viscosity

[HA] คือ ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิก

K, a คือ Mark-Houwink coefficients ขึ้นกับตัวทำละลาย ซึ่งในการวิเคราะห์นี้อ้างอิงจากรายงานของ Cleland R. L. และคณะ (1970) ใช้ตัวทำละลาย คือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ซึ่งมีค่า K เท่ากับ 0.0228 มิลลิลิตรต่อกรัม และค่า a เท่ากับ 0.816

\bar{M}_v คือ Viscosity average molecular weight

1. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกก่อนการย่อยสลายด้วยพลังงานเสียงความถี่สูง (Sonication) แสดงได้ดังรูปที่ ก.1



รูปที่ ก. 1 กราฟแสดงความหนืดตามแบบจำลองของ Huggins และแบบจำลองของ Kramer

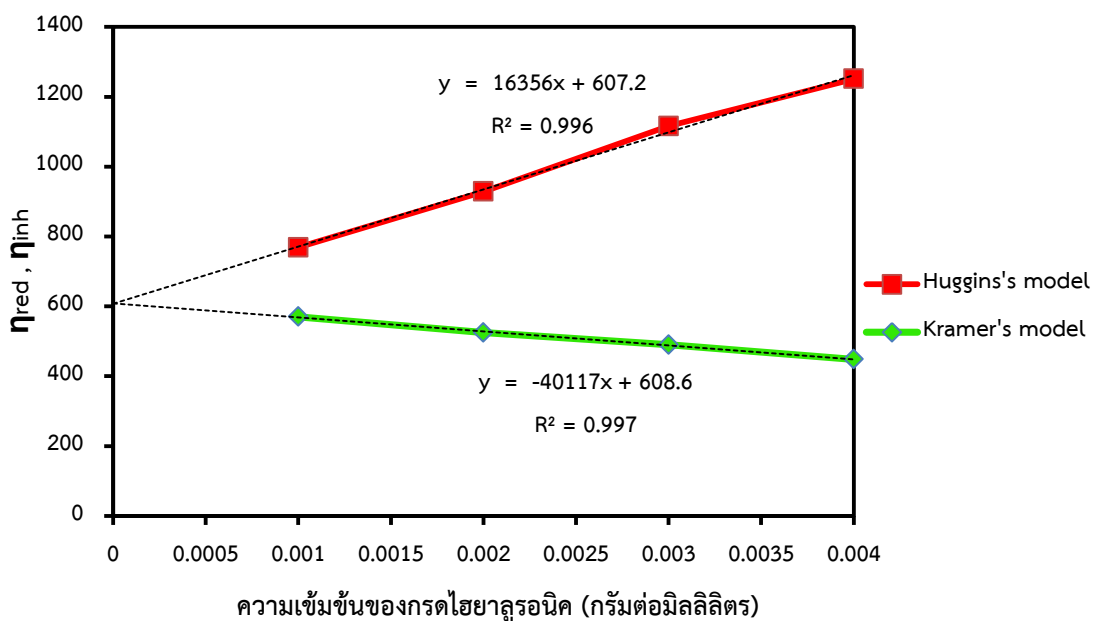
สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลตามแบบจำลองของ Huggins ได้ดังนี้ ;

$$[\eta] = K \bar{M}_v^a \tag{ก.7}$$

$$1439.5 = 0.0228 \times \bar{M}_v^{0.816} \tag{ก.8}$$

$$\bar{M}_v = 762,970 \tag{ก.9}$$

2. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกภายหลังการย่อยสลายด้วยพลังงานเสียงความถี่สูง (Sonication) แสดงได้ดังรูปที่ ก.2



รูปที่ ก. 2 กราฟแสดงความหนืดตามแบบจำลองของ Huggins และแบบจำลองของ Kramer

สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลตามแบบจำลองของ Kramer ได้ดังนี้ ;

$$[\eta] = K \bar{M}_v^a \quad (ก.7)$$

$$608.7 = 0.0228 \times \bar{M}_v^{0.816} \quad (ก.10)$$

$$\bar{M}_v = 265,770 \quad (ก.11)$$

ดังนั้น การย่อยสลายกรดไฮยาลูรอนิกด้วยพลังงานเสียงความถี่สูง (Sonication) โดยใช้พลังงานเสียง (Amplitude) 40 เพอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที สามารถลดน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกได้ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกก่อนการย่อยสลายด้วยพลังงานเสียงความถี่สูงมีค่าประมาณ 763,000 กรัมต่อโมล และน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกภายหลังการย่อยสลายด้วยพลังงานเสียงความถี่สูงมีค่าประมาณ 266,000 กรัมต่อโมล

ภาคผนวก ข
ค่าศักย์เซต้ำของสารละลาย

ตารางที่ ข. 1 ค่าศักย์เซต้ำของสารละลายไฟโบรินไหมไทย ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร สารละลายกรดไฮยาลูรอนิก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ สารละลายผสมของไฟโบรินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิก ความเข้มข้นของของแข็งรวม 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ ดังนี้

ตัวอย่าง สารละลาย	ค่าศักย์เซต้ำ (มิลลิโวลต์)				
	pH = 2	pH = 3	pH = 4.5	pH = 6	pH = 7
SF100	+1.53 ± 0.37	+4.18 ± 0.25	+1.90 ± 0.30	-7.76 ± 0.42	-11.23 ± 0.33
SF30HA70	-1.59 ± 0.25	-19.45 ± 1.16	-42.95 ± 2.25	-56.50 ± 1.80	-48.18 ± 3.53
SF50HA50	+0.14 ± 0.30	-26.05 ± 2.62	-50.60 ± 2.59	-56.10 ± 1.95	-61.15 ± 1.20
SF70HA30	+1.14 ± 0.21	-13.68 ± 0.27	-39.55 ± 2.46	-45.10 ± 3.35	-41.18 ± 2.84
HA100	-2.99 ± 0.27	-11.18 ± 1.10	-28.53 ± 2.00	-56.00 ± 4.10	-49.28 ± 3.11

