บทที่ 2

การทดลอง

ก. เครื่องมือ / ครุภัณฑ์

1. Analytical balance (Sartorius, Scientifi Promotion Co. Ltd, Germany)
2. Filter apparatus
3. FT/IR-230 spectrophotometer (JASCO)
4. High speed centrifuge
5. Hot air oven (Memmert)
6. Hot plate with magnetic stirring control
7. HPLC (Agilent Technologies, USA
8. JEOL GC mate: EI-MS (JEOL)
9. JNM-α600 spectrometer (JEOL)
10. Lyophilizer
11. Micropipette
12. Microtiter plate reader (Biorad 680, USA)
13. Microwave (National, Japan)
14. Multiple-point magnetic stirrer
15. Nikon camera
16. pH Meter (Henna, USA)
17. Refrigerator (Sanyo, Thailand)
18. Rotary evaporator (EYELA®, N-100)
19. Sonicator

ข. พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษาในโครงการนี้เป็นใบฝรั่งสด ที่มีอายุต่าง ๆ กัน โดยเก็บจากต้นฝรั่งปลูกในจังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย

ค. วัสดุ / เคมีภัณฑ์ / เภสัชภัณฑ์

1. ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (Sigma, USA)
2. Acetic acid
3. Acetone AR (Merck, Germany)
4. Acetronitrile AR (Merck, Germany)
5. Acetronitrile HPLC (Merck, Germany)
6. 5-Beta-cholanic acid (Sigma, USA, MW=360.57)
7. Butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma, USA)
8. Chitosan (บริษัทซีเฟรช ไคโตซาน (แลป) จำกัด ประเทศไทย)
9. Chitosan (บริษัทต้าหมิงเอ็นเตอร์ไพส์จำกัด ประเทศไทย)
10. Chloroform AR (Merck, Germany)
11. Cosmosil 75µm C_{18}-OPN (Nacalai Tesque, Japan)
12. Dialysis membrane (Cellu.Sep T4, USA, MWCO = 12000-14000)
13. Dichloromethane AR (Merck, Germany)
14. Diethyl ether AR (Merck, Germany)
15. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
16. Disodium hydrogen phosphate (Ajax Finechem, New Zealand, MW=177.99)
17. Ellagic acid (Sigma, USA)
18. Ethanol 95%
19. Ethanol absolute AR (Merck, Germany)
20. Ethyl acetate AR (Merck, Germany)
21. Ferric chloride ($FeCl_3 6H_2O$) (Sigma, USA)

22. Ferrous sulfate ($FeSO_4 7H_2O$) (Sigma, USA)
23. Gallic acid (Sigma, USA)
24. Glycol chitosan (Sigma, USA, MW=2.5 x 10^5, DD = 82.7 %)
25. Hydrochloric acid
26. MCI-gel (Mitsubishi, Japan)
27. Methanol AR (Merck, Germany)
28. Methanol HPLC (Merck, Germany)
29. N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (Sigma, USA, MW=191.70)
30. n-Butanol AR (Merck, Germany)
31. n-Hexane AR (Merck, Germany)
32. N-Hydroxysuccinimide (Sigma, USA, MW=115.09)
33. Phosphoric acid (Merck, Germany)
34. Polyethylene glycol (PRG) 200 / PEG 300 / PEG 400 / PEG 600
35. Potassium persulfate (BDH Chemicals Ltd, England)
36. Prolyethylene glycol 400
37. Propylene glycol
38. Quercetin (Sigma, USA)
39. Sephadex LH-20 (GE Healthcare)
40. Silica gel 60 (230-400 mesh) (Merck, Germany)
41. Sodium acetate
42. Sodium alginate (Merck, Germany)
43. Sodium dihydrogen phosphate (Fisher Scientific, UK, MW = 156.01)
44. Toyopearl HW-40C (Toshoh, Japan)
45. TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) (Sigma, USA)
46. Trolox (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Fluka, Switzerland)
47. Tween 20 / Tween 80
48. วัสดุอื่น ๆ เช่น เครื่องแก้วต่าง ๆ กระดาษกรอง Whatman no.1

ง. วิธีทดลอง

การศึกษาการสกัดสารจากใบฝรั่ง

ในการศึกษาการสกัดจากใบฝรั่ง ได้แบ่งออกเป็นดังต่อไปนี้

1. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสกัด
2. การศึกษาสารสกัดแยกส่วน

ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสกัด

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสารสกัด ได้แบ่งหัวข้อการศึกษาออกเป็น 3 หัวข้อย่อย แต่ละหัวข้อหมายถึงการศึกษาปัจจัยที่อาจส่งผลต่อปริมาณสารสกัด (% yield) และฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัด หัวข้อย่อยดังกล่าว ได้แก่

1. การศึกษาผลของขบวนการทำให้แห้ง (Drying process)
2. การศึกษาผลของวิธีการสกัด (Extraction method)
3. การศึกษาผลของอายุของใบฝรั่ง (Leaf age)

การศึกษาผลของขบวนการทำให้ใบแห้ง

ในการวิจัยขั้นตอนนี้ ใช้ Absolute ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัด และเพื่อไม่ให้เกิดความแปรปรวนอันเนื่องจากวิธีการสกัดและอายุของใบฝรั่ง ดังนั้นจึงกำหนดใช้วิธีสกัดเพียงวิธีเดียว โดยเลือกใช้วิธี sonication extraction และกำหนดอายุของใบฝรั่งเพียงอายุเดียว คือใช้เฉพาะใบฝรั่งที่มีอายุปานกลาง หรือที่เรียกว่า ใบเพสลาด สภาวะต่าง ๆ ของขบวนการทำให้แห้ง ที่ใช้ศึกษามีดังต่อไปนี้

1. อบแห้งใบสด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง
2. ผึ่งแห้งใบสด ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
3. อบแห้งใบลวก ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง
4. ผึ่งแห้งใบลวก ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ขั้นตอนการสกัดมีรายละเอียดดังต่อไปนี้คือ นำใบฝรั่งมาล้างน้ำสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออก จากนั้นแบ่งครึ่งไปทำการลวก (การลวก ที่กล่าวในการวิจัยครั้งนี้ หมายถึงการนำพืชไปจุ่มในน้ำเดือด (ประมาณ100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นจัดทันที เป็นเวลา 15 นาที) ดังแสดงในรูปที่ 2-1 นำใบฝรั่งสดและใบที่ลวกแล้ว ไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ดังแสดงในรูปที่ 2-2 เป็นเวลานาน 20 ชั่วโมง และโดยการผึ่ง (ดังแสดงในรูปที่ 2-3) ที่อุณหภูมิห้องคือประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (หรือ 72 ชั่วโมง) ต่อจากนั้นนำใบฝรั่งที่แห้งแล้วไปบด (ดังแสดงในรูปที่ 2-4) จนได้ใบฝรั่งเป็นผงละเอียด นำผงบดของใบฝรั่ง ไปสกัดด้วยวิธี sonication extraction โดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย ใช้อัตราส่วนของผงบดใบฝรั่งต่อตัวทำละลายในการสกัด 1 ครั้ง เท่ากับ 1: 4 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการสกัดสามครั้ง ๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้ความดันโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อเอาตัวทำละลายออก จนได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณหา % yield เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชา ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 2-1 การลวกใบฝรั่ง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 13 ธ.ค. 2555
เลขทะเบียน 246722
เลขเรียกหนังสือ

