

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 การย่อยแป้งดิบโดยแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส

4.1.1. ลักษณะโครงสร้างแกรนูลของแป้ง

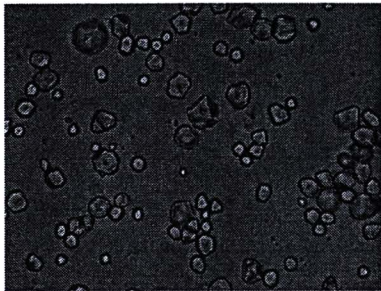
การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เริ่มต้นจากการนำผงแป้งดิบ (native starch) ไปศึกษาลักษณะโครงสร้างของเม็ดแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์แสงโพลาไรซ์ดิง (รูปที่ 4.1) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแป้งทั้ง 4 ชนิดที่นำมาศึกษามีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 4.1)

ลักษณะของเม็ดแป้งแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงโพลาไรซ์พบว่าเม็ดแป้งดิบทั้ง 4 ชนิดยังคงแสดงคุณสมบัติของการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ (birefringence) ทำให้มองเห็นเม็ดแป้งในลักษณะที่เป็นรูปกากบาท (maltese cross) ซึ่งเกิดจากลักษณะโครงสร้างที่เป็นระเบียบที่อยู่ภายในเม็ดแป้ง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแป้งดิบจะมีสมบัติที่เปลี่ยนแปลงได้ถ้าเม็ดแป้งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำถูกให้ความร้อนซึ่งจะส่งผลให้พันธะไฮโดรเจนในเม็ดแป้งถูกทำลายทำให้โครงสร้างที่เป็นระเบียบของเม็ดแป้งถูกทำลายเกิดการสูญเสียสมบัติของการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ ลักษณะกากบาทในเม็ดแป้งจะลดลงหรือหายไป การวิจัยในครั้งนี้มีการเตรียมอาหารวุ้นดัดแปรเพื่อใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัส โดยการใช้แป้งดิบทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวไปผสมในส่วนผสมของอาหารวุ้นแทนน้ำตาลกลูโคสซึ่งปกติจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีการเตรียมโดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ซึ่งอุณหภูมิและความดันนี้จะส่งผลทำให้ความเป็นผลึกและโครงสร้างที่เป็นระเบียบของเม็ดแป้งดิบถูกเปลี่ยนสภาพไปซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะต้องรักษาสภาพเดิมของเม็ดแป้งไว้ การทดลองครั้งนี้จึงต้องปรับเปลี่ยนการเตรียมอาหารวุ้นที่มีแป้งเป็นส่วนผสมโดยการผสมแป้งในอาหารวุ้นภายหลังที่เตรียมด้วยส่วนผสมและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยเมื่ออาหารวุ้นมีอุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิ 50°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่วุ้นยังไม่แข็งตัวและผงแป้งสามารถกระจายตัวอยู่ในอาหารได้ทั่วทั้ง plate แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีการผสมแป้งลงในอาหารวุ้นที่อุณหภูมิ 50°C ก็ต้องมีการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของแป้งว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ โดยทำการตรวจสอบด้วยวิธีเดียวกันกับที่ใช้กับแป้งดิบ ผลการศึกษาพบว่าโครงสร้าง ขนาดและลักษณะของเม็ดแป้งภายใต้การเตรียมที่อุณหภูมิ 50°C ของแป้งทั้ง 4 ชนิด ไม่พบการเปลี่ยนแปลงไปของรูปร่างลักษณะของเม็ดแป้ง ยังคงมีความเป็นผลึก ความเป็นระเบียบของโครงสร้างเม็ดแป้งทำให้มองเห็นลักษณะ birefringence ของเม็ดแป้งทั้ง 4 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โพลาไรซ์ (รูปที่ 4.2) ทำให้แน่ใจได้ว่าอาหารวุ้นดัดแปรผสมแป้งดิบแทนน้ำตาลกลูโคสนี้สามารถนำไปใช้ทดสอบความสามารถในการ

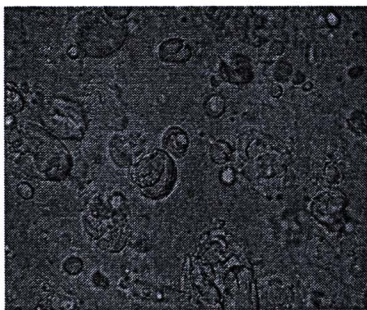
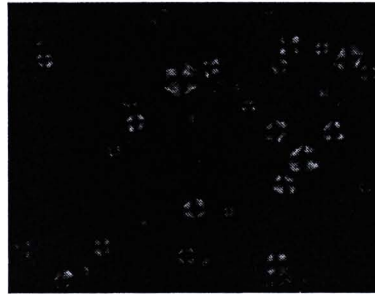
เจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสได้โดยแบ้งที่ใช้ยังคงรูปเดิมอยู่ และเป็นการทำให้มั่นใจว่าแบ้งที่อยู่ในรูปธรรมชาติสามารถที่จะนำไปใช้เป็นอาหารให้กับเชื้อในกลุ่มของ probiotic ได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับข้อมูลโดยทั่วไปที่ว่า แบ้งเมื่อถูกทำให้ร้อนขึ้นภายใต้สภาวะที่มีน้ำมากเพียงพอ แกรนูลแบ้งจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสภาพโครงสร้างที่เป็นระเบียบที่มีอยู่ภายในแกรนูลแบ้งไปสู่ความไม่เป็นระเบียบภายใต้กระบวนการที่เรียกว่า gelatinization ซึ่งจะเกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกันไปโดยขึ้นกับชนิดของแบ้ง การเปลี่ยนแปลงมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่ของน้ำเข้าไปสู่แกรนูลโดยเฉพาะในบริเวณที่เป็นส่วนอสังฐาน เกิดการอ้วนน้ำและพองตัว มีการสูญเสียคุณสมบัติ birefringence และความเป็นผลึกรวมทั้งมีการรั่วออกมาของอะมิโลส และต่อมาเกิดการเกิดเป็น paste ต่อมา อุณหภูมิที่ก่อให้เกิด gelatinization และทำให้แกรนูลถูกทำลายไปโดยส่วนใหญ่จะเกิดที่อุณหภูมิมากกว่า 50 °ซ (Zhang และคณะ, 2005) แต่ในการศึกษาในครั้งนี้มีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ส่วนประกอบของแบ้งแทนกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิประมาณ 50 °ซ จึงไม่ทำให้โครงสร้างของแกรนูลแบ้งมีการเปลี่ยนแปลงไป



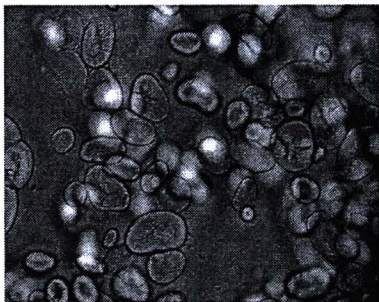
แป้งข้าวเหนียว



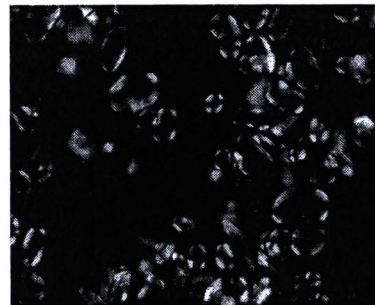
แป้งข้าวโพด



แป้งมันฝรั่ง



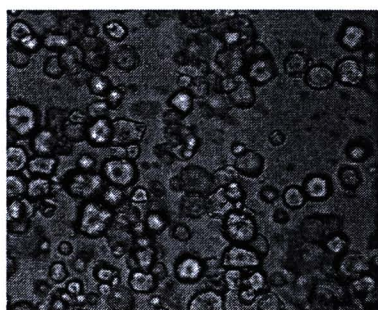
แป้งถั่วเขียว



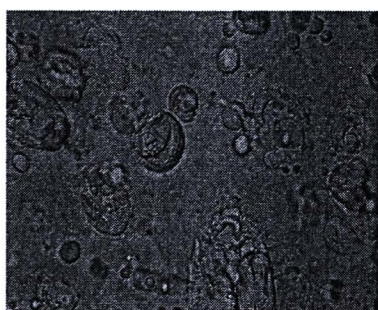
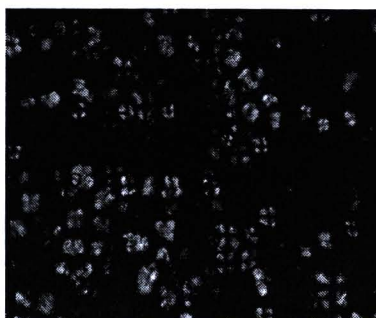
รูปที่ 4.1 ลักษณะเม็ดแป้งดิบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (ซ้าย) และกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงโพลาไรซ์ (ขวา) ที่กำลังขยาย $\times 40$



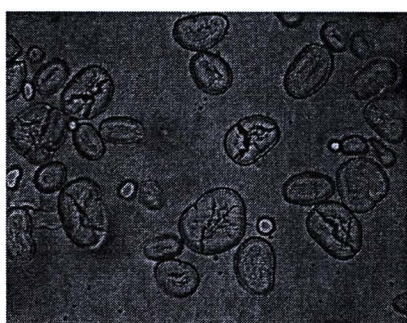
แป้งข้าวเหนียว



แป้งข้าวโพด



แป้งมันฝรั่ง



แป้งถั่วเขียว



รูปที่ 4.2 ลักษณะเม็ดแป้งในอาหารสุนัขแห้งที่ผสมที่อุณหภูมิ 50 °ซ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ธรรมดา (ซ้าย) และกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงโพลาไรซ์ (ขวา) ที่กำลังขยาย $\times 40$

ตารางที่ 4.1 รูปร่างและลักษณะของเม็ดแป้งชนิดต่าง ๆ

แป้ง	รูปร่างลักษณะ
ข้าวเหนียว	เม็ดเล็ก มีหลายเหลี่ยม เกะกันเป็นกลุ่ม
ข้าวโพด	เม็ดใหญ่ บางเม็ดมี 4 – 5 เหลี่ยม บางเม็ดกลม
มันฝรั่ง	เม็ดยาวรี บริเวณผิวมีรูปคล้ายครึ่งวงกลม
ถั่วเขียว	เม็ดใหญ่ รูปร่างยาวรีคล้ายไข่ มีรอยแยกบนผิว

4.1.2 การเจริญเติบโตและการย่อยแป้งดิบของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส

หลังจากที่แยกได้เชื้อเดี่ยวบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสทั้ง 15 ชนิดที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อดูความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารแข็งที่ใช้แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง และ แป้งถั่วเขียว ที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แทนกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อที่ใช้ในปริมาณ 2% (w/v) ผลการทดลองพบว่า แลคโตบาซิลลัสทั้ง 15 ชนิด มีความสามารถในการเจริญและความสามารถในการย่อยแป้งทั้ง 4 ชนิดได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2)

