

การพัฒนาไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมจากพอลิเมอร์ เพื่อการนำส่งวัคซีนโดยการรับประทาน

Development of Polymeric Microparticles for the Delivery of Oral Vaccine

ชาวลิต มณฑล¹, ศราวุธ เพิ่มพูนคุณารักษ์¹, อรุณช ธนเขตไพศาล¹, อุรชา รัชต์दानนท์ชัย², วันดี รังสิวิจิตรประภา¹

Chaowalit Monton¹, Sarawut Phermphoonkunarak¹, Oranuch Thanaketsaisarn¹, Uracha Ruktanonchai², Wandee Rungseewijitprapa¹

¹กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

²ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

Received: 30 October 2007 Accepted: 28 December 2007

Abstract

The object of this study was to develop microparticles from poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) using solvent evaporation method for oral vaccine delivery. The PLGA microparticles were coated with chitosan that varying molecular weight (50000, 100000, 200000), concentration (0.25%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2% w/w), Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 1.0% w/w and mixture of chitosan and CTAB in the ratio of 1:1. The obtained microparticles had average size in the range of 1.517 to 5.077 micrometers. Microscopic images from scanning electron microscope showed spherical shape with smooth surface. The microparticles had positive surface charge (10.4-66.4 mV) and could adsorb Ovalbumin (OVA) about 32.3-75.0% w/w. The 1% w/w CTAB-coated microparticles showed the highest OVA-loading. In conclusion, the developed microparticles by coating with these cationic agents showed the optimum size which was smaller than 10 micrometers and the positive surface charge, resulting in the higher protein adsorption. These microparticles possibly act as the appropriate protein delivery system targeting to peyer's patches of small intestine for oral vaccine.

Keywords: Microparticles, Drug delivery system, Oral vaccine, Ovalbumin, Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid)

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมจากพอลิเมอร์กลุ่มโพลีเอสเทอร์ชนิด Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) โดยวิธีระเหยตัวทำละลาย จากนั้นเคลือบด้วยโคโตนมวลโมเลกุล 50000, 100000 และ 200000 ความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2 โดยน้ำหนัก และ Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก และส่วนผสมของโคโตนและ CTAB ในอัตราส่วน 1:1 จากผลการทดลอง พบว่าไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ มีขนาดอยู่ในช่วง 1.517-5.077 ไมโครเมตร เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีรูปร่างเป็นทรงกลมและผิวเรียบ มีค่าประจุที่ผิวเป็นบวก (10.4-66.4 มิลลิโวลต์) และสามารถดูดซับ Ovalbumin (OVA) ได้ร้อยละ 32.3-75.0 ซึ่งไมโครพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก สามารถดูดซับ Ovalbumin ได้สูงสุด จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า ไมโครพาร์ติเคิลที่พัฒนาจากการใช้สารเคลือบผิวชนิดประจุบวก มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 10 ไมโครเมตร และให้ประจุผิวของอนุภาคเป็นบวก ทำให้สามารถดูดซับแอนติเจนได้ดี อาจถูกนำมาใช้เป็นระบบนำส่งโปรตีนเข้าสู่ peyer's patches ของผนังลำไส้เล็กเพื่อใช้เป็นวัคซีนในรูปแบบรับประทานได้

คำสำคัญ: ไมโครพาร์ติเคิล ระบบนำส่งยา วัคซีนรูปแบบรับประทาน โอลิบูมิน Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid)

บทนำ

จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพ ทำให้ชีววัตถุจำนวนมากได้ถูกพัฒนาขึ้น โดยในปี 2549 หน่วยงาน Pharmaceutical Research and Manufacturers Association ได้รายงานไว้ว่า ชีววัตถุที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพ จำนวนกว่า 418 ชนิด กำลังอยู่ในขั้นตอนของการทดลองทางคลินิก หรือรอการอนุมัติจากองค์การอาหารและยา (Almeida and Souto, 2007)

สารชีววัตถุที่ผลิตขึ้นนี้ ส่วนมากเป็นสารโมเลกุลใหญ่ เช่น เปปไทด์, โปรตีน โดยสามารถใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบเฉพาะที่ และทั่วร่างกายซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของอนุภาคหรือสารนั้นๆ (Challacombe et al., 1992) เมื่อให้สารเหล่านี้โดยการรับประทาน มักมีชีวประสิทธิผลต่ำเนื่องจากถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหาร และถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้ได้น้อย จึงทำให้การบริหารสารโมเลกุลใหญ่เข้าสู่ร่างกาย จำกัต้องอยู่กับการฉีดแต่อย่างไรก็ตาม การนำส่งสารโมเลกุลใหญ่โดยการรับประทาน มีข้อดีเหนือกว่าการฉีดหลายประการ