รูปที่ 2-2 การอบใบฝรั่ง

รูปที่ 2-3 การผึ่งใบฝรั่ง

รูปที่ 2-4 การบดใบฝรั่ง

การศึกษาผลของวิธีการสกัด

ในการวิจัยขั้นตอนนี้ เพื่อไม่ให้เกิดความแปรปรวนอันเนื่องจากอายุของใบ ดังนั้นจึงกำหนดอายุของใบฝรั่งที่ใช้ให้คงที่ โดยได้เลือกใช้ใบฝรั่งเฉพาะที่มีอายุปานกลาง หรือที่เรียกว่า ใบเพสลาด เท่านั้น และกำหนดขบวนการทำให้แห้ง เป็นการลวกแล้วอบที่ 50 องศาเซลเซียสเท่านั้น ได้ทำการศึกษาผลของวิธีสกัด 5 วิธี ดังต่อไปนี้

1. Maceration extraction
2. Stirring extraction
3. Sonication extraction
4. Soxhlet extraction
5. Microwave assisted extraction

ขั้นตอนการสกัดมีรายละเอียดดังต่อไปนี้คือ นำใบฝรั่งอายุปานกลาง มาล้างน้ำสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออก จากนั้นนำไปทำการลวกในน้ำเดือดตามรายละเอียดที่กล่าวแล้วในตอนต้น แล้วอบที่ 50 องศาเซลเซียสในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะได้ใบฝรั่งแห้งกรอบสนิท ต่อจากนั้นนำใบฝรั่งแห้งที่ได้ไปบด เพื่อให้ได้ใบฝรั่งที่เป็นผงละเอียด นำผงบดของใบฝรั่ง ไปสกัดด้วยวิธีสกัดต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาทั้ง 5 วิธี การศึกษาในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายไปด้วย โดยในการสกัดทั้ง 5 วิธีใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดเปรียบเทียบกัน คือ Absolute ethanol และ Ethanol 95% เป็นตัวทำละลาย รายละเอียดการสกัดแต่ละวิธีมีต่อไปนี้

Maceration extraction

วิธีนี้ทำโดยใช้ อัตราส่วนของผงบดใบฝรั่งต่อตัวทำละลายในการสกัด 1 ครั้ง เท่ากับ 1 : 4 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) หมักผงใบฝรั่งที่อุณหภูมิห้องร่วมกับตัวทำละลาย ทำการหมักสามครั้ง ๆ ละ 24 ชั่วโมง คนผสมเบา ๆ ด้วยไม้พายเพียง 2 ครั้งในระหว่างการหมัก 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแรกทำการกรองด้วยผ้าขาวบางเนื้อละเอียดเอาสารละลายไว้แล้วเอากากมาเติมตัวทำละลาย และคนผสมให้เข้ากัน หมักต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนครบสามครั้ง รวมสารละลายที่กรองได้แต่ละครั้งไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้ง

ภายใต้ความดันโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อกำจัดเอาตัวทำละลายออก จนได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณหา % yield เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชา และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทดสอบขั้นตอนอื่นต่อไป

Stirring extraction

วิธีนี้ทำคล้าย Maceration extraction คือใช้ อัตราส่วนของผงบดใบฝรั่งต่อตัวทำละลายในการสกัด 1 ครั้ง เท่ากับ 1 : 4 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) หมักผงใบฝรั่งที่อุณหภูมิห้องร่วมกับตัวทำละลาย ทำการหมักสามครั้ง ๆ ละ 24 ชั่วโมงทำการสกัดสามครั้งๆ ละ 24 ชั่วโมง แต่การคนจะแตกต่างจากวิธี Maceration extraction กล่าวคือวิธีนี้จะต้องคนผสมตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer ด้วยอัตราเร็วของการคนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแรกทำการกรองด้วยผ้าขาวบางเนื้อละเอียดเอาสารละลายไว้แล้วเอากากมาเติมตัวทำละลาย หมักต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ระหว่างการหมักต้องคนผสมตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ด้วยอัตราเร็วของการคนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนครบสามครั้ง รวมสารละลายที่กรองได้แต่ละครั้งไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้ความดันโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อกำจัดเอาตัวทำละลายออก จนได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณหา % yield เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชา และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทดสอบขั้นตอนอื่นต่อไป

Sonication extraction

วิธีนี้ทำโดยใช้ อัตราส่วนของผงบดใบฝรั่งต่อตัวทำละลายในการสกัด 1 ครั้ง เท่ากับ 1 : 4 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นำสารผสมไปหมักภายในเครื่อง sonicator เปิดเครื่องใช้ความถี่สูงสุดนาน 10 นาที เมื่อครบ 10 นาทีแรกทำการกรองด้วยผ้าขาวบางเนื้อละเอียดเอาสารละลายไว้แล้วเอากากมาเติมตัวทำละลาย และคนผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมักต่อภายในเครื่อง sonicator เปิดเครื่องต่ออีก 10 นาที ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนครบสามครั้ง รวมสารละลายที่กรองได้แต่ละครั้งไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้ความดันโดยใช้

เครื่อง rotary evaporator เพื่อกำจัดเอาตัวทำละลายออก จนได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณหา % yield เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชา และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทดสอบขั้นตอนอื่นต่อไป

Soxhlet extraction

วิธีนี้ทำโดยใช้หลักการหมักผงใบฝรั่งที่อุณหภูมิจุดเดือดของตัวทำละลาย โดยใช้อัตราส่วนของผงบดใบฝรั่งต่อตัวทำละลายในการสกัด 1 ครั้ง เท่ากับ 1 : 12 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำผงใบฝรั่งมาบรรจุในถุงผ้าขางบางเนื้อละเอียดก่อน แล้วจึงนำไปทำการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet apparatus ซึ่งบรรจุตัวทำละลายรออยู่แล้ว การสกัด 1 ครั้ง ใช้เวลานานติดต่อกัน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้ความดันโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อกำจัดเอาตัวทำละลายออก จนได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณหา % yield เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชา และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทดสอบขั้นตอนอื่นต่อไป

Microwave assisted extraction

วิธีนี้ทำโดยใช้ อัตราส่วนของผงบดใบฝรั่งต่อตัวทำละลายในการสกัด 1 ครั้ง เท่ากับ 1 : 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำสารผสมไปหมักภายในเครื่อง microwave เปิดเครื่องใช้ระดับ High นาน 5 นาที เมื่อครบ 5 นาทีแรกทำการกรองด้วยผ้าขาวบางเนื้อละเอียดเอาสารละลายไว้แล้วเอากากมาเติมตัวทำละลาย และคนผสมให้เข้ากันแล้วนำไปสกัดต่อภายในเครื่อง microwave ต่ออีก 5 นาที ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนครบสามครั้ง รวมสารละลายที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้ความดันโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อกำจัดเอาตัวทำละลายออก จนได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณหา % yield เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชา และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทดสอบขั้นตอนอื่นต่อไป

การศึกษาผลของอายุของใบฝรั่ง

ในการวิจัยขั้นตอนนี้ เพื่อไม่ให้เกิดความแปรปรวนอันเนื่องจากปัจจัยอื่นที่ไม่ได้ศึกษา ดังนั้นจึงกำหนดขบวนการทำให้แห้งและวิธีการสกัดเพียงวิธีเดียว โดยเลือกใช้การลวกและอบที่ 50 องศาเซลเซียส และสกัดด้วยวิธี sonication extraction ได้ทำการศึกษาใบฝรั่งที่มีอายุแตกต่างกัน โดยนำใบฝรั่งสดมาจัดแบ่งกลุ่มเป็น 3 ประเภทตามอายุของใบ ดังต่อไปนี้

1. ใบอ่อน (ที่ใช้ในการทดลองนี้แสดงในรูปที่ 2-5)
2. ใบที่มีอายุปานกลาง (ที่ใช้ในการทดลองนี้แสดงในรูปที่ 2-6)
3. ใบแก่ (ที่ใช้ในการทดลองนี้แสดงในรูปที่ 2-7)

