

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมอนุภาคไข่ขาวด้วยวิธีทำให้เกิดอิมัลชันโดยการแพร่ของตัวทำละลาย

Optimal conditions for the preparation of egg white particles by solvent emulsification-diffusion method

สุใจ ทานิสูด¹, ประสงค์ สีหานาม^{2*}

Suchai Tanisood¹, Prasong Srihanam^{2*}

Received: 24 May 2019 ; Revised: 26 August 2019 ; Accepted: 10 September 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมอนุภาคไข่ขาวด้วยวิธีการทำให้เกิดอิมัลชันโดยการแพร่ของตัวทำละลาย โดยปรับความเข้มข้นของสารละลายไข่ขาวเป็น 1, 2, 3, 4 และ 5 % (w/v) อัตราส่วนของวัฏภาคน้ำ (สารละลายไข่ขาว) : วัฏภาคน้ำมัน (เอทิลอะซิเตต) เท่ากับ 0.25:100 และอัตราเร็วในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที ผลจากการตรวจสอบสัณฐานวิทยา พบว่า อนุภาคไข่ขาวมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันตามความเข้มข้นของสารละลายไข่ขาว โดยที่ความเข้มข้น 3% (w/v) อนุภาคไข่ขาวมีรูปร่างค่อนข้างกลม อนุภาคกระจายตัวดี มีผิวหน้าเรียบ แต่เมื่อนำไปผสมยาบลูเด็กซ์แทรน อนุภาคที่เตรียมจากความเข้มข้น 5 % (w/v) มีรูปร่างกลมและเรียบที่สุด ผลของ FTIR สเปกตรัม แสดงให้เห็นว่าอนุภาคไข่ขาวมีโครงสร้างแบบเกลียวอัลฟาและเกลียวสุ่ม เมื่อผสมยาโครงสร้างของอนุภาคจะเปลี่ยนเป็นแบบแผ่นจีบเบต้ามากขึ้นซึ่งทำให้ทนต่อความร้อนได้สูงขึ้น เมื่อทดสอบรูปแบบการปลดปล่อยยา พบว่า มีลักษณะแตกต่างกันและทุกอนุภาคสามารถควบคุมการปลดปล่อยได้ ผลการทดลองที่ได้นี้ มีประโยชน์ต่อการพัฒนาอนุภาคไข่ขาวสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยาต่อไป

คำสำคัญ : ไข่ขาว สัณฐานวิทยา โครงสร้าง การปลดปล่อยยา อนุภาค

Abstract

The objective of this work is to optimize the preparation conditions of egg white particles by a solvent emulsification-diffusion method. The concentration of egg white was adjusted to 1, 2, 3, 4 and 5% (w/v), respectively, and the ratio of the water phase (egg white solution) to oil phase (ethyl acetate) was 0.25:100 mL and spinning rate was 600 rpm. Morphology observation indicated that both shape and size of the egg white particles varied according to concentrations used. At 3% (w/v) egg solution, the particles had an almost spherical shape, separated and smooth in surfaces, and these morphologies were also found at 5% (w/v) after blending with blue dextran. FTIR spectra indicated that the egg white particles co-existed as α -helix and random coil structures. Then, they changed to β -sheet when blended with drug resulting in high temperature resistance. Variable drug release profiles and drug-controlled release from all types of the egg white particles were observed. The obtained results could be used as basic information for development of the egg white particles for further drug-controlled release applications.

Key words : Egg white, Morphology, Structure, Drug release, Particle

¹นิสิตปริญญาโท สาขาเคมีศึกษา "รองศาสตราจารย์ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมเคมีและหน่วยวิจัยเคมีสร้างสรรค์และนวัตกรรม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150 ประเทศไทย

¹Master student (Chemistry), ^{2*} Assoc. Prof., the Center of Excellence in Chemistry and Creative and Innovation Chemistry Research Unit, Department of Chemistry Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.

*Corresponding author: Prasong Srihanam, Department of Chemistry and Creative and Innovation Chemistry Research Unit, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand

E-mail: psrihanam@gmail.com

บทนำ

สิ่งที่น่ากังวลใจตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา กำลังส่งผลกระทบต่อชีวิตของประชาชนและทวีความรุนแรงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกลายเป็นปัญหาของประเทศทั่วโลก คือ ปัญหาขยะ โดยเฉพาะขยะพลาสติก เนื่องจากพลาสติกส่วนใหญ่แตกสลายยากและใช้เวลานาน บางชนิดอาจยาวนานถึง 1000 ปี^{1,2} แนวทางหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจและน่าจะใช้สำหรับแก้ปัญหาขยะพลาสติก คือ การใช้พอลิเมอร์ที่แตกสลายทางชีวภาพได้ (biodegradable polymer)³ ซึ่งแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ประเภท ได้แก่ พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ⁴ เช่น แป้ง เซลลูโลส ไพโบรอินจากไหม อัลจิเนตและเคราติน⁵⁻⁷ เป็นต้น และ พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น พอลิยูรีเทน (polyurethane, PUR) พอลิไกลโคลิกแอซิด (polyglycolic acid, PGA), พอลิแล็กติกแอซิด (polylactic acid, PLA) และพอลิแล็กติกโคไกลโคลิกแอซิด (lactic-co-glycolic acid, PLGA) เป็นต้น⁸ พอลิเมอร์ธรรมชาติได้รับความสนใจในการศึกษาและการประยุกต์ใช้งาน เพราะมีความปลอดภัยสูงและยังมีสมบัติทางชีวภาพหลายประการที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ โดยเฉพาะทางการแพทย์และเภสัชกรรม^{9,12}

