

เพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์ เพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิว (occlusion effect) เพิ่มความคงตัวของสารสำคัญและผลิตภัณฑ์ เพิ่มการดูดซึมสารลงในชั้นที่ลึกยิ่งขึ้น การนำมาทำเป็นทางเครื่องสำอางสามารถทำได้ในหลายรูปแบบคือ รูปแบบโลชั่น หรือบรรจุลงในเนื้อครีม หรือทำให้อยู่ในรูปแบบเจล ได้มีการศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนของเซริซินอยู่บ้างในต่างประเทศโดย Cho และคณะ ได้ทำการศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนเซริซินด้วยวิธี self-assembly โดยใช้เซริซินทำปฏิกิริยา hydrophobic interaction กับ polyethylene glycol (PEG) แล้วได้เป็นอนุภาคนาโนซึ่งมีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาด 200-400 นาโนเมตร [9]

การพัฒนาการเตรียมอนุภาคนาโนเซริซินในประเทศไทยยังมีการศึกษากันน้อยมาก รวมถึงการพัฒนาวิธีการเตรียมผงไหมเซริซินเพื่อที่จะให้ได้ปริมาณที่มากก็ยังมีน้อย ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะพัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดและเตรียมผงไหมเซริซินและเตรียมอนุภาคนาโนเซริซินให้ได้ตามคุณสมบัติที่เหมาะสมตามต้องการ เพื่อให้ได้ปริมาณผงเซริซินที่มาก วิธีการผลิตที่ง่าย ต้นทุนในการผลิตต่ำ และอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าและยกระดับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรให้เป็นสินค้าอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต ผงไหมเซริซินและอนุภาคนาโนเซริซินที่เตรียมได้คาดว่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมตำรับเครื่องสำอางในอนาคตต่อไป

2. วัตถุประสงค์

ศึกษาและพัฒนาวิธีการผลิตผงไหม และผงไหมนาโน และทำการศึกษาคูณสมบัติต่างๆ ให้ได้คุณภาพดีและเหมาะสมสำหรับใช้ใน การทำเครื่องสำอาง

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมผงไหมเซริซิน

1) เตรียมผงไหมเซริซินโดยการสกัดด้วยด่าง (adapted from Yamada et al.,2001)

นำรังไหมพันธุ์ UB1xUB5 สีขาว จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดขอนแก่นที่สะอาด ตัดให้ได้ชิ้นเล็กๆ ต้มในสารละลาย 0.5% Sodium carbonate (0.5% Na₂CO₃) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 3 ครั้ง (อัตราส่วนรังไหม 1 กรัม/น้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นกรองเพื่อที่จะเอาสารละลายเซริซิน เพิ่มความเข้มข้นสารละลายเซริซินโดยการระเหยน้ำออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปรับ pH ของสารละลายเซริซินให้ได้ pH 7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น หลังจากนั้นทำการไดอะไลซิส 3 วัน เพื่อกำจัดไอออนของเกลือ นำสารละลายเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงและนำส่วนที่เป็นสารละลายใส (supernatant) มาทำให้แห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งที่จุดเยือกแข็ง (Freeze drying) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลได้ (% Yield)

2) เตรียมผงไหมเซริซินโดยการสกัดด้วยน้ำร้อน (adapted from Yamada et al.,2001 และ Zhang et al., 2004) นำรังไหมพันธุ์ UB1xUB5 ที่สะอาด ตัดให้ได้ชิ้นเล็กๆ แช่รังไหมในน้ำกลั่น 24 ชั่วโมง (อัตราส่วนรังไหม 1 กรัม/น้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นต้มรังไหมที่อุณหภูมิ 100

องศาเซลเซียส นาน 1.5, 3.0, 6.0 และ 9.0 ชั่วโมง 3 ครั้ง กรองและแยกเอาส่วนของสารละลาย เซรีซิน เพิ่มความเข้มข้นสารละลายเซรีซินโดยการระเหยนํ้าออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นำสารละลายมาทำให้เป็นผงไหมเซรีซินด้วยวิธีทำให้แห้งที่จุดเยือกแข็ง (Freeze drying) คำนวณหานํ้าหนักผงไหม (% Yield)

3) ศึกษาเทคนิคการทำไหมเซรีซินแห้งโดยใช้วิธีทำให้แห้งที่จุดเยือกแข็ง (Freeze drying) และวิธีพ่นแห้ง (Spray drying)

นํ้ารังไหมพันธุ์ UB1xUB5 ที่สะอาด ตัดให้ได้ชิ้นเล็กๆ แซ่รังไหมในนํ้ากลั่น 24 ชั่วโมง (อัตราส่วนรังไหม 1 กรัม/นํ้ากลั่น 30 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นต้มรังไหมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 9.0 ชั่วโมง 3 ครั้ง กรองและแยกเอาส่วนของสารละลายเซรีซิน นำสารละลายมาทำให้เป็นผงไหมเซรีซินด้วยวิธีทำให้แห้งที่จุดเยือกแข็ง (Freeze drying) และวิธีพ่นแห้ง (Spray dry) คำนวณหานํ้าหนักผงไหม (% Yield)

4) หานํ้าหนักมวลโมเลกุลของเซรีซินที่สกัดได้โดยใช้ SDS-PAGE

เตรียมสารตัวอย่างเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หาขนาดมวลโมเลกุลของเซรีซินโดยใช้ 12 % Acrylamide gel (separating gel) และ 4 % Acrylamide gel (stacking gel) ด้วยเครื่อง Gel Electrophoresis (Bio-RAD, Mini-PROTEAN 3 Cell). และย้อมสีเจลดด้วย Coomassie Blue R250

5) หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford Protein assay (Microtiter plate) (Bio-Rad)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 0.000, 0.005, 0.010, 0.015 และ 0.020 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ในสารละลาย PBS (pH 7.4) เตรียมสารตัวอย่าง เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรในสารละลาย PBS (pH 7.4) เติมนํ้า Dye Reagent (Bio-RAD) ใน สารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง ผสมสารละลายในแต่ละหลุมให้เข้ากันโดยใช้ multichannel pipette Incubate ที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง (Absorbance จะเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น) นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

3.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของผงไหมเซรีซิน

1) ศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนเซรีซินที่เตรียมได้ ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) ได้แก่ UV-visible Spectrophotometry (UV) (Wu et al., 2007) และ Infrared Spectroscopy (IR) (Ki et al., 2007)

2) วัดขนาดอนุภาคผงไหมเซรีซินที่สกัดได้ (Zhang et al, 2004) โดยเตรียมผงเซรีซินในนํ้า กลั่น 5 มิลลิลิตร เข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยนํ้าหนักต่อปริมาตร (0.01%w/v) นำสารตัวอย่างมา sonicate 15 นาที และวัดขนาดและประจุของอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (Dynamic light scattering (nanosizer), Malvern Instruments)

3) ศึกษาลักษณะรูปร่างของผงไหมเซรีซินที่สกัดได้ ด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

4) ศึกษาสมบัติความร้อนของผงไหมเซรีซินที่สกัดได้ ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC)

3.3 การเตรียมอนุภาคนาโนจากผงไหมเซรีซิน

1) เตรียมอนุภาคนาโนอาศัยหลักการเตรียมนาโนซัสเพนชัน (nanosuspension) โดยเครื่อง high speed homogenizer (adapted from C. Jacobs and R.H. Muller., 2002 และ P. Bandyopadhyay and N.S. Neeta., 2007)

นำผงเซรีซินมาละลายในน้ำกลั่น ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มการละลายของผงเซรีซิน นำ Span 60 มาละลายในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ (ได้แก่ เมทานอล เอทานอล หรือ ไอโซโพรพานอล) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มการละลายของสารลดแรงตึงผิว ผสมสารละลายเซรีซินกับ สารละลายของ Span 60 ให้เข้ากัน ปั่นด้วยเครื่อง high speed homogenizer ด้วยความเร็วและเวลาในการปั่นที่เหมาะสม วัดขนาดอนุภาคที่ได้ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (Dynamic light scattering (nanosizer), Malvern Instruments) ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีต่อการลดขนาดของอนุภาคนาโนเซรีซินได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ (แอลกอฮอล์), ความเข้มข้นของ Span 60, ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์, ความเข้มข้นของผงไหมเซรีซิน, ระดับความเร็วและระยะเวลาในการปั่นของสารละลายตัวอย่าง ด้วยเครื่อง high speed homogenizer จากนั้นเลือกสภาวะในการเตรียมนาโนเซรีซินที่เหมาะสม เพื่อใช้เตรียมนาโนเซรีซินด้วยเครื่อง high pressure homogenizer

2) วิธีการเตรียมนาโน โดยเครื่อง high pressure homogenizer

เตรียมนาโนซัสเพนชันของเซรีซินตามสภาวะที่เหมาะสมแล้วนำมาศึกษา ปัจจัยที่มีผลต่อการลดขนาดอนุภาคเซรีซินด้วยเครื่อง high pressure homogenizer ได้แก่ ความดันและจำนวนรอบในการพาสารตัวอย่างผ่านเครื่อง วัดขนาดอนุภาค

3) ศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนเซรีซินที่เตรียมได้จากเครื่อง high pressure homogenizer โดยการวัดขนาดอนุภาคนาโนเซรีซิน, วัดประจุของอนุภาคนาโนเซรีซินด้วยเครื่องวัดประจุ (Zeta potential) และ ศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคนาโนเซรีซินด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)