ภาคผนวก ค

การศึกษาการเชื่อมขวางทางเคมีของฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิคถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ได้ค่อนข้างยากเมื่อเปรียบเทียบกับกรเชื่อมขวางไฟโบรอินไหมไทย โมเลกุลบางส่วนของกรดไฮยาลูรอนิคที่เกิดการเชื่อมขวางไม่สมบูรณ์จะละลายน้ำหายไป ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาสภาวะการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพื่อให้เกิดการเชื่อมขวางได้สมบูรณ์ที่สุด โดยทำการศึกษาในรูปแบบของฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิค

วิธีการเชื่อมขวางฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิค [ดัดแปลงจาก Tomihata K. และคณะ (1997) [120]]

1. ชั่งน้ำหนักฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิค ขนาด $1 \times 1 \times 0.1$ ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. เตรียมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ในตัวทำละลายผสมของอะซิโตนและน้ำในอัตราส่วนการผสม 4:1 และทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง ได้แก่ 0.15, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เท่ากับ 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เพื่อให้หมู่แอลดีไฮด์ให้เกิดการเชื่อมขวางได้ดียิ่งขึ้น
3. แช่ฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิคในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ล้างฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิคด้วยสารละลายไกลซีน ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เพื่อกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยา เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นตากแห้งฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิค และชั่งน้ำหนักฟิล์มภายหลังการเชื่อมขวางสามารถคำนวณร้อยละของน้ำหนักแห้งที่หายไปของฟิล์มได้ดังสมการ

$$\text{ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไป} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (\text{ค.1})$$

โดยที่

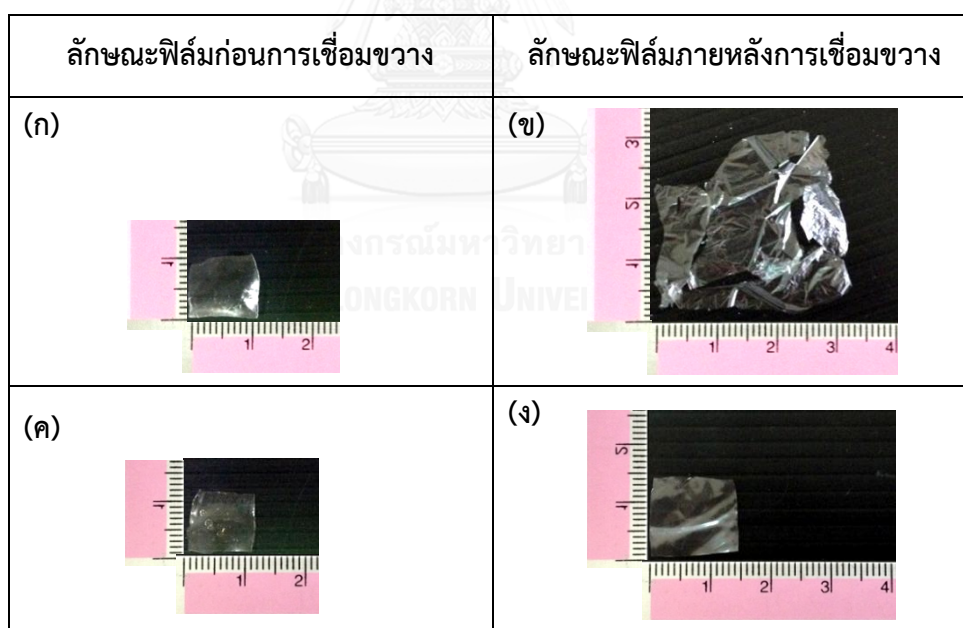
W_i คือ น้ำหนักฟิล์มก่อนการเชื่อมขวาง

W_f คือ น้ำหนักฟิล์มหลังการเชื่อมขวาง

ผลการศึกษาการเชื่อมขวางฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ดังแสดงในตารางที่ ค.1 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิคมีค่าน้อยที่สุด เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น หมู่แอลดีไฮด์ในโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์มีมากขึ้น สามารถเกิดอันตรกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิคมากขึ้น การเชื่อมขวางจึงเกิดได้สมบูรณ์มากขึ้น ลักษณะฟิล์มก่อนและหลังการเชื่อมขวางจึงมีลักษณะไม่แตกต่างกันมากนักดังแสดงในรูปที่ ค.1 แต่เมื่อความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปมีค่าเพิ่มขึ้น อีกทั้งฟิล์มที่ได้ภายหลังการเชื่อมขวางมีลักษณะต่างจากฟิล์มก่อนการเชื่อมขวาง คือ ขนาดของฟิล์มหลังการเชื่อมขวางมีขนาดหน้าตัดกว้างขึ้น เกิดการแผ่ขยายของฟิล์มเนื่องจากการละลายน้ำ แสดงให้เห็นว่า ในระบบมีกลูตารัลดีไฮด์ไม่เพียงพอในการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิคให้เกิดขึ้นสมบูรณ์ โมเลกุลบางส่วนจึงไม่ถูกเชื่อมขวาง ทำให้ฟิล์มบางส่วนละลายน้ำหายไป แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ในช่วง 0.15-2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิคภายหลังการเชื่อมขวางละลายน้ำหายไปทั้งหมด แสดงให้เห็นว่ากลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่ำไม่สามารถเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิคได้สำเร็จ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกสภาวะการเชื่อมขวางโดยใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 เป็นสภาวะในการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิค

ตารางที่ ค. 1 ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิกภายหลังการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

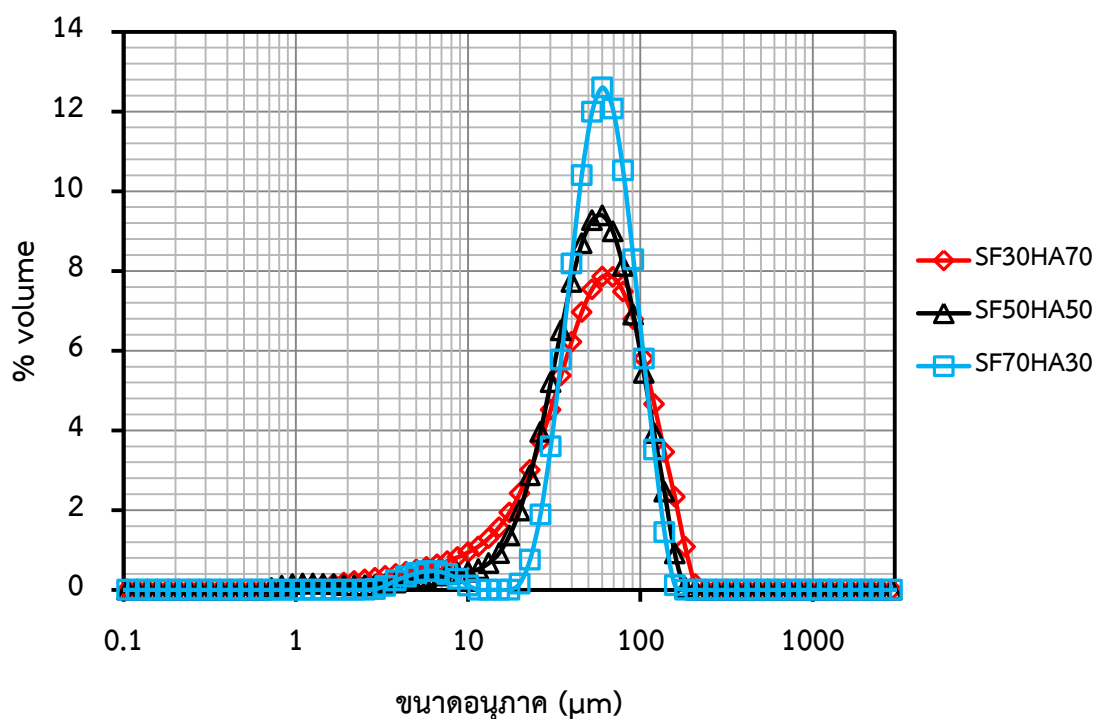
ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	น้ำหนักฟิล์มก่อนการเชื่อมขวาง (มิลลิกรัม)	น้ำหนักฟิล์มหลังการเชื่อมขวาง (มิลลิกรัม)	ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของฟิล์มกรดไฮยาลูรอนิก
0.15	4.1	ฟิล์มละลายน้ำทั้งหมด	-
1.0	4.0	ฟิล์มละลายน้ำทั้งหมด	-
1.5	3.7	ฟิล์มละลายน้ำทั้งหมด	-
2.0	3.5	ฟิล์มละลายน้ำทั้งหมด	-
2.5	3.4	2.9	14.7
3.0	3.8	3.6	5.3



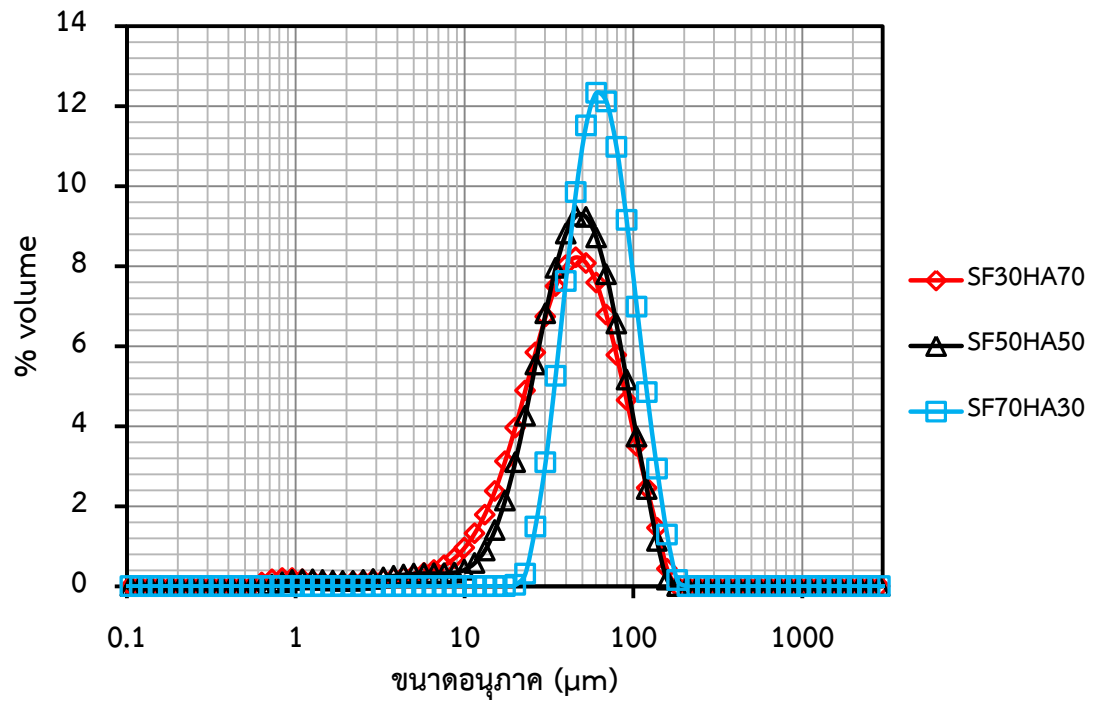
รูปที่ ค. 1 ลักษณะฟิล์มของกรดไฮยาลูรอนิกก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (ก และ ข) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ (ค และ ง) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ภาคผนวก ง