นำใบฝรั่งอายุต่าง ๆ มาล้างน้ำสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออก จากนั้นนำไปทำการลวกในน้ำเดือดตามที่กล่าวรายละเอียดแล้วในตอนต้น แล้วอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะได้ใบฝรั่งแห้งกรอบสนิท ต่อจากนั้นให้นำไปบดจนได้ใบฝรั่งเป็นผงละเอียด นำผงบดของใบฝรั่ง ไปสกัดด้วยวิธี sonication extraction ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้แล้วในตอนต้น โดยใช้ Ethanol 95% เป็นตัวทำละลาย (อัตราส่วนของผงบดใบฝรั่งต่อตัวทำละลายในการสกัด 1 ครั้ง เท่ากับ 1: 4 กรัมต่อปริมาตร) ทำการสกัดสามครั้ง ๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้ความดันโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อเอาตัวทำละลายออก จนได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณหา % yield เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชา ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 2-5 ลักษณะใบอ่อนที่ใช้ในการวิจัย

รูปที่ 2-6 ลักษณะใบที่มีอายุปานกลางที่ใช้ในการวิจัย

รูปที่ 2-7 ลักษณะใบแก่ที่ใช้ในการวิจัย

การศึกษาสารสกัดแยกส่วน (Fractionation)

ในการศึกษาสารสกัดแยกส่วน ได้คัดเลือกวิธีการสกัดและขบวนการทำให้แห้งที่มีประสิทธิภาพที่สุด มาทำการสกัดแยกส่วนใบฝรั่งที่มีอายุต่าง ๆ กัน โดยใช้ตัวทำละลายต่างขั้วเริ่มตั้งแต่ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุดไปจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วมากที่สุด คือ n-Hexane, Ethyl acetate, n-Butanol, Ethanol (absolute), Methanol และ น้ำกลั่น ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดของการทดลองดังต่อไปนี้

นำใบฝรั่งสดอายุต่าง ๆ (ใบอ่อน ใบกลางหรือใบเพสลาด และใบแก่) มาล้างน้ำสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออก จากนั้นนำไปทำการลวกในน้ำเดือดตามที่กล่าวรายละเอียดแล้วในตอนต้น แล้วนำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะได้ใบฝรั่งแห้งกรอบสนิท ต่อจากนั้นนำไปบดจนได้ใบฝรั่งเป็นผงละเอียด นำผงบดของใบฝรั่ง ไปสกัดด้วยวิธี sonication extraction ตามรายละเอียดของวิธีนี้ที่ได้กล่าวแล้วในตอนต้น โดยเริ่มใช้ n-Hexane เป็นตัวทำละลาย ใช้อัตราส่วนของผงบดใบฝรั่งต่อตัวทำละลายในการสกัด 1 ครั้ง เท่ากับ 1: 4 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการสกัดสามครั้ง ๆ ละ 10 นาที นำกากที่ได้หลังจากการสกัดครั้งที่ 3 ไปอบไล่ตัวทำละลายเดิม (n-Hexane) ให้หมดไป แล้วจึงนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วเพิ่มขึ้น ได้แก่ Ethyl acetate, n-Butanol, Ethanol (absolute), Methanol และ น้ำกลั่นตามลำดับ ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนครบทุกตัวทำละลาย นำของเหลวผสมที่ผ่านการสกัดแต่ละครั้งและแต่ละตัวทำละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no 1 แล้วรวมสารละลายที่กรองได้จากตัวทำละลายเดียวกันไประเหยแห้งภายใต้ความดันโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อเอาตัวทำละลายออก จนได้สารสกัดแยกส่วนที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณหา % yield เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชา ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเพื่อรอนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาฤทธิ์ Antioxidant

การศึกษาฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดใบฝรั่งในการวิจัยครั้งนี้ ใช้วิธี ABTS และ วิธี FRAP ดังต่อไปนี้

วิธี ABTS

วิธีนี้มีหลักการคือใช้ 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt เป็นสารก่อ free radical ซึ่งเป็นสารมีสีและสามารถดูดกลืนแสงที่สามารถวัดได้ เมื่อสารสกัดใบฝรั่งทำปฏิกิริยากับ Free radical ABTS แล้ว ค่าการดูดกลืนแสงของ Free radical ABTS จะลดลง เมื่อวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่เหลืออยู่ก็สามารถหาฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดได้

รายละเอียดของวิธีที่ทำการทดลองในครั้งนี้มีดังต่อไปนี้คือ เตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS โดยใช้สารละลาย ethanolic ของ ABTS ตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 7 mM ทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ โดยให้ทำปฏิกิริยากันในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 – 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลายผสมที่ได้ด้วย Ethanol จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ± 0.2 หน่วย จากนั้นผสมสารสกัดใบฝรั่งใน Ethanol ให้ได้เป็น Ethanolic solution ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 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 ฤทธิ์ Antioxidant ที่ได้หมายถึงฤทธิ์การจับอนุมูลอิสระ ABTS ค่าที่บ่งชี้ความแรงของฤทธิ์จะเป็นค่าที่เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox เรียกว่า TEAC มาจากคำว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ซึ่งค่านี้แสดงถึงความเข้มข้นของ Trolox ที่ให้ฤทธิ์ Antioxidant เท่ากับสารสกัดใบฝรั่งที่ทดสอบ 1.0 มิลลิกรัม ถ้าสารสกัดมีค่า TEAC สูง แสดงว่ามีฤทธิ์ Antioxidant สูง สำหรับวิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของ Trolox แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก

วิธี FRAP

วิธีนี้มีหลักการคือใช้ FRAP reagent ซึ่งเป็นสารผสมของ 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) และ $FeCl_3 6H_2O$ แทน oxidized intermediate radical เมื่อสารสกัดใบฝรั่งทำปฏิกิริยากับ Fe^{3+} จะได้ reduced form Fe^{2+} ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ เมื่อวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ reduced form ที่เพิ่มขึ้นก็สามารถหาฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดได้

รายละเอียดของวิธีที่ทำการทดลองในครั้งนี้มีดังต่อไปนี้คือ เตรียม FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย 20 mM $FeCl_3$ ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.3 M Acetate buffer pH 3.6 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ ลงไปผสมให้เข้ากัน เจือจางสารสกัดใบฝรั่งให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้เพียง 20 ไมโครลิตรผสมกับ FRAP reagent 180 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่ได้ที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้ Microteter plate reader ฤทธิ์ Antioxidant ที่ได้หมายถึงฤทธิ์การมี reduction power โดยหากสารสกัดมีฤทธิ์ดังกล่าวมาก ก็จะให้ค่าการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} มาก ค่าที่แสดงออกมาเป็นค่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} (ที่สมดุลกับ 1 mM $FeSO_4$) ที่เกิดจากสารสกัดใบฝรั่งที่ทดสอบ 1 มิลลิกรัม เรียกว่า Equivalent concentration (EC) ถ้าสารสกัดมีค่า EC สูง แสดงว่ามีฤทธิ์ Antioxidant สูง สำหรับวิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข

การศึกษาหาปริมาณ Total phenolic content ของสารสกัด

ฤทธิ์ Antioxidant มักเกี่ยวเนื่องกันกับปริมาณ Total phenolic content (TPC) การศึกษาหา TPC ใช้หลักการหา Gallic acid equivalent (GAE) โดยให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent และ sodium carbonate (Na_2CO_3) แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงเทียบกับ Standard Gallic acid