(De Magistris, 2006) คือ เป็นการเพิ่มความร่วมมือของผู้ป่วยในการบริหารยาและหลีกเลี่ยงปัญหาการติดเชื้อผ่านทางเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนาที่เกิดจากการใช้เข็มฉีดยา (Levine, 2003) นอกจากนี้ยังบริหารง่ายและไม่ต้องใช้บุคลากรทางการแพทย์ ลดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาและสามารถให้ได้หลายครั้ง ส่วนข้อดีอื่นๆ ได้แก่ การให้สารโมเลกุลใหญ่ในรูปแบบรับประทานเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ล้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยกว่ารูปแบบการให้ทางหลอดเลือดดำ ซึ่งต้องการความบริสุทธิ์และความปราศจากเชื้ออย่างสูง

ปัจจุบันนี้ นักวิจัยจำนวนมากได้พยายามพัฒนาระบบนำส่งเปปไทด์และโปรตีนโดยการรับประทานแต่ก็มีคำถามในเรื่องของการดูดซึมของสารโปรตีนที่ไม่ต้องการ หรือเป็นการรบกวนการดูดซึมของโปรตีนหรือสารอาหารที่มีประโยชน์ ในบรรดาวิธีการต่างๆ วิธีที่น่าสนใจที่สุดคือการใช้ตัวพาที่มี ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 10 ไมโครเมตร ในการนำส่ง (Borges et al., 2005)

ตัวพาที่ใช้ในการนำส่งสารเปปไทด์และโปรตีนชนิดที่มีผู้ศึกษามากที่สุดคือ การใช้พอลิเมอร์ในกลุ่มโพลีเอสเทอร์ โดยในระยะแรกของการพัฒนานั้น ยังคงเน้นที่การบริหารยาโดยการฉีด ซึ่งโพลีเอสเทอร์จัดเป็นพอลิเมอร์กลุ่มแรกที่ทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยายอมรับให้ใช้ในคนได้ เนื่องจากเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อและสลายตัวได้ภายในร่างกาย (Italia et al., 2007) นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารได้ (Byrd et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตาม การนำอนุภาคที่เตรียมจากโพลีเอสเทอร์มาบริหารยาโดยการรับประทาน ยังมีข้อเสียคือ สามารถดูดซับยาหรือเปปไทด์ได้น้อย จึงนำมาสู่การเคลือบผิวอนุภาคด้วยไคโตแซน (Chitosan) เพื่อให้สามารถดูดซับเปปไทด์ได้มากขึ้น นอกจากนี้ไคโตแซนยังมีคุณสมบัติเป็นสารเกาะติดกับเยื่อเมือกที่ผิวได้ (mucoadhesive) (De Magistris, 2006) ทำให้เพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของยา และมีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านเมมเบรนของสารโมเลกุลใหญ่ได้ และประการสำคัญคือ การที่สามารถปกป้องยาจากการทำลายของกรดในทางเดินอาหารได้ไคโตแซนเป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติเตรียมได้โดยการทำปฏิกิริยา deacetylation ของสารโคตินซึ่งพบมากในเปลือกกุ้ง หอย กระดองปูที่เป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล (De Magistris, 2006) ไคโตแซนมีคุณสมบัติเหมาะสมหลายประการในการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมทั้งในแง่ความปลอดภัย ความเป็นพิษต่ำ ความเข้ากันได้กับสารในร่างกายมนุษย์ สามารถสลายตัวได้ง่ายตามธรรมชาติ (Cui, 2006) ไคโตแซนเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก (Illum et al., 2001) ทำให้สามารถจับกับประจุลบของเนื้อเยื่อในร่างกาย จึงทำให้ไคโตแซนได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นตัวพาและสารชีวภาพ

ในงานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาไมโครพาร์ติเคิลจากโพลีเอสเทอร์ให้มีประจุที่ผิวเป็นบวก โดยใช้สารเคลือบผิว 2 ชนิดคือไคโตแซนและ CTAB เพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดซับโปรตีนต้นแบบ Ovalbumin โดยศึกษาจากลักษณะทางเคมีและกายภาพ สำหรับนำมาใช้ในรูปแบบวัคซีนชนิดรับประทาน