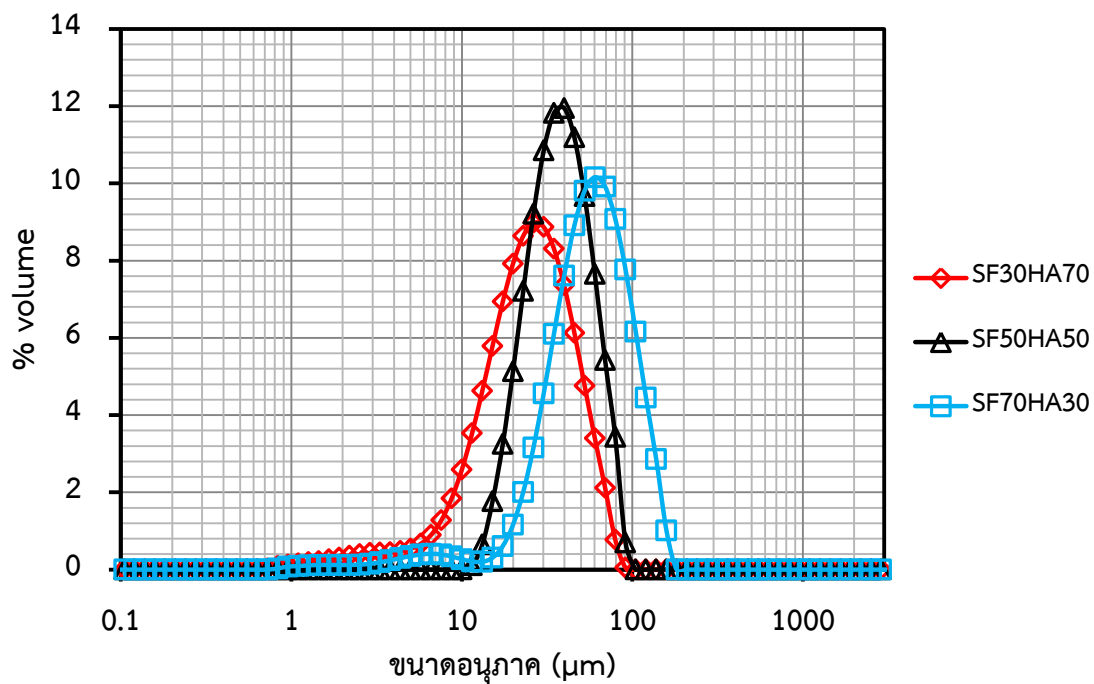
กราฟแสดงขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอิน
ใหม่ไทยและกรดไฮยาลูรอนิกที่ผลิตได้ วิเคราะห์โดยเครื่องวัดขนาดและการกระจายตัวของ
อนุภาค (Master sizer)