รายละเอียดของวิธีที่ทำการทดลองในครั้งนี้มีดังต่อไปนี้คือ นำสารสกัดใบฝรั่งมาเจือจางด้วย Ethanol ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำ 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ลงไป 200 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเติม 2% sodium carbonate (Na_2CO_3) ลงไป 600 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วย shaker นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Microtiter plate

reader วิธีนี้ใช้น้ำเป็น negative control เปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารมาตรฐานคือ Gallic acid สำหรับวิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของ Gallic acid แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ค

การศึกษา HPLC Finger print ของสารสกัดใบฝรั่ง

นำสารสกัดแยกส่วนของใบฝรั่งที่มีอายุต่าง ๆ กัน มาศึกษา Finger print โดยใช้ HPLC และ UV detector ที่ความยาวคลื่น 373 นาโนเมตรและเทียบกับสารมาตรฐานคือ Quercetin โดยมีรายละเอียดของการศึกษาดังต่อไปนี้

1. **อุปกรณ์ / รายละเอียด HPLC ที่ใช้**
   - Column ZORBAX-SB-C18 (5 μm, 4.6 x 150 mm)
   - Guard column ZORBAX-SB-C18 (5 μm, 4 x 18 mm)
   - HPLC (HP 1000), Hewlett Packard (USA)
2. **สภาวะ HPLC ที่ใช้**

Control

Flow	:	1,000 ml/min
Stop-time	:	50.00 min
Post-time	:	20.00 min

Solvents

Solvent A	:	Acetonitrile
Solvent B	:	0.1 % Phosphoric acid
Solvent C	:	MeOH
Solvent D	:	Water

Presssure Limits

Minimum Pressure	:	0 bar
Maximum Pressure	:	300 bar

ผสม solvent ต่าง ๆ ตามเวลาและสัดส่วนตามตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 รายละเอียดของ mobile phase ที่ใช้

Time (min)	Solvent A	Solvent B	Solvent C	Solvent D	Flow
0.00	15.0	85.0	0.0	0.0	1.000
5.00	15.0	85.0	0.0	0.0	1.000
40.00	30.0	70.0	0.0	0.0	1.000
45.00	40.0	60.0	0.0	0.0	1.000
50.00	15.0	85.0	0.0	0.0	1.000

การศึกษาสมบัติการละลาย

สมบัติการละลาย เป็นสมบัติเคมีกายภาพเบื้องต้นของสารทดสอบที่จำเป็นต่อการพัฒนารูปแบบยาเตรียมหรือระบบนำส่งยาในทางเภสัชกรรม ในการวิจัยครั้งนี้การศึกษาสมบัติการละลาย ทำโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้ทางเภสัชกรรม และในการเตรียมอนุภาคนาโน ค่าการละลายที่ได้จากการทดลองจะเป็นค่าโดยประมาณ แต่สามารถบอกแนวโน้มของการละลายของสารตัวอย่างที่ทดสอบในตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบได้ รายละเอียดของการทดลองมีดังต่อไปนี้

1. ชั่งสารตัวอย่าง ใส่ใน test tube
2. ค่อย ๆ เติมตัวทำละลายที่ศึกษาลงไป
3. ปั่นผสมให้ทั่วโดย Vortex Mixer หรืออาจใช้ sonication ช่วย สังเกตผลการทดลอง
4. หากยังละลายไม่หมด ให้ทำซ้ำข้อ 2-3 จนกระทั่งสารสกัดละลายหมด
5. บันทึกผลการทดลอง
6. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 – 5 แล้วหาค่าเฉลี่ยของการละลาย

การศึกษาพฤติกรรมของสารเมื่อได้รับความร้อน

พฤติกรรมของสารสกัดเมื่อได้รับความร้อน เป็นสมบัติทางกายภาพอย่างหนึ่งของสารแต่ละชนิด ที่จำเป็นต่อการพัฒนารูปแบบยาเตรียมหรือระบบนำส่งยา การศึกษาในโครงการนี้ทำโดยอาศัยเครื่องมือ Differential Scanning Calorimeter (DSC) รายละเอียดของการทดลองมีดังต่อไปนี้คือ ชั่งสารตัวอย่างใส่ใน DSC aluminum pan ปริมาณแน่นอนในช่วง 3-5 มิลลิกรัม จากนั้นปิดฝาให้สนิทแล้วใส่ลงในเครื่อง DSC เพื่อวัดปริมาณพลังงานหรือความร้อนที่สารตัวอย่างดูดหรือคายออกมา สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเริ่มให้ความร้อนตั้งแต่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ไปจนถึง 350 องศาเซลเซียส อัตราเร็วในการเพิ่มความร้อนเท่ากับ 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่มีอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อนาที

การสกัดสาร Quercetin ออกจากใบฝรั่ง

การสกัดสาร Quercetin ออกจากใบฝรั่ง ทำดังต่อไปนี้

นำสารสกัดหยาบของใบฝรั่ง จำนวน 20 กรัม มาทำการแยกโดยใช้ Flash column chromatography โดยมีรายละเอียดต่อไปนี้

: Cosmosil 75μm C18-OPN 300 g.

: Column size: diameter 6 cm, height 25 cm

: Mobile: 5%, 20%, 35%, 50%, 65% and 100% methanol

(1500 ml/solvent, เก็บ 100 ml/flask จะเก็บได้ทั้งหมด 90 flask)

นำสารละลายที่เก็บได้ใน flask ที่ 21 – 30 มารวมกัน แล้วนำไปแยกต่อโดย การใช้ Sephadex column chromatography โดยใช้ส่วนของสารสกัดจำนวน 1.0015 กรัม ในรายละเอียดต่อไปนี้

: Sephadex LH-20 100 g

: Column size: diameter 2.5 cm, height 100 cm

: Mobile: methanol 2,000 ml, acetone:methanol (1:1) 500 ml และ acetone 500 ml

(เก็บ 100 ml/flask, จะเก็บได้ทั้งหมด 30 flask)

นำสารละลายที่เก็บได้ใน flask ที่ 13 – 15 มารวมกัน แล้วนำไปแยกต่อโดย โดยใช้ Column chromatography ในรายละเอียดต่อไปนี้

: Silica gel 60, 230-400 mesh 10 g

: Column size: diameter 1.0 cm, height 20 cm

: Mobile: hexane:ethyl acetate (1:1), hexane:ethyl acetate (3:7), ethyl acetate:acetone (1:1), ethyl acetate:acetone (3:7), acetone, methanol

(ใช้ 50 ml/solvemt; เก็บ 10 ml/flask จะเก็บได้ทั้งหมด 35 flask)

นำสารละลายที่เก็บได้ใน flask ที่ 4 – 10 มารวมกัน แล้วนำไปทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; acetone : water : acetic acid; 2:1:0.1; 10% sulfuric acid spraying reagent) พบว่าได้ spot เดียว ถือว่าเป็นสารบริสุทธิ์ นำไปตรวจหา molecular interaction และ mass โดย FTIR และ EI-MS ตามลำดับ และ confirm ผลว่าเป็น Quercetin โดยอาศัย NMR เปรียบเทียบกับ NMR attribution ของสารมาตรฐาน Quercetin ดังรายละเอียดต่อไปนี้

FTIR

โดยอาศัยเครื่อง JASCO FT/IR-230 spectrophotometer โดยนำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยวางบนหลุมหรือที่บรรจุสารของเครื่องแล้วนำ probe จากเครื่องลงมาแตะที่สารแล้วจึงทำการ scan ช่วง 4000-600 cm^{-1}

EI-MS

โดยอาศัยเครื่อง JEOL GC mate: EI-MS โดยนำสารตัวอย่างละลายใน Methanol จำนวนเล็กน้อย แล้วใส่ในหลอดแก้ว ก่อนนำเข้าเครื่องวัด