จากผลการทดสอบเพื่อหาความสามารถในการเจริญเติบโตและการย่อยแป้งดิบทั้ง 4 ชนิดของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสทั้ง 15 ชนิดบนอาหารแข็งที่ใช้แป้งดิบเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสพบว่าแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสเกือบทุกสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นสามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีแป้งดิบเป็นส่วนผสมได้ เพียงแต่มีความแตกต่างกันที่ระดับความสามารถในการเจริญเติบโตโดยพิจารณาได้จากความหนาของโคโลนีบนอาหารในกรณีของกลูโคสและแป้งมันฝรั่งตามลำดับ (รูปที่ 4.3–4.4)

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตและการย่อยแป้งดิบของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งดิบ 2% w/v เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส

<i>Lactobacillus</i> spp. / แป้ง	กลูโคส	ข้าวเหนียว	ข้าวโพด	มันฝรั่ง	ถั่วเขียว
<i>L. acidophilus</i>	+++	++	+++	++	+++
<i>L. amylovorus</i>	+	++++	++++	+++	++
<i>L. bulgaricus</i>	+++	+	++	++	++
<i>L. brevis</i> (subsp. <i>brevis</i>)	+	+	+	++	+
<i>L. casei</i>	+++	+	++	+++	+
<i>L. cellobiosus</i>	+++	++	++	+++	+++
<i>L. delbrueckii</i> (subsp. <i>bulgaricus</i>)	+++	+	+	++	+
<i>L. delbrueckii</i> (subsp. <i>lactis</i>)	+++	++	+	+	++
<i>L. fermentum</i>	++	+	+	+++	+
<i>L. halotolerans</i>	++	++	+	++	+
<i>L. jensenii</i>	+++	+	++	+++	+
<i>L. lactis</i>	+++	+	+	+++	++
<i>L. plantarum</i>	+++	++	+++	+++	+++
<i>L. sake</i>	+	+	+	++	+
<i>L. salivarius</i> (subsp. <i>salivarius</i>)	+	+	+	+++	+

หมายเหตุ: - ไม่มีการเจริญของเชื้อ
 + การเจริญของเชื่อน้อย
 ++ การเจริญของเชื้อปานกลาง
 +++ การเจริญของเชื้อมาก
 ++++ การเจริญของเชื้อมากและเกิดวงใส

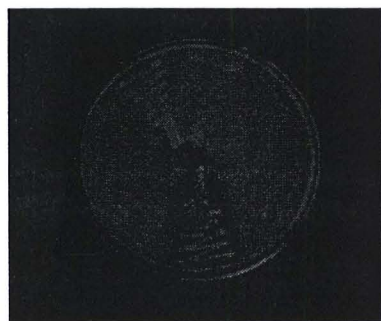


รูปที่ 4.3. การเจริญของ *Lactobacillus* spp. บนอาหารแข็งที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

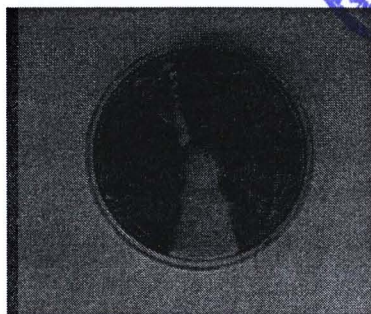


รูปที่ 4.4 การเจริญของ *Lactobacillus* spp. บนอาหารแข็งที่มีแป้งมันฝรั่งดิบเป็นแหล่งคาร์บอน

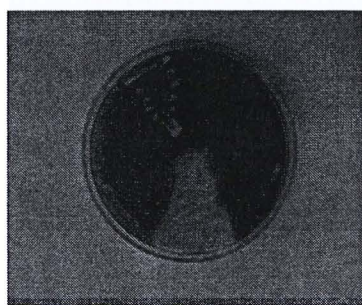
เมื่อพิจารณาในประเด็นการย่อยแป้งนอกเหนือไปจากการเจริญเติบโตซึ่งเชื่อที่ทุกตัวสามารถเจริญเติบโตได้นั้น จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีเพียงแบคทีเรีย *L. amylovorus* ชนิดเดียวเท่านั้นที่มีความสามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีแป้งข้าวโพด และแป้งข้าวเหนียวดิบได้ดีพร้อมกับมีความสามารถในการย่อยแป้งได้จนเกิดวงใส (clear zone) และเมื่อทดสอบว่ายังคงมีแป้งคงเหลืออยู่หรือไม่โดยการใช้วิธีของ Michael และ Peleazar (1995) ด้วยการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารแป้ง ปรากฏว่าวงใสรอบ ๆ โคโลนีจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินซึ่งแสดงว่าไม่มีแป้งอยู่ในบริเวณนั้นทำให้สามารถสรุปได้ว่าการย่อยแป้งเกิดขึ้น แต่พื้นที่นอกออกไปยังคงปรากฏเป็นสีน้ำเงินซึ่งแสดงถึงว่ายังคงมีแป้งอยู่ (รูปที่ 4.5-4.6) ที่แยกให้เห็นชัดเจนเมื่อมีเชื้อ *L. amylovorus* อยู่ชนิดเดียว ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่มีการศึกษาของ Giraud และคณะ (1994) ที่พบว่า *L. amylovorus* เป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถย่อยแป้งได้



แป้งข้าวเหนียว



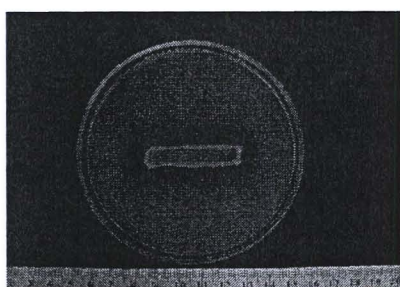
แป้งข้าวโพด



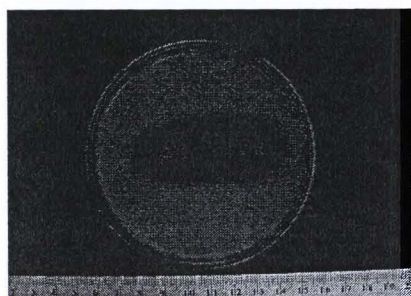
ก่อนหยดไอโอดีน

หลังหยดไอโอดีน

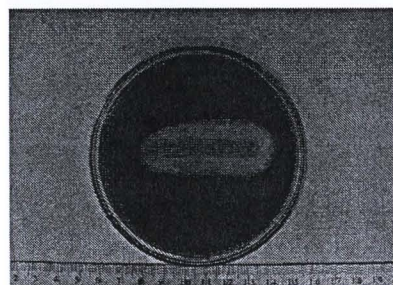
รูปที่ 4.5 การเจริญและการย่อยแป้งของ *L. amylovorus* บนอาหารแข็งที่มีแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน (บริเวณใส)



แป้งข้าวเหนียว



แป้งข้าวโพด



ก่อนหยดไอโอดีน

หลังหยดไอโอดีน

รูปที่ 4.6 ความสามารถในการย่อยแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวโพดของ *L. amylovorus*

จากความสามารถในการเจริญเติบโตและการย่อยแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวโพดที่เกิดขึ้นเป็นวงใสล้อมรอบเชื้อ *L. amylovorus* ทำให้วิเคราะห์ได้ว่าแป้งทั้งสองชนิดนี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปเตรียมให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมต่อไปเพื่อนำส่งแป้งให้ไปสู่ลำไส้ใหญ่โดยรูปแบบนี้สามารถป้องกันไม่ให้แป้งหลุดลอกออกมาในบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแต่สามารถที่จะปลดปล่อยแป้งในบริเวณลำไส้ใหญ่เพื่อให้เชื้อจำพวก probiotics ที่อยู่ในบริเวณนั้นใช้เป็นอาหารและมีการผลิตพวกรดไขมันสายสั้นที่เป็นประโยชน์ต่อไป ดังนั้นในการทดลองศึกษาขั้นตอนต่อไปจึงมีการเคลือบหรือปกป้องแป้งเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อส่งเสริมสุขภาพต่อไป โดยจะต้องสามารถทนต่อการถูกย่อยจากกรดในกระเพาะอาหารและน้ำย่อยในลำไส้เล็กและสามารถผ่านเข้าไปยังลำไส้ใหญ่และปล่อยแป้งออกมาทำให้สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์พวกโพรไบโอติก (Probiotics) ได้ ซึ่งสามารถที่จะเพิ่มมูลค่าให้กับแป้งให้อยู่ในรูปแบบอาหารเสริมสุขภาพ ดังนั้นจากผลการศึกษาค้นคว้าจึงเลือกใช้แป้งข้าวเหนียวเป็นตัวอย่างในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปเนื่องจากผลการทดลองที่ปรากฏว่าเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและถูกย่อยได้โดยเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองอีกทั้งแป้งข้าวเหนียวที่มาจากข้าวเหนียวซึ่งเป็นข้าวที่นิยมบริโภคกันมากรองจากข้าวเจ้าโดยเฉพาะประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

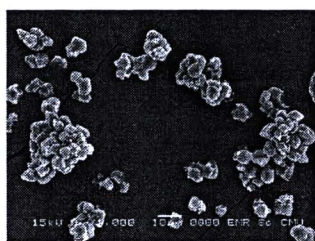
4.2 ลักษณะโครงสร้างของแป้งข้าวเหนียว

4.2.1 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

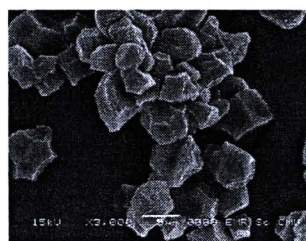
ลักษณะของแป้งข้าวเหนียวที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาจะมีลักษณะเป็นเม็ดเหลี่ยม ๆ เล็ก ๆ เกาะกันเป็นกลุ่ม มีขนาดประมาณ 3 – 5 ไมครอน และเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์พบว่าเม็ดแป้งจะมีคุณสมบัติการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ (Birefringence) เห็นเป็นรูปกากบาท (Maltese cross) ได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.1

4.2.2 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ผลการทดลองพบว่าแป้งข้าวเหนียวจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กและเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน มีลักษณะหลายเหลี่ยม พื้นผิวค่อนข้างเรียบ (รูปที่ 4.7)



(A)



(B)

รูปที่ 4.7 ลักษณะเม็ดแป้งข้าวเหนียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

(A) x1000 (B) x3000

4.3 ประเมินคุณสมบัติของแกรนูล

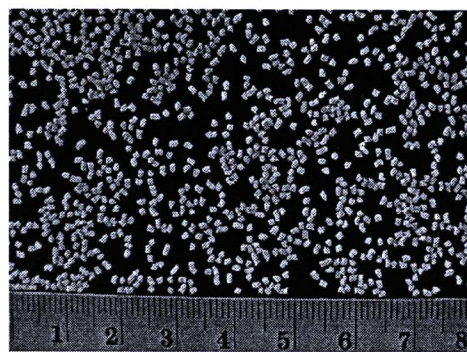
หลังจากที่มีการนำแป้งข้าวเหนียวที่มีผลการศึกษาว่า *L. amylovorus* สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสามารถย่อยได้ด้วย ซึ่งเตรียมในรูปของแกรนูลเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อส่งเสริมสุขภาพต่อไป ได้มีการตรวจสอบคุณสมบัติของแกรนูลที่เตรียมขึ้นได้ผลดังนี้