รูปที่ ง. 1 กราฟขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



รูปที่ ง. 2 กราฟขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

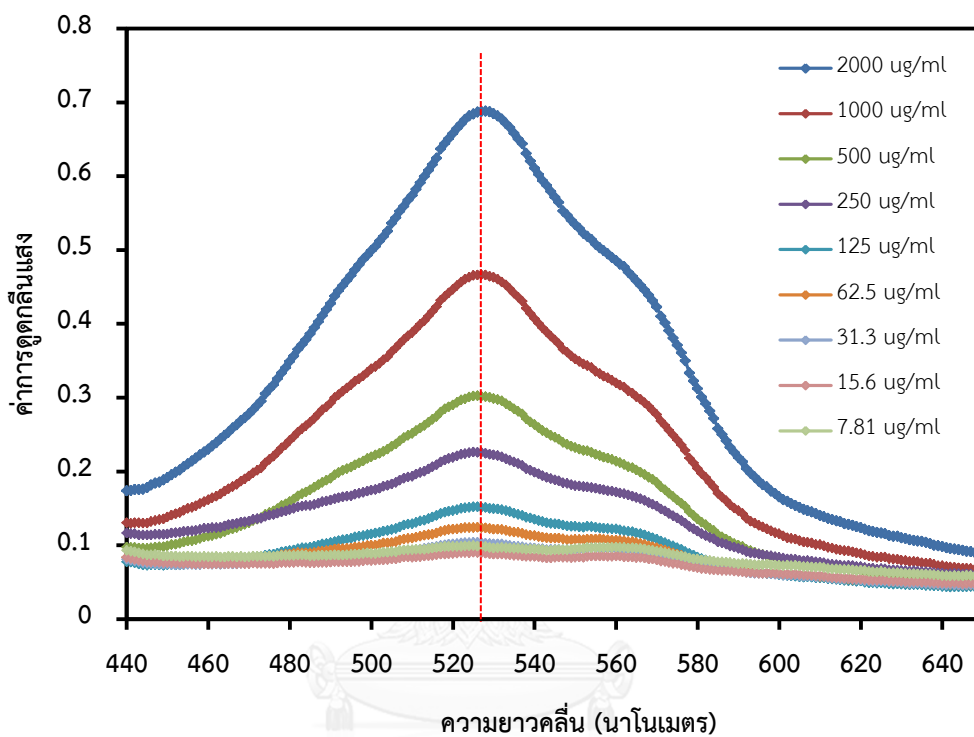


รูปที่ ง. 3 กราฟขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

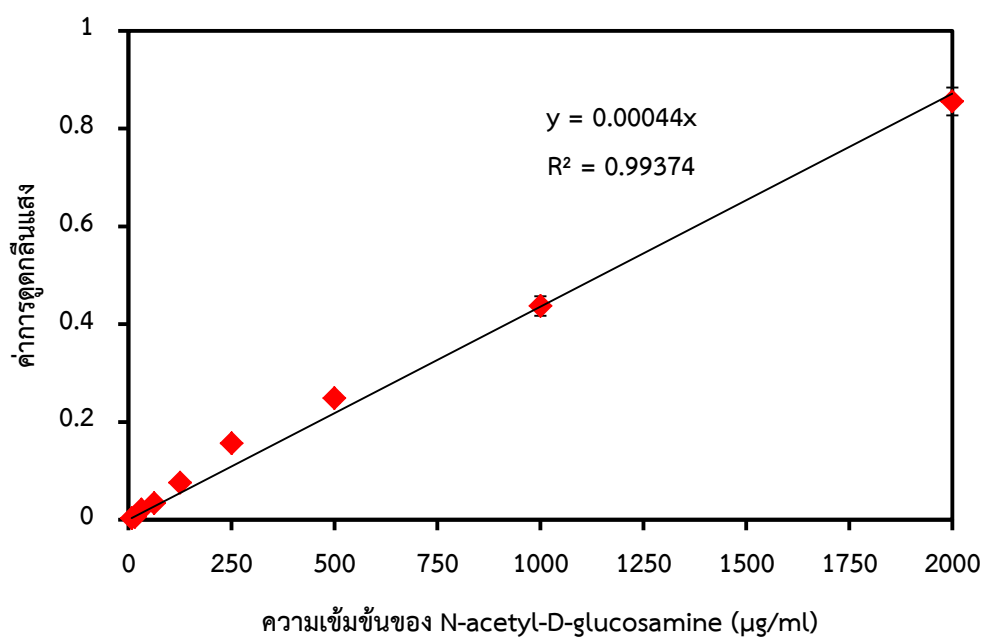
ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine

ที่ใช้ในการวัดปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่คงเหลือในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้



รูปที่ จ. 1 กราฟสแกนหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดของสารละลาย N-acetyl-D-glucosamine



รูปที่ จ. 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetyl-D-glucosamine ที่ความยาวคลื่น 528 นาโนเมตร



ภาคผนวก ฉ

การทดสอบความเสถียรของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

ตารางที่ ฉ. 1 น้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลาต่าง ๆ ภายหลังจากการแช่น้ำปราศจากไอออน ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตัวอย่าง	เวลาในการเชื่อมขวาง (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ภายหลังจากแช่น้ำที่ระยะเวลาต่าง ๆ (มิลลิกรัม)			
		2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	144 ชั่วโมง
SF30HA70	4	^{a,c} 0.2 ± 0.1	^{a,c} 0.4 ± 0.1	^{a,c} 0.7 ± 0.3	^{a,c} 1.0 ± 0.1
	6	^{a,c} 0.2 ± 0.1	^{a,c} 0.4 ± 0.1	^{a,c} 0.7 ± 0.1	^{a,c} 0.8 ± 0.1
	24	^{a,c} 0.2 ± 0.1	^{a,c} 0.2 ± 0.1	^{a,c} 0.6 ± 0.3	^{a,c} 0.7 ± 0.1
SF50HA50	4	^{a,c} 0.1 ± 0.1	^{a,c} 0.4 ± 0.1	^{a,c} 0.6 ± 0.1	^{a,c,d} 0.8 ± 0.1
	6	^{a,c} 0.1 ± 0.1	^{a,c} 0.3 ± 0.2	^{a,c,d} 0.6 ± 0.2	^{a,b,c,d} 0.6 ± 0.1
	24	^{a,c} 0.1 ± 0.1	^{a,c} 0.1 ± 0.1	^{a,c} 0.4 ± 0.2	^{b,c,d} 0.5 ± 0.1
SF70HA30	4	^{a,c} 0.1 ± 0.1	^{a,c} 0.3 ± 0.1	^{a,c} 0.4 ± 0.1	^{a,d} 0.5 ± 0.1
	6	^{a,c} 0.1 ± 0.1	^{a,c} 0.2 ± 0.1	^{a,d} 0.3 ± 0.1	^{a,d} 0.4 ± 0.1
	24	^{a,c} 0.1 ± 0.1	^{a,c} 0.2 ± 0.1	^{a,c} 0.3 ± 0.2	^{a,d} 0.3 ± 0.1

(a,b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาข้อมูล น้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลม โดยเปรียบเทียบอนุภาคทรงกลมมีอัตราส่วนการผสมโดย น้ำหนักและระยะเวลาการแช่น้ำเหมือนกันที่เวลาในการเชื่อมขวางแตกต่างกัน)

