บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดขนาดอนุภาค (รุ่น Delsa™ NanoC, BECKMAN COULTER®, Japan)
2. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) (Thermo Electron Corporation, USA)
3. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microsope, TEM) (รุ่นTECNAI T20 G^2, Philips, Japan)
4. เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (รุ่น LABOROTA 4011, Heidolph®, Germany)
5. เครื่องปั่นหยาบ (รุ่นJF-317, Imarflex®)
6. เครื่องชั่งวิเคราะห์ ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO®)
7. ตู้อบ (Memmert®, รุ่น D06062 model l600, Germany)
8. ตู้เย็น (Mitsubishi®, รุ่น MR-F50C/ST)
9. เครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (Heidolph®, รุ่น MR3001)
10. ชุดคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)
11. ชุดสกัดซอกเล็ต (Soxhlet Apparatus)
12. เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator)
13. หลอดหยด (Dropper)
14. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 250 มิลลิลิตร
15. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร
16. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
17. แท้งค์โครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC Tank)
18. กรวยแยก (Separating Funnel)
19. กระดาษกรอง (Whatman™ no.1)
20. ขวดชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
21. ขวดก้นกลม (Round Bottom Flask)

22. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 10, 25, 100 มิลลิลิตร

23. เตาหลุมให้ความร้อน (Heating Mantle)

24. คอลัมน์ (Phenomenex®, USA) ชนิดรีเวอร์สเฟส ซี-18 (Reversed Phase C_{18}) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตรและยาว 250 มิลลิเมตร

25. หลอดยูวี (UV Lamp)

26. ไมโครปิเปต (Micropipettes)

27. แผ่นโครมาโทรกราฟี (TLC Aluminium Sheet) (Merck®)

3.1.2 วัตถุดิบและสารเคมี

1. Acetone (QRëC™, Newzealand)
2. Methanol HPLC Grade (Fisher Chemical, UK)
3. Methanol AR Grade (Merck, Germany)
4. Cremophor® ELP (Sigma, Germany)
5. Squalene (Fluka, Japan)
6. น้ำมันมะพร้าว (Virgin coconut oil) (SAFC, Philipines)
7. Ethyl Acetate (Mallinckrodt Chemicals, USA)
8. Diethyl Ether (PANREAC QUIMICA SAU, EU)
9. Dichloromethane (Fisher Chemical, UK)
10. n-Hexane (QRëC™, Newzealand)
11. Hexane (J.T Baker, USA)
12. Acetronitile (Merck, Germany)
13. Sephadex® LH-20 (Sigma, Sweden)
14. สารมาตรฐาน 6-Gingerol (Sigma®, Germany)
15. น้ำปราศจากไอออน (DI water)
16. ขิงแก่สด (จากตลาดไท จังหวัดปทุมธานี)

3.2 วิธีการศึกษาวิจัย

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

นำขิงสดมาเช็ดทำความสะอาดด้วยผ้าชุบน้ำหมาด ๆ ฝานเป็นแผ่นบาง ๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45^0C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดขิงแห้งให้เป็นผงเก็บในภาชนะปิดสนิท

3.2.2 ศึกษาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสำคัญในปริมาณสูงสุด

งานวิจัยนี้จะศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารสำคัญ 6-Gingerol สูงสุด ซึ่งแบ่งการศึกษาเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกใช้ตัวทำละลาย Acetone (นลัท ถาวรเจริญรักษ์ และคณะ. 2552) กลุ่มที่สองใช้ตัวทำละลาย Methanol (Pawar, N., et al. 2011) โดยทุกกลุ่มศึกษาจะทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยชุดสกัดซอกเล็ต (Soxhlet apparatus) (Singh, G., et al. 2008) การสกัดด้วยวิธีหมัก (นลัท ถาวรเจริญรักษ์ และคณะ. 2552) และการสกัดด้วยการใช้คลื่นเสียง (Sonication) (Pawar, N. et al. 2011) ซึ่งทุกวิธีจะใช้ผงขิง 20 กรัม ปริมาตรตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตร สกัดนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกสารสกัดหยาบและนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 6-Gingerol ในสารสกัดหยาบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (ดูข้อ 3.2.4) เทียบจากกราฟมาตรฐาน นำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกันเพื่อเลือกวิธีสกัดและตัวทำละลายเหมาะสมที่สามารถสกัดสารสำคัญ 6-Gingerol จากผงขิงในปริมาณมากที่สุด และใช้เป็นวิธีเตรียมสารสกัดหยาบสำหรับงานวิจัยในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 การแยกสารรบกวนออกจากสารสกัดหยาบที่ได้จากผงขิง

1) การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-Liquid Extraction)

การทำสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีการสกัดของเหลวด้วยของเหลว มีขั้นตอนดังนี้ (แผนภูมิที่ 3.1)

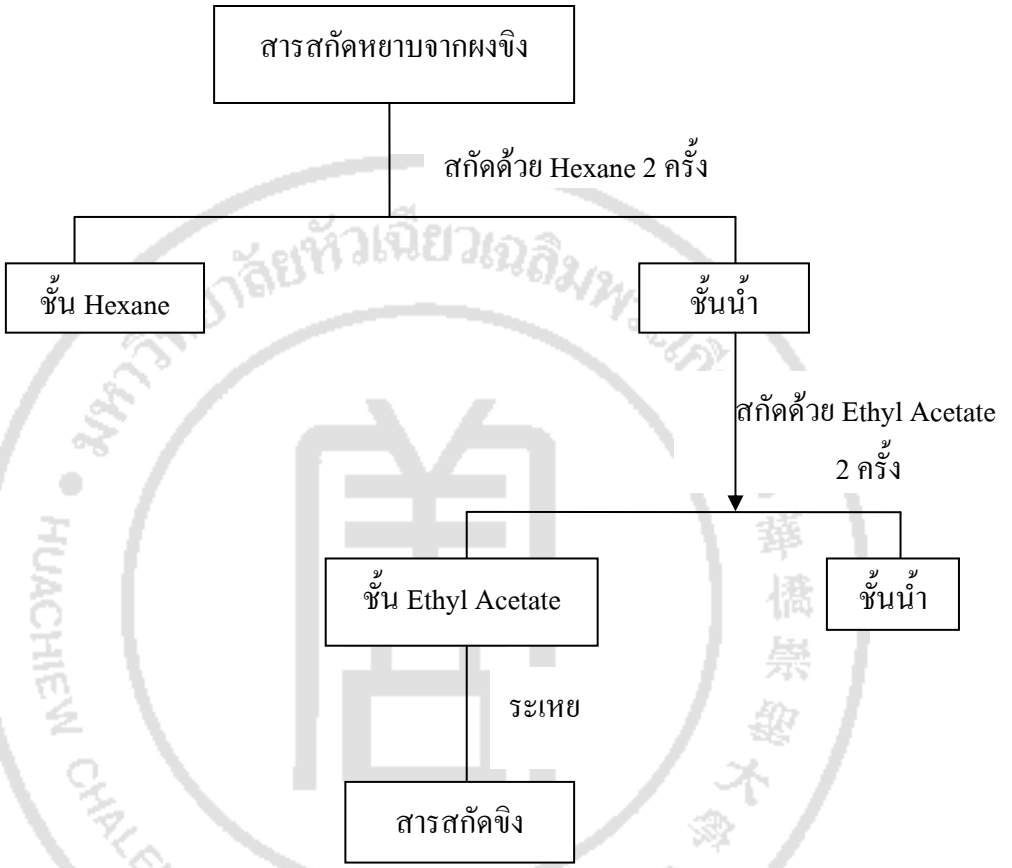
1.1) นำสารสกัดหยาบที่ระเหยแล้วมาสกัดแยกสารรบกวนด้วย Hexane และน้ำ (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) นำชั้น Hexane ทิ้งไป

1.2) นำชั้นน้ำมาพาร์ทิชัน (Partition) ด้วย Ethyl Acetate และน้ำ (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

1.3) นำสารชั้น Ethyl Acetate ที่สกัดแยกได้มาระเหยให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator)

แผนภูมิที่ 3.1

การสกัดแยกส่วนของสารสกัดขิงด้วยตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธีการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-Liquid Extraction)



2) การแยกสารสำคัญ 6-Gingerol โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

นำสารสกัดหยาบเข้มข้นที่ได้จากการแยกสารด้วยเทคนิคการสกัดของเหลวด้วยของเหลวมาแยกสารรบกวนที่ยังคงเหลืออยู่ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และตรวจสอบสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมีขั้นตอนการแยกสารสำคัญดังนี้