ไข่ขาว (egg white) เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ ใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง⁵ บรรจุภัณฑ์¹³ เป็นอิมัลชันและสารเพิ่มความเข้มข้น¹⁴ โมเลกุลไข่ขาวประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มีขนาดต่างกัน ได้แก่ โอวัลบูมิน (ovalbumin) โอโวลทรานสเฟอริน (ovotransferrin) โอโวลิวคอยด์ (ovomuroid) และไลโซไซม์ (lysozyme)¹⁵ โดยโอวัลบูมินมีปริมาณมากที่สุด รายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า โปรตีนในไข่ขาวมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น โอโวลทรานสเฟอริน และไลโซไซม์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนโอโวลิวคอยด์ ช่วยสมานแผลและต้านการอักเสบ¹⁶ มีฤทธิ์กระตุ้นการขยายตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ได้¹⁶⁻¹⁸ อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้ไข่ขาวเป็นวัสดุในงานด้านชีวการแพทย์ยังคงมีข้อจำกัดอยู่ เนื่องจากมีความเสถียรต่ำ มีรายงานการศึกษาที่ก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการเตรียมวัสดุชีวภาพจากไข่ขาวเพื่อให้มีความแข็งแรงสูงขึ้น โดยการผสมไข่ขาวกับพอลิเมอร์ หลายชนิด เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol, PVA), พอลิเอทิลีนออกไซด์ (polyethylene oxide, PEO) แป้งและเซลลูโลสอะซิเตต¹⁹⁻²¹ เป็นต้น

โปรตีนที่มีโครงสร้างแบบเส้นใยหลายชนิด เช่น ไหมไฟโบรอิน (silk fibroin) เคราติน (keratin) เจลาติน (gelatin) และคอลลาเจน (collagen) สามารถเตรียมให้อยู่ในรูปแบบที่หลากหลายได้ เช่น ฟิล์ม แผ่น ไฮโดรเจล ฟองน้ำ หรืออนุภาค²⁴⁻²⁶ แต่โปรตีนที่มีโครงสร้างแบบกลม (globular) เช่น เซรีซิน และ

ไข่ขาว ยังมีรายงานเกี่ยวกับการเตรียมเป็นรูปแบบดั่งที่เตรียมจากโปรตีนเส้นใยน้อยมาก สำหรับประเทศไทย ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับการเตรียมวัสดุที่ทำจากไข่ขาว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเตรียมในรูปแบบอนุภาค ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมอนุภาคไข่ขาวด้วยวิธีการทำให้เกิดอิมัลชันโดยการแพร่ของตัวทำละลาย (water-in-oil emulsification-diffusion) เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ประหยัดสารเคมีและไม่ต้องการอุปกรณ์และเครื่องมือขั้นสูง^{26,27} โดยการปรับเปลี่ยนปัจจัยที่มีผลต่อการก่ออนุภาค ได้แก่ ความเข้มข้นของไข่ขาว อัตราส่วนระหว่างสารละลายไข่ขาวและตัวทำละลาย (ethyl acetate) รวมทั้งอัตราเร็วในการปั่นกวน แล้วตรวจสอบและอภิปรายผลของปัจจัยเหล่านี้ต่ออนุภาคดังกล่าว

วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการเตรียมไข่ขาว คือ ไข่ไก่จากท้องตลาด โดยนำไข่ไก่มาแยกไข่ขาวออกจากไข่แดง จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้ผงไข่ขาว เพื่อใช้เตรียมสารละลายไข่ขาวความเข้มข้นเริ่มต้น 1, 2, 3, 4 และ 5 % (w/v) โดยการชั่งผงไข่ขาว 1, 2, 3, 4, และ 5 กรัม ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ทำการปั่นกวนจนผงไข่ขาวละลายอย่างสมบูรณ์

การเตรียมอนุภาค

ทำการเตรียมอนุภาคไข่ขาวด้วยวิธี water-in-oil emulsification-diffusion ตามวิธีที่เคยมีรายงานมาก่อน²⁷ มีขั้นตอนดังนี้ นำสารละลายไข่ขาวความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ ซึ่งเปรียบเสมือนวัฏภาคน้ำ ปริมาตรแตกต่างกัน คือ 1.0, 0.5 และ 0.25 มิลลิลิตร มาหยดลงในสารละลายเอทิลอะซิเตต ซึ่งเปรียบเสมือนวัฏภาคน้ำมัน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในบีกเกอร์ที่มีการปั่นกวนโดยใช้แท่งแม่เหล็กที่ความเร็ว 600 รอบ/นาที (เป็นอัตราเร็วที่ได้ทดลองมาก่อนหน้านี้ว่าเหมาะสมที่สุด) จากนั้นใช้อะลูมิเนียมฟอยล์ปิดปากบีกเกอร์เพื่อป้องกันการระเหยของเอทิลอะซิเตตระหว่างกระบวนการแพร่กระจาย ทำการปั่นกวนเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำสารละลายมาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้อนุภาคตกตะกอน แล้วแยกเอาตะกอนไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง

การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของอนุภาค

ลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ พื้นผิว พื้นที่ตัดขวางและการแยกตัวภาคของอนุภาค ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM; JEOL 6460LV, Japan) โดยนำอนุภาคมาติดบนที่วางก่อนนำไปเคลือบด้วยทองคำเพื่อเพิ่มพื้นที่เหนี่ยวนำอิเล็กตรอนก่อนที่จะนำไปส่องภายใต้กล้อง

การตรวจสอบโครงสร้างระดับทุติยภูมิ

นำอนุภาคทั้งหมดที่เตรียมได้ ไปตรวจสอบโครงสร้างระดับทุติยภูมิด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrophotometer และใช้วิธีการเตรียมด้วย KBr disk โดยใช้อากาศเป็นตัวอ้างอิง ในการกำหนดค่าการวัดใช้กำลังขยาย 4 cm^{-1} และ 32 scans

