บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาวิจัยเรื่องนี้ ผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้ารายละเอียดเกี่ยวกับทฤษฎี งานวิจัย และแนวคิดที่เกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้

2.1 มะเขือเทศ และสารไลโคปีน
2.2 การสกัดสารสำคัญโดยใช้ตัวทำละลาย
2.3 การแยกสารรบกวนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี
2.4 การตรวจสอบสารสำคัญด้วยเทคนิครงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง
2.5 การตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์รงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง
2.6 การตรวจเอกลักษณ์สารด้วยนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์
2.7 การตรวจเอกลักษณ์สารด้วยแมสสเปกโทรเมทรี
2.8 ระบบนำส่งยาแบบถุง
2.9 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
2.10 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย

2.1 มะเขือเทศและสารไลโคปีน

2.1.1 มะเขือเทศ (Tomato cherry, Tomato, Love apply, Wild tomato)

1) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae มีชื่ออื่น ๆ คือ มะเขือส้ม (เหนือ) ตรอบ (เขมร-สุรินทร์) ตีรอบ (เขมร) น้ำเนอ (ละว้า-เชียงใหม่) หมากเขือเทศ บักเขือเทศ (อีสาน) เขือเทศ (ใต้) มะเขือเทศเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในป่าของประเทศเปรู และเอกวาดอร์ในอเมริกากลาง เป็นพืชที่แพร่หลายไปทั่วโลก เป็นพืชล้มลุก อายุประมาณ 1 ปี สูงประมาณ 1-2 เมตร ลักษณะเป็นพุ่มเลื้อย ลำต้นและใบมีขนปกคลุม มีกลิ่นเฉพาะตัว ใบเป็นใบเดี่ยวขอบหยักเป็นซี่ห่าง ๆ ดอกสีเหลืองออกเป็นช่อ ๆ ละ 3-7 ดอก ดอกมีสีเหลือง ขนาดเล็ก ผลจะฉ่ำน้ำมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันตามพันธุ์ ผลสุกสีแดง ผิวนอกบางเป็นมัน มีเนื้อฉ่ำน้ำ ขนาดและรูปร่างจะแตกต่างกันตามพันธุ์ การขยายพันธุ์ทำโดยใช้เมล็ด (สมพร ภูติยานันต์. 2546)

2) องค์ประกอบทางเคมี

ในผลมะเขือเทศพบสารไลโคปีน (Lycopene) ไวโอลาแซนธิน (Violaxanthin) นีโอแซนธิน (Neoxanthin) ลูธีน (Lutein) ซีแซนธิน (Zeaxanthin) แอลฟา-คริปโทแซนธิน (α-Cryptoxanthin) เบต้า-คริปโทแซนธิน (β-Cryptoxanthin) แอลฟา-แคโรธีน (α-Carotene) แกมมา-แคโรธีน (γ-Carotene) ซีต้า-แคโรธีน (ς-Carotene) นิวโรสปอรีน (Neurosporene) ไฟโตอีน (Phytoene) ไฟโตฟลูอีน (Phytofluene) ไซโคลโคพีน (Cyclolycopene) เบต้า-แคโรธีน (β-Carotene) 5,6-อีพ็อกไซด์ (5,6-Epoxide) ซึ่งแอลฟา-แคโรธีน (α-Carotene) เบต้า-แคโรธีน (β-Carotene) เบต้า-คริปโทแซนธิน (β-Cryptoxanthin) อยู่ในรูปโปรวิตามินเอสามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ (Retinal) ภายในระบบร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังมีวิตามินซี วิตามินอี และแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ โซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส กำมะถัน แมงกานีส เหล็ก

ทองแดง สังกะสี ซีลีเนียม ใบและต้นมีสารโทมาธีน (Tomatine) และสารสเตอรอยด์ซาโปนิน (Steroidal saponins) เนื้อในเมล็ด (seed cake) มีโปรตีน 10% แร่ธาตุ เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และไฟเบอร์หยาบ และพบสารนีโอทิโกเจนิน ไตรแซคคาไรด์ (Neotigogenin trisaccharide) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบที่เป็นพิษและไม่ใช่สารอาหารเช่น กรดอ๊อกซาลิก และไนเตรตในปริมาณที่ต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์และแหล่งที่มา (สมพร ภูติยานันต์. 2546, Guil-Guerrero and Rebolloso-Fuentes. 2009)

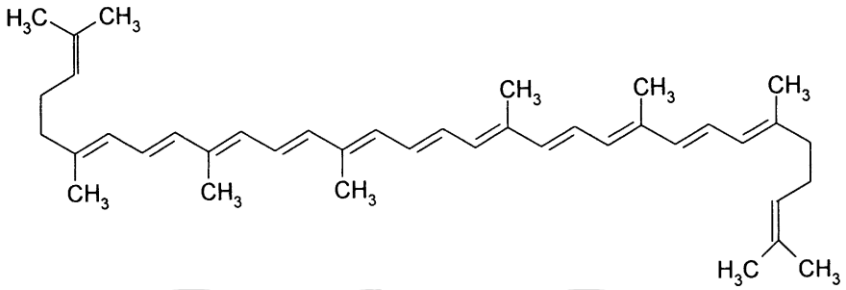
3) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบทางคลินิก

น้ำคั้นจากผลมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอย่างอ่อน ยับยั้งต่อโปลิโอไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงอย่างอ่อน และพบสารไลโคเปอร์ไซซิน (Licopersicin) ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียได้ ยับยั้งการเกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะอย่างอ่อนในหนูตัวผู้และช่วยลดการเกิดมะเร็งที่ระบบทางเดินอาหาร สารสกัดของผลมะเขือเทศจากตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น แสดงฤทธิ์ยับยั้งสารเร่งการเกิดมะเร็งอย่างอ่อนในเซลเพาะเลี้ยงและยับยั้งการเกิดไลปิดเปอร์ออกไซด์ และยับยั้งการก่อกลายพันธ์บน agar plate เป็นต้น ส่วนโอเลโอเรซิน (Oleoresin) จากมะเขือเทศซึ่งมีไลโคปีนสูงพบว่าสามารถลดการเกิดและขนาดของมะเร็งในหนูทดลองที่ได้รับสารกระตุ้นการเกิดมะเร็งที่เต้านม เมล็ดแห้งมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน สารสกัดซาโปนินจากใบของมะเขือเทศแสดงฤทธิ์ต้านฮีสตามีน ใบแห้งแสดงฤทธิ์ต้านแมลง ใบสดที่สกัดด้วยน้ำ แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา และเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืช (สมพร ภูติยานันต์. 2546)

2.1.2 ไลโคปีน (Lycopene)

ไลโคปีนเป็นสารแคโรทีนอยด์ (Ψ,Ψ - Carotene) ชนิดหนึ่ง ละลายได้ในน้ำมัน ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยพืชและจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ พบมากในมะเขือเทศ นอกจากนี้ยังพบได้ในโรสฮิพ แตงโม มะละกอ เกรฟฟรุ๊ตสีชมพู และฝรั่ง สารสีแดงของไลโคปีนดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 472 nm เป็นสารไฮโดรคาร์บอนชนิดเตตร้าเทอร์ปีนซึ่งประกอบ ด้วยคาร์บอน 40 อะตอม และไฮโดรเจน 56 อะตอม ($C_{40}H_{56}$) มีน้ำหนักโมเลกุล 536.85 มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ตรงเปิดแบบไม่อิ่มตัวประกอบด้วยพันธะคู่ 13 แห่ง โดยมีพันธะคู่แบบคอนจูเกต 11 แห่ง และพันธะคู่ที่ไม่เป็นแบบคอนจูเกต 2 แห่ง ซึ่งทำให้เป็นโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพที่สุดในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์ธรรมชาติในการจับกับอนุมูลออกซิเจนเดี่ยว รูปแบบโครงสร้างไลโคปีนที่พบในมะเขือเทศส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบ ออล-ทรานส์ไลโคปีน (all-trans Lycopene) โดยมีสัดส่วนประมาณร้อยละ 94–96 ของไลโคปีนทั้งหมดและเป็นรูปแบบที่มีความคงสภาพทางอุณหพลศาสตร์ที่สุด ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 1 (Shi John et al. 2009, Tzouganaki et al. 2002, Vertzoni et al. 2005)

ภาพที่ 1 โครงสร้างออล-ทรานส์ไลโคปีน (all-trans Lycopene)

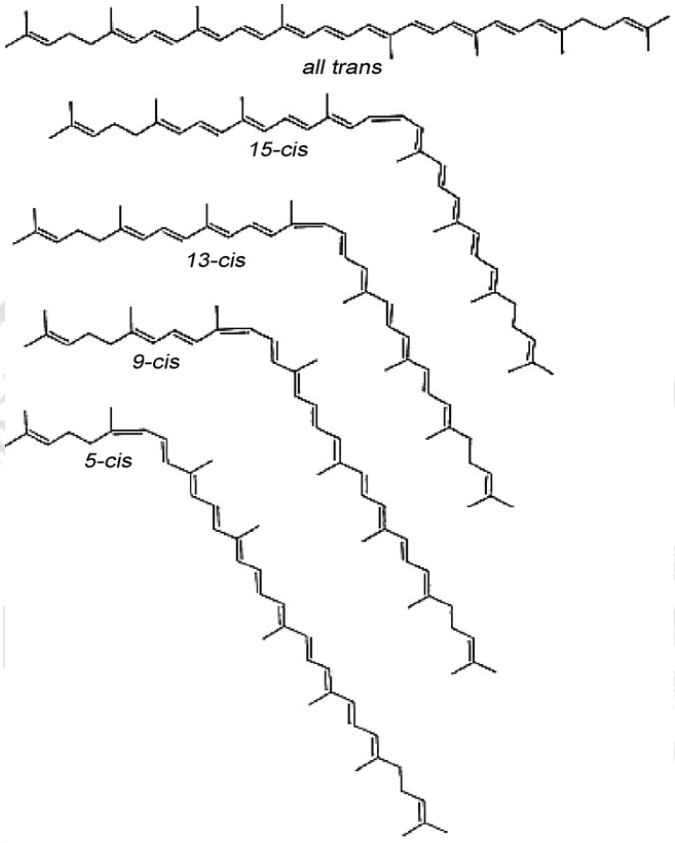


ที่มา: Tzouganaki et al. 2002

ไลโคปีนสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างในระหว่างกระบวนการ การเก็บ จากแสง ความร้อน อากาศ หรือปฏิกิริยาเคมี ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบไอโซเมอร์ไรเซชัน (Isomerization) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของพันธะคู่ในโครงสร้าง โดยอาจเกิดแบบตำแหน่งเดียว (monoisomerization) หรือหลายตำแหน่ง (polyisomerization) โครงสร้างเปลี่ยนแปลงจากรูปแบบทรานส์ไปเป็นรูปแบบซิส (ภาพที่ 2) ซึ่งรูปแบบที่มีความคงสภาพมากที่สุดได้แก่ 5-ซิสไลโคปีน รองลงมาคือ ออล-ทรานส์ 9-ซิส 13-ซิส 15-ซิส 7-ซิส และ 11-ซิสไลโคปีน ตามลำดับ สำหรับรูปแบบที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงสุดได้แก่ รูปแบบ 5-ซิสไลโคปีน รองลงมาคือ 9-ซิส 7-ซิส 13-ซิส 11-ซิส และออล-ทรานส์ไลโคปีน ตามลำดับ หรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบไม่ผันกลับทำให้โครงสร้างโมเลกุลแตกเกิดสารอะซีโตน เมธิลเฮปทีโนน เลวูลินิคอัลดีไฮด์ และอาจมีกลัยโอซาล ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้สีของไลโคปีนซีดและเกิดกลิ่นคล้ายกลิ่นฟางหญ้า (Bramley. 2000, Rao, A.V and Rao, L.G. 2007, Shi John et al. 2008)

จากงานวิจัยของ Shi, J. และคณะ (2008) ซึ่งทำการทดสอบผลของความร้อนและแสงต่อความคงสภาพของสารไลโคปีนในมะเขือเทศข้นพบว่า ความร้อนและแสงทำให้ไลโคปีนเกิดไอโซเมอร์ไรเซชันและออกซิเดชัน แต่พบว่าความร้อนช่วยแยกไลโคปีนออกมาจากเนื้อเยื่อมะเขือเทศในช่วงเวลาเริ่มต้น และเมื่อให้ความร้อนมะเขือเทศข้นต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่ 60-80 ºC พบว่าปริมาณไลโคปีนทั้งหมดลดลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่อุณหภูมิที่ 100-120 ºC พบออล-ทรานส์ไลโคปีนเกิดไอโซเมอร์ไรเซชันเป็นซิส- ไลโคปีนอย่างรวดเร็ว และซิส-ไลโคปีนเสื่อมสลายอย่างรวดเร็ว แต่พบว่าอุณหภูมิที่ 100-120 ºC ช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศแต่ในการสกัดควรพิจารณาการเกิดไอโซเมอร์ไรเซชันและความคงสภาพของไลโคปีนด้วย ในการวิจัยทางด้านแสง โดยทดสอบภายใต้ความเข้มของแสง 3-7 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที (ความเข้มของแสงภายนอกปกติ 2000 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ความเข้มของแสงภายในห้อง 140 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที) พบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของออล-ทรานส์ไลโคปีนแต่มีผลต่อความไม่คงสภาพของซิส-ไลโคปีน อย่างไรก็ตามแสงที่ใช้ทดสอบมีความเข้มอ่อนมากเมื่อเทียบกับแสงภายนอก