เครื่องมือและอุปกรณ์

Ultra turrax T18 basic (IKA labortechnik, สหรัฐอเมริกา), Zetasizer Nano ZS (Malvern, อังกฤษ), Refrigerated centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R, สหรัฐอเมริกา), Dry keeper (Sanplatech D-Box 2, ญี่ปุ่น), Scanning electron microscope (SEM) (Hitachi S-3400N, สหรัฐอเมริกา), Viscometer (Brookfield DV-II+, สหรัฐอเมริกา), Eliza plate reader (MRX Revelation, อังกฤษ)

วัสดุและสารเคมี

Poly (lactic-co-glycolic acid); PLGA (มวลโมเลกุล 33400) (Resomer RG 503H, Boehringer Ingelheim, เยอรมนี), Chitosan มวลโมเลกุล 50000, 100000 และ 200000 (Seafresh, ไทย), Poly (vinyl alcohol) (PVA) (Aldrich, Gillingham, สหราชอาณาจักร), Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Fluka, เดนมาร์ก), Ovalbumin (OVA; grade V) (Sigma chemical, เยอรมนี)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมไมโครพาร์ติเคิลเปล่า

เตรียมโดยใช้วิธีระเหยตัวทำละลาย (Solvent evaporation method) ที่มีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย โดยละลาย PLGA ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ด้วย ethyl acetate ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ หยดลงใน PVA ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร พร้อมกับปั่นด้วยเครื่อง Ultraturrax T18 โดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เดิมส่วนผสมที่ได้ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วย magnetic stirrer นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อระเหย ethyl acetate ออกไป นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ได้เป็นไมโครพาร์ติเคิลเปียก เพื่อนำไปเคลือบผิวต่อไป

2. การเคลือบผิวไมโครพาร์ติเคิล

นำไมโครพาร์ติเคิลเปียกมากระจายตัวใหม่ในสารเคลือบผิวประจุบวก (Chitosan, CTAB หรือ Chitosan + CTAB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วย magnetic stirrer นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อดูดซับสารเคลือบผิวประจุบวกที่ผิวของไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ โดยศึกษาที่มวลโมเลกุลของ chitosan (MW 50000, 100000, 200000), ความเข้มข้นของ chitosan (ร้อยละ 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 โดยน้ำหนัก) และชนิดของสารเคลือบผิวประจุบวก (Chitosan ร้อยละ 1, CTAB ร้อยละ 0.5 + Chitosan ร้อยละ 0.5 หรือ CTAB ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก) สำหรับสูตรที่ใช้ chitosan เป็นสารเคลือบผิวจะต้องนำไป dialysis นาน 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัด acetic acid ออกไป แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เพื่อเก็บตะกอนของไมโครพาร์ติเคิล แล้วนำไปตากให้แห้งใน desiccator

3. การดูดซับ OVA บนไมโครพาร์ติเคิล

นำไมโครพาร์ติเคิลที่ได้ มาปั่นผสมด้วย magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง โดยให้มีอัตราส่วนของไมโครพาร์ติเคิลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และ OVA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนัก ในน้ำกลั่น นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง เพื่อเก็บตะกอนของไมโครพาร์ติเคิลที่ดูดซับ OVA แล้ว โดยเก็บส่วนของสารละลายไว้ได้ เพื่อวิเคราะห์หา OVA ที่ไม่ได้กักเก็บในไมโครพาร์ติเคิล โดยการวิเคราะห์หาโปรตีนด้วย Lowry method (Lowry et al., 1951)

4. ประเมินไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้

4.1 การวัดขนาดและประจุไฟฟ้าที่ผิวของไมโครพาร์ติเคิล

ปิเปตสารตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม ultrapure water ปริมาตร 5 มิลลิลิตร วัดโดยใช้เครื่อง Zetasizer[®] ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้เป็น volume diameter และค่า zeta potential โดยแต่ละตัวอย่างวัด 3 ครั้ง ค่าที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของไมโครพาร์ติเคิลแห้ง

นำไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ไปเคลือบด้วยทอง แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ที่กำลังขยาย 5000, 10000, 50000 และ 100000 เท่า เพื่อศึกษาผิวและการกระจายขนาดของไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้

4.3 ศึกษาความสามารถในการกักเก็บสาร (Percentage loading)