การตรวจสอบสมบัติเชิงความร้อน

นำอนุภาคที่เตรียมได้ มาชั่งน้ำหนักให้อยู่ในช่วง 0.3-0.5 มิลลิกรัม แล้วบรรจุในถ้วยแพลททินัม (platinum pan) จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50-1000 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 20 องศาเซลเซียสต่อนาทีภายใต้สภาวะของแก๊สไนโตรเจนด้วยอัตราการไหลของแก๊สที่ 100 มิลลิลิตรต่อนาที

การทดสอบรูปแบบการปลดปล่อยยาจากอนุภาค

ยาตัวอย่างที่นำมาบรรจุในอนุภาค คือ บลูเด็กซ์แทรน (blue dextran) ทำการทดสอบโดยนำอนุภาคที่ผสมยาในความเข้มข้นแตกต่างกันมาใส่หลอดไมโครเซนติพิวจ์ เติมน้ำสารละลายบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, pH 7.4) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า เมื่อถึงเวลาที่กำหนดไว้ คือ 5, 30 นาที 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง ทำการเก็บสารละลาย หลังจากเก็บสารละลายทุกครั้งจะเติมน้ำสารละลายบัฟเฟอร์ใหม่ลงไป ในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ ด้วยปริมาตรเท่ากับที่เก็บ จากนั้น นำสารละลายที่เก็บไปตรวจสอบอัตราการปลดปล่อย blue dextran โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หาร้อยละการปลดปล่อยจากการเปรียบเทียบกับปริมาณยาเริ่มต้นของค่าการดูดกลืนแสงก่อนบรรจุ และทำการทดสอบจนยาปลดปล่อยจากอนุภาคหมด (ไม่มีค่าการดูดกลืนแสง) ทำการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้น (ppm) กับกราฟมาตรฐาน

ผลการทดลอง

สัณฐานวิทยาของอนุภาคไข่ขาว

ลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคไข่ขาวพิจารณาจากภาพถ่าย SEM โดยภาพรวมอนุภาคไข่ขาวแตกต่างกันตามความเข้มข้นที่ใช้ ดังรายละเอียดต่อไปนี้ Figure 1 แสดงสัณฐานวิทยาของอนุภาคไข่ขาว ที่เตรียมจากความเข้มข้น 1% (w/v) พบว่า อนุภาคส่วนใหญ่มีรูปร่างหลากหลายและไม่สมมาตรพิจารณาอนุภาคที่มีรูปร่างคล้ายทรงกลม จะพบช่องว่างทางด้านข้าง พิจารณาอนุภาคที่กลม จะเห็นว่าผิวหน้าค่อนข้างย่นทำให้ดูขรุขระ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากการแยกตัวภาคก่อนที่จะมีการก่ออนุภาค ในระหว่างที่เกิดกระบวนการแพร่ของน้ำจากสารละลายเคราตินไปยังเอทิลอะซิเตต (emulsification-diffusion process)²⁸ Figure 2 แสดงสัณฐานวิทยาของอนุภาคไข่ขาวที่เตรียมจากความเข้มข้น 2% (w/v) พบว่าอนุภาคก่อตัวเป็นทรงกลมไม่สมมาตร มีรูปร่างและขนาดหลากหลาย ส่วนใหญ่คล้ายชั้นน้ำมีช่องว่างทางด้านข้างแต่แคบกว่าที่ความเข้มข้น 1% (w/v) นอกจากนี้ ยังมีผิวที่เรียบและหนากว่า ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากความเข้มข้นของไข่ขาวที่เพิ่มขึ้น จึงจับกันได้มากส่งผลให้ได้อนุภาคที่หนาขึ้นด้วย สภาวะนี้ก่อตัวเป็นอนุภาคไม่สมมาตร นอกจากนี้ อาจเป็นไปได้ว่า กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในไข่ขาวสามารถจับกันได้กับโมเลกุลของน้ำ จึงทำให้น้ำไม่เกิดการแพร่ไปยังวัฏภาคเอทิลอะซิเตต และเมื่อระเหยน้ำออกจึงเกิดรูปร่างที่ปรากฏ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไข่ขาวเป็น 3% (w/v) ดังแสดงใน Figure 3 พบว่าอนุภาคค่อนข้างสมมาตร มีรูปร่างส่วนใหญ่คล้ายทรงกลมอนุภาคกระจายตัวกัน มีผิวหน้าเรียบเนียนมีรอยย่นที่ผิวเล็กน้อย รอยย่นนี้คาดว่าเกิดจากการกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) ที่เป็นส่วนประกอบในไข่ขาวยึดเหนี่ยวกันเอง^{29,30} และเมื่อความเข้มข้นสูงจึงก่อตัวกันแน่นกลายเป็นอนุภาคดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำซึ่งจะมีปริมาณน้ำมาก กรดอะมิโนที่มีขั้วสูงในโปรตีนไข่ขาวสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีผ่านพันธะเคมีต่าง ๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน ไอออนิก หรือ ไดโพล เป็นต้น ทำให้ยากต่อการแพร่ไปยังเอทิลอะซิเตต Figure 4 แสดงสัณฐานวิทยาของอนุภาคไข่ขาวความเข้มข้น 4% (w/v) พบว่า อนุภาคมีรูปร่างหลากหลาย ส่วนใหญ่ก่อตัวเป็นอนุภาคทรงกลมไม่สมมาตร ผลที่ได้นี้คาดว่าน่าจะเกิดจากการแพร่ของน้ำในสารละลายไข่ขาวเข้าไปยังเอทิลอะซิเตตเกิดอย่างรวดเร็ว เพราะมีปริมาตรต่ำเนื่องจากความเข้มข้นไข่ขาวสูง ทำให้ขณะที่เกิดกระบวนการแพร่ของน้ำไม่เหลือน้ำเพื่อหล่อเลี้ยงให้โมเลกุลไข่ขาวกระจายตัว ไข่ขาวจึงจับตัวกันอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาอนุภาคที่มีรูปร่างคล้ายทรงกลม พบว่ามีผิวเรียบแน่นซึ่งน่าจะเกิดจากโปรตีนไข่ขาว

