บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

1. การสกัดสมุนไพรและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

1.1 การเตรียมผงสมุนไพร

ในการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร จะต้องมีการเตรียมสมุนไพรให้อยู่ในรูปที่พร้อมสกัด สำหรับ การเตรียมกวาวเครือขาว นำหัวกวาวเครือขาวล้างเศษดินออกให้สะอาด จากนั้นปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นบางๆ นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C (D-63450, Heraeus Instrument, Germany) เป็นเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรแห้งที่ได้ไปบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร (Fritsch, Germany) ให้เป็นผงละเอียด

ส่วนการเตรียมผงสกัดถั่วเหลือง ให้นำเมล็ดถั่วเหลืองล้างเศษดินออก จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C และบดละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร เช่นเดียวกับกวาวเครือขาว จากนั้นนำผงถั่วเหลืองและกวาวเครือขาวไปเก็บใน dessicator ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอการสกัดต่อไป

1.2 การสกัดสารจากถั่วเหลือง

ทำการสกัดสารจากถั่วเหลืองด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ จากตัวทำละลายไม่มีขั้วและเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย ดังนี้ hexane < dichloromethane < ethyl acetate < 95% ethanol ด้วยเครื่อง soxhlet extractor มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารสำคัญไอโซฟลาโวนจากสารสกัดถั่วเหลืองได้ในปริมาณสูงสุด ทำการสกัดโดยนำผงถั่วเหลืองแห้งแช่ในตัวทำละลาย hexane อัตราส่วนน้ำหนักถั่วเหลือง: Hexane (1 kg: 1 L) ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปห่อด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำเข้าบรรจุในชุดสกัด soxhlet apparatus เติมตัวทำละลาย hexane ในชุดสกัดปริมาตร 1 ลิตร และเติมตัวทำละลาย hexane ใน round bottom flask ขนาดบรรจุ 5 ลิตร ซึ่งรองรับตัวทำละลายภายใต้ชุดสกัดสารปริมาตร 1 ลิตร เปิดเครื่องสกัดสารโดยให้ความร้อนอยู่ที่อุณหภูมิระหว่าง 60-70 °C และเครื่องหล่อเย็นที่ 10 °C เมื่อครบเวลา 8 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนตัวทำละลาย hexane ใหม่ ทำการสกัดซ้ำ (3-4 ครั้ง) จนกระทั่งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไม่เปลี่ยนสี และทำการเปลี่ยนตัวทำละลายเพื่อสกัดสารอีก 1 รอบ (8 ชั่วโมง) จากนั้นนำตัวทำละลายที่ได้ในแต่ละครั้ง กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 42) และนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator (BÜCHI, Switzerland) จากนั้นนำไปตากใน dessicator จนกระทั่งสารสกัดแห้ง แล้วจึงนำไปเก็บที่ 4 °C จนกระทั่งนำไปใช้ ส่วนผงถั่วเหลืองที่เหลือจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ทำการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น โดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายในแต่ละชนิด นำไปแยกวิเคราะห์หาสารสำคัญต่อไป

1.3 การสกัดสารจากกวาวเครือขาว

ทำการสกัดสารสำคัญจากกวาวเครือขาว โดยการนำผงแห้งกวาวเครือขาว แช่ในตัวทำละลาย 95% ethanol จากนั้นทำการสกัดด้วย soxhlet extractor และนำตัวทำละลายไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator เช่นเดียวกับการสกัดสารสำคัญจากถั่วเหลือง จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งนำไปใช้

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดถั่วเหลืองและกวาวเครือขาว

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดถั่วเหลืองและกวาวเครือขาว ใช้หลักการของโครมาโตกราฟีเหลว (Liquid chromatography) ภายใต้เครื่องโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) โดยมีระบบการวิเคราะห์ ดังนี้ ความยาวคลื่นของเครื่องตรวจวัด (detector: Waters 2487 dual λ absorbance, USA) ที่ 255 nm ด้วยเครื่อง HPLC (Waters, USA) ปริมาตรสารตัวอย่างวิเคราะห์ 20 µl วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Reverse phase C18 (Symmetry C18, Ireland) วิเคราะห์ด้วยระบบ gradient elution ของ mobile phase อัตราส่วน 0.1% phosphoric acid: acetonitrile ดังนี้ เริ่มต้นที่ อัตราส่วน 90:10 นาทีที่ 3 อัตราส่วน 90:10 นาทีที่ 43 อัตราส่วน 65:35 นาทีที่ 45 อัตราส่วน 50:50 นาทีที่ 55 อัตราส่วน 90:10 ด้วยอัตราเร็ว (flow rate) 1 ml/min การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ของสารสกัด ทำได้ด้วยการละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัด จากนั้น นำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด รูเปิด 0.22 µm โดยใช้สาร puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ และคำนวนปริมาณสารสำคัญจากพื้นที่ใต้กราฟ