ภาพที่ 2 รูปแบบโครงสร้าง ออล-ทรานส์ไลโคปีน (all-trans Lycopene) และซิส-ไลโคปีน (cis –Lycopene)



ที่มา: Rao, A.V. and Rao, L.G. 2007

ไลโคปีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดของสารแคโรทีนอยด์ที่พบในผิวหนัง โดยไลโคปีนมีฤทธิ์ในการจับอนุมูลออกซิเจนเดี่ยวเป็นสองเท่าของ เบต้า-แคโรทีนและเป็นสิบเท่าของแอลฟา-โทโคฟีรอล จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า ไลโคปีนมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ผ่านกลไกของแอนติออกซิเดชันของร่างกาย โดยกำจัดอนุมูลอิสระหรือสิ่งที่ทำลายเซลในร่างกาย ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งเยื่อบุผิว มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น เนื้องอกระบบทางเดินอาหาร ต้อกระจก โรคชราก่อนวัย และโรคหลอดเลือดหัวใจ มีการนำไลโคปีนไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เครื่องสำอาง และอาหารสัตว์ (Ilahy et al. 2011, Liu Yongfeng et al. 2010, Shi J. et al. 2008)

2.2 การสกัดสารสำคัญโดยใช้ตัวทำละลาย

ในการสกัดสารสำคัญจาก พืช ผัก ผลไม้ หรือสมุนไพรที่ต้องการนั้น ควรทำการเตรียมวัตถุดิบให้สะอาดและอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อวิธีที่เลือกใช้ในการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่มีสารสำคัญตาม

ต้องการ ในกระบวนการเตรียมสารสกัดหยาบมีหลายวิธี ต้องเลือกใช้วิธีให้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ โดยพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารสำคัญที่ต้องการ เช่น ความเป็นกรดด่าง ความมีขั้ว ความคงสภาพต่อแสงและความร้อน ลักษณะเนื้อเยื่อของวัตถุดิบ โครงสร้างของสารที่ต้องการสกัด เป็นต้น วิธีการสกัดมีหลายวิธีเช่น การกลั่น (Distillation) การบีบหรือการอัด (Compression) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) การสกัดด้วยอัลตราซาวด์ (Ultrasonic Assisted Extraction) หรือการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercrtitical fluid extraction) เป็นต้น ในการเลือกวิธีการสกัดนอกจากการพิจารณาในปัจจัยต่างๆที่กล่าวข้างต้นควรคำนึงถึงอุปกรณ์ที่ต้องใช้ และค่าใช้จ่ายในการสกัดด้วยซึ่งพบว่าการสกัดด้วยอัลตราซาวด์และ การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด เป็นการใช้อุปกรณ์ในการสกัดที่มีต้นทุนสูง ในงานวิจัยนี้ขอกล่าวถึงการสกัดด้วยตัวทำละลายซึ่งเป็นวิธีที่นิยมวิธีหนึ่ง โดยก่อนการสกัดให้นำวัตถุดิบนั้นมาทำการล้างให้สะอาด ทำให้แห้ง แล้วนำมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกันเพื่อช่วยให้ตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อวัตถุดิบได้ง่าย ในขั้นตอนการใช้ตัวทำละลายสกัดสารสำคัญต้องพิจารณาความมีขั้ว ไม่มีขั้วของสารที่ต้องการสกัดชนิดตัวทำละลาย (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2556, Liu Yongfeng et al. 2004, Ong, E.S. 2004) วิธีการสกัดสารสำคัญโดยใช้ตัวทำละลายอาจทำได้หลายวิธี (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2556) ดังนี้

2.2.1 มาเซอเรชัน (Maceration)

มาเซอเรชันเป็นวิธีการหมักพืช ผัก ผลไม้ หรือสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่อ่อนและไม่แข็งแรงมาก โดยสามารถทำให้อ่อนนุ่มได้โดยน้ำยาสกัด ซึ่งทำได้โดยการนำ พืช ผัก ผลไม้และสมุนไพรที่ต้องการสกัดสารสำคัญมาทำการหมักกับตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งสามารถละลายสารสำคัญที่ต้องการสกัดจากเนื้อเยื่อได้ หมักไว้จนกระทั่งตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืช ผัก ผลไม้และสมุนไพร และละลายองค์ประกอบภายในเนื้อเยื่อออกมาได้ การหมักควรทำในภาชนะปิด ทำเป็นเวลานานตามกำหนดตามตำรับเภสัชหรือจนกระทั่งมั่นใจว่าองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ซึ่งถ้าเป็นสารสกัดที่มีสีก็สังเกตุจากสีของเนื้อเยื่อและสีของสารละลาย ในระหว่างทำการหมักควรมีการเขย่าหรือคนเพื่อช่วยเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อตัวทำละลายสกัดสารที่ต้องการออกมาจนหมดแล้วหรือครบตามระยะเวลาที่กำหนดให้ทำการแยกกากของพืช ผัก ผลไม้และสมุนไพรออกจากตัวทำละลายโดยการกรอง

2.2.2 เพอร์โคเลชัน (Percolation)

ทำโดยการปล่อยให้ตัวทำละลายไหลลงผ่านผงวัตถุดิบพืช ผัก ผลไม้ หรือสมุนไพรแบบช้า ๆ พร้อมละลายสารสำคัญที่ต้องการสกัดออกมา ซึ่งควรนำผงวัตถุดิบพืช ผัก ผลไม้ หรือสมุนไพรที่ต้องการสกัดมาหมักกับตัวทำละลายก่อน 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่ จากนั้นนำบรรจุทีละชั้นลงในเพอร์โคเลเตอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (column) ปลายเปิดทั้ง 2 ด้าน โดยด้านบนจะกว้างกว่าด้านล่าง ปลายล่างเปิดปิดได้เพื่อคุมอัตราการไหลของสารสกัด เติมตัวทำละลายหรือน้ำยาสกัดลงไปให้ตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพรประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราที่เหมาะสม พร้อมกับเติมตัวทำละลายใหม่ลงไปเรื่อย ๆ อย่าให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดรวมกันแล้วนำไปกรอง

2.2.3 การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction)

เป็นการสกัดสารสำคัญที่ต้องการเหมือนกับวิธีเพอร์โคเลชันแต่ต้องใช้ความร้อนเข้าช่วยและใช้ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxhlet extractor) ซึ่งเป็นระบบปิดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เมื่อ

ได้ความร้อน ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบิล (Thimble) ซึ่งบรรจุวัตถุดิบ พืช ผัก ผลไม้ หรือสมุนไพรไว้ ตัวทำละลายจะผ่านวัตถุดิบในทิมเบิลซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อย ๆ จนสารสำคัญถูกสกัดออกมา เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (Extracting chamber) ของซอกซ์เลตแอพพาราตัส (Soxhlet apparatus) สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะวนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์

2.2.4 การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction)

เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจและนำมาใช้ในการสกัดสารมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ใช้เวลาน้อย ไม่ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของสารเสื่อมสลาย ลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ โดยอาศัยหลักการที่สารอยู่ในอุณหภูมิและความดันที่สูงกว่าจุดวิกฤติ (Critical point) เป็นของไหลที่มีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์อยู่ระหว่างก๊าซและของเหลว เรียกว่า ของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid) โดยมีความหนืดและสัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusion coefficient) ใกล้เคียงกับก๊าซ ถ้ามีการปรับสภาวะอุณหภูมิและความดันให้เหมาะสมจะสามารถแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างของของแข็งได้ดี ซึ่งมีคุณสมบัติในการละลายสารได้เหมือนของเหลว วิธีการนี้ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดมีข้อเสียได้แก่ เครื่องมือมีราคาแพง เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ที่ต้องทนต่อความดันสูง

2.3 การแยกสารรบกวนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Separation of interfering substances by column chromatography)

สารที่สกัดได้จาก พืช ผัก ผลไม้และสมุนไพรจากการหมักด้วยวิธีมาเซอเรชัน เป็นสารสกัดหยาบ มักมีสารหลายชนิดที่ถูกละลายออกมาอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย เมื่อทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จนหมด ได้สารสกัดผสม จึงควรนำทำมาแยกองค์ประกอบสำคัญจากสารรบกวนที่ไม่ต้องการออก โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการแยกสารสำคัญที่ต้องการออกจากสารผสม ซึ่งอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว (Distribution of partition) ขององค์ประกอบในสารซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ต่างกันระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) และวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) ทำให้มีผลต่อการแยกสาร โดยลักษณะการแยกจะขึ้นอยู่กับประเภทของโครมาโทการฟีที่ใช้ สารที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2556) เทคนิคโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการแยกสารในงานวิจัยนี้ได้แก่คอลัมน์โครมาโทกราฟี

คอลัมน์โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารให้ได้ปริมาณมาก ๆ เทคนิคการแยกทำโดยใช้คอลัมน์บรรจุวัฏภาคคงที่และบรรจุสารที่ต้องการแยกลงไปในคอลัมน์จากนั้นชะสารที่ต้องแยกออกจากคอลัมน์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยในกรณีที่วัฏภาคคงที่เป็นนอร์มอลเฟส (Normal phase) ลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่เล็กน้อย ส่วนในกรณีที่วัฏภาคคงที่เป็น รีเวิร์สเฟส (Reverse phase) เพิ่มความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่เล็กน้อย (ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2551) ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี โดยสามารถแบ่งประเภทตามกลไกการแยก (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547) ได้ดังนี้

1) แอดซอพชันโครมาโทกราฟี (Adsorption chromatography) หรือลิควิดโซลิดโครมาโทกราฟี (Liquid solid chromatography : LSC) เป็นการใช้หลักการการมีปฏิกิริยาต่อกันระหว่างของแข็ง

และของเหลว โดยอาศัยคุณสมบัติของสารในสารละลายตัวอย่างที่มีปฏิกิริยาการดูดซับต่อวัฏภาคคงที่ต่างกัน

2) พาร์ทิชันโครมาโทกราฟี (Partition chromatography) หรือลิควิด-ลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid-liquid chromatography:LLC) เป็นเทคนิคที่โมเลกุลของสารตัวอย่างจะกระจายตัวเองระหว่างวัฏภาคทั้งสองที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และวัฏภาคทั้งสองต้องเป็นของเหลวที่มีสภาพความเป็นขั้วแตกต่างกันมากๆ

3) ไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี (Ion-exchange chromatography) เป็นวิธีที่ใช้ความแตกต่างความแรงของประจุ (Charge) ของสารตัวอย่างที่จะจับกับกลุ่มไอออนอยู่บนพื้นผิวของวัฏภาคคงที่ซึ่งมีประจุต่างกับสารตัวอย่างโดยสารที่จับกับกลุ่มไอออนได้ดีกว่าจะถูกชะล้างออกมาทีหลัง

4) ไซส์เอกซ์ครูชันโครมาโทกราฟี (Size exclusion chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสารซึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่แพร่ผ่านเข้าไปยังวัฏภาคคงที่ซึ่งเป็นพวกโพลิเมอร์ที่มีขนาดรูพรุนที่สม่ำเสมอและเชื่อมต่อกันเป็นร่างแห การแยกโดยวิธีนี้ไม่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีหรือฟิสิกส์ระหว่างสารตัวอย่างกับวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่

เทคนิคในการทำคอลัมน์โครมาโตรกราฟี คอลัมน์ที่ใช้ในโครมาโตกราฟี มีลักษณะเป็นหลอดแก้วกลวง ปลายข้างหนึ่งทำให้เล็กลง เพื่อต่อเข้ากับตัวควบคุม การไหลของตัวทำละลาย ขนาดของคอลัมน์มีได้หลายขนาด ตั้งแต่เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ถึง 5 เซนติเมตร และยาว 10 ถึง 50 เซนติเมตร ความสูงและขนาดของเฟสอยู่กับที่ ที่บรรจุในคอลัมน์จะมีผลต่ออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ โดยถ้าเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็กและบรรจุในคอลัมน์สูงมากๆ จะทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ช้าและใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน โดยขั้นตอนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2551) มีดังนี้

1) เตรียมคอลัมน์ โดยที่ปลายล่างของคอลัมน์ต้องถูกปิดไว้ด้วยใยแก้วหรือสำลี เพื่อป้องกันไม่ให้ของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์ไหลออกจากคอลัมน์ได้ จากนั้นนำเฟสอยู่กับที่ซึ่งเป็นของแข็งมากวนกับตัวทำลาย ซึ่งใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ให้เป็นสารละลายแขวนลอย แล้วเทสารละลายแขวนลอยลงในคอลัมน์และรอให้ของแข็งนอนก้น แล้วไขตัวทำละลายทิ้งไปส่วนหนึ่ง อย่าให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นเทสารละลายแขวนลอยลงในคอลัมน์อีก แล้วทำเช่นเดิม จนได้ความสูงของคอลัมน์ตามต้องการ และตัวทำลายเกือบแห้ง คืออยู่เหนือของแข็งเพียงเล็กน้อย

