

การสร้างอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินเพื่อคงแอกทิวิตีของจุลินทรีย์

นายพินิตพล พรหมบุตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF NISIN LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR SUSTAINED  
ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Mr. Pinitphon Prombutara

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินเพื่อคงแอกติวิตี ยับยั้งจุลินทรีย์
โดย	นายพิณิตพล พรหมบุตร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ณัฐพันธ์ ศุภกา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีเนียนัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ดร. ณัฐพันธ์ ศุภกา)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธีเนียนัน)

..... กรรมการ  
(ดร. อิศรา สระมาลา)

พินิตพล พรหมบุตร : การสร้างอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินเพื่อคงแอกทิวิตี  
ยับยั้งจุลินทรีย์. (PRODUCTION OF NISIN LOADED SOLID LIPID  
NANOPARTICLES FOR SUSTAINED ANTIMICROBIAL ACTIVITY) อ. ที่ปรึกษา :  
ผศ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 118 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน และ  
ศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นของเกลือต่อการปล่อยไนซินออกจากอนุภาคเพื่อ  
คงแอกทิวิตีการยับยั้งจุลินทรีย์ เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชันความดัน  
สูงจากไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 พบว่าการใช้ความดันของเครื่องโฮโมจีไนเซชันที่ 1500 บาร์ 3  
รอบ พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5 และโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 เป็นสารลดแรงตึงผิว  
และสารลดแรงตึงผิวร่วม ตามลำดับ อนุภาคจะมีขนาดเล็กและมีการกระจายขนาดอนุภาคแคบ  
ทำการบรรจุไนซินร้อยละ 0.5-3.0 ลงในอนุภาคนาโนที่เตรียมโดยภาวะข้างต้น จากการวัดด้วย  
เครื่องฟอตอน คอรัลเลชัน สเปกโทรสโกปี อนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินจะมีขนาดใหญ่กว่าอนุภาค  
นาโนที่ไม่ได้บรรจุไนซิน โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 159 ถึง 167 นาโนเมตร และมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า  
ที่อยู่ระหว่าง -28.3 ถึง -29.2 มิลลิโวลต์ ซึ่งการบรรจุไนซินร้อยละ 2 ลงในอนุภาคนาโนจะมี  
ประสิทธิภาพการสูงสุดร้อยละ 73.6 เมื่อเก็บอนุภาคไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 28 วัน อนุภาค  
นาโนจะมีขนาดและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเพิ่มขึ้นอยู่ระหว่าง 214 ถึง 245 นาโนเมตร และ  
-21.6 ถึง -25.9 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ อนุภาคนาโนสามารถควบคุมการปลดปล่อยไนซินได้นาน  
25 วัน ยกเว้นการบ่มอนุภาคที่ความเข้มข้นเกลือ 0.5 โมลาร์ อย่างไรก็ตามความเป็นกรด-เบสและ  
ความเข้มข้นเกลือของบัฟเฟอร์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้การปล่อยไนซินจากอนุภาคลดลง จากการศึกษา  
การยับยั้งเชื้อทดสอบ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 และ *Lactobacillus plantarum*  
TISTR 850 อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินร้อยละ 2 จะมีแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด  
และจะคงแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อได้นาน 20 วัน สำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST  
2871 และ 10 วัน สำหรับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ตามลำดับ จากการศึกษา  
ขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนมีการ  
เปลี่ยนแปลงขนาดเล็กน้อยในระหว่างการทดลอง

ภาควิชา...จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชา...จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา...2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4872391023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: nisin / solid lipid nanoparticles / high pressure homogenization

PINITPHON PROMBUTARA : PRODUCTION OF NISIN LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR SUSTAINED ANTIMICROBIAL ACTIVITY. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : NUTTAPUN SUPAKA, Ph.D., 118 pp.

The aims of this study were to prepare nisin loaded solid lipid nanoparticles by high pressure homogenization method and to study the effect of difference in pH and salt concentration on nisin releasing profile for sustained antimicrobial activity. An optimized condition for particle preparation was studied by characterization of unloaded nanoparticles. Using IMWITOR 900 as solid matrix at pressure of 1500 bar of high pressure homogenizer with 3 cycles, small size and narrow polydispersity were observed when 5% poloxamer 188 and 0.125% sodium deoxyglycolate were used as surfactant and co-surfactant, respectively. For 0.5%-3.0% nisin loaded, result from Photon correlation spectroscopy (PCS) showed that particle size was in range of 159-167 nm which increased from unloaded nanoparticle. Zeta-potential was in range of -28.3 to -29.2 mV. During 28 days at room temperature, size and zeta-potential were increased to range of 214-245 nm and -21.6 to -25.9 mV, respectively. *In vitro* release studies showed that nisin was released throughout 25 days except incubation with 0.5 M sodium chloride. However, the release was lower as the salt concentration and pH of the buffer increased. *In vitro* nisin biological activity was investigated by incubation in liquid medium containing either *Listeria monocytogenes* DMST 2871 or *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 and showed that antimicrobial activity was maintained up to 20 days and 10 days of incubation, respectively. Scanning electron microscopy demonstrated that particle size was slightly changed during experiment.

Department : Microbiology Student's signature : .....

Field of study : Industrial Microbiology Advisor's signature : .....

Academic year : 2007 Co-advisor's signature : .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. ณัฐพันธุ์ ศุภกา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย ที่ให้การสนับสนุนทุนค่าเล่าเรียน ค่าวิจัย และค่าใช้จ่ายส่วนตัวแก่ผู้วิจัย และขอขอบคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือทดลองต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน และ ดร. อิศรา สระมาลา ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยเหลือและเอื้ออำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนสำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัย ขอขอบคุณสำหรับทุกความช่วยเหลือ และขอบคุณสำหรับทุกความห่วงใยและกำลังใจที่มีให้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ญ
สารบัญภาพ .....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. วารสารปริทัศน์ .....	
2.1 แบคทีเรียโอซิน.....	5
2.2 ไนซิน.....	5
2.3 สมบัติทางกายภาพและเคมีของไนซิน.....	10
2.4 ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน.....	14
2.5 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน.....	18
2.6 ประโยชน์ของไนซิน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร.....	20
2.7 การนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการกักเก็บไนซิน.....	22
2.8 การเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินด้วยอนุภาคนาโน.....	26
2.9 อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง.....	28
2.10 วิธีเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง.....	30
2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยวิธีฮอโมจีไนเซชันความดันสูง.....	34
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	43
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	43
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	44
3.3 ทดสอบการละลายของไนซินในไขมันแข็งชนิดต่างๆ.....	45
3.4 หากาวยที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนจากไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 เพื่อบรรจุไนซิน.....	45

	หน้า
3.5 ศึกษาความคงตัวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 ที่บรรจุ โนซิน.....	47
3.6 ทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุโนซินด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง.....	49
3.7 การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อการปลดปล่อยโนซินจากอนุภาค นาโนชนิดไขมันแข็ง.....	50
3.8 การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการปลดปล่อยโนซินจากอนุภาค นาโนชนิดไขมันแข็ง.....	50
3.9 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของโนซินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนชนิด ไขมันแข็ง.....	51
3.10 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความคงตัวของอนุภาคนาโน ชนิดไขมันแข็ง.....	51
4. ผลการทดลอง.....	52
4.1 ทดสอบการละลายของโนซินในไขมันแข็งชนิดต่างๆ.....	52
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนจากไขมันแข็ง อิมิเตอร์ 900 เพื่อบรรจุโนซิน.....	53
4.3 ศึกษาความคงตัวด้านขนาดและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta- potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 ที่บรรจุโนซิน ในระยะเวลา 28 วัน.....	63
4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุโนซินด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง....	67
4.5 การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อการปล่อยโนซินจากอนุภาคนา โนชนิดไขมันแข็ง.....	67
4.6 การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการปลดปล่อยโนซินจากอนุภาค นาโนชนิดไขมันแข็ง.....	72
4.7 ทดสอบแอกทิวิตีชีวภาพของโนซินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนชนิด ไขมันแข็งต่อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 2871.....	76
4.8 ทดสอบแอกทิวิตีชีวภาพของโนซินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนชนิด ไขมันแข็งต่อ <i>Lactobacillus plantarum</i> TISTR 850.....	79
4.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความคงตัวของอนุภาคนาโน ชนิดไขมันแข็ง.....	81



	หน้า
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	86
รายการอ้างอิง.....	95
ภาคผนวก.....	103
ภาคผนวก ก.....	104
ภาคผนวก ข.....	105
ภาคผนวก ค.....	106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	118

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่มต่าง ๆ .....	8
2.2 เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตไนซินได้.....	13
2.3 แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ด้วยไนซิน.....	19
2.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เติมไนซินเป็นสารถนอมอาหารและเชื้อเป้าหมายในการยับยั้ง..	23
2.5 ปริมาณการใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารในประเทศต่างๆ.....	24
2.6 ตัวอย่างชนิดของอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซิน.....	27
2.7 ชนิดของไขมันที่ใช้เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง ช่วงอุณหภูมิหลอมเหลวและ ชื่อทางการค้า.....	31
2.8 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวและวิธีซึ่งใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง	32
2.9 ตัวอย่างเพปไทด์และโปรตีนที่บรรจุในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง.....	33
3.1 ภาวะที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนจากไขมันแข็งชนิดอิมิตอร์ 900.....	47
3.2 สูตรการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินไนซิน.....	48
4.1 ความสามารถในการละลายของไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/ น้ำหนัก) ในไขมันแข็งชนิดต่างๆ ที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที.....	52
4.2 ประสิทธิภาพการบรรจุไนซินด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง.....	67
4.3 ปริมาณไนซิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ปล่อยจากอนุภาคนาโนในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.002 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 เป็นเวลา 25 วัน.....	70
4.4 อัตราการปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนอนุภาคนาโน ในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.002 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 เป็น เวลา 25 วัน.....	72

ตารางที่	หน้า
4.5 ปริมาณไนซิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ปล่อยจากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.002 โมลาร์ ที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 25 วัน.....	74
4.6 อัตราการปล่อยไนซิน (มิลลิกรัม/วัน) จากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.002 โมลาร์ ที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 25 วัน.....	76

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	ปฏิกิริยาเคมีการดัดแปลงกรดอะมิโนของไนซิน..... 6
2.2	โครงสร้างของดีไฮดรอกซีอะลานีน(Dha), ดีไฮดรอกซีบีวเทอร์รีน (Dhb), แลนไธโอนีน และปีตามีทิลแลนไธโอนีน..... 11
2.3	โครงสร้างของไนซิน A ..... 11
2.4	โครงสร้างของไนซิน Z ..... 12
2.5	โครงสร้างของไนซิน Q..... 13
2.6	โครงสร้าง 3 มิติ ของไนซิน A ..... 15
2.7	ส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโมเลกุลไนซิน A..... 15
2.8	ความสามารถในการละลายของไนซินที่ความเป็นกรด-เบส 3 ถึง 8 ความสามารถในการละลายของไนซินที่ความเป็นกรด-เบส 3 ถึง 8 ในสารละลายเกลือเข้มข้น ก. 0-0.2 โมลาร์ และ ข. 0.2-1.5 โมลาร์..... 16
2.9	ความเสถียรของโมเลกุลไนซินที่อุณหภูมิ ก. 20 องศาเซลเซียส ข. 37 องศาเซลเซียส และ ค. อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส 2 ถึง 8..... 17
2.10	การสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแคทีเรียแกรมบวก..... 21
2.11	กลไกการยับยั้งแคทีเรียของไนซินโดยการจับกับลิพิด II..... 21
2.12	เอกติวิตีทางชีวภาพของไนซินที่ลดลงเนื่องจากการเพิ่มปริมาณไขมันนม..... 25
2.13	อนุภาคนาโนชนิดต่างๆ ก. ไมโครอิมัลชัน (microemulsion), ข. ลิโปโซม (liposome), ค. นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion), ง. อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ (polymeric nanoparticle)..... 27
2.14	การเตรียมอนุภาคนาโนด้วยการตกตะกอนด้วยแก๊สแอนติโซลเวนต์..... 29
2.15	แบบจำลองการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง ..... 33
2.16	วิธีห่อมอจีในเซชันความดันสูงแบบร้อน และวิธีห่อมอจีในเซชันความดันสูงแบบเย็น.... 36
2.17	ก. ความดันของเครื่องห่อมอจีในเซออร์ ข. จำนวนรอบของตัวอย่างที่ผ่านเครื่องห่อมอจีในเซออร์ที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิดไทรสเตียรีน (TSSLN) ไทรปาลมิติน (TPSLN) และ กลีเซอรอลปิฮีนเต (GBSLN) ที่บรรจุหามาซิเฟน..... 39

รูปที่	หน้า
2.18 ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในสารละลายค่าความเป็นกรด-เบส ที่ 1-7.....	40
2.19 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นเกลือชนิดต่างๆ ต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว(zeta-potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง.....	41
3.1 เครื่องหอม่จีในเซอร์ความเร็วสูง.....	46
3.2 เครื่องหอม่จีในเซอร์ความดันสูง.....	46
4.1 ขนาดของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 ซึ่งเตรียมโดยใช้ พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 และ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 500, 1000 และ 1500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ในวันที่ 0, 7 และ 14.....	55
4.2 ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว(zeta-potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 ซึ่งเตรียมโดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 และ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 500, 1000 และ 1500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมในวันที่ 0, 7 และ 14.....	56
4.3 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ความดัน 500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14.....	57
4.4 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ความดัน 1000 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14.....	58

รูปที่	หน้า
4.5 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมัน แข็งอิมิเตอร์ 900 โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสาร ลดแรงตึงผิวที่ความดัน 1,500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวรวม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวใน วันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14.....	59
4.6 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมัน แข็งอิมิเตอร์ 900 โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสาร ลดแรงตึงผิวที่ความดัน 500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวรวม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การ กระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14.....	60
4.7 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมัน แข็งอิมิเตอร์ 900 โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสาร ลดแรงตึงผิวที่ความดัน 1,000 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวรวม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวใน วันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14.....	61
4.8 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมัน แข็งอิมิเตอร์ 900 โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสาร ลดแรงตึงผิวที่ความดัน 1,500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวรวม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวใน วันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14.....	62

รูปที่	หน้า	
4.9	อนุภาคนาโนไขมันแข็งที่บรรจุไนซินซึ่งเตรียมได้จากภาวะความดัน 1500 บาร์ของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์และมีพอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และโซเดียมดีออกซีโคเลต 0.125% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม ตามลำดับ.....	63
4.10	ขนาดของอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ.....	64
4.11	ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (Zeta-potential) ของอนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ.....	66
4.12	การปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ แปรผันค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ตามลำดับ.....	65
4.13	ผลของค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ต่ออัตราการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินร้อยละ 2.....	69
4.14	การปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 โดยแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.50 โมลาร์ ตามลำดับ.....	71
4.15	ผลของความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.5 โมลาร์ ต่ออัตราการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินร้อยละ 2.....	75
4.16	การยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 2871 ของอนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 เทียบกับไนซินอิสระในระยะเวลา 20 วัน .....	78
4.17	การยับยั้งเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> TISTR 850 ของอนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 เทียบกับไนซินอิสระในระยะเวลา 20 วัน.....	80
4.18	อนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 0.5 ก. 0 วัน, ข. 7 วัน, ค. 14 วัน และ ง. 28 วัน.....	82
4.19	อนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 1.0 ก. 0 วัน, ข. 7 วัน, ค. 14 วัน และ ง. 28 วัน.....	83
4.20	อนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 2.0 ก. 0 วัน, ข. 7 วัน, ค. 14 วัน และ ง. 28 วัน.....	84

รูปที่		หน้า
4.21	อนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 3.0 ก. 0 วัน, ข. 7 วัน, ค. 14 วัน และ ง. 28 วัน.....	85
5.1	โครงสร้างของกลีเซอรอลโมโนสเตียเรต.....	87
5.2	แบบจำลองการสะสมและการปลดปล่อยไนซินที่บริเวณเปลือกนอกอนุภาคนาโนชนิด ไขมันแข็ง.....	91



# บทที่ 1

## บทนำ

การเก็บรักษาอาหารไว้ไม่ให้เน่าเสีย หรือการถนอมอาหารนั้นเป็นการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรสชาติและรสสัมผัสของอาหารไปในทางที่ไม่ดี นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการเกิดโรคจากจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนลงไปในการอาหาร เทคนิคการถนอมอาหารนั้นเริ่มขึ้นเมื่อหลายพันปีมาแล้ว ได้แก่ ชาวอียิปต์เก็บรักษาน้ำนมด้วยการหมักเป็นเนยแข็งและชาวกรีกใช้น้ำเมลดัดัญพืชที่เหลื่อจากการเก็บเกี่ยวมาหมักเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ซึ่งเทคนิคการถนอมอาหารในอดีตมักประสบปัญหาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่คงที่และยังคงเกิดการเน่าเสียของอาหารอยู่ ภายหลังจากในปี ค.ศ.1861 หลุยส์ ปาสเตอร์ ได้ค้นพบว่าจุลินทรีย์เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร จึงทำให้เทคนิคการถนอมอาหารมุ่งเน้นมาเป็นการยับยั้งจุลินทรีย์เป็นหลัก ได้แก่ การใช้ความร้อน การอบรังสี การเก็บรักษาอาหารในอุณหภูมิต่ำ และการใช้สารเคมี เป็นต้น (สุเมธธา วัฒนสินธุ์, 2545) อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคเหล่านี้มักทำให้เกิดการสูญเสียรสชาติและคุณค่าของอาหารไป อีกทั้งอาจเกิดอันตรายจากการบริโภคสารเคมีที่เติมลงไปในการอาหารได้ด้วยสาเหตุนี้สารถนอมอาหารที่มีแหล่งที่มาจากรธรรมชาติ (Natural food preservatives) จึงเริ่มเข้ามามีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแทนเทคนิคที่ได้กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้สนใจสารจำพวกเพปไทด์หรือโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งสร้างมาจากแบคทีเรีย โดยสารดังกล่าวถูกเรียกว่า “แบคเทอริโอซิน” (Bacteriocin)

ปัจจุบันแบคเทอริโอซินเป็นที่รู้จักดีในแง่ของการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ และสารถนอมอาหาร การใช้แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ได้มาจากแบคทีเรียแกรมบวกจำพวกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเฉพาะในซอสซึ่งมีส่วนประกอบของแลนโทไอโนน (lanthionine) ที่จัดอยู่ในกลุ่มแบคเทอริโอซินแลนติไบโอติก (lantibiotic) โดยเป็นกลุ่มของสารต้านจุลินทรีย์ที่มีหมู่แลนโทไอโนนเป็นองค์ประกอบ โครงสร้างของโนซินประกอบด้วยกลุ่มกรดอะมิโนที่ไม่พบในธรรมชาติ (unusual amino acid) ได้แก่ ดีไฮโดรอะลานีน (Dha) ดีไฮโดรพิวทีรีน (Dhb) แลนโทไอโนน และบีตาเมทิลแลนโทไอโนน ( $\beta$ -methyllanthionine) (Hansen, 1993) ซึ่งมีกลไกในการทำลายแบคทีเรีย โดยการทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย (Chen และ Hoover, 2003) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้กว้างโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกทั้งที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ ตัวอย่างเช่นแบคทีเรียในสกุลต่าง ๆ ได้แก่ *Enterococcus*, *Lactobacillus*,

*Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* และ *Listeria* เป็นต้น

ไนซินเป็นสารถนอมอาหารที่มีแหล่งที่มาจากธรรมชาติที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นสารปฏิชีวนะชนิดแรกที่ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารถนอมอาหาร โดยในปี 1969 องค์การอนามัยโลก (WHO) รับรองว่าไนซินมีความปลอดภัยและอนุญาตให้ใช้เติมในอาหารเพื่อถนอมอาหารได้ จากความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิดโดยเฉพาะจำพวกที่ทำให้อาหารเน่าเสียและก่อโรคต่างๆ โดยเฉพาะเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่มีความไวต่อการยับยั้งของไนซิน ซึ่งเป็นปัญหาการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท (Ross และคณะ, 2002) ทำให้ปัจจุบันได้มีการใช้ไนซินอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก ในหลายประเทศได้มีการประยุกต์ใช้ไนซินในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่มาจากนม และป้องกันการเน่าเสียในอาหารกระป๋องจากแบคทีเรียและสปอร์ของแบคทีเรียที่ทนความร้อน นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ และไวน์ โดยเติมไนซินในการผลิตเพื่อลดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทำให้เกิดกรดในผลิตภัณฑ์เบียร์ และไวน์ (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการเติมไนซินลงในอาหารหลายประเภทเพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหาร แต่แอกทิวิตีการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินจะลดลงอย่างมากเมื่อเติมลงในอาหาร ขณะที่การทดลองยับยั้งแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกทิวิตีของไนซินยังคงมีอยู่ (Schillinger และคณะ, 1996) เนื่องจากเกิดการสูญเสียไนซินในระบบอาหารขึ้นหลายกรณี เช่น อุณหภูมิและความเป็นกรด-เบสที่ไม่เหมาะสมต่อเสถียรภาพของโมเลกุลไนซินในระหว่างกระบวนการผลิตและหลังกระบวนการผลิต การจับกันระหว่างไนซินกับองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร เช่น โปรตีนและไขมัน การสูญเสียแอกทิวิตีชีวภาพโดยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ต่างๆ ภายในอาหาร และการที่ไนซินไม่สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกับอาหารจึงเกิดการตกตะกอนและทำให้ไม่สามารถสัมผัสกับแบคทีเรียเป้าหมายได้ (Antonio และคณะ, 2007) จากสาเหตุดังกล่าวทำให้ต้องมีการเติมไนซินในอาหารปริมาณมากเพื่อให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ตามเป้าหมาย ซึ่งอาจทำให้สิ้นเปลืองไนซินและอาจทำให้เกิดการดื้อไนซินของแบคทีเรียได้ โดยแบคทีเรียจะปรับเปลี่ยนสภาพของผนังเซลล์ทำให้ไนซินไม่สามารถจับกับผนังเซลล์ได้หรือสามารถสร้างเอนไซม์ไนซิเนส (Nisinase) มาทำลาย ไนซินได้ แบคทีเรียที่มักดื้อต่อปริมาณไนซินที่เพิ่มขึ้นได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Sterptococcus bovis*, *Clostridium botulinum* โดยเฉพาะสปอร์ของ *Clostridium* จะมีการดื้อต่อไนซินสูงกว่าเซลล์ของแบคทีเรีย (vegetative cell) (Mazzotta และคณะ, 1997) Chi-Zhang และ คณะ (2003) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการใช้ปริมาณไนซินอิสระที่แตกต่างกันและควบคุมให้มีเติมไนซินลงไปทีละน้อยอย่างต่อเนื่อง พบว่า

ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* จะขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของโนซินกับเชื้อ *Listeria monocytogenes* (mode of delivery) โดยทำการทดลองศึกษาการเติม โนซินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ภาวะด้วยกัน ได้แก่ การเติมโนซินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทันที การเติมโนซินลงอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณน้อยอย่างต่อเนื่องโดยใช้ปั๊มควบคุม และการเติมโนซินลงไปในปริมาณหนึ่งก่อนแล้วค่อยเติมโนซินลงไปอีกอย่างต่อเนื่องโดยใช้ปั๊มควบคุม จากผลการทดลองพบว่า การเติมโนซินลงไปในปริมาณ 200 หน่วยสากล/มิลลิลิตร ทันทีจะทำให้จำนวนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 4 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุม แต่ภายหลัง 40 ชั่วโมงจำนวนเชื้อกลับเพิ่มขึ้น ส่วนการเติมโนซินลงไปในปริมาณที่ต่อเนื่องโดยเริ่มจาก 200 หน่วยสากล/มิลลิลิตร จนมีปริมาณทั้งหมดเป็น 1000 หน่วยสากล/มิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งเชื้อได้ 2-3 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่การเติมโนซินลงไป 200 หน่วยสากล/มิลลิลิตร ทันทีก่อนแล้วค่อยเติมโนซินลงไปอีกอย่างต่อเนื่อง 200 หน่วยสากล/มล. และการเติมโนซินลงไป 200 หน่วยสากล/มิลลิลิตร ทันทีก่อนแล้วค่อยเติมโนซินลงไปอีกอย่างต่อเนื่อง 500 หน่วยสากล/มิลลิลิตร ตามเวลาที่กำหนดจะให้ผลการทดลองเหมือนกันคือสามารถลดปริมาณเชื้อลงอย่างรวดเร็วประมาณ 4 log CFU/มิลลิลิตร และจำนวนเชื้อจะคงที่ตลอดการทดลอง ผู้ทำการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการเติมโนซินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทันทีจะมีการสูญเสียโนซินร้อยละ 50 เนื่องจากถูกเซลล์แบคทีเรียดูดซึมไว้และเกิดการดื้อโนซินของเชื้อ *Listeria monocytogenes* (Chi-Zhang et al., 2003)

จากปัญหาที่เกิดขึ้นในการใช้โนซินเป็นสารถนอมอาหารดังที่กล่าวมาข้างต้นนั้นเป็นการแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มความเสถียรให้กับโนซินและการทำให้โนซินสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียในอาหารจึงมีความสำคัญมาก ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำอนุภาคนาโน (Nanoparticles) มาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความเสถียรของโนซิน โดยการเตรียมอนุภาคนาโนเมตรที่มีโนซินบรรจุอยู่ภายในเพื่อป้องกันการสูญเสียโนซินจากการทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบต่างๆ ของอาหาร และควบคุมให้มีการปลดปล่อยโนซินออกจากอนุภาคนาโนอย่างต่อเนื่องโดยคาดว่าจะทำให้แอกทิวิตีชีวภาพของโนซินคงอยู่ได้นานในอาหาร เทคโนโลยีการเตรียมอนุภาคนาโนนั้นสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นกับความเหมาะสมในการนำไปใช้งานจึงทำให้เกิดอนุภาคนาโนหลายรูปแบบขึ้น เช่น นาโนอิมัลชัน (Nanoemulsion) ลิโปโซม (Liposome) สารแขวนลอยอนุภาคนาโน (Nanosuspension) อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ (Polymeric nanoparticles) และอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง (Solid lipid nanoparticles) เป็นต้น ในงานวิจัยนี้เลือกที่จะใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเพื่อบรรจุโนซิน เนื่องจากอนุภาคนาโนชนิดนี้มีความคงตัวสูงและสามารถกักเก็บสารออกฤทธิ์ได้ปริมาณมาก และมีการควบคุมการปลดปล่อยสารออกจากอนุภาคได้ดี นอกจากนี้วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเป็นสารที่มีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค

เนื่องจากถูกย่อยสลายได้ดีในร่างกายมนุษย์ และไม่มีการใช้ตัวทำลายอินทรีย์ในขั้นตอนการเตรียมอนุภาค

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซิน เพื่อเพิ่มความเสถียรของโมเลกุลไนซินและคงแอกทิวิตีทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียให้อยู่ได้นานกว่าไนซินอิสระ พร้อมทั้งศึกษาความคงตัวของอนุภาคนาโนและการปลดปล่อยไนซินออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

การถนอมอาหารเป็นการเก็บรักษาอาหารไม่ให้เน่าเสีย โดยเป็นการยับยั้ง ทำลาย และลดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหาร การถนอมอาหารมีหลายวิธีเช่น การใช้ความร้อน การใช้ความเย็น การทำให้แห้ง การใช้สารเคมี และ การใช้รังสี เป็นต้น แต่วิธีการเหล่านี้มักประสบปัญหาอันเนื่องมาจากแบคทีเรียบางชนิดสามารถทนความร้อนได้ เช่น แบคทีเรียสร้างสปอร์ ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Clostridium* sp. หรือการที่แบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *Listeria monocytogenes* เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคมีที่ใส่ไปในอาหารเพื่อถนอมอาหารบางชนิด เช่น ไนเตรต มีผลข้างเคียงทำให้เป็นมะเร็งได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541) และวิธีการถนอมอาหารที่กล่าวมาแล้วนั้นต้องเสียต้นทุนสูง จากสาเหตุเหล่านี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาวิธีการถนอมอาหารแบบใหม่ จึงทำให้เกิดการค้นพบสารต้านจุลินทรีย์จำพวกเพปไทด์ที่สร้างมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก ภายหลังให้ชื่อสารนี้ว่า แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่ามาใช้ในการถนอมอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีความปลอดภัยสามารถถูกย่อยได้อย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Chen และ Hoover, 2003) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด การใช้สารแบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารจะเป็นการใช้ในรูปสารบริสุทธิ์ สารกึ่งบริสุทธิ์ หรือหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักเพื่อให้ผลิตสารแบคเทอริโอซิน (Cintas และคณะ, 2001)

#### 2.1 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นเพปไทด์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ไวต่อสารนี้ แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมลบ คือ โคลิซิน (colicin) ที่ผลิตจาก *Escherichia coli* ซึ่งโคลิซินนี้มีผลยับยั้งแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้าง (Oscariz และ Pisabarro, 2001) แบคเทอริโอซินมีสมบัติคล้ายกับสารปฏิชีวนะ (antibiotic) แต่ก็มีความแตกต่างของสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย โดยแบคเทอริโอซินจะมีขอบเขตการยับยั้งที่แคบและยับยั้งได้ในกลุ่มสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันเท่านั้น ดังนั้นแบคเทอริโอซินจึงนิยมใช้ใน

