

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

- (1) ปีกเกอร์ขนาด 50, 100, 200, 250, 600 และ 1000 มิลลิลิตร
- (2) ขวดแก้วขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- (3) ขวดวัดปริมาตรขนาด 5, 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- (4) ขวดDuran ขนาด 100, 200, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- (5) หลอดทดลองขนาด 13 × 100 และ 16 × 150 มิลลิลิตร
- (6) กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
- (7) หลอดหยด
- (8) จุกยาง
- (9) แท่งแม่เหล็กกวนสาร
- (10) แท่งแก้วคนสาร
- (11) ช้อนตักสาร
- (12) พาราฟิล์ม
- (13) กระดาษชั่งสาร

3.1.2 เครื่องมือ

- (1) เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่งไฟฟ้า (Electric Balance) รุ่น AE200 บริษัท Mettler จากประเทศสหรัฐอเมริกา
- (2) ปิเปตอัตโนมัติปริมาณ 50-200, 200-1000 ไมโครลิตร และ 1-5 มิลลิลิตร
- (3) เครื่อง Stirrer รุ่น T422177 ยี่ห้อ Clifton Ceraster จากประเทศออสเตรเลีย
- (4) เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) ยี่ห้อ Beckman จากประเทศสหรัฐอเมริกา

- (5) เครื่องเขย่ายี่ห้อ Innova รุ่น 4340 บริษัท New Brunswick Scientific จากประเทศสหรัฐอเมริกา
- (6) Water bath ยี่ห้อ Memmert รุ่น WMB 1.0 จากประเทศเยอรมัน
- (7) UV vis spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-3900 จากประเทศสหรัฐอเมริกา
- (8) เครื่องวัดค่าศักย์ไฟฟ้ายี่ห้อ Malvern รุ่น Zetasizer nano series 5.10 จากประเทศอังกฤษ
- (9) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Harrier 18/80 บริษัท Thai Polymedic จากประเทศไทย
- (10) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ยี่ห้อ Jeol รุ่น JEM1200 จากประเทศญี่ปุ่น
- (11) Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectrometer ยี่ห้อ Bruker รุ่น Tensor 27 จากประเทศสหรัฐอเมริกา
- (12) Transmission Fourier Transform Infrared spectrometer ยี่ห้อ Bruker รุ่น Tensor 27 จากประเทศสหรัฐอเมริกา
- (13) เครื่องวัดค่าศักย์ไฟฟ้า (Zeta potential analyzer) ผลิตภัณฑ์ Malvern รุ่น Zetasizer ZS จากประเทศอังกฤษ

3.1.3 สารเคมี

- (1) ไคโตซานผง จากบริษัท Seafresh Chitosan (Lab) ประเทศไทย
- (2) แอลฟาโทโคฟีรอล จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
- (3) กลูโคส จากบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (4) Dinitrosalicylic acid (DNS) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
- (5) โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (6) โซเดียม-โพแทสเซียม ทาร์เทต จากบริษัท Fluka ประเทศสหรัฐอเมริกา
- (7) เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จากบริษัท Lab-scan ประเทศไทย
- (8) กรดอะซิติก 97 เปอร์เซ็นต์ จากบริษัท Lab-scan ประเทศไทย

3.2 การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซาน

3.2.1 เตรียมสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร โดยการนำไคโตซาน 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 กรัมละลายใน ddH₂O ภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลาข้ามคืน

3.2.2 เติมกรดอะซิติก 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งไว้เป็นเวลาข้ามคืน ปรับปริมาตรด้วย ddH₂O จนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากขั้นตอนนี้แล้วนำไปทำตามขั้นตอนที่ 3.3 ต่อไป

3.2.3 นำสารละลายไคโตซานที่เตรียมได้ในข้อ 3.1.1 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาหยดสารละลายไตรโพลีฟอสเฟต (Tripolyphosphate; TPP) 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปช้าๆ ภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนสารจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.4 นำสารละลายที่ได้ไปทำการให้คลื่นความถี่สูง (Sonication) เป็นเวลา 5 นาที

3.2.5 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย ddH₂O ปริมาตร 40 มิลลิลิตร อีก 3 รอบ