2.1) นำสารสกัดหยาบเข้มข้นที่ได้จากการสกัดของเหลวด้วยของเหลวมาการแยกสารรบกวน ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ Sephadex® LH-20 ขนาดอนุภาค 25-100 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ (Stationary Phase) และ Methanol เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ทำการตรวจแต่ละ แฟรกชัน (Fraction) ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography,

TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (Solvent System) เป็น Hexane และ Diethyl Ether ในอัตราส่วน 40:60 โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 6-Gingerol นำมาตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet, UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คัดแยกแฟรกชัน (Fraction) ที่มีสารสำคัญเป็นองค์ประกอบมารวมกันแล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน

2.2) นำสารสกัดหยาบขิงเข้มข้นที่ได้จากข้อ 2.1 มาแยกสารรบกวนออกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้ง โดยใช้ Sephadex® LH-20 ขนาดอนุภาค 25-100 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่ Methanol และ Dichloromethane อัตราส่วน 1:1 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และทำการตรวจสอบแต่ละแฟรกชัน (Fraction) ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็นสารละลายผสมระหว่าง Hexane และ Diethyl Ether ในอัตราส่วน 40:60 โดยเทียบกับสารมาตรฐาน 6-Gingerol นำมาตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คัดแยกแฟรกชันที่มีสารสำคัญเป็นองค์ประกอบมารวมกัน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน เก็บสารสกัดเข้มข้นใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20^{0}C

3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ 6-Gingerol ในสารสกัดขิงด้วยวิธี External Standard Technique

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard Solutions)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 6-Gingerol ใน Methanol ให้มีความเข้มข้น 0.06 0.13 0.23 0.34 และ 0.57 µg/ml

ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะ (Condition) ที่พัฒนา ดังนี้

วัฏภาคคงที่ : คอลัมน์ชนิดรีเวอร์สเฟส ซี-18 (Reversed Phase C_{18}) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร และยาว 250 มิลลิเมตร

วัฏภาคเคลื่อนที่ : สารละลายผสมระหว่าง Acetonitrile และ น้ำ ขับเคลื่อนด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างกันแบบเกรเดียนต์ (Gradient) ดังตารางที่ 3.1

อัตราการไหล (Flow rate) : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด **:** ดิโอดอะเรย์ดีเทกเตอร์ (Diode Array Detector) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด **:** 20 ไมโครลิตร

ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีก (Peak Area) ทั้ง 5 ความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 6-Gingerol กับพื้นที่ใต้พีก

2) การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 6-Gingerol ในสารละลายสารสกัดขิง (Ginger Extract Solution)

เตรียมสารละลายสารสกัดขิงใน Methanol ให้มีความเข้มข้น 0.1 µg/ml. แล้วนำไปกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ (Membrane Filter) ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 6-Gingerol ในสารละลายสารสกัดขิง โดยฉีดสารละลายสารสกัดขิงเข้าในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงที่ใช้สภาวะเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง และนำพื้นที่ใต้พีกมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

นำพื้นที่ใต้พีกเฉลี่ยมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ 6-Gingerol เพื่อคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ 6-Gingerol ในสารละลายสารสกัดขิง โดยคำนวณจากสมการเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน 6-Gingerol ที่ได้จากการหาความสัมพันธ์เชิงเส้น

ตารางที่ 3.1
อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ ณ เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	ร้อยละ (โดยปริมาตร)		อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)
	Acetronitrile	น้ำ	
0	40	60	1
5	40	60	1
6	55	45	1
12	55	45	1
13	90	10	1
40	90	10	1

3.2.5 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

ในการวิเคราะห์สารด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ศึกษาเพื่อให้แน่ใจว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มีดังนี้

1. ความเฉพาะเจาะจง (Selectivity) เป็นความสามารถของวิธีที่จะตรวจวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์เท่านั้น โดยปราศจากการรบกวนจากสารอื่นที่มีในตัวอย่างทำโดยตรวจดูผลการวิเคราะห์สารสกัดขิง ต้องไม่มีพีคใดรบกวนพีคของ 6-Gingerol

2. ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้น เป็นการทดสอบโดยการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 6-Gingerol เทียบกับพื้นที่ใต้พีก ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Determination, r^2) โดยทั่วไปเกณฑ์การยอมรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.995-1.000

การสร้างกราฟมาตรฐานของ 6-Gingerol โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6-Gingerol ใน Methanol ให้มีความเข้มข้น 0.06 0.13 0.23 0.34 และ 0.57 µg/ml แต่ละตัวอย่างทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง สมการเส้นตรงได้จากการสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 6-Gingerol

3. ความแม่น (Accuracy)

ความแม่นเป็นคุณสมบัติหลักที่สำคัญของการวิเคราะห์ บอกถึงความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด แสดงว่าการวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้องสูง ความแม่นของวิธีวิเคราะห์รายงานค่าเป็นร้อยละการกลับคืน (% Recovery)

การทดสอบความแม่น ทำโดยการเติมสารมาตรฐาน 6-Gingerol ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในสารสกัดขิง โดยครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของปริมาณ 6-Gingerol ในสารสกัดขิง 3 ระดับที่ร้อยละ 75 100 และ 125 ฉีดซ้ำระดับละ 3 ครั้ง นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณร้อยละการกลับคืนได้ดังนี้

$$\% \text{ การกลับคืน} = \frac{C_a - C_b}{C_c} \times 100$$

โดย C_a = ปริมาณ 6-Gingerol ที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดขิงที่เติมสารมาตรฐาน 6-Gingerol

C_b = ปริมาณ 6-Gingerol ที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดขิง

C_c = ปริมาณสารมาตรฐาน 6-Gingerol ที่เติมลงไปในสารสกัดขิง

เกณฑ์การยอมรับของร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 80.00-120.00 ในแต่ละระดับ (A.O.A.C. 2005)

4. ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงของการวิเคราะห์เป็นการทดสอบว่าวิธีที่เลือกใช้และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้ผลใกล้เคียงกันในการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันซ้ำ ๆ หลายครั้งภายใต้สภาวะที่กำหนด และผลการทดสอบที่จะได้แสดงในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD, Relative Standard Deviation) และจะต้องมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ไม่เกิน 2 (A.O.A.C. 2005) การทดสอบแบ่งเป็นการทดสอบในวันเดียวกันและการทดสอบต่างวัน

ทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกัน (Intra-Day: Repeatability) ทำโดยนำสารสกัดขิงฉีดซ้ำ 6 ครั้งในวันเดียวกัน

ทดสอบความเที่ยงต่างวัน (Inter-Day: Reproducibility) ทำโดยนำสารสกัดขิงชนิดเดียวกับการทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกันมาฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ในวันที่ 4 นับถัดจากวันที่ทำการทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกัน

3.2.6 การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน

เตรียมนาโนอิมัลชันด้วยเทคนิค Spontaneous Emulsification โดยเตรียมวัฏภาคน้ำมันประกอบด้วย น้ำมันมะพร้าว Cremophor® ELP Acetone และวัฏภาคน้ำ ผสมแต่ละวัฏภาคให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำวัฏภาคน้ำมันเทผสมลงในวัฏภาคน้ำเป็นสายอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก ความเร็วรอบประมาณ 1000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุนแล้วประเมินสูตรตำรับที่เตรียมได้โดยพิจารณาจากการเกิดการแยกชั้นด้วยตาเปล่า ตรวจสอบขนาดอนุภาคและการกระจาย (PI, Polydispersity Index) ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (Delsa NanoC Beckman Coulter®) สูตรตำรับที่เหมาะสมจะต้องมีลักษณะภายนอกที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้น มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร (Porras, M., et al. 2004, Usn, N., et al. 2004)

1. การศึกษาปริมาณน้ำมันมะพร้าวในตำรับโดยใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวคงที่

ศึกษาปริมาณน้ำมันมะพร้าวที่เหมาะสมสำหรับการตั้งตำรับนาโนอิมัลชันโดยปรับเปลี่ยนปริมาณของน้ำมันมะพร้าวให้แตกต่างกัน ได้แก่ ร้อยละ 1 5 10 และ 15 โดยน้ำหนัก ใช้ Cremophor® ELP ร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก เป็นสารลดแรงตึงผิว เตรียมนาโนอิมัลชันตามสัดส่วนที่แสดงดัง ตารางที่ 3.2 ด้วยเทคนิค Spontaneous Emulsification ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น คัดเลือกสูตรตำรับที่มีความคงตัว มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.2
สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณน้ำมันมะพร้าวในตำรับ
โดยใช้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวคงที่

วัฏภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
		A1	**A2**	**A3**	**A4**
A	น้ำมันมะพร้าว	1	5	10	15
	Cremophor® ELP	6	6	6	6
	Acetone	40	40	40	40
B	น้ำ qs.	100	100	100	100

2. การศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับโดยใช้ปริมาณน้ำมันมะพร้าวคงที่

ศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมสำหรับการตั้งตำรับนาโนอิมัลชัน โดยเลือกตำรับที่ดีที่สุดจากการศึกษาข้อ (1) มา และปรับเปลี่ยนปริมาณสารลดแรงตึงผิวให้แตกต่างกัน ได้แก่ ร้อยละ 2 4 6 และ 8 โดยน้ำหนัก และคงความเข้มข้นของน้ำมันมะพร้าวในสูตรตำรับที่เลือกไว้เตรียมนาโนอิมัลชัน ตามสัดส่วนที่แสดงดัง ตารางที่ 3.3 ด้วยเทคนิค Spontaneous Emulsification ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น คัดเลือกสูตรตำรับที่มีความคงตัว มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.3
สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับ
โดยใช้ปริมาณน้ำมันมะพร้าวคงที่

วัฏภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
		B1	**B2**	**B3**	**B4**
A	น้ำมันมะพร้าว	1	1	1	1
	Cremophor® ELP	2	4	6	8
	Acetone	40	40	40	40
B	น้ำ qs.	100	100	100	100

3. การศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วมในตำรับ

ศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสมสำหรับการตั้งตำรับนาโนอิมัลชัน ซึ่งเลือกใช้ Acetone เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยเลือกตำรับที่ดีที่สุดจากการศึกษาข้อ (2) มาแล้วทำการปรับเปลี่ยนปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วมให้มีความเข้มข้นต่างกันได้แก่ ร้อยละ 20 30 40 และ 50 โดยน้ำหนัก เตรียมนาโนอิมัลชันตามสัดส่วนที่แสดงดังตารางที่ 3.4 ด้วยเทคนิค Spontaneous Emulsification ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น คัดเลือกสูตรตำรับที่มีความคงตัว มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.4

สูตรการเตรียมนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาปริมาณสารลดแรงตึงผิวร่วมในตำรับ

วัฏภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
		C1	C2	C3	C4
A	น้ำมันมะพร้าว	1	1	1	1
	Cremophor® ELP	4	4	4	4
	Acetone	20	30	40	50
B	น้ำ qs.	100	100	100	1000

4. การศึกษาการใช้น้ำมันผสมในวัฏภาคน้ำมันเพื่อตั้งตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน

เลือกตำรับที่เหมาะสมจากข้อ (3) มา 1 ตำรับเพื่อศึกษาผลของการใช้น้ำมันผสมในวัฏภาคน้ำมัน โดยเลือกใช้ Squalene เพื่อเพิ่มความคงตัวให้แก่ตำรับและลดอัตราการเกิดออสวาลด์ไรเพนนิ่ง (Ostwald Ripening) ที่มีผลต่อความคงตัวของนาโนอิมัลชัน ตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานมีส่วนผสมของน้ำมันมะพร้าวกับ Squalene ในอัตราส่วนน้ำมันมะพร้าวต่อ Squalene ดังนี้ 1.0:0 0.98:0.02 0.96:0.04 0.94:0.06 0.92:0.08 0.9:0.1 และ 0.8:0.2 แสดงในตารางที่ 3.5 ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยของ Block, L.H. 1996; Mollet, H. and Grubenmann, A. 2001; Leal-Calderon, F. 2007

ตารางที่ 3.5
การศึกษาการใช้น้ำมันผสมในวัฏภาคน้ำมันเพื่อตั้งตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐาน

วัฏภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)							
		D1	**D2**	**D3**	**D4**	**D5**	**D6**	**D7**	**D8**
A	น้ำมันมะพร้าว	1.00	0.98	0.96	0.94	0.92	0.90	0.80	0.00
	Squalene	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.20	1.00
	Cremophor® ELP	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
	Acetone	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
B	น้ำ qs.	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