4.3.1 ลักษณะภายนอกของแกรนูล

ขนาดของแกรนูลแป้งข้าวเหนียวที่เตรียมขึ้นโดยใช้ PVP K – 90 เป็นสารช่วยยึดเกาะในรูปของสารละลาย 10 % w/v เพื่อให้ได้ก้อนผสมที่เปียกพอเหมาะและนำไปกดผ่านแรงเบอร์ 16 และนำไปอบแห้งจะได้แกรนูลที่มีขนาดความยาวมากกว่าแกรนูลที่ผ่านการลดขนาดด้วยแรงเบอร์ 20 ประมาณ 5-6 เท่า (รูปที่ 4.8)



ก่อนลดขนาด



หลังลดขนาด

รูปที่ 4.8 ลักษณะและขนาดของแกรนูลแป้งข้าวเหนียวก่อนและหลังการลดขนาดด้วยแรงเบอร์ 20

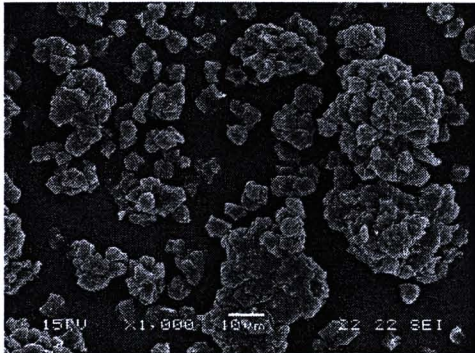
4.3.2 ลักษณะของแกรนูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ในการดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้นำแกรนูลขนาด 20 mesh ไปบดให้มีขนาดเล็กลงแล้วจึงนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าโดยทั่วไปลักษณะรูปร่างและโครงสร้างของเม็ดแป้งจะเหมือนกับของแป้งข้าวเหนียวดิบ แต่จะมีลักษณะที่ต่างไปจากเดิมคือมีลักษณะของการเกาะกลุ่มกันของเม็ดแป้งเป็นจำนวนมากและมีขนาดของกลุ่มที่ใหญ่ (รูปที่ 4.9)

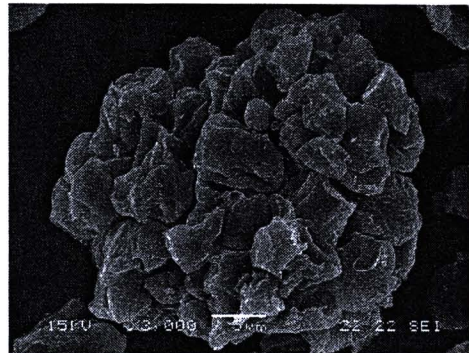
4.3.3 ความแข็งของแกรนูล

จากการวัดความแข็งของแกรนูลแป้งข้าวเหนียวที่คัดขนาด 20 mesh โดยความแข็งของแกรนูลที่วัดได้จากการวางตุ้มน้ำหนักบนแกรนูลเริ่มตั้งแต่ตุ้มน้ำหนักน้อยไปจนถึงตุ้มน้ำหนักมากที่ทำให้

แกรนูลนั้นแตกออก โดยใช้ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 50 แกรนูล จากการศึกษาพบว่า แกรนูลขนาด 20 mesh ที่เตรียมได้ในครั้งนี้มีค่าความแข็ง 289.45 ± 21.24 กรัม เป็นระดับความแข็งของแกรนูลแบ่งที่ใช้ PVP K-90 (10% w/w) เป็นสารช่วยยึดเกาะโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นอกจากได้แกรนูลที่มีความแข็งและเมื่อทดสอบในเบื้องต้นพบว่าสามารถแตกตัวได้ดีด้วย PVP นอกจากช่วยในการยึดเกาะยังมีคุณสมบัติที่สามารถดูดน้ำเข้าหาตัวได้ดีทำให้ส่งเสริมการแตกตัวของแกรนูลได้ในเวลาที่เหมาะสมอีกด้วย



(A)



(B)

รูปที่ 4.9 ลักษณะของแกรนูลแบ่งข้าวเหนียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

(A) x1000 (B) x3000

4.3.4 ความกร่อนของแกรนูล

หลังจากนำแกรนูลจำนวน 50 เม็ด มาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความกร่อน ผลการทดลองพบว่าแกรนูลมีค่าความกร่อนเฉลี่ยอยู่ที่ 0.37 % โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ค่าความกร่อนที่ได้มีค่าไม่เกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยไม่เกิน 0.8% ตาม BP 1993 ซึ่งคาดว่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำไปเคลือบในขั้นตอนต่อไป

4.4 การเคลือบแกรนูลแบ่งข้าวเหนียว

หลังจากที่ได้มีการศึกษาถึงความเหมาะสมของแกรนูลที่เตรียมขึ้นโดยศึกษาคุณสมบัติในด้านต่างๆ โดยเฉพาะทางด้านความแข็งและความกร่อนของตัวแกรนูลซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำไปเคลือบโดยเฉพาะมีความกร่อนต่ำ เพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางส่งเสริมสุขภาพต่อไป นอกจากนั้นเพื่อให้การเตรียมมีความสม่ำเสมอจึงทำการคัดเลือกให้ได้แกรนูลที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากขึ้นอีกครั้งหนึ่งจากแกรนูลที่เตรียมได้ทั้งหมดหลังการลดขนาดโดยเครื่อง oscillating granulator โดยทำการคัดเอาเฉพาะแกรนูลที่ค้าง

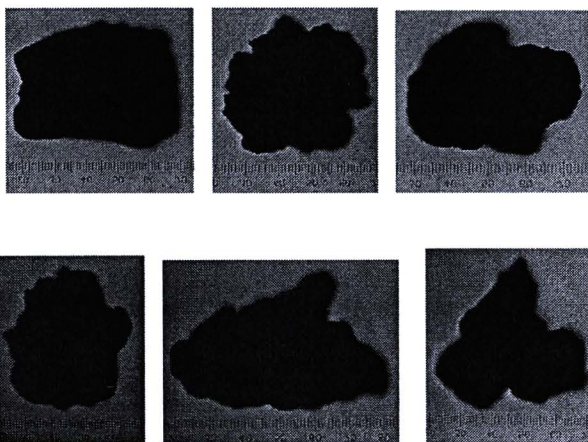
อยู่บนร่ขงนศด 20 mesh เทนนั้นเก็บไว้ศึกษศสำหรับกรเคลือบในชั้นตอนตอไปโดยกรเคลือบฟิล์มและเคลือบเจลศด็น

4.4.1 กรเคลือบฟิล์มแกรนูล

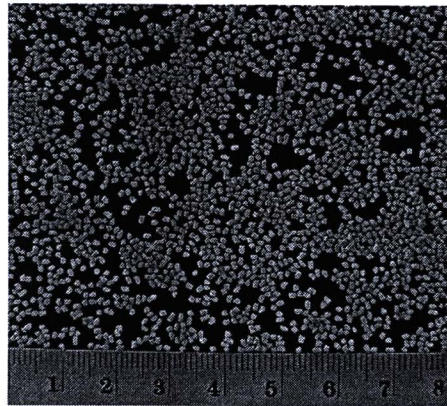
หล้งจศกรกรเคลือบแกรนูลแบ่งโดยวิธีกรเคลือบฟิล์มซึ่งในกรเคลือบครั้งน้ได้ใช้ Eudragit® L100 และ Eudragit S®100 ในลศดส่วนของพอลิเมอร์ท้สองชนิดเป็น 1:1 คมสูตรของน้ยศที่กศหนดไว้ โดย Eudragit® ท้สองชนิดที่้ใช้จะทศน้ที่ปกป้องแกรนูลที่้อยุภยในโดยขึ้นอยุกับคมเป็นกรต-เบส กรเคลือบฟิล์มด้วยพอลิเมอร์โดย้ใช้กรร Glatt ทศกรเคลือบคมสภวศที่ได้กศหนดไว้ และทศกรลุ่มเก็บตวัอย่งแกรนูลที่ถูกรเคลือบคมน้ห้กของแกรนูลที่เพิ่มขึ้นคมน้ห้กที่เพิ่มขึ้น 25, 50 และ 100% จกน้ห้กเร้มต่นของแกรนูลกอนเคลือบ

4.4.1.1 ลักษณะทงภยภพของแกรนูลแบ่งที่เคลือบด้วยฟิล์ม

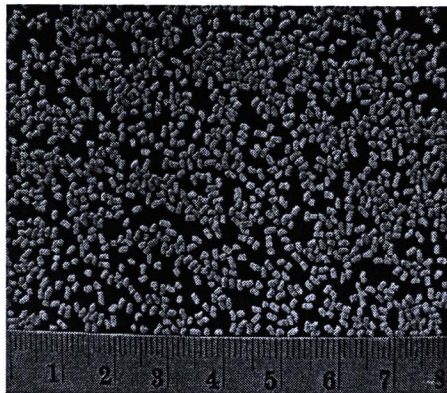
ลักษณะและรูปร่งของแกรนูลกอนกรเคลือบภยใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 4.10) จะมีลักษณะที่ไม่กลม ขรุขระ และรูปร่งที่ตศดท่งกันออกไป สำหรับแกรนูลที่เคลือบได้ (รูปที่ 4.11) จะมีขนาดที่ใหญ่ขึ้นคมน้ห้กที่เพิ่มขึ้นโดยมีลักษณะเช่นตเดียวกันกับแกรนูลกอนเคลือบ คี้อลักษณะของแกรนูลเคลือบจะมีขนาดและรูปร่งตศดท่งกันออกไป เมื่อน้แกรนูลที่เคลือบที่มีคมหนศดท่งกันน้ไปศึกษารูปร่งลักษณะโดย้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดล่องกรศด (SEM) พบว่จะเห็นชั้นของฟิล์มที่เคลือบแกรนูลได้อย่งชัดเจน โดยคมหนศของชั้นฟิล์มที่เคลือบแกรนูลจะเพิ่มขึ้นคมเปอร์เซ็นต์น้ห้กแกรนูลที่เพิ่มขึ้น อย่งไรก็คมฟิล์มที่เคลือบอยุรอบแกรนูลจะมีคมหนศที่ไม่สม่ศมอท้ท้ห้กเม็ดแกรนูล ซึ่งเป็นผลเนื่องมจกแกรนูลกอนกรเคลือบที่มีขนาดรูปร่งไม่กลมและพื้นผิวที่ขรุขระ ทศให้ฟิล์มที่กศดขึ้นที่ไปเคลือบผิวแกรนูลไม่สม่ศมอไปตวัย (รูปที่ 4.12)



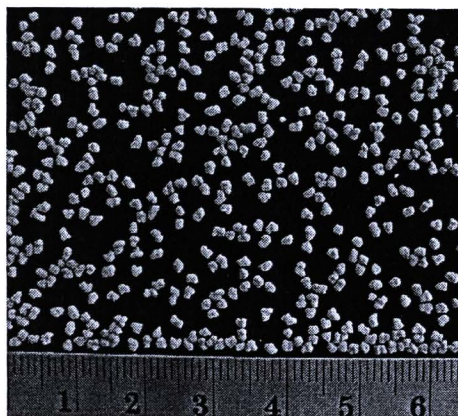
รูปที่ 4.10 ลักษณะภยใต้กล้องจุลทรรศน์ของแกรนูลกอนกรเคลือบ



(ก)