^{1}H-NMR

โดยนำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยละลายใน CD_3OD จำนวนเล็กน้อย แล้วใส่ในหลอดแก้ว ก่อนนำเข้าเครื่องวัด โดยอาศัยเครื่อง ^{1}H-NMR (400MHz, CD_3OD)

^{13}C-NMR

โดยนำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยละลายใน CD_3OD จำนวนเล็กน้อย แล้วใส่ในหลอดแก้ว ก่อนนำเข้าเครื่องวัด โดยอาศัยเครื่อง ^{13}C-NMR (100MHz)

การศึกษาเตรียมอนุภาคนาโนของสารสกัด

ในการศึกษาเพื่อเตรียมอนุภาคนาโนของสารสกัดจากใบฝรั่ง ได้ใช้ Quercetin บริสุทธิ์ เป็น model drug และศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีผลต่ออนุภาคนาโนที่เตรียมได้ดังต่อไปนี้

1. การศึกษาผลของไคโตซานจากสัตว์ต่างชนิดกัน
2. การศึกษาผลของลำดับการเติมสาร
3. การศึกษาผลของ molecular weight (MW) ของไคโตซาน
4. การศึกษาผลของ degree of acetylation (DA) ของไคโตซาน
5. การศึกษาผลของระบบตัวทำละลายสารสกัด
6. การศึกษาผลของอัลจิเนต

ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

การศึกษาผลของไคโตซานจากสัตว์ต่างชนิดกัน

ในการศึกษาผลของไคโตซานจากสัตว์ต่างชนิดกันในโครงการนี้ ได้ใช้ไคโตซานจากส่วนของสัตว์ต่าง ๆ 3 ชนิด ดังต่อไปนี้

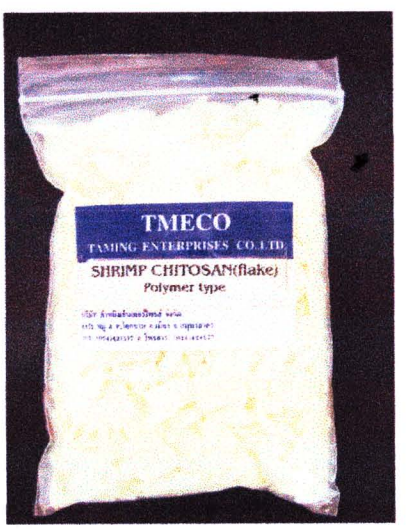
1. ไคโตซานจากเปลือกกุ้ง
2. ไคโตซานจากกระดองปู
3. ไคโตซานจากแกนปลาหมึก

โดยได้นำไคโตซานของสัตว์ทั้ง 3 ชนิด ที่มี MW แตกต่างกันชัดเจน คือเป็นชนิดโพลิเมอร์ (ซึ่งมี MW สูง) กับชนิดโอลิโกเมอร์ (ซึ่งมี MW ต่ำ) ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงมีไคโตซานที่ทำการศึกษาทั้งหมด 6 ชนิด ดังต่อไปนี้ และแต่ละชนิดมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2-8 ถึงรูปที่ 2-13

1. ไคโตซานจากกุ้ง ชนิดโอลิโกเมอร์ (1)
   (จากบริษัทต้าหมิงเอ็นเตอร์ไพส์ จำกัด ประเทศไทย)
2. ไคโตซานจากกุ้ง ชนิดโพลิเมอร์
   (จากบริษัทต้าหมิงเอ็นเตอร์ไพส์ จำกัด ประเทศไทย)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

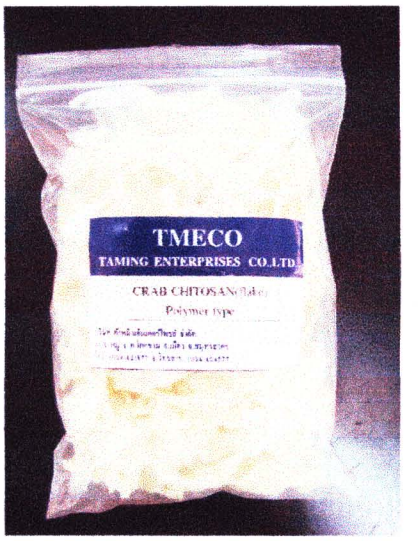
3. ไคโตซานจากปู ชนิดโอลิโกเมอร์
   (จากบริษัทต้าหมิงเอ็นเตอร์ไพส์ จำกัด ประเทศไทย)
4. ไคโตซานจากปู ชนิดโพลิเมอร์
   (จากบริษัทต้าหมิงเอ็นเตอร์ไพส์ จำกัด ประเทศไทย)
5. ไคโตซานจากปลาหมึก ชนิดโอลิโกเมอร์
   (จากบริษัทต้าหมิงเอ็นเตอร์ไพส์จำกัด ประเทศไทย)
6. ไคโตซานจากกุ้ง ชนิดโอลิโกเมอร์ (2)
   (จากบริษัทซีเฟรช ไคโตซาน (แลป) จำกัด ประเทศไทย)



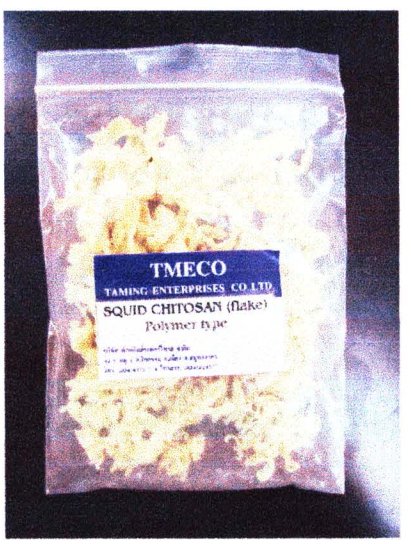
รูปที่ 2-8 ไคโคซานจากกุ้งชนิดโอลิโกเมอร์ (1)
(ไคโตซานชนิดที่ 1)

รูปที่ 2-9 ไคโตซานจากกุ้งชนิดโพลีเมอร์
(ไคโตซานชนิดที่ 2)

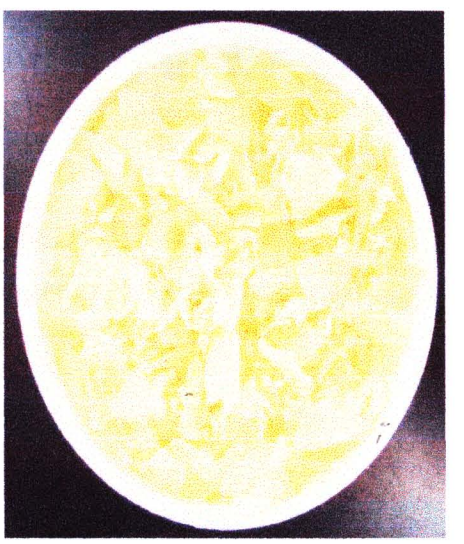
รูปที่ 2-10 ไคโตซานจากปูชนิดโอลิโกเมอร์
(ไคโตซานชนิดที่ 3)



รูปที่ 2-11 ไคโตซานจากปูชนิดโพลีเมอร์
(ไคโตซานชนิดที่ 4)



รูปที่ 2-12 ไคโตซานจากปลาหมึกชนิดโพลิเมอร์
(ไคโตซานชนิดที่ 5)



รูปที่ 2-13 ไคโตซานจากกุ้งชนิดโอลิโกเมอร์ (2)
(ไคโตซานชนิดที่ 6)

