บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

งานวิจัยนี้เพื่อทำการเตรียมสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศ และเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงที่มีความคงสภาพ จากนั้นนำสารสกัดไลโคปีนมาทำการกักเก็บด้วยอนุภาคนำส่งแบบถุงเพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (In vitro) ของสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บและที่ไม่ได้กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุง

วิธีวิจัยเริ่มจากการสกัดสารสำคัญจากมะเขือเทศด้วยวิธีการหมักแบบมาเซอเรชัน และนำมาทำการแยกสารรบกวนออกเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีสารสำคัญไลโคปีนเข้มข้นขึ้นโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี และตรวจสอบเอกลักษณ์สารสกัดไลโคปีนโดยใช้นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์และแมสสเปกโทรเมทรี และวิเคราะห์หาปริมาณด้วย HPTLC พร้อมทั้งตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ HPTLC จากนั้นเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงจากสารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตท และคอเลสเตอรอล โดยนำตำรับที่เตรียมได้มาทำการประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพและสภาพความคงตัว ซึ่งจากข้อมูลที่ได้นำมาทำการเลือกสูตรตำรับที่มีสภาพความคงตัวและนำมาทำการกักเก็บสารสกัดไลโคปีนในอนุภาคนำส่งแบบถุงเพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบความคงสภาพของสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บและไม่ได้กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงทางด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่อง HPTLC, Camag® ประกอบด้วยเครื่องหยดสารอัตโนมัติ (Linomat 5) เครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) และเครื่องคอมพิวเตอร์

2) เครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ (Mass spectrometer, MicrOTOF, Bruker Daltonics, USA)

3) เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectrometer, Fourier 300, Bruker, USA)

4) เครื่องเขย่าสารด้วยคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic bath 40 Hertz (Hz), Branson® 2510, USA)

5) เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer V-630, Jasco, Japan)

6) เครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator, Heizbad HB digit, Heidolp®, Germany)

7) เครื่องวัดอนุภาค (รุ่น Delsa™ Nano C, Particle analyzer, Beckman Coulter, Japan)

8) กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope : TEM, Technai, Netherland)

9) กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์ (Polarized light microscope, Nikon®, Japan)

10) เครื่องอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrometer : FT-IR, รุ่น Spectrum 100, PerkinElmer ®, USA)

11) เครื่องปั่นเหวี่ยง (รุ่น UNIVERSAL 320 R, Hettich®, Germany)
12) เครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) (รุ่น MR 3001, Heidolph®, Germany)
13) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (รุ่น 800, K.K. Scientific Co., Ltd.)
14) ตู้เย็น
15) ตู้แช่แข็ง
16) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius®, Germany)
17) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler®, Switzerland)
18) ไมโครปิเปต (Micropipette)
19) บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 250, 400, 600, 1000 ml
20) ขวดแก้วสีชาขนาด 5 ลิตร
21) กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10, 50, 100 ml
22) ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5, 10, 25 ml
23) ขวดก้นกลม (Round bottom flask) ขนาด 500 และ 1000 ml
24) กรวยกรอง (Funnel)
25) หลอดทดลอง (Test tube)
26) ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
27) หลอดหยด (Dropper)
28) แท่งแก้วคน (Stirring rod)
29) กระดาษกรอง (Filter paper, Whatman no. 1)
30) แผ่น HPTLC aluminium sheet, Silica gel 60 F_{254}, Merck®, Germany
31) แท้งค์แก้ว (Glass chamber)
32) คอลัมน์ ยาว 55 cm เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 cm
33) สำลี
34) แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์
35) ถาดสแตนเลส

3.1.2 วัตถุดิบและสารเคมี

1) มะเขือเทศสด จากตลาดสดในประเทศ
2) ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas)
3) คอเลสเตอรอล (Cholesterol, Fluka)
4) เซฟาเด็กซ์แอลเอช 20 (Sephadex® LH 20, Sigma-Aldrich)
5) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
6) ไดเซทธิลฟอสเฟต (Dicetyl phosphate, Sigma-Aldrich)
7) 2,2-ไดฟีนิล-1-พิคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich)
8) เมทธานอล (Methanol, Merck)
9) สารมาตรฐานไลโคปีน (Lycopene standard-L-9879, Sigma-Aldrich)
10) อะซีโตน (Acetone)
11) เอทธิลอะซีเตท (Ethyl acetate)
12) เอทธานอล (Ethanol)

13) แอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มิเตท (Ascorbic acid-6-palmitate, Sigma-Aldrich)
14) เฮกเซน (Hexane)
15) น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

3.2 วิธีการศึกษาวิจัย

3.2.1 เตรียมสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศ

การเตรียมสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศ ตามขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมมะเขือเทศ

นำมะเขือเทศสดมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด เช็ดให้แห้ง นำมาแยกเอาส่วนขั้วสีเขียวและแกนสีขาวออกหั่นให้เป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร บันทึกน้ำหนักสด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65-70 ℃ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง

2) ทำการหมักมะเขือเทศแห้งด้วยการหมักแบบมาเซอเรชัน

นำมะเขือเทศแห้งที่เตรียมได้จากข้อ 1) ใส่ในขวดแก้วสีชา เติมตัวทำละลายเอทธิลอะซีเตทในอัตราส่วน 1:10 (w/v) และเก็บไว้ในที่มืด ไม่ให้ถูกแสง ประมาณ 7 วัน หรือสังเกตุว่าสารละลายเป็นสีส้มแดงเข้ม ทำการกรองแยกสารสกัดเอทธิลอะซีเตทออกจากกากมะเขือเทศโดยกรองผ่านกระดาษกรอง

นำสารสกัดมะเขือเทศในเอทธิลอะซีเตทมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยแยกตัวทำละลายเอทธิลอะซีเตท ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 45 ℃ ความดัน 270 บาร์ ความเร็ว 60 รอบต่อนาที (ภาพที่ 5) หลังจากตัวทำละลายระเหยหมดแล้วให้นำสารสกัดมะเขือเทศเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิ -4 ℃ เพื่อไปทำการแยกสารรบกวนดังข้อ 3)

ภาพที่ 5 การแยกสารละลายเอทธิลอะซีเตทออกจากสารสกัดจากมะเขือเทศด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศแบบหมุน

3) การแยกสารรบกวนจากสารสกัดมะเขือเทศด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารสกัดมะเขือเทศที่ได้จากข้อ 2 มาแยกสารรบกวนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเด็กซ์แอลเอช 20 ขนาดอนุภาค 25-100 μm เป็นวัฏภาคคงที่ซึ่งบรรจุลงในคอลัมน์แก้วความยาว 55 cm เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 cm โดยให้มีความสูงของวัฏภาคคงที่ประมาณ 30 cm วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซีโตน ดังภาพที่ 6

ภาพที่ 6 การทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ทำการละลายสารสกัดมะเขือเทศเข้มข้นด้วยอะซีโตนจนกระทั่งละลายหมดแล้วค่อย ๆ เทสารละลายสกัดมะเขือเทศลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้จนกระทั่งหมด จากนั้นค่อย ๆ เติมอะซีโตนลงในคอลัมน์โดยรักษาให้ระดับสูงกว่าผิวหน้าของวัฏภาคคงที่เล็กน้อย ทำการเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ ให้ทำการเก็บสารเป็นส่วน ๆ เรียกสารที่เก็บแยกแต่ละส่วนว่า แฟรกชัน (Fraction) และเนื่องจากสารสกัดมะเขือเทศเป็นสารมีสี ซึ่งทำให้สามารถสังเกตุสีของสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้ จึงทำการเก็บสารตามสีที่แยกออกมา และนำสารแฟรกชันแต่ละสีไปทำการตรวจสอบเอกลักษณ์สารสำคัญไลโคปีนตามวิธีข้อ 3.2.2, 2) จากผลที่ได้ให้ทำการรวบรวมแฟรกชันที่พบสารสำคัญไลโคปีน (แผนภูมิที่ 2) เพื่อนำไปทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญไลโคปีนด้วยเทคนิค HPTLC (ภาพที่ 7)

แผนภูมิที่ 2 การแยกสารสำคัญไลโคปีนจากสารสกัดมะเขือเทศด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ภาพที่ 7 เครื่องรงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง

3.2.2 ตรวจเอกลักษณ์และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญไลโคปีนด้วยรงคเลขผิวบางแบบสมรรถนสูง

นำแฟรกชันสารสกัดตามสีที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี มาทำการตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญไลโคปีนด้วยเทคนิค HPTLC โดยวิธี External standard technique โดยทำการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญไลโคปีน ตามขั้นตอนดังนี้คือ