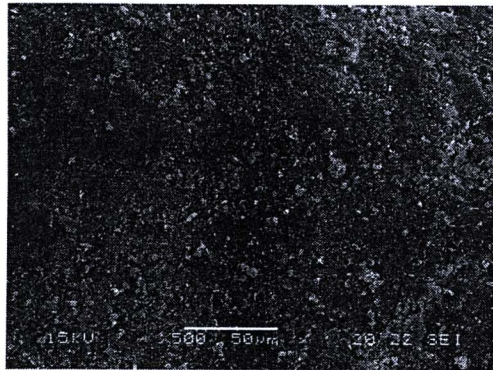


(ข)

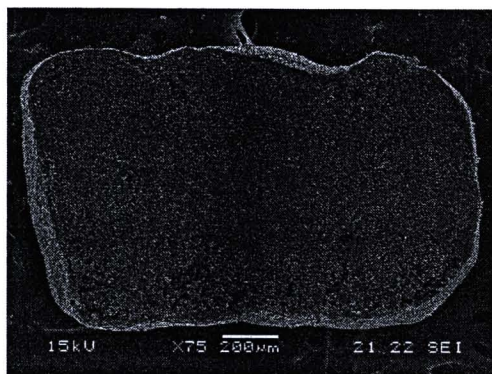


(ค)

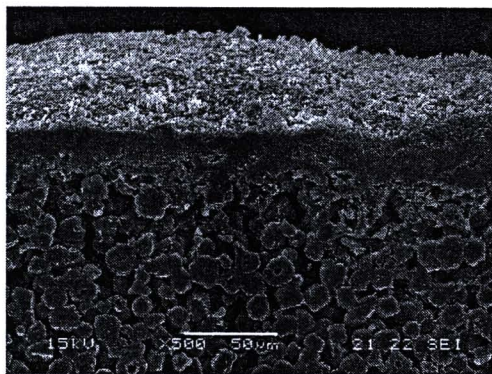
รูปที่ 4.11 ลักษณะและรูปร่างแกรนูลแบ่งที่เคลือบด้วย Eudragit[®] L100 – S 100 (1:1)
ตามน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (ก) 25 % (ข) 50 % (ค) 100% จากน้ำหนักเริ่มต้น



(ก)

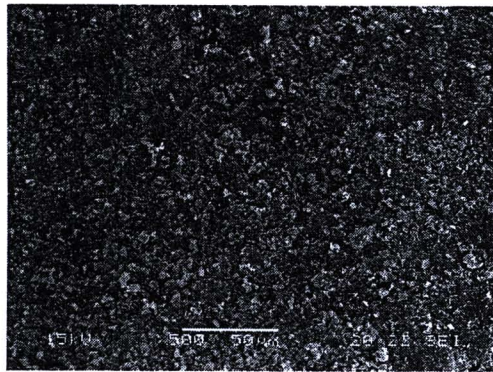


(ข)

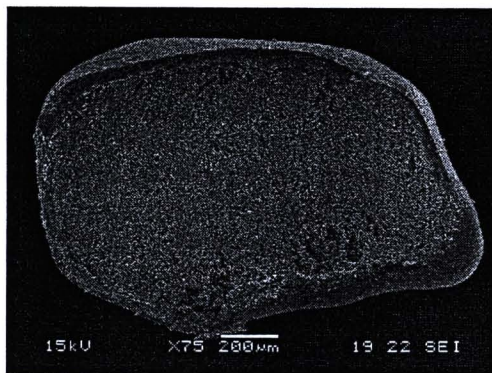


(ค)

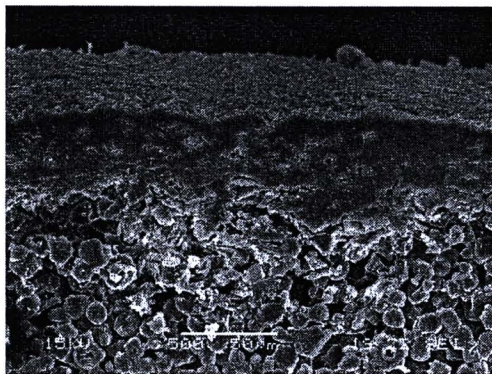
รูปที่ 4.12 ลักษณะแกรนูลเคลือบด้วยฟิล์ม Eudragit® L100 – S100 (1:1) ที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 25% ภายใต้
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ก) พื้นผิวภายนอก (ข) ภาดตัดขวาง (x75) (ค) ภาดตัดขวาง (x500)



(ก)

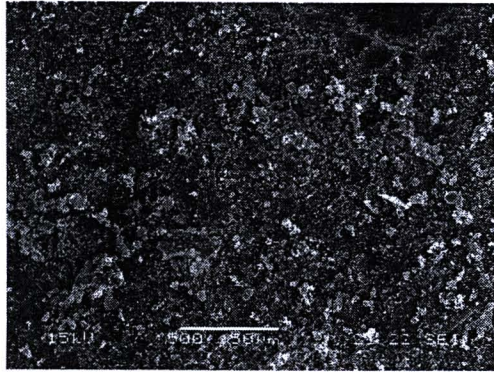


(ข)

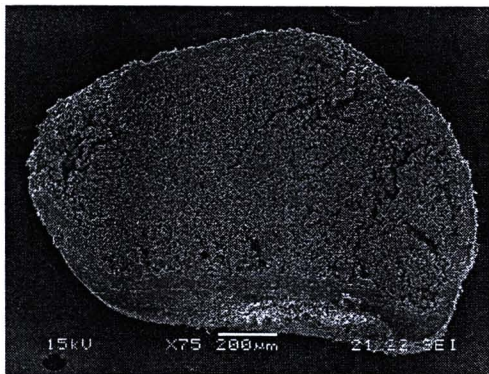


(ค)

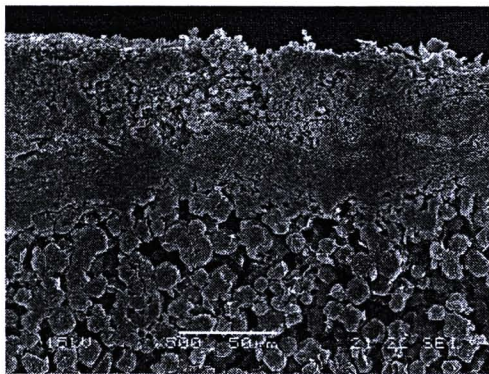
รูปที่ 4.12 (ต่อ) ลักษณะแกรนูลเคลือบด้วยฟิล์ม Eudragit[®] L100 – S100 (1:1) ที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 50%
 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ก) พื้นผิวภายนอก (ข) ภาคตัดขวาง (x75) (ค)
 ภาคตัดขวาง (x500)



(ก)



(ข)



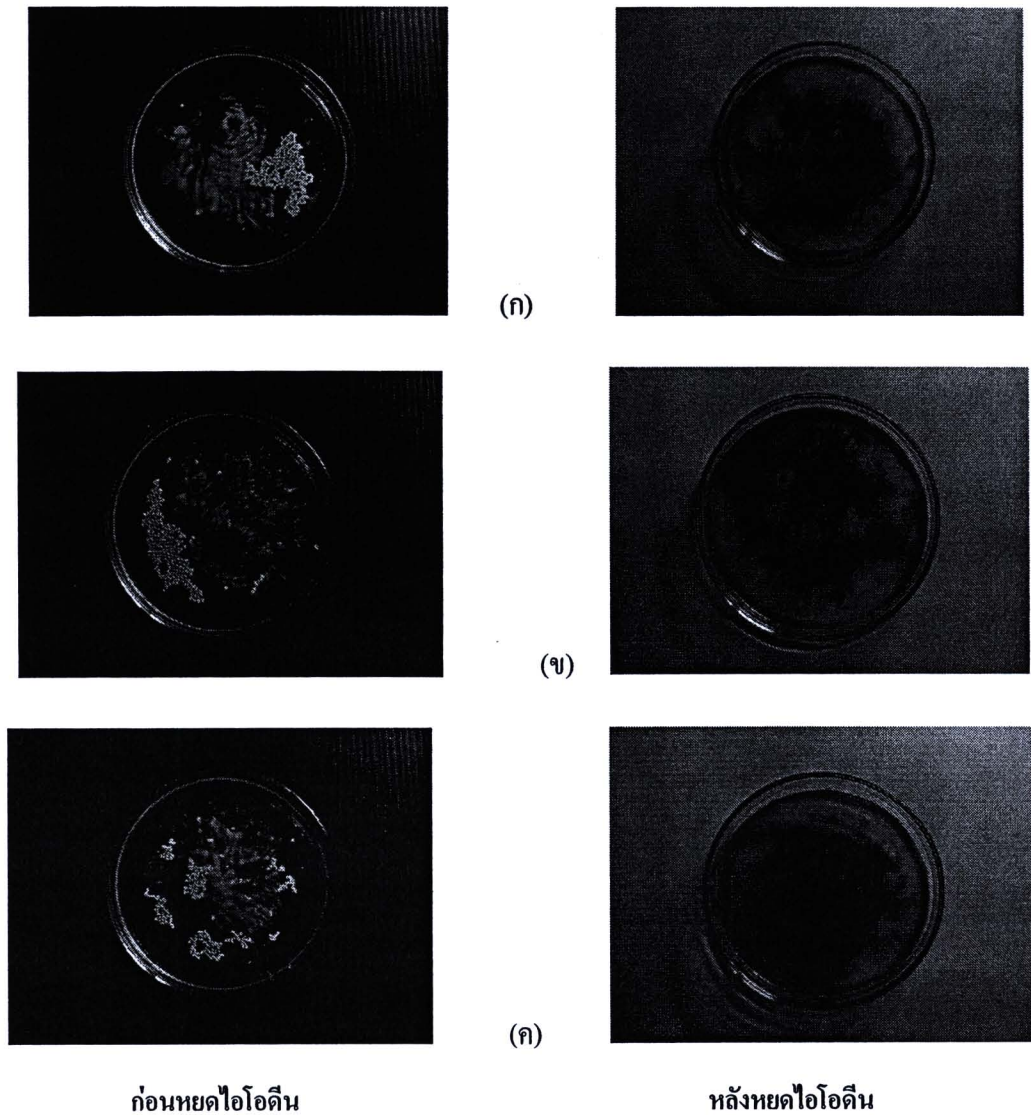
(ค)

รูปที่ 4.12 (ต่อ) ลักษณะแกรนูลเคลือบด้วยฟิล์ม Eudragit® L100 – S100 (1:1) ที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 100%
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ก) พื้นผิวภายนอก (ข) ภาควัดขวาง (x75) (ค)
ภาควัดขวาง (x500)