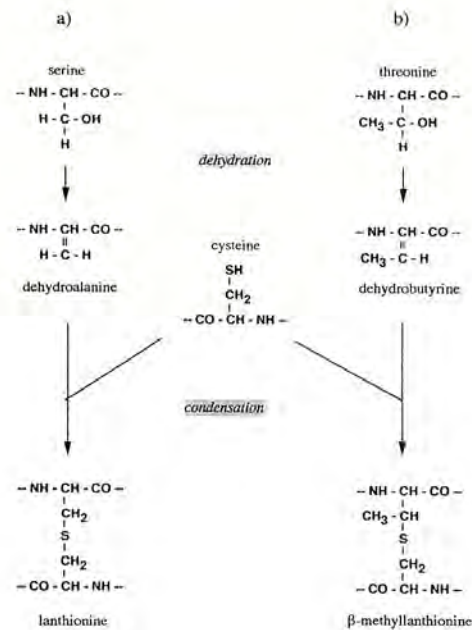
อุตสาหกรรมอาหารเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่เรียกทำให้เกิดการเน่าเสีย ในขณะที่สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะใช้เพื่อยับยั้งหรือรักษาโรคติดเชื้อ (Cintas และคณะ, 2001)

### 2.1.1 การจำแนกประเภทของแบคทีเรียโอสิน (Chen and Hoover, 2003)

สามารถแบ่งชนิดของแบคทีเรียโอสินตามน้ำหนักโมเลกุล และโครงสร้างทางกายภาพ และทางเคมี ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

#### (1) แลนทิไบโอติก (Lantibiotics)

แบคทีเรียโอสินกลุ่มนี้เป็นสายเพปไทด์สายสั้น ๆ ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 19-50 หมู่ มีสมบัติทนความร้อนและมีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงเป็นองค์ประกอบ เช่น แลนโธนิน (lanthionine) บีตาเมทิลแลนโธนิน ( $\beta$ -methyl-lanthionine) ดีไฮโดรบิวทิวรีน (dehydrobutyrine, Dhb) และ ดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine, Dha) ดังนั้นแบคทีเรียโอสินกลุ่มนี้จึงต้องมีกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสเพื่อให้ได้กรดอะมิโนที่สามารถใช้งานได้ ปฏิริยาเคมีของการดัดแปลงนี้เกี่ยวข้องกับการกำจัดน้ำ (dehydration) ที่ปลายเซรีน (serine) และทรีโอนีน (threonine) ได้เป็น Dha และ Dhb ตามลำดับ หลังจากนั้นหมู่ซัลไฟไฮดริล (sulphydryl) ของปลายซิสเตอีน (cysteine) จะเกิดปฏิกิริยากับ Dha และ Dhb สร้างเป็นสะพานซัลไฟด์ของแลนโธนิน (Ala-s-Ala) หรือวงแหวนเมทิลแลนโธนิน (Ala-s-Aba) (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 ปฏิริยาเคมีของการดัดแปลงกรดอะมิโนของโอสิน (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์เหล่านี้มักจะอยู่บริเวณใกล้เคียงกับยีนโครงสร้าง (structural gene) นอกจากนี้เมื่อมีการขนส่งแบคทีเรียโอสตินชนิดนี้ด้วยวิธี ABC transport system ออกนอกเซลล์จะมีการกำจัดเพปไทด์สายนำด้วยเอนไซม์โปรตีเอส

ภายในกลุ่มแลคโตบาโอติกก็มีความแตกต่างทางโครงสร้างและกลไกในการยับยั้งทำให้แยกแลคโตบาโอติกได้อีกเป็น 2 กลุ่ม คือ

(1.1) แลคโตบาโอติกที่มีโครงสร้างสายเพปไทด์เป็นเส้นตรง มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีประจุบวก มีกลไกในการยับยั้งโดยการทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย แลคโตบาโอติกกลุ่มนี้ที่ค้นพบครั้งแรก คือ ไนซิน (nisin) ซึ่งปัจจุบันมีความสำคัญในแง่ของการเป็นสารถนอมในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด

(1.2) แลคโตบาโอติกที่มีโครงสร้างสายเพปไทด์เป็นรูปร่างกลม (globular) ไม่มีประจุหรือมีประจุลบ กลไกการยับยั้งเกี่ยวข้องกับการยับยั้งเอนไซม์ที่มีความจำเพาะ และมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียค่อนข้างหลายชนิดทำให้เป็นที่สนใจได้ในอนาคตซึ่งอาจเป็นสารต้านจุลชีพที่เป็นจุดเด่นของแบคทีเรียแลคติกที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร

(2) แบคทีเรียโอสตินที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและทนต่อความร้อน

กลุ่มนี้เป็นสายเพปไทด์ที่ไม่มีการดัดแปลง มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 10 กิโลดาลตัน และทนความร้อนได้ 60-100 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที แบคทีเรียโอสตินกลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยได้แก่

(2.1) แบคทีเรียโอสตินที่มีสมบัติเหมือนเพดิโอสติน (pediocin-like peptide)

(2.2) แบคทีเรียโอสตินที่ประกอบด้วยเพปไทด์ที่แตกต่างกัน 2 ส่วน ซึ่งแบคทีเรียโอสตินกลุ่มนี้จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อเพปไทด์ทั้ง 2 ส่วนนี้ทำงานร่วมกัน

(2.3) แบคทีเรียโอสตินที่ต้องการโปรตีน sec ในการส่งแบคทีเรียโอสตินชนิดนี้ออกนอกเซลล์แบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอสติน

นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียโอสตินใหม่อีก 2 กลุ่มที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและทนต่อความร้อน กลุ่มแรกเป็นแบคทีเรียโอสตินที่ประกอบด้วยซิสเตอีนหนึ่งหรือสองชิ้นส่วน คือ ไธออลบาโอติก (thiolbiotics) และซิสติบาโอติก (cystibiotics) ตามลำดับ แบคทีเรียโอสตินในกลุ่มนี้ได้แก่ แลคโตคอคซิน เอ (lactococcin A) และอีกกลุ่มคือแบคทีเรียโอสตินที่ไม่มีส่วนประกอบของซิสเตอีนได้แก่ แลคโตคอคซิน บี (lactococcin B) (Oscariz และ Pisabarro, 2001)

(3) แบคทีเรียโอสตินที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่แต่ไม่ทนต่อความร้อน

แบคทีเรียโอสตินกลุ่มนี้เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน สูญเสียประสิทธิภาพการทำงานเมื่อถูกความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่านั้น

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างแบคทีเรียโอสตินในกลุ่มต่าง ๆ (Chen และ Hoover, 2003)

แบคทีเรียโอสติน	จุลินทรีย์ที่สร้าง
<b>กลุ่ม 1 (แลนติไบโอติก)</b> 1.1 แลนติไบโอติกที่มีโครงสร้างสายเพปไทด์เป็นเส้นตรง ไนซิน (nisin) แลคโตซิน เอส (lactocin S) อีพิเดอร์มิน (epidermin) กอลลิเดอร์มิน (gallidermin) แลคทีซิน 481 (lactacin 481) 1.2 แลนติไบโอติกที่มีโครงสร้างสายเพปไทด์เป็นรูปร่างกลม เมอร์ซาซิดิน (mersacidin) ซินนามัยซิน (cinnamycin) แอนโคเวนนิน (ancovenin) ดูรามัยซิน (duramycin) แอคตาการ์ดิน (actagardin)	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus gallinarum</i> <i>Lactococcus lactis</i>  <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces cinnamoneus</i> <i>Streptomyces</i> sp. <i>Streptomyces cinnamoneus</i> <i>Actinoplanes</i> sp.



ตารางที่ 2.1(ต่อ) ตัวอย่างแบคทีเรียโอสลินในกลุ่มต่าง ๆ (Chen และ Hoover, 2003)

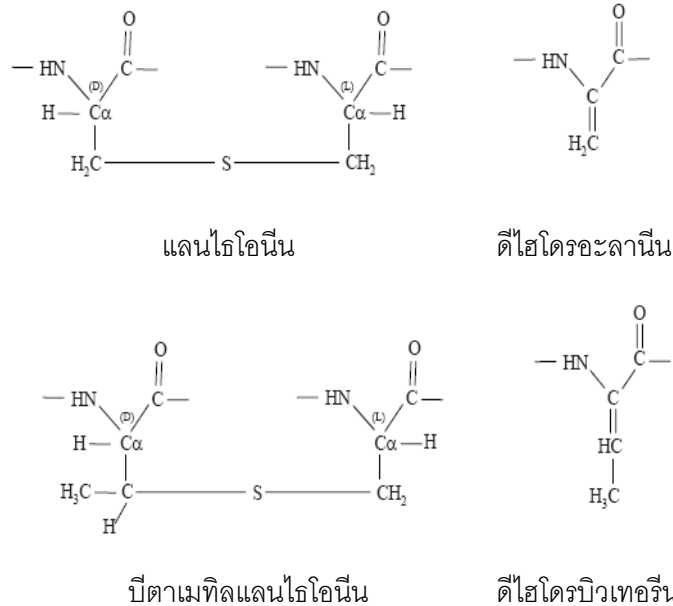
แบคทีเรียโอสลิน	จุลินทรีย์ที่สร้าง
<p><b>กลุ่ม 2 (โมเลกุลขนาดเล็กทนความร้อน)</b></p> <p>2.1 แบคทีเรียโอสลินที่มีสมบัติเหมือนเพดิโอสลิน</p> <p>เพดิโอสลิน PA-1 (pediocin PA-1)</p> <p>ซาคาซิน A (sakacin A)</p> <p>ซาคาซิน P</p> <p>ลิวโคซิน A-UAL 187 (leucocin A-UAL 187)</p> <p>มีเซนเทอริซิน Y105 (mesentericin Y105)</p> <p>เอนเทอโรซิน A (enterocin A)</p> <p>ไดเวอร์ซิน V41 (divercin V41)</p> <p>แลคโตคอกซิน MMFII (lactococcin MMFII)</p> <p>2.2 แบคทีเรียโอสลินที่ประกอบด้วยเพปไทด์ที่แตกต่างกัน 2 ส่วน</p> <p>แลคโตคอกซิน G (lactococcin G)</p> <p>แลคโตคอกซิน M (lactococcin M)</p> <p>แลคตาซิน F (lactacin F)</p> <p>แพลนทาริซิน A (plantaricin A)</p> <p>แพลนทาริซิน EF (plantaricin EF)</p> <p>แพลนทาริซิน JK (plantaricin JK)</p> <p>2.3 แบคทีเรียโอสลินที่ต้องการโปรตีน sec ในการสัง แบคทีเรียโอสลินชนิดนี้ออกนอกเซลล์</p> <p>อะซิโดซิน B (acidocin B)</p> <p>คาร์โนแบคทีเรียโอสลิน (carnobacteriocin)</p> <p>ไดเวอร์จิซิน A (divergicin A)</p> <p>เอนเทอโรซิน P (enterocin P)</p> <p>เอนเทอโรซิน B (enterocin B)</p>	<p><i>Pediococcus acidilactici</i></p> <p><i>Lactobacillus. sakei</i></p> <p><i>Lactobacillus. sakei</i></p> <p><i>Leuconostoc gelidum</i></p> <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i></p> <p><i>Enterococcus faecium</i></p> <p><i>Carnobacterium divergens</i></p> <p><i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>Lactobacillus johnsonii</i></p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p> <p><i>Lactobacillus. plantarum</i></p> <p><i>Lactobacillus. plantarum</i></p> <p><i>Lactobacillus acidophilus</i></p> <p><i>Carnobacterium piscicola</i></p> <p><i>Carnobacterium divergens</i></p> <p><i>Escherichia faecium</i></p> <p><i>Escherichia faecium</i></p>

<p>กลุ่ม 3 (โมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ทนความร้อน)</p> <p>เฮลเวตีซิน J (helveticin J)</p> <p>เฮลเวตีซิน V-1829 (helveticin V-1829)</p>	<p><i>Lactobacillus helveticus</i></p> <p><i>Lactobacillus helveticus</i></p>
---	---

## 2.2 ไนซิน

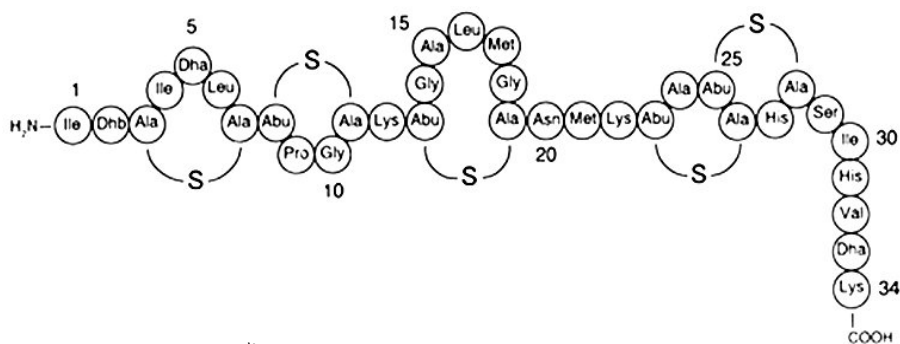
ไนซินเป็นแบคทีเรียโอสตินชนิดหนึ่งซึ่งรู้จักมากกว่า 50 ปี ไนซินถูกค้นพบครั้งแรกโดย Rogers และคณะ ในปี ค.ศ.1928 โดยพบว่าแบคทีเรียที่เรียในกลุ่ม *Lactococcus* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น ๆ หลังจากนั้นได้มีการศึกษาโดย Whitehead และคณะในปี ค.ศ. 1933 พบว่านมที่เก็บไว้เพื่อเตรียมเป็นเนยแข็งจะเป็นกรดซ้ำ โดยพบว่าสาเหตุที่เกิดการเป็นกรดซ้ำก็เนื่องมาจากหัวเชื้อที่เดิมลงไปเพื่อใช้ในการเตรียมเนยแข็งสร้างสารบางอย่างที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างกรด จากนั้นได้ทำการทดลองแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจากนมและพบว่าสารนั้นมีสมบัติเป็นโปรตีน ต่อมาในปี ค.ศ.1943 Shattock และ Mattick ได้ศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus* ที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้ โดยพบว่ามันแอนติเจนที่ผิวเซลล์สามารถทำปฏิกิริยาแล้วเกิดการตกตะกอนกับแอนติซีรัมในกลุ่ม N จึงจัดแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ตามลักษณะทางเซรุ่มวิทยาในกลุ่ม N เช่นเดียวกับ *Lactococcus cremoris* *Lactococcus diacetylactis* *Lactobacillus hordniae* และ *L. xylosus* ซึ่งแบคทีเรีย *Lactococcus* สายพันธุ์นี้มีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด จึงให้เรียกสารต้านแบคทีเรียนี้ว่า ไนซิน (nisin) ซึ่งมาจากคำว่า “Group N Inhibitory Substance” (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ไนซินเป็นสารต้านจุลชีพชนิดเพปไทด์ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* เนื่องจากไนซินมีส่วนประกอบของแลนโทโอนิน จึงจัดไนซินอยู่ในกลุ่มแลนติไบโอติก โครงสร้างของไนซิน ประกอบด้วยกลุ่มกรดอะมิโนที่ไม่พบในธรรมชาติ ได้แก่ ดีไฮโดรอะลานีน (Dha), ดีไฮโดริวูเทอรีน (Dhb), แลนโทโอนิน และบีตาเมทิลแลนโทโอนิน (รูปที่ 2.2) (De Vuyst and Vandamme, 1994)



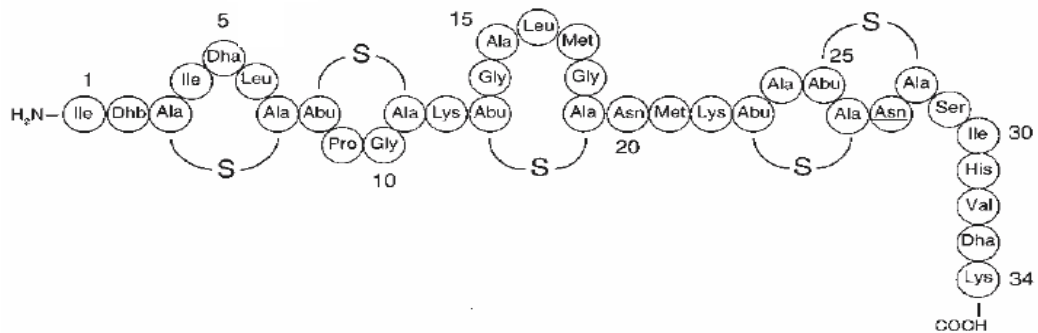
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของดีไฮโดรอะลานีน(Dha), ดีไฮโดรบีวเทอริน (Dhb), แลนไธโอนีน และปีตาเมทิลแลนไธโอนีน (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ไนซินสามารถแบ่งออกได้เป็นสามชนิดโดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโน ได้แก่ ไนซิน A ไนซิน Z และ ไนซิน Q โดยไนซิน A เป็นไนซินชนิดแรกที่ถูกค้นพบ ซึ่งแยกได้จาก *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* NCFB 49, *Lactobacillus lactis* ssp *lactis* ATCC 11454 และ *Lactobacillus lactis* ssp *lactis* BB24 ไนซิน A มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 3.35 กิโลดาลตัน (De Vuyst and Vandamme, 1994) ลำดับกรดอะมิโนของไนซิน A เป็นดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 2.3



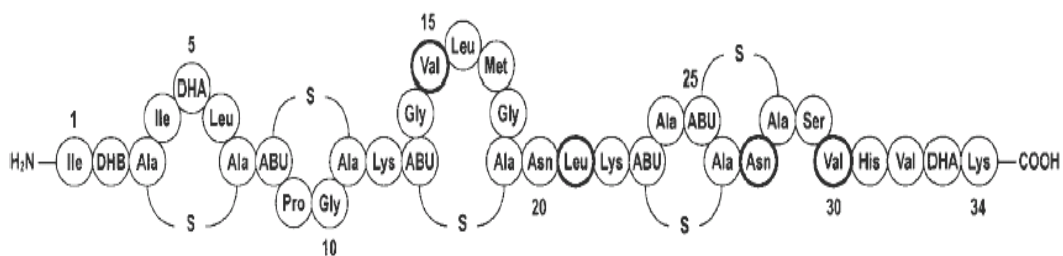
รูปที่ 2.3 ลำดับกรดอะมิโนของไนซิน A จาก *Lactobacillus lactis* ssp *lactis* (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ต่อมาในปีค.ศ.1991 ได้มีการค้นพบโนซินที่มีความแตกต่างจากโนซิน A โดยมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 เป็นแอสพาราจีน ซึ่งต่างจากโนซิน A ที่เป็นฮิสติดีนและเรียกโนซินชนิดนี้ว่าโนซิน Z ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งแยกได้จาก *Lactobacillus lactis* ssp *lactis* NIZO 22186, *Lactobacillus lactis* ssp *lactis* N8, *Lactobacillus lactis* ssp *lactis* SIK-83 และ *Lactobacillus lactis* ssp *lactis* สายพันธุ์อื่นๆ โนซิน Z มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 3.33 กิโลดาลตัน โดยมีสมบัติการละลายที่ค่าความเป็นกรด-เบสเป็นกลางได้ดีกว่าโนซิน A ทั้งโนซิน A และโนซิน Z มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิดเหมือนกัน เช่น กลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารและแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ (De Vuyst และ Vandamme, 1994)



รูปที่ 2.4 ลำดับกรดอะมิโนของโนซิน Z (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

ในปี ค.ศ. 2003 Zendo และคณะ ได้ค้นพบโนซิน Q ซึ่งเป็นโนซินชนิดใหม่ที่มีกรดอะมิโนแตกต่างจากโนซิน A โดยในส่วนของเพปไทด์สายหลักมีกรดอะมิโนแตกต่างจากโนซิน A 4 หมู่ ได้แก่ กรดอะมิโนวาเลอีนในตำแหน่งที่ 15 กรดอะมิโนลิซีนในตำแหน่งที่ 21 กรดอะมิโนแอสพาราจีนในตำแหน่งที่ 27 และกรดอะมิโนวาเลอีนในตำแหน่งที่ 30 และในส่วนของเพปไทด์สายนำโมเลกุลของโนซินก่อนการดัดแปลงจะมีกรดอะมิโนแตกต่างจากโนซิน A 2 ตัว ได้แก่ ทริปโตเฟนและไทโรซีน โนซิน Q สังเคราะห์จาก *Lactobacillus lactis* สายพันธุ์ 61-14 ซึ่งแยกจากแม่น้ำในประเทศญี่ปุ่น ขนาดมวลโมเลกุลของโนซิน Q เท่ากับ 3.32 กิโลดาลตัน และมีลำดับกรดอะมิโนดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลำดับกรดอะมิโนของไนซิน Q (Zendo และคณะ, 2003)

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียที่สามารถผลิตไนซินได้

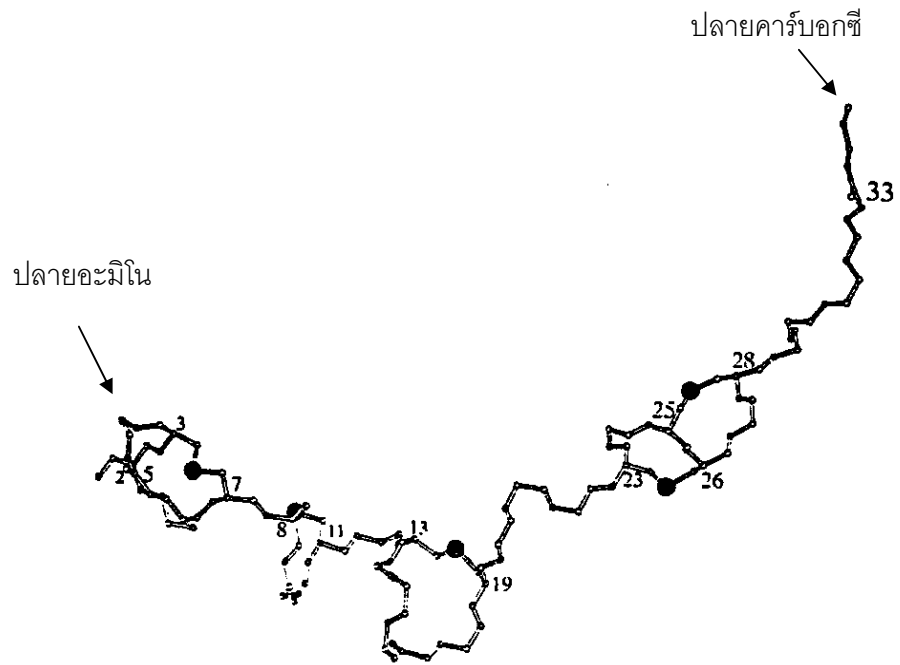
แบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างไนซิน	ชนิดของไนซิน	อ้างอิง
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> INRA 415	ไนซิน A	Garde และคณะ, 2000
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> ITAL 383	ไนซิน A	Moreno และคณะ, 2000
<i>Lactococcus lactis</i> BB24	ไนซิน A	Rodriguez และคณะ, 1995
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> ATCC 11454	ไนซิน A	De Vuyst และคณะ, 1994
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> NCFB 49	ไนซิน A	De Vuyst และคณะ, 1994
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> MF2	ไนซิน A	Kaewsarmsri, 2007
<i>Lactococcus lactis</i> BFE 1500	ไนซิน Z	Olasupo และคณะ, 1999
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> WNC 20	ไนซิน Z	Noopakdee และคณะ, 2002
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> A164	ไนซิน Z	Choi และคณะ, 2000
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> HPB 1688	ไนซิน Z	Cai และคณะ, 1997
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> NIZO 22186	ไนซิน Z	De Vuyst และคณะ, 1994
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> N8	ไนซิน Z	De Vuyst และคณะ, 1994
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> NCFB 894	ไนซิน Z	De Vuyst และคณะ, 1994
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> LDV 22186	ไนซิน Z	De Vuyst และคณะ, 1994
<i>Lactococcus lactis</i> 61-14	ไนซิน Q	Zendo และคณะ, 2003

### 2.3 สมบัติทางกายภาพและเคมีของไนซิน

โครงสร้างปฐมภูมิของไนซินได้ถูกนำเสนอขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Gross และคณะ ในปี ค.ศ. 1971 ไนซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 หมู่ โดยมีไอโซลิวซีนที่ปลายอะมิโน (N-terminal) และไลซีนที่ปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ไนซินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงแอลฟา, ปีตาแบบไม่อิ่มตัว ( $\square$ ,  $\square$  unsaturated) ได้แก่ ดีไฮโดรอะลานีน (Dha) (ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 5 และ 33) ดีไฮโดรบีวทีรีน (Dhb) (ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 2) และมีกรดอะมิโนที่สร้างพันธะไธโออีเทอร์ (thioether linkage) ได้แก่ แลนไทโอนีน (Lan, Ala-s-Ala) (ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 3-7) และ ปีตา-เมทิลแลนไทโอนีน (Ala-s-Aba; Aba, กรดอะมิโนบีวทีรีน) (ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 8-11, 13-19, 23-26 และ 25-28) ดังนั้นโมเลกุลไนซินจึงประกอบด้วยกรดอะมิโนแอลฟา, ปีตาแบบไม่อิ่มตัว ( $\square$ ,  $\square$  unsaturated) 3 หมู่ และวงแหวนซัลเฟอร์ระหว่างโมเลกุล (intramolecular sulfur ring) 5 วง ซึ่งถูกสร้างโดยปลายแลนไทโอนีน 1 วง (ring a) ปลายปีตา-เมทิลแลนไทโอนีน 4 วง (ring b, c, d, e)

นอกจากนี้กรดอะมิโนที่สร้างพันธะไธโออีเทอร์ (thioether linkage) ยังเกิดเป็นโครงแบบ มีโซ (meso-configuration) ส่วนแอลฟาคาร์บอนของปลายอะมิโน (N-terminal) ของ แลนไทโอนีนและปีตา-เมทิลแลนไทโอนีนมีโครงแบบ D (D-configuration) ขณะที่ปีตาคาร์บอนมี โครงแบบ L (L-configuration) เนื่องจากผลการเปลี่ยนแปลงสเตอริโอเคมีของการเติมหมู่ ซัลฟ์ ไฮไดรลในปฏิกิริยาการดัดแปลงหลังการแปลรหัส โครงสร้างที่สมบูรณ์นี้ส่งผลต่อสมบัติของ ไนซิน เช่น การทนต่อกรดและความร้อน (เป็นผลมาจากการเชื่อมกันของพันธะไธโออีเทอร์ที่เสถียรมาก) ต่อมาในปี ค.ศ. 1991 ได้มีผู้พบการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนของไนซินซึ่งสกัดได้จาก *Lactococcus lactis* ssp *lactis* NIZO 22186 จากกรดอะมิโนฮิสติดีนไปเป็นแอสพาราจีนที่ ตำแหน่ง 27 โดยที่ยังมีสมบัติเหมือนเดิม จึงได้ให้ชื่อไนซินที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็นฮิสติดีนว่า ไนซิน A ส่วนไนซินที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็นแอสพาราจีนว่าไนซิน Z เมื่อทราบลำดับกรดอะมิโนทำให้ทราบว่าไนซินมีสมบัติเป็นทั้งโมเลกุลที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (amphiphilic) (รูปที่ 2.7) คือ ที่ ปลายอะมิโน (N-terminal) จะมีกลุ่มของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และกรดอะมิโน 4 หมู่ที่ปลายคาร์บอกซี (C-terminal) จะมีสมบัติเป็นโมเลกุลที่ชอบน้ำ (Liu และ Hansen., 1990) โดยโมเลกุลของไนซินจะมีกรดอะมิโน ฮิสติดีน 2 หมู่ ไลซีน 3 หมู่ ไอโซลิวซีน 1 หมู่ที่ปลายอะมิโน และ ไลซีน 1 หมู่ที่ปลายคาร์บอกซี ซึ่งแสดงค่า pKa ที่ 6.0, 10.53, 9.68 และ 2.18 ตามลำดับ (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

Van de ven และคณะ (1991) ได้เสนอโครงสร้างแบบสามมิติของไนซิน A เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1991 จากการศึกษาคอนฟอร์เมชันสามมิติด้วยเครื่อง NMR พบว่าโครงสร้างของไนซินมีความยืดหยุ่นสูงและประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงแหวน 5 วง (รูปที่ 2.6)

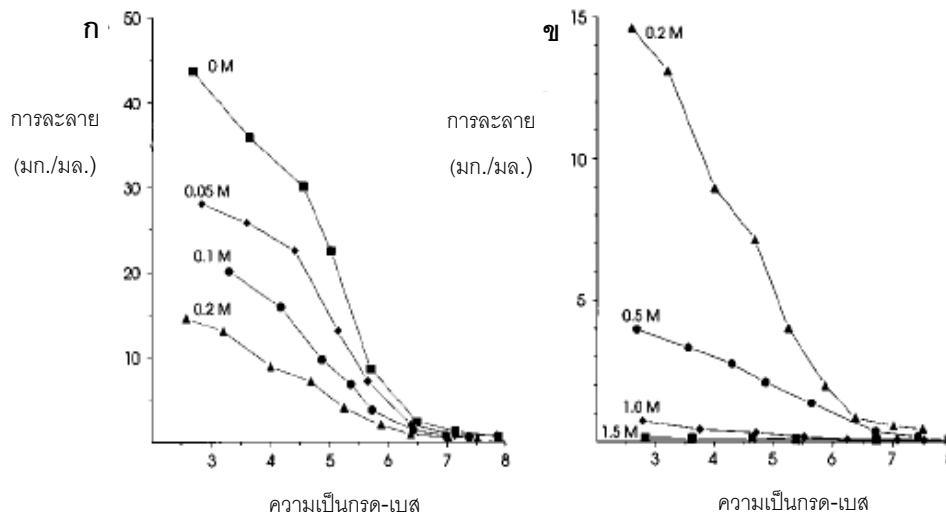


รูปที่ 2.6 โครงสร้าง 3 มิติของไนซิน A (ตัวเลขที่แสดงคือตำแหน่งกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลง)  
(Van de ven และคณะ, 1996)