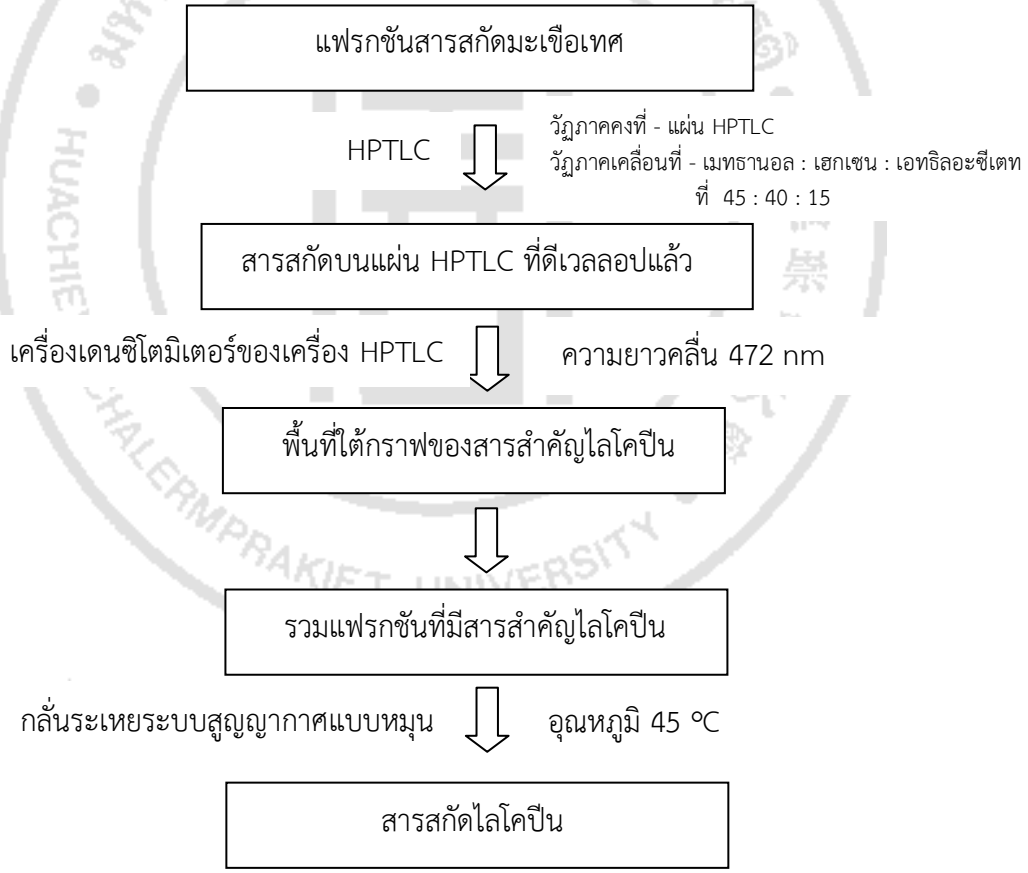
1) วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เหมาะสม

นำสารมาตรฐานไลโคปีนและสารสกัดมะเขือเทศ streak ลงบนแผ่น HPTLC ด้วยเครื่องหยดสารอัตโนมัติในปริมาณแถบละ 1 µl โดยแต่ละแถบมีความกว้าง 0.6 cm แล้วนำแผ่น HPTLC มาใส่ในแท็งค์แก้วเพื่อทำการดีเวลลอป โดยระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ เมทธานอล:เฮกเซน:เอทธิลอะซีเตท อัตราส่วน 45:40:15 จากนั้นนำแผ่น HPTLC ที่ดีเวลลอปแล้วไปตรวจสอบค่าพื้นที่ใต้พีคด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ของเครื่อง HPTLC ที่ความยาวคลื่น 472 nm รายงานผลเป็นค่า Relative front (R_f)

2) การตรวจหาองค์ประกอบไลโคปีนในแฟรกชันที่ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ทำการตรวจหาองค์ประกอบไลโคปีนในแฟรกชันที่ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยการนำแฟรกชันสารสกัดมะเขือเทศ มาทำการ streak ลงบนแผ่น HPTLC ด้วยเครื่องหยดสารอัตโนมัติ ที่ปริมาณ 1 µl โดยแต่ละแถบมีความกว้าง 0.6 cm แล้วนำแผ่น HPTLC มาทำการดีเวลลอปในแท้งค์แก้วด้วยระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ เมทธานอล:เฮกเซน:เอทธิลอะซีเตท อัตราส่วน 45:40:15 หลังการดีเวลลอปนำแผ่น HPTLC ไปตรวจสอบค่าพื้นที่ใต้พีคด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ของเครื่อง HPTLC ที่ความยาวคลื่น 472 nm นำแฟรกชันที่มีสารสำคัญไลโคปีนเป็นองค์ประกอบมารวมกันแล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศแบบหมุน เก็บสารสกัดไลโคปีนใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ -4 °C เพื่อนำไปตรวจหาปริมาณไลโคปีนด้วยวิธี HPTLC ต่อไป (แผนภูมิที่ 3)

แผนภูมิที่ 3 การตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญไลโคปีนด้วย HPTLC



3) การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญไลโคปีนในสารสกัดมะเขือเทศ

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญไลโคปีน โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

i) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solutions)