4.4.1.2 การทดสอบการทนต่อน้ำย่อยเสมือนในร่างกายของแกรนูลเคลือบฟิล์ม

การนำแกรนูลเคลือบจำนวน 100 แกรนูลเพื่อทดสอบความสามารถของแกรนูลเคลือบในการทนต่อน้ำย่อยเสมือนของทางเดินอาหาร ผลการศึกษาพบว่าแกรนูลแบง์ที่เคลือบด้วยฟิล์ม Eudragit L 100 – S 100 ในอัตราส่วน (1:1) ที่มีความหนาต่างๆ กันโดยดูจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 25, 50 และ 100% จากน้ำหนักเริ่มต้นที่ยังไม่ได้เคลือบ ไม่ว่าจะมีความหนาของฟิล์มเป็นเท่าใดก็ไม่สามารถทนต่อน้ำย่อยเสมือนสภาวะกรด HCl 0.1 N. pH 1.2 ที่ใช้เวลา 2 ชั่วโมงในการทดสอบได้นั้นคือการร่วออกของแบง์ออกมาได้ โดยทดสอบด้วยการหยดสารละลายไฮโดรคลอริกพบว่าการเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มจนถึงดำ ซึ่งแสดงถึงการที่มีแบง์อยู่ในน้ำยาที่ถูกทดสอบและมีการร่วออกมาของแบง์เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4.13) ซึ่งแสดงการร่วออกของแบง์จากแกรนูลเคลือบทั้งสามกลุ่มที่มีความหนาของการเคลือบที่น้ำหนักของแกรนูลที่เพิ่มขึ้น 25, 50 และ 100% ของน้ำหนักเริ่มต้น

เมื่อนำแกรนูลเคลือบที่มีการร่วออกของแบง์มาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพพบว่าสิ่งที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าคือ จะมีรูเล็ก ๆ บนผิวของแกรนูลที่ติดสีน้ำเงินและมีผงแบง์ที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน-ดำเกาะติดอยู่ตามรูเล็ก ๆ เหล่านั้น (รูปที่ 4.14) ซึ่งคาดว่ารูเล็ก ๆ เหล่านี้จะเป็นช่องทางให้มีการซึมเข้าของกรด HCl เนื่องจากผลของการเคลือบแกรนูลโดยวิธีการพ่นสารละลายเคลือบลงบนเม็ดแกรนูล (film coating) ที่มีรูปร่างไม่กลมอึกทั้งพื้นผิวยังขรุขระ ทำให้แกรนูลแต่ละเม็ดได้รับน้ำยาเคลือบไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งเม็ดแกรนูลเป็นผลทำให้ระดับความหนาของฟิล์มที่เคลือบไม่เท่ากันทั่วทั้งแกรนูล จุดที่พบรอยร่วบนผิวและมีแบง์เกาะติดอยู่อาจจะจะเป็นจุดที่ความหนาของฟิล์มที่บางและหนาไม่เพียงพอตลอดจนคุณภาพของฟิล์มอาจยังมีช่องหรือรูที่ฟิล์มอยู่ จึงเป็นช่องทางให้กรดแทรกซึมเข้าไปและทำให้แบง์ร่วออกมาได้ถึงแม้ว่าพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดจะไม่สามารถละลายในสภาพที่เป็นกรด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการสังเกตในเบื้องต้นจากการศึกษาสมบัติทางกายภาพของแกรนูลแบง์ที่เคลือบได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่พบว่าความหนาของฟิล์มพอลิเมอร์ที่เคลือบไม่เท่ากันทั่วทั้งเม็ด ส่วนที่เคลือบได้บางอาจจะจะเป็นจุดที่ไม่สามารถทนต่อการสัมผัสกับกรด จึงเป็นไปได้ว่าการใช้พอลิเมอร์เคลือบแบง์ในรูปแกรนูลอาจจะเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม ในการศึกษาต่อไปอาจจะมีการเปลี่ยนผงแบง์ให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมที่ไม่ใช่แกรนูลในลักษณะที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ เช่นอาจทำให้อยู่ในรูปของเม็ดกลมเพลเลทซึ่งจะมีลักษณะที่กลมมากและพื้นผิวที่เรียบกว่าเป็นอันมากที่กระบวนการมีการนวดและบั่นให้เรียบ หรืออาจจะมีการพัฒนาน้ำยาในการเคลือบฟิล์มให้มีความเหมาะสมหรือมีความทนต่อสภาวะกรด-เบสได้ดีขึ้น การศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทำการทดสอบในน้ำยาเสมือนในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ลำดับต่อไป เนื่องจากผลจากการเคลือบที่มีความหนาต่างกันจากน้ำหนักของแกรนูลที่เพิ่มขึ้นไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะทำการทดสอบในสภาวะต่อไป



รูปที่ 4.13 การร่วออกของแป้งจากแกรนูลที่เคลือบด้วย Eudragit L 100 – S 100 (1:1) หลังผ่านการทดสอบใน 0.1 N. HCl pH 1.2 นาน 2 ชั่วโมง จากแกรนูลที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (ก) 25 % (ข) 50% (ค) 100%



รูปที่ 4.14 รูปร่างเล็ก ๆ (แสดงในวงกลม) ที่ตรวจพบได้ด้วยตาเปล่าบนผิวของแกรนูลเคลือบฟิล์ม

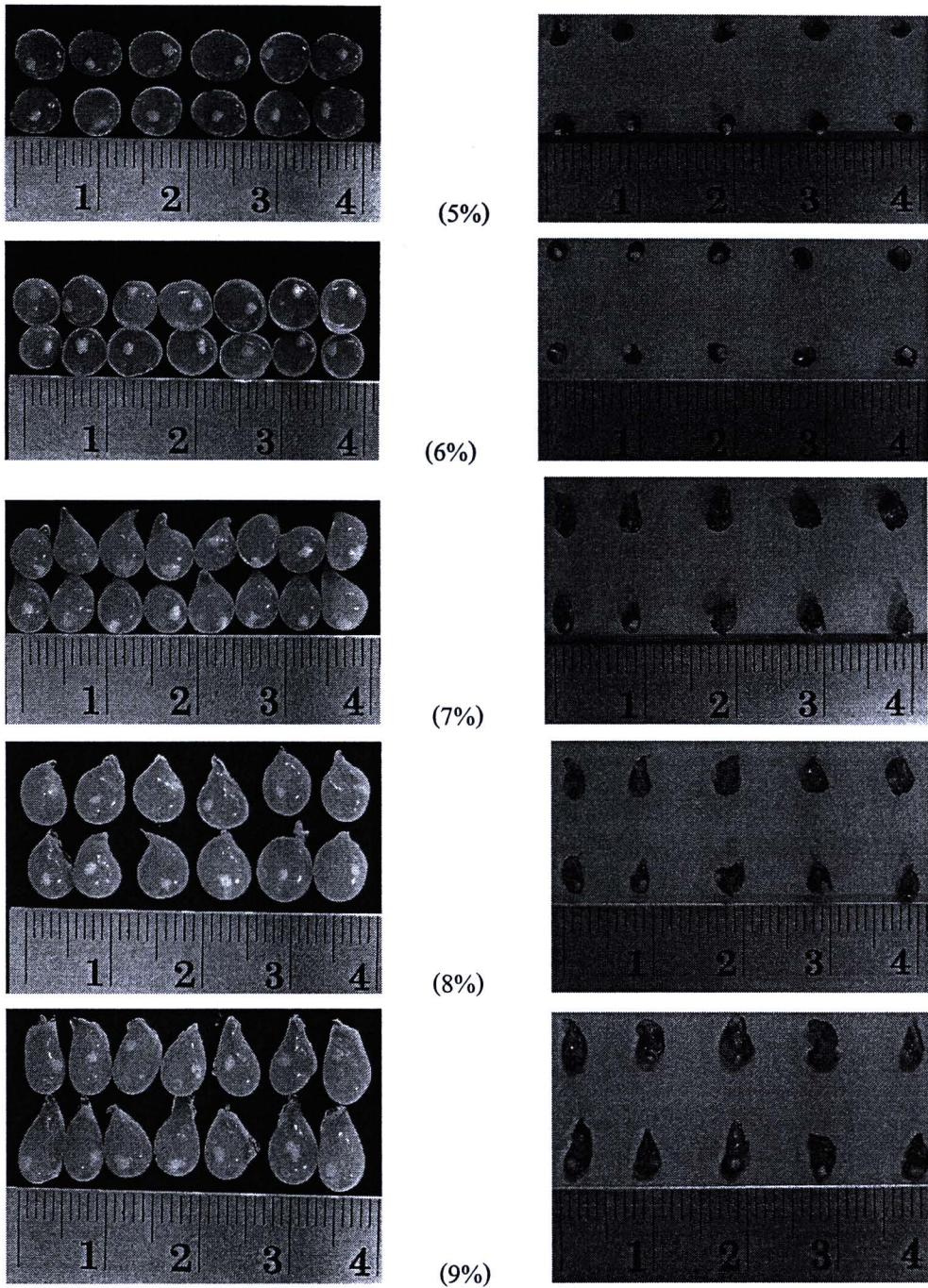
4.4.2 การเคลือบแกรนูลด้วยวิธี ionotropic gelation technique

แกรนูลที่ทำการเคลือบด้วยเทคนิคโดยอาศัยวิธี ionotropic gelation technique มีการนำไปตรวจสอบด้านต่างๆ ได้ผลเป็นดังนี้

4.4.2.1 ลักษณะทางกายภาพของแกรนูลแบ่งที่เคลือบด้วยเทคนิค

แกรนูลแบ่งข้าวเหนียวที่เคลือบด้วยเทคนิคชนิด LC – 710 ที่เตรียมจากสารละลายความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้น 5, 6, 7, 8 และ 9% จะมีรูปร่างและลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าแตกต่างกัน (รูปที่ 4.15)

รูปร่างและขนาดของแกรนูลที่เตรียมได้จากสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 5 และ 6% มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันโดยมีลักษณะรูปกลมและแบนเล็กน้อย โดยมีแกรนูลแบ่งอยู่ภายในจำนวน 1 แกรนูลของแต่ละเม็ดที่เคลือบได้ โดยแกรนูลแบ่งที่บรรจุอยู่ภายในจะอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันออกไป สำหรับเม็ดเคลือบที่เตรียมได้จากสารละลายพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้น 7, 8 และ 9% มีรูปร่างที่คล้ายคลึงกันภายในกลุ่มนี้ โดยมีรูปร่างใกล้เคียงรูปทรงกลมในส่วนฐานแต่ส่วนหัวจะค่อนข้างเรียวกว่าส่วนฐานซึ่งโดยส่วนรวมจะมีรูปร่างคล้ายรูปหยดน้ำ แกรนูลแบ่งอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันเช่นกัน ในตารางที่ 4. 3 แสดงถึงน้ำหนักเปียก (wet weight) น้ำหนักแห้ง (dry weight) พร้อมทั้งแสดงค่า % น้ำหนักที่ลดลงไปของแกรนูลหลังผ่านการทำให้แห้ง การทดลองได้จากค่าเฉลี่ยของแกรนูลจำนวน 50 แกรนูลซึ่งได้จากการสุ่ม



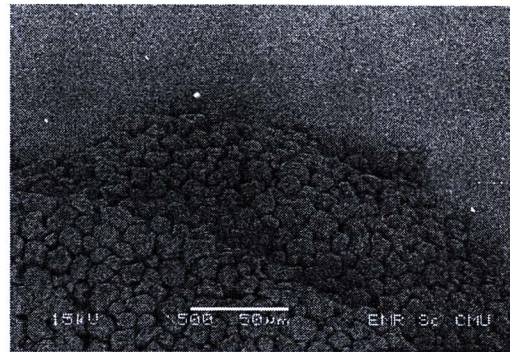
รูปที่ 4.15 ลักษณะแกรนูลที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่ระดับความชื้น 5, 6, 7, 8 และ 9 %
 หลังการเตรียมขึ้นใหม่ (ภาพซ้าย) และหลังการอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 12 ชั่วโมง
 (ภาพขวา)