2) ใส่สารตัวอย่าง วิธีใส่สารตัวอย่างให้ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างให้ได้ปริมาตรตามต้องการแล้วใส่ลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวัง พยายามปล่อยสารละลายตัวอย่างออกจากปิเปต

3) ทำการอีลูทสาร เมื่อใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์เรียบร้อยแล้วให้เติมตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่หรือตัวอีลูท ตัวอีลูทจะไหลลงสู่คอลัมน์ตามแรงดึงดูดของโลก สามารถปรับขนาดของอัตราการไหลได้ถ้าไหลเร็วเกินไปโดยใช้จุกปิดเปิด ที่ต่อเข้ากับปลายข้างล่างของคอลัมน์

4) เก็บสารตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ สารละลายที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์สามารถเก็บได้เป็นส่วนๆ เรียกสารที่เก็บแยกแต่ละส่วนว่า แฟรกชัน (fraction) เช่น ส่วนละ 1 ถึง 10 ลบ.ซม. แล้วนำแต่ละส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป เมื่อสามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างในแต่ละส่วนได้ และศึกษาได้ว่าส่วนใดของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์จะมีสารตัวอย่างมากที่สุด และถ้าต้องการเก็บสารตัวอย่างให้ได้สมบูรณ์ จะต้องเก็บตั้งแต่ส่วนใดถึงส่วนใด ถ้าการไหลของตัวอีลูทช้ามาก การเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ จะเสียเวลามากในการเฝ้าดู สามารถใช้เครื่องมือช่วย ซึ่งเรียกว่า แฟรกชันคอเลคเตอร์ (Fraction collector)

5) การวัดปริมาณสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ (Detection) สารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ สามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณได้หลายวิธี คือใช้การวิเคราะห์ทางแสง (Optical method) เช่น UV, IR และ fluorescence เป็นต้น หรือใช้การวิเคราะห์ทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า (Electroanalytical method) เช่น การทำโวลแทมเมตรีการวัดค่าการนำไฟฟ้า และวัดค่าศักย์ไฟฟ้า เป็นต้น

ในขั้นตอนการแยกสารจากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี อาจทำการประเมินสารที่แยกด้วยสายตาสำหรับสารที่มีสีหรือไม่มีสีแต่เรืองแสง เช่น ควินิดีน เป็นต้น และทำการเก็บแต่ละแฟรกชัน หากเป็นสารไม่มีสีต้องเก็บหลาย ๆ แฟรกชัน แต่ละแฟรกชันมีปริมาตรน้อย ๆ อาจใช้เครื่องแฟรกชันคอเลคเตอร์แบบอัตโนมัติ (Automatic fraction collector) เพื่อนำสารที่ได้มาทำการตรวจสอบต่อด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเพื่อทำให้ทราบองค์ประกอบของสารอย่างคร่าว ๆ ก่อนที่จะนำไปตรวจสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพ (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2553)

2.4 การตรวจสอบสารสำคัญด้วยเทคนิครงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง

เทคนิครงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography : HPTLC) HPTLC เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจาก TLC สามารถใช้ได้กับสารที่มีปริมาณน้อยลง แยกได้ดีขึ้นและใช้เวลาน้อยลง ซึ่งขั้นตอนในการวิเคราะห์แบบเดียวกับ TLC ทุกประการ โดยใช้เทคนิคการแยกสารบนแผ่น TLC ซึ่งเป็นวัฏภาคคงที่และการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการพาสารให้เคลื่อนที่และเกิดการแยกสารออกจากกัน ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไปบนวัฏภาคคงที่เป็นระยะทางมากน้อยแตกต่างกันขึ้นกับสัมพรรคภาพ (Affinity) และคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของสารของวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ ซึ่งแตกต่างที่เทคนิคของ HPTLC นั้น ต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติช่วยทำการวิเคราะห์เพราะต้องมีความแม่นยำในการทำมาก โดยให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ (ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2551)

ระยะทางที่สารตัวอย่างหรือตัวถูกละลายเคลื่อนที่ สามารถแสดงได้ด้วยค่า Retardation factor or Relative front (R_f) ซึ่งจะมีค่าคงที่เหมือนทุกครั้งภายใต้สภาวะเดียวกัน ค่า R_f คำนวณได้ ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

โดย ค่า R_f ที่เหมาะสมสำหรับการแยกที่ดีจะมีค่าประมาณ 0.4-0.8 (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547)

ในการตรวจวิเคราะห์ของ HPTLC จะประกอบด้วยเครื่องหยดสารอัตโนมัติ ซึ่งเป็นเข็มฉีดยาขนาดต่างๆ เช่น ขนาด 100 µl เป็นต้น เพื่อใช้ทำการหยด หรือ streak สารที่ต้องการตรวจสอบลงบนแผ่น TLC ซึ่งใช้เป็นวัฏภาคคงที่ จากนั้นนำแผ่น TLC ไปทำการดีเวลลอป (Develop) โดยการแช่ในถังแก้ว (Glass chamber) ภายในถังแก้วบรรจุด้วยระบบสารละลายที่เหมาะสมที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อให้เกิดการนำพาและแยกสารที่ต้องการ ซึ่งสามารถนำไปตรวจวัดความเข้มของสารด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) โดยกำหนดความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่ต้องการ โดยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์จะต่อกับเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมสามารถแปรผลการวิเคราะห์ได้พื้นที่กราฟที่แปรผันตามปริมาณสาร

2.5 การตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์รงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPTLC ควรมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation of high performance thin layer chromatography analysis method) ซึ่งการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นปัจจัยสำคัญเพื่อทำให้มั่นใจว่าวิธีที่นำมาวิเคราะห์เหมาะสมกับวัตถุประสงค์และเป็นไปตามกฎระเบียบมาตรฐาน โดยข้อมูลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สามารถค้นคว้าได้จากงานทางวิชาการหลายแหล่งเช่น Quality assurance in analytical chemistry, ICH guideline, FDA guidance for Industry, US Pharmacopeia, Validation and quality assurance of planar chromatographic procedures in pharmaceutical analysis เป็นต้น (Ferenczi-fodor et al. 2001)

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ HPTLC ทำการประเมินได้ดังนี้ (ปนัดดา พัฒนวศิน. 2550, ICH guideline. 2005) ดังนี้

2.5.1 ความแม่น (Accuracy)

ความแม่นของวิธีวิเคราะห์เป็นพารามิเตอร์ที่แสดงถึงความใกล้เคียงของค่าซึ่งยอมรับตามแบบแผนหรือค่าตามที่อ้างอิงกับค่าที่ตรวจพบ โดยได้จากการคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของสารมาตรฐานที่เติมลงไปในสารตัวอย่างสองแบบคือ แบบที่เติมสารมาตรฐานในปริมาณที่ทราบแน่นอนและแบบที่ไม่เติม โดยแสดงผลเป็นค่าร้อยละการกลับคืน และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation : RSD) โดยค่าร้อยละการกลับคืนหาได้ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

โดย A = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน
B = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่ไม่เติมสารมาตรฐาน
C = ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

2.5.2 ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แสดงถึงความใกล้กันของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (ลำดับของการกระจายข้อมูล) ระหว่างการวัดที่ได้รับจากตัวอย่างที่เหมือนกันในการทำซ้ำภายใต้สภาวะที่ได้กำหนดไว้ แสดงได้ด้วยค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Coefficient of variance) หรือค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage relative standard deviation:% RSD) ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ โดยรูปแบบการวิเคราะห์ซ้ำเป็นแบบการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะและช่วงเวลาการวิเคราะห์เดียวกัน (Repeatability or intraday precision) การวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันแต่มีสิ่งอื่นที่ต่างกัน (Intermediate precision) ได้แก่ วัน (Interday precision) ผู้วิเคราะห์ อุปกรณ์ หรืออื่น ๆ หรือการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการอื่นที่ดำเนินการวิธีวิเคราะห์แบบเดียวกัน (Reproducability)

2.5.3 ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงเป็นการประเมินการวิเคราะห์ว่าสภาวะที่ใช้สามารถแยกองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์จากสารอื่น เช่นสารปนเปื้อน สารที่สลายตัว สารประกอบอื่น ๆ เป็นต้น

ที่รวมอยู่ในตัวอย่างได้หรือไม่ ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยรงคเลขผิวบาง นำผลการแยกของสารมาทำการเปรียบเทียบ

2.5.4 ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเป็นพารามิเตอร์ที่ถูกนำมาประเมินในวิธีวิเคราะห์ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารสำคัญกับค่าที่วัดได้ โดยการใช้สารมาตรฐาน และ/หรือ สารผสมสังเคราะห์ซึ่งได้จากการแยกจากผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นนั้น ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงถูกประเมินด้วยวิธีทางสถิติ เช่น การคำนวณด้วยการถดถอยเชิงเส้น (Regression line) โดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (Method of least squares) ซึ่งรายงานเป็นค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r) และสมการซึ่งแสดงถึงจุดตัดแกน Y (y-Intercept) ความชันของกราฟการถดถอยเชิงเส้น (Slope of the regression line) การแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นควรทำที่ความเข้มข้นของสารอย่างน้อยที่ 5 ความเข้มข้น

วิธีวิเคราะห์รงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูงที่ได้รับการประเมินความถูกต้องของวิธี ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับได้

2.6 การตรวจเอกลักษณ์สารด้วยนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์ (Nuclear magnetic resonance : NMR) (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. 2550)

อันตรกิริยาระหว่างรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าและนิวเคลียสบางชนิดในสนามแม่เหล็ก จะเกิดสัญญาณซึ่งสามารถบอกสภาพแวดล้อมของนิวเคลียสเหล่านี้ในโมเลกุลได้ และยังสามารถบอกจำนวนนิวเคลียสที่สัมพันธ์กันในแต่ละตำแหน่ง ปรากฏการณ์นี้เป็นพื้นฐานของเทคนิคทางสเปคโตรสโคปีที่ชื่อว่า นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของไฮโดรเจนนิวเคลียสหรือโปรตอน (^{1}H–NMR spectroscopy) ใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์โครงสร้างของสารปรากฏการณ์ของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์เกิดเมื่อโปรตอนซึ่งสปินในทิศเดียวกับสนามแม่เหล็กถูกเหนี่ยวนำให้ดูดกลืนพลังงาน และเปลี่ยนทิศไปสปินในทิศต้านกับสนามแม่เหล็ก เพื่อให้เข้าใจการเปลี่ยนสภาวะสปินของโปรตอน เราจะเปรียบโปรตอนที่สปินเป็นลูกข่างที่หมุนรอบตัวเอง ลักษณะการหมุนเช่นนี้เรียกว่า พรีเซสชัน (Precession) ความถี่ที่โปรตอนสปินเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มสนามแม่เหล็ก ถ้าความเข้มสนามแม่เหล็กเพิ่มขึ้น ความถี่ของการหมุน (Precession) ก็เพิ่มขึ้น ในสนามแม่เหล็กที่มีความเข้ม 1.41 เทสลา (Tesla) ความถี่ของการหมุนมีค่าประมาณ 60 MHz ถ้าให้พลังงานที่มีความถี่ตรงกับย่านความถี่วิทยุแก่โปรตอนที่สปินอยู่และความถี่ของคลื่นวิทยุที่ป้อนเข้ามาตรงกับความถี่ที่โปรตอนกำลังสปิน โปรตอนที่สปินในทิศเดียวกับสนามแม่เหล็ก (สภาวะพื้นหรือพลังงานต่ำ)จะดูดกลืนพลังงาน และเปลี่ยนไปสปินในทิศต้านกับทิศของสนามแม่เหล็ก (สภาวะเร้าหรือพลังงานสูง) การเปลี่ยนสภาวะสปินเช่นนี้เรียกว่า การเกิดเรโซแนนซ์ (Resonance) เราอาจกล่าวว่า โปรตอนมีเรโซแนนซ์กับคลื่นความถี่วิทยุที่เข้ามา ซึ่งเป็นที่มาของคำว่า นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

ข้อมูลที่ได้จาก ^{1}H –NMR สเปคตรัม มี 4 ประเภท คือ

1) เคมีคัลชิฟท์ (Chemical shift : δ, ppm) บอกตำแหน่งสัญญานของโปรตอนที่วัดห่างจากตำแหน่งสัญญาณของ TMS (Tetramethylsilane) TMS เป็นสารอ้างอิงที่กำหนดให้มีค่า δ = 0 ช่วง

chemical shifts ของโปรตอนในสารประกอบอินทรีย์ทั่วไปมีค่าระหว่าง δ 0–10 การที่โปรตอนเกิดเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่งต่างกันเนื่องจากโปรตอนอยู่ในสภาวะแวดล้อมทางเคมีที่แตกต่างกัน