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในชั้นน้ำ โดยใช้ Lowry method โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน และวิเคราะห์หาปริมาณ OVA จากกราฟมาตรฐานที่ได้ (ค่าที่ได้ คือปริมาณโปรตีนในชั้นน้ำ) แล้วนำมาคำนวณดังสูตร

$$\% \text{ Loading} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่ใช้ทั้งหมด} - \text{ปริมาณโปรตีนในชั้นน้ำ}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่ใช้ทั้งหมด}}$$

ผลการทดลอง

1. ศึกษาปัจจัยด้านมวลโมเลกุลของ Chitosan ต่อขนาด ประจุที่ผิวอนุภาคและความสามารถในการกักเก็บสารของไมโครพาร์ติเคิล

ในการทดลองนี้ได้พัฒนาไมโครพาร์ติเคิลเปล่าจากพอลิเมอร์ Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) โดยวิธีระเหยตัวทำละลาย ไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 3.8 ไมโครเมตร และมีประจุที่ผิวอนุภาคเท่ากับ -24.8 มิลลิโวลต์ จากนั้นเมื่อนำไปเคลือบด้วย chitosan และดูดซับ OVA พบว่าการใช้ chitosan MW 50,000 ทำให้ได้ไมโครพาร์ติเคิลมีขนาดเล็กที่สุด การใช้ chitosan MW 200,000 (ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 5.077 ไมโครเมตร) ทำให้ได้ไมโครพาร์ติเคิลมีขนาดใหญ่กว่าการใช้ chitosan MW 50,000 (ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 2.457 ไมโครเมตร) การใช้ chitosan ทั้งสองขนาดมวลโมเลกุล ยังคงให้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมโครเมตรตามที่ต้องการ เมื่อพิจารณา zeta potential พบว่าการเคลือบอนุภาคด้วย

chitosan มวลโมเลกุลต่างๆ ทำให้ไมโครพาร์ติเคิลเปลี่ยนจากประจุลบมาเป็นประจุบวก และหลังจากการดูดซับ OVA พบว่าไมโครพาร์ติเคิลมีประจุลบ แสดงให้เห็นว่า OVA ถูกดูดซับที่ผิวของอนุภาค โดยมีค่า zeta potential อยู่ในช่วง -9.0 ถึง -25.3 มิลลิโวลต์ และการเคลือบไมโครพาร์ติเคิลด้วย chitosan MW 50,000

ทำให้ไมโครพาร์ติเคิลมีความสามารถในการกักเก็บสารสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 44.8 ในขณะที่ไมโครพาร์ติเคิลที่ถูกเคลือบด้วย chitosan MW 200000 มีความสามารถในการกักเก็บสารร้อยละ 32.6 ดังผลการทดลองตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาค ประจุไฟฟ้าที่ผิวและความสามารถในการกักเก็บสาร (Percentage loading) ของไมโครพาร์ติเคิล ก่อนและหลังการเคลือบด้วย Chitosan (ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนัก) มวลโมเลกุลต่างๆ (n=3)

มวลโมเลกุลของ Chitosan	Size (นาโนเมตร) หลังดูดซับ OVA	Zeta potential (มิลลิโวลต์)		% Loading
		ก่อนดูดซับ OVA	หลังดูดซับ OVA	
50,000	2457 ± 64	+30.1 ± 0.6	-9.0 ± 0.5	44.8 ± 1.8
100,000	N/Aa	+45.3 ± 2.1	-22.5 ± 0.6	32.3 ± 11.2
200,000	5077 ± 327	+21.9 ± 1.6	-25.3 ± 2.2	32.6 ± 2.3

^aไม่สามารถวัดได้เนื่องจากขนาดอนุภาคเฉลี่ยมากกว่า 6000 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขีดความสามารถของเครื่องมือ (Malvern Instrument LTD, 2003)

2. ศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้น ของ chitosan ต่อขนาด ประจุที่ผิวอนุภาคและความสามารถในการกักเก็บสารของไมโครพาร์ติเคิล

จากการศึกษาผลของมวลโมเลกุลของ chitosan ที่ใช้เคลือบไมโครพาร์ติเคิล ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าการเคลือบไมโครพาร์ติเคิลด้วย chitosan MW 50,000 ทำให้ได้ไมโครพาร์ติเคิลมีขนาดเล็กที่สุด จึงเลือก chitosan MW 50,000 มาศึกษาผลของความเข้มข้นของ chitosan ต่อขนาด ประจุที่ผิวอนุภาคและความสามารถในการกักเก็บสาร