ปริมาณสูงจับตัวกันจึงรวมเป็นเนื้อเดียวกันได้ดี Figure 5 แสดงลักษณะวิทยาของอนุภาคไข่ขาวความเข้มข้น 5% (w/v) พบว่า อนุภาคไข่ขาวที่เตรียมได้ คล้ายกับอนุภาคใน Figure 4 ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเตรียมอนุภาคไข่ขาว คือ ใช้ความเข้มข้นของไข่ขาว 3% (w/v) อัตราส่วน W : O = 0.25:100 อัตราเร็วในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที

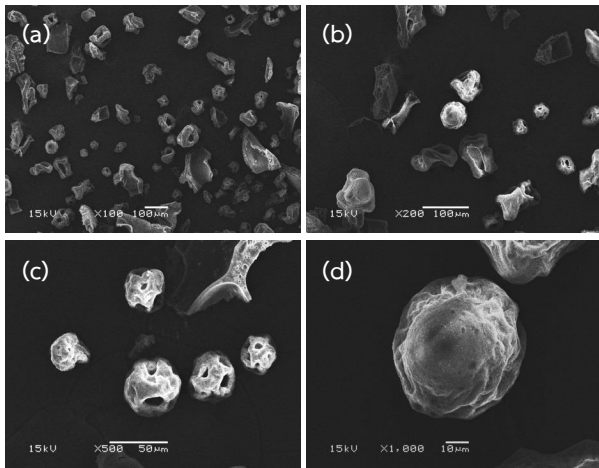


Figure 1 SEM images of 1 % (w/v) egg white particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X (c) and 1000X (d) of magnifications.

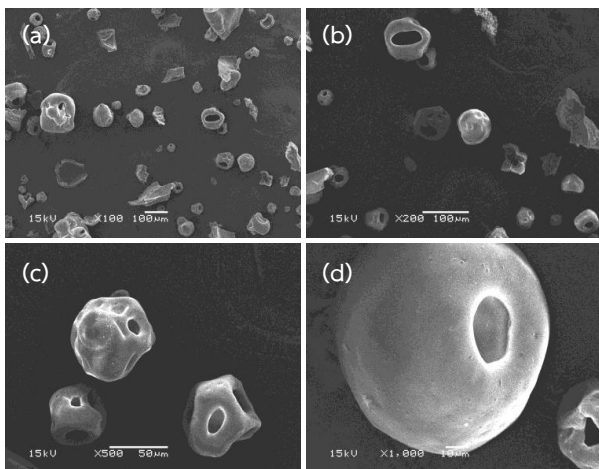


Figure 2 SEM images of 2 % (w/v) egg white particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X (c) and 1000X (d) of magnifications.

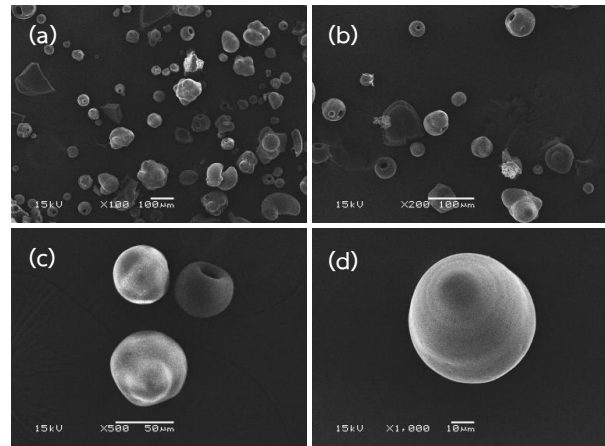


Figure 3 SEM images of 3 % (w/v) egg white particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X (c) and 1000X (d) of magnifications.

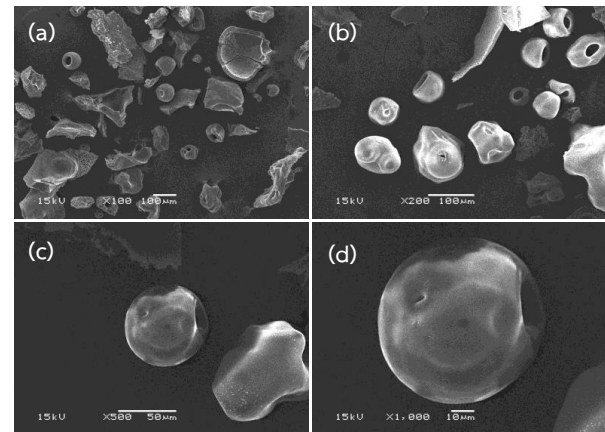


Figure 4 SEM images of 4 % (w/v) egg white particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X (c) and 1000X (d) of magnifications.

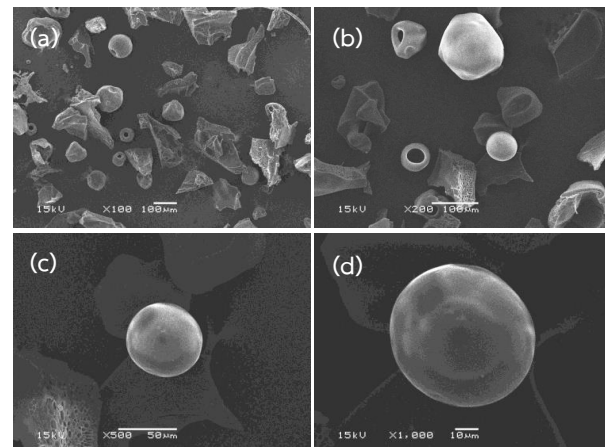


Figure 5 SEM images of 5 % (w/v) egg white particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X (c) and 1000X (d) of magnifications.