เตรียมสารละลายมาตรฐานไลโคปีนในอะซีโตนให้มีความเข้มข้น 0.30 mg/ml ทำการ streak สารละลายมาตรฐานไลโคปีนลงบนแผ่น HPTLC ด้วยเครื่องหยดอัตโนมัติ ในปริมาณแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 และ 3.0 µg ตามลำดับ โดยแต่ละแถบมีความกว้าง 0.6 cm แต่ละระดับปริมาณ streak ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำแผ่น HPTLC ไปดีเวลลอปในแท้งค์แก้ว ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่

เมทธานอล:เฮกเซน:เอทธิลอะซีเตท ที่ 45:40:15 หลังการดีเวลลอปนำแผ่น HPTLC ไปตรวจสอบค่าพื้นที่ใต้พีคด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ของเครื่อง HPTLC ที่ความยาวคลื่น 472 nm

ii) การหาสมการจากการสร้างกราฟมาตรฐาน

นำค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคทั้ง 5 ระดับมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณของสารละลายมาตรฐานไลโคปีนกับพื้นที่ใต้พีค ได้สมการจากการสร้างกราฟมาตรฐาน

iii) การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญไลโคปีนในสารสกัดมะเขือเทศ

นำสารสกัดมะเขือเทศที่ได้มา streak ลงบนแผ่น HPTLC ด้วยเครื่องหยดอัตโนมัติในปริมาณ 0.3, 0.4 และ 0.5 µl โดยแต่ละแถบมีความกว้าง 0.6 cm แต่ละระดับปริมาณ streak ซ้ำ 3 ครั้งจากนั้นนำแผ่น HPTLC ไปดีเวลลอปในแท้งค์แก้ว ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ เมทธานอล:เฮกเซน:เอทธิลอะซีเตท ที่ 45:40:15 หลังการดีเวลลอป นำแผ่น HPTLC ไปตรวจสอบค่าพื้นที่ใต้พีคด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ของเครื่อง HPTLC ที่ความยาวคลื่น 472 nm โดยนำค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคมาทำการคำนวณปริมาณของสารสำคัญไลโคปีนในสารสกัดมะเขือเทศจากสมการของกราฟมาตรฐาน

3.2.3 ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์รงคเลขผิวบางแบบสมรรถนะสูง

การตรวจสอบความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เพื่อให้แน่ใจว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือ โดยมีการวิเคราะห์ดังนี้

1) ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงเป็นการประเมินการวิเคราะห์ว่าสภาวะที่ใช้สามารถวิเคราะห์สารสำคัญไลโคปีนจากสารสกัดมะเขือเทศ ทำการวิเคราะห์โดยนำสารมาตรฐานไลโคปีนและสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศ streak ลงบนแผ่น HPTLC ด้วยเครื่องหยดสารอัตโนมัติ ในปริมาณแถบละ 1 µl โดยแต่ละแถบมีความกว้าง 0.6 cm แล้วนำแผ่น HPTLC มาทำการดีเวลลอปในแท้งค์แก้วด้วยระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ เมทธานอล:เฮกเซน:เอทธิลอะซีเตท อัตราส่วน 45:40:15 จากนั้นนำแผ่น HPTLC ที่ดีเวลลอปแล้วไปตรวจสอบค่าพื้นที่ใต้พีคด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ของเครื่อง HPTLC ที่ความยาวคลื่น 472 nm รายงานค่า Relative front (R_f)

2) ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นการทดสอบโดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานไลโคปีนกับพื้นที่ใต้พีค นำมาสร้างกราฟมาตรฐาน ทำให้ได้กราฟมาตรฐานของไลโคปีน ซึ่งค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r) โดยเกณฑ์การยอมรับค่า r ในการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรมมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.998 (Ferenczi-Fodor et al. 2001)

การวิเคราะห์ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานไลโคปีนในอะซีโตนให้มีความเข้มข้น 0.30 mg/ml ทำการ streak สารละลายมาตรฐานไลโคปีนลงบนแผ่น HPTLC ด้วยเครื่องหยดอัตโนมัติในปริมาณแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 และ 3.0 µg ตามลำดับ โดยแต่ละแถบมีความกว้าง 0.6 cm แต่ละระดับปริมาณ streak ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำแผ่น HPTLC ไปดีเวลลอปในแท้งค์แก้วด้วยระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ เมทธานอล:เฮกเซน:เอทธิลอะซีเตท อัตราส่วน 45:40:15 หลังการดีเวลลอปนำแผ่น HPTLC ไปตรวจสอบค่าพื้นที่ใต้พีคด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ของเครื่อง HPTLC ที่ความยาวคลื่น 472 nm นำค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคทั้ง 5 ระดับมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณของสารละลายมาตรฐานไลโคปีนกับพื้นที่ใต้พีค รายงานค่า r ที่ได้

3) ความแม่น (Accuracy)