พบว่า ไมโครพาร์ติเคิลหลังจากดูดซับ OVA ที่ได้จากการเคลือบด้วย chitosan ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.25-2.0 โดยน้ำหนัก มีขนาดอยู่ในช่วง 2133-2923 นาโนเมตร มีค่า zeta potential อยู่ในช่วง -9.0 ถึง -23.0 มิลลิโวลต์ และมีความสามารถในการกักเก็บสารใกล้เคียงกัน ในช่วงร้อยละ 42.5-44.9 จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่า ความเข้มข้นของ chitosan ไม่มีผลทำให้ขนาดอนุภาคและความสามารถในการกักเก็บสารแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อใช้สถิติ one-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาค ประจุไฟฟ้าที่ผิวและความสามารถในการกักเก็บสาร (Percentage loading) ของไมโครพาร์ติเคิล ก่อนและหลังการเคลือบด้วย Chitosan (MW 50,000) ความเข้มข้นต่างๆ

มวลโมเลกุลของ Chitosan (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	Size (นาโนเมตร) หลังดูดซับ OVA	Zeta potential (มิลลิโวลต์)		% Loading
		ก่อนดูดซับ OVA	หลังดูดซับ OVA	
0.25	2457 $\pm$ 64	+30.1 $\pm$ 0.6	-9.0 $\pm$ 0.5	44.8 $\pm$ 1.8
0.5	2133 $\pm$ 319	+29.6 $\pm$ 2.6	-23.0 $\pm$ 0.8	44.9 $\pm$ 1.0
1.0	2923 $\pm$ 110	+66.4 $\pm$ 1.8	-10.8 $\pm$ 1.0	42.9 $\pm$ 3.1
1.5	2807 $\pm$ 45	+54.6 $\pm$ 2.3	-16.3 $\pm$ 0.6	42.5 $\pm$ 4.6
2.0	2500 $\pm$ 34	+40.8 $\pm$ 1.3	-7.6 $\pm$ 0.4	43.3 $\pm$ 1.8

3. ศึกษาปัจจัยด้านชนิดของสารเคลือบผิวประจุบวกต่อ ขนาด ประจุที่ผิวอนุภาคและความสามารถในการกักเก็บสารของไมโครพาร์ติเคิล

การเคลือบไมโครพาร์ติเคิลด้วยสารเคลือบผิวชนิดบวก CTAB มีการเปลี่ยนแปลงค่า zeta potential เป็นแนวทางเดียวกับการเคลือบด้วยสารเคลือบผิวประจุบวก chitosan คือไมโครพาร์ติเคิลเปลี่ยนจากประจุลบมาเป็นประจุบวก และเมื่อมีการดูดซับ OVA พบว่าไมโครพาร์ติเคิลกลับมามีประจุลบ จากการศึกษาชนิด

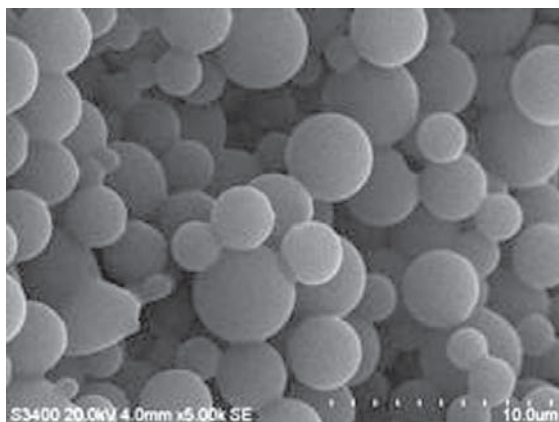
ของสารเคลือบผิวไมโครพาร์ติเคิลประจุบวกทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่ามีค่า zeta potential อยู่ใน ช่วง -10.8 ถึง -25.0 มิลลิโวลต์ นอกจากนี้พบว่าขนาดของไมโครพาร์ติเคิลหลังจากดูดซับ OVA ที่ได้จากการเคลือบด้วย CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ทำให้ไมโครพาร์ติเคิลที่ได้มีขนาดเล็กที่สุดคือ 1517 นาโนเมตร และมีความสามารถในการกักเก็บสารสูงที่สุด (ร้อยละ 75.0)

ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาค ประจุไฟฟ้าที่ผิวและความสามารถในการกักเก็บสาร (Percentage loading) ของไมโครพาร์ติเคิล เมื่อเคลือบด้วยสารเคลือบผิวประจุบวกชนิดต่างๆ