ผลของยาลูเดกซ์แทรนต่ออนุภาคไข่ขาว

เมื่อทดลองผสมยาลูเดกซ์แทรน ซึ่งเป็นยาที่มีสภาพขั้วสูงและละลายน้ำได้ดี ทำให้การขึ้นรูปเป็นอนุภาคทรงกลมทำได้ยากโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นไข่ขาวต่ำ (1 และ 2% w/v) ดังแสดงใน Figure 6-7 พบว่า อนุภาคก่อตัวเป็นทรงกลมไม่สมบูรณ์ มีรูกลวงและผิวค่อนข้างขรุขระ ซึ่งคาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากยามีส่วนเข้าไปเพิ่มความเป็นขั้วของสารละลายไข่ขาว และเกิดการจับกันระหว่างโปรตีนและน้ำ ทำให้น้ำแพร่ไปยังเอทิลอะซีเตตได้ยาก จึงปรากฏเป็นรูกลวง และยังคงเหลืออยู่ในอนุภาคโดยเฉพาะบริเวณผิวหน้า ดังนั้น เมื่อเกิดการระเหยของน้ำจะทำให้บริเวณผิวหน้าขรุขระดังรูป เมื่อความเข้มข้นของไข่ขาวเพิ่มขึ้น จะสามารถเตรียมอนุภาคทรงกลมได้เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากยาทำให้สารละลายโปรตีนมีขั้วสูงจึงยังคงก่อตัวเป็นอนุภาคทรงกลมไม่เต็มที่ (Figure 8) ในความเข้มข้นไข่ขาวสูง ๆ (4 และ 5% w/v) อนุภาคก่อตัวเป็นทรงกลมได้ดีขึ้นดังปรากฏใน Figure 9-10 ซึ่งเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ปริมาณโปรตีนในสารละลายก็จะสูงขึ้นและจับกันหนาแน่นมากกว่าในความเข้มข้นต่ำ ส่งผลให้สามารถก่อตัวเป็นอนุภาคทรงกลมได้ดี (Figure 10)

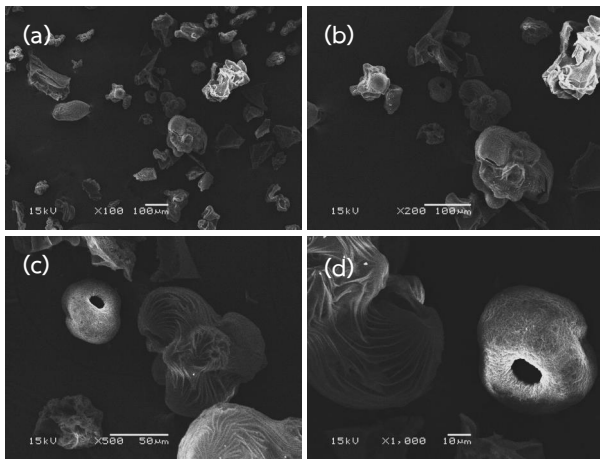


Figure 6 SEM images of 1% (w/v) egg white mixed blue dextran particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X(c) and 1000X (d) magnifications.

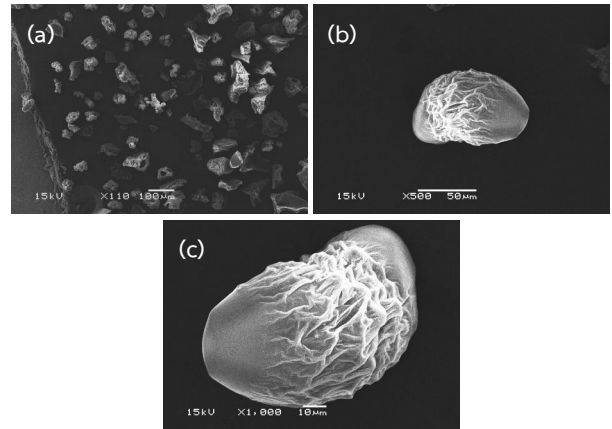


Figure 7 SEM images of 2% (w/v) egg white mixed blue dextran particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 500X(b) and 1000X (c) magnifications.

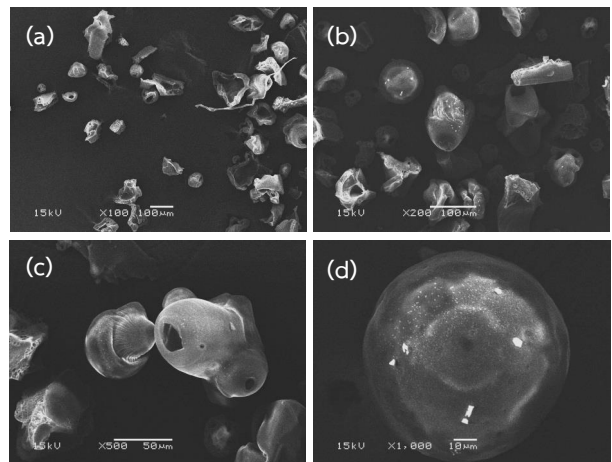


Figure 8 SEM images of 3% (w/v) egg white mixed blue dextran particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X(c) and 1000X (d) magnifications.

