บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

ในการศึกษาวิจัยนี้ มีความจำเป็นต้องใช้อุปการณ์พื้นฐาน และสารเคมีต่างๆซึ่งสามารถสรุปได้ตามรายการ ดังต่อไปนี้

3.1.1 อุปกรณ์

1. อ่างน้ำเขย่าพร้อมควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) รุ่น WB14บริษัท Memmert, Germany
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Jouan MR Z3i บริษัท Joudan, France
3. เครื่องแช่แข็งตัวอย่าง (Freeze) รุ่น FC_200 บริษัท กรุงไทยการไฟฟ้าจำกัด, ประเทศไทย
4. เครื่องอบแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer) รุ่น CRY005-80 บริษัท Telstar cryodos, Spain ติดตั้งพร้อมกับ Vacuum pump รุ่น 949 – 9315 บริษัท Leini Torino, Italy
5. High speed homogenizer รุ่น Ultra Turrax T25 บริษัท Memmert, Germany พร้อมกับหัว homogenizer รุ่น S25N-18G บริษัท IKA, Germany
6. Rotary evaporator รุ่น R-200V800 บริษัท Buechi laboratorrium-technik AG, Switzerland ติดตั้งพร้อมกับ
   6.1 Vacuum pump รุ่น V-500 บริษัท Buechi laboratorrium-technik AG, Switzerland
   6.2 Water bath รุ่น B-490 บริษัท Buechi laboratorrium-technik AG, Switzerland
7. Fourier transform infrared spectrometer รุ่น FT/IR-230 บริษัท JASCO Coporation, Tokyo, Japan
8. High Performance Liquid Chromatagraphy รุ่น Agilent 1100 Series บริษัท Agilent, Germany
9. Column chromatography รุ่น Inertsil ODS-3, 5 μm, Japan
10. Transmission Electron microscope (TEM) รุ่น JEM 2010 บริษัท JEOL, Japan
11. Nanosizer รุ่น Nano-ZS บริษัท Malvern Instruments Ltd., UK
12. Magnetic stirrer regulator hotplate
13. Magnetc Bar (ยาว 5 ซม.)

3.1.2 สารเคมี

1. เคอร์คูมิน (Curcumin) บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด, Thailand [AL]

Curcumin / Turmeric Extract Powder

- Appearance – yellow to yellow-orange powder
- Curcumin : 79.78 %
- Demethoxycurcumin : 18.73 %
- Bisdemethoxycurcumin : 1.70 %
- Moisture ≤ 1 %
- Loss on drying ≤ 1%
- Heavy metal
  - Pb Not more than 10 ppm
  - Hg Not more than 2 ppm
  - Cd Not more than 0.3 ppm
  - As Not more than 4 ppm
- Microbial limit
  - Total Plate Count: Less thane 1,000 cfu/g
  - Yeast and mold : Less thane 1,000 cfu/g
  - *E. coli* : Non-detectable
  - *Salmonella* : Non-detectable
- Mean Particle size : 28.46 μm

2. ไคโตซาน (Chitosan) บริษัท ซีเฟรชไคโตซาน (แล็บ) จำกัด, Thailand [LB]

Chitosan / Seafresh Chitosan powder

- Molecular weight : 227,000
- Appearance : yellowish
- Deacetylation degree : 87% minimum
- Particle size : mesh. No. 18 (~ 1 mm)
- Ash content : less than 0.73%
- Moisture content : less than 9.0%
- Heavy metal : Non-detectable
- Microbial limit

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Total Plate Count : Less thane 10 cfu/g
- Yeast and mold : Less thane 10 cfu/g
- *E. coli* : Non-detectable
- *Salmonella* : Non-detectable

3. กรดอะซิติก (Acetic acid) บริษัท Merck, Germany [AL]
4. โซเดียมคลอไรด์ [NaCl] บริษัท Merck, Germany [LB]
5. โซเดียมฟอสเฟต [$Na_2HPO_4.12H_2O$] บริษัท Ajax Finechem, Newzealand [LB]
6. โซเดียมแอซิกฟอสเฟต [$NaH_2PO_4.2H_2O$] บริษัท Fisher Scientific, UK [LB]
7. เอทานอล 99.7-100%v/v บริษัท BDH, England [AL]
8. ปิโตรเลียมอีเทอร์(Petroleum Ether) บริษัท Shell Chemical, Thailand [CM]
9. Acetronitrile สำหรับ HPLC บริษัท J.T. Baker, USA [AL]
10. สแปน 80 (Span 80) บริษัท Fluka chemical, Switzerland [LB]
11. ทวีน 80 (Tween 80)บริษัท Fisher Scientific, UK [LB]
12. น้ำมันแร่(Mineral oil) [CM] บริษัท The East Asiatic, Thailand [CM]
13. โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต บริษัท Fluka chemical, Switzerland [LB]
14. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

หมายเหตุ : ความบริสุทธิ์ของสารเคมี [AL] ระดับ Analytical grade [LB] ระดับ Lab grade และ [CM] ระดับ Commercial grade

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

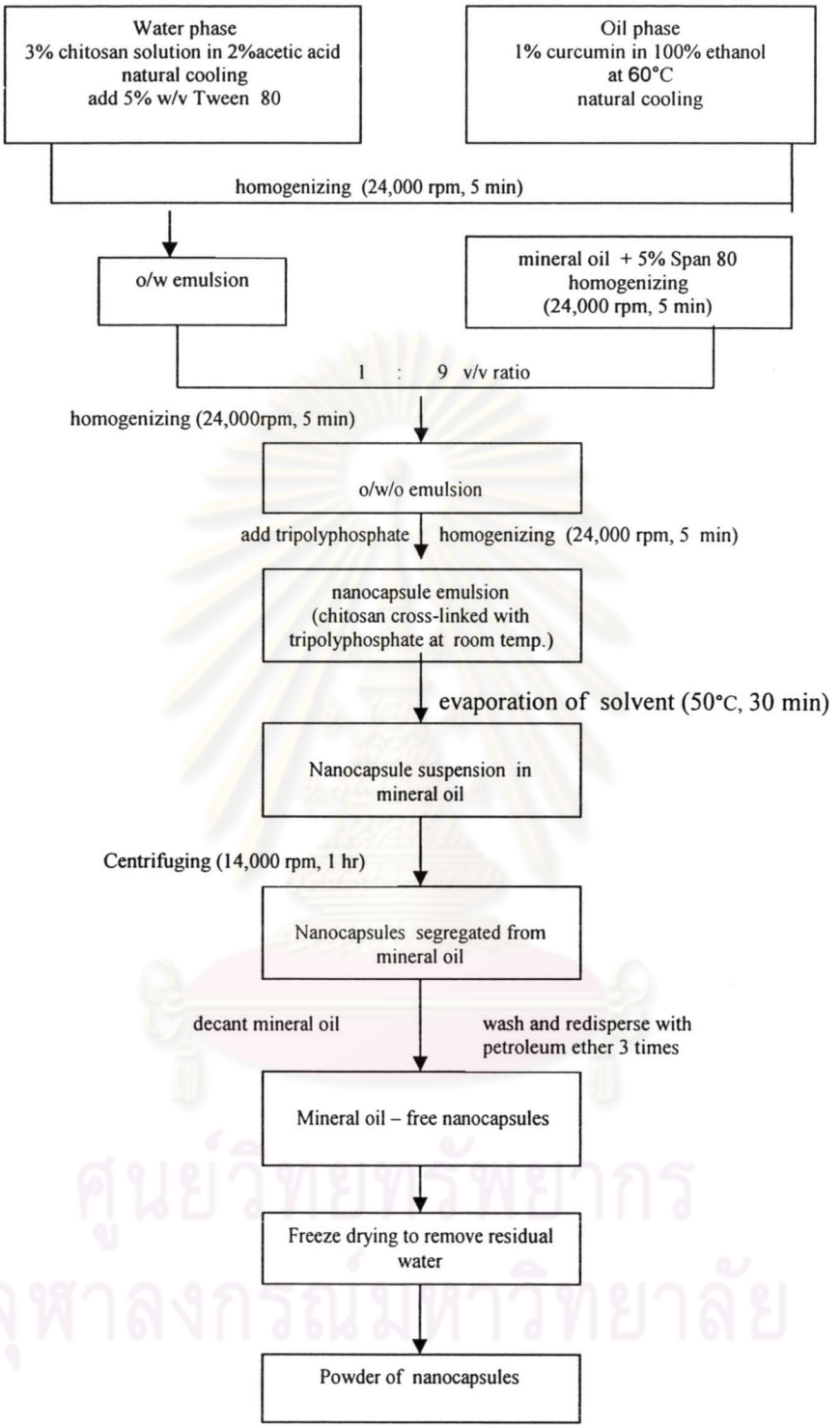
3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมนาโนแคปซูล

1. เตรียมเป็น emulsion (o/w) คือมีวัฏภาคภายในเป็นน้ำมัน วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำ โดยนำ curcumin มาละลายใน 0.01g/ml ethanol
2. นำ 3% ไคโตซาน ละลายในสารผสมระหว่าง 2%v/v acetic acid กับ methanol อัตราส่วน 4:1 โดยใช้ 5% w/v Tween 80 เป็นอิมัลซิฟายเออร์
3. เตรียม emulsion ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ Untraturrax Janke& Kunkel T25 homogenizer ทำการผสมด้วยอัตราเร็ว 21,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
4. ต่อจากนั้นเติม mineral oil ลงไปใน emulsion อัตราส่วน 9:1 v/v โดยใช้ 5% w/v Span 80 เป็นอิมัลซิฟายเออร์ ดังนั้นจะได้ของผสมเป็นอิมัลชันเชิงซ้อน (o/w/o emulsion)
5. เติม tripolyphosphate 2 ml : chitosan 5 ml ลงในอิมัลชันเชิงซ้อน ซึ่งจะเกิดการเชื่อมโยงระหว่าง tripolyphosphate กับ chitosan
6. ระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที
7. แยก nanocapsule ที่แขวนลอยโดย centrifuge 14,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
8. เท mineral oil ทิ้งไป แล้วล้าง nanocapsule ด้วย petroleum ether 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำ nanocapsules ที่ได้ไป freeze dry ที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
9. ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ Powder of nanocapsules

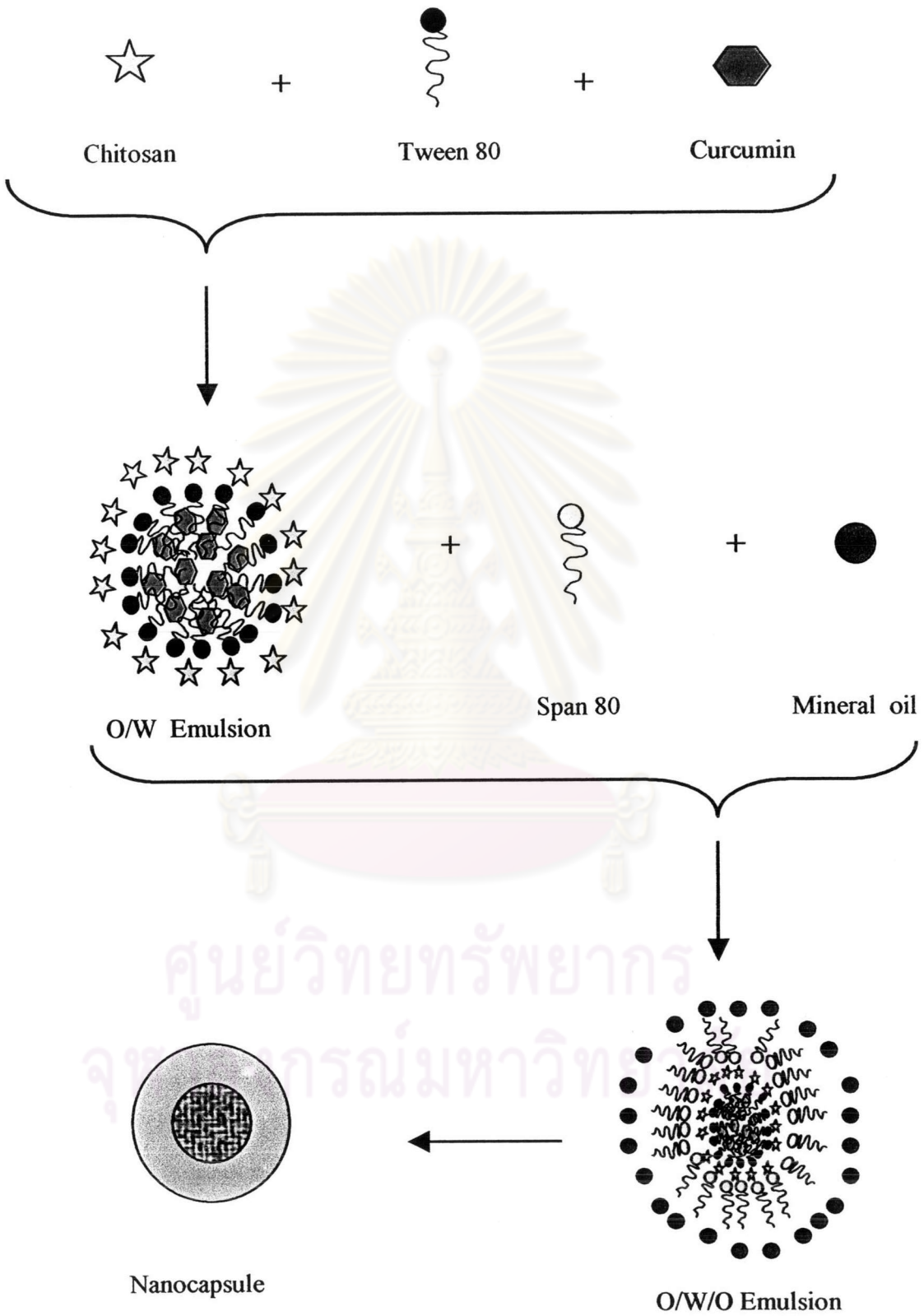
ดูรูปที่ 3.1 ประกอบ ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมนาโนแคปซูลของเคอร์คูมิน (curcumin) ที่หุ้มด้วยไคโตซาน

3.2.1.1 กลไกการเกิดนาโนแคปซูล



รูปที่ 3.2 การสังเคราะห์นาโนแคปซูลโดยใช้วิธีการอิมัลชันเชิงซ้อน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 เงื่อนไขของการเตรียมนาโนแคปซูลที่ศึกษา

3.2.2.1 ผลกระทบของความเข้มข้นของไคโตซาน

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยกำหนดในการเตรียมนาโนแคปซูลของเคอร์คูมิน

Parameter	Value
CS concentration (%w/v)	**2.0, 2.5 and 3.0**
Core to Wall ratio (v/v)	1:3, 1:4 and 1:5
Span 80 : Tween 80 (v/v)	50/50,60/40 and 70/30
TPP concentration (%w/v)	0.7,1.0 and 1.5

ตรวจสอบคุณลักษณะ นาโนแคปซูลที่ผลิตได้ จากประสิทธิภาพการบรรจุแคปซูล (Encapsulation Efficiency) ขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายขนาดอนุภาค สันฐาน (Morphology) และการปลดปล่อยสารเคอร์คูมิน

3.2.2.2 ผลกระทบของสัดส่วนระหว่างวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน

ตารางที่ 3.2 ปัจจัยกำหนดในการเตรียมนาโนแคปซูลของเคอร์คูมิน

Parameter	Value
CS concentration (%w/v)	2.0, 2.5 and 3.0
Core to Wall ratio (v/v)	**1:3, 1:4 and 1:5**
Span 80 : Tween 80 (v/v)	50/50,60/40 and 70/30
TPP concentration (%w/v)	0.7,1.0 and 1.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตรวจสอบคุณลักษณะ นาโนแคปซูลที่ผลิตได้ จากประสิทธิภาพการบรรจุแคปซูล (Encapsulation Efficiency) ผลได้ (Process Yield) ของการผลิตนาโนแคปซูล ขนาดอนุภาคเฉลี่ย และการกระจายขนาดอนุภาค สันฐาน (Morphology) และการปลดปล่อยสารเคอร์คูมิน

3.2.2.3 ผลกระทบของสัดส่วนอิมัลซิฟายเออร์ระหว่าง Span 80 : Tween 80

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยกำหนดในการเตรียมนาโนแคปซูลของเคอร์คูมิน

Parameter	Value
CS concentration (%w/v)	2.0, 2.5 and 3.0
Core to Wall ratio (v/v)	1:3, 1:4 and 1:5
Span 80 : Tween 80 (v/v)	**50/50,60/40 and 70/30**
TPP concentration (%w/v)	0.7,1.0 and 1.5

ตรวจสอบคุณลักษณะ นาโนแคปซูลที่ผลิตได้ จากประสิทธิภาพการบรรจุแคปซูล (Encapsulation Efficiency) ผลได้ (Process Yield) ของการผลิตนาโนแคปซูล ขนาดอนุภาคเฉลี่ย และการกระจายขนาดอนุภาค และสันฐาน (Morphology)

3.2.2.4 ผลกระทบของความเข้มข้นของไตรพอลิฟอสเฟต (Tripolyphosphate)

ตารางที่ 3.4 ปัจจัยกำหนดในการเตรียมนาโนแคปซูลของเคอร์คูมิน

Parameter	Value
CS concentration (%w/v)	2.0, 2.5 and 3.0
Core to Wall ratio (v/v)	1:3, 1:4 and 1:5
Span 80 : Tween 80 (v/v)	50/50,60/40 and 70/30
TPP concentration (%w/v)	**0.7,1.0 and 1.5**

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

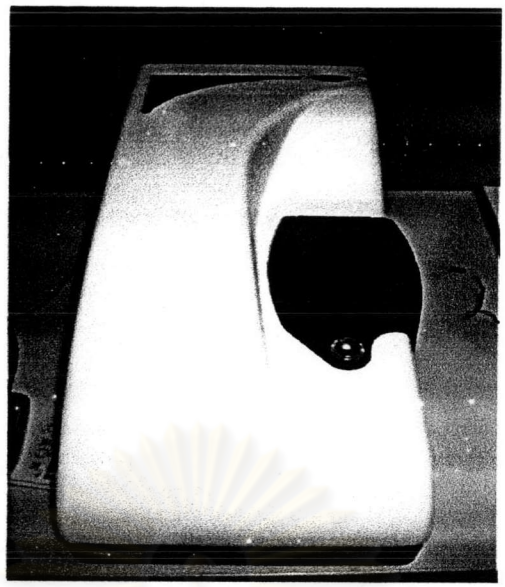
ตรวจสอบคุณลักษณะ นาโนแคปซูลที่ผลิตได้ สันฐาน (Morphology) FT-IR สเปกตัม เพื่อศึกษาหมู่ฟังก์ชันของไคโตซานที่เชื่อมโยงกับไตรพอลิฟอสเฟต

3.2.3 ขั้นตอนการตรวจสอบคุณลักษณะของนาโนแคปซูล

3.2.3.1 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายขนาดอนุภาคของนาโนแคปซูล

เนื่องจากการหาขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายขนาดอนุภาคเป็นสมบัติที่สำคัญที่สุดประการหนึ่งของนาโนแคปซูล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำนาโนแคปซูลในสภาพอิมัลชัน ดังรูปที่ 3.2 ปริมาตร 200 µL ไปกระจายตัวใน Mineral oil 2 ml แล้วจึงทำการวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ย และการกระจายขนาดอนุภาคของนาโนแคปซูล ด้วยเทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) โดยใช้เครื่อง Nanosizer รุ่น Nano-ZS ดังรูป ที่ 3.3