2) อินทีเกรชัน (Integration) สัญญานซึ่งประกอบด้วยพีค (1 พีค 2 พีค 3 พีค . . .) NMR สเปคโตรมิเตอร์มีอุปกรณ์อิเล็คโทรนิกที่สามารถอินทิเกรท (Integrate) พื้นที่ใต้พีคเหล่านี้ออกมาเป็นเส้นที่มีความสูงที่สามารถวัดได้กำกับที่แต่ละสัญญาน สัญญานที่มีความเข้มสูง (มีจำนวนโปรตอนมาก) จะมีเส้นอินทีเกรทที่มีความสูงมากกว่า ดังนั้น เราจึงสามารถวัดความสูงของเส้นอินทีเกรทของแต่ละสัญญานและนำมาเทียบเป็นอัตราส่วน ถ้าทราบจำนวนโปรตอนทั้งหมด (จากสูตรโมเลกุล) ก็สามารถหาจำนวนโปรตอนของแต่ละสัญญานได้

3) สปิน-สปิน สปลิทติง (Spin-spin splitting) เป็นการแยกของสัญญานออกเป็นหลายพีค เนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างสปินของโปรตอนที่อยู่ข้างเคียงกัน อันตรกิริยานี้ เรียกว่า คัพพลิง (Coupling)

4) ค่าคงที่คู่ควบ (Coupling constant) ช่วงห่างระหว่างพีคของแต่ละสัญญาน สามารถอ่านค่าได้จากสเปคตรัมโดยตรง โปรตอนสองกลุ่มที่คัพเพิล (Couple) กันจะมีช่วงห่างระหว่างพีคหรือ ค่าคงที่คู่ควบเท่ากัน

2.7 การตรวจเอกลักษณ์สารด้วยแมสสเปกโทรเมทรี (ณรงค์ ไชยสุต. 2541)

แมสสเปกตรัมใช้ศึกษาโครงสร้างเคมีของสาร โดยแมสสเปกตรัมของสารที่นำมาทำการตรวจสอบเปลี่ยนไปเป็นอิออนของแก๊สที่เคลื่อนที่ได้ (อิออนบวก) และอิออนเหล่านี้แยกออกจากกันได้โดยใช้หลักอัตราส่วนมวลต่อประจุ เมื่อสารเกิดการแตกตัวเป็นอิออนให้อนุภาคบวกของสารนั้น ข้อมูลที่หาได้ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ถูกต้อง สัญญาณที่ได้จากแมสสเปกโทรมิเตอร์เกิดจากปฏิกิริยาเคมี โดยเป็นการแตกตัวเป็นอิออนและแฟรกเมนเตชันเมื่อมีอิเล็กตรอนกระแทก โดยใช้พลังงานจากลำอิเล็กตรอน ดังนี้

$$M + e \longrightarrow M^{+} + 2e$$

โดย M เป็นโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์
M^{+} เป็นโมเลกูลาร์อิออนหรือแพเรนต์อิออน

แมสสเปกตรัมของสารที่นำมาวิเคราะห์ แสดงพีคโมเลกูลาร์อิออน (Peak molecular ion) ซึ่งเป็นค่ามวลโมเลกูลาร์อิออน (M^{+}) โดยมีค่าเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบที่เกิดการให้อิเล็คตรอน มวลของอิออนนี้จึงใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสาร สารอินทรีย์ร้อยละ 80-90 ให้พีคโมเลกูลาร์อิออน โดยพีคที่สูงที่สุดของแมสสเปกตรัมเรียกว่า พีคเบส (Peak base) เป็นพีคที่เกิดจากโมเลกุลเกิดแฟรกเมนต์ให้อิออนที่เสถียร ถ้าสารมีไอโซโทปจะมีพีคไอโซโทป (Isotope peak) ซึ่งเป็นปริมาณและน้ำหนักไอโซโทปของธาตุที่มีในธรรมชาติ พบพีคโมเลกูลาร์อิออนที่ $(M+1)^{+}$ บางทีพบที่ $(M+2)^{+}$ ซึ่งขึ้นกับปริมาณของไอโซโทปนั้น เช่นสารประกอบที่มีคลอรีน หรือโบรมีนให้พีค $(M+2)^{+}$ ที่ความเข้มสูง

2.8 ระบบการนำส่งยาแบบถุง (Vesicle drug delivery system)

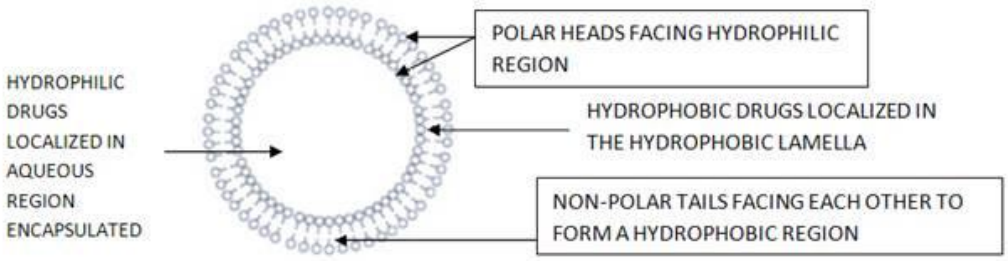
ในทางเครื่องสำอางได้มีการนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการพัฒนารูปแบบการนำส่งทางผิวหนังอย่างหลากหลายรูปแบบ ระบบการนำส่งยาแบบถุงเป็นอีกรูปแบบหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม เริ่มมีการกล่าวครั้งแรกในปี ค.ศ. 1963 โดยในปี ค.ศ. 965 Bangham และคณะ เรียกอนุภาคขนาดเล็กที่ประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันที่เรียงตัวซ้อนกันสองชั้นสลับกับชั้นของน้ำว่า ไลโปโซม (Liposome) โดยเตรียมขึ้นจากไขมันประเภทฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) เพื่อใช้ในการศึกษาค้นคว้าและพัฒนาหาแบบจำลองของผนังเซลล์ที่ดีขึ้น ต่อมาได้มีความสนใจในการนำไลโปโซมไปใช้เป็นตัวพายาสารต่าง ๆ หรือเครื่องสำอางเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากไลโปโซมมีส่วนประกอบและสมบัติคล้ายคลึงกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามพบว่าฟอสโฟลิพิดเป็นสารที่ไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและออกซิเดชัน มีปัญหาด้านความไม่คงตัวทางเคมีและกายภาพ มีการรั่วของสารบรรจุอย่างมาก ความบริสุทธิ์ของสารฟอสโฟลิพิดไม่คงที่ และราคาต้นทุนที่สูง ปัจจุบันมีการค้นคว้าพัฒนามากมายโดยสามารถเตรียมได้จากสารหลายชนิดและอาจใช้ชื่อตามสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการสร้างผนังถุงเช่น การใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Nonionic surfactants) เรียกว่า ไนโอโซม (Niosome) โดยมีสารลดแรงตึงผิวหลายชนิดสามารถใช้ในการเตรียมไนโอโซม เช่น โพลีออกซีเอทิลีนอัลคิลอีเทอร์ (Polyoxyethylene alkyl ether) ร่วมกับซูโครสอีเทอร์ หรือโพลีออกซีเอทิลีนอัลคิลเอสเทอร์ (Polyoxyethylene alkyl ester) ร่วมกับซูโครสอีเทอร์ เป็นต้น ซึ่งพบว่ามีสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ให้เลือกใช้เป็นจำนวนมากและมีความคงตัวที่ดีกว่าไลโปโซม นอกจากนี้ยังมีการใช้สารสฟิงโกลิพิด (Spingolipid) เรียกว่า สฟิงโกโซม (Sphingosome) สารซีรามายด์ (Ceramide) เรียกว่า ซีรามายด์ (Ceramide) สารกลีเซอริลไดลอเรต (Glyceryl dilaurate) เรียกว่า โนวาโซม (Novasome) และสารแอสคอร์บิลปาล์มมิเตท (Ascorbyl palmitate) เรียกว่า แอสปาโซม (Aspasome) เป็นต้น สารสังเคราะห์ที่ไม่มีประจุถูกสร้างขึ้นจำนวนมากมาย ทำให้สามารถสร้างระบบนำส่งยาแบบถุงที่มีสมบัติบางอย่างคล้ายไลโปโซมและสามารถหลีกเลี่ยงข้อเสียของไลโปโซมดังที่กล่าวมา ปัจจุบันระบบนำส่งยาแบบถุงยังคงได้รับความสนใจและพัฒนาอย่างมากมาย (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552, อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2545) ดังตัวอย่างในงานวิจัย เช่น งานวิจัยของ Santo, I.E. และคณะ (2014) โดยการใช้วิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวดโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับเอธานอลทำการเตรียมไลโปโซมจากซอยบีนฟอสฟาติดิลโคลีน (Soybean phosphatidylcholine) โดยอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดอยู่ในช่วง 130-294 nm และนำมาทำการทดลองกักเก็บโบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) พบว่ามีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารได้ร้อยละ 85-90 งานวิจัยของ Lia, Y. และคณะ (2014) ทำการพัฒนาสภาพความคงตัวของไลโปโซมโดยใช้ซิตรัสเพคติน (Citrus pectin) พบว่าช่วยเพิ่มความคงสภาพของไลโปโซม งานวิจัยของ Pando, D. และคณะ (2013) ทำการพัฒนาการกักเก็บสารเรสวีราทรอล (Resveratrol) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในไวน์แดงด้วยไนโอโซมที่เตรียมจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ 2 ชนิด ได้แก่ สแปน 60 (Span 60) และ สแปน 80 (Span 80) พบว่าไนโอโซมที่เตรียมจากสแปน 80 มีความคงสภาพมากกว่าที่เตรียมจากสแปน 60 แต่มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารที่ต่ำกว่า หรือในงานวิจัยของ Gopinath, D. และคณะ (2004) ได้ใช้สารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตทซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาทำการเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงเพื่อใช้ในการกักเก็บตัวยาอะซิโดไธมิดีน (Azidothymidine) และศึกษาการปลดปล่อยยาในหลอดทดลองแบบฟรานซ์ดิฟฟิวชันเซล (Franz diffusion cell) พบว่าตัวยาอะซิโดไธมิดีนที่กักเก็บในแอสปาโซมมีการซึมผ่าน (Permeation) สูงกว่า

สารละลายอะซิโดไธมิดีน เป็นต้น ด้วยประโยชน์ของระบบนำส่งยาแบบถุง จึงขอกล่าวถึงระบบนำส่งยาแบบถุงในด้านต่าง ๆ ได้แก่ลักษณะโครงสร้าง ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเตรียม วิธีการเตรียม การลดขนาดอนุภาค การตรวจสอบและควบคุมคุณภาพ และการศึกษาสภาพความคงตัว ดังต่อไปนี้

2.8.1 ลักษณะโครงสร้างของระบบนำส่งแบบถุง

ระบบนำส่งแบบถุงเป็นอนุภาคขนาดเล็กมีลักษณะเป็นถุงทรงกลม (Spherical shape) ผนังประกอบด้วยโมเลกุลของสารที่มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic part) และชอบไขมัน (Lipophilic part) จะเรียงตัวต่อกันเป็นผนังสองชั้น (Bilayer) โดยหันส่วนที่ชอบน้ำออก ชั้นของผนังสองชั้นนี้จะโอบล้อมเป็นถุงทรงกลมล้อมรอบส่วนของสารละลายน้ำไว้ภายใน ดังภาพที่ 3 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับผนังเซลล์ ส่วนที่ต่างจากผนังเซลล์คืออนุภาคอาจมีผนังสองชั้นของสารไขมันมากกว่าหนึ่งชุด ในขณะที่ผนังเซลล์มีผนังสองชั้นเพียงชุดเดียว ระหว่างผนังสองชั้นของอนุภาคเป็นชั้นน้ำ (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552, Uchegbu and Vyas. 1998)

ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างอนุภาคนำส่งแบบถุง



ที่มา: http://pharmaxchange.info/press/2012/niosomes/สืบค้นวันที่ 11 มีนาคม 2556: ออนไลน์

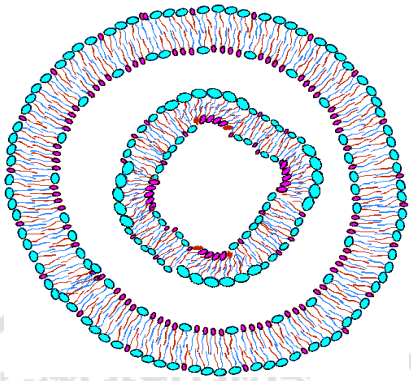
โครงสร้างถุงทรงกลมอาจมีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียวหรือซ้อนกันมากกว่า 1 ชั้น เป็นชั้นบาง ๆ (Lamellar) (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552) ซึ่งแบ่งได้ดังนี้

1) แบบผนังหลายชั้น (Multilamellar vesicles, MLV) มีขนาดใหญ่ประมาณ 0.1–10 μm ประกอบด้วยชั้นไขมันสองชั้นจำนวนหลาย ๆ ชั้นเป็นส่วนของผนัง ดังภาพที่ 4

2) แบบผนังชั้นเดียวขนาดใหญ่ (Large unilamellar vesicles, LUV) ขนาด 0.5-10 μm โดยอาจได้จากการนำอนุภาคแบบผนังหลายชั้น (Multilamellar vesicles, MLV) มาทำการลดขนาดลงด้วยการอัด (Extrusion) ผ่านเมมเบรน