ตารางที่ 4. 3 น้ำหนักเปียก น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักที่ลดลงของแกรนูลเคลือบเพคติน (n = 50)

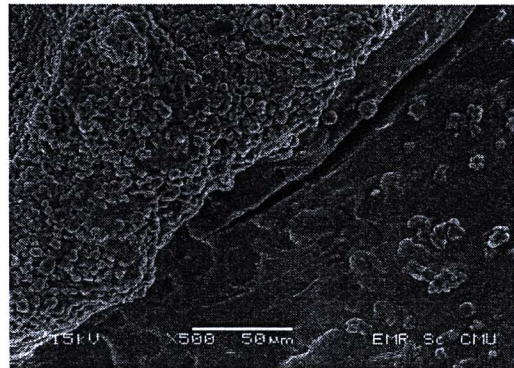
ความเข้มข้นเพคติน (w/w)	น้ำหนักเปียก (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	% น้ำหนักที่ลดลง
5%	3.2149 ± 0.0201	0.1974 ± 0.0308	93.85%±6.17
6%	3.3398 ± 0.0272	0.2664 ± 0.0407	92.02%±9.08
7%	4.1553 ± 0.0340	0.4594 ± 0.0292	88.94%±20.04
8%	5.1295 ± 0.0142	0.5757 ± 0.0202	88.77%±7.23
9%	5.4529 ± 0.0109	0.6164 ± 0.0598	88.69%±19.85

จากตารางแสดงให้เห็นว่าน้ำหนักแกรนูลเคลือบเพคตินไม่ว่าน้ำหนักเปียกหรือน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณเพคตินที่ใช้ในการเตรียม โดยเรียงลำดับความเข้มข้นของเพคตินจากมากไปหาน้อยดังนี้คือ 9% > 8% > 7% > 6% > 5% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักที่ลดลงหลังทำให้แห้งที่เป็นไปในทางตรงข้ามกับเปอร์เซ็นต์เพคตินที่เพิ่มขึ้นคือมีลำดับตรงข้ามกัน โดยมีลำดับดังนี้ 5% > 6% > 7% > 8% > 9% สารละลายเพคตินที่มีความเข้มข้นที่สูงจะมีความหนืดที่สูงตามขึ้นไปด้วย เมื่อผ่านการ Cross-link ในสารละลาย CaCl_2 พบว่าเม็ดเคลือบที่ได้จากสารละลาย 5 % และ 6% จะมีเนื้อผิวสัมผัสที่นุ่มกว่าเม็ดเคลือบที่เตรียมได้จากสารละลาย 7%, 8% และ 9% ซึ่งเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของเพคตินและเม็ดเคลือบที่เตรียมได้อาจจะมีคุณสมบัติในการทนต่อการกด-เบสของน้ำยาเสมือนของทางเดินอาหาร ซึ่งจะได้ทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ผลการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเม็ดเคลือบเพคตินที่เตรียมได้จากสารละลายเพคติน 5% และ 9% มีลักษณะผิวที่ค่อนข้างเรียบ เมื่อทำการศึกษาโดยตัดแบ่งครึ่งทางขวาง (Cross section) พบว่ามีเนื้อเพคตินหุ้มอยู่โดยรอบแกรนูลและภายในมีเม็ดแบ่งเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนอย่างแน่น (รูปที่ 4.16) แสดงว่าการเตรียมแกรนูลแบ่งเคลือบด้วยเพคตินในครั้งนี้ เพคตินสามารถห่อหุ้มอยู่โดยรอบแกรนูลแบ่ง 1 เม็ดได้เป็นอย่างดี มีความหนาของชั้นเคลือบที่หนาและไม่พบร่องรอยของช่องหรือความเป็นรูพรุนของชั้นเคลือบ โดยคาดว่าจะสามารถที่จะทำหน้าที่ในการป้องกันแบ่งที่อยู่ภายในให้สามารถทนต่อสภาวะกรด-เบสที่มีสภาวะเหมือนในระบบทางเดินอาหารได้ โดยไม่เห็นความแตกต่างของโครงสร้างของแกรนูลแบ่งเคลือบไม่ว่าจะศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนใน mode ของ low vacuum mode ที่ศึกษาตัวอย่างที่อยู่ในลักษณะที่ยังมีน้ำอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับ high vacuum mode ซึ่งต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้แห้งก่อนที่จะนำมาศึกษาซึ่งก็ยังคงแสดงโครงสร้างที่สามารถจะป้องกันแบ่งที่อยู่ภายในได้



Low vacuum mode

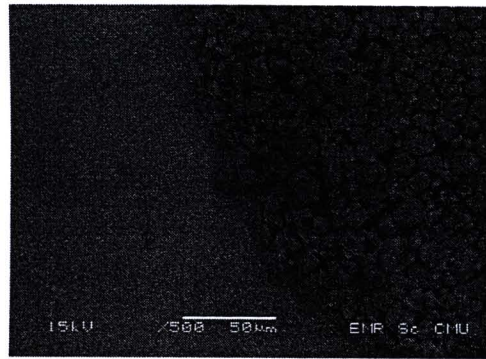
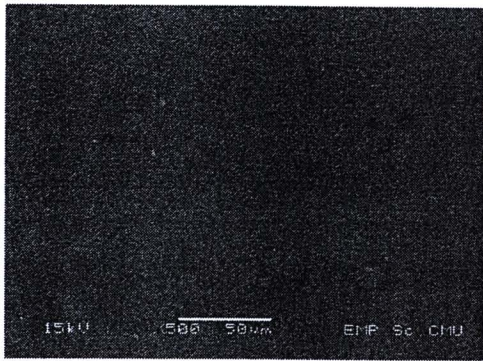


High vacuum mode

รูปที่ 4.16 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะพื้นผิวภายนอก (ซ้าย) และภาคตัดขวาง (ขวา) ของเม็ดเคลือบเพดตินจากสารละลายเพดตินความเข้มข้น 5% ที่กำลังขยาย $\times 500$ ที่ low และ high vacuum mode

4.4.2.2 การทดสอบการรั่วออกของแป้งจากเม็ดเคลือบเพดติน

การทดลองใน *in vitro* ครั้งนี้ได้ดัดแปรโดยอ้างอิงการทดลองสภาพเสมือนในสภาวะกรด-เบสของระบบทางเดินอาหารการทดลองของ Mura และคณะ (2003) และวิธีการทดสอบการปลดปล่อยยาของ Das และ Ng (2010) วิธีการเช่นเดียวกันกับที่ทดสอบกับเม็ดเคลือบพอลิเมอร์สังเคราะห์ Eudragit[®] โดยในเบื้องต้นทดสอบในน้ำย่อยสภาพเสมือนกระเพาะอาหารตามเวลาที่กำหนด ต่อมาทดสอบในน้ำย่อยสภาพเสมือนของลำไส้เล็ก และชั้นสุดท้ายทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยแป้งออกจากเม็ดเคลือบในน้ำย่อยเสมือนในลำไส้ใหญ่



Low vacuum mode



High vacuum mode

รูปที่ 4.17 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะพื้นผิวภายนอก (ซ้าย) และภาคตัดขวาง (ขวา) ของเม็ดเคลือบพอลิเมอร์จากสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 9% ที่กำลังขยาย $\times 500$ ที่ low และ high vacuum mode

ผลการทดสอบพบว่าในตัวกลางที่มีภาวะกรด (0.1 N. HCl pH 1.2) เมื่อนำเม็ดเคลือบพอลิเมอร์ในรูปแท่งที่เตรียมได้จากสารละลายพอลิเมอร์ 5, 6, 7, 8 และ 9% ไปแช่และมีการแช่ตลอดเวลาในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ± 0.2 °C นานเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาพเสมือนที่กระเพาะอาหาร เมื่อครบเวลาและนำมาตรวจสอบพบว่าระดับการถูกทำลายของผิวเม็ดเคลือบที่เป็นพอลิเมอร์จะสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ใช้เคลือบ โดยเม็ดเคลือบที่ได้จากสารละลาย 5% เม็ดเคลือบมีระดับการถูกทำลายและมีการร้าวออกของแข็งจากเม็ดเคลือบพอลิเมอร์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับที่ได้จากสารละลาย 6% แต่จะมากกว่าของเม็ดเคลือบที่เตรียมจากสารละลาย 7%, 8% และ 9% โดยพบว่าผิวพอลิเมอร์ที่

เตรียมจากสารละลาย 5% และ 6% จะบางลงและมีลักษณะเป็นชั้นใสที่เกิดจากการพองตัวเมื่อแช่ในสารละลายที่ใช้ทดสอบ และพบมีการรั่วออกของแบ่งออกมาส่วนหนึ่งจากเม็ดเคลือบเพคติน แสดงว่าการเคลือบที่มีการใช้สารละลายเพคตินในความเข้มข้น 5% และ 6% อาจมีเนื้อเพคตินที่ไม่มากพอจนไม่สามารถทนทานต่อกรดได้นาน 2 ชั่วโมง โดยพบการรั่วออกของแบ่งในสภาวะกรดจากเม็ดเคลือบในจำนวน 57.66 ± 2.51 และ 40 ± 9.16 เม็ด จากแกรนูลเคลือบที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 100 เม็ดที่ใช้ในการทดลองตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเพคตินที่ใช้เป็น 7%, 8% และ 9% พบว่าเม็ดเคลือบเพคตินมีความทนทานในสภาวะกรดได้นานขึ้น โดยพบจำนวนเม็ดเคลือบเพคตินที่แบ่งรั่วออกมาได้ลดลงเป็น 34.66 ± 14.74 และ 10.00 ± 2.00 สำหรับเม็ดเคลือบเพคตินที่เตรียมจากสารละลายเพคติน 7% และ 8% ตามลำดับ และที่เตรียมจากความเข้มข้นของสารละลาย 9% ไม่พบเม็ดเคลือบใดที่มีการรั่วออกของแบ่งจากเม็ดเคลือบที่ใช้ทดสอบ 100 เม็ด ซึ่งเป็นผลจากมีเนื้อเพคตินที่ไปหุ้มแกรนูลเพิ่มขึ้นทำให้เกิดเจลชั้นที่หนาขึ้น จึงทำให้สามารถปกป้องแกรนูลแบ่งและมีความทนทานต่อกรดได้มากกว่าโดยเฉพาะที่มีการใช้สารละลายเพคตินความเข้มข้น 9% ที่ไม่พบการรั่วออกของแบ่งเลย