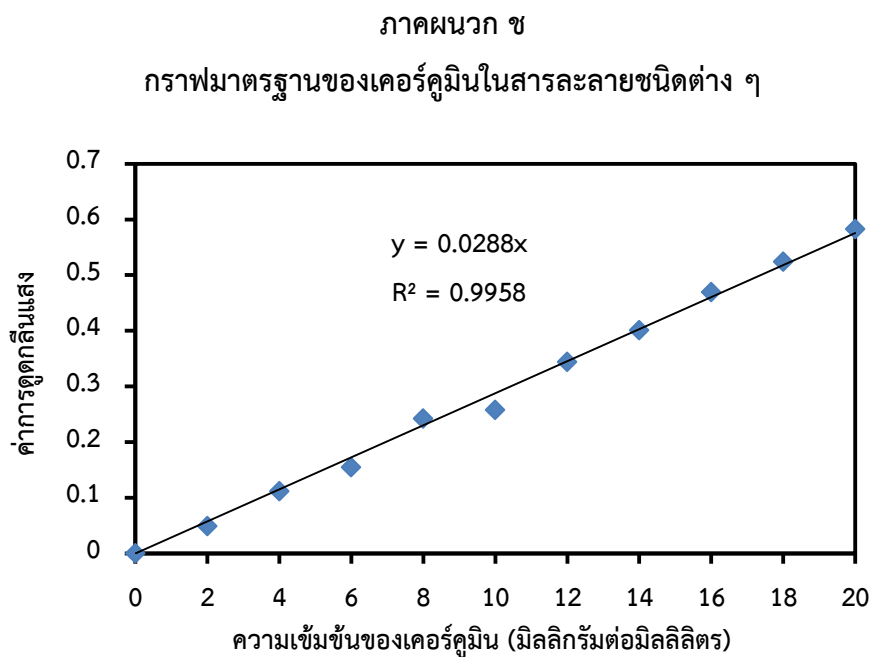
(c,d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาข้อมูล น้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลม โดยเปรียบเทียบเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคและ ระยะเวลาการแช่น้ำเท่ากันที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกัน)

ตารางที่ ๑. 2 ปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำภายหลังการแช่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิกในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่ผ่านการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นเวลาต่าง ๆ ในน้ำปราศจากไอออน ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในแต่ละช่วงเวลา

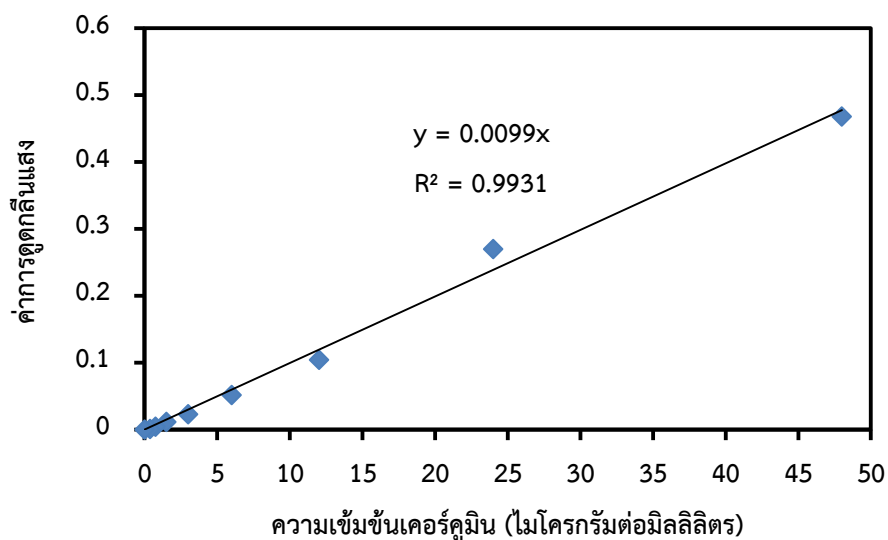
ตัวอย่าง	เวลาในการเชื่อมขวาง (ชั่วโมง)	ปริมาณของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในน้ำ ภายหลังการแช่น้ำที่ระยะเวลาต่าง ๆ (มิลลิกรัม)			
		2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	144 ชั่วโมง
SF30HA70	4	0	0.6 ± 0.1 ^{a,b}	0.8 ± 0.1 ^{a,b}	1.0 ± 0.1 ^{a,b}
	6	0	0.3 ± 0.1 ^{a,b}	0.5 ± 0.1 ^{a,b}	0.7 ± 0.1 ^{a,b}
	24	0	0.4 ± 0.2 ^{a,b}	0.5 ± 0.1 ^{a,b}	0.7 ± 0.1 ^{a,b}
SF50HA50	4	0	0.3 ± 0.1 ^{a,b}	0.5 ± 0.1 ^{a,b,c}	0.6 ± 0.1 ^{a,b,c}
	6	0	0.3 ± 0.3 ^{a,b}	0.4 ± 0.1 ^{a,b}	0.5 ± 0.1 ^{a,b}
	24	0	0.2 ± 0.2 ^{a,b}	0.3 ± 0.2 ^{a,b}	0.4 ± 0.2 ^{a,b}
SF70HA30	4	0	0.3 ± 0.1 ^{a,b}	0.3 ± 0.2 ^{a,c}	0.3 ± 0.2 ^{a,c}
	6	0	0.2 ± 0.1 ^{a,b}	0.3 ± 0.1 ^{a,b}	0.3 ± 0.2 ^{a,b}
	24	0	0.2 ± 0.1 ^{a,b}	0.2 ± 0.1 ^{a,b}	0.2 ± 0.1 ^{a,b}