การทดสอบความแม่นของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ ทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานไลโคปีนที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศ โดยให้สารละลายมาตรฐานไลโคปีนมีระดับความเข้มข้นที่ 3 ระดับคือ ที่ร้อยละ 80, 100 และ120 ของปริมาณสารสำคัญไลโคปีนในสารสกัดมะเขือเทศ แต่ละระดับความเข้มข้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานค่าความแม่นเป็นร้อยละการกลับคืน (% Recovery) โดยการเตรียมสารสกัดมะเขือเทศให้มีความเข้มข้น 10 % ของสารสกัดเริ่มต้น ซึ่งเตรียมโดยการนำสารสกัดมะเขือเทศมา 1 ml และปรับปริมาตรด้วยอะซีโตนเป็น 10 ml นำสารมาตรฐานไลโคปีนปริมาณ 0.46, 0.57 และ 0.71 µg เติมลงในสารสกัดมะเขือเทศ 1 µl นำสารละลายที่ผสมแล้ว streak บนแผ่น HPTLC ด้วยเครื่องหยดอัตโนมัติแถบละ 1 µl โดยแต่ละแถบมีความกว้าง 0.6 cm แต่ละระดับปริมาณ streak ซ้ำ 3 ครั้ง นำผลวิเคราะห์ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณร้อยละการกลับคืน โดยเกณฑ์การยอมรับของร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 95-105 (Ferenczi-fodor et al. 2001) คำนวณค่าร้อยละการกลับคืนได้ดังนี้

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

โดย A = ปริมาณไลโคปีนที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดมะเขือเทศที่เติมสารมาตรฐานไลโคปีน
B = ปริมาณไลโคปีนในสารสกัดมะเขือเทศ
C = ปริมาณสารมาตรฐานไลโคปีนที่เติมลงไปในสารสกัดมะเขือเทศ

4) ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงของการวิเคราะห์แสดงถึงลำดับความใกล้ของผลการทดสอบระหว่างชุดข้อมูลที่วัดได้โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยทำการวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision) และการวิเคราะห์ความเที่ยงต่างวัน (Inter-day precision) ดังนี้

การวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวันเดียวกันโดยใช้สารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศมาทำการstreak ที่ปริมาณ 0.3, 0.4 และ 0.5 µl ตามลำดับโดยแต่ละแถบมีความกว้าง 0.6 cm และแต่ละระดับปริมาณทำการ streak ซ้ำ 3 ครั้ง และทำการวิเคราะห์ความเที่ยงต่างวัน โดยการทดสอบสารสกัดจากมะเขือเทศตัวอย่างเดียวกับที่ทดสอบในการทำซ้ำครั้งแรกมาทดสอบซ้ำในวันที่ 5 นับจากวันที่ทดสอบการทำซ้ำครั้งแรกและวิธีทำการทดลองแบบเดียวกับครั้งแรก โดยผลการทดสอบที่ได้ควรมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage of relative standard deviation : %RSD) ≤ 2 และ ≤ 3 สำหรับการวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์ความเที่ยงต่างวัน ตามลำดับ (Ferenczi-fodor et al. 2001)

3.2.4 ตรวจเอกลักษณ์สารสกัดไลโคปีนด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

นำสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศละลายในตัวทำละลาย โดยใช้คลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานภายในและตัวทำละลายมาตรวจด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ที่คลื่นความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ตซ์ โดยเครื่องเชื่อมต่อกับระบบคอมพิวเตอร์ ได้โปรตอนสเปคตรัมของสารที่ตรวจสอบ

3.2.5 ตรวจเอกลักษณ์สารสกัดไลโคปีนด้วยแมสสเปกโทรเมทรี

นำสารสกัดไลโคปีนจากมะเขือเทศมาตรวจด้วยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอร์เมทเป็นสารวัดเทียบของเครื่องและก๊าซไนโตรเจนเป็นแหล่งกำเนิดที่อุณหภูมิ 150 °C อัตราการไหล 4.0 ลิตร/นาที ศักย์ไฟฟ้าสูงที่ 5.0 กิโลโวลต์ โดยตรวจ m/z ในช่วง 100-800 รายงานแมสสเปคตรัมของสารที่ตรวจสอบ

3.2.6 การเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงที่ไม่ได้กักเก็บและที่กักเก็บสารสกัดไลโคปีน

จากงานวิจัยของ Gopinath, D. และคณะ (2004) ทำการเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชัน พบว่าสารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตท สารเดียว ไม่สามารถเกิดเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงได้ เมื่อเติมสารคอเลสเตอรอล จึงสามารถเกิดเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงได้แต่ไม่มีความคงสภาพ เมื่อทำการเติมสารไดเซทธิลฟอสเฟตซึ่งเป็นสารที่ให้ประจุลบในอัตราส่วนร้อยละ 10 พบว่าอนุภาคนำส่งแบบถุงมีความคงสภาพ แต่จากรายงานวิจัยไม่พบข้อมูลการศึกษาระยะเวลาของความคงสภาพ ผลจากงานวิจัยได้สูตรตำรับที่ดีกว่าสูตรตำรับอื่นมีอัตราส่วนของ สารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตท:คอเลสเตอรอล ที่ 1:1