3.2.6 เติม ddH₂O กลับเข้าไปที่ตะกอน โดยจะเก็บอนุภาคนาโนไคโตซานที่ได้ใน ddH₂O ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำไปทำการทดลองต่อไป

3.3 การกักเก็บสารต่างๆ ในอนุภาคไคโตซาน

3.3.1 การกักเก็บกลูโคส

3.3.1.1 ทำการกำหนดความเข้มข้นของไคโตซานและกลูโคสเพื่อหาประสิทธิภาพการกักเก็บ โดยการนำสารละลายไคโตซานที่เตรียมได้จากขั้นตอน 3.2 ในทุกๆ ความเข้มข้น ผสมกับสารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75, และ 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร ภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนสาร

3.3.1.2 หยดสารละลายไตรโพลีฟอสเฟต 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปช้าๆ ภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนสาร

3.3.1.3 นำสารละลายที่ได้ไปทำการให้คลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 5 นาที

3.2.1.4 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย ddH₂O อีก 3 ครั้ง

3.3.1.5 เติม ddH₂O กลับเข้าไปที่ตะกอนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่เหลือด้วยวิธี DNS แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ตามรายละเอียดที่ 3.6.1 หาประสิทธิภาพการกักเก็บสาร ตามรายละเอียดที่ 3.3.4 และปลดปล่อยสารตามรายละเอียดที่ 3.3.5 ต่อไป

3.3.1.6 เลือกความเข้มข้นของไคโตซานและกลูโคสที่ให้ประสิทธิภาพการกักเก็บดีที่สุด และทำการทดสอบผลการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซาน กลูโคส เพื่อนำมาใช้ในการกักเก็บกลูโคส และแอลฟาโทโคฟีรอลพร้อมกันต่อไป

3.3.2 การกักเก็บแอลฟาโทโคฟีรอล

3.3.2.1 ทำการกำหนดความเข้มข้นของไคโตซานและแอลฟาโทโคฟีรอล เพื่อหาประสิทธิภาพการกักเก็บ โดยการนำสารละลายไคโตซานที่เตรียมได้จากขั้นตอน 3.2 ผสมกับสารละลายแอลฟาโทโคฟีรอล 0.25, 0.5, 0.75 และ 1%w/v ภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนสาร

3.3.2.2 หยดสารละลายไตรโพลีฟอสเฟต 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปช้าๆ ภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนสาร

3.3.2.3 นำสารละลายที่ได้ไปทำการให้คลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 5 นาที

3.3.2.4 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย ddH₂O อีก 3 รอบ

3.3.2.5 เติม ddH₂O กลับเข้าไปที่ตะกอนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาโทโคฟีรอลที่เหลือ ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ตามรายละเอียดที่ 3.6.2 และหาประสิทธิภาพการกักเก็บตามรายละเอียดที่ 3.3.4 และการปลดปล่อยสารตามรายละเอียดที่ 3.3.5 ต่อไป

3.3.2.6 เลือกความเข้มข้นของไคโตซานและแอลฟาโทโคฟีรอลที่ให้ประสิทธิภาพการกักเก็บดีที่สุด และทำการทดสอบผลการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซาน กลูโคส แอลฟาโทโคฟีรอล เพื่อนำมาใช้ในการกักเก็บแอลฟาโทโคฟีรอล และสารทั้งสองชนิดพร้อมกันต่อไป

3.3.3 การกักเก็บแอลฟาโทโคฟีรอลและกลูโคส

3.3.3.1 นำสารละลายไคโตซานที่เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมได้จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไคโตซาน กลูโคส และแอลฟาโทโคฟีรอลแล้วมาทำการเตรียมอนุภาคไคโตซานกักเก็บสารทั้งสองชนิดพร้อมกัน โดยการผสมกลูโคสและแอลฟาโทโคฟีรอลจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันก่อนภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนสาร

3.3.3.2 นำสารละลายกลูโคสและแอลฟาโทโคฟีรอลที่ผสมกันแล้วมาใส่ลงในสารละลายไคโตซาน แล้วจึงค่อยๆหยดสารละลายไตรโพลีฟอสเฟต 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปอย่างช้าๆ