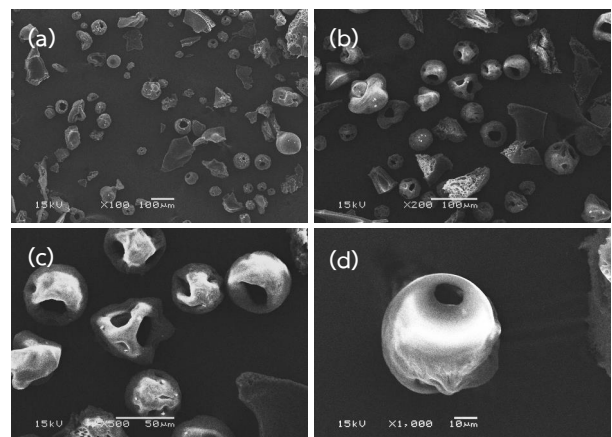


Figure 9 SEM images of 4% (w/v) egg white mixed blue dextran particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X(c) and 1000X (d) magnifications.

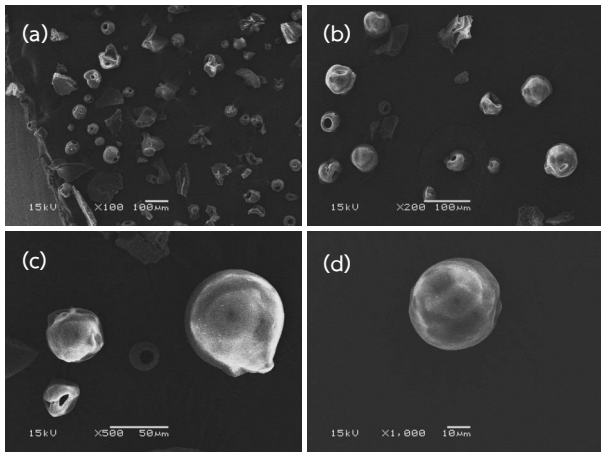


Figure 10 SEM images of 5% (w/v) egg white mixed blue dextran particles prepared by using W:O = 0.25:100 with stirring rate of 600 rpm at 100X (a), 200X (b), 500X(c) and 1000X (d) magnifications.

โครงสร้างระดับทุติยภูมิของอนุภาค

Figure 11 และ Figure 12 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคไข่ขาวที่เตรียมจากความเข้มข้น 3% (w/v) และอนุภาคไข่ขาว (5% w/v) ผสมยาบลูเด็กซ์แทรน ตามลำดับ จากรูปปรากฏบริเวณการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง amide A (3200-3400 cm^{-1}), amide I (1700-1600 cm^{-1}), amide II (1600-1500 cm^{-1}) และ amide III (1300-1200 cm^{-1}) ซึ่งเป็นบริเวณการดูดกลืนแสงหลักของโปรตีน เมื่อพิจารณาจากการดูดกลืนแสง พบว่า อนุภาคไข่ขาวมีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นแบบเกลียวอัลฟา (α -helix) และแบบเกลียวสุ่ม (random coil)¹² การผสมยาบลูเด็กซ์แทรนทำให้โครงสร้างของอนุภาคไข่ขาวเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยโดยเฉพาะที่ตำแหน่ง amide II (1520 cm^{-1}) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบแผ่นจีบเบต้า (β -sheet) และ amide III (1259 cm^{-1}) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบเกลียวสุ่ม³¹

สมบัติเชิงความร้อนของอนุภาค

Figure 13 และ Figure 14 แสดงสมบัติเชิงความร้อนของอนุภาคไข่ขาวและอนุภาคไข่ขาวผสมยาบลูเด็กซ์แทรน ตามลำดับ อนุภาคทั้งสองมีตำแหน่งของอุณหภูมิที่เกิดการแตกสลายมากกว่า 2 ตำแหน่ง ซึ่งมาจากองค์ประกอบของโปรตีนไข่ขาวที่มีมากกว่า 4 ชนิด การแตกสลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เกิดจากการระเหยของโมเลกุลน้ำ¹⁵ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการแตกสลายของอนุภาคไข่ขาวที่ผสมยาบลูเด็กซ์แทรน พบว่า ยามีผลทำให้อุณหภูมิการแตกสลายเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคที่ไม่มียา

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนในไข่ขาวและยาน่าจะสร้างแรงยึดเหนี่ยวต่อกันผ่านพันธะไฮโดรเจนและแรงดึงดูดทางไฟฟ้า

รูปแบบการปลดปล่อยยาจากอนุภาค

รูปแบบการปลดปล่อยยาบลูเด็กซ์แทรนจากอนุภาคไข่ขาวแสดงดัง Figure 15 จากรูปจะเห็นว่า อนุภาคไข่ขาวที่เตรียมจากความเข้มข้น 5% (w/v) จะปลดปล่อยยาในปริมาณมากที่สุด รองลงมา คือ อนุภาคที่เตรียมจากไข่ขาว 2, 3, 1 และ 4% (w/v) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า อนุภาคไข่ขาวสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้แตกต่างกัน ขึ้นกับความเข้มข้นที่เลือกใช้ในการเตรียมอนุภาค นอกจากนี้ ปริมาณยาสูงสุดที่ปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคไข่ขาวที่เตรียมจากความเข้มข้น 5% (w/v) คิดเป็นประมาณร้อยละ 66 เมื่อทำการทดสอบการปลดปล่อยเป็นเวลา 7 ชั่วโมง

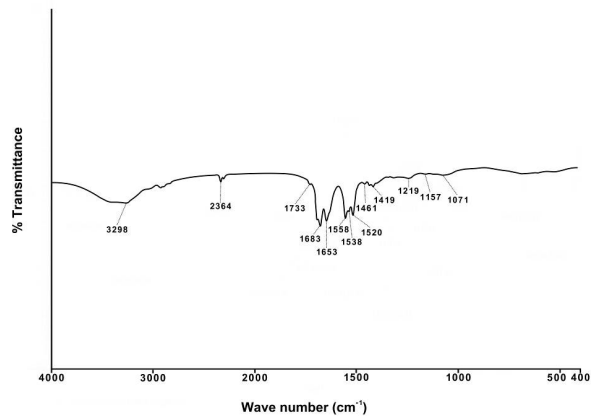


Figure 11 FTIR spectra of egg white particles prepared from 3 % (w/v) concentration.