จากการทบทวนในงานวิจัยดังกล่าว ผู้ทำวิจัยมีความสนใจทำการพัฒนาสูตรตำรับ โดยใช้อัตราส่วนของ สารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตท:คอเลสเตอรอล ที่ 1:1 และเติมสารไดเซทธิลฟอสเฟตในอัตราส่วนต่างกัน และศึกษาความคงสภาพเพื่อเลือกสูตรตำรับที่มีความคงสภาพในการกักเก็บสารสกัดไลโคปีน โดยขั้นตอนการเตรียมมีดังนี้

1) การเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุง

เตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงตามอัตราส่วนในสูตรตำรับที่ 1-7 ดังตารางที่ 1 ด้วยวิธีฟิล์มไฮเดรชัน (Film hydration method) โดยนำสารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตท คอเลสเตอรอล และไดเซททิลฟอสเฟท ตามอัตราส่วน ผสมกันในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 10 ml ในขวดก้นกลมแล้วทำให้เกิดฟิล์มด้วยการระเหยเอาส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 55 °C ความดันบรรยากาศปกติ ความเร็ว 80 รอบต่อนาที จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยหมดและเกิดฟิล์ม แล้วนำมาทำให้แห้งต่อด้วยการใช้แก๊สไนโตรเจนเป่าเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยหมดอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นทำให้ฟิล์มนี้กลับมาเปียกอีกครั้งด้วยการเติมน้ำไม่มีอิออน (Deionized water) 10 ml ทำให้ฟิล์มรอบขวดหลุดออกและกระจายอยู่ในน้ำด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 65 °C ฟิล์มที่หลุดออกมาจะสร้างเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงชนิด MLV นำไปลดขนาดอนุภาคด้วยคลื่นเสียงโดยนำขวดไปแช่ในอ่างคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic bath) ประมาณ 30 นาที นำสูตรตำรับที่เตรียมได้ไปทำการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะและสภาพความคงตัวตามข้อ 3.2.7

2) การเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงที่กักเก็บสารสกัดไลโคปีน

จากสูตรตำรับที่เลือกจากผลในข้อ 1) เพื่อมาทำการกักเก็บสารสกัดไลโคปีน โดยวิธีการบรรจุสารสกัดไลโคปีนในอนุภาคนำส่งแบบถุง ทำโดยการเติมสารสกัดไลโคปีน ลงไปในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 10ml จากนั้นนำไปเติมลงในสารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตท คอเลสเตอรอล และไดเซททิลฟอสเฟท ตามอัตราส่วนในสูตรตำรับ ในขวดก้นกลมแล้วนำไปทำให้เกิดฟิล์มด้วยการระเหยเอาส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 55 °C ความดันบรรยากาศปกติ ความเร็ว 80 รอบต่อนาที จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยหมดและเกิดฟิล์ม แล้วนำมาทำให้แห้งต่อด้วยการใช้แก๊สไนโตรเจนเป่าเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยหมดอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นทำให้ฟิล์มนี้กลับมาเปียกอีกครั้งด้วยการเติมน้ำไม่มีอิออน 10 ml ทำให้ฟิล์มรอบขวดหลุดออกและ

กระจายอยู่ในน้ำด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 65 °C ฟิล์มที่หลุดออกมาจะสร้างเป็นอนุภาคนำส่งแบบถุงชนิด MLV นำไปลดขนาดอนุภาคด้วยคลื่นเสียงโดยนำขวดไปแช่ในอ่างคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic bath) ประมาณ 30 นาที

ตารางที่ 1 อัตราส่วนสารในสูตรตำรับอนุภาคนำส่งแบบถุง

สาร	สูตรตำรับอนุภาคนำส่งแบบถุง (%μmol)						
	1	2	3	4	5	6	7
แอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มิเตท	50	47.5	45	44	42.5	41	40
คอเลสเตอรอล	50	47.5	45	44	42.5	41	40
ไดเซทธิลฟอสเฟต	0	5	10	12	15	18	20

3.2.7 การตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะและสภาพความคงตัวของอนุภาคนำส่งแบบถุงที่ไม่ได้กักเก็บและกักเก็บสารสกัดไลโคปีน

นำสารจากสูตรตำรับอนุภาคนำส่งแบบถุงตำรับที่ 1-7 มาทำการตรวจสอบดังนี้

1) สัณฐานวิทยาของอนุภาค

1.1) ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์โดยใช้แสงปกติและแสงโพลาไรซ์