เมื่อนำเม็ดเคลือบที่ผ่านการทดสอบในขั้นตอนการแช่ในสภาวะกรดและนำมาทำการทดสอบต่อในสารละลายที่มีสภาพเสมือนในลำไส้เล็ก ที่ใช้ phosphate buffer pH 6.8 อีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเม็ดเคลือบที่เตรียมจากสารละลายเพคติน 5, 6 และ 7% ไม่สามารถทนต่อสภาวะนั้นได้ต่อไป มีการแตกตัวกลายเป็นเจลใสชิ้นเล็ก ๆ และในบางส่วนยังพบแบ่งติดอยู่บ้าง โดยตรวจพบจำนวนเม็ดเคลือบที่มีการรั่วออกของแบ่งเป็นจำนวน 42.33 ± 2.51 , 60 ± 9.16 และ 45.33 ± 14.74 เม็ดตามลำดับ สำหรับเม็ดเคลือบที่ได้จากสารละลายเพคติน 8% และ 9% จะทนต่อ phosphate buffer pH 6.8 ได้มากกว่า มีระดับการถูกทำลายที่แตกต่างกันโดยพบว่าที่ 8% จะมีจำนวนเม็ดเคลือบที่แตกและสลายและเกิดการรั่วออกของแบ่งมากกว่าที่ 9% โดยมีเม็ดเคลือบที่ปล่อยแบ่งออกมาจำนวน 56.00 ± 8.00 และ 38.66 ± 8.08 เม็ดตามลำดับ ซึ่งเป็นผลจากความหนาของชั้นเจลที่เกิดขึ้น เมื่อนำเม็ดแบ่งที่ยังสามารถทนต่อ phosphate buffer pH 6.8 ได้อยู่ คือในส่วนของเม็ดเคลือบเพคตินที่ 8% และ 9% พบว่ามีการปล่อยแบ่งออกมาหมดเมื่อทดสอบใน phosphate buffer pH 7.4 ที่มีสภาพเสมือนในลำไส้ใหญ่ รูปที่ 4.18 แสดงตัวอย่างลักษณะของเม็ดเคลือบเพคตินที่ผ่านการทดสอบในสภาวะกรดและ phosphate buffer pH 6.8



(ก)



(ข)

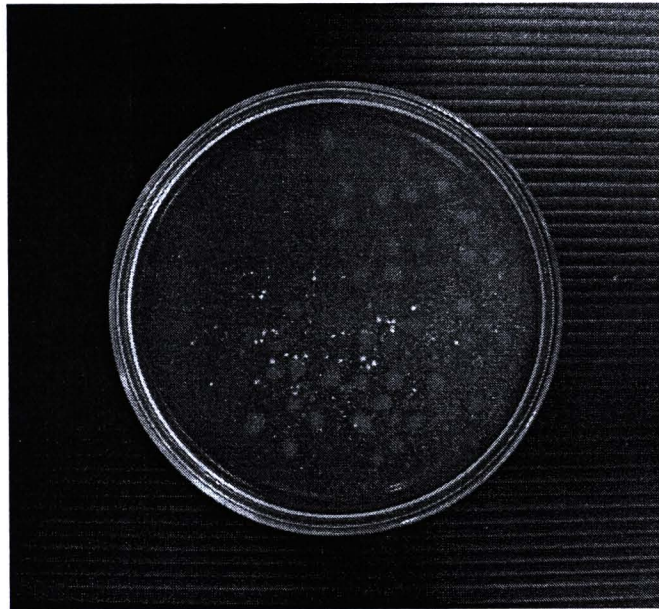
รูปที่ 4.18 ลักษณะเม็ดเคลือบเพคตินที่ผ่านการทดสอบ (ก) 0.1 N. HCl : pH 1.2

(ข) PBS : pH 6.8 นาน 2 ชั่วโมง

เมื่อนำเม็ดเคลือบเพคตินที่เตรียมได้จากสารละลายเพคติน 8% และ 9% และผ่านการทดสอบในน้ำย่อยเสมือนในลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นสภาวะกรด-เบส 6.8 ไปทำการทดสอบต่อในน้ำย่อยเสมือนของลำไส้ใหญ่โดยแช่ใน PBS (pH 7.4) นานเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเม็ดเคลือบเพคตินทั้งหมดที่นำมาทดสอบเพคตินที่ล้อมรอบมีการถูกทำลายและมีการรั่วออกของมาของแป้งที่อยู่ภายใน ดังแสดงในแต่ละสภาวะที่ใช้ในการทดสอบในรูปที่ 4.19 - 4.23

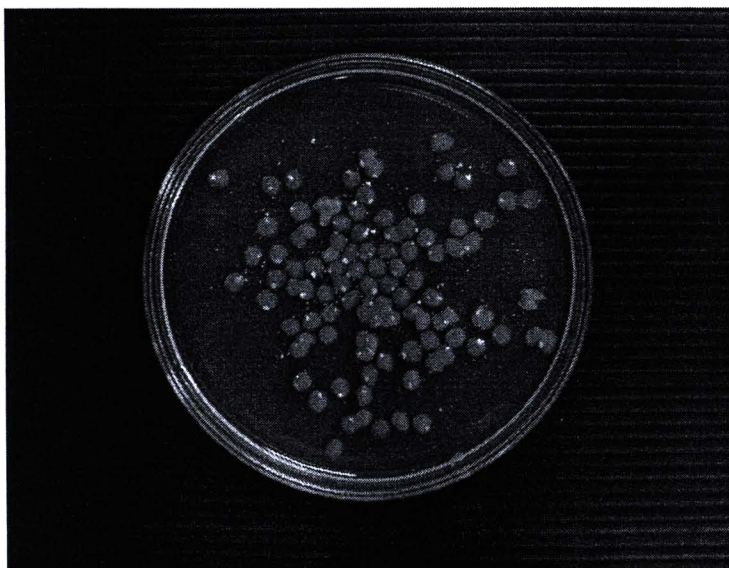


(ก)



(ข)

รูปที่ 4.19 ลักษณะเม็ดเคลือบเพคติน (5%) ที่ผ่านการทดสอบใน (ก) 0.1 N. HCl :
pH 1.2 และตามด้วย (ข) PBS : pH 6.8 นาน 2 ชั่วโมง



รูปที่ 4.20 ลักษณะเม็ดเคลือบเพคติน (6%) ที่ผ่านการทดสอบใน (ก) 0.1 N. HCl :
pH 1.2 และตามด้วย (ข) PBS : pH 6.8 นาน 2 ชั่วโมง



(ก)

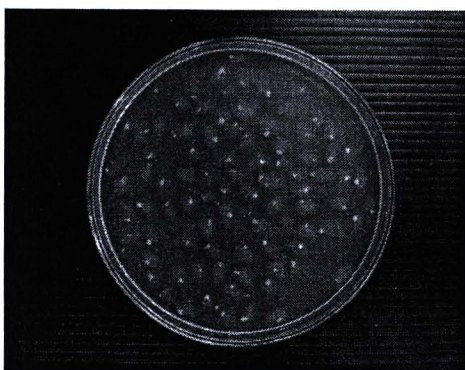


(ข)

รูปที่ 4.21 ลักษณะเม็ดเคลือบพอลิเมอร์ (7%) ที่ผ่านการทดสอบใน (ก) 0.1 N. HCl :
pH 1.2 และตามด้วย (ข) PBS : pH 6.8 นาน 2 ชั่วโมง



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.22 ลักษณะเม็ดเคสือบเพคติน (8%) ที่ทดสอบใน (ก) 0.1 N. HCl : pH 1.2
และตามด้วย (ข) PBS : pH 6.8 นาน 2 ชั่วโมง และ(ค) PBS : pH 7.4 นาน 4
ชั่วโมง



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.23 ลักษณะเม็ดเคลือบเพคติน (9%) ที่ทดสอบใน (ก) 0.1 N. HCl : pH 1.2 และตามด้วย (ข) PBS : pH 6.8 นาน 2 ชั่วโมง และ(ค) PBS : pH 7.4 นาน 4 ชั่วโมง

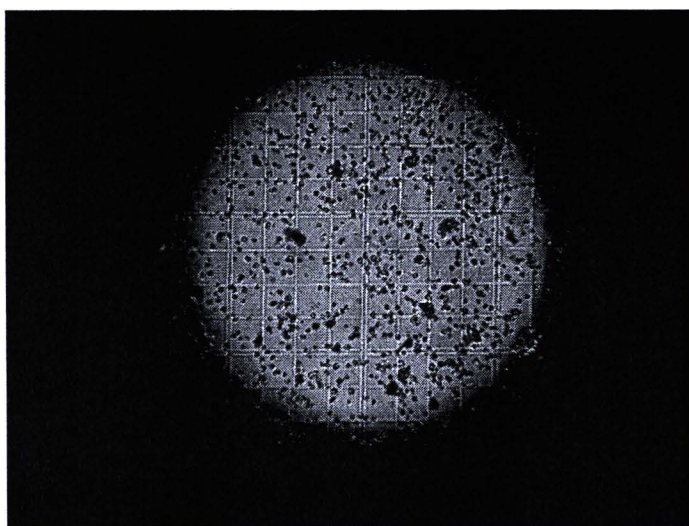
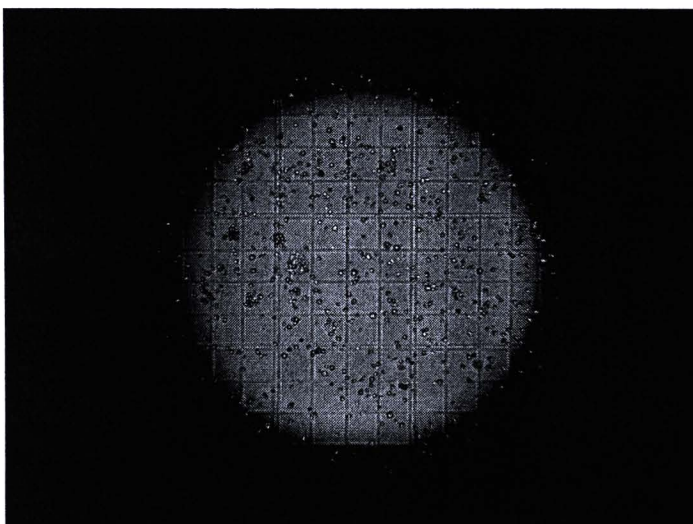
เมื่อนำเศษผงที่ร่วออกมาในแต่ละสภาวะของการทดสอบไปทำการล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นและนำไปหยดด้วยสารละลายไฮโอตินเพื่อทดสอบแบ้ง ผลการทดลองพบว่าเกิดเป็นสีน้ำเงินจากการทำปฏิกิริยาของแบ้งกับไฮโอตินซึ่งแสดงถึงการร่วออกมาของแบ้ง ความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณของแบ้งที่ร่วออกมา ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงความเข้มของสีจากการทำปฏิกิริยาของไฮโอตินกับแบ้งที่ร่วออกมาในแต่ละสภาวะ

เม็ดเคลือบเพคตินที่ % ความเข้มข้น	0.1 N. HCl: pH 1.2 (2 ชั่วโมง)	PBS : pH 6.8 (2 ชั่วโมง)	PBS : pH 7.4 (4 ชั่วโมง)
5	++	++	0
6	++	++	0
7	+	++	0
8	+	++	++
9	-	+	+++

หมายเหตุ - ไม่เกิดสีน้ำเงิน
+ เกิดสีน้ำเงินน้อย
++ เกิดสีน้ำเงินปานกลาง
+++ เกิดสีน้ำเงินมาก
0 ไม่ได้ทำการทดสอบต่อ

เมื่อนำเอาตะกอนแบ้งในแต่ละสภาวะไปตรวจดูลักษณะโครงสร้างและการกระจายตัวพบได้ว่า การกระจายตัวของแบ้งสัมพันธ์กับปริมาณแบ้งที่ร่วออกมา ถ้าปริมาณแบ้งที่ร่วออกมาน้อยสอดคล้องกับการกระจายที่บางตัว กรณีที่มีแบ้งร่วออกมามากก็จะพบจำนวนแบ้งมาก และมีการกระจายตัวหนาแน่น ตลอดจนเม็ดแบ้งมีการเกาะกลุ่มกันในลักษณะต่างๆ กัน (รูปที่ 4.24)



