



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก (*Centella asiatica*) โดยใช้เมทริกซ์ระหว่าง
ไคโตแซนและเพกติน

Encapsulation of *Centella asiatica* Active Compounds by Chitosan-Pectin Matrix

نامผู้วิจัย นางสาววันวิไล สิงห์ชู

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มาศอุบล ทองงาม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนบูรณ์ สัจจอนันตกุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนบูรณ์ สัจจอนันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก (*Centella asiatica*) โดยใช้เมทริกซ์ระหว่าง
ไคโตแซนและเพกติน

Encapsulation of *Centella asiatica* Active Compounds by Chitosan-Pectin Matrix

โดย

นางสาววันวิไล สิงห์ชู

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

พ.ศ. 2553

วันวิไล สิงห์ชู 2553: การกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก (*Centella asiatica*) โดยใช้เมทริกซ์ระหว่าง
ไคโตแซนและเพกติน ปริญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร) สาขาวิชาวิทยาศาสตรการ
อาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
มาศอุบล ทองงาม, Ph.D. 116 หน้า

บัวบก (*Centella asiatica*) เป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญ สารสำคัญที่พบมากที่สุดในบัวบกคือสารประกอบ
ไตรเทอร์ปีน ซึ่งถูกทำลายได้ง่ายในสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร ดังนั้นในงานวิจัยจึงใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและ
เพกตินเป็นตัวนำส่งสารสำคัญไปยังลำไส้เล็ก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของปริมาณไคโตแซน-เพกติน
ฟิเอช และการเติมเกลือต่อปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ สมบัติทางด้านวิทยากระแส และประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสกัดจาก
บัวบก โดยใช้เทคนิค high performance thin layer chromatography (HPTLC) สาร สำคัญจากบัวบกที่ตรวจสอบคือ
สารประกอบไตรเทอร์ปีน ซึ่งประกอบด้วย กรดเอเชียติก (asiatic acid) เอเซีย-ดีโคไซด์ (asiaticoside) กรดมาเดคาสสิก
(madecassic acid) และมาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) จากการทดลองพบว่าที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175
%w/v ที่ฟิเอช 5 ให้ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ (8.96 g/100 mL) ค่าความแข็งแรง (เท่ากับ 7180 Pa) และประสิทธิภาพในการ
กักเก็บสารสำคัญ (53.67%) ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซน และเพกตินสูงสุด เมื่อฟิเอชของสารละลายเปลี่ยนแปลงจาก 5
เป็น 3 พบว่าปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ และประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญของเมทริกซ์ที่เตรียมที่ฟิเอช 3 ต่ำกว่าฟิเอช 5
ในทุกปริมาณไคโตแซน-เพกติน เมื่อตรวจสอบอิทธิพลของเกลือ พบว่าชนิดของเกลือมีผลต่อลักษณะของเมทริกซ์ เมื่อ
เติมโซเดียมคลอไรด์ (0-150 mM) ลักษณะของเมทริกซ์ที่ได้ลักษณะคล้ายคลึงกับตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเกลือ แต่เมื่อเติม
แคลเซียมคลอไรด์ (0-150 mM) ลักษณะโครงสร้างของเมทริกซ์มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อเพิ่ม
ความเข้มข้นของเกลือ จาก 0 ถึง 150 mM ส่งผลให้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินมีค่าความแข็งแรงเพิ่มขึ้น และ
ในระบบที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 mM และแคลเซียมคลอไรด์ 50 mM พบว่ามีประสิทธิภาพในการ
กักเก็บสารสำคัญสูงสุด คือ 68.03 และ 70.19 % ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบการปลดปล่อยสารสำคัญจากบัวบกของ
เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่เตรียมในฟิเอช 5 โดยทำการจำลองสภาวะฟิเอชในทางเดินอาหารของมนุษย์
(ฟิเอช 2, 5, 6, 7 และ 9) พบว่าเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซน-เพกตินที่เหมาะสมในการนำไปใช้ควบคุมการปลดปล่อยสาร
สำคัญจากบัวบกคือเมทริกซ์ที่เตรียมที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v เตรียมที่ฟิเอช 5 และเติมโซเดียม
คลอไรด์ 100 mM เนื่องจากเมทริกซ์สามารถคงตัว (stable) ในสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร (ฟิเอช 2) และสามารถ
ปลดปล่อยได้ดีในลำไส้เล็ก (ฟิเอช 5)

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Wanwilai Singchoo 2010: Encapsulation of *Centella asiatica* Active Compounds by Chitosan-Pectin Matrix. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Assistant Professor Masubon Thongngam, Ph.D. 116 pages.

Centella asiatica is local Thai herb that is used as medicine to cure various diseases. The most interesting active compounds in *Centella asiatica* are triterpene compounds. These compounds were easily degraded in the stomach. In this research, it was aimed to characterize the chitosan-pectin matrix in order to encapsulate triterpene compounds and protect them from acidic condition in the stomach and subsequently deliver to the intestine. The purpose of this study was to examine the effect of the chitosan-pectin content, pH and salts on the yield of gel content, rheological properties (oscillatory shear measurement) and encapsulation efficiency of chitosan-pectin matrix. The encapsulation of *Centella asiatica* active compounds in chitosan-pectin matrix was determined by high performance thin layer chromatography (HPTLC). The triterpene compounds from *Centella asiatica* investigated in this study were asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside and madecassoside. The results show that chitosan-pectin; 0.25-0.175 %w/v at pH 5 gave the highest yield of gel content (8.96 g/100 mL), storage modulus (G' ; 7180 Pa) and encapsulation efficiency (53.67 %). When the pH of the solution was changed from 5 to 3, the storage modulus, the yield of gel content and encapsulation efficiency of chitosan-pectin matrix were lowered for almost all chitosan-pectin concentrations. In the presence of salts with different ion species (NaCl and CaCl_2), the complex characters were different. In the presence of sodium chloride (0-150 mM), gel formation of the polyelectrolyte complexes were similar to that of no salt addition. However, when calcium chloride was used (0-150 mM), the gel structure of complexes was more homogeneous. In addition, as the concentration of salts increased from 0 to 150 mM, the storage modulus also increased. Upon using 100 mM NaCl and 50 mM CaCl_2 , the encapsulation efficiency was the highest (68.03 and 70.19 %, respectively). Then the release of *Centella asiatica* active compounds by chitosan-pectin matrix at pH 5 was determined. The release of triterpene compounds were studied in simulated gastrointestinal tract (pH 2, 5, 6, 7 and 9). The results show that chitosan-pectin; 0.25-0.175 %w/v at pH 5 with added 100 mM NaCl was suitable for the controlled release of *Centella asiatica* active compounds because the matrix is stable at the stomach (pH 2) and could well release at the small intestine (pH 5).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ล่วงไปด้วยดีนั้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร. มาศอุบล ทองงาม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร. ธนะบุญย์ สัจจาอนันตกุล ที่ให้คำปรึกษาด้วยดีตลอดการทำวิจัย รวมถึงตรวจแก้วิทยานิพนธ์จน
สำเร็จเรียบร้อย

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. วราภา มหากาญจนกุล ประธานการสอบ
และ รศ.ดร. ทนง ภัทรพิพันธุ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจแก้วิทยานิพนธ์และให้
คำแนะนำ จนวิทยานิพนธ์สำเร็จเรียบร้อย

ขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ที่ให้การ
สนับสนุนทุนงานวิจัย

ขอบคุณบริษัท เมทโรหัม สยาม จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องรีโอมิเตอร์

ขอบคุณบริษัท รัชมอร์ พรินซ์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้กล้องจุลทรรศน์
คอนโฟคอลเลเซอร์สแกนนิ่ง

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้ ให้แก่ข้าพเจ้าตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ญาติพี่น้องทุกคน รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้การ
สนับสนุน ทั้งกำลังใจและกำลังใจมาโดยตลอด หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อบกพร่องประการใด
ข้าพเจ้าขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

วันวิไล สิงห์ชู

ธันวาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	44
สรุปและข้อเสนอแนะ	83
สรุป	83
ข้อเสนอแนะ	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	85
ภาคผนวก	97
ภาคผนวก ก วิธีคำนวณปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อน ระหว่างโคโตแซนและเพกติน	98
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านวิทยากระแส ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโคโตแซนและเพกติน	107
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนด้วยวิธี HPTLC	109
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	116

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของเพกตินและไคโตแซนที่ผสมกันที่พีเอช 3 และ 5 เตรียมโดยวิธีการเขย่า	37
2	ปริมาณไคโตแซน-เพกตินที่พีเอช 3 และ 5 ที่เตรียมโดยวิธีการกวนผสม	39
3	ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้หลังจากการเตรียมที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ และพีเอชต่างๆ เตรียมโดยวิธีการกวนผสม	47
4	ค่า zeta potential ของสารละลายไคโตแซนและสารละลายเพกติน	53
5	ค่า zeta potential ของส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน	53
6	ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้เมื่อเติมเกลือ (NaCl และ CaCl ₂) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	55
7	ค่า zeta potential ของส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v ที่มีการเติมเกลือต่างชนิดและความเข้มข้นต่างๆ	57
8	ค่าสีของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่กักเก็บสารสำคัญโดยมีปริมาณบวบก-ไคโตแซน-เพกตินและพีเอชต่างๆ	60
9	ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบกโดยเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน	63
10	ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบกที่มีลำดับการผสมต่างกัน	64
11	ค่าสีของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่กักเก็บสารสำคัญโดยมีการเติมเกลือต่างชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 5	66
12	ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบกของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v หลังจากการเติมเกลือ (NaCl และ CaCl ₂) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 5	69
ตารางผนวกที่		
ค1	ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ (g/10 mL) ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอช 3 และ 5 ที่เตรียมโดยวิธีเขย่า	115

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สารกลุ่มควอเซอติโน-3-กลูโคไซด์ (ก) และสารกลุ่มแคมเฟอร์รอล-3-กลูโคไซด์ (ข)	3
2	โครงสร้างหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก	5
3	โครงสร้างของไคติน (ก) และไคโตแซน (ข)	11
4	ลำดับอิทธิพลของไอออนต่อการจับกับโมเลกุลน้ำของฮอฟไมสเตอร์ (Hofmeister series)	16
5	โครงสร้างของเพกติน	18
6	junction zones ของเพกตินชนิด LM	19
7	เวกเตอร์ไดอะแกรมของค่า G' , G'' และ G^*	25
8	กลไกการปลดปล่อยของเมทริกซ์ระหว่างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และไคโตแซนเมื่อเปลี่ยนพีเอช	30
9	บวบกส่วนใบและก้าน	37
10	ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้หลังกรองเมทริกซ์ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอช 3 (ก) และ 5 (ข) เตรียมโดยวิธีการเขย่า	44
11	ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอชต่างๆ ที่ผสมโดยวิธีการเขย่า	45
12	ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอช 3 และ 5 เตรียมโดยวิธีการกวนผสม	46
13	ช่วง LVE ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 3 (ก) และ 5 (ข)	48
14	ค่า G' และ G'' ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ความเข้มข้นของเพกติน 0.175 %w/v และความเข้มข้นของไคโตแซน (0.25%w/v) เตรียมในสถานะพีเอช 3 และ 5	50
15	ค่า $\tan \delta$ ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ความเข้มข้นของเพกติน 0.1-0.175 %w/v และความเข้มข้นของไคโตแซนคงที่ (0.25%w/v) ที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 3 (ก) และ 5 (ข)	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซน-เพกติน; 0.25-175 %w/v ที่มีการเติมและไม่เติมเกลือ	54
17	G' และ G'' ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (ก) และแคลเซียมคลอไรด์ (ข) ที่พีเอช 5	56
18	ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก ที่พีเอช 3 และ 5	58
19	HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดที่ได้จากส่วนใสหลังการกรอง ที่พีเอช 3	61
20	HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดที่ได้จากส่วนใสหลังการกรอง ที่พีเอช 5	62
21	ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสกัดบัวบก โดยเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 5	65
22	HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจากบัวบกที่ได้จากส่วนใสหลังการกรองที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่พีเอช 5	67
23	HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจากบัวบกที่ได้จากส่วนใสหลังการกรองที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ที่พีเอช 5	68
24	ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก โดยมีลำดับการผสมต่างกัน	71
25	ลักษณะโครงสร้างของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน ตรวจสอบด้วย SEM	72
26	ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบกโดยใช้กล้องคอนโฟคอลเลเซอร์สแกนนิ่ง	73
27	HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจากบัวบกที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ โดยมีลำดับการผสมเจลที่เตรียมในพีเอช 5 โดยเติมสารสกัดบัวบกในสารละลายไคโตแซน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายเพกติน ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v	75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจากบัวบกที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ โดยมีลำดับการผสมเจลที่เตรียมในพีเอช 5 โดยเติมสารสกัดบัวบกในสารละลายเพกติน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายไคโตแซนที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v	77
29	HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจากบัวบกที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ โดยมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ในขั้นตอนการเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่พีเอช 5 ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v	78
30	HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจากบัวบกที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ โดยมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในขั้นตอนการเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่พีเอช 5 ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v	79
31	กลไกการพองตัวของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพอลิเมอร์ที่มีประจุตรงข้าม	80
32	ปริมาณการปลดปล่อยไตรเทอร์ปีน (%) ในสภาวะพีเอชต่างๆ	82
ภาพผนวกที่		
ก1	ตัวอย่างโครมาโตแกรมสารมาตรฐานผสมความเข้มข้นสารละ 100 ppm ที่ความยาวคลื่น 600 nm วิเคราะห์ด้วย HPTLC	112
ก2	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารสกัดบัวบกที่ความยาวคลื่น 600 nm วิเคราะห์ด้วย HPTLC	112
ก3	กราฟมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์ที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC	113
ก4	กราฟมาตรฐานของเอเชียดิโคไซด์ที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC	113
ก5	กราฟมาตรฐานของกรดมาเดคาสสิกที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC	114
ก6	กราฟมาตรฐานของกรดเอเชียดิกที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC	114

การกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก (*Centella asiatica*) โดยใช้เมทริกซ์ระหว่าง ไคโตแซนและเพกติน

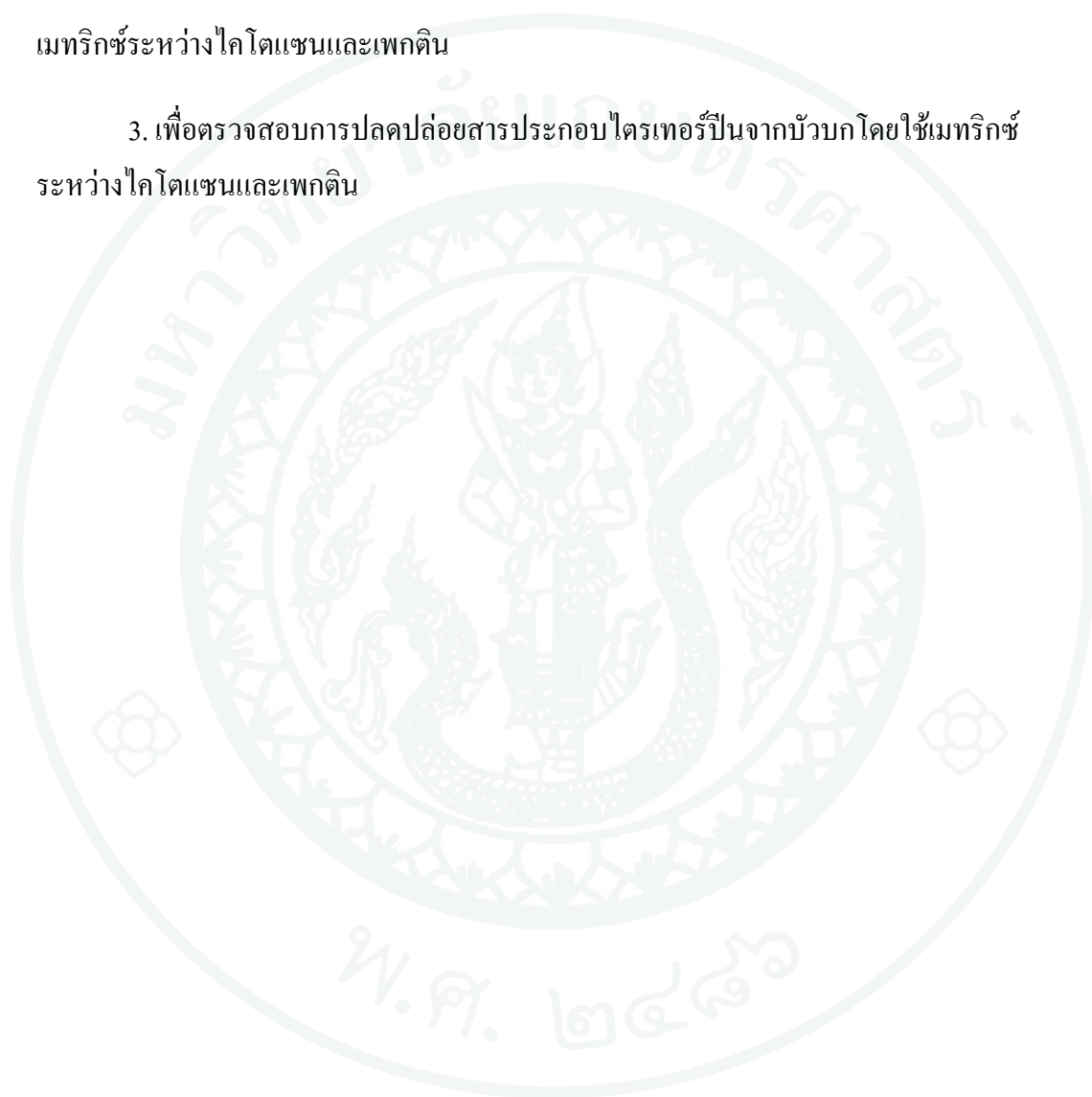
Encapsulation of *Centella asiatica* Active Compounds by Chitosan-Pectin Matrix

คำนำ

บัวบกเป็นพืชในวงศ์ Umbelliferae มีชื่อเรียกทางพฤกษศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (Linn.) Urban โดยมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีน ได้แก่ กรดเอเซียติก เอเซียติโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และมาเดลาสโคไซด์ เป็นต้น (Muangnoi, 2007) สารสำคัญเหล่านี้เมื่อเข้าสู่ระบบย่อยอาหารภายในร่างกายแล้วจะถูกทำลาย เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร จึงจำเป็นที่จะต้องป้องกันไม่ให้สารเหล่านี้ถูกทำลายในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และสามารถส่ง ผ่านไปยังส่วนของลำไส้ที่มีการดูดซึมและนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายได้ ปัจจุบันได้มีการใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในการควบคุมการปลดปล่อยยา โดยเฉพาะไคโตแซนและเพกติน เนื่องจากเป็นพอลิแซ็กคาไรด์จากธรรมชาติ ไม่เป็นพิษและมีความปลอดภัยในการนำมาใช้กับมนุษย์ (Chen *et al.*, 1995) เมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินพบว่าสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kim *et al.*, 2003) สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินสามารถคงตัวอยู่ได้ในตัวกลางที่มีสภาวะเป็นกรด เนื่องจากพอลิเมอร์ทั้งสองสามารถเกิดอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) ระหว่างประจุบวกของไคโตแซนและประจุลบของเพกติน เกิดเป็นโครงสร้างที่ไม่ละลายในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร ทำให้สามารถลดการละลายและควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญได้ (George and Abraham, 2006) ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินในการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก และศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญโดยการจำลองสภาวะพิเศษในทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งในงานวิจัยได้มุ่งเน้นถึงการสร้างระบบสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่สามารถกักเก็บสารสำคัญจากบัวบกไว้ได้ ระบบสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้สามารถนำไปใช้ในการป้องกันสารสำคัญที่มีประโยชน์ต่อร่างกายจากสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและมีการปลดปล่อยในลำไส้เล็กซึ่งจะมีการดูดซึมและนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกาย โดยคาดว่าจะสามารถนำเมทริกซ์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในอาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของปริมาณไคโตแซน-เพกติน พีเอชและเกลือต่อลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน
2. เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บสารประกอบไตรเทอร์ปีนจากบัวบกโดยใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน
3. เพื่อตรวจสอบการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนจากบัวบกโดยใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน



การตรวจเอกสาร

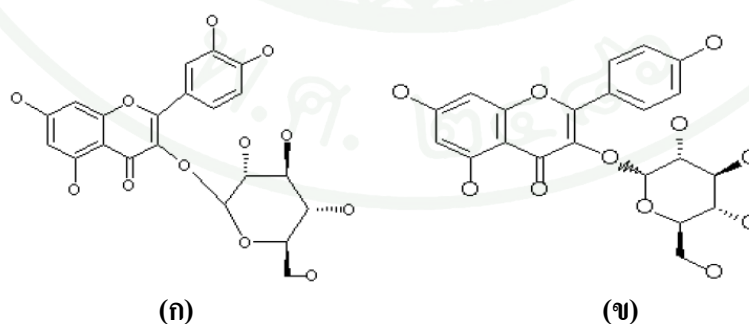
1. บัวบก

บัวบก มีชื่อภาษาท้องถิ่นว่า ผักหนอก จำปาเครือ ผักแว่น แวน่ โคลก ปะหนะเอหาเต๊ะ (ภาษากะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) และบัวบกมีชื่อภาษาอังกฤษว่า อินเดีย เพนนิเวิร์ท (Indian Pennywort) โกตุ โคล่า (Gotu Kola) เอเชียติส เพนนิเวิร์ท (Asiatic Pennywort) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า เซนเทลล่า เอเชียติกา (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae ซึ่งบัวบกจัดเป็นไม้เลื้อย คือมีลำต้นเลื้อยไปตามดินที่เรียกว่า "ไหล" มีรากงอกออกตามข้อของลำต้น ใบเป็นใบเดี่ยว มีรูปร่างกลม ฐานใบโค้งเว้าเข้าหากัน ขอบใบมีลักษณะเป็นคลื่นหยักใบงอกออกจากข้อมีลักษณะตั้งตรง สูงประมาณ 10-15 เซนติเมตร ก้านใบสีเขียว ดอกของบัวบกมีขนาดเล็ก มีสีขาว ชมพู และม่วง ดอกจะออกเป็นช่อเล็กๆ ที่ซอกใบ ผลของบัวบกมีลักษณะแบน ขยายพันธุ์ได้โดยใช้เมล็ดและไหลปักชำ แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้ไหลปักชำ วิธีการคือ นำลำต้น หรือไหลที่มีรากงอกออกมา ตัดแยกเป็นท่อนๆ แล้วนำมาปักชำในกระบะเพาะ หรือในพื้นๆ มีความชื้นแฉะ และมีแสงแดดพอสมควร (ดวงจันทร์, 2546)

1.1 องค์ประกอบทางเคมี

1.1.1 ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (flavonoid glycosides)

Prun *et al.* (1983) พบสารประกอบ ควอเซติน-3-กลูโคไซด์ (quercetin-3-glucoside) และแคมเฟอรอล-3-กลูโคไซด์ (kaempferol-3-glucoside) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบฟลาโวน (flavone) ในส่วนของใบของบัวบก (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สารกลุ่มควอเซติน-3-กลูโคไซด์ (ก) และสารกลุ่มแคมเฟอรอล-3-กลูโคไซด์ (ข)

ที่มา: Prun *et al.* (1983)

1.1.2 กรดแอมิโนอิสระ (free amino acids)

George and Gnanarethinan (1975) พบกรดแอมิโนอิสระในบัวบกที่ระบุได้มีทั้งหมด 25 ชนิด โดยในส่วนของใบ ก้าน และดอกของบัวบกจะพบปริมาณกรดแอมิโนซีรีน (serine) และอะลานีน (alanine) มากกว่ากรดแอมิโนชนิดอื่น และส่วนรากของบัวบกจะพบกรดแอมิโน แอสพาเตต (aspartate) ซีรีน (serine) กลูตาเมต (glutamate) ทรีโอนีน (threonine) อะลานีน (alanine) ไลซีน (lysine) ฮิสทีดีน (histidine) และแอมิโนบิวทิเรต (amino butyrate)

1.1.3 สารประกอบโพลีอะซีติลเลนิค (polyacetylenic compounds)

Rastogi *et al.* (1960); Sing and Rastogi (1969); Tang and Eisenbrand (1992) พบสารประกอบโพลีอะซีติลเลนิค (polyacetylenic compounds) ได้แก่ pentadeca-2,9-diene-4,6-diyne-1-ol, 3,8-diacetoxypentadeca-1,9-diene-4,6-diyne, 3-hydroxy-8-acetoxy-pentadeca-1,9-diene-4,6-diyne, 3-hydroxy-10-acetoxy-pentadeca-1,8-diene-4,6-diyne และ pentadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol

1.1.4 สารประกอบเทอร์พีนอยด์ (terpenoids compound)

สารประกอบเทอร์พีนอยด์เป็นสารสำคัญและเป็นสารที่น่าสนใจที่พบในบัวบก มีสารประกอบเทอร์พีนอยด์หลายชนิดที่ถูกแยกได้จากบัวบกได้แก่

ก. สารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์ปีน (mono-and sesquiterpene compounds)

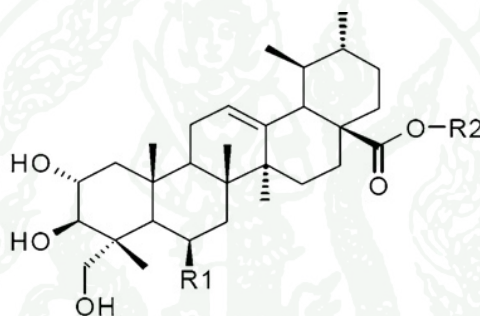
Asakawa *et al.* (1982) พบสาร โมโนและเซสควิเทอร์ปีนที่สามารถแยกได้จากบัวบก ได้แก่ β -caryophyllene, trans- β -farnesene และ germacrene-D ซึ่งเป็นสารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์ปีนหลัก นอกจากนี้ยังพบ α -copaene, β -elemene และ bicycloelemene

ข. สารประกอบไตรเทอร์ปีน

สารประกอบไตรเทอร์ปีนเป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในบัวบก (Rastogi *et al.*, 1960; Sing and Rastogi, 1969; Rao and Seshadri, 1969; Muangnoi, 2007; Jia and Lu, 2008) มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาสารไตรเทอร์ปีนในบัวบกโดยพบสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์และสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน ซึ่งสารประกอบไตรเทอร์ปีนหลักในบัวบกประกอบด้วย กรดเอเชียติค (asiatic acid) เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) กรดมาเดคาสสิก (madecassic acid) และ

มาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) (Inamdar *et al.*, 1996; Pramongkit, 1997; Jia and Lu, 2008) ซึ่งส่วนประกอบของบัวบกที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดสารสำคัญคือ ส่วนใบและก้าน (Muangnoi, 2007; นฤมล, 2551) นอกจากนี้ยังตรวจพบสารประกอบไตรเทอร์ปีนชนิดอื่นๆ อีกได้แก่ 6-เบต้าไฮดรอกซีเอเซียติก แอซิด (6- β -hydroxyasiatic acid) กรดเทอร์มิโนลิก (terminolic acid) กรดบราหมิก (brahmic) บราโมไซด์ (brahmoside) เซนเทลโลไซด์ (centelloside) กรดเซนติก (centic acid) กรดเซนโทอิก (centoic acid) และกรดเซนเทลลิก (centellic acid) เป็นต้น (Pramongkit, 1997)

สารประกอบไตรเทอร์ปีนพบได้ในพืชทุกชนิด แต่ส่วนใหญ่จะสังเคราะห์ในพืชชั้นสูง โดยสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนมีคุณสมบัติเป็นกรด มีรสชาติเผ็ดร้อนและขม เช่น ลิโมนินในผลไม้ตระกูลส้ม จะให้รสขม และละลายในไขมัน ส่วนหน้าที่ของสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนที่มีต่อพืชยังไม่ทราบแน่ชัด (Harborne, 1983)



กรดเอเซียติก	R1 = H	R2 = H
กรดมาเดคาสสิก	R1=OH	R2=H
เอเซียติโคไซด์	R1=H	R2=Glu-Glu-Rha
มาเดคาสโซไซด์	R1=OH	R2= Glu-Glu-Rha

ภาพที่ 2 โครงสร้างหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก

หมายเหตุ Glu=glucose; Rha=rhamnose

ที่มา: Jia and Lu (2008)

สารประกอบไตรเทอร์ปีนประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวง 5 วง (pentacyclic triterpenes) มีคาร์บอน 30 อะตอม และมีสารหมู่แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ หรือกรดคาร์บอกซิลิกเชื่อมต่อกับวง (ภาพที่ 2) ลักษณะโดยทั่วไปของสารประกอบไตรเทอร์ปีน คือ ไม่มีสี เป็นผลึก จุดหลอมเหลวสูง (Harborne, 1983) สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนจะอยู่ในรูปของไกลโคโคน (glycone)

และอะไกลโคน (aglycone) โดยไกลโคนมีโมเลกุลของน้ำตาลต่อกับโครงสร้างของไตรเทอร์ปีน ส่วนอะไกลโคนจะไม่มีโมเลกุลน้ำตาล ดังภาพที่ 2 (Jia and Lu, 2008) เมื่อไตรเทอร์ปีนในรูปของไกลโคนผ่านกระบวนการย่อยโมเลกุลของน้ำตาลจะถูกตัดออกด้วยเอนไซม์และจะถูกดูดซึมเข้าลำไส้หรือเส้นเลือดต่อไป (Pramongkit, 1997)

1.2 ประโยชน์ของสารประกอบไตรเทอร์ปีนจากบัวบก

จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาเกี่ยวกับสารสำคัญในบัวบกที่ออกฤทธิ์ต่างๆ พบว่าสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนมีคุณสมบัติในการรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ การรักษาบาดแผล (Vogel *et al.*, 1990) การพัฒนาทางจิตใจของเด็กที่มีความบกพร่องทางสมอง (Rao, 1973) และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-tumor) (Babu *et al.*, 1995)

1.2.1 การรักษาบาดแผล

"บัวบก" มีสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆ มากมาย ได้แก่ มีฤทธิ์ในการสมานแผล และฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดหนอง ฆ่าเชื้อราและลดอาการอักเสบได้ และยังพบว่าสารสกัดจากต้นบัวบกด้วยน้ำ มีฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร เนื่องจากมีกรดมาเดคาสสิก (madecassic acid) กรดเอเชียติก (asiatic acid) เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) และมาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) สารสำคัญเหล่านี้มีฤทธิ์ในการเร่งสร้างเนื้อเยื่อและคอลลาเจน จึงช่วยสมานแผล ทำให้เลือดไหลเวียนดี เป็นยาบำรุง แก้อาการอ่อนเพลีย รักษาแผลภายนอกโดยใช้ทา นอกจากนี้สารสกัดจากบัวบกยังมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งบางชนิด รักษาแผลเรื้อรัง เพราะมีสาร เช่น เอเชียติโคไซด์และกรดมาเดคาสสิก ซึ่งช่วยรักษาเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ส่งเสริมการทำงานของสมอง และยังมีรายงานการใช้บัวบกรักษานิ้วในระบบทางเดินปัสสาวะ ขับปัสสาวะ แก้หัด ลดความดันโลหิต แก้ตับอักเสบ ช่วยทำให้ผมดก ป้องกันและรักษาศีรษะล้าน ในออสเตรเลีย นิยมรับประทานใบบัวบกสด โดยแนะนำให้รับประทานวันละ 2 ใบทุกวัน เพื่อใช้เป็นยาอายุวัฒนะ เพราะพบว่าสารในใบบัวบกช่วยเร่งการสร้างคอลลาเจน ซึ่งช่วยชะลอความชราและเพิ่มความจำ ส่วนในประเทศฝรั่งเศสได้มีการพัฒนารูปแบบของบัวบกเป็นครีมและยาฉีดเพื่อใช้รักษาแผลสด สำหรับในประเทศไทยได้มีผลงานวิจัยของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยความร่วมมือของโรงพยาบาลรามาธิบดีและโรงพยาบาลศิริราช ในการพัฒนารูปแบบของครีมบัวบกเพื่อใช้ในผู้ป่วยที่เป็นแผลเรื้อรังจากแผลกดทับ แผลที่เกิดจากอุบัติเหตุ และแผลติดเชื้อ พบว่าครีมดังกล่าวทำให้แผลหายเร็วขึ้น ลดอาการอักเสบลงได้ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าชาวจีนและชาวอินเดียนิยมใช้บัวบกในการรักษาอาการอักเสบ แก้ฟกช้ำ ใช้บรรเทาอาการเส้นเลือดอุดตัน อาการปวดศีรษะและบำรุงกำลังได้ดี (ดวงจันทร์, 2546)

กรดไตรเทอร์ปีน (triterpene acid) และไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (triterpene glycoside) ในบัวบกสามารถเร่งการสร้างสารคอลลาเจน (collagen) ที่เป็นโครงสร้างของผิว จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นให้แผลสมานตัวได้เร็วขึ้น (Vogel *et al.*, 1990) สารเอเซียติโคไซด์ มีฤทธิ์สมานแผล เร่งการหายของแผลเมื่อทดลองในหนูขาว (Rosen *et al.*, 1967; Shim *et al.*, 1996) หนูถีบจักร (Kim *et al.*, 1998) และในคน (Montecchio *et al.*, 1991) เมื่อให้สารเอเซียติโคไซด์ขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางปากแก่หนูตะเภา และใช้ทาที่ผิวหนังในหนูตะเภาปกติและหนูขาวที่เป็นเบาหวานซึ่งแผลหายช้าที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่ามีผลในการเพิ่มปริมาณของคอลลาเจนและลดขนาดของแผล (Shukla *et al.*, 1999)

1.2.2 การรักษาโรค

ได้มีรายงานว่าไตรเทอร์ปีนซาโปนิน (triterpene saponins) จากบัวบกซึ่งเป็นตัวยาที่ละลายในน้ำได้ยาก (Nakajima and Ajiyoshi, 1972) สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) รักษาบาดแผล (wound healing) และโรคผื่นคัน (eczema) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในเรื่องของการปรับปรุงด้านความจำ ด้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง ด้านการเกิดออกซิเดชันและคลายเครียดหรือความกังวลได้ (anxiolytic) (Jia and Lu, 2008)

สารสกัดบัวบกด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์มีฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร เมื่อทดลองกับหนูขาว (Chatterjee *et al.*, 1992) การทดลองในคนก็พบว่าบัวบกใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ได้เช่นเดียวกัน (Shin *et al.*, 1982) นอกจากนี้ยังมีการใช้บัวบกในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง โดยให้ผู้ป่วยด้วยโรคความดันโลหิตสูงเรื้อรัง 87 คนกินสารสกัดบัวบกในปริมาณ 60 และ 120 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิตสูง และไม่พบผลข้างเคียง (Cesarone *et al.*, 1992) สารสกัดเอทานอลจากบัวบกทั้งต้นมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตของหนูขาวเมื่อนำเข้าทางหลอดเลือดดำ (Ramaswamy *et al.*, 1970) น้ำคั้นจากต้นของบัวบกและสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนูขาวและสุนัข ซึ่งพบว่าส่วนที่ออกฤทธิ์คือส่วนของไกลโคไซด์ (Sangsirinavin, 1978)

1.2.3 การต้านมะเร็ง

สารประกอบไตรเทอร์ปีนจากบัวบกมีสมบัติการต้านมะเร็ง โดย Park *et al.* (2004) ทำการศึกษาสารสำคัญกรดเอเซียติกของบัวบกในการเหนี่ยวนำทำให้เซลล์มะเร็งผิวหนังของคนชนิด SK-MEL-2 เกิด apoptosis ด้วยกลไกการผลิตเอนไซม์ caspase-3 ทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งทำให้เซลล์มะเร็งตาย จากผลการทดลอง พบว่ากรดเอเซียติก มีประสิทธิภาพในการ

ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนังของคนชนิด SK-MEL-2 นอกจากนี้สารประกอบไตรเทอร์ปีนสามารถขัดขวางการพัฒนาของเนื้องอกในช่องท้องของหนูเมื่อได้รับสารสกัดบวบกผ่านทางปาก (Babu *et al.*, 1995)

1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อสารประกอบไตรเทอร์ปีน

1.3.1 ตัวทำละลายที่ใช้สกัด

นฤมล (2551) ศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ น้ำ ปิโตรเลียมอีเทอร์และเฮกเซน) ต่อสารประกอบไตรเทอร์ปีนในบวบก โดยตรวจสอบปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค high performance thin layer chromatography (HPTLC) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ มีสารประกอบไตรเทอร์ปีน 4 ชนิดสูงสุด (มาเดลาสโซไซด์ กรดมาเดลาสสิก เอเชียดิโคไซด์ และกรดเอเชียดิก) รองลงมาคือ ตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และตัวทำละลายน้ำ ตามลำดับ ดังนั้นหากนำสารสกัดบวบกไปใช้ประโยชน์ในระบบอาหารอาจใช้ตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสามารถสกัดสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดได้ดีเช่นกัน