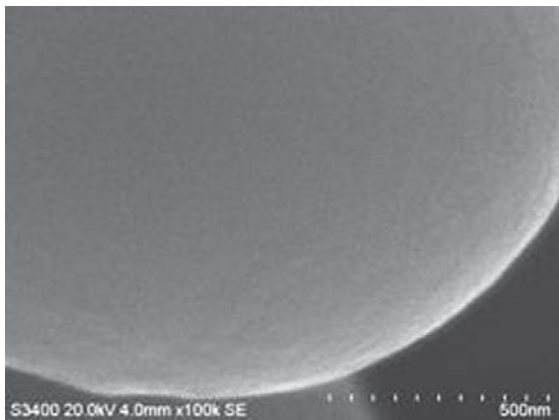
ชนิดของสารเคลือบผิว	Size (นาโนเมตร) หลังดูดซับ OVA	Zeta potential (มิลลิโวลต์)		% Loading
		ก่อนดูดซับ OVA	หลังดูดซับ OVA	
Chitosan 1.0%	2923 $\pm$ 110	+66.4 $\pm$ 1.8	-10.8 $\pm$ 1.0	42.9 $\pm$ 3.1
Chitosan 0.5% + CTAB 0.5%	2247 $\pm$ 208	+26.9 $\pm$ 0.5	-20.7 $\pm$ 0.4	43.1 $\pm$ 3.4
CTAB 1.0%	1517 $\pm$ 344	+10.4 $\pm$ 0.3	-25.0 $\pm$ 1.3	75.0 $\pm$ 1.2

4. ลักษณะพื้นผิวของ polymeric micro-particles จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

ลักษณะของ polymeric microparticles ที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิวประจุบวก เมื่อดูด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าอนุภาค ไมโครพาร์ติเคิลมีลักษณะค่อนข้างกลม พื้นผิวเรียบ สม่ำเสมอ ดังแสดงในรูปที่ 1



(a)



(b)

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของไมโครพาร์ติเคิลที่ผ่านการเคลือบด้วยสารเคลือบผิวประจุบวกจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย (a) 5,000 เท่า (b) 100,000 เท่า

วิจารณ์และสรุปผล

1. ศึกษาปัจจัยด้านมวลโมเลกุลของ chitosan ต่อ ขนาด ประจุที่ผิวอนุภาคและความสามารถในการกักเก็บสารของไมโครพาร์ติเคิล

จากการเปลี่ยนแปลงของค่า zeta potential ของไมโครพาร์ติเคิลจากเดิมซึ่งมีประจุลบมาเป็นประจุบวกหลังจากการเติมสารละลาย chitosan แสดงให้เห็นว่า chitosan สามารถถูกดูดซับที่ผิวอนุภาคของไมโครพาร์ติเคิลได้ และเป็นไปได้ว่าเกิดจากการดึงดูดกันของประจุตรงกันข้าม หลังจากการดูดซับ OVA พบว่าประจุของอนุภาคเปลี่ยนเป็นลบ เกิดจากการที่ OVA มีค่า Isoelectric point (pI) 4.5 เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกลางจึงแสดงประจุลบ zeta potential ที่วัดได้จึงมีประจุลบ

ไมโครพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย chitosan MW 50,000 และ 200,000 มีขนาดที่เล็กกว่า 10 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่สามารถผ่าน M-cell เข้าสู่ Peyer's patches และนำไปสู่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย (van der Lubben, 2001; Borges et al., 2005) อย่างไรก็ตามเนื่องจาก chitosan MW 200,000 มีความหนืด มากกว่า chitosan MW 50,000 จึงเกิดความไม่เข้ากันของไมโครพาร์ติเคิลกับสารละลาย chitosan และทำให้ไมโครพาร์ติเคิลแทรกตัวไปในสารละลาย chitosan ได้ยาก การเคลือบจึงเกิดได้ไม่ดี ซึ่งอาจมีไมโครพาร์ติเคิลบางส่วนที่ไม่ได้ถูกเคลือบ อีกทั้งไมโครพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย chitosan MW 50,000 มีขนาดเล็กทำให้มีพื้นที่ผิวมาก ทำให้เกิดการดูดซับ OVA ได้มาก ดังนั้นจึงทำให้ความสามารถในการกักเก็บสารของไมโครพาร์ติเคิลที่เกิดจากการเคลือบด้วย chitosan MW 50,000 มากกว่า ไมโครพาร์ติเคิลที่เกิดจากการเคลือบด้วย chitosan MW 200,000 นอกจากนี้การที่ขนาดของไมโครพาร์ติเคิลก่อนดูดซับ OVA มีขนาดใหญ่กว่าหลังดูดซับ OVA อาจเนื่องมาจาก chitosan มีประจุเป็นบวก และ OVA (pI = 4.5) แสดงประจุลบในสารละลายที่เป็นกลาง เกิดการดึงดูดหรือจับกันจากประจุที่ตรงข้ามกันทำให้เกิดการหดตัวของไมโครพาร์ติเคิล ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการจับกันของพลาสมิติดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบกับไลโปโซมหรือสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกแล้วทำให้โมเลกุลของพลาสมิติดีเอ็นเอหดตัว