3) แบบผนังชั้นเดียวขนาดเล็ก (Small unilamellar vesicles, SUV) ขนาด 25–50 nm โดยอาจได้จากการนำอนุภาคแบบผนังหลายชั้น (Multilamellar vesicles, MLV) มาทำการลดขนาดลงด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication)

ภาพที่ 4 โครงสร้างแบบผนังหลายชั้น (Multilamellar vesicles, MLV)



ที่มา: http://www.elsomresearch.com/learning/technology/nanosomes.htm/ สืบค้นวันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2554 : ออนไลน์

2.8.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเตรียมระบบนำส่งแบบถุง

อนุภาคนำส่งแบบถุงที่เตรียมขึ้นจากสารบางชนิดสามารถเกิดขึ้นได้เองแม้มีองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว เช่นสารไขมันฟอสโฟลิพิด ปัจจุบันมีการศึกษาพัฒนาหาสารตัวใหม่ ๆ ที่นำมาใช้เพื่อให้อนุภาคนำส่งแบบถุงมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น โดยคุณสมบัติของสารในการเกิดเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้

1) สารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุล (Amphiphile)

สารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกันต้น โดยสารประเภทนี้มีทั้งส่วนมีขั้วและไม่มีขั้วในโมเลกุลเดียวกัน มีหลายชนิดได้แก่ ไขมันประเภทฟอสโฟไลปิด เช่น ไดปาล์มิโตอิลฟอสฟาทิดิลคอลีน (Dipalmitoylphosphatidylcholine) ฟอสฟาทิดิลคอลีน (Phophatidylcholine) ฟอสฟาทิดิลเซรีน (Phosphatidylserine) เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Non-ionic surfactant) เช่น สารลดแรงตึงผิวชนิดอัลคิลอีเทอร์ (Alkyl ethers) อัลคิลเอสเทอร์ (Alkyl esters) อัลคิลเอไมด์ (Alkyl amides) ซูโครสเอสเทอร์ (Sucrose ester) เป็นต้น สารสฟิงโกลิพิด (Sphingolipid) สารซีรามายด์ (Ceramide) สารแอสคอร์บิลปาล์มิเตท (Ascorbyl palmitate) (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552, Manosroi, A. et al. 2003) และยังมีสารอีกหลายชนิดที่สามารถนำมาสังเคราะห์อนุภาคนำส่งแบบถุงได้โดยมีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุล (Amphiphile) และมีปัจจัยคุณสมบัติของสารที่เกี่ยวข้อง เช่น

- ความสมดุลของส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Lypophilic) ของสารที่เรียกว่า HLB (Hydrophilic-lipophilic balance) โดยพบว่าค่า HLB ระหว่าง 4-8 เป็นช่วงที่เหมาะสมในการเกิดอนุภาคนำส่งแบบถุง อย่างไรก็ตามพบว่าสารบางชนิดที่มีค่า HLB เกินช่วงดังกล่าวสามารถเกิดเป็นผนังสองชั้นได้เช่นกันเมื่อมีการเติมสารที่เหมาะสม เช่น พอลีซอร์เบท 20 (Polysorbate 20) ซึ่งมีค่า HLB ที่ 16.7 ซึ่งมีส่วนที่ชอบน้ำสูงมากในการเกิดผนังสองชั้นแต่พบว่าสามารถเกิดได้จากการเติมสารคอเลสเตอรอล (Cholesterol) ในระดับที่เหมาะสม (Uchegbu and Vyas. 1998)

- คริติคัลแพกกิ้งแฟกเตอร์ (Critical packing factor, P) หรือคริติคัลแพกกิ้งพารามิเตอร์ (Critical packing parameter, CPP) รวมทั้งรูปทรงเรขาคณิต (Geometric factor) ของ

โมเลกุลและแรงดึงดูดหรือแรงผลักของส่วนของสารที่อยู่ในโครงสร้างโมเลกุลมิติ (Dimensions) ซึ่งเป็นตัวกำหนดโครงสร้าง โดยค่า P หรือ CPP หาได้จากสูตรต่อไปนี้

$$CPP \text{ or } P = V/AL$$

โดย V คือ ปริมาตรของโมเลกุลไขมัน (Hydrocarbon chain volume)
A คือ พื้นที่หน้าตัดของส่วนมีขั้วของโมเลกุลไขมัน (Head group area)
L คือ ความยาวของสายไฮโดรคาร์บอน (ที่มาจากกรดไขมัน) ในโมเลกุลไขมัน (Hydrocarbon chain length)

ค่า CPP หรือ P ที่คำนวณได้พบว่าค่าที่อยู่ระหว่าง 0.5-1.0 ทำให้เกิดโครงสร้างแบบสองชั้น โดยเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อพื้นที่หน้าตัดของส่วนมีขั้วของโมเลกุลไขมันมีค่าระหว่าง 0.25-0.5 ตารางมิลลิเมตร (อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2545)

2) สารเติม (Additives)

มี 2 ประเภท (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552) ได้แก่

- สารสเตอรอล (Sterol) เช่น ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol), ไดไฮโดรคอเลสเตอรอล (Dihydrocholesterol) และคอเลสเตอรอล (Cholesterol) ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยทำให้ผนังของถุงมีความแข็งแรงมากขึ้น

- สารบัฟเฟอร์อิเล็กโทรไลต์ สารปรับพีเอช และสารที่มีประจุ โดยสารเหล่านี้ทำหน้าที่เพิ่มความคงตัวจากการลดการรวมตัวหรือหลอมตัวรวมกันหรืออาจทำให้ช่องว่างระหว่างชั้นเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บสารบางชนิดหรือทำหน้าที่เพิ่มความคงตัว สารเติมที่ไม่มีประจุ เช่น คอเลสเตอริลโพลี-24-ออกซีเอทิลีนอีเทอร์ (Cholesterylpoly-24-oxyethylene ether) เป็นการเพิ่มความคงตัวด้วยวิธีการกีดขวาง (Steric stabilization) เพื่อป้องกันการรวมตัวของอนุภาค สำหรับสารที่มีประจุ ได้แก่สารเติมที่มีประจุลบ เช่น กรดฟอสฟาติดิก (Phosphatidic acid) ไดซิทิลฟอสเฟต (Dicetylphosphate) และสารเติมที่มีประจุบวก เช่น สเตียริลเอมีน (Stearylamine) ซึ่งเป็นการเพิ่มความคงตัวด้วยไฟฟ้าสถิต (Electrostatic stabilization)

3) อุณหภูมิทรานซิชัน (Transition temperature, Tc)

อุณหภูมิทรานซิชันคืออุณหภูมิที่สารเปลี่ยนสภาพจากเจล (Gel) หรือของแข็งไปเป็นของเหลว (Liquid crystal) อุณหภูมิทรานซิชันเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด เช่นฟอสโฟลิพิดที่สกัดได้จากไข่แดงจะมีค่า Tc เท่ากับ -15 °C เป็นต้น โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นกับความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนและความไม่อิ่มตัวของสายไฮโดรคาร์บอนว่ามีมากน้อยเพียงใด รวมทั้งสมบัติของส่วนที่มีขั้ว เมื่อสายสายไฮโดรคาร์บอนมีความยาวมากขึ้นและอิ่มตัวขึ้น ทำให้อนุภาคที่ได้มีความเป็นของเหลวลดลงคือเป็นของแข็งมากขึ้นส่งผลให้สภาพซึมได้ของสารที่กักเก็บในอนุภาคลดลง ดังนั้นเพื่อให้การเตรียมอนุภาคมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ควรควบคุมอุณหภูมิขณะเตรียมอนุภาคให้สูงกว่า Tc ของสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกัน ในขณะเดียวกันในการเก็บรักษาหรือระหว่างการใช้อนุภาคควรควบคุมให้มีอุณหภูมิต่ำกว่าค่า Tc ของสารที่ใช้เตรียมเพื่อป้องกันสภาพซึมได้ของสารที่กัก

เก็บในอนุภาคและการรวมตัวของอนุภาค ซึ่งจะส่งผลทำให้อนุภาคขนาดใหญ่ขึ้นและอาจเกิดการตกตะกอนทำให้ไม่มีความคงสภาพ (อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2545)

2.8.3 วิธีการเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุง

การเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงใช้วิธีเดียวกับการเตรียมไลโปโซม ซึ่งทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปควรเลือกวิธีการเตรียมที่เหมาะสมกับคุณสมบัติของสารสำคัญที่ต้องการ วิธีการเตรียมมีหลายวิธีซึ่งมีความแตกต่างกันในรายละเอียดตามตัวอย่างดังนี้

1) วิธีฟิล์มไฮเดรชัน (Film hydration method)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการเตรียมมากที่สุด ด้วยการทำละลายสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกันในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม แล้วทำให้เกิดฟิล์มด้วยการระเหยเอาส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ออก จากนั้นทำให้ฟิล์มนี้กลับมาเปียกอีกครั้ง (Rehydrate) ด้วยการเติมน้ำ หรือสารละลายบัฟเฟอร์ หรือสารละลายน้ำ ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิทรานซิชันของสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกัน ฟิล์มที่กลับมาเปียกจะสร้างเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงชนิด MLV สำหรับวิธีการบรรจุสารสำคัญลงในอนุภาค ถ้าเป็นสารที่ละลายน้ำได้จะเติมลงในส่วนสารละลายน้ำที่ใช้ในช่วงทำให้ฟิล์มเปียก ถ้าเป็นสารที่ละลายในไขมันให้เติมพร้อมกับสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกัน (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552, Uchegbu and Vyas. 1988)

2) วิธีระเหยกลับวัฏภาค (Reverse phase evaporation method)

เตรียมโดยการละลายสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกันในตัวทำละลายอินทรีย์ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์ (Diisopropyl ether) หรือส่วนผสมของสารทั้งสองกับคลอโรฟอร์ม (Chloroform) จากนั้นเติมวัฏภาคน้ำลงในสารละลายที่มีสารโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมัน แล้วนำไปลดขนาดด้วยการใช้คลื่นความถี่สูง (Sonication) จนเกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน จากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออก ระบบจะมีลักษณะข้นหนืดคล้ายเจล จะเกิดการกลับวัฏภาคเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงชนิด MLV ที่เก็บกักสารได้จำนวนมาก (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552, Kumar and Rajeshwarrao. 2011)

3) วิธีดีไฮเดรชันและรีไฮเดรชัน (Dehydration – rehydration method)

เป็นการเตรียมโดยผสมสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกันและสารละลายของสารหรือตัวยาเข้าด้วยกันก่อน จากนั้นจึงดึงน้ำออกให้หมด (Dehydration) ด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง (Lyophilization) หรือการระเหย (Evaporation) หลังจากนั้นเติมน้ำ (Rehydration) จะเกิดการสร้างเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงชนิด MLV แล้วจึงนำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านเข้าเครื่องฟลูอิดไดเซอร์ก็จะได้อนุภาคที่มีสมบัติและขนาดตามที่ต้องการ (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552, อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2545)

4) วิธีฉีดด้วยตัวทำละลาย (Solvent injection method)

เตรียมโดยการละลายสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมัน ในตัวทำละลายที่มีความดันไอสูง เช่นไดเอทธิลอีเทอร์ (Diethyl ether) ฟลูโอโรคาร์บอน (Fluorocarbons) หรือเอธานอล (Ethanol) จากนั้นนำมาฉีดผ่านเข็มฉีดยาที่บรรจุน้ำหรือสารละลายน้ำของตัวยา อุณหภูมิสารละลายต้องสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลาย เมื่อสารละลายสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันถูกฉีดเข้าไปตัวทำละลายจะระเหยออกไปเหลือแต่สารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมัน ซึ่งเมื่อสัมผัสน้ำจะ

จัดเรียงตัวเกิดเป็นอนุภาคนำส่งพร้อมกักเก็บยา วิธีนี้เกิดการสร้างเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงชนิด SUV (อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2545)

5) วิธีของเหลววิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid method)

การเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงทั้ง 4 วิธีดังที่กล่าวมาแล้วนั้น มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม วิธีการเตรียมมีหลายขั้นตอน มีวิธีการเตรียมบางชนิดที่ไม่ได้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่นการใช้ความร้อน และวิธีการเจือจางโพลีออลซึ่งไม่เหมาะต่อสารสำคัญที่ไม่ทนต่อความร้อน ในทางอุตสาหกรรมทางยาและเครื่องสำอางซึ่งมีการให้ความสำคัญในวิธีการเตรียมในด้านการลดความเป็นพิษ ในขณะเดียวกันก็ปรับปรุงเสถียรภาพและการละลายของสารสำคัญด้วย วิธีการเตรียมแบบของเหลววิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid method) จึงถูกนำมาใช้เนื่องจากเป็นวิธีการเตรียมโดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการเตรียม โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้เนื่องจากมีอุณหภูมิวิกฤต (Critical Temperature) ต่ำ โดยอยู่ที่ 31.1°C และความดันวิกฤต (Critical pressure) ที่ 73.8 บาร์ หาง่าย และราคาไม่แพง สามารถใช้กับสารที่สลายตัวง่ายต่อความร้อน ซึ่งทำโดยการทำละลายสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกัน ในคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัดอากาศให้อยู่ในสภาวะเหลววิกฤตยวดยิ่ง (Supercritical fluid) ซึ่งเป็นสภาวะระหว่างสภาวะก๊าซและของเหลว ทำให้คาร์บอนไดออกไซด์มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดี สามารถทำละลายสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกันได้ เมื่อเติมสารละลายของสารสำคัญในน้ำลงไป จะทำการเพิ่มอุณหภูมิและความดันพร้อมอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อีกครั้ง จากนั้นปรับอุณหภูมิและความดันให้เป็นปกติ ก็จะเกิดการแยกตัวของอนุภาคนำส่งแบบถุงออกมา วิธีนี้เกิดการสร้างเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงชนิด LUV (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. 2552, Manosroi, A. et al. 2008)