การเตรียมอนุภาคนาโนจากไคโตซานของสัตว์ชนิดต่าง ๆ มีหลักการทำดังต่อไปนี้

1. นำไคโตซานมาละลายใน Acetic acid 1% (v/v) ปั่นทิ้งไว้ข้ามคืน (700 rpm)
2. นำ Sodium alginate มาละลายในน้ำ ปั่นทิ้งไว้ข้ามคืน (700 rpm)
3. ละลาย $CaCl_2$ ในน้ำ
4. นำสารละลาย $CaCl_2$ หยดลงในสารละลาย Alginate ปั่นทิ้งไว้ 30 นาที (700 rpm)
5. หยดสารละลายไคโตซาน ลงในสารละลายข้อ 4 ปั่นทิ้งไว้ 30 นาที (700 rpm)

การศึกษาผลของลำดับการเติมสาร

การศึกษาผลของลำดับการเติมสาร เพื่อให้เกิดอนุภาคนาโน ใช้หลักการเตรียมอนุภาคนาโนเช่นเดียวกับการศึกษาผลของไคโตซานจากสัตว์ต่างชนิดกัน แต่มีรายละเอียดปลีกย่อยดังต่อไปนี้

1. ใช้ไคโตซาน (จากเปลือกกุ้ง ของบริษัทซีเฟรช ไคโตซาน (แลป) จำกัด) ที่มี DA เท่ากับ 95% มี MW เท่ากับ 15000
2. เตรียมสารละลาย Sodium alginate ความเข้มข้น 0.03 %w/v ในน้ำปราศจากไอออน (ใช้ปริมาณ 10.0 มิลลิลิตร =A)
3. เตรียมสารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย water-DMSO (1:1) (ใช้ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร =B)
4. เตรียมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.18 mM (ใช้ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร =C)
5. เตรียมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %w/v ในสารละลาย Acetic acid 1%v/v (ใช้ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร =D)
6. ทำการเตรียมอนุภาคนาโน โดยเติมสารละลาย A, B, C, D ตามลำดับ ดังต่อไปนี้

    6.1 A B C D

    6.2 A B D C

    6.3 C B A D

    6.4 B C D A

(หมายเหตุ การเติมสารละลายแต่ละชนิด ให้ค่อย ๆ หยดลงไป ในขณะหยดให้ปั่นที่ 700 rpm ตลอดเวลา หลังจากหยดสารละลายสุดท้ายแล้วให้ปั่นต่ออีก 30 นาที)

การศึกษาผลของ Molecular weight (MW) ของไคโตซาน

การศึกษาผลของ MW ของไคโตซาน เพื่อให้เกิดอนุภาคนาโน ใช้หลักการเตรียมอนุภาคนาโนเช่นเดียวกับการศึกษาผลของไคโตซานจากสัตว์ต่างชนิดกัน แต่มีรายละเอียดปลีกย่อยดังต่อไปนี้

1. ใช้ไคโตซาน (จากเปลือกกุ้ง ของบริษัทซีเฟรช ไคโตซาน (แลป) จำกัด) ที่มี DA เท่ากับ 95 มี MW เท่ากับ 15000, 22000, และ 760000
2. นำไคโตซานแต่ละชนิดมาเตรียมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %w/v ในสารละลาย Acetic acid 1%v/v
3. เตรียมสารละลาย Sodium alginate ความเข้มข้น 0.03 %w/v ในน้ำปราศจากไอออน
4. เตรียมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.18 mM
5. เตรียมสารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0.10, 0.20, และ 0.30 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย water-DMSO (1:1)
6. นำสารละลายแต่ละชนิด เติมลงตามลำดับที่เหมาะสมซึ่งได้จากผลการทดลองข้างต้น

(หมายเหตุ การเติมสารละลายแต่ละชนิด ให้ค่อย ๆ หยดลงไป ในขณะหยดให้ปั่นที่ 700 rpm ตลอดเวลา หลังจากหยดสารละลายสุดท้ายแล้วให้ปั่นต่ออีก 30 นาที)

การศึกษาผลของ Degree of deacetylation (DD) ของไคโตซาน มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การศึกษาผลของ DD ของไคโตซาน เพื่อให้เกิดอนุภาคนาโน ใช้หลักการเตรียมอนุภาคนาโนเช่นเดียวกับการศึกษาผลของไคโตซานจากสัตว์ต่างชนิดกัน แต่มีรายละเอียดปลีกย่อยดังต่อไปนี้

1. ใช้ไคโตซาน (จากเปลือกกุ้ง ของบริษัทซีเฟรช ไคโตซาน (แลป) จำกัด) ที่มี MW 22000 และมี DD เท่ากับ 95% และ 85%
2. นำไคโตซานแต่ละชนิดมาเตรียมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %w/v ในสารละลาย Acetic acid 1%v/v
3. เตรียมสารละลาย Sodium alginate ความเข้มข้น 0.03 %w/v ในน้ำปราศจากไอออน

4. เตรียมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.18 mM
5. เตรียมสารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0.10, 0.20, และ 0.30 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ในสารละลาย water-DMSO (1:1)
6. นำสารละลายแต่ละชนิด เติมลงตามลำดับที่เหมาะสมซึ่งได้จากผลการทดลองข้างต้น

(หมายเหตุ การเติมสารละลายแต่ละชนิด ให้ค่อย ๆ หยดลงไป ในขณะหยดให้ปั่นที่ 700 rpm ตลอดเวลา หลังจากหยดสารละลายสุดท้ายแล้วให้ปั่นต่ออีก 30 นาที)

การศึกษาผลของระบบตัวทำละลายสารสกัด

การศึกษาผลของระบบตัวทำละลายสารสกัด เพื่อให้เกิดอนุภาคนาโน ใช้หลักการเตรียมอนุภาคนาโนเช่นเดียวกับการศึกษาผลของไคโตซานจากสัตว์ต่างชนิดกัน แต่มีรายละเอียดปลีกย่อยดังต่อไปนี้

1. ใช้ไคโตซาน (จากเปลือกกุ้ง ของบริษัทซีเฟรช ไคโตซาน (แลป) จำกัด) ที่มี MW 15000 และมี DD เท่ากับ 95%
2. เตรียมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %w/v ในสารละลาย Acetic acid 1%v/v
3. เตรียมสารละลาย Sodium alginate ความเข้มข้น 0.03 %w/v ในน้ำปราศจากไอออน
4. เตรียมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.18 mM
5. เตรียมสารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0.00, 0.10, และ 0.30 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ในระบบตัวทำละลายระหว่าง water กับตัวทำละลายอื่น ได้แก่ Dimethylsufoxide (DMSO), Polyethylene (PEG) 400, Propylene glycol (PG), และ Tween 20 ในสัดส่วน 1:1 (by volume) ดังต่อไปนี้
    - 5.1 water-DMSO
    - 5.2 water-PEG 400
    - 5.3 water-PG
    - 5.4 water-Tween 20
6. นำสารละลายแต่ละชนิด เติมลงตามลำดับที่เหมาะสมซึ่งได้จากผลการทดลองข้างต้น

(หมายเหตุ การเติมสารละลายแต่ละชนิด ให้ค่อย ๆ หยดลงไป ในขณะหยดให้ปั่นที่ 700 rpm ตลอดเวลา หลังจากหยดสารละลายสุดท้ายแล้วให้ปั่นต่ออีก 30 นาที)

การศึกษาผลของอัลจิเนต มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การศึกษาผลของอัลจิเนต เพื่อให้เกิดอนุภาคนาโน ใช้หลักการเตรียมอนุภาคนาโนเช่นเดียวกับการศึกษาผลของไคโตซานจากสัตว์ต่างชนิดกัน แต่มีรายละเอียดปลีกย่อยดังต่อไปนี้