1.3.2 วิธีการสกัด

วิธีการสกัด (แบบเขย่า 24 ชั่วโมง และวิธีการปั่นละเอียด) มีผลต่อปริมาณสารประกอบไตรเทอร์ปีน สารสกัดบวบกจากวิธีสกัดแบบการปั่นให้ละเอียด (homogenize) มีปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าสารสกัดจากวิธีเขย่า 24 ชั่วโมง ปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนมาเดลาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียดิกในสารสกัดเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธีสกัดแบบการปั่นให้ละเอียด คือ 41.3, 34.4, 20.1 และ 4.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (นฤมล, 2551)

1.3.3 ความร้อนจากกระบวนการแปรรูป

เมื่อนำบวบกผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีต่างๆ คือ บวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dried) และบวบกทำแห้งแบบถาด (tray dried) พบว่าความร้อนมีผลต่อปริมาณไตรเทอร์ปีน โดยตรวจสอบปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค HPTLC โดยตัวอย่างบวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งมีปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าบวบกทำแห้งแบบถาด (55 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ยังพิจารณาผลของไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดในแต่ละผลิตภัณฑ์ (น้ำบวบกผง น้ำบวบก และน้ำชาบวบก) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความร้อนสูง มีปริมาณไตรเทอร์ปีนรวมลดลง โดยน้ำบวบกผง น้ำบวบก

และนำข้าวบั่วก ผ่านการแปรรูปโดยใช้ความร้อนอยู่ในช่วง 80-180 องศาเซลเซียสทำให้สารไตรเทอร์ปีนเสื่อมสลาย (นฤมล, 2551)

Kormin (2005) ได้ศึกษาผลของความร้อนในขั้นตอนการเตรียมเครื่องคัมนุมุนไพรต่อองค์ประกอบทางเคมีของข้าวบั่วก ได้แก่ มาเดกาสโซไซด์ เอเซียติโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียติก พบว่าการให้ความร้อนที่ 65, 80 และ 100 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมดลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Choi *et al.* (1982) พบว่าปริมาณไตรเทอร์ปีนลดลงหลังจากการให้ความร้อนในการสกัดที่ 80 องศาเซลเซียส

1.3.4 เอนไซม์

Muangnoi (2007) ได้รายงานผลการศึกษาปริมาณไตรเทอร์ปีน หลังจากการเก็บข้าวบั่วกสดไว้ 5 และ 7 วัน พบว่าปริมาณมาเดกาสโซไซด์และเอเชียติโคไซด์ลดลงและปริมาณกรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่ง Bader *et al.* (1998) ให้เหตุผลว่ามาเดกาสโซไซด์และเอเชียติโคไซด์เปลี่ยนรูปไปเป็นกรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียติกเนื่องจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในข้าวบั่วก นอกจากนี้ยังทำการศึกษาปริมาณไตรเทอร์ปีนจากข้าวบั่วกสดและข้าวบั่วกที่เคี้ยวในโตรเจนเหลว พบว่าข้าวบั่วกที่เคี้ยวในโตรเจนเหลวมีปริมาณมาเดกาสโซไซด์และเอเชียติโคไซด์มากกว่าในข้าวบั่วกสด และมีปริมาณกรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียติกในข้าวบั่วกที่ผ่านการเคี้ยวในโตรเจนเหลวน้อยกว่าในข้าวบั่วกสด ซึ่งเป็นไปได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในข้าวบั่วกถูกยับยั้งโดยไนโตรเจนเหลว (Muangnoi, 2007)

นฤมล (2551) ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อการไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคโคน โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างน้ำข้าวบั่วกและน้ำข้าวบั่วกปั่นผสมกับข้าวบั่วกสด พบว่าไม่พบไตรเทอร์ปีนไกลโคโคน (เอเชียติโคไซด์และมาเดกาสโซไซด์) ในตัวอย่างน้ำข้าวบั่วกปั่นผสมกับข้าวบั่วกสดแต่พบไตรเทอร์ปีนอะไกลโคโคน (กรดเอเชียติก และกรดมาเดกาสติก) เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ในข้าวบั่วกจะไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคโคน (เอเชียติโคไซด์และมาเดกาสโซไซด์) ให้เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคโคน (กรดเอเชียติก และกรดมาเดกาสติก)

1.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนในข้าวบั่วก

Pramongkit (1997) นำเทคนิค TLC ระบุชนิดของสารสำคัญกลุ่มไตรเทอร์ปีนในข้าวบั่วก โดยใช้ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (15:7:1 v/v/v) โดยมี spraying reagent คือสารแอนโทรน 0.2 % ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้นแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกสารสกัดไตรเทอร์ปีนจากสาร

สกัดบวบ โดยสารไตรเทอร์ปีนที่แยก ได้แก่ เอเชียดิโคไซด์ กรดเอเชียดิก กรดมาเดคาสติก และมาเดคาสโซไซด์

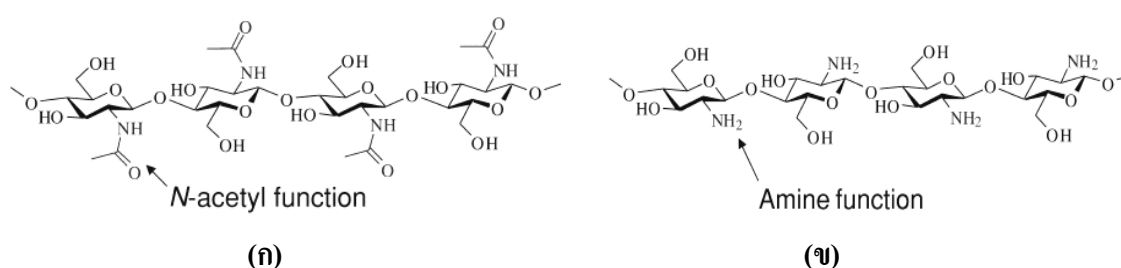
นฤมล (2551) ตรวจสอบปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค HPTLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (15:7:1 v/v/v) โดยมี spraying reagent คือ สารแอนโทรน 0.2 เปอร์เซ็นต์ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดบวบที่สกัดด้วยเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ สกัดได้ไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด 928.13 มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญ 4 ชนิด คือ สารมาเดคาสโซไซด์ (41.3 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) รองลงมาคือเอเชียดิโคไซด์ (34.4 เปอร์เซ็นต์ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) กรดมาเดคาสติก (20.1 เปอร์เซ็นต์ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) และกรดเอเชียดิก (4.2 เปอร์เซ็นต์ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) ตามลำดับ

2. ไคโตแซน (chitosan)

ไคโตแซนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic polysaccharide) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ไคโตแซนเป็นสารอนุพันธ์จากไคตินที่สกัดมาจากเปลือกกุ้งและปู โดยมีไคตินอยู่ประมาณ 14-27 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) (วิสิฐและวันทนิย์, 2535) ไคโตแซนมีศักยภาพที่จะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากกว่าไคติน เนื่องจากไคตินเป็นสารพอลิเมอร์ไร้ประจุทำให้ยากต่อการละลายในสารละลายทั่วไป

2.1 โครงสร้างทางเคมี

ไคโตแซนเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากการนำหมู่อะซิติลออกจากไคติน (deacetylation) ทำให้โมเลกุลเดี่ยวของไคตินที่เป็นเอ็นอะซิติลกลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine) (ภาพที่ 3ก) เปลี่ยนเป็นกลูโคซามีน (glucosamine) ซึ่งมีหมู่เอมิโนอิสระที่สามารถรับโปรตอน และทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีประจุบวก ด้วยเหตุนี้ไคโตแซนจึงมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากไคติน นอกจากนี้ไคโตแซนยังมีส่วนของโมเลกุลที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยาอยู่หลายหมู่ เช่น หมู่เอมิโน ($-NH_2$) ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่สอง หมู่แอลกอฮอล์ ($-CH_2OH$) ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่สาม และตัวที่หก (ภาพที่ 3ข) และส่วนของโมเลกุลเหล่านี้มีผลทำให้ไคโตแซนสามารถละลายได้ในสารละลายหลายชนิดที่มีพีเอชต่ำกว่า 6.5 และสามารถใส่ประจุลบได้หลากหลายกว่าไคติน (Tan *et al.*, 1996)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของไคติน (ก) และไคโตแซน (ข)

ที่มา: Illum *et al.* (2001)

2.2 การใช้ประโยชน์

ไคโตแซนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการแพทย์ เกษตวิทยา การเกษตร ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเคมี กระดาษ และการบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปใช้ในระบบนำส่งยา เนื่องจากไคโตแซนเป็นสารธรรมชาติที่สามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อและเซลล์ของร่างกาย สามารถรับประทานได้ และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Illum *et al.*, 2001)

2.2.1 ด้านการแพทย์และเกษตรวิทยา

ไคโตแซนมีคุณสมบัติเป็นสารก่อฟิล์ม จึงสามารถนำมาเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มที่มีลักษณะบางใสปิดรักษาแผลผ่าตัดและไฟไหม้ ซึ่งจะช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น ทำผลิตภัณฑ์แผ่นปิด ตกแต่งแผล ด้ายเย็บแผล ซึ่งข้อดีของมันก็คือ จะสลายตัวอย่างช้า ๆ และถูกดูดซับเข้าร่างกาย โดยไม่มีปฏิกิริยาต่อต้านจากร่างกาย ใช้เป็นเลนส์สายตา เนื่องจากมีคุณสมบัติยอมให้ออกซิเจนผ่านเข้าออกได้ และไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา ใช้เป็นสารป้องกันการตกตะกอนของเลือด ใช้เป็นตัวจับและตกตะกอนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ใช้ผลิตผนังเทียม เช่น ผนังไต ใช้เป็นสารลดโคเลสเตอรอล และใช้เป็นสารเชื่อมหรืออุดฟันในด้านทันตกรรม (Brzeski and Prudden, 1987; Anonymous, 1989)

2.2.2 อุตสาหกรรมกระดาษ

ปัจจุบันมีการรณรงค์ให้ใช้สารที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่กำลังเกิดขึ้น เช่นเดียวกับอุตสาหกรรมกระดาษที่พยายาม

จะค้นหาสารชีวภาพที่สามารถใช้ทดแทนสารสังเคราะห์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งไคโตแซนมีสมบัติหลายประการที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการปรับปรุงสมบัติของกระดาษ อาทิ มีประจุบวก สามารถสร้างฟิล์มได้ น้ำหนักโมเลกุลสูงและมีโครงสร้างเป็นเส้นตรง นอกจากนี้ไคโตแซนยังสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จากรายงานวิจัยพบว่าการใช้ไคโตแซนในปริมาณ 0.25-1 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มความแข็งแรงของกระดาษได้ดี (Lertsutthiwong *et al.*, 2002)

2.2.3 ด้านการเกษตร

ได้มีการพัฒนาการนำไคโตแซนไปใช้ทางการเกษตรอย่างมากมายเนื่องจากการใช้ไคโตแซนให้ผลดีในแง่ของการเป็นสารธรรมชาติที่ช่วยลดความเสี่ยงของเกษตรกรและผู้บริโภคต่อการได้รับสารพิษจากปุ๋ยและยาปราบศัตรูพืช เช่น การเคลือบเมล็ดพันธุ์เพื่อป้องกันการงอกและเสียหายของเมล็ดพันธุ์ โดยฟิล์มไคโตแซนมีลักษณะยืดหยุ่น แข็งแรง ยึดเกาะกับผิวเมล็ดพันธุ์ได้ดี ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ยาม่าแมลง นอกจากนี้ยังใช้ในการเคลือบผิวผลไม้ เพื่อควบคุมการเปลี่ยนแปลงและทำให้ผลไม้มีลักษณะใกล้เคียงกับธรรมชาติและมีคุณภาพดีให้นานที่สุด (Brzeski and Prudden, 1987)

2.2.4 อุตสาหกรรมอาหาร

มีการพัฒนาการใช้ไคโตแซนมากขึ้น เช่น นำมาทำมายองเนส เนยถั่ว และใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มอาหาร ซึ่งไม่เป็นพิษและความแข็งแรงสูง เช่น ใช้บรรจุไส้กรอก ใช้ในการถนอมรักษาอาหาร สารกันบูด เนื่องจากไคโตแซนมีคุณสมบัติด้านแบคทีเรียและเชื้อรา ไคโตแซนเป็นอาหารเสริมที่ไม่ให้พลังงานและไม่มีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากคนไม่มีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยไคโตแซน ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้ในอาหารสำหรับควบคุมน้ำหนัก (ภาวดี และคณะ, 2542)

2.2.5 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ไคโตแซนได้ถูกนำมาใช้เพื่อจุดประสงค์หลายอย่าง เช่น เป็นสารเพิ่มความข้นเหนียวในครีม เป็นส่วนผสมในโลชั่น เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นและความเนียนนุ่ม เป็นส่วนผสมในแชมพูสระผม ครีมนวดผมและครีมปรับสภาพผม เนื่องจากมีคุณสมบัติ ความหนืด และการเคลือบเพื่อช่วยเก็บความชุ่มชื้นไว้ ทำให้เส้นผมนุ่มได้ บริษัทในประเทศเยอรมนี และญี่ปุ่นได้ใช้ไคโตแซนเป็นส่วนประกอบในแป้งแต่งหน้า เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น ความเรียบ รวมทั้งได้มีการนำสารไคโตแซนมาใช้ในโฟมล้างหน้า สบู่เหลว ยาสีฟัน และครีมทาหน้า (ธีรพล, 2534)

2.2.6 การบำบัดน้ำเสีย

มีการใช้ไคโตแซนเป็นสารตกตะกอนในการบำบัดน้ำเสีย ใช้กำจัดโลหะหนักและสารพิษโดยอาศัยสมบัติความเป็นพอลิอิเล็กโตรไลต์และความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะหนัก ได้มีการใช้ไคโตแซนร่วมกับพอลิเมอร์ที่มีประจุลบหรือเกลืออนินทรีย์ เช่น อะลูมิเนียมซัลเฟต หรือเฟอร์ริกซัลเฟต ทำให้ไคโตแซนสามารถลดปริมาณของแข็งที่แขวนลอยในน้ำทิ้งได้ 70-80 เปอร์เซ็นต์ และแยกโปรตีนได้ 13-68 เปอร์เซ็นต์ (Asano, 1978) นอกจากนี้มีการใช้ไคโตแซนในกระบวนการกำจัดน้ำเสียเพื่อแยกโลหะหนักและโลหะมีพิษ เช่น Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} และ Mn^{2+} เป็นต้น ไคโตแซนยังสามารถจับกับสารกำจัดแมลง เช่น DDT และสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำ เช่น พลูโตเนียม เมทิลเมอร์คิวรีแอกซิเดตซึ่งเกิดจากโรงงานผลิตแอสเบตต์ไฮด์รอลอด จนมีการใช้ไคโตแซนในการกำจัดปิโตรเลียมในน้ำเสีย โดยความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น เวลาในการดูดซับ ขนาดหรือพื้นที่ผิวของไคโตแซน และความเข้มข้นของไอออนเริ่มต้น เป็นต้น (Hirano, 1996)

2.2.7 การนำไปใช้ในระบบนำส่ง

Knorr (1984) ได้เสนอว่าไคโตแซนสามารถใช้เป็นตัวพา (carrier) สารปรุงแต่งรสอาหาร หรือสารสำคัญต่างๆ เนื่องจากไคโตแซนสามารถเกิดเป็นเมทริกซ์กับสารที่มีประจุลบ และมีลักษณะเป็นเจล ซึ่งสามารถห่อหุ้มสารสำคัญไว้ได้และไคโตแซนก็จะถูกย่อยสลาย (degradation) ได้ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตในลำไส้ใหญ่ของร่างกายคนเรา

ไคโตแซนสามารถละลายได้ง่ายในสถานะที่มีพีเอชต่ำ แต่จะไม่ละลายเมื่ออยู่ในสถานะที่มีพีเอชสูง จากคุณสมบัติความไวต่อพีเอชของไคโตแซนดังกล่าวจึงไม่เหมาะสำหรับการนำส่งยาไปยังลำไส้ เนื่องจากไคโตแซนละลายในกระเพาะอาหาร จึงทำให้ยาที่ปลดปล่อยออกมาเกิดการเสียสภาพได้ (George and Abraham, 2006) ดังนั้นจึงจำเป็นในการสร้างเมทริกซ์ที่เหมาะสมต่อการนำส่งยา โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและพอลิเมอร์อื่นๆ เช่น คอนดรอยติน (chondroitin) คาราจีแนน (carageenan) แซนแทนกัม (xanthan gum) โซเดียมแอลจีเนต (sodium alginate) และเพกติน (pectin) (Dumitriu and Chornet, 1996; Kim *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005; Bhise *et al.*, 2007; Bigucci *et al.*, 2008)

โครงข่ายระหว่างไคโตแซนและแซนแทนเกิดจากพันธะไอออนิกระหว่างหมู่แอมิโนของไคโตแซนและหมู่คาร์บอกซิลของแซนแทน ซึ่งจะมีความไวต่อพีเอชโดยแสดงลักษณะการพองตัวที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารที่ถูกกักเก็บไว้ เช่น ยารักษาโรค เอนไซม์ และ

แบคทีเรีย (Chu *et al.*, 1995, 1996; Chelet *et al.*, 2000) ได้นำระบบดังกล่าวไปใช้ในการกักเก็บและนำส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมาย ซึ่งโครงข่ายระหว่างไคโตแซนและแซนแทนเป็นระบบสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อการทำงานของเอนไซม์ได้สูงเมื่ออยู่ในระบบย่อยอาหาร (Chelet *et al.*, 2000)

Liao *et al.* (2005) ศึกษาประสิทธิภาพในการนำส่งยาโดยใช้ระบบสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากไฟเบอร์ 2 ชนิด คือ ไคโตแซนและแอลจินต จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและแอลจินต มีประสิทธิภาพในการนำส่งยา โดยมีความสามารถในการกักเก็บ (encapsulation) สูง และบรรจุยาได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินสามารถนำไปใช้ในระบบนำส่งยาหรือสารสำคัญได้ เนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนและเพกตินจะเกิดที่พีเอชต่ำ ดังนั้นตัวยาจึงไม่มีการปลดปล่อยในกระเพาะอาหาร เมื่อพีเอชสูงขึ้นจะเกิดการพองตัว (swelling) และปลดปล่อยตัวยาออกมา (George and Abraham, 2006)

2.3 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกกับพอลิเมอร์ที่มีประจุตรงกันข้าม (polyelectrolyte complexes)

ไคโตแซนเป็นพอลิอิเล็กโตรไลต์ที่ทำให้ประจุบวกสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกกับพอลิเมอร์ที่มีประจุลบภายใต้สภาวะกรดได้ (Sandford, 1992; Rinaudo, 2006) พอลิเมอร์ธรรมชาติที่ทำให้ประจุลบ ได้แก่ แซนแทน (xanthan) คาราจีแนน (carrageenan) แอลจินต (alginate) เพกติน (pectin) เฮพาริน (heparin) และไฮยาลูโรแนน (hyaluronan) (Rusu-Balaita *et al.*, 2003; Vasilii *et al.*, 2005) สารประกอบเชิงซ้อนโดยอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกโดยไคโตแซนและพอลิเมอร์ที่ทำให้ประจุลบ (polyanions) นิยมนำไปใช้ในการกักเก็บและการควบคุมการปลดปล่อยยา (Gupta and Ravikumar, 2001)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

2.4.1 อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ทั้งสองชนิด

Dumitriu *et al.* (1994) ศึกษาวิธีการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและแซนแทน พบว่าสมบัติการกักเก็บน้ำ (water retention) และความแข็งแรงของสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างไคโตแซนและแซนแทน และจากการรายงานของ Argin-Soysal *et al.* (2009) พบว่าความเข้มข้นของแซนแทนมีผลต่อการเกิดโครงข่ายของไคโตแซนและแซนแทน เมื่อความเข้มข้นของแซนแทนสูงขึ้นส่งผลให้ระดับการพองตัวของเจลสูงขึ้นที่ความ

เข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.7 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร ของไคโตแซน ซึ่งการที่เจตมียระดับการพองตัวสูงนั้นส่งผลให้เกิดการลดการเคลื่อนที่ของสายโซ่ (chain mobility) และเกิดความคงตัวของโครงข่าย

จากการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและกัมคอนดาโกกู (gum kondagogu) ซึ่งเกิดจากอันตรกิริยาลิเล็กโตรสแตติกระหว่างหมู่เอมีนของไคโตแซนและหมู่คาร์บอกซิลของกัมคอนดาโกกู พบว่าที่อัตราส่วน 4: 1 และ 5: 1 (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตรของกัมคอนดาโกกู:ไคโตแซน) มีผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน คือ มีน้ำหนักของสารประกอบเชิงซ้อนสูง (Naidu *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาผลของ molar ratios ต่อ น้ำหนักของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกติน พบว่าที่อัตราส่วน 1:1 จะให้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักสูงสุด แสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วนดังกล่าวสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้ดีที่สุด (Bigucci *et al.*, 2008) นอกจากนี้มีการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาลิเล็กโตรสแตติกระหว่างไคโตแซนและแอลจินेट โดยทำการวัดค่า zeta potential ของสารละลายไฮลิ่งกรองเมทริกซ์ พบว่าอัตราส่วนระหว่างไคโตแซนและเพกตินมีผลต่อค่าความเป็นประจุของส่วนไฮลิ่งที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ ซึ่งจะบ่งบอกถึงประจุที่เหลือจากการเกิดอันตรกิริยาลิเล็กโตรสแตติก หากค่า zeta potential ของสารละลายไฮลิ่งมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จะแสดงถึงการเกิดอันตรกิริยาลิเล็กโตรสแตติกได้ดีที่สุด (Saether *et al.*, 2008)

2.4.2 พิเศษของสารละลาย

Argin-Soysal *et al.* (2009) ทำการศึกษาผลของพิเศษของสารละลายไคโตแซนต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและแซนแทน โดยทำการศึกษาที่พิเศษต่างๆ คือ 4.5, 5.5 และ 6.2 พบว่าที่ความเข้มข้นของไคโตแซนและแซนแทน 0.7 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตรในสภาวะพิเศษของสารละลายไคโตแซนเท่ากับ 5.5 มีระดับการพองตัวของเจลสูงสุด

จากการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่พิเศษ 2, 3, 4 และ 5 พบว่าที่พิเศษ 5 ให้น้ำหนักของสารประกอบเชิงซ้อนสูงสุด เนื่องจาก pKa ของไคโตแซนมีค่าประมาณ 6.3 ดังนั้นในช่วงพิเศษ 2-5 หมู่เอมีนของไคโตแซนส่วนใหญ่จะมีการให้โปรตอน (protonated) ส่วนระดับการแตกตัวของเพกติน (pKa ~3.5) จะแตกตัวให้ประจุลบลดลงเมื่อพิเศษของสารละลายต่ำกว่า pKa ดังนั้นอันตรกิริยาทางอิเล็กโตรสแตติกระหว่างไคโตแซนและเพกตินสามารถเกิดได้ดีที่พิเศษต่ำ (Rolin *et al.*, 1998; Bigucci *et al.*, 2008)

2.4.3 เกลือ

อิทธิพลของไอออนที่มีต่อสารมาโครโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับชนิด ความแรงและความสามารถในการจับกับโมเลกุลน้ำของไอออน ไอออนที่มีขนาดเล็กและมีความหนาแน่นของประจุมากจะมีแรงดึงดูดโมเลกุลน้ำให้เข้ามาใกล้ได้มากกว่าไอออนที่มีขนาดใหญ่และมีความหนาแน่นของประจุต่ำ ซึ่งการดึงดูดโมเลกุลน้ำให้เข้ามาใกล้ไอออนจะส่งผลให้โมเลกุลของน้ำที่เคยจับกับโมเลกุลของน้ำด้วยตัวเอง หรือจับอยู่กับสารมาโครโมเลกุลต้องแยกออกจากกันและหันมาจับกับโมเลกุลของไอออนแทน ทำให้โครงสร้างของน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจส่งผลให้โครงสร้างของน้ำมีความเป็นระเบียบเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของไอออน (Zhang and Cremer, 2006) จากทฤษฎีการจัดลำดับอิทธิพลของไอออนโดยฮอฟไมสเตอร์ (Hofmeister series) สามารถเรียงลำดับความแรงของไอออนทั้งไอออนบวกและลบที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลน้ำได้ ดังภาพที่ 4

Strongly hydrated anions	Weakly hydrated anions
Citrate ³⁻ > SO ₄ ²⁻ > PO ₃ ²⁻ > F ⁻ > Cl ⁻ > Br ⁻ > I ⁻ > NO ₃ ⁻ > ClO ⁻	
N(CH ₃) ₄ ⁴⁺ > NH ₄ ⁺ > Cs ⁺ > Rb ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > H ⁺ > Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Al ³⁺	
Weakly hydrated cations	Strongly hydrated cations

ภาพที่ 4 ลำดับอิทธิพลของไอออนต่อการจับกับโมเลกุลน้ำของฮอฟไมสเตอร์ (Hofmeister series)

ที่มา: Chaplin (2008)

จากภาพที่ 4 ไอออนที่อยู่ในกลุ่ม strongly hydrated จะเป็นกลุ่มที่สามารถดึงดูดโมเลกุลของน้ำมากกว่าไอออนที่อยู่ในกลุ่ม weakly hydrated เนื่องจากไอออนในกลุ่ม strongly hydrated เป็นไอออนที่มีความแรงของประจุมากกว่าไอออนในกลุ่ม weakly hydrated ดังนั้นจึงสามารถดึงดูดโมเลกุลของน้ำในสารละลายให้เข้ามาใกล้ชิดไอออนได้มาก ทำให้โมเลกุลของน้ำมีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบมากขึ้น น้ำอิสระที่จะเกิดอันตรกิริยากับสารมาโครโมเลกุลมีสัดส่วนลดลงดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่สารมาโครโมเลกุลจะเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันมากขึ้น เรียกปรากฏการณ์ที่เกิดจากอิทธิพลของไอออนกลุ่มนี้ว่า “salting out effect” ตัวอย่างปรากฏการณ์ที่เกิดจากอิทธิพลของไอออนกลุ่มนี้ เช่น โปรตีนเกิดการตกตะกอน และสสารซิมิอุทมิเจลาทีในเซชันเพิ่มขึ้น เป็นต้น สำหรับอิทธิพลของไอออนบวกและลบที่เป็น weakly hydrated ions ซึ่งมีความแรงของประจุต่ำดังนั้นจึงสามารถดึงดูดโมเลกุลของน้ำเข้ามาใกล้ชิดไอออนได้น้อย และทำลายความเป็นระเบียบของโมเลกุลน้ำให้ลดลง ดังนั้นจึงมีสัดส่วนของน้ำอิสระที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับ

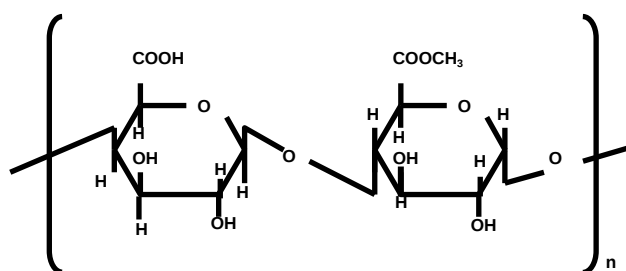
สารมาโครโมเลกุลมากขึ้น สารมาโครโมเลกุลจึงเกิดการกระจายตัวหรือละลายน้ำได้มากขึ้น เรียกปรากฏการณ์ที่เกิดจากอิทธิพลของไอออนกลุ่มนี้ว่า “salting in effect” ตัวอย่างปรากฏการณ์ที่เกิดจากอิทธิพลของไอออนกลุ่มนี้ เช่น โปรตีนเกิดการละลาย และสตาร์ชมีอุณหภูมิเจลลาติไนเซชันลดลง เป็นต้น (Zhang and Cremer, 2006) อย่างไรก็ตามการที่ไอออนจะมีอิทธิพลทำให้เกิดปรากฏการณ์ได้นั้นยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ (Damodaran, 1994)

de Vasconcelos *et al.* (2006) ศึกษาผลของความแรงไอออนต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง poly (methacrylic acid) และไคโตแซน พบว่าการเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) มีอิทธิพลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายได้ 2 ลักษณะ คือ ที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ จะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้ดีขึ้นโดยการลดขนาดของโมเลกุลพอลิอิเล็กโตรไลต์ (เพิ่มความหนาแน่นของประจุบนพื้นผิว) และเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นจนถึงจุดจุดหนึ่งจะเกิดความจำเพาะของแรงดึงดูดทางอิเล็กโตรสแตติกระหว่างประจุลบ ($-\text{COO}^-$) ของ poly (methacrylic acid) และประจุบวก ($-\text{NH}_3^+$) ของไคโตแซน ส่งผลให้การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินลดลง

3. เพกติน (pectin)

3.1 โครงสร้างทางเคมี

เพกตินเป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่ผลิตได้จากผลไม้ เช่น เปลือกส้ม ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เพกตินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ โครงสร้างโมเลกุลของเพกติน (ภาพที่ 5) ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกรดกาแล็กทูโรนิก (D-galacturonic acid) เป็นสายหลัก และมีสายแขนงเป็นน้ำตาลอะราบินโนส (L-arabinose) และน้ำตาลกาแล็กโทส (D-galactose) หมู่คาร์บอกซิล ($-\text{COOH}$) ของกรดกาแล็กทูโรนิกบางส่วนถูกเอสเทอร์ไฟด์ด้วยหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) เป็นเมทิลเอสเทอร์ และมีระดับการเกิดเอสเทอร์ (degree of esterification; DE) แตกต่างกัน (Daniel and Bemiller, 2001)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของเพกติน

ที่มา: Sinha and Kumria (2001)

3.2 ชนิดของเพกติน

เพกตินทางการค้าแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เพกตินชนิด HM (high methoxy pectin) และชนิด LM (low methoxy pectin) ตาม degree of esterification หรือ DE ส่งผลให้เพกตินที่มี DE ต่างกัน มีสภาวะในการเกิดเจล (setting condition) ระยะเวลาในการเกิดเจล (gelling time) และความแข็งแรงของเจล (gel strength) แตกต่างกัน เนื่องจากเพกตินสามารถแตกตัวได้ดีที่พีเอชมีค่าสูงกว่าค่า pK_a (~3.5) ดังนั้นเพกตินที่มีค่า DE น้อย (มีปริมาณหมู่เมทอกซิลน้อย) จะแตกตัวให้ประจุลบได้มากกว่าเพกตินที่มีค่า DE มาก (มีปริมาณหมู่เมทอกซิลมาก) (Rolin *et al.*, 1998)

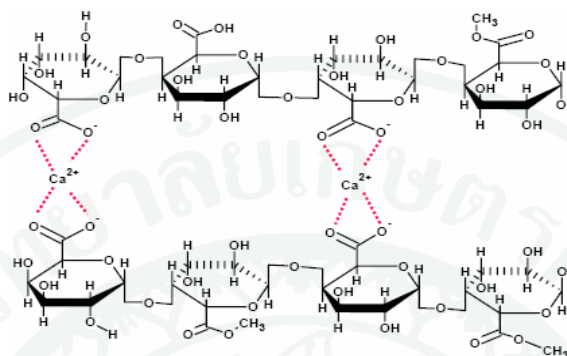
3.2.1 high methoxy pectin

เพกตินชนิด HM มีค่า DE มากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือมีปริมาณหมู่เมทอกซิล (methoxyl group) มากกว่าหรือเท่ากับ 7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโมเลกุลเพกติน เพกตินชนิด HM สามารถเกิดเจลได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอช 2.0-3.0 และมีของแข็งที่ละลายได้ เช่น น้ำตาล อย่างน้อย 55 เปอร์เซ็นต์ (Rolin *et al.*, 1998)

3.2.2 low methoxy pectin

เพกตินชนิด LM มีค่า DE ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หรือมีปริมาณหมู่เมทอกซิลน้อยกว่า 7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโมเลกุลเพกติน เพกตินชนิด LM สามารถเกิดเจลโดยการเชื่อมข้าม (cross-linking) กับประจุบวกสอง (divalent cations) เช่น แคลเซียมไอออน เพกตินชนิดนี้สามารถเกิดเจลได้ที่พีเอชเป็นช่วงกว้างตั้งแต่ 2.9-5.5 เจลที่ได้เป็นชนิด thermo-reversible gel ลักษณะเนื้อเจลมีความอ่อนนุ่มและยืดหยุ่นมากกว่าเพกตินชนิด HM (นิธิยา, 2545) ซึ่งการเชื่อมข้ามระหว่างแคลเซียมไอออนและหมู่คาร์บอกซิลของเพกติน เกิดบริเวณ junction zone ระหว่างโมเลกุล

homogalacturonic smooth region ของสายโซ่เพกติน โครงสร้างบริเวณ junction zone ถูกเรียกว่า egg-box binding process (ภาพที่ 6) นอกจากนี้เพกตินยังสามารถเกิดอันตรกิริยากับพอลิเมอร์ที่มีประจุตรงข้าม เช่น โคลิโดแซน และเกิดเป็นโครงข่ายเจลที่เป็นระบบของสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น (Marudova *et al.*, 2004)



ภาพที่ 6 junction zones ของเพกตินชนิด LM

ที่มา: Daniel and Bemiller (2001)

3.3 การใช้ประโยชน์

3.3.1 อุตสาหกรรมอาหาร

เพกตินเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) หรือพอลิเมอร์ธรรมชาติ (natural polymer) ที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางค์มานาน โดยใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด สารก่อเจลในผลิตภัณฑ์แยม เยลลี่ และสารเพิ่มความคงตัวของระบบคอลลอยด์ เพกตินนิยมใช้ในอาหารประเภท แยม, เยลลี่, ไส้ของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ (bakery filling), ฟรุตทอปปีง (fruit topping), น้ำผลไม้และผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเนื้อคล้ายเยลลี่ (พรตักดี, 2551) ได้แก่

ก. การเติมเพกตินชนิด LM จำนวนเล็กน้อยลงในโยเกิร์ตจะช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อของโยเกิร์ตให้ดีขึ้น

ข. สำหรับน้ำผลไม้เข้มข้นจะเติมเพกตินชนิด HM เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับอนุภาคของเนื้อผลไม้ ทำให้อนุภาคกระจายตัวแขวนลอยอยู่ได้โดยไม่ตกตะกอน และมีการเติมเพกตินชนิด HM ลงไปในน้ำผลไม้ผงสำเร็จรูปเพื่อให้เกิดความรู้สึกเหมือนน้ำผลไม้ธรรมชาติขึ้น

ก. ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เช่น แยมที่นำมาเติมในทาร์ต (tart) จะให้ลักษณะผิวเรียบเป็นเงาหลังจากอบแล้ว และทนต่อการอบ

3.3.2 การนำไปใช้ในระบบนำส่ง

ในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการนำเพกตินมาใช้ในทางเภสัชกรรมและอุตสาหกรรมยาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากเพกตินมีสมบัติเฉพาะที่ทำให้สามารถนำมาใช้กักเก็บหรือนำส่งยา โปรตีน และเปปไทด์ เป็นต้น เพกตินสามารถใช้ในระบบนำส่งยาเพื่อให้ระบบนำส่งยาลอยตัวได้ในกระเพาะอาหาร ระบบนำส่งนี้สามารถใช้ในกรณีที่ยามีช่วงการดูดซึมในทางเดินอาหารสั้น ยาที่มีปัญหาเรื่องความคงตัวในลำไส้เล็ก หรือใช้เพื่อต้องการให้ยาออกฤทธิ์เฉพาะที่ในกระเพาะอาหาร เช่น กรณีต้องการกำจัดเชื้อ *Helicobacter pylori* ส่วนการนำส่งยาไปสู่ลำไส้ใหญ่สามารถใช้ได้ในกรณีที่ยาไม่คงตัวหรือไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนต้น ยาที่ใช้ในการรักษาพยาธิสภาพในลำไส้ใหญ่ หรือยาที่ต้องการให้ดูดซึมหรือออกฤทธิ์ช้า ระบบนำส่งยาสู่ลำไส้ใหญ่ต้องไม่ปลดปล่อยตัวยาออกมาในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และยอมให้ตัวยาลดปล่อยออกมาเมื่อไปถึงบริเวณลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีการนำเพกตินมาใช้ในการวิจัยและพัฒนาระบบนำส่งยาสู่ลำไส้ใหญ่ในรูปยาเม็ดเมทริกซ์ที่เป็นลักษณะของเม็ดเจล (gel bead) ยาเม็ดชนิดดอกเคลือบและยาเม็ดเคลือบฟิล์ม รวมถึงการใช้เพกตินเพื่อนำส่งยาไปสู่ลำไส้ใหญ่ (พรศักดิ์, 2551)