3.3.3.3 นำสารละลายที่ได้ไปทำการให้คลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 5 นาที

3.3.3.4 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วย ddH₂O อีก 3 รอบ

3.3.4.5 เติม ddH₂O กลับเข้าไปที่ตะกอนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการกักเก็บแอลฟาโทโคฟีรอลและกลูโคส ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ตามรายละเอียดที่ 3.6.2 และวิธี DNS รายละเอียดที่ 3.6.1 ตามลำดับ

3.3.3.6 นำ suspension ที่เตรียมได้ไปทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บตามรายละเอียดที่ 3.3.4 และการปลดปล่อยสารตามรายละเอียดที่ 3.3.5 ต่อไป

3.3.4 สูตรการหาประสิทธิภาพการกักเก็บ (Encapsulation efficiency) (Yan *et al.*, 2005)

คำนวณหาประสิทธิภาพการกักเก็บสาร (%EE) โดยใช้สูตร

$$\text{Encapsulation efficiency (\%EE)} = \frac{(\text{Total agent} - \text{Free agent})}{\text{Total agent}} \times 100 \quad (1)$$

3.3.5 สูตรการหาประสิทธิภาพการปลดปล่อย (Releasing efficiency) (Ratul *et al.*, 2010)

คำนวณหาประสิทธิภาพการปลดปล่อยสาร (%RE) โดยใช้สูตร

$$\text{Releasing efficiency (\%RE)} = \frac{(\text{Free agent})}{\text{Total agent}} \times 100 \quad (2)$$

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยการกำหนดความเข้มข้นโคโตซาน กลูโคส และ แอลฟาโทโคฟีรอล นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Oneway ANOVA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistics Package for the Social Sciences (SPSS) 19.0 มีการทดสอบหาค่าความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ .05 ถ้าได้ค่า $p\text{-value} \leq .05$ แสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และถ้าค่า $p\text{-value} \geq .05$ แสดงว่าข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจะทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นโคโตซาน กลูโคส และแอลฟาโทโคฟีรอลที่ให้ประสิทธิภาพการกักเก็บดีที่สุด เลือกลำดับมาทำการเตรียมอนุภาคนาโนโคโตซานกักเก็บสารสองชนิดพร้อมกัน ทดสอบประสิทธิภาพการปลดปล่อย ปัจจัยที่มีผลต่อการปลดปล่อยต่อไป

3.5 การปลดปล่อยสารต่างๆ จากอนุภาคโคโตซาน

3.5.1 อัตราการปลดปล่อยสารแบบสะสม

3.5.1.1 นำ suspension ของอนุภาคโคโตซานที่กักเก็บกลูโคส แอลฟาโทโคฟีรอล และสารทั้งสองชนิดพร้อมกันมาทำการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3.5.1.2 ส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกลูโคส แอลฟาโทโคฟีรอล ด้วยวิธี DNS ตามรายละเอียดที่ 3.6.1 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ตามรายละเอียดที่ 3.6.2 ตามลำดับ

3.5.1.3 ทำซ้ำขั้นตอนเดิมเป็นเวลา 7 วัน

3.5.1.4 ทำการศึกษาผลของค่าพีเอช 3, 5, 7 และ 9 และผลของอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25, 45, 60 และ 80 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อการปลดปล่อย

3.5.1.5 ทำตามขั้นตอนเดียวกันกับการปลดปล่อยสารแบบสะสมเป็นเวลา 7 วัน โดยมีตัวควบคุมเป็น suspension ของอนุภาคนาโนโคโตซานที่ไม่ได้กักเก็บสาร

3.5.2 อัตราการปลดปล่อยสารแบบไม่สะสม

3.5.2.1 นำ suspension ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่กักเก็บกลูโคส แอลฟาโทโคฟีรอล และสารทั้งสองชนิดพร้อมกันมาทำการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3.5.2.2 ส่วนใสที่ได้นำมาทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกลูโคส แอลฟาโทโคฟีรอลที่ปลดปล่อย ด้วยวิธี DNS แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ตามรายละเอียดที่ 3.6.1 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ตามรายละเอียดที่ 3.6.2 ตามลำดับ

3.5.2.3 นำส่วนตะกอนมาเติม ddH₂O ใหม่ลงไปแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำซ้ำขั้นตอนเดิมเป็นเวลา 7 วัน

3.5.2.4 ทำการศึกษาผลของค่าพีเอช 3, 5, 7 และ 9 และผลของอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25, 45, 60 และ 80 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อการปลดปล่อย

3.5.2.5 ทำตามขั้นตอนเดียวกันกับการปลดปล่อยสารแบบไม่สะสมเป็นเวลา 7 วัน โดยมีตัวควบคุมเป็น suspension ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่ไม่ได้กักเก็บสาร

3.6 การวิเคราะห์ต่างๆ

3.6.1 การหาปริมาณกลูโคสด้วยวิธี DNS

3.6.1 นำส่วน suspension ที่เตรียมได้มาเติมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid) โดยปริมาณตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร : สารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร

3.6.2 ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นตัวลงในทันที

3.6.3 เติม ddH₂O ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันและนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller, 1959)

3.6.2 การหาปริมาณแอลฟาโทโคฟีรอล

นำส่วน suspension ที่เตรียมได้มาทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร (Bilal *et al.*, 2004)

3.7 การศึกษาลักษณะของอนุภาคนาโนไคโตซาน

3.7.1 วิเคราะห์ประจุบนผิวอนุภาค

นำอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมได้ทั้งก่อนและหลังการกักเก็บกลูโคส แอลฟาโทโคฟีรอล และสารทั้งสองชนิดพร้อมกันมาศึกษาการวัดประจุรวมบนผิวของอนุภาคทั้งก่อนและหลังการกักเก็บและปลดปล่อย โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zeta Potential Analyzer ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC)

3.7.2 วัดขนาดและรูปร่างอนุภาค

นำอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมได้ทั้งก่อนและหลังการกักเก็บกลูโคส แอลฟาโทโคฟีรอล และสารทั้งสองชนิดพร้อมกันมาทำการเตรียมตัวอย่างบนกริด ที่ศูนย์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา แล้วนำไปวัดขนาดอนุภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาร

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของอนุภาค ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะนำมาสู่การศึกษากลไกการกักเก็บและปลดปล่อยสาร เพื่อที่จะทำให้สามารถอธิบายกลไกการกักเก็บและปลดปล่อยสารได้ โดยทำให้ทราบถึงหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญภายในโครงสร้างโมเลกุลกลูโคส แอลฟาโทโคฟีรอลที่ถูกกักเก็บในอนุภาคไคโตซาน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับหมู่ฟังก์ชันของไคโตซานก่อนและหลังการกักเก็บและปลดปล่อยที่เปลี่ยนแปลงไป โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.8.1 นำส่วน suspension ของอนุภาคนาโนไคโตซานทั้งก่อนและหลังการกักเก็บและปลดปล่อยสารชนิดเดียวและทั้งสองชนิดมาทำการอบให้แห้ง

3.8.2 บดตัวอย่างให้ละเอียด แล้วนำมาทำการเตรียมตัวอย่าง

3.8.3 ชั่งตัวอย่าง และสารโพแทสเซียมโบรไมด์มาในอัตราส่วน 1:200 มิลลิกรัม แล้วบดรวมกันอย่างละเอียด

3.8.4 นำไปเข้าเครื่องอัดแรงดันไม่เกิน 10 นิวตัน เป็นเวลา 3 นาที เพื่อขึ้นรูปตัวอย่างเป็นแผ่นกลม

3.8.5 นำแผ่นตัวอย่างไปเข้าเครื่องมือวิเคราะห์สารด้วยแสงอินฟราเรด (FTIR) โดยใช้เทคนิค Transmission (TR) ยกเว้นแอลฟาโทโคฟีรอลวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Attenuated total reflection (ATR) โดยเครื่องมือที่ใช้ในการวัดนี้ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัย Remediation คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

3.8.6 วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม IR Mentor และ Win-IRES

3.9 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการอาคารบร.5 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์