(compaction or condensation) มีขนาดอนุภาคเล็กลง (Zuzzi et al., 2007)

จากที่กล่าวข้างต้น chitosan MW 50000 เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในการเคลือบไมโครพาร์ติเคิล มากกว่า chitosan MW 100000 และ chitosan MW 200000 เนื่องจากให้ขนาดอนุภาคที่เล็กและมีความสามารถในการกักเก็บสารสูง นอกจากนี้ มีรายงานสนับสนุนว่าขนาดอนุภาคเล็ก จะเพิ่มความสามารถที่จะถูกดูดซึมผ่าน M-cell ได้ดีขึ้น (Jung et al., 2000)

2. ศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของ chitosan ต่อขนาด ประจุที่ผิวอนุภาคและความสามารถในการกักเก็บสารของไมโครพาร์ติเคิล

การเคลือบไมโครพาร์ติเคิลด้วย chitosan ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้ขนาดของไมโครพาร์ติเคิลหลังจากดูดซับ OVA มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า chitosan ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษาไม่ได้มีผลต่อขนาดของไมโครพาร์ติเคิล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก chitosan ที่ความเข้มข้นต่างๆ สามารถเกาะที่ผิวของไมโครพาร์ติเคิลได้พอๆ กัน ส่งผลให้ขนาดที่ได้ไม่แตกต่างกัน นั่นคือขนาดไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้อยู่ในช่วง 2133-2923 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่สามารถและมีประสิทธิภาพที่จะผ่าน M-cell เข้าสู่ Peyer's patches ได้

เมื่อพิจารณาค่า zeta potential พบว่าไมโครพาร์ติเคิลที่ได้หลังเคลือบด้วย chitosan มีค่าเป็นบวก และเมื่อดูดซับ OVA พบว่าอนุภาคที่ได้มีประจุลบ ดังเหตุผลที่กล่าวข้างต้น และการใช้ chitosan ความเข้มข้นต่างๆ ไม่ได้ทำให้ความสามารถในการกักเก็บสารเปลี่ยนแปลงมากนัก ทั้งนี้เนื่องมาจาก OVA ถูกดูดซับได้อย่างอึดื้อบนไมโครพาร์ติเคิล นั่นคือไมโครพาร์ติเคิลดูดซับ OVA ได้เต็มที่ที่ร้อยละ 42.5-44.9

3. ศึกษาปัจจัยด้านชนิดของสารเคลือบผิวประจุบวกต่อ ขนาด ประจุที่ผิวอนุภาคและความสามารถในการกักเก็บสารของไมโครพาร์ติเคิล

จากการศึกษาชนิดของสารเคลือบผิวประจุบวกที่ใช้เคลือบไมโครพาร์ติเคิล พบว่าขนาดอนุภาคของ

ไมโครพาร์ติเคิลที่ได้เป็นดังนี้ chitosan 1% > chitosan 0.5% + CTAB 0.5% > CTAB 1.0% โดยน้ำหนัก เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย ขนาดของไมโครพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย chitosan ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก มีขนาดใหญ่ที่สุด เกิดจากการที่ chitosan เป็นสารพอลิเมอร์ที่มีการพองตัว มีขนาดโมเลกุลใหญ่และมีความสามารถในการดูดซับบนผิวอนุภาคได้ดี ดังนั้นไมโครพาร์ติเคิลที่ถูกดูดซับด้วย chitosan จึงมีขนาดของไมโครพาร์ติเคิล ใหญ่กว่าไมโครพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก มีขนาดโมเลกุลและความหนืดน้อยกว่า ไมโครพาร์ติเคิลที่เคลือบด้วย CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักนี้ มีขนาดเล็กที่สุด ส่งผลทำให้มีพื้นที่ผิวที่สามารถกักเก็บสารได้มากขึ้น

เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวประจุบวกได้แก่ CTAB เป็นสารเคลือบผิวไมโครพาร์ติเคิลพบว่าการเปลี่ยนแปลงค่า zeta potential เป็นบวกเช่นเดียวกันกับการใช้สารพอลิเมอร์ประจุบวกได้แก่ chitosan โดยภายหลังจากการที่ไมโครพาร์ติเคิลดูดซับ OVA อนุภาคที่ได้จะกลับมามีประจุลบ ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น

เมื่อพิจารณาความสามารถในการกักเก็บสาร พบว่า CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก มีความสามารถในการกักเก็บสารสูงที่สุด ส่วนอนุภาคที่เคลือบด้วย chitosan ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ chitosan ร้อยละ 0.5 + CTAB ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก มีความสามารถในการกักเก็บสารใกล้เคียงกัน ซึ่งการที่ CTAB สามารถกักเก็บยาได้มาก เกิดจากการที่มีขนาดเล็กกว่า ทำให้มีพื้นที่ผิวในการดูดซับสารมาก ส่งผลให้ความสามารถในการกักเก็บสารสูงไปด้วย แม้ว่า CTAB จะมีความสามารถในการกักเก็บสารมากกว่า chitosan อย่างไรก็ตามการนำสารพอลิเมอร์ chitosan มาใช้เป็นสารเคลือบผิวอนุภาคในระบบนำส่งโปรตีนอาจส่งผลดีมากกว่าในแง่มีความเป็นพิษต่ำ และคุณสมบัติการยึดเกาะเยื่อเมือกของ chitosan (Mucoadhesive) ที่เพิ่มระยะเวลาการสัมผัสกับลำไส้ของไมโครพาร์ติเคิล ทำให้เพิ่มโอกาสที่จะนำส่งโปรตีนเข้าสู่เซลล์โดยเฉพาะ Peyer's patches ได้ดีขึ้น (Fuying et al., 2006)

จากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่าสารเคลือบผิวชนิดประจุบวกทั้งที่เป็นสารลดแรงตึงผิว CTAB หรือ สารพอลิเมอร์ chitosan สามารถเพิ่มความสามารถในการกักเก็บโปรตีนชนิด OVA ได้ และขนาดของอนุภาคไมโคร-พาร์ติเคิลที่ได้ น้อยกว่า 10 ไมโครเมตร ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นระบบนำส่งโปรตีนเข้าสู่

Peyer's patches ของผนังลำไส้เล็ก อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาความสามารถในการป้องกันการเสื่อมสลายด้วยกรดในทางเดินอาหาร ความสามารถในการปลดปล่อยตัวยา และความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการนำส่งแอนติเจนของระบบไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยปริญญานิพนธ์ โครงการสร้างปัญญาวิทย์ ผลิตนักเทคโนโลยี (Young Scientist and Technologist Programme: YSTP) ตลอดจนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการ “โครงการอุตสาหกรรมสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (IRPUS)” เลขที่โครงการ R50C02002

เอกสารอ้างอิง

- Almeida AJ, Souto E. 2007. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 478-490.
- Borges O, Borchard G, Verhoef JC, et al. 2005. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int J Pharm* 299: 155-166.
- Byrd W, Lorimier AD, Zheng ZR, et al. 2005. Microencapsulated subunit vaccine approach to enterotoxigenic *Escherichia coli* and other mucosal pathogens. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 1362-1380.
- Challacombe SJ, Rahman D, Jeffery H, et al. 1992. Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles containing antigen. *Immunology* 76: 164-168.
- Cui F, Qian F, Yin C. 2006. Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles. *Int J Pharm* 316: 154-161.
- de Magistris MT. 2006. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 52-67.
- Illum L, Jabbar-Gill I, Hinchcliffe M. 2001. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 51: 81-96.
- Italia JL, Bhatt DK, Bhardwaj V, et al. 2007. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: Nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral®. *J Control Release* 119: 197-206.
- Jung T, Kamm W, Breitenbach A, et al. 2000. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm* 50: 147-160.
- Levine MM. 2003. Can needle-free administration of vaccines become the norm in global immunization? *Nat Med* 9: 99-103.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Malvern Instrument Ltd. 2003. Zetasizer nano series user manual.
- Van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, et al. 2001. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 52: 139-144.
- Zuzzi S, Cametti C, Onori G, et al. 2007. Liposome-induced DNA compaction and reentrant condensation investigated by dielectric relaxation spectroscopy and dynamic light scattering techniques. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 76(1): 011925.