รูปที่ 2.7 ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) (สีเข้ม) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (สีจาง) ของโมเลกุลไนซิน A (Van de ven และคณะ, 1991)

Rollema และคณะ (1995) พบว่าความสามารถในการละลายของไนซินจะขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือ (ionic strength) ของสารละลาย ซึ่งจากผลการทดลองค่าความเป็นกรด-เบสที่เพิ่มขึ้นจาก 3 ถึง 8 ในแต่ละความเข้มข้นเกลือที่ 0.01-0.5 โมลาร์ จะทำให้ไนซินละลายได้น้อยลง โดยไนซินจะละลายได้มากที่สุดประมาณ 45 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายเกลือไฮเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นประมาณ 0.01 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 3 และเมื่อค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายนี้เพิ่มขึ้นจาก 3 เป็น 8 ไนซินจะมีการละลายลดลงประมาณ 10 เท่า ขณะที่ความเข้มข้นเกลือมากกว่า 1.0 โมลาร์ ผลของการละลายไนซินจะไม่ขึ้นกับค่าความเป็นกรด-เบสที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นเกลือนี้ไนซินจะละลายได้น้อยกว่า 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 2.8)

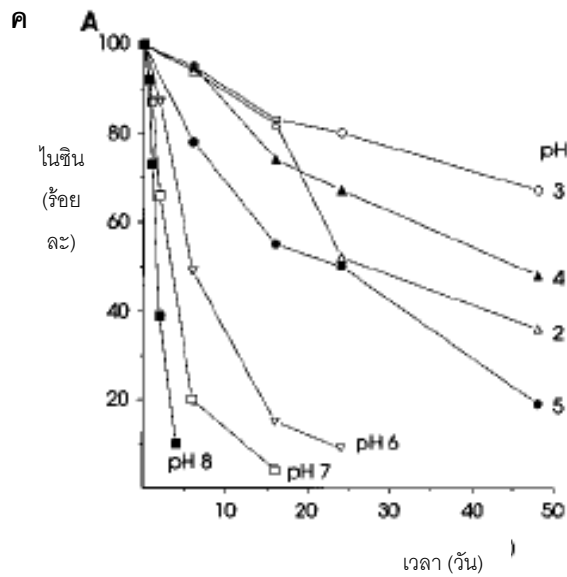
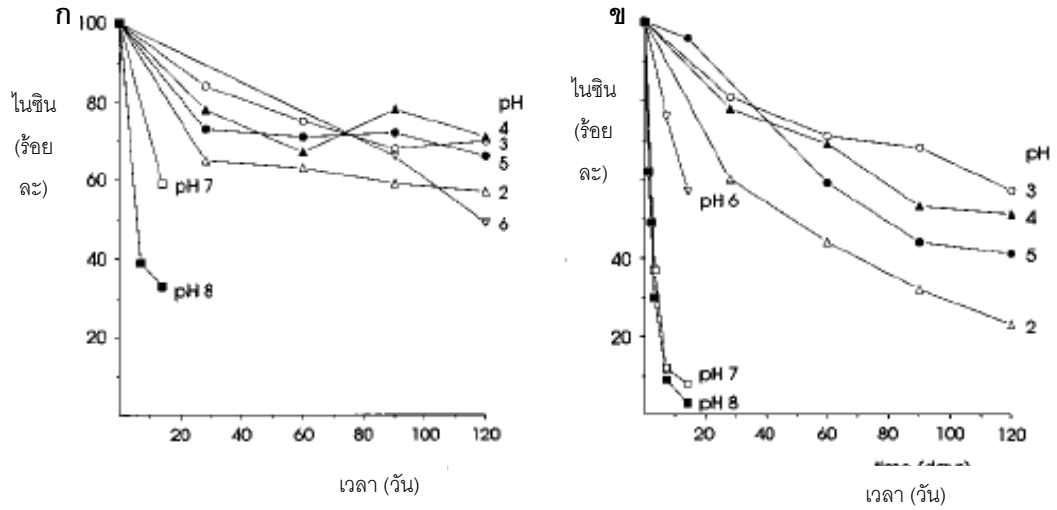


รูปที่ 2.8 ความสามารถในการละลายของไนซินที่ความเป็นกรด-เบส 3 ถึง 8 ในสารละลายเกลือเข้มข้น ก. 0-0.2 โมลาร์ และ ข. 0.2-1.5 โมลาร์ (Rollema และคณะ, 1995)

Rollema และคณะ (1995) ยังได้ทำการทดลองผลของความเป็นกรด-เบสที่ค่า 2 ถึง 8 ต่อความเสถียรของโมเลกุลไนซินที่อุณหภูมิ 20, 37 และ 75 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ไนซินจะมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-เบส 3, 4 และ 5 ใกล้เคียงกัน และที่ค่าความเป็นกรด-เบส 2 และ 6 ไนซินจะมีความเสถียรลดลงเล็กน้อย ขณะที่ค่าความเป็นกรด-เบส 7 และ 8 ความเสถียรของโมเลกุลไนซินจะลดลงอย่างรวดเร็ว และที่อุณหภูมิ 37 และ 75 องศาเซลเซียส ไนซินจะมีความเสถียรมากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส 3 ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-เบส 2, 4 และ 5 ไนซินจะมีความเสถียรลดลงมากกว่าร้อยละ 40-80 และที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6, 7 และ 8 ไนซิน



จะมีความเสถียรลดลงมากกว่าร้อยละ 80 (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 ความเสถียรของโมเลกุลโนซินที่อุณหภูมิ ก. 20 องศาเซลเซียส ข. 37 องศาเซลเซียส และ ค. อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส 2 ถึง 8 (Rollema และคณะ, 1995)

นอกจากนี้ไนซินยังถูกทำให้เสียสภาพไปได้ด้วยเอนไซม์แอลฟา-ไคโมทริปซิน ( $\alpha$ -chymotrypsin) และ โปรตีเนสเค (proteinase-K) แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยคาร์บอกซีเพปติเดส (carboxypeptidase) อีลาสเทส (elastase) เพปซิน (pepsin) และทริปซิน (trypsin) ในบางภาวะพบว่าแบคทีเรียที่สามารถทนต่อไนซินได้ โดยการสร้างไนซินเนส (nisinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไนซินได้ เช่น *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, *Leuconostoc* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus polymyxa* และ *Bacillus cereus* (De Vuyst and Vandamme, 1994)

## 2.4 ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน

ไนซินมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด (ตารางที่ 2.3) โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกทั้งที่สร้างสปอร์ได้ และไม่สร้างสปอร์ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* และ *Listeria* โดยเฉพาะ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารซึ่งพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและควบคุมยาก สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์พบว่าไนซินมีฤทธิ์ป้องกันการสร้างสปอร์ใน *Clostridia* และ *Bacilli* เป็นต้น (Chen และ Hoover, 2003) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ รา ยีสต์ และไวรัสไม่สามารถถูกยับยั้งด้วยไนซิน อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานว่ายีสต์ และรา ถูกยับยั้งแบบไม่จำเพาะเมื่อใช้ในไนซินที่ความเข้มข้นสูง (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ไนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ในไนซินร่วมกับสารคีเลต สารเคมี และสารถนอมอาหารจากธรรมชาติชนิดอื่น เช่น EDTA ไลโซไซม์ (lysozyme) โซเดียมซิเตรต (sodium citrate) และ ซินนามอน (cinnamon) เป็นต้น เพื่อช่วยในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Delves-broughton J. 1993, Branen และคณะ, 2003, Long และคณะ, 2003, Yuste และคณะ, 2004)

ตารางที่ 2.3 แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ด้วยไนซิน

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<b>แบคทีเรียแกรมบวก</b>	
<i>Carnobacterium divergens</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Lactobacillus casei</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Lactobacillus sakei</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Lactobacillus brevis</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Leuconostoc cremoris</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Listeria monocytogenes</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Listeria innocua</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Listeria murrayi</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Bacillus subtilis</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Bacillus cereus</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Micrococcus luteus</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Clostridium butyricum</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Clostridium perfringens</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cintas และคณะ, 2001
<i>Oenococcus oeni</i>	Beatriz และคณะ, 2007
<i>Broxchotrix thermospacta</i>	Tjakko และคณะ, 1995
<b>แบคทีเรียแกรมลบ (เมื่อใช้ร่วมกับสารเสริมฤทธิ์)</b>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Branen และคณะ, 2003
<i>Escherichia. coli</i> O157:H7	Yuste และคณะ, 2004
<i>Salmonella typhimurium</i>	Yuste และคณะ, 2004
<i>Arcobacter butzleri</i>	Long และคณะ, 2003

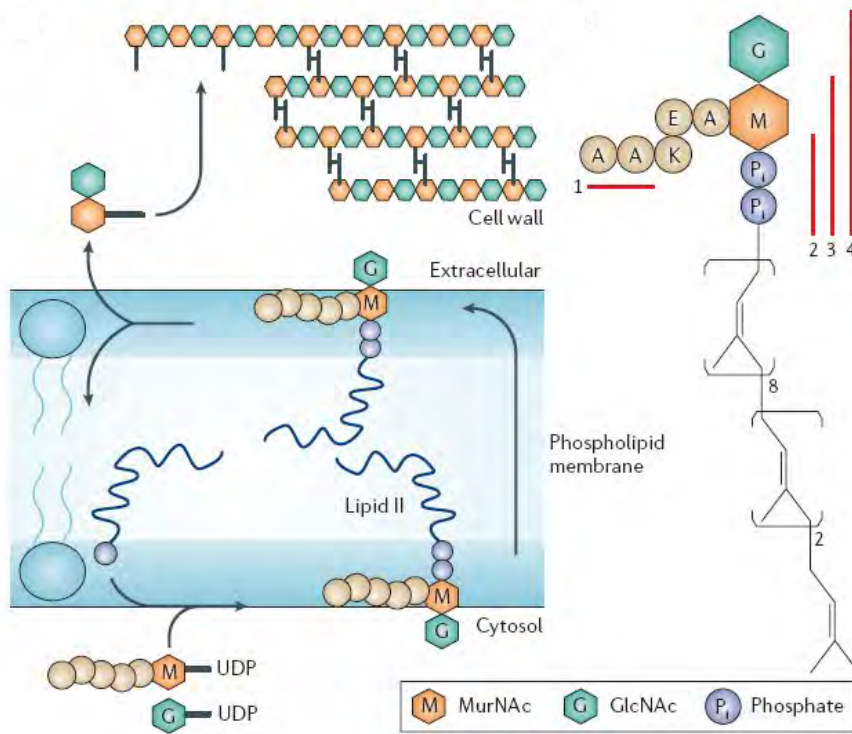
ตารางที่ 2.3 เชื้อแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ด้วยไนซิน (ต่อ)

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<b>สปอร์ทนร้อนของแบคทีเรีย</b>	
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Delves และคณะ, 1996
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Delves และคณะ, 1996

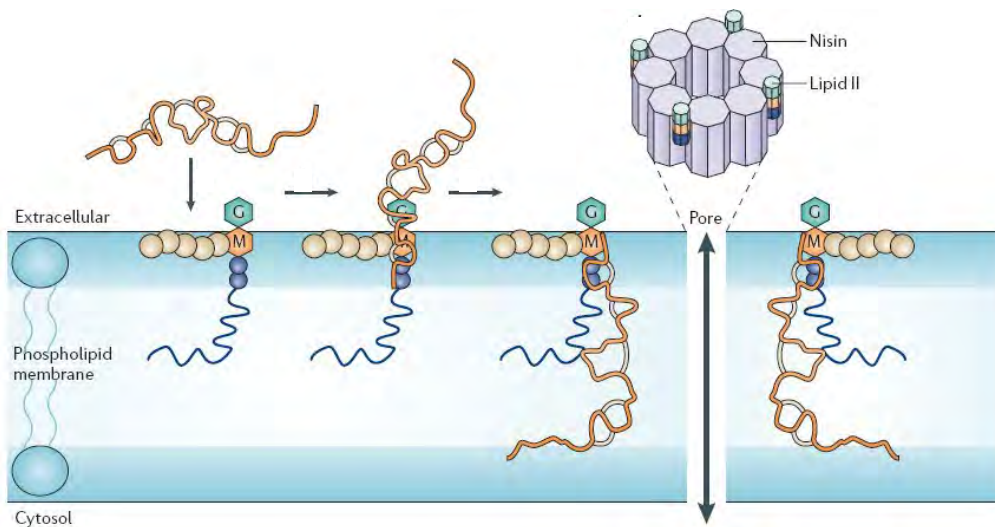
## 2.5 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน

กลไกในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินมีเป้าหมายอยู่ที่การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีอยู่ 2 กลไกด้วยกัน กลไกแรกจะคล้ายกับสารเคมีพวกดีเทอร์เจนต์ คือ ไนซินจะใช้ส่วนที่ชอบน้ำหรือประจุบวกที่บริเวณปลายอะมิโน (N-terminal) ทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นประจุลบที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดช่องผ่านเข้า-ออกของสารบริเวณที่มีประจุลบ เช่น กรดไทโคอิก (teichoic acid) กรดไลโปไทโคอิก (lipoteichoic acid) และฟอสโฟลิพิด (phospholipids) เป็นผลให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้อุณหภูมิเสถียรภาพบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์สารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น โปแทสเซียม, โปรตอน, กรดอะมิโน, นิวคลีโอไทด์ จึงรั่วออกมานอกเซลล์ และสูญเสียความต่างศักย์บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ไม่สามารถสร้างพลังงานได้ ในที่สุดกระบวนการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลต่างๆ ก็จะหยุด เป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย (Van Hensden และคณะ, 1998)

สำหรับกลไกที่สองนั้นนอกจากไนซินจะทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกับกลไกแรกแล้วนั้น ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้อีกด้วย เนื่องจากไนซินจะจับกับลิพิด II คอมเพลกซ์ (Lipid II-complex) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่จะนำเพปทิโดไกลแคนซัพยูนิตไปสังเคราะห์เป็นผนังเซลล์ (รูปที่ 2.10) จากรูปที่ 2.11 โมเลกุลไนซินจะเข้ามาใกล้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นจะใช้ส่วนปลายอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงจับกับ ลิพิด II คอมเพลกซ์ (Lipid II - complex) แล้วแทรกตัวลงไปเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไนซิน 2 โมเลกุลจะจับกับ ลิพิด II คอมเพลกซ์ (Lipid II - complex) 1 โมเลกุล ทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์และไม่สามารถนำหน่วยย่อยของเพปทิโดไกลแคนไปสังเคราะห์เป็นผนังเซลล์ได้ (Wiedemann และคณะ, 2001) สำหรับกลไกยับยั้งการสร้างสปอร์นั้น ไนซินจะไปเปลี่ยนแปลงหมู่ซัลไฟด์ไรล (sulfhydryl groups) ของโปรตีนที่อยู่ในส่วนประกอบของเยื่อหุ้มสปอร์ซึ่งจะอยู่ในระยะที่จะเกิดการงอกของสปอร์ทำให้ไม่สามารถเกิดเป็นสปอร์ที่สมบูรณ์ได้ (De Vuyst และ Vandamme, 1994)



รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Breukink และ Kruijff, 2004)



รูปที่ 2.11 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินโดยการจับกับลิพิด II คอมเพลกซ์ (Breukink และ Kruijff, 2004)

## 2.6 ประโยชน์ของไนซิน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ไนซินเป็นสารต้านจุลินทรีย์ชนิดแรกที่ใช้เป็นสารถนอมอาหาร โดยถูกใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1950 โดยเติมลงไปในการหมักเพื่อป้องกันการเน่าเสียที่เกิดจาก *Clostridium butyricum* ปัจจุบันได้มีการนำไนซินมาใช้เป็นสารถนอมอาหารอย่างแพร่หลาย เนื่องจากไนซินมีสมบัติที่น่าสนใจ ได้แก่

- 1) จัดอยู่ในบัญชีสารที่ทราบความปลอดภัย (Generally recognized as safe substances)
- 2) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอตและถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในน้ำย่อยอาหาร
- 3) สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้กว้าง โดยเฉพาะที่เป็นสาเหตุก่อโรคที่ปนเปื้อนมาในอาหาร
- 4) ทนความร้อนได้ดี

จากสมบัติที่กล่าวมาข้างต้น ไนซินจึงถูกนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารเพื่อ

- 1) เก็บรักษาและยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหาร
- 2) ลดปัญหาการก่อโรคจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร
- 3) คงคุณค่าและรสชาติของอาหารไม่ให้เกิดเสียหายเนื่องจากกระบวนการถนอมอาหารด้วยความร้อน
- 4) หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีอันตรายเป็นสารถนอมอาหาร

โดยประเภทของอาหารที่นิยมใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารได้แก่ นมพาสเจอร์ไรซ์ ซีส อาหารกระป๋อง เนื้อ ไข่กรอก อาหารทะเล ผัก และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น (ตารางที่ 2.4) ซึ่งลักษณะการประยุกต์ใช้ไนซินในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จะเป็นการเติมผงไนซินที่ถูกทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อผู้ผลิตเป็นส่วนผสมของอาหาร ในปริมาณที่กฎหมายในแต่ละประเทศกำหนด โดยปัจจุบันได้ใช้ไนซินเป็นสารเติมแต่งอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก (ตารางที่ 2.5) และยังมีการใช้เชื้อผลิตไนซินที่มีชีวิตร่วมกับหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเพื่อสร้างไนซินออกมาเป็นสารถนอมอาหาร โดยการใช้เชื้อมีชีวิตที่สร้างไนซินนี้จะมีข้อดีคือไม่มีการกำหนดปริมาณของไนซินที่เชื้อสร้างขึ้น แต่มีข้อจำกัดคือ เชื้อที่สร้างไนซินจะต้องไม่ยับยั้งหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิต (Degan และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีการเคลือบไนซินบนแผ่นฟิล์มที่ใช้เป็น

ภาชนะในการบรรจุอาหารเพื่อให้ไนซินสามารถปลดปล่อยออกมาในระหว่างการเก็บรักษาอาหาร แต่วิธีนี้การควบคุมการปลดปล่อยของไนซินจะทำได้ยาก (Mauriello และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารและแบคทีเรียเป้าหมายในการยับยั้ง

ประเภทอาหาร	แบคทีเรียเป้าหมาย	ความเข้มข้นไนซินที่ใช้ (หน่วยสากล/กรัม)	เอกสารอ้างอิง
<b>ผลิตภัณฑ์นม</b>			
ชีสพาสเจอร์ไรซ์	สปอร์ <i>Clostridium</i> spp และ <i>Bacillus</i> spp	200-600	De Vuyst และคณะ, 1994
ชีสแช่แข็ง	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	Zottola และคณะ, 1994
ชีสแช่แข็ง	<i>Listeria monocytogenes</i>	300	Zottola และคณะ, 1994
คอตเทจชีส	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,000	Ferreira และ Lund ,1996
ริโคต้าชีส	<i>Listeria monocytogenes</i>	100	Davies และคณะ, 1997
นมพาสเจอร์ไรซ์	สปอร์ <i>Bacillus cereus</i>	4000	Wanding และคณะ,1999
<b>เนื้อสัตว์</b>			
ไส้กรอก	<i>Lactobacillus sake</i>	1,000	Delves และคณะ, 1996
เนื้อวัว	<i>Brochothrix</i> <i>thermosphacta</i>	5,000	Delves และคณะ, 1996
เนื้อวัว	สปอร์ <i>Clostridium</i> sp	3,000	De Vuyst และคณะ, 1994
เนื้อวัว	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0000	De Vuyst และคณะ, 1994
เนื้อหมู	<i>Listeria monocytogenes</i>	10,000	De Vuyst และคณะ, 1994
<b>อาหารกระป๋อง</b>			
ผักกระป๋อง	สปอร์ <i>Clostridium</i> sp. และ <i>Bacillus</i> sp.	200	Delves และคณะ, 1996
ถั่วกระป๋อง	สปอร์ <i>Clostridium</i> sp. และ <i>Bacillus</i> sp.	200	Delves และคณะ, 1996
มะเขือเทศ	สปอร์ <i>Clostridium</i> sp.	200	Delves และคณะ, 1996
กระป๋อง	และ <i>Bacillus</i> sp.		
ซูบข้าวโพด	สปอร์ <i>Clostridium</i> sp.	500	De Vuyst และคณะ, 1994

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารและแบคทีเรียเป้าหมายในการยับยั้ง  
(ต่อ)

ประเภทอาหาร	ชื่อเป้าหมาย	ความเข้มข้นที่ใช้ (หน่วยสากล/กรัม)	เอกสารอ้างอิง
<b>อาหารทะเล</b> แซลมอนรมควัน	<i>Listeria monocytogenes</i>	100	Nilsson และคณะ, 1997
<b>ผักผลไม้</b> กิมจิ	<i>Lactobacillus</i> sp.	100	Choi และคณะ, 2000
เมลอน	<i>Listeria monocytogenes</i>	50	Ukuku และคณะ, 2005
<b>เครื่องดื่ม</b> <b>แอลกอฮอล์</b>			
ไวน์	Lactic acid bacteria	100	Beatriz และคณะ, 2007
เบียร์	Lactic acid bacteria	100	Ogden และคณะ, 1988

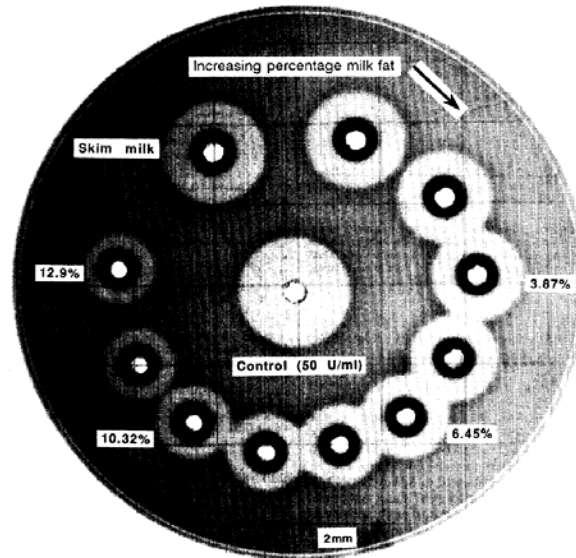


ตารางที่ 2.5 ปริมาณการใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารในประเทศต่างๆ (Cleveland และคณะ, 2001)

ประเทศ	ประเภทของอาหารที่อนุญาตให้มีการเติมไนซิน	ปริมาณไนซินสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ (หน่วยสากล/กรัม)
อาร์เจนตินา	ชีส	500
ออสเตรเลีย	ชีส, มะเขือเทศกระป๋อง	ไม่จำกัด
เบลเยียม	ชีส	100
ไซปรัส	ชีส, ผักกระป๋อง	ไม่จำกัด
ฝรั่งเศส	ชีส	ไม่จำกัด
อิตาลี	ชีส	500
เม็กซิโก	ไม่จำกัดประเภทอาหาร	500
เนเธอร์แลนด์	ชีส	800
เปรู	ไม่จำกัดประเภทอาหาร	ไม่จำกัด
รัสเซีย	ชีส, ผักกระป๋อง	8,000
อังกฤษ	ชีส, อาหารกระป๋อง, ครีม	ไม่จำกัด
สหรัฐอเมริกา	ชีส	10,000

อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินที่เติมลงไปนั้น อาจมี ประสิทธิภาพลดลง หรือต้องการไนซินเป็นจำนวนมากขึ้นจึงสามารถยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้ ซึ่ง เหตุการณ์นี้อาจเกิดจากการสูญเสียไนซิน เนื่องจากความร้อนของกระบวนการผลิตอาหาร ตัวอย่างเช่น การใช้ความร้อนในการหลอมเหลวของชีสในขบวนการผลิตจะทำให้สูญเสียไนซินที่เติม ลงไปร้อยละ 15-20 และขบวนการทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนอย่างเฉียบพลัน (Ultra high temperature treatment) ในอุตสาหกรรมผลิตนมนั้นจะมีการสูญเสียไนซินถึงร้อยละ 40 (Delves และ คณะ, 1996) นอกจากนี้การสูญเสียไนซินอาจมาจากการจับกับส่วนประกอบของอาหาร เช่น โปรตีน และไขมัน เนื่องจากโมเลกุลของไนซินมีประจุเป็นทั้งบวกและลบ (Amphiphilic molecule) และมีโครงสร้างบางส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) จึงอาจทำให้นิซินสามารถจับกับประจุหรือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนและไขมันได้ (Aasen และคณะ, 2003) จากรายงานการวิจัยพบว่า การ สูญเสียไนซินจากการจับกับโปรตีนจะมีมากกว่าการจับกับไขมัน โดยไนซินจะจับกับโปรตีนในอาหาร มากถึงร้อยละ 80 (Aasen และคณะ, 2003) Chung และคณะ (1989) พบว่าไนซินปริมาณ 155

หน่วยสากล/กรัม ที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่เติมลงในเนื้อวัวจะมีปริมาณลดลงเหลือ 8 หน่วยสากล/กรัม เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน ส่วนการจับกันของไนซินกับไขมันจะเกิดขึ้นมากในอาหารที่เป็นของเหลว ซึ่งไนซินจะถูกกักอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างเฟสของน้ำและไขมัน จากรูปที่ 2.12 ร้อยละไขมันนมที่เพิ่มขึ้นจะทำให้แอกทิวิตีชีวภาพของไนซินลดลง (Jung และคณะ, 1992)



รูปที่ 2.12 แอกทิวิตีของไนซินที่ลดลงเนื่องจากการเพิ่มปริมาณไขมันนม (Dong-Sun และคณะ, 1992)

และการสูญเสียไนซินยังมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ที่อยู่ในอาหารที่สามารถทำปฏิกิริยาไนซินได้ โดยเฉพาะอาหารที่ไม่ได้ผ่านความร้อน (Dong-sun และคณะ, 1992 และ Aasen และคณะ, 2003) Rose และ คณะ (2003) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (Glutathione S-Transferase) ซึ่งมีไนซินเป็นสารตั้งต้น พบว่าเอนไซม์นี้จะเร่งการจับกันของกลูตาไธโอน (Glutathione) กับไนซิน ทำให้ไนซินสูญเสียแอกทิวิตีชีวภาพไป แต่เอนไซม์นี้สามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อน

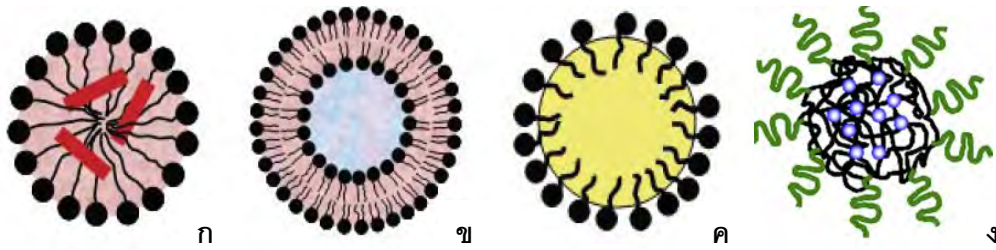
## 2.7 การนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการกักเก็บไนซิน

จากปัญหาการสูญเสียไนซินที่ใช้เดิมเป็นสารนอมอาหารดังที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ทำให้การเพิ่มความคงตัวของโมเลกุลไนซินมีความสำคัญมาก ดังนั้นจึงนำเอาอนุภาคนาโน (Nanoparticles) มาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความคงตัวของไนซิน โดยคาดว่ากระบวนการบรรจุไนซินลงในอนุภาคนาโนจะสามารถป้องกันไม่ให้ไนซินทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบต่างๆ ในอาหาร และยังคงควบคุมการปลดปล่อยไนซินออกจากอนุภาคให้มีปริมาณไนซินในอาหารคงที่อีกด้วย (ตารางที่ 2.6)

นาโนเทคโนโลยี คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง การสังเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องจักรหรือผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตรเทียบเท่ากับระดับอนุภาคของโมเลกุลหรืออะตอม (1 นาโนเมตรถึง 100 นาโนเมตร) รวมถึงการออกแบบหรือการใช้เครื่องมือสร้างวัสดุอยู่ในระดับที่เล็กมาก หรือการเรียงอะตอมและโมเลกุลในตำแหน่งที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ และถูกต้อง ทำให้โครงสร้างของวัสดุหรือสสารมีสมบัติพิเศษไม่ว่าทางด้านฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพส่งผลให้มีประโยชน์ต่อผู้ใช้สอย โดยเทคโนโลยีการผลิตอนุภาคนาโนนั้นสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นกับความเหมาะสมในการนำเอาไปใช้งาน ทำให้เกิดอนุภาคนาโนหลายรูปแบบขึ้น เช่น

1. ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) คือ อนุภาคที่เกิดจากผสมและรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวในเฟสของน้ำ (self-assembly) โดยมีส่วนที่ชอบน้ำเรียงตัวอยู่รอบนอกอนุภาค และส่วนที่ไม่ชอบน้ำหันเข้าข้างในอนุภาค อนุภาคชนิดนี้จะเหมาะสำหรับการเก็บสารออกฤทธิ์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งจะแทรกตัวกันอยู่ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำภายในอนุภาค (รูปที่ 2.13 ก.)
2. ไลโพโซม (liposome) คือ อนุภาคที่มีลักษณะเป็นถุงกลมมีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ซึ่งเตรียมได้จากฟอสโฟลิพิด (phospholipid) อนุภาคชนิดนี้สามารถกักเก็บสารออกฤทธิ์ได้ทั้งที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ โดยสารที่ละลายน้ำจะถูกบรรจุอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มซึ่งเป็นส่วนชอบน้ำของอนุภาค ส่วนสารที่ไม่ละลายน้ำจะถูกบรรจุอยู่ในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำภายในอนุภาค (รูปที่ 2.13 ข.)
3. นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) คือ อนุภาคที่เกิดจากรวมตัวของน้ำและน้ำมัน ด้วยการปั่นผสมน้ำมันให้กระจายตัวไปในเฟสของน้ำและมีสารลดแรงตึงผิวเป็นตัวทำให้น้ำกับน้ำมันรวมตัวกันได้ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวนี้อาจล้อมรอบอยู่ที่ชั้นนอกของอนุภาค โดยสารออกฤทธิ์จะถูกกักเก็บอยู่ในอนุภาคขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารนั้นกับน้ำมัน (รูปที่ 2.13 ค.)

4. อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ (polymeric nanoparticle) คือ อนุภาคที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ชีวภาพซึ่งมีการสลายตัวเองได้ (biodegradable polymer) ซึ่งเตรียมด้วยการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยสารออกฤทธิ์ที่บรรจุอยู่ภายในจะถูกควบคุมการปลดปล่อยจากการสลายตัวของพอลิเมอร์ (รูปที่ 2.13 ง.)



รูปที่ 2.13 อนุภาคนาโนชนิดต่างๆ ก. ไมโครอิมัลชัน (microemulsion), ข. ลิโปโซม (liposome), ค. นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion), ง. อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ (polymeric nanoparticle)

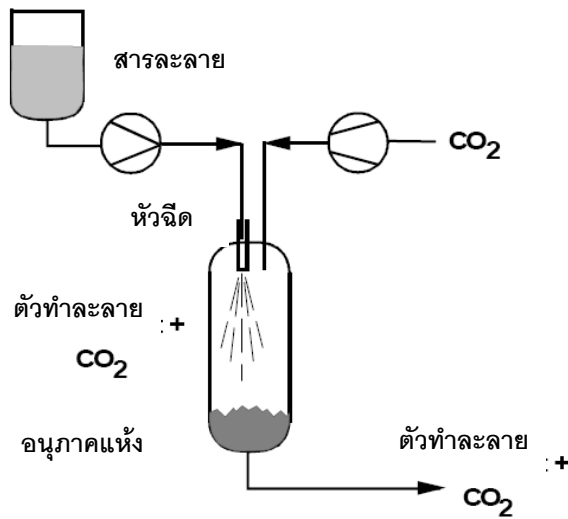
ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างชนิดของอนุภาคนาโนที่บรรจุในชิน

ชนิดอนุภาคนาโน	เอกสารอ้างอิง
ไลโปโซม	Laridi และคณะ, 2002 Benech และคณะ, 2003
นาโนไลโปโซม	Colas และคณะ, 2007
อนุภาคนาโนพอลิ-แลคไทด์ (poly-L-lactide nanoparticle)	Salmaso และคณะ, 2004

### 2.8 การเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของในชินด้วยอนุภาคนาโน

Benech และ คณะ (2002) ได้ศึกษาแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของในชินที่บรรจุในอนุภาคไลโปโซม เปรียบเทียบกับในชินที่สร้างจากหัวเชื้อผสม (Mixed culture) ในการหมัก Cheddar Cheese เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พร้อมทั้งศึกษาสมบัติของในชินที่ถูกบรรจุและการปลดปล่อยในชินจากอนุภาคไลโปโซม จากผลการทดลองพบว่า แอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อของในชินที่บรรจุภายในไลโปโซมลดลงเพียงร้อยละ 10 ในขณะที่ในชินที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* ssp.

*lactis* biovar *diacetylactis* UL 719 จะมีแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อลดลงถึงร้อยละ 88 ไนซินจะถูกบรรจุภายในอนุภาคไลโปโซมด้วยการเอาส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการแสดงแอกทิวิตีชีวภาพแทรกไปในผนังหุ้มไลโปโซมที่เป็นส่วนของฟอสโฟลิพิด ดังนั้นจึงสามารถปกป้องไนซินจากเอนไซม์และการทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบทางเคมีในอาหารทำให้ไนซินที่ถูกบรรจุมีความคงตัวมากขึ้น (Benech และคณะ, 2002) นอกจากนี้ Laridi และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการบรรจุไนซินลงในอนุภาคไลโปโซม (encapsulation efficiencies) พบว่าการใช้โพร-ไลโปโซม H ในการบรรจุไนซิน 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีประสิทธิภาพการบรรจุสูงสูดร้อยละ 47 และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 740 นาโนเมตร เนื่องจาก โพร-ไลโปโซม H ประกอบด้วยไขมันประเภท ฟอสฟาทีดิลอินซิทอล (phosphatidylinositol) ซึ่งแสดงประจุลบอยู่ปริมาณมาก ไนซินซึ่งมีประจุบวกจึงสามารถจับกับประจุลบของโพร-ไลโปโซม H ได้ดี มีผลให้ประสิทธิภาพการบรรจุไนซินสูงขึ้นเมื่อเทียบกับโพร-ไลโปโซม ชนิดอื่น และยังพบว่าการบรรจุไนซินที่ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำจะทำให้ประสิทธิภาพการบรรจุเพิ่มขึ้นอีกด้วย แต่ข้อจำกัดของการบรรจุไนซินในอนุภาคไลโปโซม คือ ความคงตัวของไลโปโซม และการปลดปล่อยไนซินออกจากไลโปโซมจะขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อม แรงกระทำระหว่างประจุ และอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ระหว่างไนซินกับส่วนประกอบของไลโปโซมทำให้คุณภาพของ ไลโปโซมไม่คงที่ (Laridi และคณะ, 2002) ต่อมา Salmaso, และ คณะ (2004) ได้นำเทคนิคการบรรจุไนซินลงในพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ โดยการตกตะกอนให้เกิดอนุภาคระดับนาโนเมตรด้วยแอนติโซลเวนต์ (anti-solvent) ซึ่งมีหลักการคือ ละลายไนซินร้อยละ 20 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และพอลิ-แลค-แลกไทด์ (poly-L-lactide) ร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในตัวทำละลายผสมร้อยละ 50 ต่อ 50 ของไดเมทิลซัลโฟไซด์/ไดคลอโรมีเทน หลังจากนั้นผ่านสารละลายลงในหัวฉีด (Nozzle) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตร ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 288 เคลวิน และความดัน 15 เมกะพาสคาล เมื่อทำการให้ CO<sub>2</sub> ซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติโซลเวนต์ลงไปอย่างรวดเร็วในระบบแอนติโซลเวนต์ จะละลายตัวทำละลายออกไปจากระบบ ทำให้ของแข็งซึ่งในที่นี้คือ พอลิเมอร์มีความหนาแน่นน้อยลงจนอิ่มตัวถึงขั้นอิ่มตัวอย่างยิ่งยวด (supersaturation) พอลิเมอร์จะตกตะกอนเป็นอนุภาคขนาดเล็กและเกิดการบรรจุไนซินเข้าไปภายในอนุภาค หลังจากนั้นกำจัดตัวทำละลายส่วนเกินออกจากระบบ โดยการชะด้วย CO<sub>2</sub> ในอัตราการไหล 1,500 นิวตัน.ลิตร/ชั่วโมง อีกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (รูปที่ 2.14)



รูปที่ 2.14 การเตรียมอนุภาคนาโนด้วยการตกตะกอนด้วยแก๊สแอนติโซลเวนต์ (Salmaso, และ คณะ 2004)

ข้อดีของการเตรียมอนุภาคนาโนด้วยวิธีนี้คืออนุภาคที่ได้จะมีความคงตัวไม่เปลี่ยนแปลงสมบัติตามภาวะแวดล้อม อนุภาคที่เตรียมได้สามารถควบคุมขนาดและคุณภาพในการผลิตแต่ละครั้งให้คงที่ได้เนื่องจากการควบคุมตัวแปรในกระบวนการผลิต เช่น อุณหภูมิ, ความดัน, อัตราการไหลของสารละลายและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อนำสารละลาย เป็นต้น ในงานวิจัยนี้อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ที่บรรจุไนซินมีขนาดระหว่าง 200-400 นาโนเมตร อนุภาคมีรูปร่างทรงกลม ผิวเรียบ และมีไนซินร้อยละ 84 บรรจุอยู่ในอนุภาคจากปริมาณไนซินเริ่มต้น ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนพบว่า ร้อยละของการปลดปล่อยไนซินขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-เบส และความเข้มข้นของเกลือ โดยการเพิ่มค่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นของเกลือจะทำให้ร้อยละการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนลดลง เนื่องจากค่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นจะทำให้การละลายของไนซินลดลง ทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไนซินจับกับพอลิเมอร์ได้ดีขึ้นทำให้การปลดปล่อยไนซินออกมาจากอนุภาคน้อยลง และเมื่อผู้วิจัยทำการทดสอบแอกทิวิตีทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (*Lactobacillus delbrueckii*) ของไนซินที่บรรจุอยู่ในอนุภาคนาโนปรากฏว่าไนซินที่ปล่อยออกมาจากอนุภาคนาโนนั้นสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้นานถึง 45 วัน ขณะที่ไนซินอิสระยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียง 5 วัน (Salmaso, และ คณะ 2004)

อย่างไรก็ตามวิธีการประดิษฐ์อนุภาคนาโนด้วยเทคนิคการตกตะกอนด้วยแอนติโซลเวนต์ มีข้อเสีย คือ การใช้เครื่องมือประดิษฐ์อนุภาคที่ซับซ้อน มีการควบคุมตัวแปรหลายตัว และต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก ซึ่งอาจกำจัดออกจากผลิตภัณฑ์ไม่หมดทำให้มีสารพิษตกค้าง ซึ่งอาจเกิดอันตรายกับผู้บริโภคได้ ดังนั้น ในการใช้ในจีนเป็นสารนอมอาหารจึงควรคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลัก จึงได้เกิดแนวคิดที่จะนำในจีนบรรจุลงในอนุภาคนาโนที่ทำมาจากไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticles; SLN) ซึ่งไขมันแข็งที่นำมาใช้นั้นปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคสามารถย่อยสลายได้ดีในร่างกายมนุษย์ และมีวิธีการเตรียมที่ทำได้ง่าย

## 2.9 อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง (Solid lipid nanoparticles)

อนุภาคนาโนไขมันชนิดแข็ง (solid lipid nanoparticle) เป็นอนุภาคนาโนอีกชนิดหนึ่งที่ใช้เก็บกักสารออกฤทธิ์ ซึ่งมีข้อดีกว่าอนุภาคนาโนที่กล่าวมาข้างต้น คือ สามารถควบคุมการปล่อยสารออกฤทธิ์ได้นาน มีความปลอดภัยสามารถนำมาใช้ในอาหารได้ และสามารถถ่ายเทเทคโนโลยีจากห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งจะมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 50 ถึง 1,000 นาโนเมตร สามารถเตรียมได้โดยหลอมเหลวสารหล่อหุ้มประเภทไขมัน (ตารางที่ 2.7) เช่น กลีเซอรไรด์และแว็กซ์ เป็นต้น ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว (ตารางที่ 2.8) ที่ผสมลงไปเพื่อไม่ให้ไขมันแข็งจับกันเป็นก้อนขณะเตรียมอนุภาคและสามารถรวมไขมันกับน้ำเป็นเนื้อเดียวกันได้ จากนั้นทำการลดขนาดอนุภาคลงในระดับนาโนเมตร เมื่อเตรียมเสร็จและปล่อยให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง สารหล่อหุ้มจะเปลี่ยนสถานะมาเป็นของแข็งและหุ้มสารออกฤทธิ์เอาไว้ข้างใน ลักษณะโครงสร้างของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งจะมีชั้นของสารลดแรงตึงผิวห่อหุ้มเรียงตัวกันชั้นเดียว (monolayer) อยู่ภายนอก แต่ ณ อุณหภูมิห้อง อนุภาคนาโนที่อยู่ในสถานะของไขมันแข็งจะมีการสลายตัวที่ช้าจึงสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยสารออกฤทธิ์จะค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยออกมา ทำให้สามารถช่วยยืดระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ภายในได้ดีกว่าอนุภาคนาโนอิมัลชันซึ่งประกอบด้วยไขมันเหลวที่มีการสลายตัวเร็วกว่า (Wolfgang และคณะ, 2001) (รูปที่ 2.15) ทำให้มีผู้วิจัยสนใจบรรจุสารออกฤทธิ์ลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอย่างแพร่หลาย (ตารางที่ 2.9)

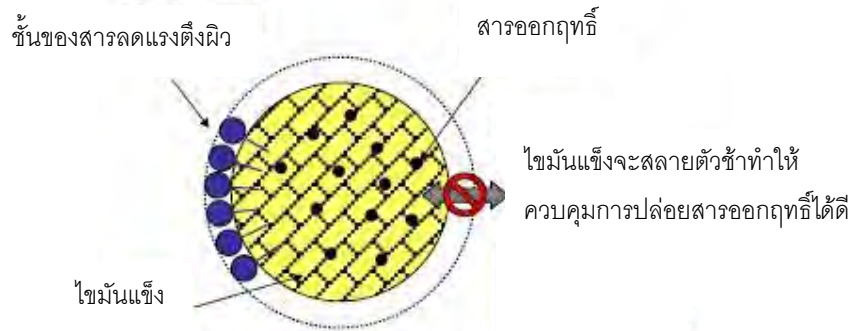
ตารางที่ 2.7 ชนิดของไขมันที่ใช้เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง ช่วงอุณหภูมิหลอมเหลวและชื่อทางการค้า (Wolfgang และคณะ, 2001)

ไขมันแข็ง	ช่วงอุณหภูมิหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	ชื่อทางการค้า
<b>กลีเซอไรด์</b>		
กลีเซอริลโมโนไทรแคพริน	31-32	Tricaprin
กลีเซอริลโมโนไทรลอรเรต	46.5	Trilaurin
กลีเซอริลไทรมายริสเทรต	55-58	Dynasan 114
กลีเซอริลไทรพามมิเทรต	61-65	Dynasan 116
กลีเซอริลไทรสเตียเรต	70-73	Dynasan 118
กลีเซอริลพาลมิโทสเตียเรต	53-57	Precirol ATO 5
กลีเซอริลโมโนสเตียเรต	54-64	Imwitor 900
กลีเซอริลเบนซีน	69-74	Compritol 888 ATO
ไฮโดรจีเนเตด โคโคกลีเซอไรด์	42-44	Sofisan 142
ไฮโดรจีเนเตด โคโคกลีเซอไรด์	33.5-35.5	Witepsol W 35
ไฮโดรจีเนเตด โคโคกลีเซอไรด์	33.5-35.5	Witepsol H 35
ไฮโดรจีเนเตด โคโคกลีเซอไรด์	41-43	Witepsol H42
ไฮโดรจีเนเตด โคโคกลีเซอไรด์	42-44	Witepsol E 48
<b>กรดไขมัน</b>		
กรดพาลมิติค	63-64	Palmitic acid
กรดสเตียริก	69-71	Stearic acid
กรดเบนซีน	77-80	Behenic acid
<b>ซีผึ้ง</b>		
เซทิลพาลมิเทต	46-51	Cutina CP
<b>ไขมันชนิดอื่น</b>		
โพรพิลีนไกลคอลโมโนสเตียเรต	34-37.5	Monosteol
พอลิเอทิลีนไกลคอล 6-สเตียเรต	33-37	Superpolystate



ตารางที่ 2.8 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวและวิธีที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง  
(Wolfgang และคณะ, 2001)

สารลดแรงตึงผิว	วิธีเตรียม
<b>สารลดแรงตึงผิวจากธรรมชาติ</b>	
เลซีทีนจากหัวเหลือง	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบร้อน/ไมโครอิมัลชัน
เลซีทีนจากไข่	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบร้อน/ไมโครอิมัลชัน
<b>สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์</b>	
พอล็อกซาเมอร์ 188	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบร้อน/แบบเย็น
พอล็อกซาเมอร์ 182	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบเย็น
พอล็อกซาเมอร์ 407	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบร้อน
พอล็อกซามีน 908	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบร้อน
ไทล็อกซาพอล	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบร้อน/การเตรียมอนุภาคเป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์
พอลิซอร์เบต 20	ไมโครอิมัลชัน
พอลิซอร์เบต 60	ไมโครอิมัลชัน
พอลิซอร์เบต 80	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบร้อน/แบบเย็น
โซเดียมโคเลต	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบเย็น
โซเดียมดีออกซีโคเลต	ฮอโมอิจีโนเซชันความดันสูงแบบร้อน/แบบเย็น
กรดเกลือโซเดียมเทารอโคคลิก	ไมโครอิมัลชัน
กรดเทารอดีออกซีโคคลิก	ไมโครอิมัลชัน
บิวทานอล	ไมโครอิมัลชัน
กรดบิวทริก	ไมโครอิมัลชัน
ไดออกทิล โซเดียมซัลโฟซีคซิเนต	ไมโครอิมัลชัน



รูปที่ 2.15 แบบจำลองการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง  
 ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ประเภทเพปไทด์ที่บรรจุในอนุภาคนาโนชนิดมันแข็ง

เพปไทด์/โปรตีน	วิธีเตรียม	เอกสารอ้างอิง
แอลบูมิน	การเตรียมอนุภาคเป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	Gualbert และคณะ, 2003
ไซโคลสปอริน	ห่อหุ้มในเซชันความดันสูงแบบร้อน	Muller และคณะ, 2007
อินซูลิน	การเตรียมอนุภาคเป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	Zhang และคณะ, 2006
โอิวาลบูมิน	การเตรียมอนุภาคเป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	Videira และคณะ, 2002
คีโทโคนาโซล	ห่อหุ้มในเซชันความดันสูงแบบร้อน	Souto และคณะ, 2005
อิมิดาโซล	ห่อหุ้มในเซชันความดันสูงแบบร้อน	Souto และคณะ, 2005
คลอทริมาโซล	ห่อหุ้มในเซชันความดันสูงแบบร้อน	Souto และคณะ, 2004
ไลโซไซม์	ห่อหุ้มในเซชันความดันสูงแบบเย็น	Almeida และคณะ, 1997
โทโมเพนทิน	ไมโครอิมัลชัน	Morel และคณะ, 1996
ไรแฟมพิซิน ไอโซไนอะซิด และ ไพราซิनाไมด์	การเตรียมอนุภาคเป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	Pandey และคณะ, 2005
โกนาโดเรลิน	การเตรียมอนุภาคเป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	Hu และคณะ, 2003
คลอซาพีน	ห่อหุ้มในเซชันความดันสูงแบบร้อน	Venkateswarlu และคณะ, 2004
ไฮโดรคอร์ติโซน และ โพรแอสเทอโรน	ไมโครอิมัลชัน	Cavalli และคณะ, 1999

## 2.10 วิธีการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

การเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมีวิธีหลักๆ 4 วิธี (Wolfgang และคณะ, 2001) คือ

### 1. ฮอโมจีไนเซชันความเร็วสูงและการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (High speed homogenization )

วิธีฮอโมจีไนเซชันความเร็วสูงเป็นวิธีการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งโดยการตีปั่นไขมันที่หลอมเหลวกับสารลดแรงตึงผิวด้วยความเร็วสูงเพื่อกระจายไขมันให้รวมตัวกับน้ำเกิดเป็นอนุภาคนาโนขึ้น การเตรียมอนุภาคด้วยวิธีนี้มีขั้นตอนการเตรียมที่ง่าย แต่อนุภาคที่ได้จะมีขนาดแตกต่างกัน โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 80-800 นาโนเมตร

### 2. การเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยกระบวนการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (SLN prepared by solvent emulsification)

วิธีการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยกระบวนการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เริ่มจากการละลายสารออกฤทธิ์ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่สามารถรวมกับน้ำได้ เช่น ไซโคลเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และ ไดเอทิลอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงเทส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสารออกฤทธิ์ละลายอยู่ลงในสารละลายสารลดแรงตึงผิว ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกซึ่งในขั้นตอนนี้ไขมันจะเกิดการตกตะกอนได้เป็นอนุภาคนาโนที่มีสารออกฤทธิ์บรรจุอยู่ในอนุภาคนาโนที่เตรียมด้วยวิธีนี้จะมีความหนาอยู่ระหว่าง 30-100 นาโนเมตร และเป็นวิธีที่สามารถหลีกเลี่ยงการสลายตัวของสารออกฤทธิ์จากความร้อนได้ดี แต่อย่างไรก็ตามอาจเกิดปัญหาการกำจัดตัวทำละลายออกไม่หมดทำให้เกิดความเป็นพิษต่อผลิตภัณฑ์ได้

### 3. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion based SLN preparation)

วิธีไมโครอิมัลชันเป็นการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยการเจือจางไมโครอิมัลชันในน้ำ เริ่มจากการละลายสารออกฤทธิ์ในไขมันหลอมเหลว และเทลงในสารลดแรงตึงผิวที่ละลายในน้ำร้อนซึ่งมีอุณหภูมิเดียวกันกับไขมันหลอมเหลว ทำการกวนอย่างช้าๆ โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เท่ากับอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลวไขมัน จากนั้นนำอิมัลชันที่ได้เทลงในน้ำเย็น (2-3 องศา

เซลเซียส) ทั้งนี้ ในอัตราส่วน 1:25 หรือ 1:50 ซึ่งเหตุการณ์นี้จะทำให้เกิดการแตกตัวของไมโครอิมัลชันเป็นนาโนอิมัลชัน และเกิดการแข็งตัวทำให้สารออกฤทธิ์ถูกบรรจุอยู่ในอนุภาค

#### 4. ฮอมอจีไนเซชันความดันสูง (High pressure homogenization)

วิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ไม่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และสามารถขยายขนาดการผลิตได้ง่าย โดยอาศัยหลักการทำงานของเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ความดันสูง คือ เครื่องจะอัดของเหลวด้วยแรงดัน 100-2,000 บาร์ ผ่านช่องขนาดเล็ก ของเหลวจะกลายเป็นของไหลที่มีความเร็วสูง ทำให้เกิดแรงเฉือนอย่างมากจนไปลดขนาดอนุภาคที่ละลายอยู่จนถึงระดับนาโนเมตร และพบว่าสามารถใช้ไขมันแข็งได้มากถึงร้อยละ 40 ในการเตรียมอนุภาค ส่วนวิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูง ยังแบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ วิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อน และวิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบเย็น (รูปที่ 2.16)

##### 4.1 ฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อน (Hot homogenization)

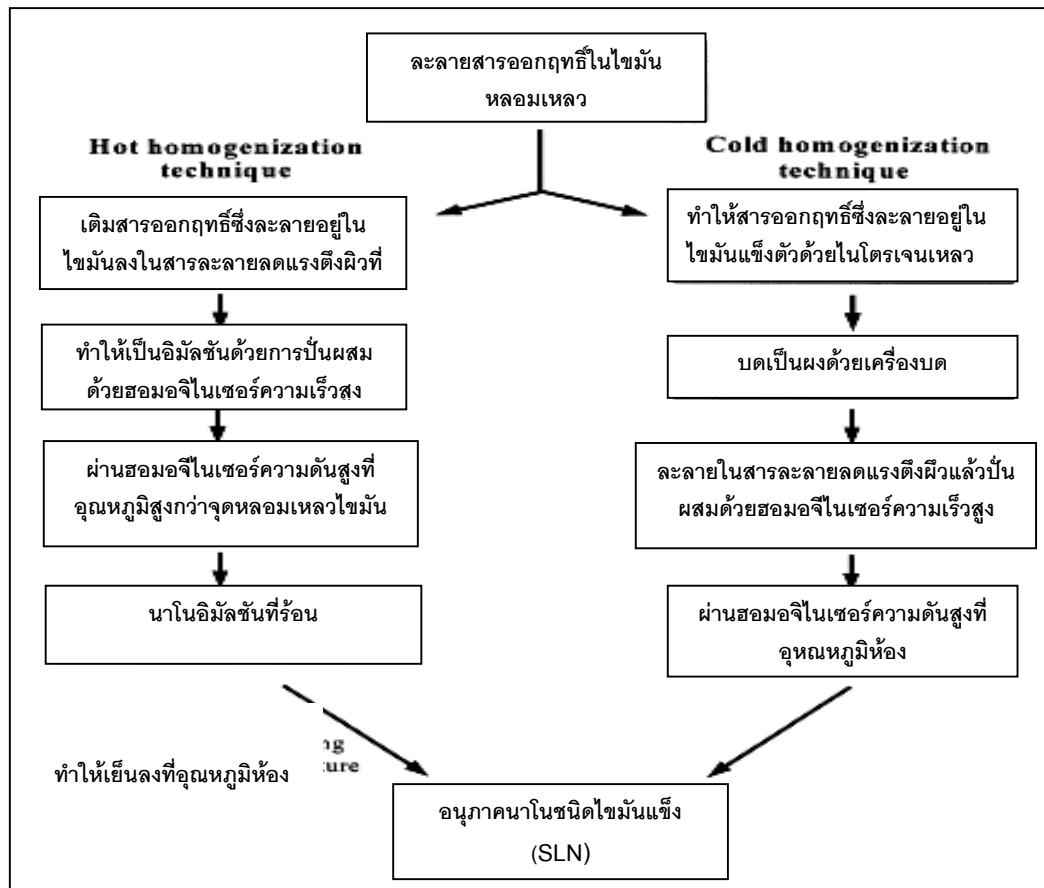
วิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อนมีขั้นตอนการเตรียมอนุภาคคือ ละลายสารออกฤทธิ์ในไขมันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวซึ่งทำให้ละลายในน้ำร้อนแล้ว ลงไปในไขมันหลอมเหลวที่มีสารออกฤทธิ์ละลายอยู่ แล้วนำไปตีปั่นด้วยเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ความเร็วสูง เพื่อให้ส่วนน้ำและไขมันเข้ากันเป็นอิมัลชันและเป็นการลดขนาดอนุภาคเบื้องต้น ก่อนนำอิมัลชันที่ได้เข้าเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ความดันสูงเพื่อลดขนาดอนุภาคให้อยู่ในระดับนาโนเมตร ซึ่งส่วนใหญ่จะผ่านเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ความดันสูงซ้ำ 3-5 รอบ ที่ความดันประมาณ 500-1,500 บาร์ ขึ้นกับชนิดของไขมันและสารออกฤทธิ์ที่ใช้ เมื่อเสร็จแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบนาโนอิมัลชัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ไขมันที่อยู่ในรูปแบบนาโนอิมัลชันจะเกิดการแข็งตัวทำให้สารออกฤทธิ์ถูกบรรจุเข้าสู่ภายในอนุภาคนาโน โดยในระหว่างขั้นตอนการเตรียมจะต้องรักษาอุณหภูมิในระบบให้สูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันอยู่ตลอดเวลาเพื่อป้องกันการแข็งตัวของไขมันก่อนที่จะมีการบรรจุสารออกฤทธิ์ วิธีนี้จะให้ขนาดอนุภาคนาโนที่เล็กและมีขนาดในแต่ละอนุภาคใกล้เคียงกันแต่จะไม่เหมาะสำหรับการบรรจุสารออกฤทธิ์ที่ไม่ทนความร้อน เนื่องจากอาจเกิดการสลายตัวระหว่างการผลิตอนุภาคได้

#### 4.2 ฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบเย็น (Cold homogenization)

วิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบเย็นนั้น ในขั้นตอนแรกจะเหมือนกับวิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อนคือ การละลายสารออกฤทธิ์ในไขมันที่ถูกหลอมเหลว แต่หลังจากนั้นจะทำให้เย็นลงทันทีด้วยไนโตรเจนเหลว ช่วงนี้สารออกฤทธิ์จะแพร่เข้าไปเป็นเนื้อเดียวกับไขมันเนื่องจากการให้ความเย็นโดยฉับพลัน ทำการบดเพื่อให้ได้อนุภาคขนาดเล็กและเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ความเย็นจะช่วยทำให้อนุภาคแตกเป็นอนุภาคเล็กยิ่งขึ้น จากนั้นนำเข้าเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ความดันสูงที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งวิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบเย็นจะมีข้อได้เปรียบคือ ทำให้สารออกฤทธิ์สัมผัสกับความร้อนน้อยลงซึ่งเป็นการหลีกเลี่ยงการสลายตัวของสารออกฤทธิ์ แต่ด้วยวิธีนี้ขนาดอนุภาคที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าวิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อน

ฮอมอจีไนเซชันแบบร้อน

ฮอมอจีไนเซชันแบบเย็น



รูปที่ 2.16 วิธีสอมอจีในเซชันความดันสูงแบบร้อน และวิธีสอมอจีในเซชันความดันสูงแบบเย็น