(a แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาข้อมูลน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลม โดยเปรียบเทียบอนุภาคทรงกลมมีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักและระยะเวลาการแช่น้ำเหมือนกันที่เวลาในการเชื่อมขวางแตกต่างกัน)

(b,c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาข้อมูลน้ำหนักแห้งที่หายไปของอนุภาคทรงกลม โดยเปรียบเทียบเวลาในการเชื่อมขวางอนุภาคและระยะเวลาการแช่น้ำเท่ากันที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักแตกต่างกัน)



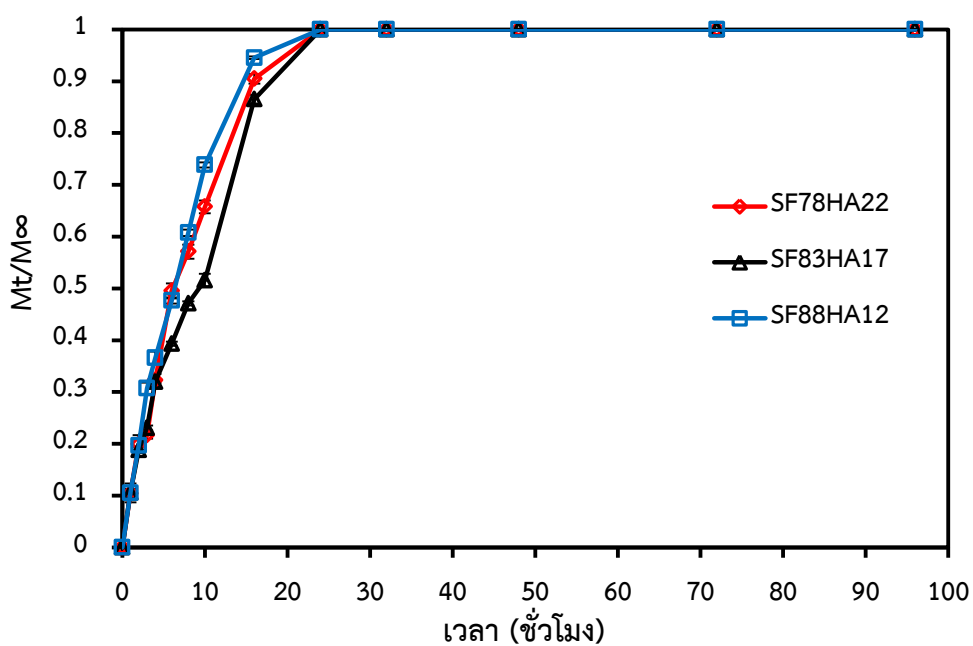
รูปที่ ข. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยเอทานอล ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ก่อนการละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)



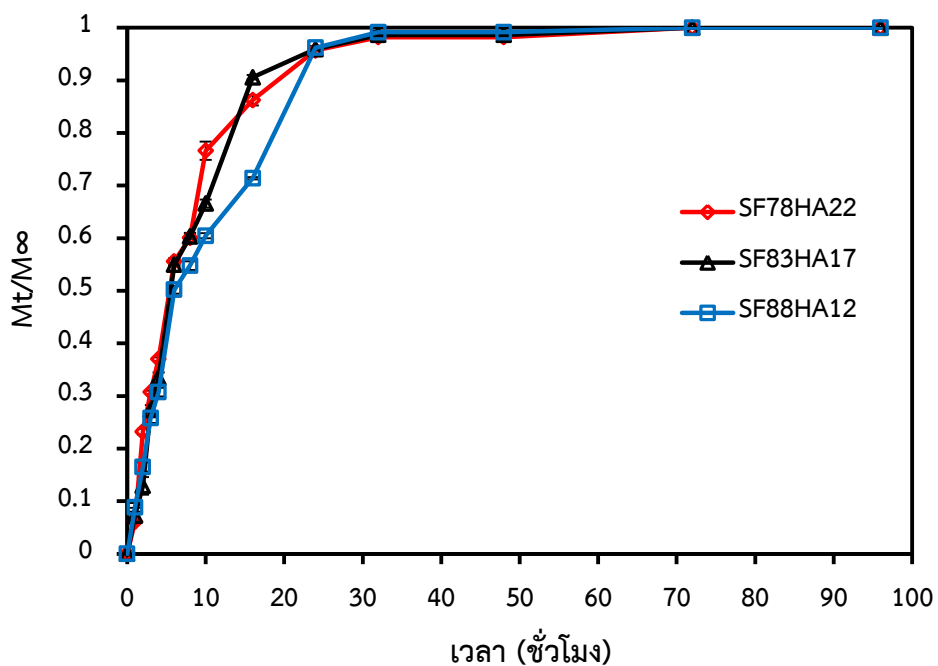
รูปที่ ข. 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยเอทานอล ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ก่อนการละลายในสารละลายผสมของบัฟเฟอร์ฟอสเฟตและ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ภาคผนวก ช

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์เทียบกับเวลา ของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินไหมไทยและกรดไฮยาลูรอนิค



รูปที่ ช. 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t (M_t) หารด้วยปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_∞) เทียบกับเวลาในการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ ซ. 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t (M_t) หารด้วย ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลานันต์ (M_∞) เทียบกับเวลาในการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ของอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็น องค์ประกอบ

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณปริมาณกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิก

- การคำนวณหาจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่มีอยู่ในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก
 - น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก ($C_{14}H_{21}NO_{11}$) $_n$ 1 หน่วยย่อย มีค่าเท่ากับ 380 g/mol
 - น้ำหนักโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์ 1 หน่วยย่อย มีค่าเท่ากับ 101.5 g/mol
 - น้ำหนักโมเลกุลที่วัดได้จากค่าความหนืดเฉลี่ย (\overline{M}_v) เท่ากับ 762,970 g/mol

ดังนั้น สายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกทั้งหมดจะมีจำนวนหน่วยย่อย เท่ากับ

$$\frac{762,970}{380} = 2,008 \text{ หน่วยย่อย}$$

เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของกรดไฮยาลูรอนิกใน 1 หน่วยย่อยจะพบตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลจำนวน 4 ตำแหน่ง

ดังนั้น ในสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกทั้งหมดจะมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล เท่ากับ

$$2,008 \times 4 = 8,031 \text{ ตำแหน่ง}$$

- การคำนวณปริมาณของกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้

การเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกด้วยกลูตารัลดีไฮด์จะเกิดขึ้นเมื่อ หมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ในโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ในโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิก และเมื่อพิจารณาลักษณะการเชื่อมขวางดังแสดงในรูปที่ ฉ. 1 จะพบว่า หมู่ไฮดรอกซิลในกรดไฮยาลูรอนิก 2 ตำแหน่ง สามารถเกิดปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ได้ 1 โมเลกุล ซึ่งในสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกทั้งหมดมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล 8,031 ตำแหน่ง ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้กลูตารัลดีไฮด์ทั้งหมด เท่ากับ

$$\frac{8031}{2} \times 1 = 4,016 \text{ โมเลกุล}$$

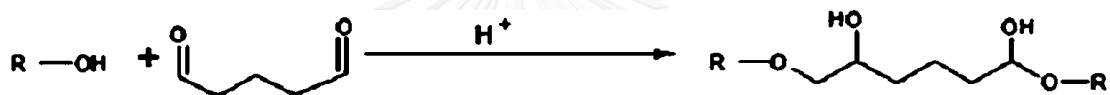
ปริมาณกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวางกรดไฮยาลูรอนิกทั้งสายโซ่โมเลกุลจะมีค่าเท่ากับ

$$4,016 \times 101.5 = 407,624 \text{ กรัม}$$

เมื่อคำนวณอัตราส่วนโดยน้ำหนักของกรดไฮยาลูรอนิกต่อกลูตารัลดีไฮด์ (HA : GA) จะมีค่าเท่ากับ

$$\begin{aligned}
 &= \frac{762,970}{407,624} : \frac{407,624}{407,624} \\
 &= 1.87 : 1 \\
 &\sim 2 : 1
 \end{aligned}$$

หมายเหตุ น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการคำนวณ คือ น้ำหนักโมเลกุลจากค่าความหนืดเฉลี่ย \bar{M}_v ส่งผลให้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของ HA:GA มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การคำนวณอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คิดได้จาก M_w



รูปที่ ๑. ปฏิกริยาการเชื่อมขวางโมเลกุลกรดไฮยาลูรอนิกด้วยกลูตารัลดีไฮด์

ภาคผนวก ญ

การคำนวณปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่จริงในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Elson-Morgan assay ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบเทียบกับปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการเตรียมเริ่มต้น ตัวอย่างเช่น อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิก (SF30HA70) สามารถคำนวณหาปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่มีอยู่จริงในอนุภาคทรงกลมได้โดย

อัตราส่วนผสม SF30HA70 จะมีกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้เริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีกรดไฮยาลูรอนิกอยู่ 16.95 มิลลิกรัม แต่ปริมาณกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบได้จริงในอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ มีเพียง 4.28 มิลลิกรัม เมื่อกำหนดร้อยละของกรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบเมื่อคิดเทียบกับกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้เริ่มต้นจะมีค่าเท่ากับ

$$\frac{4.28}{16.95} \times 100 = 25.25 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

แสดงให้เห็นว่า อนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้มีกรดไฮยาลูรอนิกคงเหลืออยู่ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ จาก 70 ส่วนที่ใช้เริ่มต้น (SF30HA70) ส่งผลให้อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อกรดไฮยาลูรอนิกเริ่มต้นมีการเปลี่ยนแปลง สามารถคำนวณหาอัตราส่วนการผสมที่แท้จริงได้โดย

กรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้เริ่มต้น 16.95 มิลลิกรัม. คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์

กรดไฮยาลูรอนิกที่ตรวจพบในอนุภาค 4.28 มิลลิกรัม. จะคิดเป็น 17.68 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น ส่วนที่เหลือจะกลายเป็นสัดส่วนของไหมไฟโบรอิน คิดเป็น $100 - 17.98 = 82.32$ เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักที่แท้จริงจะกลายเป็น SF82HA18

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยะรัตน์ สังขพันธ์ เกิดเมื่อวันที่ 31 มกราคม พ.ศ. 2533 ภูมิลำเนาจังหวัดสุพรรณบุรี เข้าศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนสงวนหญิง จังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555

ผลงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Sungkhaphan P., Kanokpanont S., Damrongsakkul S., Development of Thai Silk Fibroin /Hyaluronic Acid Microspheres by Water-In-Oil Emulsion Method, Oral Presentation, Pure and Applied Chemistry International Conference 2014 (PACCON2014), The Centara Hotel and Convention Centre, Khon Kaen, Thailand, 8-10 January 2014.