รูปที่ 4.24 การกระจายตัวของแบ่งที่ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ($\times 10$)

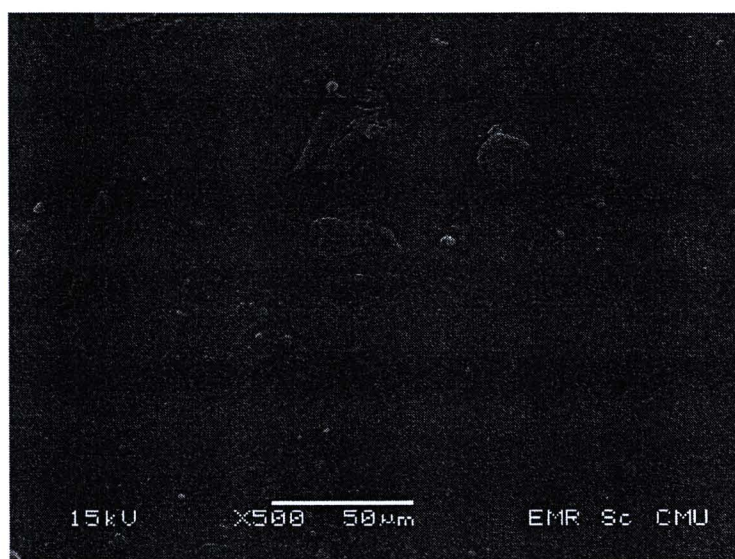
(บน) การร่วของแบ่งปริมาณน้อย

(ล่าง) การร่วของแบ่งปริมาณมาก

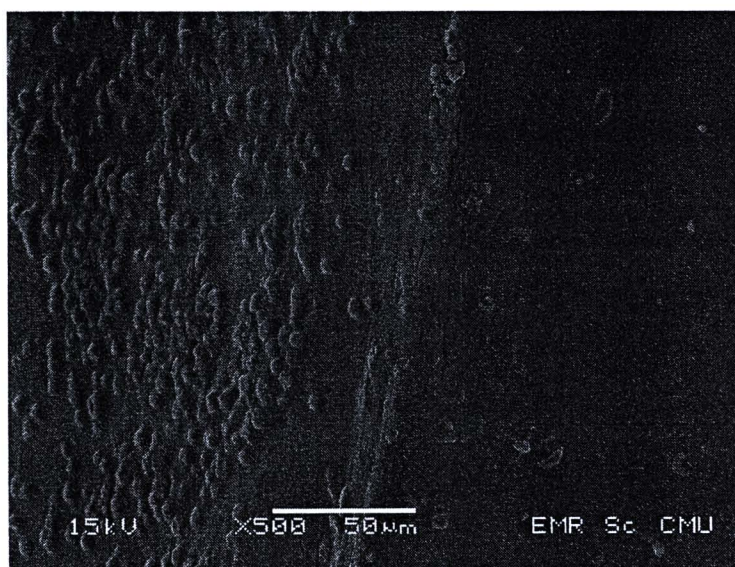
4.4.2.3 ลักษณะทางกายภาพของเม็ดเคลือบเพคติน (9 %) หลังการทดลองใน *in vitro* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของแกรนูลเคลือบเพคติน 9% หลังมีการแช่ในกรด HCl 0.1 N, pH 1.2 และ PBS pH 6.8 พบว่าที่สภาวะกรดนั้นผิวเพคตินมีร่องรอยของการยุบของผิวเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับผิวเพคตินก่อนการทดลอง เมื่อศึกษาในลักษณะภาคตัดขวางพบว่าการแช่อยู่ในกรด 2 ชั่วโมง ผิวเพคตินยังคงสภาพเดิมและสามารถทนทานต่อการถูกทำลายโดยกรดโดยดูจากภาพถ่ายพบว่าเพคตินยังคงหุ้มแบ่งไว้ได้อย่างหนาแน่นโดยไม่พบว่ามีแบ่งหลุดลอกออกมาจากแกรนูลเคลือบ หลังการนำเม็ดเคลือบเพคตินที่ผ่านการทดสอบในสภาวะกรดและนำไปทดสอบในสภาวะเบสที่ pH 6.8 จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงที่เด่นชัดคือ พื้นผิวที่ถูกกระทำโดยกรด 2 ชั่วโมงและทดสอบต่อในสภาพ pH 6.8 อีก 2 ชั่วโมง พบการบางตัวลง พื้นผิวจะมีรอยแยกและรอยกัดเซาะเพิ่มขึ้นและสิ่งที่เห็นเด่นชัดยิ่งขึ้นคือจากการศึกษาในแนวภาคตัดขวาง พบว่าเม็ดเคลือบมีร่องรอยของการถูกแทรกซึมโดยสารละลายจากการที่ส่วนเคลือบที่เป็นเพคตินบางตัวลง ทำให้แกรนูลที่เกาะกันเป็นกลุ่มเริ่มแตกกระจายและมีการเปลี่ยนรูปร่างจากเม็ดกลมเป็นรูปรียาวเป็นแฉก ๆ คล้ายๆ รูปดาวหรือปะการังเล็ก ๆ การเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนนี้สอดคล้องกับการศึกษาด้วยตาเปล่าที่พบว่า เจลเพคตินที่เกิดขึ้นหลังผ่านการแช่ใน PBS, pH 6.8 จะมีการพองตัวเพิ่มขึ้นพร้อม ๆ กับการพองตัวขยายขนาดของแกรนูลแบ่งที่บรรจุอยู่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่าแบ่งเริ่มมีการแตกตัวออกมาจากแกรนูลแบ่งในรูปเม็ดแบ่งเล็กๆ แต่เนื่องจากเพคตินมีคุณสมบัติที่ดีในการกักเจลจึงทำให้มีการค่อย ๆ ปลดปล่อยแบ่งออกจากแกรนูลและเม็ดเพคตินที่เคลือบ ทำให้การนำส่งแบ่งไปสู่เป้าหมายสามารถดำเนินต่อไปได้ (รูปที่ 4.25–4.26) เพคตินสามารถที่จะทำปฏิกิริยาได้กับแคลเซียมออกไซด์ได้เป็น calcium pectinate และนำไปใช้เคลือบเป็นฟิล์มที่ชอบน้ำแต่ไม่ละลายในน้ำโดยอาศัยกระบวนการ interfacial complexation โดยเฉพาะในเพคตินพวก low ester จะได้ ionic bridges ระหว่าง calcium ions และ ionised carboxyl groups ของ galacturonic acid ที่มีอยู่ในเพคตินซึ่งเป็นโมเดลที่เรียกว่า “egg box-model” และเพคตินที่มีการทำให้เกิดเป็นเฮลเตอร์ในบางส่วนและมีค่าดีกรีที่ต่ำจะทำให้ได้ bead ที่กลมและเหมาะสม (Sriamornsak, 1998)

การศึกษาทดลองในครั้งนี้จึงมีความเป็นไปได้ในการนำผลการศึกษาไปพัฒนาต่อยอดโดยการเคลือบแกรนูลแบ่งด้วยเพคตินซึ่งสามารถป้องกันแบ่งไม่ให้รั่วออกมาในน้ำย่อยในกระเพาะอาหารหรือน้ำย่อยในส่วนของลำไส้เล็กแต่สามารถที่จะปล่อยให้แบ่งออกมาได้เมื่อแกรนูลเคลื่อนตัวเข้าไปถึงบริเวณลำไส้ใหญ่ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาแบ่งให้อยู่ในรูปแบบอาหารเสริมสุขภาพต่อไปในอนาคต

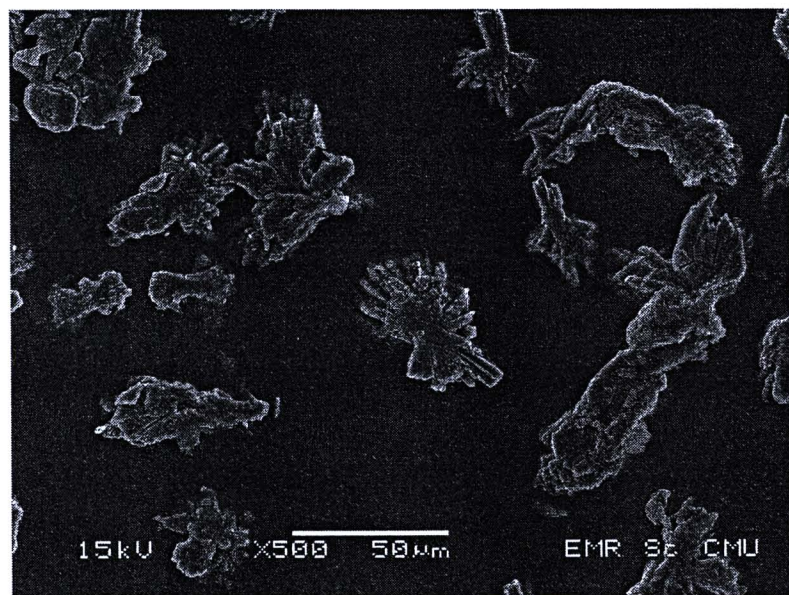
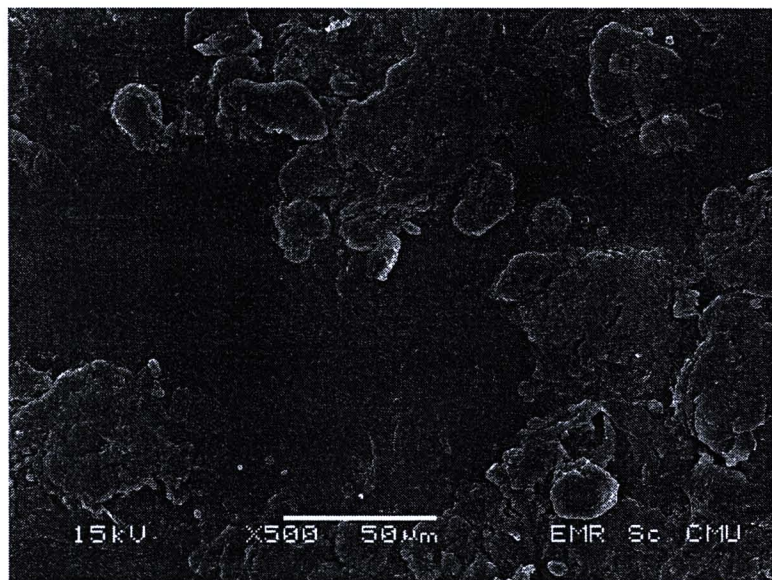


(ก)



(ข)

- รูปที่ 4.25 การเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวของเม็ดเคลือบพดติน 9% ใน 0.1 N. HCl pH 1.2 นาน 2 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Low vacuum mode)
- (ก) พื้นผิวส่วนนอก
- (ข) ภาพตัดขวาง



รูปที่ 4.26 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเมมเบรนเคลือบเพคติน 9% หลังจากทดสอบใน 0.1 N. HCl pH 1.2 ต่อด้วย PBS : pH 6.8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Low vacuum mode)
 (บน) พื้นผิวส่วนนอก
 (ล่าง) ภาคตัดขวาง