1. ใช้ไคโตซาน (จากเปลือกกุ้ง ของบริษัทซีเฟรช ไคโตซาน (แลป) จำกัด) ที่มี MW 15000 และมี DD เท่ากับ 95%
2. เตรียมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %w/v ในสารละลาย Acetic acid 1%v/v
3. เตรียมสารละลาย Sodium alginate ความเข้มข้น 0.03 % และ 0.06 w/v ในน้ำปราศจากไอออน
4. เตรียมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.18 mM
5. เตรียมสารละลาย Quercetin ความเข้มข้น 0.00, 0.10, และ 0.30 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย water-PEG ในสัดส่วน 1:1 (by volume)
6. นำสารละลายแต่ละชนิด เติมลงตามลำดับที่เหมาะสมซึ่งได้จากผลการทดลองข้างต้น (หมายเหตุ การเติมสารละลายแต่ละชนิด ให้ค่อย ๆ หยดลงไป ในขณะหยดให้ปั่นที่ 700 rpm ตลอดเวลา หลังจากหยดสารละลายสุดท้ายแล้วให้ปั่นต่ออีก 30 นาที)

การศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บของอนุภาคนาโน

การศึกษาหาประสิทธิภาพการกักเก็บ (Entrapment efficiency) ของอนุภาคนาโน ใช้หลักการการวิเคราะห์หาปริมาณสารแบบ indirect analysis ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. นำของเหลวผสมที่มีอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. นำ supernatant ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (Quercetin) โดย HPLC ดังรายละเอียดต่อไปนี้
    1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน Methanol เพื่อสร้าง standard curve
    2. เตรียมสารละลาย Phosphoric acid ความเข้มข้น 0.1 %w/v ในน้ำ กรองสารละลายผ่าน nylon membrane ขนาดรูเปิด 450 นาโนเมตร

3. เตรียม mobile phase ของ HPLC โดยผสม Acetonitrile กับ 0.1 %w/v phosphoric acid สัดส่วน 30 : 70 โดยปริมาตร ทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 373 nm โดย UV detector

3. คำนวณหาประสิทธิภาพการกักเก็บสารสำคัญ แบบ indirect method โดยสมการ ต่อไปนี้

$$\% \text{ Entrapment} = \frac{\text{actual Quercetin added} - \text{Quercetin in supernatant}}{\text{actual Quercetin added}} \times 100$$

การศึกษาขนาด การกระจายขนาดของอนุภาค และ Zeta potential

ในการศึกษาขนาด การกระจายขนาดของอนุภาค และ Zeta potential ทำโดยอาศัย เครื่อง Photon correlation spectrophotometer (PCS) (Zetasizer Nano ZS, บริษัท Malvern, Herrenberg, Germany) โดยอาศัยหลักการ dynamic scattering ที่มุม 173 องศา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเจือจางตัวอย่างด้วย deionized water จนได้ความเข้มข้นพอเหมาะอยู่ในช่วงที่วัดได้ ทำการวัด 3 ครั้ง การคำนวณขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค ใช้ค่า refractive index และ viscosity ของน้ำเป็น reference สำหรับการคำนวณค่า zeta potential ใช้ค่า viscosity และ dielectric constant ของน้ำเป็น reference

การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากอนุภาคนาโน

ในการศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากอนุภาคนาโน ได้คัดเลือกศึกษากับระบบและปัจจัยที่ทำให้สามารถเตรียมอนุภาคนาโนได้อย่างเหมาะสมตามความต้องการ ซึ่งต้องพิจารณาจากผลการทดลองข้างต้น จากผลการทดลองที่ผ่านมาทั้งหมด สามารถคัดเลือกอนุภาคนาโนที่เหมาะสมเพื่อศึกษาพฤติกรรมการปลดปล่อยสารสำคัญคือ Quercetin ได้ โดยเป็นอนุภาคนาโนที่เตรียมได้จากสารละลายและชนิดของไคโตซานรวมถึงสภาวะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

สารละลายที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนที่ใช้ในการทดลองขั้นตอนนี้ มี 4 ชนิด ได้แก่

1. สารละลายสารสำคัญ (Quercetin) ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร โดยเลือกใช้ Propylene glycol เป็นตัวทำละลายสารสำคัญ

2. สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %w/v ในสารละลาย Acetic acid 1%v/v
3. สารละลาย Sodium alginate ความเข้มข้น 0.03 %w/v
4. สารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.18 mM

ส่วนไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาขั้นตอนนี้ ได้เลือกใช้ไคโตซานจากเปลือกกุ้ง ที่มี MW และ DD ดังต่อไปนี้

1. ชนิดที่ 1 มี MW = 15000 และ DD = 95%
2. ชนิดที่ 2 มี MW = 22000 และ DD = 95%
3. ชนิดที่ 3 มี MW = 760000 และ DD = 95%
4. ชนิดที่ 4 มี MW = 45000 และ DD = 85%

ได้ทำการศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนาโนเปรียบเทียบกับสารสำคัญที่ไม่ถูกกักเก็บในอนุภาคนาโน ดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลาย Phosphate buffer (200 mM, pH 7.4) ดังต่อไปนี้
    a. ชั่ง Na_2HPO_4 มา 36.32 กรัม ละลายน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้าย ให้ได้ 1 ลิตร
    b. ชั่ง NaH_2PO_4 มา 31.08 กรัม ละลายน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้าย ให้ได้ 1 ลิตร
    c. จากนั้น นำสารละลาย Na_2HPO_4 40.5 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลาย NaH_2PO_4 9.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. นำอนุภาคนาโนที่ต้องการศึกษา ที่มีปริมาณ Quercetin 1.5 มิลลิกรัม กระจายตัวในสารละลาย Phosphate buffer ที่เตรียมได้ แล้วใส่ลงใน dialysis bag ปิดหัวท้ายของ dialysis bag ให้แน่นสนิท
3. เติม Tween 20 ลงในสารละลาย Phosphate buffer ให้ได้ความเข้มข้น 2% เพื่อใช้เป็น dissolution medium
4. นำ dialysis bag ที่บรรจุสารทดสอบจุ่มใน dissolution medium 50 มิลลิลิตร
5. คนด้วยอัตรา 100 rpm ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. วิเคราะห์หาปริมาณ Quercetin ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในเวลาต่าง ๆ โดยดูดสารละลายครั้งละ 3 ml และแทนที่ด้วย dissolution medium ปริมาณเท่ากัน กรองสารละลายผ่าน 200 nm nylon membrane นำ filtrate ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังรายละเอียดต่อไปนี้
   a. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน Methanol เพื่อสร้าง standard curve
   b. เตรียมสารละลาย Phosphoric acid ความเข้มข้น 0.1 %w/v ในน้ำ กรองสารละลายผ่าน nylon membrane ขนาดรูเปิดเท่ากับ 450 นาโนเมตร
   c. เตรียม mobile phase ของ HPLC โดยผสม Acetonitrile กับ 0.1 %w/v Phosphoric acid สัดส่วน 30 : 70 โดยปริมาตร ทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 373 nm โดย UV detector

การศึกษาความคงตัว

ในการศึกษาความคงตัวของสารสำคัญภายในอนุภาคนาโน ได้คัดเลือกศึกษากับระบบและปัจจัย ที่ทำให้สามารถเตรียมอนุภาคนาโนได้อย่างเหมาะสมตามความต้องการ เช่นเดียวกับระบบที่ใช้ในการศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากอนุภาคนาโน ดังต่อไปนี้

สารละลายที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนที่ใช้ในการทดลองขั้นตอนนี้ มี 4 ชนิด ได้แก่

1. สารละลายสารสำคัญ (Quercetin) ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร โดยเลือกใช้ Propylene glycol เป็นตัวทำละลายสารสำคัญ
2. สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %w/v ในสารละลาย Acetic acid 1%v/v
3. สารละลาย Sodium alginate ความเข้มข้น 0.03 %w/v
4. สารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.18 mM

ส่วนไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาขั้นตอนนี้ ได้เลือกใช้ไคโตซานจากเปลือกกุ้ง ที่มี MW และ DD ดังต่อไปนี้

1. ชนิดที่ 1 มี MW = 15000 และ DD = 95%
2. ชนิดที่ 2 มี MW = 22000 และ DD = 95%

3. ชนิดที่ 3 มี MW = 760000 และ DD = 95%
4. ชนิดที่ 4 มี MW = 45000 และ DD = 85%

ได้ทำการทดลองโดยนำอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ มาทำการศึกษาความคงตัว โดยบรรจุในภาชนะสองชนิด คือชนิดที่กันแสงได้และชนิดที่ไม่กันแสง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ที่อุณหภูมิเย็น (4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส), และอุณหภูมิร้อน (45 องศาเซลเซียส) ดังนั้นตัวอย่างสำหรับการศึกษาความคงตัวจึงมีดังต่อไปนี้

1. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 15000 DD 95% (CS#1) ที่อุณหภูมิเย็น
2. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 22000 DD 95% (CS#2) ที่อุณหภูมิเย็น
3. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 760000 DD 95% (CS#3) ที่อุณหภูมิเย็น
4. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 45000 DD 85% (CS#4) ที่อุณหภูมิเย็น
5. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 15000 DD 95% (CS#1) ที่อุณหภูมิห้อง
6. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 22000 DD 95% (CS#2) ที่อุณหภูมิห้อง
7. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 760000 DD 95% (CS#3) ที่อุณหภูมิห้อง
8. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 45000 DD 85% (CS#4) ที่อุณหภูมิห้อง
9. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 15000 DD 95% (CS#1) ที่อุณหภูมิร้อน
10. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 22000 DD 95% (CS#2) ที่อุณหภูมิร้อน
11. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 760000 DD 95% (CS#3) ที่อุณหภูมิร้อน
12. อนุภาคนาโนที่ใช้ไคโตซาน MW 45000 DD 85% (CS#4) ที่อุณหภูมิร้อน

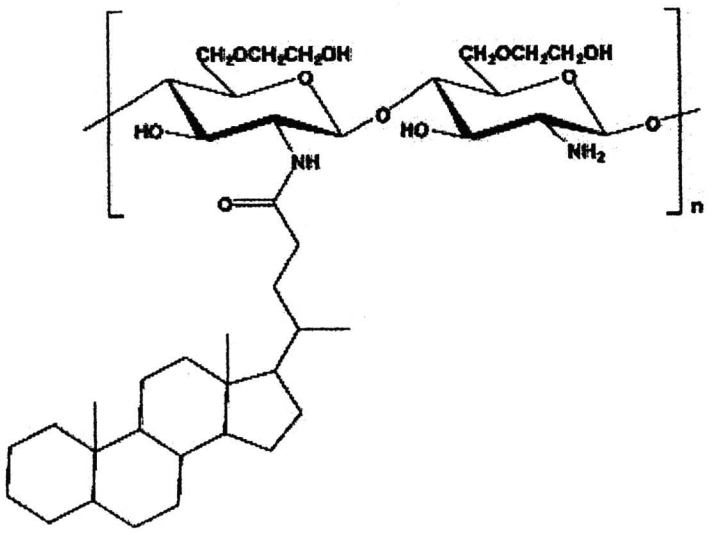
การประเมินผล ประเมินโดยสมบัติต่อไปนี้

1. ความคงสภาพของสารสำคัญที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนาโน
2. Degradation kinetic ของสารสำคัญที่ถูกกักเก็บในอนุภาคนาโน
3. สมบัติเคมีกายภาพของอนุภาคนาโน เช่น ขนาดและการกระจายขนาด รวมถึง zeta potential

การเตรียม Hydrophobic glycol chitosan

การเตรียม Hydrophobic glycol chitosan (HGC) ใช้อนุพันธ์ของไคโตซานคือ Glycol chitosan เป็นสารตั้งต้น ดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลาย Glycol chitosan ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลในน้ำ โดยชั่ง Glycol chitosan 500 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลาย 5-Beta-cholanic acid ความเข้มข้น 56 ไมโครโมลใน Methanol โดยชั่ง 5-eta-cholanic acid 20 มิลลิกรัม ละลายใน Methanol 60 มิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลาย N-Hydroxysuccinimide ความเข้มข้น 1.5 โมลอิควิวาเลนต์ของสารละลาย 5-beta-cholanic acid โดยชั่ง N-Hydroxysuccinimide 9.87 มิลลิกรัม ละลายใน Methanol 2 มิลลิลิตร
4. เตรียมสารละลาย N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride ความเข้มข้น 1.5 mole equivalent ของสารละลาย 5-Beta-cholanic acid โดยชั่ง N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride 16.43 มิลลิกรัม ละลายใน Methanol 2 มิลลิลิตร
5. นำสารละลาย Glycol chitosan ผสมอย่างรวดเร็วกับสารละลาย 5-beta-cholanic acid ที่อุณหภูมิห้อง
6. นำสารละลายผสมวางใน ice bath แล้วค่อย ๆ เติมสารละลาย N-Hydroxysuccinimide และ สารละลาย N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride คนอย่างแรงเพื่อเร่งให้เกิดปฏิกิริยา
7. ปั่นสารละลายผสมให้ปฏิกิริยาดำเนินไป 12 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะปิด
8. นำสารละลายที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Dialysis bag ที่จำกัดขนาดของรูพรุนที่มวลโมเลกุล 10,000 โดยใช้สารละลายผสมของ Methanol กับน้ำ ที่ความเข้มข้น 4 ต่อ 1 โดยปริมาตร เป็นสารละลายข้างนอกถุงปั่นทิ้งไว้ เป็นเวลา 3 วัน
9. นำสารละลายใน dialysis bag มาทำให้แห้ง ด้วยวิธี Lyophilization สารประกอบที่ได้คือ อนุพันธ์ของไกลคอลไคโตซานที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ แต่สามารถแขวนลอยในน้ำได้ สารประกอบที่ได้คือ HGC มีโครงสร้าง ดังแสดงในรูปที่ 2-14



รูปที่ 2-14 โครงสร้างทางเคมีของ HGC

การเตรียมอนุภาคนาโน HGC ที่บรรจุ Quercetin

การบรรจุ Quercetin ในอนุภาคนาโน HGC ทำโดยใช้เทคนิค dialysis มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. นำ HGC ที่เตรียมได้ จำนวน 20 มิลลิกรัม มาละลายในสารละลายผสมที่มี Methanol และ น้ำ ที่ 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร ปริมาณ 4 มิลลิลิตร
2. ละลาย Quercetin ตามปริมาณที่ต้องการกักเก็บ ใน Methanol 2 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย Quercetin ลงในสารละลาย HGC ที่เตรียมได้
4. จากนั้นปั่นอย่างแรง ติดต่อกันเป็นเวลาจำนวน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
5. นำสารละลายที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ถุง Dialysis bag ที่จำกัดขนาดของรูพรุนที่มวลโมเลกุล 12,000 โดยใช้น้ำกลั่น เป็นสารละลายข้างนอกถุง ปั่นทิ้งไว้ เป็นเวลา 2 วัน
6. นำสารละลายในถุง Dialysis bag มาปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
7. นำมากรองด้วยหัวกรองขนาด 800 นาโนเมตร
8. นำ Filtrate มาทำให้แห้ง ด้วยวิธี Lyophilization