## 2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยวิธีสอมอจีในเซชันความดันสูง

### 1. ชนิดของไขมันแข็ง

อิทธิพลจากชนิดของไขมันแข็งมีผลกระทบต่อขนาดและความคงตัวของอนุภาค โดยขนาดเฉลี่ยของอนุภาคจะใหญ่ขึ้นเมื่อมีการใช้ไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูง เนื่องจากความหนืดที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียมอนุภาค จากการทดลองของ Wissing และคณะ (2003) พบว่าขนาดของอนุภาคจากไขมันแข็งชนิดไวเทปซอล W35 (117 นาโนเมตร) มีขนาดเล็กกว่าชนิดไดนาแซน 118 (275 นาโนเมตร) ซึ่งไขมันแข็งชนิดไวเทปซอล W35 นั้นจะมีจุดหลอมเหลวที่ต่ำกว่าไขมันแข็งชนิดไดนาแซน 118 (ตารางที่ 2.6) และยังพบว่าการใช้ปริมาณไขมันแข็งเกินกว่าร้อยละ 10 จะทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น เนื่องจากเกิดความหนืดสูงในระบบเช่นกัน นอกจากนี้ไขมันแข็งที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกรดไขมันที่มีโครงสร้างซับซ้อนจะทำให้ประสิทธิภาพในการบรรจุสารออกฤทธิ์ลดลง

เนื่องจากการเกิดผลึกไขมันที่รวดเร็วและมีหนาแน่นสูงทำให้สารออกฤทธิ์แทรกตัวในอนุภาคได้น้อย

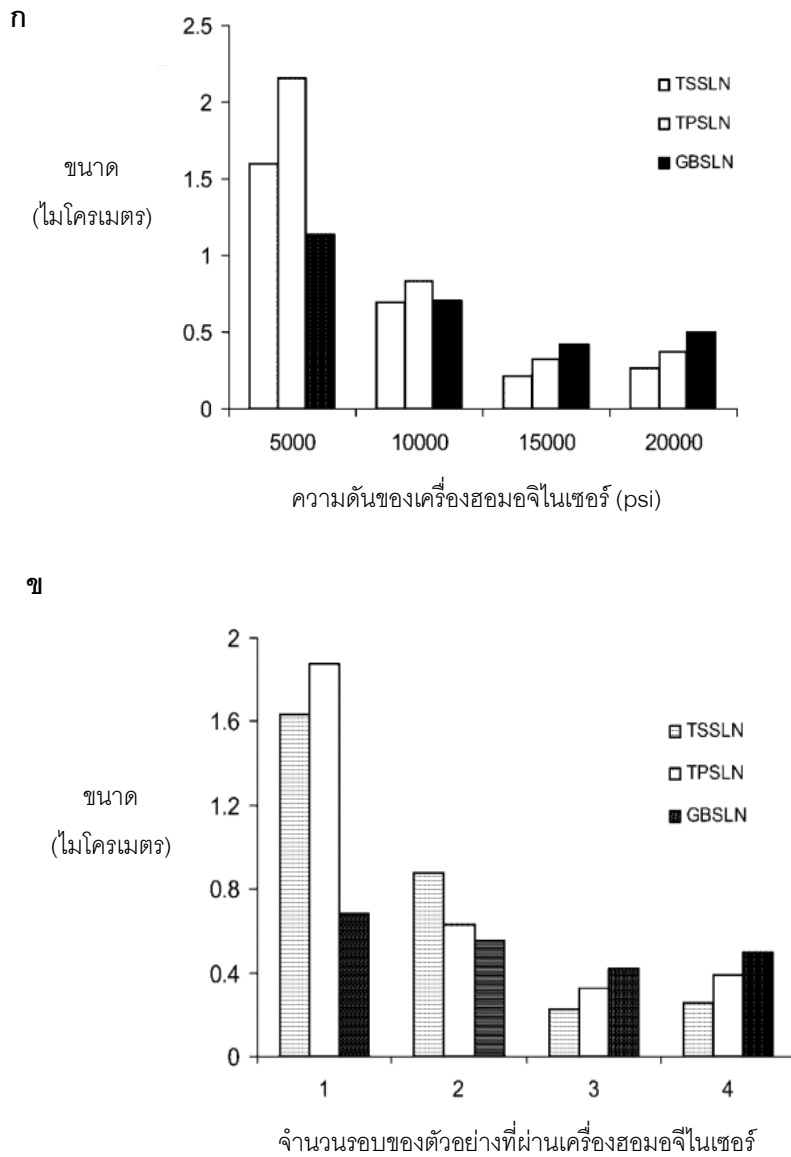
## 2. สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม

การเลือกใช้ชนิดและปริมาณความของสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมมีผลต่อความคงตัวของอนุภาค โดยการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไอออนิก (ionic surfactant) ได้แก่ อีพิคูรอน 100 ในการเตรียมอนุภาคนาโนจากกรดไขมันสเตียริก อนุภาคที่เตรียมได้จะมีขนาดเล็กกว่าการใช้ทวิน 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่ใช่ไอออนิก (nonionic surfactant) (Wolfgang และคณะ, 2001) และการศึกษาผลของความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวต่อขนาดอนุภาคพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวจะทำให้อนุภาคมีขนาดลดลง ซึ่งเกิดจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่เพิ่มขึ้นจะไปลดแรงตึงผิวทำให้การกระจายตัวของอนุภาคดีขึ้น และทำให้ปริมาณประจุไฟฟ้าที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคหรือค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาค (zeta-potential) มีปริมาณมากขึ้น ซึ่งประจุบนผิวอนุภาคนี้จะส่งผลกัันระหว่างอนุภาค ทำให้อนุภาคมีการเกาะกลุ่มลดลง จากการใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวร้อยละ 5 จะทำให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่บริเวณผิวของอนุภาค (zeta-potential) ลดลงอยู่ในช่วง -30 ถึง -40 มิลลิโวลต์ ซึ่งเป็นค่าความต่างศักย์ที่ต่ำพอที่จะลดการเกาะกันระหว่างอนุภาคได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมจะช่วยให้ขนาดอนุภาคลดลงและอนุภาคมีความคงตัวสูง เนื่องจากจะช่วยเพิ่มความหนาของชั้นสารลดแรงตึงผิวที่ล้อมรอบอนุภาค (Wissing และคณะ, 2003)

## 3. ความดันและจำนวนรอบที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ ความดันสูง

การใช้เลือกใช้ความดันและจำนวนรอบของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ที่เหมาะสมเพื่อเตรียมอนุภาคให้มีขนาดเล็กและมีความคงตัวสูงจะขึ้นอยู่กับชนิดของไขมันแข็งและสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ โดยทั่วไปการเพิ่มความดันและจำนวนรอบของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์จะมีผลทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตามการใช้ความดันสูงและจำนวนรอบในการเตรียมอนุภาคที่มากเกินไปจะไม่ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลงแต่กลับจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องในระบบอนุภาคจะมีพลังงานจลน์ที่สูงทำให้อนุภาคเกิดการชนกันและจับกลุ่ม นอกจากนี้ผลของพลังงานที่สูงจะไปทำลายชั้นของสารลดแรงตึงผิวที่ล้อมรอบอนุภาคทำให้อนุภาคมีความคงตัวน้อยลง ดังเช่นผลจากการศึกษาขนาดของ

อนุภาคนาโนโดยใช้ไขมันแข็งชนิดไตรสเตียรีน ไทรปาลมิติน และ กลีเซอรอลบีฮีเนต เพื่อบรรจุ ทาโมซิเฟนลงในไขมันแต่ละชนิด พบว่าการใช้ความดัน 15,000 psi และจำนวนรอบของเครื่อง ฮอมอจีไนเซอร์ 3 รอบ จะทำให้อนุภาคที่เตรียมได้จากไขมันแข็งทั้งสามชนิดมีขนาดเล็กที่สุด (รูปที่ 2.17) (Reddy และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.17 ก. ความดันของเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ ข. จำนวนรอบของตัวอย่างที่ผ่านเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ที่มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนไขมันแข็งชนิดไตรสเตียรีน (TSSLN) ไทรปาลมิติน (TPSLN) และ กลีเซอรอลบีฮีเนต (GBSLN) ที่บรรจุทาโมซิเฟน (Reddy และคณะ, 2006)

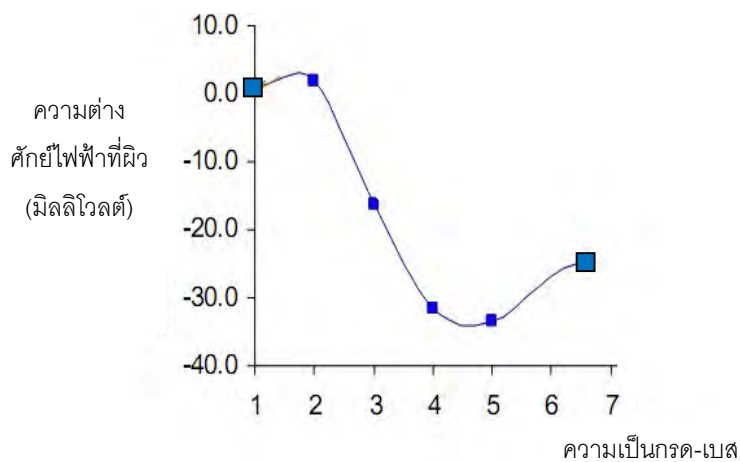


#### 4. อุณหภูมิ

การใช้อุณหภูมิที่สูงในขณะการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยวิธีโฮมอจีในเซชัน ความดันสูงจะทำให้ประสิทธิภาพการบรรจุสารออกฤทธิ์ลดลงและอนุภาคจะมีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ออกมาอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเตรียมอนุภาคด้วยการโฮมอจีในเซชันความดันสูงจนเกิดเป็นนาโนอิมัลชันที่ร้อน การใช้อุณหภูมิสูงจะทำให้สารออกฤทธิ์มีความสามารถในการละลายในชั้นน้ำได้ดีขึ้น และเมื่อทิ้งอนุภาคให้เย็นสารออกฤทธิ์จะกลับมาแทรกตัวในชั้นไขมันแข็งได้น้อย แต่จะแบ่งแยกอยู่ในชั้นน้ำเป็นส่วนใหญ่ และนอกจากนี้สารออกฤทธิ์จะแทรกตัวอยู่บริเวณเปลือกนอกของอนุภาคทำให้มีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากเปลือกอนุภาคออกมาอย่างรวดเร็ว (Muller และคณะ, 2000)

#### 5. ความเป็นกรด-เบส

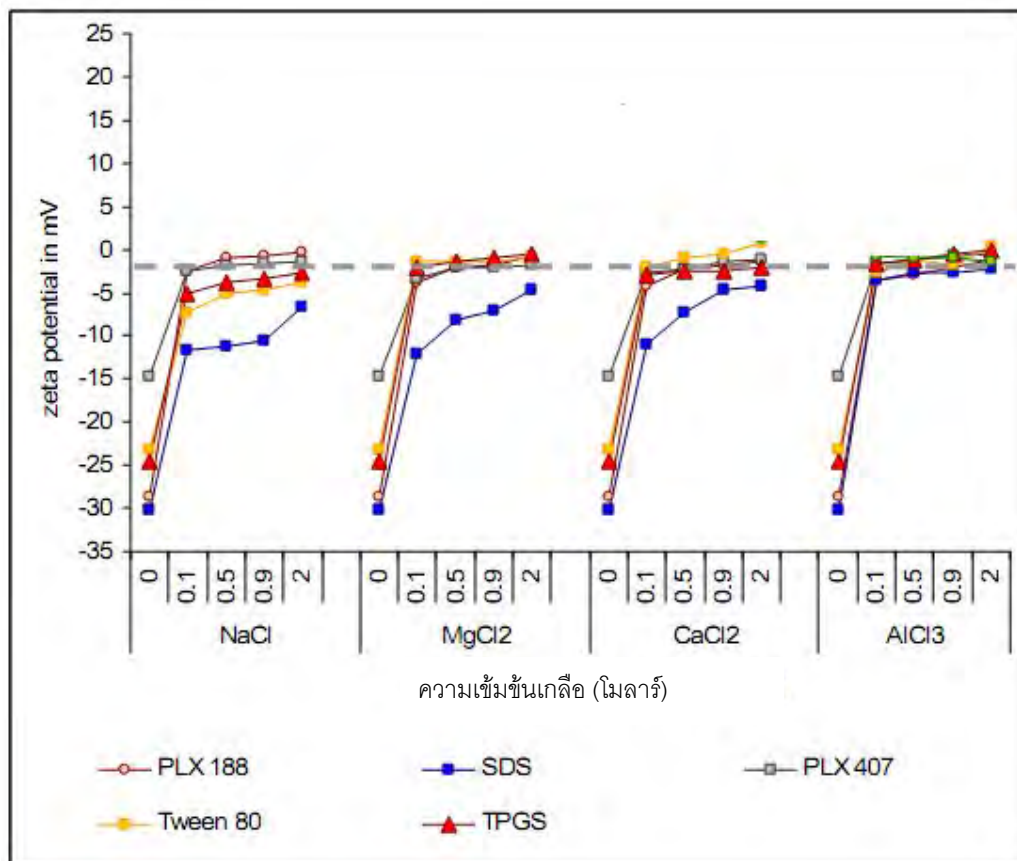
ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายจะมีผลต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง โดยค่าความเป็นกรด-เบสที่ลดลงจะทำให้อนุภาคมีความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) เพิ่มขึ้น (ประจุลบมีปริมาณน้อยลง) (รูปที่ 2.18) เนื่องจากที่ความเป็นกรด-เบสต่ำจะทำให้หมู่ฟังก์ชันที่บริเวณผิวของอนุภาคเกิดการแตกตัวให้ประจุบวกมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) เปลี่ยนไปจนเกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น (Zimmermann และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.18 ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในสารละลายค่าความเป็นกรด-เบส ที่ 1-7

### ความเข้มข้นของเกลือ

สารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงจะมีค่า ionic strength สูง ซึ่งจะไปทำลายชั้นของสารลดแรงตึงผิวที่หุ้มอนุภาคอยู่ด้วยปฏิกิริยาการดึงน้ำออก (dehydration) ทำให้ชั้นของสารลดแรงตึงผิวมีความหนาลดลงส่งผลให้อนุภาคมีความคงตัวน้อยลงและมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) มีค่าเพิ่มขึ้น (ประจุลบมีปริมาณน้อยลง) (รูปที่ 2.19) (Zimmermann และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.19 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นเกลือชนิดต่างๆ ต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่เตรียมด้วยสารลดแรงตึงผิว พอล็อกซาเมอร์ 188 (PLX 188) โซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต (SDS) พอล็อกซาเมอร์ 407 (PLX 407) ทวิน 80 (Tween 80) และโทโคฟีรอล พอลิเอทิลีนไกลคอล ซักซิเนต (TPGS)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเลือกใช้อุณหภูมิในชนิดไขมันแข็งในการบรรจุไนซิน แทนอุณหภูมิในชนิดอื่นที่มีผู้บรรจุไนซินลงไปแล้ว (ตารางที่ 2.6) เนื่องจากข้อได้เปรียบของอนุภาคในการควบคุมการปลดปล่อยได้นานและมีความปลอดภัยสามารถนำมาใช้ในอาหารได้ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยมีจุดประสงค์ของงานวิจัยคือ สามารถเตรียมอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินด้วยวิธีฮอโมจีไนเซชันแบบร้อนที่มีความคงตัว จากการแปรผันภาวะในการเตรียมอนุภาคได้แก่ ความดันของเครื่องวิธีฮอโมจีไนเซเซอร์ และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว พร้อมทั้งหาปริมาณไนซินที่เหมาะสมในการบรรจุลงอนุภาคอีกด้วย นอกจากนี้ยังศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือต่อการปลดปล่อยไนซิน และแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของไนซินที่ถูกปลดปล่อยออกมา เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS3020 ของบริษัท Sanyo, ญี่ปุ่น
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, เยอรมัน
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า รุ่น PL-08 (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, เยอรมัน
4. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ AG285 ของบริษัท Mettler toledo, สวิตเซอร์แลนด์
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06061 ของบริษัท Memmert, เยอรมัน
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, ญี่ปุ่น
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, ญี่ปุ่น
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดกลาง รุ่น AG-506R
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น AG-2506
9. ตู้เย็บเชื้อรุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, ไทย
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท สหรัฐอเมริกา
11. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10, P20, P200 และ P1000 ของบริษัท Gilson, ฝรั่งเศส
12. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, ญี่ปุ่น
13. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, ญี่ปุ่น

14. เครื่องผสมอจี้ไนเซอร์ความเร็วสูง (High speed homogenizer) รุ่น Ultra turrax T25 ของบริษัท IKA werke, เยอรมัน
15. เครื่องผสมอจี้ไนเซอร์ความดันสูง (High pressure homogenizer) รุ่น Emulsiflex C3 ของบริษัท Avestin, เยอรมัน
16. เครื่องนาโนไซเซอร์ (Nanosizer) รุ่น NanoZS ของบริษัท Malvern, สหราชอาณาจักร
17. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบกราด (Scanning electron microscopy) รุ่น S-3400 N ของบริษัท Hitachi, ญี่ปุ่น
18. เครื่องแยกสารโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) รุ่น Water 1283 ของบริษัท Water, เยอรมัน
19. เครื่องโซนิคเตอร์ รุ่น SA203 ของบริษัท Misonix, สหรัฐอเมริกา
20. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดในลอนขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร และ 25 มิลลิเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Rosh Kaisha, ญี่ปุ่น
21. หลอดอัลตราฟิลเตรชัน (ultra-filtration tube) ที่สามารถคัดแยกโมเลกุลขนาดน้ำหนัก 30,000 ดาลตันได้ รุ่น Amicon Ultra 4 ของบริษัท Milipore, ไอร์แลนด์

### 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตเน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
3. พอลิเพปโตเน (polypeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, อิตาลี
7. ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ของบริษัท J.T. Baker, สหรัฐอเมริกา
8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
9. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, อังกฤษ
10. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
11. ไบมันเชิงชนิดอิมิวเตอร์ 900 (Imwitor 900) ของบริษัท Sasol, เยอรมัน
12. ไบมันเชิงชนิดเซทิลพาลมิเตต (Cetyl palmitate) ของบริษัท Sasol, เยอรมัน

13. ไชมันแข็งชนิดซอฟทิแซน 154 (Softisan 154) ของบริษัท Sasol, เยอรมัน
14. ไชมันแข็งชนิดซอฟทิแซน 378 (Softisan 378) ของบริษัท Sasol, เยอรมัน
15. ไชมันแข็งชนิดไวเทปซอล E85 (Witepsol E85) ของบริษัท Sasol, เยอรมัน
16. พอล็อกซาเมออร์ 188 (Poloxamer 188) ของบริษัท BASF, เยอรมัน
17. โซเดียมดีออกซีโคเลต (Sodium deoxycholate) ของบริษัท Fluka, สวิสเซอร์แลนด์
18. กรดไตรฟลูโอโรอะซีติก (Trifluoroacetic acid) ของบริษัท Fluka, สวิสเซอร์แลนด์
19. อะซีโตรไนไตรล์ (Acetonitrile) ของบริษัท BDH Chemical, สหราชอาณาจักร
20. ไนซิน A บริสุทธิ์ น้ำหนักโมเลกุล 3.35 กิโลดัลตัน แยกทิวติชีวิภาพ 1,000,000 หน่วยสากลต่อกรัม ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ของบริษัท Sigma, สหราชอาณาจักร

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นชนิดเพื่อการวิเคราะห์ (Analytical grade)

### 3.3 ทดสอบการละลายของไนซินในไขมันแข็งชนิดต่างๆ

ละลายผงไนซินลงในไขมันแข็งหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสแต่ละชนิด ได้แก่ เซทิลพาลมีเตด ซอฟทิแซน 154 ซอฟทิแซน 378 อิมวิตอร์ 900 และไวเทปซอล E85 โดยเพิ่มปริมาณของไนซินขึ้นจนเห็นแขวนลอยอยู่ในไขมัน บันทึกปริมาณไนซินมากที่สุดที่สามารถละลายได้ในไขมันแข็งแต่ละจากการสังเกตด้วยตาเปล่า โดยทำการทดลองการละลายเป็นเวลา 60 นาที

### 3.4 หากภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนจากไขมันแข็งอิมวิตอร์ 900 เพื่อบรรจุไนซิน

เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยวิธีโฮมोजีไนเซชันความดันสูงแบบร้อน (hot high pressure homogenization) โดยหลอมเหลวไขมันแข็งชนิดอิมวิตอร์ 900 ปริมาณ 5.0 กรัม ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และละลายสารลดแรงตึงผิวพอล็อกซาเมออร์ 188 และโซเดียมดีออกซีโคเลตซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมในน้ำร้อนปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารลดแรงตึงผิวที่ละลายแล้วลงในไขมันแข็งที่หลอมเหลว จึงนำไปปั่นด้วยเครื่องโฮมोजีไนเซชันความเร็วสูง (รูปที่ 3.1) ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายมีลักษณะเป็นอิมัลชัน นำอิมัลชันที่ได้ผ่านเครื่องโฮมोजีไนเซชันความดันสูง (รูปที่ 3.2) จำนวน 3 รอบ เพื่อลดขนาดอนุภาคทำการแปรผันความดันที่ใช้ในแต่ละตัวอย่าง โดยให้ความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวพอล็อกซาเมออร์ 188 ร้อยละ 2.5 และ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ดังตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นกวนทิ้งไว้ให้เย็นที่

อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ในขวดใสที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำตัวอย่างไปหาขนาดอนุภาค Polydispersity index (PDI) การกระจายขนาดอนุภาค (size distribution) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta potential) และการกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential distribution) ด้วยเครื่องนาโนไฮเซออร์ หลังจากเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลา 0, 7, และ 14 วัน เพื่อเปรียบเทียบความคงตัวของอนุภาคในแต่ละภาวะสำหรับใช้ในการบรรจุในซินต่อไป



รูปที่ 3.1 เครื่องฮอมอจีไนเซออร์ความเร็วสูง



รูปที่ 3.2 เครื่องฮอมอจีไนเซออร์ความดันสูง

ตารางที่ 3.1 ภาวะที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนจากไขมันแข็งชนิดอิมิวเตอร์ 900

ไขมัน (น้ำหนัก/ปริมาตร)	ความดัน (บาร์)	สารลดแรงตึงผิว (น้ำหนัก/ปริมาตร)
อิมิวเตอร์ 900 ร้อยละ 10	500	พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 และ โซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125
อิมิวเตอร์ 900 ร้อยละ 10	1,000	พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 และ โซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125
อิมิวเตอร์ 900 ร้อยละ 10	1,500	พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 และ โซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125
อิมิวเตอร์ 900 ร้อยละ 10	500	พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 และ โซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125
อิมิวเตอร์ 900 ร้อยละ 10	1,000	พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 และ โซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125
อิมิวเตอร์ 900 ร้อยละ 10	1,500	พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 และ โซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125

### 3.5 ศึกษาความคงตัวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 ที่บรรจุในซิน

เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 บรรจุในซิน โดยบรรจุในซินที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในแต่ละสูตรดังนี้ ร้อยละ 0.5, ร้อยละ 1.0, ร้อยละ 2.0 และ ร้อยละ 3.0 น้ำหนัก/น้ำหนัก ซึ่งในซินจะละลายในไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ตามสูตรในตารางที่ 3.2 ละลายสารลดแรงตึงผิวพอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5 น้ำหนัก/ปริมาตร และโซเดียมดีออกซีโคเลตซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมร้อยละ 0.125 น้ำหนัก/ปริมาตร ในน้ำร้อนปริมาตร 42.45 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารลดแรงตึงผิวที่ละลายแล้วลงในไขมันแข็ง หลอมเหลว จึงนำไปปั่นด้วยเครื่องโฮมोजิเนเซอร์ความเร็วสูงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายมีลักษณะเป็นอิมัลชัน นำอิมัลชันที่ได้ผ่านเครื่องโฮมोजิเนเซอร์ ความดันสูงจำนวน 3 รอบภายใต้ความดัน 1500 บาร์ เพื่อลดขนาดอนุภาค กวนทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่เตรียมได้ในขวดใสที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างไปหาขนาดอนุภาค Polydispersity index (PDI) การกระจายขนาดอนุภาค (size distribution) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่



ผิว (zeta potential) และการกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential distribution) ด้วยเครื่องนาโนไฮเซอร์ หลังจากเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 0, 7, 14 และ 28 วัน จากนั้นแยกส่วนที่เป็นอนุภาคนาโนจากส่วนสารละลายด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 22,000 x g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ล้างอนุภาคนาโนด้วยน้ำกลั่น 2 รอบทดสอบผลของความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือต่อการปลดปล่อยโนซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งพร้อมทั้งทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 และ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 เพื่อศึกษาความคงตัวของอนุภาคนาโน ผลของความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือต่อการปลดปล่อยโนซินและแอกทิวิตีชีวภาพของโนซินซึ่งปล่อยออกจากอนุภาคนาโน ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 สูตรการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุโนซิน

สูตร	โนซิน (มิลลิกรัม)	อิมวิตอร์ 900 (กรัม)	พอลิออกซาเมอร์ 188 (กรัม)	โซเดียมดีออกซีโค- เลต (มิลลิกรัม)	น้ำ (มิลลิลิตร)
1.อนุภาคนาโน บรรจุโนซิน ร้อยละ 0.5	25	4.975	2.5	65	42.45
2.อนุภาคนาโน บรรจุโนซิน ร้อยละ 1.0	50	4.950	2.5	65	42.45
3.อนุภาคนาโน บรรจุโนซิน ร้อยละ 2.0	100	4.900	2.5	65	42.45
4.อนุภาคนาโน บรรจุโนซิน ร้อยละ 3.0	150	4.850	2.5	65	42.45

### 3.6 ทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุโนซินด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ซึ่งอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน 50 มิลลิกรัม นำมาสกัดโนซินด้วยการเติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร และตามด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการกรองโนซินที่สกัดได้ด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตรที่มีความกว้างของรู 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงดูดสารละลายได้ 700 ไมโครลิตร ที่ได้จากการกรองมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุโนซินในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง วิเคราะห์ปริมาณโนซินด้วยเครื่องแยกสารโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส (Reverse phase HPLC) ที่มีคอลัมน์ C-18 เป็นตัวยึดเกาะ โดยใช้กรดไตรฟลูโอโรอะซีติก (TFA) ร้อยละ 0.05 (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งละลายในน้ำเป็นตัวชะคอลัมน์ตัวที่หนึ่ง (สารละลาย A) และกรดไตรฟลูโอโรอะซีติก (TFA) ร้อยละ 0.05 (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งละลายในอะซิโตไนไตรล์เป็นตัวชะคอลัมน์ตัวที่สอง (สารละลาย B) ในช่วง 5 นาทีแรกของการวิเคราะห์ ทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย A และ สารละลาย B ในปริมาณเท่ากับร้อยละ 20 และ ร้อยละ 80 ตามลำดับ จากนั้นที่เวลา 5-20 นาที ค่อยๆปรับให้ความเข้มข้นของสารละลาย A เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 20 ไปจนถึงร้อยละ 80 และ สารละลาย B ค่อยๆลดลงจากร้อยละ 80 ไปจนถึงร้อยละ 20 โดยใช้อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณโนซินโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 220 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต และคำนวณหาปริมาณโนซินจากพื้นที่ใต้กราฟ โดยใช้กราฟมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโนซินระหว่าง 0.125 - 2.00 มิลลิกรัม./มิลลิลิตร (ภาคผนวก) และคำนวณค่าประสิทธิภาพการบรรจุโนซิน (Encapsulation Efficiency) จากสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการบรรจุโนซิน} = \frac{\text{ปริมาณโนซินที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน}}{\text{ปริมาณโนซินเริ่มต้นที่ใช้บรรจุลงในอนุภาค}} \times 100$$

### 3.7 การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ละลายอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร้อยละ 2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตรที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ตามลำดับ นำสารแขวนลอยข้างต้นไปทำให้กระจายตัวด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกวนสารแขวนลอยด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 วัน ทำการเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนดไว้ คือ 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 และ 25 วัน ตามลำดับ จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยหลอดอัลตราฟิลเตรชัน (ultra-filtration tube) ที่สามารถคัดแยกโมเลกุลขนาดน้ำหนัก 30,000 ดาลตันได้ โดยใช้ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายใส 700 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนซินด้วยเครื่องแยกสารโครมาโทกราฟี สมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส (Reverse phase HPLC) ต่อไป

### 3.8 การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ละลายอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร้อยละ 2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ปริมาณ 50 กรัม ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 5 ปริมาณ 1 มิลลิลิตรที่มี ค่าความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ นำสารแขวนลอยข้างต้นไปทำให้กระจายตัวด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกวนด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 วัน ทำการเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนดไว้ คือ 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 และ 25 วัน ตามลำดับ จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยหลอดอัลตราฟิลเตรชัน (ultra-filtration tube) ที่สามารถคัดแยกโมเลกุลขนาดน้ำหนัก 30,000 ดาลตันได้ โดยใช้ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายใส 700 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนซินด้วยเครื่องแยกสารโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส (Reverse phase HPLC) ต่อไป