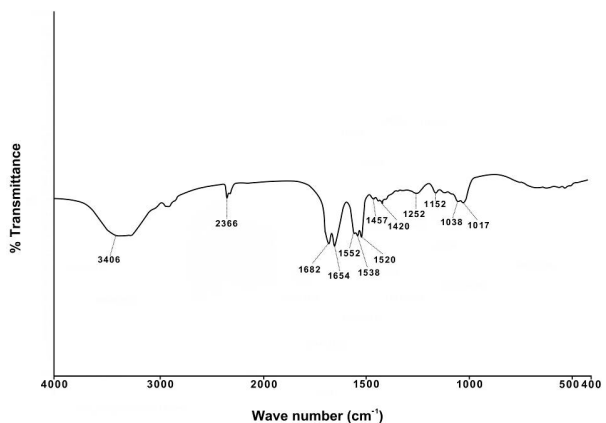


Figure 12 FTIR spectra of egg white mixed blue dextran particles prepared from 5 % (w/v) concentration.

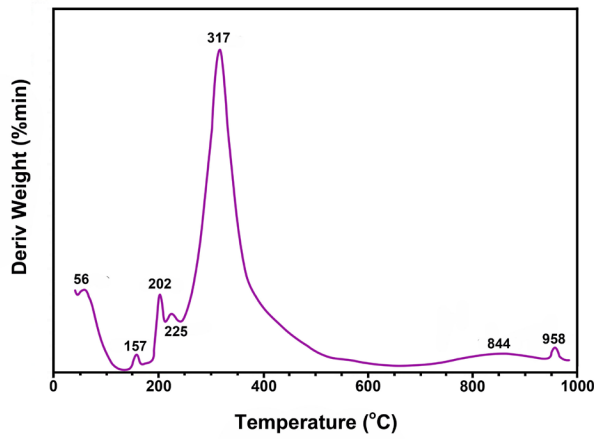


Figure 13 DTG thermogram of egg white particles prepared from 3%(w/v) concentration.

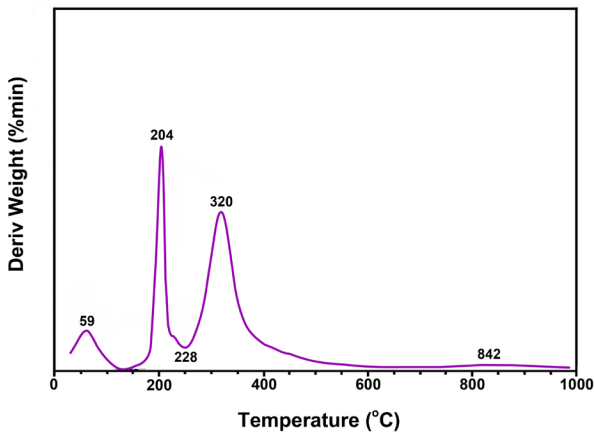


Figure 14 DTG thermogram of egg white mixed blue dextran particles prepared from 5%(w/v) concentration.

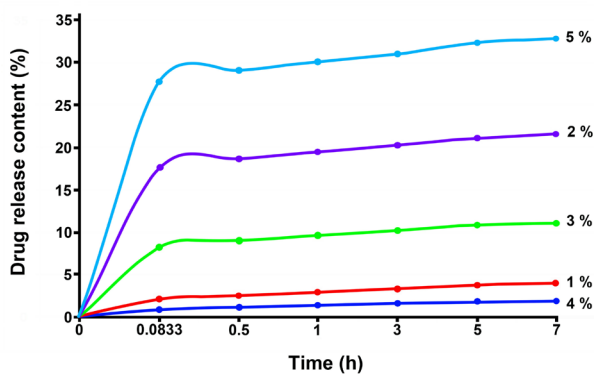


Figure 15 Releasing patterns of blue-dextran from egg white particles prepared from different concentrations.

สรุปผลการทดลอง

สามารถเตรียมอนุภาคไข่ขาวที่มีสัณฐานวิทยา โครงสร้าง ทุกติภูมิและสมบัติเชิงความร้อนแตกต่างกันตามความเข้มข้นของสารละลายไข่ขาว ด้วยวิธีการทำให้เกิดอิมัลชันโดยการแพร่ของตัวทำละลาย (solvent emulsification-diffusion method) สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมอนุภาคไข่ขาว คือ ใช้ความเข้มข้นไข่ขาว 3% (w/v) อัตราส่วน W:O เท่ากับ 0.025:100 มิลลิลิตร อัตราเร็วในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที จะทำให้อนุภาคมีรูปร่างทรงกลม ผิวหน้าเรียบ มีขนาดสม่ำเสมอ อนุภาคไข่ขาวมีความยืดหยุ่นสูงเพราะมีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นแบบเกลียวอัลฟาและเกลียวสุ่ม แต่อุณหภูมิจะมีโครงสร้างแข็งขึ้นเมื่อผสมยาบลูเด็กซ์แทรนเพราะจะมีโครงสร้างแบบแผ่นจับเบต้าเพิ่มขึ้นส่งผลให้อุณหภูมิในการแตกสลายของอนุภาคไข่ขาวที่ผสมยาสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคไข่ขาวที่ไม่ผสมยา อนุภาคไข่ขาวมีรูปแบบการปลดปล่อยยาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายไข่ขาวที่ใช้เตรียมอนุภาค ซึ่งถือเป็นข้อดีที่จะพัฒนาอนุภาคไข่ขาวสำหรับนำส่งยาหรือโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และให้ความอนุเคราะห์ห้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดสำหรับตรวจสอบสัณฐานวิทยาของอนุภาค ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมความเป็นเลิศทางเคมี (PERCH-CIC) ที่สนับสนุนงบประมาณบางส่วนสำหรับการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Xanthos D, Walker TR. International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): A review. *Mar Pollut Bull.* 2017;118(1-2):17-26.
2. Zhao Y, Saldaña MDA. Use of potato by products and gallic acid for development of bioactive film packaging by subcritical water technology. *J Super-crit Fluid.* 2018;143:97-106.
3. Liu R, Dai L, Zou Z, Si C. Drug-loaded poly(L-lactide)/lignin stereocomplex film for enhancing stability and sustained release of trans-resveratrol. *Int J Biol Macromol.* 2018;119:1129-1136.