5. การศึกษาผลของ Squalene ต่อลักษณะของนาโนอิมัลชัน

เลือกตำรับที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ (4) มา 1 ตำรับและทำการศึกษาผลของการใช้ Squalene ที่มีต่อลักษณะนาโนอิมัลชัน โดยให้ปริมาตรของน้ำมันมะพร้าวคงที่และเปลี่ยนปริมาณของ Squalene ในสัดส่วนต่าง ๆ (ตารางที่ 3.6) นำมาเตรียมนาโนอิมัลชันตามขั้นตอนที่กล่าวไว้ข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30^0C ระยะเวลา 3 เดือน สังเกตและบันทึกผลทุก ๆ 1 เดือน

ตารางที่ 3.6

สูตรตำรับนาโนอิมัลชันเพื่อศึกษาผลของ Squalene ต่อลักษณะของนาโนอิมัลชันในสัดส่วนต่างกัน

วัฏภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
		E1	**E2**	**E3**	**E4**
A	น้ำมันมะพร้าว	0.8	0.8	0.8	0.8
	Squalene	0.1	0.2	0.4	0.6
	Cremophor® ELP	4.0	4.0	4.0	4.0
	Acetone	40.0	40.0	40.0	40.0
B	น้ำ qs	100.0	100.0	100.0	100.0

3.2.7 การเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิง

1. การศึกษาตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงร่วมกับการใช้น้ำมันผสม

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชันก่อนและหลังการเติมสารสกัดขิงในตำรับนาโนอิมัลชันที่มีการใช้น้ำมันผสม โดยเลือกสูตรตำรับจาก ข้อ 3.2.6 ที่มีความคงตัวทางกายภาพมาเพื่อบรรจุสารสกัดขิงปริมาณร้อยละ 3 โดยน้ำหนักโดยเติมลงในวัฏภาคน้ำมัน ศึกษาตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงร่วมกับการใช้น้ำมันผสมคือ มีส่วนผสมของน้ำมันมะพร้าวกับ Squalene ในอัตราส่วนน้ำมันมะพร้าวต่อ Squalene ดังนี้ 1.0:0 0.98:0.02 0.96:0.04 0.94:0.06 0.92:0.08 0.9:0.1 และ0.8:0.2 แสดงในตารางที่ 3.7 ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยของ Block, L.H. 1996; Mollet, H. and Grubenmann, A. 2001; Leal-Calderon, F. 2007

ตารางที่ 3.7

การศึกษาตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงร่วมกับการใช้น้ำมันผสม

วัฏภาค	ส่วนประกอบ	ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)						
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
A	น้ำมันมะพร้าว	1.00	0.98	0.96	0.94	0.92	0.90	0.80
	Squalene	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.20
	Cremophor® ELP	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
	Acetone	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
	สารสกัดขิง	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
B	น้ำ qs.	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

2. การศึกษาผลของการระเหยตัวทำละลายต่อลักษณะนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิง

นำนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงที่เตรียมได้ตามตารางที่ 3.7 วัดขนาดอนุภาคก่อนการระเหยตัวทำลายและหลังการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค แต่ละตัวอย่างวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.2.8 การประเมินคุณลักษณะเคมีกายภาพของนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิง

1. การวัดขนาดและการกระจายอนุภาค เตรียมตำรับครบ 1 วัน แล้วทำการตรวจวัดขนาดอนุภาคและการกระจาย (PI) ของนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (รุ่น Delsa™ NanoC, BECKMAN COULTER®, Japan) โดยใช้หลักการกระจายแสงแบบพลวัต แต่ละตัวอย่างทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง สูตรตำรับที่เหมาะสมจะต้องมีลักษณะภายนอกที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้น มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 500 นาโนเมตร

2. การวัดค่าซีต้าโพเทนเชียล (Zeta Potential) ทำการวัดค่าซีต้าโพเทนเชียลของนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงด้วยเครื่องวัดซีต้าโพเทนเชียล (รุ่น Delsa™ NanoC, BECKMAN COULTER®, Japan) การวัด 1 ครั้ง กำหนดรอบวัด 30 รอบ แต่ละตัวอย่างทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง

3. การตรวจสอบสัณฐานวิทยา (Morphology) และโครงสร้าง

เลือกตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานและตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงที่ดีที่สุดมาอย่างละ 1 ตำรับ และทำการตรวจสอบสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของนาโนอิมัลชันก่อนการเติมและหลังการเติมสารสกัดขิงด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) โดยหยดตัวอย่างลงบนคอปเปอร์กริด (Copper Grid) และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยด 2% ของสารละลายกรดฟอสโฟทังสติก (Phosphotunstic Acid) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

4. การศึกษาความคงตัว

4.1 การประเมินความคงตัวทางกายภาพ (Physical Appearance) เลือกตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงที่ดีที่สุดจากข้อ 3.2.7 มา 1 ตำรับแล้ว ทำการประเมินความคงตัว ทางกายภาพในสภาวะปกติ โดยบรรจุลงในขวดแก้วสีชาปิดฝาให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30^0C และ 4^0C ระยะเวลา 3 เดือน พิจารณาการแยกชั้นและสี วัดขนาดอนุภาค และการกระจายในตัวอย่างทุกเดือน

ประเมินความคงตัวทางกายภาพของนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงในสภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (Heating Cooling Cycle) โดยนำตัวอย่างมาบรรจุลงในขวดแก้วสีชาและปิดฝาให้สนิทแล้วนำขวดอิมัลชันใส่ในตู้อบอุณหภูมิ 45^0C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำเข้าตู้เย็น อุณหภูมิ 4^0C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำสลับกันจนครบ 6 รอบ

4.2 การประเมินความคงตัวทางเคมี (Chemical Appearance) เลือกตำรับที่ดีที่สุดจากข้อ 3.2.7 มา 1 ตำรับแล้วทำการทดสอบความคงตัวทางเคมีในนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงซึ่งจะวิเคราะห์หาปริมาณของ 6-Gingerol ก่อนและหลังการทดสอบสภาวะเร่งด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง โดยทำการเจือจางนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิง 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol ให้ครบ 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ฉีดเข้าในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับ ข้อ 3.2.4 และฉีดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปหาปริมาณของ 6-Gingerol เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และวิเคราะห์ผลทางสถิติ Paired T-test

4.3 ศึกษาอัตราการเกิดออสวาลด์ไรเพนนิ่ง (Ostwald Ripening) ศึกษาอัตราการเกิดออสวาลด์ไรเพนนิ่งในตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงโดยเก็บทุกตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดอนุภาคทันทีหลังจากการเตรียมเสร็จ เมื่อครบ 7 วัน นำทุกตัวอย่างมาวัดขนาดอีกครั้ง นำผลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการเกิดออสวาลด์ไรเพนนิ่งดังนี้

$$\text{Ostwald Ripening } (nm.day^{-1}) = \frac{S_7 - S_0}{D_7 - D_0}$$

โดย S_7 ขนาดอนุภาคที่วัดได้หลังจากตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ 7 วัน

S_0 ขนาดอนุภาคที่วัดได้ทันทีหลังจากเตรียมเสร็จ

D_7 เก็บตัวอย่างไว้ 7 วัน

D_0 วันแรกของการเตรียม

3.2.9 การประเมินประสิทธิภาพและความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์

การวิจัยครั้งนี้ดำเนินการวิจัยโดยนำตำรับนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงและตำรับนาโนอิมัลชันพื้นฐานที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัครแบบ Single Blind Test และศึกษาความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้ใช้โดยให้กรอกแบบสอบถามหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ครบ 28 วัน ตามแบบฟอร์มที่กำหนดให้

(1) ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธีเลือกตัวอย่างแบบไม่ทราบจำนวนประชากร โดยวิธีสุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive Sampling) โดยผู้ศึกษาจะกำหนดคุณสมบัติของกลุ่มตัวอย่างไว้ก่อน