นำสารที่เตรียมได้ไปตรวจดูลักษณะอนุภาคเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์โดยใช้แสงปกติและแสงโพลาไรซ์ โดยนำสารที่ต้องการตรวจหยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ ประมาณ 1 หยด จากนั้นปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์โดยใช้แสงปกติและแสงโพลาไรซ์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า (100x) ทำการบันทึกภาพ

1.2) ตรวจสอบลักษณะรูปร่างอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

นำสารที่เตรียมได้ไปตรวจสอบลักษณะรูปร่างอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (FEI®, Netherland TECNAI T20 G2) โดยการหยดสารที่ต้องการตรวจลงบนคอปเปอร์กริดที่หุ้มด้วยฟิล์มคาร์บอน (Carbon film-covered copper grid) และปล่อยให้สารแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดสารละลายยูเรนิลอะซีเตท 2% (2% Uranylacetate) ทำความสะอาดสารละลายที่เกินด้วยกระดาษกรอง ตั้งคอปเปอร์กริดที่เตรียมไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำคอปเปอร์กริดไปที่เตรียมได้ไปส่องดูด้วยกล้อง และทำการบันทึกภาพ

2) วัดขนาดอนุภาค กระจายของอนุภาค

นำสารที่เตรียมได้ ไปตรวจวัดขนาดอนุภาคและการกระจายของอนุภาคด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (Delsa™ Nano C, Particle analyzer, Japan) ซึ่งใช้หลักการวัดการกระเพื่อมของความเข้มแสง (Dynamic laser light scattering : DLLS) ทำโดยการนำสารที่เตรียมได้ใส่ลงในควอทซ์คิวเวตต์ (Quartz cuvette) จากนั้นใส่ลงในช่องสำหรับตรวจการวัดขนาดของเครื่องซึ่งเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ที่มีระบบประมวลผล ได้ผลเป็นขนาดอนุภาคและค่าการกระจายอนุภาค โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง ทำการบันทึกผล

3) วัดศักย์ไฟฟ้าซีต้าของอนุภาค

นำสารเดียวกันที่ทำการวัดขนาดอนุภาคแล้วมาทำการวัดศักย์ไฟฟ้าซีต้าโดยการใช้เข็ม

ฉีดยาขนาด 1 ml ดูดสาร 0.8 ml แล้วฉีดลงในช่องใส่สารของชุดวัดศักย์ไฟฟ้าของเครื่อง จากนั้นนำไปใส่ลงในช่องสำหรับตรวจวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าของเครื่องซึ่งเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ที่มีระบบประมวลผล โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัด 3 ครั้ง ทำการบันทึกผล

4) การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR)

นำสารจากสูตรตำรับอนุภาคนำส่งแบบถุงที่ไม่ได้กักเก็บและที่กักเก็บสารสกัดไลโคปีน สารสกัดไลโคปีน และสารสกัดไลโคปีนที่นำมาผสมกับอนุภาคนำส่งแบบถุง (Physical mix) ไปตรวจด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer ซึ่งใช้เทคนิค Attenuated total reflectance (ATR) โดยการทำความสะอาดเพลทสแตนเลสของเครื่อง FT-IR ซึ่งเชื่อมต่อกับระบบคอมพิวเตอร์ ทำการบันทึกอากาศเป็นสเปคตรัมพื้นเริ่มต้น (background) จากนั้นใส่สารที่ต้องการทดสอบลงบนเพลทสแตนเลสและทำการตรวจในช่วงคลื่น 4000-650 cm^{-1} จะได้สเปคตรัมของสารที่ตรวจสอบ

5) ตรวจสอบสภาพความคงตัวของอนุภาคนำส่งแบบถุงที่กักเก็บและที่ไม่ได้กักเก็บสารสกัดไลโคปีน

5.1) นำอนุภาคนำส่งแบบถุงสูตรตำรับที่ 1-7 ที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 °C และที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) สังเกตุลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับที่เตรียมขึ้นว่ามีการตกตะกอนของสารเพิ่มขึ้นหรือไม่ และทำการวัดขนาดอนุภาค การกระจายอนุภาค และวัดศักย์ไฟฟ้าซีตาร่วมด้วย โดยทำการตรวจตั้งแต่เริ่มต้นและทุกๆ เดือน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

5.2) จากผลการทดลองในข้อ 5.1) ที่ได้ทำการเลือกสูตรตำรับที่มีสภาพความคงตัวนำมาทำการเตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงที่กักเก็บสารสกัดไลโคปีนและทำการศึกษาสภาพความคงตัวดังข้อ 5.1)

3.2.8 ตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไลโคปีนและสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงด้วยวิธี DPPH Assay (Brand-Williams et al. 1995, Liu Donghong et al. 2008)

ในการตรวจฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไลโคปีนและสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงด้วยการทดสอบฤทธิ์ต้าน $DPPH^{\bullet}$ นั้น เนื่องจากไลโคปีนในสารสกัดมะเขือเทศจะทำปฏิกิริยากับอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ได้สารสีน้ำตาลดำ ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 515 nm ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนการดูดกลืนแสงจากสารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้น จึงทดสอบฤทธิ์ต้าน $DPPH^{\bullet}$ ที่ความยาวคลื่น 540 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ DPPH ดูดกลืนแสงได้อย่างมีนัยสำคัญและไม่มีการรบกวนจากสีน้ำตาลดำที่เกิดขึ้น โดยทำการเตรียมสารดังนี้

1) เตรียมสารละลาย $DPPH_2$

ละลายสาร 2,2-ไดฟีนิล-1-พิคริลไฮดราซิล 236.60 mg ในเอทธานอล 200 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร (ความเข้มข้น $3x10^{-3}$ mol/L)

2) เตรียมสารสกัดไลโคปีน อนุภาคนำส่งแบบถุง และสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุง

นำสารสกัดไลโคปีนมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 2.12, 1.70, 1.48 และ 1.27 µmol/mlตามลำดับ

เตรียมอนุภาคนำส่งแบบถุงตามสูตรตำรับที่ 4 (ตารางที่ 1)

เตรียมสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงตามสูตรตำรับที่ 4 ทำการกักเก็บสารสกัดไลโคปีนที่ความเข้มข้น 2.12, 1.70, 1.48 และ 1.27 µmol/ml ตามลำดับ

3) การตรวจฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

ทำการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายใต้สภาวะการเก็บดังนี้

i) ภายในห้องที่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง (28±2 ºC) นำมาทำการตรวจสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซ้ำทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการตรวจสอบสารสกัดไลโคปีนที่ความเข้มข้น 2.12, 1.70, 1.48 และ 1.27 µmol/ml สารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงตามสูตรตำรับที่ 4 ทำการกักเก็บสารสกัดไลโคปีนที่ความเข้มข้น 2.12, 1.70, 1.48 และ 1.27 µmol/ml และอนุภาคนำส่งแบบถุงตามสูตรตำรับที่ 4

ii) เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4±2 ºC และที่อุณหภูมิห้อง (28±2 ºC) เป็นเวลา 3 เดือน นำมาทำการตรวจสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการตรวจสอบสารสกัดไลโคปีนที่ความเข้มข้น 2.12 µmol/ml สารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงตามสูตรตำรับที่ 4 ทำการกักเก็บสารสกัดไลโคปีนที่ความเข้มข้น 2.12 µmol/ml และอนุภาคนำส่งแบบถุงตามสูตรตำรับที่ 4

วิธีการตรวจสอบทำดังนี้

นำเอทธานอลที่ใช้เป็นตัวทำละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) เท่ากับ 0.00

นำเอทธานอลปริมาณ 400 µl มาเติมสารละลาย DPPH ปริมาณ 3600 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm เป็นค่า Absorbance of control ($Abs_{control}$)

นำเอทธานอลปริมาณ 400 µl มาเติมในสารสกัดไลโคปีน อนุภาคนำส่งแบบถุง หรือสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงปริมาณ 3600 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm เป็นค่า Absorbance of blank (Abs_{blank})

นำสารสกัดไลโคปีน อนุภาคนำส่งแบบถุง และสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุง ซึ่งเก็บภายใต้สภาวะการเก็บตามข้อ i) และ ii) ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารปริมาณ 400 µl เติมลงในสารละลาย DPPH ปริมาณ 3600 µl (ความเข้มข้น 3×10^{-3} mol/L) วัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ทำการวัดทุก 10 นาที จนกระทั่งครบ 60 นาที ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนคลื่นแสง เป็นค่า Absorbance of sample (Abs_{sample})

รายงานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไลโคปีน และสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุง เป็นค่า % Scavenging capacity หาได้จากสมการดังนี้

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

เมื่อ Abs_{sample} : ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารสกัดมะเขือเทศ อนุภาคนำส่งแบบถุงหรือสารสกัดมะเขือเทศที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงและสารละลาย DPPH

Abs_{blank} : ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารสกัดไลโคปีนที่ไม่ได้กักเก็บหรือสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุงในเอทธานอล

$Abs_{control}$: ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH และเอทธานอล

ในการหาค่า % Scavenging capacity ของสารสกัดไลโคปีนที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งแบบถุง ให้นำค่า % Scavenging capacity ของอนุภาคนำส่งแบบถุงมาหักออกด้วย เนื่องจากอนุภาคนำส่งแบบถุงที่เตรียมจากสารแอสคอร์บิคแอซิด-6-ปาล์มมิเตทเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