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคที่ผิวหนัง (จากการทดลอง) การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะทำ 2 วิธี คือการใช้เครื่อง UV-spectrophotometer เพื่อหาปริมาณน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด (Bucci et al., 2003) และการใช้ Gas chromatography เพื่อหาปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดในน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีสารหอมระเหย เป็นสารสำคัญในอัตราส่วนที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าวจึงต้องใช้สภาวะในการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน

การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์จะเตรียมโดยการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม เช่น methanol หรือ ethanol ในอัตราส่วนต่างๆ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณปริมาณน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดแต่ละชนิดด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer (Genesys 10, Thermo electron corporation, USA) และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟี ภายใต้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography: GC-FID) (HP6890 series, USA) และเครื่องตรวจวัดชนิด flame ionized detector ใช้คอลัมน์ HP-5 (crosslinked 5% phynyl 95%

dimethylpolysiloxane) 30 m X 0.25 mm X 0.25 μm ใช้อุณหภูมิในการวิเคราะห์แตกต่างกันไปตามชนิดของน้ำมัน mobile phase เป็นฮีเลี่ยม (Helium) ที่อัตราเร็ว 1 ml/min ยกเว้นการวิเคราะห์น้ำมันโหระพา ใช้อัตราเร็ว 1.5 ml/min

2.1 การวิเคราะห์น้ำมันโหระพา (sweet basil oil)

สภาวะการวิเคราะห์ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์จาก Hussain และคณะ (Hussain et al., 2008) ดังนี้ injector temperature และ detector temperature เป็น 220 °C และ 290 °C ตามลำดับ โดยมีสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ เริ่มต้นที่ 80 °C (hold 3 min) จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 170 °C และ 250 °C (hold 10 min) ด้วยอัตราเร่ง 4 °C/min และ 50 °C/min ตามลำดับ

2.2 การวิเคราะห์น้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil) และ ตะไคร้หอม (citronella oil)

สภาวะการวิเคราะห์ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์จาก Tzortzakis และคณะ (Tzortzakis et al., 2007) ดังนี้ injector temperature และ detector temperature เป็น 230 °C และ 310 °C ตามลำดับ โดยมีสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ เริ่มต้นที่ 50 °C (hold 3 min) จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 140 °C และ 300 °C (hold 10 min) ด้วยอัตราเร่ง 4 °C/min และ 50 °C/min ตามลำดับ

2.3 การวิเคราะห์น้ำมันสะระแหน่ (peppermint oil)

สภาวะการวิเคราะห์ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์จาก Yeung และคณะ (Yeung et al., 2003) ดังนี้ injector temperature และ detector temperature เป็น 250 °C โดยมีสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ เริ่มต้นที่ 60 °C (hold 18 min) จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 140 °C และ 230 °C (hold 1 min) ด้วยอัตราเร่ง 5 °C/min และ 30 °C/min ตามลำดับ

3. การเตรียมระบบนำส่งนีโอโซม

3.1 การพัฒนาตำรับนีโอโซม

1) การเตรียมนีโอโซมเปล่า (blank niosome) ความเข้มข้น 20 mM

เตรียมนีโอโซมด้วยวิธี film hydration method ดัดแปลงจาก Balakrishnan และคณะ (Balakrishnan et al., 2009) ซึ่งสรุปได้ดังนี้ ชั่ง cholesterol ปริมาณ 10 mM (ประมาณ 386.65 mg) ละลายด้วย chloroform ปริมาตร 10 ml และชั่ง span®20 ปริมาณ 10 mM (ประมาณ 346.46 mg) ละลายด้วย methanol 10 ml จากนั้นผสมสารละลายเข้าด้วยกันใน round bottom flask ขนาด 500 ml จึงนำไประเหยตัวทำละลายออกอย่างช้าๆ ด้วย rotary evaporator (BÜCHI, Switzerland) จนเกิดฟิล์มขึ้น เก็บในตู้ดูดความชื้นอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อดูดไอระเหยของตัวทำละลายที่หลงเหลือ ล้าง round bottom flask ด้วยปริมาตรน้ำที่เหลือ 20 ml จึงเริ่มลดขนาดอนุภาคนีโอโซมด้วยเครื่อง high pressure homogenizer (APV 1000, Invensys APV Product, Denmark) ที่ความดัน 500 bar เป็นเวลา 10 min เก็บใส่ภาชนะที่มีฝาปิด ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง รอการทดสอบอื่นๆ ต่อไป

