บทที่ 2

การทดลอง

ก. เครื่องมือ

1. Balance (Sartorious Model BP110, AG Gottingen Co. Ltd., Germany)
2. Conductivity meter (Cyberscan CON 11, Eutech instruments, Singapore)
3. GC-MS (Hewlett-Packard model 6890 (GC) / HP 5973 MS)
4. High pressure homoginizer (Micron LAB40, Homogenizer Systems, Germany)
5. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Hewlett Packard, USA)
6. Hot air oven (Thelco. Model 27 GCA. Co., Ltd., USA.)
7. Incubator (National Appliance Co., Model 332, USA.)
8. Micropipette (Eppendorf, USA)
9. Microtiter plate reader (Biorad 680, USA)
10. Multiple-Point Stirrer (Thermo scientific, McQueen Labs, USA)
11. pH meter (Hanna pH 211 microprocessor, USA)
12. Photon correlation spectroscopy (Malvern Zetasizer IV, Malvern Instruments, UK)
13. Refractometer (ATAGO รุ่น 3T จากบริษัท Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan)
14. Refrigerator (SANYO, Japan)
15. Sonicator T460/H (Elma รุ่น Transsonic, Germany)
16. Steam distillation / Clevenger apparatus
17. Surface tensiometer (FACE-CBVP-A3, Japan)
18. UV-sepectrometer (Shimazu UV-2450 Japan)
19. Vortex mixer (Model 1291, LAB-LINE Instrument, Inc., USA)
20. Water bath with shaker (Memmert, GMBH Co., Ltd., Germany)

ข. พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาสกัดน้ำมันในโครงการนี้ คือตะไคร้ และงา

ค. วัสดุ / เคมีภัณฑ์ / เภสัชภัณฑ์

1. Acetone AR (Merck, Germany)
2. Acetonitrile HPLC (LAB-SCAN Analytical Science, ประเทศไทย)
3. Acetic acid (Fisher Chemicals, Loughborough, UK)
4. Acetronitrile AR (Merck, Germany)
5. Acetronitrile HPLC (Merck, Germany)
6. Acetylcholinesterase (AChE, specific activity 425.94 U/mg) (Sigma-Aldrich, USA)
7. Acetylthiocholine iodide (ATCI) (Fluka, Steinheim, Garmany)
8. 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (ABTS) (Sigma- Aldrich, USA)
9. n-Butanol AR (Merck, Germany)
10. Butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma-Aldrich, USA)
11. Butyrylcholinesterase (BChE, specific activity 7.4 U/mg) (Sigma-Aldrich, USA)
12. Butyrylthiocholine iodide (BTCI) (Fluka, Steinheim, Garmany)
13. Calcium chloride (Fisher Chemicals, Loughborough, UK)
14. Chloroform AR (Merck, Germany)
15. Clotrimazole (Sigma-Aldrich, USA)
16. Dialysis membrane (MWCO = 12000-14000) (Cellu.Sep T4, USA)
17. Dichloromethane AR (Merck, Germany)
18. Dichloromethane HPLC (Fisher Scientific, UK)
19. Diethyl ether AR (Merck, Germany)
20. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
21. 2,2-Diphedyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, USA)
22. Disodium hydrogen phosphate (Ajax Finechem, New Zealand)