6) วิธีการอัดก๊าซไนโตรเจน (Bubbling of nitrogen)

เป็นวิธีการเตรียมอีกวิธีหนึ่งที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ทำโดยการฉีดฟองแก๊สไนโตรเจนเข้าไปในสารแขวนตะกอนของสารผสมที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันในโมเลกุลเดียวกันในน้ำ การอัดแก๊สไนโตรเจนในช่วงแรก สารผสมสารที่มีโครงสร้างทั้งแบบชอบน้ำและไขมันเกิดเป็นผนังชั้นเดียวหุ้มแก๊สไนโตรเจน เมื่อเพิ่มแก๊สไนโตรเจนเข้าไปอีก โมเลกุลของสารจะไม่สามารถเรียงตัวอยู่ตรงผิวสัมผัส แต่จะเรียงตัวเป็นผนังสองชั้นเกิดเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุง และในระหว่างการเกิดอนุภาคนำส่งแบบถุงจะเก็บกักสารไว้ ซึ่งจะทำให้เกิดอนุภาคนำส่งแบบถุงชนิด LUV (อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2545, Kumar and Rajeshwarrao. 2011)

2.8.4 การลดขนาดของอนุภาคนำส่งแบบถุง

วิธีการเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงดังที่กล่าวข้างต้น ขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้อาจอยู่ในช่วงไมโครเมตร บางวิธีสามารถเตรียมได้ขนาดเล็กกว่าไมโครเมตร โดยอยู่ในช่วงนาโนเมตรโดยถ้าขนาดใหญ่กว่าที่ต้องการมักมีการใช้ขั้นตอนการลดขนาดซึ่งทำได้หลายวิธี (อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2545, Uchegbu and Vyas. 1998) ดังนี้

1) การอัดด้วยความดันสูง (High pressure homogenization)

เทคนิคนี้ใช้เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Homogenizer) โดยมีหลักการคือ นำอนุภาคนำส่งแบบถุงที่เตรียมไว้แล้วมาผ่านเครื่องอัดความดันสูงหลายๆ ครั้ง ซึ่งโดยปกติคือ 2-3 ครั้ง จนได้อนุภาคที่มีขนาดสม่ำเสมอ

2) การใช้คลื่นความถี่สูง (Sonication)

เทคนิคนี้ใช้ลดขนาดอนุภาคโดยใช้คลื่นความถี่สูง เช่น อัลตราโซนิค (Ultrasonic) เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูงชนิดแท่ง (Probe sonicator) หรือ คลื่นความถี่สูงชนิดอ่าง (Bath sonicator) ซึ่งทำให้อนุภาคนำส่งแบบถุงแตกออกแล้วกลับมาเรียงตัวใหม่ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กลงและสม่ำเสมอขึ้น

3) การอัดผ่านแผ่นเมมเบรน (Membrane extrusion)

เทคนิคนี้เป็นการลดขนาดอนุภาคนำส่งแบบถุงโดยอัดผ่านแผ่นเมมเบรนที่เตรียมจากพอลิคาร์บอเนต (Polycarbonate membrane) ซึ่งมีช่องเปิดขนาดสม่ำเสมอ เช่น นิวคลีโอพอร์ฟิลเตอร์ (Nucleopore filters) 100 นาโนเมตร เป็นต้น การอัดผ่านสามารถทำได้หลายครั้ง ส่วนใหญ่มักใช้เมมเบรนที่มีขนาดช่องใหญ่ก่อน แล้วจึงลดขนาดช่องให้เล็กลงใกล้เคียงกับขนาดอนุภาคที่ต้องการ

4) การใช้ไมโครฟลูอิดไดเซอร์ (Microfluidizer)

เทคนิคนี้เป็นการใช้เครื่องไมโครฟลูอิดไดเซอร์ซึ่งพัฒนาจากเครื่องมือที่ใช้เตรียมอิมัลชันและคอลลอยด์ ซึ่งเป็นการให้อนุภาคนำส่งแบบถุงผ่านเครื่องไมโครฟลูอิดไดเซอร์ซึ่งมีเครื่องปั๊มที่สามารถปรับแรงดันได้ตั้งแต่ 60-12,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยมีอัตราการไหลของของเหลวในเครื่องได้ตั้งแต่ 35-200 มิลลิเมตรต่อนาที จากนั้นของเหลวจะถูกแยกเป็นสายภายในห้อง (Chamber) แล้วของเหลวแต่ละสายจะผ่านเข้าไปในช่องสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ (Rectangular slits) ด้วยความเร็วสูง จากนั้นของเหลวทั้งสองสายจะชนกันด้วยความเร็วสูง ขณะชนจะเกิดแรงตัดที่ทำให้อนุภาคเดิมแตกออกแล้วกลับมารวมใหม่เป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงที่มีขนาดเล็กลง

5) การแช่แข็งและหลอมละลาย (Freeze-thaw method)

เทคนิคนี้ใช้กระบวนการแช่แข็งและหลอมละลาย (Freeze-thaw) เพื่อลดขนาดอนุภาคนำส่งแบบถุง โดยนำอนุภาคนำส่งแบบถุงแห้งหรือแขวนตะกอนผสมกับสารละลายยา แล้วนำมาผ่านกระบวนการแช่แข็งและเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้หลอมละลายหลาย ๆ รอบ ทำให้อนุภาคแตกออกแล้วกลับมารวมตัวกันใหม่พร้อมทั้งกักเก็บสารหรือยาไว้

2.8.5 การตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของอนุภาคนำส่งแบบถุง

อนุภาคนำส่งแบบถุงที่เตรียมได้นำมาทำการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพ โดยวิธีการที่สำคัญ (อรัญญา มโนสร้อย และ จีรเดช มโนสร้อย. 2545) ดังนี้

1) การตรวจและวัดขนาดอนุภาค

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจและวัดขนาดอนุภาคมีมากมาย เช่น

1.1) การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscope analysis) หรือกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์ (Polarized light microscope) หรือกล้องจุลทรรศน์วาวแสง (Fluorescent microscope) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะอนุภาคที่เตรียมได้เบื้องต้น

1.2) การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope : SEM) หรือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope : TEM) หรือ กล้องจุลทรรศน์การแตกในสภาวะแข็ง (Freeze fracture electron microscope) เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจเพื่อเป็นการยืนยันลักษณะอนุภาคที่เตรียมได้

1.3) การกระจายแสง ซึ่งเป็นเทคนิคการวัดโดยหลักการกระเจิงแสงแบบพลวัต (Dynamic light scattering : DLS) ขั้นตอนการวัดทำได้ง่ายแต่เครื่องมือมีราคาสูง สามารถวัดกระจาย

ขนาดอนุภาค (Polydispersity index:PI) โดยถ้าขนาดอนุภาคเล็กกว่า 600 nm สามารถวัดศักย์ไฟฟ้าซีต้า (Zeta-potential) ร่วมด้วย

2) การตรวจสอบการกักเก็บสารในอนุภาคนำส่งแบบถุงด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. 2550, Kamil et al. 2011)

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) ซึ่งคลื่นอินฟราเรดให้ข้อมูลที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการหาหมู่ฟังค์ชันในโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ ย่านอินฟราเรดในสเปคตรัมของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่ให้ประโยชน์มากที่สุดต่อนักเคมีอินทรีย์คือย่านความถี่ระหว่าง 4,000-650 ซม$^{-1}$ (ซม$^{-1}$ เป็นหน่วยของจำนวนคลื่นต่อวินาทีหรือเรียกว่า เลขคลื่น) และความยาวคลื่นระหว่าง 2.5-15 μm (1 μm = 10^{-6} m) สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความยาวคลื่นและเลขคลื่น คือความยาวคลื่น (μm) =10,000 เลขคลื่น (ซม$^{-1}$) อินฟราเรดสเปคตรัม เป็นการพลอตระหว่างความถี่ (เลขคลื่น, ซม$^{-1}$) หรือความยาวคลื่น (μm) และความส่งผ่านของสาร (Transmittance:T) โดยความส่งผ่านของสารเป็นอัตราส่วนระหว่างความเข้มของรังสีที่ผ่านสารตัวอย่าง (Transmitted radiation, I) และความเข้มของรังสีที่ตกกระทบสาร

การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดตรงกับพลังงานในช่วง 2-10 กิโลแคลอรี่ต่อโมล พลังงานของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในย่านนี้ก่อให้เกิดการสั่นแบบยืด (Stretching) และแบบงอ (Bending) ของพันธะในโมเลกุลของสาร การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเป็นขบวนการควันไทส์ (Quantized) กล่าวคือการที่สารจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดนั้น ความถี่ของรังสีที่ถูกดูดกลืนจะต้องตรงกับความถี่ของการสั่นของพันธะเท่านั้น นอกจากนี้ การสั่นของพันธะทุกประเภทในโมเลกุลมิได้ให้พีคใน IR สเปคตรัมเสมอไปการสั่นของพันธะที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไดโพลโมเมนต์ (dipole moment) เท่านั้นที่จะมีพีคปรากฏใน IR สเปคตรัม โดยทั่วไป แถบที่เกิดใน IR สเปคตรัม เกิดจากการสั่นแบบพื้นฐาน ได้แก่ การยืดและการงอ

การวิเคราะห์ IR สเปคตรัม มีประโยชน์ในการหาหมู่ฟังค์ชั่นของโมเลกุล แต่เนื่องจากมีพีคจำนวนมากใน IR สเปคตรัม เราคงไม่สามารถคาดหวังว่าจะรู้ทุกพีคใน IR สเปคตรัม ขั้นตอนต่อไปนี้อาจเป็นแนวทางเริ่มต้นในการแปรข้อมูลจาก IR สเปคตรัมได้ ดังนี้

- ตรวจสอบว่ามีหมู่คาร์บอนิลหรือไม่

  หมู่คาร์บอนิลให้แถบที่มีความเข้มสูงในย่าน 1680-1820 ซม$^{-1}$

- ถ้ามีหมู่คาร์บอนิล ให้วิเคราะห์ต่อไปว่า เป็นสารประกอบคาร์บอนิลประเภทใดโดยตรวจสอบว่าสารประกอบคาร์บอนิลนั้นยังมีหมู่ฟังค์ชั่นอื่นที่พบใน IR สเปคตรัม หรือไม่

  กรดคาร์บอกซิลิก การยืด O–H ให้แถบกว้างและความเข้มสูงมากในย่าน 2400-3400 ซม$^{-1}$และมักเกยกับแถบการยืด C–H

  แอลดีไฮด์ การยืด C–H ให้แถบที่มีความเข้มปานกลางถึงอ่อนที่ 2750 ซม$^{-1}$ และ 2850 ซม$^{-1}$ แถบ 2850 ซม$^{-1}$ อาจถูกบดบังจากแถบการยืด C–H ของหมู่ CH_3, CH_2

  เอไมด์ การยืด N–H ให้แถบที่มีความเข้มปานกลางใกล้ 3500 ซม$^{-1}$ อาจมีหนึ่งหรือสองแถบ

  แอนไฮไดรด์ แถบการยืด C=O มี 2 แถบใกล้ 1760-1810 ซม$^{-1}$

  เอสเทอร์การยืด C–O ให้แถบที่มีความเข้มปานกลางถึงเข้มในย่าน 1000-1300 ซม$^{-1}$ อาจมีมากกว่าหนึ่งแถบ

  คีโตน ถ้าไม่มีแถบสำคัญอื่น ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ก็น่าจะเป็นสารประกอบคีโตน

- ถ้าไม่ใช่สารประกอบคาร์บอนิล

แอลกอฮอล์และฟีนอล การยืด O–H ให้แถบที่มีความเข้มสูงและกว้างในย่าน 3200-3600 ซม$^{-1}$ และแถบการยืด C–O ในย่าน 1000-1300 ซม$^{-1}$

เอมีน การยืด N–H ให้หนึ่งหรือสองแถบที่มีความเข้มปานกลางใกล้ 3500 ซม$^{-1}$

อีเทอร์ การยืด C–O ให้แถบที่มีความเข้มปานกลางถึงเข้มในย่าน 1000-1300 ซม$^{-1}$ อาจมีมากกว่าหนึ่งแถบ