Sriamornsak and Nunthanid (1998) ศึกษาการปลดปล่อยยาจากเพกตินบีดที่เตรียมเจลโดยการใช้ไอออน (ionic gelation) จากการศึกษาพบว่า การปลดปล่อยยาจากเพกตินบีดใน Tris buffer พีเอช 7.4 ที่ความเข้มข้นของยา 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร จะมีการปลดปล่อยยาออกมาเร็วที่สุด รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของยา 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร จะปลดปล่อยยาออกมาภายในระยะเวลา 80 นาที ในขณะที่ความเข้มข้นของยา 2.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร จะมีอัตราการปลดปล่อยช้าที่สุด คือ เมื่อเวลาผ่านไป 112 นาที จะมีการปลดปล่อยยาออกมา 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณยาทั้งหมด แสดงให้เห็นได้ว่าเมื่อสัดส่วนความเข้มข้นระหว่างพอลิเมอร์ต่อยาเพิ่มขึ้นจะทำให้การปลดปล่อยยาช้าลง ซึ่งกลไกการปลดปล่อยยาจากเพกตินบีดจะแพร่ผ่านส่วนที่เป็นรูพรุนของเจล

อย่างไรก็ตามการใช้เพกตินบีดในการนำส่งยายังมีข้อเสียอยู่หลายประการ เช่น การสลายตัวอย่างรวดเร็วของเม็ดเจลในลำไส้เล็ก ซึ่งข้อเสียเหล่านี้จะทำให้เกิดการสูญเสียยาก่อนที่จะมีการดูดซึมได้ (Munjeri *et al.*, 1998) ต่อมา Kim *et al.* (2003) ศึกษาการปลดปล่อยแอลบูมิน (albumin) จากไคโตแซน-เพกตินบีด โดยใช้เพกตินชนิด LM เนื่องจากเป็น polyanionic สามารถ

เกิดเจลกับ polycationic ที่มีคุณสมบัติเฉพาะทำให้สามารถนำมาใช้กักเก็บหรือนำส่งโปรตีนได้ (Chang and Lin, 2000) ในงานวิจัยได้ทำการศึกษาการปลดปล่อยแอลบูมิน (albumin) จาก ไคโตแซน-เพกตินบีด เปรียบเทียบกับเพกตินบีดในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 พบว่าเพกตินบีดจะมีการปลดปล่อยแอลบูมินในปริมาณที่มากกว่าไคโตแซน-เพกตินบีด แสดงว่าไคโตแซนมีผลทำให้การปลดปล่อยแอลบูมินจากเพกตินบีดช้าลง

4. สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกติน

ไคโตแซนและเพกตินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์จากธรรมชาติที่มีลักษณะโคเดน คือ เป็นวัสดุชีวภาพ (biomaterials) ย่อยสลายตามธรรมชาติ มีความปลอดภัยในการนำมาใช้กับมนุษย์ ไม่เกิดผลเสียและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เกิดการแพ้ ไม่ไวไฟ และไม่เป็นพิษ (Chen *et al.*, 1995) ส่วนเพกตินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic polysaccharide) ทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก (Ashford *et al.*, 1993) ดังนั้นจึงได้มีงานวิจัยที่ใช้ระบบสารประกอบเชิงซ้อน (polyelectrolyte complexes) ในการนำส่งยา จากงานวิจัยพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินสามารถป้องกันตัวยาได้ที่พีเอชต่ำในกระเพาะอาหารได้ ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินเกิดจากหมู่คาร์บอกซิล ($-\text{COO}^-$) ของเพกตินชนิด LM จับกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับหมู่แอมิโน ($-\text{NH}_3^+$) ของไคโตแซนด้วยพันธะไอออนิก (George and Abraham, 2006) สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินมักเกิดขึ้นในสถานะที่เป็นกรด เนื่องจากพอลิเมอร์ทั้งสองจะเกิดประจุในช่วงพีเอชประมาณ 3-6 (Nordby *et al.*, 2003) ซึ่งนอกจากพีเอชจะมีผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแล้ว ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ความแรงไอออน (ionic strength) และอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์สองชนิดยังมีอิทธิพลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอีกด้วย (Kubota and Kikuchi, 1998) ดังนั้นสารประกอบกลุ่มนี้จึงนิยมใช้เป็นตัวพา (carriers) ในระบบนำส่งยา (Michaels and Miekka, 1961)

5. คุณสมบัติทางด้านวิทยากระแสของสารประกอบเชิงซ้อน

การศึกษาคุณสมบัติทางด้านวิทยากระแสเป็นการศึกษาเกี่ยวกับผลการตอบสนองของตัวอย่างเมื่อมีแรงกระทำใดๆ ที่ทำให้ตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป (deformation) หรือเกิดการเคลื่อนตัวไหลไป (ธงชัย, 2549) การตรวจสอบคุณสมบัติทางวิทยากระแสมีหลายลักษณะ (Daubert and Foegeding, 1998) ได้แก่

1. tube viscometry เป็นการทดสอบในลักษณะที่ตัวอย่างไหลผ่านหลอดแก้วที่มีรูเปิดแคบๆ มีการกำหนดแรงดันในการดันตัวอย่างให้ออกมา เครื่องมือที่ใช้ทดสอบได้แก่ oswald หรือ U-tube viscometer เป็นต้น

2. rotational viscometry เป็นการทดสอบที่มีแกนหมุนหมุนในตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในภาชนะสำหรับทดสอบ ซึ่งมีหลายลักษณะ เช่น concentric cylinder, cone-plate เป็นต้น เครื่องจะตรวจวัดแรงต้านทานการกว่นของตัวอย่าง แล้วแสดงเป็นค่าความหนืด เครื่องมือที่ใช้ทดสอบได้แก่ brookfield viscometer, cone-plate viscometer

3. large deformation เป็นการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง โดยดูการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างหลังจากได้รับแรง ซึ่งแรงที่ให้ เช่น แรงกด (compression) แรงดึง (tensile) แรงเฉือน (shear) เป็นต้น เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ texture analyzer

4. small deformation เป็นการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยแรงที่ให้แกตัวอย่างจะไม่ก่อให้เกิดการเสียหายแก่โครงสร้าง ส่งผลให้สามารถอธิบายถึงลักษณะโครงสร้างของตัวอย่างได้ แรงที่ให้แกตัวอย่างแบ่งออกเป็น

(1) oscillatory เป็นการทดสอบโดยให้แรงสั่นสะเทือนแกตัวอย่างแล้วดูการเปลี่ยนมุมของคลื่นเปรียบเทียบกับ ideal elastic และ ideal viscous ซึ่งอาจทดสอบในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือเวลา (dynamic oscillatory) หรือกำหนดให้สภาวะคงที่ (static) ค่าที่ได้รายงานเป็น loss modulus (G'') บ่งบอกถึงความเป็นของเหลว (liquid like) และ storage modulus (G') บ่งบอกถึงความเป็นของแข็ง (solid like)

(2) constant stress (creep relaxation) เป็นการทดสอบโดยกำหนดให้แรงที่ให้แกตัวอย่างคงที่ แล้วตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวอย่าง โดยเมื่อถอนแรงแล้วตัวอย่างกลับมาอยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงกับรูปร่างเดิม จัดว่าตัวอย่งนั้นเป็น viscoelastic solid material แต่เมื่อถอนแรงแล้วโครงสร้างของตัวอย่างไม่กลับมาคือมีลักษณะเป็นของไหล บ่งบอกว่าตัวอย่งนั้นเป็น viscoelastic fluid material

(3) constant strain (stress relaxation) เป็นการทดสอบโดยกำหนดให้การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวอย่างคงที่ แล้วตรวจวัดแรงต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ถ้าตัวอย่างไม่มีแรงต้านทานเกิดขึ้น บ่งบอกว่าตัวอย่งนั้นเป็น viscoelastic fluid material

5.1 การศึกษาสมบัติทางด้านวิทยากระแสของตัวอย่างกึ่งของแข็งของเหลว

วัสดุที่แสดงพฤติกรรมทั้งแบบที่เป็นของแข็งที่สามารถยืดหยุ่น (elastic) และของเหลวที่มีความข้นหนืด (viscous) เมื่อมีความเค้นเฉือน (shear stress) มักจะทำต่อตัวอย่างที่ความเครียดต่ำค่าหนึ่ง (small strain) แล้วถอนความเค้นเฉือนออก ตัวอย่างจะสามารถคืนตัวกลับสภาพเดิมทันที คือ มีลักษณะเหมือนพวกของแข็งที่สามารถยืดหยุ่น (elastic) และมีบางส่วนสามารถไหลได้เหมือนพวกของเหลวที่มีความข้นหนืด (viscous) ซึ่งถือว่าเป็นตัวอย่างประเภทกึ่งของแข็งของเหลวหรือเรียกว่า วัสดุวิสโคอีลาสติก (viscoelastic materials) ดังนั้นตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นวิสโคอีลาสติกนั้น เมื่อมีการถอนความเค้นเฉือนออกไป บางส่วนของตัวอย่างจะค่อยๆ คืนตัวกลับตามระยะเวลา และ บางส่วนก็จะเกิดการไหลไปข้างหน้าไม่สามารถคืนกลับสภาพเดิมได้ สำหรับการศึกษาพฤติกรรมของวัสดุวิสโคอีลาสติกเป็นการศึกษาโดยวิธีพลวัต (dynamic methods) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ศึกษาสมบัติทางด้านการตอบสนองต่อการเค้นแบบสั่น (oscillatory stress) วิธีนี้สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงสถานะหนึ่งไปยังอีกสถานะหนึ่ง (phase transition) ของตัวอย่างได้ เช่น การเปลี่ยนสถานะจากโซลเป็นเจล (ธงชัย, 2549)

Arguelles-Monal *et al.* (1998) ได้ศึกษาวัสดุวิสโคอีลาสติกโดยวิธีพลวัตแบบสั่น (dynamic oscillatory) ของ chitosan-glutaraldehyde chemical gels ซึ่งเป็นเจลที่เกิดจากการเชื่อม-ข้าม (crosslink) โดยพันธะโควาเลนต์ของไคโตแซน โดยเน้นถึงคุณลักษณะทางวิสโคอีลาสติกที่อธิบายถึงระดับการเชื่อมข้ามของเจลได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสมบัติทางวิทยากระแสของโครงข่าย (semi-interpenetrating) ของไคโตแซนและ polyethylene oxide พบว่าโครงข่ายมีคุณสมบัติที่แสดงลักษณะความเป็นของแข็งที่ยืดหยุ่น (G') เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม polyethylene oxide (Khalid *et al.*, 1999) นอกจากนี้ Martinez-Ruvalcaba (2007) ได้ศึกษาคุณสมบัติทางวิทยากระแสของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและแซนแทนโดยวิธีพลวัต พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนเป็นวัสดุวิสโคอีลาสติกที่แสดงค่าความเป็นของแข็งที่สามารถยืดหยุ่น (G') สูงกว่าค่าความเป็นของเหลวที่มีความข้นหนืด (G'') ซึ่งค่า G' เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและแซนแทน

5.2 ตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับวิทยากระแสของวัสดุ

5.2.1 ความเค้น (stress: τ) คือ ค่าสัดส่วนระหว่างแรง (force) มีหน่วยเป็นนิวตัน (N) ต่อพื้นที่บนระนาบ (area) ของตัวอย่าง มีหน่วยเป็น ตารางเมตร (m^2) ดังแสดงในสมการที่ (1) (Mezger, 2002)

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (1)$$

เมื่อ τ คือ ความเค้น มีหน่วยเป็น ปาสคาล (Pa)

F คือ แรง มีหน่วยเป็น นิวตัน (N)

A คือ พื้นที่ที่มีหน่วยเป็น ตารางเมตร (m²)

5.2.2 ความเครียด (strain: γ) หรือ deformation เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวอย่างขณะถูกแรงกระทำ ดังนั้นความเครียดจึงคำนวณได้จากสัดส่วนระหว่างระยะทางที่ตัวอย่างเคลื่อนที่ไปเมื่อมีแรงมากระทำ ต่อความสูงหรือช่องว่างระหว่างหัววัดและแท่นวางตัวอย่าง (gap) มีหน่วยเป็น เมตร/เมตร ซึ่งเรียกว่า ไร้มิติ (dimensionless) หรือไม่มีหน่วย บางครั้งรายงานเป็น เปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนแปลงไป (% deformation) ดังนั้นค่าความเครียดสามารถคำนวณได้จากสมการที่ (2) (Mezger, 2002)

$$\gamma = \frac{s}{h} \quad (2)$$

เมื่อ γ คือ ความเครียด มีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์ หรือไม่มีหน่วย

s คือ ระยะทางที่ตัวอย่างเคลื่อนที่ไป มีหน่วยเป็น เมตร

h คือ ความสูงหรือช่องว่างระหว่างหัววัดและแท่นวางตัวอย่าง (gap) มีหน่วยเป็น เมตร

5.2.3 ค่า complex shear modulus (G^*) คือความลาดชันเชิงเส้นตรงของกราฟความเค้นและความเครียดที่เกิดขึ้นจากแรงเฉือนมากระทำต่อตัวอย่าง ค่า G^* บ่งบอกถึงความยืดหยุ่นของวัสดุ (elasticity) ซึ่งตามกฎของฮุก (Hook's Law) ค่า G^* สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (3) (Mezger, 2002)

$$G^* = \frac{\tau(t)}{\gamma(t)} \quad (3)$$

เมื่อ G^* คือ สัดส่วนความเค้นต่อความเครียด มีหน่วยเป็น ปาสคาล (Pa)

$\tau(t)$ คือ ความเค้นที่เวลา t มีหน่วยเป็น ปาสคาล (Pa)

$\gamma(t)$ คือ ความเครียดที่เวลา t มีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์ หรือไม่มีหน่วย

5.2.4 ค่า storage modulus (G') คือ ค่าที่แสดงลักษณะความเป็นของแข็งที่สามารถยืดหยุ่น (elastic) ค่า loss modulus (G'') คือ ค่าที่แสดงลักษณะความเป็นของเหลวที่มีความข้นหนืด

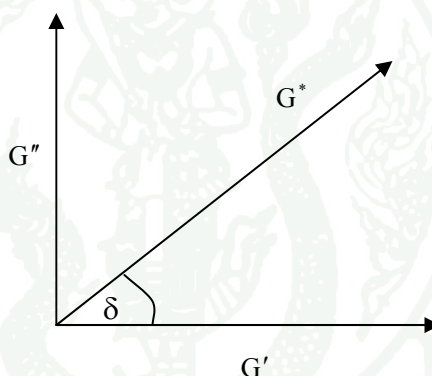
(viscous) โดยแสดงเวกเตอร์ไคอะแกรมให้เห็นดังภาพที่ 7 และสามารถคำนวณค่าดังกล่าวได้จากสมการที่ (4) (Mezger, 2002)

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (4)$$

เมื่อ G^* คือ ค่าสัมบูรณ์ของสัดส่วนความเค้นต่อความเครียด มีหน่วยเป็น ปาสคาล (Pa)

G' คือ ค่าที่แสดงลักษณะความเป็นของแข็งที่สามารถยืดหยุ่น (elastic) มีหน่วยเป็น ปาสคาล (Pa)

G'' คือ ค่าที่แสดงลักษณะความเป็นของเหลวที่มีความข้นหนืด (viscous) มีหน่วยเป็น ปาสคาล (Pa)



ภาพที่ 7 เวกเตอร์ไคอะแกรมของค่า G' , G'' และ G^*

ที่มา: Mezger (2002)

จากภาพที่ 7 เมื่อทราบค่ามุม δ แล้วจึงสามารถคำนวณค่า $\tan \delta$ ได้จากสมการที่ (5) ซึ่งค่า $\tan \delta$ คือ สัดส่วนของค่าที่แสดงลักษณะความเป็นของเหลวที่มีความข้นหนืดต่อลักษณะความเป็นของแข็งที่สามารถยืดหยุ่น ซึ่งไม่มีหน่วย (Mezger, 2002)

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (5)$$

6. การกักเก็บสารสำคัญ (encapsulation)

การกักเก็บสารสำคัญเป็นกระบวนการที่สาร 1 ชนิดหรือสารผสมถูกกักเก็บด้วยสารอีกชนิดหนึ่ง สารที่ถูกกักเก็บนั้นส่วนใหญ่แล้วจะเป็นของเหลว แต่สามารถเป็นอนุภาคของแข็งหรือแก๊สได้ สารที่ถูกกักเก็บนั้นจะมีชื่อเรียกที่หลากหลายได้แก่ core material, payload, actives, fill หรือ internal phase ส่วนสารที่เป็นตัวเคลือบหรือกักเก็บเรียกว่า wall material, carrier, membrane, shell หรือ coating material (Dziezak, 1988)

การกักเก็บเป็นวิธีการปกป้องสารสำคัญจากการย่อยสลายเนื่องจากแสงสว่าง ออกซิเจน หรือพีเอชจากสิ่งแวดล้อม หรือเพื่อไปขัดขวางให้เกิดการระเหยที่ช้าลง ซึ่งวิธีการกักเก็บสารสำคัญสามารถออกแบบให้ผลิตภัณฑ์มีการปลดปล่อยช้าๆ อย่างต่อเนื่องหรือปลดปล่อยในจุดที่แน่นอน การกักเก็บสารสำคัญถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เทคนิคการกักเก็บสารสำคัญประกอบด้วย liposome entrapment, inclusion complex และ coacervation ซึ่งถูกนำมาใช้ในการปกป้องสารสำคัญและได้มาซึ่งการควบคุมการปลดปล่อย (Sara and Gary, 1995)

6.1 liposome entrapment

ไลโปโซมเป็นระบบนำส่งยาและสารที่มีขนาดเล็กระดับนาโนจนถึงไมครอน เริ่มพบในอุตสาหกรรมยาและปัจจุบันได้มีการนำมาใช้กับอาหาร ซึ่งไลโปโซม (liposome) ประกอบด้วยเฟสของเหลว (aqueous phase) และเฟสลิพิด (lipid phase) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการกักเก็บด้วยวิธีนี้คือคุณสมบัติในการละลายของสารสำคัญ สารที่ละลายน้ำได้ไม่สามารถกักเก็บในส่วนผนัง bilayer ของฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ส่วนสารที่ละลายน้ำได้ก็สามารถกักเก็บไว้ในส่วนกลางของถุงไลโปโซมซึ่งมีลักษณะเป็นวัตถุน้ำ (Sara and Gary, 1995)

6.2 inclusion complexation

เป็นการกักเก็บที่ใช้ในระดับโมเลกุล มีการใช้เบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (β -cyclodextrin) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 7 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4 โดยมีไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) อยู่ตรงกลางและไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) อยู่ด้านนอก เมื่ออยู่ในสารละลายโมเลกุลที่มีความเป็นขั้วต่ำจะไปอยู่ในส่วนกลางของไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทรินสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (inclusion complex) กับยาที่ละลายน้ำได้น้อย ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีอัตราการละลายสูงขึ้นและยากี้อมีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น ดังนั้นการกักเก็บวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับสารสำคัญที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย และมีปัญหาด้านการละลาย (Sara and Gary, 1995)

6.3 coacervation (phase separation)

เป็นกระบวนการฟอร์มตัวเป็นของแข็งในของเหลว coacervation (phase separation) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนภายใต้การกวนอย่างต่อเนื่อง ขั้นตอนแรกคือการฟอร์ม (formation) ของเฟสที่แยกกัน 3 เฟส (coating material, core material และ liquid) ขั้นตอนที่สองคือ deposition ของพอลิเมอร์ที่เป็นของเหลวเคลือบรอบๆ core material และขั้นตอนสุดท้ายคือ solidification ของ coating material (Bakan, 1978) ตัวอย่างเช่น เจลาตินที่เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex coacervates) กับประจุลบของ พอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เจลแลนกัม (gellan gum) ซึ่งไฮโดรคอลลอยด์เหล่านี้สามารถกระจายตัวเข้ากันได้ที่มีเฟสมากกว่า 6 เนื่องจากไฮโดรคอลลอยด์มีประจุสุทธิเป็นลบ จึงเกิดการผลักรันของประจุที่เหมือนกัน แต่เมื่อพีเอชถูกปรับให้ต่ำกว่า pI ของเจลาติน (ประมาณ 5) ประจุสุทธิของเจลาตินจะกลายเป็นบวกทำให้เกิดอันตรกิริยากับประจุลบของเจลแลนกัม ซึ่งระบบนี้สามารถกักเก็บน้ำมันได้โดยการทำเป็นอิมัลชัน เมื่อพีเอชลดต่ำลงถึง 4.5 จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex coacervates) ระหว่างเจลาตินกับเจลแลนกัม และเคลือบรอบๆ หยดไขมัน จากนั้นจะมีการเชื่อมข้ามกับแอลดีไฮด์ (เช่น glutaraldehyde) เพื่อให้เกิดการกักเก็บอย่างสมบูรณ์ (Sara and Gary, 1995) ตัวอย่างที่นำมาใช้ในระบบอื่นๆ เช่น ประจุบวกของไคโตแซนเกิดอันตรกิริยากับประจุลบของไฮโดรคอลลอยด์ เช่น แอลจินेट, คาราจีแนน และเพกติน ซึ่งไฮโดรคอลลอยด์ทั้ง 3 ชนิดจะมีประจุลบภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (Rusu-Balaita *et al.*, 2003; Vasiliu *et al.*, 2005) ซึ่ง Knorr *et al.* (1990) ได้ทำการศึกษาเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและแอลจินेट และเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและคาราจีแนนที่เตรียมโดยวิธีการ coacervates เพื่อการกักเก็บสารให้กลิ่นรส (flavors) และสี (colors) โดยพบว่าเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและแอลจินेट และเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและคาราจีแนนจะมีความสามารถในการปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าการใช้แอลจินेट คาราจีแนน หรือไคโตแซนเพียงอย่างเดียว ซึ่งปัจจัยในการกักเก็บด้วยวิธีการนี้ได้แก่ พีเอชของสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ ชนิดของไฮโดรคอลลอยด์ เป็นต้น

7. วัสดุที่ใช้กักเก็บสารสำคัญ (encapsulated material)

วัสดุที่นิยมนำมาใช้กักเก็บสารสำคัญได้แก่ ลิพิด (lipid), น้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight sugars) และพอลิเมอร์ (ที่ได้จากการสังเคราะห์และจากธรรมชาติ) (Sara and Gary, 1995)

7.1 ลิปิด (lipid)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เช่น เลซิธิน (lecithins) สามารถฟอร์มเป็นไลโปโซม (liposome) ได้เอง โครงสร้างนี้จะก่อตัวเป็น lipid bilayer ที่ล้อมรอบส่วนที่เป็นสารละลาย (aqueous phase) โดยจะมีลักษณะเป็น tubule ซึ่งมีโครงสร้างเป็นท่อกลวงเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3-1 ไมโครเมตร และมีความยาวตั้งแต่ไม่กี่ไมครอน จนถึง 100 ไมโครเมตร ทำหน้าที่เป็นคาпилลารี (capillaries) ดูดของเหลวที่ใส่เข้าไป จึงได้มีการใช้ไลโปโซมในการกักเก็บยา และปัจจุบันได้นำมาใช้ในระบบอาหาร โดยสารสำคัญที่ถูกกักเก็บจะต้องละลายในเฟสไฮโดรฟิลิกของไลโปโซม (Sara and Gary, 1995)

7.2 น้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight sugars)

เป็นการใช้วิธีการกักเก็บ 2 วิธีคือ inclusion complexation ด้วยเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน และ co-crystallization กับซูโครส (sucrose) กระบวนการ co-crystallization จะปรับความเข้มข้นของซูโครสให้อิ่มตัว (sucrose syrup) จนถึงจุดอิ่มตัวแบบยิ่งยวด (supersaturation) ซึ่งการเติมวัตถุคิบัที่ใช้กักเก็บและการกวนนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิด nucleation และ agglomeration (Sara and Gary, 1995)

7.3 พอลิเมอร์

เป็นไฮโดรคอลลอยด์ที่ใช้สำหรับการกักเก็บสารสำคัญ ซึ่งใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ และพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ (Sara and Gary, 1995)

7.3.1 พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์

พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ที่ใช้ในการกักเก็บ ได้แก่ แลคไทด์/ไกลคอลได์ (lactide/glycolide), พอลิแอลคิล แอลฟา-ไซยาโนอะคริเลต (poly (alkyl α -cyanoacrylate)) และ พอลิอะคริลาไมด์พอลิเมอร์ (polyacrylamide polymers) พอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเตรียมเป็นไมโครสเฟียร์ (microsphere) สำหรับการนำไปใช้ในยา แต่พอลิเมอร์ประเภทนี้ยังไม่มีการนำไปใช้ในอาหาร (Sara and Gary, 1995)

7.3.2 พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ

พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติที่ใช้ในการกักเก็บ ได้แก่ อนุพันธ์ของสตาร์ช (starch derivatives), มอลโทเด็กซ์ทริน (maltodextrins), เซลลูโลส (cellulose), กัมอะราบิก (gum arabic), อะการ์ (agar), คาราจีแนน (carrageenans), แอลจิเนต (alginates), ไคโตแซน (chitosan), เพกติน ชนิด LM (low methoxyl pectin), เจลแลนกัม (gellan gum) และเจลาติน (gelatin) ซึ่งไฮโดรคอลลอยด์ที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุ ยกเว้นอนุพันธ์ของสตาร์ช, มอลโทเด็กซ์ทริน และเซลลูโลส (ยกเว้น carboxymethyl cellulose; CMC ซึ่งมีประจุเป็นลบ) พอลิเมอร์ที่มีประจุเหล่านี้เป็นตัวสำคัญในการนำมาใช้สำหรับ coacervation ซึ่งพอลิเมอร์เหล่านี้จะฟอร์มเจลภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและมีคุณสมบัติในการกักเก็บสารสำคัญไว้ได้ (Sara and Gary, 1995)

8. การควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญ (controlled release)

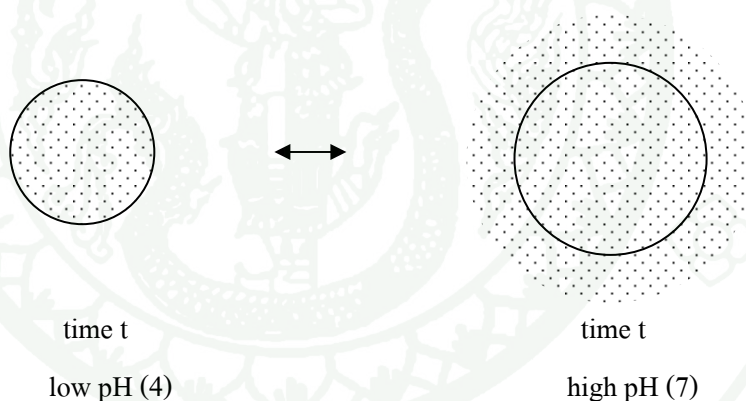
หลังจากการกักเก็บแล้วก็จะทำการควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญหรือวัตถุดิบอาหาร (food ingredients) ซึ่งถูกกักเก็บด้วยเหตุผลที่หลากหลาย เช่น เพื่อแยกหรือปกป้องสารจากสภาพแวดล้อม (เช่น น้ำ, กรด, ออกซิเจน และวัตถุดิบอาหารอื่นๆ) การรักษาความคงตัวของสารสำคัญในระหว่างกระบวนการแปรรูป เพื่อใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย (อาจจะปลดปล่อยภายหลังการแปรรูปหรือเก็บรักษา หรือระหว่างการเตรียมขั้นสุดท้ายก่อนการบริโภค) (Sara and Gary, 1995) นอกจากนี้ยังมีการควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญภายในระบบย่อยอาหารของร่างกายเพื่อนำส่งสารสำคัญไปยังอวัยวะเป้าหมายหรือส่วนที่จะมีการดูดซึมได้ กลไกของการควบคุมการปลดปล่อยมีดังนี้ คือ

8.1 pH sensitive release

กลไกการปลดปล่อยนี้ได้มีการนำไปใช้ในเครื่องสำอาง ที่ใช้ระบบการกักเก็บโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงพีเอชของผิวหนัง เมื่อพีเอชเปลี่ยนแคปซูลก็จะเกิดการ collapses ปลดปล่อยสารสำคัญในส่วน core material ออกมา ซึ่งทฤษฎีนี้ได้นำไปใช้ในระบบอาหารประเภทโปรตีนที่มีความไวต่อพีเอช ซึ่งความสามารถในการละลายของโปรตีนจะขึ้นกับพีเอช นอกจากนี้กลไกการปลดปล่อยนี้ได้นำไปใช้ในระบบการนำส่งวิตามินบี 2 (riboflavin) และอินซูลิน (insulin) ผ่านการเชื่อมต่อกันระหว่างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (poly(vinyl alcohol)) และไคโตแซน พบว่าจะมีการปลดปล่อยวิตามินบี 2 และอินซูลินเมื่อพีเอชเปลี่ยนไป ดังภาพที่ 8 จะเห็นว่าเมื่อพีเอชเปลี่ยนจาก 4 เป็น 7 พบว่าเมทริกซ์จะเกิดการพองตัวและปลดปล่อยสารสำคัญออกมา ดังนั้นพีเอชจึงมีอิทธิพลต่อ

ความสามารถในการซึมผ่านของวิตามินบี 2 และอินซูลินผ่านพอลิเมอร์ผสม (polymer blend) ระหว่างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (poly(vinyl alcohol)) และไคโตแซน (Donald , 2000)

สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินสามารถนำไปใช้ในระบบนำส่งยาหรือสารสำคัญได้ เนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนและเพกตินจะเกิดที่พีเอชต่ำ ดังนั้นตัวยาก็จะไม่มีการปลดปล่อยในกระเพาะอาหาร เมื่อพีเอชสูงขึ้นจะเกิดการพองตัว (swelling) และปลดปล่อยตัวย่อออกมา (George and Abraham, 2006) นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยของโปรตีนจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกติน พบว่าโปรตีนจะมีการปลดปล่อยออกมาเพียงเล็กน้อยในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 1.4 ซึ่งเป็นสภาวะในกระเพาะอาหาร และสามารถรักษาการปลดปล่อยของปริมาณโปรตีนส่วนใหญ่ไว้ได้ถึง 24 ชั่วโมงในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 7.4 ซึ่งเป็นส่วนของลำไส้เล็ก (Chang and Lin, 2000) และยังพบว่าอัตราการปลดปล่อยโปรตีนจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินน้อยกว่าไมโครแคปซูลระหว่างไคโตแซนและแอลจินเตออย่างมาก ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร (Okhamafe *et al.*, 1996)



ภาพที่ 8 กลไกการปลดปล่อยของเมทริกซ์ระหว่างพอลิไวนิลแอลกอฮอล์และไคโตแซน เมื่อเปลี่ยนพีเอช

ที่มา: Donald (2000)

8.2 diffusion controlled release

กลไกนี้จะจำกัดในการปลดปล่อยของสารสำคัญโดยการควบคุมการแพร่ของสารสำคัญภายในแคปซูลไปยังพื้นผิวของอนุภาค กระบวนการควบคุมการปลดปล่อยโดยการแพร่มีการใช้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งถูกควบคุมโดยความสามารถในการละลายขององค์ประกอบในเมทริกซ์และความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ขององค์ประกอบผ่านเมทริกซ์ซึ่งจะเห็น

ได้ชัดเมื่อสารสำคัญไม่ละลายในเมทริกซ์มันก็จะไม่สามารถแพร่ผ่านเมทริกซ์ออกมาได้โดยไม่คำนึงถึงขนาดของรูพรุน (Donald , 2000)

Wu *et al.* (2005) ศึกษาการใช้ไคโตแซนปิดในการนำส่งยา ที่มีชื่อว่า ammonium glycyrrhizinate ซึ่งใช้รักษาโรคที่เกี่ยวกับตับ เช่น ตับเป็นพิษ หรือใช้เป็นยาแก้ไอเสบ ไคโตแซนปิดเตรียมจากการเกิดเจลโดยพันธะไฮออนิกระหว่างไคโตแซนและไตรโพลีฟอสเฟต โดยพบว่าการปลดปล่อย ammonium glycyrrhizinate จากไคโตแซนปิด ใน phosphate-buffered saline (PBS) พีเอช 7.4 โดยจะมีการปลดปล่อยยาออกมาอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้น (10 ชั่วโมงแรก) หลังจากนั้นก็จะมีการปลดปล่อยยาออกมาอย่างช้าๆ ซึ่ง Zhou *et al.* (2001) ได้รายงานว่าการปลดปล่อยยาจากพอลิเมอร์เมทริกซ์ (polymer matrix) นั้นจะมี 2 กลไกที่แตกต่างกัน คือ การแพร่ของยาของโมเลกุลยา และการสลายตัวของพอลิเมอร์เมทริกซ์ เช่นเดียวกับเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่เกิดการพองตัวของเมทริกซ์เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นแล้วเกิดการปลดปล่อยโดยการแพร่ของโมเลกุลยาออกมา เมื่อเมทริกซ์ผ่านไปยังส่วนของลำไส้ใหญ่ก็จะเกิดการสลายตัวของเพกตินและไคโตแซนเนื่องจากพอลิแซ็กการไรด์ทั้งสองชนิดเป็นไฟเบอร์ที่ถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ (Bigucci *et al.*, 2008) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญโดยการแพร่ ได้แก่

8.2.1 ความสามารถของเมมเบรน (membrane) หรือ wall material ในการควบคุมการปลดปล่อยของสารให้กลิ่น (aroma) เช่น การปลดปล่อยของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) เมื่อน้ำมันสัมผัสกับอากาศ สิ่งที่เกิดขึ้นคือการสูญเสียขององค์ประกอบที่ระเหยได้อย่างรวดเร็วและน้ำมันก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้เมมเบรนที่เหมาะสมก็จะเกิดการแพร่ที่สามารถปลดปล่อยอย่างช้าๆ สม่ำเสมอตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Donald, 2000)

8.2.2 ความสามารถของเมมเบรนในการซึมผ่านของน้ำ ที่มีอิทธิพลมาจากโมเลกุลที่สามารถซึมผ่านน้ำได้ คุณสมบัติทางเคมีของเมมเบรน, ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาและอุณหภูมิในการเกิด glass transition โดยพบว่าเมทริกซ์ที่มีโครงสร้างอยู่ในสถานะ glass ส่วนของ amorphous จะไม่สามารถยอมให้เกิดการแพร่ ในขณะที่เมทริกซ์ในสถานะ rubbery จะยอมให้เกิดการแพร่ของตัวถูกละลายได้มากกว่า ซึ่งส่วน crystalline ในพอลิเมอร์ก็มีความสำคัญเช่นกันคือ จะทำหน้าที่เป็นตัวพาสารให้เกิดการแพร่ โดยส่วน amorphous จะช่วยส่งเสริมการแพร่ ดังนั้น glass /rubber transition ของเมทริกซ์จะเป็นสิ่งที่ควรพิจารณาเพื่อประเมินคุณสมบัติในการปลดปล่อย (Donald, 2000)

8.2.3 ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ระดับของการพองตัวและการเชื่อมข้ามก็จะมีผลต่อการแพร่ของสารสำคัญผ่านเมทริกซ์ โดยน้ำจะเพิ่ม free volume ภายในเมทริกซ์และช่องว่างของรูพรุนภายนอกเมทริกซ์จึงไปเพิ่มการดูดซับน้ำของเมทริกซ์ (Donald, 2000)



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

- 1.1 บัวบกสดส่วนใบ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.6 ซม.) และก้าน (ยาว 12 ซม.) ซื้อมาจากตลาด
อมรพันธุ์ จังหวัดกรุงเทพฯ
- 1.2 โกลโตแซน (Medium molecular weight) Mw เท่ากับ 723986 g/mol จากบริษัท Aldrich
chemical (St.Louis, MO)
- 1.3 เพกติน (GENU[®] pectin type LM-5 CS) DE เท่ากับ 7.5% จากบริษัท CP Kelco (Lille
Skensved, Denmark)

2. สารเคมี

- 2.1 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Analytical reagent, UNIVAR,
Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)
- 2.2 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl : Analytical reagent, UNIVAR, Ajax
Finechem Pty Ltd, Australia)
- 2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH : Analytical reagent, Merck,
Germany)
- 2.4 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride; CaCl_2 : Laboratory reagent, UNILAB, Asia
Pacific Specialty Chemicals Limited, Australia)
- 2.5 โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate; NaHCO_3 : Analytical reagent, UNIVAR,
Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)
- 2.6 กรดแอซิติค (Glacial acetic acid; CH_3COOH : Analytical grade, J.T.Baker, Thailand)
- 2.7 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; H_2SO_4 : Analytical reagent, Mallinckrodt Chemicals,
Thailand)
- 2.8 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric; HCl : Analytical grade, Merck, Germany)
- 2.9 สารแอนโทรน (Anthrone reagent: Sigma-Aldrich, Germany)
- 2.10 เอทานอล (Ethanol absolute; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: Analytical grade, Scharlau, Barcelona, Spain)
- 2.11 คลอโรฟอร์ม (Chloroform; CHCl_3 : HPLC grade, Lab Scan, Ireland)
- 2.12 เมทานอล (Methanol; CH_3OH : HPLC grade, Mallinckrodt Chemicals, USA)