4. Tian H, Tang Z, Zhuang X, Chen X, Jing X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog Polym Sci*. 2012;37(2):237-280.
5. Khot SN, Development and application of triglyceride-based polymers and composites. *J Agric Food Chem*. 2001;49(8):3957-64.
6. Lammel AS, Hu X, Park SH, Kaplan DL, Scheibel TR. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials* 2010;31(16):4583-91.
7. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL, Khot SN. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *J Agric Food Chem*. 2007;49(8):207-233.
8. Alizadeh-Osgouei M, Li Y, Wen C. A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioact Mater*. 2019;4(1):22-36.
9. Qian F, Chen D, Yang Z, Li M. 2009. In vitro and in vivo research on using antheraea pernyi silk fibroin as tissue engineering tendon scaffolds. *Mater Sci Eng. C* 2009;29(5):1527-1534.
10. Liu Y, Zhang j, Gao Y, Zhu J. Preparation and evaluation of glyceryl monooleate-coated hollow-bioadhesive microspheres for gastroretentive drug delivery. *Int J Pharm*. 2011;413(1-2):103-109.
11. Martín-Alfonso JE, Félix M, Romero A, Guerrero A. Development of new albumen based biocomposites formulations by Injection moulding using chitosan as physicochemical modifier additive. *Compos B Eng*. 2014;61:275-281.
12. You R, Zhang J, Gu S, Zhou Y, Li X, Ye D, Xu W. Regenerated egg white/silk fibroin composite films for biomedical applications. *Mater Sci Eng. C* 2017;79:430-435.
13. Yamauchi K, Maniwa M, Mori T. Cultivation of fibroblast cells on keratin-coated substrata. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(3):259-270.
14. Kuan YH, Bhat R, Karim AA. Emulsifying and foaming properties of ultraviolet-irradiated egg white protein and sodium caseinate. *J Agric Food Chem*. 2011;59(8):4111-18.
15. Weijers M, Velde FVD, Stijnman A, Pijpekamp AVD. Structure and rheological properties of acid-induced egg white protein gels. *Food Hydrocolloid*. 2006;20:146-159.
16. Mine Y, Ma F, Lauriau S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agr Food Chem*. 2004;52(5):1088-1094.
17. Geng F, Huang X, Ma M. Hen egg white ovomacroglobulin promotes fibroblast migration via mediating cell adhesion and cytoskeleton. *J Sci Food Agric*. 2016;96(9):3188-3194.
18. Jalili-Firoozinezhad S, Rajabi-Zeleti S, Mohammadi P, Gaudiello E, Bonakdar S, Solati-Hashjin M, Marsano A, Aghdami N, Scherberich A, Baharvand H, Martin I. Facile fabrication of egg white macroporous sponges for tissue regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(15):2281-2290.
19. Tomczyńska-Mlekoa, M, Terpiłowski K, Mlekoc S. New product development: cellulose/egg white protein blend fibers. *Carbohydr Polym* 2015;126:168-174.
20. Wongsasulak S, Patapeejumruswong M, Weiss J, Supaphol P, Yoovidhya T. Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *J Food Eng*. 2010;98(3):370-376.
21. Zahedi P, Fallah-Darrehchi M. Electrospun egg albumin-PVA nanofibers containing tetracycline hydrochloride: morphological, drug release, antibacterial, thermal and mechanical properties. *Fiber Polym*. 2015;16(10):2184-2192.
22. Baimark Y, Srihanam P, Srisuwan Y. Phinyocheep P. Preparation of porous silk fibroin microparticles by a water-in-oil emulsification-diffusion method. *J Appl Polym Sci*. 2010;118:1127-1133.
23. Lu Q, Zhang S, Hu K, Feng Q, Cao C, Fuzhai C. Cytocompatibility and blood compatibility of multifunctional fibro/collagen/heparin scaffolds. *Biomaterials* 2007;28:2306-2313.
24. Vepari CD, Kaplan DL. Silk as a biomaterials. *Prog Polym Sci*. 2007;32:991-1007.

25. Vasconcelos A, Fredi G, Cavaco-Paulo A. Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules* 2008;9:1299-1305.
26. Baimark Y, Srisa-ard M, Srihanam P. Morphology and thermal stability of silk fibroin/starch blended microparticles. *Express Polym Lett.* 2010;4(12):781-789.
27. Srihanam Pr, Srisuwan Y, Imsombut T, Baimark Y. Silk fibroin microspheres prepared by the water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery. *Korean J Chem Eng.* 2011;28(1):293-297.
28. Sinha V, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release.* 2003;90(3): 261-280.
29. Lim, LT, Mine Y, Tung MA. Transglutaminase cross-linked Egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. *J Agric Food Chem.* 1998;46(10):4022-4029.
30. You R, Zhang J, Gu S, Zhou Y, Li X, Ye D, Xu W. Regenerated egg white/silk fibroin composite films for biomedical applications. *Mater Sci Eng. C* 2017;79:430-435.
31. Hu X, Kaplan D, Cebe P, Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* 2006;39:6161-6170.