อัลคิลอีเทอร์ ให้แถบเดียวในย่าน 1085-1150 ซม$^{-1}$

เอลิลอัลคิลอีเทอร์ ให้ 2 แถบ แถบหนึ่งในย่าน 1200-1275 ซม$^{-1}$ และอีกหนึ่งแถบในย่าน 1020-1075 ซม$^{-1}$

สารประกอบไนโตร การยืด N=O ให้แถบที่มีความเข้มสูง 2 แถบในย่าน 1500-1600 ซม$^{-1}$ และย่าน 1300-1390 ซม$^{-1}$

ไนทริล การยืด C≡N ให้แถบที่มีความเข้มค่อนข้างอ่อนในย่าน 2150-2260 ซม$^{-1}$

เฮโลเจน ฟลูออรีน:การยืด C–F ให้แถบที่มีความเข้มสูงในย่าน 1000-1400 ซม$^{-1}$ คลอรีน:การยืด C–Cl ให้แถบที่มีความเข้มสูงในย่าน 600-800 ซม$^{-1}$ โบรมีน:การยืด C–Br ให้แถบในย่าน 400-600 ซม$^{-1}$ ซึ่งมักไม่เห็นใน IR สเปคตรัม ไอโอดีน:การยืด C–I ให้แถบในย่าน 400-600 ซม$^{-1}$ ซึ่งมักไม่เห็นใน IR สเปคตรัม

- ไฮโดรคาร์บอน

อะโรเมติก การยืด =C–H ที่ 3000-3100 ซม$^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคเล็กและแหลมคม อาจมีหลายพีค การยืด C=C เกิดในช่วง 1450-1600 ซม$^{-1}$ อาจมีถึง 4 แถบคือที่ 1450, 1500, 1580 และ 1600 ซม$^{-1}$ การงอของ C–H (ออกนอกระนาบ) เป็นแถบที่มีความเข้มสูงเกิดในย่าน 675-900 ซม$^{-1}$ ใช้บอกรูปแบบการแทนที่บนวงเบนซีนได้

วงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ 1 หมู่ เกิดที่ 690 และ 750 ซม$^{-1}$

วงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ 2 หมู่แบบออโท เกิดที่ 750 ซม$^{-1}$

วงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ 2 หมู่แบบเมตา เกิดที่ 690, 780 ซม$^{-1}$ และอาจมีอีก 1 แถบที่มีความเข้มปานกลางใกล้ 880 ซม$^{-1}$

วงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ 2 หมู่แบบพารา เกิดที่ 800-850 ซม$^{-1}$ แถบคอมบีเนชั่นและโอเวอร์โทนเกิดในช่วง 1667-2000 ซม$^{-1}$

อัลเคน

การยืดของ C–H ให้แถบที่มีความเข้มสูงที่ 2850-2960 ซม$^{-1}$

การงอของ C–H ให้แถบที่มีความเข้มปานกลางใกล้ 1375 ซม$^{-1}$ และ 1450 ซม$^{-1}$

อัลคีน

การยืด C=C ให้แถบที่มีความเข้มต่ำใกล้ 1650 ซม$^{-1}$ (ถ้าเป็นอัลคีนที่มีความสมมาตรแถบนี้จะไม่ปรากฏใน IR สเปคตรัม) การยืด =C–H ของไวนิลที่ 3000-3100 ซม$^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคเล็กและแหลมคม

อัลไคน์

การยืด C≡C ให้แถบที่มีความเข้มต่ำใกล้ 2150 ซม$^{-1}$ (ถ้าเป็นอัลไคน์ที่มีความสมมาตรแถบนี้จะไม่ปรากฏใน IR สเปคตรัม) การยืด ≡C–H ที่มีความเข้มสูงใกล้ 3300 ซม$^{-1}$

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR มีข้อดีหลายข้อ ข้อแรกคือ มีค่าสัญญาณต่อคลื่นรบกวน (signal-to-noise) สูง ช่วยให้สัญญาณชัดเจน และเนื่องจากสเปคตรัมทั้งหมดถูกส่องกราด (scan) ภายในช่วงเวลาสั้น (ไม่เกิน 1 วินาที) การส่องกราดหลายครั้งจึงสามารถทำได้รวดเร็วและนำข้อมูลมารวมกัน สัญญาณจากพีคแท้ ๆ เป็นบวก และมักเกิดที่ความถี่เดียวกันเวลาส่องกราด ส่วนพีคของสัญญาณรบกวนเป็นทั้งบวกและลบและเกิดที่เลขคลื่นแบบสุ่ม ทำให้สัญญานของพีคแท้ ๆ ถูกย้ำหลาย ๆ ครั้งแต่สัญญานของคลื่นรบกวนถูกหักล้างออกไป ดังนั้น เราจึงได้ IR สเปคตรัมที่ชัดเจน ใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อย (1 มิลลิกรัมหรือน้อยกว่า) และได้สเปคตรัมที่มีคุณภาพดีที่ถูกต้องแม่นยำ

3) การทดสอบสภาพความคงตัวของอนุภาคนำส่งแบบถุง

สำหรับการทดสอบความคงตัวของอนุภาคนำส่งแบบถุงไม่มีวิธีทั่วไป การทดสอบจะเป็นกรณี ๆ ไปแล้วแต่ประเภทของผลิตภัณฑ์และสภาวะการนำไปใช้ อย่างไรก็ตามยาหรือเครื่องสำอางในรูปแบบอนุภาคนำส่งแบบถุงที่ต้องขนส่งไปยังที่ต่าง ๆ มีวิธีทดสอบทั่วไป และเก็บในที่ที่มีอุณหภูมิแตกต่างกันดังนี้

- ความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °C) เป็นเวลา 12-24 เดือน
- ความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 เดือน
- ความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่ 45 °C เป็นเวลา 1 เดือน
- ความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 12 เดือน
- ความคงตัวในวงจรแช่แข็ง-หลอมละลาย (Freeze-thaw ที่ -20 °C/25 °C) จำนวน 2-3 รอบ
- ความคงตัวในวงจรร้อน-เย็น (Heat-Cool ที่ 45 °C/5 °C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในแต่ละอุณหภูมิจำนวน 6 รอบ
- ความคงตัวในการเขย่าด้วยเครื่องเขย่ากลับหัว (Reciprocating shaker ที่ 60 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 24-28 ชั่วโมง

ในการทดสอบยาหรือเครื่องสำอางในรูปแบบอนุภาคนำส่งแบบถุง ควรใช้ภาชนะบรรจุที่ใช้จริงและทุกขนาด จะประเมินผลจากการตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของลักษณะทางกายภาพ (Characteristics) ความคงตัวทางกายภาพ (Physical stability) ความคงตัวทางเคมี (Chemical stability) และสมบัติทางชีววิทยา (Biological properties) อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบไม่จำเป็นต้องตรวจสอบสมบัติทั้งหมดในทุกด้าน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรูปแบบการนำไปใช้ (อรัญญา มโนสร้อย และจีรเดช มโนสร้อย. 2545)

2.9 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็นหลายกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ เช่น การเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ การทำให้เปอร์ออกไซด์ (Peroxide) หมดฤทธิ์ และการเข้าจับกับโลหะหนัก เป็นต้น ซึ่งวิธีศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองที่นิยมในการทำวิจัยปัจจุบัน (สุนีย์ ชาญณรงค์. 2552) มีตัวอย่างดังนี้

2.9.1 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

วิธีนี้ประกอบด้วยสารอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารเรืองแสง ซึ่งสารอนุมูลอิสระจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารเรืองแสงได้เป็นสารไม่เรืองแสงขึ้น วัดผลจากค่าความเข้มของแสงจางลง เมื่อเติมสารต้านอนุมูล

อิสระเข้าไปในปฏิกิริยา สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระทำให้สารเรืองแสงไม่จางหาย จึงวัดค่าความเข้มของสารเรืองแสงได้มากขึ้น ตามความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ วิธีเป็นวิธีการศึกษาฤทธิ์แบบทางอ้อม จากการติดตามความเข้มของสารเรืองแสง จากนั้นเปรียบเทียบฤทธิ์ของตัวอย่างกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน สารมาตรฐานที่นิยมใช้ ได้แก่ 6-ไฮดรอกซี-2,5,7,8-เตตราเมธิลโครแมน-2-คาร์บอกซิลิคแอซิด (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid : HTCC; Trolox) หรืออาจใช้สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น บิวทีเลทไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene : BHT) หรือ แอลฟา-โทโคฟีรอล ซึ่งละลายน้ำได้น้อย ในงานวิจัยส่วนใหญ่จึงนิยมใช้ HTCC ซึ่งละลายน้ำดีกว่าแทน ทำโดยการเตรียมสารละลาย HTCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำการทดลองในลักษณะเดียวกันกับสารตัวอย่าง จากนั้น นำค่าความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่วัดได้ไปพล็อตกับความเข้มข้นของ HTCC เพื่อใช้เป็น calibration curve ดังนั้น ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้ จะเป็นค่าทรอล็อกซ์อิควิวาเลนท์ (Trolox equivalent : TE) มีหน่วยเป็น ไมโครโมลาร์ทรอล็อกซ์อิควิวาเลนท์ต่อลิตรหรือต่อกรัมของสารตัวอย่าง สำหรับสารอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่อนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล (Peroxyl) ซึ่งได้จากปฏิกิริยาการให้ความร้อนแก่สารตั้งต้น Azo-initiator compound เช่น สาร 2'-เอโซ-บิส-(อะมิดิโนโพรเพน) ไดไฮโดรคลอไรด์ (2'-Azo-bis-(2-amidinopropane) dihydrochloride : ABAP) เป็นต้น สารเรืองแสงที่ใช้ในการศึกษานี้คือฟลูโอเรสซีน (Fluorescein) หรืออาจจะใช้เบต้า-ฟิโคอิรีธริน (beta-Phicoerythrin)

วิธีนี้มีข้อด้อยคือจะวัดปริมาณได้เฉพาะสารที่กลไกออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลเท่านั้น ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดมีกลไกอื่น ๆ เกิดขึ้นร่วมด้วยจะไม่สามารถถูกตรวจพบได้ ทำให้ค่าที่ได้ต่ำกว่าที่เป็นจริง

2.9.2 Total antioxidant scavenging capacity (TOSC)

วิธีนี้เป็นปฏิกิริยาที่ดูผลการยับยั้งอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล คล้ายกับวิธี ORAC กล่าวคือให้สารต้านอนุมูลอิสระเข้าแย่งจับกับอนุมูลอิสระทำให้ผลผลิตทางปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ใช้สารอนุมูลอิสระเป็นสารตั้งต้นมีปริมาณลดลง โดยในปฏิกิริยานี้ประกอบด้วยสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ แอลฟา-คีโต-แกรมมา-เมไธออลบิวธิริคแอซิด (α-Keto-γ-methiolbutyric acid : KMBA) และอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากันจะได้แก๊สเอทธิลีน (Ethylene) ออกมา เมื่อมีการเติมตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเข้าแย่งจับกับอนุมูลอิสระ ผลคือไปยับยั้งการผลิตแก๊สเอทธิลีนหรือทำให้ผลิตได้น้อยลงตามปริมาณของอนุมูลอิสระที่เหลืออยู่ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของแก๊สเอทธิลีนของปฏิกิริยาของตัวอย่างที่ศึกษา จะทราบค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ วิธีนี้จะใช้ แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น

$$\text{TOSC value} = 100 - (AUC_{sample} / AUC_{control} \times 100)$$

โดย AUC_{sample} = พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง

$AUC_{control}$ = พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน

ดังนั้นถ้า TOSC value = 0 แปลว่า ในตัวอย่างไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ถ้า TOSC value เท่ากับ 100 แสดงว่า ตัวอย่างสามารถยับยั้งการผลิตแก๊สเอทธิลีนได้อย่างสมบูรณ์ นั่นคือ ในปฏิกิริยาไม่มี

อนุมูลอิสระเหลือพอจะทำปฏิกิริยากับ KMBA ให้แก๊สเอทธิลีนได้เลย

วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะในการศึกษา Total oxyradical scavenging capacity ของตัวอย่างจากสิ่งมีชีวิต เช่นเซลล์หรือตัวอย่างเลือด เป็นต้น

ค่าความสามารถในการต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระที่ศึกษาโดยวิธี TOSC อาจคำนวณเป็นค่า TE โดยการเทียบกับ calibration curve ของ HTCC

2.9.3 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

วิธีนี้มีหลักการคล้ายคลึงกับวิธี ORAC แต่เป็นการวัดสีของอนุมูลอิสระที่หายไปจากการเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารต้านอนุมูลอิสระวัดการหายไปของสีอนุมูลอิสระโดยใช้ไดโอด-แอเรย์ สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Diode-array spectrophotometer) สารอนุมูลอิสระที่ใช้ คือ แคทอิออนเรดิคัลเอบีทีเอส (Cation radical ABTS : $ABTS^{\bullet+}$) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่คงตัว สารละลายมีสีเขียวแกมน้ำเงิน ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อนำมาใช้เป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระ ในปฏิกิริยาจะถูกสารรีดิวซ์ให้เป็น 2,2'-อะซิโน-บิส (3-เอธิลเบนซไธอะโซลีน-6-ซัลโฟนิคแอซิด (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid : ABTS) ที่ไม่มีสีเกิดขึ้นแทน