กลุ่มประชากรอาสาสมัครที่จะศึกษา

1. เพศหญิง จำนวน 20 คน
2. อายุ 20 ปี ขึ้นไป
3. ความสูง 155-170 เซนติเมตร

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ

1. อาสาสมัครยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจโดยลงนามในเอกสารยินยอมหรือโดยได้รับการบอกกล่าวอย่างเต็มใจ
2. เป็นผู้มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคแทรกซ้อน
3. มีปัญหาเซลลูไลท์บริเวณต้นขาในระดับความรุนแรงน้อย คือ มองเห็นผิวเป็นริ้วคลื่นเมื่อใช้มือบีบ
3. ไม่เป็นโรคผิวหนังและไม่มีประวัติการเกิดภูมิแพ้ ไม่มีบาดแผลบริเวณต้นขา
4. ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ใด ๆ รวมทั้งไม่ได้รับการรักษาด้วยวิธีอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการลดเซลลูไลท์ และไม่ได้รับยาลดอาการแพ้ใด ๆ ขณะร่วมการวิจัย

(2) ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย (แผนภูมิที่ 3.2)

1. จัดเตรียมเอกสาร แบบฟอร์มที่ใช้ในการวิจัย และใบยินยอมของอาสาสมัครเพื่อยื่นเสนอโครงการต่อคณะกรรมการจริยธรรมงานวิจัยให้มีการดำเนินการวิจัยในมนุษย์ซึ่งจะนำมาเป็นส่วนหนึ่งในการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์

2. การทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนัง

ตำรับที่จะนำมาทดสอบ ประกอบด้วยนาโนอิมัลชันพื้นฐาน จำนวน 1 ตำรับ และนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิง จำนวน 1 ตำรับ ทดสอบด้วยวิธี Covered Patch Test (จีรเดช มโนสร้อย และอรัญญา มโนสร้อย. 2537) โดยใช้แผ่นผ้าก๊อซกว้างยาวขนาด 2.5 เซนติเมตร ชุบตำรับที่จะทดสอบปริมาณ 0.5 กรัม แล้วปิดไว้บนผิวหนังบริเวณด้านในแขนของอาสาสมัคร หลังจากนั้นจึงใช้แผ่นพลาสติกบาง ๆ ปิดทับ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงจากนั้นนำผ้าก๊อซออก เช็ดด้วยน้ำอุ่นทิ้งให้แห้ง สังเกตผลที่เวลาต่าง ๆ คือ ที่ 1 24 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วประเมินผลการระคายเคืองจากการอ่านผลการเกิดอาการบวม หรือแดงตามค่าระดับคะแนนดังนี้คือ

0 = ไม่เกิดอาการบวมแดง

1 = เกิดอาการบวมแดงน้อยมาก

2 = เกิดอาการบวมแดงชัดเจน

3 = เกิดอาการบวมแดงปานกลางถึงมาก

4 = เกิดอาการบวมแดงรุนแรง

3. การประเมินประสิทธิภาพของนาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงลดเซลลูไลท์ในอาสาสมัคร

โดยวิธีให้อาสาสมัครทุกคนสเปรย์นาโนอิมัลชันขิงบริเวณต้นขาขวาแล้วนวดเป็นวงกลม และสเปรย์นาโนอิมัลชันพื้นฐาน (Placebo) บริเวณต้นขาซ้ายแล้วนวดเช่นกัน อาสาสมัครจะใช้ผลิตภัณฑ์ด้วยตนเองทุกวันวันละ 2 ครั้ง คือตอนเช้าและตอนเย็นหลังอาบน้ำต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 28 วัน อาสาสมัครทุกคนบันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นรอบวงต้นขาที่ตำแหน่ง 70 และ 80 เซนติเมตรจากปลายเท้า อาสาสมัครจะเป็นผู้วัดเองโดยสายวัดที่ผู้วิจัยเตรียมให้ 5 ครั้งคือ วันที่ 0 (ก่อนใช้ผลิตภัณฑ์) 7 14 21 และ 28 ของการใช้ผลิตภัณฑ์ ผู้วิจัยจะรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองแล้วนำวิเคราะห์ข้อมูลหาความแตกต่างว่าเส้นรอบวงต้นขาของข้างที่ใช้นาโนอิมัลชันผสมสารสกัดขิงลดลงอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่เมื่อเทียบกับข้างที่ใช้นาโนอิมัลชันพื้นฐานโดยวิเคราะห์ทางสถิติ Paired T-test

4. การประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ โดยให้อาสาสมัครกรอกแบบสอบถามความพึงพอใจหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ครบ 28 วันตามแบบฟอร์มที่กำหนดให้ (ดูภาคผนวก ข)

แผนภูมิที่ 3.2
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในอาสาสมัคร