

ผลของการดูดซับสารสกัดผลหม่อนบนอนุภาคไมโครอัลจิเนตต่อความคงตัว
ของสารแอนโทไซยานินที่อุณหภูมิสูง

นางสาวรุ่งนภา แยมเดช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECT OF ABSORPTION ON ALGINATE MICROSPHERE OF MULBERRY FRUITS
EXTRACTS ON STABILITY OF ANTHOCYANIN CONTENTS AT HIGH TEMPERATURE

Miss Rungrapha Yamdech

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของการดูดซับสารสกัดผลหม่อนบนอนุภาคไมโคร
อัลจิเนตต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานินที่อุณหภูมิสูง

โดย

นางสาวรุ่งนภา แยมเดช

สาขาวิชา

วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนงค์นาฏ สมหวังธนโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิรักษ์ สุทธิธารวัช)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย แพชมัด)

รุ่งนภา แย้มเดช : ผลของการดูดซับสารสกัดผลหม่อนบนอนุภาคไมโครอัลจิเนตต่อความคงตัวของสารแอนโทไซยานินที่อุณหภูมิสูง. (EFFECT OF ABSORPTION ON ALGINATE MICROSPHERE OF MULBERRY FRUITS EXTRACTS ON STABILITY OF ANTHOCYANIN CONTENTS AT HIGH TEMPERATURE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ไศรดา กนกพานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์, 164 หน้า.

การศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดผลหม่อนสดและผลหม่อนทำแห้งแบบเยือกแข็งจากแหล่งปลูก 2 แหล่งคือ จังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดนครราชสีมา พบว่าสารสกัดผลหม่อนจากทั้ง 2 แหล่ง มีค่าร้อยละของน้ำหนักแห้ง และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และสี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนจากนครราชสีมาสูงกว่าเพชรบูรณ์เท่ากับ 14.35 ± 0.43 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่แยกจากหนูวิสตา พบว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารผสมแอนโทไซยานินบริสุทธิ์ในรูปสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G) ปริมาณ 50 และ 100 ไมโครโมลลาร์ สามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และการสะสมแคลเซียมของเซลล์ให้สูงขึ้น แต่การใช้สารสกัดจากผลหม่อนในปริมาณที่มีแอนโทไซยานินเท่ากันกลับมีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ ALP และการสะสมของแคลเซียมอย่างมีนัยสำคัญ และในผลการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนที่ถูกดูดซับบนอนุภาคไมโครอัลจิเนตขนาดเม็ดอัลจิเนตเป็ยกขนาด 415.63 ± 13.09 ไมโครเมตร สามารถกักเก็บแอนโทไซยานินได้ 17.08 ± 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัมไมโครอัลจิเนต เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 และ 100 องศาเซลเซียส ปริมาณแอนโทไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนตลดเหลือร้อยละ 92 และ 24 ซึ่งมีความคงตัวกว่าในสารสกัดที่ไม่ได้ถูกดูดซับ ในสภาวะการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรส์ทำให้แอนโทไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนตมีความคงตัวสูงขึ้น การดูดซับแอนโทไซยานินจากสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนตช่วยเพิ่มความคงตัวของแอนโทไซยานินที่อุณหภูมิสูงได้

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....
 ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5270794721 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : ANTHOCYANIN / MULBERRY / ALGINATE

RUNGNAPHA YAMDECH: EFFECT OF ABSORPTION ON ALGINATE MICROSPHERE OF MULBERRY FRUITS EXTRACTS ON STABILITY OF ANTHOCYANIN CONTENTS AT HIGH TEMPERATURE. ADVISOR: ASST. PROF. SORADA KANOKPANONT, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PORNANONG ARAMWIT, Ph.D., 164 pp.

This study characterized the water extracts of mulberry fruits and freeze dried fruits from two cultivation areas in Thailand, Phetchabun (PB) and Nakhonratchasima (NK) province. Total solid weight, total soluble solid (% Brix), titratable acidities, reducing sugar, pHs and color were significantly different. The NK mulberry fresh fruit extracts had higher anthocyanin contents than those from PB. The anthocyanin contents were highest at 14.35 ± 0.43 mg/gDW with free radical scavenging activity with IC_{50} of 0.23 ± 0.01 mg/ml. The effect of anthocyanin (cyanidin-3-glucoside, C3G) on rat's bone marrow derived-mesenchymal stem cells (MSCs) was investigated *in vitro*. MSCs culture with growth media mixed with C3G at 50 and 100 micromoles were found to enhance the alkaline phosphatase (ALP) activities and calcium deposition of MSCs, while using the mulberry extract reduced these signs of osteogenic differentiation at the same conditions. The stability of anthocyanins adsorbed on alginate microspheres, with average bead sizes at 415.63 ± 13.09 μ m were studied. Anthocyanins loading on alginate microspheres were at 17.08 ± 0.25 mg/g dry weight. At 70 and 100 °C, anthocyanins retention were at 92%wt and 24%wt, respectively. Microspheres increased the anthocyanins stability at sterilized condition. Absorption of anthocyanins from mulberry fruit extracts on alginate microspheres enhanced their stability at high temperature.

Department : Chemical Engineering Student's Signature

Field of Study : Chemical Engineering Advisor's Signature

Academic Year : 2012 Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.โศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา, รศ.ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัยได้อย่างถูกต้อง

ขอขอบคุณ คณะกรรมการ ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนงนาฏ สมหวังธนโรจน์ ประธานกรรมการ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิรักษ์ สุทธิธรรวัช และรองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย แพชมัด กรรมการ ที่ท่านได้สละเวลาอันมีค่ามาร่วมเป็นการสอบวิทยานิพนธ์นี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณ ทูสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.) และโครงการไทยเข้มแข็ง SP2 ที่ให้เงินสนับสนุนการวิจัยของวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ สถานที่ทำวิจัย ได้แก่ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวภาพ และห้องปฏิบัติการชีววัสดุ อาคารอนุสาสน์ยันตรกรรม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อาคาร อ.ป.ร. คณะแพทยศาสตร์, อาคารจุฬาวิทย์ คณะเภสัชศาสตร์ และสถาบันวิจัยและวัสดุ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่ วัสดุ อุปกรณ์ในการทำการทดลองและความอนุเคราะห์เพื่อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยนี้

ขอบคุณมากสำหรับ คุณณอม วงศ์พุทธรักษา คุณรุ่งนภา วรรณดี คุณสลิตา ศิลปดิษฐ์ คุณภัทรานิษฐ์ ตริยาวิจิตรวิทย์ คุณปิยนุช จิตวิจิตรเกียรติ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวภาพ ที่ได้ให้กำลังใจ คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และให้แรงผลักดัน รวมทั้งการสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 หม่อน.....	5
2.2 แอนโธไซยานิน.....	7
2.3 แอนโธไซยานินในผลหม่อน.....	9
2.4 ความคงตัวของแอนโธไซยานิน.....	12
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	17
2.6 ฤทธิ์ของแอนโธไซยานินต่อเซลล์.....	17
2.7 เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก.....	18
2.8 การใช้สารกระตุ้นในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก.....	22
2.9 อัลจีเนต.....	25
2.10 เทคโนโลยีสำหรับการบรรจุหรือห่อหุ้มสารสำคัญ.....	29
2.11 การผลิตอนุภาคไมโครด้วยการผลิตเม็ดอัลจีเนต.....	31
2.12 งานวิจัยที่เทคนิคการห่อหุ้มสารต้านอนุมูลอิสระ.....	34
2.13 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	38
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	40

3.1	วัสดุและสารเคมี.....	40
3.2	อุปกรณ์.....	41
3.3	แผนผังการดำเนินงาน.....	43
3.4	ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	44
3.4.1	การเตรียมสารสกัดผลหม่อน.....	44
3.4.2	การศึกษาลักษณะทางกายภาพของหม่อนสกัด.....	46
3.4.3	การศึกษาความคงตัวในสารสกัดผลหม่อน.....	50
3.4.4	การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก.....	51
3.4.5	การศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์.....	52
3.4.6	การศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก... ..	54
3.4.7	การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต.....	56
3.4.8	การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไมโครอัลจิเนต.....	57
3.4.9	ปริมาณแอนโธไซยานินที่ถูกรวบรวมในอนุภาคไมโครอัลจิเนต.....	59
3.4.10	ความคงตัวของแอนโธไซยานินในสารสกัดหม่อนที่ถูกกักเก็บในอนุภาคไมโครอัลจิเนต.....	59
3.4.11	ปัญหาทางจริยธรรมในการทดลอง.....	59
3.4.12	การใช้สถิติในการวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	59
3.4.13	สถานที่ทำการวิจัย.....	60
บทที่ 4	ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	61
4.1	ลักษณะกายภาพและเคมีของสารสกัดผลหม่อน.....	61
4.1.1	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อน.....	62
4.1.2	ลักษณะทางเคมีของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อน.....	66
4.2	ศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของแอนโธไซยานินและสารสกัดผงผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูวิสต้าในระดับห้องปฏิบัติการ.....	77
4.2.1	ศึกษาความเป็นพิษและการเจริญเติบโตของแอนโธไซยานินและสารสกัดหม่อนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก.....	77
4.2.2	ศึกษาผลของแอนโธไซยานินและสารสกัดหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนูวิสต้าในระดับห้องปฏิบัติการ....	86

4.3	ศึกษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อน.....	92
4.3.1	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน.....	92
4.3.2	ผลของสภาวะการฆ่าเชื้อที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน.....	99
4.3.3	ผลของสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle ที่มีต่อความคงตัวของ สารสกัดผลหม่อน.....	100
4.4	การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต.....	103
4.5	ความสามารถในการดูดซับน้ำและสารสกัดหม่อนของอนุภาคไมโครอัลจิเนต.....	112
4.6	ปริมาณสารสำคัญที่กักเก็บได้.....	116
4.7	การศึกษาคงตัวของอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ถูกดูดซับสารสกัดหม่อน.....	118
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	122
5.1	สรุปผลการวิจัย.....	122
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	125
	รายการอ้างอิง.....	126
	ภาคผนวก.....	137
	ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential.....	138
	ภาคผนวก ข การหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	140
	ภาคผนวก ค การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	142
	ภาคผนวก ง การหาชนิดและปริมาณแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค High- Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	144
	ภาคผนวก จ การวัดหาจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT หรือ (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2- yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay	149
	ภาคผนวก ฉ การวัดหาจำนวนเซลล์ด้วยวิธี DNA.....	151
	ภาคผนวก ช การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ระยะเวลาที่เซลล์แบ่งตัว เป็นสองเท่า.....	153
	ภาคผนวก ซ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	155
	ภาคผนวก ฌ การวัดปริมาณแคลเซียม.....	157
	ภาคผนวก ฎ จรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง.....	159
	ภาคผนวก ฏ การหาขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Maztersizer malvidin 2000.....	161
	ภาคผนวก ฐ การหาปริมาณการกักเก็บแอนโทไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนต.....	162

ญ

หน้า

ภาคผนวก ฐ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์.....	163
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	164

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติทางเคมีของผลหม่อนที่ปลูกในประเทศไทย	6
2.2	ส่วนประกอบทางเคมีของผลหม่อนสุกสีด้าของพันธุ์ต่างๆ	6
2.3	ชนิด หมู่ฟังก์ชัน และลักษณะสีของแอนโทไซยานิน	8
2.4	ปริมาณแอนโทไซยานินในผลหม่อนสกัดด้วยเอทานอล	10
2.5	สมบัติเฉพาะของไซเดียมอัลจินต	28
2.6	สรุปงานวิจัยเกี่ยวกับการห่อหุ้มสารสกัดจากพืชที่เกี่ยวข้อง	36
4.1	สมบัติทางกายภาพของผลหม่อนสด	62
4.2	สมบัติทางกายภาพของสารสกัดหม่อน	64
4.3	สี ระบบ L^* , a^* และ b^* ของสารสกัดผลหม่อน	65
4.4	สรุปสมบัติทางเคมีของสารสกัดผลหม่อน	76
4.5	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (growth rate, μ), เวลาการแบ่งตัว ที่คูณคือระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (population doubling time, PDT) และความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สูงสุด (maximum density) ที่เวลา t_{max}	81
4.6	การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไข กระดูกของหนูวิสต้าที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ	91
4.7	ค่าคงที่ปฏิกิริยานุพันธ์อันดับหนึ่งของการสลายตัวของแอนโทไซยานินใน สารสกัดหม่อน	96
4.8	สมภาวะที่ใช้ในการทดลองในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินต	104
4.9	แสดงขนาดอนุภาคเฉลี่ยของเม็ดอัลจินตสูตรต่างๆ	109
4.10	ร้อยละการดูดซับน้ำและสารสกัดหม่อนที่เวลา 4 ชั่วโมง	115

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางกายภาพของผลหม่อน.....	6
2.2	โครงสร้างทั่วไปของแอนโทไซยานิน.....	7
2.3	โครงสร้างแอนโทไซยานินชนิดหลักที่พบในผลหม่อน.....	9
2.4	กราฟ HPLC-PAD ที่ 520 นาโนเมตร (a) สารสกัดของผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (b) สารสกัดของผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ หลังจากไฮโดรไลซิสด้วยกรด.....	11
2.5	กราฟ HPLC ของผลหม่อนสกัดสายพันธุ์ กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 (ผลหม่อนที่สุกเต็มที่) ที่ 520 นาโนเมตร.....	12
2.6	โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่เสื่อมสลายจากการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช...	14
2.7	การเสื่อมสลายของมอนอเมอริกแอนโทไซยานินในน้ำลูกหม่อนที่อุณหภูมิต่างกัน (ที่พีเอช 2.5).....	15
2.8	ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (A) และค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH 50% (IC ₅₀ , B) ของน้ำผลหม่อนสีม่วงหลังจากเก็บไว้ในสภาวะที่อุณหภูมิต่างกัน.....	16
2.9	ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ.....	19
2.10	ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในระดับห้องปฏิบัติการ...	20
2.11	จุลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์สีดำ..	21
2.12	โครงสร้างของ quercetin.....	22
2.13	โครงสร้างของ dexamethasone.....	23
2.14	โครงสร้างของ L-ascorbate-2-phosphate.....	24
2.15	โครงสร้างของ naringin.....	24
2.16	(a) มอนอเมอร์ M และ G ของอัลจิเนต (b) โครงสร้างของอัลจิเนต (c) ตัวอย่างลำดับการจัดเรียงของมอนอเมอร์ในสายโซ่อัลจิเนต.....	26
2.17	ชนิดของ block ในอัลจิเนตรูปแบบ: G-blocks รูปกลาง: M-block รูปล่าง: MG-blocks.....	26
2.18	ลักษณะการจับของแคลเซียมไอออนกับอัลจิเนต.....	29

2.19	รูปแบบการห่อหุ้ม: (a) core-shell encapsulation (b) matrix encapsulation.	30
2.20	การเกิดอัลจิเนตเจลแบบ (a) external gelation (b) internal gelation.....	32
2.21	การเตรียมเม็ดอัลจิเนตโดยวิธี emulsification.....	33
2.22	วิธีการขึ้นรูปเม็ดอัลจิเนตสำหรับใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โดยวิธี direct-extrusion.	34
3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัย.....	43
3.2	ขั้นตอนการสกัดสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนที่ใช้ในการวิจัยนี้.....	45
3.3	High-performance liquid chromatography DAD chromatogram ของแอนโธไซยานินที่สกัดจาก wide mulberry.....	48
3.4	อุปกรณ์การขึ้นรูปแบบ external gelation.....	57
4.1	ลักษณะทั่วไปของผลหม่อนสายพันธุ์เชียงใหม่จากแหล่งปลูกจังหวัด (a) เพชรบูรณ์ และ (b) นครราชสีมา.....	61
4.2	ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา.....	67
4.3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา.....	68
4.4	ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา.....	70
4.5	ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินด้วย HPLC ของสารสกัดผลหม่อนสด.....	71
4.6	เปรียบเทียบเทคนิควิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินของวิธี pH differential กับ วิธี HPLC ซึ่งใช้สารละลายไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในน้ำปราศจากไอออนในการเปรียบเทียบ.....	74
4.7	ค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC ₅₀ ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์และนครราชสีมา.....	75
4.8	การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100), สารสกัดผงผลหม่อนความเข้มข้น 0.25 mg/μl (M50), 0.5 mg/μl (M100) และซิงค์อะซิเทรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN).....	80
4.9	รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น	

	50 μ M (C3G50), 100 μ M (C3G100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) ที่ระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	82
4.10	รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μ M (C3G50), 100 μ M (C3G100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) ที่ระยะเวลา 72, 120 และ 168 ชั่วโมง.....	83
4.11	รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อนความเข้มข้น 0.25 mg/ μ l (M50), 0.5 mg/ μ l (M100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) ที่ระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	84
4.12	รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อนความเข้มข้น 0.25 mg/ μ l (M50), 0.5 mg/ μ l (M100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) ที่ระยะเวลา 72, 120 และ 168 ชั่วโมง.....	85
4.13	จำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (a) กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียมที่สร้าง (c) ที่เลี้ยง ในอาหาร Normal Medium (NM), อาหาร Normal Medium ที่มีปริมาณ ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μ M (C3G50), 100 μ M (C3G100) และอาหาร Osteogenic Medium.....	88
4.14	จำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (a) กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียมที่สร้าง (c) ที่เลี้ยง ในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อนความเข้มข้น 0.25 mg/ μ l (M50), 0.5 mg/ μ l (M100) และอาหาร Osteogenic Medium.....	89
4.15	การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดสารสกัดผลหม่อนสด (a) และผงผลหม่อนสกัด (b) จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ	93
4.16	การสลายตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดสารสกัดผลหม่อนสด (a) และ ผงผลหม่อนสกัด (b) จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ ตามสมการปฏิกิริยาอนุพันธ์อันดับหนึ่ง	95
4.17	ค่าคงที่สมการอาร์เรเนียสของการสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดผล	

	หม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (เคลวิน).....	96
4.18	การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 10 ชั่วโมง.....	98
4.19	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดที่ได้จากแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ ในสภาวะไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ, สภาวะฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ (HTST), สภาวะฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ (LTLT) และสภาวะฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์	100
4.20	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดที่ไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อจากแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ในสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle	101
4.21	ลักษณะรูปร่างของเม็ดอัลจินเตชันขึ้นรูปด้วยวิธี external gelation ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4xโดยใช้สารละลายโซเดียมอัลจินเตความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแก๊สไนโตรเจนอัตราการไหล 10, 15 และ 20 ลิตรต่อนาที.....	107
4.22	การกระจายตัวของขนาดอนุภาค (size distribution) ของเม็ดอัลจินเต 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG ด้วยเครื่อง Masterzier malvidin 2000	110
4.23	ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไมโครอัลจินเต โดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ของอนุภาคไมโครอัลจินเต 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG หลังการทำแห้งแบบอบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส.....	111
4.24	ร้อยละการดูดซับน้ำและสารสกัดผงหม่อนแห้งของอนุภาคไมโครอัลจินเตแห้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินเตร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (1.0%ALG), ร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (1.5%ALG), ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (2.0%ALG) และ ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (2.5%ALG).....	113
4.25	ลักษณะการดูดซับน้ำและสารสกัดผงหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจินเตของ 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG หลังจากการดูดซับ	

	ผ่านไป 4 ชั่วโมง.....	114
4.26	อนุภาคไมโครอัลจิเนตหลังการดูดซับสารสกัดหม่อน ผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่เวลาต่างๆ.....	115
4.27	ปริมาณการกักเก็บแอนโธไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนต.....	117
4.28	การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโธไซยานินในสารสกัดผงผลหม่อนสกัด และในสารสกัดผงผลหม่อนที่ถูกดูดซับในอนุภาคไมโครอัลจิเนต ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ.....	119
4.29	การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโธไซยานินในสารสกัดผงผลหม่อนสกัด และในสารสกัดผงผลหม่อนที่ถูกดูดซับในอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่สภาวะฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ 121 องศาเซลเซียส (20 นาที).....	120

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

หม่อน (Mulberry) ถือว่าเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย หม่อนที่ปลูกในเมืองไทยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus Alba* ชื่อภาษาอังกฤษว่า white mulberry ในอดีตประเทศไทยได้ปลูกหม่อนเพื่อนำใบหม่อนมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงหนอนไหมเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นรังไหมเท่านั้น แต่นอกจากใบหม่อนแล้วยังได้ผลผลิตที่เป็นผลพลอยได้อีกอย่างคือ ผลหม่อน โดยผลหม่อนห่ามจะให้รสชาติเปรี้ยว มีสีแดง ผลหม่อนสุกจะให้รสชาติหวาน มีสีม่วงดำ จึงนำผลหม่อนมารับประทานและแปรรูปเป็นอาหารและเครื่องดื่มมากมายเช่น แยม เยลลี่ ไวน์ หม่อน น้ำหม่อน ลูกอมสมุนไพรจากใบหม่อน และผลหม่อน จากสีสัน รสชาติและคุณค่าทางโภชนาการได้มีรายงานการวิจัยพบว่าหม่อนมีองค์ประกอบสำคัญได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolics), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid), วิตามินอี และ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) [Yang, X. และคณะ, 2010] ซึ่งเป็นสารประเภทพอลิฟีนอลที่มีคุณสมบัติสำคัญคือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ [Lietti, A. และคณะ, 1976] ลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ [Morse, M.A. และ Stoner, G.D., 1993] Chen, P.N. และคณะ (2006) รายงานว่าแอนโทไซยานินจากผลหม่อนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งชนิด A549 ได้ นอกจากนี้เคยมีรายงานล่าสุดในปี 2010 พบว่าแอนโทไซยานินจากผลหม่อนมีผลช่วยพัฒนาการเรียนรู้ ความจำ และการแก่ชราซึ่งช่วยป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในหนูชนิด SAMR1 และ SAMP8 [Shih, P.H. และคณะ, 2010] อีกทั้งยังสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูวิสต้าได้ [Yang, X. และคณะ, 2010] จะเห็นว่าหม่อนเป็นแหล่งของสารสำคัญที่จะส่งผลต่อการรักษาโรคต่างๆให้แก่มนุษย์ได้ นับว่าผลหม่อนเป็นผลไม้ที่ไม่ได้ต่างไปจากผลรสเบอรรี่ บลูเบอรรี่ ที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้ปัจจุบันได้รับความสนใจและได้มีการเพาะปลูกมากมาย โดยเฉพาะในพื้นที่ทางแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น บุรีรัมย์ สุรินทร์ และเพชรบูรณ์ แต่สารแอนโทไซยานินนั้น มีสมบัติไม่มีความคงตัว อันเนื่องมาจากกระบวนการการเก็บรักษา อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ออกซิเจน [Tsai, P.J. และคณะ, 2005] จากสมบัติความไม่คงตัวนี้ทำให้ผู้วิจัยหาวิธีในการแก้ปัญหา โดยการนำเทคนิคที่เรียกว่า ไมโครเอนแคปซูลेशन

(microencapsulation) มาช่วยในการรักษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในผลหม่อนให้มีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น

เทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชัน เป็นกระบวนการที่มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในกระบวนการตรึงการป้องกันหรือรักษาความคงตัว การควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญ และช่วยทำให้ของเหลวอยู่ในรูปของแข็งได้ [Chan, E.S. และคณะ, 2009] โดยเทคนิคนี้จะใช้วัสดุพอลิเมอร์มาห่อหุ้มสารที่เราสนใจเกิดเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ซึ่งในปี 2007 Ersus และ Yurdagel ได้ใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชันกับสารแอนโทไซยานินในแครอทดำ ด้วยกระบวนการพ่นแห้งเป็นกระบวนการที่มีใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยใช้ maltodextrin เป็นวัสดุพอลิเมอร์ [Ersus, S. และ Yurdagel, U., 2007] แต่เนื่องจากกระบวนการพ่นแห้งเป็นกระบวนการที่ใช้อุณหภูมิสูงกว่า 160 องศาเซลเซียสซึ่งไม่เหมาะสมกับสารที่มีความคงตัวต่ำจึงควรเลือกเทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชัน ด้วยกระบวนการอื่นแทนการใช้วิธีการพ่นแห้งและควรเป็นกระบวนการที่มีการหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิสูง

อัลจิเนต (alginate) ได้รับความนิยมนำมาใช้ในงานทางด้านวัสดุชีวภาพและมีสมบัติสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษ และไม่ก่อให้เกิดการแพ้ [Yang, J.S. และคณะ, 2011] นอกจากนี้มีงานวิจัยจำนวนมากนำอัลจิเนตมาใช้ในประยุกต์ในกระบวนการไมโครเอนแคปซูลเลชันในงานเกี่ยวกับ จุลินทรีย์ เอนไซม์ ฮอร์โมน ยา น้ำมัน และการเติมแต่งกลิ่นรสในอาหาร เนื่องจากสามารถคงตัวต่ออุณหภูมิและเกิดไฮโดรเจลเร็วเมื่อโมเลกุลมาจับกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์โดยไม่มีการใช้ความร้อน [Chan, E.S. และคณะ, 2009] ต่อมาในปี 2010 Chan, E.S. และคณะ ได้นำเทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชันร่วมกับการใช้วัสดุธรรมชาติอัลจิเนตมาใช้ในการห่อหุ้มสารสกัดจากสมุนไพร *Piper sarmentosum* ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีสมบัติเสื่อมสลายง่ายโดยใช้การดูดซับสารสกัดสมุนไพรนี้ในอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้งซึ่งขึ้นรูปด้วยกระบวนการ external gelation เป็นวิธีที่ง่ายในขั้นตอนเดียวและระหว่างกระบวนการไม่มีการใช้ความร้อน ทำให้ผู้วิจัยเลือกนำเทคนิคไมโครเอนแคปซูลเลชันวิธีดังกล่าวมาพัฒนาในการห่อหุ้มสารสกัดจากผลหม่อนเพื่อให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินที่อุณหภูมิสูง หวังผลในการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติด้านเคมี ได้แก่ ปริมาณสารแอนโทไซยานิน กิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) และชีวภาพ ได้แก่ ผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโต (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenesis) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells) ของหนูวิสต้า (Wistar rat) นอกร่างกาย
2. เพื่อศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในหม่อนสกัดโดยการห่อหุ้มสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนตของสารสกัดผลหม่อนแห้ง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 วิเคราะห์ลักษณะสมบัติทางเคมีกายภาพ ของสารสกัดผลหม่อนสดและผลหม่อนสกัด (โดยใช้หม่อนสดแช่แข็งและหม่อนแห้ง)

- ค่าพีเอช, ร้อยละของของแข็ง, ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้, สีด้วยระบบ $L^*a^*b^*$, ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

- ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปของมิลลิกรัมของ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อน้ำหนักหม่อนแห้ง

- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH โดยแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยค่า IC_{50}

1.3.2 ศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูวิสต้า นอกร่างกาย โดยประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay และความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกโดยวิเคราะห์สัญญาณการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) และปริมาณแคลเซียมต่อจำนวนเซลล์

1.3.3 ศึกษาความคงตัวของสารสกัดผลหม่อนสดและผลหม่อนสกัดที่อุณหภูมิต่างๆ สภาวะฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรส์และพาสเจอร์ไรส์ สภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle

1.3.4 เตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต ให้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยของเม็ดปิดเปียกขนาด 300-500 ไมครอนและวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไมโครอัลจิเนต

-ขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาคของเม็ดปิดเปียก

-โครงสร้างพื้นฐาน (morphology) ของอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้ง

-การดูดซับน้ำ

-การดูดซับสารสกัดผลหม่อน

1.3.5 ศึกษาวิธีและผลของการบรรจุสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนตต่อคุณภาพของสารสกัดหม่อนและหาปริมาณสารสำคัญที่ยังคงประสิทธิภาพที่กักไว้ได้

1.3.6 ศึกษาความคงตัวของผงผลหม่อนสกัดที่บรรจุในอนุภาคไมโครอัลจิเนตเทียบกับหม่อนสกัดก่อนการบรรจุที่อุณหภูมิสูง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

14.1 ข้อมูลทางเคมีกายภาพ ของสารสกัดผลหม่อนทั้งสารสกัดผลหม่อนสด และผงผลหม่อนสกัด จาก 2 แหล่งผลิตในประเทศ

14.2 ผลทางชีววิทยาของสารสกัดผลหม่อนที่มีต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกของของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูสัตว์ในระดับห้องปฏิบัติการ

14.3 ผลของความคงตัวของอุณหภูมิสูงและสภาวะแรงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนโดยอนุภาคไมโครอัลจิเนต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หม่อน (Mulberry)

หม่อนเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Moraceae ตระกูล *Morus* spp. ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนอยู่ในแถบเขตนานาจัดเป็นไม้ผลในกลุ่ม deciduous fruit plant หรือประเภท hard wood คือใบจะร่วงในฤดูใบไม้ร่วงและมีการพักตัวในฤดูหนาว พันธุ์หม่อนที่ปลูกกันอยู่ทั่วโลกมีมากมายหลายสายพันธุ์โดยมีแหล่งกำเนิดกระจายกว้างขวางมากคือ ตั้งแต่เขตร้อน (tropical zone) เขตอบอุ่น (subtropical zone) เขตหนาว (temperate zone) และเขตหนาวเย็น (sob-arctic zone) ส่วนใหญ่เป็นการปลูกเพื่อนำใบไปเลี้ยงเป็นอาหารไหม แต่มีอีกหลายพันธุ์ที่นำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น การรับประทานผล การนำไปเป็นต้นไม้สำหรับบังลม การปลูกเพื่อใช้เป็นอาหารของนก การปลูกเป็นไม้ประดับริมถนนหนทาง และบางพันธุ์ยังเป็นพืชพันธุ์ป่า การจำแนกพันธุ์หม่อนระดับสปีชีส์เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ.1753 เมื่อ Linneaus ได้จำแนกพันธุ์หม่อนออกเป็น 5 สปีชีส์ได้แก่ *Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L., *Morus tartarica* L. และ *Morus indica* L. จนถึงปี ค.ศ.1917 Koidzumi ได้จำแนกพันธุ์หม่อนออกเป็น 24 สปีชีส์ และ 1 ซับสปีชีส์ ต่อมา นักพฤกษศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Horita ได้จำแนกพันธุ์หม่อนออกเป็น 35 สปีชีส์ [วสันต์ คุ้มภรณ์, 2553]

พันธุ์หม่อนที่ปลูกในประเทศไทย

พันธุ์หม่อนตระกูล *Morus alba* L. ได้ปลูกในประเทศไทยเพื่อเก็บผลผลิตใบหม่อนมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงหนอนไหมให้ได้รังไหมและเก็บผลผลิตผลหม่อนพื้นที่ส่วนใหญ่ที่ปลูกหม่อนคือภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น บุรีรัมย์ สุรินทร์ และเพชรบูรณ์ พันธุ์หม่อนที่มีการเพาะปลูกและปรับปรุงพันธุ์ เช่น พันธุ์เชียงใหม่ นครราชสีมา 60 บุรีรัมย์ 60 บุรีรัมย์ 51 ศรีสะเกษ 33 และสกลนคร 72



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของผลหม่อน [Qin, C. และคณะ, 2010]

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางเคมีของผลหม่อนที่ปลูกในประเทศไทย [www.moac.go.th]

ผลหม่อนสด	ผลห้าม	ผลสุก	ผลหม่อนอบแห้ง(%)	
ความชื้น (%)	87.00	83.50	โปรตีน	12.81
ความหวาน (% brix)	10.05	13.10	ไขมัน	4.94
ปริมาณกรด (% w/w as citric)	1.35	0.65	คาร์โบไฮเดรต	8.14
			เส้นใย	6.74
			เถ้า	0.06
			ความชื้น	16.56

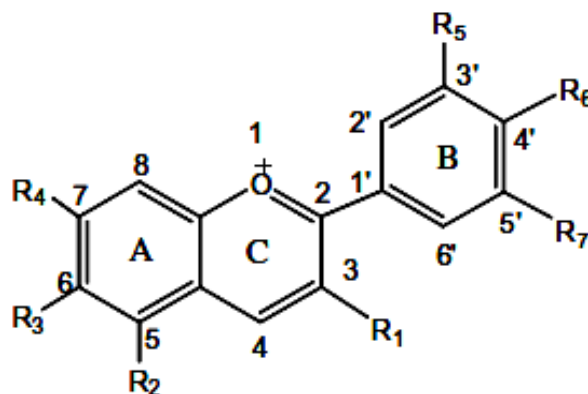
ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของผลหม่อนสุกสีดำของพันธุ์ต่างๆ [วสันต์ นุ้ยภิรมย์, 2553]

พันธุ์หม่อน	โปรตีน (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)	ไขมัน (%)	น้ำตาล (%)	ความเปรี้ยว (% w/v)	pH	ความชื้น (%)
นครราชสีมา 60 1/	1.56	ไม่มีข้อมูล	1.47	26.31	1.39	6.0	90.27
บุรีรัมย์ 60 1/	1.26	ไม่มีข้อมูล	1.31	21.81	1.51	5.9	90.15
เชียงใหม่ 2/	11.86	61.19	3.66	11.2	1.19	4.0	16.58

1/ วิเคราะห์ จากผลหม่อนสด 2/ วิเคราะห์ จากผลหม่อนอบแห้ง

2.2 แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

แอนโทไซยานินมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก *anthos* หมายถึง ดอกไม้ และ *kyanos* หมายถึง สีน้ำเงิน [Kong, J.M. และคณะ, 2003] แอนโทไซยานินเป็นสารสีหรือรงควัตถุที่พบได้ทั่วไปที่ตามองเห็นได้ในดอกไม้ ผลไม้ และผักบางชนิด ใบหรือลำต้นของพืชบางชนิดที่มีสีจัดจัดเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีสมบัติละลายน้ำได้ และมีความคงตัวต่ำซึ่งสีที่ได้จากแอนโทไซยานินได้แก่ สีน้ำเงิน สีม่วง สีแดง และสีส้ม ซึ่งสามารถสกัดได้จากผลองุ่น ผลแอปเปิ้ล ผลของพืชพวกเบอร์รี่ ผลหม่อน กะหล่ำปลีม่วง ข้าวฉนิล ข้าวเหนียวดำ ดอกอัญชัน ดอกทิวลิป ดอกกุหลาบ ดอกกล้วยไม้ เป็นต้น แอนโทไซยานินเป็นไกลโคไซด์ของแอนโทไซยานิดินมีโครงสร้างเป็นเกลือฟลาโวนิเดียมในธรรมชาติมักพบในรูปไกลโคไซด์ซึ่งมีน้ำตาลมาเกาะที่ตำแหน่ง C-3 หรือ C-5 [www.drug. pharmacy.psu.ac.th] ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส แรมโนส ไซโรส และอะราบินอส [Wang, L.S. และ Gary, D.S., 2008] ซึ่งแอนโทไซยานิดินคือโครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน ดังรูปที่ 2.2 ปัจจุบันได้พบแอนโทไซยานิดิน 22 ชนิด ดังตารางที่ 2.3 ชนิดที่พบบ่อยมากที่สุดโดยทั่วไปมี 6 ชนิด คือ ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีลาร์โกนินิดิน (pelargonidin) มัลวิดิดิน (malvidin) พีทูนิดิน (petunidin) และพีโอนิดิน (peonidin) ซึ่งมีสัดส่วนที่พบในผักและผลไม้โดยประมาณคือ ไซยานิดินร้อยละ 50, เดลฟินิดินร้อยละ 12, พีลาร์โกนินิดินร้อยละ 12, พีโอนิดินร้อยละ 12, พีทูนิดินร้อยละ 7 และมัลวิดิดินร้อยละ 7 [Castaneda-Ovando, A. และคณะ, 2009] จากความหลากหลายของแอนโทไซยานิดินทำให้สามารถเกิดแอนโทไซยานินมากกว่า 500 ชนิด โดยชนิดของแอนโทไซยานินนั้นขึ้นกับจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล ลักษณะ และจำนวนของหมู่น้ำตาลที่มาเกาะ ตำแหน่งการเกาะติดของหมู่น้ำตาลนั้น จำนวนและลักษณะของกรดอะลิฟาติกหรือ กรดอะโรมาติกที่มาเกาะกับหมู่น้ำตาล [Kong, J.M. และคณะ, 2003]



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทั่วไปของแอนโทไซยานิน [Castaneda-Ovando, A. และคณะ, 2009]

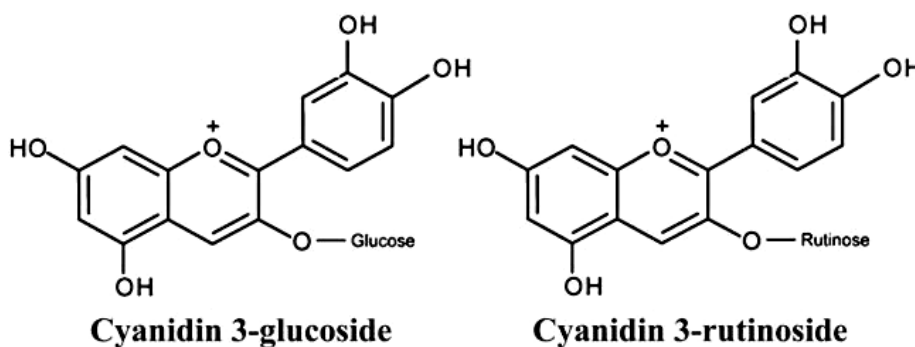
ตารางที่ 2.3 ชนิด หมู่ฟังก์ชัน และลักษณะสีของแอนโทไซยานิดิน [Castaneda-Ovando, A. และคณะ, 2009]

ชื่อ	คำย่อ	ชนิดหมู่ฟังก์ชัน							สี
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	
Arrabidin	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	N.R. ^a
Aurantidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Blue-red
Carajurin	Cj	H	H	OH	OH	H	Ome	OMe	N.R. ^a
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Blue-red
Europinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Blue-red
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Blue-red
30-HydroxyAb	3'OHAb	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	N.R.a
6-HydroxyCy	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Red
6-HydroxyDp	6OHDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Blue-red
6-HydroxyPg	6OHPg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	N.R. ^a
Luteolin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Blue-red
5-MethylCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-red
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Blue-red
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Blue-red
Riccionidin A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	N.R. ^a
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red

หมายเหตุ NR คือ ไม่ได้รายงาน

2.3 แอนโทไซยานินในผลหม่อน

มีรายงานวิจัยว่าในผลหม่อน (mulberry fruits) สปีชีส์ *Morus alba L.* พบแอนโทไซยานิน ชนิดหลัก 2 ชนิดคือไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (cyanidin 3-rutinoside) [Qin, C. และคณะ, 2010][Bae, S.H. และ Shu, H.J., 2007][มนต์วดี หุ่นเจริญ และศศิธร ตรงจิตภักดี, 2553] ซึ่งมวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ $[C_{21}H_{21}O_{11}]^+$ เท่ากับ 449.108 กรัมต่อโมลและไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ $[C_{27}H_{31}O_{15}]^+$ เท่ากับ 595.526 กรัมต่อโมล โครงสร้างของสารดังกล่าวแสดงดังรูปที่ 2.3 และนอกจากนี้ยังพบแอนโทไซยานินย่อยชนิดอื่นๆ เช่น พีลาร์โกนิน-3-กลูโคไซด์ (pelargonidin-3-glucoside) และพีลาร์โกนิน-3-รูทีโนไซด์ (pelargonidin-3-rutinoside) [Qin, C. และคณะ, 2010]



รูปที่ 2.3 โครงสร้างแอนโทไซยานินชนิดหลักที่พบในผลหม่อน [Butt, M.S. และคณะ, 2008]

Bae, S.H. และ Shu, H.J (2007) ได้วิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินของผลหม่อน 5 สายพันธุ์คือ Pachungsipyung, Whazosipmunja, Suwonnosang, Jasan และ Mocksang เป็นสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศเกาหลีซึ่งอยู่ในสปีชีส์ *Morus alba L.* ทำการสกัดโดยนำผลหม่อนมา 50 กรัมปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกันและสกัดด้วย 70% เอทานอลเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแล้วล้างด้วยเอทานอล 50 มิลลิลิตร และสกัดกากที่เหลือซ้ำอีกครั้งแล้วนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดรวมกันแล้วผ่านกระบวนการระเหยภายใต้สภาวะต่ำกว่าบรรยากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเพื่อให้ได้สารสกัดแห้ง การวิเคราะห์แอนโทไซยานินโดยใช้ HPLC คอลัมน์ C18 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาทีที่มีความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย B 20%-80% (1.5% กรดฟอสฟอริก, 20% กรดอะซิติก, 25% อะซิโตนไตรคลอไรด์ละลายในน้ำ) ในตัวทำละลาย A คือ 1.5%

กรดฟอสฟอริกละลายในน้ำการวิเคราะห์พบแอนโทไซยานินหลัก 2 ชนิดคือ ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และไชยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ดังตารางที่ 2.4

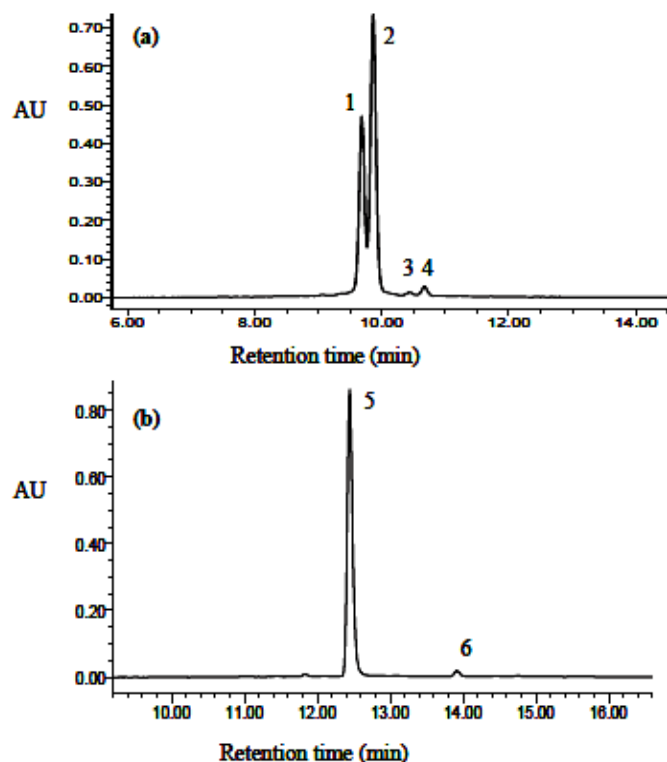
ตารางที่ 2.4 ปริมาณแอนโทไซยานินในผลหม่อนสกัดด้วยเอทานอล [Bae, S.H. และ Shu, H.J, 2007]

Mulberry fruit extract	TA ($\mu\text{g/g}$)	Cyanidin-3-glucoside ($\mu\text{g/g}$)	Cyanidin-3-rutinoside ($\mu\text{g/g}$)
M-1	1229.3 \pm 21.4 ^d	847.1 \pm 11.2 ^c	259.3 \pm 15.3 ^d
M-2	2057.3 \pm 18.5 ^a	1364.9 \pm 10.4 ^a	486.7 \pm 18.5 ^a
M-3	1599.3 \pm 21.0 ^c	1091.6 \pm 19.6 ^b	347.7 \pm 12.4 ^c
M-4	1664.1 \pm 11.9 ^b	1077.3 \pm 11.2 ^b	420.5 \pm 20.1 ^b
M-5	137.3 \pm 7.7 ^e	93.2 \pm 7.4 ^d	30.6 \pm 3.8 ^e

หมายเหตุ M-1: Pachungsipyung, M-2: Whazosipmunja, M-3: Suwonnosang, M-4: Jasan, M-5: Mocksang

Qin, C. และคณะ (2010) ได้ใช้ HPLC-PAD ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินในผลหม่อนสกัดสปีชีส์ *Morus alba* L. สายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศจีน การสกัดทำโดยนำหม่อนสดที่ปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นมา 100 กรัมผสมกับสารสกัด 500 มิลลิลิตรเป็นสัดส่วน 1:5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สารสกัดประกอบด้วย 95% เอทานอล ต่อ 0.1% กรดไฮโดรคลอริก สัดส่วน 1:1 เก็บในที่มืดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วแยกส่วนใสมารองด้วยกระดาษกรอง การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทำได้โดยผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรดก่อนมาวิเคราะห์ด้วย HPLC-PAD ที่ค่าการดูดกลืนแสง 520 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ C18 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ A (0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ในน้ำ), B (0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติกในอะซิโตนไตริล) การชะ (elution) เกิดที่เวลา 0–60 นาที: 0 นาที, 10% B; 0–2 นาที, 10% B; 2–35 นาที, 10–90% B; 35–40 นาที, 90–100% B; 40–60 นาที, 100% B. อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบแอนโทไซยานินต่างกัน 4 ชนิด ที่เวลา 9.6 นาทีพบพีคที่ 1 38% คือ ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์, เวลา 9.9 นาทีพบพีคที่ 2 60% คือ ไชยานิดิน-3-รูทีโนไซด์, พีคที่ 3 พบที่เวลา 10.4 นาที ปริมาณ 0.5% และพีคที่ 4 พบเวลา 10.7 นาที 1.5% คือ ฟิลาโรโกนิน-3-กลูโคไซด์ และฟิลาโรโกนิน-3-รูทีโนไซด์ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.4(a) จากนั้นเมื่อนำสารสกัด

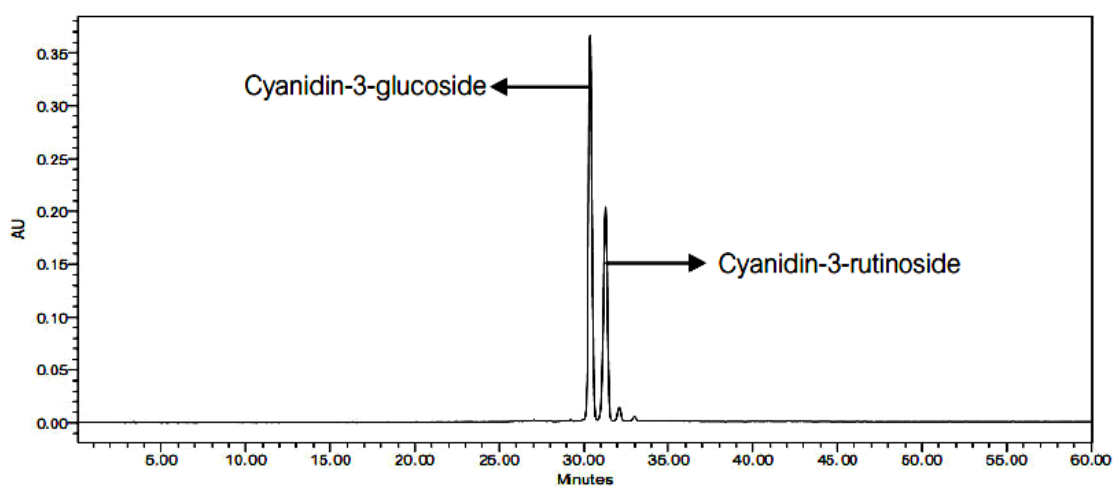
หม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มาไฮโดรไลซิสด้วยกรดแล้ววิเคราะห์ พบว่าแอนโธไซยานินในหม่อนสกัดจะเกิดอะไกลโคโคน 2 ชนิด คือ ไซยานิดิน กับพีลาร์โกนินดิน ดังแสดงในพีคที่ 5 และ 6 ที่เวลา 12.5 และ 13.9 นาทีตามลำดับดังรูปที่ 2.4 (b) โดยแอนโธไซยานินจากพีคที่ 1 กับ 2 เมื่อถูกไฮโดรไลซิสจะได้เป็นพีคที่ 5 และพีคที่ 3 กับ 4 เมื่อถูกไฮโดรไลซิสจะได้เป็นพีคที่ 6



รูปที่ 2.4 กราฟ HPLC-PAD ที่ 520 นาโนเมตร (a) สารสกัดของผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (b) สารสกัดของผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ หลังจากไฮโดรไลซิสด้วยกรด [Qin, C. และคณะ, 2010]

มนต์วดี นุ่นเจริญ และศศิธร ตรงจิตภักดี (2553) ได้ตรวจสอบชนิด และปริมาณแอนโธไซยานินในผลหม่อนแห้งสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 การสกัดทำโดยใช้ผลหม่อนแห้งน้ำหนัก 1 กรัมสกัดด้วยสารละลายเมทานอล 50% ที่มีส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริก 0.01% ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง การวิเคราะห์ชนิดแอนโธไซยานินด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (Symmetry, 4.6mm.x250mm) (Water, Milford, MA, USA) โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำปราศจากไอออนและอะซิโตไนไตรล์ที่มีส่วนผสมของ 0.1% กรดฟอสฟอริก ทั้ง 2 วัฏภาคเคลื่อนที่ และใช้ UV diode-array detector

ตรวจวัดแอนโทไซยานินที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พบแอนโทไซยานินหลัก 2 ชนิดคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 889.3 ± 36.9 และ 827.4 ± 31.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของหม่อนแห้งตามลำดับ นอกจากนี้ยังหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH-differential พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดเท่ากับ 1843.6 ± 13.9 มิลลิกรัมของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัมของหม่อนแห้งจากการตรวจสอบชนิดและปริมาณแอนโทไซยานินแสดงให้เห็นว่าผลรวมของปริมาณแอนโทไซยานินของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์จากเทคนิค HPLC ใกล้เคียงกับปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ตรวจสอบด้วยวิธี pH-differential



รูปที่ 2.5 กราฟ HPLC ของผลหม่อนสกัดสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 (ผลหม่อนที่สุกเต็มที่) ที่ 520 นาโนเมตร [มนต์วดี ฟู่นเจริญ และศศิธร ตรงจิตภักดี, 2553]

2.4 ความคงตัวของแอนโทไซยานิน (Anthocyanin stability) [Castaneda-Ovando, A. และคณะ, 2009]

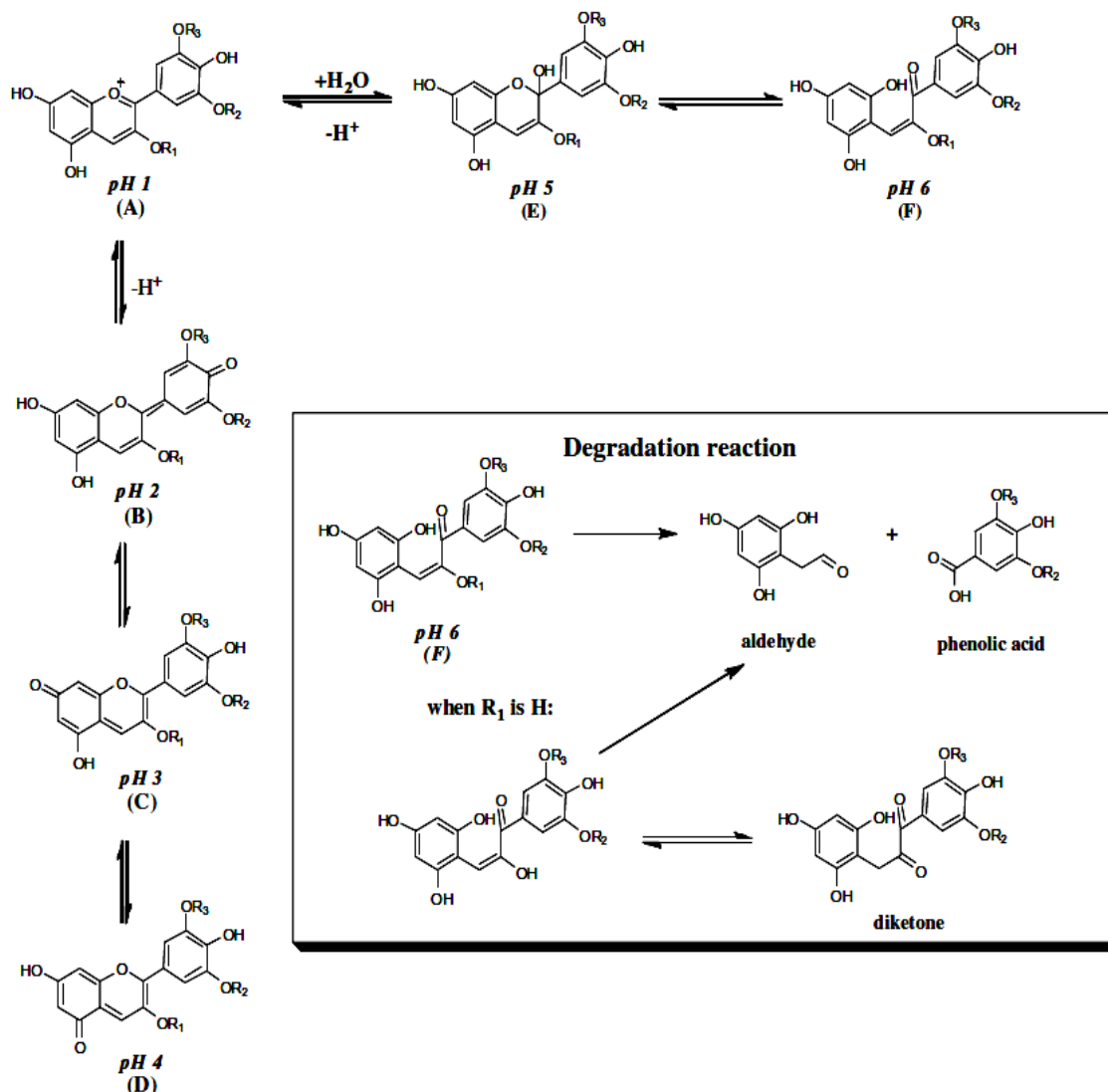
แอนโทไซยานิน เป็นสารที่มีความคงตัวต่ำและไม่ค่อยเสถียร เกิดการเสื่อมสลาย (degradation) ได้ง่าย [Giusti และ Wrolstad, 2003] ความเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินนั้น มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิในการเก็บ โครงสร้างทางเคมี ความเข้มข้น แสงออกซิเจน ตัวทำละลาย และเอนไซม์

ตัวทำละลายและความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน

การใช้ตัวทำละลายในการสกัดแอนโทไซยานินที่ต่างกันมีผลทำให้สีของแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการเกิดเกลือฟลาโวลีเทียม (flavylium salts) ในสารละลายมีธรรมชาติที่ต่างกัน เช่น สารละลายอะซิโตนไตรต์ เอทานอล โพรพิลีนไกลคอล ไดโอเซน และทิวโทนาโนเป็นต้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีซึ่งขึ้นอยู่กับทั้งตัวทำละลายที่ใช้และความเข้มข้นของเกลือฟลาโวลีเทียม ในตัวทำละลายโพรติกเป็นตัวทำละลายที่มีหมู่ไฮดรอกซิลหรือเอมีน ซึ่งสีของเกลือฟลาโวลีเทียมแสดงเป็นสีแดง ในขณะที่ในตัวทำละลายอโพรติกจะแสดงเป็นสีเหลือง

ค่าพีเอช

แอนโทไซยานินสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีในสภาวะสารละลายตัวกลางที่มีค่าพีเอชต่างกัน ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1 แอนโทไซยานินจะมีโครงสร้างอยู่ในรูปฟลาโวลีเทียมแคทไอออน (flavylium cation) มีสีแดงและสามารถเปลี่ยนแปลงให้แอนโทไซยานินเกิดเป็นสีม่วงและแดงได้ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2 ถึง 4 จะเกิดเป็นโครงสร้างของควินอยดอลบลู (quinoidal blue) มีสีฟ้าและที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5 และ 6 โครงสร้างเปลี่ยนไปเป็นคาร์บินอลซูโดเบส (carbinol pseudobase) และแคลโคน (chalcones) ตามลำดับ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจนไม่ปรากฏสีหรือจะแสดงการให้สีค่อนข้างน้อย และที่พีเอชเท่ากับ 7 สารแอนโทไซยานินจะเกิดการสลายตัว จากรูปที่ 2.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชจึงสรุปได้ว่าที่พีเอชระหว่าง 4 กับ 6 จะเกิดสมดุลของควินอยดอลคาร์บินอล ร่วมกับฟลาโวลีเทียมแคทไอออน เมื่อพีเอชสูงขึ้นจนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนหรือเป็นกลาง ปริมาณฟลาโวลีเทียมแคทไอออนจะเริ่มลดลงและเมื่อสภาวะที่เป็นกรดมากจะเกิดโครงสร้างที่เป็นฟลาโวลีเทียมแคทไอออนที่มีความคงตัวมากที่สุด ดังนั้นที่พีเอชเท่ากับ 1 เป็นสภาวะที่มีความคงตัวสูงสุดซึ่งความคงตัวของแอนโทไซยานินหรือเรียกว่า อะไกลโคน (aglycones) มีอิทธิพลจากหมู่ที่มาแทนวงแหวน B และหมู่ไฮดรอกซิลกับเมทริกซ์ที่มากเกาะกับโมเลกุลทำให้ความคงตัวของอะไกลโคนลดลงในสภาวะที่เป็นกลาง ดังนั้น ฟิลาโรโกนินจึงเป็นแอนโทไซยานินที่มีความคงตัวมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของอะไกลโคน โมโนไกลโคไซด์ และไดไกลโคไซด์ ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้เนื่องจากโมเลกุลของน้ำตาลสามารถช่วยลดการเสื่อมสลายไปเป็นสารที่ไม่คงตัวของทั้งกรดฟีนอลิกและสารประกอบอัลดีไฮด์ได้ปฏิกิริยาการเสื่อมสลายในรูปที่ 2.6

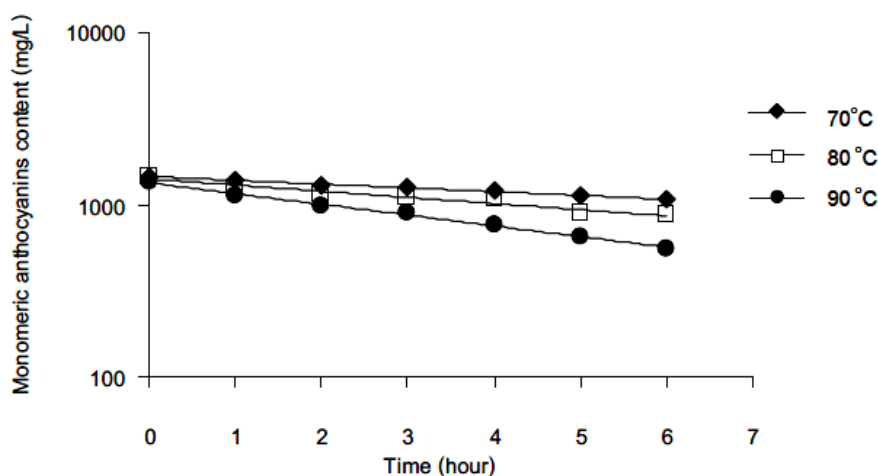


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของแอนโธไซยานินที่เสื่อมสลายจากการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช (A) ที่พีเอช 1 เกิดโครงสร้างฟลาโวลีเทียมแคทไอออนลักษณะสีเป็นสีแดง, (B)-(D) พีเอช 2-4 เกิดโครงสร้างควิโนนยดอลบูลลักษณะเป็นสีฟ้า, (E)-(F) พีเอช 5-6 เกิดโครงสร้างคาร์บินอล ซูโดเบส และแคลโคเนลักษณะเป็นสีอ่อนหรือไม่มีสี [Castaneda-Ovando, A. และคณะ, 2009]

อุณหภูมิ

มนต์วดี หุ่นเจริญ และศศิธร จันทนรวงกูร (2551) ได้ศึกษาความคงตัวของแอนโธไซยานินต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 70–90 องศาเซลเซียสและที่ค่าพีเอช 2.5-8.0 ในน้ำลูกหม่อน พบว่าการเสื่อมสลายของแอนโธไซยานินเป็นไปตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง เมื่อเทียบกับอุณหภูมิโดยมีสมการคือ $\ln(C_t/C_0) = -k \times t$ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของแอนโธไซยานินในน้ำลูกหม่อนมีค่าสูงขึ้น มีผลทำให้ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$)

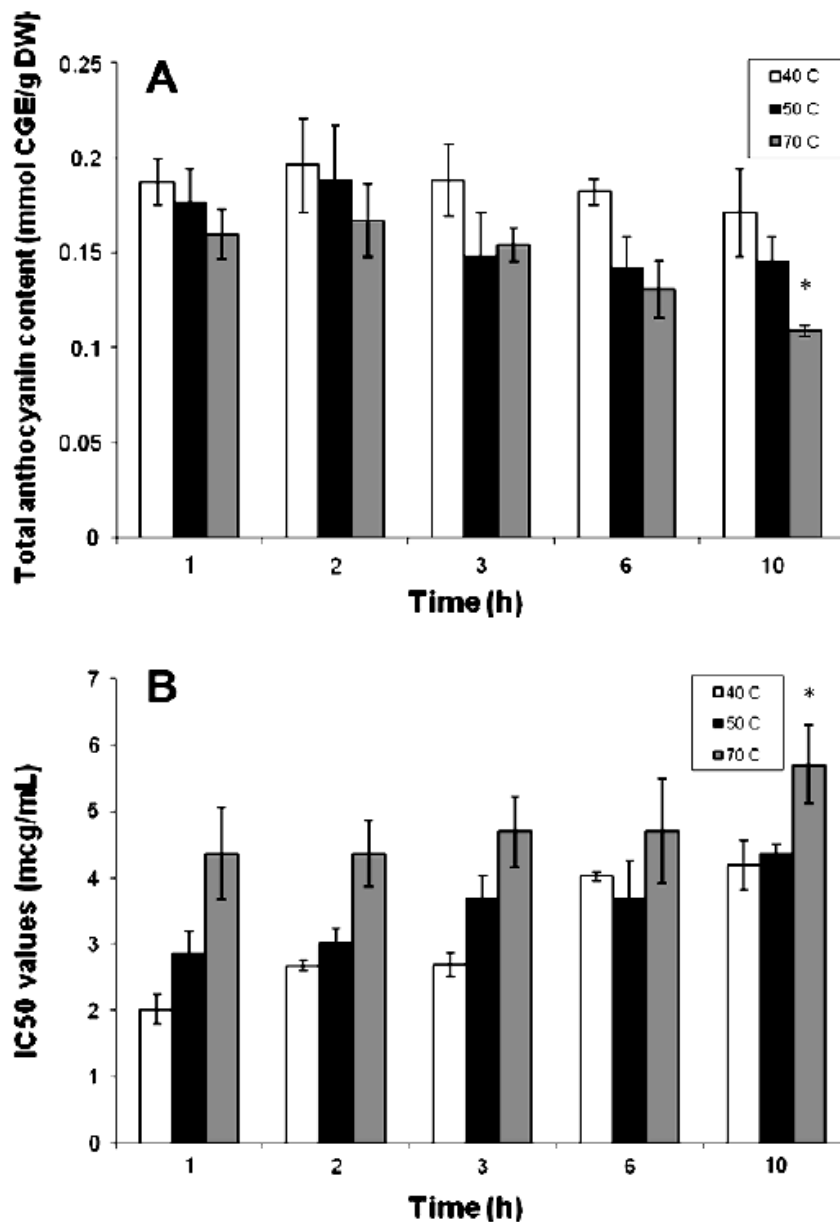
ลดลงและค่าพีเอชที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน พบว่าเมื่อพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น แอนโทไซยานินในน้ำลูกหม่อนมีความคงตัวลดลง เกิดความคงตัวสูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.5 รองมา 4.0, 6.0 และ 8.0 ตามลำดับ และได้เลือกน้ำลูกหม่อนที่สภาวะค่าพีเอช 2.5 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 องศาเซลเซียส พบว่าแอนโทไซยานินมีค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) เท่ากับ 13.7, 8.4 และ 4.6 ชั่วโมงตามลำดับ ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การเสื่อมสลายของมอนอเมอร์แอนโทไซยานินในน้ำลูกหม่อนที่อุณหภูมิต่างกัน (ที่พีเอช 2.5) [มนต์วดี และศศิธร, 2551]

Aramwit, P. และคณะ (2010) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส และแสงฟลูออเรสเซนซ์ (220 V, 50 Hz และ 0.37 A) ต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในน้ำผลหม่อนสปีชีส์ *Morus alba L.* สายพันธุ์เชียงใหม่ของผลหม่อน 3 สี คือ ม่วง ม่วงแดง และแดง พบว่าผลหม่อนสีม่วงจะมีปริมาณแอนโทไซยานิน การต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับผลหม่อนสีม่วงแดงและผลหม่อนสีแดง และพบว่าสารสกัดหม่อนที่เก็บอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง มีปริมาณแอนโทไซยานินและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) โดยแสดงจากค่า IC_{50} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังได้หาปริมาณน้ำตาล สารเบตาแคโรทีน กรดแอสคอร์บิก และสีของผลหม่อนทั้ง 3 สี นอกจากวิธีสารสกัดผลหม่อนที่ได้รับแสงฟลูออเรสเซนซ์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินและการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง

อย่างมีนัยสำคัญ โดยที่สารเบตาแคโรทีน กรดแอสคอบิก มีปริมาณที่ลดลงด้วย แสดงให้เห็นว่า ทั้งอุณหภูมิและแสงมีผลทำให้ความคงตัวของสารแอนโทไซยานินลดต่ำลงได้



* indicates significant differences at $p < 0.05$.

รูปที่ 2.8 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (A) และค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH 50% (IC_{50} , B) ของน้ำผลหม่อนสีม่วงหลังจากเก็บไว้ในสภาวะที่อุณหภูมิต่างกัน [Aramwit, P. และคณะ, 2010]

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารประกอบที่สามารถถูกออกซิไดส์ได้ง่ายจะพบว่าเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์หรือสารต้านอนุมูลอิสระหมายถึงสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระและป้องกันไม่ให้เกิดการตั้งอิเล็คตรอนตั้งแต่ตำแหน่งแรกโดยทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระแล้วทำให้อนุมูลอิสระหมดความสามารถที่ไปทำลายหรือเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเซลล์ จากงานวิจัยมากมายพบว่าองค์ประกอบแอนโทไซยานินและสารแอนติออกซิแดนซ์จะสร้างการป้องกันให้ผักและผลไม้ต่อการเสื่อม และการเว็กรัง สารที่มีสมบัติเป็นสาร phytochemical จะแสดงควมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเช่น สารประกอบฟีนอลลิก (ฟลาโวนอยด์) อนุพันธ์คลอโรฟิล โทโคฟีโนล แคโรทีนอยด์ และกรดแอสคอร์บิก พบว่าแอนโทไซยานินและแอนโทไซยานิน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซีและวิตามินอี เนื่องจากสารประกอบนี้สามารถจับกับอนุมูลอิสระโดยให้อิเล็คตรอนของอะตอมไฮโดรเจนที่เกาะอยู่กับฟีนอลลิก และพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งในผลแบล็คเบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ แดง ราสเบอร์รี่ดำ และสตอเบอรี่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นโดยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [Castaneda-Ovando, A. และคณะ, 2009]

2.6 ฤทธิ์ของแอนโทไซยานินต่อเซลล์

Kang, S.Y. และคณะ (2003) พบว่าแอนโทไซยานินจาก Tart cherry มีฤทธิ์สามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ จากผลการทดลองแอนโทไซยานินและไซยานิดินสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT 29 และ HCT 116 ได้ที่ค่า IC₅₀ ของแอนโทไซยานินและไซยานิดินเท่ากับ 780 และ 63 ไมโครโมลลาร์ สำหรับการยับยั้งเซลล์ HT 29 และ 285 กับ 85 ไมโครโมลลาร์สำหรับการยับยั้งเซลล์ HCT 116

Shin, P.H. และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของแอนโทไซยานินในรูปอนุพันธ์ของอะไกลโคน 5 ชนิดไซยานิดิน เดลฟินิดิน มัลวิดิน ฟิลาโรโกนิน และพีโอนินต่อการต้านการเกิดมะเร็งและอนุพันธ์ไกลโคไซด์ 4 ชนิดคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ มัลวิดิน-3-กลูโคไซด์ ฟิลาโรโกนิน-3-กลูโคไซด์และพีโอนิน-3-กลูโคไซด์ที่มีผลต่อเซลล์และการชักนำให้เซลล์เกิดตาย (apoptosis) ในเซลล์ human gastric adenocarcinoma AGS พบว่ามัลวิดินความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลลาร์มีผลทำให้การแสดงออกของสัญญาณการตาย คือ p38 kinase สูงขึ้น และสามารถยับยั้ง ERK activity ซึ่งเป็นกิจกรรมในการแบ่งเซลล์มะเร็ง

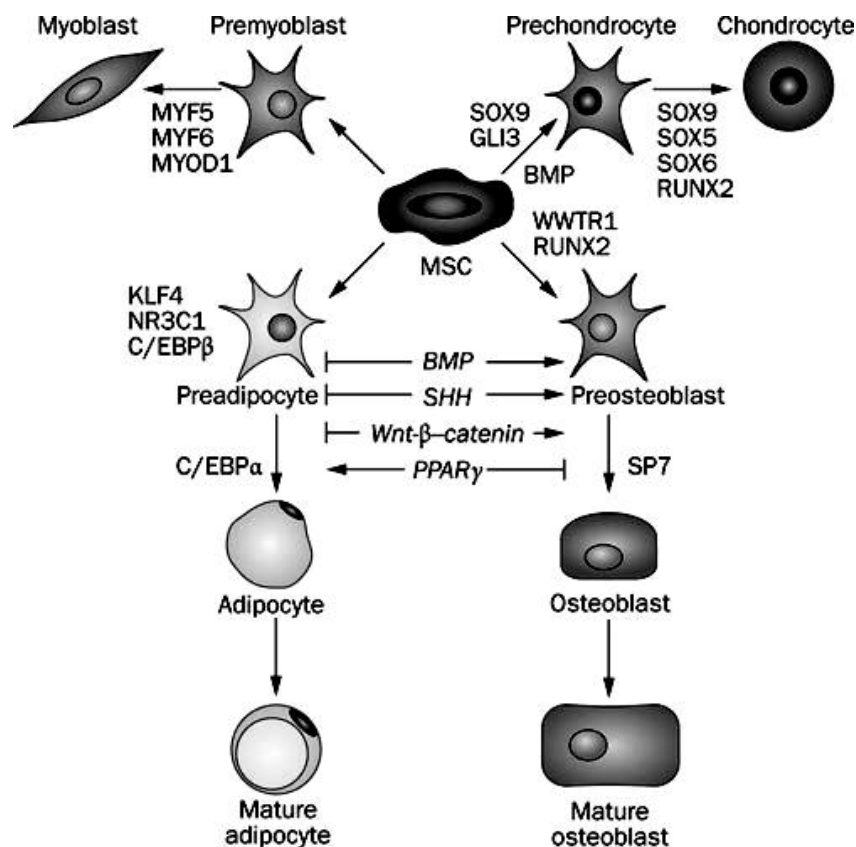
Netzel, M. และคณะ (2007) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเมตาบอลิซึมของแอนโทไซยานินในแครอทดำจากการทดลอง พบว่าแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากแครอทดำมีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ HT-29

colorectal adenocarcinoma ที่ความเข้มข้น 0.5-1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเซลล์ HT-60 promyelocytic leukaemia ที่ความเข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและการศึกษาในเมตาบอลิซึมของแอนโทไซยานินโดยแอนโทไซยานินจะมีโครงสร้างสองแบบคือ acylated และ nonacylated ซึ่งโครงสร้างแบบ acylated จะมีความคงตัวมากกว่า nonacylated จึงทำให้โครงสร้างที่เป็น nonacylated มีการนำกลับมากับปัสสาวะของคนมากกว่าโครงสร้างที่เป็น acylated ถึง 8 เท่า

2.7 เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow-derived mesenchymal stem cell, MSC)

Mesenchymal stem cells คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) ซึ่งสามารถสกัดแยกออกมาจากไขกระดูก (bone marrow) เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) และเลือดสายสะดือ (cord blood) เป็นต้น สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากและสามารถเปลี่ยนแปลง (differentiation) เป็นเซลล์สายพันธุ์ต่างๆ ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันดังรูปที่ 2.9 เช่น เซลล์กระดูก (osteoblast) เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) เซลล์ไขมัน (adipocyte) และเซลล์กล้ามเนื้อ (myocyte) [Grigoriadis, M.L และคณะ, 1988] และเจริญพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่เหมาะสมได้เช่น กระดูก (bone) กระดูกอ่อน (cartilage) กล้ามเนื้อ (muscle) เอ็น (ligament) และไขมัน (adipose) เนื่องจากเซลล์ MSC ถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ง่ายในหลอดทดลอง จึงนิยมนำมาใช้ในการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยเฉพาะวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกและกล้ามเนื้อ ในปี 1995 Lennon และคณะ แยก MSC จากไขกระดูก Fisher F-344 rat อายุ 2-4 เดือน [Lennon, D.P. และคณะ, 1995] เซลล์ MSC เมื่อนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์ยึดเกาะบนจานเลี้ยงเซลล์และเริ่มเจริญเติบโตรวมกันเป็นกลุ่มหรือเรียกว่า fibroblastic-like cell cluster (fibroblast colony forming units: CFU-F) การควบคุมให้ MSC เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ สามารถทำได้โดยการเติมสารอาหารต่างๆ เช่น growth factor หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ MSC เป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ มีรายงานการวิจัยว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของสารจำพวก osteo-inductive agents เช่น β -glycerophosphate, L-Ascorbic acid, calcium hexose monophosphate และ dexamethasone [Kim, H.J. และคณะ, 2005] มีผลดีต่อการเกิดกระดูกและกิจกรรมของ ALP เกิดขึ้นสูงสุดในช่วงสองสัปดาห์แรก ของการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูก [Kim, H.J. และคณะ, 2005] แต่สำหรับ dexamethasone เป็นสารกลุ่ม glucocorticoid ชนิดหนึ่งสามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการเกิด osteogenic differentiation ได้โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะเกิดการยับยั้ง osteogenic differentiation แต่ทำให้เกิด adipogenic

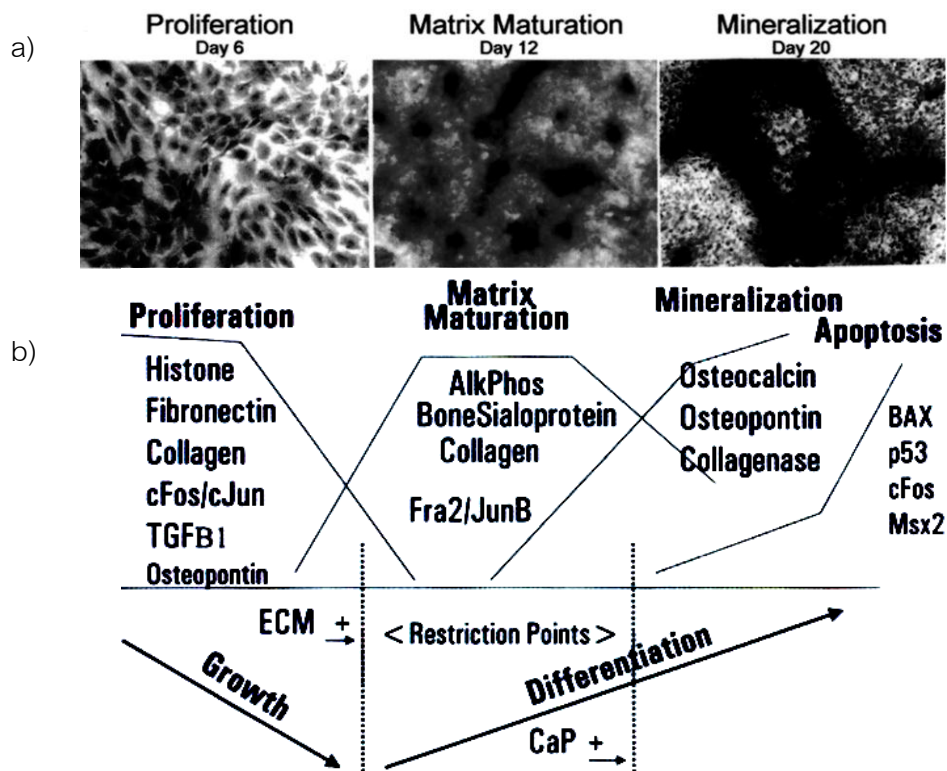
differentiation ในขณะที่ใช้ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นให้เกิด osteogenic differentiation [Nichoas, D.E. และคณะ, 2006] นอกจากนี้การดัดแปลงหรือปรับปรุงโครงสร้างเซลล์ให้มีสมบัติเหมาะสมกับ MSC เช่น สมบัติทางเคมีของพื้นผิวโครงสร้างเซลล์ ซึ่งสามารถควบคุมพฤติกรรมของเซลล์ การยึดเกาะ รูปร่างและการเปลี่ยนแปลงหน้าที่เป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ โดยพื้นผิวของโครงสร้างเซลล์ควรประกอบด้วยหมู่ methyl (-CH₃), hydroxyl (-OH), carboxyl (-COOH), amino (-NH₂) และ silane (-SH) ซึ่งหมู่เหล่านี้พบในระบบชีวภาพ ช่วยสามารถกระตุ้นให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (osteoblasts) นอกจากนี้หมู่ -OH และ -COOH ช่วยให้ MSC เปลี่ยนแปลงเป็น chondrocytes [Curran และคณะ 2006]



รูปที่ 2.9 ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ

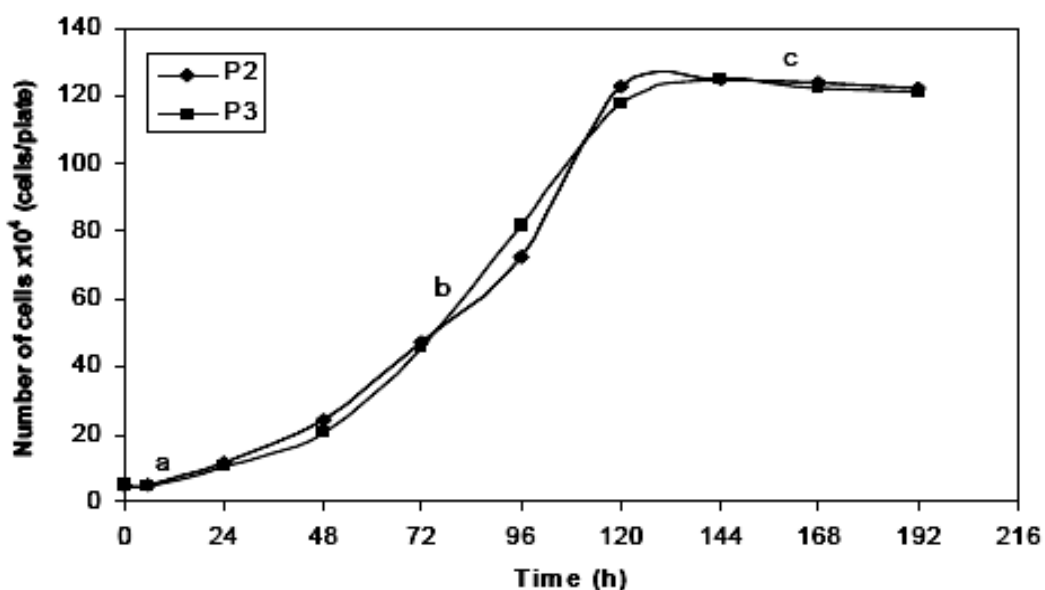
[www.nature.com/nrrheum/journal/]

การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรกการเพิ่มจำนวน (proliferation) เป็นขั้นตอนของเซลล์เกิดการแบ่งตัวและขยายจำนวนอยู่ในระยะเวลาประมาณ 6 วัน ในช่วงนี้จะมีการแสดงออกของยีน histone, fibronectin, collagen cFos/cJun, TGFB1 และ osteopontin ขั้นตอนที่สอง matrix Maturation เซลล์จะเริ่มหยุดการแบ่งตัวทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงและเริ่มสร้าง extracellular matrix (ECM) เกิดขึ้นภายใน 12 วัน โดยจะเกิดการแสดงออกของเอนไซม์ alkaline phosphatase, Bone sialprotein, collagen, Fra2/JunB ซึ่งในขั้นตอนนี้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (differentiation) และขั้นตอนสุดท้าย เซลล์เริ่มสร้างแร่ธาตุ (mineralization) เช่น ถ้าเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกจะเริ่มสร้างแคลเซียมขึ้นมาในขั้นตอนนี้ใน 20 วัน การแสดงออกของยีนในขั้นตอนสุดท้ายนี้ได้แก่ osteocalcin, osteopontin และ collagenase ในการเจริญพัฒนามาเป็นขั้นตอนสุดท้ายนี้เซลล์จะเกิดการตาย (apoptosis) เพื่อเตรียมการสร้างแร่แคลเซียมใน matrix ขึ้น ดังแสดงรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในระดับห้องปฏิบัติการ (a) การย้อมสีด้วย toluidine blue (ซ้าย), alkaline phosphatase (กลาง), von Kossa silver (ขวา) (b) ปริมาณของสารสำคัญและยีนที่เกิดขึ้นในขั้นตอนต่างๆ [Lian, J.B. และ Stein, G.S., 2001]

การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์วิสต้า พบว่าเซลล์ต้นกำเนิด MSC ที่แยกจากไขกระดูกหนูพันธุ์วิสตันั้นใน passage ที่ 2 และ 3 มีอัตราการแบ่งตัว 0.038 รุ่นต่อชั่วโมง เวลาในการแบ่งตัวเป็นทวีคูณเป็น 25.99 และ 26.33 ชั่วโมงตามลำดับ ญัฐพล วชิรโรจน์(2552) ได้แสดงจลศาสตร์ของการเจริญเติบโตดังรูปที่ 2.11

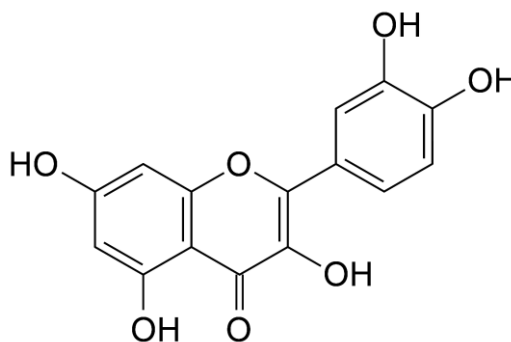


รูปที่ 2.11 จลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์วิสต้า (Mesenchymal Stem Cells, MSC) passage ที่ 2 และ 3 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM, 15% FBS ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ บนจานเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนพื้นที่ 2.8×10^4 มม². กราฟแสดง a คือ lag phase, b คือ exponential phase และ c คือ stationary phase [ญัฐพล วชิรโรจน์, 2552]

นอกจากนั้นได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ MSC บนจานเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีนโดยมีการเปรียบเทียบเลี้ยงในอาหารปกติ (Normal Medium, NM) และอาหารที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (Osteogenic Medium, OM) ใน passage 2 และ 3 พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน OM เหนียวกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) มากกว่าเซลล์เลี้ยงใน NM ทุกช่วงเวลา แต่เซลล์ที่เลี้ยงใน NM จะมีการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าใน OM ซึ่งเอนไซม์ ALP ที่เซลล์สร้างขึ้นได้แสดงสัญญาณการเปลี่ยนเป็นกระดูกที่เกิดขึ้นในช่วงแรก

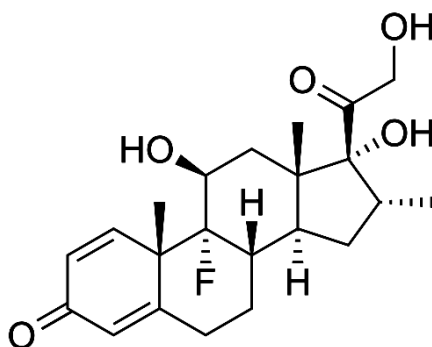
2.8 การใช้สารกระตุ้นในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

Kim, Y.J. และคณะ (2006) รายงานวิจัยว่า สาร quercetin (รูปที่ 2.12) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต และช่วยให้การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ human Mesencrymal Stem Cells (hMSC) โดยเกิดการสร้างแคลเซียมสะสมที่สูงสุดของการทดสอบด้วย quercetin ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ตรวจสอบด้วยการย้อมสี Alizarin red S มีปริมาณการสะสมแคลเซียมมากกว่าการทดสอบด้วยสาร chrysin และ kaempferol เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เช่นกัน นอกจากนี้ยังตรวจสอบการแสดงออกของยีน BMP2, alkaline phosphatase, Runx2, osteopontin พบว่าหลังจาก 3 วัน มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงขึ้นและเมื่อทดสอบต่อเนื่องหลังจาก 6 วัน การแสดงออกของยีน alkaline phosphatase เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าการใช้สาร quercetin มีส่วนช่วยกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้



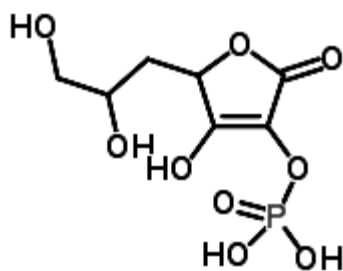
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของ quercetin [<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Quercetin.png>]

Ito, S. และคณะ (2007) ได้ศึกษาการกระตุ้นของเซลล์ต้นกำเนิด ROB-C26 เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก โดยใช้สาร dexamethasone (รูปที่ 2.13) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม glucocorticoids พบว่า dexamethasone สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเซลล์กระดูกได้ แบบ dose dependent และ time dependent ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในการเกิด osteogenic differentiation คือ Runx2, Dlx5, BSP และ OC โดยพบว่า dexamethasone ความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ มีผลต่อการแสดงออกของยีนสูงสุด นอกจากนี้ยังได้มีการย้อมสีเซลล์หาปริมาณการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์ ALP พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร dexamethasone สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ALP ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบที่ไม่ได้เติม dexamethasone



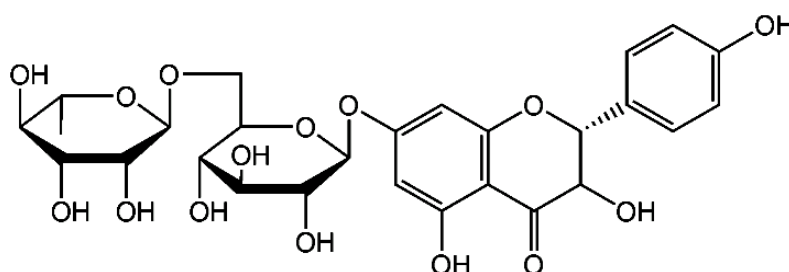
รูปที่ 2.13 โครงสร้างของ dexamethasone [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dexamethasone_structure.svg]

Choi, K.M. และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของกรดแอสคอร์บิก หรือ L-ascorbate-2-phosphate (Asc-2-P) (รูปที่ 2.14) ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครโมลลาร์ พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ MSCs สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้น Asc-2-P ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของ Asc-2-P 250 ไมโครโมลลาร์จะทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุดในขณะที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลลาร์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกโดยมีการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 21 วัน นำมาวิเคราะห์การย้อมสีของแคลเซียมสะสมที่เซลล์สร้างขึ้นด้วยเทคนิคการย้อมสี Von Kossa พบว่าการทดสอบเซลล์ด้วยอาหารที่มี Asc-2-P ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครโมลลาร์ทำให้ปริมาณการสะสมแคลเซียมสูงขึ้นเมื่อเทียบกับตัวควบคุมนอกจากนี้ยังได้มีการวิเคราะห์ปริมาณการสร้างคอลลาเจนและ GAG ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในการสร้าง ECM ในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ โดยที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลลาร์มีผลทำให้ปริมาณการสร้างคอลลาเจนต่อเซลล์สูงอย่างมีนัยสำคัญและ GAG ไม่แตกต่างกับตัวควบคุมซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะมีผลทำให้การสร้าง GAG ลดลงได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับการเลือกใช้ความเข้มข้นของ Asc-2-P สำคัญต่อการสร้างคอลลาเจนและ GAG ให้มีปริมาณสูงได้



รูปที่ 2.14 โครงสร้างของ L-ascorbate-2-phosphate [<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21613248.html>]

Zhang, P. และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของสาร naringin (รูปที่ 2.15) ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ human bone mesenchymal stem cell (hBMSCs) พบว่าสาร naringin มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ hBMSCs ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เซลล์ที่ทดสอบด้วย naringin ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณ ALP activity สูงขึ้นแบบ dose dependent ตรวจสอบด้วยการย้อมสี ALP และยังได้มีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ALP, osteocalcin, collagen I และ osteopontin ได้ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นเมื่อเทียบกับตัวควบคุม และเมื่อทำการเลี้ยงต่อเนื่องจนถึง 28 วัน เซลล์มีการสร้างแคลเซียมสะสมเพิ่มสูงขึ้นซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคการย้อมสี Von Kossa โดยเฉพาะการทดสอบด้วยความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณแคลเซียมสูงมากอย่างมีนัยสำคัญ



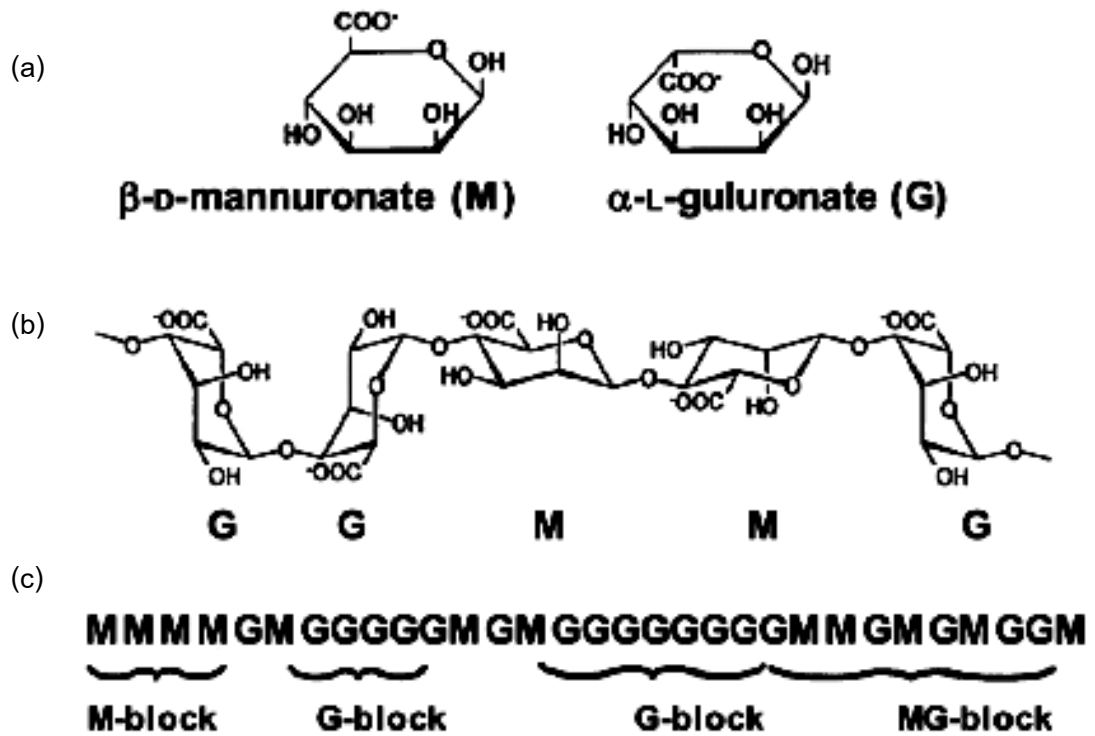
รูปที่ 2.15 โครงสร้างของ naringin [<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Naringin.png>]

Zhang, J.F. และคณะ (2010) สกัดสารฟลาโวนอยด์ที่ได้จาก สมุนไพรจีน *Herba Epimedii* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบบ dose dependent ด้วยการทดสอบความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และสามารถช่วยสนับสนุนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ hMSC ในการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์สร้างแคลเซียมได้ วิเคราะห์โดยการย้อมสี Alizarin red S และมีผลให้ ALP activity สูงสุดในวันที่ 12 และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการเลี้ยงใน osteogenic medium และปริมาณการแสดงออกของยีน mRNA ของ OPN และ OCN สูงขึ้น แสดงถึงการเกิด osteogenic differentiation และนอกจากนี้การแสดงออกของโปรตีน BMP-2, BMP-4, Runx2, β -catenin และ cyclinD1 ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกมีปริมาณสูงขึ้นด้วยเช่นกัน

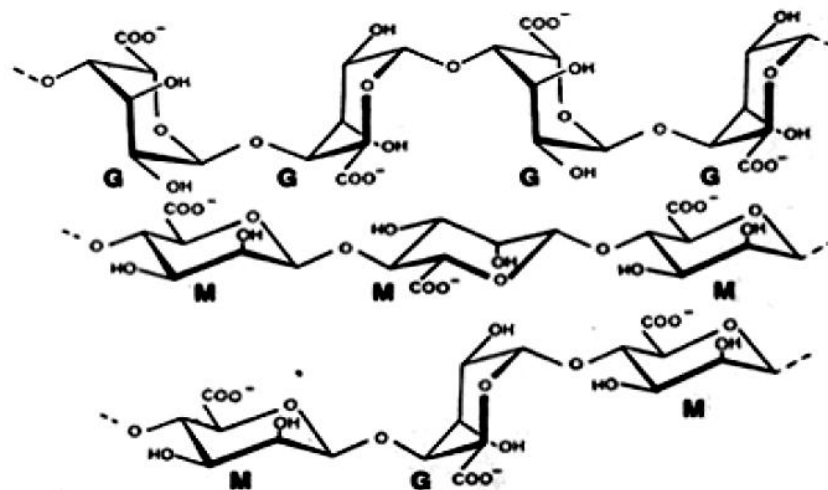
2.9 อัลจิเนต (Alginate)

อัลจิเนตเป็นสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) มีโครงสร้างเป็น glycuronoglycan สายยาวเป็นพอลิเมอร์สายตรง ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิดดังรูปที่ 2.16 คือ D-mannuronic acid (M-blocks) และ L-gluronic acid (G-blocks) ซึ่งเป็น C-5 epimer มีโครงสร้างคล้ายกันแตกต่างกันตรงตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิลซึ่งส่งผลให้โครงสร้างแบบ block มีความแตกต่างกันมากพอลิเมอร์ของอัลจิเนตเกิดการเชื่อมต่อของมอนอเมอร์ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (1,4) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของโมเลกุลหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของอีกโมเลกุลหนึ่งซึ่งทำให้เกิดสายพอลิเมอร์ได้ 3 ชนิด ดังรูปที่ 2.17

1. M blocks ประกอบด้วย D-mannuronic acid เพียงอย่างเดียวซึ่งเกิดจาก equatorial group ทั้ง C1 และ C4 ทำให้สายพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรงคล้ายริบบิ้น
2. G blocks ประกอบด้วย L-gluronic acid เพียงอย่างเดียวซึ่งเกิดจาก axial group ทั้ง C1 และ C4 ทำให้สายพอลิเมอร์มีลักษณะคดไปมาเหมือนฟันเลื่อย ลักษณะเช่นนี้มีความสำคัญต่อการเกิดเจล
3. MG blocks ประกอบด้วย D-mannuronic acid และ L-gluronic acid



รูปที่ 2.16 (a) มอนอเมอร์ M และ G ของอัลจิเนต (b) โครงสร้างของอัลจิเนต (c) ตัวอย่างลำดับการจัดเรียงของมอนอเมอร์ในสายโซ่อัลจิเนต [Thu, B. และคณะ, 1996] [Draget, K.I. และ Taylor, C., 2011]



รูปที่ 2.17 ชนิดของ block ในอัลจิเนตรูปบน: G-blocks รูปกลาง: M-block รูปล่าง: MG-blocks [Imeson, A., 1992]

ปริมาณและการกระจายตัวของแต่ละมอนอเมอร์ขึ้นกับชนิดพันธุ์ ชั้น และอายุของสาหร่ายจากการแยกมาเป็นอัลจินเตต [Jeanie, L. และคณะ, 2004] องค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของ D-mannuronic acid และ L-gluronic acid ในสายพอลิเมอร์มีผลต่อลักษณะและสมบัติของ อัลจินเตตเช่น ความพรุน การบวมน้ำ ความคงตัว และความแข็งแรงของเจล [Thu, B. และคณะ, 1996] สมบัติทางกายภาพของอัลจินเตตขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดคือ ในการเกิดเจลถ้ามี G-blocks มากจะทำให้มีความแข็งแรงของเจลสูง เจลที่ได้มีความแข็ง ไม่มีความยืดหยุ่น มีความคงทนต่อความร้อนได้ดี แต่เกิดการสูญเสียได้ง่าย จึงไม่เหมาะกับงานแช่แข็งผลิตภัณฑ์ ขณะที่อัลจินเตตที่มี M-blocks จะให้เจลที่มีความอ่อนนุ่ม มีความยืดหยุ่น ไม่ทนความร้อน เหมาะกับผลิตภัณฑ์แช่แข็งเพราะทนต่อการ freeze thaw ได้ดี [สายสนม ประดิษฐ์ดวง, 2530] ส่วนอัลจินเตตที่ละลายน้ำได้ดีจะมีปริมาณ MG blocks มาก การนำอัลจินเตตไปใช้ในอุตสาหกรรมนั้นต้องพิจารณาคุณสมบัติของอัลจินเตตและองค์ประกอบของกรดยูโรนิก จากการที่อัตราส่วนของกรดสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของสาหร่ายนั้นจะพบ G-blocks มากในบริเวณที่สาหร่ายต้องการความแข็งแรง ได้แก่ ส่วนคล้ายลำต้น และพบ M-blocks มากบริเวณที่สาหร่ายต้องการความยืดหยุ่น ได้แก่ ส่วนที่คล้ายใบ [Annison, G.N. และคณะ, 1983]

อัลจินเตตมีสมบัติสามารถละลายน้ำได้ เข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจึงถูกนำไปประยุกต์ใช้สำหรับงานด้านวัสดุชีวภาพ (biomaterial) ในงานวิจัยที่หลากหลายได้แก่ ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ (cell immobilization) ระบบนำส่งยา (drug delivery) ระบบควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญ (controlled release) การตรึงพวกจุลินทรีย์ (immobilization of micro-organism) อุตสาหกรรมอาหาร [Ji และคณะ, 2011] และงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) กล้ามเนื้อลายหรือนำไปใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับ ข้อต่อ กระดูก กล้ามเนื้อกระดูก ซึ่งข้อมูลทางด้านสมบัติเชิงกลของอัลจินเตตในด้านแรงกดและแรงเฉือนค่าความเค้นแรงกดของไฮโดรเจลมีช่วงระหว่างน้อยกว่า 1 กิโลปาสคาล ถึงมากกว่า 1000 กิโลปาสคาล ค่าโมดูลัสของแรงเฉือนมีค่าในช่วง 0.02 – 40 กิโลปาสคาล ในทางการค้าสามารถแบ่งอัลจินเตตได้เป็น 3 เกรด คือ ความหนืดสูง ความหนืดปานกลาง และความหนืดต่ำ ดังตารางที่ 2.5 ซึ่งอัลจินเตตเกรดความหนืดสูงความเข้มข้นร้อยละ 1 จะมีความหนืดเท่ากับ 170 เซนติพอยด์, ความหนืดปานกลางความเข้มข้นร้อยละ 5 มีความหนืด 230 เซนติพอยด์ และความหนืดต่ำความเข้มข้นร้อยละ 5 มีความหนืด 138 เซนติพอยด์ [Toti, U.S. และ Aminabhavi, T.M., 2004] การสกัดอัลจินเตตโดยมากสกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาลจะมีปริมาณ guluronic acid สูงส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงกลของอัลจินเตตเจล แต่สามารถแยกอัลจินเตตที่มีปริมาณ

mannuronic acid สูงได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ได้จากการสกัดมาจากแบคทีเรีย [Draget, K.I. และ Taylor, C., 2011] ซึ่งสมบัติเชิงกลนี้จะมีผลต่อคุณสมบัติของพอลิเมอร์ เช่น การเชื่อมขวาง สภาพแวดล้อมการเจล และสภาพแวดล้อมของการเก็บ [Jeanie, L. และคณะ, 2004]

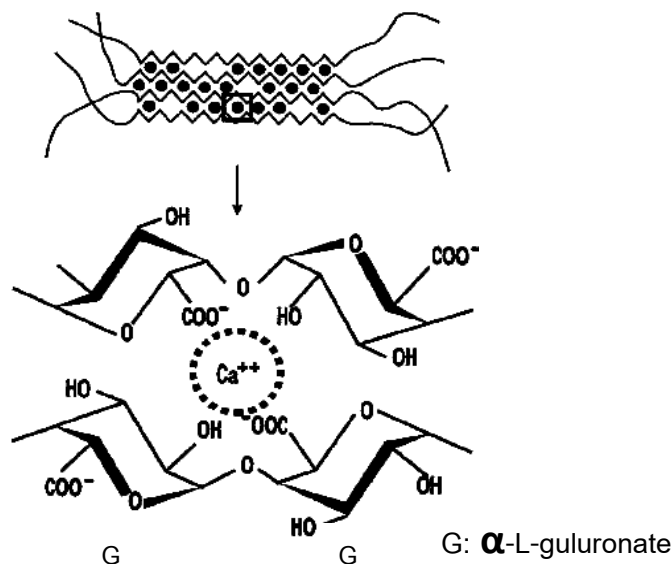
ตารางที่ 2.5 สมบัติเฉพาะของไฮเดียมอัลจินตจากบริษัท Sigma ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Macrocystis pyrifera* [Sigma Chemical Co., 1998]

ตัวอย่าง	M/G ratio	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย
ไฮเดียมอัลจินตความหนืดต่ำ (A2158)	1.56	$1.2-8.0 \times 10^4$
ไฮเดียมอัลจินตความหนืดปานกลาง (A2033)	1.56	$0.8-1.2 \times 10^5$
ไฮเดียมอัลจินตความหนืดสูง (A7128)	1.56	$1.2-1.9 \times 10^5$

การเกิดเจลของอัลจินต

อัลจินตสามารถเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างให้อยู่ในรูปของไฮโดรเจลโดยการสร้างพันธะอิออนนิคแบบไม่ถาวรเพื่อเชื่อมขวาง (crosslink) อัลจินตกับไอออนประจุบวกสอง (divalent cations) เช่น Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} และ Mn^{2+} [Mofidi, N. และคณะ, 2000] ประจุบวกสองต่างชนิดกันจะมีผลต่อการเกิดเจลของอัลจินตได้ต่างกัน อย่างไรก็ตาม Mg^{2+} ไม่ทำให้เกิดเจล ซึ่งได้มีการรายงานว่าชนิดของไอออนประจุบวกสองที่นำมาใช้คือ Ba^{2+} และ Ca^{2+} [Yoo, I.K. และคณะ, 1996] โดยที่ไอออนชนิดอื่นที่ไม่นำมาใช้เพราะมีความเป็นพิษเนื่องจากเป็นไอออนของโลหะหนัก การเกิดเจลของอัลจินตพอลิเมอร์ส่วนใหญ่จะทำได้โดยการแลกเปลี่ยนไอออนกับไฮเดียมไอออนจาก G-blocks กับไอออนประจุบวกสองการเรียงตัวเป็นชั้นๆ อย่างเป็นระเบียบของ G-blocks ทำให้เกิดลักษณะโครงสร้างแบบกล่องไข่ (egg-box model) ดังรูปที่ 2.18 ขนาดรูพรุนและคุณสมบัติทางกลของเจลขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของสายโซ่และปริมาณของ G-blocks ในอัลจินตและไอออนประจุบวกหนึ่ง (monovalent cations) บางชนิด เช่น Na^+ จะช่วยให้สารละลายอัลจินตเกิดความหนืดแต่ไม่ทำให้เกิดไอออนเจล อัลจินตที่ไปเชื่อมต่อกับไอออนประจุบวกสองมีผลช่วยให้เจล (ความยืดหยุ่นของร่างแหในเทอมของค่ามอดูลัสของยัง) โดยมีลำดับความแข็งแรงของการเกิดเจลดังนี้ $\text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ และอัลจินตสามารถเกิดเป็นเจลกรด (acid gel) ที่พีเอชต่ำกว่าค่า pKa ของ guronic acid ได้ความคงตัวเกิดจากระหว่างโมเลกุลของพันธะไฮโดรเจนจากโครงสร้าง

ของอัลจิเนตที่ประกอบด้วยหมู่ของ $-\text{COO}^-$ และ $-\text{COOH}$ ตลอดสายโซ่โมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นโดยขึ้นกับ พีเอช หมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) [Ji และคณะ, 2011]



รูปที่ 2.18 ลักษณะการจับของแคลเซียมไอออนกับอัลจิเนต [Dupuis, G. และคณะ, 2006]

2.10 เทคโนโลยีสำหรับการบรรจุหรือห่อหุ้มสารสำคัญ (Microencapsulation)

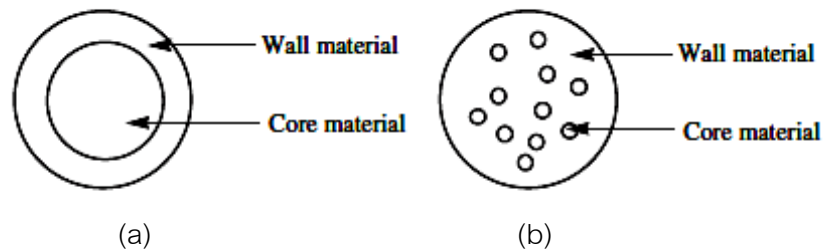
การผลิตอนุภาคขนาดไมโครเป็นเทคโนโลยีสำหรับการนำวัสดุที่เป็นของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ถูกห่อหุ้มให้อยู่ในรูปของแคปซูลขนาดเล็กเพื่อเป็นตัวป้องกันหรือปลดปล่อยสารสำคัญ ภายในออกมาเมื่อเราต้องการ ซึ่งสามารถทำได้จากหลายวิธีดังนี้ การพ่นแห้ง (spray drying) การเคลือบสารที่ไม่ทนต่อความร้อน (spray cooling หรือ spray chilling) การฉีด(extrusion) กระบวนการใช้เคลือบอนุภาคของแข็ง(fluidized bed) กระบวนการที่อาศัยหลักการทางเคมี (coacervation) ไลโปโซม (liposomes) และการผลิตเม็ดอัลจิเนต (alginate beads) เหตุผลของการใช้เทคนิคการห่อหุ้มสารสำคัญ คือ

1. เนื่องจากสารบางชนิดมีความไวต่อสภาวะแวดล้อม ภายนอกเช่น แสงแดด ออกซิเจน น้ำ ทำให้มีคุณสมบัติเปลี่ยนไป
2. เนื่องจากสารบางชนิดระเหยได้ง่าย หากไม่มีแคปซูลมาป้องกันอาจจะหายหมด
3. ช่วยให้ง่ายต่อการนำไปใช้งานเช่น การเปลี่ยนสารที่เป็นของเหลวให้อยู่ในรูปแคปซูลที่เป็นของแข็ง ง่ายแก่การนำไปผสมกับสารอื่นและไม่จับตัวเป็นก้อน

4. สามารถควบคุมการทำงานของสารให้มีการปลดปล่อยสารในบริเวณที่เหมาะสมและยังลดความสิ้นเปลืองในการใช้สาร

ตามปกติแล้วส่วนของแคปซูลจะประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนหลักๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.19 คือสารสำคัญที่บรรจุอยู่ภายในแคปซูลซึ่งเรียกว่า คอร์ (core) และผนังที่ห่อหุ้มซึ่งอยู่รอบนอกสารสำคัญเรียกว่า วอลล์ (wall) หรือ เซลล์ (shell) ส่วนประกอบและรูปแบบของ microencapsule มี 2 รูปแบบคือ

1. Core-shell-encapsulation คือ สารที่ใช้เป็นคอร์ทั้งหมดถูกห่อหุ้มด้วยเซลล์
2. Matrix encapsulation คือ สารที่ใช้เป็นคอร์กระจายตัวอยู่ภายในสารที่เป็นเซลล์



รูปที่ 2.19 รูปแบบการห่อหุ้ม: (a) core-shell encapsulation (b) matrix encapsulation

[Fang, Z. และ Bhandari, B., 2010]

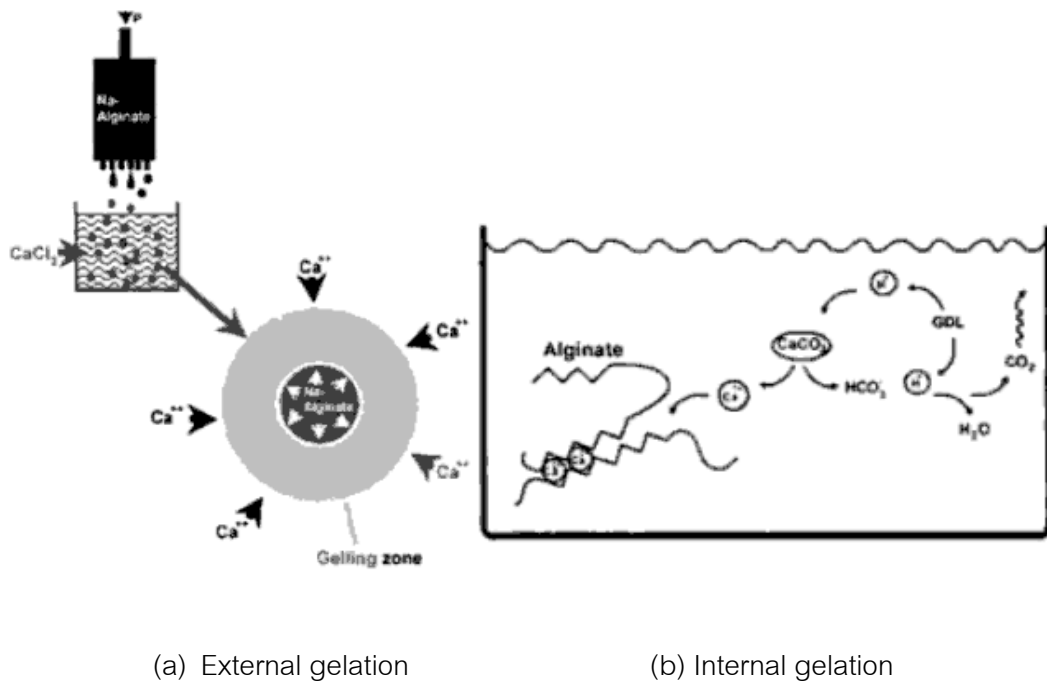
ตัวอย่างการนำเทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูลมาใช้ประโยชน์ดังนี้ [เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล, 2009]

- อุตสาหกรรมสิ่งทอ มีการผลิตไมโครเอนแคปซูลของสารที่มีการเปลี่ยนสถานะเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดยเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขึ้นสารดังกล่าวที่แทรกอยู่ในใยผ้าจะละลาย ทำให้อากาศผ่านเข้าออกได้ ทำให้ผู้สวมใส่รู้สึกเย็นสบาย แต่เมื่ออากาศเย็นลง สารดังกล่าวจะแข็งตัวปิดกั้นช่องว่างระหว่างเส้นใยทำให้ผู้สวมใส่รู้สึกอบอุ่นขึ้น
- อุตสาหกรรมเกษตร สามารถผลิตแคปซูลของยาฆ่าแมลง ที่มีการปลดปล่อยสารทีละน้อย แต่ใช้ระยะเวลาเวลานาน ซึ่งช่วยให้เกษตรกรไม่ต้องฉีดพ่นยาฆ่าแมลงบ่อยครั้ง ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและยังเป็นการทำลายสภาพแวดล้อมอันเนื่องมาจากสารพิษที่ตกค้างอีกด้วย

- อุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสารบางชนิดเช่น สารให้กลิ่นรส มีการระเหยได้ง่าย และอาจสูญเสียคุณสมบัติในระหว่างกระบวนการผลิต นอกจากนี้วิตามินหลายชนิด มีความไวต่อออกซิเจนและแสงสว่างทำให้สูญเสียไปในระหว่างที่ปรุงหรือถนอมอาหาร จึงมีการนำเทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูลขึ้น มาใช้ในอาหารหลายชนิด อาทิ หมากฝรั่ง ซึ่งต้องการให้มีรสชาติอยู่นานขึ้นขณะที่เคี้ยว
- อุตสาหกรรมยา โดยแคปซูลยาจะมีการปลดปล่อย ตัวยาออกมาทำงานได้ยาวนานขึ้น หรือตรงบริเวณอวัยวะเป้าหมายที่ต้องการให้ออกฤทธิ์ เช่น ยาแอสไพริน ถ้าหากมีการให้ ยาครั้งเดียวในปริมาณที่มากนั้น อาจทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารและมีเลือดออกได้ ซึ่งหากใช้เทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูลจะทำให้ตัวยาค่อยๆ ถูกปล่อยออกมาช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้

2.11 การผลิตอนุภาคขนาดไมโครด้วยการผลิตเม็ดอัลจิเนต

เม็ดอัลจิเนต (alginate beads) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ยิมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในกระบวนการเอนแคปซูลเลชันเพราะสามารถทำได้ง่ายในระดับห้องปฏิบัติการเหมาะสำหรับสารที่มีสมบัติที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ สารที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิ แต่มีข้อจำกัดสองอย่างคือ หนึ่ง สามารถทำได้ง่ายในทีละน้อยจากการใช้หลอดฉีดยาหยดสารละลายอัลจิเนตลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ปั่นกวนไว้ซึ่งในการขยายขนาดค่อนข้างทำได้ยากและราคาแพง ข้อสอง ไมโครแคปซูลที่ได้มีรูพรุนที่หลากหลายจึงได้มีการพัฒนาให้นำไปสู่ในระดับอุตสาหกรรมได้โดยมีการประยุกต์นำ อากาศ กระแสไฟฟ้า การสั่น มาใช้ช่วยในการควบคุมอัตราการผลิตของอัลจิเนต [Gouin, S., 2004] เม็ดอัลจิเนตที่ใช้ในงานวิจัยต่างๆ สามารถเตรียมโดยการทำให้เกิดเจลจากภายนอก (external gelling) หรือจากภายใน (internal gelling) โดยวิธีการทำให้เกิดเจลจากภายนอกเกิดจากการเชื่อมขวางแคลเซียมไอออนโดยการแพร่แคลเซียมไอออนจากสารละลายเข้าสู่ผิวด้านนอกโซเดียมอัลจิเนต ทำให้เกิดเจลอย่างรวดเร็วจากด้านนอกสู่ด้านในเม็ดเจล ดังรูปที่ 2.20 (a) และส่วนการทำเกิดเจลจากภายในเกิดจากหยดสารละลายเชื่อมขวางในที่นี้คือแคลเซียมไอออนลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ทำให้เกิดเจลจากด้านในของเม็ดเจลไปสู่ด้านนอกจากการแพร่ของแคลเซียมไอออน ดังรูปที่ 2.20 (b)



(a) External gelation

(b) Internal gelation

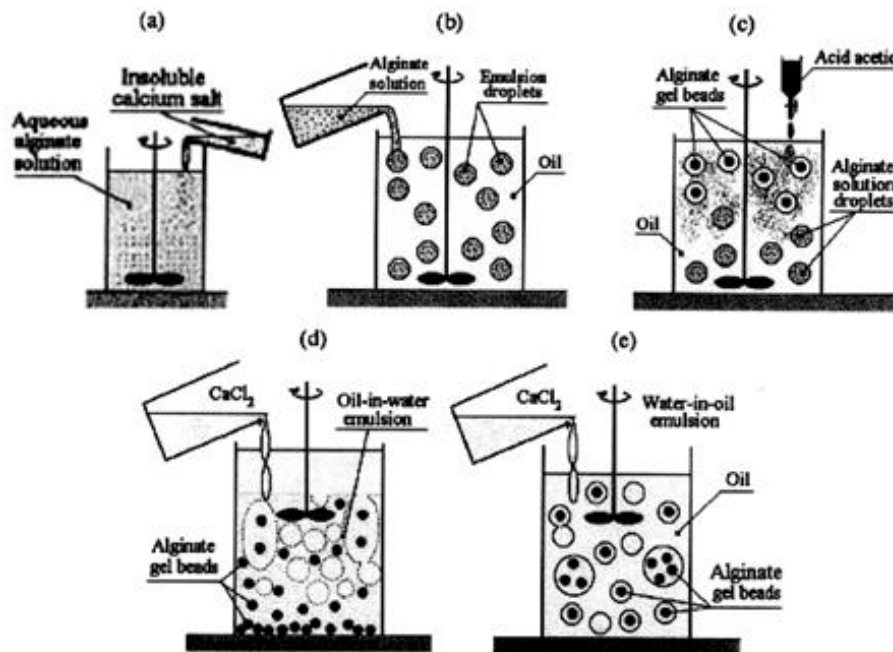
รูปที่ 2.20 การเกิดอัลจินตเจลแบบ (a) External gelation (b) Internal gelation [Draget, K.I. และคณะ, 2005]

การเกิดเจลจากภายนอกอาจทำได้โดยใช้สองเทคนิคต่อไปนี้

1. Emulsion method

วิธีการมีเฟสของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายที่ประกอบด้วยไซเตียมอัลจินตถูกกระจายในเฟสของสารลดแรงตึงผิวพร้อมทั้งมีการปั่นกวนด้วยความเร็วรอบที่สูงเพื่อให้ได้อนุภาคขนาดเล็กจากนั้นใส่สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงไปพร้อมปั่นกวนจนเกิดอนุภาคขนาดไมครอน และเติมไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ เพื่อให้อนุภาคแข็งตัว [Lemoine, D. และคณะ, 1988] เม็ดอัลจินตที่สามารถผลิตได้จะได้อนุภาคขนาดเล็กซึ่งได้ขนาดที่เล็กกว่า 150 ไมครอน และเป็นอนุภาคทรงกลมอัลจินตที่เกิดการเคลือบผิว ปัจจัยที่ควบคุมได้แก่ ความเข้มข้นของอัลจินต ธรรมชาติและองค์ประกอบของลดแรงตึงผิว มวลโมเลกุลของอัลจินต การออกแบบและอัตราการปั่นกวนของถังปฏิกรณ์ อนุภาคที่ได้จะมีความคงตัว และสามารถนำไปผ่านการฆ่าเชื้อและทำแห้งได้ วิธีการนี้สามารถทำในกระบวนการผลิตขนาดใหญ่ได้แต่ข้อเสียคือ ขั้นตอนมีความยุ่งยากซับซ้อนหลายขั้นตอน อนุภาคที่ได้มีขนาดรูพรุนที่ใหญ่ [Mofidi, N. และคณะ, 2000] การนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยในการเอนแคปซูเลชั่น อินซูลิน [Silva, C.M. และคณะ, 2006]

วิตามินอี [Yoo, I.K. และคณะ, 2006] โปรตีน [Zheng, C.H. และคณะ, 2004] สารแคพซูล [Lee, J.H. และคณะ, 2009] ยา paclitaxel ด้านมะเร็ง [Alipour, S. และคณะ, 2010] เป็นต้น

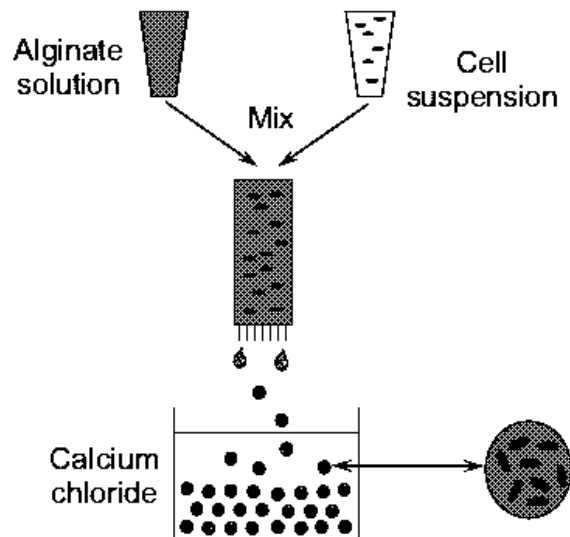


รูปที่ 2.21 การเตรียมเม็ดอัลจินตโดยวิธี emulsification (a) สารละลายแคลเซียมเฟสน้ำมันผสมกับสารละลายอัลจินตเฟสน้ำจะกระจายตัวดี (b) สารละลายอัลจินตเฟสน้ำผสมในเฟสน้ำมันเกิดอนุภาคขึ้น (c) เติมกรดเพื่อให้เกิดการเจลของอนุภาค (d) ค่อยๆ เติมแคลเซียมคลอไรด์เกิดการ เจลจากภายนอก (e) สามารถเกิดเฟสตรงข้ามได้เป็น water/oil emulsion [Poncelet, D. และคณะ, 1999]

2. Direct-extrusion method

วิธีการหยดสารละลายโซเดียมอัลจินตด้วยหลอดฉีดยาหรือพ่นด้วยหัวฉีดลงบนอ่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และปั่นกวนเม็ดอัลจินตให้กระจายในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แคลเซียมจะเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนกับโซเดียมโดยการแพร่ผ่านเกิดเป็นเจลไอออนขึ้นจากผิวด้านนอกเข้าสู่ภายในได้โดยตรงจากนั้นแช่เม็ดอัลจินตที่ได้ในอ่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ตามความเหมาะสมของลักษณะเม็ดที่ต้องการให้เจลแข็งทั้งเม็ดหรือเกิดเป็นช่องว่างภายในซึ่งกระบวนการเตรียมเม็ดอัลจินตวิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถเตรียมได้ง่ายและได้เม็ดอัลจินตที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 500 ไมครอน [Lucy, S.C. และคณะ, 1994] ข้อดีสามารถขึ้นรูปได้ภายในขั้นตอนเดียวและสามารถควบคุมขนาดอนุภาคได้ แต่ข้อเสียความสามารถในการขยายกำลังการ

ผลิตต่ำ ความเหมาะสมของการนำไปใช้เกี่ยวกับงานวิจัยในการห่อหุ้มเซลล์ [Hunt, N.C. และคณะ, 2010] การห่อหุ้มสารสกัดสมุนไพร [Chan, E.S. และคณะ, 2010] ระบบนำส่งยา [Kundu และMandal, 2009] เป็นต้น



รูปที่ 2.22 วิธีการขึ้นรูปเม็ดอัลจินเตสำหรับใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ โดยวิธี Direct-extrusion [Draget, K.I. และTaylor, C., 2011]

2.12 งานวิจัยที่ใช้เทคนิคการห่อหุ้มสารต้านอนุมูลอิสระ

Ersus, S. และ Yurdagel, U. (2007) ได้ศึกษาการห่อหุ้มแอนโทไซยานินจากสารสกัดแครอทดำสีซีซี *Daucus carota L.* ด้วยวิธีการพ่นแห้งโดยวัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มมีด้วยกัน 3 ชนิด คือ Maltodextrin MDX 29 (28–31 DE) Glucodry 210 (20–23 DE) และ Stardri 10 (10 DE) ซึ่งแต่ละชนิดจะมีปริมาณ DE ที่แตกต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียสมีการรักษาปริมาณแอนโทไซยานินได้มากที่สุด สำหรับการใช้ Glucodry 210 เป็นวัสดุห่อหุ้มโดยมีขนาดในช่วง 3-20 ไมโครเมตร และปริมาณการกักเก็บสารแอนโทไซยานินสูงสุดคือ 630.92 ± 15.71 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมและเมื่อศึกษาสภาวะการเก็บของแอนโทไซยานินที่ถูกห่อหุ้มในวัสดุห่อหุ้มทั้ง 3 ชนิด พบว่าในระยะเวลา 64 วัน อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส สามารถรักษาความคงตัวของแอนโทไซยานินได้ร้อยละ 77 และร้อยละ 89 ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าค่าเวลาครึ่งชีวิตเป็นเวลาที่แอนโทไซยานินที่ถูกห่อหุ้มสลายตัวไปครึ่งหนึ่งจากปริมาณทั้งหมดที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียสจะมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 10 และ 25 เดือนตามลำดับ และในสภาวะที่มีแสง 3000

ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 9 เดือน ซึ่งมีผลของทั้งอุณหภูมิและแสงร่วมด้วย

เนติ วระนุช และคณะ (2552) ได้ศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแคปซูลบรรจุสารสกัดผลหม่อนด้วยวิธี direct-extrusion เพื่อใช้เป็นเครื่องสำอางบำรุงผิวหน้าโดยมีการประเมินคุณภาพของเครื่องสำอางจากปริมาณสารสำคัญโปรแอนโทไซยานินด้วยวิธี butanol hydrochloric assay พบว่าไซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมความหนืดปานกลางที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเท่านั้นที่สามารถขึ้นรูปเป็นแคปซูลทรงกลมได้ร้อยละ 80 ขนาดแคปซูลที่เตรียมได้อยู่ในช่วง 0.81-0.85 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของสารสกัด ขนาดเข็มฉีดยา ไม่มีผลต่อขนาดแคปซูล จากนั้นนำไปทดสอบความคงตัวของสารสกัดหม่อนในแคปซูลที่สภาวะเร่ง พบว่าสามารถรักษาความคงตัวของปริมาณโปรแอนโทไซยานินในสารสกัดหม่อนได้สูงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ร้อยละ 94.22 เทียบกับก่อนการกักเก็บสารสกัดมีความคงตัวร้อยละ 79 ในส่วนความคงตัวของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหม่อน พบว่ามีความคงตัวร้อยละ 82.95 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในสารสกัดหม่อนมีความคงตัวเพียงร้อยละ 28

Chan, E.S. และคณะ (2010) ได้ศึกษาการห่อหุ้มสารสกัดสมุนไพร *Piper sarmentosum* ด้วยอัลจิเนตปิดโดยการดูดซับสารสกัดสมุนไพรไว้ในอัลจิเนตปิดที่ขึ้นรูปด้วยวิธี direct-extrusion และทำแห้งด้วยวิธี air dry โดยใช้ไซเดียมอัลจิเนต 2 ชนิดคือ high G กับ high M ได้อัลจิเนตปิดที่มีขนาด 2.2 มิลลิเมตรพบว่าประสิทธิภาพในการห่อหุ้มทั้งหมด (overall encapsulation efficiency) เมื่อใช้อัลจิเนตชนิด high M สูง เท่ากับ 0.78 ± 0.18 กรัมต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับอัลจิเนตชนิด high G ได้เพียง 0.26 ± 0.06 กรัมต่อกรัม โดยที่ความเข้มข้นของอัลจิเนต ความเข้มข้นของสารสกัด ขนาดของเม็ดปิด ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ปริมาณน้ำที่มีในเม็ดปิดต่ำมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มทั้งหมดสูงด้วยเช่นกัน ทั้งการใช้อัลจิเนตทั้งสองชนิด แต่จากความแตกต่างของชนิดอัลจิเนตทำให้พบว่าอัลจิเนตชนิด high G จะทำให้รูปร่างของอัลจิเนตปิดมีความคงรูปและค่าความชอบในการดึงดูดสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant affinity) มากกว่าชนิด high M และงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มสารสกัดสมุนไพรด้วยการดูดซับในอัลจิเนตปิดไม่มีผลทำให้โครงสร้างของสารสกัดสมุนไพรเปลี่ยนจากพิกที่ปรากฏด้วย FTIR แสดงหมู่ฟังก์ชันของสารสกัดสมุนไพรที่ถูกห่อหุ้มในอัลจิเนตปิด อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการใช้ห่อหุ้มสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารที่มีการสลายตัวได้ง่ายจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

ตารางที่ 2.6 สรุปงานวิจัยเกี่ยวกับการห่อหุ้มสารสกัดจากพืชที่เกี่ยวข้อง

วิธีการขึ้นรูป	สารที่ถูกห่อหุ้ม	ชนิดสารห่อหุ้ม	ขนาดอนุภาค (μm)	ปริมาณการกักเก็บสารสำคัญ (ต่อกรัมอนุภาค)	สภาวะทดสอบความคงตัว	ระยะเวลาในการเก็บ (เดือน)	ร้อยละการสลายตัวของสารสำคัญที่ระยะเวลาการเก็บ	อ้างอิง
การพ่นแห้ง (spray drying)	สารสกัดแคโรทีน	Glucodry 210	3-20	6.3×10^{-3} กรัม	4 องศาเซลเซียส 25 องศาเซลเซียส แสง (25 องศาเซลเซียส)	28 10 9	50.0 % 50.0 % 50.0 %	Ersus, S. และ Yurdagel, U. (2007)
การพ่นแห้ง	<i>Acai (Euterpe oleraceae Mart.)</i>	maltodextrin 10DE	13-21	-	-	-	-	Tonon, R.V. และคณะ (2008)
การพ่นแห้ง	cactus pear (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	maltodextrin 10DE	-	0.60×10^{-3} กรัม	60 องศาเซลเซียส	1.5	36 %	Saenz, C. และคณะ (2009)
		inulin	-	0.64×10^{-3} กรัม	60 องศาเซลเซียส	1.5	40 %	
Direct-extrusion	สารสกัดผลหม่อน	ไซเดียมอัลจิเนต	810-850	0.738 มิลลิลิตร	สภาวะเร่ง 4 องศาเซลเซียส	1	94.2 %	เนติ วระนุช และคณะ (2552)

วิธีการขึ้นรูป	สารที่ถูกห่อหุ้ม	ชนิดสารห่อหุ้ม	ขนาดอนุภาค (µm)	ปริมาณการกักเก็บสารสำคัญ (ต่อกรัมอนุภาค)	สภาวะทดสอบความคงตัว	ระยะเวลาในการเก็บ (เดือน)	ร้อยละการสลายตัวของสารสำคัญที่ระยะเวลาการเก็บ	อ้างอิง
Direct-extrusion	สารสกัดสมุนไพร <i>Piper sarmentosum</i>	ไซโตยมอัลจินเตชนิด high G	2200	0.78 กรัม	-	-	-	Chan, E.S. และคณะ (2010)
การพ่นแห้ง	beetroot juice	gum Arabic	-	0.12×10^{-3} กรัม	30 องศาเซลเซียส	1.5	20%	Pitalua, E. และคณะ (2010)
การพ่นแห้ง	Blackcurrant berries (<i>Ribes nigrum L.</i>)	maltodextrin 11 DE, 18DE, 21DE	-	$3.61-4.54 \times 10^{-3}$ กรัม	8 องศาเซลเซียส	12	16-35%	Anna, M.B. และ Paul, P.K. (2010)
การพ่นแห้ง	purple sweet potato	inulin	-	$2.96-3.99 \times 10^{-3}$ กรัม	25 องศาเซลเซียส	-	24-32%	Ahmed, M. และคณะ (2010)
		maltodextrin ผสมกับ ascorbic acid	-	0.57×10^{-3} กรัม	-		-	

2.13 สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

สิทธิบัตรในไทย: ที่เกี่ยวข้องการผลิตและการห่อหุ้มด้วยอัลจินเตปิดยังไม่มีรายงาน

สิทธิบัตรต่างประเทศ :

สิทธิบัตรอเมริกา 4401456 ปี 1983

เจ้าของผลงาน Connick และ William

ชื่อสิทธิบัตร Controlled release of bioactive materials using alginate gel beads

ได้เตรียมอัลจินเตเจลปิดที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถเป็นประโยชน์ในการควบคุมการปลดปล่อยของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจินเตผสมกับสารกำจัดวัชพืชในน้ำและหยดลงในสารละลายเกลือโลหะในกลุ่ม ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และคอปเปอร์คลอไรด์เกิดการพอร์มตัวเป็นอัลจินเตเจลปิดขึ้นจะได้เป็นอัลจินเตเจลปิดที่มีสารกำจัดวัชพืชกระจายอยู่ภายในปิดแช่ในสารละลายนาน 5-20 นาทีจากนั้นแยกเม็ดปิดออกจากสารละลายและนำไปทำให้แห้ง

Claim

1. ชนิดของยากำจัดวัชพืชที่ใช้คือ S-ethyl hexahydro-1H-azepine-1-carbothioate 2-chloro-2',6'-diethyl-N- (methoxymethyl) acetanilide 2-chloro-2',6'-diethyl-N- (butoxymethyl) acetanilide (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid 7-oxabicyclo [2,2,1] -heptane-2,3-dicarboxylic acid
2. ความเข้มข้นของอัลจินเต 1.0-1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของยากำจัดวัชพืช 3.0-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

สิทธิบัตรญี่ปุ่น 5334229 ปี 1994

เจ้าของผลงาน Sakamoto และ Yuji

ชื่อสิทธิบัตร Alginate gel bead

ได้พัฒนาการผลิตเจลปิดสำหรับการห่อหุ้มพันธุ์พืชเป็นประโยชน์ในงานด้านเกษตรกรรมและการผลิตพืชผลโดยหยด 2% โซเดียมอัลจินเตที่ประกอบด้วยพันธุ์พืชซึ่งตรึงไว้ในอัลจินเตเจลปิดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลลาร์ แล้วล้างด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และแช่ด้วยเกลือไอออนประจุบวกหนึ่งเพราะช่วยจะทำให้เม็ดปิดแตกหลังจากที่หวานเมล็ดหลังจากนั้นล้างเกลือออกอีกครั้งด้วยน้ำ

Claim

1. สารแคลเซียมซีเลทได้แก่ โซเดียมซีเตรต โซเดียมเฮกซะเมทาฟอสเฟต โซเดียมพอลิฟอสเฟต และโซเดียมเอทีลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตรตความเข้มข้น 0.02-0.5% เวลาที่ใช้ในการล้าง 2 ถึง 10 ชั่วโมง
2. ไอออนประจุบวกหนึ่งได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ โซเดียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ หรือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ ถึง 2 โมลลาร์ เวลาในการแช่ 5 นาที ถึง 12 ชั่วโมงเพื่อให้เม็ดปิดเปราะ
3. เวลา 15 ถึง 45 นาที ในการล้างเอาเกลือออกของเม็ดปิดด้วยน้ำ

สิทธิบัตรอเมริกา 5744337 ปี 1998

เจ้าของผลงาน Price และคณะ

ชื่อสิทธิบัตร Internal gelation method for forming multilayer microspheres and product there of

ได้ผลิตอนุภาคระดับไมครอนที่สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างได้ และสามารถทำการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์สำคัญได้ทำโดยวิธีอิมัลชันประกอบด้วย สารโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้เกลือ ไอออนประจุบวกสองหรือสาม สารยับยั้งการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชัน น้ำ สารตัวทำละลายที่ไม่ผสมกับน้ำ และสารออกฤทธิ์สำคัญซึ่งจะได้อนุภาคโพลีแซคคาไรด์ระดับไมครอนมีขนาดอนุภาคประมาณ 2-1000 ไมครอน วิธีการคือเตรียมเฟสของ น้ำ และเฟสของน้ำมันโดยเฟสของน้ำจะมีองค์ประกอบของเกลือไดหรือไตรวาเลนส์ไอออนโลหะ ความเข้มข้นที่เหมาะสมทำให้โพลีแซคคาไรด์เจลได้ และมีสารโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้กับสารยับยั้งการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชันผสมกัน ซึ่งในเฟสน้ำนี้จะมีสารออกฤทธิ์สำคัญผสมอยู่ด้วยจากนั้นนำเฟสน้ำผสมกับเฟสน้ำมันและปั่นจนจนเกิดเป็นอิมัลชันแบบ น้ำมัน/น้ำ/น้ำมัน โดยสารออกฤทธิ์สำคัญถูกกักเก็บไว้ในอนุภาคโพลีแซคคาไรด์ระดับไมครอนจากนั้นทำการแตกเฟสที่เป็นอิมัลชันออกก็จะได้เป็นอนุภาคไมครอนมา

Claim

1. ใช้น้ำเติมลงไปในการแตกเฟสอิมัลชัน
2. เฟสน้ำมันจะอยู่ในกลุ่มของ น้ำมันข้าวโพด ดอกคำฝอย เมล็ดฝ้าย ถั่วลิสง และสารเหล่านี้ผสมกัน
3. สารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ หมึก เซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิต สารที่มีกลิ่น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

1. ผลหม่อนสดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียสและผงผลหม่อนสกัด แหล่งที่ 1 ไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์ พันธุ์เชียงใหม่ (*Morus alba*), ช่วงการเก็บเกี่ยวเดือนธันวาคม 2553 แหล่งที่ 2 สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ศูนย์ด่านเกวียน จังหวัดนครราชสีมา มีเฉพาะหม่อนสดสายพันธุ์เชียงใหม่ (*Morus alba*) ช่วงการเก็บเกี่ยวเดือนมีนาคม 2554
2. หนูวิสต้า, เพศเมีย อายุ 3 สัปดาห์ (ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล)
3. Potassium chloride (KCl, Fluka, Germany)
4. Sodium acetate hydrated ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Ajax Finechem, Australia)
5. Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Fujicco, Japan)
6. 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, Germany)
7. Absolute ethanol (JT Baker, Malaysia)
8. Hydrochloric Acid (HCl, Qrec, Newzeland)
9. MEM/ALPHA minimum essential medium alpha modification (Hyclone, USA)
10. Fetal bovine serum (Hyclone, UK)
11. Penicillin-Streptomycin solution (Hyclone, USA)
12. Trypsin/EDTA 0.25% Trypsin (1X) solution (Hyclone, USA)
13. Phosphate buffer saline, PBS powder, (Hyclone, USA)
14. Sodium chloride (NaCl, Ajax Finechem, Australia)
15. Tri-sodium citrate ($\text{Na}_3\text{Citrate}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany)
16. Hoechst 33258 (bisBenzimide H33258, Sigma-Aldrich, Germany)
17. Sodium lauryl sulphate (SDS lysis buffer, Ajax Finechem, Australia)
18. Dimethyl sulfoxide for cell freezing (Cell culture tested DMSO, Sigma-Aldrich, Germany)
19. p-Nitrophenol standard solution (10 mM, Sigma-Aldrich, Germany)
20. p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (pNPP, Sigma-Aldrich, Germany)

21. Sodium hydroxide (Ajax Finechem, Australia)
22. Ascorbic acid for cell culture tested (Sigma, China)
23. β -glycerol phosphate disodium salt pentahydrate (Fluka, Germany)
24. Dexamethasone (Sigma, China)
25. O-cresolphthalein complex substrate (OCPC), (C₃₂H₁₂N₂O₁₂, Fluka, Japan)
26. Ethanolamine (C₂H₇NO, Sigma, Germany)
27. CO₂ gas
28. Trypan blue stain 0.4% (Gibco, USA)
29. Acetic acid (CH₃COOH, J.T.Baker, Thailand)
30. Calcium carbonate (CaO₃, Fluka, Italy)
31. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Riedel-deHaen, USA)
32. Sodium hydrogen carbonate (Merck, Germany)
33. Buffer solution pH4.0 (Ajax Finechem, Australia)
34. Buffer solution pH7.0 (Ajax Finechem, Australia)
35. Calcium chloride (CaCl₂, Ajax Finechem, Australia)
36. Alginic acid sodium salt from brown algae (Na-alginate, Sigma-Aldrich, Germany)
37. N₂ gas
38. 3, 5 Dinitrosalicylic acid (DNS) (Sigma-Aldrich, Germany)
39. Potassium sodium tartrate (Ajax Finechem, Australia)
40. Sodium sulphite (Fluka, Germany)
41. Glucose (Ajax Finechem, Australia)

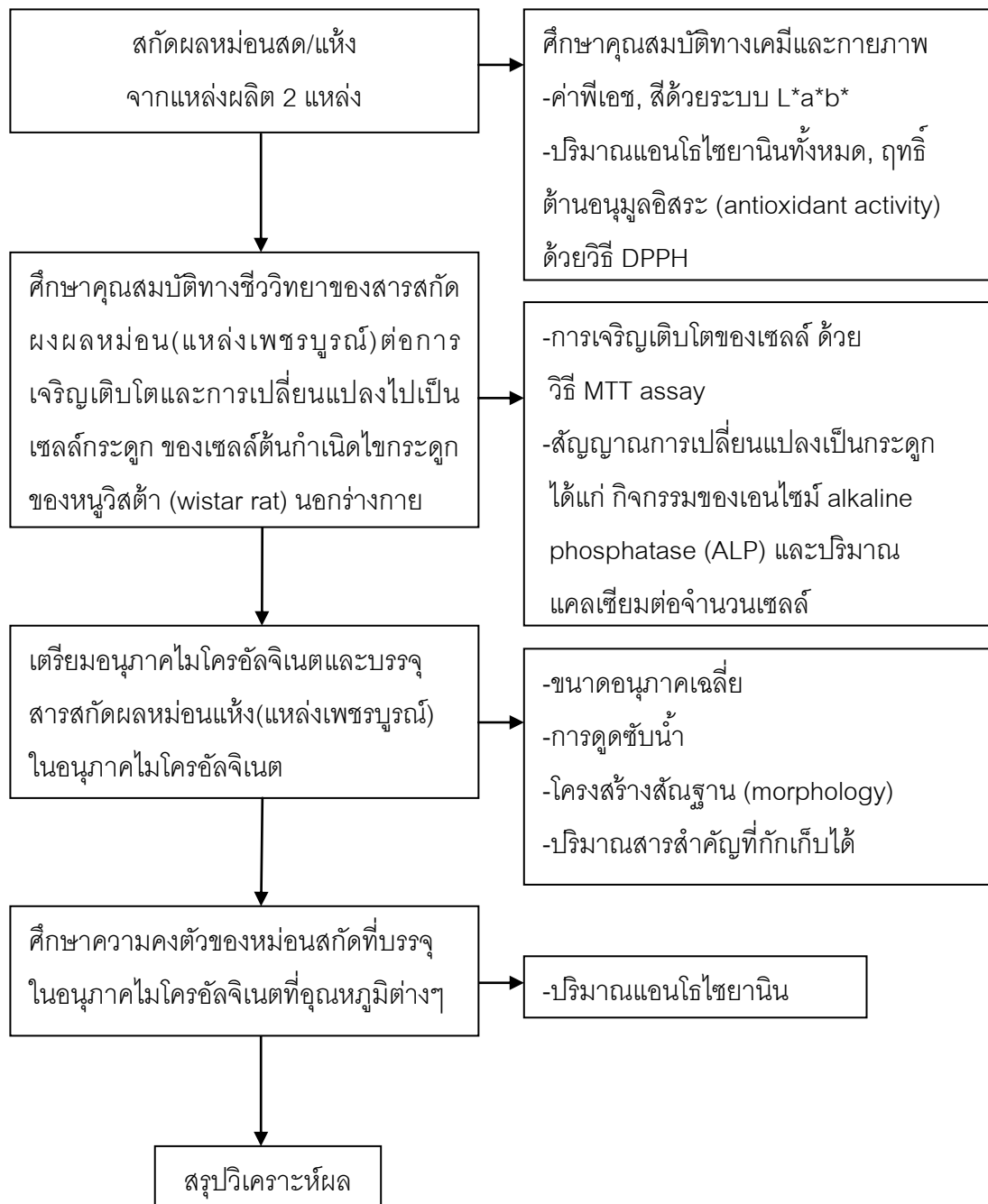
3.2 อุปกรณ์

1. Laminar Flow (Holten, EU)
2. CO₂ incubator (HEPA CLASS 100, USA)
3. Fluorescence microplate reader (Perkin elmer, 1420 multilabel counter, USA)
4. Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)

5. UV-VIS spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning, USA)
6. Microplate reader (UVM 340, ASYS, Australia)
7. Scanning Electron Microscope (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan)
8. Centrifuge (Eppendorf 5810R, Germany)
9. -40°C freezer (Heto, PowerDry LL3000, USA)
10. Lyophilizer (Christ Loc-1m, Alpha 1-4, Germany)
11. Vacuum drying oven and pump (VD23, Binder, Germany)
12. 24-well and 96-well polystyrene tissue culture plates (Costar, USA)
13. Hemocytometer (Counting chamber, Boeco, Germany)
14. Autopitte (100-5,000 ul with tips (Eppendorf, Germany)
15. Stirrer (MSH-10, Daihan Scientific Ltd., WiseStir)
16. Refrigerator 4°C (PT203, Italy)
17. Autoclave (HVE-25/50, Hiclave)
18. Sputter coater (SCD 040, Balzer, Lichtenstein)
19. Centrifuge (Hettich universal 320R, Germany)
20. Waterbath (SUB6, Grant, England)
21. Peristaltic Pump (MCP V5.21 15M 726B-0773, Watson-Marlow, USA)
22. 1.5 ml sterilized vials (Corning USA)
23. Phase-contrast microscope (IX70, Olympus Optical CO., Japan)
24. 96-well black plate (Corning USA)
25. Vortex (Chemoscience, Thailand)

3.3 แผนผังการดำเนินงาน

แผนผังสรุปการดำเนินการทั้งโครงการเป็นไปดังรูปที่ 3.1 และมีรายละเอียดของขั้นตอนดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมสารสกัดผลหม่อน

ผลหม่อนสดสายพันธุ์เชียงใหม่ 2 ชนิดที่ได้จากแหล่งการปลูก 2 แหล่ง คือไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์และสถาบันหม่อนใหม่แห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ศูนย์ด้านเกวียน นครราชสีมา

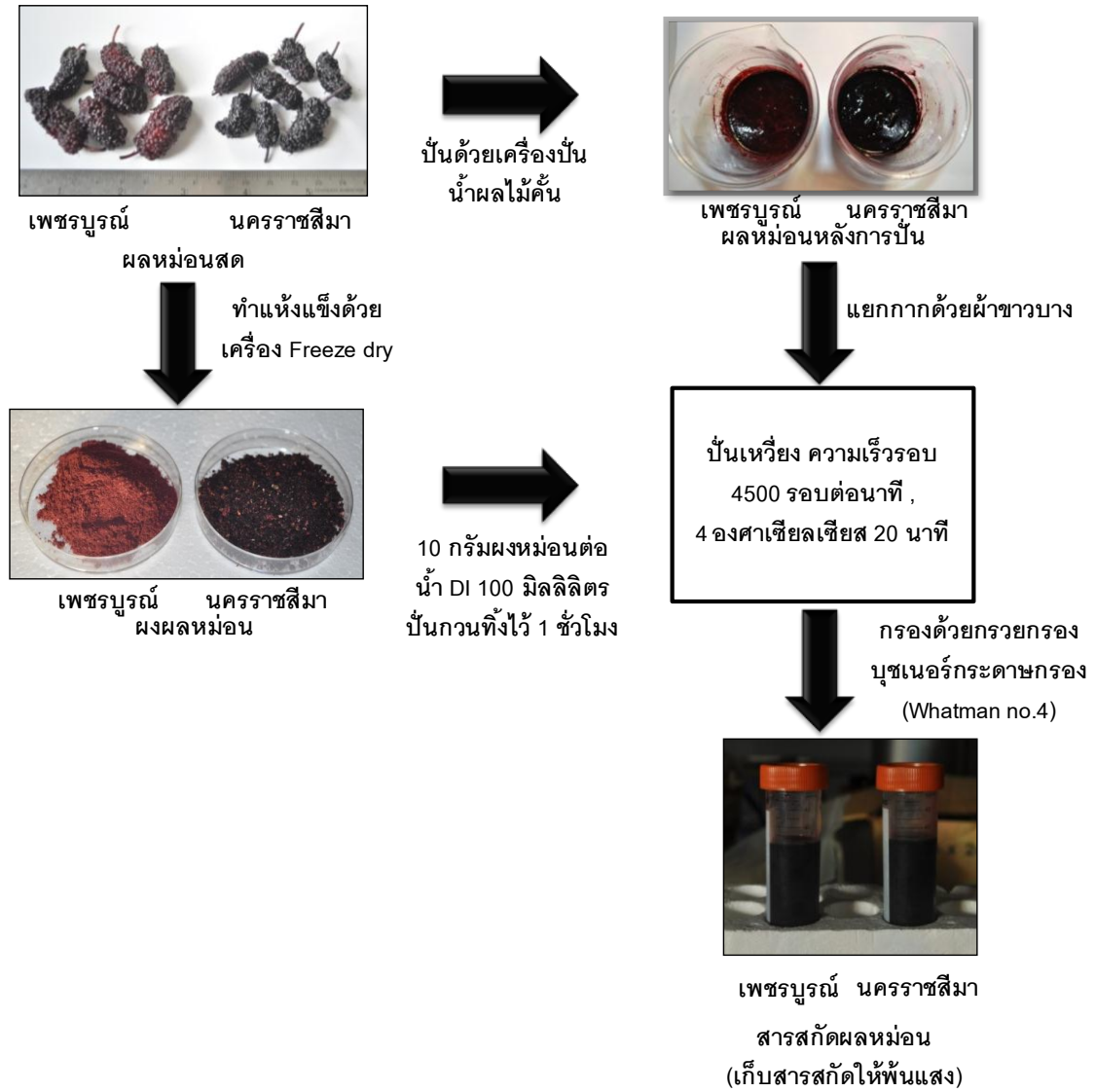
- นำคั้นผลหม่อนสด เตรียมการสกัดจากผลหม่อนทำได้โดยการนำผลหม่อนมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้แล้วนำไปคั้นเพื่อแยกส่วนที่เป็นน้ำหม่อนออกจากกากผลหม่อนด้วยผ้าขาวบางและนำส่วนที่เป็นน้ำหม่อนมาแยกเอาส่วนใสอีกครั้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuged) ด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman no.4) โดยใช้กรวยกรองบุชเนอร์ จะได้ลักษณะสารละลายเป็นสีม่วงเข้มดังรูปที่ 3.2

- ผงผลหม่อนสกัดจาก 2 แหล่ง คือ

1. ผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแช็ง (freeze dried) แล้วทำเป็นผงเพื่อการค้า จากไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์

2. ผลหม่อน จากสถาบันหม่อนใหม่แห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ศูนย์ด้านเกวียน นครราชสีมา ซึ่งผู้วิจัยนำผลหม่อนสดมาแยกก้าน ใบ และสิ่งเจือปนออกก่อนแล้วนำไปแช่แช็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจากนั้นนำผลหม่อนที่ได้ผ่านกระบวนการทำแห้งแช็งแล้วนำบดละเอียดให้เป็นผงด้วยครกบดยา การสกัดผงผลหม่อนสกัดทำโดยละลายผงหม่อนด้วยอัตราส่วน 10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรในน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) และปั่นกวนทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแยกส่วนใสออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีและกรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ใช้กระดาษกรองอีกครั้ง สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นสีม่วงเข้มเช่นกัน ดังรูปที่ 3.2

การควบคุมคุณภาพ ทำโดยควบคุมการทดลองที่ใช้สารสกัดหม่อนทั้งหมดทำในที่มืดเพื่อป้องกันแสง ปิดฝาสนิทเพื่อป้องกันอากาศ และหม่อนสกัดที่เตรียมทั้งสองวิธีนี้จะมีการใช้งานทันทีผลหม่อนสดที่รับมาจากไร่และผงผลหม่อนสกัดจะมีการเก็บไว้โดยการแช่แช็งที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทดลองและมีการทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำทุกการทดลอง



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนที่ใช้ในการวิจัยนี้

3.4.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของหม่อนสกัด

ก. ค่าพีเอช ด้วย pH meter (Mettler Toledo, USA)

ข. ร้อยละของของแข็ง (% solid weight) โดยนำผลหม่อนสดจากแหล่งปลูกทั้ง 2 แหล่ง คือจังหวัดเพชรบูรณ์และนครราชสีมา โดยนำผลหม่อนไประเหิดเอาน้ำออกด้วยกระบวนการทำแห้งแช่แข็ง (freeze dry) ซึ่งน้ำหนักของผลหม่อนสดก่อนการทำแห้งและหลังการทำแห้งเพื่อหาปริมาณน้ำหนักของผลหม่อนแห้งและน้ำในผลหม่อนของผลหม่อนสดที่ระเหิดไปในกระบวนการทำแห้งแช่แข็งก่อนที่จะนำไปทำเป็นผงผลหม่อนสกัดต่อไป

ค. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS) ด้วยเครื่อง hand refractometer อ่านค่าเป็นองศาบริกซ์ ($^{\circ}$ Brix) ซึ่งเป็นอุปกรณ์มาตรฐานที่ส่วนมากใช้วัดค่าน้ำตาลในสารละลายโดยอาศัยหลักการหักเหของแสงซึ่งจะมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในสารละลาย

ง. ปริมาณกรดที่ไทเทรตทั้งหมด โดยให้สารสกัดทำปฏิกิริยากับต่างแก่ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.025 นอร์มัล) โดยนำสารสกัดที่กรองแล้วปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 40 มิลลิลิตร แล้วหยดฟีนอล์ฟทาเลอิน 1% ซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์ประมาณ 3-5 หยด แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มัลจนกระทั่งค่าพีเอชของสารสกัดเท่ากับ 8.3 (วัดด้วยพีเอชมิเตอร์) ซึ่งเป็นค่าพีเอชของจุดยุติของฟีนอล์ฟทาเลอิน (เนื่องจากสีของสารสกัดเป็นสีม่วงเข้มทำให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีไม่ชัดเจน) แล้วคำนวณหาร้อยละของกรดซิตริกซึ่งเป็นกรดที่พบในผลหม่อน [Ercisli, S. และ Orhan, E., 2007] ดังสมการที่ (3.1)

$$\% \text{Citric acid} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{meq.wt of citric acid} \times 100}{\text{ml sample juice}} \dots\dots\dots (3.1)$$

โดย % Citric acid = % กรดซิตริก (% น้ำหนักต่อปริมาตร)

N NaOH = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลต่อลิตร)

ml NaOH = ปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ไทเทรต (มิลลิลิตร)

ml sample juice = ปริมาณสารสกัดที่ใช้ (มิลลิลิตร)

meq.wt of Citric acid = 0.064 [Ercisli, S. และ Orhan, E., 2007]

จ. สี วัดด้วยเครื่องมือวัดสี colormeter (ยี่ห้อ CE MINOLTA รุ่น CR-400, ประเทศญี่ปุ่น) ในระบบ Hunter's scale ซึ่งจะวัดค่า L^* a^* b^* โดยที่ L^* แสดงค่าความสว่างซึ่งมีค่าเท่ากับ 0-100 L^* เท่ากับ 0 หมายถึง สีดำ และ L^* เท่ากับ 100 หมายถึง สีขาว โดยที่ความสว่างมากค่า L^* จะใกล้ 100 แต่ถ้าความสว่างน้อย ค่าของ L^* ก็จะเข้าใกล้ 0 ค่า a^* และ b^* บอกทิศทางของสี เช่น $+a^*$ หมายถึงอยู่ในทิศของสีแดง $-a^*$ หมายถึงอยู่ในทิศของสีเขียว ถ้า a มีค่าเป็นบวกยิ่งค่ามากแสดงว่าวัตถุมีสีแดงอยู่มาก แต่ถ้า a เป็นค่าลบ ยิ่งค่าติดลบมากแสดงว่าวัตถุมีสีเขียวมาก, $+b^*$ หมายถึงอยู่ในทิศของสีเหลือง และ $-b^*$ หมายถึงอยู่ในทิศของสีน้ำเงิน ถ้าค่า b ยิ่งค่าเป็นบวกมากแสดงว่าวัตถุจะมีสีเหลืองมาก แต่ถ้า b เป็นลบมากแสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงินมาก [Rommel, A. และคณะ, 1990]

ฉ. ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด ในสารสกัดผลหม่อนการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อนด้วยวิธี pH-differential ตามวิธีของ Durst, R.W. และ Wrolstad, R.E. (2005) ทำโดยเตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 1.0 (โพแทสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัมในน้ำปราศจากไอออน 980 มิลลิลิตร) วัดค่าพีเอชและปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้พีเอช 1.0 และเตรียมสารละลายไซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.5 (ไซเดียมอะซิเตท 54.43 กรัมในน้ำปราศจากไอออน 960 มิลลิลิตร) วัดค่าพีเอชและปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้พีเอชเท่ากับ 4.5 นำสารสกัดจากผลหม่อนมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ทั้งสองเป็น 100 เท่าจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตรโดยมีสารละลายเปรียบเทียบกับ (blank) ซึ่งใช้น้ำ DI แล้วคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินจากสมการ (3.2) และ (3.3) แสดงตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวก ก

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \dots\dots\dots(3.2)$$

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A \times MW \times DF \times 1000)}{\epsilon \times l} \dots\dots\dots(3.3)$$

โดยที่ A_{520} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

A_{700} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร

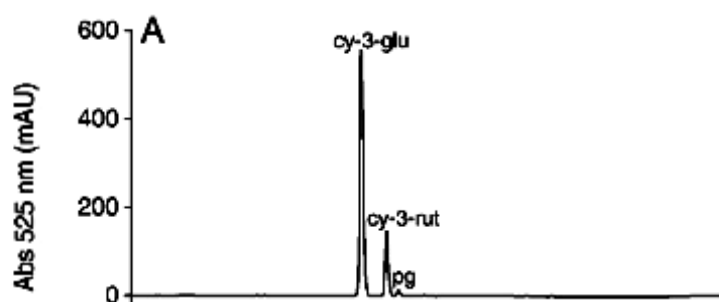
MW = มวลโมเลกุลของ cyanindin-3-glucoside = 449.2 กรัมต่อโมล

DF = dilution factor = 100

ϵ = molar absorptivity = 26,900

1 = pathlength เซนติเมตร

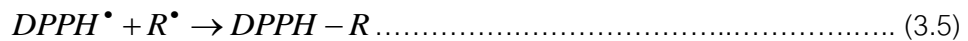
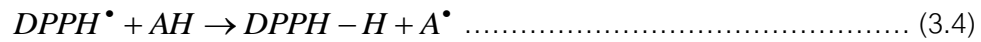
การรายงานผลปริมาณแอนโทไซยานิน มีหน่วยเป็น (น้ำหนักแอนโทไซยานินต่อน้ำหนักแห้ง) วิธี pH-differential นี้ทำเพื่อใช้ในงานวิจัยเป็นประจำเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูง โดยมีการเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินที่แม่นยำด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C-18 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าดูดกลืนแสง 530 นาโนเมตรและมีเฟสเคลื่อนที่คือ ตัวทำละลายชนิด A ประกอบด้วย 1.5% กรดฟอสฟอริก, 20% กรดอะซิติก, 25% อะซิโตนในไตรลีนน้ำ และตัวทำละลายชนิด B คือ 1.5% กรดฟอสฟอริกในน้ำตามวิธีของ Bae, S.H. และ Suh, H.J. (2007) ใช้สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์เป็นสารแอนโทไซยานินมาตรฐาน (Fujicco, ญี่ปุ่น, Code No.30637661) ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในการสกัดหม่อน (รูปที่ 1.2) ตัวอย่างพืชที่ปรากฏจากการวิเคราะห์แอนโทไซยานินในผลด้วยเครื่อง HPLC แสดงในรูปที่ 3.3 [Hassimotto, M.A. และคณะ, 2008]



รูปที่ 3.3 High-performance liquid chromatography DAD chromatogram ของแอนโทไซยานินที่สกัดจาก wide mulberry (*Morus nigra L.*) (แสดงพีคของ cy-3-glu = cyanidin 3-glucoside, cy-3-rut = cyanidin 3-rutinoside, pg = pelargonidin derivate [Hassimotto, M.A. และคณะ, 2008])

ช. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity, IC_{50}) การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay ดัดแปลงตามวิธีของ Brand-William, W. และคณะ (1995) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในด้านออกซิเดชันทำโดยเตรียมสารละลาย DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติค่อนข้างเสถียรชนิดหนึ่งเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย DPPH จะมีสีม่วงและสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตรโดย DPPH จะเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบ (AH) หรือ

อนุมูลอิสระ (R•) ดังสมการที่ (3.4) และ (3.5) สารละลาย DPPH จะเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีม่วงเป็นสีเหลืองส่งผลให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตรลดลง



การทดลองทำโดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรในเอทานอลบริสุทธิ์และเตรียมสารสกัดผลหม่อนโดยเจือจางเป็นลำดับเท่า (serial dilution) ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตรจากนั้นเติมเอทานอล 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วเติมสารละลาย DPPH 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันและบ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้ 30 นาที ในที่มีดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader และสารละลายที่ไม่ได้เติมสารละลาย DPPH เป็นสารละลายเปรียบเทียบกับ (blank) แล้วคำนวณหา antioxidant activity ในรูปของค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC₅₀ โดยสร้างกราฟระหว่าง % Inhibition DPPH กับความเข้มข้นของสารดังแสดงในภาคผนวก ข ตัวอย่างจากกราฟจะได้ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ คือค่า IC₅₀ ตามสมการ (3.6)

$$\% \text{ Inhibition DPPH} = \left(\frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \times 100 \dots\dots\dots (3.6)$$

โดยที่ OD_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

การรายงานผลกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีหน่วยเป็นร้อยละโดยปริมาตรของสารสกัดถ้าค่า IC₅₀ มีค่าน้อยแสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ ใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำก็สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% จากเริ่มต้น

ณ. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Colorimetric Method (DNS method) ดัดแปลงตามวิธีของ Miller, G.L. (1959) วิธีการนี้ใช้ทดสอบหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group, C=O) ในน้ำตาลรีดิวซ์ โดยสาร 3, 5 Dinitrosalicylic Acid (DNS) เป็นสารประกอบอะโรมาติก สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugars) และทำให้เกิดเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ภายใต้สภาวะความเป็นด่างซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 520-575 นาโนเมตรสามารถทำได้โดยเตรียมสารละลาย dinitrosalicylic acid 1% ดังนี้ เตรียมสาร DNS 1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตรและเตรียมสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.6 กรัมละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในสารละลาย DNS ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิจนกระทั่งสารละลายใสแล้วค่อยๆ เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 30 กรัมลงในสารละลายผสมที่ใสแล้วที่ละน้อยจนครบจากนั้นเติมโซเดียมซัลไฟต์ 0.05 กรัม และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรเก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง การทดลองใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐานโดยเตรียม stock solution ของสารละลายกลูโคสในน้ำกลั่นเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขั้นตอนการทดสอบนำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาณกลูโคส 500 ไมโครลิตรแล้วเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำเย็นทันทีจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองผสมสารให้เข้ากันจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปรียบเทียบ สารมาตรฐานทำเช่นเดียวกัน เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{520} (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (แกน X) แสดงกราฟในภาคผนวก ค จำนวนความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.3 การศึกษาความคงตัวในสารสกัดผลหม่อน

นำสารสกัดผลหม่อนไปให้ความร้อนโดยควบคุมให้สารสกัดอยู่ในสภาวะป้องกันแสงและอากาศแบบต่างๆ ต่อไปนี้

ก. ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ข. ทำปลอดเชื้อตามมาตรฐานอุตสาหกรรมอาหารโดยการใช้ความร้อน 2 แบบคือ กระบวนการพาสเจอร์ไรส์และการสเตอริไลส์ได้แก่ พาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT (Low temperature

long times) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, พาสเจอร์ไรส์แบบ HTST (High temperature short times) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที) และสเตอริไลส์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที [<http://www.fda.moph.go.th/>]

ค. สภาวะเร่งแบบ freeze-thaw cycling โดยนำตัวอย่างไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 46 ชั่วโมงจากนั้นนำมาละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงทำซ้ำจนครบ 4 รอบ [Regan, J. และ Mulvihill, D.M., 2010]

น้ำสกัดผลหมอนที่ผ่านกระบวนการเหล่านี้แล้วถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนติไฮ-ยานินทั้งหมดด้วย วิธี pH differential ตามรายละเอียดในข้อ 3.4.2 ฉ.

3.4.4 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Mesenchymal Stem Cells, MSCs)

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกถูกสกัดจากกระดูกต้นขาหลังของหนูวิสต้า (เพศเมีย อายุ 3 สัปดาห์) ซึ่งได้จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ตามวิธีของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2009) โดยผ่าเอากระดูกต้นขาหลังของหนูตั้งแต่บริเวณสะโพกเฉพาะเนื้อเยื่ออื่นออกให้สะอาดตัดที่ปลายทั้งสองข้างของกระดูกจะพบช่องไขกระดูกใช้เข็มเบอร์ 24 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร (alpha-modified eagle medium: α -MEM ที่มี 15 % FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) ชะล้างผ่านช่องไขกระดูกลงหลอดขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งก้อนไขกระดูกหลุดออกหมดทำสารแขวนลอยให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เข็มฉีดพ่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นดูดใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่อาหาร 3 มิลลิลิตรไว้เรียบร้อยแล้วทำการเพาะเซลล์ในสภาวะ 5 % CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 4 หลังจากการเพาะเซลล์เพื่อกำจัดเซลล์เม็ตเล็ดที่ไม่เกาะจานเลี้ยงเซลล์จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน ในวันที่ 7-10 หลังการเพาะเซลล์สามารถทำการแบ่งเซลล์ (subculture) ได้โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลลาร์ (pH 7.4) ที่มี 0.25 % โดยมวล trypsin และ 0.02 % โดยมวล EDTA อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ขยายจำนวนเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพอลิสไตรีนเพาะเลี้ยงให้จำนวนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 90 (ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 4 วัน) สำหรับการทดลองใช้เซลล์ใน passage ที่ 2-3 เท่านั้นเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

3.4.5 การศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

เพาะเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนเซลล์ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ใน 24 well-plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (Normal Medium, NM) ประกอบด้วย α -MEM, 15% FBS, 50 U/ml penicillin streptomycin ในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยเติมสารมาตรฐานไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G) และสารสกัดจากผลหม่อนให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรของปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน (มีการเติมสารสกัดหม่อนเพิ่มเพื่อให้ความเข้มข้นคงที่เมื่อมีการเปลี่ยนอาหาร) ตรวจสอบการยึดเกาะของเซลล์ (attachment) ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) ที่เวลา 1, 2, 3, 5 และ 7 วันกลุ่มการทดลองแบ่งเป็น 6 กลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่	ตัวย่อ	สารสกัดหม่อน (mg/ml)	สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (μ M)	หมายเหตุ
1	NM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เพื่อเป็น positive control
2	C3G50	-	50	-
3	C3G100	-	100	-
4	M50	2.5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 50 ไมโครโมลลาร์
5	M100	5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 100 ไมโครโมลลาร์
6	Zn	-	-	เติม Zn acetate 20 ppm

ก. จำนวนเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay หรือ (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay [Liu และคณะ, 2004] MTT มีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ tetrazolium มีสีเหลืองโดยที่ MTT ที่ถูกละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี phenol red จะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ formazan สีม่วงที่เนื่องจากการถูกทำลายวงแหวน tetrazolium ด้วยเอนไซม์ dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ผลิตภัณฑ์สีม่วงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้แต่สามารถละลายได้โดยใช้ตัวทำละลายเช่น dimethyl

sulfoxide (DMSO) สารละลายสีม่วงที่ได้จะถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณผลึก formazan ที่ถูกละลายออกมามีค่าแปรผันโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ แสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวก จ และคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth rate, μ) ดังสมการ (3.7) ถึง (3.12) และเวลาการแบ่งตัวที่คูณคือระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (Population Doubling Time, PDT) ดังสมการ (3.9), (3.11) และ (3.12) โดยการคำนวณทำในช่วง log phase (exponential growth phase) [Vunjak-Novakovic และคณะ, 2006] ดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ } \mu \text{ (ต่อชั่วโมง)} \quad \mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots (3.7)$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{x} dx \dots\dots\dots (3.8)$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1 \dots\dots\dots (3.9)$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)} \dots\dots\dots (3.10)$$

โดย X_1 คือจำนวนเซลล์ที่เวลา t_1

X_2 คือจำนวนเซลล์ที่เวลา t_2

เวลาแบ่งตัวที่คูณ T (ชั่วโมง) โดยที่ $T = t_2 - t_1$ และ $X_2 = 2X_1$

$$\text{จากสมการ (3.9)} \quad \mu T = \ln(2X_1) - \ln X_1 \dots\dots\dots (3.11)$$

$$T = \frac{\ln 2}{\mu} \dots\dots\dots (3.12)$$

ข. รูปร่าง (Morphology) ของเซลล์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon eclipse TS100, USA) ศึกษาลักษณะรูปร่าง และการยึดเกาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, 5 วัน และ 7 วัน

3.4.6 การศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

การศึกษาทำโดยการเพาะเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร [Ratanavaraporn, J. และคณะ, 2010] ใน 24 well-plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ

1. Normal Medium (NM): ประกอบด้วย α -MEM, 15% FBS, 50 U/ml penicillin streptomycin

2. Osteogenic Medium (OM): ประกอบด้วย α -MEM, 10% FBS, 50 U/ml penicillin streptomycin, 50 μ g/ml, L-ascorbic, 10^{-6} M dexamethasone และ 1 M β -glycerophosphate

เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 5 % CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยเติมสารมาตรฐาน ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G) และสารสกัดจากผลหม่อนให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 1 โดยปริมาตรของปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (มีการเติมสารสกัดหม่อนเพิ่มเพื่อให้ความเข้มข้นคงที่เมื่อมีการเปลี่ยนอาหาร) ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 6 กลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่	ตัวย่อ	สารสกัดหม่อน (mg/ml)	สารไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (μ M)	หมายเหตุ
1	NM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเพื่อเป็น negative control
2	C3G50	-	50	-
3	C3G100	-	100	-
4	M50	2.5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 50 ไมโครโมลลาร์
5	M100	5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 100 ไมโครโมลลาร์
6	OM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ OM เพื่อเป็น positive control

โดยมีการประมาณการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยวิเคราะห์
 สัญญาณการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกด้วยวิธีต่อไปนี้

ก. กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase, ALP) ซึ่งเป็น
 early marker ของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกวิเคราะห์เอนไซม์ ALP ภายในเซลล์ทำโดย
 การทำให้เซลล์แตกโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ด้วยการเติมสาร SDS lysis buffer
 1 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้ววัดกิจกรรมของเอนไซม์ใน
 cell lysate นั้นด้วยสาร p-nitrophenyl phosphate ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์โดยการเปิด
 สารมาตรฐานและสารตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตรใส่ลงในภาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุมแล้ว
 เติม p-nitrophenyl phosphate 100 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุด
 ปฏิกิริยาด้วยสารละลายไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 นอร์มัลปริมาตร 80 ไมโครลิตร
 และใช้สาร p-nitrophenol เจือจางในน้ำปราศจากไอออนความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62,
 0.31, 0.16 และ 0.08 มิลลิโมลลาร์เป็นสารมาตรฐาน แสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ข

จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร [Takahashi Y. และคณะ, 2005]
 รายงานผล ALP ต่อจำนวนเซลล์ ทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ข. ปริมาณการสะสมแคลเซียม ซึ่งเป็น late marker ของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์
 กระดูกวิเคราะห์โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงใน
 cell lysate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4
 ชั่วโมงเพื่อ กรดไฮโดรคลอริกจะช่วยย่อยแคลเซียมออกมาหลังจากนั้นเปิดสารตัวอย่างมา 10
 ไมโครลิตร ใส่ในภาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 48 หลุมเติมสารละลาย ethanolamine buffer ความ
 เข้มข้น 0.88 โมลลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ O-Cresolphthalein Complex Substrate
 (OCPC) ความเข้มข้น 0.63 มิลลิโมลลาร์ในกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใช้
 สารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลลาร์ในกรดไฮโดรคลอริกโดยมีปริมาณ
 แคลเซียมความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสาร
 มาตรฐาน โดยแสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ฉ แคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ OCPC ให้สาร
 สีม่วงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร [Takahashi และคณะ,
 2005] รายงานผลปริมาณแคลเซียมต่อจำนวนเซลล์ ทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์

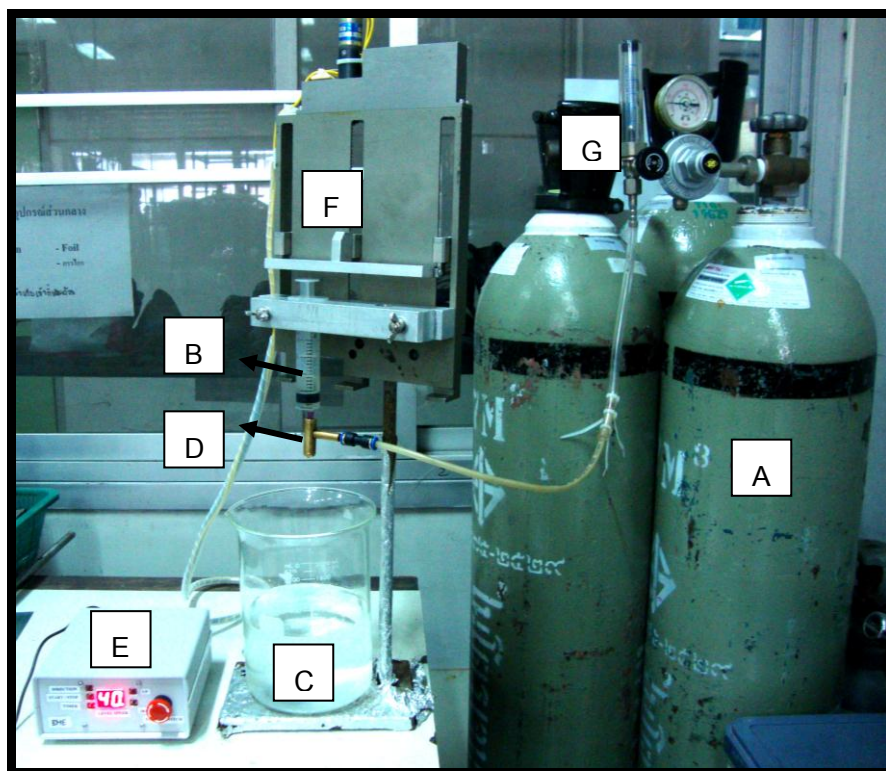
ค. จำนวนเซลล์ ด้วยวิธี DNA assay เป็นวิธีประมาณการเปลี่ยนแปลงของประชากร
 เซลล์ด้วยการใส่สารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติจับจำเพาะกับ DNA เช่น bisbenzidine (Hoechst) มี
 มวลโมเลกุลขนาด 533.88 และย้อมบริเวณเบส A-T ให้เรืองแสงได้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มี

การกระตุ้นด้วยความถี่ 340-380 นาโนเมตรและปลดปล่อยพลังงานแสงที่ 430-450 นาโนเมตร ทำได้โดยเตรียมสารมาตรฐานโดยใช้เซลล์เชื้อจางด้วย SDS ให้มีความเข้มข้น 1.56×10^4 , 3.12×10^4 , 6.25×10^4 , 1.25×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ cell lysate ของตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำ cell lysate ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย DNA ออกมาการนำตัวอย่างไปวัดให้นำ cell lysate มาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนและเตรียมสารละลาย Hoechst 33258 ซึ่งเตรียมได้โดยนำ Hoechst 33258 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร น้ำปราศจากไอออน 19 มิลลิลิตร และ SSC 1 มิลลิลิตร ผสมรวมกันจากนั้นบีบอัดสารละลายของสารมาตรฐานและตัวอย่างที่นำไปวัด ปริมาณ DNA ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในภาตสีดำขนาด 96 หลุมแล้วเติมสารละลาย Hoechst 33258 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรนำไปวัด fluorescence intensity ที่ 355 นาโนเมตร (excitation) และ 460 นาโนเมตร (emission) ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ [Takahashi Y. และคณะ 2005] โดยแสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ข

3.4.7 การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต

อนุภาคอนุภาคไมโครอัลจิเนตเตรียมโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตชนิด medium viscosity (Cat.A2033, บริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำปราศจากไอออนถูกปั่นจนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นกำจัด ฟองอากาศในสารละลายที่เตรียมได้โดยการใช้ปั๊มดูดอากาศและเตรียมสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตรขึ้นตอนการขึ้นรูปใช้กระบอกลอยตัวสารละลาย โซเดียมอัลจิเนตปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อกับเครื่องมือขึ้นรูปแบบ external gelation ดังรูปที่ 3.4 ต่อหัวสเปร์ย์ 3 ทางกับเข็มฉีดยาเบอร์ 24 หัวตัดต่อเข้ากับกระบอกลอยตัวที่ตำแหน่ง B และที่ ตำแหน่ง D ด้านตั้งฉากกับหัวสเปร์ย์ต่อกับสายยางและต่อเข้ากับหัวควบคุมแหล่งจ่ายแก๊ส ไนโตรเจนที่ตำแหน่ง G ตั้งบีกเกอร์ใส่สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ปริมาตร 1 ลิตร โดยมีระยะ จากหัวสเปร์ย์ถึงผิวสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 16 เซนติเมตรที่ตำแหน่ง C เปิดเครื่อง และปรับอัตราการกดของกระบอกลอยตัวขึ้นรูปโซเดียมอัลจิเนตลงอ่างแคลเซียมคลอไรด์ที่ ตำแหน่ง E พร้อมปรับอัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจนตำแหน่ง G ตัวควบคุมกระบอกลอยตัว ตำแหน่ง F จะคอยกดเลื่อนลงและสารละลายโซเดียมอัลจิเนตจะถูกพ่นลงมาในอ่างแคลเซียม คลอไรด์แช่และปั่นจนอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ได้ไว้ในอ่างแคลเซียมคลอไรด์ ประมาณ 30 นาที

เพื่อให้ภายในเป็นเจลทั้งหมดแล้วล้างด้วยน้ำ DI ประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดแคลเซียมคลอไรด์ ส่วนที่เหลือ จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



รูปที่ 3.4 อุปกรณ์การขึ้นรูปแบบ external gelation (A.แก๊สไนโตรเจน, B.สารละลายโซเดียมอัลจิเนต, C.สารละลายแคลเซียมคลอไรด์, D.หัวพ่นสารละลายโซเดียมอัลจิเนต, E.ปรับระดับความเร็วของอัตราการกดของหลอดฉีดยา, F.ตัวควบคุมอัตราการกดหลอดฉีดยา, G.ปรับอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน)

3.4.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไมโครอัลจิเนต

ก. รูปร่างของอนุภาคไมโครอัลจิเนตเป็ยก ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon, Eclipse 80i, Japan) ขนาดกำลังขยาย 4 เท่า

ข. ขนาดของอนุภาคไมโครอัลจิเนตเป็ยก วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK) นำอนุภาคไมโครอัลจิเนตประมาณ 0.5 กรัม ผสมในน้ำปราศจากไอออน อนุภาคถูกทำแขวนลอยและกระจายตัวไม่เกาะกลุ่มกันด้วยคลื่นอัลตราโซนิคเป็นเวลา 5 นาที และปั่นกวนสารแขวนลอยนี้ที่ความเร็ว 1,750 รอบต่อนาทีระหว่างการวิเคราะห์

ค. โครงสร้างสัณฐาน (Morphology) ของอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้ง โดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM-JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan) ดูลักษณะรูปร่าง พื้นผิวภายนอกและภายในของอนุภาค

ง. การดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้ง โดยชั่งน้ำหนักอนุภาคไมโครอัลจิเนตก่อนแช่น้ำ (W_0) ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในถุงตาข่ายขนาดเล็กที่ช่องของตาข่ายอนุภาคผ่านออกไม่ได้ และแช่ถุงที่บรรจุอนุภาคไมโครอัลจิเนตลงในน้ำปราศจากไอออนที่เวลาต่างๆ (ชั่วโมง) นำถุงออกมาชั่งน้ำที่ไม่ได้ถูกดูดซับด้วยกระดาษไม่มีชุย และชั่งน้ำหนักทันทีจะได้น้ำหนักหลังแช่น้ำปราศจากไอออน (W_w) จนน้ำหนักคงที่และสามารถหาค่าการดูดซับน้ำดังสมการที่ 3.13

$$\text{การดูดซับน้ำ (\%โดยน้ำหนัก)} = \frac{(W_w - W_d)}{W_d} \times 100 \dots\dots\dots (3.13)$$

จ. การดูดซับสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้ง โดยเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต (กรัม) แช่ในสารสกัดหม่อนโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืดและหาปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดหม่อนเริ่มต้นก่อนการดูดซับไว้ด้วยวิธีในข้อ 3.4.2 ฉ. จากนั้นนำตัวอย่างมาชั่งสารสกัดส่วนเกินออกด้วยกระดาษไม่มีชุย ชั่งน้ำหนักอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ดูดซับสารสกัดหม่อนไว้ได้ที่เวลาต่างๆ จนน้ำหนักเริ่มคงที่โดยระบุให้น้ำหนักอนุภาคไมโครอัลจิเนตก่อน คือ W_{d2} กรัม และหลังแช่สารสกัดหม่อนที่เวลา (ชั่วโมง) ต่างๆ คือ W_{w2} และสามารถหาค่าการดูดซับสารสกัดหม่อนดังสมการที่ 3.14 จากนั้นนำอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ดูดซับสารสกัดหม่อนไปทำแห้งด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่างที่แห้งให้พื้นแสง

$$\text{การดูดซับสารสกัดหม่อน (\%โดยน้ำหนัก)} = \frac{(W_{w2} - W_{d2})}{W_{d2}} \times 100 \dots\dots\dots (3.14)$$

ฉ. การตรวจสอบการดูดซับสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนต โดยนำอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ถูกดูดซับจากข้อ 3.4.8 จ. มาทดสอบโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5, 10, 20, 30 และ 60 นาที และถ่ายภาพดูลักษณะสีของสารสกัดหม่อนที่ถูกดูดซับไว้ในอนุภาคไมโครอัลจิเนต

3.4.9 ปริมาณแอนโธไซยานินที่ถูกบรรจุในอนุภาคไมโครอัลจิเนต

ปริมาณแอนโธไซยานินที่ถูกบรรจุในอนุภาคไมโครอัลจิเนตตาม 3.4.8 จ. สามารถหาปริมาณแอนโธไซยานินที่กักเก็บได้ตามวิธีดัดแปลงของ Tanon, R.V. และคณะ (2010) โดยนำอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่บรรจุสารสกัดหม่อนที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งแล้วปริมาณ 5 มิลลิกรัมมาสกัดซ้ำจำนวน 2 ครั้งด้วยสารละลายผสมของ กรดไฮดรอกลอลริค : น้ำปราศจากไอออน : เอทานอล (1:29:70) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ผสมสารละลายสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกอนุภาคไมโครอัลจิเนตออกจากสารละลายสกัดซึ่งจะได้ส่วนใสแยกชั้นกับอนุภาค จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ที่มีปริมาณแอนโธไซยานินไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 534 นาโนเมตรโดยนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณแอนโธไซยานินที่ทราบค่าแสดงกราฟในภาคผนวก ฎ เพื่อหาปริมาณแอนโธไซยานินที่ถูกบรรจุในอนุภาคไมโครอัลจิเนตรายงานผลเป็นปริมาณแอนโธไซยานิน(มิลลิกรัม) ต่อกกรัมของอนุภาคไมโครอัลจิเนต

3.4.10 ความคงตัวของแอนโธไซยานินในสารสกัดหม่อนที่ถูกกักเก็บในอนุภาคไมโครอัลจิเนต

ทดสอบความคงตัวของแอนโธไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 4, 40, 70, 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง และสภาวะการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที โดยสภาวะป้องกันแสงเพื่อไม่ให้แสงมีผลต่อความคงตัวแล้วนำไปทดสอบหาปริมาณสารแอนโธไซยานินทั้งหมด

3.4.11 ปัญหาทางจริยธรรมในการทดลอง

การทดสอบที่มีการใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกออกมาจากหนูวิสต้าจะมีการเสนอแผนงานวิจัยและได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนการดำเนินการโดยผู้วิจัยได้ปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด

3.4.12 การใช้สถิติในการวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูลโดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม 3 ซ้ำนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบอะโนวา (Anova) ด้วย

โปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ (Minitab system for Windows version 14, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} < 0.05$)

3.4.13 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวภาพ ชั้น 5 และห้องปฏิบัติการชีววัสดุ ชั้น 6 ตึกอาคารอนุสาสน์รัตนธรรม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ชั้น 9 ตึก อ.ป.ร. คณะแพทยศาสตร์ และอาคารจุฬาวิทย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ลักษณะกายภาพและเคมีของสารสกัดผลหม่อน

ผลหม่อนสายพันธุ์เซียงใหม่ (*Morus alba L.*) ที่นำมาใช้ในการศึกษานั้นมาจากแหล่งที่มาในประเทศไทยด้วยกัน 2 แหล่งคือ จากไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์ และจากสถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ ศูนย์ด่านเกวียน จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีลักษณะโดยทั่วไปของผลหม่อนดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะทั่วไปของผลหม่อนสายพันธุ์เซียงใหม่จากแหล่งปลูกจังหวัด (a) เพชรบูรณ์ (b) นครราชสีมา

ผลหม่อนจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์จะมีลักษณะผลที่ใหญ่ มีขนน้อย สีม่วงแดง ส่วนผลหม่อนจากแหล่งจังหวัดนครราชสีมาจะมีผลที่เล็กกว่า มีขนดก สีม่วงเข้มกว่า และผลหม่อนค่อนข้างมีความเหนียวมากกว่า แต่ลักษณะโดยรวมคล้ายคลึงกันคือ ผลหม่อนมีสีม่วง ผิวขรุขระ นอกจากลักษณะทั่วไปเมื่อนำผลหม่อนมาศึกษาลักษณะทางกายภาพ ดังตารางที่ 4.1 พบว่าผลหม่อนจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อผลเท่ากับ 2.53 ± 0.49 กรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลหม่อนของนครราชสีมาอย่างมีนัยสำคัญ โดยผลหม่อนที่ปลูกในนครราชสีมา มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.46 ± 0.51 กรัม แต่การที่ผลผลิตของหม่อนจากทั้งสองแหล่งมีน้ำหนักที่แตกต่างกันมากเนื่องจากผลหม่อนจากไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์นั้นได้มีการควบคุม ดูแล และพัฒนาการผลิตผลหม่อน

เป็นอย่างดีเพื่อให้ได้คุณภาพสูงในการจำหน่ายเชิงการค้า จึงทำให้ได้ผลหม่อนที่มีลูกโตและน้ำหนักมาก นอกจากผลหม่อนสดแล้วยังสามารถนำผลหม่อนไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dried) เพื่อง่ายต่อการเก็บรักษาและสามารถยืดอายุของผลหม่อนได้นานพบว่าผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งจากเพชรบูรณ์มีร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 14.27 ± 0.35 และจากนครราชสีมาเท่ากับ 22.19 ± 0.17 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าผลหม่อนที่ได้จากเพชรบูรณ์ มีปริมาณน้ำในผลหม่อนมากกว่าผลหม่อนจากนครราชสีมา คือมีปริมาณน้ำประมาณร้อยละ 85.8 ซึ่งผลหม่อนจากนครราชสีมาเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 77.8

ตาราง 4.1 สมบัติทางกายภาพของผลหม่อนสด

แหล่งของผลหม่อน สายพันธุ์เชียงใหม่	น้ำหนักเฉลี่ย ต่อผล(กรัม)	น้ำหนักแห้งของ ผลหม่อน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ปริมาณน้ำในผล (ร้อยละโดย น้ำหนัก)
เพชรบูรณ์ (<i>Morus alba</i>)	2.53 ± 0.49^a	14.27 ± 0.35^c	85.72 ± 0.35^e
นครราชสีมา (<i>Morus alba</i>)	1.46 ± 0.51^b	22.19 ± 0.17^d	77.82 ± 0.17^f

^{a-f} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของผลหม่อนแหล่งต่างๆ

เมื่อนำผลหม่อนสดจาก 2 แหล่งนำมาผ่านกระบวนการสกัดโดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ และแยกกากได้ส่วนใสของสารสกัดผลหม่อนสด และผลหม่อนจากแต่ละแหล่งนำมาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน ได้เป็นสารสกัดผงผลหม่อนสกัดแล้วนำมาศึกษาคุณลักษณะของสารสกัดที่ได้ทั้งทางกายภาพและเคมี ดังนี้

4.1.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อน

ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหม่อนของทั้งสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าสารสกัดหม่อนที่ได้มีค่าความหนาแน่นใกล้เคียงกับความหนาแน่นของน้ำซึ่งมีค่าประมาณ 1.0 กรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความหนาแน่นของสารสกัดหม่อนที่ได้

อยู่ในช่วง 0.971 ± 0.006 ถึง 1.012 ± 0.004 กรัมต่อมิลลิลิตร แสดงถึงความเป็นเนื้อเดียวกันของสารสกัดที่สามารถสกัดสารสำคัญที่ละลายในน้ำได้เท่านั้น จากนั้นเมื่อพิจารณาหาค่าความเป็นกรดต่าง หรือค่าพีเอช พบว่าสารสกัดหม่อนมีค่าเป็นกรดเล็กน้อยประมาณ 3.67 ถึง 4.31 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากผลหม่อนสดกับผงผลหม่อนสกัด พบว่าสารสกัดที่ได้จากผงผลหม่อนสกัดละลายในน้ำปราศจากไอออนมีค่าพีเอชสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ 3.67 ± 0.02 เป็น 4.04 ± 0.01 จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ และพีเอชสูงขึ้นจาก 4.08 ± 0.02 เป็น 4.31 ± 0.01 สำหรับแหล่งจังหวัดนครราชสีมา นอกจากนี้ยังมีการหาค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อนซึ่งแสดงค่าเป็น % Brix สารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งจังหวัดนครราชสีมาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดเท่ากับ 15.9 ± 0.08 % Brix และสารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.98 ± 0.12 % Brix ผลหม่อนที่ได้จากแหล่งนครราชสีมาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้สูงกว่าแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ เนื่องจากผลหม่อนจังหวัดนครราชสีมาปริมาณน้ำเป็นองค์ประกอบต่ำกว่าผลหม่อนจากเพชรบูรณ์ และในสารสกัดผงผลหม่อนพบว่าผลหม่อนจากทั้ง 2 แหล่งมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดผงผลหม่อนจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์เท่ากับ 7.68 ± 0.17 % Brix และ แหล่งนครราชสีมาเท่ากับ 7.70 ± 0.14 % Brix จากค่า % Brix ของผงผลหม่อนสกัดมีค่าใกล้เคียงกันเนื่องจากเกิดจากการเอาผงผลหม่อนปริมาณเท่ากันมาสกัดในน้ำในสัดส่วนที่เท่ากัน อีกทั้งค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้สอดคล้องกับค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งของสารสกัด สารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งเพชรบูรณ์มีค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.19 ± 0.03 และนครราชสีมาร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 17.47 ± 0.03 สำหรับสารสกัดผงผลหม่อนพบว่าร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 6.59 ± 0.99 และ 7.48 ± 0.04 จากแหล่งเพชรบูรณ์และนครราชสีมาตามลำดับ และมีรายงานวิจัยศึกษาสมบัติทางกายภาพของผลหม่อน *Morus alba* เพาะปลูกในแถบประเทศตุรกี พบว่าผลหม่อนมีน้ำหนักเฉลี่ย 3.49 กรัม น้ำหนักแห้งของผลหม่อนร้อยละ 29.5 ค่าพีเอช 5.6 และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดร้อยละ 20.4 จะเห็นว่ามี ความแตกต่างทางด้านสมบัติทางกายภาพแม้จะเป็นผลหม่อนสปีชีส์เดียวกันอันเนื่องจากหลายปัจจัย อาทิ ความแตกต่างของสายพันธุ์ ระยะเวลาเก็บเกี่ยว การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตของผลหม่อน [Ercisli, S. และ Orhan, E., 2007]

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางกายภาพของสารสกัดหม่อน

ชนิดสารสกัด	แหล่งผลหม่อน	ความหนาแน่น (กรัมต่อมิลลิลิตร)	pH	Total soluble solids (% Brix)	ร้อยละของน้ำหนักรักษา
ผลหม่อนสด	เพชรบูรณ์	0.986±0.001 ^{a,b}	3.67±0.02 ^c	9.98±0.12 ^f	11.19±0.03 ⁱ
	นครราชสีมา	1.012±0.004 ^b	4.08±0.02 ^d	15.9±0.08 ^g	17.47±0.03 ^j
ผงผลหม่อน	เพชรบูรณ์	0.988±0.016 ^{a,b}	4.04±0.01 ^c	7.68±0.17 ^h	6.59±0.99 ^k
	นครราชสีมา	0.971±0.006 ^a	4.31±0.01 ^e	7.70±0.14 ^h	7.48±0.0 ^k

^{a-k} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสารสกัดผลหม่อนชนิดต่างๆ

การวัดสีของสารสกัดผลหม่อนทั้งสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด โดยใช้เครื่องมือ colorimeter รายงานผลเป็นค่า L*, a* และค่า b* โดยค่า L* แสดงค่าความสว่างถ้าใกล้ 100 แสดงว่าสว่างมาก ค่า a* แสดงค่าสีแดงกับสีเขียวถ้าค่า a* มีค่าเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีแดงและถ้าค่า a* มีค่าเป็นลบแสดงว่าวัตถุมีสีเขียว ค่า b* แสดงค่าสีเหลืองกับสีน้ำเงินถ้าค่า b* มีค่าเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีเหลือง และถ้าค่า b* มีค่าเป็นลบแสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงิน ดังตารางที่ 4.3 พบว่าสารสกัดหม่อนมีค่า L* ต่ำกว่า 100 มากแสดงถึงสีของสารสกัดมีความสว่างต่ำเมื่อเทียบกับระหว่างสารสกัดผลหม่อนสดกับผงผลหม่อนสกัดพบว่าสารสกัดที่ได้จากผลหม่อนสดจะมีค่าความสว่างสูงกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดผลหม่อนสดจาก 2 แหล่งมีความสว่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณา ค่า a* ของสารสกัดผลหม่อนที่ได้มีค่าเป็นบวกแสดงถึงลักษณะสารสกัดค่อนข้างจะเป็นสีแดง ซึ่งสารสกัดหม่อนจากแหล่งเพชรบูรณ์มีสีแดงมากกว่านครราชสีมา ในส่วนของค่า b* ซึ่งมีค่าติดลบมากแสดงว่าสารสกัดที่ได้จะมีสีในโทนสีน้ำเงิน สารสกัดหม่อนสดมีสีน้ำเงินมากกว่าผงผลหม่อนสกัด และสารสกัดจากแหล่งนครราชสีมาสีน้ำเงินมากกว่าเพชรบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามสรุปไม่ได้ว่าผลหม่อนของนครราชสีมาสีเข้มกว่าเพชรบูรณ์ระยะการเก็บผลหม่อนมีผลต่อสีของผลหม่อนที่ได้ มนต์วีดี นุ่นเจริญ และศศิธร ตรงจิตภักดี พบว่าระยะการเจริญเติบโตของผลหม่อนมีลักษณะสีแตกต่างกัน คือถ้าเป็นผลหม่อนสุกเต็มที่จะได้ผลหม่อนสีม่วง

เข้ม และมีผลทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานิน ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าผลหม่อนระยะก่อนสุก [มนต์วดี หุ่นเจริญ และศศิธร ทรงจิตภักดี, 2553] และงานวิจัยของ Aramwit, P. และคณะ (2010) พบว่าสีของผลลูกหม่อนมีผลทำให้คุณลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลหม่อนแตกต่างกัน รวมถึงปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย ดังนั้นในการนำผลหม่อนมาศึกษานั้น สีเป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการควบคุมสมบัติทางเคมีและกายภาพ จึงควรเก็บผลหม่อนที่มีลักษณะสีเดียวกัน ของในแต่ละสายพันธุ์เนื่องจากสีแสดงถึงระยะการสุกของผลหม่อน โดยเฉพาะถ้าต้องการปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารสำคัญในผลหม่อนสูงควรเก็บผลหม่อนในระยะสุกจะดีที่สุด ดังนั้นผลหม่อนที่มีสีโทนน้ำเงินเข้มในผลหม่อนนครราชสีมา แสดงว่ามีระยะการสุกมากกว่าเนื่องจากมีน้ำตาลมากกว่า และน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นของสารแอนโทไซ-ยานิน [Gonzalez-SanJose, M.L., 1992] การผลิตแอนโทไซยานินของหม่อนทำให้การแสดงออกของสีผลหม่อนมีสีเข้มได้ จากสีจางกว่าได้เบื้องต้นว่าปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้จากหม่อนทั้ง 2 แหล่งแตกต่างกัน

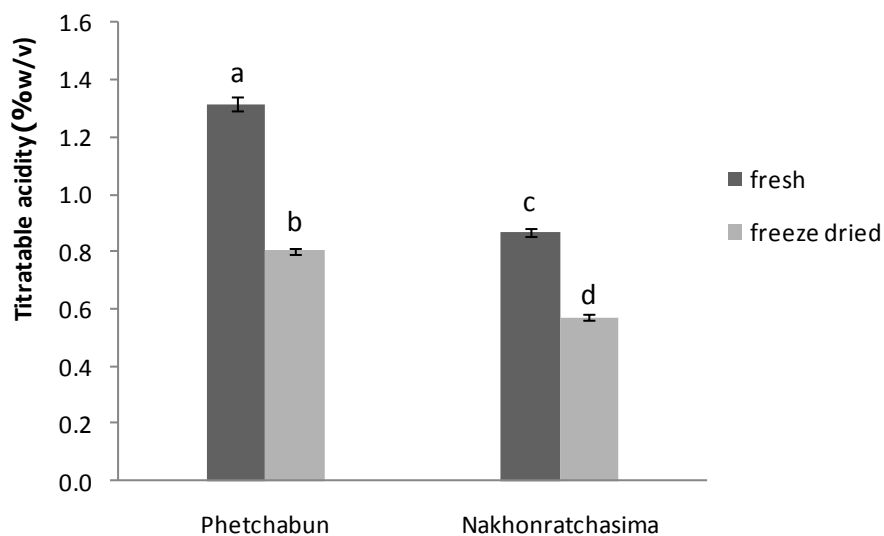
ตารางที่ 4.3 สี ระบบ L*, a* และ b* ของสารสกัดผลหม่อน

ชนิดสารสกัด	แหล่งผลหม่อน	สี		
		L* (ค่าความสว่าง)	a* (ค่าสีแดง)	b* (ค่าสีน้ำเงิน)
ผลหม่อนสด	เพชรบูรณ์	20.45±0.28 ^{b,c}	2.19±0.11 ^d	-2.17±0.07 ^e
	นครราชสีมา	20.83±0.27 ^b	2.00±0.11 ^d	-2.23±0.05 ^{e,g}
ผงผลหม่อน	เพชรบูรณ์	20.03±0.15 ^{a,c}	2.21±0.17 ^d	-2.20±0.06 ^e
	นครราชสีมา	19.80±0.20 ^a	2.07±0.11 ^d	-2.33±0.05 ^{f,g}

^{a-g} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสารสกัดผลหม่อนชนิดต่างๆ

4.1.2 ลักษณะทางเคมีของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด

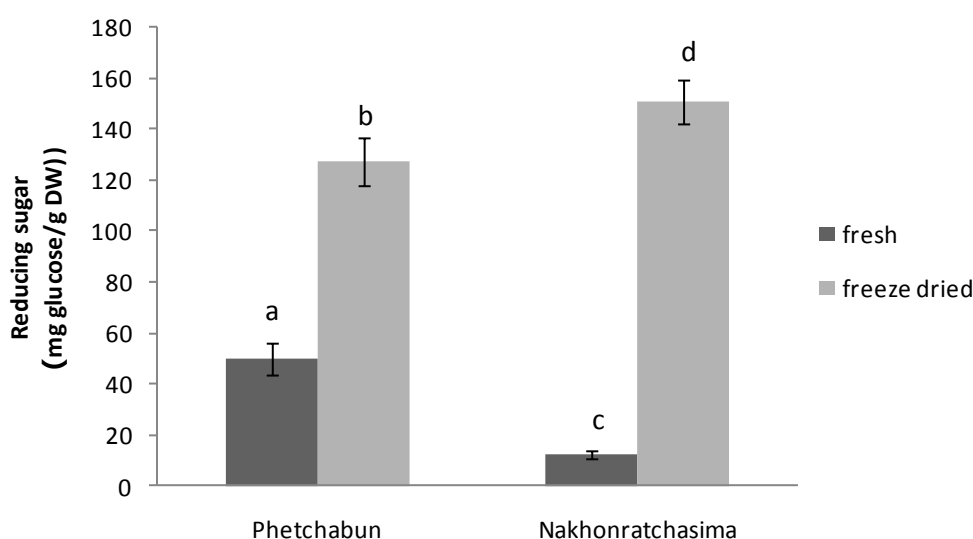
การศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดผลหม่อน ในที่นี้จะพิจารณาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้น้ำตาลรีดิวซ์ และสาระสำคัญซึ่งเป็นสารสีที่สามารถละลายน้ำได้ พบปริมาณสูงในผลไม้สีเข้มทั่วไปคือ สารแอนโทไซยานินเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง อีกทั้งยังได้มีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลหม่อน ดังรูปที่ 4.2 พบว่ากรดในน้ำผลหม่อนสกัดจากการใช้เทคนิคการไทเทรตหาปริมาณกรด ซึ่งในที่นี้ คือกรดซิตริกในสารสกัดผลหม่อนสดมีปริมาณกรดที่ไทเทรตได้สูงกว่าในผงผลหม่อนสกัด คือ แหล่งเพชรบูรณ์มีปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ร้อยละ 1.32 ± 0.02 และ 0.80 ± 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารสกัดหม่อนสดและสารสกัดผงผลหม่อนสกัดตามลำดับ และปริมาณกรดที่ไทเทรตของสารสกัดจากแหล่งนครราชสีมา มีร้อยละ 0.87 ± 0.02 และ 0.57 ± 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดตามลำดับเช่นกัน สารสกัดผลหม่อนที่ได้จากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์จะมีปริมาณกรดที่สูงกว่าจากแหล่งนครราชสีมา ซึ่งปริมาณกรดที่ไทเทรตได้นี้สอดคล้องกับค่าพีเอชในตารางที่ 4.2 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในสารสกัดหม่อนสูงจะมีค่าพีเอชต่ำ สารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดของแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ที่มีปริมาณกรดสูงกว่านครราชสีมาเป็นเพราะความแตกต่างของระยะสุกของผลหม่อนจะเห็นได้จากสีของเพชรบูรณ์ที่มีลักษณะหม่อนสีม่วงแดงในขณะที่หม่อนจากนครราชสีมาเป็นสีม่วงเข้มจึงเป็นไปได้ที่ผลหม่อนจากเพชรบูรณ์ยังมีระยะสุกไม่เต็มที่จึงมีปริมาณกรดที่สูงกว่า



รูปที่ 4.2 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา โดยที่ a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาปริมาณน้ำตาลในสารสกัดหม่อนเนื่องจากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นในการเกิดแอนโทไซยานิน Ozgen, M. และคณะ (2009) ได้รายงานว่ามีน้ำตาลชนิดหลักอยู่ 2 ชนิดคือ กลูโคสและฟรุคโตส ประมาณร้อยละ 52 และ ร้อยละ 48 ตามลำดับ ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวิซ์ และอีกร้อยละ 1 ที่พบน้อยมากคือน้ำตาลซูโครส จากน้ำตาลชนิดหลักที่พบในผลหม่อนทำให้ในงานวิจัยนี้ได้หาปริมาณน้ำตาลที่พบในสารสกัดโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.3 สารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ 50.13 ± 6.25 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ผงผลหม่อนสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ 127.26 ± 9.29 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และแหล่งจังหวัดนครราชสีมา สารสกัดผลหม่อนสดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ 12.25 ± 1.22 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และสารสกัดผงผลหม่อนแห้งเท่ากับ 150.55 ± 8.56 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทุกกลุ่มสารสกัด โดยเฉพาะผงผลหม่อนสกัดที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์สูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดมากเนื่องจาก ผงผลหม่อนสกัดเกิดจากการทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงมีการดึงน้ำออกจากผลหม่อนหมดทำให้มีน้ำตาลยังคงอยู่ในปริมาณสูงในสถานะแห้ง เมื่อนำมาผ่านกระบวนการสกัดด้วยน้ำจึง

ทำให้สารสกัดที่ได้จากผงผลหม่อนสกัดมีปริมาณน้ำตาลที่สูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดมาก สิ่งที่น่าสนใจก็คือสารสกัดหม่อนที่มีค่าพีเอชสูงจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงเช่นกัน อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่สอดคล้องกับค่า Brix เนื่องจาก Brix เป็นค่าที่ใช้บอกความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลายมักใช้วัดในน้ำผลไม้หรือน้ำผลไม้เข้มข้น การวัดค่า Brix เป็นการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายอยู่รวมทั้งหมด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส วิตามิน กรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริกและแร่ธาตุต่างๆ [Chang, W.K. และคณะ, 2002] โดยวัดค่าดัชนีหักเหของแสงเมื่อเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางด้วย refractometer ถ้าในสารสกัดมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่างกัน เมื่อแสงส่องผ่านจะเกิดการหักเหและให้ค่าดัชนีหักเหของแสงต่างกัน ซึ่งในสารสกัดหม่อนยังมีองค์ประกอบอื่นที่ละลายน้ำได้อยู่เช่นกัน

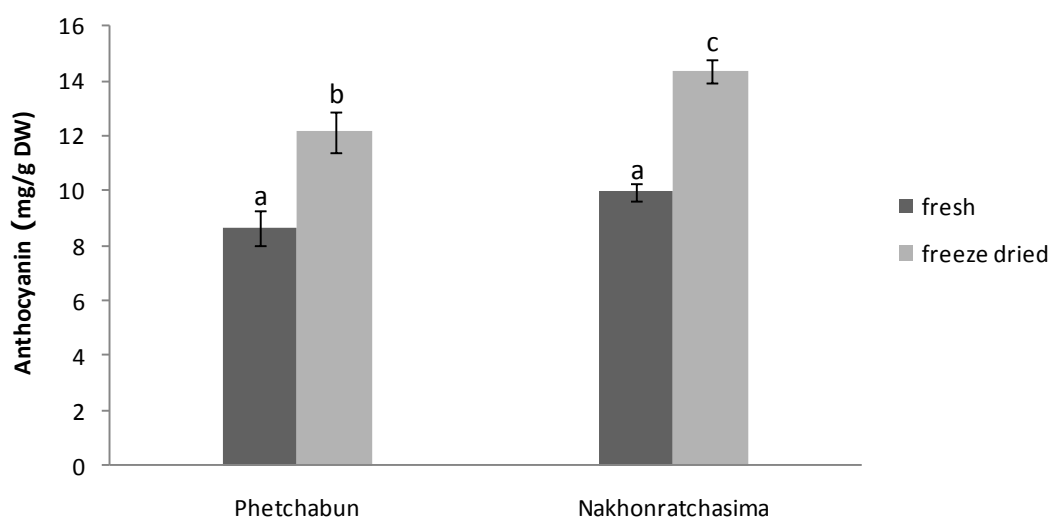


รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด จากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา โดยที่ a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดด้วยวิธี HPLC ดังรูปที่ 4.4 พบว่าสารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งเพชรบูรณ์มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเท่ากับ 8.67 ± 0.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งและสารสกัดผงผลหม่อนสกัดเท่ากับ 12.14 ± 0.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งและในสารสกัดหม่อนจากแหล่งนครราชสีมาที่มีปริมาณ

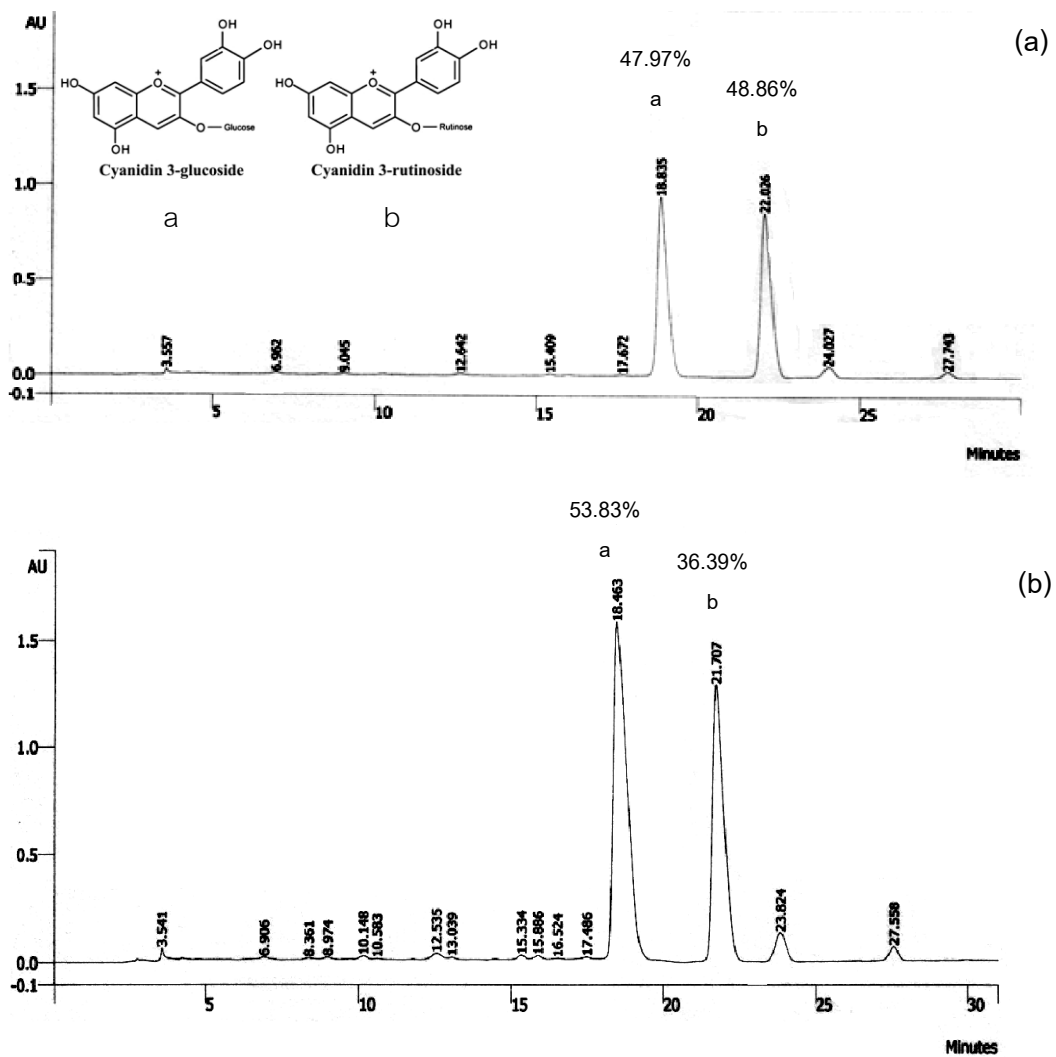
แอนโทไซยานิน 9.96 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 14.35 ± 0.43 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดตามลำดับ จากงานวิจัยของมนต์วดี และ ศศิธร (2551) สกัดผลหม่อนพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มพี-42-1 ด้วยเมทานอลร้อยละ 50 ผสมกับกรด ไฮโดรคลอริกร้อยละ 1 พบว่าสารสกัดหม่อนที่ได้มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเท่ากับ 18.43 มิลลิกรัมต่อกรัมหม่อนแห้ง มีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าในงานวิจัยดังกล่าว เนื่องจากการใช้ ตัวทำละลายด้วยเมทานอลสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าน้ำทำให้ได้สารประเภท ฟีนอลิกที่สูงขึ้น [Arabshahi-Delouee, S. และ Urooj, A., 2007]

นอกจากนี้รายงานที่ Aramwit, P. และคณะ (2010) วิเคราะห์น้ำคั้นหม่อนสดสายพันธุ์ เชียงใหม่ (*Morus alba L.*) จากไร่กำนันจุล เพชรบูรณ์ พบว่าสีของผลหม่อนมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานิน โดยผลหม่อนสีแดงมีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 13.48 มิลลิกรัมต่อกรัมหม่อนแห้ง ผลหม่อนสีม่วงแดง 44.92 มิลลิกรัมต่อกรัมหม่อนแห้ง และผลหม่อนสีม่วง 76.36 มิลลิกรัมต่อกรัมหม่อนแห้ง สรุปว่าหม่อนที่มีสีโทนม่วงจะมีปริมาณแอนโทไซยานินที่สูงกว่า จากงานวิจัยดังกล่าวมีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ คือค่า b^* ของสารสกัดผงผลหม่อนมีค่าติดลบสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดและอีกทั้งสารสกัดทั้งสองชนิดจากแหล่งจังหวัดนครราชสีมา มีค่า b^* ติดลบสูงกว่าแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ แสดงว่าสารสกัดผลหม่อนจากแหล่งนครราชสีมา มีสีโทนน้ำเงินมากกว่าจากเพชรบูรณ์และทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินที่พบจากแหล่งนครราชสีมาสูงกว่าเพชรบูรณ์ประมาณร้อยละ 25 ซึ่งแอนโทไซยานินนี้นอกจากเป็นสารสำคัญที่พบในผลหม่อนแล้วยังมีการรายงานที่พบแอนโทไซยานินในผลไม้ชนิดต่างๆมากมายได้แก่ น้ำผลไม้ส้มสีเลือด 87.4 มิลลิกรัมต่อลิตร [Kirca, A. และ Cemeraglu, B., 2003] น้ำผลไม้แบล็คเบอร์รี่ 400.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [Wang, W.D. และ Xu, S.Y., 2007] น้ำผลไม้แครอทดำ 439 มิลลิกรัมต่อลิตร [Kirca, A. และคณะ, 2007] ถั่วดำ 0.8-1.4 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง [Lee, I.H. และคณะ, 2007]



รูปที่ 4.4 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมาโดยใช้วิธี HPLC โดยที่ a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค HPLC ได้ผลดังรูปที่ 4.5 แหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์และนครราชสีมา พบว่าสารสกัดผลหม่อนมีสารแอนโทไซยานินหลัก 2 ชนิดคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) พบในพีคแรกและไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (cyanidin-3-rutinoside) ซึ่งพบในพีคที่สองที่เวลา 18.835 และ 22.026 นาที ของสารสกัดหม่อนสดจากแหล่งเพชรบูรณ์ มีปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ร้อยละ 47.97 และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ร้อยละ 48.86 และที่เวลา 18.463 และ 21.707 นาที พบไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ร้อยละ 53.83 และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ร้อยละ 36.39 ของสารสกัดหม่อนสดจากแหล่งนครราชสีมา ตามลำดับ เป็นไปตามรายงานการวิจัยของการสกัดผลหม่อนพบว่าแอนโทไซยานินส่วนใหญ่ที่พบคือไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ รองมาคือ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ [Qin, C. และคณะ, 2010][Bae, S.H. และ Shu, H.J., 2007][มนต์วีดี และศศิธร, 2553]



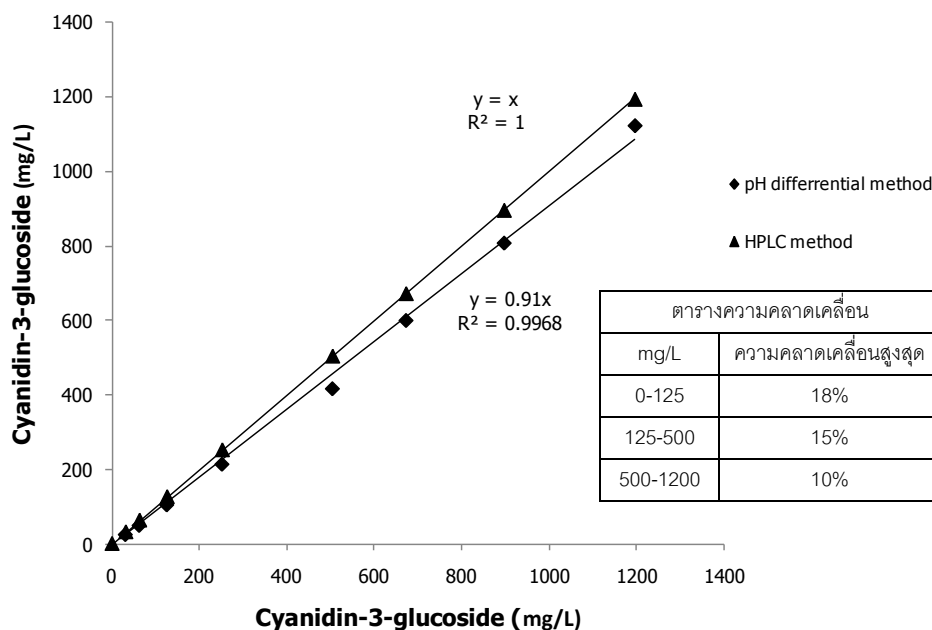
รูปที่ 4.5 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดจาก (a) เพชรบูรณ์ (b) นครราชสีมา, ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ 20 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ C-18 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าดูดกลืนแสง 530 นาโนเมตร ภูมิภาคเคลื่อนที่คือตัวทำละลาย A 1.5% H_3PO_4 , 20% HOAc, 25% MeCN ในน้ำ และตัวทำละลาย B 1.5% H_3PO_4 ในน้ำ [มนต์วีดี และศศิธร, 2553] พบพีคหลักคือ a: ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่เวลาประมาณ 18 นาที, และพีค b: ไชยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ที่เวลาประมาณ 22 นาที

จากพีคของแอนโทไซยานินทั้งสองที่พบทั้งในสารสกัดจากแหล่งเพชรบูรณ์และนครราชสีมา จะเห็นว่าผลหม่อนจากนครราชสีมามีความสูงของพีคที่สูงกว่าแหล่งเพชรบูรณ์ และมีแอนโทไซยานินชนิดไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในปริมาณมากกว่าไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ในขณะที่ผลหม่อนจากเพชรบูรณ์มีแอนโทไซยานินทั้งสองชนิดในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้แอนโทไซยานินทั้ง 2 ชนิด ที่สามารถวิเคราะห์พบได้ในผลหม่อนแล้วยังสามารถพบแอนโทไซยานินชนิดดังกล่าวและชนิดอื่นที่ไม่ได้ถูกวิเคราะห์พบในผลหม่อนแต่สามารถพบได้ในผลไม้ชนิดอื่นได้แก่เบอร์รี่ มีแอนโทไซยานินชนิด ฟิลาโรโกนิน-3-รูทีโนไซด์ ประมาณร้อยละ 83 และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ประมาณร้อยละ 13 ของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด [Longo, L. และ Vasapillo, G., 2006] สตรอเบอร์รี่ พบแอนโทไซยานินชนิดหลักคือ ฟิลาโรโกนิน-3-กลูโคไซด์ ประมาณร้อยละ 77-90, ฟิลาโรโกนิน-3-รูทีโนไซด์ ร้อยละ 6-11 และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ร้อยละ 3-10 [Silva, L.D. และคณะ, 2007] ถั่วเหลืองสีดำ พบแอนโทไซยานิน หลัก 5 ชนิด คือเดลฟินิดิน-3-กลูโคไซด์, ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์, ฟิลาโรโกนิน-3-กลูโคไซด์, ฟิลาโรโกนิน-3-กลูโคไซด์ และไซยานิดิน [Lee, J.H. และคณะ, 2009] เป็นต้น

เมื่อพิจารณาการทำแห้งแบบเยือกแข็งของผลหม่อนที่มีต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด พบว่าการทำแห้งเยือกแข็งของผลหม่อนเมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่าประมาณ -20 องศาเซลเซียสแล้วนำไปทำแห้งภายใต้สุญญากาศ น้ำที่เกิดเป็นผลึกจะเกิดการระเหิดออกทำให้เกิดการสูญเสียน้ำไปทั้งหมด ค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งของผลหม่อนสดจากเพชรบูรณ์เท่ากับร้อยละ 14.27 และผลหม่อนสดจากนครราชสีมาเท่ากับร้อยละ 22.19 ดังนั้นเกิดการสูญเสียน้ำไปร้อยละ 85.73 และร้อยละ 77.81 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) พบว่าผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำแห้งเยือกแข็งแล้วนำมาสกัดสารสกัดผลหม่อนด้วยน้ำทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดของผลหม่อนสกัดสูงกว่าสารสกัดจากผลหม่อนสดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการทำแห้งเป็นการระเหิดน้ำออกแต่สารสำคัญนั้นที่จริงมีอยู่ที่ผิวกับส่วนของเนื้อผลหม่อนมากกว่าซึ่งการสูญเสียน้ำในจำนวนหนึ่งแต่กลับทำให้สารแอนโทไซยานินที่ได้มีมากกว่าในปริมาณสูง Gonzalez-SanJose, M L. (1992) รายงานว่าน้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของแอนโทไซยานิน และสารประกอบโพลีฟีนอลหลายชนิดมีความเข้มข้นสูงที่บริเวณเปลือก (skin) ของผลองุ่นซึ่งมีสีแดงเข้มมากกว่าในน้ำคั้น ในกรณีของผลหม่อนก็น่าจะเป็นไป

ทำนองเดียวกัน เนื่องจากในผลผลิตหม่อนสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิฟสูงกว่าสารสกัดผลผลิตหม่อนสดมาก จึงมีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินในผลผลิตหม่อนสกัดที่ได้จากการทำแห้งแข็งผลผลิตหม่อนทั้งผลสูงกว่าในน้ำคั้นจากผลสดที่มีการแยกกากซึ่งมีเปลือกเป็นองค์ประกอบจำนวนมากออกมากจึงเป็นไปได้ว่าการบริโภคหม่อนทั้งผลหรือส่วนเปลือกจะได้รับแอนโทไซยานินมากกว่าการบริโภคสารสกัดที่ผ่านกระบวนการกรองเอากากออก

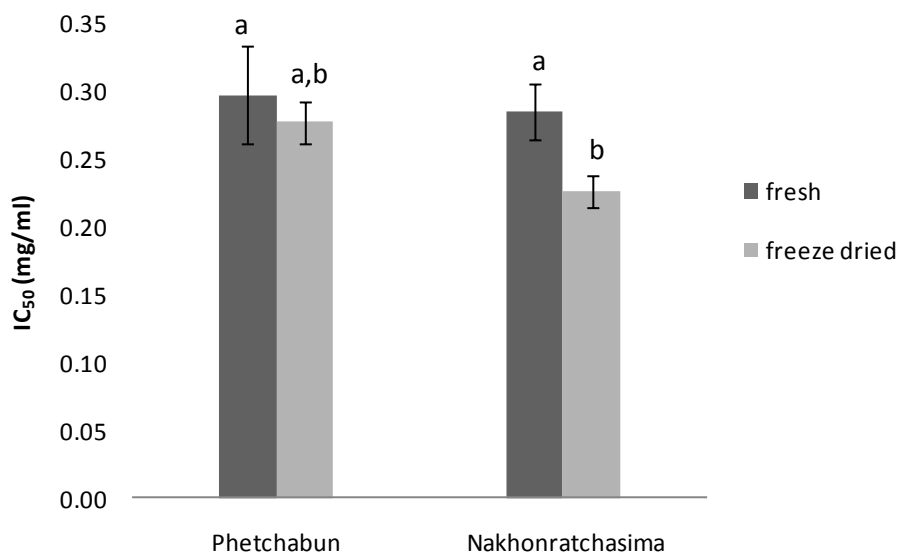
การหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากวิธี pH-differential เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และมีการนำไปใช้ในงานวิจัยต่างๆ จำนวนมากต่างจากเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้วิธี pH-differential ในการหาปริมาณแอนโทไซยานินและนำ HPLC มาเปรียบเทียบค่าความคลาดเคลื่อนของวิธีดังกล่าวนี้ดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าในช่วงที่ปริมาณแอนโทไซยานินต่ำกว่า 125 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธี pH-differential กับ HPLC มีค่าความคลาดเคลื่อนประมาณร้อยละ 18 แต่ช่วงปริมาณแอนโทไซยานิน 125-500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าวิธี pH-differential กับ HPLC มีค่าความคลาดเคลื่อนต่างกันประมาณร้อยละ 15 และช่วงที่ปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่า 500 มิลลิกรัม ค่าความคลาดเคลื่อนประมาณร้อยละ 10 อาจมีสาเหตุมาจากทั้ง 2 วิธีมีการประมาณค่าที่ต่างกัน คือ HPLC ใช้การประมาณค่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากพื้นที่ใต้พีคของแอนโทไซยานินชนิดเดียวคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ในขณะที่ pH-differential เป็นการประมาณจากสูตรการคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสภาวะพีเอช 1.0 ที่แอนโทไซยานินคงตัวสูงสุด และพีเอช 4.5 แอนโทไซยานินเสื่อมสลายมากที่สุด [Durst, R.W. และ Wrolstad, R.E. 2005] ซึ่งในสารสกัดผลผลิตหม่อนมีแอนโทไซยานินมากกว่าหนึ่งชนิด การวิเคราะห์ผลที่ใช้ในงานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในช่วงที่สูงกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่การศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ ค่าจะอยู่ครอบคลุมในทุกช่วง เนื่องจากแอนโทไซยานินมีการเสื่อมสลายไป อย่างไรก็ตามค่าที่วัดได้จากวิธี pH differential ที่ได้ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบเทคนิควิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินของวิธี pH differential (◆) กับวิธี HPLC (▲) ซึ่งใช้สารละลายไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในน้ำปราศจากไอออนในการเปรียบเทียบ

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเป็นที่ทราบกันดีว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถจับกับอนุมูลอิสระของปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อเปลี่ยนให้โครงสร้างของอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวขึ้น สำหรับผลของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำหม่อนทำโดยพิจารณาจากค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC_{50} ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่สามารถบอกประสิทธิภาพของ ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระได้ครั้งหนึ่งดังรูปที่ 4.7 พบว่า แหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ สารสกัดผลหม่อนสดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดผงผลหม่อน พิจารณาจากปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) จากค่า IC_{50} ความเข้มข้นที่น้อยกว่าคือ 0.28 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดผงผลหม่อน และ 0.30 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดผลหม่อนสดซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สำหรับสารสกัดจากแหล่งนครราชสีมาพบว่าฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผงผลหม่อนเท่ากับ 0.23 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดผลหม่อนสดเท่ากับ 0.29 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัดผงผลหม่อนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 แหล่งที่มาพบว่าสาร

สกัดผลหม่อนสดจากจังหวัดนครราชสีมาและเพชรบูรณ์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สำหรับสารสกัดผลหม่อน ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากนครราชสีมาต่ำกว่าแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ หมายถึงสารสกัดจากนครราชสีมามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระนั้น สอดคล้องกับปริมาณแอนโทไซยานินที่พบเนื่องจากแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามนอกจากสารแอนโทไซยานินแล้วในหม่อนสกัดยังมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบอื่นหลายชนิด ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อนโดยทั่วไปมีแอนโทไซยานินอยู่ประมาณร้อยละ 60-80 อีกประมาณร้อยละ 20-40 เป็นสารสำคัญชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในผลไม้ [Arabshahi-Delouee, S. และUrooj, A., 2007] จากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดผลหม่อนสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าผลหม่อนสดซึ่งพิจารณาต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัด เพราะการสกัดหม่อนแห้งสกัดโดยน้ำจึงสามารถสกัดสารสำคัญชนิดอื่นนอกจากแอนโทไซยานินที่สามารถละลายในน้ำได้มากกว่าแต่เนื่องจากสารสกัดหม่อนสดได้จากการคั้นน้ำซึ่งอาจมีสารสำคัญตัวอื่นที่ละลายอยู่ในน้ำคั้นที่ต่ำกว่า



รูปที่ 4.7 ค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC_{50} ของสารสกัดผลหม่อนสดและผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์และนครราชสีมา โดยที่ a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุปปริมาณกรด ปริมาณแอนโทไซยานิน และค่า IC₅₀ ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด จากทั้งสองแหล่งปลูกดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สรุปสมบัติทางเคมีของสารสกัดผลหม่อน

ชนิดสารสกัด	จังหวัด แหล่งปลูก ผลหม่อน	ปริมาณกรดที่ไทเทรต (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)	IC ₅₀ (มิลลิกรัมของสาร สกัดหม่อนต่อ มิลลิลิตร)
ผลหม่อนสด	เพชรบูรณ์	1.32±0.02 ^a	50.13±6.25 ^e	8.67±0.63 ⁱ	0.30±0.0 ^l
	นครราชสีมา	0.87±0.02 ^b	12.25±1.22 ^f	9.96±0.32 ⁱ	0.29±0.02 ^l
ผงผลหม่อน	เพชรบูรณ์	0.80±0.01 ^c	127.26±9.29 ^g	12.14±0.77 ^j	0.28±0.02 ^{l,m}
	นครราชสีมา	0.57±0.01 ^d	150.55±8.56 ^h	14.35±0.43 ^k	0.23±0.01 ^m

^{a-m} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p< 0.05)

4.2 ศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของแอนโธไซยานินและสารสกัดผงผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูวิสตาในระดับห้องปฏิบัติการ

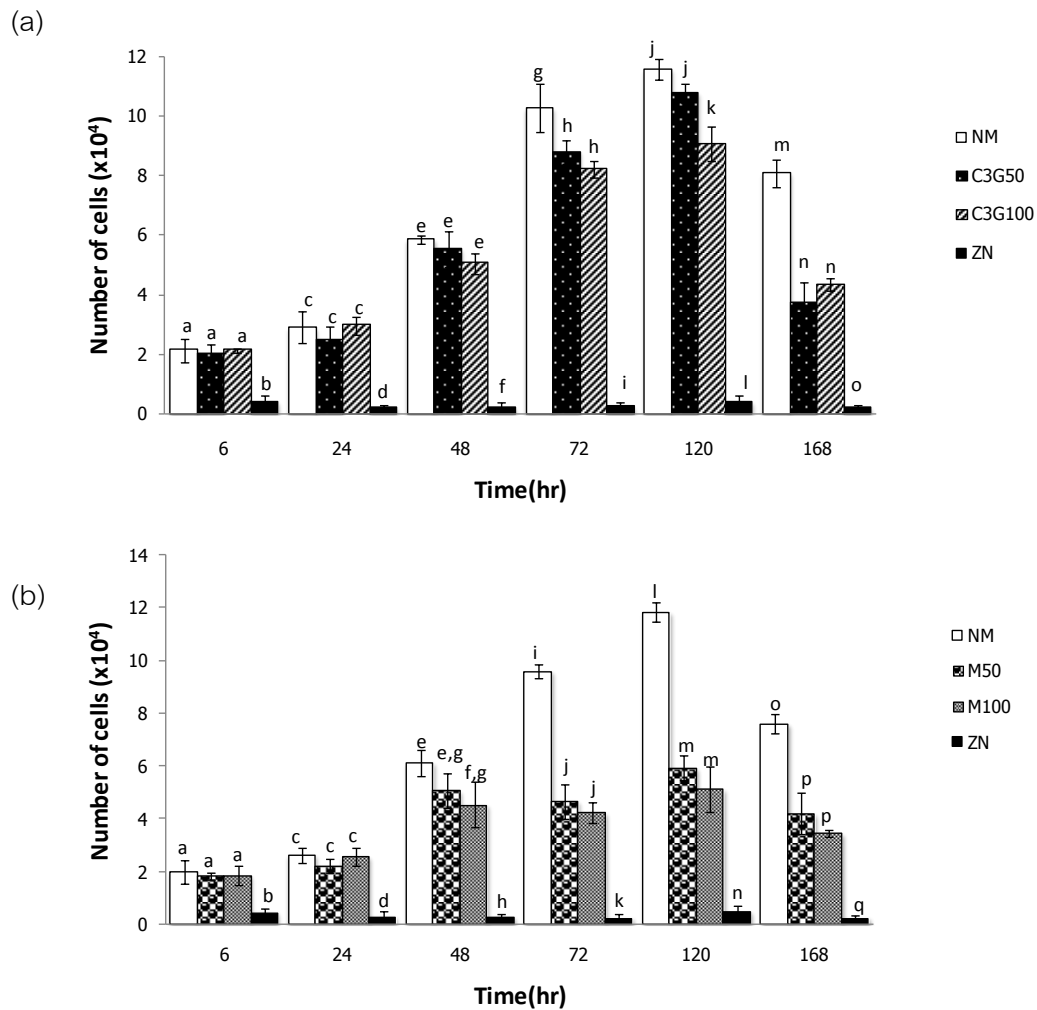
4.2.1 ศึกษาความเป็นพิษและการเจริญเติบโตของแอนโธไซยานินและสารสกัดหม่อนต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก

การศึกษาคือความเป็นพิษของแอนโธไซยานินและสารสกัดผงผลหม่อนต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แสดงในรูปแบบที่ 4.8 (a) การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ผสมสารไซยานิน-3-กลูโคไซด์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ C3G50 และ C3G100 พบว่าไม่เป็นพิษกับเซลล์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น โดยจำนวนเซลล์เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ 24 ชั่วโมงจนกระทั่งถึง 120 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ตามมาตรฐานความปลอดภัย ISO 10993 part 5 ทำให้เซลล์ตายตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรก การเพาะเลี้ยงเซลล์ระยะแรกจะมี lag phase ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกเนื่องจากเซลล์มีการใช้พลังงานเพื่อปรับตัว เกาะติดพื้นผิว และสร้าง Extra Cellular Matrix (ECM) โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่ำสุดและเริ่มมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว (log phase) [ณัฐพล วชิรโรจน์, 2552] การเลี้ยงเซลล์ในอาหารปกติ NM C3G50 และ C3G100 นี้มีระยะ log phase ในช่วง 24-72 ชั่วโมง ดังแสดงรูปในภาคผนวก ข หากคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 26.22×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ 21.27×10^{-3} ต่อชั่วโมงสำหรับการเลี้ยงใน C3G50 และ C3G100 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.5 การเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งในอาหาร C3G50 และ C3G100 ต่ำกว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (NM) เล็กน้อย จากค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ต่ำกว่าทำให้ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า population doubling times (PDT) สูงกว่า แสดงถึงปริมาณ C3G ที่เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงเล็กน้อยแต่เซลล์ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้อยู่โดยที่เซลล์ไม่ตาย โดยทั่วไปเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เลี้ยงใน NM มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ประมาณ $26.34-26.95 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง และอัตราการแบ่งตัวเป็น 2 เท่าประมาณ 25.72-26.32 ชั่วโมง และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติใน passage 2-3 จะมีอัตราการแบ่งตัว 2 เท่า ประมาณ 25.99-26.33 ชั่วโมง โดยจำนวนเซลล์มีปริมาณมากสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง คือประมาณ 150 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร และหลังจากนั้นในเวลาที่ 168 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ลดลงอาจเป็นเพราะข้อจำกัดทางพื้นที่ของถาดเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม มีพื้นที่ในการ

เพาะเลี้ยงเท่ากับ 200 ตารางมิลลิเมตรต่อหลุม ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์สูงเกินจนไม่สามารถขยายจำนวนต่อไปได้ [Vachiraroj, N. และคณะ, 2009] รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เลี้ยงในอาหาร NM, C3G50 และ C3G100 ในแต่ละช่วงเวลาแสดงดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง เซลล์เริ่มมีการยึดเกาะและแผ่ขยายบนสภาพเพาะเลี้ยงและหลังจากเวลา 24 ชั่วโมงเซลล์เริ่มมีการเพิ่มจำนวนจนกระทั่งถึงเวลาประมาณ 72 ชั่วโมงจำนวนเซลล์มีความหนาแน่นมากในขณะที่การเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ผสมซึ่งค้ำชีเตตรตลักษณะของเซลล์เกาะบ้างเล็กน้อยแต่ไม่มีการแผ่ขยาย และความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดต่อตารางมิลลิเมตรที่เวลา 120 ชั่วโมงในอาหาร NM เท่ากับ 578.75 ± 17.97 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร, C3G50 เท่ากับ 538.75 ± 16.52 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร และ C3G100 เท่ากับ 453.75 ± 29.55 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร

นอกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหารที่มีไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์เป็นองค์ประกอบแล้ว เนื่องจากในสารสกัดผลหม่อนมีสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์อยู่จึงได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลหม่อน M50 และ M100 ซึ่งมีความเข้มข้นของสารสกัดผลหม่อนเท่ากับ 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยที่แต่ละความเข้มข้นคิดเป็นปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์เทียบเท่า 50 และ 100 ไมโครโมลลาร์ มีลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์จากการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.8 (b) พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร M50 และ M100 มีระยะ log phase ที่สั้นลงเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่มี C3G อยู่ ซึ่งระยะ log phase จะอยู่ในช่วง 24- 48 ชั่วโมง (ในภาคผนวก ฉ) และมีจำนวนเซลล์เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มคงที่เข้าสู่ระยะ stationary phase ในช่วง 48-120 ชั่วโมง จะเห็นได้จากจำนวนเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไปในระยะ log phase การเลี้ยงในอาหารปกติ M50 ในตารางที่ 4.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 15.35×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ M100 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 14.94×10^{-3} ต่อชั่วโมง และอัตราเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็น 2 เท่าที่เลี้ยงในอาหาร M50 และ M100 เท่ากับ 45.14 ชั่วโมง และ 46.39 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าสูงกว่าการเลี้ยงในอาหาร C3G มากกว่าประมาณ 10 ชั่วโมง และเนื่องจากข้อจำกัดของพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เท่ากันแต่กลับพบว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M50 และ M100 มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเพียง 296.67 ± 24.66 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตรและ 256.67 ± 42.52 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร เท่านั้น ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหาร NM ประมาณ 2 เท่า โดยพิจารณาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M50 และ M100 แสดงไว้ในรูปที่ 4.11 และ 4.12 พบว่าในระยะเวลา 6 ชั่วโมงแรก เซลล์เริ่มมีการยึดเกาะ หลังจากนั้นที่เวลา 24 ชั่วโมงเซลล์ที่เกาะมีการแผ่ขยายมากขึ้นแต่จำนวนเซลล์ไม่ค่อย

เพิ่มขึ้น แต่หลังจากที่ 48 ชั่วโมงเซลล์มีการเพิ่มจำนวนเล็กน้อยแต่น้อยกว่าการเลี้ยงในอาหาร NM มาก การเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M50 และ M100 นั้นให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์การเข้าสู่ stationary phase เร็วขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารปกติและอาหารที่เลี้ยงด้วย C3G อีกทั้งจำนวนเซลล์สูงสุดต่อพื้นที่ยังมีความหนาแน่นต่ำ แสดงว่าสารสกัดผลหม่อนที่ใช้ศึกษานี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดผลหม่อนจะมีปริมาณไซยานิน-3-กลูโคไซด์ เทียบเท่ากับการใช้สารไซยานิน-3-กลูโคไซด์มาตรฐาน ซึ่งยังได้มีการวัดค่าพีเอชและค่าออสโมลาริตีเทียบกับการเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติแสดงในภาคผนวก รฐ พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเซลล์ C3G50, C3G100, M50 และ M100 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ NM แต่สำหรับค่าแรงดันออสโมลาริตีนั้นมีค่าต่ำกว่า NM เล็กน้อย นอกจากนี้ในสารสกัดหม่อนที่มีแอนโธไซยานินเป็นองค์ประกอบแล้วยังมีสารประกอบชนิดอื่นในปริมาณสูงได้แก่ น้ำตาลรีดิวิซ์ 127.26 ± 9.29 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ร้อยละ 0.80 ± 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารประกอบโพลีฟีนอลอื่นๆ เคยมีรายงานว่าน้ำตาลกลูโคสปริมาณความเข้มข้น 49.5 มิลลิโมลลาร์ (8.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ เนื่องจากกลูโคสไปยับยั้งการทำงานของ ornithine decarboxylase (ODC) activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ polyamine ในขั้นตอนการควบคุมปฏิกิริยาซึ่ง polyamine นี้เป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยทำให้โครงสร้าง DNA ที่ถูกสังเคราะห์มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น [Terada และคณะ, 1988] ซึ่งด้วยเหตุผลนี้ทำให้แอนโธไซยานินไม่สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้อย่างเต็มที่ในสารสกัดผลหม่อนความเข้มข้นดังกล่าวเนื่องจากมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก



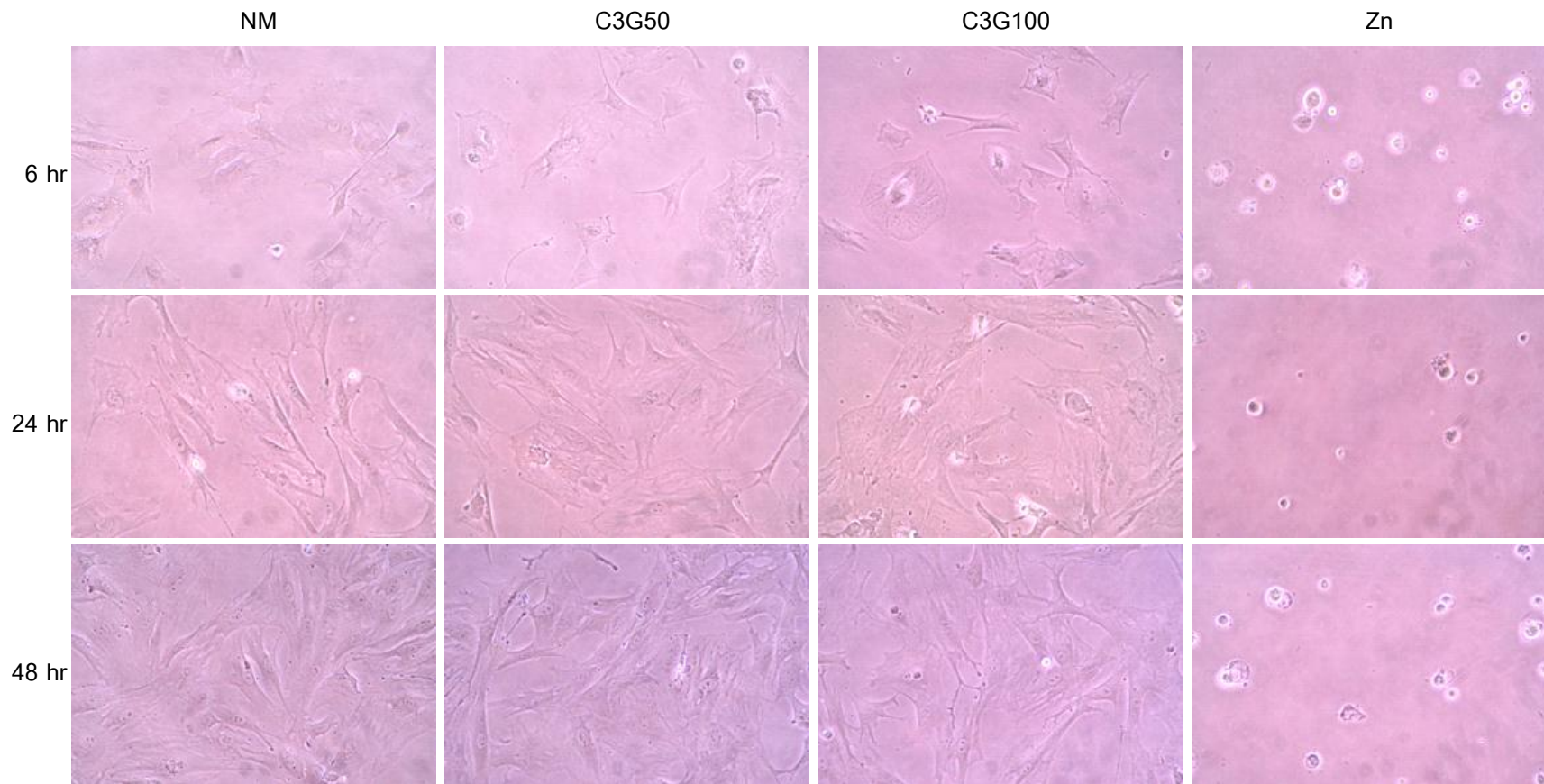
รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) (a), สารสกัดผงผลหม่อน ความเข้มข้น 2.5 mg/ml (M50), 5.0 mg/ml (M100) (b) และ ซิงค์อะซิเทรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) บนภาตเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 24 หลุม ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (a-q แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกันและในการทดสอบครั้งเดียวกัน)

ตารางที่ 4.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (growth rate, μ), เวลาการแบ่งตัวทีคูณ คือ ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (population doubling time, PDT) และความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สูงสุด (maximum density) ที่เวลา t_{\max}

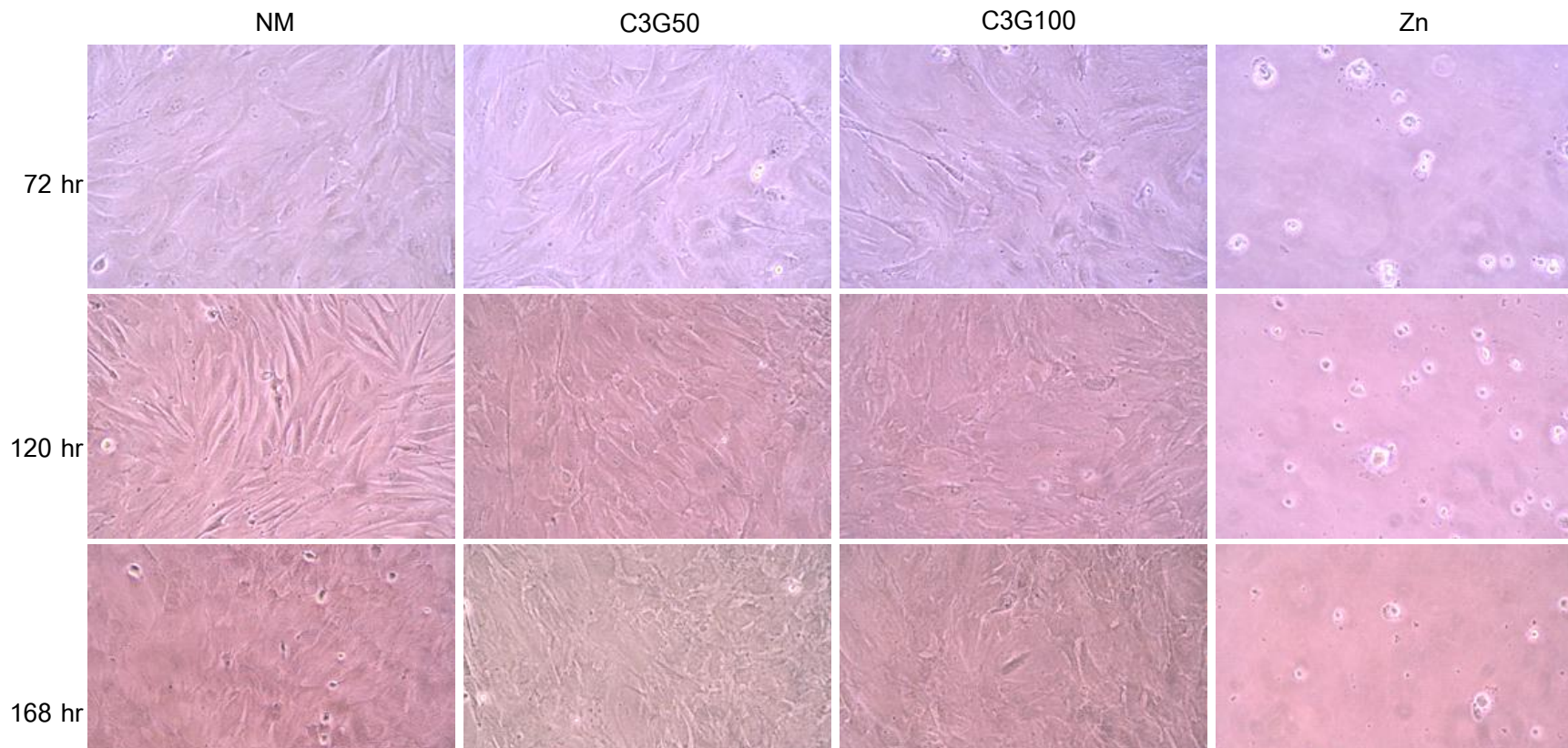
Sample	$\mu \times 10^{-3}$ (hr ⁻¹)	PDT (hr)	Maximum density (cells/mm. ²)	t_{\max} (hr)
NM ¹	26.34	26.32	578.75±17.97	120
C3G50 ¹	26.22	26.44	538.75±16.52	120
C3G100 ¹	21.27	32.59	453.75±29.55	120
Zn ¹	-268.24	Infinity	N/A	6
NM ²	26.95	25.72	591.67±18.93	120
M50 ²	15.35	45.15	296.67±24.66	120
M100 ²	14.94	46.40	256.67±24.66	120
Zn ²	-248.61	Infinity	N/A	6

¹ รายงานผลจากรูปที่ 4.12(a)

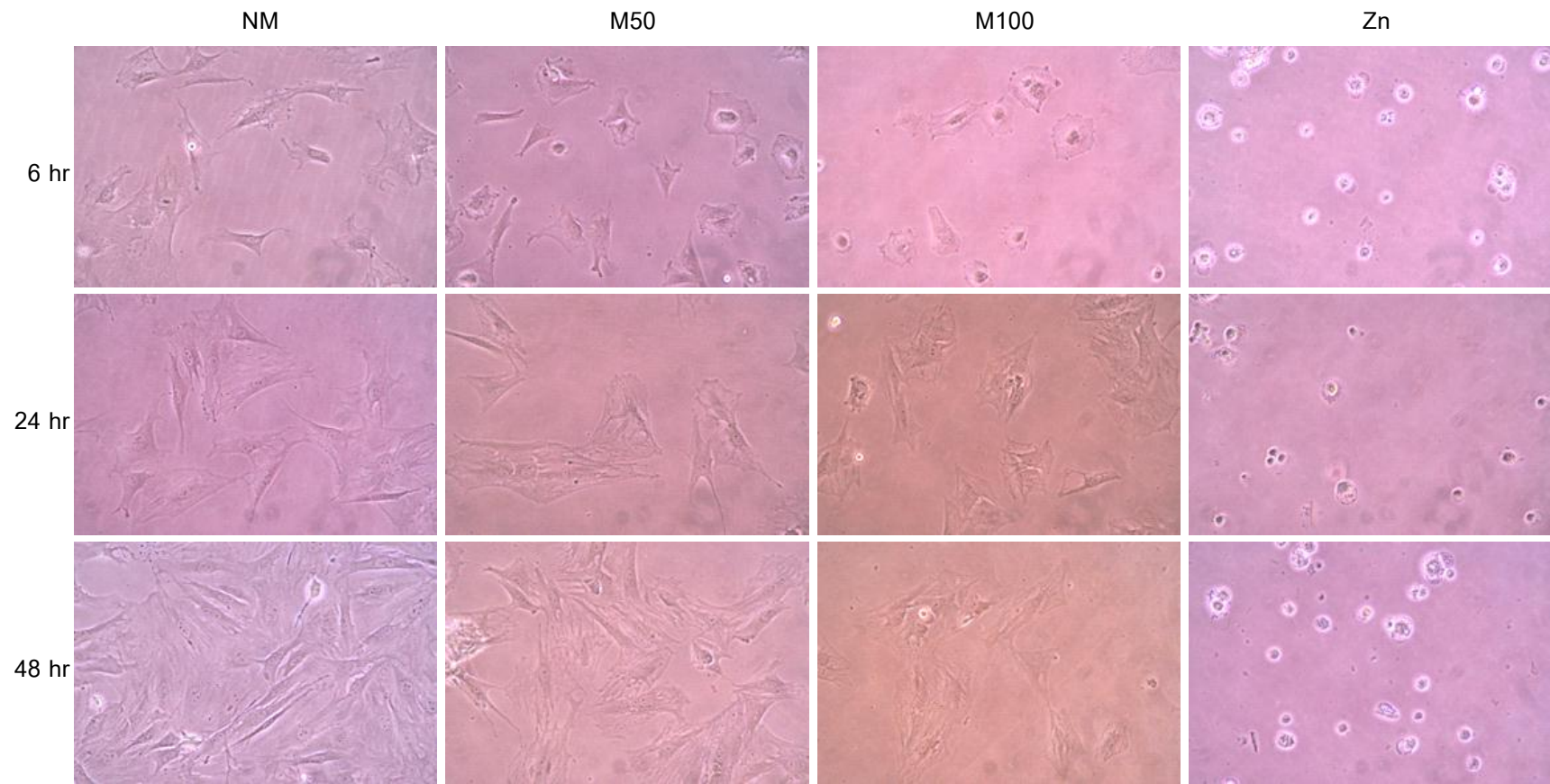
² รายงานผลจากรูปที่ 4.12(b)



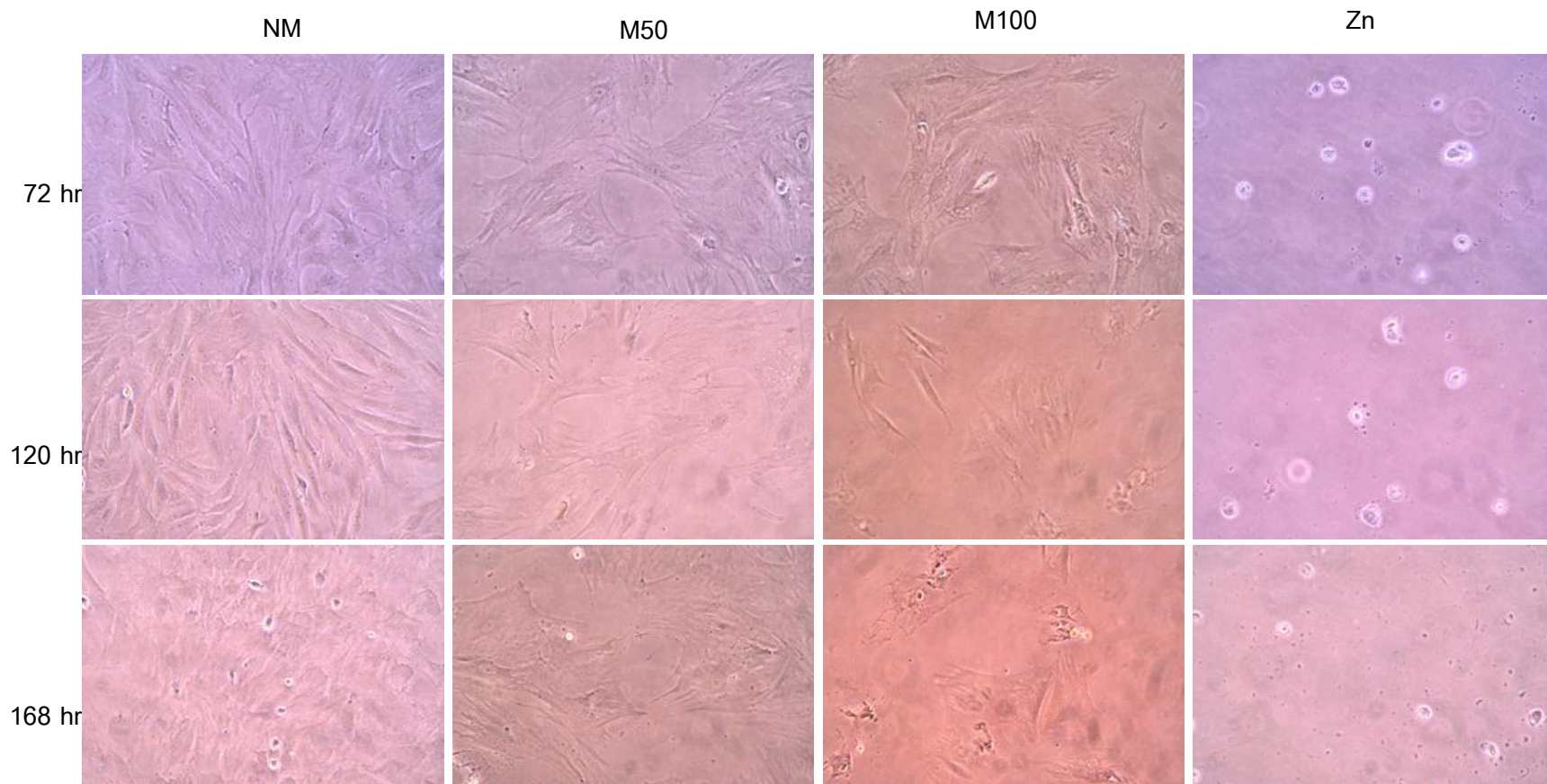
รูปที่ 4.9 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ที่ระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (Zn) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ที่ระยะเวลา 72, 120 และ 168 ชั่วโมง



รูปที่ 4.11 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อน ความเข้มข้น 2.5 mg/ml (M50), 5.0 mg/ml (M100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 1x10⁴ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ที่ระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง



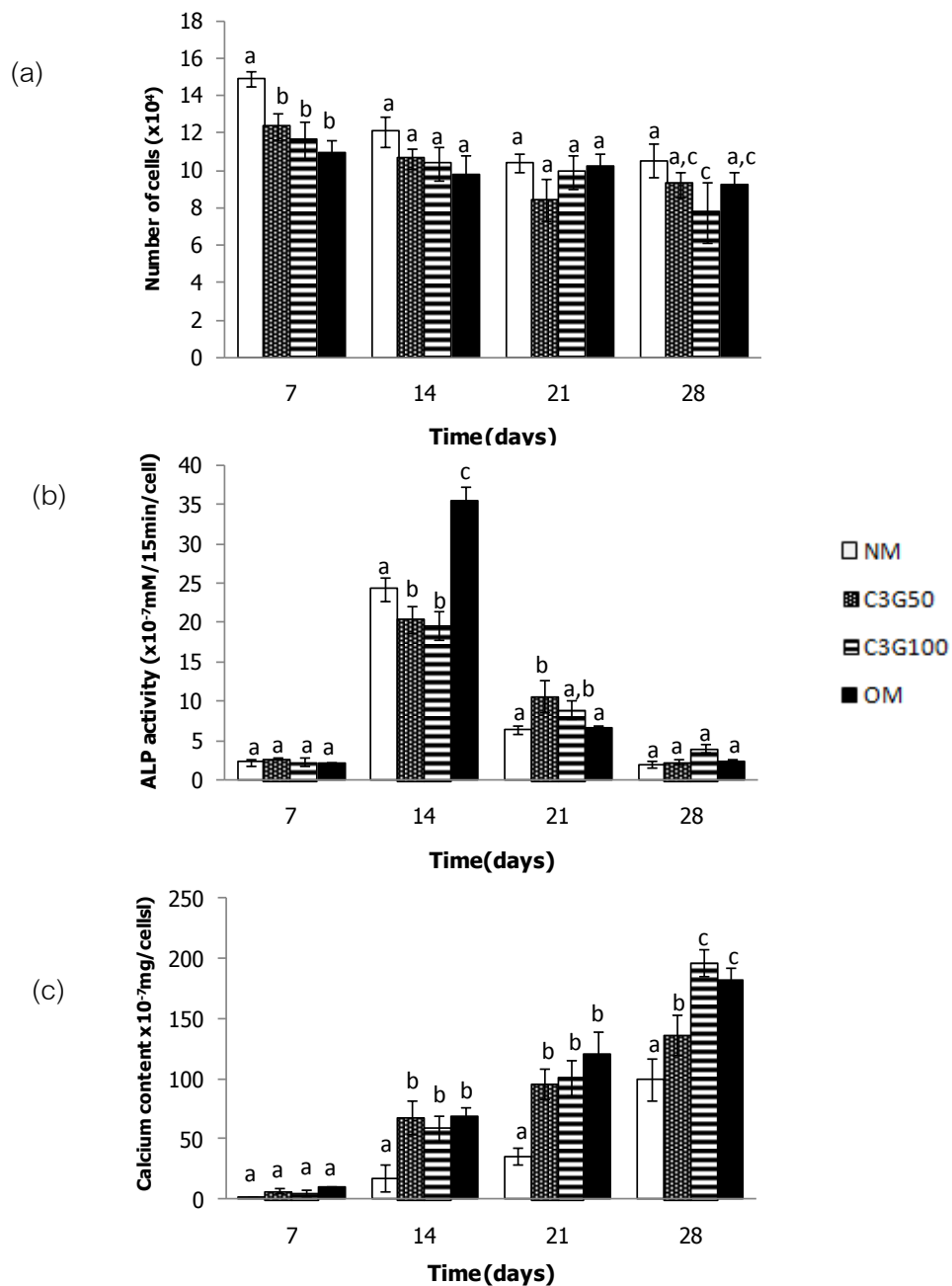
รูปที่ 4.12 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อน ความเข้มข้น 2.5 mg/ml (M50), 5.0 mg/ml (M100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 1x10⁴ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ที่ระยะเวลา 72, 120 และ 168 ชั่วโมง

4.2.2 ศึกษาผลของแอนโธไซยานินและสารสกัดหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูวิสตาในระดับห้องปฏิบัติการ

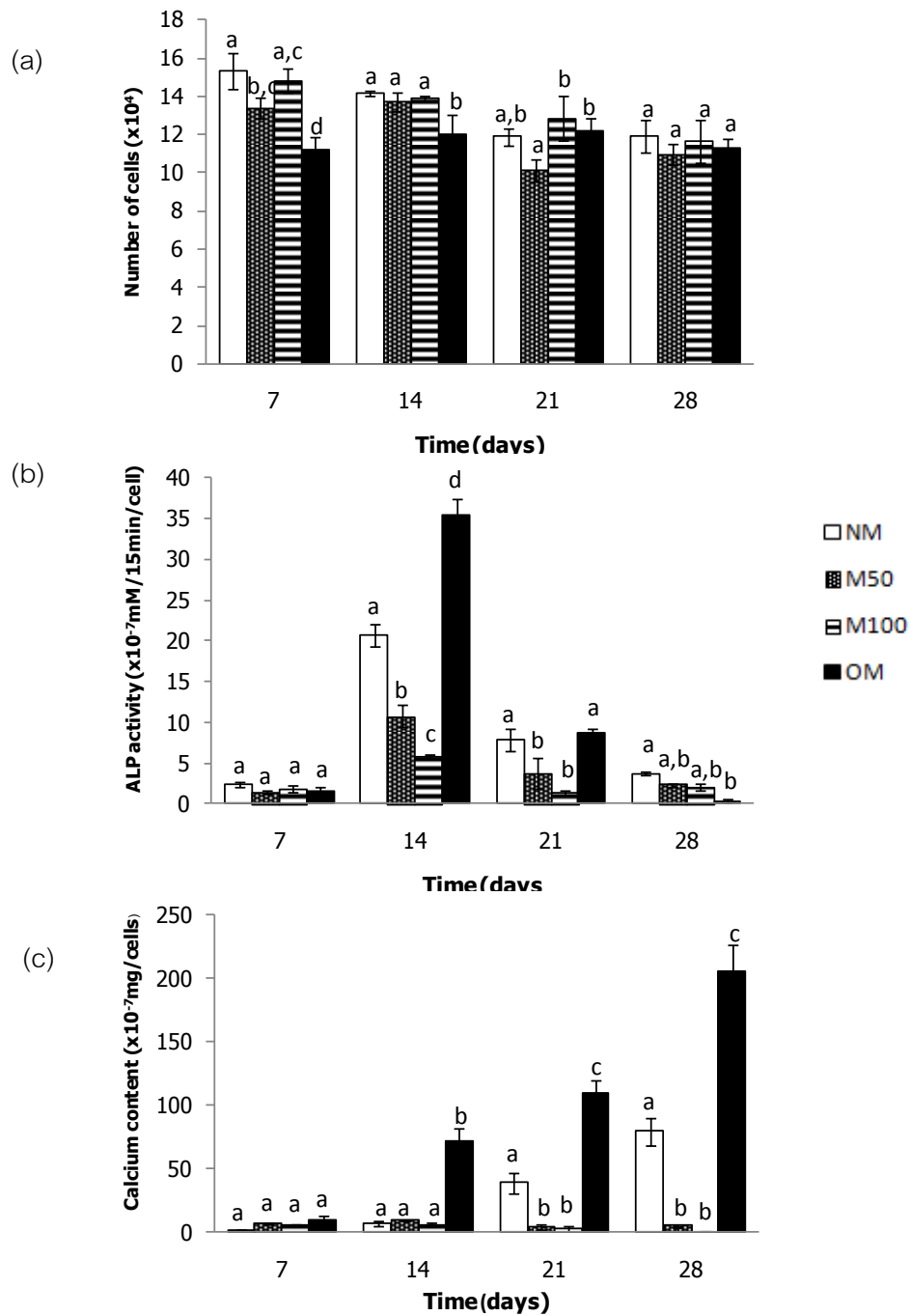
เมื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่มีการเติมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และสารสกัดผงผลหม่อนในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติโดยเฉพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับการใช้อาหาร Osteogenic Medium (OM) มาตรฐานที่มีรายงานการใช้งานทั่วไป ได้แก่ อาหารที่มี dexamethasone, β -glycerophosphate และ ascorbic acid เป็นอาหารพื้นฐานสามารถช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ [Vater และคณะ, 2011] พบว่าไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลลาร์ (C3G50) และ 100 ไมโครโมลลาร์ (C3G100) มาทดสอบดังรูปที่ 4.13 (a) พบว่าการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหาร NM, C3G50, C3G100 และ OM หลังการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน จำนวนเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงและไม่เห็นการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะ growth phase โดยทั่วไปการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหาร NM ซึ่งทำหน้าที่เป็น growth media จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามลักษณะกลศาสตร์การเจริญเติบโตจนกว่าเซลล์จะเข้าสู่ stationary phase หรือเพิ่มจำนวนมากจนเต็มพื้นที่ในขณะที่การใช้อาหาร OM จำนวนเซลล์มักจะเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าเนื่องจากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง [Belmonte, M.M. และคณะ, 2005] โดยทั่วไปแล้วการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblasts) จะมีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิด เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ immature osteoprogenitor จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น mature osteoprogenitor แล้วจึงเปลี่ยนเป็น preosteoblast จากนั้นจึงได้เปลี่ยนเป็นเซลล์ mature osteoblast แล้วจึงเปลี่ยนเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่คือ osteocyte ในที่สุด [Lian, J.B. และ Stein, G.S., 2001] เซลล์ต้นกำเนิดจะมีการเจริญเติบโตสูงจนถึงช่วงเวลานึ่งการเจริญเติบโตจะลดลงและจะมีการสร้าง Extra Cellular Matrix (ECM) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระยะนี้มีการหลั่งสารสำคัญใน ECM ของเซลล์คือ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) คอลลาเจนชนิด I เป็นต้น ซึ่งเป็น early marker ในช่วงนี้ หลังจากกระบวนการสร้าง ECM ลดลง จะเกิดการสะสมแร่ธาตุเพิ่มขึ้นเพื่อให้กลายเป็นเซลล์กระดูกในระยะนี้จะมีการหลั่งสารสำคัญซึ่งเป็น late marker คือ ออกสทีโอแคลซิน คอลลาจีเนส แคลเซียม [Komori T. และ Kishimoto T., 1998] ค่ากิจกรรม ALP ต่อเซลล์ รูปที่ 4.13 (b) ที่สร้างขึ้นในช่วงแรกของการเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ซึ่งเป็น early maker วัดได้สูงสุดในวันที่ 14 โดยที่การเลี้ยงเซลล์ในอาหาร C3G50 และ C3G100 มีผลทำให้กิจกรรม ALP ต่อเซลล์ลดลงเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญ โดยปกติแล้วการเลี้ยงเซลล์ใน osteogenic medium จะทำ

ให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALP สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 [Porter, A.E. และคณะ, 2004] แต่เมื่อพิจารณาปริมาณแคลเซียมสะสมที่เซลล์สร้างขึ้น รูปที่ 4.13 (c) นั้นกลับพบว่า การเลี้ยงในอาหาร C3G50 และ C3G100 เพิ่มการสะสมของแคลเซียมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการสร้างแคลเซียมขึ้นมาเนื่องจากเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร C3G50 และ C3G100 มีปริมาณแคลเซียมสะสมสูงแต่จุดสูงสุด (peak) ของกิจกรรมเอนไซม์ ALP ในวันที่ 14 มีค่าต่ำกว่าการเลี้ยงในอาหาร OM ซึ่งค่านั้นอาจจะไม่ใช่จุดสูงสุดของ ALP ก็ได้ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์มีสถานะแตกต่างกัน ดังนั้นจุดสูงสุดของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALP อาจเกิดได้ในเวลาที่ต่างกัน แต่ในการทดลองนี้เก็บตัวอย่างในทุกๆ 7 วัน จุดสูงสุดอาจพบก่อนช่วงเวลา 14 วัน ถ้ามีการเก็บตัวอย่างในช่วงระยะเวลาต่างๆ มากกว่านี้อาจพบจุดสูงสุดของการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร C3G50 และ C3G100 ได้

สำหรับการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่มีการใช้อาหาร M50 และ M100 ในการเลี้ยงเซลล์ ดังรูปที่ 4.14 (a) พบว่าจำนวนเซลล์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลา และกิจกรรม ALP ต่อเซลล์สูงสุดในช่วง 14 วันเช่นกัน โดยที่อาหารเลี้ยงเซลล์ M50 และ M100 มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ ALP อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.14 (b)) อีกทั้งเมื่อพิจารณาการสะสมปริมาณแคลเซียมพบว่า M50 และ M100 ลดปริมาณการสะสมของแคลเซียม (รูปที่ 4.14 (c)) แสดงว่าสารสกัดผลหมอนที่ใช้ในการศึกษาไม่ได้มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก แต่สารไฮยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลลาร์มีฤทธิ์ในการช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนูไปเป็นเซลล์กระดูกได้ ถึงอย่างไรก็ตาม สารสกัดผลหมอนมีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นอาหารเสริม เพราะการกินสารสกัดผลหมอนเข้าไปในร่างกาย กลไกการดูดซึมของสารแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหมอน ไม่ว่าจะเป็น กลูโคส แอนโธไซยานิน และสารชนิดอื่นๆ ย่อมมีกระบวนการดูดซึมสารเข้าสู่ร่างกายแตกต่างกัน เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีโครงสร้างและสมบัติที่ต่างกัน ดังนั้น จึงเป็นไปได้ที่แอนโธไซยานิน จะถูกดูดซึมแยกออกจากสารอื่นๆ ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ ดังนั้นแอนโธไซยานินที่อยู่ในสารสกัดผลหมอนนั้น ร่างกายจึงสามารถดูดซึมนำไปใช้งานได้ ทำให้อาจจะมีศักยภาพที่จะใช้งานเพื่อเป็นประโยชน์กับงานด้านการแพทย์ที่มีการใช้เซลล์ต้นกำเนิดเพื่องานซ่อมแซมกระดูกต่อไป



รูปที่ 4.13 จำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (a) กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียมที่สร้าง (c) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM) เป็น negative control, อาหาร Normal Medium ที่มีปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) และอาหาร Osteogenic Medium เป็น positive control บน ภาดเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 24 หลุม ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2×10^4 ต่อตารางเซนติเมตร (a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน)



รูปที่ 4.14 จำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (a) กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียมที่สร้าง (c) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM) เป็น negative control, สารสกัดผงผลหม่อนความเข้มข้น 0.25 mg/μl (M50), 0.5 mg/μl (M100) และอาหาร Osteogenic Medium เป็น positive control บนสภาพเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน ขนาด 24 หลุมที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2x10⁴ ต่อตารางเซนติเมตร (a, b, c, d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในช่วงเวลาเดียวกัน)

จนถึงปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ของแอนโธไซยานินส่วนมากจะการนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งเนื่องจากสมบัติที่สำคัญคือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีงานวิจัยมากมายพบว่าแอนโธไซยานินสามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT 29 และ HCT 116 [Kang, S.Y. และคณะ, 2003], เซลล์ human gastric adenocarcinoma AGS [Shin, P.H. และคณะ, 2005], เซลล์ HT-29 colorectal adenocarcinoma และ HT-60 promyelocytic leukaemia [Netzel, M. และคณะ, 2007] แต่มีใช้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะต้านการเจริญเติบโตเท่านั้น สารบางชนิดถ้ามีการใช้ปริมาณที่เหมาะสมยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ ในปี 2006 Kim และคณะได้พบว่า สาร quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต และช่วยให้การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ของเซลล์ human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) โดยสร้างกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงซึ่งร่วมกับการกระตุ้นของ estrogen receptor ที่เซลล์สร้างขึ้น [Kim, Y.J. และคณะ, 2006] นอกจากนี้สารสกัดขมิ้นชัน (curcumin) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีรายงานว่าทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์หลายชนิดมีผลลด differentiation ของเซลล์ไขมัน [Kim และคณะ, 2010] แต่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ mouse embryonal carcinoma PCC4 [Bath และคณะ, 2001] จากลักษณะโครงสร้างของแอนโธไซยานินที่มีความคล้ายคลึงและอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอลเดียวกันอาจเป็นไปได้ที่แอนโธไซยานินจะมีฤทธิ์กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ และสามารถสรุปเปรียบเทียบค่ากิจกรรม ALP และปริมาณแคลเซียมที่สร้างสะสมของเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกที่ทำการศึกษานในงานวิจัยนี้ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูวิสต้าที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

ชนิดอาหาร		กิจกรรมของ ALP		ปริมาณแคลเซียมสะสม	
		($\times 10^7$ mM/15min/cells) สูงสุดที่ 14 วัน	ร้อยละสัมพันธ์เทียบกับ NM	($\times 10^{-7}$ mg/cells) สูงสุดที่ 28 วัน	ร้อยละสัมพันธ์เทียบกับ NM
แอมโนไซยามีน	NM ¹	24.35±1.50	100%	99.13±17.63	100%
	C3G50 ¹	20.47±1.74	84.06%	136.56±16.25	137.76%
	C3G100 ¹	19.64±1.82	80.66%	196.52±11.04	198.24%
	OM ¹	29.31±3.27	120.37%	182.22±10.44	183.82%
สารสกัดผงหม่อน	NM ²	20.71±1.33	100%	79.21±10.49	100%
	M50 ²	10.74±1.38	51.86%	4.41±0.70	5.57%
	M100 ²	5.87±0.22	28.34%	0.71±0.53	0.72%
	OM ²	35.39±1.98	170.88%	205.55±20.12	259.50%

¹ รายงานผลจากรูปที่ 4.13

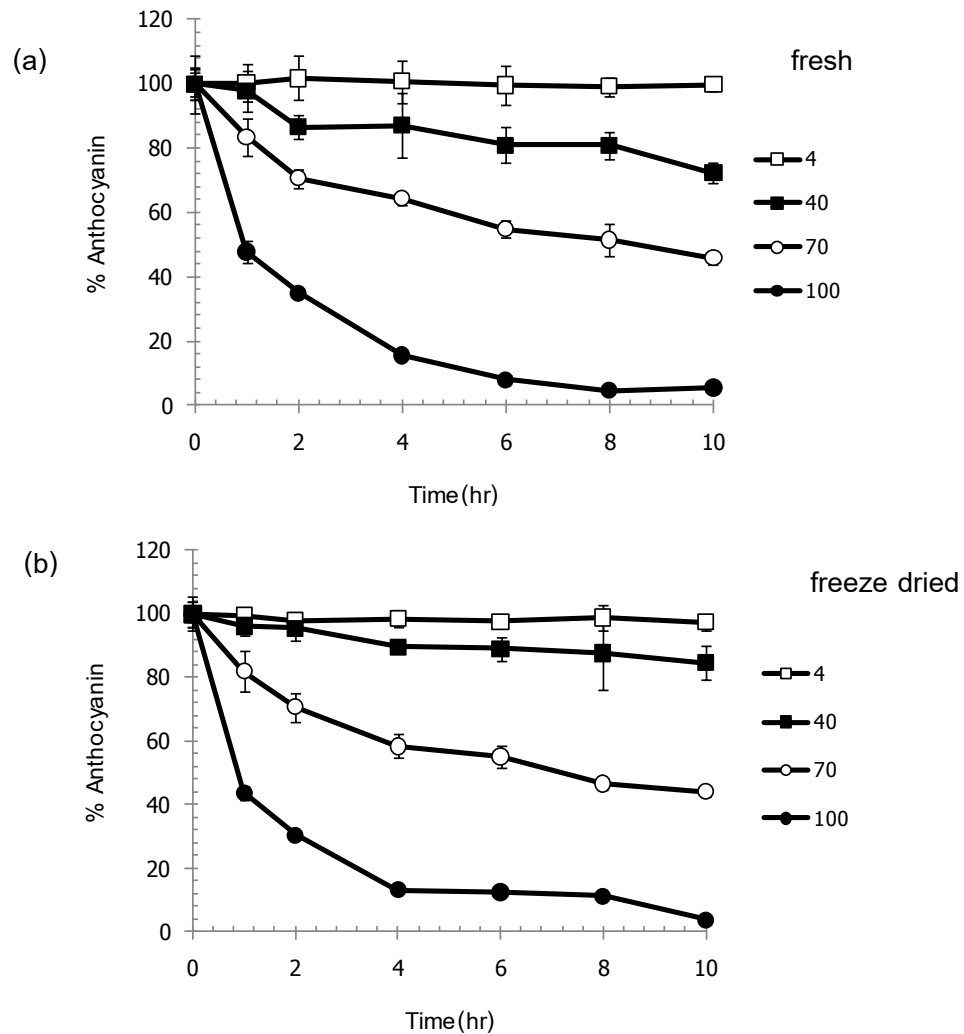
² รายงานผลจากรูปที่ 4.14

4.3 ศึกษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อน

ในการศึกษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดหม่อนได้เลือกสารสกัดผลหม่อนที่ได้จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ เพียงแหล่งเดียวในการศึกษาเนื่องจากแหล่งผลิตเป็นไร่ที่มีมาตรฐานและการควบคุมคุณภาพของผลหม่อนที่ดีได้แก่ ขนาด อายุ และการหลีกเลี่ยงศัตรูพืช อีกทั้งผลหม่อนจากไร่ยังมีการผลิตที่สม่ำเสมอในจำนวนมากเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์อีกด้วย

4.3.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน

จากการศึกษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนต่ออุณหภูมิดังแสดงในรูปที่ 4.15 (a) และ รูปที่ 4.15 (b) แอนโทไซยานินมีความคงตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของทั้งสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด แต่สารสกัดหม่อนสดมีแนวโน้มที่จะสลายตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสมากกว่าผงผลหม่อนสกัด เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 70 และ 100 องศาเซลเซียสการสลายตัวของแอนโทไซยานินเพิ่มสูงขึ้นมาก จากร้อยละของสารแอนโทไซยานินมีค่าต่ำลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทั้งในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดเมื่อเวลาผ่านไปจนถึง 10 ชั่วโมงแสดงให้เห็นว่าสารแอนโทไซยานินมีการสลายตัวเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลา การที่แอนโทไซยานินมีการสลายตัวมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นนั้นเนื่องมาจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ทำให้โครงสร้างของแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยที่อุณหภูมิสูงจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน (hydrolyzation) ของ 3-glycoside ทำให้ flavylum cation เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น chalcone ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัวน้อย [Laleh และคณะ, 2006]



รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดสารสกัดผลหม่อนสด (a) และ ผงผลหม่อนสกัด (b) จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

อีกทั้งจากลักษณะการสลายตัวของแอนโทไซยานิน เมื่อนำมาพล็อตกราฟให้อยู่ในรูปลอการิทึมธรรมชาติของปริมาณแอนโทไซยานินที่เวลาใดๆ ต่อแอนโทไซยานินเริ่มต้นเทียบกับเวลาสามารถสร้างความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 4.16 (a) และ 4.16 (b) แสดงให้เห็นว่าอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์เป็นปฏิกิริยาอนุพันธ์อันดับหนึ่ง (first order reaction) โดยสามารถหาค่าคงที่อัตรา (k) ได้จากความชันของกราฟจากสมการ 4.1 และครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ซึ่งเป็นเวลาที่แอนโทไซยานินสลายตัวไปร้อยละ 50 ได้จากสมการ และ 4.2

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kirca, A. และ Cemeroglu, B., (2003), Wang, W.D. และ Xu, S.Y., (2007), Kirca, A. และคณะ (2007)

$$\ln(C_t/C_0) = -k \times t \dots\dots\dots (4.1)$$

$$t_{1/2} = -\ln 0.5 \times k^{-1} \dots\dots\dots (4.2)$$

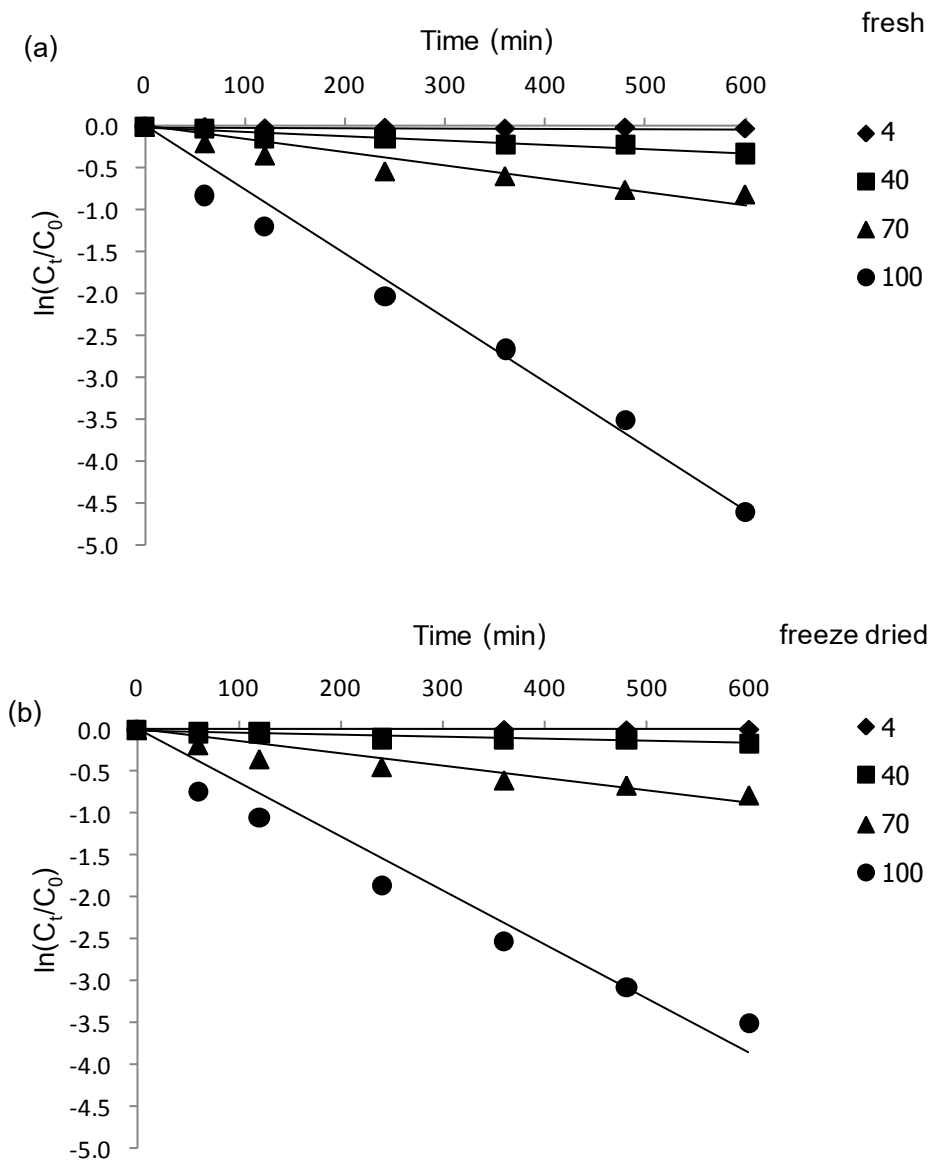
โดยที่ C_0 คือ ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดหม่อนเริ่มต้น, C_t คือ ปริมาณแอนโทไซยานินที่เวลาต่างๆ

จากสมการปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง พบว่าการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ค่าคงที่อัตราของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นในขณะที่ค่าครึ่งชีวิตลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.7 นอกจากนี้ยังพบว่าค่าครึ่งชีวิตของการสลายตัวของสารสกัดหม่อนสดสูงกว่าผงผลหม่อนสกัด ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของผงหม่อนสกัดต่ำกว่า โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส ค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 7.31 ชั่วโมง และ 7.91 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 1.51 และ 1.67 ชั่วโมงของสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดตามลำดับ และค่าคงที่อัตราของการสลายตัวนั้นขึ้นกับอุณหภูมิจากสมการอาร์เรเนียส (Arrhenius equation) $k = k_0 \times e^{-E_a/RT}$ โดยที่ k_0 คือแฟกเตอร์ความถี่ (frequency factor) หน่วยนาที่⁻¹, E_a คือค่าพลังงานก่อกัมมันต์ (activation energy) หน่วยกิโลจูลต่อโมล, R คือค่าคงที่ของแก๊สซึ่งเท่ากับ 8.314 จูลต่อโมลต่อเคลวิน และ T คืออุณหภูมิสัมบูรณ์ หน่วยเคลวิน [Wang, W.D. และ Xu, S.Y., 2007] ซึ่งถ้าเราเขียนสมการให้อยู่ในรูปลอการิทึมธรรมชาติจะได้ว่า

$$\ln k = \ln k_0 \times e^{-E_a/RT} \dots\dots\dots (4.3)$$

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \dots\dots\dots (4.4)$$

เราสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln k$ กับ $1/T$ จะได้กราฟเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 4.17 และมีค่าความชันเท่ากับ $-E_a/R$ และจุดตัดแกน $\ln k$ ที่จุด $\ln k_0$ จากความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถคำนวณหาค่าคงที่อัตราที่อุณหภูมิอื่นจากค่าพลังงานก่อกัมมันต์ของการสลายตัวของผงผลหม่อนสกัดและสารสกัดผลหม่อนสดได้

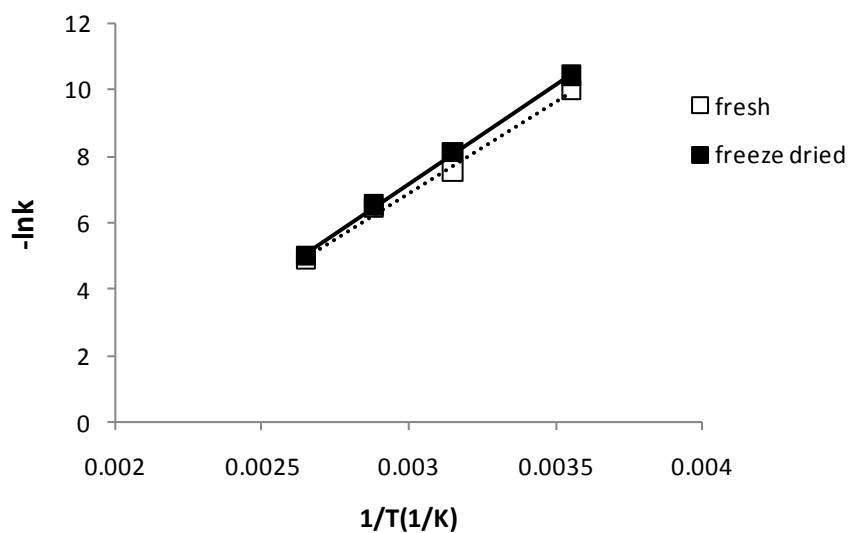


รูปที่ 4.16 การสลายตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดสารสกัดผลหม่อนสด (a) และผงผลหม่อนสกัด (b) จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ตามสมการปฏิกิริยาอนุพันธ์อันดับหนึ่ง

ตารางที่ 4.7 ค่าคงที่ปฏิกิริยาอนุพันธ์อันดับหนึ่งของการสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดหม่อน

ชนิดสารสกัด จากแหล่งเพชรบูรณ์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	$-k \times 10^3$ (นาที่ ⁻¹)	$t_{1/2}$ (ชั่วโมง)
ผลหม่อนสด	4	0.046	251.14
	40	0.53	21.80
	70	1.58	7.31
	100	7.64	1.07
ผงผลหม่อน	4	0.03	385.08
	40	0.30	38.51
	70	1.46	7.91
	100	6.91	1.67

หมายเหตุ : k คือ ค่าคงที่อัตรา, $t_{1/2}$ = ค่าครึ่งชีวิต (เวลาที่แอนโทไซยานินในสารสกัดหม่อนลดลงครึ่งหนึ่งของเริ่มต้น)

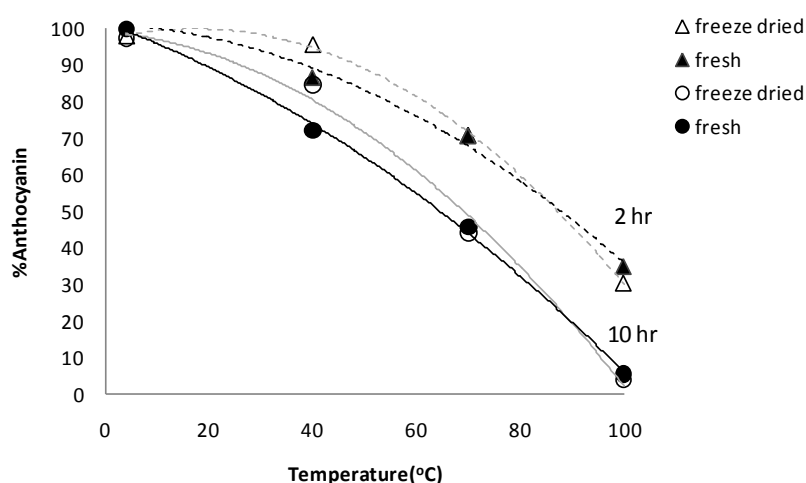


รูปที่ 4.17 ค่าคงที่สมการอาร์เรเนียสของการสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (เคลวิน)

ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับรายงานของ Kirca, A. และ Cemeroglu, B. (2003) พบว่าแอนโทไซยานินในน้ำของส้มสีเลือด (blood orange) เกิดการสลายตัวเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ที่ Brix ร้อยละ 11 ค่าครึ่งชีวิต เท่ากับ 6.3, 3.6 และ 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสตามลำดับ นอกจากนี้ในปี 2007 ยังมีรายงานว่าแอนโทไซยานินในน้ำของแบล็คเบอร์รี่สลายตัวมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเช่นกันที่อุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 16.7, 8.8, 4.7 และ 2.9 ชั่วโมงตามลำดับ [Wang, W.D. และ Xu, S.Y., 2007] การเปรียบเทียบการสลายตัวของสารแอนโทไซยานินที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในสภาวะเดียวกันกับงานวิจัยนี้ของในผลหมอนกับส้มสีเลือดและแบล็คเบอร์รี่มีการสลายตัวที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดผลหมอนมีค่าครึ่งชีวิตสูงกว่าในน้ำส้มสีเลือดแต่ต่ำกว่าน้ำแบล็คเบอร์รี่ อาจจะเป็นเพราะชนิดของสารแอนโทไซยานินและองค์ประกอบทางเคมีที่มีความแตกต่างกันของผลไม้ที่ต่างชนิดกัน [Wang, W.D. และ Xu, S.Y., 2007] ซึ่งอาจมีผลต่อความคงตัวของสารแอนโทไซยานินได้ นอกจากนี้ มนต์วีดี และศศิธร (2551) ยังได้รายงานผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในน้ำลูกหมอนพบว่า การสลายตัวสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นโดยอัตราการสลายตัวเกิดเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ความคงตัวของสารสกัดผลหมอนค่าครึ่งชีวิตในน้ำลูกหมอนเท่ากับ 12.3, 6.2 และ 4.0 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสตามลำดับ ที่สภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส น้ำลูกหมอนในงานวิจัยดังกล่าวมีความคงตัวของแอนโทไซยานินสูงกว่า เนื่องจากมีค่าครึ่งชีวิตที่มากกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้อาจเนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวได้ใช้กระบวนการสกัดน้ำหมอนด้วยความร้อนอุณหภูมิประมาณ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาทีและมีการเติมเอนไซม์เพคตินเนสจากนั้นสกัดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีที่ต่างกับงานวิจัยนี้ ต่อมา Aramwit, P. และคณะ (2010) ได้รายงานผลของความคงตัวของแอนโทไซยานินในน้ำคั้นของผลหมอนจากไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 70 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเวลา 10 ชั่วโมง ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สลายตัวไปประมาณร้อยละ 10 แม้ว่าการศึกษานี้เป็นผลไม้ชนิดเดียวกัน คือผลหมอน แต่การสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหมอนที่ได้นี้มีความแตกต่างกันอาจเป็นเพราะสายพันธุ์ ลักษณะการ

เพาะปลูก แหล่งเพาะปลูก และฤดูกาลเก็บเกี่ยว ที่ทำให้สมบัติทางกายภาพและเคมีต่างกัน มีผลต่อความคงตัวของสารแอนโทไซยานินได้

นอกจากนี้สามารถสร้างความสัมพันธ์ของร้อยละของแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนที่เก็บไว้เป็นเวลา 2 และ 10 ชั่วโมงที่อุณหภูมิต่างๆ ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด ดังรูปที่ 4.18 จะเห็นว่าการสลายตัวของแอนโทไซยานินสูงขึ้นตามอุณหภูมิที่เก็บรักษา อีกทั้งสามารถแสดงเป็นสมการเชิงคณิตศาสตร์ชนิดพหุนามตัวแปรเดียว (polynomial equation) ดีกรี 2 ได้ว่า $y = -0.0103x^2 + 0.3573x + 96.858$ และ $y = -0.0058x^2 - 0.0741x + 101.43$ ของผงผลหม่อนสกัดและสารสกัดผลหม่อนสดที่เวลา 2 ชั่วโมงตามลำดับ และ $y = -0.0044x^2 - 0.5122x + 101.46$ สำหรับผงผลหม่อนสกัด และ $y = -0.0083x^2 - 0.1372x + 99.297$ สำหรับสารสกัดผลหม่อนสด ที่เวลา 10 ชั่วโมง ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถใช้ประมาณร้อยละของแอนโทไซยานินที่เหลืออยู่ ณ อุณหภูมิต่างๆ เพื่อทำนายการสลายตัวของแอนโทไซยานินเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงได้ หากผ่านกระบวนการให้ความร้อน ณ อุณหภูมินั้นๆ เป็นระยะเวลา 2 และ 10 ชั่วโมงจากกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงเวลาในการให้ความร้อนมีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินน้อยกว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

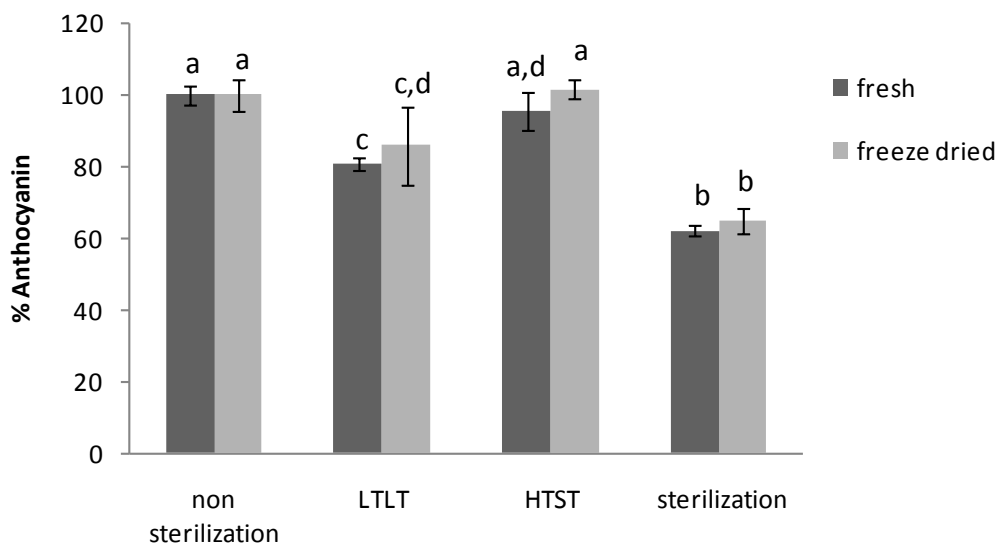


รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียสที่เวลา 2 และ 10 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ ระหว่างสารสกัดผลหม่อนสดและสารสกัดผงผลหม่อนสกัด พบว่ากระบวนการทำแห้งแข็งไม่มีผลทำให้แอนโทไซยานินคงตัวสูงขึ้น ไม่ว่าจะผ่านกระบวนการในอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4, 70 และ 100 องศาเซลเซียสโดยสารสกัดที่ผ่านการเก็บในแต่ละอุณหภูมินั้นจะมีร้อยละของปริมาณแอนโทไซยานินที่เหลืออยู่ใกล้เคียงกัน โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารสกัดผงผลหม่อนมีความคงตัวดีกว่าสารสกัดผลหม่อนสดเพียงเล็กน้อย

4.3.2 ผลของสภาวะการฆ่าเชื้อที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน

เมื่อนำสารสกัดผลหม่อนของทั้งผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ คือ พาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาที), พาสเจอร์ไรส์ แบบ HTST (อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที) และ สเตอริไลส์ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที) จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินที่เปลี่ยนแปลงไปดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่าการฆ่าเชื้อแบบ LTLT และแบบสเตอริไลส์ มีผลให้ปริมาณแอนโทไซ-ยานินในสารสกัดหม่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยลดลงเหลือร้อยละ 86 ของสารสกัดผงผลหม่อนสกัดและร้อยละ 81 ของสารสกัดหม่อนสดตามลำดับและการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ มีผลทำให้แอนโทไซยานินเสื่อมสลายมากที่สุด โดยมีแอนโทไซยานินในสารสกัดผงผลหม่อนสกัดเหลืออยู่เพียงร้อยละ 64 และในสารสกัดผลหม่อนสดเท่ากับร้อยละ 62 ซึ่งนอกจากอุณหภูมิที่มีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินแล้ว เวลาที่มีส่วนสำคัญแม้ว่าการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST ซึ่งใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT แต่ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อที่ต่ำเพียง 15 วินาทีเท่านั้น ทำให้พบว่าการใช้เวลาที่มากขึ้นมีผลต่อการสลายตัวของสารแอนโทไซยานิน ซึ่งก็มีผลควบคู่ไปกับการใช้อุณหภูมิที่สูง อีกทั้งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสารสกัดของผลหม่อนสดกับผงผลหม่อนสกัดที่สภาวะเดียวกันก็ให้ผลเช่นเดียวกันกับข้างต้นคือสารสกัดจากผงผลหม่อนสกัดที่ผ่านกระบวนการทำแห้งไม่ได้มีความคงตัวของแอนโทไซยานินสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสด เพราะเนื่องจากปริมาณแอนโทไซยานินจากผลการทดลองที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

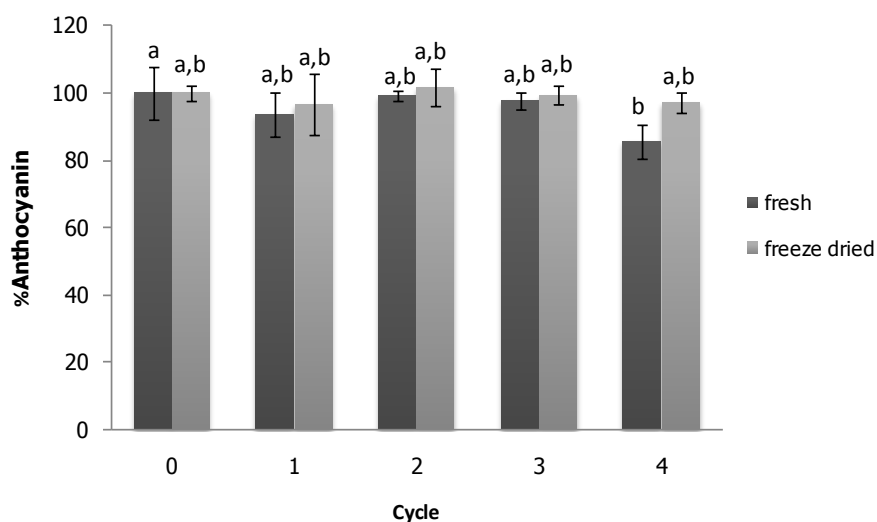


รูปที่ 4.19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดที่ได้จากแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ ในสถานะไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ (non sterilization), สถานะ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ 60 องศาเซลเซียสเวลา 30 นาที (LTLT), สถานะฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ 70 องศาเซลเซียสเวลา 15 วินาที (HTST) และสถานะฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ 121 องศาเซลเซียสเวลา 20 นาที (sterilization) (a-d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของทุกกลุ่มตัวอย่าง)

4.3.3 ผลของสถานะเร่งแบบ freeze thaw cycle ที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน

ในการศึกษาสถานะเร่งซึ่งเป็นการเร่งสารสกัดผลหม่อนให้เกิดการสูญเสียสภาพได้เร็วยิ่งขึ้นโดยการเร่งแบบ freeze thaw cycle มีการเปลี่ยนแปลงสถานะในการเก็บสารสกัดโดยสลับกันระหว่างอุณหภูมิร้อนกับเย็น ทำโดยนำสารสกัดผลหม่อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็น ระยะเวลา 46 ชั่วโมง และทำให้น้ำแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที นับเป็น 1 รอบ ทำจนครบ 4 รอบ [Regan, J. และ Mulvihill, D.M., 2010] หาร้อยละของแอนโทไซยานินที่คงอยู่เทียบกับที่เริ่มต้นแสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.20 พบว่าสถานะแบบ freeze thaw cycle ไม่มีผลทำให้สารแอนโทไซยานินเสื่อมสภาพได้เร็วยิ่งขึ้น ปริมาณแอนโทไซยานินในแต่ละรอบการทดลองมีค่าลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด และในรอบที่ 4 จะเห็นว่าปริมาณแอนโทไซยานินลดต่ำกว่ารอบที่ 1 ถึง รอบที่ 3 โดยเฉพาะสารสกัดผงผลหม่อนสกัดที่มีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำกว่าสารสกัดผลหม่อนสด การที่นำสารสกัด

หม่อนมาทดสอบด้วยสภาวะเร่งนี้ส่งผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินน้อยเมื่อเทียบกับการให้ความร้อนสูงที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง อาจเป็นเพราะการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินได้รับผลจากอุณหภูมิมากกว่าการใช้วงจรร้อนแข็งสลับกันด้วยการเร่งสภาวะของสารสกัดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่มีผลทำให้แอนโทไซยานินเสื่อมสลายข้างต้นนั้นจะทำนายได้ว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสประมาณ 90 นาที ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงน้อยมากประมาณร้อยละ 10 ซึ่งในสภาวะเร่งนี้มีการใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 40 องศาเซลเซียส 90 นาที ในการทำให้ร้อนและหลังจากนั้นจึงทำให้แข็งด้วยอุณหภูมิตดลบจึงทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงอย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยทั่วไปสภาวะ freeze thaw cycle ใช้ในการเร่งอายุให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมสภาพเร็วกว่าปกติเพื่อใช้ทำนายวันหมดอายุของผลิตภัณฑ์ แต่ยังไม่มียางานว่าระบบ freeze thaw cycle ประเภทนี้แทนระยะเวลาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ได้กี่เดือน แต่ในการทดสอบตามมาตรฐานเภสัชตำรับของอเมริกา United States Pharmacopeia (USP) คือสภาวะเร่งใช้อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 เดือน จะแทนระยะเวลาความคงตัวเท่ากับ 2 ปี



รูปที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดที่ไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ จากแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ ในสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle โดย แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 46 ชั่วโมงจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2 องศาเซลเซียส) เวลา 30 นาที และแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 90 นาที เท่ากับ 1 cycle จนครบ 4 cycle โดยที่ a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นอกจากนี้ยังพบว่าความคงตัวของแอนโทไซยานินของผลหมอนสกัดที่ศึกษาในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ สภาวะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle มีความคงตัวดีกว่าในสารสกัดหมอนสด เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินไม่ได้ขึ้นกับอุณหภูมิเพียงอย่างเดียวแต่ยังขึ้นกับองค์ประกอบอื่นซึ่งความแตกต่างของสารสกัดทั้งสองนั้นนอกจากอุณหภูมิและเวลาที่ควบคุมให้อยู่ในสภาวะเดียวกัน สมบัติทางกายภาพและเคมีของสารสกัดทั้งสองในเริ่มต้นมีความแตกต่างกันด้วยคือ ค่าพีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ร้อยละของน้ำหนักแห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ และปริมาณแอนโทไซยานิน อาจมีผลทำให้ความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดหมอนสดมีความแตกต่างกันได้ ในที่นี้ผลหมอนสกัดมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.04 ซึ่งสูงกว่าสารสกัดหมอนสดมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.67 จึงน่าจะมีผลทำให้สารสกัดหมอนสดมีความคงตัวสูงกว่าผลหมอนสกัดเพราะโครงสร้างของแอนโทไซยานินในสภาวะที่เป็นกรดมีความคงตัวมากกว่าในสภาวะที่เป็นกลางหรือด่าง [Bae และ Suh, 2007] แต่ผลการทดลองกลับให้ผลที่ตรงข้ามกันแต่นอกจากค่าพีเอชที่แตกต่างกันของสารสกัดทั้งสองแล้ว องค์ประกอบอื่นๆ ก็อาจมีผลเช่นกัน ได้มีรายงานวิจัยพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินมีหลายปัจจัย ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ แสง ออกซิเจน เอนไซม์ ซัลไฟต์ กรดแอสคอบิก น้ำตาล และความเข้มข้น [Cavalcanti, R.N. และคณะ, 2010] นอกจากนี้พีเอชแล้วปริมาณน้ำตาลก็เป็นส่วนสำคัญเนื่องจากในงานวิจัยนี้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในผลหมอนสกัดที่พบสูงถึง 127.26 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สารสกัดหมอนสดมีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 50.13 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลที่มากกว่าในผลหมอนสกัดอาจทำให้เกิดสาร furfural สูงขึ้นในระหว่างการให้ความร้อนเมื่อเวลาผ่านไปมีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดต่ำลง เนื่องจากสาร furfural เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของน้ำตาลจากปฏิกิริยาการเมลไลเซชัน [Tsai, P.J. และคณะ, 2005] แต่ก็กลับพบว่าผลหมอนสกัดมีความคงตัวสูงกว่าสารสกัดหมอนสด อาจเป็นเพราะปฏิกิริยาการเมลไลเซชันนี้จะเกิดได้ดีในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 120 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอชระหว่าง 3-9 ซึ่งในที่นี้ใช้อุณหภูมิไม่เกิดชน 120 องศาเซลเซียส แต่ยังพบสาเหตุอื่นที่อาจมีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินคือ ปริมาณของแข็ง (solid contents) ในสารสกัด พิจารณาได้จาก % brix และร้อยละน้ำหนักแห้งของสารสกัด พบว่าสารสกัดหมอนสดมี % brix และร้อยละน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่สูงกว่าผลหมอนสกัด ในผลหมอนสกัดมีเท่ากับ 7.78% brix ในขณะที่สารสกัดหมอนสดเท่ากับ 9.98 % brix และร้อยละน้ำหนักแห้งร้อยละ 6.59 และ 11.19 ตามลำดับ เนื่องจากปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้สูง จึงทำให้มีปริมาณน้ำน้อย ออกซิเจนซึ่งเป็นโมเลกุลในการเร่งการสลายตัวจึงอยู่ใกล้ชิดกัน

ทำให้เกิดการเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของแอนไฮโดรซัยยานินให้สลายตัวได้เร็วขึ้น [Wang, W.D. และ Xu, S.Y., 2007][Kirca, A. และ Cemeroglu, B., 2003][Kirca, A. และคณะ, 2007] และจากผลการทดลองดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการเก็บรักษาสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดเพื่อให้ได้แอนไฮโดรซัยยานินคงมีประสิทธิภาพสูงสุดคือ ควรเก็บสารสกัดหม่อนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสให้ปราศจากการสัมผัสแสงและอากาศ แต่ถ้าจำเป็นต้องนำสารสกัดหม่อนไปผ่านกระบวนการที่ใช้ความร้อนสูงควรใช้เวลาสั้น เพื่อให้แอนไฮโดรซัยยานินเสื่อมสลายน้อยที่สุดและการฆ่าเชื้อที่มีความเหมาะสมถ้าต้องการให้ได้รับแอนไฮโดรซัยยานินที่มีความคงตัวสูงสุดควรผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที แต่ถึงอย่างไรก็ตามการนำไปใช้ต้องเลือกสภาวะที่เหมาะสมนำไปทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในสารสกัดแล้วเป็นไปตามมาตรฐานองค์การอาหารและยา ซึ่งการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสภาวะต่างๆ ที่มีต่อปริมาณแอนไฮโดรซัยยานินเท่านั้น

4.4 การเตรียมอนุภาคไมโครอัลจิเนต

ในการขึ้นรูปเม็ดอัลจิเนตเตรียมได้ด้วยวิธีการเจลแบบ external gelation ใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต เท่ากับร้อยละ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเตรียมได้ของสารโซเดียมอัลจิเนตชนิดความหนืดปานกลาง (medium viscosity, Sigma Aldrich) และแก๊สไนโตรเจนซึ่งเป็นแก๊สเฉื่อยใช้ในการพ่นให้อนุภาคมีขนาดเล็กในระดับไมโครเมตร อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนที่ใช้เท่ากับ 10, 15, และ 20 ลิตรต่อนาทีโดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตขึ้นรูปเม็ดอัลจิเนตโดยใช้แก๊สไนโตรเจนทั้ง 3 อัตราการไหล สามารถสรุปสภาวะที่ใช้ขึ้นรูปดังตารางที่ 4.8 การเลือกใช้แก๊สไนโตรเจนนี้เพื่อไม่ให้ในเม็ดอัลจิเนตมีอากาศอยู่ภายในเนื่องจากการทดลองต่อไปได้อนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ได้ไปดูดซับแอนไฮโดรซัยยานินในสารสกัดหม่อน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอนไฮโดรซัยยานินกับอากาศที่เกิดการสะสมในอนุภาคไมโครอัลจิเนตนี้

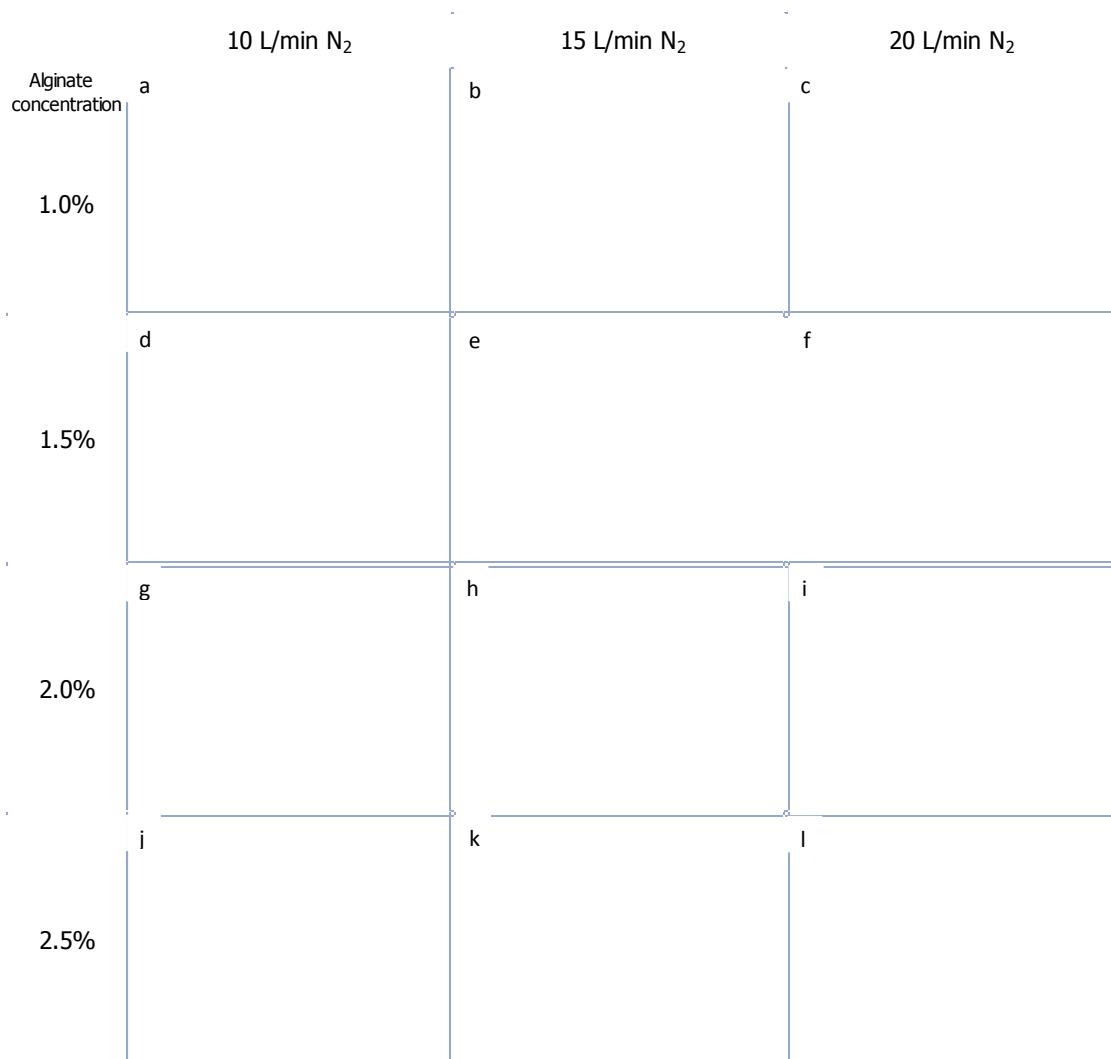
ตารางที่ 4.8 สภาวะที่ใช้ทำการทดลองในการเตรียมอนุภาคไมโครอัลจินต

ความเข้มข้นของ สารละลายโซเดียม อัลจินต(ร้อยละโดย น้ำหนักต่อปริมาตร)	ความหนืดของสารละลายโซเดียม อัลจินต (เซนติพอยด์, (cP)) ที่ 25 องศาเซลเซียส, 100 rpm	อัตราการไหล ของแก๊สไนโตรเจน (ลิตรต่อนาที)
1.0	8.63±0.15	10
		15
		20
1.5	39.45±1.89	10
		15
		20
2.0	89.55±6.08	10
		15
		20
2.5	178.45±3.57	10
		15
		20

เม็ดอัลจินตเกิดขึ้นเมื่อสารละลายโซเดียมอัลจินตเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนกับแคลเซียมคลอไรด์โดยกรดกลูโคนิกซึ่งเป็นองค์ประกอบในอัลจินตจะเชื่อมขวางกับแคลเซียมได้เป็นแคลเซียมอัลจินต [Kim, H.S. 1990] การเกิดเป็นเม็ดอัลจินตเกิดจากการแลกเปลี่ยนไอออนจากพื้นผิวด้านนอกสู่ด้านในโดยการแพร่ของแคลเซียมไอออนทำให้เม็ดอัลจินตเกิดเจลที่ผิวนอกก่อน โดยแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เม็ดอัลจินตเป็นเจลแข็งทั้งเม็ด ลักษณะรูปร่างของเม็ดอัลจินตที่ขึ้นรูปได้สามารถตรวจสอบได้โดยกล้องจุลทรรศน์ (ยี่ห้อ Nikon, รุ่น Eclipse 80i, Japan) กำลังขยาย 4 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.21 พบว่าลักษณะเม็ดอัลจินตที่ขึ้นรูปได้จากสารละลายโซเดียมอัลจินตความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรโดยใช้แก๊สไนโตรเจนอัตราการไหล 10 ลิตรต่อนาทีในการพ่นอนุภาคให้มีขนาดระดับไมครอนดังรูปที่ 4.21 (a) ทำให้ได้เม็ดอัลจินตมีลักษณะเป็นทรงกลมมากที่สุดสำหรับความ

เข้มข้นนี้และมีขนาดเม็ดใหญ่กว่าการขึ้นรูปที่ใช้แก๊สไนโตรเจนที่อัตราการไหลมากกว่านี้และเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนให้สูงขึ้นเป็น 15 และ 20 ลิตรต่อนาทีดังรูปที่ 4.21 (b) และ (c) มีผลทำให้ลักษณะเม็ดอัลจินเตไม่คงรูปเป็นทรงกลม บิดเบี้ยว และเกิดเป็นแผ่นของอนุภาคเล็กจับกลุ่มกัน อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินเตที่ต่ำเกินไปทำให้ความหนืดต่ำเมื่อแก๊สไนโตรเจนมีอัตราการไหลสูงขึ้นทำให้มีแรงตึงผิวน้อยจึงยากในการก่อตัวเป็นอนุภาคที่ผิวกลมได้ สำหรับเม็ดอัลจินเตที่ขึ้นรูปโดยใช้สารละลายโซเดียมอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าการใช้แก๊สไนโตรเจนที่อัตราการไหล 10 ลิตรต่อนาทีดังรูปที่ 4.21 (d) ทำให้เม็ดอัลจินเตมีลักษณะกลมสม่ำเสมอมากที่สุดเช่นกันเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนเป็น 15 ลิตรต่อนาที ดังรูปที่ 4.21 (e) ทำให้เม็ดอัลจินเตยังมีลักษณะกลมอยู่ แต่เพิ่มปริมาณการเกิดเม็ดอัลจินเตที่มีลักษณะเป็นทรงลูกแพร์เพิ่มสูงขึ้นและเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 20 ลิตรต่อนาที ดังรูปที่ 4.21 (f) พบว่าเม็ดอัลจินเตเล็กลงมากไม่ค่อยเป็นรูปทรงและเกิดการจับตัวเป็นแผ่นขนาดใหญ่ขึ้น เม็ดอัลจินเตของการใช้สารละลายโซเดียมอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนที่ทำให้ลักษณะเป็นทรงกลมคือ 10 และ 15 ลิตรต่อนาที ดังรูปที่ 4.21 (g) และรูปที่ 4.21 (h) ตามลำดับโดยอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนเท่ากับ 10 ลิตรต่อนาที เม็ดอัลจินเตมีลักษณะลูกแพร์เกิดขึ้นผสมด้วยเล็กน้อยแต่การใช้แก๊สไนโตรเจนที่อัตราการไหล 15 ลิตรต่อนาทีเม็ดอัลจินเตที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะกลมสม่ำเสมอมากกว่าและสำหรับการใช้แก๊สไนโตรเจนที่อัตราการไหล 20 ลิตรต่อนาที พบว่าเม็ดอัลจินเตที่เกิดขึ้นเล็กลงมากและลักษณะไม่ค่อยเป็นทรงกลมแต่ลดการจับกลุ่มกันของอนุภาค ดังรูปที่ 4.21 (i) สำหรับเม็ดอัลจินเตที่ขึ้นรูปด้วยสารละลายโซเดียมอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าลักษณะเม็ดอัลจินเตทรงลูกแพร์เกิดขึ้นในการใช้แก๊สไนโตรเจนทุกอัตราการไหลคือที่ 10, 15 และ 20 ลิตรต่อนาที โดยเฉพาะที่อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 10 ลิตรต่อนาที ลักษณะเม็ดอัลจินเตส่วนใหญ่จะเป็นทรงลูกแพร์เกือบทั้งหมดดังรูปที่ 4.21 (j) เมื่อเพิ่มแก๊สไนโตรเจนให้มีอัตราการไหลสูงขึ้นอีกเป็น 15 ลิตรต่อนาที ทำให้เม็ดอัลจินเตมีลักษณะเป็นทรงกลมมากขึ้นแต่ยังปรากฏเม็ดอัลจินเตทรงลูกแพร์อยู่ดังรูปที่ 4.21 (k) ซึ่งถ้าเพิ่มอัตราการไหลของแก๊สให้สูงขึ้นเป็น 20 ลิตรต่อนาที ลักษณะเม็ดอัลจินเตจะมีขนาดที่ไม่สม่ำเสมอแตกต่างกันมากดังรูปที่ 4.21 (l) ซึ่งการใช้แก๊สไนโตรเจน 15 ลิตรต่อนาทีจึงเป็นอัตราการไหลที่น่าจะมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการขึ้นรูปที่ใช้สารละลายโซเดียมอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรนี้

ปัจจัยที่ส่งผลในการผลิตเม็ดอัลจินตด้วยสารละลายโซเดียมอัลจินตที่เกิดการพ่นลงในอ่างแคลเซียมคลอไรด์มีหลายปัจจัยด้วยกัน อาทิเช่น แรงตึงผิว, ขนาดหัวเข็ม, ความสูงของหัวเข็มกับระดับสูงสุดของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ [Chan, E. S. และคณะ, 2009], ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินต, ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ [Kim C. K. และ Lee E.J., 1992], ระยะเวลาในการแช่ของเม็ดอัลจินตในอ่างแคลเซียมคลอไรด์, ความหนืดของอัลจินต [Ostberg, T. และคณะ, 1993], อัตราการไหลของสารละลายโซเดียมอัลจินต, อัตราการไหลของแก๊สเป็นต้น จากการทดลองเกิดปัญหาหลายอย่างคือ ลักษณะรูปร่างเม็ดอัลจินตไม่เป็นทรงกลม การกระจายตัวของเม็ดอัลจินตไม่สม่ำเสมอเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดอัลจินต ซึ่งการควบคุมตัวแปรทั้งหมดให้คงที่และเปลี่ยนแปลงเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินตตัวแปรเดียวเป็นไปได้ยากมากเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินตให้สูงขึ้นมีผลทำให้ความหนืดของสารละลายสูงขึ้นความหนืดที่สูงขึ้นจะทำให้อัตราการพ่นของอัลจินตสูงขึ้นไปด้วยอีกทั้งไม่สามารถควบคุมให้อัตราการไหลของแก๊สในโตรเจนเท่ากันได้จากค่าความหนืดที่เพิ่มขึ้นจากการใช้สารละลายโซเดียมอัลจินตที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น มีผลทำให้เพิ่มแรงตึงผิวได้เพียงเล็กน้อย ความหนืดของสารละลายจึงทำให้สมบัติทางการไหลมีความสำคัญมากกว่าแรงตึงผิว เนื่องจากสารละลายโซเดียมอัลจินตเป็นของไหลแบบนอนนิวโตเนียน (non-Newtonian) [Lee. H. H. และคณะ, 1996] การใช้อัตราการไหลของแก๊สในโตรเจนที่เหมาะสมกับความหนืดของสารละลายจะสามารถทำให้เม็ดอัลจินตเป็นทรงกลมได้ ถ้าอัตราการไหลของแก๊สที่ต่ำไปจะทำให้เม็ดอัลจินตเกิดเป็นทรงลูกแพรมีลักษณะของผิวเม็ดอัลจินตต่อกันแยกออกจากกันไม่ขาดและถ้าอัตราการไหลในโตรเจนสูงเกินไปจะทำให้ลักษณะขนาดเม็ดอัลจินตเล็กมากและการที่เม็ดอัลจินตเล็กมากมีผลทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเป็นแผ่นลอยอยู่บนอ่างแคลเซียมคลอไรด์ ดังรูป 4.21 (c) และ 4.21 (f) นอกจากนี้รายงานวิจัย ของ Chan E. S และ คณะ (2009) ได้ศึกษาโมเดลสำหรับรูปร่างและขนาดของเม็ดอัลจินตด้วยวิธี extrusion-dripping พบว่าสมบัติของสารละลายโซเดียมอัลจินตมีผลต่อรูปร่างและขนาดของเม็ดอัลจินตตามกลศาสตร์ของไหลซึ่งอธิบายด้วยความสัมพันธ์กับแรงความหนืดและแรงตึงผิว และแบ่งชนิดของรูปร่างของเม็ดอัลจินตที่เกิดขึ้นได้ 4 ชนิดตามระยะของหัวเข็มถึงผิวหน้าของอ่างแคลเซียมคลอไรด์คือ ทรงกลม, ทรงหยดน้ำตา, ทรงลูกแพร และ ทรงไข่



รูปที่ 4.21 ลักษณะรูปร่างของเม็ดอัลจิเนตขึ้นรูปด้วยวิธี external gelation ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4x โดยใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแก๊สไนโตรเจนอัตราการไหล 10, 15 และ 20 ลิตรต่อนาที (สเกลบาร์มีขนาด 500 ไมโครเมตร)

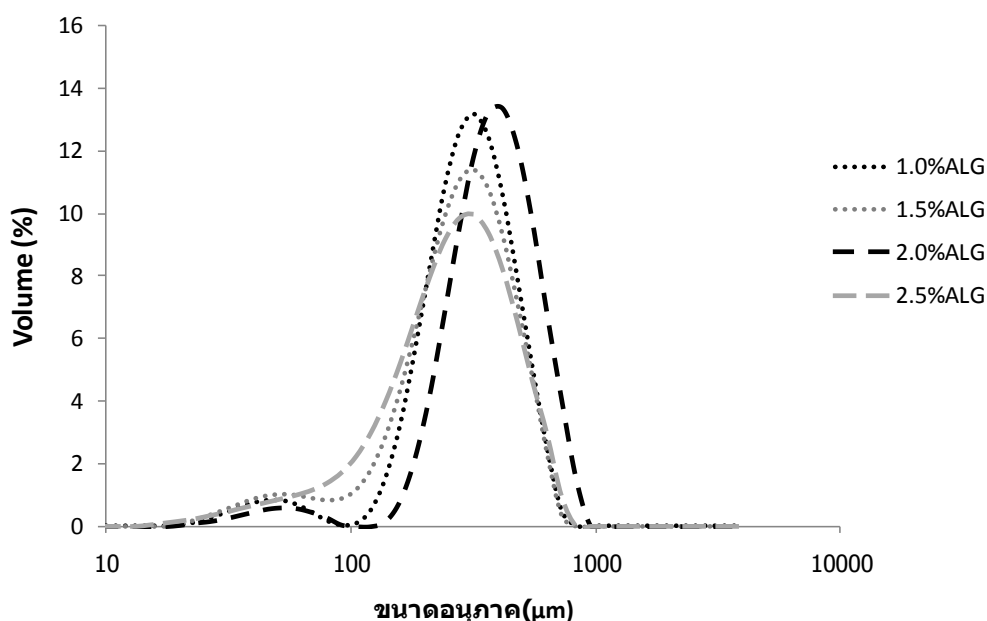
จากการทดลองข้างต้นสามารถเลือกสภาวะสำหรับการขึ้นรูปเม็ดอัลจินตโดยพิจารณา ลักษณะรูปร่างของเม็ดอัลจินตที่ลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลมมากที่สุดของในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายไฮเดียมอัลจินตที่ใช้ทำการทดลองและหาขนาดอนุภาคเฉลี่ย ด้วยการนำเทคนิคการกระเจิงของแสงด้วยเครื่อง masterzier malvidin มาใช้หาขนาดอนุภาคเฉลี่ยของเม็ดอัลจินต และศึกษาลักษณะการกระจายตัวโดยให้เม็ดอัลจินตแขวนลอยในน้ำเคลื่อนที่ไปมา ดังแสดงในตารางที่ 4.9 เม็ดอัลจินตที่เตรียมได้จากสารละลายไฮเดียมอัลจินตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้สัญลักษณ์ดังนี้ 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.0%ALG ตามลำดับ โดยแต่ละสูตรจะได้ลักษณะรูปร่างของเม็ดอัลจินตต่างกัน 1.0%ALG และ 1.5%ALG จะได้รูปร่างเม็ดอัลจินตทรงกลม 2.0%ALG จะได้รูปร่างเม็ดอัลจินตค่อนข้างทรงกลมแต่ในสูตร 2.5%ALG รูปร่างของเม็ดอัลจินตที่ได้จะเป็นทรงกลมผสมแปรร และขนาดอนุภาคเฉลี่ยของเม็ดอัลจินต 1.0%ALG เท่ากับ 325.00 ± 17.09 ไมโครเมตร, 1.5%ALG เท่ากับ 415.63 ± 13.09 ไมโครเมตร, 2.0%ALG เท่ากับ 302.30 ± 12.90 ไมโครเมตร และ 2.5%ALG เท่ากับ 291.78 ± 05.56 ไมโครเมตร ที่อัตราการไหลเดียวกันของแก๊สไนโตรเจน อัตราเร็ว 10 ลิตรต่อนาที เม็ดอัลจินต 1.5%ALG มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่า 1.0%ALG เนื่องจากการพ่นสารละลายอัลจินตลงในอ่างแคลเซียมคลอไรด์เกิดจากแก๊สไนโตรเจนเข้าไปกระจายตัวในสารละลายไฮเดียมอัลจินตทำให้เกิดการกระจายตัวออกจากกัน และเมื่อสารละลายกระจายตัวออกจากกันแล้วหลังจากนั้นอนุภาคตกลงสู่อ่างแคลเซียมคลอไรด์ด้วยแรงดึงดูดของโลกโดยมีแรงตึงผิวพยุงอยู่ด้วย [Chan, E. S. และคณะ, 2009] ซึ่งแรงตึงผิวน้อย จากความหนืดของสารละลายที่สูงขึ้นทำให้ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นได้ แต่สำหรับการใช้แก๊สไนโตรเจน 15 ลิตรต่อนาทีจะพบว่าเม็ดอัลจินต 2.5%ALG มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่า 2.0%ALG แต่ก็ยังมีขนาดที่เล็กกว่าการใช้แก๊สไนโตรเจนอัตราเร็ว 10 ลิตรต่อนาที เนื่องจากอัตราเร็วของแก๊สที่สูงขึ้นจึงมีผลทำให้ขนาดอนุภาคเล็กลงได้

ตารางที่ 4.9 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของเม็ดอัลจิเนตสูตรต่างๆ

ความเข้มข้นของ สารละลาย โซเดียมอัลจิเนต (ร้อยละโดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร)	อัตราการไหลของ แก๊สไนโตรเจน (ลิตรต่อนาที)	สัญลักษณ์ ที่ใช้	ขนาด อนุภาคเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	รูปร่าง
1.0	10	1.0%ALG	325.00±17.09 ^a	ทรงกลม
1.5	10	1.5%ALG	415.63±13.09 ^b	ทรงกลม
2.0	15	2.0%ALG	302.30±12.90 ^a	ค่อนข้างกลม
2.5	15	2.5%ALG	291.78±05.56 ^a	กลมผสมแปรร

^a และ ^b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

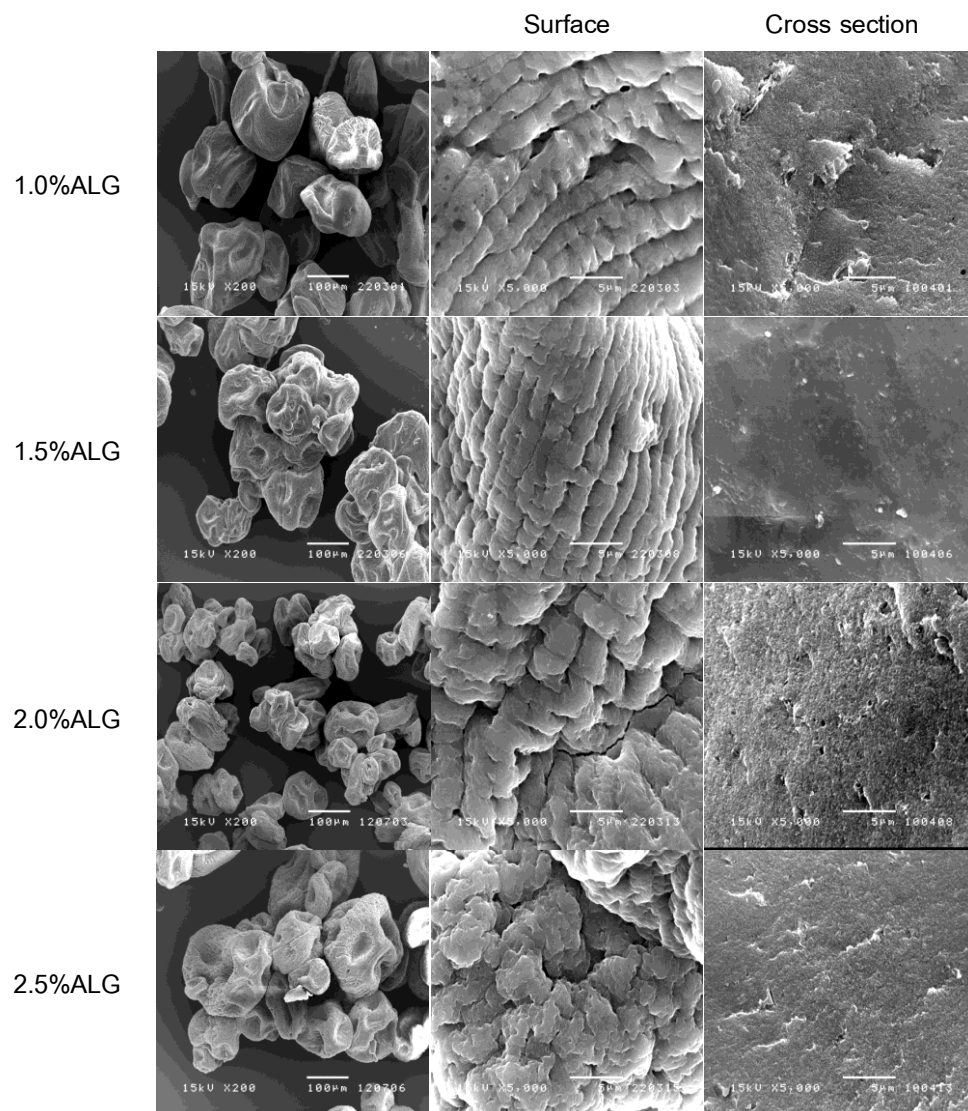
การวิเคราะห์ลักษณะการกระจายตัวดังรูปที่ 4.22 พบว่าลักษณะการกระจายตัวมีสองช่วง คือช่วงที่อนุภาคต่ำกว่า 100 ไมโครเมตรและสูงกว่า 100 ไมโครเมตรเกิดการกระจายตัวของอนุภาคเป็นสองกลุ่มดังที่เห็นเป็นสองพีค เม็ดอัลจิเนต 1.0%ALG และ 1.5%ALG มีช่วงการกระจายตัวของอนุภาคใกล้เคียงกัน แต่เม็ดอัลจิเนต 1.0%ALG ปริมาณอนุภาคที่มีขนาดในช่วง 200-400 ไมครอนจะมีปริมาณมากกว่าจาก % volume ที่สูงกว่านั้น คืออนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่า และเม็ดอัลจิเนต 1.5%ALG จะเกิดอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 100 ไมครอนมากกว่า 1.0%ALG โดยช่วงในการกระจายตัวของ 1.0%ALG และ 1.5%ALG อยู่ในช่วงเดียวกันคือ 20-825 ไมโครเมตร ในขณะที่เม็ดอัลจิเนต 2.0%ALG และ 2.5%ALG ช่วงการกระจายตัวของทั้งสองนี้มีช่วงกว้างที่ต่างกัน โดยเม็ดอัลจิเนต 2.0%ALG ช่วงของการกระจายตัวจะเลื่อนไปทางด้านที่มีขนาดอนุภาคใหญ่มากขึ้น แต่การกระจายตัวของขนาดอนุภาคแคบกว่า 2.5%ALG แต่สำหรับเม็ด อัลจิเนต 2.5 %ALG จะเห็นว่ายอดพีคต่ำกว่าและฐานพีคกว้างกว่านั้นคือมีการกระจายตัวในช่วง กว้างกว่าซึ่งการผลิตเม็ดอนุภาคที่ดีควรจะมีช่วงการกระจายตัวที่แคบจะได้ขนาดของอนุภาคที่มีความสม่ำเสมออีกทั้งในสูตรนี้ยังเกิดอนุภาคขนาดประมาณ 100 ไมโครเมตรมากกว่าสูตรอื่นๆ และการแบ่งกลุ่มของความแตกต่างของขนาดไม่ชัดเจนดังลักษณะพีคหนึ่งกับพีคที่สองเริ่มมีการรวมกันการกระจายของ 2.0%ALG อยู่ในช่วง 20-832 ไมครอน และ 2.5%ALG อยู่ในช่วง 15-725 ไมครอนซึ่งการกระจายตัวของเม็ดอัลจิเนตในทุกสูตรนี้อยู่ในช่วงที่กว้างมา



รูปที่ 4.22 การกระจายตัวของขนาดอนุภาค (size distribution) ของเม็ดอัลจิเนต 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG ด้วย Masterzier malvidin 2000

เมื่อนำเม็ดอัลจิเนตเปียกที่ได้นี้ไปผ่านกระบวนการทำแห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้เป็นอนุภาคไมโครอัลจิเนต สามารถนำไปศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไมโครอัลจิเนตนี้ โดยดูลักษณะรูปร่าง พื้นผิว ภายนอกและภายใน โดยใช้เครื่องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กระบวนการทำแห้งด้วยวิธีการอบนี้ น้ำจะถูกดึงออกจากอนุภาคอย่างรวดเร็ว ทำให้อนุภาคเกิดการหดตัวและไม่คงรูปร่างเป็นทรงกลมดังรูปที่ 4.23 พิจารณาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG พบว่าอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่เกิดขึ้นมีลักษณะหดตัวลงทำให้มีขนาดอนุภาคที่เล็กลงจากเม็ดอัลจิเนตเปียกอีกทั้งการดึงน้ำออกอย่างรวดเร็ว ทำให้อนุภาคเกิดการเกาะกลุ่มไม่กระจายตัวและในส่วนของลักษณะพื้นผิวของอนุภาคหลังการทำแห้งจะมีความขรุขระมากขึ้นและมีความไม่เป็นระเบียบมากขึ้นด้วย และเมื่อผ่าตัดขวาง (cross section) ดูลักษณะโครงสร้างภายในของอนุภาคในระดับไมครอน ดังรูปที่ 4.23 cross section จะเห็นว่าภายในของอนุภาคตันไม่เกิดรูพรุนภายในโครงสร้างที่มองเห็นได้ อาจเกิดจากที่อนุภาคเกิดการหดตัวให้โครงสร้างเข้ามาชิดและติดกัน โครงสร้างของอัลจิเนตประกอบด้วย G block และ M block ซึ่งการเชื่อมขวางด้วยไอออนประจุบวกสองเกิดเฉพาะที่ตำแหน่ง G block เท่านั้น [Lemoine, D. และคณะ, 1998] กับไอออนของแคลเซียมที่ได้จากสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ อัลจิเนตที่ใช้มีสัดส่วน M/G เท่ากับ 1.56 จึงมีปริมาณของอัลจิเนตชนิด G น้อยกว่าทำให้เกิดการเชื่อมขวางด้วยไอออนน้อยจึงอาจมีผลทำให้

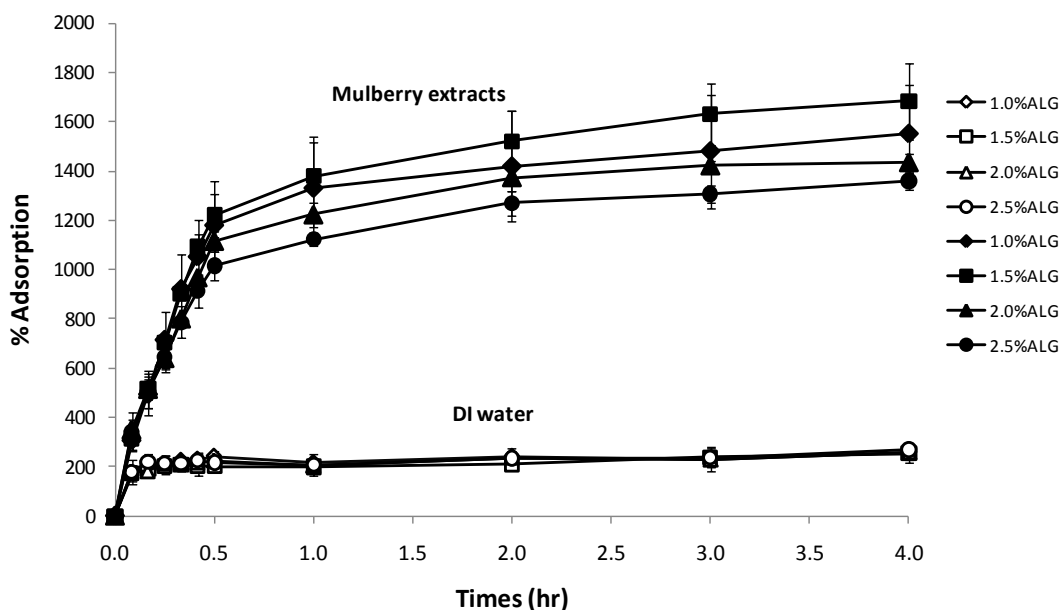
ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของเม็ดอัลจิเนตแห้งหลังการอบมีการหดตัวสูง Chan, E.S. และคณะ (2009) พบว่าเม็ดอัลจิเนตที่ได้จากอัลจิเนตชนิดที่มีสัดส่วนของ M/G (0.59) ต่ำ จะเกิดการหดตัวร้อยละ 12 (shrinkage factor, k_{SF} เท่ากับ 0.88) และสัดส่วนของ M/G (1.56) สูงจะหดตัวสูงขึ้นเป็นร้อยละ 19 (shrinkage factor, k_{SF} เท่ากับ 0.81) โดยที่การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอัลจิเนตไม่มีผลต่อร้อยละการหดตัวของปัด เนื่องจากสัดส่วนของ M/G มีผลต่อการหดตัวมาก เพราะอัลจิเนตที่มีสัดส่วน M/G ต่ำ จะมี G block มากกว่าอัลจิเนตที่มีสัดส่วน M/G สูง



รูปที่ 4.23 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคไมโครอัลจิเนต โดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของอนุภาคไมโครอัลจิเนต 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG หลังการทำแห้งแบบอบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

4.5 ความสามารถในการดูดซับน้ำและสารสกัดหม่อนของอนุภาคไมโครอัลจิเนต

จากการนำอนุภาคไมโครอัลจิเนตไปทดสอบหาความสามารถในการดูดซับน้ำเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงโดยแช่ในน้ำปราศจากไอออน (DI) ซึ่งค่าความเป็นพีเอชประมาณ 6.8 ดังรูปที่ 4.24 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการแช่ของอนุภาคไมโครอัลจิเนตในน้ำ DI มากขึ้นจากเริ่มต้น 0 นาที ถึง 5 นาที ความสามารถในการดูดซับน้ำสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว 1.0%ALG มีความสามารถในการดูดซับน้ำร้อยละ 172.74 ± 17.98 , 1.5%ALG ร้อยละ 173.06 ± 29.53 , 2.0%ALG ร้อยละ 179.97 ± 48.48 และ 2.5%ALG ร้อยละ 179.54 ± 27.65 เมื่อระยะเวลาในการดูดซับน้ำเพิ่มสูงขึ้น ร้อยละการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครอัลจิเนตทั้ง 4 สูตรเพิ่มสูงขึ้นด้วยจนถึงเวลาประมาณ 30 นาทีและหลังจากเวลา 30 นาที พบว่าการดูดซับน้ำได้อิ่มตัวและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีความสามารถในการดูดซับน้ำเท่ากับร้อยละ 242.48 ± 21.30 (1.0%ALG), 200.82 ± 21.60 (1.5%ALG), 224.84 ± 23.85 (2.0%ALG) และ 216.33 ± 31.94 (2.5 %ALG) ความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครอัลจิเนตของทั้ง 4 สูตรนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อนุภาคไมโครอัลจิเนตมีความสามารถในการดูดซับน้ำปราศจากไอออนซึ่งมีค่าพีเอช 6.8 ทำให้สามารถดูดซับน้ำได้ประมาณร้อยละ 170-240 หรือประมาณ 1.7-2.4 เท่า ของน้ำหนักแห้งของอนุภาคไมโครอัลจิเนต มีรายงานการวิจัยพบว่าพีเอชมีผลต่อการดูดซับเนื่องจากองค์ประกอบทางโมเลกุลของกรดแมนนูโรนิก (mannuronic) และกลูโรนิก (guluronic) ในอัลจิเนตเป็นสิ่งสำคัญ โขเดียมอัลจิเนตที่ใช้เป็นชนิดความหนืดปานกลางโดยมีองค์ประกอบของกรดแมนนูโรนิกร้อยละ 61 และกลูโรนิกร้อยละ 39 หรือ (สัดส่วน M/G เท่ากับ 1.56) การเชื่อมขวางเกิดขึ้นกับกรดกลูโรนิกเท่านั้นเมื่อปริมาณกรดกลูโรนิกสูงขึ้นความหนืดของสารละลายนั้นสูงขึ้นด้วย ทำให้เจลที่ได้มีความแข็งแรงมากขึ้น [Poncelet, D. และคณะ, 1999] การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายของโซเดียมอัลจิเนตจะเป็นการเพิ่มสัดส่วนของปริมาณกรดกลูโรนิกให้สูงขึ้น

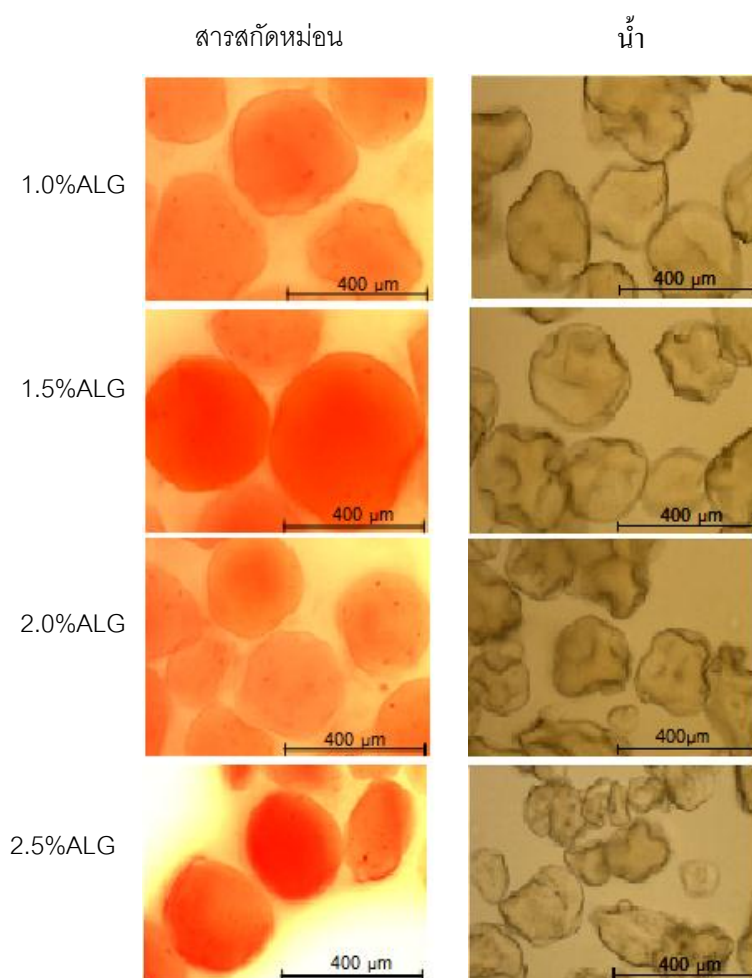


รูปที่ 4.24 ร้อยละการดูดซับน้ำและสารสกัดผงหม่อนแห้งของอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้งโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (1.0%ALG), ร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (1.5%ALG), ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (2.0%ALG) และ ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (2.5%ALG) (ใช้น้ำปราศจากไอออนในการดูดซับค่าพีเอชเท่ากับ 6.8 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสารสกัดผงหม่อนแห้งในการดูดซับค่าพีเอชเท่ากับ 4.31 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

นอกจากความสามารถในการดูดซับน้ำของอนุภาคไมโครอัลจิเนต พบว่าอนุภาคไมโครอัลจิเนตมีร้อยละการดูดซับน้ำที่สูงประมาณ 1.7-2.4 เท่านอกจากนี้ต้องมีทดสอบความสามารถในการดูดซับสารสกัดผลหม่อนเพื่อหาเวลาที่มีความเหมาะสมในการดูดซับสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนตต่อไปเนื่องจากสารสกัดผลหม่อนมีความเป็นกรดสูงกว่าน้ำซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.31 ± 0.01 การนำอนุภาคไมโครอัลจิเนตมาทดสอบโดยการแช่ในสารสกัดผลหม่อนเพื่อพิจารณาความสามารถในการดูดซับของสารสกัดผลหม่อน พบว่าความสามารถในการดูดซับสารสกัดผลหม่อนสูงชันอย่างรวดเร็วภายในช่วงเวลา 30 นาทีและค่อยๆ เพิ่มสูงชันอย่างช้าจนกระทั่งคงที่เมื่อถึงเวลา 4 ชั่วโมงแต่เนื่องจากสารสกัดผลหม่อนมีค่าพีเอชต่ำกว่าน้ำ DI ทำให้อนุภาคไมโครอัลจิเนตที่แช่ในสารสกัดผลหม่อนนี้มีความสามารถในการดูดซับได้ดีกว่าน้ำ DI มากถึงประมาณ 14-17 เท่าของน้ำหนักแห้งที่เวลาในการดูดซับสารสกัดผลหม่อนคงที่เวลา 4 ชั่วโมง 1.0%ALG มีร้อยละการดูดซับสารสกัดผลหม่อนเท่ากับ 1552.52 ± 198.34 , 1.5%ALG มีร้อยละการดูดซับสาร

สกัดผลหม่อนเท่ากับ 1684.30 ± 154.80 , 2.0%ALG มีร้อยละการดูดซับสารสกัดผลหม่อนเท่ากับ 1434.65 ± 37.75 และ 2.5%ALG มีร้อยละการดูดซับสารสกัดผลหม่อนเท่ากับ 1358.88 ± 32.81 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

นอกจากนี้ยังได้แสดงภาพการดูดซับน้ำและสารสกัดผงผลหม่อน ดังรูปที่ 4.25 หลังจากเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง จะพบว่าสีของสารสกัดหม่อนที่เห็นได้กึ่งจลจลทรศน์นี้จะได้เป็นลักษณะสีส้ม การดูดซับเกิดภายในทั้งอนุภาคและมีการขยายตัวจากที่ก่อนการดูดซับลักษณะอนุภาคจะเหี่ยวและเกาะกลุ่มกันแต่หลังการดูดซับแล้วอนุภาคมีขนาดที่กลมมากขึ้นและไม่เกาะกลุ่มกันดังเดิม แต่อนุภาคก็ยังไม่สามารถขยายตัวกลับมาเหมือนอนุภาครูปร่างกลมและผิวเรียบเหมือนตอนเป็นเม็ดอัลจินเตก่อนการอบแห้ง สำหรับการดูดซับน้ำอนุภาคบวมขึ้นเล็กน้อยแต่อนุภาคยังหดตัวอยู่ นอกจากนี้สามารถสรุปตารางความสัมพันธ์ของความสามารถในการดูดซับน้ำและสารสกัดผงผลหม่อนของอนุภาคไมโครอัลจินเตได้ดังตารางที่ 4.10



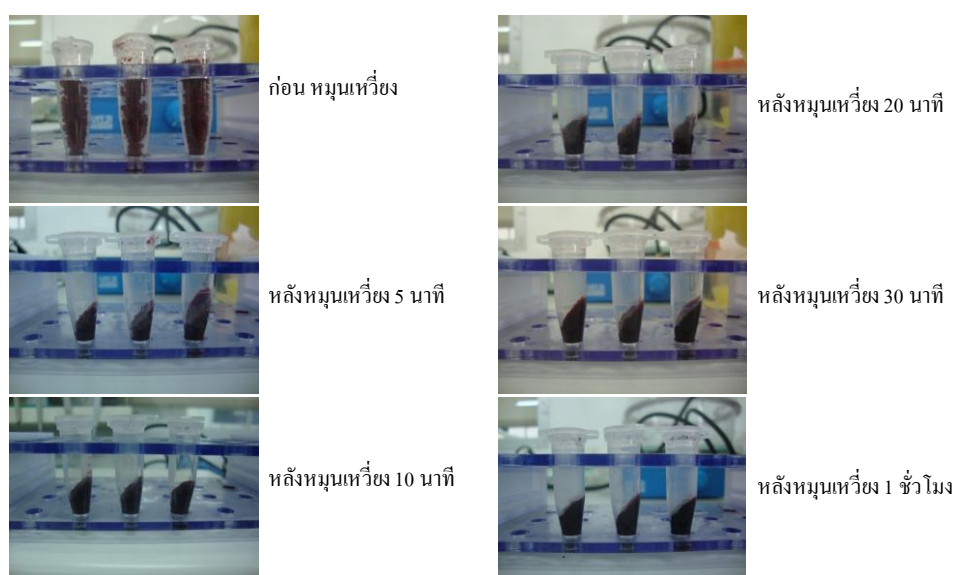
รูปที่ 4.25 ลักษณะการดูดซับน้ำและสารสกัดผงผลหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจินเตของ 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG หลังจากการดูดซับผ่านไป 4 ชั่วโมง (20x)

ตารางที่ 4.10 ร้อยละการดูดซับน้ำ (pH 6.8) ที่เวลา 30 นาทีและร้อยละการดูดซับสารสกัดหม่อน (pH 4.31) ที่เวลา 4 ชั่วโมง

อนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้ง	ร้อยละการดูดซับน้ำ	ร้อยละการดูดซับสารสกัดหม่อน
1.0%ALG	242.48±21.30 ^a	1552.52±198.34 ^{b,c}
1.5%ALG	200.82±21.60 ^a	1684.30±154.80 ^c
2.0%ALG	224.84±23.85 ^a	1434.65±37.75 ^{b,c}
2.5%ALG	216.33±31.94 ^a	1358.88±32.81 ^d

^a และ ^b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับสารดูดซับต่างชนิดกัน

เมื่อผ่านกระบวนการดูดซับสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนตสามารถยืนยันได้ว่า สารสกัดหม่อนถูกดูดซับไว้ในอนุภาคจริงดังแสดงในรูปที่ 4.26 อนุภาคไมโครอัลจิเนตหลังจากดูดซับสารสกัดหม่อนนำไปผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลาต่างๆจะเห็นว่าก่อนการหมุนเหวี่ยงของอนุภาคไมโครอัลจิเนตหลังถูกดูดซับมีสีน้ำตาลเข้มของสีในทุกอนุภาค และหลังการหมุนเหวี่ยงที่เวลา 5, 10, 20, 30 และ 60 นาที ลักษณะสีในอนุภาคที่ถูกดูดซับยังคงมีความสม่ำเสมออยู่ไม่ได้ถูกปั่นแยกออกมาอนุภาคแสดงว่าอนุภาคไมโครอัลจิเนตสามารถดูดซับสารสกัดหม่อนไว้ภายในด้วยพันธะที่ค่อนข้างแข็งแรงได้ไม่ได้ดูดซับแค่ที่พื้นผิวภายนอกเท่านั้น

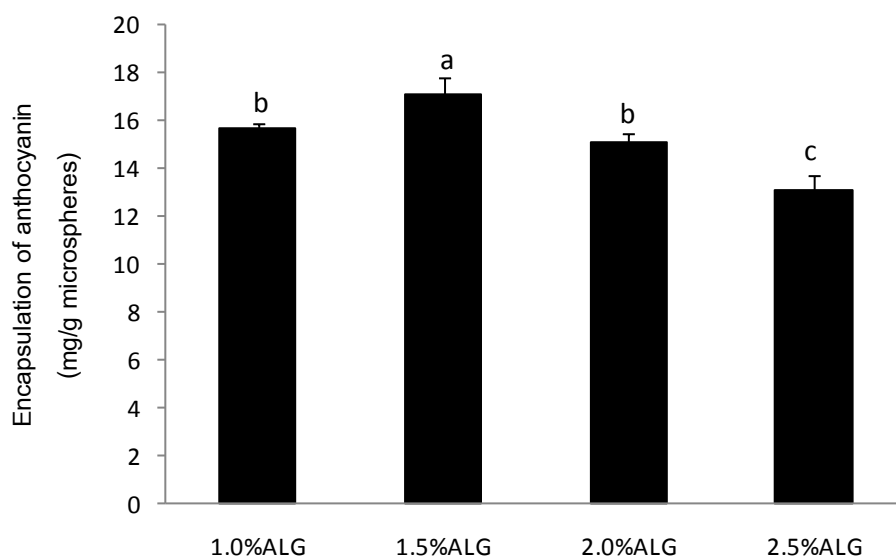


รูปที่ 4.26 อนุภาคไมโครอัลจิเนตหลังการดูดซับสารสกัดหม่อน ผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่เวลาต่างๆ

4.6 ปริมาณสารสำคัญที่กักเก็บได้

การกักเก็บสารแอนโทไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนตโดยการดูดซับสารสกัดผลหม่อน 4 ชั่วโมงแล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 3 วันสามารถหาปริมาณการกักเก็บสารแอนโทไซยานินโดยการสกัดสารแอนโทไซยานินออกจากอนุภาคไมโครอัลจิเนต ด้วยสารละลายผสมของ กรดไฮดรอกลอลริค:น้ำปราศจากไอออน:เอทานอล (1:29:70) 2 ครั้งเพื่อให้สามารถสกัดแอนโทไซยานินออกมาได้หมด โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมของสารแอนโทไซยานินทั้งหมดต่อกรัมของอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่กักเก็บแอนโทไซยานินไว้ พบว่าปริมาณการกักเก็บแอนโทไซยานินใน 1.0%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG เท่ากับ 15.67 ± 0.76 , 17.08 ± 0.25 , 15.10 ± 0.37 และ 13.07 ± 0.62 มิลลิกรัมแอนโทไซยานินต่อกรัมอนุภาคไมโครอัลจิเนตตามลำดับ ดังรูปที่ 4.27 อนุภาคไมโครอัลจิเนตสูตร 1.5%ALG สามารถกักเก็บสารแอนโทไซยานินได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญในขณะที่ใช้ 1.0%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG ปริมาณการกักเก็บลดลงตามลำดับ จากความสามารถในการดูดซับสารสกัดผลหม่อนที่ไม่ต่างอย่างมีนัยสำคัญแต่เมื่อภายหลังการดูดซับและผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วกลับทำให้มีการกักเก็บสารแอนโทไซยานินที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยสูตร 1.5%ALG ของอนุภาคไมโครอัลจิเนตมีปริมาณการกักเก็บที่ดีที่สุด สอดคล้องกับความสามารถในการดูดซับสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่สามารถดูดซับสารสกัดหม่อนได้สูงสุดที่สูตรนี้ หลังจากการทำแห้งแบบเยือกแข็งของอนุภาคแล้วจึงมีผลทำให้สามารถกักเก็บแอนโทไซยานินได้ในปริมาณมากเช่นกัน การกักเก็บแอนโทไซยานินไว้ในอนุภาคไมโครอัลจิเนตนี้ อาจเกิดจากแรงทางกายภาพของความแตกต่างกันระหว่างประจุ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของสารละลายไฮเดรียมอัลจิเนตนี้ทำให้ปริมาณการกักเก็บลดลงเนื่องจากมีเนื้อสารของแคลเซียมอัลจิเนตที่สูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามการกักเก็บจะได้ปริมาณสูงเป็นผลมาจากความสามารถของการดูดซับของสารสกัด ซึ่งปัจจัยที่ทำให้สามารถดูดซับได้แตกต่างกันในงานวิจัยนี้อาจเป็นเพราะ ขนาดของอนุภาคไมโครอัลจิเนต รูปทรง เป็นต้น ซึ่งขนาดอนุภาคไมโครอัลจิเนตในแต่ละสูตรนี้มีช่วงการกระจายตัวที่กว้างประมาณ 15-830 ไมโครเมตร และรูปทรงไม่สามารถเห็นได้ในระดับไมโครเมตร ทำให้ไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัดของความสามารถในการดูดซับสารสกัดหม่อนในอนุภาคไมโครอัลจิเนตได้ นอกจากนี้งานวิจัยของ Ersus, S. และ Yurdagel, U. (2007) ได้กักเก็บสารแอนโทไซยานินด้วยเทคนิคการพ่นแห้งโดยใช้สารพอลิแซคคาไรด์คือ มอลโตเด็คทรีนที่มีค่า DE ต่างกันคือ 28-31 DE (MDX 29), 20-23 DE (Glucodry 210) และ 10 DE (SD 10) พบว่าปริมาณการกักเก็บสารแอนโทไซยานินเท่ากับ 428.96 ± 1.46 , 630.92 ± 15.71 และ 499.39 ± 22.23 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมอนุภาคของ MDX 29, Glucodry 210

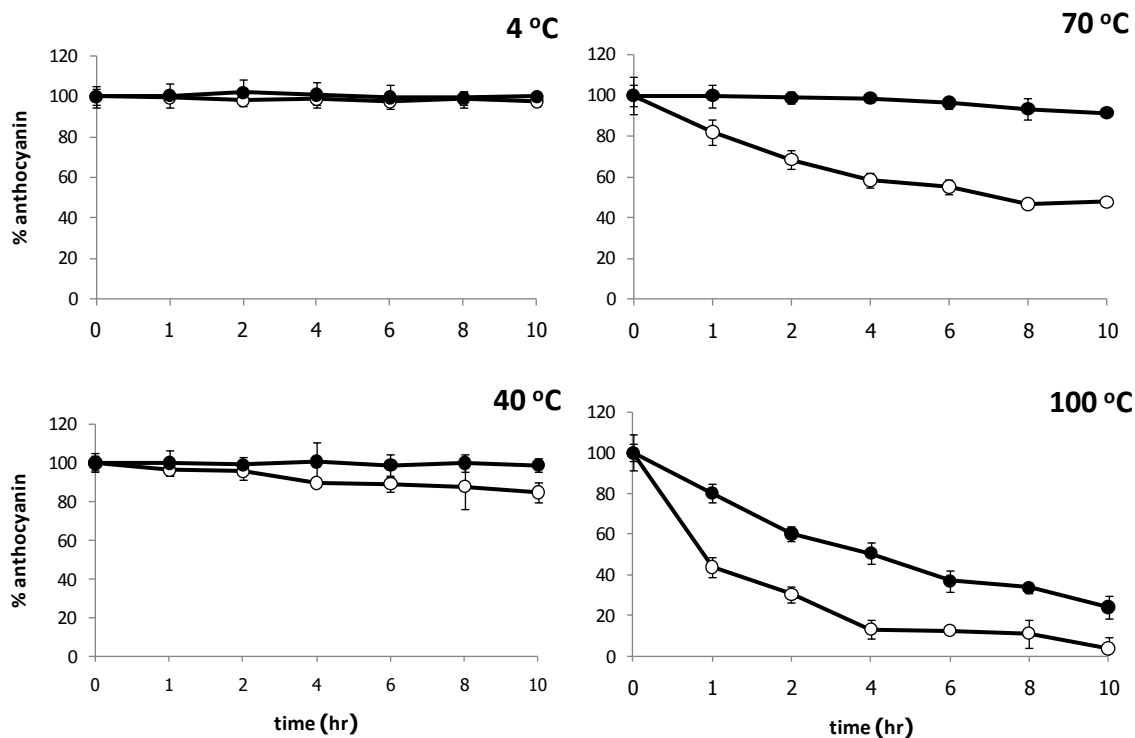
และ SD 10 ตามลำดับ ซึ่งการกักเก็บสารแอนโทไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้งสามารถกักเก็บได้สูงกว่าประมาณ 2-3 เท่าและต่อมาในปี 2010 Chan และคณะได้ผลิตอัลจิเนตปิดเพื่อใช้กักเก็บสารสกัดสมุนไพรร *Piper sarmentosum* โดยใช้อัลจิเนตสองชนิดในการศึกษาคือ ชนิดที่มีกรดกุกูลิโรนิกสูงกับชนิดที่มีแมนนูโรนิกสูง พบว่าปริมาณการกักเก็บสารสกัดสมุนไพรรได้เท่ากับ 0.78 ± 0.18 กรัมต่อกรัมอนุภาค และ 0.26 ± 0.06 กรัมต่อกรัมอนุภาค [Chan, .E.S และคณะ, 2010] ซึ่งสูงกว่างานวิจัยนี้เนื่องจากพิจารณาจากน้ำหนักของสารสกัดสมุนไพรรทั้งหมดที่ถูกดูดซับ ซึ่งงานวิจัยนี้พิจารณาเฉพาะปริมาณแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในสารสกัดผงผลหมอนเท่านั้นที่ถูกดูดซับในอนุภาคไมโครอัลจิเนต แต่อย่างไรก็ตามการใช้อนุภาคไมโครอัลจิเนตสามารถกักเก็บแอนโทไซยานินในสารสกัดหมอนได้ด้วยการดูดซับไว้ภายในได้และในปริมาณที่สูงซึ่งสามารถนำวิธีการนี้มาใช้ในการประยุกต์เพื่อประโยชน์ในงานด้านการกักเก็บสารสำคัญต่อไปได้



รูปที่ 4.27 ปริมาณการกักเก็บแอนโทไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนต โดยที่ a, b, c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$

4.7 การศึกษาความคงตัวของอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ดูดซับสารสกัดหม่อน

เมื่อนำอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห่งที่ผ่านกระบวนการดูดซับสารสกัดผงผลหม่อนมาพิจารณาปริมาณการกักเก็บแอนโธไซยานินในสารสกัดหม่อนแล้วพบว่า 1.5%ALG มีปริมาณการกักเก็บแอนโธไซยานินสูงสุดจึงได้เลือกสูตรนี้ ในการทดสอบความคงตัวของสารแอนโธไซยานินที่อนุภาคนั้นๆ ได้แก่ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับความคงตัวของแอนโธไซยานินในสารสกัดผงผลหม่อน ดังรูปที่ 4.28 พบว่าที่อุณหภูมิ 4 และ 40 องศาเซลเซียสไม่จำเป็นต้องใช้อนุภาคไมโครอัลจิเนตในการกักเก็บสารแอนโธไซยานินในสารสกัดหม่อนเพื่อเพิ่มความคงตัวของแอนโธไซยานิน เนื่องจากเมื่อเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มมากขึ้นปริมาณแอนโธไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนตไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับสารสกัดหม่อน สำหรับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเพิ่มความคงตัวให้สูงขึ้นเล็กน้อยประมาณร้อยละ 10 สำหรับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ถ้าหากต้องผ่านกระบวนการที่ให้ความร้อนสูงเป็น 70 และ 100 องศาเซลเซียส การใช้อนุภาคไมโครอัลจิเนตจะสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของแอนโธไซยานินได้ โดยที่ระยะเวลา 10 ชั่วโมง อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะสามารถเพิ่มความคงตัวของแอนโธไซยานินจากในสารสกัดหม่อนเท่ากับร้อยละ 48 ให้สูงขึ้นเป็นร้อยละ 92 ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 90 และสำหรับที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อนุภาคไมโครอัลจิเนตจะช่วยเพิ่มความคงตัวของแอนโธไซยานินให้สูงขึ้นได้จากในสารสกัดหม่อนที่มีปริมาณแอนโธไซยานินคงเหลือร้อยละ 4 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 24 เมื่อถูกกักเก็บไว้ในอนุภาคไมโครอัลจิเนต เนื่องจากการกักเก็บแอนโธไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจิเนตลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากการสัมผัสโดยตรงของแอนโธไซยานินกับออกซิเจนในอากาศภายนอก แต่อย่างไรก็ตามแอนโธไซยานินเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูง อาจสัมพันธ์กับน้ำตาลและโปรตีนอื่นๆร่วมกันทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ (nonenzymatic browning reaction) เกิดจากน้ำตาลหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่เกิดการเชื่อมสลาย สามารถเร่งให้แอนโธไซยานินสลายตัวได้ ปฏิกิริยานี้จะขึ้นกับอุณหภูมิและสามารถเร่งได้ด้วยออกซิเจน ซึ่งบ่อยครั้งจะเกิดขึ้นได้ในน้ำผลไม้ [Tanon, R.V. และคณะ, 2007]

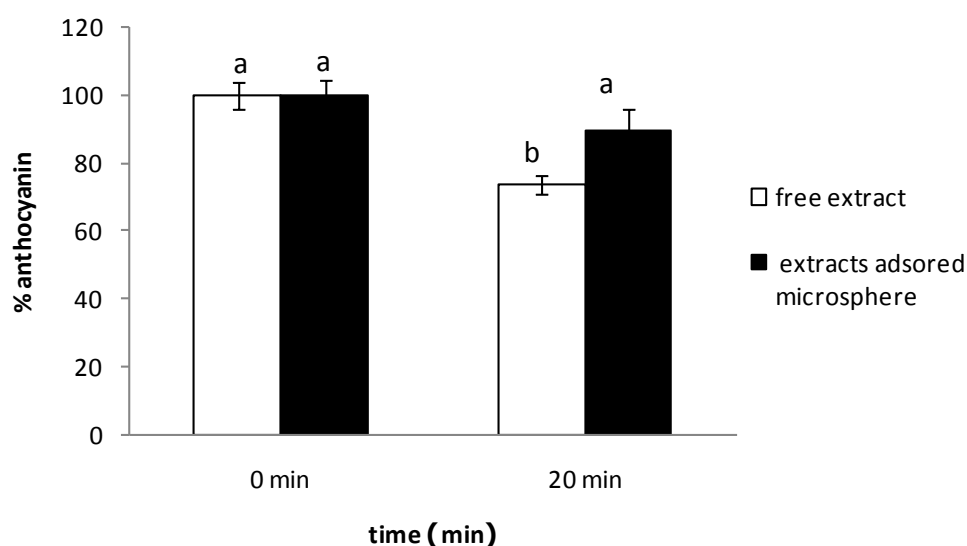


รูปที่ 4.28 การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผงผลหม่อนสกัด และในสารสกัดผงผลหม่อนที่ถูกดูดซับในอนุภาคไมโครอัลจิเนต ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ (โดยที่ ○ สารสกัดไม่ได้ถูกดูดซับ ● สารสกัดที่ถูกดูดซับในอนุภาคไมโครอัลจิเนต)

งานวิจัยของ Ersus, S. และ Yurdagel, U. (2007) ได้ทดสอบความคงตัวของแอนโทไซยานินในอนุภาคมอลโตเด็กตรินด้วยการพ่นแห้งในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถรักษาความคงตัวไว้ได้นานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 25-28 เดือน และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 9-10 เดือน และนอกจากนี้ในปี 2010 Tanon, R.V และคณะได้ทดสอบความคงตัวของแอนโทไซยานินจากน้ำผลไม้อะซาอี (*Euterpe oleracea Mart.*) ที่ถูกกักเก็บด้วยวิธีการพ่นแห้งของสารประเภทคาร์โบไฮเดรต 4 ชนิดคือ มอลโตเด็กตริน 10 DE และ 20 DE , กัมอะระบิก และทาพิโอค่าสเตรชโดยทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 962, 677, 826 และ 695 วัน สำหรับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเท่ากับ 411, 260, 328 และ 248 วันสำหรับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ

นอกจากนี้ในการศึกษาการฆ่าเชื้อสารสกัดหม่อนในสภาวะต่างๆ พบว่าการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที) ทำให้แอนโทไซยานินสลายตัวมากที่สุดเมื่อเทียบกับการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ ทั้งชนิด LTLT (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 30 นาที และ HTST (อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที) จึงได้เลือกสภาวะนี้มาใช้ในการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินที่ถูกกักเก็บด้วยอนุภาคไมโครอัลจิเนตต่อไป แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 4.29 พบว่าการใช้อนุภาคไมโครอัลจิเนตในการเพิ่มความคงตัวให้แอนโทไซยานินเมื่อผ่านกระบวนการฆ่าแบบสเตอริไลส์ อนุภาคไมโครอัลจิเนตสามารถรักษาความคงตัวของแอนโทไซยานินให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ เมื่อเปรียบเทียบกับแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนโดยปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนหลังจากผ่านการฆ่าเชื้อคงเหลือร้อยละ 74 แต่เมื่อใช้อนุภาคไมโครอัลจิเนตทำให้แอนโทไซยานินที่พบร้อยละ 90 จะเห็นว่าการรักษาความคงตัวให้แก่สารสำคัญที่เกิดการสลายตัวได้ง่ายที่ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์นั้น การใช้อนุภาคไมโครอัลจิเนตในการดูดซับสารสกัดหม่อนที่มีแอนโทไซยานินจะสามารถช่วยรักษาความคงตัวของแอนโทไซยานินให้สูงขึ้นได้ประมาณร้อยละ 20



รูปที่ 4.29 การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสกัดและในสารสกัดผลหม่อนที่ถูกดูดซับในอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่สภาวะฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ 121 องศาเซลเซียส (20 นาที)

อย่างไรก็ตามที่สภาวะอุณหภูมิสูงมากนั้นเช่นประมาณ 100 องศาเซลเซียสการกักเก็บแอนโทไซยานินยังไม่สามารถช่วยได้มากเมื่อใช้เวลานานขึ้นในการให้ความร้อนแต่ในสภาวะที่อุณหภูมิ 40 และ 70 องศาเซลเซียส สามารถช่วยรักษาความคงตัวไว้ให้สูงขึ้นได้ถึงประมาณร้อยละ 90 จึงสรุปได้ว่าการใช้อนุภาคไมโครอัลจิเนตในการช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในผลหม่อนนี้มีผลทำให้รักษาความคงตัวให้เพิ่มสูงขึ้นได้เมื่อเทียบกับ

แอนโทไซยานินที่อยู่ในสารสกัดหม่อนที่ไม่ได้ถูกกักเก็บไว้ในอนุภาคไมโครอัลจิเนต และสามารถนำไปวิจัยและศึกษาต่อ ในด้านการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และอาหารเสริมต่อไปเพื่อให้เกิดประโยชน์ในงานวิจัยด้านไมโครเอนแคปซูลได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด จากแหล่งปลูก 2 แหล่งคือ จังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดนครราชสีมา พบว่าร้อยละของน้ำหนักแห้งในผลหม่อนจากนครราชสีมามีค่าสูงกว่าเพชรบูรณ์ ร้อยละ 22.17 และร้อยละ 14.27 ตามลำดับ และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดในหม่อนสดของนครราชสีมามีค่าบรีกซ์ร้อยละ 15.9 สูงกว่าแหล่งเพชรบูรณ์ซึ่งเท่ากับร้อยละ 9.98 เนื่องจากมีปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบน้อยกว่า สารสกัดหม่อนผลที่ได้มีค่าความหนาแน่นใกล้เคียงกับน้ำ ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของสารสกัดผลหม่อนสดสูงกว่าสารสกัดผงผลหม่อนของทั้งสองแหล่ง แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดผงผลหม่อนสูงกว่าสารสกัดหม่อนสดอย่างมีนัยสำคัญ ค่าพีเอชของสารสกัดทั้งสองแบบเป็นกรดอ่อนประมาณ 3.67- 4.31 แต่สีของสารสกัดผลหม่อนจากนครราชสีมามีสีโทนน้ำเงินมากกว่าเพชรบูรณ์และพบปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าคือ 9.96 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 14.35 ± 0.43 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดตามลำดับ การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผงผลหม่อน แหล่งนครราชสีมามีฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าเพชรบูรณ์อย่างมีระดับนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามผลหม่อนสายพันธุ์เดียวกันแต่คุณลักษณะสมบัติต่างกันมีปัจจัยจากแหล่งปลูก ระยะเวลาเก็บผลผลิต โดยเฉพาะระดับความสุกของผลที่มีผลทำให้สีของผลหม่อนแตกต่างกันซึ่งทำให้ปริมาณน้ำตาล เป็นสารตั้งต้นของแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารสำคัญในผลหม่อนต่างกันด้วย

ในการศึกษาความเป็นพิษและการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ผสมสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติโดยมีไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลลาร์ (C3G50) และ 100 ไมโครโมลลาร์ (C3G100) มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ให้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 26.22×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ 21.27×10^{-3} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ จำนวนเซลล์มีปริมาณมากสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง และหลังจากนั้นในเวลา 168 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ลดลงอาจเป็นเพราะข้อจำกัดทางพื้นที่ของภาชนะเลี้ยง ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดต่อตารางมิลลิเมตร ในอาหาร

C3G50 และ C3G100 เท่ากับ 538.75 ± 16.52 และ 453.75 ± 29.55 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร และพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (M50) และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (M100) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจากในสารสกัดหม่อนนอกจากจะมีแอนโทไซยานินแล้วยังมีองค์ประกอบอื่นหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลรีดิคซ์ กรดซิตริก และของแข็งละลายน้ำได้ ซึ่งอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ M50 และ M100 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 15.35×10^{-3} และ 14.94×10^{-3} ต่อชั่วโมงตามลำดับ และความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเพียง 296.67 ± 24.66 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตรและ 256.67 ± 42.52 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหาร NM ประมาณ 2 เท่า

เมื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่มีการเติมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และสารสกัดผลหม่อนในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ พบว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร C3G50 และ C3G100 มีค่ากิจกรรม ALP ต่อเซลล์ที่สร้างขึ้นในช่วงแรกของการเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้สูงสุดในวันที่ 14 แต่ลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหาร NM และ OM โดยที่ปริมาณแคลเซียมสะสมที่เซลล์สร้างขึ้นนั้นกลับเพิ่มการสะสมของแคลเซียมให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการสร้างแคลเซียมขึ้นมาเนื่องจากเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก สำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อาหาร M50 และ M100 พบว่าจำนวนเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา แต่ M50 และ M100 มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ ALP อย่างมีนัยสำคัญ และมีผลลดปริมาณการสะสมของแคลเซียมที่เซลล์สร้างขึ้นด้วย แสดงว่าสารสกัดผลหม่อนที่ใช้ในการศึกษาไม่ได้มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ในขณะที่สารแอนโทไซยานินบริสุทธิ์สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ที่มีความเข้มข้นดังกล่าว

ในการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนจากเพชรบูรณ์ในสภาวะควบคุมแสงและอากาศพบว่าอุณหภูมิ เวลาในการเก็บรักษา และวิธีในการทำปลอดเชื้อมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัด โดยมีการสลายตัวของแอนโทไซยานินสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาสูงขึ้น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนมีความคงตัวมากที่สุดแต่หากเก็บรักษาที่ 70 และ 100 องศาเซลเซียสแอนโทไซยานินในหม่อนสกัดทั้งสองชนิดเสื่อมสลายเท่าๆ กันคือ เหลืออยู่ร้อยละ 45 และร้อยละ 5 ตามลำดับ (หากเก็บรักษาเป็นเวลา 10 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสารสกัดผลหม่อนมีความคงตัวสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดเล็กน้อย โดยหากเก็บ

รักษาไว้ที่อุณหภูมินี้ 10 ชั่วโมงปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผงผลหม่อนเหลืออยู่ร้อยละ 84.70 และในสารสกัดผลหม่อนสดคงเหลืออยู่ร้อยละ 72.23 นอกจากนี้กระบวนการฆ่าเชื้อยังมีผลต่อการสลายตัวของสารแอนโทไซยานิน การฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาทีที่มีผลให้มีปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดเหลืออยู่ร้อยละ 80.92 และในสารสกัดผงผลหม่อนเหลืออยู่ร้อยละ 85.84 สำหรับการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรส์ ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดคงเหลือเพียงร้อยละ 62.14 และในสารสกัดผงผลหม่อนร้อยละ 64.76 เท่านั้น ส่วน การฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 15 วินาที มีผลให้แอนโทไซยานินการสลายตัวเล็กน้อย การทำแห้งแข็งของผลหม่อนสดไม่มีผลเพิ่มความคงตัวให้สารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อน นอกจากนี้ในระบบสภาวะเร่งแบบ freeze thaw ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บสารสกัดผลหม่อนเพื่อให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยปราศจากแสงและอากาศ แต่ถ้าต้องการให้สารสกัดหม่อนผ่านกระบวนการที่ใช้ความร้อนสูงควรใช้เวลาสั้นๆ ในกระบวนการจึงมีความเหมาะสม

ในการเตรียมเม็ดอัลจิเนตโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5%w/v สามารถเตรียมเม็ดอัลจิเนตได้ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 290-420 ไมโครเมตร ซึ่งการใช้แก๊สไนโตรเจนที่มีอัตราการไหลสูงขึ้นจาก 10 เป็น 15 และ 20 ลิตรต่อนาทีมีผลทำให้ขนาดอนุภาคเล็กลงและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่มากขึ้นมีผลทำให้รูปร่างของเม็ดอัลจิเนตมีลักษณะเป็นลูกแพร์มากขึ้นด้วย เมื่อนำเม็ดอัลจิเนต 1%ALG, 1.5%ALG, 2.0%ALG และ 2.5%ALG ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงพบว่าลักษณะอนุภาคไมโครอัลจิเนตแห้งมีรูปร่างหดตัวลงพื้นผิวขรุขระเนื่องจากเกิดการดึงน้ำออกอย่างช้าๆ จากนั้นเมื่อนำอนุภาคเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำและสารสกัดผงผลหม่อนซึ่งมีความแตกต่างของค่าพีเอชพบว่าสามารถดูดซับน้ำได้เพียงร้อยละ 200-250 ในขณะที่การดูดซับด้วยสารสกัดผลหม่อนสามารถดูดซับได้ถึงร้อยละ 1350-1685 เนื่องจากสารสกัดผงผลหม่อนมีพีเอชต่ำกว่าจึงส่งผลให้ปริมาณการดูดซับที่สูงกว่า ซึ่งการดูดซับที่เกิดขึ้นนั้นได้พิสูจน์ด้วยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีแล้วว่าสารสกัดหม่อนสามารถถูกกักเก็บไว้ภายในอนุภาคด้วยพันธะที่ค่อนข้างแข็งแรงจริงเห็นได้จากความสม่ำเสมอของสารสกัดทั่วถึงทั้งอนุภาคไมโครอัลจิเนตหลังจากนั้นได้นำอนุภาคไมโครอัลจิเนตที่ถูกดูดซับด้วยสารสกัดหม่อนไปทำแห้งแบบเยือกแข็งแล้วหาปริมาณการกักเก็บแอนโทไซยานินในอนุภาคพบว่า 1.5%ALG สามารถกักเก็บแอนโทไซยานินได้สูงสุดเท่ากับ 17.08 ± 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัมอนุภาคไมโครอัลจิเนต ซึ่งได้นำ

สูตรนี้ใช้ในการศึกษาผลของความถี่ต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิพบว่าหากนำอนุภาคผ่านกระบวนการความร้อนสูง 70 และ 100 องศาเซลเซียสจะเพิ่มความคงตัวของแอนโธไซยานินให้สูงขึ้นถึงประมาณร้อยละ 92 และ 24 ตามลำดับ แต่สำหรับอุณหภูมิ 4 และ 40 องศาเซลเซียสไม่จำเป็นต้องใช้อนุภาคไมโครอัลจิเนตเพื่อเพิ่มความคงตัวนอกจากนี้ยังได้ทดสอบในสภาวะการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรส์ พบว่าอนุภาคไมโครอัลจิเนตช่วยเพิ่มความคงตัวของแอนโธไซยานินได้เช่นกัน เพิ่มสูงขึ้นประมาณร้อยละ 20 เทียบกับสารสกัดที่ไม่ได้กักเก็บในอนุภาคไมโครอัลจิเนต

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงวิธีการสกัดให้มีปริมาณแอนโธไซยานินให้ได้สูงกว่านี้ และสกัดซ้ำจากกากหม่อนที่เหลือที่ยังคงมีสีม่วงเข้มอยู่
2. การทดสอบสภาวะเร่งควรนำสารสกัดหม่อนที่ได้ไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อในสภาวะที่เลือกก่อนนำมาทดสอบ
3. การออกแบบการทดลองควรมีการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดุกของการเลี้ยงในไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในทางชีววิทยาเชิงลึกมากกว่านี้เพื่อให้มั่นใจว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์กระดุกได้จริง
4. การขึ้นรูปเม็ดอัลจิเนตควรหาสภาวะที่สามารถผลิตเม็ดอัลจิเนตที่มีขนาดใกล้เคียงกัน มากที่สุดเพื่อลดปัญหาเรื่องการกระจายตัวของขนาดอนุภาค หรือไม่ควรมีการคัดขนาดอนุภาคให้มีช่วงไม่กว้างมากก่อนนำไปศึกษา
5. การทำแห้งของเม็ดอัลจิเนตควรหาวิธีในการแก้ปัญหาการเกาะกลุ่มของอนุภาคระหว่างการทำแห้ง เช่น อาจมีระบบสั่นให้กับอนุภาคระหว่างการทำแห้ง ใช้แก๊สช่วยกระจายให้อนุภาคแยกจากกันระหว่างการทำแห้ง ใช้สารบางชนิดมาผสมเพื่อไม่ให้อนุภาคติดกัน เป็นต้น

รายการอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. องค์ความรู้ด้านการเกษตร. (ออนไลน์). 2553. แหล่งที่มา: <http://www.moac.go.th> (15 ธันวาคม 2553)
- เครือข่ายความร่วมมือบริการเภสัชสนเทศ ศูนย์เภสัชสนเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ความรู้ทางเภสัชศาสตร์. (ออนไลน์). 2553. แหล่งที่มา: <http://www.drug.pharmacy.psu.ac.th> (15 ธันวาคม 2553)
- ณัฐพล วชิโรจน์. การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ใช้เซลล์ต้นกำเนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2552)
- เนติ วรรณุช, กรกนก อิงคินันท์, อรรถวิทย์ สมศิริ, วิโรจน์ แก้วเรือง, และสถาพร วงศ์เจริญวงกิจ. การศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้าจากสารสกัดผลหม่อน. กรมหม่อนไหม (2551)
- มนต์วดี หุ่นเจริญ และศศิธร จันทนวางกูร. ผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ของน้ำลูกหม่อน. การประชุมทางวิชาการขอ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 46. (2551): 562-569.
- มนต์วดี หุ่นเจริญ และศศิธร ตรงจิตภักดี. ผลของระยะเวลาเจริญเติบโตต่อแอนโทไซยานินส์และ ความสามารถต้านออกซิเดชันของผลหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน -เอ็มบี-42-1 การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2553):161-168.
- วสันต์ นุ้ยภิรมย์. หม่อนรับประทานผลและการแปรรูป. สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2553)
- สายสนม ประดิษฐ์ดวง. สารห่วยทะเลในอุตสาหกรรมอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2530) 49 น.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. สารระงับ. (ออนไลน์). 2553. แหล่งที่มา: <http://www.fda.moph.go.th/fda-net/product/food/ntfmobomiNph/ntf267.html> (15 ธันวาคม 2553)
- เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. เทคโนโลยี โปรโมชัน แม็ค. ฉบับ 36, สิงหาคม-กันยายน (2552).
- Aramwit, P., Bang, N. and Srichana, T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. Food Research International 43(2010):1093-1097.

- Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of Mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry 102(2007): 1233–1240.
- Alipour, S., Montaseri, H. and Tafaghodi, M. Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery . Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 81(2010): 521–529.
- Anna, M.B. and Paul, P.K., Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. Industrial Crops and Products 65(2010): 124–133.
- Ahmed, M., Akter, M.S., Lee, J.C. and Eun, J.B. Encapsulation by spray drying of Bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. LWT - Food Science and Technology 43(2010): 1307-1312.
- Annisson. G.N., Chietham, W.H. and Couperwhite, I. Determination of uronic acid composition of alginate by high-performance liquid chromatography. Journal Chromatography. 264 (1983):137-143.
- Bae, S.H. and Suh, H.J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. LWT 40(2007): 955–962.
- Brand-Williams, W. Cuvelier, M.E. and Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. J. Technol 28(1995): 25-30.
- Butt, M.S., Nazir, A., Sultan, M.T. and Schroen, K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. Food Science & Technology 19(2008): 505-512.
- Bath, B.K., Tripathi, R. and Srinivas, U.K. Curcumin-induced differentiation of mouse embryonal carcinoma PCC4 cells. Differentiation 68(2001): 133-140.
- Belmonte, M.M., Lucarini, G., Virgili, L., Biagini, G., Detomaso, L., Favia, P. et al. Mesenchymal stem cells on plasma-deposited acrylic acid coatings: An in vitro investigation to improve biomaterial performance in bone reconstruction. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 20(2005): 343-360.
- Chena, P.N., Chub, S.C., Chiouc, H.L., Kuo, W.H., Chiang, C.L. and Hsieh, Y.H. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. Cancer Letters 235(2006): 248–259.

- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M.D., Paez-Hernandez, M.E., Rodriguez, J.A. and Galan- Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins. Food Chemistry 113(2009): 859–871.
- Chan, E.S., Lee, B.B., Ravindra, P. and Poncelet, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. Journal of Colloid and Interface Science 338(2009): 63–72.
- Chan, E.S., Yim Z.H., Phan, S.H., Mansa, R.F. and Ravindra, P. Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. Food and Bioproducts Processing 8(2010): 195–201.
- Chen, P.N., Chu, S.C., Chiou, H.L., Kuo, W.H., Chiang, C.L. and Hsieh, Y.S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. Cancer Letters 235(2006): 248–259.
- Choi, K.M., Seo, Y.K., Yoon, H.H., Song K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S. and Park, J.K. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. The Society for Biotechnology 105(2008): 586-594.
- Curran, J.M., Chen, R., Hunt, J.A. Material induced mesenchymal stem cell differentiation. Stem Cells 24(2006): 707-716.
- ChemSpider The free chemical database. Structure search. (Online). 2012. Available from : <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21613248.html> (2012, August 25)
- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T. and Meireles, M.A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-an overview. Food Research International 44(2011): 499-509.
- Chang, W.K., Chen, M.Z. and Chao, Y.C. Use of the refractometer as a tool to monitor dietary formula concentration in gastric juice. Clinical Nutrition 6(2002): 521-525
- Durst, R.W. and Wrolstad, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method. Collaborative Study 88(2005): 1269-1278.

- Drurya, J.L., Dennisb, R.G. and Mooneya, D.J. The tensile properties of alginate hydrogels Biomaterials 25(2004): 3187–3199.
- Draget, K.I. and Taylor, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications . Food Hydrocolloids 25(2011): 251–256.
- Draget, K.I., Smidsrod, O. and Skjak-Brek, G. Alginate from algae. polysaccharides and polyamides in the food industry, properties, production and patents. (2005)15p.
- Dupuis, G., Chambin, O. and Génelot, C. Colonic Drug Delivery: Influence of cross-linking agent on pectin beads properties and role of the shell capsule type Drug Development and Industrial Pharmacy. 32(2006): 847–855.
- Ersus, S. and Yurdagel, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. Journal of Food Engineering 80(2007): 805-812.
- Ercisli, S. and Orhan, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. Food Chemistry 103(2007): 1380–1384.
- Fang, Z. and Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols a review. Trends in Food Science & Technology 21(2010): 510-523.
- Gonzalez-SanJose, M.L., Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries. Food Chemistry 43(1992): 193-197.
- Gouin, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends Trends in Food Science & Technology 15(2004): 330–347.
- Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N. and Aubin, J.E. Differentiation of muscle fat cartilage and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. Journal Cell Biol 106(1988): 2139-2151.
- Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochemical Engineering Journal 14(2003): 217-225.
- Hunt, N.C., Smith, A.M., Gbureck, U., Shelton, R.M. and Grover, L.M. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. Acta Biomaterial 6(2010): 3649–3656.

- Hassimotto, M.A., Genovese, M.I. and Lajolo, F.M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra L.*) in rats. Nutrition Research 28(2008): 198–207.
- Hosseinian, F.S., Li, W. and Beta, T. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. Food Chemistry 109(2008): 916–924.
- Hwang, Y.S., Cho, J., Tay, F., Heng, J.Y.Y., Ho, R., Kazarian, S.G. et al. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. Biomaterials 30(2009): 499-507.
- Ito, S., Suzuki, N., Kato, S., Takahashi, T. and Takagi, M. Glucocorticoids induce the differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26 into adipocytes and osteoblasts, but fail to induce terminal osteoblast differentiation. Bone 40(2007):84-92.
- Imeson, A. Thickening and gelling agents for food. Blackie Academic and Professional, UK. (1992) 258p.
- Jeanie, L.D., Robert G.D. and David J.M. The tensile properties of alginate hydrogels. Biomaterials 25(2004): 3187–3199.
- Kang, S.Y., Seeram, N.P., Nair, M.G. and Bourquin, L.D. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in ApcMinmice and reduce proliferation of human colon cancer cells. Cancer Letters 194(2003): 13–19.
- Kim, H.J., Kim, U.J., Novakovic, G.V., Min, B.H., and Kaplan, D.L. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. Biomaterials 26(2005): 4442-4452.
- Kim, Y.J., Bae, Y.C., Suh, K.T., Jung, J.S., Quercetin, a flavonoid, inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells. Biochemical pharmacology 72(2006): 1268-1278.
- Kim, C.K. and Lee, E.J. The controlled release of blue dextran from alginate beads. International Journal of Pharmaceutics. 79(1992): 11-19.
- Kirca, A. and Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. Food Chemistry 81(2003): 583-587.

- Kim, H.S. A kinetic study on calcium alginate bead formation. Korean Journal of Chemical Engineering. 7(1990): 1-6.
- Kim, C.Y., Le, T.T., Chen, C., Cheng, J.X. and Kim, K.H. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. The Journal of Nutritional Biochemistry, In Press, Corrected Proof, Available online 28 December (2010)
- Kirca, A., Ozkan, M. and Cemeroglu, B. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. Food Chemistry 101(2007): 212-218.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F. and Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 64(2003): 923-933.
- Lietti, A., Cristoni, A. and Picci, M. Studies of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. vasoprotective and anti-inflammatory activity. Arzneimittel-Forschung 26(1976): 829-832.
- Lennon, D.P. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cell. Experimental Cell Research 219(1995): 211-222.
- Lemoine, D., Wauters, F., Bouchend'homme, S. and Pre, V. Preparation and Characterization of alginate microspheres containing a model antigen. International Journal of Pharmaceutics 176(1998): 9-19.
- Lee, I.H., Hung, Y.H. and Chou, C.C. Total phenolic and anthocyanin contents, as well as antioxidant activity, of black bean koji fermented by *Aspergillus awamori* under different culture conditions. Food Chemistry 104(2007): 936-942.
- Lee, J.H., Kang, N.S., Shin, S.O., Shin, S.H., Lim, S.G., Suh, D.Y. et al. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max L.*) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. Food Chemistry 112(2009): 226-231.
- Lee, H.H., Park, O.J., Park, J.M. and Yang, J.W. Continuous production of uniform calcium alginate beads by sound wave induced vibration. J.Chem.Tech.Biotechnol. 67(1996): 255-259.
- Lian, J.B. and Stein, G.S. Osteoporosis (2 nd ed.). San Diego: CA Academic, 2001

- Longo, L. and Vasapollo, G., Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. Food Chemistry 94(2006): 226-231.
- Lucy, S.C. Wan, Paul W.S. Heng and L.W. Chan. Surfactant effects on alginate microspheres. International Journal of Pharmaceutics. 103(1994): 267-275.
- Laleh, G.H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R. and Zare, S. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. Pakistan Journal of Nutrition. 5(2006): 90-92.
- Morse, M.A. and Stoner, G.D. Cancer chemoprevention principles and prospects. Carcinogenesis 14(1993): 1743–1746.
- Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M. and Sarbolouki, M.N. Mass preparation and Characterization of alginate microspheres. Process Biochemistry 35(2000): 885-888.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 31(1959): 426-428.
- Netzel, M., Netzel, G., Kammerer, D.R., Schieber, A., Carle, R., Simons, L. et al. Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. Innovative Food Science and Emerging Technologies 8(2007): 365–372.
- Nicholas, D.E., Eileen, G., and Julia, M.P. Scaffolds for stem cells. Materials today 9(2006):26-33.
- Nature publishing group. Nature journal. (Online). 2010. Available from : www.nature.com/nrrheum/journal (2010, August 22)
- Ozgen, M., Serce, S. and Kaya, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits Kaya. Scientia Horticulturae 119(2009): 275–279.
- Ostberg, T., Vesterhus, L. and Graffner, C. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: II. effect of process and formulation factors on matrix properties. International Journal of Pharmaceutics 97(1993): 183-193.

- Porter, A. E., Taak, P., Hobbs, L.W., Coathup, M.J., Blunn, G.W. and Spectord, M. Bone bonding to hydroxyapatite and titanium surfaces on femoral stems retrieved from human subjects at autopsy. Biomaterials 25(2004): 5199–5208.
- Poncelet, D., Babak, V., Dulieu, C. and Picot, A. A physico-chemical approach to Production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects 155 (1999):171–176.
- Pitalua, E., Jimenez, M., Vernon-Carter, E.J. and Beristain, C.I. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum arabic as wall material . Food and Bioproducts Processing 88(2010): 253–258.
- Qin, C., Li, Y., Niu, W., Ding, Y., Zhang, R. and Shang, X. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. Food Sci. 28(2010): 117–126.
- Ratanavaraporn, J., Kanokpanont, S., Tabata, Y. and Damrongsakkul, S. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films. Carbohydrate Polymer 78 (2009): 873-878.
- Ratanavaraporn, J., Kanokpanont, S., Tabata, Y. and Damrongsakkul, S. Modulation of In vitro attachment, proliferation and osteogenic differentiation of rat bone-marrow-derived stem cells using different molecular mass chitosans and their blends with gelatin. Journal of Biomaterials Science 21(2010): 979–996.
- Regan, J., and Mulvihill, D.M. Heat stability and freeze–thaw stability of oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate–maltodextrin conjugates. Food Chemistry 119(2010): 182–190.
- Rommel, A., Heatherbell, D.A., Wrolstad, R.E. Red raspberry juice and wine: effect of processing and storage on anthocyanin pigment composition, colour and appearance. Journal of Food Science 55(1990): 1011–1017.
- Shih, P.H., Yeh, C.T. and Yen, G.C. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. Food and Chemical Toxicology 43(2005): 557–1566.

- Sigma Chemical Co. Characteristic of sodium alginate. Sigma Co., USA. (1998). 5p.
- Shih, P.H. Chan, Y.C. Liao, J.W. Wang, M.F. and Yen, G.C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea L.*) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. Journal of nutritional biochemistry 21(2010): 598–605.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, I.V., Goncalves, A.R. and Veiga, F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. International Journal of Pharmaceutics 311(2006): 1–10.
- Silva, L.D., Escribano-Bailon, M.T., Alonso, J.J.P., Rivas-Gonzalo, J.C. and Santos-Buelga, C. Anthocyanin pigments in strawberry. LWT 40(2007): 374-382.
- Saenz, C., Tapia, S., Chavez, J. and Robert, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). Food Chemistry 114(2009): 616–622.
- Terada, M., Inaba, M., Yano, Y., Hasuma, T., Nishizawa, Y., Morii, H. and Otani, S. Growth-Inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. Bone 22(1998): 17–23.
- Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. Biomaterials 26 (2004): 3587-3596.
- Takahashi, Y., Yamamoto, M. and Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal Stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. Biomaterials 26(2005): 3587–3596.
- Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrsd, O., Soon-Shiong P., and Skj-Braek, G. Alginate polycation microcapsules I. Interaction between alginate and polycation. Biomaterials 17(1996): 1031-1040.
- Tsai, P.J., Delva, L., Yu, T.Y., Huang, Y.T. and Dufosse, L. Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. Food Research International 38(2005): 1059–1065.

- Toti, U.S. and Aminabhav, T.M. Different viscosity grade sodium alginate and modified sodium alginate membranes in pervaporation separation of water + acetic acid and water + isopropanol mixtures. Journal of Membrane Science 228(2004): 199-208.
- Tonon, R.V., Brabet, C. and Hubinger, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae Mart.*) powder produced by spray drying. Journal of Food Engineering 88(2008): 411–418.
- Vunjak-Novakoivic, G. and Freshney, R.I. Culture of cell for Tissue Engineering. John Wiley and Sons (2006): 3-22.
- Vachiraroj, N., Damrongsakkul, S., and Kanokpanont, S. Gelatin/Hydroxyapatite scaffolds: Studies on adhesion, growth and differentiation on Mesenchymal Stem cells. Advance Materials Research 9(2010): 121-124.
- Wang, W.D. and Xu, S.Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. Journal of Food Engineering 82(2007): 271–275.
- Wang, L.S. and Gary, D.S. Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Letters 269(2008): 281–290.
- Wan, S.C., Heng, W.S. and Chan, L.W. Surfactant effects on alginate microspheres. International Journal of Pharmaceutics 103(1994): 267-275.
- Wikipedia The Free Encyclopedia. File. (Online). 2012. Available from : <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Quercetin.png> (2012, August 25)
- Wikipedia The Free Encyclopedia. File. (Online). 2012. Available from : http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dexamethasone_structure.svg (2012, August 25)
- Wikipedia The Free Encyclopedia. File. (Online). 2012. Available from : <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Naringin.png> (2012, August 25)
- Yang, X., Yang, L. and Zheng, H.Y. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba L.*) fruit in hyperlipidaemia rats. Food and Chemical Toxicology 48 (2010): 2374–2379.
- Yang, J.S., Xie, Y.J. and He, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. Carbohydrate Polymers 84(2011): 33–39.

- Yoo, I.K., Seong, G.H., Chang, H.N. and Park, J.K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. Enzyme and Microbial Technology 19(1996): 426-433.
- Yoo, S.H., Song, Y.B., Chang, P.S. and Lee, H.G. Microencapsulation of α -Tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. International Journal of Biological Macromolecules 38(2006): 25–30.
- Zheng, C.H., Gao, J.Q., Zhang, Y.P. and Liang, W.Q. A protein delivery system: Biodegradable alginate–chitosan–poly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres. Biochemical and Biophysical Research Communications 323 (2004): 1321–1327.
- Zhang, P., Dai, K.R., Yan, S.G., Yan, W.Q., Zhang, C., Chen, D.Q. et al. Effects of naringin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell. European Journal of Pharmacology 607(2009): 1-5.
- Zhang, J.F., Li, G., Chan, C.Y., Meng, C.L., Lin, M.C.M., Chen, Y.C. et al. Flavonoids of *Herba Epimedii* regulate osteogenesis of human mesenchymal stem cells through BMP and Wnt-catenin signaling pathway. Molecular and Cellular Endocrinology 314(2010): 70-74.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential

วิธีการทดลอง

1.เตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 1.0 โดยชั่งสารโพแทสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัมผสมในน้ำปราศจากไอออน 980 มิลลิลิตร วัดค่าพีเอชและปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้พีเอช 1.0

2. เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.5 โดยชั่งสารโซเดียมอะซิเตท 54.43 กรัมผสมในน้ำปราศจากไอออน 960 มิลลิลิตร) วัดค่าพีเอชและปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้พีเอชเท่ากับ 4.5

3.นำสารสกัดจากผลหม่อนที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ทั้งสองเป็น 100 เท่าจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตรโดยมีสารละลายเปรียบเทียบ (blank) ซึ่งใช้น้ำ DI แล้วคำนวณหาปริมาณแอนโธไซยานินจากสมการ (ก-1) และ (ก-2)

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \dots\dots\dots (ก-1)$$

$$\text{ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A \times MW \times DF \times 1000)}{\epsilon \times 1} \dots\dots\dots (ก-2)$$

โดยที่ A_{520} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

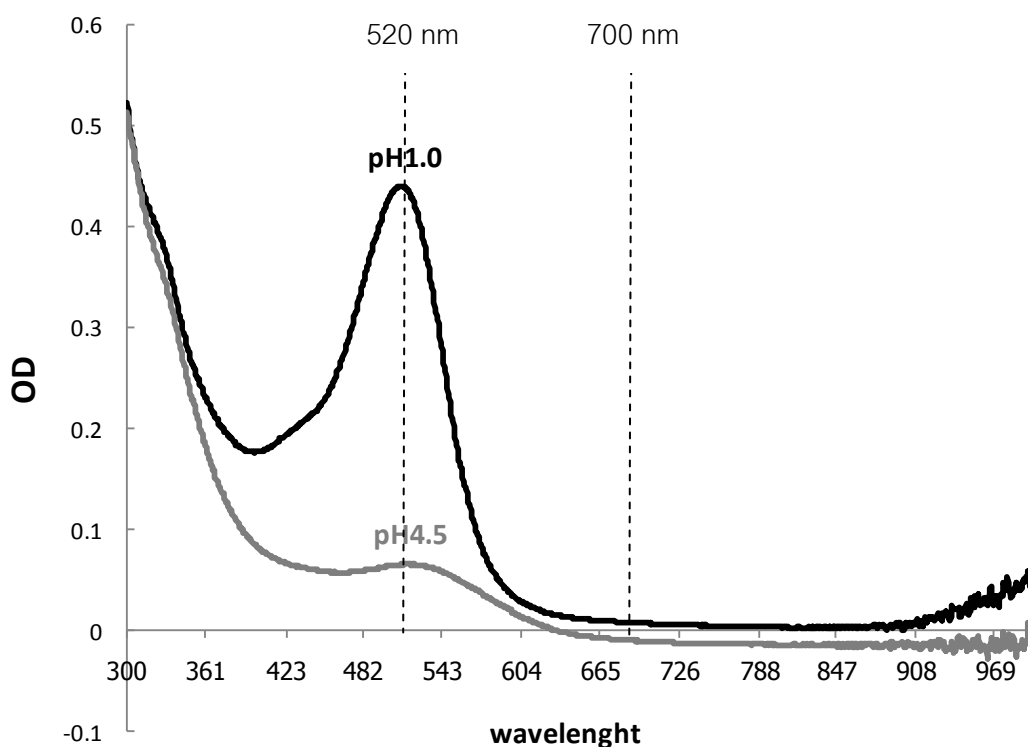
A_{700} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร

MW = มวลโมเลกุลของ cyanindin-3-glucoside = 449.2 กรัมต่อโมล

DF = dilution factor = 100

ϵ = molar absorptivity = 26,900

1 = pathlength เซนติเมตร



รูปที่ ก ตัวอย่างสเปกตรัมของผงผลหม่อนสกัดในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1.0 และ 4.5

ตัวอย่างการคำนวณ

การหาปริมาณแอนโทไซยานินของผงผลหม่อนสกัด

ผงผลหม่อนสกัดในบัฟเฟอร์ pH 1.0 มีค่าดูดกลืนแสงที่ 520 เท่ากับ 0.426

ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 มีค่าดูดกลืนแสงที่ 520 เท่ากับ 0.066

ในบัฟเฟอร์ pH 1.0 มีค่าดูดกลืนแสงที่ 700 เท่ากับ 0.007

ในบัฟเฟอร์ pH 4.5 มีค่าดูดกลืนแสงที่ 700 เท่ากับ -0.001

จากสูตรการคำนวณ ก-1, ก-2

$$A = (0.426 - 0.066) - (0.007 - (-0.001)) = 0.352$$

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} &= \frac{(0.352 \times 449.2 \times 100 \times 1000)}{26,900 \times 1} \\ &= 587.8 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

ภาคผนวก ข การหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการทดลอง

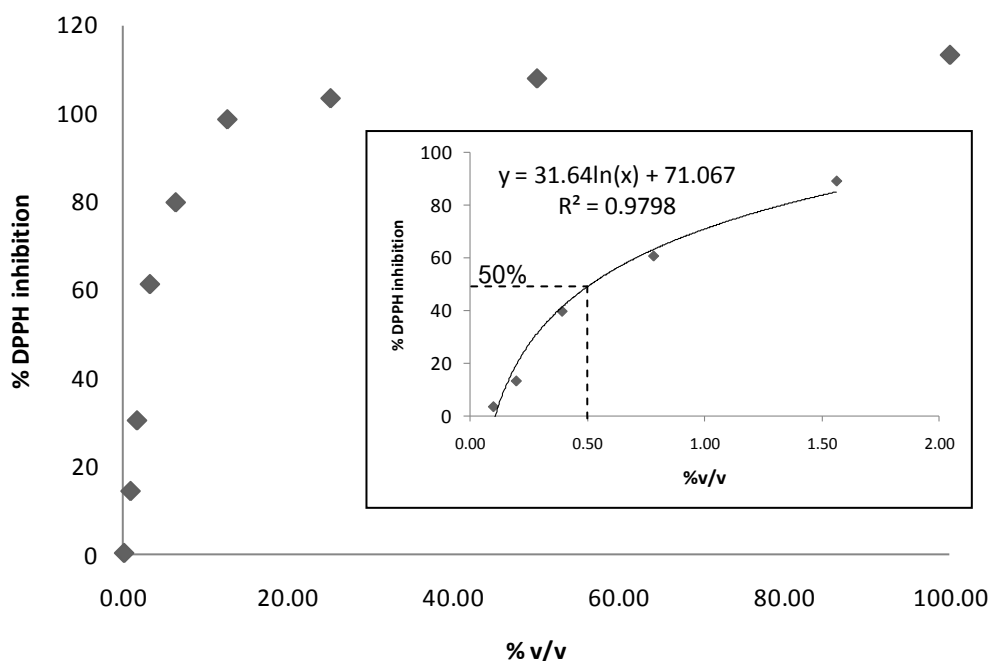
1. เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรในเอทานอลบริสุทธิ์
2. เตรียมการเจือจางสารสกัดผลหม่อนเป็นลำดับเท่า (serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 0-100 % โดยปริมาตร ปริมาณความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร
3. เติมน้ำเอทานอล 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วเติมสารละลาย DPPH 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันและปฏิกิริยาทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
4. ทำการทดลองซ้ำดังข้อ 3 แต่ไม่เติมสารละลาย DPPH เป็นสารละลายเปรียบเทียบ (blank)
5. นำตัวอย่างในข้อ 3 และ 4 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
6. คำนวณหา antioxidant activity ในรูปของค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC₅₀ โดยสร้างกราฟระหว่าง % DPPH Inhibition กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างจากกราฟ จะได้ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ คือค่า IC₅₀ ตามสมการ (ข-1)

$$\% \text{Inhibition DPPH} = \left(\frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \times 100 \dots\dots\dots (ข-1)$$

โดยที่ OD_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

การรายงานผลกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีหน่วยเป็นร้อยละโดยปริมาตรของสารสกัดถ้าค่า IC₅₀ มีค่าน้อยแสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีคือ ใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำก็สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% จากเริ่มต้น



รูปที่ ข ตัวอย่างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % DPPH Inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดผงผลหม่อนสกัด

ตัวอย่างการคำนวณ

ในกราฟรูปที่ ข จะใช้สมการในการหาความเข้มข้นที่ให้ค่า % DPPH inhibition เท่ากับ 50% จากสมการ $y = 31.64\ln x + 71.067$ จะสามารถหาค่า x โดยแทนค่า y เท่ากับ 50

$$y = 31.64\ln x + 71.067$$

$$50 = 31.64\ln x + 71.067$$

$$x = 0.514 \%v/v$$

สารสกัดผงผลหม่อน 100%v/v มีค่า dry weight = 6.593 %wt, density = 1.016 g/ml

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของผงผลหม่อนสกัด (mg/ml)} &= \left(\frac{X}{100}\right) \times \frac{\%dryweight}{100} \times density(g/ml) \times \frac{1000mg}{1g} \\ &= \left(\frac{0.514}{100}\right) \times \left(\frac{6.593}{100}\right) \times 1.016 \times 1000mg/ml \\ &= 0.339 mg/ml \end{aligned}$$

ดังนั้น ความเข้มข้นของผงผลหม่อนสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

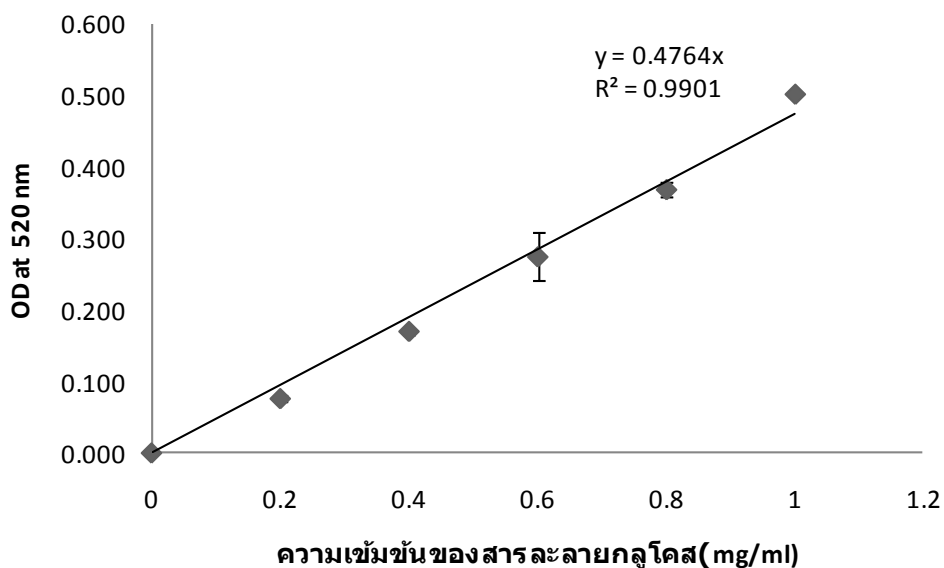
50% มีค่าเท่ากับ 0.339 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic Acid 1% ดังนี้ เตรียมสาร DNS 1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตรและเตรียมสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.6 กรัมละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในสารละลาย DNS ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิจนกระทั่งสารละลายใสแล้วค่อยๆ เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 30 กรัมลงในสารละลายผสมที่ใสแล้วที่ละน้อยจนครบ
3. เติมโซเดียมซัลไฟต์ 0.05 กรัม และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรเก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง
4. เตรียมสารละลายกลูโคสใช้เป็นสารมาตรฐานในน้ำกลั่นเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. ในการทดสอบนำสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานปริมาณกลูโคส 500 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองนำไปต้มในน้ำเดือด อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำเย็นทันทีจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองผสมสารให้เข้ากัน ใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปรียบเทียบ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดย
6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{520} (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (แกน X) คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ค กราฟมาตรฐานปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์

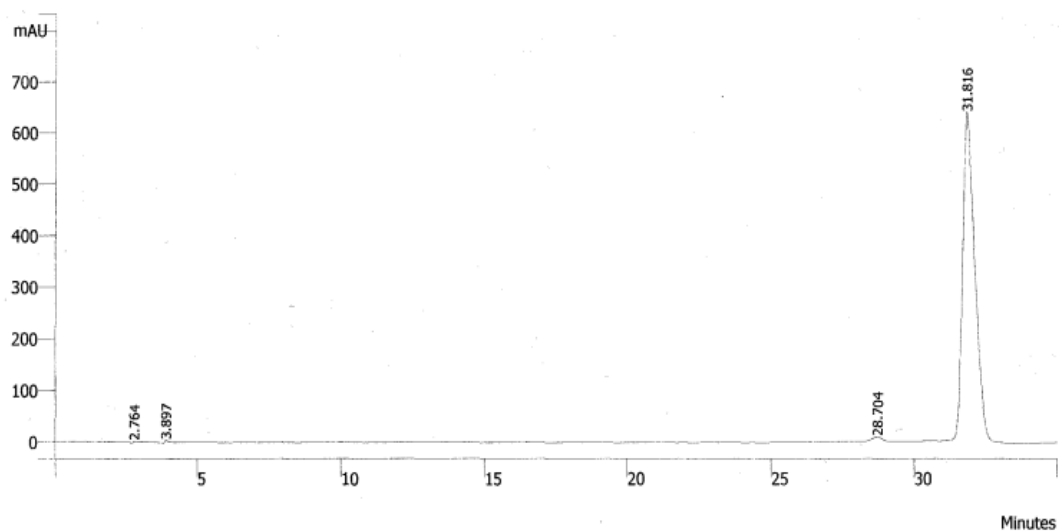
ตัวอย่างการคำนวณ

สารละลายตัวอย่างของสารสกัดผงผลหม่อน (เจือจางด้วยน้ำ 15 เท่า) วัดค่า OD ได้ 0.382
 ปริมาณความเข้มข้นกลูโคส = (OD ของตัวอย่าง - OD ตัวควบคุม) / ความเข้มข้น x dilution factor
 ปริมาณความเข้มข้นกลูโคส = (0.382 - 0.115) / 0.476 x 15 = 8.407 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 มีค่า dry weight = 6.593 %wt, density = 1.016 g/ml

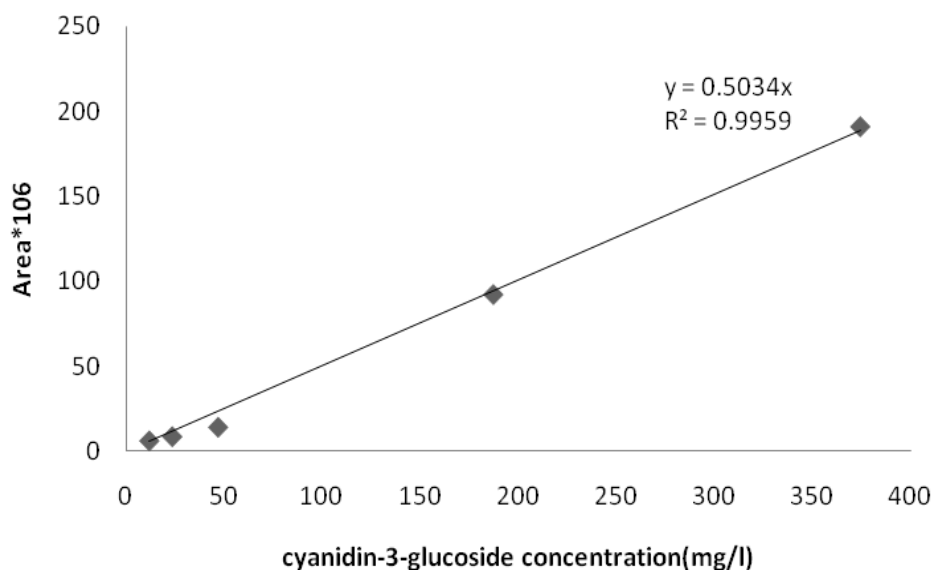
$$\begin{aligned} \text{ปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (mg / gDW)} &= \left(\frac{X \times 100}{\% \text{dryweight} \times \text{density (g / ml)}} \right) \\ &= \frac{8.407 \times 100}{6.593 \times 1.016} \text{ mgGlu cose / gDW} \\ &= 127.26 \text{ mgGlu cose / gDW} \end{aligned}$$

ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 127.26 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมสารสกัดหม่อนแห้ง

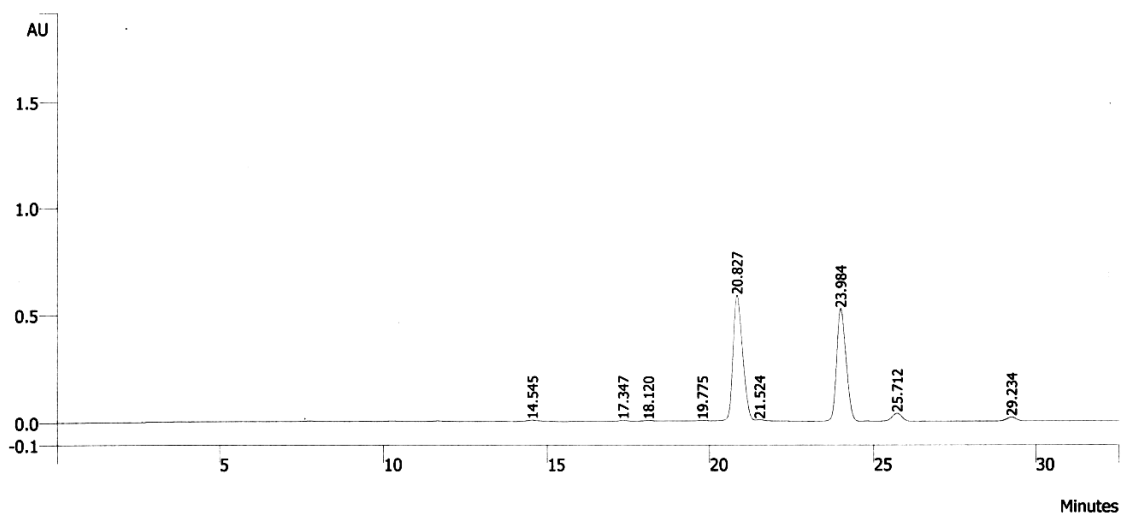
ภาคผนวก ง
การหาชนิดและปริมาณแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค HPLC



รูปที่ ง-1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์บริสุทธิ์ (สารแอนโทไซยานินมาตรฐาน)

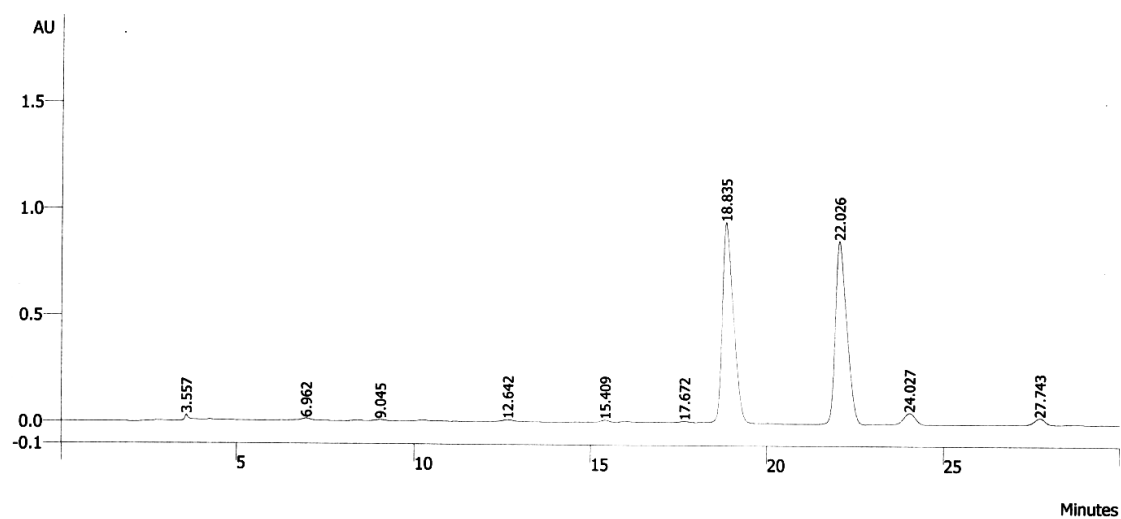


รูปที่ ง-2 กราฟมาตรฐานของสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



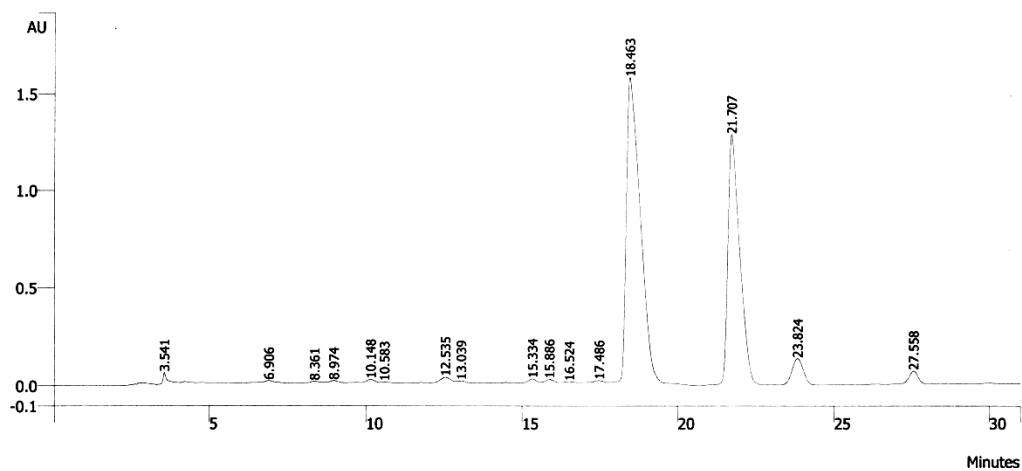
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)
1		0.4180	14.545	991674	BB	22.3
2		0.3164	17.347	750761	BB	17.6
3		0.1856	18.120	440443	BB	15.4
4		0.1981	19.775	469979	BV	16.1
5		50.1125	20.827	118891360	VB	18.7
6		0.1385	21.524	328501	TS	0.0
7		43.6983	23.984	103673840	BB	18.5
8		3.3651	25.712	7983579	BB	20.1
9		1.5674	29.234	3718721	BB	19.7
Totals		99.9999		237248864		

รูปที่ ง-3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแห้ง
ปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์



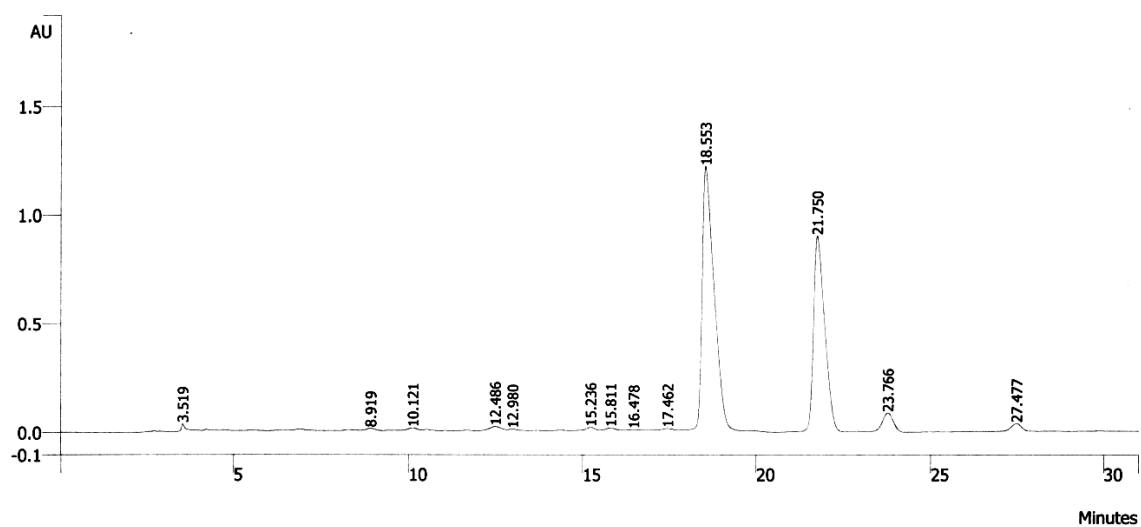
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)
1		0.4216	3.557	1802399	BB	6.1
2		0.4482	6.962	1915870	BB	15.2
3		0.2906	9.045	1242160	VB	16.6
4		0.5331	12.642	2278940	BV	22.6
5		0.4973	15.409	2125923	BV	17.0
6		0.3280	17.672	1401932	BV	17.2
7		47.9753	18.835	205082176	VB	20.1
8		44.8571	22.026	191752384	BB	20.6
9		3.0400	24.027	12995009	TF	0.0
10		1.6089	27.743	6877521	BB	19.5
Totals		100.0001		427474336		

รูปที่ ง-4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผงผลหม่อนแห้ง
ปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์



Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)
1		0.5783	3.541	5253608	BB	6.4
2		0.3006	6.906	2731092	BB	15.8
3		0.1851	8.361	1681981	BV	19.7
4		0.2586	8.974	2349690	VV	16.1
5		0.4394	10.148	3991711	VV	17.6
6		0.1176	10.583	1068623	VV	16.6
7		0.7771	12.535	7060330	VV	23.7
8		0.1849	13.039	1679400	VB	22.9
9		0.4746	15.334	4311932	VV	16.7
10		0.4532	15.886	4117465	VV	18.8
11		0.2601	16.524	2362702	VV	28.4
12		0.4760	17.486	4324363	VV	25.4
13		53.1427	18.463	482796640	VB	29.4
14		37.0926	21.707	336983552	BV	24.2
15		3.7540	23.824	34104708	VB	24.2
16		1.5051	27.558	13673734	BB	19.3
Totals		99.9999		908491520		

รูปที่ ง-5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแห้ง
ปลูกันครราชสีมา



Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)
1		0.3761	3.519	2078149	BB	6.0
2		0.2838	8.919	1568077	BB	13.9
3		0.3664	10.121	2024660	BV	16.5
4		0.8397	12.486	4640221	BV	23.1
5		0.2187	12.980	1208271	VB	21.2
6		0.6975	15.236	3854262	VV	16.9
7		0.6951	15.811	3841271	VV	20.3
8		0.5120	16.478	2829329	VV	0.0
9		0.9684	17.462	5351261	VV	24.3
10		53.8296	18.553	297453504	VB	22.1
11		36.3855	21.750	201060160	BB	20.6
12		3.4336	23.766	18973456	BB	20.2
13		1.3936	27.477	7700655	BB	19.5
Totals		100.0000		552583296		

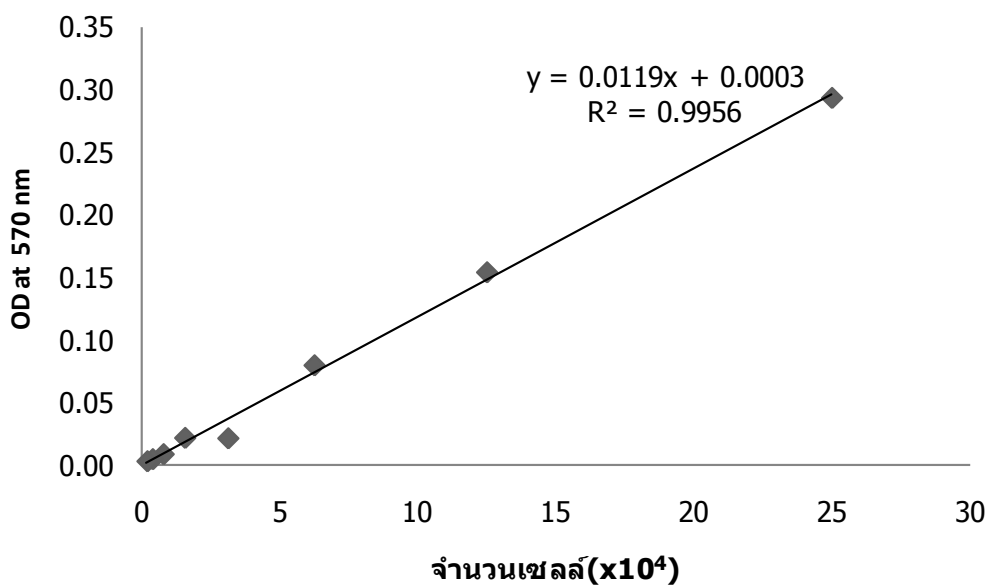
รูปที่ ง-6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผงผลหม่อนแห้ง
ปลูกจังหวัดนครราชสีมา

ภาคผนวก จ

การวัดหาจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ PBS โดยชั่ง PBS 9.8 กรัมผสมในน้ำ DI ปริมาตร 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.4
2. เตรียมสารละลาย MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole), ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสมสาร MTT ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ PBS ปริมาตร 1 ml
3. เตรียมตัวอย่างโดย คุดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ PBS พีเอช 7.4
4. เติมสารละลาย MTT จากข้อ 1 ลงในหลุมที่มีเซลล์อยู่ 350 ไมโครลิตร และบ่มที่สภาวะ CO₂ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
5. นำสารละลาย MTT ออกจากหลุมเลี้ยงเซลล์
6. เติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในหลุมเลี้ยงเซลล์แล้วใช้ปิเปตพ่น DMSO ขึ้น-ลงเพื่อละลายผลึก formazan เกิดเป็นสารละลายสีม่วง และใช้สารละลาย DMSO เป็น blank นำตัวอย่างที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร
7. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เพื่อใช้วิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของตัวอย่าง



รูปที่ ๑ กราฟมาตรฐานของเซลล์ rMSC ด้วยวิธี MTT (n = 4)

ตัวอย่างการคำนวณ

จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (NM) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

นำตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสงได้ 0.069

$$\text{จำนวนเซลล์} = (\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} - \text{ตัวควบคุม}) / (\text{ความชัน} / 10^4)$$

$$\text{ดังนั้น จำนวนเซลล์} = (0.069 - 0.052) / (1.428 / 10000) = 14,280 \text{ เซลล์}$$

ภาคผนวก จ

การวัดหาจำนวนเซลล์ด้วยวิธี DNA

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย SSC (20X) ซึ่งสาร NaCl 17.999 กรัม + Na₃Citrate. 2H₂O 8.823 กรัมผสมในน้ำ DDW จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลาย SDS lysis buffer โดยผสม SDS 20 มิลลิกรัม + ของ 20X SSC ปริมาตร 5 มิลลิลิตร+ น้ำ DDW ปริมาตร 95 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลายสีย้อมเรืองแสง Hoechst โดยละลาย Hoechst 33258 ในสารละลาย DMSO ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้เซลล์แขวนลอยในอาหาร 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน vial แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีเทอาหารทิ้งแล้วเติม SDS lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงใน vial ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เจือจางเซลล์มาตรฐานโดยใช้ SDS lysis buffer ให้เป็นความเข้มข้น 1.5625×10^4 , 3.125×10^4 , 6.25×10^4 , 1.25×10^5 , 2.5×10^5 และ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในถาด 24 well plate แข็งแข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอนำออกมาวัดพร้อมกับตัวอย่าง

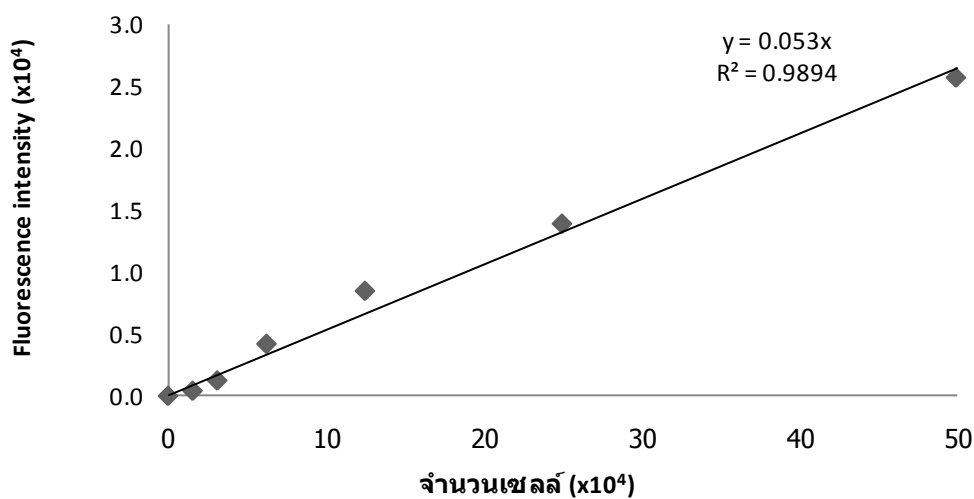
5. สำหรับตัวอย่าง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 และเติมสาร SDS lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงหลุมการเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แข็งแข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์แตก และปล่อย DNA ออกมา

6. เตรียมตัวอย่างกับเซลล์มาตรฐานในข้อ 4 ก่อนไปวัด DNA ดังนี้ นำตัวอย่างทั้งหมดมาละลายที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ครั้งแล้วนำกลับไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 1 วัน แล้วจึงนำมาละลายที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นการ freeze thaw เซลล์ 1 รอบเพื่อช่วยให้ผนังเซลล์แตกได้ดียิ่งขึ้นจากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างในแต่ละหลุมขึ้นลงหลายๆ ครั้งเพื่อผสมให้สารละลายเข้ากัน

7. ปิเปตสารละลายจากข้อ 6 มาปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงใน 96-well black plate และใช้ SDS lysis buffer เป็น Blank และเติมสีย้อม Hoechst (โดยเตรียมผสม Hoechst ในข้อ 3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร + น้ำ DDW ปริมาตร 19 มิลลิลิตร + SSC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร

100 ไมโครลิตร เพื่อข้อมสารเรืองแสงให้ติด DNA ในการเตรียมสารละลายในข้อ 7 นี้ควรทำในที่มืดเพื่อรักษาความคงตัวของสีข้อม

8. นำสารละลายในข้อ 7 ไปวัด fluorescence intensity ที่ 355 นาโนเมตร (Excitation) and 460 นาโนเมตร (Emission) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์กับค่า fluorescence intensity แล้วเทียบกับตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์



รูปที่ ๑ กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์โดยวิธี DNA

ตัวอย่างการคำนวณ

จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ในอาหาร NM เป็นเวลา 7 วัน

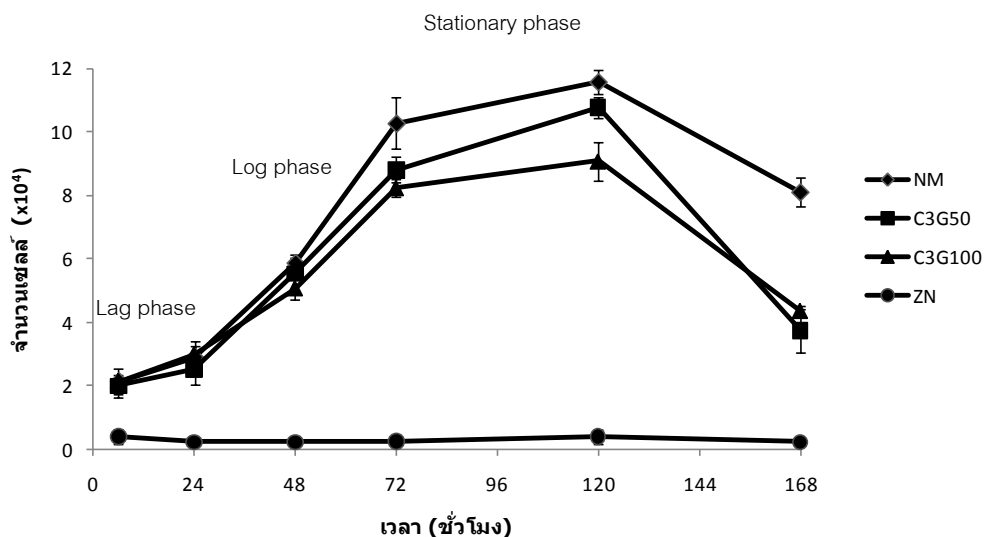
นำตัวอย่างไปวัดค่า Fluorescent intensity ได้ 12,867

จำนวนเซลล์ = (Fluorescent intensity ของตัวอย่าง-ตัวควบคุม)/ความชัน

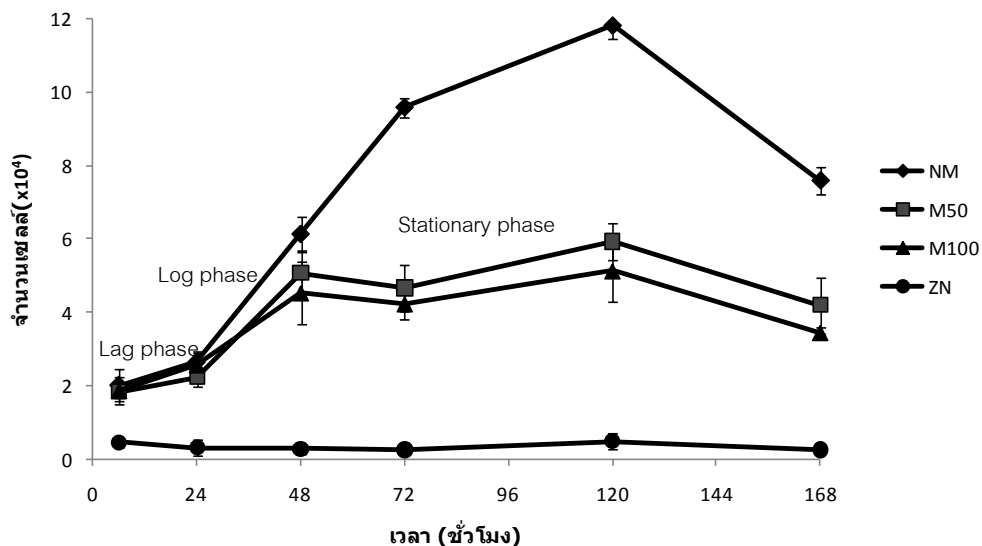
ดังนั้น จำนวนเซลล์ = $(12,867 - 5,050) / 0.053 = 147,490$ เซลล์

ภาคผนวก ข

การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) และ
ระยะเวลาที่เซลล์แบ่งตัวเป็นสองเท่า (Population Doubling Time, PDT)



รูปที่ ข-1 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไชยานินดีน-3- กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μ M (C3G50), 100 μ M (C3G100) และซิงค์อะซิเตรต ความเข้มข้น 20 ppm (ZN)



รูปที่ ข-2 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงหม่อนความเข้มข้น 0.25 mg/ μ l (M50), 0.5 mg/ μ l (M100) และซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN)

ตัวอย่างการคำนวณ

อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ μ (ต่อชั่วโมง) ที่เลี้ยงในอาหาร C3G100

ระยะ log phase อยู่ในช่วง 24-72 ชั่วโมง

ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีจำนวนเซลล์ 29,670 เซลล์

ที่เวลา 72 ชั่วโมงมีจำนวนเซลล์ 82,330 เซลล์

จากสมการ

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)} \\ &= \frac{(\ln 82,330 - \ln 29,670)}{(72 - 24)} = 21.27 \times 10^{-3} \text{ ต่อชั่วโมง}\end{aligned}$$

ดังนั้น อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร C3G100 เท่ากับ 21.27×10^{-3} ต่อชั่วโมง

เวลาแบ่งตัวที่คูณ T (ชั่วโมง)

จากสมการ

$$\begin{aligned}T &= \frac{\ln 2}{\mu} \\ &= \frac{\ln 2}{(21.27 \times 10^{-3})} = 32.59 \text{ ชั่วโมง}\end{aligned}$$

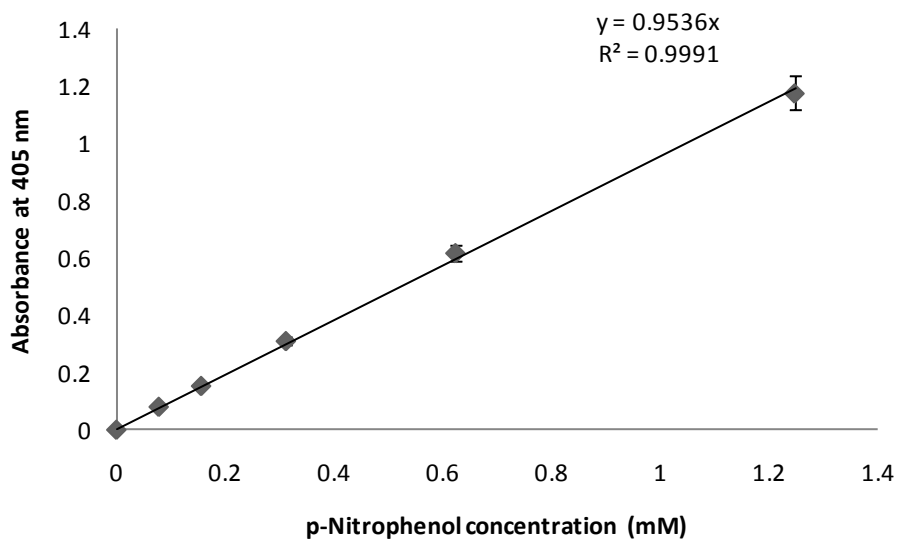
ดังนั้น เวลาแบ่งตัวที่คูณของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร C3G100 เท่ากับ 32.59 ชั่วโมง

ภาคผนวก ซ

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ p-nitrophenol (10mM) เจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.78125, 0.15625, 0.3125, 0.625, และ 1.25 มิลลิโมลลาร์
2. สำหรับตัวอย่างเติมสาร SDS lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงใช้น้ำกลั่นเป็น Blank
3. ปิเปตสารในข้อ 1, 2 มาปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate แล้วเติมสารละลายซับสเตรท p-Nitrophenyl phosphate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 นาทีหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม NaOH ความเข้มข้น 0.02 นอร์มัล ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) จะเปลี่ยน pNPP ให้เป็น p-Nitrophenol ได้สารสีเหลือง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร



รูปที่ ๗ กราฟมาตรฐานของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)

ตัวอย่างการคำนวณ

นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรได้ 0.106

กิจกรรมของเอนไซม์ ALP = (OD ของตัวอย่าง-ตัวควบคุม)/ความชัน

กิจกรรมของเอนไซม์ ALP = (0.106-0.069)/0.954 = 0.0385 มิลลิโมลลาร์ต่อ 15 นาที

จำนวนเซลล์ = 146,772 เซลล์

กิจกรรมของเอนไซม์ ALP ต่อจำนวนเซลล์ = 0.0385/146,772 มิลลิโมลลาร์ต่อ 15 นาทีต่อเซลล์
 = 2.626×10^{-7} มิลลิโมลลาร์ต่อ 15 นาทีต่อเซลล์

ภาคผนวก ฅ

การวัดปริมาณแคลเซียม

วิธีการทดลอง

1.เตรียมสารละลาย ethanolamine buffer ความเข้มข้น 0.88 โมลลาร์ในน้ำ DDW, เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลลาร์ (1 M HCl) และเตรียมสารละลายซับซ้อน O-cresolphthalein complex (OCPC) ความเข้มข้น 0.63 มิลลิโมลลาร์ ด้วย 1 M HCl

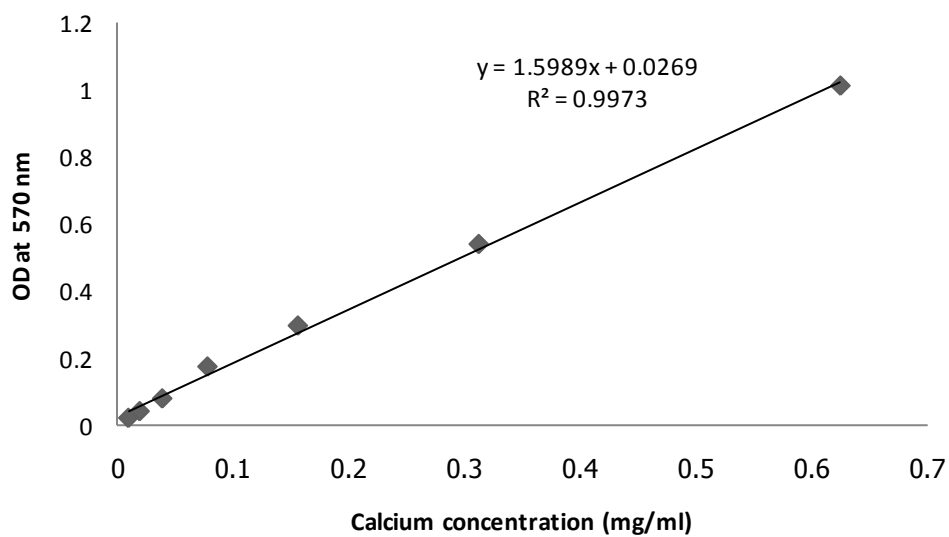
2. เตรียม CaCO_3 มาตรฐานโดยละลาย CaCO_3 5 กรัม ใน 1 M HCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตรได้เป็น CaCO_3 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (แคลเซียม 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

3. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายจากข้อ 2 นำมาเจือจางในสารละลาย 1 M HCl ให้ได้ความเข้มข้น 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. สำหรับตัวอย่างเติมสาร SDS lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตมา 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย 1 M HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตรบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 4-24 ชั่วโมง โดยใช้สาร 1 M HCl เป็น Blank

5. ปิเปตสารในข้อ 3 และ 4 มาปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ลงใน 48-well plate แล้วเติมสาร ethanolamine buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารซับซ้อน OCPC ปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยแคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ OCPC ให้สารสีม่วงจากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าวปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ใน 96-well plate นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร

6. สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมของตัวอย่าง



รูปที่ ๓ กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม

ตัวอย่างการคำนวณ

นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรได้ 0.291

ปริมาณแคลเซียม = (OD ของตัวอย่าง-ตัวควบคุม)/ความชัน

ปริมาณแคลเซียม = $(0.291 - 0.184) / 1.599 = 0.0669$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จำนวนเซลล์ = 153,764 เซลล์

ปริมาณแคลเซียมต่อจำนวนเซลล์ = $0.0669 / 153,764$ มิลลิกรัมต่อเซลล์

= 4.35×10^{-7} มิลลิกรัมต่อเซลล์

ภาคผนวก ญ

จรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง

ตามมาตรฐานการดูแลและใช้สัตว์ทดลองแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การจัดการสภาพแวดล้อมของสถานที่เลี้ยงสัตว์

การจัดการสภาพแวดล้อมของสถานที่เลี้ยงสัตว์ สามารถป้องกันการติดเชื้อมีการควบคุมอุณหภูมิที่ $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 90\%$ มีการระบายอากาศ แสง และเสียงให้คงที่และเหมาะสมกับความต้องการของสัตว์ทดลองไม่สร้างความเครียดให้แก่สัตว์

2. วัสดุอุปกรณ์เลี้ยงสัตว์ทดลอง

กรงหรือคอกเลี้ยงสัตว์

กรงหรือคอกที่ใช้เลี้ยงสัตว์ มีความแข็งแรงมั่นคงเพียงพอที่จะป้องกันสัตว์หลบหนีได้ และถูกต้องตามมาตรฐานสากลที่กำหนดไว้สำหรับชนิด ขนาด และจำนวนสัตว์ ไม่มีส่วนประกอบที่จะทำให้สัตว์บาดเจ็บและทำด้วยวัสดุที่คงทนต่อสารเคมีหรือความร้อนที่ใช้ป้องกันการติดเชื้อ

วัสดุรองนอน

วัสดุที่ใช้รองนอนมีความเหมาะสมกับสัตว์ทดลอง ไม่แหลมคม มีคุณสมบัติที่ซึมซับน้ำแล้วไม่เปื้อนยุ่ย และปลอดภัยจากสารพิษและเชื้อโรค

การให้อาหารสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองได้รับอาหารและน้ำที่สะอาดปราศจากเชื้อโรค สารพิษและสารก่อมะเร็ง ได้รับอาหารและน้ำกินในปริมาณที่เพียงพอกับความต้องการตามระยะเวลา ส่วนประกอบของอาหารจะมีโปรตีน ไขมัน แป้ง วิตามิน แร่ธาตุและกาก อย่างครบถ้วนเหมาะสมกับความต้องการของสัตว์ทดลอง

3. การจัดการ

สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในห้องควบคุมเชื้อที่ภาควิชาสัตววิทยา คณะแพทยศาสตร์ การเลี้ยงสัตว์จะเลี้ยงตามระบบการเลี้ยงแบบ Strict hygienic conventional อย่างต่อเนื่องและเข้มงวดในการป้องกันการติดเชื้อ โดยดำเนินการตามระบบดังกล่าวข้างต้นอย่างเคร่งครัด

หน่วยงานเลี้ยงสัตว์ มีสัตวแพทย์หรือนักวิชาการที่มีพื้นฐานความรู้และประสบการณ์ ด้านสัตว์ทดลอง และมีพนักงานเลี้ยงสัตว์ที่ผ่านการอบรมการเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ได้มาตรฐาน หน่วยงานเลี้ยงสัตว์ มีข้อมูลแหล่งที่มาของวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ การป้องกันการติดเชื้อ การควบคุมการตรวจสอบสภาพแวดล้อม และการช่วยให้สัตว์ตายอย่างสงบในกรณีที่จำเป็น เพื่อให้สามารถจัดหาวัสดุอุปกรณ์ดังกล่าวได้อย่างต่อเนื่อง และถูกต้องตามความต้องการพร้อมทั้ง

มีอุปกรณ์สำรอง และหน่วยซ่อมบำรุงที่มี ประสิทธิภาพ โดยได้รับงบประมาณในการดำเนินการดังกล่าวอย่างเพียงพอและต่อเนื่อง

หน่วยงานเลี้ยงสัตว์มีการกำจัดซากสัตว์ทดลองด้วยวิธีการเผาเท่านั้น ไม่ใช้วิธีอื่นและ มีการกำจัดขยะปฏิภูมอย่างถูกต้องและเหมาะสม

4. เทคนิคในการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลอง

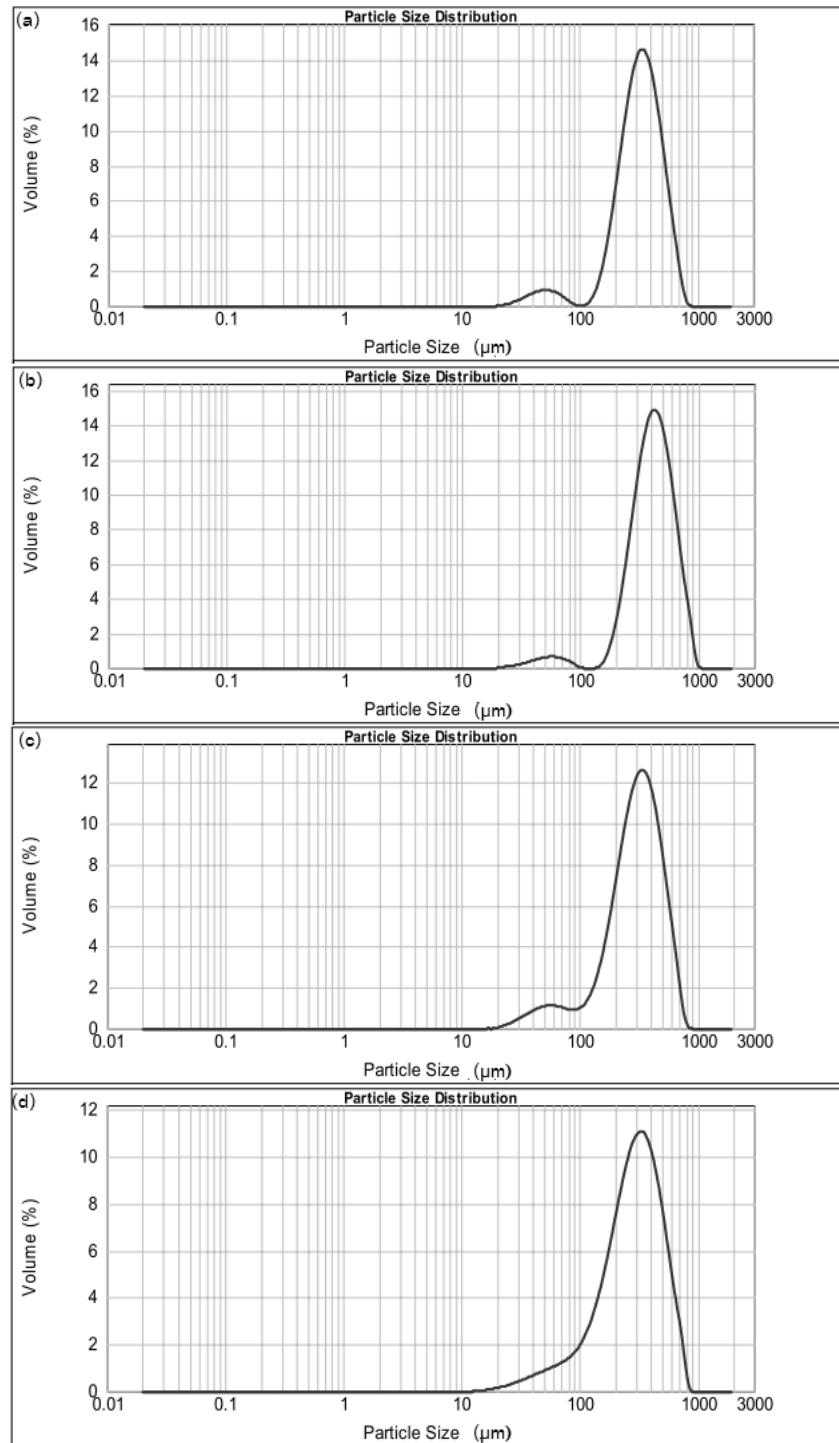
ผู้ใช้สัตว์ทดลอง มีการกำหนดแผนงานและวิธีการปฏิบัติต่อสัตว์อย่างถูกต้องสอดคล้อง กับมาตรฐานสากลไว้ในโครงการอย่างชัดเจน

ผู้ใช้สัตว์และพนักงานเลี้ยงสัตว์ มีการปฏิบัติต่อสัตว์ด้วยความเมตตา ไม่ทำให้สัตว์ ได้รับความเจ็บปวดหรือเกิดความเครียดในกรณีที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ จะมีการแสดงเหตุผล ทางวิชาการที่ชัดเจนว่าไม่มีทางเลือกอื่นแล้ว

ผู้ใช้สัตว์มีการเรียนรู้เทคนิคพื้นฐานการปฏิบัติต่อสัตว์และมีความชำนาญพร้อมในเรื่อง ต่างๆดังต่อไปนี้

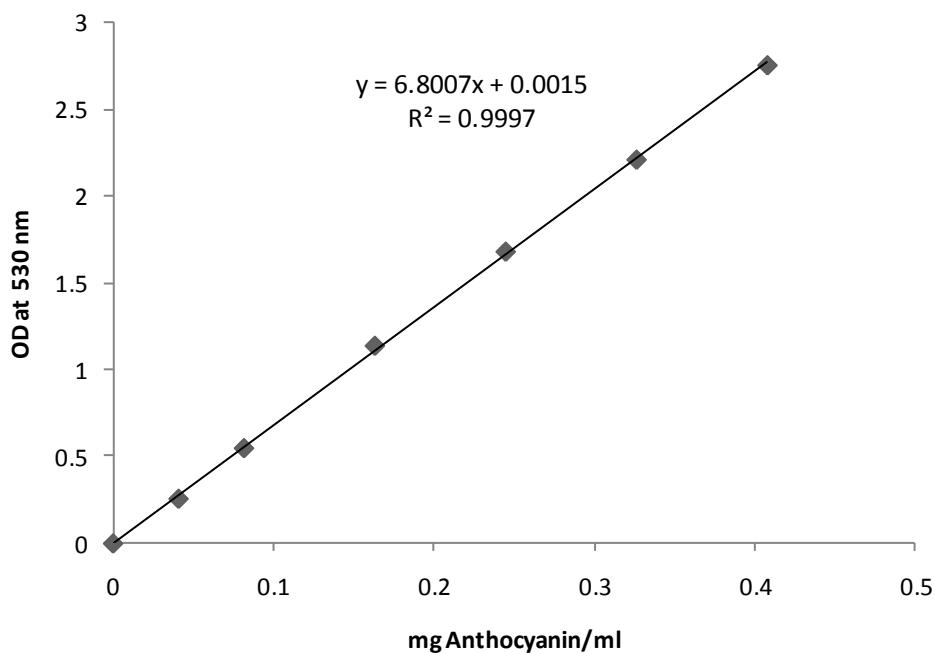
1. การจับและควบคุมสัตว์
2. การทำเครื่องหมายบนตัวสัตว์
3. การแยกเพศ
4. การให้สารทางปาก ผิวหนัง กล้ามเนื้อ เส้นเลือด
5. การเก็บตัวอย่างเลือด อุจจาระ ปัสสาวะ ชี้นเนื้อ
6. การทำให้สัตว์สลบ
7. การทำให้ตายอย่างสงบ
8. การชันสูตรซากศพ

ภาคผนวก ก
การหาขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Mastersizer malvidin 2000



รูปที่ ๗ ลักษณะการกระจายตัว(Size distribution) ของอัลจิเนตบีด 1.0%ALG (a), 1.5%ALG (b), 2.0%ALG (c) และ 2.5%ALG (d) ด้วยเครื่อง Mastersizer malvidin 2000

ภาคผนวก ฎ
การหาปริมาณการกักเก็บแอนโทไซยานินในอนุภาคไมโครอัลจีเนต



รูปที่ ฎ กราฟมาตรฐานของแอนโทไซยานิน

ตัวอย่างการคำนวณ

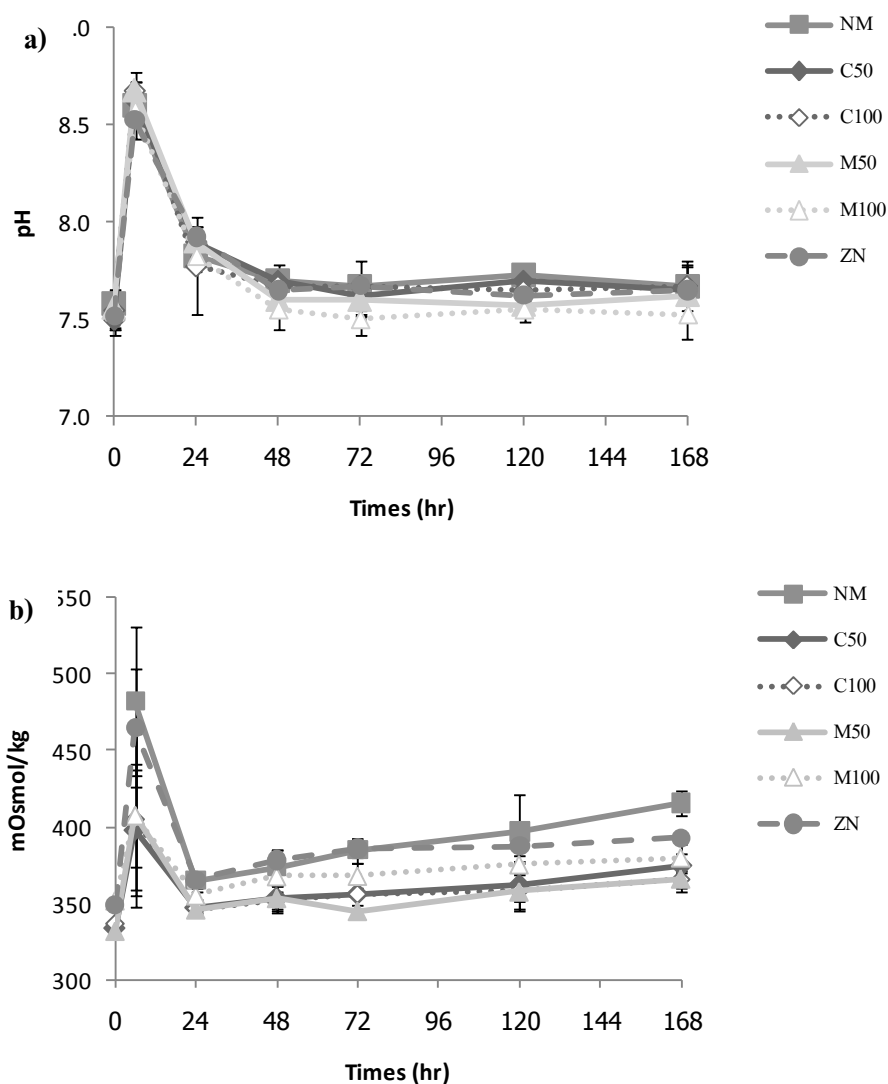
นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดแอนโทไซยานินจากอนุภาคไมโครอัลจีเนต 1%ALG ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.578

จากกราฟมาตรฐานตัวอย่างมีปริมาณแอนโทไซยานิน 0.0849 มิลลิกรัม แต่ในการทดลองใช้อนุภาคไมโครอัลจีเนต 5 มิลลิกรัม

$$\text{จึงได้ว่า ปริมาณแอนโทไซยานิน} = \frac{0.0849 \text{ mg} / \text{ml}}{5 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 16.986 \frac{\text{mgATC}}{\text{gMC}}$$

ดังนั้น ปริมาณการกักเก็บแอนโทไซยานินเท่ากับ 16.986 มิลลิกรัมแอนโทไซยานินต่อ
 กรัมไมโครอัลจีเนต

ภาคผนวก ฐ
การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและออสโมลาริตีในอาหารเลี้ยงเซลล์



รูปที่ ฐ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (a) และ ค่าออสโมลาริตี (b) ของที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100), สารสกัดผงผลหม่อน ความเข้มข้น 2.5 mg/ml (M50), 5.0 mg/ml (M100) และ ซิงค์อะซีเทตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) บนภาคเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 24 หลุม ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 หลังจากผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนูสตั๊เป็นระยะเวลา 6, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรุ่งนภา แย้มเดช เกิดเมื่อวันที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2531 เกิดที่โรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายในปีการศึกษา 2548 จากโรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย นครปฐม (พระตำหนักสวนกุหลาบมัธยม) จากนั้นได้เข้าศึกษาในระดับปริญญาตรี มหาวิทยาลัยศิลปากร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สาขาวิศวกรรมเคมี จนสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี และในปีการศึกษา 2552 ภาควิชา ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานในการประชุมวิชาการ

R. Yamdech¹, P. Aramwit², S. Kanokpanont¹, Stability of Anthocyanins from Mulberry Extracts in Alginate Microspheres at High Temperature, Poster Presentation, Chiang Mai International Conference on Biomaterials & Applications (CMICBA2011), The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 9-10 August 2011

R. Yamdech¹, P. Aramwit², S. Kanokpanont¹, Anthocyanins contents and antioxidant activity of mulberry fruit extracts: The effect of freeze drying and absorption on alginate beads, Oral Presentation, The 4th AUN/SEED-Net Regional Conference on Biotechnology: EMERGING BIOTECHNOLOGY FOR GREEN ENGINEERING, Montien Surawongse Hotel, Bangkok, Thailand, 26-27 January 2012

งานที่ได้ตีพิมพ์

R. Yamdech, P. Aramwit and S. Kanokpanont, Stability of Anthocyanin from Mulberry Extracts in Alginate Microspheres at High Temperature. Advanced Materials Research 506 (2012): 587-590.