วิธีนี้เป็นการวัดฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยกลการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยตรง ประสิทธิภาพหรือฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระคิดเทียบค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน HTCC การวิเคราะห์ผลการทดลองทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุมูลอิสระ ($ABTS^{\bullet+}$) ที่หายไป หลังจากปล่อยให้ทำปฏิกิริยาตามเวลาที่กำหนด ผู้คิดค้นวิธีนี้ได้แนะนำให้วัดผลที่เวลา 6 นาที จากนั้นเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับ calibration curve ซึ่งได้จากการพล๊อตค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นคำนวณฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า TE ต่อกรัมของตัวอย่าง

2.9.4 ABTS assay

เป็นวิธีที่พัฒนาจากวิธี TEAC assay เป็นการศึกษาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยให้สารต้านอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ได้จากการเตรียมขึ้นใหม่ ๆ (Freshly prepared) จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระนาน 6 นาที (หรือนานกว่านั้นถ้าต้องการติดตามดูผลของปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ) จากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm คำนวณค่า % Inhibition จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[(A_{734} \text{ of control} - A_{734} \text{ of extract})]}{A_{734} \text{ of control}} \times 100$$

Control คือ ปฏิกิริยาที่ไม่เติมสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการทดลองนี้จะเหมือนกับวิธี TEAC assay ซึ่งเพียงแต่ใช้ HTCC มาเป็นสารมาตรฐานจะเทียบเคียงค่าได้ TE ออกมา การศึกษานี้จึงอาจรายงานผลเป็น % Inhibition ไว้เปรียบเทียบกันเองระหว่างตัวอย่างที่ต่างชนิดกันหรืออาจใช้สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่มีกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระแบบเดียวกันเช่น วิตามินซี (Ascorbic acid) หรือแอลฟา-โทโคฟีรอล เป็นตัวเทียบก็ได้

อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เตรียมจากปฏิกิริยาของ ABTS กับโปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) โดยละลาย ABTS ในน้ำให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลต่อลิตร และให้ทำปฏิกิริยากับ

โปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลต่อลิตร ตั้งของผสมไว้ในที่มืดนาน 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สารนี้จะคงตัวอยู่ได้นาน 2 วัน

วิธีนี้สามารถวิเคราะห์โดยการวัดที่เวลาที่ทำปฏิกิริยาค่าใดค่าหนึ่ง (Define time point) หรือทำการวัดที่เวลาต่าง ๆ และวัดจากค่าพื้นที่ใต้กราฟก็ได้ โดยเทียบค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยาแบบเดียวกันเช่นเดียวกับวีอื่น ๆ ที่กล่าวมา และเป็นวิธีที่สามารถใช้ได้กับทั้งสารต้านอนุมุลอิสระทั้งที่ละลายน้ำและละลายไขมัน

2.9.5 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เป็นวิธีวัดฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระจากการวัดประสิทธิภาพการรีดิวซ์สารเฟอร์ริกอิออน (Ferric ion) ให้เป็นสารเฟอรัส (Ferrous) โดยตรง สารตั้งต้นของปฏิกิริยานี้รวมเรียกว่า FRAP reagents ประกอบด้วย 2,3,5-Triphenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-dienechloride (TPTZ) ทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสารเชิงซ้อนกับ $FeCl_3$ ได้เป็น Fe^{3+}-TPTZ (เป็นสารไม่มีสี) เมื่อสารเชิงซ้อนนี้ถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ จะได้สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+}-TPTZ (สีน้ำเงิน) เกิดขึ้น ซึ่งวัดการเปลี่ยนแปลงนี้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 593 nm การรายงานผลจะบอกค่าเป็น ค่า FRAP มีหน่วยเป็นมิลลิโมล/ลิตร ของ $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่เตรียมเป็น calibration curve เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Fe^{2+}-TPTZ มีหน่วยเป็นมิลลิโมล/ลิตร ต่อหน่วยของตัวอย่าง

2.9.6 DPPH Assay

เป็นวิธีนี้เป็นวิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ง่าย นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการทดสอบฤทธิ์ของอาหารและสมุนไพร (สุนีย์ ชาญณรงค์. 2552)

ในปี 1958 Blois ผู้คิดค้นในหลักการและวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารอนุมูล 2,2-ไดฟีนิล-1-พิคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl: $DPPH^{\bullet}$) มาทำการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีที่ใช้เทคนิคการสังเกตุสีที่ง่าย (Mishra et al. 2012)

$DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลที่มีความคงสภาพในสารละลาย มีสีม่วงโดยดูดกลืนคลื่นที่ 515 nm หลักการคือ เมื่อ อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ จับกับไฮโดรเจนอะตอมของโมเลกุลที่พร้อมจับกับอนุมูลอิสระ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดการลดลงของอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เปลี่ยนไปเป็น $DPPH_2$ ในการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและทำให้การดูดกลืนคลื่นที่ 515 nm ลดลง ทำให้สามารถวัดคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นถูกตรวจวัดด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer) (Mishra et al. 2012) โดยสมการปฏิกิริยาอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมุลอิสระ (AH) หรือกับ อนุมูล ($R^{\bullet}$) แสดงได้ดังนี้ (Brand-Williams et al. 1995)

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

หรือ

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

จากรายงานการวิจัยของ Liu Donghong และคณะ (2008) ซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไลโคปีนได้ใช้ช่วงการดูดกลืนคลื่นที่ 540 nm เนื่องจากเมื่อไลโคปีนทำปฏิกิริยา

กับ DPPH$^{\bullet}$ จะมีสีน้ำตาลดำเกิดขึ้นซึ่งจะทำให้รบกวนการอ่านค่าการดูดกลืนคลื่นที่ 515 nm ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่เหมาะสมของ DPPH$^{\bullet}$ เพื่อลดการรบกวนดังกล่าว จึงวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 540 nm ซึ่งยังคงดูดกลืนแสงได้ดี โดยที่สีน้ำตาลดำที่เกิดขึ้นไม่รบกวนในความยาวคลื่นนี้ ในการศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถคำนวณได้จาก การเปรียบเทียบสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน โดยวัดที่ระยะเวลาที่ทำปฏิกิริยาเท่ากัน การคำนวณหาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระสารตัวอย่างที่ทดสอบ โดยรายงานเป็นค่า % Scavenging Capacity หาได้จากสมการดังนี้ (Liu Donghong et al. 2008)

$$\% \text{ Scavenging Capacity} = 100 - [(Abs_{sample}-Abs_{blank})x\ 100/\ Abs_{control}]$$

โดย Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างและสารละลาย DPPH
Abs_{blank} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างและตัวทำละลาย
$Abs_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH และตัวทำละลาย

2.10 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย

จากการค้นคว้าในงานวิจัยและทบทวนวรรณกรรมพบว่า ไลโคปีนเป็นสารแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่งที่พบในผิวหนังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ (Darvin et al. 2008) โดยมีฤทธิ์ในการจับกับออกซิเจนเดี่ยวเป็นสองเท่าของเบต้า-แคโรทีน และเป็นสิบเท่าของแอลฟา-โทโคฟีรอล (วิตามินอี) และเนื่องจากในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ไลโคปีนขึ้นเองได้ ต้องได้รับจากแหล่งสารอาหาร โดยแหล่งที่สำคัญของไลโคปีนได้แก่ มะเขือเทศ (Shi John et al. 2008) การนำไลโคปีนจากมะเขือเทศสามารถทำได้โดยการสกัดซึ่งวิธีการสกัดมีหลายวิธี ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีการสกัดไลโคปีนด้วยตัวทำละลาย ซึ่งเป็นวิธีที่มีความสะดวกในระดับปฏิบัติการ ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความซับซ้อนราคาสูง โดยตัวทำละลายที่ใช้ คือ เอทธิลอะซีเตท ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (L.S. Vaughn Katherine et al. 2008, Liu Yongfeng et al. 2004) และนำสารสกัดจากมะเขือเทศที่ได้จากการสกัดซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิดมากมายรวมทั้งสารไลโคปีนที่ต้องการไปทำการแยกสารรบกวนที่ไม่ต้องการและเพื่อให้ได้สารสกัดไลโคปีนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารให้ได้ปริมาณมาก (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547) จากนั้นนำสารสกัดไลโคปีนที่ได้มาทำการตรวจเอกลักษณ์ไลโคปีนด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และแมสสเปกโทรเมทรี และหาปริมาณสารสกัดไลโคปีนด้วยเทคนิครงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูงพร้อมทั้งทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์รงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะเพื่อทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับได้

เนื่องจากสภาพความคงตัวของไลโคปีนอาจจะแปรเปลี่ยนได้และอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการ (Lee, M.T. and Chen, B.H. 2002, Shi John et al. 2008) หากใช้ระบบการกักเก็บสารระดับนาโนเทคโนโลยีจะสามารถช่วยรักษาสภาพความคงตัวของไลโคปีนได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่เปลี่ยนแปลงธรรมชาติทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร ทั้งยังใช้เป็นตัวนำส่งสารไปยังเป้าหมายได้อีกด้วย (Kaur et al. 2007, Uchegbu and Vyas. 1998) ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตท ที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถเตรียมเป็น

อนุภาคนำส่งแบบถุงได้ โดยจากงานวิจัยของ Gopinath, D. และคณะ (2004) ได้ใช้สารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตทซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาทำการเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงเพื่อใช้ในการกักเก็บตัวยาอะซิโดไธมิดีน (Azidothymidine) และศึกษาการปลดปล่อยยาในหลอดทดลองแบบฟรานซ์ดิฟฟิวชันเซล (Franz diffusion cell) พบว่าตัวยาอะซิโดไธมิดีนที่กักเก็บในแอสปาโซมมีการซึมผ่าน (Permeation) สูงกว่าสารละลายอะซิโดไธมิดีนแต่ไม่พบข้อมูลการศึกษาสภาพความคงตัวในงานวิจัยดังกล่าว ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงมีความสนใจในการนำสารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตทมาทำการวิจัยพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคนำส่งแบบถุงและทำการประเมินคุณลักษณะเฉพาะของอนุภาคนำส่งแบบถุง พร้อมทั้งทำการศึกษาสภาพความคงตัวเพื่อทำการเลือกสูตรตำรับที่มีความคงสภาพและนำมาใช้ในการกักเก็บสารสกัดไลโคปีน พร้อมทั้งทำการประเมินคุณลักษณะเฉพาะอนุภาคนำส่งแบบถุงที่กักเก็บสารสกัดไลโคปีนและตรวจสอบการกักเก็บของสารสกัดไลโคปีนในอนุภาคนำส่งแบบถุงด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer : FT- IR) จากนั้นนำสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงและสารละลายสารสกัดไลโคปีนมาทำการประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay โดยพบว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบในรายงานการวิจัยของ Liu Donghong และคณะ (2008) ซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไลโคปีนได้ใช้ช่วงการดูดกลืนคลื่นที่ 540 nm และให้ผลอย่างมีนัยสำคัญ และวิธี DPPH Assay เป็นวิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการทดสอบฤทธิ์ของอาหารและสมุนไพร (สุนีย์ ชาญณรงค์. 2552) โดยนำผลจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay ที่ได้มาทำการประเมินประสิทธิภาพของอนุภาคนำส่งที่ช่วยรักษาความคงสภาพของสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงเปรียบเทียบกับสารละลายไลโคปีนทางด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY RATTANAKOSIN
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THANYABURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY KRUNGTHEP
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SUVARNABHUMI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY TAWAN-OK
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY ISAN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PHRA NAKHON
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY LANNA
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SRIVIJAYA
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY RATTANAKOSIN
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THANYABURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY KRUNGTHEP
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SUVARNABHUMI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY TAWAN-OK
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY ISAN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PHRA NAKHON
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY LANNA
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SRIVIJAYA
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY RATTANAKOSIN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THANYABURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY KRUNGTHEP
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SUVARNABHUMI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY TAWAN-OK
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY ISAN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PHRA NAKHON
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY LANNA
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SRIVIJAYA
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY RATTANAKOSIN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THANYABURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY KRUNGTHEP
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SUVARNABHUMI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY TAWAN-OK
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY ISAN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PHRA NAKHON
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY LANNA
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SRIVIJAYA
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY RATTANAKOSIN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THANYABURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY KRUNGTHEP
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SUVARNABHUMI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY TAWAN-OK
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY ISAN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PHRA NAKHON
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY LANNA
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SRIVIJAYA
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY RATTANAKOSIN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THANYABURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY KRUNGTHEP
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SUVARNABHUMI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY TAWAN-OK
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY ISAN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PHRA NAKHON
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY LANNA
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SRIVIJAYA
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY RATTANAKOSIN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THANYABURI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY KRUNGTHEP
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SUVARNABHUMI
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY TAWAN-OK
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY ISAN
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PHRA NAKHON
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY LANNA
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SRIVIJAYA

แผนภูมิที่ 1 กรอบแนวคิดที่ใช้ในงานวิจัย