2) การเตรียมนีโอโซมกักเก็บสารสกัดกวาวเครือขาว

ชั่งสารสกัดกวาวเครือขาวในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 g ละลายด้วยตัวทำละลายผสม methanol: chloroform (1:1) ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 5, 10 และ 15 mg/ml เมื่อคำนวนเทียบกับปริมาตรทั้งหมดของนีโอโซมที่เตรียม และกรองผ่านกระดาษกรอง 0.22 μm จึงนำไปผสมกับสารละลายผสมของ cholesterol: span®20 ก่อนทำให้เกิดฟิล์ม จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกอย่างช้าๆ ด้วย rotary evaporator (BÜCHI, Switzerland) จนเกิดฟิล์มขึ้น จากนั้นเติม deionized water 80 ml เขย่าให้เข้ากันด้วย incubated shaker (Kuhner/ ISF-1-W with cooling, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 40 °C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 60 นาที จึงนำไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง high pressure homogenizer เช่นเดียวกับการเตรียม blank niosome

3) การเตรียมนีโอโซมกักเก็บสารสกัดถั่วเหลือง

การเตรียมนีโอโซมกักเก็บสารสกัดถั่วเหลืองทำวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมนีโอโซมกักเก็บสารสกัดกวาวเครือขาว

4) การเตรียมนีโอโซมกักเก็บน้ำมันหอมระเหย

การเตรียมนีโอโซมกักเก็บน้ำมันหอมระเหย สามารถทำได้โดยการเตรียมฟิล์มขึ้นมาเช่นเดียวกับการเตรียมนีโอโซมเปล่า จากนั้น ทำการชั่ง น้ำมันหอมระเหย ปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 g เทลงไปบนแผ่นฟิล์ม และหมุนขวด round bottom flask ไปรอบๆ เพื่อให้น้ำมันกระจายตัวทั่วแผ่นฟิล์ม ให้น้ำมันหอมระเหยกระจายทั่วแผ่นฟิล์ม จากนั้นจึงทำเช่นเดียวกับการเตรียม blank niosome

3.2 การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซม

การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของนีโอโซม มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความคงตัวของนีโอโซมต่อสภาพแวดล้อม โดยการเก็บนีโอโซมที่อุณหภูมิ 25 °C จากนั้นทำการประเมินลักษณะทางกายภาพของการเปลี่ยนแปลงของ สี การตกตะกอน ขนาดอนุภาค และประจุของอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคที่ใช้หลักการกระเจิงของแสงเลเซอร์ (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Sparing Lane South, Worcs, UK) และวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (model MP220, Mettler-Toledo GmbH, Switzerland) ในวันที่ 0, 3, 7 14 และ 28 วัน

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารที่กักเก็บในนีโอโซม

การวิเคราะห์หาปริมาณสารที่กักเก็บในนีโอโซม เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่กักเก็บอยู่ภายในนีโอโซม เป็นแบบ indirect method ซึ่งดัดแปลงมาจาก Liolios และคณะ (Liolios et al., 2009) โดยสามารถสรุปได้ดังนี้

1) วิเคราะห์ปริมาณสารทั้งหมดในนีโอโซม โดยละลายนีโอโซมและสารสำคัญด้วยตัวทำละลาย methanol จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งหมด ดังนี้

1.1) สารสกัดพืช นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารไอโซฟลาโวนด้วยเครื่อง HPLC (Waters, USA)

1.2) น้ำมันหอมระเหย นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer (Genesys 10, Thermo electron corporation, USA)

1.3) น้ำมันหอมระเหย นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดด้วยเครื่อง GC-FID (HP6890 series, USA)

2) ปิเปตนีโอโซมที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 2 ml นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Optima™ L-100 K Ultracentrifuge, USA) ที่ความเร็ว 50,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส (supernatant) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณส่วนที่ไม่ได้กักเก็บ จากนั้นนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1) แล้วนำปริมาณที่ได้จากการวิเคราะห์ไปคำนวนหา %การกักเก็บของสารในนีโอโซมดังสมการ

$$\% \text{ การกักเก็บของสาร} = \frac{(\text{ปริมาณสารทั้งหมดในตำรับ} - \text{ปริมาณสารจากสารละลายส่วนใส})}{\text{ปริมาณสารทั้งหมดในตำรับ}} \times 100$$

3.4 การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญของนีโอโซม

ทำการศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญจากนีโอโซม เปรียบเทียบกับสารสกัดกวาวเครือขาว สารสกัดถั่วเหลือง และน้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยใช้ dialysis tubing มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณสารสำคัญที่ปลดปล่อยออกมาจากนีโอโซมในช่วงระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

1) นีโอโซมกักเก็บสารสกัดพืช

การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญจากนีโอโซมและสารสกัดจากพืช โดยการบรรจุใน ใน dialysis tubing ปริมาตร 1 ml ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายตัวกลางคือ 80% ethanol: phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (อัตราส่วน 20 : 80) ปริมาตร 10 ml เขย่าด้วย incubator shaker (Kuhner/ ISF-1-W with cooling, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 32 °C อัตราเร็ว 120 rpm ทำการสุ่มสารละลายตัวกลางที่เวลา 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่วิเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารไอโซฟลาโวนด้วยเครื่อง HPLC (Waters, USA)

2) นีโอโซมกักเก็บน้ำมันหอมระเหย

การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญจากนีโอโซมและน้ำมันหอมระเหย โดยการบรรจุใน dialysis tubing ปริมาตร 1 ml ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายตัวกลางคือ 60% ethanol ปริมาตร 10 ml นำไปเขย่าด้วยเครื่อง incubator shaker (Kuhner/ ISF-I-W with cooling, Switzerland)

ที่อุณหภูมิ 32 °C อัตราเร็ว 120 rpm และทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลา 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารที่ถูกปลดปล่อยดังนี้

2.1) วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดของนีโอโซมกักเก็บน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่อง GC-FID

2.2) วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดด้วย UV- spectrophotometer (Genesys 10, Thermo electron corporation, USA) ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ดังนี้ น้ำมันโหระพาที่ความยาวคลื่น 275 nm น้ำมันตะไคร้หอมที่ความยาวคลื่น 221 nm น้ำมันตะไคร้ที่ความยาวคลื่น 215 nm และน้ำมันสะระแหน่ที่ความยาวคลื่น 239 nm

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพการซึมผ่านทางผิวหนัง

การศึกษาประสิทธิภาพในการซึมผ่านมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสำคัญในนีโอโซมที่ซึมผ่านทางผิวหนังของนีโอโซมโดยเปรียบเทียบกับสารสกัดพืช การศึกษานี้ทำด้วยวิธี Franz diffusion cell โดยใช้สารสกัดกวาวเครือขาวและ นีโอโซมกักเก็บสารสกัดกวาวเครือขาว เป็นสารทดสอบ สามารถสรุปวิธีการศึกษามีดังนี้คือ

1) การเตรียมชิ้นเนื้อทดสอบ

ใช้หนังบริเวณหน้าท้องของหมูแรกเกิด โดยการตัดแยกชิ้นเนื้อออกจากร่างกาย จากนั้นทำการลอกชั้นไขมันใต้ผิวหนังด้วย propanol จนกระทั่งเหลือชั้นของ epidermis จากนั้นนำไปแช่ใน release buffer ที่อุณหภูมิ 32 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2) การทดสอบด้วยวิธี Franz diffusion cell

เติมตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาอัตราเร็วในการปลดปล่อยผ่านผิวหนัง (อัตราส่วน 80% ethanol : PBS pH 7.4 เป็น 20 : 80) ปริมาตร 13 ml ในเครื่อง Franz diffusion cell (Crown glass company, Inc., USA) จากนั้นนำหนังหมูแรกเกิดที่แช่ในตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาไปขึงให้แน่นเข้ากับเครื่อง และปรับสภาวะเครื่องให้มีอุณหภูมิเป็น 32 °C จากนั้นนำนีโอโซม และสารสกัดในความเข้มข้นเดียวกัน ใส่ลงในเครื่องปริมาตร 1 ml จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารที่ซึมผ่านผิวหนังปริมาตร 0.5 ml ที่เวลา 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง และเติมตัวทำละลายในปริมาตรที่เท่าเดิม และนำตัวทำละลายที่สุ่ม ณ เวลาต่างๆ ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ด้วยเครื่อง HPLC (Waters, USA)