23. 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-Aldrich, USA)
24. Ethanol 95% (BDH Chemicals Ltd, England)
25. Ethanol absolute AR (Merck, Germany)
26. Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) (Sigma-Aldrich, USA)
27. Ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$) (Sigma-Aldrich, USA)
28. n-Hexane AR (Merck, Germany)
29. Hexan-1-ol (Asia Pacific Specialty Chemical Limited ABN, Australia)
30. Hydrochloric acid (BDH Chemicals Ltd, England)
31. 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Fluka, Switzerland)
32. L-dopa (Fluka Chemical, Japan)
33. Methanol AR (Merck, Germany)
34. Methanol HPLC (Merck, Germany)
35. n-Octanol (Merck, Germany)
36. Octylphenol-polyethylene glycolether (Triton X-114) (Acros Organics, New Jersy, USA)
37. n-Pentanol (Merck, Germany)
38. Phosphoric acid (Merck, Germany)
39. Polyethylene glycol (PEG) 200 / PEG 300 / PEG 400 / PEG 600 (Fluka, Switzerland)
40. Polyoxyethylene (10) oleyl ether (Brij 97) (Steinheim, Garmany)
41. Polyethylene glycol sorbitan trioleate (Tween 85) (Acros Organics, New Jersy, USA)
42. Potassium persulfate (BDH Chemicals Ltd, England)
43. Propylene glycol (Fluka, Switzerland)
44. iso-Propanol (Merck, Germany)
45. n-Propanol (Merck, Germany)
46. Sesame oil (บริษัทสยามเซซามี่จำกัด จังหวัดแม่ฮ่องสอน)
47. Sesamin (Phytolab GmbH, Germany)
48. Sodium acetate (Fluka, Switzerland)

49. Sodium chloride (Fisher Chemicals, Loughborough, UK)
50. 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Sigma, USA)
51. Tween 20 / Tween 80 (Namsiang Co., Ltd. (Bangkok, Thailand)
52. Tyrosinase enzyme (Fluka Chemical, Japan)
53. α-Tocopherol (Fluka Chemie GmbH, Switzerland)
54. γ-Tocopherol) (Phytolab GmbH, Germany)
55. วัสดุอื่น ๆ เช่น เครื่องแก้วต่าง ๆ กระดาษกรอง Whatman no.1

ง. วิธีทดลอง

การสกัดน้ำมัน

ในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ได้นำส่วนของลำต้นซึ่งเรียกว่ากอ ซึ่งเป็นส่วนก้านชูใบและใบของตะไคร้ ที่มีอายุไม่อ่อนหรือแก่เกินไปมาใช้มาล้างน้ำสะอาด แล้วสะเด็ดน้ำออกให้มากที่สุด บันทึกน้ำหนักพืชสดที่ได้ จากนั้นนำมาบดผสมกับน้ำกลั่นแล้วทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Hydro-distillation ใช้เครื่องกลั่นขนาด 1 ลิตร รองรับปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ด้วย cleventure apparatus สำหรับน้ำมันชนิดเบากว่าน้ำ จดบันทึกปริมาตรน้ำมันหอมระเหยภายหลังจากทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ค่าปริมาตรที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้เป็นร้อยละของพืชสด (yield percent) และเก็บในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสง และในตู้เย็น เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

สำหรับน้ำมันระเหยยาก ซึ่งในที่นี้หมายถึงน้ำมันงา ได้รับความอนุเคราะห์จากแหล่งผลิตต่าง ๆ ในจังหวัดแม่ฮ่องสอน

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมัน

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย (น้ำมันตะไคร้) ทำโดยอาศัย GC-MS ส่วนน้ำมันระเหยยาก (น้ำมันงา) ศึกษาโดยอาศัย HPLC ดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ทำโดยอาศัยเครื่อง GC-MS ต่อกับ electron impact (EI, 70 eV) โดยมี HP 5973 mass selective detector และต่อกับ silica capillary column (HP-5MS) ของ (Hewlett Packard®, USA) ขนาด 30.0 เมตร × 250 ไมครอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านในเท่ากับ 0.25 ไมครอน สภาวะที่ใช้ในการศึกษาคือใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาในอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที มี injector temperature เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส ให้มี oven temperature เท่ากับ 100 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที ไปถึง 188 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มเป็นอัตรา 20 องศาเซลเซียส/นาที ไปถึง 280 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิจับวัด (detector temperature) เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส ผลการทดลองประเมินโดยใช้โปรแกรมจากเครื่อง GC-MS ซึ่งคำนวณจากการเปรียบเทียบกับ mass spectra database (WILEY&NIST) และ spectroscopic data