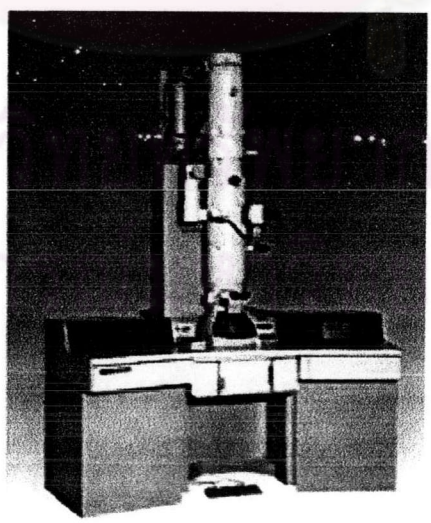
รูปที่ 3.3 Nanocapsules emulsion



รูปที่ 3.4 เครื่อง Nanosizer รุ่น Nano-ZS บริษัท Malvern

3.2.3.2 สัณฐาน (Morphology) ของนาโนแคปซูล

ในการวิเคราะห์สัณฐานของนาโนแคปซูลที่เตรียมได้ จะเริ่มต้นโดยนำตัวอย่างไปบดและกระจายตัวในน้ำปราศจากไอออน โดยใช้ Ultrasonic bathประมาณ 30 นาที จากนั้นจึงหยดตัวอย่างที่กระจายตัว ลงบน TEM grid เพื่อนำไปสังเกตสัณฐานของนาโนแคปซูล โดยการส่องและถ่ายภาพด้วย Transmission Electron Microscope (TEM) ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.5 Transmission Electron Microscope (TEM) รุ่น JEM 2010 บริษัท JEOL

3.2.3.3 ประสิทธิภาพการบรรจุแคปซูล (Encapsulation Efficiency)

ในการศึกษานี้จะทำการประเมินประสิทธิภาพของการบรรจุเคอร์คูมินใน แคปซูล โดยอาศัยหลักพื้นฐานซึ่งแสดงในสมการต่อไปนี้

$$\%EE = \frac{Lc}{Tc} \times 100$$

โดยที่ L_c คือ ความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่ถูกบรรจุในนาโนแคปซูล

T_c คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ประมาณจากปริมาณเคอร์คูมินที่ใช้ในแต่ละการทดลอง

(วิเคราะห์ผลที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ชั่งตัวอย่างปริมาณ 10 mg ละลายใน 50 v/v Acetic acid 10 ml นำสารละลายวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ curcumin โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatagraphy (HPLC)

Chromatographic condition ;

Column:	Inertsil ODS-3 - C_{18}, d_p 5µm, 250 × 4.6 mm
Mobile phase:	acetonitrile /10 % acetic acid in water (50:50)
Flow - rate:	1 ml/min
Detection:	UV at 254 nm
Detector wave length:	430 nm
Injection volume:	10 µL
Technique of analysis:	External standard technique

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3.4 ผลได้ (Process Yield) ของการผลิตนาโนแคปซูล

ในการศึกษานี้จะทำการประเมินผลได้ (Process Yield) ของการผลิตนาโนแคปซูล จะสามารถประเมินผลได้โดยอาศัยสมการ ต่อไปนี้

$$\% \text{ Process Yield (P.Y.)} = \frac{\text{Nanocapsules weight}}{\text{Total solids (CS+TPP+Curcumin) weight}}$$

P.Y. = ผลได้ของการผลิตนาโนแคปซูล (g)
Nanocapsules = น้ำหนักของนาโนแคปซูลที่ผลิตได้ (g)
CS = น้ำหนักของไคโตซานเริ่มต้น (g)
TPP = น้ำหนักของไตรพอลิฟอสเฟต (Tripolyphosphate) เริ่มต้น (g)
Curcumin = น้ำหนักของเคอร์คูมินเริ่มต้น (g)

3.3.3.5 คุณลักษณะกายภาพทางเคมีของไคโตซาน (Physicochemical characterizations of chtosan)

นำผงนาโนแคปซูลที่ผลิตได้ วิเคราะห์ฟังก์ชันนัลกรุ๊ปของไคโตซาน โดยใช้เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) เพื่อวิเคราะห์ยืนยันผลการเชื่อมโยงหมู่ฟังก์ชันของไคโตซานกับไตรพอลิฟอสเฟต

3.3.3.6 การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากนาโนแคปซูล

ชั่งนาโนแคปซูล 10 mg ลอยตัวใน 10ml ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 กับเอทานอล อัตราส่วน 1:1 บรรจุใส่ไว้ในขวดรูปชมพู่ ที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมกับเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เก็บตัวอย่าง 1 ml ทุกๆครั้งที่เก็บตัวอย่าง ต้องเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 กับเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ใหม่ เข้าแทนที่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยออกมา ณ เวลาต่างๆกัน โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatagraphy (HPLC)