- 2.13 กรดเอเชียติก (Asiatic acid; $C_{30}H_{48}O_5$; HPLC grade, Extrasynthese, France)
- 2.14 กรดมาเดคาสติก (Madecassic acid mixture of 2 isomers: one of type olean-12-ene and one of type urs-12-ene; $C_{30}H_{48}O_6$; HPLC grade, Extrasynthese, France)
- 2.15 เอเชียติโคไซด์ (Asiaticoside; $C_{48}H_{78}O_{20}$; HPLC grade, Extrasynthese, France)
- 2.16 มาเดคาสไซด์ (Madecassoside; $C_{48}H_{78}O_{20}$; HPLC grade, Extrasynthese, France)
- 2.17 โรดามีน บี (Rhodamine B; $C_{34}H_{34}ClN_2O_7$; Analytical grade, lot. R648MP, Invitrogen, USA)
- 2.18 ฟลูออเรสซีนามีน (Fluoresceinamine; FA; $C_{20}H_{13}NO_5$; Fluorescence grade, Fluka, Switzerland)

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1 กระจกกรอง (Glass microfibre filters: GF/D grade, $\varnothing$ 90 mm, Whatman, England)
- 3.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (model SPB31, Scale Tech, Germany)
- 3.3 เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter: model 2-Star, Thermo Orion, USA)
- 3.4 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (9-Position Hot Plate/ Stirrer, model 51450, Cole Parmer Instrument Co., Chicago, IL)
- 3.5 อ่างให้ความร้อนและกวนสารละลายด้วยแม่เหล็ก (Pair stirrer PS-100, EYELA, Rikakikai Co. LTD., Tokyo, Japan)
- 3.6 ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump: VCP 8101, Harmony, Taiwan)
- 3.7 เครื่องรีโอมิเตอร์ (Rheometer: Physica MCR 301, Anton Paar, Germany)
- 3.8 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer: Dura-TopTM MP, FTS SYSTEMS, USA)
- 3.9 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer: Heto model FD2.5, Heto Lab Equipment Manufacturers, Denmark)
- 3.10 เครื่องบด (Blender: VA-M11L, Hitachi, Tokyo, Japan)
- 3.11 เครื่องปั่นละเอียด (Homogenizer: ULTRA-TURRAX[®] T 25 basic, IKA[®]-WERKE, Germany) พร้อมหัวปั่น
- 3.12 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยระบบคลื่นเสียง (Ultra Sonicator: RK 52, BANDELIN SONOREX, Germany)
- 3.13 เครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate centrifuge: Sorvall RC 5C Plus Superspeed Centrifuge, Sorvall, USA)

3.14 เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สูญญากาศ (Evaporator: BUCHI Rotavapor R-114, BUCHI, Switzerland)

3.15 ตู้แช่แข็ง (Freezer: SF-C1497 (GYN), Sanyo, Thailand)

3.16 อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking Water Bath: SV1422, Memmert, Germany)

3.17 เครื่องวัดสี (Minolta Spectrophotometer: model CM-3500d, Minolta CO. LTD, Japan)

3.18 เครื่องวัดค่าประจุไฟฟ้าบนผิวอนุภาค (Zetasizer: Zen 3600, Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, UK)

3.19 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: model JSM-5600LV, JEOL, Japan)

3.20 กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลเลเซอร์สแกนนิ่ง (Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM): LSM 700, Carl Zeiss MicroImaging, Germany)

3.21 อุปกรณ์สำหรับแยกสารสกัดด้วยเทคนิค High Performance Thin-layer Chromatography ประกอบด้วย แผ่นแก้วโครมาโทกราฟีชนิดผิวเคลือบ (HPTLC Glass Plate: Camag, Germany) เครื่องหยดสาร (Linomat IV, Camag, Germany) เครื่องสเปรย์ (Camag, Germany) เครื่องให้ความร้อน (TLC Plate Heater III, Camag, Germany) เครื่องสแกน (Densitometer: TLC Scanner 3, Camag, Germany) พร้อมโปรแกรมสำเร็จรูป (CATS)

3.22 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

วิธีการ

1. การเตรียมวัตถุดิบ

1.1 การเตรียมสารละลายเพกติน

เตรียมสารละลายเพกตินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร โดยชั่งเพกติน แล้วนำมาละลายในแอซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 3 และ 5 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาละลายต่อโดยกวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา ประมาณ 16 ชั่วโมง

1.2 การเตรียมสารละลายไคโตแซน

เตรียมสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร โดยชั่งไคโตแซน แล้วนำมาละลายในแอซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 3 และ 5 กวนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่ อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

1.3 เตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอช ต่างๆ

ผสมสารละลายทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในหลอดให้มีปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร โดยกำหนดความเข้มข้นของไคโตแซนเป็น 0.1, 0.125, 0.15, 0.175 เปอร์เซ็นต์น้ำหนัก-โดยปริมาตรและความเข้มข้นของเพกตินเป็น 0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225, 0.25, 0.275, 0.3, 0.325, 0.35 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร โดยเตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร และสารละลายเพกตินความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนัก โดยปริมาตรในแอซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 3 และ 5 ทำการผสมเจลที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ดังตารางที่ 1 ผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันโดยผสมสารละลายไคโตแซนแล้วตามด้วย สารละลายเพกติน ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนเป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ แล้วรายงานผลในหน่วย กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของเพกตินและไคโตแซนที่ผสมกันที่พีเอช 3 และ 5 เตรียมโดยวิธีการเขย่า

ความเข้มข้นของเพกติน (%w/v)	ความเข้มข้นของไคโตแซน (%w/v)
0.1	0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225, 0.25, 0.275, 0.3, 0.325, 0.35
0.125	0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225, 0.25, 0.275, 0.3, 0.325, 0.35
0.15	0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225, 0.25, 0.275, 0.3, 0.325, 0.35
0.175	0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225, 0.25, 0.275, 0.3, 0.325, 0.35

1.4 เตรียมสารสกัดบวบก

เตรียมสารสกัดบวบกตามวิธีของนฤมล (2551) โดยนำบวบกส่วนใบและก้าน (ภาพที่ 9) ที่ผ่านการล้างแบบเยือกแข็งบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จากนั้นนำตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ลงในตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นละเอียด (homogenizer) เป็นเวลา 2 นาที แล้วผสมตัวอย่างให้เข้ากันโดยเครื่องสั่นสะเทือนด้วยระบบคลื่นเสียง (ultra sonicator) ที่ความถี่ 35 กิโลเฮิร์ตเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสกัดตัวอย่างบวบก 2 รอบ เก็บส่วนใสไว้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์



ภาพที่ 9 บวบกส่วนใบและก้าน

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน (2552)

1.5 เตรียมบัวบกผง

นำสารสกัดบัวบกจากข้อ 1.4 มาทำการระเหยเอทานอลที่ความดัน 175 มิลลิบาร์ ด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ แล้วมาทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) จากนั้นนำมาบดให้เป็นผง เก็บไว้ในโถสุญญากาศขึ้นจนกว่าจะทำการวิเคราะห์

2. การวิเคราะห์ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้, สมบัติทางวิทยากระแสนของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินและ ค่า zeta potential ของส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์

เตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน แล้วนำไปวัดค่า storage modulus (G') และ loss modulus (G'') ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

2.1 ผลของปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอชของสารละลายต่อลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

2.1.1 การเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอชต่างๆ

จากขั้นตอนการเตรียมเมทริกซ์ในข้อ 1.3 เป็นการเตรียมโดยวิธีการเขย่าที่มีปริมาตรของสารละลายผสมรวม 10 มิลลิลิตร โดยเลือกปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่ให้ปริมาณเมทริกซ์สูงสุดไปศึกษาต่อไป แล้วจึงทำการเปลี่ยนแปลงวิธีการเตรียมเมทริกซ์เพื่อต้องการเตรียมเมทริกซ์ในปริมาตรเพิ่มขึ้นและสามารถนำเมทริกซ์ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยเตรียมเมทริกซ์ให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ คือ เตรียมสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร และสารละลายเพกตินความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตรในแอซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 3 และ 5 ทำการผสมที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ (ตารางที่ 2) ให้มีปริมาตรของสารละลายผสมรวม 100 มิลลิลิตร โดยผสมสารละลายไคโตแซนแล้วตามด้วยสารละลายเพกตินที่มีปริมาณในการผสมดังแสดงในภาคผนวก ก1 ผสมโดยการกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงกรองด้วยปั๊มสูญญากาศที่ความดัน 70 มิลลิบาร์ เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำเมทริกซ์ที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณเมทริกซ์ที่ได้และวัดค่า G' และ G'' แล้วนำส่วนสารละลายใสไปวัดค่า zeta potential

ตารางที่ 2 ปริมาณไคโตแซน-เพกตินที่พีเอช 3 และ 5 ที่เตรียมโดยวิธีการกวนผสม

พีเอชของสารละลาย	ปริมาณไคโตแซน-เพกติน (%w/v)
3	0.25-0.1
	0.25-0.125
	0.25-0.15
	0.25-0.175
5	0.25-0.1
	0.25-0.125
	0.25-0.15
	0.25-0.175

2.1.2 การหา linear viscoelastic range (LVE range) โดยการทำการ amplitude sweep test

ใช้ตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 3 กรัม วางบนแท่นวางตัวอย่าง แล้วทำการวัดค่า G' เพื่อหา ช่วง linear viscoelastic range ซึ่งมีการตั้งค่าต่างๆดังแสดงในภาคผนวก ข1.2.1 โดยวัดค่าซ้ำ 2 ครั้ง (duplication) และ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง (replication) จากนั้นวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ strain โดยใช้โปรแกรม rheoplus

2.1.3 การตรวจสอบความแข็งแรงของโครงข่าย โดยการทำการ frequency sweep test

ใช้ตัวอย่างประมาณ 3 กรัม วางบนแท่นวางตัวอย่าง โดยใช้หัววัดชนิด parallel plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ใช้เปอร์เซ็นต์ strain ในช่วง linear viscoelastic range ที่ได้จากข้อ 2.1.2 ในการทำการ frequency sweep test เพื่อวัดค่า storage modulus (G') และ loss modulus (G'') ซึ่งมีการตั้งค่าต่างๆดังแสดงในภาคผนวก ข1.2.2 โดยวัดค่าซ้ำ 2 ครั้ง (duplication) และทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง (replication)

2.1.4 การวิเคราะห์ค่า zeta potential ของสารละลายไคโตแซน

เตรียมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร และสารละลายเพกตินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.125, 0.15 และ 0.175 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร และนำส่วนใส่ที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินจากข้อ 2.1.1 ในสภาวะพีเอชและปริมาณไคโตแซน-เพกติน ดังตารางที่ 2 แล้ววิเคราะห์ค่า zeta potential ด้วยเครื่อง zetasisizer โดยมีการกำหนดค่า refractive index (RI) ของตัวอย่างดังนี้ RI ของไคโตแซน= 1.580 (Schauer *et al.*, 2003) RI ของเพกติน= 1.504 (Benitez *et al.*, 2007) และ RI ของสารประกอบ-

เชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกติน = 1.403 (Marudova *et al.*, 2005) จากนั้นนำตัวอย่างที่อยู่ในรูปสารละลายปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ชนิด DTS1060C-Clear disposable zeta cell โดยไม่ให้มีฟองอากาศภายในเซลล์ ปิดจุกของเซลล์ทั้งสองด้าน แล้วนำเซลล์ใส่ในเครื่อง zetasizer เครื่องก็จะแสดงผลออกมาเป็นค่า zeta potential

2.2 ผลของเกลือต่อลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

2.2.1 การเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมเกลือต่างชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

เลือกปริมาณไคโตแซน-เพกตินจากข้อ 2.1.1 ที่ให้ค่าความแข็งแรงของโครงข่ายสูงสุด แล้วนำมาศึกษาผลของเกลือ โดยชนิดของเกลือที่เลือกใช้งานวิจัย คือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) โดยมีขั้นตอนในการผสม ดังนี้ คือ เตรียม stock solution ของสารละลายเกลือเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นจึงนำมาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นเป็น 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ แล้วเติมสารละลายไคโตแซนและเพกติน ตามลำดับ ให้มีปริมาตรของสารละลายผสมรวม 100 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรของสารละลายแต่ละชนิดที่ใช้ในการผสมดังแสดงในภาคผนวก ก2 ผสมโดยการกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 16 ชม. จากนั้นจึงกรองแล้วนำเมทริกซ์ที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ วัดค่า G' และ G'' และนำส่วนสารละลายไปวัดค่า zeta potential

2.2.2 การตรวจสอบความแข็งแรงของโครงข่าย โดยการทำให้ frequency sweep test

การทำ frequency sweep test เป็นการวัดค่า storage modulus (G') และ loss modulus (G'') ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมเกลือจากข้อ 2.2.1 ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์และตั้งค่าต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก ข1.2.2

2.2.3 การวิเคราะห์ค่า zeta potential ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

นำส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมเกลือจากข้อ 2.2.1 แล้ววิเคราะห์ค่า zeta potential ด้วยเครื่อง zetasizer โดยมีการกำหนดค่า refractive index (RI) ของตัวอย่างเท่ากับ 1.403 โดยมีวิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

3. ศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บสารไทรเทอร์ปีนจากบัวบกโดยใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

3.1 การเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสกัดบัวบก

เตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บ (encapsulation) สารสกัดจากบัวบก โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ เติมสารสกัดบัวบกที่เตรียมจากข้อ 1.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายไคโตแซนและเพกติน ตามลำดับ ให้มีปริมาตรของสารละลายผสมรวม 100 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรของสารละลายแต่ละชนิดที่ใช้ในการผสมดังแสดงในภาคผนวก ก 3 และเมทริกซ์ถูกเตรียมที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอชต่างๆ ดังตารางที่ 2 ผสมโดยการกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงกรองแล้วนำเมทริกซ์ไปชั่งน้ำหนักและวัดปริมาตรของสารละลายที่กรองได้ แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปตรวจวัดปริมาณสารไทรเทอร์ปีนอิสระด้วยเทคนิค HPTLC ดังภาคผนวก ก1

นอกจากนี้ยังศึกษาผลของเกลือต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บ โดยเลือกปริมาณไคโตแซน-เพกตินจากข้อ 2.1.1 ที่ให้ค่าความแข็งแรงของโครงข่ายสูงสุด แล้วนำมาศึกษาผลของเกลือ โดยมีการเตรียมเกลือที่ความเข้มข้นตามข้อ 2.2.1 โดยการเติมสารละลายไคโตแซนที่มีสารละลายเกลือความเข้มข้นต่างๆ ลงในสารสกัดบัวบก (20 มิลลิลิตร) ที่เตรียมจากข้อ 1.4 ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายเพกติน ให้มีปริมาตรของสารละลายผสมรวม 100 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรของสารละลายแต่ละชนิดที่ใช้ในการผสมดังแสดงในภาคผนวก ก4 ผสมโดยการกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 16 ชม. จากนั้นจึงกรองแล้วนำเมทริกซ์ไปชั่งน้ำหนักและวัดปริมาตรของสารละลายที่กรองได้ แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปตรวจวัดปริมาณสารไทรเทอร์ปีนอิสระด้วยเทคนิค HPTLC ดังภาคผนวก ก1

3.2 การวิเคราะห์ค่าสีของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

วัดค่าสีในระบบ CIE (ค่า L^* , a^* และ b^*) ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก และเมทริกซ์ที่มีการเติมเกลือจากข้อ 3.1 โดยใช้วิธีการวัดสีของวัสดุแข็งแบบทึบแสง (opaque) โดยการนำตัวอย่างเมทริกซ์ที่กรองได้วางใน petri dish แล้ววางฟิวบริวเวอร์ที่จะวัดให้แนบกับช่องรับแสง เครื่องวัดสีจะปล่อยแสงออกมากระทบผิวชั้นทดสอบ และแสดงค่าสีที่วัดได้เป็นตัวเลข ของค่า L^* , a^* และ b^* โดยวัดค่าซ้ำ 3 ครั้ง (duplication) และทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง (replication)

3.3 ตรวจสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก

ตรวจวัดปริมาณสารไตรเทอร์ปีนชนิดหลัก 4 ชนิด ได้แก่ เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) กรดเอเชียติก (asiatic acid) มาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) และกรดมาเดคาสสิก (madecassic acid) โดยเทคนิค high performance thin layer chromatography (HPTLC) ตามวิธีของ นฤมล (2551) โดยเตรียมแผ่นแก้วโครมาโทกราฟีชนิดผิวเคลือบในการแยกสารไตรเทอร์ปีนด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ (15:7:1 v/v/v) หยดสารมาตรฐานผสม (เอเชียติโคไซด์ กรดเอเชียติก มาเดคาสโซไซด์ และกรดมาเดคาสสิก) และตัวอย่างสารสกัดบัวบก ทั้งให้แห้ง แล้วนำแผ่น HPTLC ใส่ในแท่งแก้วที่มีตัวทำละลายเคลื่อนที่ เมื่อสารที่หยดเคลื่อนที่ถึงจุดที่กำหนด นำแผ่น HPTLC ทั้งให้แห้ง แล้วนำไปสเปรย์ด้วยสารแอนโทรน 0.2 เปอร์เซ็นต์ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ผลด้วยการสแกนความหนาแน่นของสารที่แยกได้ (density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมวลผลที่ได้โดยโปรแกรมสำเร็จรูป CATS โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังภาคผนวก ค1 จากนั้นคำนวณประสิทธิภาพการกักเก็บ (encapsulation efficiency; EE) สารไตรเทอร์ปีนจากสมการที่ (6) ที่ดัดแปลงมาจาก Yu *et al.* (2009)

$$EE = \left(\frac{\text{ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมด} - \text{ปริมาณไตรเทอร์ปีนอิสระ}}{\text{ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมด}} \right) \times 100 \quad (6)$$

3.4 ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

3.4.1 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่เตรียมจากข้อ 2.1.1 และ 3.1 มาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) จากนั้นนำไปตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

3.4.2 ตรวจสอบด้วย confocal laser scanning microscopy (CLSM)

นำเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ได้จากการกรอง (ข้อ 3.1) มาทำการย้อมสีด้วยโรดามีน บี (rhodamine B) ซึ่งย้อมติดหมู่เอมีโนของไคโตแซน โดยมี excitation ที่ 568 นาโนเมตร และ emission ที่ 580-670 นาโนเมตร และฟลูออเรสซินามีน (fluoresceinamine) ซึ่งย้อม

ติดหมู่คาร์บอกซิลของเพกติน โดยมี excitation 488 นาโนเมตร และ emission ที่ 500-520 นาโนเมตร (Savary *et al.*, 2008) จากนั้นนำไปตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินด้วย confocal laser scanning microscopy (CLSM)

4. ศึกษาการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนโดยใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

นำเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสกัดบัวบกที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมด 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร โดยเตรียมจากบัวบกผง (วิธีการข้อ 1.5) แล้วละลายด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเมทริกซ์ที่กรองได้มาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) จากนั้นนำไปศึกษาการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีน ซึ่งใช้วิธีดัดแปลงจาก Beysseriat *et al.* (2006) โดยการจำลองสภาวะพีเอชในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก (ตอนต้น กลาง และปลาย) และลำไส้ใหญ่ โดยทำการชั่งตัวอย่างมา 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ พีเอช 1.2 (เพื่อให้ได้พีเอชของระบบเป็น 2) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วย shaking water bath ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที แล้วเปิดส่วนใสเก็บไว้ จากนั้นเปิดสารละลายบัฟเฟอร์ออกจนหมดแล้วเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 10.85, 10.85, 9 และ 9 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชของระบบเป็น 5, 6, 7 และ 9 ตามลำดับ เขย่าด้วย shaking water bath ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 และ 120 นาที (ที่พีเอชของระบบ 5, 6 และ 7) และทิ้งไว้ข้ามคืน (16 ชั่วโมง) สำหรับพีเอช 9 เพื่อดูปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมดที่มีอยู่ในเมทริกซ์ แล้วนำส่วนใสที่เก็บไว้มาวิเคราะห์ปริมาณการปลดปล่อยด้วยเทคนิค HPTLC

5. การวิเคราะห์ผล

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) ถ้าพบนัยสำคัญทางสถิติจะคำนวณค่า Duncan's multiple range test (DMRT) เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (statistical package for the social science; version 12.0)

6. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

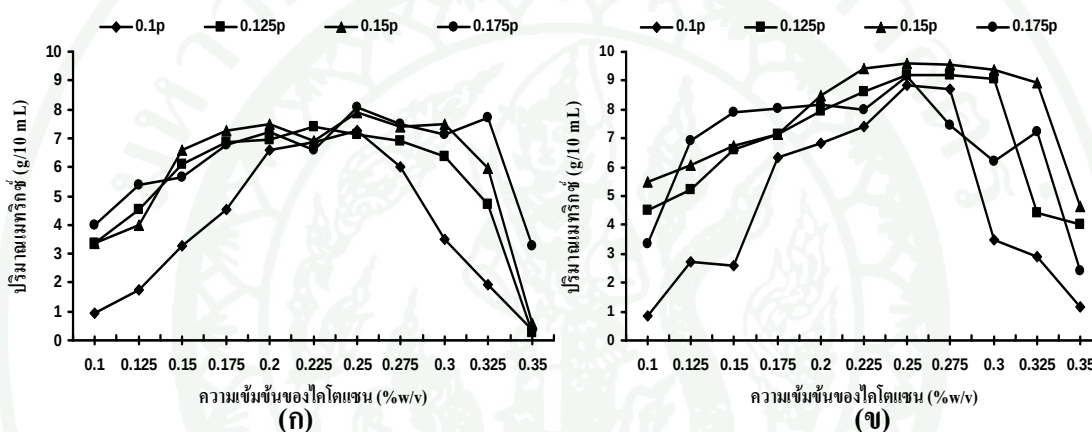
7. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2550 สิ้นสุดเดือน พฤษภาคม 2552

ผลและวิจารณ์

1. ลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

ในการทดลองเบื้องต้นเพื่อศึกษาการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินโดยทดลองที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ดังตารางผนวกที่ ค1 ที่พีเอช 3 และ 5 จากนั้นทำการผสมด้วยวิธีการเขย่าในหลอด 30 ครั้ง วางทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วชั่งน้ำหนักเจลเพื่อหาปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ ดังตารางผนวกที่ ค1 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการเลือกช่วงของปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอชที่ให้ปริมาณเมทริกซ์สูงสุด แล้วจึงนำไปศึกษาสมบัติต่างๆ ของเมทริกซ์ต่อไป

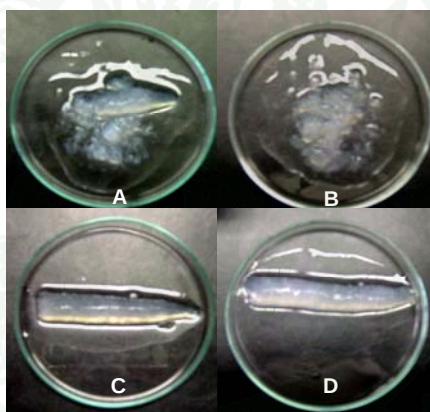


ภาพที่ 10 ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้หลังกรองเมทริกซ์ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอช 3 (ก) และ 5 (ข) เตรียมโดยวิธีการเขย่า

จากภาพที่ 10 เป็นการแสดงปริมาณเมทริกซ์ที่ได้เมื่อความเข้มข้นของไคโตแซนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.1-0.35 %w/v และที่ความเข้มข้นของเพกตินต่างๆ คือ 0.1, 0.125, 0.15 และ 0.175 %w/v พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไคโตแซนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.1-0.25 %w/v ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นและเริ่มลดลงเมื่อความเข้มข้นของไคโตแซนสูงถึง 0.275 %w/v ดังนั้นปริมาณเมทริกซ์ที่ได้จึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิด และจะเห็นได้ว่าปริมาณเมทริกซ์สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของไคโตแซนเป็น 0.25 %w/v ตลอดช่วงความเข้มข้นของเพกตินที่ศึกษา (0.1-0.175 %w/v) ทั้งในพีเอช 3 และ 5 จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของพีเอช ปริมาณไคโตแซน-เพกตินและความแรงไอออน (ionic strength) ต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพอลิอิเล็กโตรไลต์สองชนิดที่มีประจุตรงข้ามกัน คือ ไคโตแซนและเพกติน (Kubota and Kikuchi, 1998; Kubota and Shimoda, 2005) ซึ่งเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินมักเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในสถานะที่เป็นกรด เนื่องจากพอลิเมอร์ทั้งสองจะเกิดประจุในช่วงพีเอชประมาณ 3-6 (Nordby *et al.*, 2003) ดังนั้น

ในงานวิจัยจึงทำการศึกษาผลของพีเอชต่อการเกิดเมทริกซ์โดยศึกษาที่พีเอช 3 และ 5 ซึ่งหากใช้พีเอชที่เข้าใกล้ pKa ของไคโตแซน (~6.5) จะมีผลทำให้ไคโตแซนแตกตัวให้ประจุบวกได้น้อย (Tan *et al.*, 1996; Kubota and Shimoda, 2005) นอกจากนี้ในช่วงพีเอช 2-5 หมู่เอมีนของไคโตแซนส่วนใหญ่จะมีการให้โปรตอน (protonated) (Bigucci *et al.*, 2008)

จากการทดลองพบว่าปริมาณไคโตแซน-เพกตินมีผลต่อลักษณะและปริมาณเมทริกซ์ที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 11 A-B) โดยพบว่าปริมาณไคโตแซน-เพกตินที่ให้ปริมาณเมทริกซ์สูง คือ ไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 % w/v ทั้งในพีเอช 3 และ 5 ซึ่งลักษณะเมทริกซ์ที่ได้จะมีลักษณะเป็นเจลที่มีความคงตัว (ภาพที่ 11 C-D) และเมทริกซ์ที่ได้มีลักษณะใส มองเห็นเส้นใยสีขาวขุ่น หลังจากนั้นจึงเลือกอัตราส่วนที่มีปริมาณเมทริกซ์สูงสุดไปทำการศึกษาผลของพีเอช ปริมาณไคโตแซน-เพกติน และผลของเกลือต่อลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน



ภาพที่ 11 ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอชต่างๆ ที่ผสมโดยวิธีการเขย่า

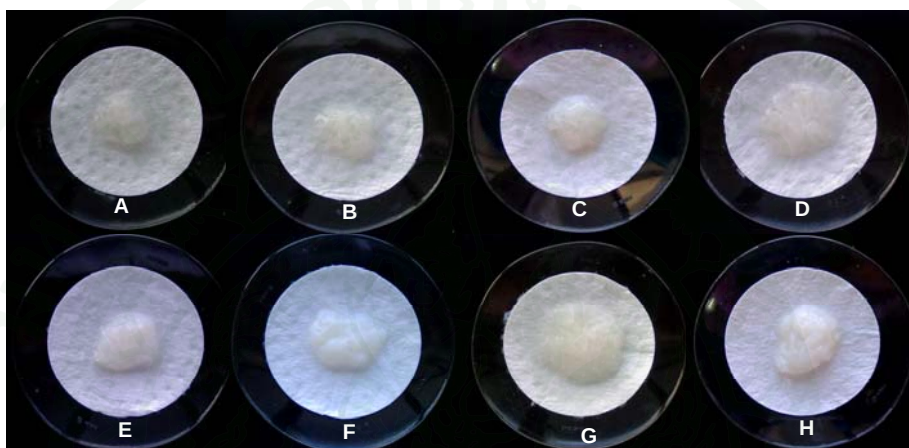
หมายเหตุ - A และ B คือ ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.3-0.1 %w/v ที่พีเอช 3 และ 5 ตามลำดับ
- C และ D คือ ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1 %w/v ที่พีเอช 3 และ 5 ตามลำดับ

2. ผลของปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอชต่อลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

ในการทดลองนี้ทำการปรับวิธีการเตรียมเมทริกซ์เป็นวิธีการกวนผสมดังข้อ 2.1.1 เตรียมโดยการควบคุมความเข้มข้นของไคโตแซนให้คงที่ 0.25 %w/v และปรับความเข้มข้นของเพกตินที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.125, 0.15, 0.175 และ 0.2 %w/v ตามลำดับ ที่พีเอชของสารละลาย

เท่ากับ 3 และ 5 ผสมโดยการกวนอย่างต่อเนื่อง จากนั้นนำเมทริกซ์ที่ผ่านการกรองมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณเมทริกซ์ที่ได้และศึกษาสมบัติทางวิทยากระแสโดยวัดค่าความเป็นของแข็ง (G') และค่าความเป็นของเหลว (G'') ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์

จากการทดลองพบว่าเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่เตรียมทั้งในพีเอช 3 และ 5 มีลักษณะที่คล้ายกันคือมีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (inhomogeneous) และมองเห็นโครงสร้างของเมทริกซ์ที่มีเส้นใยสีขาวจับกันเป็นก้อนและมีรูปร่างไม่แน่นอน ดังภาพที่ 12 A-H



ภาพที่ 12 ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอช 3 และ 5 เตรียมโดยวิธีการกวนผสม

หมายเหตุ - A, B, C และ D คือ ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v ตามลำดับ ที่พีเอช 3
- E, F, G และ H คือ ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v ตามลำดับ ที่พีเอช 5

เมื่อนำเมทริกซ์ที่ได้มาชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ ดังตารางที่ 3 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพกตินตั้งแต่ 0.1-0.175 %w/v โดยให้ความเข้มข้นของไคโตแซนคงที่ (0.25 %w/v) ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ก็จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพกตินจึงมีปริมาณของโมเลกุลที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับไคโตแซนได้มาก จึงสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้มากขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของเพกตินเพิ่มขึ้นเป็น 0.2 %w/v พบว่าปริมาณเมทริกซ์ที่ได้เริ่มคงที่ ($p > 0.05$) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของเพกตินและไคโตแซนมีผลต่อการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน (Bigucci *et al.*, 2008) นอกจากนี้การที่มีปริมาณเมทริกซ์น้อยเมื่อความเข้มข้นของเพกตินต่ำนั้นเนื่องมาจากปริมาณของไคโตแซน-เพกตินมีน้อย การเกิด

อันตรกิริยาระหว่างพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิดจึงเกิดขึ้น ได้น้อยลงเมื่อลดปริมาณของเพกติน (Naidu *et al.*, 2009)

ตารางที่ 3 ปริมาณเมทริกซ์หลังจากการเตรียมที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอช 3 และ 5 เตรียมโดยวิธีการกวนผสม

pH	ปริมาณไคโตแซน-เพกติน (%w/v)	ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ (g/100 mL)
3	0.25-0.1	1.84 ± 0.02^a
	0.25-0.125	2.74 ± 0.37^b
	0.25-0.15	3.19 ± 0.03^b
	0.25-0.175	4.03 ± 0.04^c
	0.25-0.2	4.02 ± 0.06^c
5	0.25-0.1	4.92 ± 0.38^d
	0.25-0.125	6.38 ± 0.55^e
	0.25-0.15	7.92 ± 0.53^f
	0.25-0.175	8.96 ± 0.28^g
	0.25-0.2	8.95 ± 0.06^g

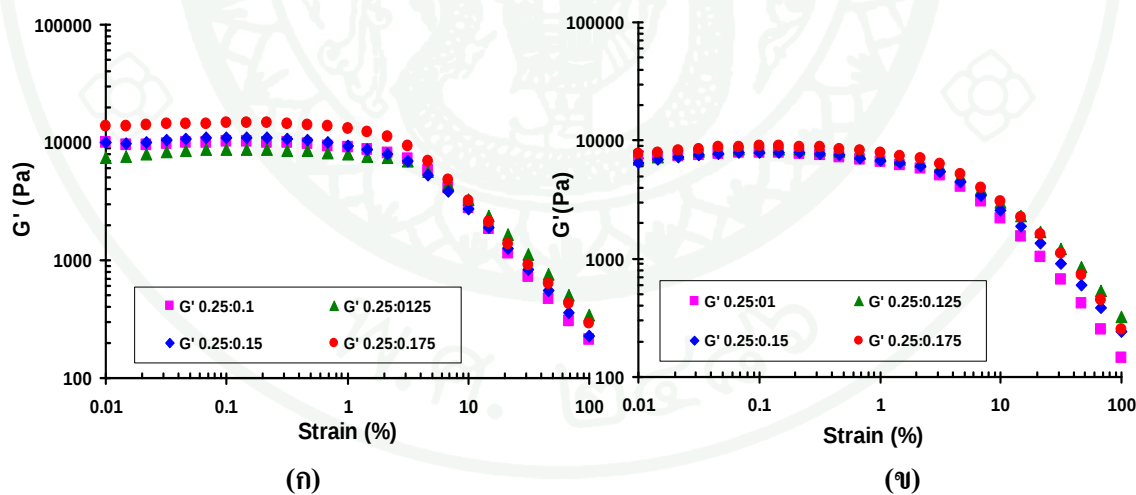
หมายเหตุ - อักษร a-g หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณเมทริกซ์ระหว่างการเตรียมที่พีเอช 3 และ 5 พบว่าพีเอชมีอิทธิพลต่อการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน คือ เมทริกซ์ที่มีการเตรียมในสภาวะพีเอช 5 จะให้ปริมาณเมทริกซ์สูงกว่าพีเอช 3 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าพีเอชและปริมาณไคโตแซน-เพกตินมีอิทธิพลต่อการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน (Kubota and Kikuchi, 1998) จึงคาดว่าปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกระหว่างไคโตแซนและเพกติน จึงได้ทำการวัดค่าความแข็งแรงของเมทริกซ์และค่า zeta potential ของส่วนใสที่ได้จากการกรองเพื่อตรวจสอบการเกิดอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกระหว่างไคโตแซนและเพกติน จากการศึกษาปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ที่เตรียมทั้งในพีเอช 3 และ 5 พบว่า ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 และ 0.25-0.2 %w/v มีปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกช่วงของปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.1 การวิเคราะห์ linear viscoelastic range (LVE) ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

จากภาพที่ 11 จะเห็นได้ว่าเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินมีลักษณะเป็นเจลนัม และเห็นเป็นเส้นใยจับกันเป็นก้อน จากนั้นจึงนำเมทริกซ์มาตรวจสอบพฤติกรรมวิสโคอีลาสติกของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน (ธงชัย, 2549; Dumitriu, 1998) ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์โดยเลือกใช้หัววัดชนิด parallel plate จากนั้นวัดค่าที่ตอบสนองของเมทริกซ์ต่อการให้แรงเฉือนแบบสั่น (oscillatory stress) (ค่า G' และ G'') (ธงชัย, 2549; Dumitriu, 1998)

ในการศึกษาสมบัติทางวิทยากระแสของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินนั้น จะทำการทดสอบ amplitude sweep ก่อน เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ strain ที่อยู่ในช่วง linear viscoelastic range (LVE) (Mezger, 2002; Pai *et al.*, 2002) โดยทำการศึกษาในช่วงเปอร์เซ็นต์ strain ตั้งแต่ 0.01-100 เปอร์เซ็นต์ และเมทริกซ์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ คือ เมทริกซ์ที่มีปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v ที่พีเอช 3 และ 5 ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบ amplitude sweep พบว่าเปอร์เซ็นต์ strain เท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมที่ทำให้ทุกตัวอย่างยังคงอยู่ในช่วง LVE ดังภาพที่ 13ก-ข โดยค่าที่ได้วิเคราะห์จากโปรแกรม rheoplus เมื่อได้ค่าเปอร์เซ็นต์ strain แล้วจึงนำค่าดังกล่าวไปใช้ทดสอบ frequency sweep

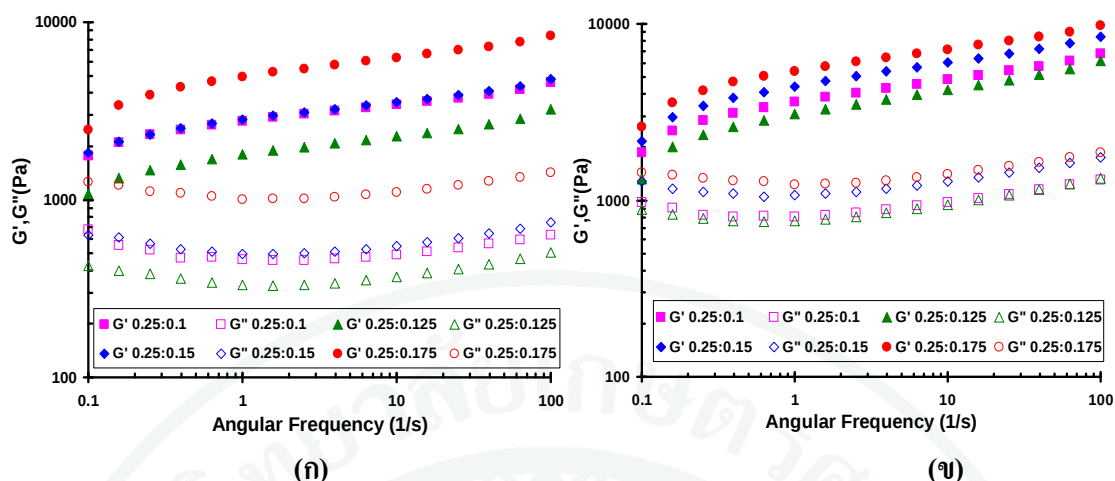


ภาพที่ 13 LVE range ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 3 (ก) และ 5 (ข)

2.2 การตรวจสอบความแข็งแรงของโครงข่ายเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

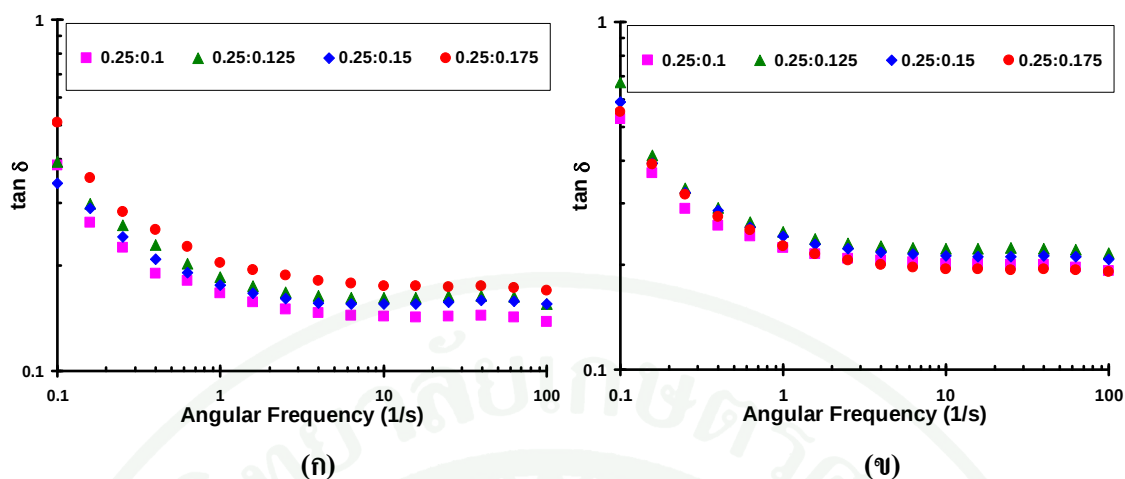
การทดสอบ frequency sweep ใช้ตรวจสอบความแข็งแรงของโครงข่ายเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน โดยการวัดค่า G' (ลักษณะความเป็นของแข็งที่สามารถยืดหยุ่น) และ G'' (ลักษณะความเป็นของเหลวที่มีความข้นหนืด) ที่สามารถบ่งบอกถึงคุณลักษณะและโครงสร้างของเมทริกซ์ที่ได้ว่ามีโมเลกุลเกี่ยวพันกันอย่างไรบ้างหรือเกิดโครงสร้างที่แข็งแรง (ธงชัย, 2549; รุ่งนภา, 2549) ค่าที่บ่งบอกถึงความแข็งแรงของโครงข่าย คือ ค่า storage modulus (G') (Martinez-Ruvalcaba *et al.*, 2007; Rinaudo and Moroni, 2009) ในการทดลองช่วงความถี่ที่ใช้คือ 0.1-100 วินาที⁻¹ ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ คือ ค่า G' และ G'' ดังภาพที่ 14ก-ข

จากภาพที่ 14 เป็นการศึกษาผลของพีเอชและปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่อสมบัติทางวิทยากระแส โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นของไคโตแซนคงที่ (0.25 %w/v) และความเข้มข้นของเพกตินต่างๆ (0.1-0.175 %w/v) ที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 3 และ 5 เมื่อพิจารณาค่า G' และ G'' ดังภาพที่ 14ก-ข พบว่าเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินมีค่า G' มากกว่า G'' แสดงว่าตัวอย่างเป็นวัสดุวิสโคอีลาสติกที่แสดงลักษณะเป็นของแข็งมากกว่าของเหลว และยังพบว่าพีเอชมีผลต่อค่า G' และ G'' จากภาพที่ 14ก แสดงลักษณะของเมทริกซ์ที่เตรียมในสภาวะพีเอช 3 พบว่าปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v จะให้ค่า G' สูงสุดในช่วงปริมาณไคโตแซน-เพกตินที่ศึกษา คือ ที่ความเข้มข้นของไคโตแซน 0.25%w/v และความเข้มข้นของเพกติน 0.1-0.175%w/v ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณไคโตแซน-เพกตินมีผลต่อค่าความแข็งแรงของโครงข่ายระหว่างไคโตแซนและเพกติน เมื่อพิจารณาที่พีเอช 5 (ภาพที่ 14ข) พบว่าที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v จะให้ค่า G' สูงสุดเช่นกัน ดังนั้นที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินดังกล่าวจึงมีความแข็งแรงของโครงข่าย (G') สูงสุดในช่วงปริมาณไคโตแซน-เพกตินที่ศึกษา อาจเนื่องมาจากที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน ดังกล่าวสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกติน (George and Abraham, 2006; Bigucci *et al.*, 2008) ได้ดีกว่าที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินอื่นๆ จึงทำให้เมทริกซ์ที่ได้มีความแข็งแรงสูงสุด



ภาพที่ 14 ค่า G' และ G'' ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ในสภาวะพีเอชของสารละลายเท่ากับ 3 (ก) และ 5 (ข)

เมื่อพิจารณาค่า $\tan \delta$ ซึ่งเป็นอัตราส่วนของ G'' ต่อ G' ค่าดังกล่าวสามารถบอกถึงลักษณะโครงสร้างของเมทริกซ์ กรณีที่มีค่า $\tan \delta$ น้อยกว่า 1 คือมีค่า G' มากกว่า G'' แสดงให้เห็นถึงลักษณะเมทริกซ์ที่ยืดหยุ่น โดยเมทริกซ์ที่มีค่า $\tan \delta$ น้อยกว่า 0.1 แสดงว่ามีลักษณะเป็นเจลแข็ง (strong gel) ส่วนเมทริกซ์ที่มีค่า $\tan \delta$ มากกว่า 0.1 แสดงว่ามีลักษณะเป็นเจลอ่อน (weak gel) (Ikeda and Nishinari, 2001) จากภาพที่ 15 เป็นการแสดงค่า $\tan \delta$ ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน ที่ความเข้มข้นของไคโตแซนคงที่ (0.25 %w/v) และความเข้มข้นของเพกตินต่างๆ (0.1-0.175 %w/v) ที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 3 และ 5 พบว่าเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินทุกๆ ปริมาณไคโตแซน-เพกตินทั้งในพีเอช 3 และ 5 มีค่า $\tan \delta (G''/G')$ น้อยกว่า 1 แสดงว่าเมทริกซ์มีลักษณะเป็นเจลที่มีความยืดหยุ่น นอกจากนี้ยังพบว่า $\tan \delta$ มีค่ามากกว่า 0.1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินมีลักษณะเป็นเจลอ่อน (weak gel) อาจเนื่องมาจากเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินเกิดการจับกันเป็นโครงสร้างอย่างหลวมๆ ทำให้เกิดลักษณะเป็นเจลอ่อน



ภาพที่ 15 ค่า $\tan \delta$ ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินในช่วงความเข้มข้นของเพกติน 0.1-0.175 %w/v และความเข้มข้นของไคโตแซนคงที่ (0.25%w/v) ที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 3 (ก) และ 5 (ข)

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าไคโตแซนและเพกตินสามารถเกิดอันตรกิริยาแบบอิเล็กโตร-สแตติกระหว่างประจุบวกของไคโตแซนและประจุลบของเพกติน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าทางประจุไฟฟ้า โดยการวัดค่า zeta potential ของสารละลายสไลต์ที่ได้จากการกรองเพื่อตรวจสอบการเกิดอันตรกิริยาทางอิเล็กโตรสแตติกระหว่างประจุบวกของไคโตแซนและประจุลบของเพกติน

เมื่อพิจารณาค่า zeta potential ของสารละลายไคโตแซนและเพกตินที่ความเข้มข้นและพีเอชต่างๆ (ตารางที่ 4) พบว่าสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 0.25%w/v ที่เตรียมในสถานะพีเอช 3 และ 5 มีค่าประจุเป็นบวก โดยไคโตแซนที่เตรียมในสถานะพีเอช 3 มีค่าประจุ (86.93 มิลลิโวลต์) มากกว่าพีเอช 5 (41.95 มิลลิโวลต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจาก pKa ของไคโตแซนมีค่าประมาณ 6.5 ดังนั้นในช่วงพีเอชต่ำกว่า pKa หมู่เอมีนของไคโตแซนส่วนใหญ่จะเกิดการให้โปรตอน (protonated) (Bigucci *et al.*, 2008) เมื่อละลายไคโตแซนที่พีเอช 5 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ pKa จึงทำให้แตกตัวให้ประจุน้อยกว่าที่พีเอช 3 จึงแสดงให้เห็นว่าพีเอชมีผลต่อการแตกตัวของไคโตแซน (Saether *et al.*, 2008) ส่วนสารละลายเพกตินที่ถูกเตรียมในสถานะพีเอชต่างกัน พบว่าที่พีเอช 5 มีค่าประจุเป็นลบมากกว่าพีเอช 3 ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4) เนื่องจากที่พีเอช 5 มีค่ามากกว่าค่า pKa ของเพกติน (~3.5) ทำให้เพกตินสามารถแตกตัวให้ประจุลบมากกว่าพีเอช 3 และยังพบว่าที่พีเอช 3 เมื่อความเข้มข้นของเพกตินเพิ่มขึ้นเป็น 0.15 %w/v ค่าของประจุแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ที่พีเอช 5 ค่าของประจุไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p>0.05$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพกติน ดังนั้นพีเอชและความเข้มข้นมีผลต่อการแตกตัวของเพกติน

ตารางที่ 4 ค่า zeta potential ของสารละลายไคโตแซนและสารละลายเพกติน

ชนิดของ พอลิแซ็กคาไรด์	ความเข้มข้นของ พอลิแซ็กคาไรด์ (% w/v)	zeta potential (mV)	
		pH 3	pH 5
ไคโตแซน	0.25	86.93 ± 0.19^B	41.95 ± 0.35^A
	0.1	-24.80 ± 0.28^{bA}	-27.1 ± 0.85^{bB}
	0.125	-25.50 ± 0.42^{bA}	-28.5 ± 1.27^{abB}
	0.15	-26.65 ± 0.49^{aA}	-28.4 ± 1.56^{aB}
	0.175	-26.70 ± 0.14^{aA}	-27.55 ± 1.91^{abB}

หมายเหตุ : - อักษร a-b หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกัน

แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- อักษร A-B หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแถวเดียวกันมีตัวอักษรต่างกัน

แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 5 แสดงค่า zeta potential ของส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ถูกเตรียมในพีเอชและปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ซึ่งการวัด zeta potential ของส่วนใสนั้น เพื่อต้องการดูว่ามีพอลิแซ็กคาไรด์ตัวใดเหลืออยู่ เมื่อพิจารณาที่พีเอชเดียวกันที่มีปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ (ตารางที่ 5) พบว่าค่า zeta potential ของส่วนใสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดย zeta potential มีค่าประจุเป็นบวกทั้งในพีเอช 3 และ 5 จึงคาดว่าไคโตแซนเหลืออยู่มากในสารละลายที่กรอง ซึ่งเป็นประจุบวกของไคโตแซนที่ไม่ได้เกิดอันตรกิริยาทางอิเล็กโตรสแตติกกับประจุลบของเพกติน และจะเห็นได้ว่าที่พีเอช 3 จะมีการเป็นประจุบวกสูงกว่าที่พีเอช 5 อาจเนื่องมาจากระดับการแตกตัวของไคโตแซนที่พีเอช 3 จะแตกตัวให้ประจุบวกมากกว่าที่พีเอช 5 (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่า zeta potential ของส่วนใส ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า zeta potential ไม่มากเมื่อเทียบกับสารละลายไคโตแซน อาจเป็นไปได้ว่าประจุบวกของไคโตแซนสามารถเกิดอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกกับประจุลบของเพกตินได้น้อยมาก โดยเฉพาะที่พีเอช 5 ซึ่งจะเห็นได้จากค่า zeta potential ของสารละลายไคโตแซนใกล้เคียงกับค่า zeta potential ของสารละลายใสหลังกรองเมทริกซ์ ดังนั้นเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากอันตรกิริยาอื่นๆ อีก คือ พันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของไคโตแซนและเพกติน และอาจเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ระหว่างโมเลกุลของไคโตแซนและเพกตินได้บ้างเล็กน้อย เนื่องจากเพกตินมีระดับของหมู่เมทิล

เอสเทอร์น้อยมาก ($DE = 7.5\%$) จึงทำให้มีหมู่เมทิลเอสเทอร์ที่สามารถเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกกับไคโตแซนได้น้อย (Nordby *et al.*, 2003; Kubota and Shimoda, 2005; Bigucci *et al.*, 2008; Livney *et al.*, 2008)

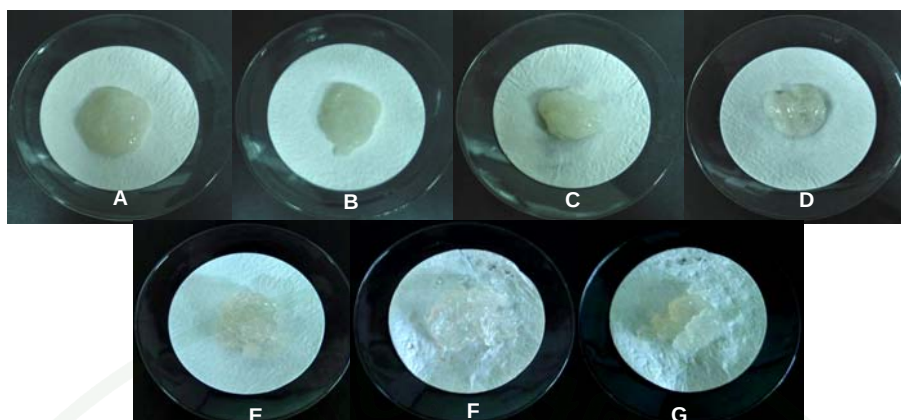
ตารางที่ 5 ค่า zeta potential ของส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

พีเอช	ปริมาณไคโตแซน-เพกติน (%w/v)	zeta potential (mV)
3	0.25-0.1	67.90 ± 1.56^{cd}
	0.25-0.125	74.00 ± 1.27^c
	0.25-0.15	71.30 ± 2.97^{de}
	0.25-0.175	66.75 ± 1.63^c
5	0.25-0.1	36.70 ± 1.98^b
	0.25-0.125	34.85 ± 1.63^{ab}
	0.25-0.15	33.25 ± 1.20^{ab}
	0.25-0.175	32.20 ± 1.13^a

หมายเหตุ : - อักษร a-c หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3. ผลของเกลือต่อลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

อันตรกิริยาหลักระหว่างไคโตแซนและเพกตินคาดว่าเป็นอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางด้านวิสโคอีลาสติคพบว่าพีเอชมีผลต่อการเกิดอันตรกิริยา ในการศึกษาต่อมาจึงมีสมมติฐานว่าชนิดและความเข้มข้นของเกลือที่ใช้อาจจะมีผลต่ออันตรกิริยาที่เกิดขึ้นเช่นกัน ดังนั้นในงานวิจัยส่วนนี้จึงเตรียมเมทริกซ์ที่พีเอช 5 และมีปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้ความแข็งแรงและปริมาณเมทริกซ์สูงสุด โดยเลือกเกลือที่นำมาใช้เปรียบเทียบ 2 ชนิด คือ โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำเมทริกซ์ที่เตรียมได้ (ภาพที่ 16) ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณเมทริกซ์ที่เกิดขึ้นและศึกษาสมบัติทางวิทยากระแสโดยวัดค่าความแข็งแรง (G') และค่าความเหนียว (G'') ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ โดยกำหนดค่าเปอร์เซ็นต์ strain ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ช่วงความถี่ 0.1-100 วินาที⁻¹ จากนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินไปวัดค่า zeta potential



ภาพที่ 16 ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v ที่มีการเติมและไม่เติมเกลือ

หมายเหตุ - A คือ ไม่มีการเติมเกลือ; B, C และ D คือ เติมโซเดียมคลอไรด์ 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ; E, F และ G เติมแคลเซียมคลอไรด์ 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมเกลือ ดังภาพที่ 15 A-G พบว่าเมื่อเติมเกลือที่มีชนิดของไอออนแตกต่างกัน (Ca^{2+} และ Na^+) จะให้ลักษณะเมทริกซ์ที่ต่างกัน เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ เมทริกซ์มีลักษณะคล้ายคลึงกับเมทริกซ์ที่ไม่มีการเติมเกลือ คือมีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียว มองเห็นเป็นเส้นใยสีขาวที่จับกันเป็นก้อนนุ่มและมีรูปร่างไม่แน่นอน (ภาพที่ 16 A-D) แต่เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์พบว่าเมทริกซ์มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous) สี และไม่เห็นเส้นใยภายในโครงสร้างเมทริกซ์ (ภาพที่ 16 E-F) แสดงว่าแคลเซียมคลอไรด์อาจมีผลต่อการเกิดโครงสร้างเมทริกซ์แตกต่างจากโซเดียมคลอไรด์

จากตารางที่ 6 แสดงผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลือต่อปริมาณเมทริกซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อเติมเกลือที่มีชนิดของไอออนแตกต่างกัน (Ca^{2+} และ Na^+) เมทริกซ์ที่ได้จะมีปริมาณแตกต่างกัน และระบบที่มีการเติมเกลือจะมีปริมาณเมทริกซ์มากกว่าที่ไม่มีการเติมเกลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-100 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณเมทริกซ์ที่ได้เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) และเมื่อความเข้มข้นของ NaCl สูงถึง 150 มิลลิโมลาร์ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้จะมีค่าลดลง เนื่องจากโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนมีจำนวนมาก จึงเข้าไปจับกับเพกตินและไคโตแซน จึงทำให้ไคโตแซนและเพกตินสามารถเกิดอันตรกิริยาทางอิเล็กโตรสแตติกและพันธะไฮโดรเจนได้น้อยลง (Wang *et al.*, 2004; de Vasconcelos *et al.*, 2006) นอกจากนี้ เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-50 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณเมทริกซ์ที่ได้เพิ่มขึ้นจาก 8.96 เป็น

14.48 กรัม/100 มิลลิลิตร ($p \leq 0.05$) และพบว่าที่ความเข้มข้น 50-150 มิลลิโมลาร์ ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน ($p > 0.05$) การที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำแต่ทำให้ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้มากขึ้นนั้น อาจเนื่องมาจากแคลเซียมคลอไรด์จะไปลดแรงผลักดันสายโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีประจุชนิดเดียวกัน โดยไอออนของเกลือเข้าไปจับกับพอลิอิเล็กโตรไลต์ที่มีประจุตรงข้าม คือ คลอไรด์ไอออน (Cl^-) จะเกิดปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของไคโตแซน (NH_3^+) ส่วนแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะเกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของเพกติน (COO^-) ทำให้โมเลกุลของไคโตแซนและเพกตินมีความยืดหยุ่นมากขึ้น จึงอาจส่งผลให้อันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนและเพกตินเกิดได้ดีขึ้น (Dautzenberg, 1997; Schorsch *et al.*, 1997; Martinez-Ruvalcaba *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ว่าปริมาณเมทริกซ์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์นั้น อาจเกิดจากเพกตินชนิด LM สามารถเกิดเจลได้ดีกับแคลเซียมไอออนได้เช่นกัน (นิธิยา, 2545)

ตารางที่ 6 ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้เมื่อเติมเกลือ (NaCl และ CaCl_2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

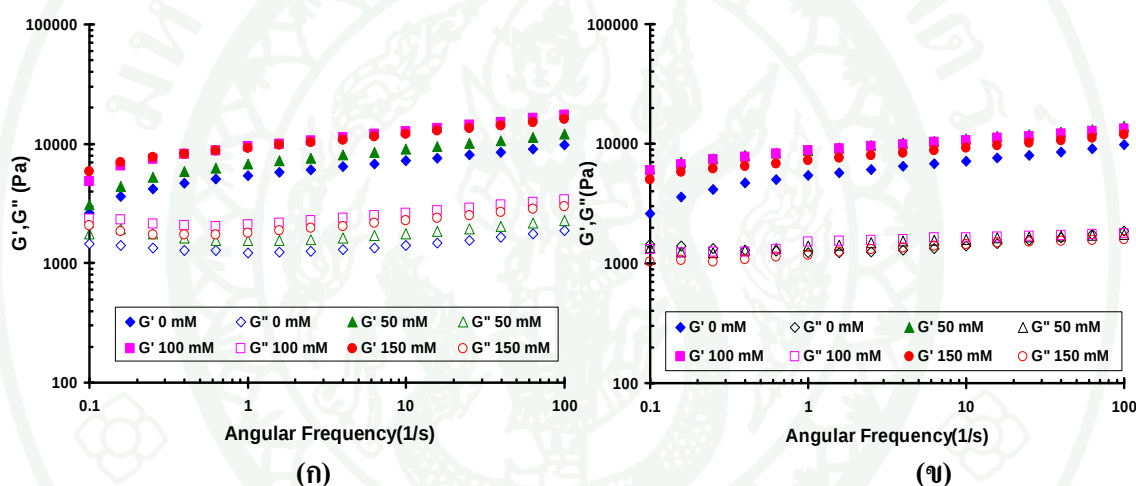
ชนิดของเกลือ	ความเข้มข้นของเกลือ (mM)	ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ (g/100 mL)
NaCl	0	8.96 ± 0.28^a
	50	12.26 ± 0.42^b
	100	15.89 ± 0.27^d
	150	9.47 ± 0.75^a
CaCl_2	0	8.96 ± 0.28^a
	50	14.48 ± 0.15^c
	100	14.44 ± 0.44^c
	150	14.38 ± 0.62^c

หมายเหตุ - อักษร a-d หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

นอกจากนี้เพื่อตรวจสอบความแข็งแรงของเมทริกซ์เมื่อมีการเติมเกลือในระบบโดยสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเมทริกซ์ คือ พีเอช 5 ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน ; 0.25-0.175 %w/v เพื่อศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของเกลือต่อความแข็งแรงของโครงข่าย ดังภาพที่ 17 เมื่อพิจารณาค่า G' และ G'' ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน (ภาพที่ 17ก) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ค่า G' และ G'' มีค่าสูงขึ้น แต่เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100-150 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่า G' และ G'' ที่มีค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ดังภาพที่ 17ข พบว่าเมทริกซ์มีความแข็งแรงมากขึ้น แต่เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50-150 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่า G' และ G'' ที่มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าความแข็งแรงของ

เมทริกซ์ (G') ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณเมทริกซ์ที่เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเติมเกลือ (0-150 mM) มีผลต่อการเพิ่มความแข็งแรงให้กับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกติน โดยไอออนของเกลือจะเข้าไปจับกับพอลิเล็กโตรไลต์ที่มีประจุตรงข้าม คือ คลอไรด์ไอออน (Cl^-) จะเกิดปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของไคโตแซน (NH_3^+) ส่วนโซเดียมไอออน (Na^+) หรือ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะเกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของเพกติน (COO^-) ส่งผลให้เกิดการลดแรงผลักระหว่างโมเลกุลระหว่างพอลิเมอร์ที่มีประจุชนิดเดียวกัน ทำให้โมเลกุลของไคโตแซนและเพกตินมีความยืดหยุ่นมากขึ้น จึงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างไคโตแซนและเพกตินได้ดีขึ้น

(Dautzenberg, 1997; Schorsch *et al.*, 1997; Martinez-Ruvalcaba *et al.*, 2007) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดและความเข้มข้นของเกลือมีอิทธิพลต่อความแข็งแรงของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน



ภาพที่ 17 ค่า G' และ G'' ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (ก) และแคลเซียมคลอไรด์ (ข) ที่พีเอช 5

จากการวัดค่า zeta potential ของสารละลายที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน พบว่าพีเอชมีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาทางอิเล็กโตรสแตติกระหว่างประจุบวกของไคโตแซนและประจุลบของเพกติน ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของการเติมเกลือเพื่อตรวจสอบการเกิดอันตรกิริยาทางอิเล็กโตรสแตติกระหว่างประจุบวกของไคโตแซนและประจุลบของเพกตินโดยวัดค่า zeta potential ของสารละลายที่ได้จากการกรอง ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่า zeta potential ของส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซน-เพกติน;
0.25-0.175 %w/v) ที่มีการเติมเกลือต่างชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของเกลือ	ความเข้มข้น ของเกลือ (mM)	zeta potential ของ สารละลายเกลือ (mV)	zeta potential ของส่วนใส หลังกรองเมทริกซ์ (mV)
โซเดียมคลอไรด์	0	3.75 ± 0.69^{cd}	32.20 ± 1.13^c
	50	1.49 ± 1.30^{bc}	28.50 ± 0.42^b
	100	-1.95 ± 2.07^a	25.60 ± 1.84^a
	150	-1.20 ± 0.59^{ab}	26.45 ± 1.77^{ab}
แคลเซียมคลอไรด์	0	3.75 ± 0.69^{cd}	32.20 ± 1.13^c
	50	6.29 ± 0.50^{de}	25.05 ± 0.78^a
	100	7.02 ± 0.21^{de}	28.90 ± 0.14^b
	150	8.41 ± 2.67^c	29.00 ± 0.71^b

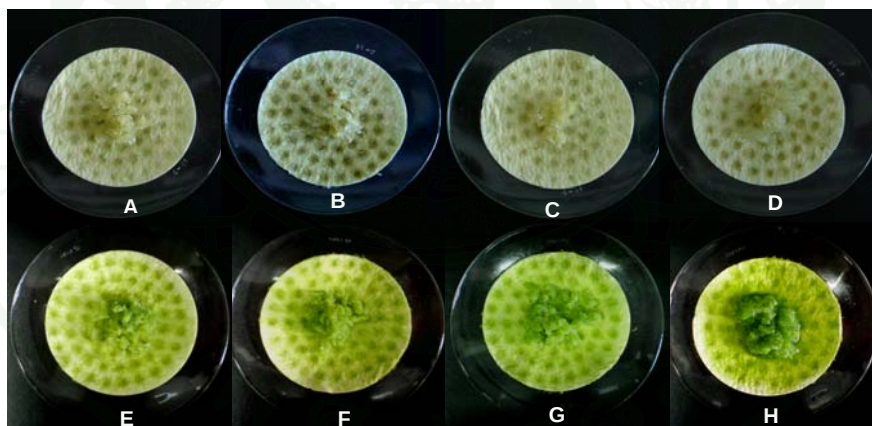
หมายเหตุ - อักษร a-e หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกันแสดง
ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 7 พบว่าเมทริกซ์ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์มีค่า zeta potential ของส่วนใสที่ได้จากการกรองน้อยกว่าเมทริกซ์ที่ไม่มีการเติมเกลือ และยังพบว่าค่า zeta potential มีค่าเป็นบวก แสดงให้เห็นว่ามีโมเลกุลของไคโตแซนที่เหลือจากการเกิดสารประกอบ-เชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกติน เมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 50-150 มิลลิโมลาร์ ให้ค่า zeta potential ($25.60-28.50$ mV) ต่ำกว่าสารละลายส่วนใสที่ไม่เติมเกลือ (32.20 มิลลิโวลต์) ส่วนการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0-150 mM พบว่าที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ให้ค่า zeta potential ต่ำสุด (25.05 มิลลิโวลต์) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการเติมเกลือส่งผลให้ประจุที่เหลือในสารละลายยังคงเป็นประจุบวกของไคโตแซนเช่นเดียวกับระบบที่ไม่มีการเติมเกลือ และส่งผลให้ประจุไคโตแซนที่เหลืออยู่มีค่าความเป็นประจุบวกลดลง แสดงว่าระบบสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้ดีขึ้น โดยจะให้ผลสอดคล้องกับปริมาณเมทริกซ์และความแข็งแรงของโครงข่ายที่สูงขึ้น จากนั้นได้นำเมทริกซ์มาทำการศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบ๊วก แล้วตรวจสอบการปลดปล่อยโดยจำลองสภาวะพีเอชภายในทางเดินอาหารของมนุษย์

4. การศึกษาลักษณะของเมทริกซ์และประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญโดยใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

4.1 ผลของพีเอชและปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่อลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

การศึกษาลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบกโดยใช้เมทริกซ์ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v ซึ่งมีการเติมสารสกัดบัวบกที่เตรียมจากวิธีการข้อ 1.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยมีเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย พบว่าลักษณะเจลที่ได้จะมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์จากบัวบกเนื่องจากคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียวที่พบอยู่ในพืช (นิธิยา, 2545) จากภาพที่ 18 เป็นการแสดงลักษณะของเมทริกซ์ที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก โดยเตรียมที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ ที่พีเอช 3 และ 5 แล้วทำการกรองเมทริกซ์ดังภาพที่ 18 จึงทำให้มองเห็นน้ำซึมบนกระดาษกรอง โดยเมทริกซ์ที่เตรียมในสภาวะพีเอช 5 (ภาพที่ 18E-H) จะให้ลักษณะเมทริกซ์ที่มีสีเขียวเข้มกว่าพีเอช 3 (ภาพที่ 18A-D) จึงแสดงให้เห็นว่าพีเอชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดบัวบก



ภาพที่ 18 ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบกที่พีเอช 3 และ 5

หมายเหตุ - A, B, C และ D คือ ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v ตามลำดับ ที่พีเอช 3
 - E, F, G และ H คือ ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v ตามลำดับ ที่พีเอช 5

เมื่อตรวจสอบค่าสีของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสกัดจากบวบ (ตารางที่ 8) พบว่าเจลที่มีสภาวะในการเตรียมต่างกัน จะมีลักษณะของสีเขียวที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่า L^* , a^* และ b^* ของเมทริกซ์ที่ไม่เติมสารสกัดบวบกับเมทริกซ์ที่เติมสารสกัดบวบ (ตารางที่ 8) จากการทดลองพบว่าเมทริกซ์ที่ไม่เติมสารสกัดบวบมีความสว่าง (L^*) สูงกว่าเมทริกซ์ที่เติมสารสกัดบวบ ($p \leq 0.05$) และเมทริกซ์ที่มีการกักเก็บสารสกัดจากบวบจะแสดงถึงลักษณะความเป็นสีเหลือง (b^* มีค่าเป็นบวก) และความเป็นสีเขียว (a^* มีค่าเป็นลบ) เนื่องจากสารสกัดบวบที่เติมลงไปทำให้เมทริกซ์ที่ได้มีสีเขียวและมีความเข้มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมทริกซ์ที่เติมสารสกัดบวบและเตรียมที่พีเอช 5 มีค่าความสว่าง ระดับความเป็นสีเขียวและเหลืองสูงกว่าพีเอช 3 ($p \leq 0.05$) จึงแสดงให้เห็นว่าพีเอชมีผลต่อระดับความเป็นสีเขียวหรือการเปลี่ยนแปลงสีของคลอโรฟิลล์ของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบวบ ซึ่งความเป็นกรดที่มากขึ้นทำให้คลอโรฟิลล์ในบวบถูกทำลายและทำให้สีของสารสกัดบวบในเมทริกซ์เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากพีเอชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์ โดยกรดสามารถเกิดปฏิกิริยากับคลอโรฟิลล์ ทำให้สูญเสีย แมกนีเซียม (Mg^{2+}) ออกไปจากโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ ทำให้คลอโรฟิลล์เปลี่ยนรูปเป็นฟีโอไฟติน (pheophytin) (นิธิยา, 2545)

เมื่อเปรียบเทียบค่าสีที่พีเอชเดียวกันพบว่าปริมาณไคโตแซน-เพกตินไม่มีผลต่อปริมาณการเปลี่ยนแปลงสีของบวบ (L^* , a^* และ b^*) จากผลการทดลองแสดงว่าพีเอชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสกัดบวบ นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจสอบผลของพีเอชต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสารสำคัญจากบวบ

ตารางที่ 8 ค่าสีของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่กักเก็บสารสำคัญโดยมีปริมาณบวบก-ไคโตแซน-เพกตินและพีเอชต่างๆ

พีเอช	ปริมาณบวบก-ไคโตแซน- เพกติน (%w/v)	L*	a*	B*
3	0-0.25- 0.175	37.48 ± 2.46 ^d	-1.57 ± 0.15 ^d	-2.84 ± 0.54 ^a
	0.2-0.25-0.1	28.05 ± 1.41 ^a	-5.53 ± 0.56 ^b	13.67 ± 1.14 ^b
	0.2-0.25-0.125	30.22 ± 0.70 ^{ab}	-4.01 ± 0.01 ^c	14.99 ± 1.28 ^b
	0.2-0.25-0.15	32.85 ± 0.75 ^{bc}	-4.39 ± 0.37 ^c	16.54 ± 3.13 ^b
	0.2-0.25-0.175	30.28 ± 0.65 ^{ab}	-4.61 ± 0.25 ^c	13.18 ± 0.86 ^b
5	0-0.25-0.175	47.10 ± 1.84 ^e	-2.12 ± 0.16 ^d	-4.10 ± 0.12 ^a
	0.2-0.25-0.1	36.29 ± 0.96 ^d	-11.27 ± 0.26 ^a	22.25 ± 0.16 ^c
	0.2-0.25-0.125	37.38 ± 0.24 ^d	-11.14 ± 0.26 ^a	20.39 ± 1.31 ^c
	0.2-0.25-0.15	35.81 ± 1.58 ^{cd}	-10.92 ± 0.90 ^a	19.95 ± 1.42 ^c
	0.2-0.25-0.175	34.37 ± 0.29 ^{cd}	-11.75 ± 0.26 ^a	22.57 ± 1.68 ^c

หมายเหตุ - อักษร a-c หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกันแสดง
ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

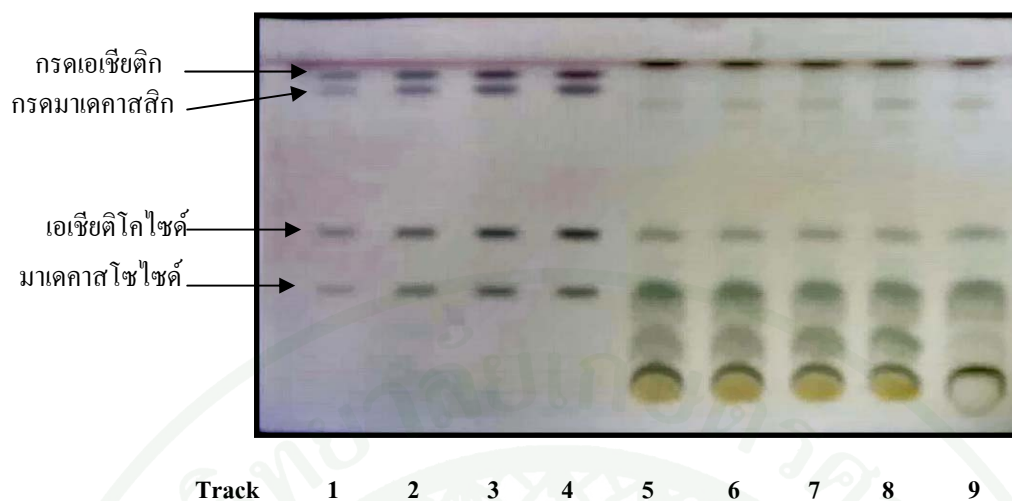
- ค่า L* คือค่าแสดงความเข้มและความสว่างของสี ซึ่งค่า L* มีค่า 0-100 ถ้าค่า L*
สูง หมายถึงมีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L* ต่ำแสดงว่ามีสีเข้มมาก

- ค่า a* เมื่อมีค่าเป็นบวกแสดงระดับความเป็นสีแดง และเมื่อมีค่าเป็นลบแสดงระดับ
ความเป็นสีเขียว

- ค่า b* เมื่อมีค่าเป็นบวกแสดงระดับความเป็นสีเหลือง และเมื่อมีค่าเป็นลบแสดงระดับ
ความเป็นสีน้ำเงิน

4.2 ผลของพีเอชและปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่อประสิทธิภาพการกักเก็บสารสำคัญจาก บวบก

ในงานวิจัยส่วนนี้ได้ตรวจสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบก โดย
การนำส่วนสีที่ได้จากการกรองเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไคโตรนอร์ปีนอิสระด้วยเทคนิค HPTLC ซึ่ง
แสดง HPTLC fingerprints ของสารสำคัญในสารสกัดจากบวบก ดังแสดงในภาพที่ 19 และ 20

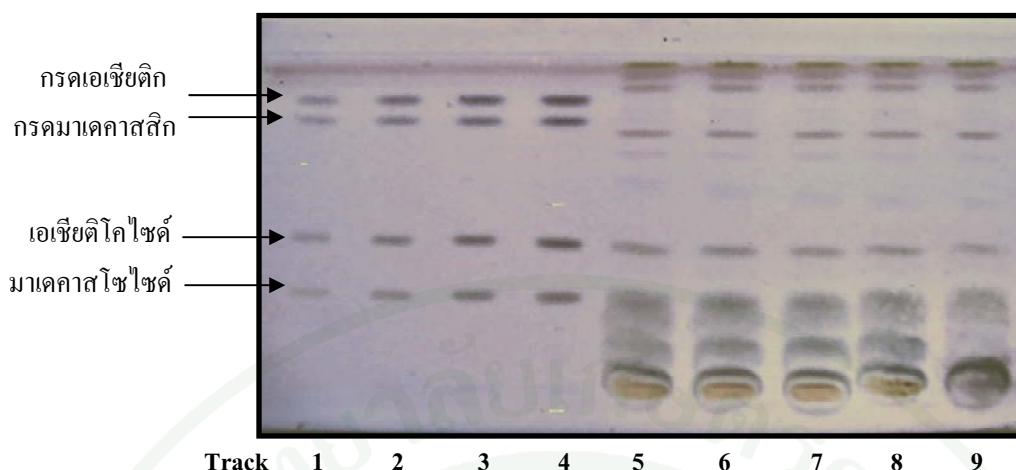


ภาพที่ 19 HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดที่ได้จากส่วนไสหลังการกรอง ที่พีเอช 3

หมายเหตุ - Track 1, 2, 3 และ 4 คือ สารมาตรฐานโดยหยดสารที่ปริมาตร 3, 6, 9 และ 12 ไมโครลิตร ตามลำดับ

- Track 5, 6, 7 และ 8 คือ สารสำคัญในส่วนไสที่ได้จากการกรอง ที่ปริมาณโคโคแซนเพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v ตามลำดับ

- Track 9 คือ สารสกัดบวบ 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในแอซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 3



ภาพที่ 20 HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสาร ไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดที่ได้จากส่วนใสหลังการกรอง ที่พีเอช 5

หมายเหตุ - Track 1, 2, 3 และ 4 คือ สารมาตรฐานโดยหยดสารที่ปริมาตร 3, 6, 9 และ 12 ไมโครลิตร ตามลำดับ

- Track 5, 6, 7 และ 8 คือ สารสำคัญในส่วนใสที่ได้จากการกรอง ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1, 0.25-0.125, 0.25-0.15 และ 0.25-0.175 %w/v ตามลำดับ
- Track 9 คือ สารสกัดบวบก 20 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรในแอซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5

จากภาพที่ 19 และ 20 ใน track ที่ 1-4 เป็นสารมาตรฐานกลุ่มไตรเทอร์ปีน 4 ชนิด คือ กรดเอเชียติก (asiatic acid) เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) กรดมาเดคาสสิก (madecassic acid) และ มาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) และ track ที่ 5-8 แสดงลักษณะแถบสีของสารสำคัญจากบวบก ในส่วนใสที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ ซึ่งปริมาณไตรเทอร์ปีนที่ได้จะนำไปใช้ในการคำนวณเป็น ปริมาณไตรเทอร์ปีนอิสระ สำหรับ track ที่ 9 คือ แถบสีของสารสกัดบวบก 20 เปอร์เซนต์โดย ปริมาตรในแอซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 3 (ภาพที่ 19) และพีเอช 5 (ภาพที่ 20) โดยนำไปสแกนเพื่อหา พื้นที่ใต้กราฟ แล้วนำไปคำนวณเป็นปริมาณไตรเทอร์ปีนเริ่มต้น ซึ่งพบว่าปริมาณสารสำคัญเพียง 2 ชนิด ได้แก่ มาเดคาสโซไซด์ (169.29 $\mu\text{g/mL}$) และเอเชียติโคไซด์ (146.25 $\mu\text{g/mL}$) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาประสิทธิภาพในการกักเก็บดังสมการที่ 6 จากการทดลองพบว่าในสารสกัดจาก บวบกมีสารสำคัญเริ่มต้นเพียง 2 ชนิด คือ เอเชียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ โดยไม่พบแถบสี ของ กรดเอเชียติก และกรดมาเดคาสสิก ทั้งในพีเอช 3 และ 5 อาจเนื่องจากสารสำคัญ 2 ชนิดนี้มีใน ปริมาณที่น้อยมากจึงไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีการนี้ เมื่อพิจารณาใน track ที่ 5-8 พบว่าการ เตรียมเมทริกซ์ที่พีเอช 3 จะแสดง HPTLC fingerprints ของสารสำคัญในสารสกัดจากบวบก

แตกต่างจากการเตรียมเมทริกซ์ที่พีเอช 5 โดยที่ พีเอช 3 จะมีความเข้มข้นของแถบสีที่เข้มกว่าพีเอช 5 และที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1 %w/v ปรากฏแถบสีที่เข้มกว่าอัตราส่วนอื่นๆ โดยความเข้มข้นของแถบสีที่เห็นมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้คือ เมื่อปรากฏแถบสีที่เข้มมาก พื้นที่ใต้กราฟที่ได้ก็จะมากด้วย เพื่อตรวจสอบอิทธิพลของปริมาณไคโตแซน-เพกตินและพีเอชที่ใช้ในการเตรียมเมทริกซ์ต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญ จึงนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพในการกักเก็บจากสมการที่ 6

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบกโดยเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

พีเอช	ปริมาณไคโตแซน-เพกติน (%w/v)	ประสิทธิภาพในการกักเก็บ (%)
3	0.25-0.1	17.28 ± 2.07^b
	0.25-0.125	19.18 ± 0.71^b
	0.25-0.15	11.56 ± 0.68^a
	0.25-0.175	24.47 ± 0.30^c
5	0.25-0.1	32.77 ± 3.52^d
	0.25-0.125	31.86 ± 0.27^d
	0.25-0.15	33.85 ± 1.28^d
	0.25-0.175	53.67 ± 1.74^e

หมายเหตุ - อักษร a-e หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อคำนวณประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน แสดงดังตารางที่ 9 โดยคำนวณจากปริมาณของสารสำคัญจากบวบกอิสระในส่วนใสที่ได้จากการกรอง พบว่าพีเอชและปริมาณไคโตแซน-เพกตินมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบก โดยเมทริกซ์ที่เตรียมในพีเอช 5 จะให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสูงกว่าพีเอช 3 ($p \leq 0.05$) และยังพบว่าที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v ที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 5 จะให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสูงที่สุด (53.67 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 9) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวัดสี โดยเมทริกซ์ที่เตรียมในพีเอช 5 มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์สูงกว่าพีเอช 3

จากผลการตรวจสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบกโดยมีลำดับการผสมเจือคือ เติมสารสกัดบวบกในสารละลายไคโตแซน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายเพกติน ดังนั้นจากการทดลองได้เกิดสมมติฐานว่าลำดับในการเติมพอลิแซคคาไรด์ในการเตรียม

เมทริกซ์อาจมีผลต่อการกักเก็บสารสำคัญ เนื่องจากการเปลี่ยนลำดับในการผสมมีผลต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Saether *et al.*, 2008) จึงได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับเมทริกซ์ที่เตรียมโดยการเติมสารสกัดบวบกที่เตรียมจากวิธีการข้อ 1.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยมีเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย เติมลงในสารละลายเพกติน ก่อนนำไปผสมกับสารละลายไคโตแซน (ตารางที่ 10) พบว่าเมทริกซ์ที่มีลำดับการผสมต่างกันมีประสิทธิภาพในการกักเก็บไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จึงแสดงให้เห็นว่าลำดับการผสมเจลไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบก

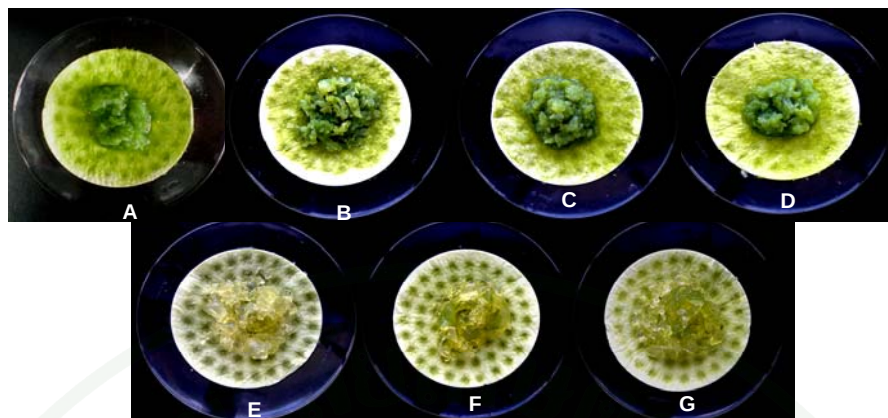
ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบวบกที่มีลำดับการผสมต่างกัน

ลำดับการผสมเจล	ประสิทธิภาพในการกักเก็บ (%)
บวบก-ไคโตแซน-เพกติน	53.67 ± 1.74 ^{ns}
บวบก-เพกติน-ไคโตแซน	48.89 ± 2.47 ^{ns}

หมายเหตุ - อักษร ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3 ผลของเกลือต่อลักษณะของเมทริกซ์และประสิทธิภาพการกักเก็บ

เนื่องจากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าเกลือมีผลต่อลักษณะและความแข็งแรงของเมทริกซ์ ซึ่งอาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บจึงเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v ที่พีเอช 5 ซึ่งเป็นสภาวะการเตรียมที่อัตราส่วนและพีเอชที่ให้ความแข็งแรงของเมทริกซ์สูงสุด ในการเตรียมเมทริกซ์นั้นได้เติมเกลือ 2 ชนิด คือ โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ เมทริกซ์มีลักษณะคล้ายคลึงกับเมทริกซ์ที่ไม่มีการเติมเกลือคือมีลักษณะที่จับกันเป็นก้อน ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 21 A-D) แต่เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์พบว่าเมทริกซ์มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันและใส (ภาพที่ 21 E-G) จากนั้นนำเมทริกซ์ที่ได้ไปวัดค่าสีและตรวจสอบประสิทธิภาพการกักเก็บจากส่วนใสที่ได้จากการกรองเพื่อหาปริมาณไทรเทอร์ปีนอิสระด้วยเทคนิค HPTLC



ภาพที่ 21 ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสกัดบัวบกโดยเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 5

หมายเหตุ - A คือ ไม่เติมเกลือ; B, C และ D คือ เติมโซเดียมคลอไรด์ 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์; E, F และ G คือ เติมแคลเซียมคลอไรด์ 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์

เมื่อทำการตรวจสอบค่าสีของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสกัดจากบัวบก ดังตารางที่ 11 พบว่า เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ ค่าความสว่าง (L^*) มีค่าใกล้เคียงกับเมทริกซ์ที่ไม่มีการเติมเกลือ ($p>0.05$) และมีค่าความสว่างสูงกว่าเมทริกซ์ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ($p\leq 0.05$) อาจเนื่องมาจากการใช้วิธีการวัดสีของวัสดุแข็งแบบทึบแสง ทำให้เมทริกซ์ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์มีความสว่างน้อยกว่าตัวอย่างอื่นๆ

เมื่อพิจารณาค่า a^* และ b^* (ตารางที่ 11) พบว่า a^* มีค่าเป็นลบ คือแสดงลักษณะเป็นสีเขียว ส่วน b^* มีค่าเป็นบวก คือแสดงลักษณะเป็นสีเหลือง ซึ่งการเติมเกลือต่างชนิดกันค่า a^* และ b^* ก็จะต่างจากเมทริกซ์ที่ไม่มีการเติมเกลือ คือ เมทริกซ์ที่ไม่มีการเติมเกลือจะมีระดับของสีเขียวและเหลืองสูงกว่าเมทริกซ์ที่เติมเกลือ ($p\leq 0.05$) ส่วนการเติมโซเดียมคลอไรด์จะแสดงระดับของสีเขียวและเหลืองสูงกว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ และการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ให้ระดับของสีเขียวสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น ($p\leq 0.05$) จึงกล่าวได้ว่าชนิดและความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของคลอโรฟิลล์ ซึ่งเห็นได้จากการเติมโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 150 มิลลิโมลาร์ ค่า a^* และ b^* เริ่มลดลง การที่ค่าความเป็นสีเขียวลดลงเมื่อเติมเกลือ โดยเฉพาะเมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์นั้น อาจเนื่องมาจากแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เข้าไปแทนที่แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) มีผลทำให้สีเขียวของคลอโรฟิลล์จางลง (Humphrey, 1980) ส่งผลให้เมทริกซ์ที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์มีค่าความสว่าง ความเป็นสีเขียวและสีเหลืองลดลง

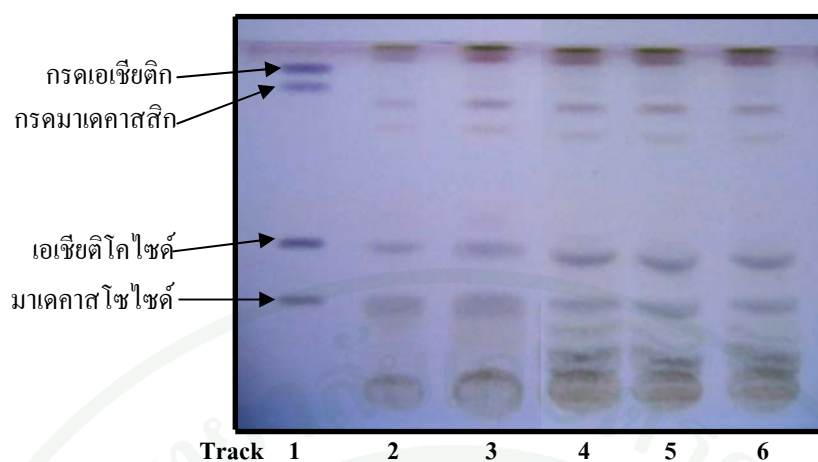
ตารางที่ 11 ค่าสีของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่กักเก็บสารสำคัญโดยมีการเติมเกลือต่างชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 5

ชนิดของเกลือ	ความเข้มข้นของเกลือ (mM)	L*	a*	B*
NaCl	0	34.37 ± 0.30^{bc}	-11.75 ± 0.25^a	22.57 ± 1.68^d
	50	35.77 ± 0.08^c	-10.16 ± 0.32^b	20.75 ± 1.41^d
	100	33.30 ± 0.36^b	-9.26 ± 0.05^c	20.90 ± 0.01^d
	150	35.18 ± 0.03^{bc}	-8.59 ± 0.25^c	17.07 ± 0.06^c
CaCl ₂	0	34.37 ± 0.30^{bc}	-11.75 ± 0.25^a	22.57 ± 1.68^d
	50	21.29 ± 2.37^a	-4.13 ± 0.43^d	10.62 ± 2.43^b
	100	19.30 ± 0.51^a	-3.55 ± 0.64^d	7.21 ± 1.32^{ab}
	150	19.47 ± 0.15^a	-2.48 ± 0.31^e	6.06 ± 1.65^a

หมายเหตุ - อักษร a-e หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ค่า L* คือค่าแสดงความเข้มและความสว่างของสี ซึ่งค่า L* มีค่า 0 – 100 ถ้าค่า L* สูง หมายถึงมีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L* ต่ำแสดงว่ามีสีเข้มมาก
- ค่า a* เมื่อมีค่าเป็นบวกแสดงระดับความเป็นสีแดง และเมื่อมีค่าเป็นลบแสดงระดับความเป็นสีเขียว
- ค่า b* เมื่อมีค่าเป็นบวกแสดงระดับความเป็นสีเหลือง และเมื่อมีค่าเป็นลบแสดงระดับความเป็นสีน้ำเงิน

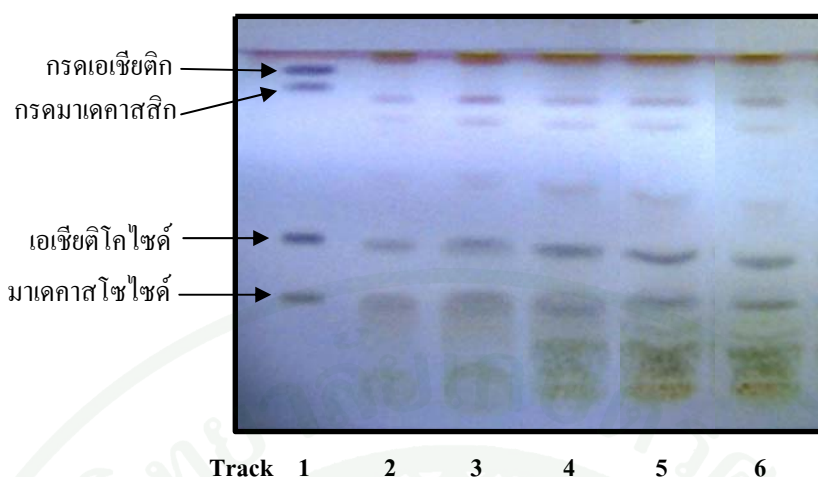
จากผลการตรวจสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบกโดยการนำส่วนใบที่ได้จากการกรองไปวัดปริมาณไทรเทอร์ปีนอิสระด้วยเทคนิค HPTLC ซึ่งแสดง HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไทรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดในสารสกัดจากบัวบก ดังภาพที่ 22 และ



ภาพที่ 22 HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจาก บัวบกที่ได้จากส่วนใบหลังการกรองที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่พีเอช 5

หมายเหตุ - Track 1 คือ สารมาตรฐาน

- Track 2 และ 3 คือ สารสกัดบัวบก 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในแอซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 โดยหยดสารที่ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ
- Track 4, 5 และ 6 คือ สารสำคัญในส่วนใบที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่าง ไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ



ภาพที่ 23 HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจาก บัวบกที่ได้จากส่วนใบหลังการกรองที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ที่พีเอช 5

หมายเหตุ - Track 1 คือ สารมาตรฐาน

- Track 2 และ 3 คือ สารสกัดบัวบก 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในแอซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 โดยหยดสารที่ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ
- Track 4, 5 และ 6 คือ สารสำคัญในส่วนใบที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่าง ไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

จากภาพที่ 22 และ 23 ใน track ที่ 1 เป็นลักษณะแถบสีของสารมาตรฐานกลุ่มไตรเทอร์ปีน 4 ชนิด คือ กรดเอซีติก เอซีติโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และมาเดลาสโซไซด์ ใน track ที่ 2 และ 3 แสดงลักษณะแถบสีของสารสกัดจากบัวบกในแอซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5 โดยหยดสารที่ ปริมาตร 10 และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ พบว่าการหยดสารปริมาตรเพิ่มขึ้นส่งผลให้แถบสีเข้ม ขึ้นและพื้นที่ใต้กราฟก็มากขึ้นด้วย ซึ่งจะเห็นว่าปริมาตรในการหยดของสารสกัดบัวบกมีผลต่อ ความเข้มของแถบสีและพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ และในสารสกัดบัวบกตรวจพบแถบสีของสารสำคัญ เพียงสองชนิดคือ เอซีติโคไซด์และมาเดลาสโซไซด์ ส่วนใน track 4, 5 และ 6 คือ แถบสีของส่วน ใบที่ได้จากการกรองเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมเกลือ 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งพื้นที่ใต้กราฟของแถบสีจะใช้ในการคำนวณประสิทธิภาพการกักเก็บ สารสำคัญจากบัวบก

ตารางที่ 12 แสดงประสิทธิภาพการกักเก็บสารสำคัญจากบ๊วกโดยเมทริกซ์ที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบ โดยคำนวณจากปริมาณไทรเทอร์ปีนรวมพบว่าการเติมเกลือมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเพิ่มขึ้น โดยพบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0-100 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เมทริกซ์สามารถกักเก็บสารสำคัญเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 150 มิลลิโมลาร์ ประสิทธิภาพในการกักเก็บลดลง เช่นเดียวกับการเติมแคลเซียมคลอไรด์ก็พบว่าเมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เมทริกซ์สามารถกักเก็บสารสำคัญเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 100-150 มิลลิโมลาร์ ประสิทธิภาพในการกักเก็บลดลง ดังนั้นการเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่ำ ทำให้โครงข่ายของเมทริกซ์สามารถกักเก็บสารสำคัญไว้ได้ดีขึ้น เนื่องจากเกลือจะไปลดแรงผลักระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีประจุชนิดเดียวกัน ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในเรื่องอิทธิพลของเกลือ แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นจนถึงจุดจุดหนึ่งประสิทธิภาพในการกักเก็บลดลง เนื่องจากไอออนของเกลือจำนวนมากสามารถทำปฏิกิริยากับไคโตแซนและเพกติน และอาจมีผลให้โมเลกุลของไคโตแซนและเพกตินสามารถเกิดอันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติกและเกิดพันธะไฮโดรเจนได้น้อยลง (Wang *et al.*, 2004; de Vasconcelos *et al.*, 2006) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บลดลง

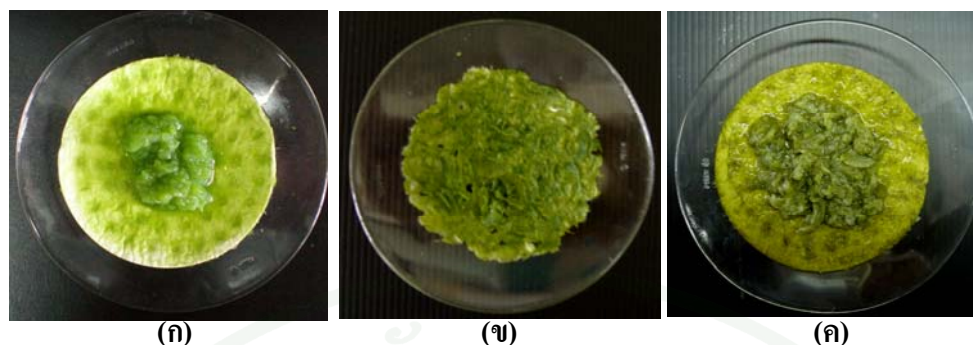
ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบ๊วกของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v หลังการเติมเกลือ (NaCl และ CaCl_2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 5

ชนิดของเกลือ	ความเข้มข้นของเกลือ (mM)	ประสิทธิภาพในการกักเก็บ (%)
NaCl	0	53.67 ± 1.74^a
	50	56.13 ± 1.30^a
	100	68.03 ± 1.53^{de}
	150	59.83 ± 1.92^b
CaCl_2	0	53.67 ± 1.74^a
	50	70.19 ± 0.83^c
	100	66.37 ± 1.49^d
	150	64.32 ± 1.13^c

หมายเหตุ - อักษร a-e หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

5. ลักษณะโครงสร้างของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

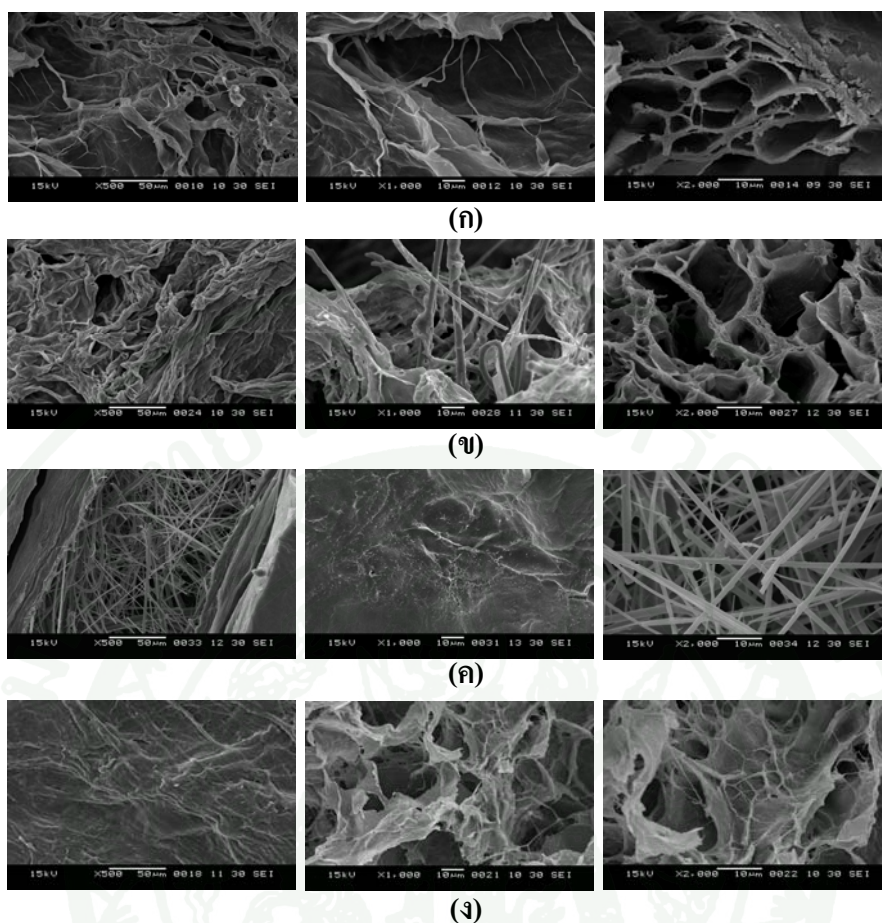
จากการสังเกตในการทดลองพบว่าเมทริกซ์ที่เตรียมจากไคโตแซนและเพกตินมีลักษณะที่แตกต่างกัน และเมื่อมีการเติมสารสกัดบวบกที่เตรียมจากวิธีการข้อ 1.4 ที่มีความเข้มข้น 0.2 %w/v (20 มิลลิลิตร) โดยมีเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย พบว่าเมทริกซ์มีลักษณะแตกต่างกัน โดยเฉพาะเมทริกซ์ที่มีลำดับการผสมที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 24 โดยทำการเตรียมเมทริกซ์ที่มีปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v ที่พีเอช 5 จะเห็นได้ว่าเมทริกซ์ที่มีการเติมไคโตแซนก่อนเพกตินจะมีลักษณะที่จับตัวกันเป็นก้อน (ภาพที่ 24ก) ส่วนเมทริกซ์ที่มีการเติมเพกติน ก่อนไคโตแซนจะมีลักษณะเป็น aggregate กระจายตัว แต่เมื่อกรองจึงสามารถกระจายตัวออกเป็นแผ่นฟิล์มได้ (ภาพที่ 24ค) ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเติมสารสกัดบวบกที่มีแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในระบบ 16 มิลลิลิตร เมื่อเติมลงในสารละลายเพกติน เพกติน จึงเกิดการตกตะกอน (Roiln *et al.*, 1998) โครงสร้างของเมทริกซ์จึงเปลี่ยนแปลงไป แต่เมื่อลดปริมาณแอลกอฮอล์ลง โดยการเติมสารสกัดบวบกที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (1.0 %w/v) โดยเตรียมจากบวบกผงดังวิธีการข้อ 1.5 แล้วละลายบวบกผงดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ จึงมีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในระบบเพียง 4 มิลลิลิตร ส่งผลให้ลักษณะของเมทริกซ์แตกต่างกันเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง ดังภาพที่ 24ค โดยจะมีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับเมทริกซ์ที่เติมไคโตแซนก่อนเพกติน จึงแสดงให้เห็นว่าแอลกอฮอล์มีผลต่อการตกตะกอนของเพกติน ทำให้เมทริกซ์มีลักษณะเป็น aggregate กระจายตัว แต่เมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ลดลงพบว่าลำดับการผสมไม่มีผลต่อลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน



ภาพที่ 24 ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก โดยมีลำดับการผสมต่างกัน

- หมายเหตุ - ก คือเติมสารละลายไคโตแซนลงในสารสกัดบัวบก 0.2 %w/v ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ 16 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยสารละลายเพกติน
- ข คือเติมสารละลายเพกตินลงในสารสกัดบัวบก 0.2 %w/v ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ 16 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยสารละลายไคโตแซน
- ค คือเติมสารละลายเพกตินลงในสารสกัดบัวบก 1.0 %w/v ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ 4 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยสารละลายไคโตแซน

จากนั้นจึงได้นำเมทริกซ์จากสถานะต่างๆ มาตรวจสอบโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากภาพที่ 25 แสดงให้เห็นว่าเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ไม่มีการเติมสารสกัดบัวบก (ภาพที่ 25ก) และมีการเติมสารสกัดบัวบกที่เตรียมจากวิธีการข้อ 1.4 ที่มีความเข้มข้น 0.2%w/v (20 มิลลิลิตร) โดยมีเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย (ภาพที่ 25ข) มีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน คือ มีโครงสร้างเป็นร่างแหที่แข็งแรงและต่อเนื่อง และแสดงลักษณะโครงสร้างที่มีรูพรุน โดยมีช่องว่างทั้งขนาดใหญ่และเล็กเป็นจำนวนมากโดยสานตัวกันอย่างหนาแน่น ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดบัวบกสามารถกักเก็บอยู่ภายในโครงสร้างร่างแหของไคโตแซนและเพกติน



ภาพที่ 25 ลักษณะโครงสร้างของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน ตรวจสอบด้วย SEM

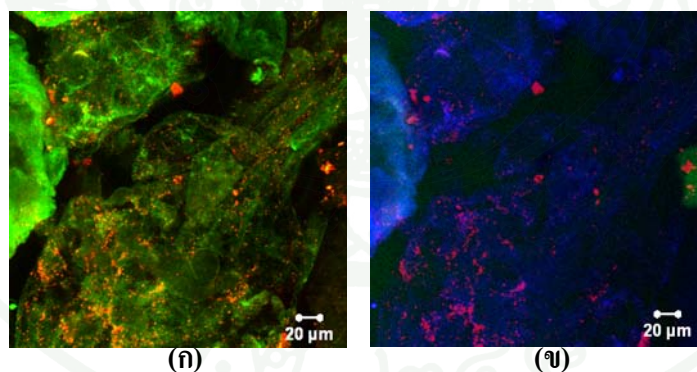
หมายเหตุ - ก คือ เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ไม่เติมสารสกัดบัวบก กำลังขยาย 500, 1000 และ 2,000 เท่า

- ข คือ เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่เติมสารสกัดบัวบก 0.2%w/v โดยมีลำดับการผสมจากการเติมสารสกัดบัวบกลงในสารละลายไคโตแซน ก่อนการเติมสารละลายเพกติน ที่กำลังขยาย 500, 1000 และ 2,000 เท่า

- ค คือ เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่เติมสารสกัดบัวบก 0.2%w/v โดยมีลำดับการผสมจากการเติมสารสกัดบัวบกลงในสารละลายเพกติน ก่อนการเติมสารละลายไคโตแซน ที่กำลังขยาย 500, 1000 และ 2,000 เท่า

- ง คือ เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่เติมสารสกัดบัวบก 1%w/v โดยมีลำดับการผสมจากการเติมสารสกัดบัวบกลงในสารละลายเพกติน ก่อนการเติมสารละลายไคโตแซน ที่กำลังขยาย 500, 1000 และ 2,000 เท่า

ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบกเมื่อสังเกตด้วยกล้องคอนโฟคอลเลเซอร์สแกนนิ่ง (confocal laser scanning microscopy; CLSM) (ภาพที่ 26) โดยสภาวะการเตรียมเมทริกซ์ที่ศึกษา คือที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v ที่พีเอช 5 แล้วนำเมทริกซ์ที่ได้ย้อมสีสองชนิดคือโรดามีน บี (rhodamine B) ใช้ในการย้อมไคโตแซน โดยย้อมติดที่หมู่เอมีน และฟลูออเรสซีนามีน (fluoresceinamine; FA) ใช้ในการย้อมเพกตินโดยย้อมติดที่หมู่คาร์บอกซิล เมื่อส่องด้วยกล้องคอนโฟคอลเลเซอร์สแกนนิ่ง จะมองเห็นเพกตินเป็นสีเขียวและไคโตแซนเป็นสีแดง ดังภาพที่ 26ก โดยจะมองเห็นโครงสร้างของทั้งไคโตแซน (สีแดง) และเพกติน (สีเขียว) ไคโตแซนจะอยู่กระจัดกระจายบนโครงสร้างของเพกติน ซึ่งเป็นไปได้ว่าไคโตแซนสามารถจับกับเพกตินแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (George and Abraham, 2006) โดยหมู่เอมีนจับกับหมู่คาร์บอกซิลแล้วจะเห็นการติดสีทั้งสีแดงและเขียว (ภาพที่ 26ก) นอกจากนี้ยังทำการสังเกตคลอโรฟิลล์จากบัวบกที่กักเก็บในเมทริกซ์ โดยใช้ช่วงความยาวคลื่นของ diaminido-2-phenylindole; DAPI ซึ่งมี excitation ที่ 345 nm และ emission ที่ 455 nm (Morikaw and Yanagida, 1981) เพื่อสังเกตคลอโรฟิลล์จากบัวบก (สีน้ำเงิน) ดังภาพที่ 26ข พบว่าคลอโรฟิลล์จะอยู่ในส่วนเดียวกับเพกติน ซึ่งจะเห็นส่วนของเพกตินที่ไม่มีคลอโรฟิลล์อยู่ด้วย ส่วนไคโตแซนจะอยู่อย่างกระจัดกระจายบนโครงสร้างของเพกตินและคลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าเมทริกซ์กักเก็บสารสำคัญจากบัวบกไว้ภายในโครงข่าย แล้วมีไคโตแซนมาเสริมความแข็งแรงให้กับโครงข่าย



ภาพที่ 26 ลักษณะของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) โดยใช้กล้องคอนโฟคอลเลเซอร์สแกนนิ่ง

หมายเหตุ - สีแดง คือ ไคโตแซนที่ติดสีย้อมโรดามีน บี

- สีเขียว คือ เพกตินที่ติดสีย้อมฟลูออเรสซีนามีน

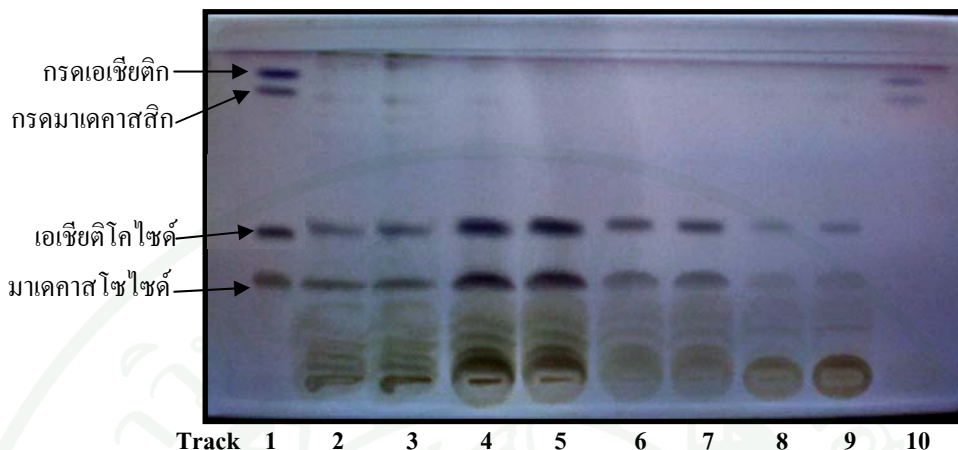
- สีน้ำเงิน คือ คลอโรฟิลล์ในสารสกัดบัวบก

6. การปลดปล่อยสารสำคัญจากบับกโดยใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

เมื่อทำการศึกษาการกักเก็บสารสำคัญจากบับกโดยใช้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินแล้ว จึงนำเมทริกซ์ที่ได้มาศึกษาการปลดปล่อยโดยการเตรียมเมทริกซ์ที่มีลำดับการผสมต่างกัน โดยเตรียมที่พีเอช 5 ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v และเตรียมเมทริกซ์โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นเมทริกซ์ที่มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสูงสุด สารสกัดบับกที่ใช้ในการเตรียมเมทริกซ์นั้นมีความเข้มข้น 1.0 %w/v และมีปริมาณแอลกอฮอล์ในระบบ 4 มิลลิลิตร โดยตรวจพบปริมาณสารประกอบไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด ในสารสกัดบับก ได้แก่ กรดเอเชียติก (16.77 $\mu\text{g/mL}$) เอเชียติโคไซด์ (193.68 $\mu\text{g/mL}$) กรดมาเดลาสติก (42.55 $\mu\text{g/mL}$) และมาเดลาสโคไซด์ (396.90 $\mu\text{g/mL}$) จากนั้นนำเมทริกซ์ที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dried) บดให้เป็นผงแล้วทำการศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญจากบับก ภายใต้การจำลองสภาวะพีเอชต่างๆ ในทางเดินอาหารของมนุษย์ ได้แก่ ในกระเพาะอาหาร (พีเอช 2) ลำไส้เล็กตอนต้น ตอนกลาง ตอนปลาย และลำไส้ใหญ่ (พีเอช 5, 6, 7 และ 9) แล้ววัดปริมาณการปลดปล่อยด้วยเทคนิค HPTLC โดยคำนวณเป็นปริมาณไตรเทอร์ปีนรวมจากสารสำคัญ 4 ชนิดคือ กรดเอเชียติก เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดลาสติก และมาเดลาสโคไซด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีน (Inamdar *et al.*, 1996; Pramongkit, 1997; Sribusarakum, 1997; Gnanapragasama *et al.*, 2004)

จากภาพที่ 27-30 เป็นการแสดง HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญในสารสกัดจากบับกโดยการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ เมทริกซ์ที่มีลำดับการผสมโดยการเติมสารสกัดบับกในสารละลายไคโตแซน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายเพกติน (ภาพที่ 27) เมื่อแช่ในพีเอช 2 เป็นระยะเวลา 30 (track 2) และ 60 (track 3) นาที แล้วนำสารละลายส่วนสไปวัดปริมาณการปลดปล่อยด้วยเทคนิค HPTLC จะปรากฏแถบสีของมาเดลาสโคไซด์และเอเชียติโคไซด์ ที่มีความเข้มของแถบสีและพื้นที่ใต้กราฟน้อยกว่าเมทริกซ์ที่แช่ในพีเอช 5 (track 4 และ 5) เมื่อเมทริกซ์ผ่านไปยังพีเอช 6 (track 6 และ 7) และ 7 (track 8 และ 9) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมงและ 2 ชั่วโมง พบว่ามีการปลดปล่อยมาเดลาสโคไซด์และเอเชียติโคไซด์ลดลง และเริ่มมีการปลดปล่อยกรดมาเดลาสติก และกรดเอเชียติกในสภาวะพีเอช 7 และ 9 และจะเห็นว่าระยะเวลาที่เมทริกซ์อยู่ในสภาวะพีเอชต่างๆ นานขึ้นมีผลต่อการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนในปริมาณมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการปลดปล่อยกรดมาเดลาสติกและกรดเอเชียติกปริมาณมากขึ้นเมื่อแช่เมทริกซ์ในพีเอช 9 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (track 10) ซึ่งปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนรวมจากสภาวะพีเอชตั้งแต่ 2 ถึง 9 ใช้คำนวณเป็นปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมดที่อยู่ในเมทริกซ์ โดยจะมีการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนรวม ในสภาวะพีเอช 2

(26.17%) น้อยกว่าที่พีเอช 5 (30.81%) ดังภาพที่ 27 และจะมีการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์-
ปีนที่พีเอช 6, 7 และ 9 ดังนี้ คือ 20.87, 11.56 และ 10.59 % ตามลำดับ



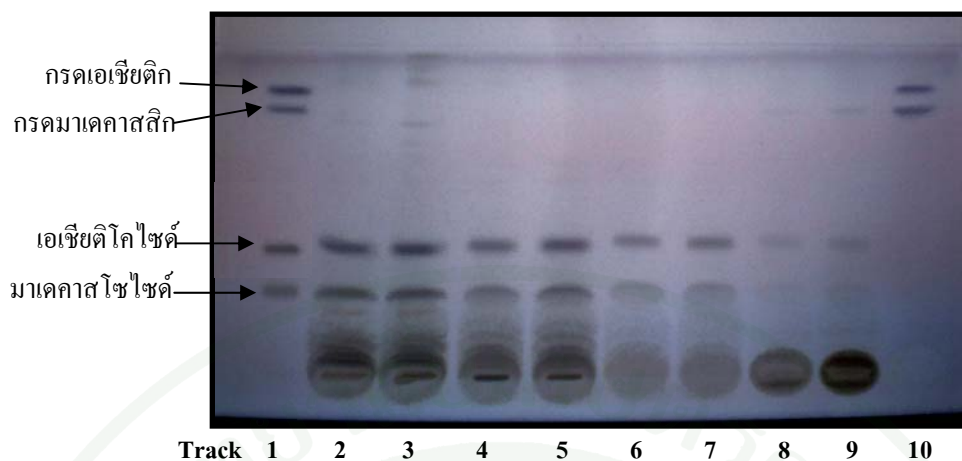
ภาพที่ 27 HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจาก
บัวบกที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ โดยมีลำดับการผสมเจลที่เตรียมในพีเอช 5
โดยเติมสารสกัดบัวบกในสารละลายไคโตแซน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายเพกติน
ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v

หมายเหตุ - Track 1 คือ สารมาตรฐาน

- Track 2 และ 3 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 2 เป็นระยะเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ
- Track 4 และ 5 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 5 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 6 และ 7 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 6 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 8 และ 9 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 7 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 10 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 9 เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

เมื่อทำการเปรียบเทียบเมทริกซ์ที่มีลำดับการผสมต่างกัน โดยเติมสารสกัดบัวบกที่มีความ
เข้มข้น 1.0 %w/v และมีปริมาณแอลกอฮอล์ในระบบ 4 มิลลิลิตร พบว่าจะมีลักษณะการปลดปล่อย
แตกต่างกัน คือ เมทริกซ์ที่เตรียมโดยการเติมสารสกัดบัวบกในสารละลายเพกติน ก่อนการนำไป
ผสมกับสารละลายไคโตแซน (ภาพที่ 28) จะมีการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสภาวะ

พีเอช 2 (32.25%) มากกว่าที่พีเอช 5 (21.13%) ดังภาพที่ 28 และจะมีการปลดปล่อยสารประกอบไทรเทอร์ปีนที่พีเอช 6, 7 และ 9 ดังนี้คือ 14.30, 9.97 และ 22.35 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพีเอชมีผลต่อการปลดปล่อยสารประกอบไทรเทอร์ปีน และเมทริกซ์ที่มีลำดับการผสมโดยการเติมสารสกัดบวบลงในสารละลายไคโตแซน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายเพกตินนั้นเหมาะสมในการนำไปใช้ เนื่องจากเมทริกซ์มีความคงตัว (stable) อยู่ในสภาวะพีเอช 2 ได้ดีกว่าเมทริกซ์ที่เติมสารสกัดบวบลงในสารละลายเพกติน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายไคโตแซน อาจเนื่องมาจากการกลไกการเกิดเมทริกซ์ที่ต่างกัน ความสามารถในการรักษาสารสำคัญเอาไว้ได้จึงต่างกันเมื่อแช่เมทริกซ์ไว้ในสภาวะพีเอชต่าง ๆ โดยเมทริกซ์ที่เตรียมจากการเติมสารสกัดบวบลงในสารละลายไคโตแซน ก่อนการเติมสารละลายเพกติน อาจมีกลไกในการกักเก็บจากการที่สารสำคัญจากบวบทำปฏิกิริยากับไคโตแซนก่อนการทำปฏิกิริยากับเพกติน เมื่อเปลี่ยนลำดับการผสม กลไกในการกักเก็บจึงเปลี่ยนไป สารสำคัญจากบวบอาจทำปฏิกิริยากับเพกตินก่อน แล้วค่อยทำปฏิกิริยากับไคโตแซน ดังนั้นเมทริกซ์ที่ได้จึงอาจมีโมเลกุลของไคโตแซน อยู่รอบนอก ซึ่งไคโตแซนไม่ทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อเมทริกซ์ผ่านไปยังพีเอช 2 จึงทำให้ปลดปล่อยสารสำคัญออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารสำคัญจากบวบมีผลต่อประจุของทั้งไคโตแซนและเพกติน โดยจะเห็นได้จากค่า zeta potential ของสารละลายไคโตแซนและเพกตินมีค่าความเป็นประจุลดลงเมื่อเติมสารสกัดบวบ (ตารางผนวกที่ ค2) แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากบวบสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งกับไคโตแซนและเพกติน

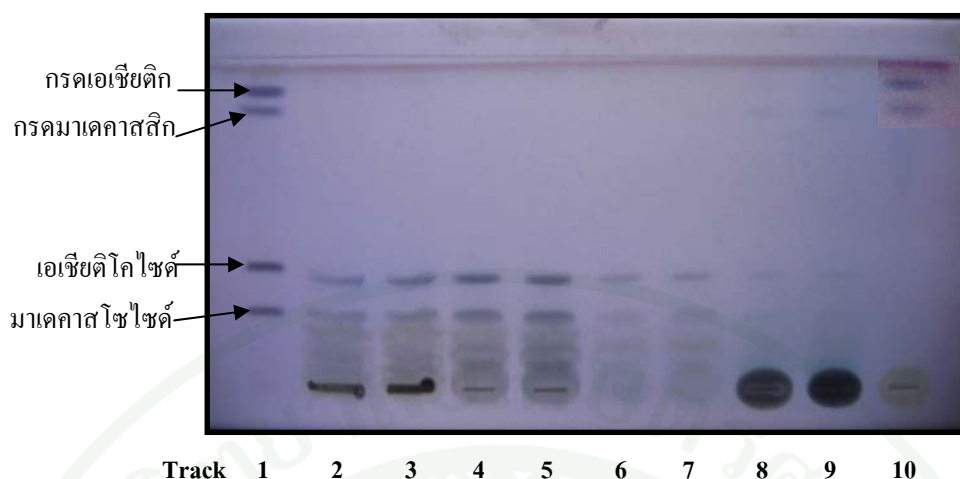


ภาพที่ 28 HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจาก บัวบกที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ โดยมีลำดับการผสมเจลที่เตรียมในพีเอช 5 โดยเติมสารสกัดบัวบกในสารละลายเพกดิน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายไคโตแซน ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v

หมายเหตุ - Track 1 คือ สารมาตรฐาน

- Track 2 และ 3 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 2 เป็นระยะเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ
- Track 4 และ 5 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 5 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 6 และ 7 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 6 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 8 และ 9 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 7 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 10 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 9 เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

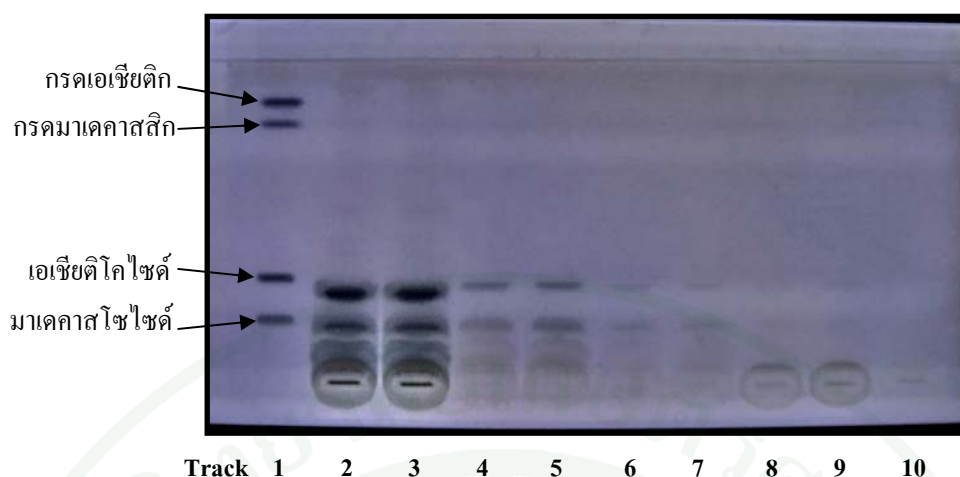
เมื่อตรวจสอบปริมาณการปลดปล่อยสารสำคัญของเมทริกซ์ที่มีการเติมเกลือต่างชนิดกัน คือ เติมนโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ดังภาพที่ 29 และ 30 พบว่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มของแถบสีของสารสำคัญในสารสกัดจากบัวบกต่างกัน



ภาพที่ 29 HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจาก บัวบกที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ โดยมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ในขั้นตอน การเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตเซนและเพกตินที่พีเอช 5 ที่ปริมาณไคโตเซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v

หมายเหตุ - Track 1 คือ สารมาตรฐาน

- Track 2 และ 3 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 2 เป็นระยะเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ
- Track 4 และ 5 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 5 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 6 และ 7 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 6 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 8 และ 9 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 7 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 10 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 9 เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง



ภาพที่ 30 HPTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสำคัญจาก บัวบกที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ โดยมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ใน ขั้นตอนการเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

หมายเหตุ - Track 1 คือ สารมาตรฐาน

- Track 2 และ 3 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 2 เป็นระยะเวลา 30 และ 60 นาที ตามลำดับ
- Track 4 และ 5 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 5 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 6 และ 7 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 6 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 8 และ 9 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 7 เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- Track 10 คือ สารสำคัญที่มีการปลดปล่อยในสภาวะพีเอช 9 เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

จากภาพที่ 29 เมทริกซ์ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์จะแสดงลักษณะการปลดปล่อยคล้ายกับเมทริกซ์ที่ไม่มีการเติมเกลือ คือเมื่อแช่ในพีเอช 2 จะปรากฏแถบสีที่มีความเข้มและพื้นที่ได้กราฟน้อยกว่าพีเอช 5 (track 2-5) เมื่อเมทริกซ์แช่ในพีเอช 6 (track 6 และ 7) และ 7 (track 8 และ 9) พบว่ามีการปลดปล่อยมาเลอิกไซด์และเอซีติโคไซด์ลดลง และเริ่มมีการปลดปล่อยกรดมาเลอิก และกรดเอซีติกในสภาวะพีเอช 7 เมื่อแช่เมทริกซ์ในสภาวะพีเอช 9 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่ามีการปลดปล่อยกรดมาเลอิกและกรดเอซีติกในปริมาณมาก (track 10) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ

การปลดปล่อยสารไทรเทอร์ปีนที่พีเอช 2, 5, 6, 7 และ 9 พบว่ามีการปลดปล่อยดังนี้ คือ 23.97, 42.45, 14.31, 5.88 และ 13.39 % ตามลำดับ

สำหรับการปลดปล่อยของเมทริกซ์ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ดังภาพที่ 30 พบว่ามีการปลดปล่อยมาเคาสโซไซไซด์และเอเซียติโคไซด์ออกมาปริมาณมากในสภาวะพีเอช 2 เนื่องจากที่พีเอช 2 มีแถบสีของสารดังกล่าวที่เข้มกว่าพีเอช 5 (track 2-5) และจะเห็นได้ว่าไม่มีการปลดปล่อยกรดมาเคาสติกและกรดเอเซียติกออกมาเลย อาจเนื่องมาจากเมทริกซ์ที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ไม่สามารถกักเก็บกรดมาเคาสติกและกรดเอเซียติกเอาไว้ได้ โดยแสดงปริมาณการปลดปล่อยสารไทรเทอร์ปีนที่พีเอช 2, 5, 6, 7 และ 9 ดังนี้ คือ 67.61, 23.53, 7.19, 1.67 และ 0 % ตามลำดับ ดังนั้นเมทริกซ์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้คือ เมทริกซ์ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากเมทริกซ์มีความคงตัว (stable) อยู่ในสภาวะพีเอช 2 ได้ดีกว่าเมทริกซ์ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ อาจเนื่องมาจากการกลไกการเกิดเมทริกซ์ที่แตกต่างกัน ความสามารถในการรักษาสารสำคัญเอาไว้ได้จึงต่างกันเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชต่าง ๆ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าพีเอชมีผลต่อการปลดปล่อยสารประกอบไทรเทอร์ปีนอาจเนื่องจากเมทริกซ์เกิดการพองตัวเมื่อพีเอชเปลี่ยนแปลงไป (พีเอช 2, 5, 6, 7 และ 9) ความสมดุลของประจุภายในโครงข่ายเจลและระดับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนและเพกตินก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลง แล้วจะส่งผลให้เกิดการพองตัวเนื่องจากเกิดการแตกตัวของสารประกอบเชิงซ้อนและปลดปล่อยสารสำคัญออกมา (Bigucci *et al.*, 2008) ซึ่งกลไกการพองตัวของระบบสารประกอบเชิงซ้อนเมื่อแช่ในสารละลายที่เป็นกรดและเบส จะเกิดการแตกออกของพันธะระหว่างโมเลกุล (Kubota and Shimoda, 2005) ดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 กลไกการพองตัวของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพอลิเมอร์ที่มีประจุตรงข้าม

ที่มา: Kubota and Shimoda (2005)

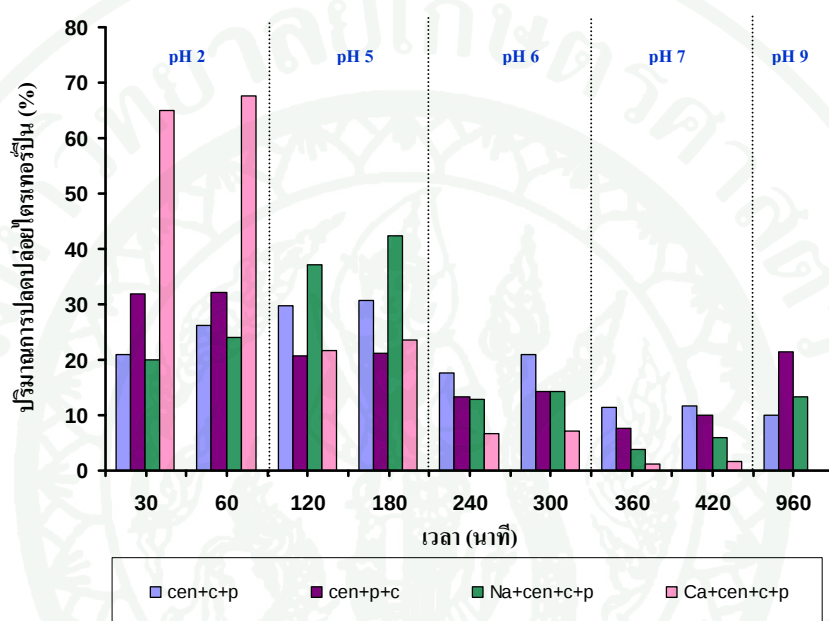
จากภาพที่ 32 ได้เปรียบเทียบปริมาณการปลดปล่อยสารสำคัญของเมทริกซ์ที่เตรียมในสภาวะต่างๆ โดยพบว่าเมทริกซ์ที่เตรียมโดยเติมสารสกัดบัวบกในสารละลายไคโตแซน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายเพกติน (ภาพที่ 32) จะเกิดการปลดปล่อยสารสำคัญที่พีเอช 5 มากกว่า

พีเอช 2 เนื่องจากที่พีเอช 5 ประจุลบของเพกตินภายในเมทริกซ์เกิดการผลักกันทำให้เมทริกซ์เกิดการพองตัว และปลดปล่อยสารสำคัญออกมา นอกจากนี้เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินเป็นโครงข่ายเจลที่จับกันอย่างแข็งแรง จึงสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ดี จึงทำให้เกิดการปลดปล่อยสารสำคัญออกมาน้อย (Naidu *et al.*, 2009) เมื่อนำเมทริกซ์แช่ในสารละลายที่พีเอช 6 และ 7 พบว่ามีการปลดปล่อยสารสำคัญออกมาในปริมาณลดลง และจะมีการปลดปล่อยเพิ่มขึ้นอีกเมื่อเมทริกซ์ผ่านไปยังพีเอช 9 อาจเนื่องจากที่พีเอช 6 และ 7 เป็นช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ทำให้เมทริกซ์เกิดการพองตัวได้น้อย ทำให้เกิดการปลดปล่อยสารสำคัญออกมาน้อย เมื่อเมทริกซ์ผ่านไปยังพีเอช 9 ซึ่งมีความเป็นด่างทำให้เมทริกซ์เกิดการพองตัวมากขึ้นและปลดปล่อยสารสำคัญที่เหลืออยู่ภายในเมทริกซ์ออกมา ดังภาพที่ 32

เมื่อลำดับการผสมเมทริกซ์เปลี่ยนไป (ภาพที่ 32) โดยเติมสารสกัดบัวบกที่มีความเข้มข้น 1.0 %w/v และมีปริมาณแอลกอฮอล์ในระบบ 4 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเพกติน ก่อนการนำไปผสมกับสารละลายไคโตแซน พบว่าลักษณะของการปลดปล่อยในสภาวะพีเอชต่างๆ แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งจะมีการปลดปล่อยสารสำคัญที่พีเอช 2 ในปริมาณที่มากกว่าพีเอช 5 อาจเนื่องมาจากลำดับการผสมเปลี่ยนไปทำให้เกิดเมทริกซ์ที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน คือสารสำคัญอาจจะจับกับเพกตินก่อนไคโตแซน ซึ่งได้โครงข่ายของเมทริกซ์ที่ไม่ทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร อาจเนื่องจากเมทริกซ์ที่ได้อาจมีโมเลกุลของไคโตแซนอยู่รอบนอก ซึ่งไคโตแซนไม่ทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อแช่เมทริกซ์ในสภาวะพีเอช 2 จึงมีการปลดปล่อยสารสำคัญออกมาในปริมาณมาก แสดงให้เห็นว่าลำดับการผสมที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณการปลดปล่อยสารสำคัญแตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเมทริกซ์ที่มีการเตรียมโดยมีการเติมเกลือต่างชนิดกัน คือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) พบว่าสารประกอบไตรเทอร์ปีนถูกปลดปล่อยออกมาในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 32 และพบว่าลักษณะการปลดปล่อยของเมทริกซ์ที่เติม NaCl มีลักษณะการปลดปล่อยสารสำคัญทั้งในสภาวะของกระเพาะและลำไส้ คล้ายคลึงกับเมทริกซ์ที่ไม่เติมเกลือ คือมีปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสภาวะพีเอช 2 น้อยกว่าพีเอช 5 และมีการปลดปล่อยสารสำคัญเพียงเล็กน้อยเมื่อแช่ในพีเอช 6 และ 7 ส่วนเมทริกซ์ที่มีการเติม CaCl_2 พบว่ามีปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสภาวะพีเอช 2 มากกว่าพีเอช 5 ซึ่งเห็นได้ว่าเมทริกซ์ที่เติม NaCl สามารถรักษาสารสำคัญเอาไว้ได้ดีกว่าเมทริกซ์ที่เติม CaCl_2 เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร (พีเอช 2) อาจเนื่องมาจากกลไกการเกิดเมทริกซ์ต่างกัน เพกตินชนิด LM สามารถเกิดเจลได้กับไอออนของ Ca^{2+} (Dea, 1989; Lofgren and Hermansson, 2007) เมื่อมีการเตรียมเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติม CaCl_2 นั้น จึง

เป็นไปได้ว่าเพกตินเลือกจับกับ Ca^{2+} แล้วค่อยจับกับไคโตแซน เมื่อแช่เมทริกซ์ที่พีเอช 2 จึงอาจทำให้เมทริกซ์ที่เติม CaCl_2 ซึ่งมีการจับกันเป็นเมทริกซ์ที่ไม่ทนต่อสภาวะกรด ดังนั้นจึงมีการปลดปล่อยสารประกอบไทรเทอร์ปีนออกมาในปริมาณมาก จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมทริกซ์ที่มีการเติมเกลือต่างชนิดกันมีผลต่อปริมาณการปลดปล่อยสารประกอบไทรเทอร์ปีนต่างกัน โดยพีเอชมีผลต่อการปลดปล่อยสารสำคัญจากบับกที่กักเก็บภายในเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน



ภาพที่ 32 ปริมาณการปลดปล่อยไทรเทอร์ปีน (%) ในสภาวะพีเอชต่างๆ

หมายเหตุ - cen+c+p คือ เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนต่อเพกตินที่กักเก็บสารสกัดบับกโดยมีการเติมไคโตแซนก่อนเพกติน โดยเตรียมที่พีเอช 5

- cen+p+c คือ เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนต่อเพกตินที่กักเก็บสารสกัดบับกโดยมีการเติมเพกตินก่อนไคโตแซน โดยเตรียมที่พีเอช 5

- Na+cen+c+p คือ เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนต่อเพกตินที่กักเก็บสารสกัดบับกโดยมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ โดยเตรียมที่พีเอช 5

- Ca+cen+c+p คือ เมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนต่อเพกตินที่กักเก็บสารสกัดบับกโดยมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ โดยเตรียมที่พีเอช 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน และตรวจสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก พบว่าพีเอช ปริมาณไคโตแซน-เพกติน และเกลือมีผลต่อการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนและประสิทธิภาพในการกักเก็บ โดยเมทริกซ์ที่เตรียมในสภาวะพีเอช 5 ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v มีปริมาณเมทริกซ์และความแข็งแรงของโครงข่ายสูงสุดในช่วงที่ศึกษา คือ 8.96 g/100 mL และ 7180 Pa ตามลำดับ เมื่อทำการเติมเกลือที่มีชนิดของไอออนแตกต่างกันพบว่าจะให้ลักษณะของเมทริกซ์ที่ต่างกัน เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 100 mM จะให้ปริมาณเมทริกซ์และความแข็งแรงของโครงข่ายสูงสุด (15.89 g/100mL และ 12748 Pa ตามลำดับ) เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ 50 mM จะให้ปริมาณเมทริกซ์และความแข็งแรงของโครงข่ายสูงสุด (14.48 g/100mL และ 11050 Pa ตามลำดับ)

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บเมื่อมีการเติมสารสกัดบัวบก พบว่าที่ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v ที่พีเอช 5 สามารถกักเก็บสารสำคัญได้สูงสุดในช่วงที่ศึกษา (53.67%) เมื่อเติมเกลือลงไป พบว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเมทริกซ์ที่ไม่เติมเกลือ โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ 100 mM และแคลเซียมคลอไรด์ 50 mM จะให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสูงสุด คือ 68.03 และ 70.19 % ตามลำดับ

เมื่อมีการศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยสารประกอบไตรเทอร์ปีนพบว่าลำดับการผสมและชนิดของเกลือที่เติมในเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน มีผลต่อการปลดปล่อยสารสำคัญจากบัวบกขึ้นกับค่าสภาวะพีเอชต่างๆ ในทางเดินอาหาร โดยเมทริกซ์ที่เติมสารละลายเพกตินลงในสารละลายไคโตแซน จะมีการปลดปล่อยสารสำคัญที่พีเอช 2 (26.17%) น้อยกว่าเมทริกซ์ที่เติมสารละลายไคโตแซนลงในสารละลายเพกติน (32.25%) ส่วนเมทริกซ์ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ จะทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ดีเช่นกัน โดยจะมีการปลดปล่อยสารสำคัญที่พีเอช 2 (23.97%) น้อยกว่าเมทริกซ์ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ (67.61%) จะเห็นได้ว่าเมทริกซ์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้คือเมทริกซ์ที่เติมสารละลายเพกตินลงในสารละลายไคโตแซน และเมทริกซ์ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากเมทริกซ์จะมีความคงตัวต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการเกิดเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีวิธีการเตรียมเมทริกซ์โดยวิธีต่างๆ กับวิธีการเตรียมเมทริกซ์ที่ใช้งานวิจัย และควรตรวจสอบความแตกต่างของประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญด้วย นอกจากนี้ควรมีการศึกษาถึงการใช้ไฮโดรคอลลอยด์ตัวอื่นๆ ในการเตรียมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วนำมาเปรียบเทียบกับเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

ควรมีการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโครงสร้างของเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมเกลือ (NaCl และ CaCl_2) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดและกล้องคอนโฟคอลเลเซอร์สแกนนิ่ง เพื่อให้ทราบถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและลักษณะการกระจายตัวของไคโตแซนและเพกตินภายในเมทริกซ์ระหว่างไคโตแซนและเพกติน

ในขั้นตอนการสกัดบวบควรมีการศึกษาวิธีการทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์ คือ ควรให้มีสารสำคัญเพียง 4 ชนิด (มาเดลาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดลาสติก และกรดเอเชียดิก) เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากการทดลองครั้งนี้เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค HPTLC พบว่า มีสารอยู่หลายชนิดในสารสกัดบวบจึงทำให้แถบสีที่ปรากฏอยู่ใกล้กัน การวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟจึงทำได้ยาก

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2546. พืชผักผลไม้ไทยมีคุณค่าเป็นทั้งอาหารและยา. สารความรู้ทางการเกษตร. แหล่งที่มา: http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio45-46/45-460032.htm, 10 มิถุนายน 2552.
- ธงชัย สุวรรณสิขิน. 2549. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมเกษตร. ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธีรพล ประมวลกิจจา. 2534. อุตสาหกรรมผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง. อุตสาหกรรมสาร 34: 1-7.
- นฤมล น้อยหอย. 2551. ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิธิยา รัตนานนท์. 2545. เคมืออาหาร. ครั้งที่ 1. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์. 2551. เพกติน: พอลิเมอร์ชีวภาพทางเภสัชกรรม. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- ภาวดี เมธะคานนท์, อศิรา เฟื่องฟูชาติ และ กองเกียรติ คงสุวรรณ. 2542. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคติน-ไคโตแซน, น. 1-4. ใน **Chitin-chitosan technical note**. กลุ่มไคติน-ไคโตแซนโปรแกรมการวิจัยพอลิเมอร์ชีวภาพ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2549. หลักการประยุกต์ไฮโดรคอลลอยด์ในผลิตภัณฑ์, น. 275. ใน รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, บรรณาธิการ. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิสิฐ จະวะสิต และ วันทนีย์ วรวงศ์ทัต. 2535. คุณสมบัติและการใช้ประโยชน์ของไคโตซานซึ่งผลิตจากกากเหลือทิ้งของโรงงานแปรรูปกุ้งและปูในประเทศไทย. วารสารการประมง 45 (6): 1099-1110.

สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน. 2552. น้ำใบข้าวบก. น้ำดื่มเพื่อสุขภาพ. แหล่งที่มา: <http://school.obec.go.th/snaree2/knowledge/healthy.html>, 11 ตุลาคม 2552.

Anomymous. 1989. Chitosan makes the grade. Manufacture Chemist, pp. 31-35. **Official method of analysis of the association of official chemists.** The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Argin-Soysal, S., P. Kofinas and Y.M. Lo. 2009. Effect of complexation conditions on xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels. **Food Hydrocolloids.** 23: 202-209.

Arguelles-Monal, W., F.M. Goycoolea, C. Peniche and I. Higuera-Ciapara. 1998. Rheological study of the chitosan-glutaraldehyde chemical gel system. **Polym. Gels. Netw.** 6: 429-440.

Asakawa, Y., R. Matsuda and T. Takemoto. 1982. Mono- and sesquiterpenoids from hydrocotyle and *Centella* species. **Phytochem.** 21: 2590-2592.

Asano, T. 1978. Chitosan application in wastewater sludge treatment, pp. 11-13. In R.A.A. Muzzarelli and E.F. Periser, eds. **Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan. 1. ed.** Boston, Cambridge.

Ashford, M., J. Fell, D. Attwood, H. Sharma and P. Woodhead. 1993. An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon. **J. Control. Release.** 26: 213-220.

Babu, T.D., G. Kuttan and J. Padikkala. 1995. Cytotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. **J. Ethnopharmacol.** 48: 53-57.

Bader, G., V. Wray, U. Just and K. Hiller. 1998. Enzymatic hydrolysis of the cytotoxic triterpenoid glycoside virgaureasaponin. **Phytochemistry.** 49: 153-156.

Bakan J.A. 1978. Microencapsulation, pp. 499-507. In Peterson M.S. and Johnson A.H., eds. **In Encyclopedia of Food Science.** AVI Publishing Co., Westport, CT.

- Benitez, E.I., D.B. Genovese and J.E. Lozano. 2007. Scattering efficiency of a cloudy apple juice: Effect of particles characteristics and serum composition. **Food. Res. Int.** 40: 915-922.
- Beysseriat, M., E.A. Decker and D.J. McClements. 2006. Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model. **Food Hydrocolloids.** 20: 800-809.
- Bhise, K.S., R.S. Dhumal, B. Chauhan, A. Paradkar and S.S. Kadam. 2007. Effect of oppositely charged polymer and dissolution medium on swelling, erosion, and drug release from chitosan matrices. **AAPS PharmSciTech.** 8: E1-E9.
- Bigucci, F., B. Luppi, T. Cerchiara, M. Sorrenti, G. Bettinetti, L. Rodriguez and V. Zecchi. 2008. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. **Eur. J. Pharm. Sci.** 35: 435-441.
- Brzeski, L.L. and J.F. Prudden. 1987. Chitin and chitosan-putting waste to good use. **INFOFISH International.** 5: 31-36.
- Cesarone, M.R., A. Laurora, M.T. De sanctis and G. Belcaro. 1992. Activity of *Centella asiatica* in venous insufficiency. **Minerva Cardioangiol.** 40 (4): 137-143.
- Chang, K.L.B. and J. Lin. 2000. Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. **Carbohydr. Polym.** 43: 163-169.
- Chaplin, M. 2008. **Hofmeister Serie.** Water Structure and Science. Available Source: www.lsbu.ac.uk/water/hofmeist.html, February 7, 2008.
- Chatterjee, I.K., A. Chakraborty and M. Pathak. 1992. Effect of plant extract *Centella asiatica* (Linn.) on cold restraint stress ulcer Rats. **Ind. J. Exp. Biol.** 30: 889-91.
- Chelet, F., M. Tabrizian, S. Dumitriu, S. Chornet, C.H. Rivard and L. Yahia. 2000. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media. **J. Biomed. Mater. Res.** 53: 592-599.

- Chen, J., S. Jo and K. Park. 1995. Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery. **Carbohydr. Polym.** 28: 69-76.
- Chen, W.B., L.F. Wang, J.S. Chen and S.Y. Fan. 2005. Characterization of polyelectrolyte complexes between chondroitin sulfate and chitosan in the solid state. **J. Biomed. Mater. Res., Part A.** 75A: 128-137.
- Choi, J.H., Kim, D.H., Sung, W.J. and Oh, S.K. 1982. Kinetic studies on the thermal degradation of ginsenosides in ginseng extract. **Hanguk Sikp'um Kwahakhoe Chi.** 14: 197-202.
- Chu, C.H., H. Kumagai and K. Nakamura. 1996. Application of polyelectrolyte complex gel composed of xanthan and chitosan to the immobilization of *Corynebacterium glutamicum*. **J. Appl. Polym. Sci.** 60: 1041-1047.
- _____, T. Sakiyama and T. Yano. 1995. pH-sensitive swelling of a polyelectrolyte complex gel prepared from xanthan and chitosan. **Biosci. Biotech. Bioch.** 59 (4): 717-719.
- Damodaran, S. 1994. Structure-function relationship of food protein, pp. 1-38. *In* N.S. Hettiarachchy and G.R. Ziegler, eds. **Protein Functionality in Food System.** Marcel Dekker Inc., New York.
- Daniel, J.R. and J.N. Bemiller. 2001. **Pectin.** Carbohydrates. Available Source: http://www.cfs.purdue.edu/class/f&n630/Virt_Class_2/pectin.htm, January 5, 2007.
- Daubert, C.R. and E.A. Foegeding. 1998. Rheological principles for food analysis, pp. 551-569. *In* S.S. Nielsen, ed. **Food Analysis.** Aspen, Maryland.
- Dautzenberg, H. 1997. Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems. 1. Effect of salt: polyelectrolyte complex formation in the presence of NaCl. **Macromolecules.** 30: 7810-7815.
- Dea, I.C.M. 1989. Industrial polysaccharides. **Pure & Appl. Chem.** 61 (7): 1315-1322.

de Vasconcelos, C.L., P.M. Bezerril, D.E.S. dos Santos, T.N.C. Dantas, M.R. Pereira and J.L.C. Fonseca. 2006. Effect of molecular weight and ionic strength on the formation of polyelectrolyte complexes based on poly(methacrylic acid) and chitosan.

Biomacromolecules. 7: 1245-1252.

Donald L.W. 2000. **Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology.** Gupta, Marcel Dekker, New York.

Dumitriu, S. and E. Chornet. 1996. Polyionic hydrogels as supports for enzyme immobilization, pp. 527-542. *In* R.A.A. Muzzarelli, ed. **Chitin enzymology.** Atec, Italy.

_____, P. Magny, D. Montane, P.F. Vidal and _____. 1994. Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan: their properties as supports for enzyme immobilization. **J. Bioact. Compat. Pol.** 9: 184-209.

Dziezak J.D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technol.** (42): 136-151.

George, M. and T.E. Abraham. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **J. Control. Release.** 114: 1-14.

George, V.K. and J.L. Gnanarethinan. 1975. Free amino acids in *Centella asiatica*. **Curr. Sci.** 44 (21): 790.

Gnanapragasama, A., K.K. Ebenezer, V. Sathisha, P. Govindarajub and T. Devakia. 2004. Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. **Life Science.** 76: 585-597.

Gupta, K.C. and M.N.V. Ravikumar. 2001. Studies on semi-interpenetrating polymer network beads of chitosan-poly(ethylene glycol) for the controlled release of drugs. **J. Appl. Polym. Sci.** 80: 639-649.

Harborne, J. B. 1983. **Phytochemical Method: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.** 2nd ed. Chapman and Hall Ltd, New York, U.S.A.

- Hirano, S. 1996. Chitin biotechnology applications. **Biotechnol. Annu. Rev.** 2: 237-258.
- Humphrey, A.M. 1980. Chlorophyll. **Food Chem.** 5: 57-67
- Ikeda, S. and K. Nishinari. 2001. "Weak gel"-type rheological properties of aqueous dispersion of nonaggregated K-carrageenan helices. **J. Agric. Food Chem.** 49: 4436-4441.
- Illum, L., I. Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe, A.N. Fisher and S.S. Davis. 2001. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 51: 81-96.
- Inamdar, P.K., A.B. Yeole, A.B. Ghogare and N.J. de Souza. 1996. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. **J. Chromatogr. A.** 742: 127-130.
- Jia, G. and X. Lu. 2008. Enrichment and purification of madecassoside and asiaticoside from *Centella asiatica* extracts with macroporous resins. **J. Chromatogr. A.** 1193: 136-141.
- Khalid, M.N., L. Ho, F. Agnely, J.L. Grossiord and G. Couarraze. 1999. Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network. Comparison with a chitosan reference gel. **S.T.P. Pharma Sci.** 9 (4): 359-364.
- Kim, H.J., H.C. Lee, J.S. Oh, B.A. Shin, C.S. Oh, R.D. Park, K.S. Yang and C.S. Cho. 1999. Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application. **J. Biomater. Sci., Polym. Ed.** 10: 543-556.
- Kim, K.K., E.S. Ksok, G.W. Lee, J.K. Park, M.S. Park and U.K. Jee. 1998. Preparation and skin permeation of poloxamer 407 hydrogel with extract of *Centella asiatica*-beta-cyclodextrin solid dispersion system. **Yakhak. Hoe. Chi.** 28 (1): 15-23.
- Kim, T.H., Y.H. Park, K.J. Kim and C.S. Cho. 2003. Release of albumin from chitosan-coated pectin beads in vitro. **Int. J. Pharm.** 250: 371-383.
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. **Food Technol.** 38 (1): 85-97.
- _____, M.D. Beaumont, C.S. Caster, H. Dornenburg, B. Gross, Y. Pandya and L.G. Romagnoli. 1990. Plant tissue culture for the production of naturally derived food ingredients. **Food Technol.** 44 (6): 71-79.

- Kormin, S. 2005. **The effect of heat processing on triterpene glycosides and antioxidant activity of herbal pegaga (*Centella asiatica* L. Urban) drink.** Master of Engineering thesis, Technological University of Malaysia.
- Kubota, N. and Y. Kikuchi. 1998. Macromolecular complexes of chitosan, p. 595. *In* S. Dumitriu, ed. **Polysaccharide: Structural Diversity and Functional Versatility.** Marcel Dekker, New York.
- _____ and K. Shimoda. 2005. Macromolecular complexes of chitosan, pp. 679-706. *In* S. Dumitriu, ed. **Polysaccharides structural diversity and functional versatility.** Marcel Dekker, New York.
- Lertsutthiwong, P., S. Chandkrachang, M.M. Nazhad and W.F. Stevens. 2002. Chitosan as a dry strength agent for paper. **Appita J.** 55 (3): 208-212.
- Liao, I.C., A.C.A. Wan, E.K.F. Yim and K.W. Leong. 2005. Controlled release from fibers of polyelectrolyte complexes. **J. Control. Release.** (104): 347-358.
- Livney, Y.D. 2008. Complexes and conjugates of biopolymers for delivery of bioactive ingredients via food, pp. 234-246. *In* N. Garti, ed. **Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals.** Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, England.
- Lofgren, C. and A.M. Hermansson. 2007. Synergistic rheological behavior of mixed HM/LM pectin gels. **Food Hydrocolloids.** 21 (3): 480-486.
- Martinez-Ruvalcaba, A., E. Chornet and D. Rodrigue. 2007. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. **Carbohydr. Polym.** 67: 586-595.
- Marudova, M., A.J. MacDougall and S. G. Ring. 2004. Pectin-chitosan interactions and gel formation. **Carbohydr. Res.** 339: 209-216.
- _____, S. Lang, G.J. Brownsey and S.G. Ring. 2005. Pectin-chitosan multilayer formation. **Carbohydr. Res.** 340: 2144-21.

- Mezger, T.G. 2002. **The rheology-handbook**. Vincentz, Stuttgart.
- Michaels, A.S. and R.G. Miekka. 1961. Polycation-polyanion complexes preparation and properties of poly-(vinylbenzyltrimethylammonium) poly-(styrenesulfonate). **J. Phy. Chem.** 65: 1765-1773.
- Montechchio, G.P., A. Samaden, S. Carbone, M. Vigotti, S. Siragusa and F. Piovela. 1991. *Centella asiatica* triterpenic fraction (CATTF) reduces the number of circulating endothelial cells in subjects with post phlebitic syndrome. **Haematologica.** 76: 256-259.
- Morikawa, K. and J. Yanagida. 1981. Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. **J. Biochem.** 89: 693-696.
- Muangnoi, C. 2007. **Bioaccessibility, Cellular Uptake, and Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Triterpenoids from *Centella asiatica* (Linn.) Urban.** The degree of master of science (nutrition) thesis, Mahidol University.
- Munjeri, O., P. Hodza, E.E. Osim and C.T. Musabayane. 1998. An investigation into the suitability of amidated pectin hydrogel beads as a delivery matrix for chloroquine. **J. Pharm. Sci.** 87: 905-908.
- Naidu, V.G.M., K. Madhusudhana, R.B. Sashidhar, S. Ramakrishna, R.K. Khar, F.J. Ahmed and P.V. Diwan. 2009. Polyelectrolyte complexes of gum kondagogu and chitosan, as diclofenac carriers. **Carbohydr. Polym.** 76: 464-471.
- Nakajima, H. and K. Ajiyoshi. 1972. Studies on the treatment of keloids and hypertrophic scars with madecassol. **Medical Consultation and New Remedy.** 9: 433-444.
- Nordby, M.H., A.L. Kjoniksen, B. Nystrom and J. Roots. 2003. Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan. Rheology. **Biomacromolecules.** 4: 337-343.
- Okhamafe, A.O., B. Amsden, W. Chu and M.F.A. Goosen. 1996. Modulation of protein release from chitosan-alginate microcapsules using the pH-sensitive polymer hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate. **J. Microencapsul.** 13: 497-508.

- Pai, V., M. Srinivasarao and S.A. Khan. 2002. Evolution of microstructure and rheology in mixed polysaccharide systems. **Macromolecules**. 35: 1699-1707.
- Park, B.C., K.O. Bosire, E.S. Lee, Y.S. Lee and J.A. Kim. 2004. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma. **Cancer Lett.** 218 (1): 81-90.
- Pramongkit, K. 1997. **Active constituents of *Centella asiatica* (Linn.) Urban in Thailand.** M.Sc. thesis, Mahidol University.
- Prun, N., B.B. Illel and J. Raynaud. 1983. Flavonoid glycosides from *Centella asiatica* L. (Umbelliferae). **Pharmazie**. 38 (6): 423.
- Ramaswamy, A.S., S.M. Periasamy and N.K. Basu. 1970. Pharmacological studies on *Centella asiatica*. **J. Res. Indian Med.** 4: 160.
- Rao, M.V.R.A. 1973. Effect of Mandookaparni (*Centella asiatica*) on the general mental ability (Medhya) of mentally retarded children. **J. Res. Indian Med.** 8: 9-16.
- Rao, P.S. and T.R. Seshadri. 1969. Variation in the chemical composition of Indian samples of *Centella asiatica*. **Curr. Sci.** 38 (4): 77.
- Rastogi R.P., B. Sarkar and M.L. Dhar. 1960. Chemical examination of *Centella asiatica* Linn.: part I. Isolation of the chemical constituents. **J. Sci. Ind. Res-B.** 19 (7): 252-257.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Prog. Polym. Sci.** 31: 603-632.
- _____ and A. Moroni. 2009. Rheological behavior of binary and ternary mixtures of polysaccharides in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**. 23: 1720-1728.
- Rolin, C., B.U. Nielsen and P.E. Glahn. 1998. Pectin, pp. 377-431. In D. Severian, ed. **Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility**. Marcel Dekker Inc., New York.
- Rosen, H., A. Blumenthal and J. McCallum. 1967. Effect of asiaticoside on wound healing in the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 125(1): 279-280.

- Rusu-Balaita, L., J. Desbrieres and M. Rinaudo. 2003. Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability. **Polym. Bull.** 50: 91-98.
- Saether, H.V., H.K. Holme, G. Maurstad, O. Smidsrod and B.T. Stokke. 2008. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydr. Polym.** 74: 813-821.
- Sandford, P. 1992. High purity chitosan and alginate: Preparation, analysis and applications, pp. 250-269. In R. Chandrasekaran, eds. **Frontiers in carbohydrate research-2**. Elsevier, London.
- Sangsirinavin, C. 1978. **Pharmacology of Extract of *Centella asiatica***. M.S. Thesis, Mahidol University.
- Sara J.R. and A.R. Gary. 1995. **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. 590 ed. American Chemical Society, Washington,DC.
- Savary, G., S. Handschin, B.C. Petit, N. Cayot and J.L. Doublier. 2008. Structure of polysaccharide-starch composite gels by rheology and confocal laser scanning microscopy: Effect of the composition and of the preparation procedure. **Food Hydrocolloids**. 22: 520-530.
- Schauer, C.L., M.S. Chen, M. Chatterley, K. Eisamann, E.R. Welsh, R.R. Price, P.E. Schoen and F.S. Liger. 2003. Color changes in chitosan and poly(allyl amine) films upon metal binding. **Thin. Solid. Films**. 434: 250-257.
- Schorsch, C., C. Garnier and J.L. Doublier. 1997. Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: comparison of guar gum with locust bean gum. **Carbohydr. Polym.** 34: 165-175.
- Shim, P.J., J.H. Park and M.S. Chang. 1996. Asiaticoside mimetics as wound healing agent. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 6 (24): 2937-2940.
- Shin, H.S., G. Choi, M.H. Lee and K.N. Park. 1982. Clinical trails of madecassol (*Centella asiatica*) on gastrointestinal ulcer patient. **Korean J. Gastroenterol.** 14 (1): 49-56.

- Shukla, A., A.M. Rasik, G.K. Jain, R. Shankar, D.K. Kulshrestha and B.N. Dhawan. 1999. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. **J. Ethnopharmacol.** 65: 1-11.
- Sing, B. and R.P. Rastogi. 1969. A reinvestigation of triterpenes of *Centella asiatica*. **Phytochemistry.** 8: 917-921.
- Sinha, V.R. and R. Kumria. 2001. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **Int. J. Pharm.** 224: 19-38.
- Sriamornsak, P. and J. Nunthanid. 1998. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. **Int. J. Pharm.** 160: 207-212.
- Sribusarakum, A. 1997. **Chromatographic Determination of Active Constituents of *Centella asiatica* (Linn.) Urban in Thailand.** M.S. Thesis, Mahidol University.
- Tan, S.C., T.K. Tan, S.M. Wong and E. Khor. 1996. The chitosan yield at zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydr. Polym.** 30: 239-242.
- Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. Chinese drugs of plant origin. **Springer Verlag.** : 273-276.
- Vasiliu, S., M. Popa and M. Rinaudo. 2005. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. **Eur. Polym. J.** 41: 923-932.
- Vogel, H.G., N. de Souza and A. D'Sa. 1990. Effect of terpenoids isolated from *Centella asiatica* on granuloma tissue. **Acta therapeutica.** 16: 285-298.
- Wang, X., J. Wang, Y. Wang and H. Yan. 2004. Salt effect on the complex formation between cationic gemini surfactant and anionic polyelectrolyte in aqueous solution. **Langmuir.** 20: 9014-9018.
- Wu, Y., Y. Yang, C. Wang, J. Hu and S. Fu. 2005. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **Int. J. Pharm.** 295: 235-245.

- Yu, C.Y., B.C. Yin, W. Zhang, S.X. Cheng, X.Z. Zhang and R.X. Zhuo. 2009. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**. 68: 245–249.
- Zhang, Y. and P.S. Cremer. 2006. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 10: 658-663.
- Zhou, S.B., X.M. Deng and X.H. Li. 2001. Investigation on a novel core-coated microspheres protein delivery system. **J. Control. Release**. 75: 27-36.





ก1. วิธีคำนวณปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกติน

1.1 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1 %w/v

1.1.1 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

1.1.2 เตรียมสารละลายเพกติน 0.10 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.10 (100)$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

1.1.3 เติมสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ = 100-50-10 =40 mL

1.2 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.125 %w/v

1.2.1 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

1.2.2 เตรียมสารละลายเพกติน 0.125 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.125 (100)$$

$$V_1 = 12.5 \text{ mL}$$

1.2.3 เติมสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ = 100-50-12.5 =37.5 mL

1.3 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.15 %w/v

1.3.1 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

1.3.2 เตรียมสารละลายเพกติน 0.15 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.15 (100)$$

$$V_1 = 15 \text{ mL}$$

1.3.3 เติมน้ำละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ = 100-50-15 =35 mL

1.4 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.125 %w/v

1.4.1 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

1.4.2 เตรียมสารละลายเพกติน 0.175 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.175 (100)$$

$$V_1 = 17.5 \text{ mL}$$

1.4.3 เติมน้ำละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ = 100-50-17.5 =32.5 mL

ก2. วิธีคำนวณปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการเติมเกลือ

2.1 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v, NaCl หรือ CaCl₂ 0.05 M

2.1.1 เตรียมสารละลายเกลือ 0.05 M จาก stock solution 1.00 M

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.05 (100)$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

2.1.2 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

2.1.3 เตรียมสารละลายเพกติน 0.175 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.175 (100)$$

$$V_1 = 17.5 \text{ mL}$$

2.1.4 เติมน้ำละลายโซเดียมแอสซิเตทบัฟเฟอร์ = 100-5- 50-17.5 =27.5 mL

2.2 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v, NaCl หรือ CaCl₂ 0.10 M

2.2.1 เตรียมสารละลายเกลือ 0.10 M จาก stock solution 1.00 M

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.10 (100)$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

2.2.2 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

2.2.3 เตรียมสารละลายเพกติน 0.175 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.175 (100)$$

$$V1 = 17.5 \text{ mL}$$

$$2.2.4 \text{ เติมสารละลายโซเดียมเอซิติเตปป์เฟอร์} = 100 - 10 - 50 - 17.5 = 22.5 \text{ mL}$$

2.3 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v, NaCl หรือ CaCl_2 0.15 M

2.3.1 เตรียมสารละลายเกลือ 0.15 M จาก stock solution 1.00 M

$$M1V1 = M2V2$$

$$1.00 (V1) = 0.15 (100)$$

$$V1 = 15 \text{ mL}$$

2.3.2 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M1V1 = M2V2$$

$$0.50 (V1) = 0.25 (100)$$

$$V1 = 50 \text{ mL}$$

2.3.3 เตรียมสารละลายเพกติน 0.175 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M1V1 = M2V2$$

$$1.00 (V1) = 0.175 (100)$$

$$V1 = 17.5 \text{ mL}$$

$$2.3.4 \text{ เติมสารละลายโซเดียมเอซิติเตปป์เฟอร์} = 100 - 15 - 50 - 17.5 = 17.5 \text{ mL}$$

ก3. วิธีคำนวณปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบก

3.1 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1 %w/v, สารสกัดบัวบก 20 mL

3.1.1 เติมสารสกัดบัวบก 20 mL

3.1.2 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M1V1 = M2V2$$

$$0.50 (V1) = 0.25 (100)$$

$$V1 = 50 \text{ mL}$$

3.1.3 เตรียมสารละลายเพกติน 0.1 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M1V1 = M2V2$$

$$1.00 (V1) = 0.1 (100)$$

$$V1 = 10 \text{ mL}$$

3.1.4 เติมสารละลายโซเดียมแอซิติเตทบัฟเฟอร์ = 100-20- 50-10 =20 mL

3.2 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.125 %w/v, สารสกัดบัวบก 20 mL

3.2.1 เติมสารสกัดบัวบก 20 mL

3.2.2 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M1V1 = M2V2$$

$$0.50 (V1) = 0.25 (100)$$

$$V1 = 50 \text{ mL}$$

3.2.3 เตรียมสารละลายเพกติน 0.125 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M1V1 = M2V2$$

$$1.00 (V1) = 0.125 (100)$$

$$V1 = 12.5 \text{ mL}$$

3.2.4 เติมสารละลายโซเดียมแอซิติเตทบัฟเฟอร์ = 100-20- 50-12.5 =17.5 mL

3.3 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.15 %w/v, สารสกัดบัวบก 20 mL

3.3.1 เติมสารสกัดบัวบก 20 mL

3.3.2 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M1V1 = M2V2$$

$$0.50 (V1) = 0.25 (100)$$

$$V1 = 50 \text{ mL}$$

3.3.3 เตรียมสารละลายเพกติน 0.15 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.15 (100)$$

$$V_1 = 15 \text{ mL}$$

3.3.4 เติมสารละลายโซเดียมแอซิติเตทบัฟเฟอร์ = 100-20- 50-15 =15 mL

3.4 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.1 %w/v, สารสกัดบัวบก 20 mL

3.4.1 เติมสารสกัดบัวบก 20 mL

3.4.2 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

3.4.3 เตรียมสารละลายเพกติน 0.175 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.175 (100)$$

$$V_1 = 17.5 \text{ mL}$$

3.4.4 เติมสารละลายโซเดียมแอซิติเตทบัฟเฟอร์ = 100-20- 50-17.5 =12.5 mL

ก4. วิธีคำนวณปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและเพกตินที่มีการกักเก็บสารสำคัญจากบัวบกและมีการเติมเกลือ

4.1 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v, สารสกัดบัวบก 20 mL, NaCl หรือ CaCl_2 0.05 M

4.1.1 เติมสารสกัดบัวบก 20 mL

4.1.2 เตรียมสารละลายเกลือ 0.05 M จาก stock solution 1.50 M

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.50 (V_1) = 0.05 (100)$$

$$V_1 = 3.33 \text{ mL}$$

4.1.3 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

4.1.4 เตรียมสารละลายเพกติน 0.175 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.175 (100)$$

$$V_1 = 17.5 \text{ mL}$$

4.1.5 เติมสารละลายโซเดียมแอซิติเตทบัฟเฟอร์ = $100 - 20 - 3.33 - 50 - 17.5 = 9.17 \text{ mL}$

4.2 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v, สารสกัดบัวบก 20 mL, NaCl หรือ CaCl_2 0.10 M

4.2.1 เติมสารสกัดบัวบก 20 mL

4.2.2 เตรียมสารละลายเกลือ 0.10 M จาก stock solution 1.50 M

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.50 (V_1) = 0.10 (100)$$

$$V_1 = 6.67 \text{ mL}$$

4.2.3 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

4.2.4 เตรียมสารละลายเพกติน 0.175 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.175 (100)$$

$$V_1 = 17.5 \text{ mL}$$

$$4.2.5 \text{ เติมสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์} = 100-20-6.67-50-17.5=5.83 \text{ mL}$$

4.3 ปริมาณไคโตแซน-เพกติน; 0.25-0.175 %w/v, สารสกัดบัวบก 20 mL, NaCl หรือ CaCl_2 0.15 M

4.3.1 เติมสารสกัดบัวบก 20 mL

4.3.2 เตรียมสารละลายเกลือ 0.15 M จาก stock solution 1.50 M

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.50 (V_1) = 0.15 (100)$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

4.3.3 เตรียมสารละลายไคโตแซน 0.25 %w/v จาก stock solution 0.50 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$0.50 (V_1) = 0.25 (100)$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

4.3.4 เตรียมสารละลายเพกติน 0.175 %w/v จาก stock solution 1.00 %w/v

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$1.00 (V_1) = 0.175 (100)$$

$$V_1 = 17.5 \text{ mL}$$

$$4.3.5 \text{ เติมสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์} = 100-20-10-50-17.5=2.5 \text{ mL}$$



ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านวิทยากระแส
ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโคโคแซนและเพกติน

ข1. วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านวิทยากระแส

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 เครื่องรีโอมิเตอร์ (Rheometer: Physica MCR 301, Anton Paar, Germany)

1.1.2 หัววัดชนิด parallel plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 การหา linear viscoelastic range โดยการทำ amplitude sweep test

ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม วางบนแท่นวางตัวอย่าง โดยใช้หัววัดชนิด parallel plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร เพื่อหา ช่วง linear viscoelastic range โดยใช้โปรแกรม rheoplus โหมด oscillatory measurement เลือกใช้ amplitude sweep test แล้วเข้าไปใน oscillation parameter โดยตั้งค่าต่างๆ ดังนี้

ระยะห่างระหว่างหัววัดกับแท่นวางตัวอย่าง (gap): 0.7 มิลลิเมตร

angular frequency: 10 1/วินาที

initial strain: 0.01 เปอร์เซ็นต์

final strain: 100 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ: 25 องศาเซลเซียส

เมื่อวัดตัวอย่างเสร็จแล้ว วิเคราะห์ค่า % strain ในโปรแกรม rheoplus

1.2.2 frequency sweep test

ใช้ตัวอย่างประมาณ 3 กรัม วางบนแท่นวางตัวอย่าง โดยใช้หัววัดชนิด parallel plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร โดยใช้โปรแกรม rheoplus โหมด oscillatory measurement เลือกใช้ frequency sweep test แล้วเข้าไปใน oscillation parameter แทนค่า %strain จากข้อ 1.2.1 oscillation parameter โดยตั้งค่าต่างๆ ดังนี้

ระยะห่างระหว่างหัววัดกับแท่นวางตัวอย่าง: 0.7 มิลลิเมตร

initial angular frequency: 0.1 วินาที⁻¹

final angular frequency: 100 วินาที⁻¹

strain: 0.1 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ: 25 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนด้วยวิธี HPTLC

ค1. การวิเคราะห์ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนด้วยวิธี HPTLC

1.1 อุปกรณ์และสภาวะในการวิเคราะห์

เครื่องสแกน TLC scanner II

HPTLC Glass Plate, Precoated Silica gel 60 F254

Mobile phase chloroform: methanol: water (15:7:1 v/v/v)

Spray reagent 0.2% anthrone reagent in conc. sulfuric

Detector UV 600 nm

Plate width 20 mm

Band 8 mm

Start pos 15 mm

Between track 10 mm

Rate 4 sec/ μ l

1.2 สารเคมี

1.2.1 คลอโรฟอร์ม

1.2.2 เมทานอลบริสุทธิ์ เกรดสำหรับ HPLC

1.2.3 สารมาตรฐานกรดเอเชียติก

1.2.4 สารมาตรฐานกรดมาเดลาสติก

1.2.5 สารมาตรฐานเอเชียติโคไซด์

1.2.6 สารมาตรฐานมาเดลาสโคไซด์

1.2.7 สารแอนโทรน

1.2.8 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1.3.1 เตรียมเฟสเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 15:7:1 v/v/v ใส่ลงในแท็งก์ ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงเพื่อให้สารอิ่มตัว

1.3.2 หยดสารมาตรฐานผสม (mix standard) กรดเอเชียติก: กรดมาเดลาสติก: เอเชียติโคไซด์: มาเดลาสโคไซด์ปริมาณ 3-12 ไมโครลิตร โดยเตรียมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นสารละ 100 ppm และหยดตัวอย่างปริมาณ 1-20 ไมโครลิตร ลงบน HPTLC plate หลังจากนั้นเป่าให้

แห้งแล้วนำไปจุ่มลงในเฟสเคลื่อนที่

1.3.3 เมื่อเฟสเคลื่อนที่วิ่งถึงจุดที่กำหนดคือ 9 เซนติเมตร นำ HPTLC plate มาพักไว้ให้แห้ง

1.3.4 เมื่อ HPTLC plate แห้งแล้วนำไปสเปรย์ด้วย 0.2 % แอนโทรอนรีเอเจนต์ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

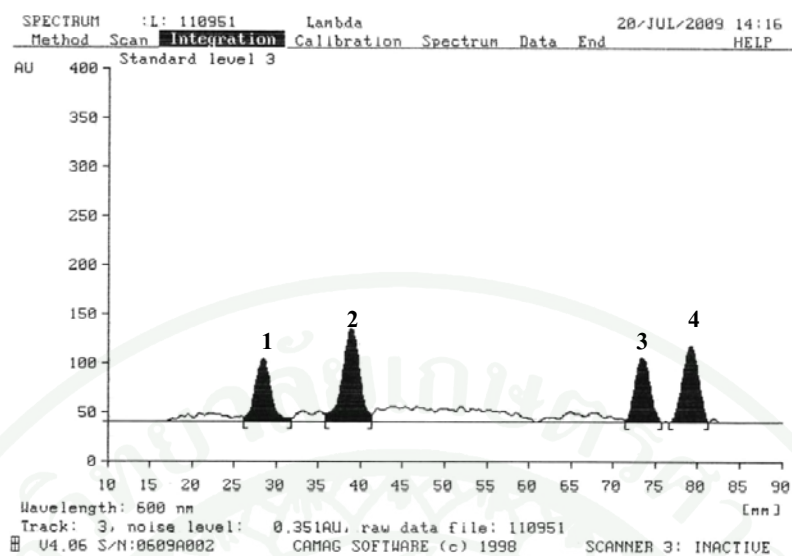
1.3.5 ให้ความร้อนกับ HPTLC plate ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้รีเอเจนต์ ทำปฏิกิริยากับสารไตรเทอร์ปีนเพื่อให้เกิดอนุพันธ์ของสารไตรเทอร์ปีนซึ่งจะทำให้เกิดแถบสีขึ้น

1.4 วิธีการคำนวณ

1.4.1 อ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารที่พบให้ตรงกับระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่ (R_f) ดังภาพผนวกที่ ค1-2 โดยพื้นที่ใต้กราฟถูกคำนวณออกมาจากโปรแกรม

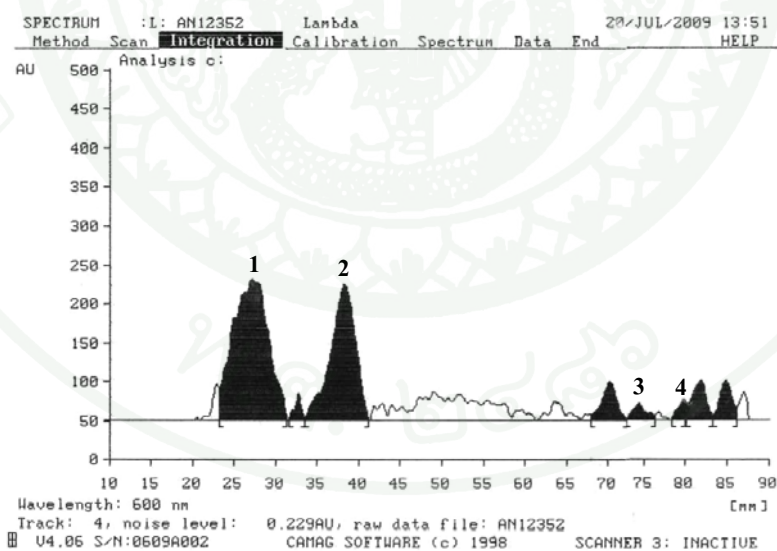
$$R_f \text{ (Retention factor)} = \frac{\text{ระยะทาง (มิลลิเมตร) ที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทาง (มิลลิเมตร) ที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

1.4.2 ปริมาณสารต่างๆ ที่พบในตัวอย่างคำนวณได้โดยแทนที่พื้นที่ใต้กราฟลงในสมการจากกราฟมาตรฐานดังแสดงภาพผนวกที่ ค3-6



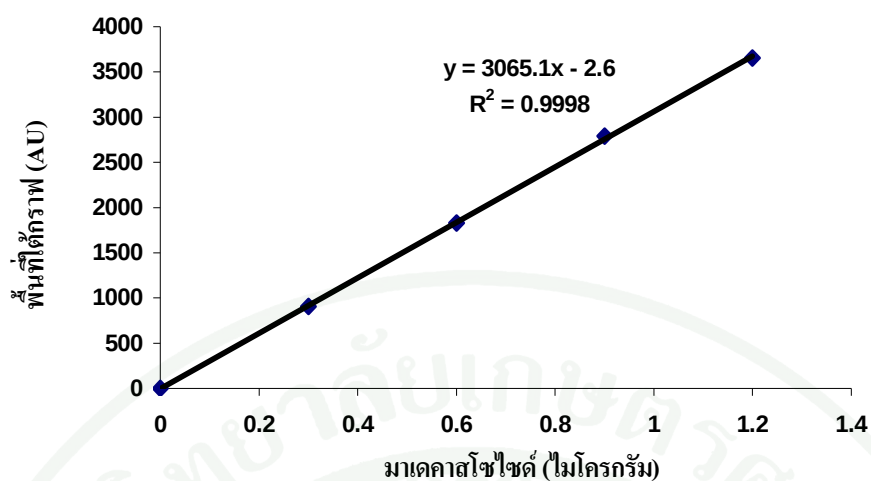
ภาพผนวกที่ ค1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมมาตรฐานผสมความเข้มข้นสารละ 100 ppm ที่ความยาวคลื่น 600 nm วิเคราะห์ด้วย HPTLC

หมายเหตุ - peak 1 คือ มาเดกาสโซไซด์, peak 2 คือ เอเชียดิโคไซด์, peak3 คือ กรดมาเดกาสสิก และ peak 4 คือ กรดเอเชียดิก

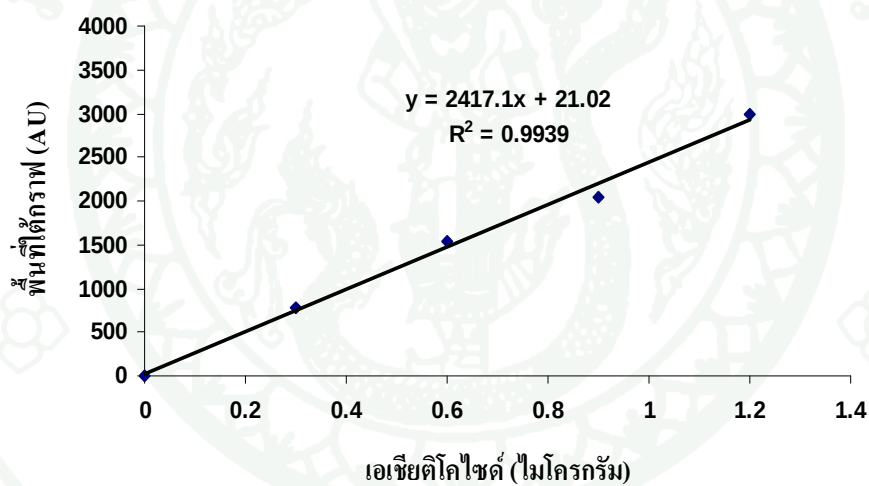


ภาพผนวกที่ ค2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารสกัดบัวบกที่ความยาวคลื่น 600 nm ที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC

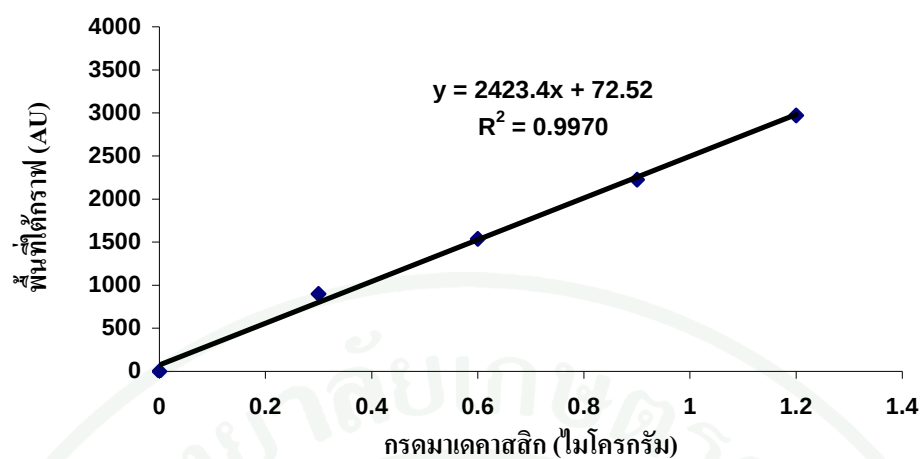
หมายเหตุ - peak 1 คือ มาเดกาสโซไซด์, peak 2 คือ เอเชียดิโคไซด์, peak3 คือ กรดมาเดกาสสิก และ peak 4 คือ กรดเอเชียดิก



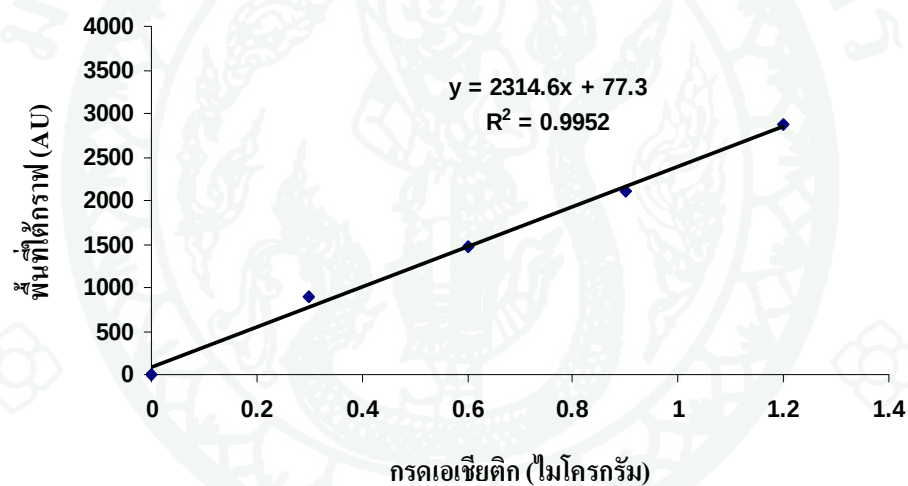
ภาพผนวกที่ ค3 กราฟมาตรฐานของมาเดคลาโซไซค์ที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC



ภาพผนวกที่ ค4 กราฟมาตรฐานของเอเชียดิโคไซค์ที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC



ภาพผนวกที่ ค5 กราฟมาตรฐานของกรดมาเดคาสลิกที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC



ภาพผนวกที่ ค6 กราฟมาตรฐานของกรดเอเซียติกที่วิเคราะห์ด้วย HPTLC

ตารางผนวกที่ ค1 ปริมาณเมทริกซ์ที่ได้ (กรัม/ 10 มิลลิลิตร) ที่ปริมาณไคโตแซน-เพกตินต่างๆ
ที่พีเอช 3 และ 5 เตรียมเมทริกซ์โดยวิธีการเขย่า

พีเอช	ความเข้มข้นของไคโตแซน	ความเข้มข้นของเพกติน (%w/v)			
	(%w/v)	0.1	0.125	0.15	0.175
3	0.1	0.96±0.13	3.37±0.11	3.38±0.19	3.98±0.35
	0.125	1.74±0.06	4.53±0.19	3.97±0.50	5.36±0.05
	0.15	3.26±0.32	6.09±0.08	6.60±0.17	5.63±0.12
	0.175	4.53±0.22	6.84±0.13	7.28±0.21	6.77±0.42
	0.2	6.58±0.32	6.97±0.27	7.47±0.03	7.23±0.74
	0.225	6.85±0.23	7.38±0.20	6.91±0.56	6.57±0.86
	0.25	7.26±0.05	7.12±0.08	7.88±0.24	8.06±0.19
	0.275	6.03±0.57	6.92±0.14	7.40±0.47	7.50±0.42
	0.3	3.48±0.15	6.35±0.49	7.47±0.12	7.15±0.06
	0.325	1.94±0.08	4.73±0.52	5.95±0.66	7.71±0.20
5	0.35	0.37±0.23	0.29±0.06	0.60±0.35	3.26±0.41
	0.1	0.87±0.06	4.50±0.45	5.48±0.06	3.34±0.16
	0.125	2.73±0.45	5.21±0.03	6.08±0.06	6.90±0.01
	0.15	2.60±0.19	6.60±0.16	6.74±0.06	7.91±0.04
	0.175	6.36±0.52	7.14±0.07	7.13±0.03	8.02±0.13
	0.2	6.84±0.25	7.94±0.07	8.49±0.08	8.16±0.10
	0.225	7.40±0.11	8.60±0.08	9.40±0.22	7.99±0.19
	0.25	8.85±0.09	9.19±0.08	9.59±0.18	9.17±0.06
	0.275	8.69±0.47	9.18±0.09	9.54±0.15	7.47±0.17
	0.3	3.48±0.36	9.05±0.08	9.37±0.07	6.20±0.08
	0.325	2.89±0.35	4.41±0.13	8.92±0.09	7.24±0.12
	0.35	1.18±0.04	4.04±0.06	4.66±0.42	2.42±0.06

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววันวิไล สิงห์ชู
วัน เดือน ปี ที่เกิด	14 กุมภาพันธ์ 2526
สถานที่เกิด	อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่
ประวัติการศึกษา	วท. บ. (วิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-