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันงา ทำโดยดัดแปลงวิธีของ Wu (2007) และ Ghafoorunissa Hemalatha (2004) โดยอาศัยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase C18 ใช้ส่วนผสมของ methanol และ น้ำ (70:30) และใช้ส่วนผสมของ acetronitile, methanol และ dichloromethane (60:35:5) เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์หา sesamin และ γ-tocopherol ตามลำดับ และใช้ UV spectrophotometer เป็นตัวจับวัด คำนวณหาหาความเข้มข้นของ sesamin และ γ-tocopherol โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานทั้งสอง ตามรายละเอียดในภาคผนวก-ก และภาคผนวก-ข ตามลำดับ ทดลองศึกษาทั้งสารสกัดจากน้ำมันงาและน้ำมันงาโดยการฉีดสารละลายน้ำมันงา (2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน chloroform)โดยตรง (direct oil injection)

นอกจากนั้น ได้ศึกษาลักษณะการดูดกลืนแสงของน้ำมันงา เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงของน้ำมันงาชนิดต่างๆและสารสำคัญที่มีในน้ำมันงาด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อใช้ในการยืนยันลักษณะของน้ำมันว่าได้มาจากงาชนิดและกรรมวิธีการผลิตเดียวกัน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง หาความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ช่วงคือ 200-400 นาโนเมตร และ 400-700 นาโนเมตร

การศึกษาสมบัติเคมีกายภาพของน้ำมัน

สมบัติเคมีกายภาพของน้ำมันที่ทำการศึกษา ได้แก่ สมบัติการละลาย Refractive index แรงตึงผิว และความหนาแน่น ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

การศึกษาสมบัติการละลายของน้ำมัน

ในการศึกษาสมบัติการละลายของน้ำมัน จะใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ที่นิยมใช้ทางเภสัชกรรมมาทำการศึกษา การทดลองทำโดยชั่งน้ำมันให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นค่อย ๆ เติมตัวทำละลายทีละน้อย แต่ละครั้งที่เติมตัวทำละลายให้ทำการผสมให้เข้ากันโดยเครื่องคนผสม ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนกระทั่งน้ำมันละลายหมด โดยสังเกตด้วยตาเปล่า บันทึกปริมาณน้อยที่สุดของตัวทำละลายที่ทำให้น้ำมันจำนวนดังกล่าวละลายหมด

สมบัติการละลายของน้ำมัน จะแสดงเป็นค่าส่วนของตัวทำละลายที่น้อยที่สุดเพื่อใช้ละลายน้ำมันจำนวน 1 ส่วน ดังนั้นหากตัวทำละลายใดมีค่าตัวเลขที่แสดงส่วนที่ต้องใช้น้อย แสดงว่าตัวทำละลายนั้นสามารถละลายน้ำมันได้ดี ในทางกลับกันหากตัวทำละลายใดมีค่าตัวเลขที่แสดงส่วนที่ต้องใช้มาก แสดงว่าตัวทำละลายนั้นสามารถละลายน้ำมันได้ไม่ดี

การศึกษาหาค่า Refractive index ของน้ำมัน

การหา Refractive index ของน้ำมันในขั้นตอนนี้ทำโดยใช้เครื่อง Refractometer (ATAGO รุ่น 3T จากบริษัท Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan)

การศึกษาหาค่าแรงตึงผิวของน้ำมัน

การศึกษาหาค่าแรงตึงผิวของน้ำมันในขั้นตอนนี้ทำโดยใช้เครื่อง Plate Tensiometer (Automatic Surface Tensiometer รุ่น CBVP-A3 บริษัท Kyowa Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan)

การศึกษาหาความหนาแน่นของน้ำมัน

การหาความหนาแน่นของน้ำมัน ดำเนินการโดยใช้ micropipette ดังต่อไปนี้

1. ดูดน้ำมันด้วย micropipette ที่ทราบปริมาตรแน่นอน (เช่น 300 มิลลิลิตร) โดยใช้ pipette tip ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
2. นำของเหลวที่ดูดได้รวมทั้ง pipette tip ไปชั่ง เพื่อหาน้ำหนักของน้ำมัน (กรัม) ที่มีปริมาตรเท่ากับ 300 มิลลิลิตร

3. นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความหนาแน่น โดยใช้สูตร D = M/V เมื่อ D หมายถึง ความหนาแน่น M หมายถึงน้ำหนัก และ V หมายถึงปริมาตรของน้ำมัน
4. ทำการทดลองข้อ 1 – 3 ซ้ำอีก 3 ครั้ง
5. นำผลการทดลองทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ย

การศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาของน้ำมัน

ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยา ได้พิจารณาทดสอบฤทธิ์ที่มีผลดีต่อผิวหนังซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักของโครงการได้แก่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เพื่อป้องกันการเหี่ยวก่อนวัยของผิวหนัง และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส เพื่อป้องกันผิวคล้ำเสีย การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในโครงการนี้ ทำการทดลองโดยใช้วิธีต่าง ๆ ได้แก่ วิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP method การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส ศึกษาโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรสิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดเม็ดสี (melanin) ที่ผิวหนัง ทำให้ผิวมีสีคล้ำ รายละเอียดของวิธีทดสอบฤทธิ์ต่างๆ มีดังต่อไปนี้

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

<u>วิธี DPPH</u>

วิธีนี้จะใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันงาที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ทำโดยผสมน้ำมันงาตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนกับ DPPH ที่ละลายใน butanol ที่ทราบปริมาตรสุดท้ายแน่นอน เก็บสารละลายผสมไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร คำนวณหาฤทธิ์การจับอนุมูลอิสระ DPPH (% free radical scavenging) จากสูตรต่อไปนี้ แล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ 50% หรือเรียกย่อว่า IC_{50}

$$\% \text{ Free radical scavenging} = \frac{A_{Blank} - A_{sample}}{A_{Blank}} \times 100$$

โดย

A_{Blank} = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH ที่ไม่ได้ผสมสารที่ต้องการทดสอบ

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH ที่ผสมสารที่ต้องการทดสอบ

วิธี ABTS

วิธีนี้ใช้อนุมูลอิสระของ ABTS ที่เตรียมใหม่ ๆมาทำการเจือจางด้วย ethanol จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ± 0.2 หน่วย จากนั้นผสมน้ำมันที่ต้องการทดสอบใน ethanol ให้ได้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ที่เตรียมได้จำนวน 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ microtiter plate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ค่าที่บ่งชี้ความแรงของฤทธิ์จะเป็นค่าที่เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox เรียกว่า TEAC ซึ่งย่อมาจาก Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ซึ่งค่านี้แสดงถึงความเข้มข้นของ Trolox ที่ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับน้ำมันที่ทดสอบ 1.0 มิลลิกรัม ถ้าน้ำมันที่ทดสอบมีค่า TEAC สูง แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง สำหรับวิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของ Trolox แสดงรายละเอียดในภาคผนวก-ค

วิธี FRAP

วิธีนี้ทำโดย เตรียม FRAP reagent จากนั้นเจือจางน้ำมันที่ทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้เพียง 20 ไมโครลิตรผสมกับ FRAP reagent 180 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่ได้ที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้ microteter plate reader ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ได้หมายถึงฤทธิ์การมี reduction power โดยหากน้ำมันที่ทดสอบมีฤทธิ์ดังกล่าวมาก ก็จะให้ค่าการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} มาก ค่าที่แสดงออกมาเป็นค่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} (ที่สมดุลกับ 1 mM $FeSO_4$) ที่เกิดจากน้ำมันที่ทดสอบ 1 มิลลิกรัม เรียกว่า Equivalent concentration หรือเรียกย่อว่า EC ถ้าน้ำมันมีค่า EC สูง แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง สำหรับวิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ แสดงรายละเอียดในภาคผนวก-ง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส

ทำการศึกษาโดยเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างน้ำมัน โดยการเจือจางน้ำมัน ด้วยสารผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) pH 6.8 และ Tween 20 ในอัตราส่วนสารผสมต่อน้ำมันเท่ากับ 29 : 1 นำสารละลายที่ได้ไปผสมกับเอนไซม์ไทโรสิเนสแล้วอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่ได้ที่ 492 นาโนเมตร โดย microplate

reader นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า % Tyrosinase inhibition จากสมการต่อไปนี้ โดยใช้ PBS เป็น blank

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \frac{\Delta A_{Blank} - \Delta A_{Sample}}{\Delta A_{Blank}} \text{ X } 100$$

โดย

ΔA_{Blank} หมายถึงค่าความแตกต่างการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเอนไซม์ไทโรสิเนส และ L-dopa กับหลุมที่มีแต่ L-dopa แต่ไม่มีเอนไซม์โดยทั้งสองหลุมไม่มีน้ำมันที่ทดสอบ

ΔA_{Sample} หมายถึงค่าความแตกต่างการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเอนไซม์ไทโรสิเนส และ L-dopa กับหลุมที่มีแต่ L-dopa แต่ไม่มีเอนไซม์โดยทั้งสองหลุมบรรจุน้ำมันที่ทดสอบลงไปด้วย

การศึกษา Phase diagram

การสร้าง phase diagram ของน้ำมันทั้งสองชนิด ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ชนิดของสารลดแรงตึงผิว
2. อิเลคโทรไลท์
3. ความเป็นกรดด่าง (pH)

โดยเริ่มทดลองศึกษากับน้ำมันตะไคร้ก่อน โดยการชั่งผสมสารต่าง ๆ คือน้ำมันตะไคร้ สารลดแรงตึงผิว (และสารช่วยลดแรงตึงผิว) และน้ำ ตามตารางที่ 2-1 ถึงตารางที่ 2-8 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมไมโครอิมัลชันจากระบบดังกล่าว ประเมินแต่ละสูตรตำรับด้วยตาเปล่า โดยสังเกตสี ความใส ความขุ่น และการแยกชั้นหรือการเกิดเจล จากนั้นนำผลที่ได้มาพิจารณาเพื่อสร้าง phase diagram โดยวิธี titration

วิธี titration ทำได้โดยผสม surfactant กับ co-surfactant ในอัตราส่วนคงที่ หลังจากนั้นนำสารผสมที่เตรียมได้มาผสมกับน้ำมันในอัตราส่วนต่างๆ หลังจากนั้นค่อยๆ titrate ด้วยน้ำทีละหยดลงไป แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) จนกระทั่งเกิดเป็นไมโครอิมัลชัน ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าว่าใสเป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 2-1 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในระบบ ที่มี Tween 20 : Ethanol = 1:1

ระบบที่	สูตร	น้ำหนักสารในแต่ละระบบ (กรัม)			
		Tween20-Ethanol	น้ำมัน	น้ำ	รวม
1	T(1)E(1)-1	2.0138	0.0478	0.0000	2.0616
2	T(1)E(1)-2	2.0016	0.0471	0.0485	2.0972
3	T(1)E(1)-3	2.0066	0.0437	0.0873	2.1376
4	T(1)E(1)-4	2.0137	0.0443	0.5279	2.5859
5	T(1)E(1)-5	2.0111	0.0468	1.0191	3.077
6	T(1)E(1)-6	2.0108	0.0433	2.0178	4.0719
7	T(1)E(1)-7	2.0061	0.0504	3.0264	5.0829
8	T(1)E(1)-8	2.0004	0.0434	4.0013	6.0451
9	T(1)E(1)-9	2.0325	0.0539	5.0391	7.1255
10	T(1)E(1)-10	2.0072	0.0430	6.005	8.0552
11	T(1)E(1)-11	2.0185	0.0409	7.0064	9.0658
12	T(1)E(1)-12	2.0164	0.0433	8.0116	10.0713
13	T(1)E(1)-13	2.0051	0.0439	0.0011	2.0501

ตารางที่ 2-2 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในระบบ ที่มี Tween 20 : Ethanol = 2:1

ระบบที่	สูตร	น้ำหนักสารในแต่ละระบบ (กรัม)			
		Tween20-Ethanol	น้ำมัน	น้ำ	รวม
1	T(2)E(1)-1	2.0023	0.0437	0.0000	2.0460
2	T(2)E(1)-2	1.9974	0.0429	0.0384	2.0787
3	T(2)E(1)-3	1.9975	0.0425	0.1050	2.1450
4	T(2)E(1)-4	1.9990	0.0462	0.5104	2.5556
5	T(2)E(1)-5	1.9972	0.0478	1.0206	3.0656
6	T(2)E(1) -6	2.0030	0.0428	1.5142	3.5600
7	T(2)E(1)-7	2.0097	0.0417	2.0096	4.0610
8	T(2)E(1)-8	1.9986	0.0464	3.0088	5.0538
9	T(2)E(1)-9	2.0078	0.0448	4.0387	6.0913
10	T(2)E(1)-10	2.0005	0.0478	5.0268	7.0751
11	T(2)E(1)-11	2.0088	0.0477	6.0173	8.0738
12	T(2)E(1)-12	2.0084	0.0471	7.0076	9.0631
13	T(2)E(1)-13	2.0081	0.0442	8.0006	10.0529
14	T(2)E(1)-14	2.0119	0.0455	9.0300	11.0874

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 2-3 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในระบบ ที่มี Tween 20 : Ethanol = 3:1

ระบบที่	สูตร	น้ำหนักสารในแต่ละระบบ (กรัม)			
		Tween20-Ethanol	น้ำมัน	น้ำ	รวม
1	T(3)E(1)-1	2.0099	0.0403	0.0000	2.0502
2	T(3)E(1)-2	2.0088	0.0444	0.0401	2.0933
3	T(3)E(1)-3	2.0156	0.0471	0.5299	2.5926
4	T(3)E(1)-4	2.0106	0.0459	1.0696	3.1261
5	T(3)E(1)-5	2.0107	0.0486	2.0051	4.0644
6	T(3)E(1)-6	2.0044	0.0451	3.0003	5.0498
7	T(3)E(1)-7	2.0110	0.0491	4.0107	6.0708
8	T(3)E(1)-8	2.0125	0.0429	5.0005	7.0559
9	T(3)E(1)-9	2.0068	0.0439	6.0051	8.0558
10	T(3)E(1)-10	2.0063	0.0439	7.0035	9.0537
11	T(3)E(1)-11	2.0030	0.0454	8.0098	10.0582
12	T(3)E(1)-12	2.0083	0.0452	9.0175	11.0710

ตารางที่ 2-4 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในระบบ ที่มี Tween 20 : Ethanol = 9:1

ระบบที่	สูตร	น้ำหนักสารในแต่ละระบบ (กรัม)			
		Tween20-Ethanol	น้ำมัน	น้ำ	รวม
1	T(9)E(1)-1	2.0123	0.0488	0.0000	2.0611
2	T(9)E(1)-2	2.0095	0.0467	0.0369	2.0931
3	T(9)E(1)-3	2.0063	0.0454	0.0912	2.1429
4	T(9)E(1)-4	2.0153	0.0464	0.5246	2.5863
5	T(9)E(1)-5	2.0091	0.0451	1.0237	3.0779
6	T(9)E(1)-6	2.0054	0.045	2.0075	4.0579
7	T(9)E(1)-7	2.0133	0.0441	3.0083	5.0657
8	T(9)E(1)-8	2.0184	0.0445	4.007	6.0699
9	T(9)E(1)-9	2.0200	0.0477	5.0133	7.0810
10	T(9)E(1)-10	2.0090	0.0500	6.0049	8.0639
11	T(9)E(1)-11	2.0112	0.0432	7.0089	9.0633
12	T(9)E(1)-12	3.9823	0.0411	8.0056	12.029
13	T(9)E(1)-13	2.0146	0.0448	9.0089	11.0683

ตารางที่ 2-5 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในระบบ ที่มี Tween 80 : Ethanol = 1:1

ระบบที่	สูตร	น้ำหนักสารในแต่ละระบบ (กรัม)			
		Tween20-Ethanol	น้ำมัน	น้ำ	รวม
1	T80(1)E(1)-1	2.0094	0.0468	0.0000	2.0562
2	T80(1)E(1)-2	2.0103	0.0806	0.0000	2.0909
3	T80(1)E(1)-3	2.0062	0.0754	0.0695	2.1511
4	T80(1)E(1)-4	2.0108	0.0511	0.0419	2.1038
5	T80(1)E(1)-5	2.0032	0.0752	0.0679	2.1463
6	T80(1)E(1)-6	2.0036	0.0575	0.0690	2.1301
7	T80(1)E(1)-7	2.0121	0.0881	0.5040	2.6042
8	T80(1)E(1)-8	2.0134	0.0688	0.1000	2.1822
9	T80(1)E(1)-9	2.0012	0.0765	1.0053	3.0830
10	T80(1)E(1)-10	2.0115	0.0820	2.0074	4.1009
11	T80(1)E(1)-11	2.0048	0.0790	5.0078	7.0916
12	T80(1)E(1)-12	2.0081	0.064	7.0292	9.1013
13	T80(1)E(1)-13	2.0075	0.0553	0.1486	2.2114
14	T80(1)E(1)-14	2.0095	0.0779	0.5464	2.6338

ตารางที่ 2-6 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในระบบ ที่มี Tween 80 : Ethanol = 2:1

ระบบที่	สูตร	น้ำหนักสารในแต่ละระบบ (กรัม)			
		Tween20-Ethanol	น้ำมัน	น้ำ	รวม
1	T80(2)E(1)-1	2.0071	0.0574	0.0000	2.0645
2	T80(2)E(1)-2	2.0023	0.0847	0.0000	2.0870
3	T80(2)E(1)-3	2.0091	0.0738	0.0544	2.1373
4	T80(2)E(1)-4	2.0102	0.0705	0.0829	2.1636
5	T80(2)E(1)-5	2.0050	0.0780	0.1250	2.2080
6	T80(2)E(1)-6	2.0068	0.0875	0.1060	2.2003
7	T80(2)E(1)-7	2.0075	0.0854	0.5026	2.5955
8	T80(2)E(1)-8	3.0128	0.0819	0.1056	3.2003
9	T80(2)E(1)-9	2.0231	0.0869	1.0075	3.1175
10	T80(2)E(1)-10	2.0040	0.0887	2.0138	4.1065
11	T80(2)E(1)-11	2.0072	0.0841	5.0224	7.1137
12	T80(2)E(1)-12	2.0098	0.0888	7.0107	9.1093
13	T80(2)E(1)-13	2.0028	0.0909	0.0827	2.1764

ตารางที่ 2-7 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในระบบ ที่มี Tween 80 : Ethanol = 3:1

ระบบที่	สูตร	น้ำหนักสารในแต่ละระบบ (กรัม)			
		Tween20-Ethanol	น้ำมัน	น้ำ	รวม
1	T80(3)E(1)-1	2.0106	0.0985	0.0000	2.1091
2	T80(3)E(1)-2	2.0034	0.0933	0.0506	2.1473
3	T80(3)E(1)-3	2.0172	0.0900	0.1068	2.2140
4	T80(3)E(1)-4	2.018	0.0938	0.0751	2.1869
5	T80(3)E(1)-5	2.0139	0.0977	0.0618	2.1734
6	T80(3)E(1)-6	2.0065	0.0918	0.1126	2.2109
7	T80(3)E(1)-7	2.0063	0.0965	0.5128	2.6156
8	T80(3)E(1)-8	2.006	0.0959	1.0085	3.1104
9	T80(3)E(1)-9	2.0109	0.0962	2.0503	4.1574
10	T80(3)E(1)-10	2.0020	0.0992	5.0028	7.1040
11	T80(3)E(1)-11	2.0136	0.0992	7.0104	9.1232

ตารางที่ 2-8 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในระบบ ที่มี Tween 80 : Ethanol = 9:1

ระบบที่	สูตร	น้ำหนักสารในแต่ละระบบ (กรัม)			
		Tween20-Ethanol	น้ำมัน	น้ำ	รวม
1	T80(9)E(1)-1	2.0058	0.1589	0.0000	2.1647
2	T80(9)E(1)-2	2.0045	0.1735	0.0000	2.178
3	T80(9)E(1)-3	2.0084	0.1802	0.0565	2.2451
4	T80(9)E(1)-4	2.0023	0.1881	0.0344	2.2248
5	T80(9)E(1)-5	2.0066	0.1607	0.0509	2.2182
6	T80(9)E(1)-6	2.0075	0.1635	0.0854	2.2564
7	T80(9)E(1)-7	2.0052	0.1648	0.5058	2.6758
8	T80(9)E(1)-8	2.0088	0.1658	0.1153	2.2899
9	T80(9)E(1)-9	2.0052	0.1644	1.0013	3.1709
10	T80(9)E(1)-10	2.0144	0.1641	2.0068	4.1853
11	T80(9)E(1)-11	2.0166	0.1656	5.0021	7.1843
12	T80(9)E(1)-12	2.0125	0.1629	7.0019	9.1773
13	T80(9)E(1)-13	2.0031	0.1614	0.5044	2.6689
14	T80(2)E(1)-14	2.0112	0.1666	0.7522	2.9300

การเตรียมระบบไมโครอิมัลชัน

การศึกษาในขั้นตอนนี้ทำโดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ไมโครอิมัลชันชนิด o/w ของน้ำมันทั้ง 2 ชนิด ซึ่งสามารถคัดเลือกได้จาก phase diagram ของน้ำมันทั้งสอง โดยกำหนดให้มีน้ำมัน 10% ทำการเตรียมอิมัลชันแบบดั้งเดิมของน้ำมันทั้งสองที่มีน้ำมัน 10% เช่นกัน เพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบกับระบบไมโครอิมัลชัน

ในการเตรียมไมโครอิมัลชันทำโดยการคนผสมกันเบา ๆ ไม่อาศัยพลังงานใด ๆ แต่ในการเตรียมอิมัลชันแบบดั้งเดิม ทำโดยอาศัยพลังงานจากเครื่อง high pressure homoginizer ทำการประเมินผลของแต่ละระบบโดยศึกษาสมบัติต่อไปนี้

1. ลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่า เช่นความใส ความขุ่น และการแยกชั้นหรือการเกิดเจล
2. ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคของวัตภาคภายใน ด้วยเครื่อง PCS
3. การนำไฟฟ้า ด้วยเครื่องวัดการนำไฟฟ้า (conductivity meter)

การศึกษาความคงสภาพของไมโครอิมัลชัน

ทำการศึกษาความคงสภาพของไมโครอิมัลชันที่มีไม่มีตัวยาที่คัดเลือกได้ โดยเตรียมและเก็บไว้ในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้องคือที่ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิห้องคือที่ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องคือประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 เดือน รวมทั้งเก็บในสภาวะอุณหภูมิผกผันหรือที่เรียกว่า heating cooling โดยเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายมาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เรียกว่าเป็น 1 รอบอุณหภูมิผกผัน ทำการทดลองจำนวน 6 รอบอุณหภูมิผกผัน เปรียบเทียบกับระบบอิมัลชันแบบแบบดั้งเดิม ประเมินสมบัติของระบบดังต่อไปนี้

1. การแยกชั้นของวัตภาคน้ำและวัตภาคน้ำมัน โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า
2. การเกิดตะกอนของตัวยา โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า
3. การเปลี่ยนแปลงสีของระบบ โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า