### 3.8 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของโนซินที่ถูกลดปล่อยจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ชั่งโนซินอิสระ 5 มิลลิกรัม และอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งซึ่งบรรจุโนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 มา 200 มิลลิกรัม, 100 มิลลิกรัม, 50 มิลลิกรัม และ 25 มิลลิกรัม ตามลำดับ นำมากระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ BHI ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก) ปริมาณ 5 มิลลิลิตรจากนั้นเติมหัวเชื้อทดสอบ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และเติมเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน โดยมีชุดการทดลองควบคุม 2 ชุด คือชุดการทดลองที่ไม่เติมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งและชุดทดลองควบคุมที่เติมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุโนซินปริมาณ 50 มิลลิกรัม ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 และ 25 วัน ตามลำดับ โดยดูผลละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่มีไฮเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 7.4 ให้มีความเข้มข้นเจือจางเป็น  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  และ  $10^{-7}$  ตามลำดับ และนำไปเกลี่ยลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สำหรับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 และอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI สำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนับหาจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) โดยทำการเกลี่ยเชื้อซ้ำ 2 ครั้ง ตามวิธีข้างต้น เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดลอง

### 3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความคงตัวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy) ในวันที่ 0, 7, 14 และ 28 ของการเตรียมอนุภาค นำอนุภาคนาโนมาหยดบนแท่นส่องตัวอย่างทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเคลือบตัวอย่างด้วยทอง แล้วจึงนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 25,000 เท่า

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ทดสอบการละลายของไนซินในไขมันแข็งชนิดต่างๆ

ศึกษาความสามารถการละลายของไนซินในไขมันแข็งชนิดต่างๆ เพื่อหาชนิดของไขมันแข็งที่ไนซินสามารถละลายได้ดี ซึ่งจะทำให้ปริมาณการกักเก็บไนซินในอนุภาคนาโนเป็นไปได้สูง จากการทดสอบการละลายของไนซินในไขมันแข็งชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีนั้น ไนซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) สามารถละลายได้ดีในไขมันชนิดอิมิวเตอร์ 900 หรือกลีเซอรอลโมโนสเตียเรต (Glyceryl monostearate) นอกจากนี้ ไนซินร้อยละ 0.5 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) สามารถละลายได้ปานกลางในไขมันแข็งชนิดไวเทปซอล E85 และไนซินไม่สามารถละลายได้ในไขมันแข็งชนิดเซทิลพาลมีเตต ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ดังนั้นจึงเลือกไขมันแข็งชนิดอิมิวเตอร์ 900 เพื่อเป็นตัวกักเก็บไนซินต่อไป

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการละลายของไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในไขมันแข็งชนิดต่างๆ ที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

ชนิดไขมันแข็ง	ไนซินร้อยละ 0.5				ไนซินร้อยละ 1.0				ไนซินร้อยละ 2.0				ไนซินร้อยละ 3.0			
	15 นาที	30 นาที	45 นาที	60 นาที	15 นาที	30 นาที	45 นาที	60 นาที	15 นาที	30 นาที	45 นาที	60 นาที	15 นาที	30 นาที	45 นาที	60 นาที
เซทิลพาลมีเตต	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ซอพทิแซน 154	I	I	I	M	I	I	I	M	I	I	I	M	I	I	I	M
ซอพทิแซน 378	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
อิมิวเตอร์ 900	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S	M	S	S	S
ไวเทปซอล E85	M	M	M	M	I	I	M	M	I	I	M	M	I	I	M	M

หมายเหตุ I คือ ไม่ละลาย (Insoluble), M คือ ละลายได้ปานกลาง (moderately soluble), S คือ ละลายได้ดี (soluble)

## 4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนจากไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 เพื่อบรรจุในซิน

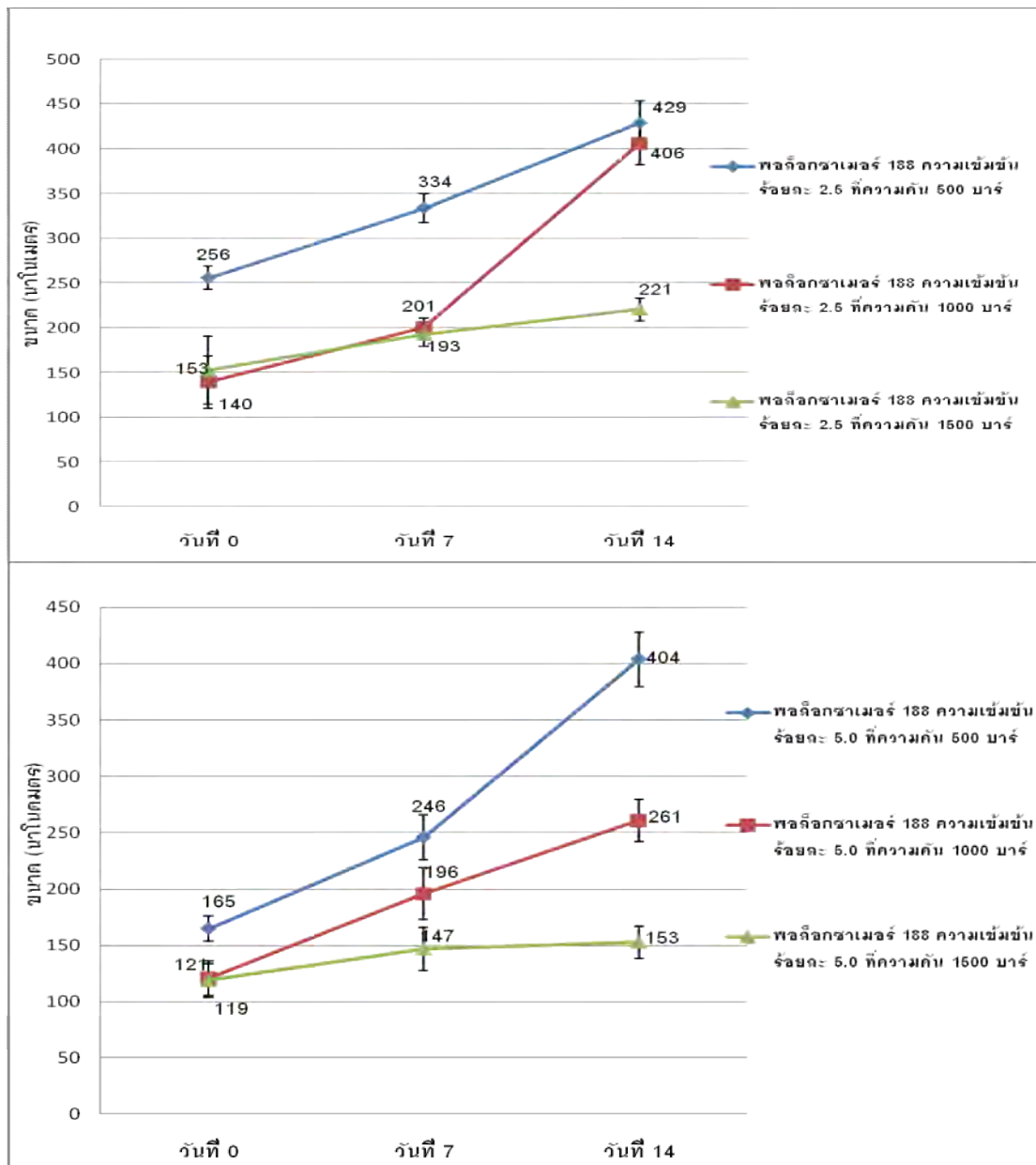
เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยวิธีฮอโมจีไนเซชันความดันสูง โดยแปรผันภาวะต่างๆ ได้แก่ ความดันของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความดันสูงที่ใช้ในการเตรียม และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวพอล็อกซาเมอร์ 188 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการบรรจุในซินลงในอนุภาคนาโนโดยศึกษาความคงตัวของขนาดอนุภาค Polydispersity index (PDI value) การกระจายขนาดอนุภาค (size distribution) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) และการกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential distribution) หลังการเตรียมอนุภาคเป็นเวลา 0, 7, และ 14 วัน ด้วยเครื่องนาโนไฮเซฮอร์ จากผลการทดลองสามารถเตรียมอนุภาคระดับนาโนเมตรจากไขมันแข็งชนิดอิมิเตอร์ 900 ที่มีไซเตียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวรวม จะมีค่า Polydispersity index (PDI value) น้อยกว่า 0.5 (ภาคผนวก) และอนุภาคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 120 ถึง 430 นาโนเมตร ขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้เตรียม

จากผลการทดลองพบว่าในการใช้พอล็อกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวในการเตรียมอนุภาคในวันที่ 0 ผลของการเพิ่มความดันของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์จาก 500 บาร์ เป็น 1,000 บาร์ อนุภาคที่เตรียมได้จะมีขนาดเล็กลงจาก 256 นาโนเมตร เป็น 140 นาโนเมตร แต่การเพิ่มความดันขึ้นเป็น 1,500 บาร์จะไม่ทำให้ขนาดอนุภาคเล็กลงอีก ซึ่งอนุภาคจะมีขนาด 153 นาโนเมตร นอกจากนี้การใช้ความดัน 500, 1,000 และ 1,500 บาร์ จะมีผลทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคมีค่าเป็น -32.3, -37.5 และ -24.4 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ขณะที่การใช้พอล็อกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวในการเตรียมอนุภาค ในวันที่ 0 ผลของการเพิ่มความดันของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์จะทำให้ขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ลดลง โดยการใช้ความดัน 500, 1,000 และ 1,500 บาร์ อนุภาคจะมีขนาด 165, 121, และ 119 นาโนเมตร ตามลำดับ และมีความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) จะมีค่า -18.3, -28.0 และ -34.0 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ

จากการเพิ่มความเข้มข้นพอล็อกซาเมอร์ 188 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวจากความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นเข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะมีผลให้ขนาดอนุภาคที่เตรียมได้ในวันที่ 0 ลดลง โดยการใช้ความดัน 500 บาร์ของเครื่องฮอโมจีไนเซชัน จะทำให้อนุภาคมีขนาดลดลงจาก 256 เป็น 165 นาโนเมตร ที่ความดัน 1,000 บาร์จะมีขนาดลดลงจาก 140 เป็น 121 นาโนเมตร และที่ความดัน 1,500 บาร์จะมีขนาดลดลงจาก 153 เป็น 119 นาโนเมตร ขณะที่ผลของการเพิ่ม

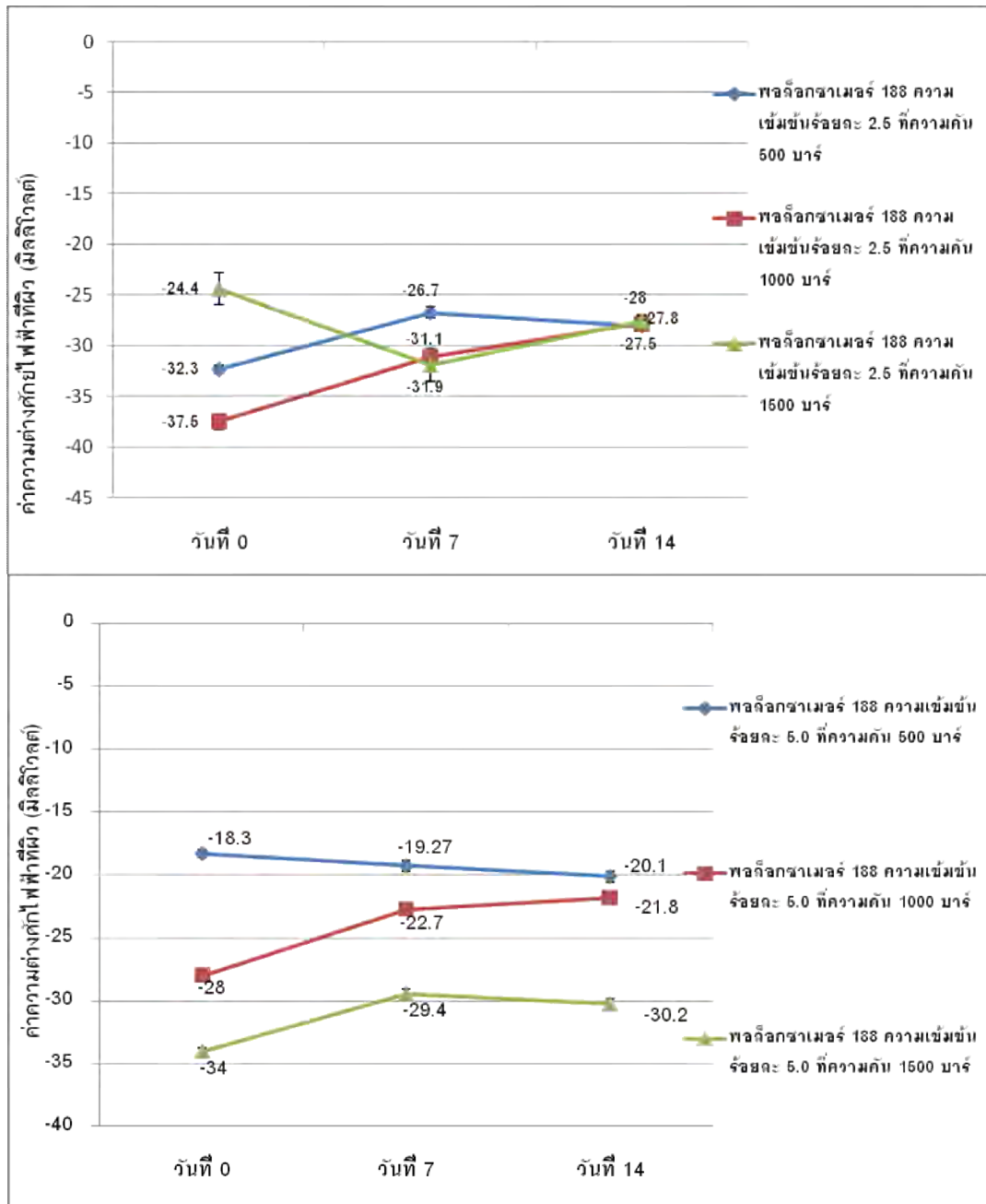
ความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวต่อค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ที่ความดัน 500 และ 1,000 บาร์ จะทำให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) เพิ่มขึ้นจาก -32.3 เป็น -18.3 มิลลิโวลต์ และ -37.5 เป็น -28.0 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ขณะที่การใช้ความดัน 1,500 บาร์ ผลของการเพิ่มความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวจะทำให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ลดลงจาก -24.4 เป็น -34.0 มิลลิโวลต์

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 และ 4.2 เมื่อเก็บอนุภาคนาโนไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 14 วัน การใช้ความดัน 1500 บาร์ของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ และเติมพอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวจะสามารถเตรียมอนุภาคที่มีขนาดเล็กและมีการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับการใช้ความดันและความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวอื่นๆ โดยมีขนาดอนุภาคเป็น 119, 197 และ 203 นาโนเมตร และมีความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) เป็น -34.0, -29.4 และ -30.2 มิลลิโวลต์ หลังจากการเตรียมอนุภาค 0, 7 และ 14 วันตามลำดับ นอกจากนี้การใช้ภาวะดังกล่าวจะให้กราฟการกระจายขนาดอนุภาค (size distribution) และกราฟการกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential distribution) ของอนุภาคที่แคบอีกด้วย (รูปที่ 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 และ 4.8) ดังนั้นในการบรรจุในซินลงในอนุภาคนาโนจากไขมันแข็งชนิดอิมิวเตอร์ 900 จึงเลือกใช้ความดัน 1500 บาร์ของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ และใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ โซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมตามลำดับ



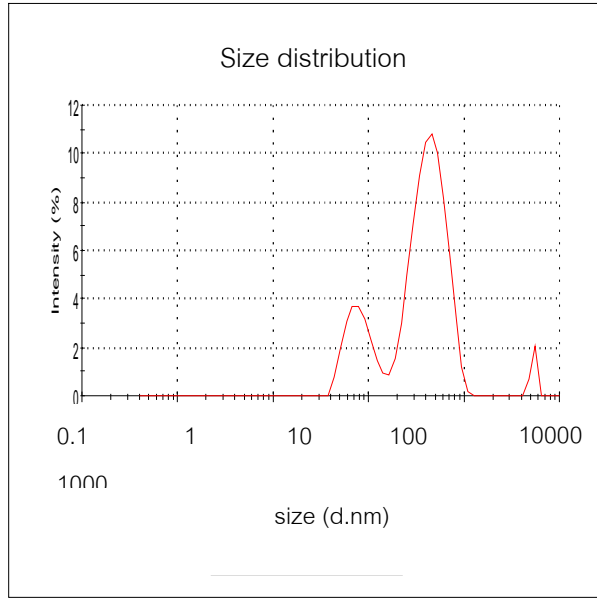
รูปที่ 4.1 ขนาดของอนุภาคนาโนชนิดไนมันแซ็งอิมิเตอร์ 900 ซึ่งเตรียมโดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 และ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 500, 1,000 และ 1,500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ในวันที่ 0, 7 และ 14



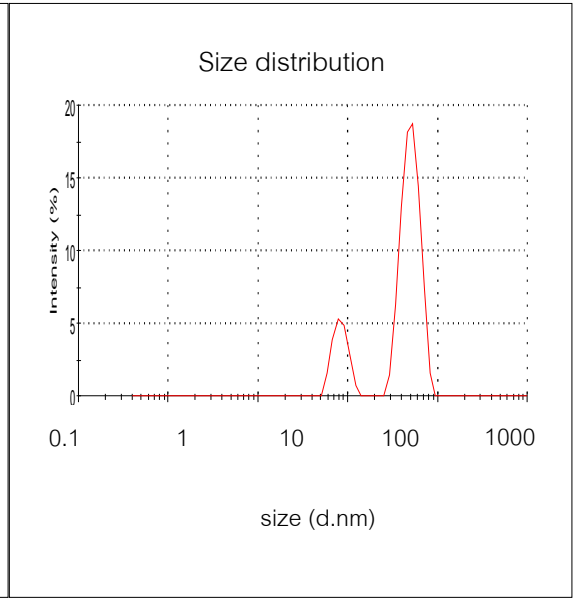


รูปที่ 4.2 ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 ซึ่งเตรียมโดยใช้พอลีอากาเมออร์ 188 ร้อยละ 2.5 และ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 500, 1,000 และ 1,500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลต ร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ในวันที่ 0, 7 และ 14

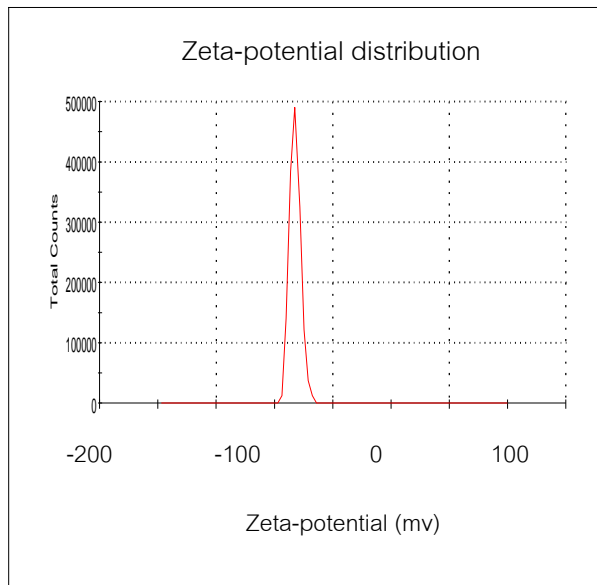
ก



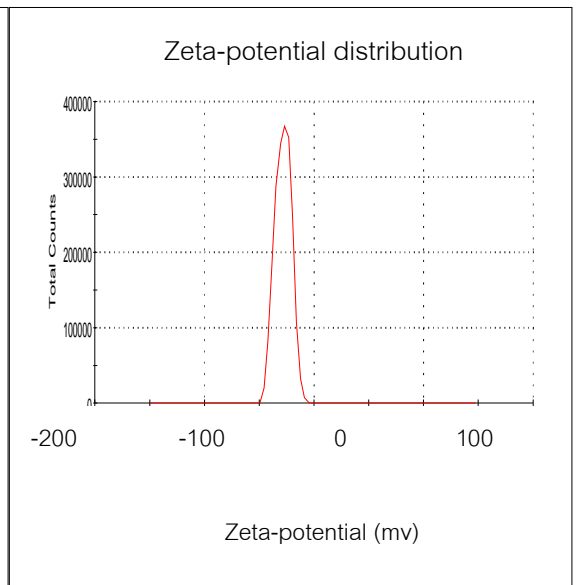
ข



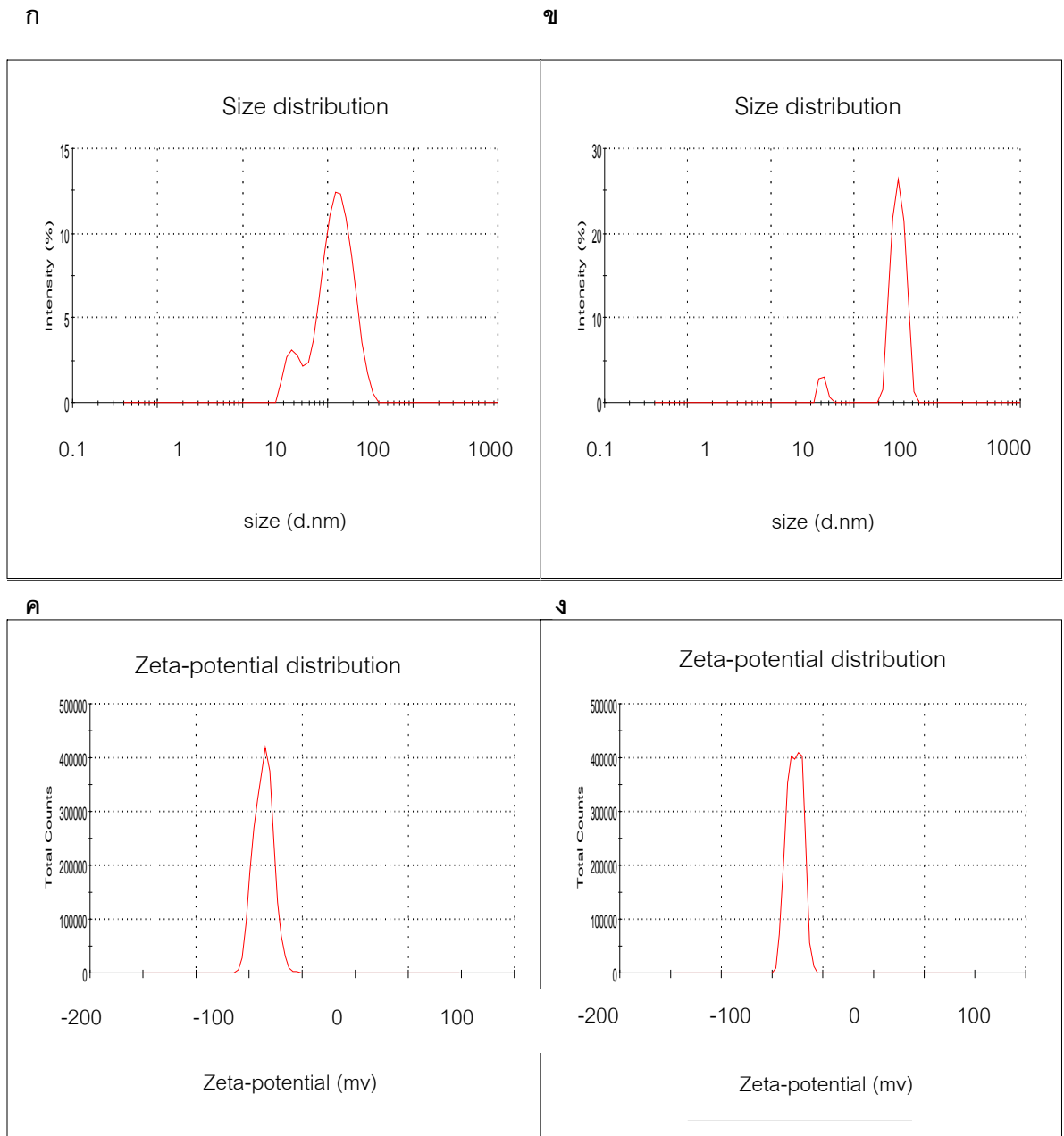
ค



ง



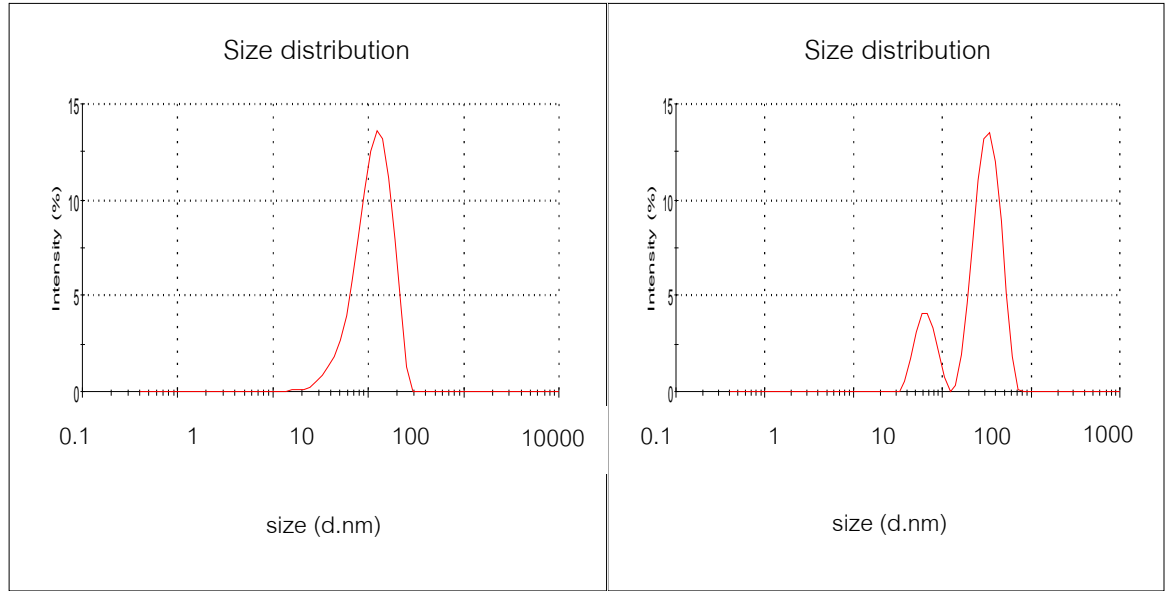
รูปที่ 4.3 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง อิมิวเตอร์ 900 โดยใช้พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14



รูปที่ 4.4 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง อิมิวเตอร์ 900 โดยใช้ฟอสฟอลิปิด 188 ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 1,000 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14

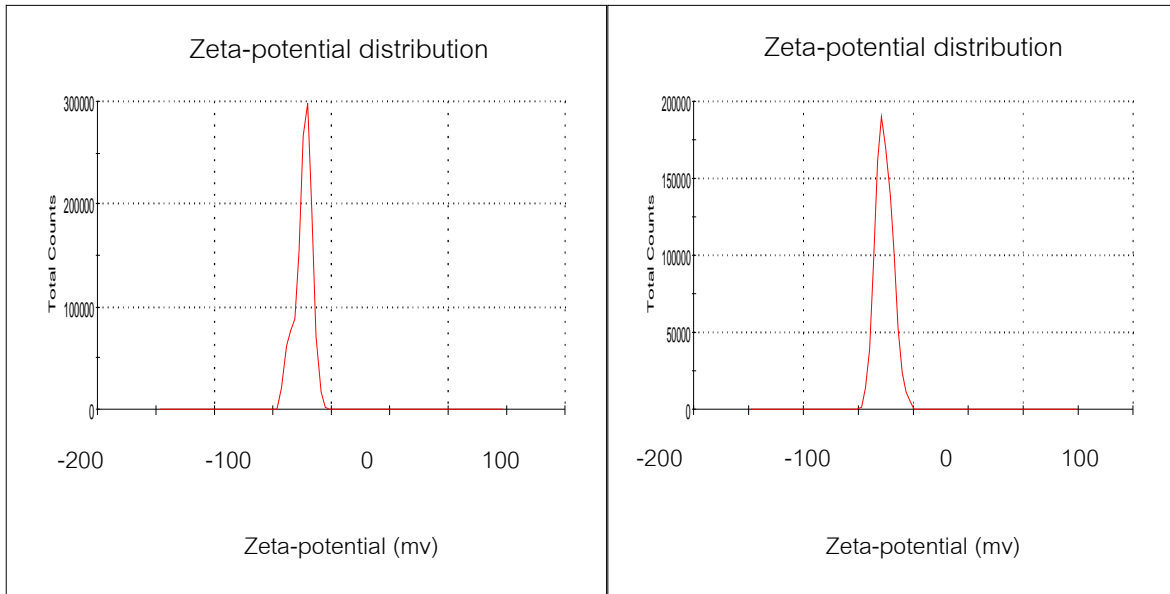
ก

ข



ค

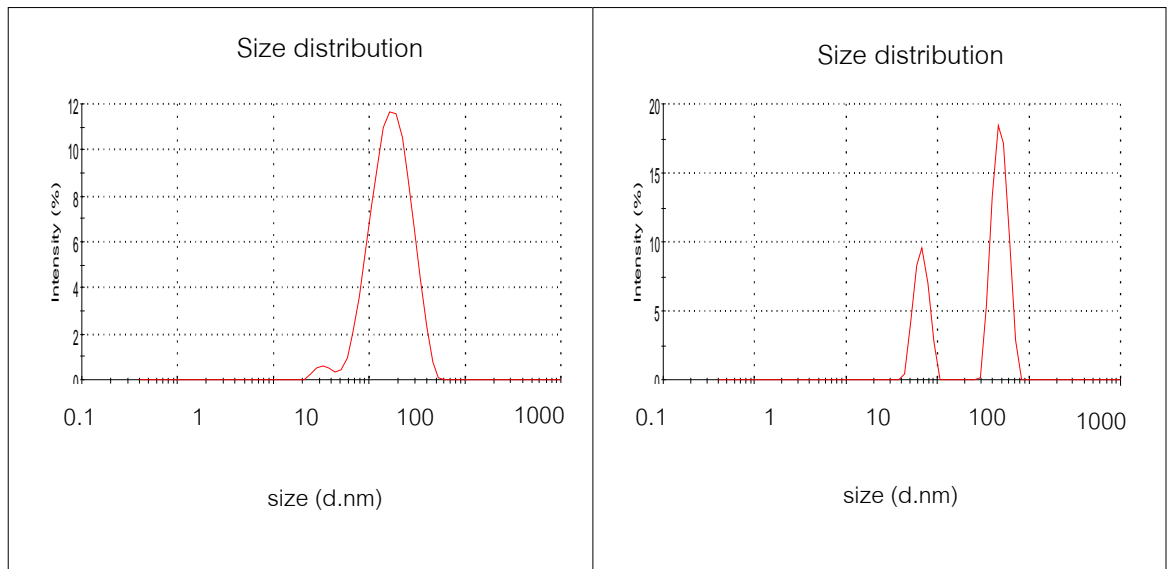
ง



รูปที่ 4.5 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง อิมิวเตอร์ 900 โดยใช้ฟอสฟอลิปิด 188 ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 1,500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14

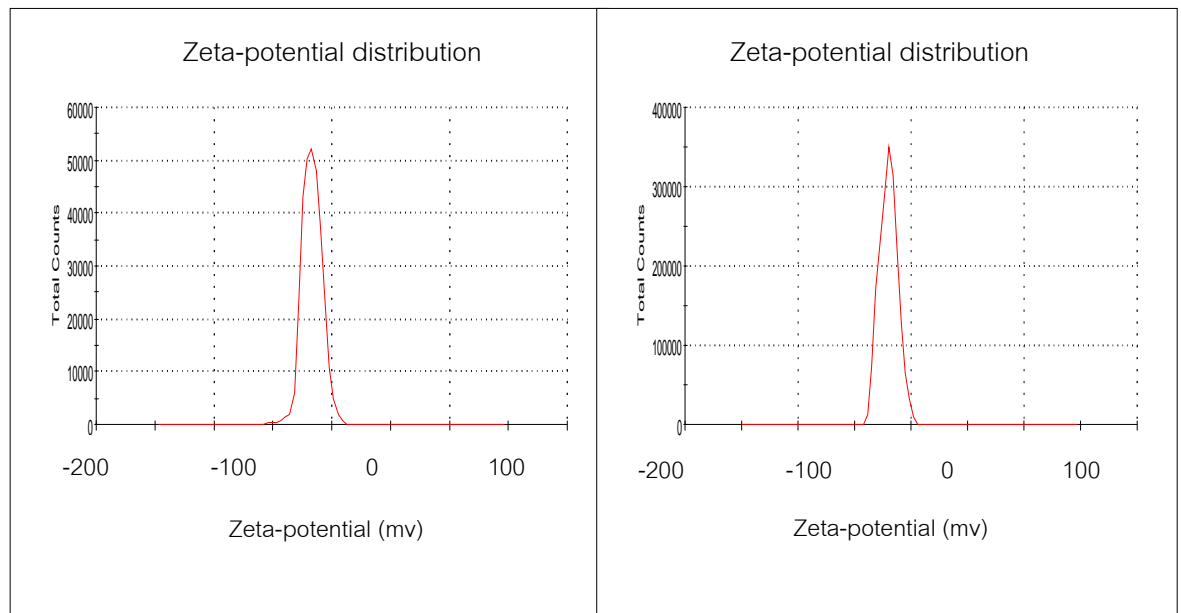
ก

ข



ค

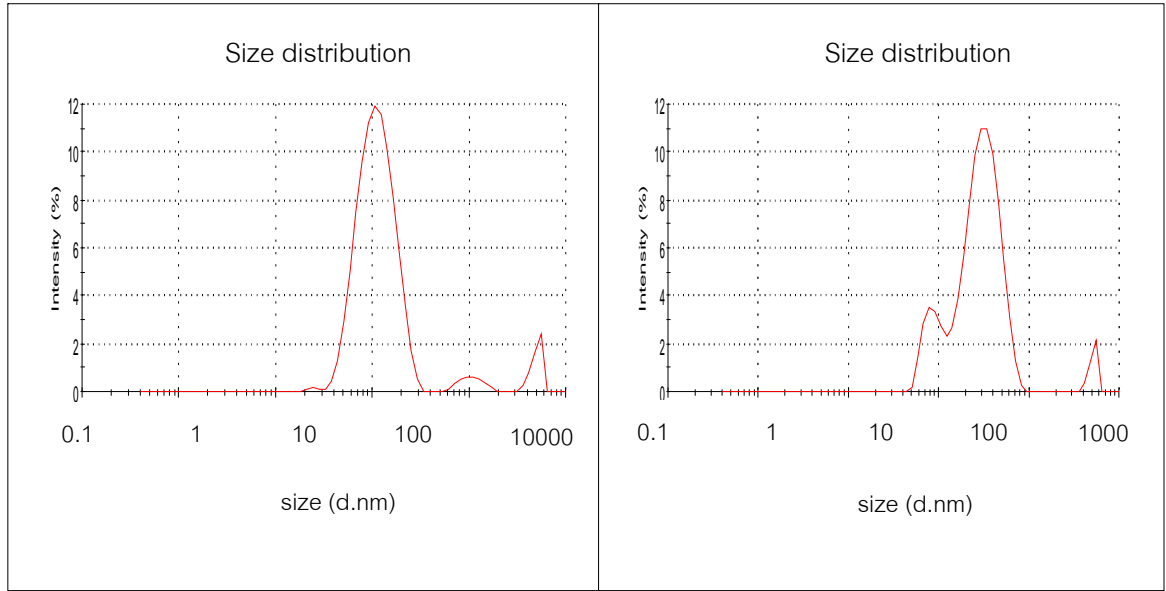
ง



รูปที่ 4.6 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง อิมิวเตอร์ 900 โดยใช้พอลิออกซามเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14

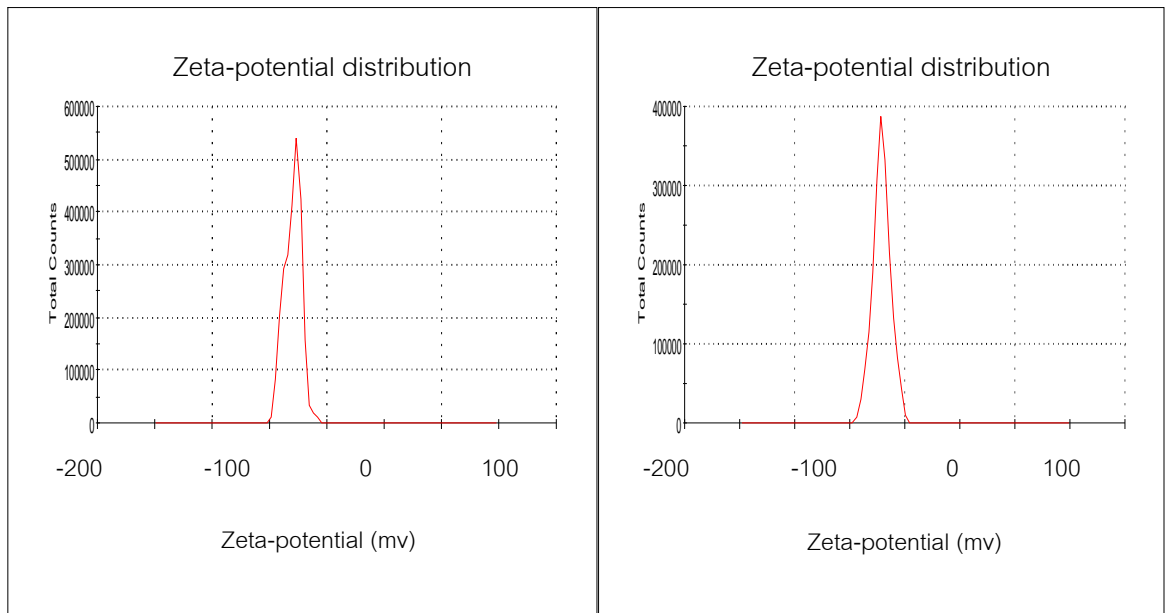
ก

ข



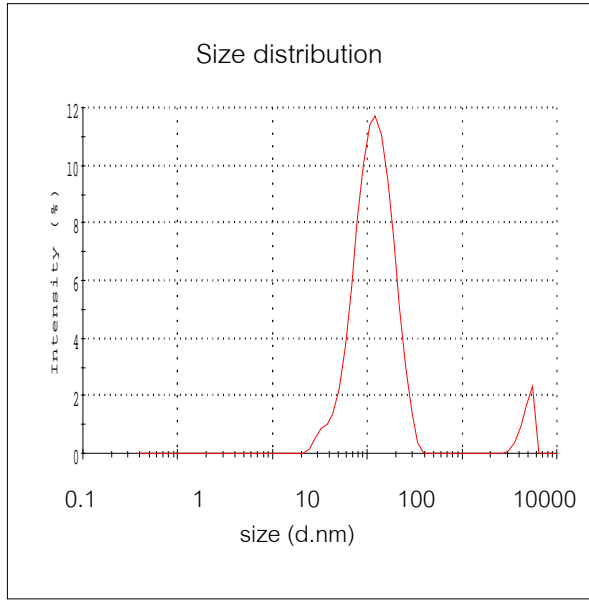
ค

ง

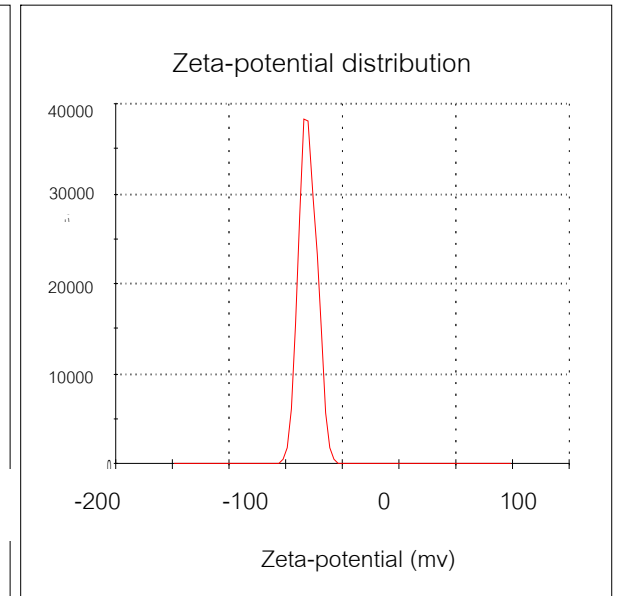
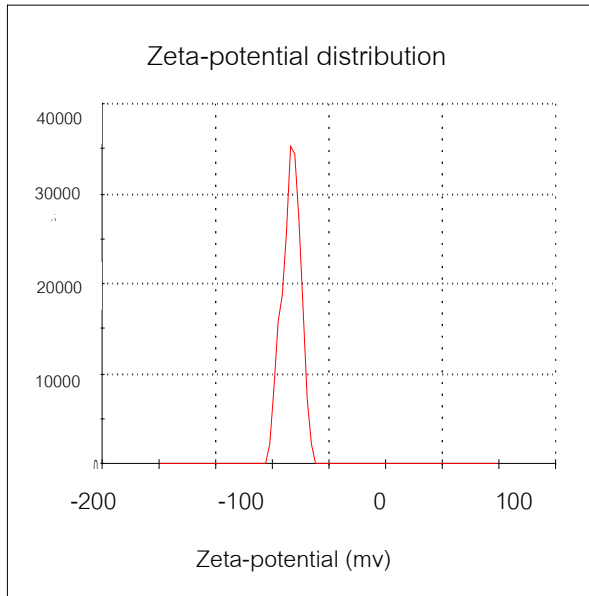
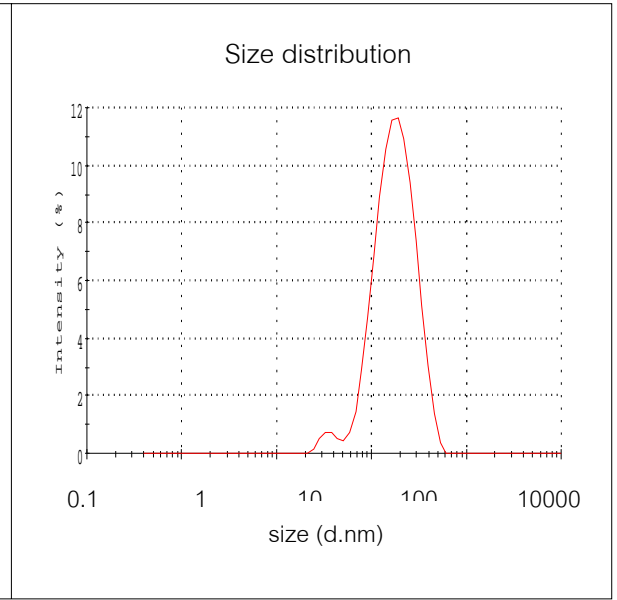


รูปที่ 4.7 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง อิมิวเตอร์ 900 โดยใช้ฟอสฟอลิอกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 1,000 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0 ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14.

ก



ข



รูปที่ 4.8 การกระจายขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง อิมิวเตอร์ 900 โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว ที่ความดัน 1,500 บาร์ โดยมีโซเดียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ก. การกระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 0 ข. การ

กระจายขนาดอนุภาคในวันที่ 14 ค. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 0  
ง. การกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวในวันที่ 14.

#### 4.3 ศึกษาความคงตัวด้านขนาดและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 ที่บรรจุในชิน ในระยะเวลา 28 วัน

ในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 ที่บรรจุในชิน โดยการใช้ภาวะความดัน 1500 บาร์ของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ และมีพอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กับ โซเดียมดีออกซีโคเลต 0.125% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ตามลำดับ อนุภาคที่เตรียมได้นั้นมีลักษณะเป็นของเหลวและมีความหนืดเล็กน้อย มีค่า Polydispersity index อยู่ระหว่าง 0.2-0.4 (ภาคผนวก) ซึ่งแสดงถึงความเป็นเนื้อเดียวกันของอนุภาค (รูปที่ 4.9)

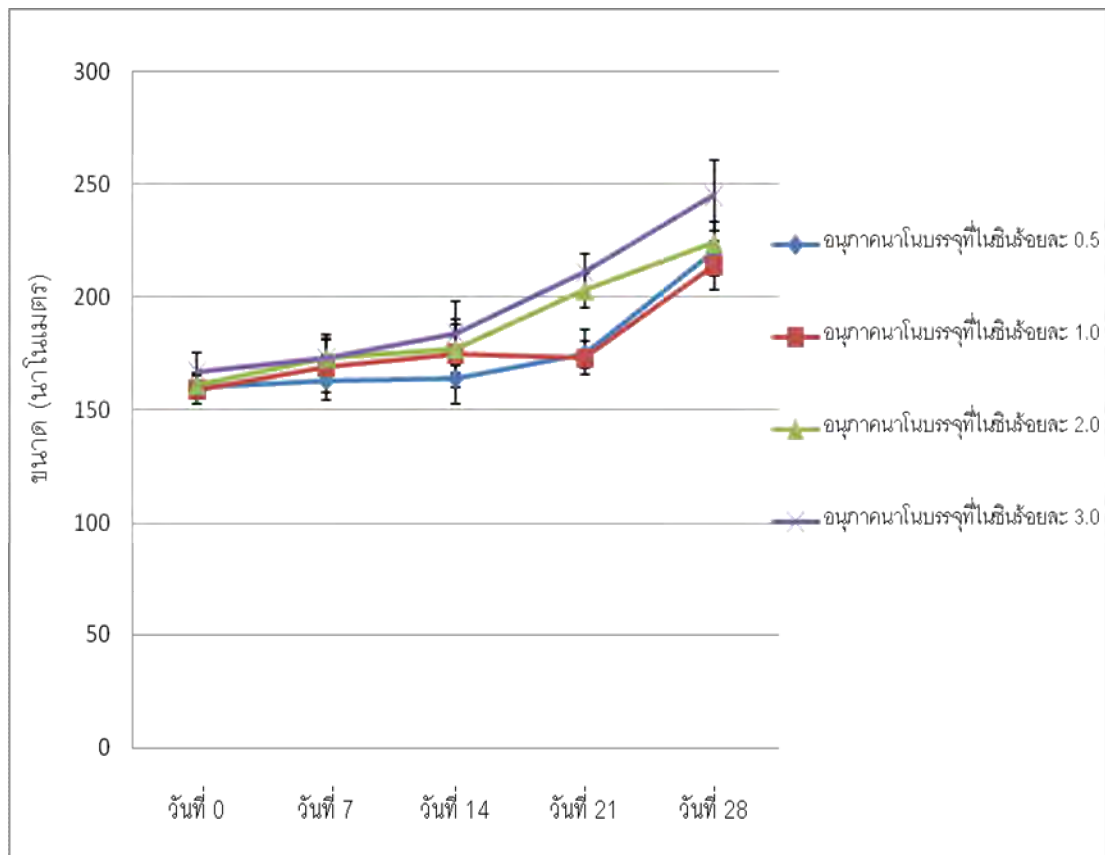


รูปที่ 4.9 อนุภาคนาโนไขมันแข็งบรรจุในชิน ซึ่งเตรียมได้จากภาวะความดัน 1500 บาร์ของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ และมีพอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และโซเดียมดีออกซีโคเลต 0.125% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ตามลำดับ

จากการวัดขนาดของอนุภาคด้วยเครื่องนาโนไฮเซอร์ ในวันแรกของการเตรียมอนุภาคนาโนที่บรรจุในชินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะมีขนาดเท่ากับ 160, 159, 161 และ

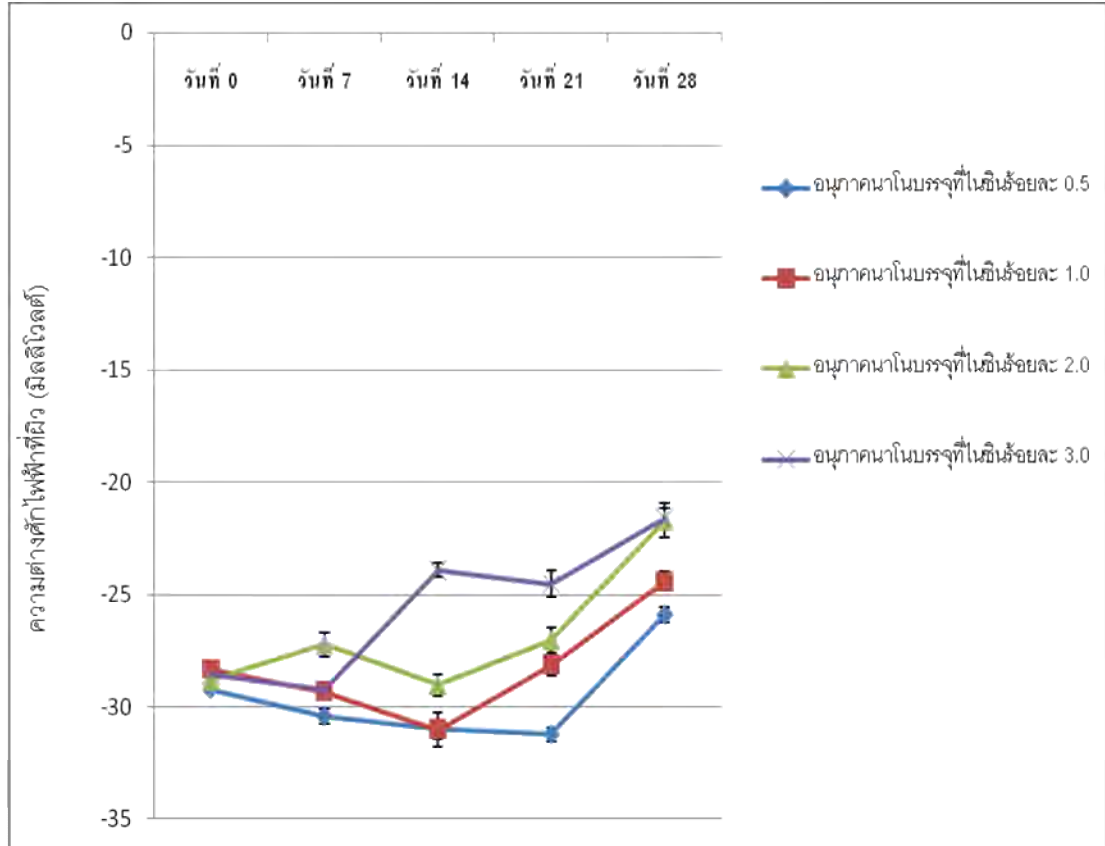


167 นาโนเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) โดยอนุภาคนาโนที่บรรจุในซินจะมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าอนุภาคนาโนที่ไม่ได้บรรจุในซิน ซึ่งมีขนาด 119 นาโนเมตรที่เตรียมได้ด้วยการใช้ความดันและความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวเดียวกัน (รูปที่ 4.1) เมื่อเก็บรักษาอนุภาคนาโนไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 28 วัน โดยทำการวัดขนาดอนุภาคทุกๆ 7 วัน เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาคนาโน พบว่าหลังจากการเก็บอนุภาคนาโนที่บรรจุในซินเป็นเวลา 21 วัน อนุภาคนาโนที่บรรจุในซินร้อยละ 0.5, 1.0 และ 2.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะมีการขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นเล็กน้อย ขณะที่อนุภาคนาโนที่บรรจุในซินร้อยละ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะมีขนาดที่เปลี่ยนไปมากที่สุดจากขนาด 167 นาโนเมตร ในวันที่ 0 เป็น 173, 184 และ 211 ในวันที่ 7, 14 และ 21 ลำดับ และหลังจากการเก็บอนุภาคนาโนไว้นาน 28 วัน พบว่าอนุภาคนาโนบรรจุในซินปริมาณร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็น 226, 214, 224 และ 245 นาโนเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 ขนาดของอนุภาคนาโนบรรจุในซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) หลังจากเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ

ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในวันแรกของการเตรียมอนุภาคมีค่าเท่ากับ -29.2, -28.3, -28.8, -28.5 มิลลิโวลต์ตามลำดับ โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจากค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนที่ไม่ได้บรรจุไนซิน ซึ่งมีค่า -34.0 มิลลิโวลต์ (รูปที่ 4.2) ที่การใช้ภาวะเดียวกันในการเตรียมอนุภาค จากนั้นทำการวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (zeta-potential) ทุกๆ 7 วันเป็นเวลา 28 วัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของอนุภาคนาโนเช่นเดียวกับขนาดอนุภาค จากผลการทดลองที่ได้จากเครื่องนาโนไฮเซอร์ พบว่าค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) จะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยภายใน 21 วัน ในการบรรจุไนซินลงในอนุภาคนาโนปริมาณร้อยละ 0.5, 1.0 และ 2.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ขณะที่การบรรจุไนซินลงในอนุภาคนาโนปริมาณร้อยละ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่วันที่ 14 หลังจากเก็บอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินไว้เป็นเวลา 28 วัน พบว่าอนุภาคจะมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในทุกความเข้มข้นของการบรรจุ ไนซินลงในอนุภาค โดยค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ในการบรรจุไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะเพิ่มขึ้นจาก -29.2, -28.3, -28.8, -28.5 มิลลิโวลต์ เป็น -25.9, -24.4, -21.7 และ -21.6 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.11) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องขนาดของอนุภาคนาโนที่ใหญ่ขึ้นในวันที่ 28 (รูปที่ 4.10) เนื่องจากค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ประจุที่ผิวของอนุภาคลดลงทำให้แรงผลักระหว่างอนุภาคลดลงเป็นสาเหตุให้อนุภาคเกาะกันมากขึ้น อนุภาคจึงมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินร้อยละ 3 จะมีขนาดใหญ่ขึ้นมากที่สุดในวันที่ 28 โดยเพิ่มขึ้นจาก 167 นาโนเมตร เป็น 245 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดเป็น -21.6 มิลลิโวลต์ ด้วย (รูปที่ 4.10 และ 4.11)



รูปที่ 4.11 ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโนบรรจุในชั้นร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ตามลำดับ

#### 4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุในซินด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

คำนวณหาปริมาณในซินที่บรรจุในอนุภาคนาโนจากกราฟมาตรฐานของในซิน พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซินที่เตรียมได้นั้น มีประสิทธิภาพการบรรจุในซินอยู่ระหว่างร้อยละ 69.2 ถึง 73.6 (ตารางที่ 4.2) โดยอนุภาคที่ทำการบรรจุในซินร้อยละ 2 (น้ำหนักในซิน/น้ำหนักไขมัน) นั้นสามารถบรรจุในซินลงในอนุภาคนาโนได้มากที่สุด 73.6 มิลลิกรัม หรือมีประสิทธิภาพในการบรรจุเท่ากับร้อยละ 73.6 ในขณะที่อนุภาคนาโนที่บรรจุในซินร้อยละ 3 (น้ำหนักในซิน/น้ำหนักไขมัน) จะมีประสิทธิภาพในการบรรจุต่ำที่สุดเท่ากับร้อยละ 69.2

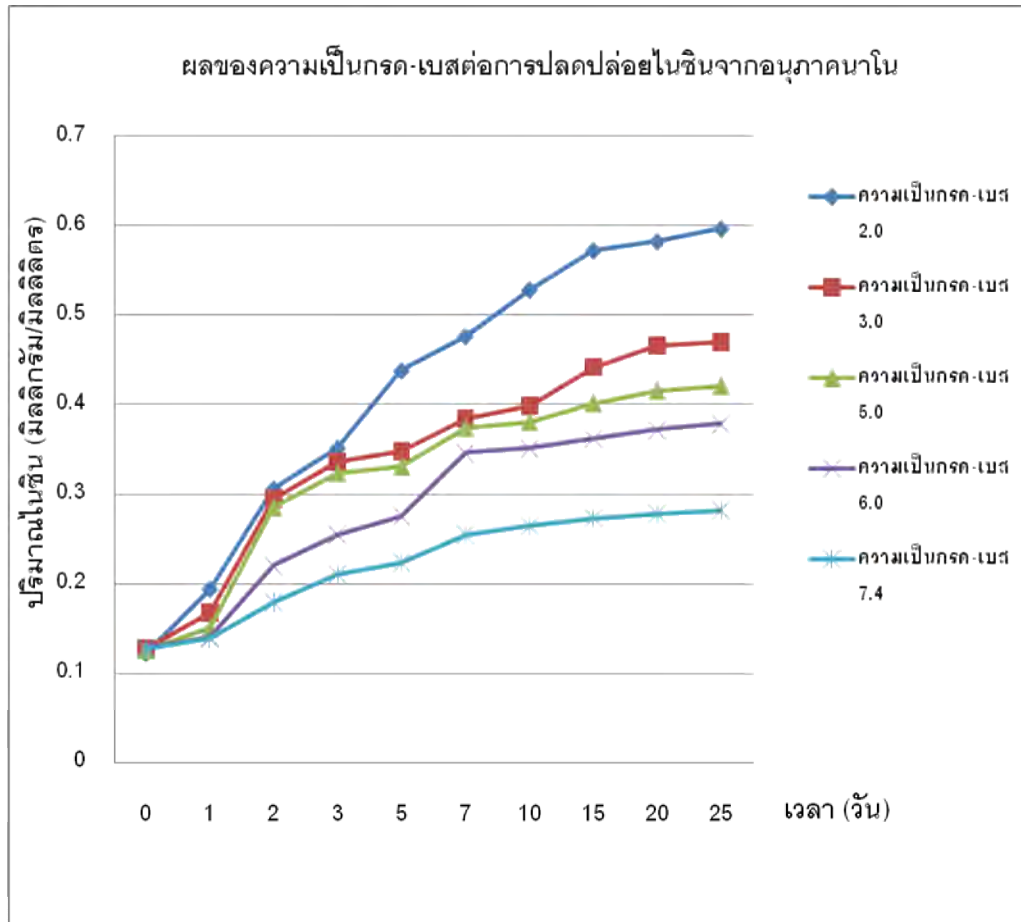
ตารางที่ 4.2 แสดงประสิทธิภาพการบรรจุในซินด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ปริมาณในซินที่ใส่ลงในอนุภาคนาโน (ร้อยละน้ำหนักในซิน/น้ำหนักไขมัน)	ปริมาณในซินที่ใส่เริ่มต้น (มิลลิกรัม)	ปริมาณในซินเฉลี่ยที่ตรวจพบจากเครื่อง HPLC (มิลลิกรัม)	ประสิทธิภาพในการบรรจุในซิน (ร้อยละ)
0.5	25	18.1	72.3
1.0	50	35.1	70.1
2.0	100	73.6	73.6
3.0	150	103.5	69.2

#### 4.5 การศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อการปล่อยในซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ศึกษาผลของความเป็นกรด-เบสต่อการปล่อยในซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง อิมิวเตอร์ 900 ที่บรรจุในซินร้อยละ 2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ด้วยการบ่มอนุภาคนาโนกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-เบสที่ 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 จากรูป 4.11 พบว่าอนุภาคนาโนสามารถปล่อยในซิน

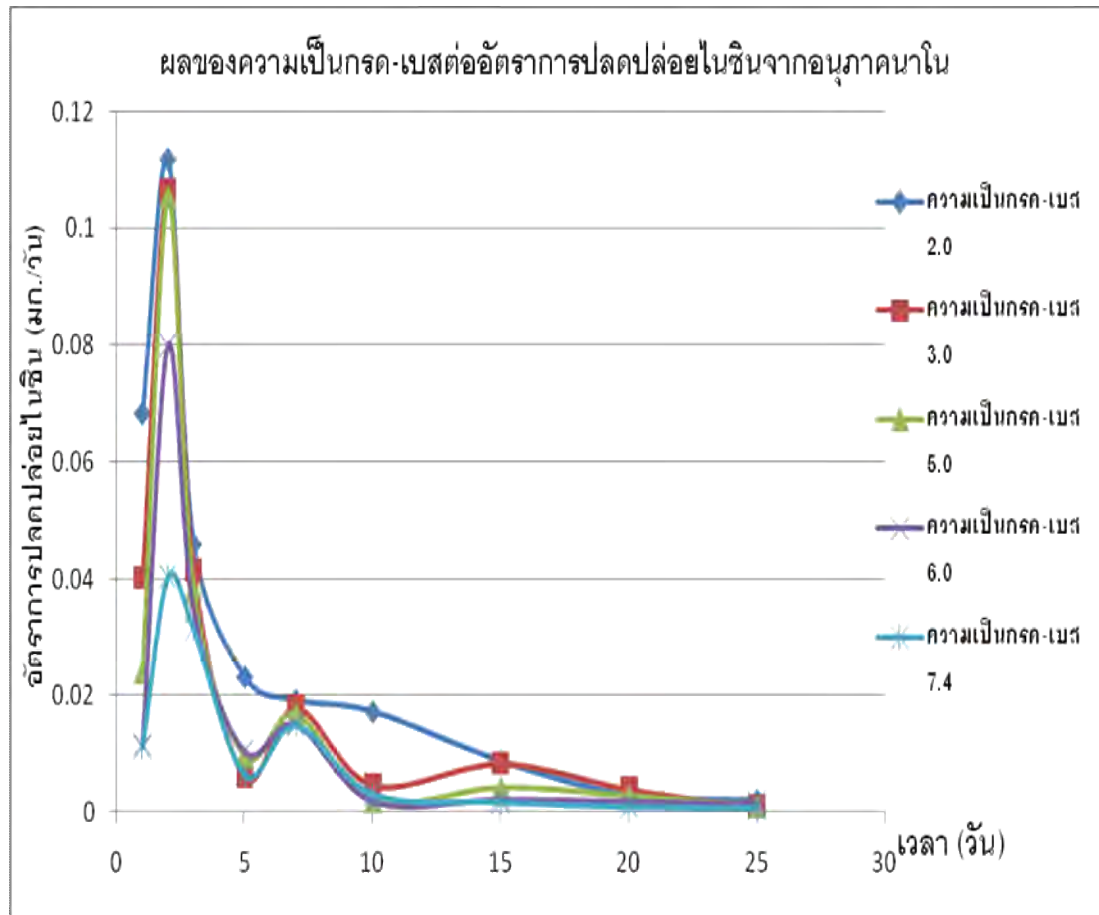
ออกมาได้ตั้งแต่เริ่มต้นบ่มอนุภาคกับบัพเฟอร์ โดยในวันที่ 0 ปริมาณไนซินเริ่มต้นที่ตรวจพบในแต่ละค่าความเป็นกรด-เบสของบัพเฟอร์จะมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 0.125, 0.127, 0.125, 0.128 และ 0.127 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) และจะมีปริมาณสะสมเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 15, 20, และ 25 โดยที่ปริมาณไนซินสะสมในการบ่มอนุภาคกับบัพเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำจะมีปริมาณไนซินสะสมมากกว่าการบ่มอนุภาคกับบัพเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสสูง (รูปที่ 4.12) ซึ่งในวันที่ 25 จะมีปริมาณไนซินสะสมสูงสุด 0.596, 0.469, 0.420, 0.378 และ 0.281 มิลลิกรัม ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-เบสยังมีผลต่อการลดลงของอัตราการปล่อยไนซินจากอนุภาคอีกด้วย ซึ่งในวันที่ 1 จะมีอัตราการปล่อยไนซินเป็น 0.0684, 0.0402, 0.0241, 0.0115 และ 0.0112 มิลลิกรัม/วัน ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ตามลำดับ และจะมีอัตราการปล่อยไนซินเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 คือ 0.1120, 0.1067, 0.1053, 0.0800 และ 0.0405 มิลลิกรัม/วัน ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ตามลำดับ ซึ่งเป็นอัตราการปล่อยไนซินสูงที่สุดในการทดลอง (ตารางที่ 4.4) หลังจากนั้นอัตราการปล่อยไนซินจะลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลโดยการบ่มอนุภาคกับบัพเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำจะมีอัตราการการปล่อยไนซินลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลที่เร็วกว่า อัตราการการปล่อยไนซินที่ลดลงของการบ่มอนุภาคกับบัพเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสสูง (รูปที่ 4.13) โดยในวันที่ 25 อัตราการปล่อยไนซินจะลดลงเหลือ 0.0020, 0.009, 0.0011 และ 0.0008 มิลลิกรัม/วัน ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)



รูปที่ 4.12 การปลดปล่อยไนจีนจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ แปรผันค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไนซิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ปล่อยจากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟต  
 บัฟเฟอร์ 0.002 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 เป็น  
 เวลา 25 วัน

ปริมาณไนซิน มก./มล.	เวลา (วัน)									
	0	1	2	3	5	7	10	15	20	25
ความเป็นกรด-เบส 2.0	0.125	0.193	0.305	0.351	0.438	0.476	0.528	0.572	0.582	0.596
ความเป็นกรด-เบส 3.0	0.127	0.167	0.294	0.336	0.348	0.384	0.398	0.441	0.465	0.469
ความเป็นกรด-เบส 5.0	0.125	0.149	0.284	0.323	0.330	0.374	0.380	0.401	0.415	0.420
ความเป็นกรด-เบส 6.0	0.128	0.140	0.220	0.254	0.275	0.345	0.351	0.362	0.371	0.378
ความเป็นกรด-เบส 7.4	0.127	0.138	0.178	0.210	0.223	0.254	0.264	0.273	0.278	0.281



รูปที่ 4.13 ผลของค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 ต่ออัตราการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินร้อยละ 2



ตารางที่ 4.4 อัตราการปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนอนุภาคนาโน ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 2.0, 3.0, 5.0, 6.0 และ 7.4 เป็นเวลา 25 วัน

อัตรา (มก./วัน) เวลา (วัน)	ความเป็น กรด-เบส 2.0	ความเป็น กรด-เบส 3.0	ความเป็น กรด-เบส 5.0	ความเป็น กรด-เบส 6.0	ความเป็น กรด-เบส 7.4
1	0.0684	0.0402	0.0241	0.0115	0.0112
2	0.1120	0.1067	0.1053	0.0800	0.0405
3	0.0460	0.0415	0.0384	0.0345	0.0314
5	0.0233	0.0061	0.0096	0.0104	0.0064
7	0.0193	0.0181	0.0169	0.0151	0.0150
10	0.0173	0.0047	0.0020	0.0019	0.0031
15	0.0088	0.0084	0.0042	0.0022	0.0018
20	0.0028	0.0040	0.0030	0.0019	0.0010
25	0.0020	0.0009	0.0011	0.0014	0.0008

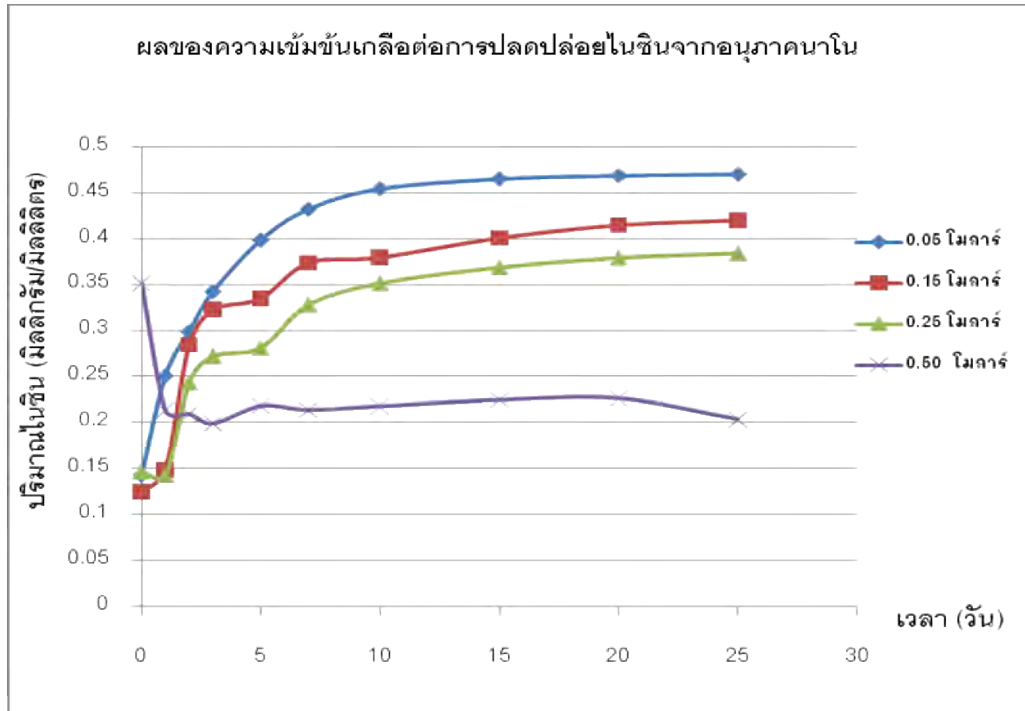
#### 4.6 การศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ศึกษาการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมูวิทอร์ 900 ที่บรรจุไนซิน 2% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ด้วยการบ่มอนุภาคนาโนกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสที่ 5.0 ทำการแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.50 โมลาร์ จากรูป 4.14 พบว่าอนุภาคนาโนสามารถปล่อยไนซินออกมาได้ตั้งแต่เริ่มต้นบ่มอนุภาคกับบัฟเฟอร์ โดยในวันที่ 0 ปริมาณไนซินเริ่มต้นที่ปล่อยออกมาในความเข้มข้น

เกลือ 0.05, 0.15, 0.25 จะมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 0.125, 0.126 และ 0.146 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 1 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นเกลือ 0.05 โมลาร์ อนุภาคนาโนจะมีปริมาณไนซินสะสมเพิ่มเป็น 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณไนซินสะสมที่ความเข้มข้นเกลือ 0.15 และ 0.25 ที่มีปริมาณไนซินสะสมใกล้เคียงกันคือ 0.149 และ 0.148 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) ต่อมาในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นเกลือ 0.15 โมลาร์ จะมีปริมาณไนซินสะสมเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับความเข้มข้นเกลือ 0.05 โมลาร์ จากนั้นในวันที่ 5 ถึง วันที่ 25 ของการทดลอง ผลของความเข้มข้นเกลือต่อปริมาณไนซินสะสมจะแยกกันให้เห็นชัดเจน โดยที่ความเข้มข้นเกลือ 0.05 โมลาร์ จะมีปริมาณไนซินสะสมมากกว่าความเข้มข้นเกลือ 0.15 โมลาร์ และ ความเข้มข้นเกลือ 0.15 โมลาร์ จะมีปริมาณไนซินสะสมมากกว่าความเข้มข้นเกลือ 0.25 โมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) จากตาราง 4.6 พบว่าในวันแรกของการทดลองความเข้มข้นเกลือ 0.05 โมลาร์จะมีอัตราการปล่อยไนซินจากอนุภาคเป็น 0.1254 มิลลิกรัม/วัน ซึ่งสูงกว่าที่ความเข้มข้นเกลือ 0.15 และ 0.25 โมลาร์ ที่มีอัตราการปล่อยไนซินจากอนุภาคเป็น 0.0241 และ 0.0014 มิลลิกรัม/วัน ตามลำดับ ต่อมาในวันที่ 2 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นเกลือ 0.05 โมลาร์จะมีอัตราการปล่อยไนซินลดลงเป็น 0.0482 มิลลิกรัม/วัน ในขณะที่อัตราการปล่อยไนซินที่ความเข้มข้นเกลือ 0.15 และ 0.25 โมลาร์ จะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.1053 และ 0.095 มิลลิกรัม/วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นอัตราการปล่อยไนซินจะลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลโดยการบ่มอนุภาคกับ บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.05 จะมีอัตราการการปล่อยไนซินลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลเร็วกว่า ที่ความเข้มข้นเกลือ 0.15 และ 0.25 โมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) โดยในวันที่ 25 อัตราการปล่อยไนซินจะลดลงเหลือ 0.0003, 0.0011 และ 0.0011 มิลลิกรัม/วัน ที่ค่าความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.15, 0.25 โมลาร์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

ส่วนความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.50 โมลาร์ เมื่อเริ่มต้นบ่มไนซินกับอนุภาคนาโน ไนซินจะถูกปล่อยออกมาจากอนุภาคในปริมาณสูงกว่าความเข้มข้นเกลือค่าอื่นๆ มาก โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.352 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปริมาณ ไนซินจะลดลงทันทีในวันที่ 1 ของการทดลอง โดยเหลือปริมาณไนซิน 0.214 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อมาในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลอง ปริมาณไนซินจะลดลงอีก โดยมีปริมาณไนซิน 0.210 และ 0.199 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งในช่วงเวลานี้แสดงให้เห็นว่าไนซินไม่สามารถปล่อยออกมาจากอนุภาคได้ และเกิดการสลายตัวของไนซินเนื่องจากปริมาณไนซินสะสมลดลงที่อัตรา -0.138, -0.0038 และ -0.0106 มิลลิกรัม/วัน ตามลำดับ ซึ่งปริมาณไนซินจะเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 5 ของการทดลอง แต่ปริมาณไนซินจะลดลงอีกครั้งในวันที่ 7 ที่อัตราการสลายตัว -0.0025 มิลลิกรัม/วัน จากนั้นปริมาณไนซินจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 10, 15 และ 20 ของการทดลอง โดยมีอัตราการปล่อยไนซินเป็น 0.013, 0.013 และ 0.004

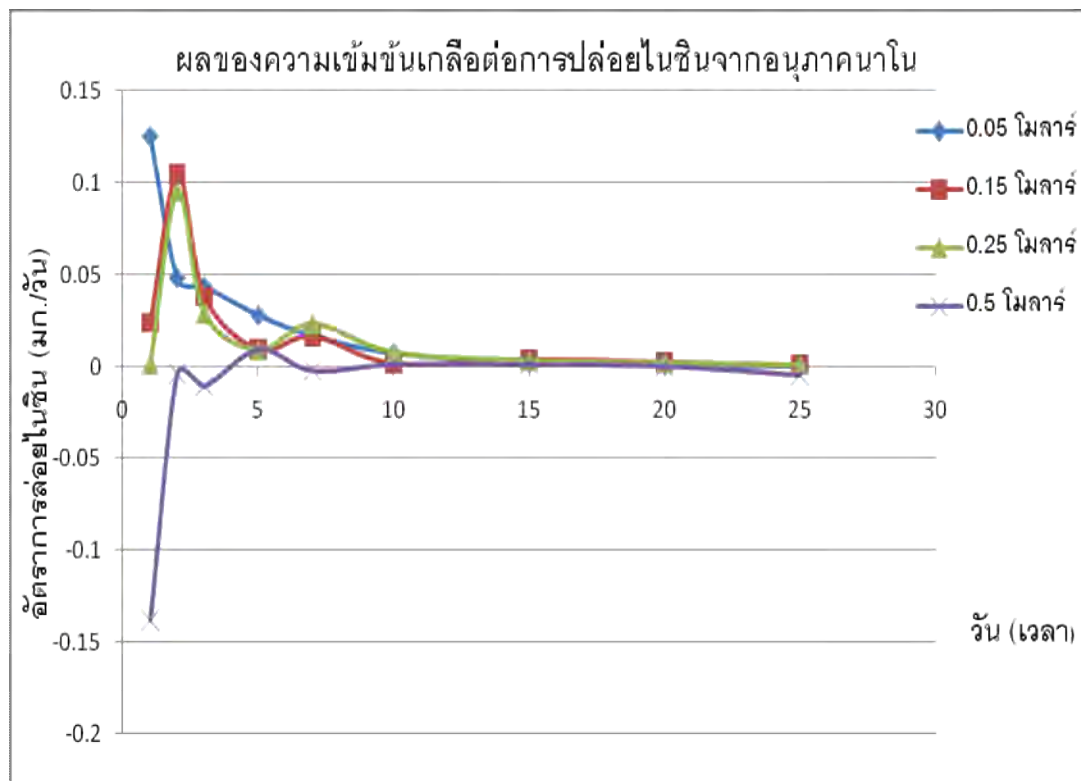
มิลลิกรัม/วัน ตามลำดับ และในวันที่ 25 ของการทดลองจะมีปริมาณไนซินลดลงเหลือ 0.204 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือคิดเป็นอัตราการสลายตัว -0.045 มิลลิกรัม/วัน



รูปที่ 4.14 การปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 ไมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 โดยแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.50 ไมลาร์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ปริมาณไนซิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ปล่อยจากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 ไมลาร์ ที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.5 ไมลาร์ เป็นเวลา 25 วัน

ปริมาณไนซิน (มก./ เมล็ด) เกลือ (โมลาร์)	เวลา (วัน)									
	0	1	2	3	5	7	10	15	20	25
0.05	0.125	0.250	0.298	0.342	0.398	0.432	0.454	0.465	0.468	0.470
0.15	0.126	0.149	0.284	0.323	0.335	0.374	0.380	0.401	0.415	0.420
0.25	0.146	0.148	0.243	0.272	0.281	0.327	0.351	0.368	0.379	0.384
0.5	0.352	0.214	0.210	0.199	0.218	0.214	0.218	0.225	0.226	0.204



รูปที่ 4.15 ผลของความเข้มข้นเกลือต่อการปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโน  
ซินจากอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินร้อยละ 2

ตารางที่ 4.6 อัตราการปล่อยไนซิน (มิลลิกรัม/วัน) จากอนุภาคนาโนในสารละลายฟอสเฟต  
 บัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่มีความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.15, 0.25 และ 0.5 โมลาร์ เป็น  
 เวลา 25 วัน

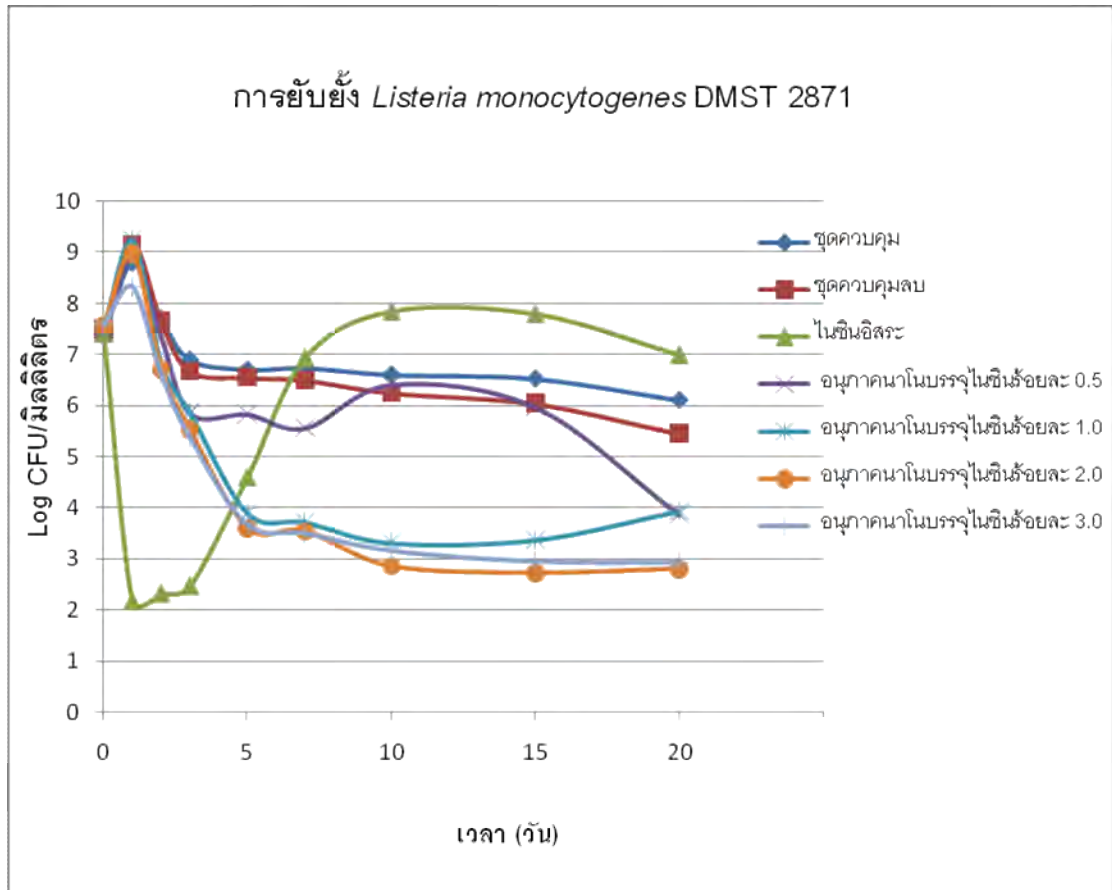
อัตรา (มก./วัน) เวลา (วัน)	ความเข้มข้นเกลือ			
	0.05 โมลาร์	0.15 โมลาร์	0.25 โมลาร์	0.50 โมลาร์
1	0.1254	0.0241	0.0014	-0.1382
2	0.0482	0.1053	0.0950	-0.0038
3	0.0436	0.0384	0.0289	-0.0106
5	0.0280	0.0096	0.0092	0.0096
7	0.0169	0.0169	0.0233	-0.0025
10	0.0074	0.0020	0.0078	0.0013
15	0.0022	0.0042	0.0034	0.0013
20	0.0007	0.0028	0.0021	0.0004
25	0.0003	0.0011	0.0010	-0.0045

#### 4.7 ทดสอบแอกทิวิตีชีวภาพของไนซินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งต่อ *Listeria monocytogenes* DMST 2871

ทำการทดสอบแอกทิวิตีชีวภาพของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 เปรียบเทียบกับไนซินอิสระต่อ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ที่เติมเชื้อ แต่ไม่มีการเติมอนุภาคนาโนเป็นชุดควบคุมและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม *Listeria monocytogenes* DMST 2871 และมีการเติมอนุภาคนาโนซึ่งไม่มีไนซินบรรจุอยู่เป็นชุดควบคุมลบ จากผลการทดลองในรูปที่ 4.16 พบว่าภายในวันแรกของการทดลองไนซินอิสระสามารถลดปริมาณ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ได้ประมาณ 6 log CFU/มิลลิลิตร จากเชื้อในชุดทดลองควบคุมซึ่งมีปริมาณเชื้อ  $7.6 \times 10^8$  CFU/มิลลิลิตร และสามารถแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อได้นาน 3 วัน หลังจากนั้นในวันที่ 5 เชื้อจะเริ่มกลับมาเจริญใหม่

และเจริญสูงสุดในวันที่ 10 โดยมีปริมาณเชื้อ  $7.1 \times 10^7$  CFU/มิลลิลิตร จากนั้นปริมาณเชื้อจะเริ่มคงที่และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 20 ขณะที่อนุภาคนาโนที่บรรจุในซินร้อยละ 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะไม่สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ได้ทันทีในวันที่ 1 และ 2 ของการทดลอง แต่จะเริ่มยับยั้งเชื้อได้เล็กน้อยประมาณ 1 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในวันที่ 3 และจะเริ่มยับยั้งเชื้อได้อย่างชัดเจนในวันที่ 5 โดยจะมีปริมาณเชื้อลดลงประมาณ 3 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นอนุภาคนาโนบรรจุในซินร้อยละ 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะทำให้ปริมาณเชื้อลดลงอีกเล็กน้อยและคงแอกทิวิตีที่ชีวภาพการยับยั้งเชื้อจนถึงวันที่ 20 โดยอนุภาคนาโนบรรจุในซินร้อยละ 2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดประมาณ 4 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 15 ขณะที่อนุภาคนาโนบรรจุในซินร้อยละ 1.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะมีการแอกทิวิตีที่ชีวภาพการยับยั้งเชื้อคงที่จากวันที่ 5 ถึงวันที่ 15 และเชื้อจะเริ่มกลับมาเจริญอีกเล็กน้อยในวันที่ 20

ส่วนอนุภาคนาโนบรรจุในซินร้อยละ 0.5 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะสามารถลดปริมาณเชื้อได้เล็กน้อยประมาณ 1 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 จากนั้นปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 จะเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับชุดทดลองควบคุม และปริมาณเชื้อจะลดลงอย่างชัดเจนในวันที่ 20 โดยจะยับยั้งเชื้อได้ประมาณ 2.3 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ชุดทดลองควบคุมลบยังแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนที่ไม่มีในซินบรรจุอยู่จะไม่สามารถการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ซึ่งแสดงว่าไขมันแข็งชนิดอิมิเตอร์ 900 ไม่มีผลกระทบต่อแอกทิวิตีของการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซินร้อยละ 1.0, 2.0 และ 3.0 จะมีแอกทิวิตีของการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ได้นานประมาณ 20 วัน ซึ่งสามารถคงแอกทิวิตีได้นานกว่าในซินอิสระที่มีแอกทิวิตีของการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ได้เพียง 3 วัน เท่านั้น

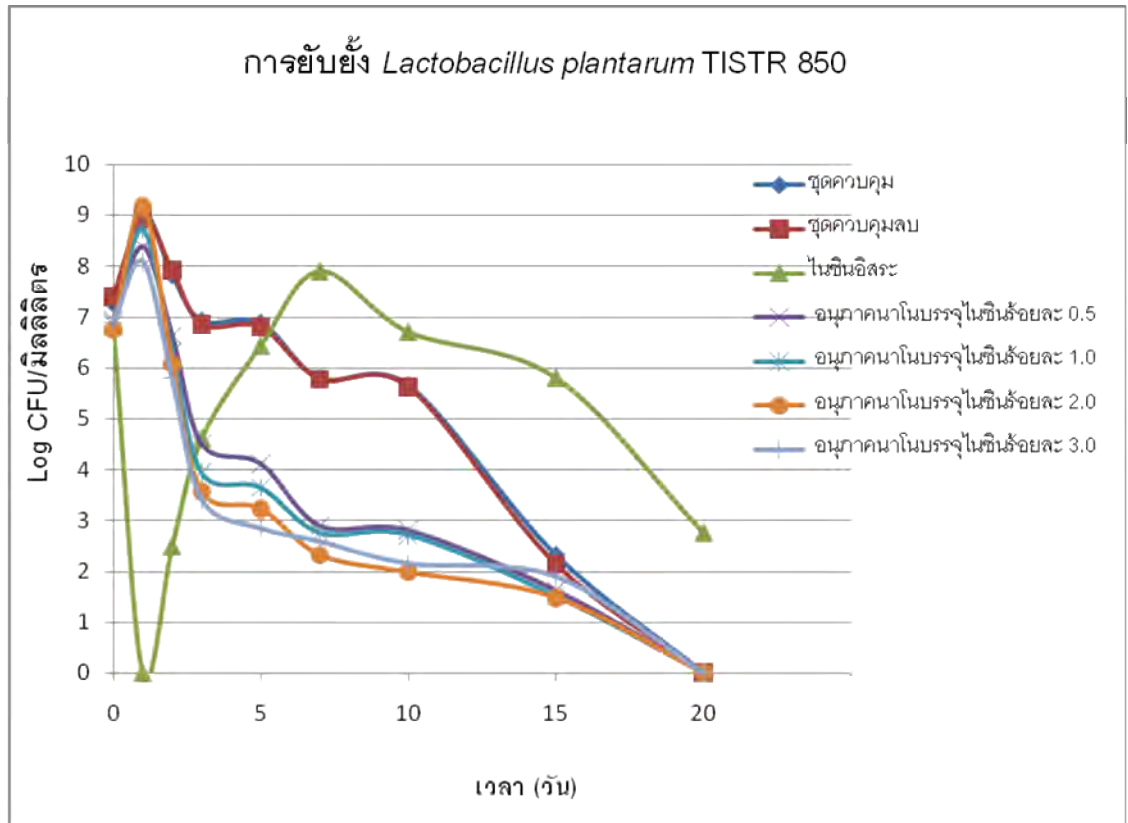


รูปที่ 4.16 การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ของอนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 เทียบกับโซเดียมคลอไรด์ในระยะเวลา 20 วัน

#### 4.8 ทดสอบแอกทิวิตีชีวภาพของโนซินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งต่อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850

ทำการทดสอบแอกทิวิตีชีวภาพของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุโนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 เปรียบเทียบกับโนซินอิสระต่อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติม *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 แต่ไม่มีการเติมอนุภาคนาโนเป็นชุดควบคุม และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเชื้อและมีการเติมอนุภาคนาโนซึ่งไม่มีโนซินบรรจุอยู่เป็นชุดควบคุมลบ จากรูปที่ 4.17 โนซินอิสระสามารถยับยั้งเชื้อได้เพียงในวันแรกของการทดลอง จากนั้นเชื้อจะกลับมาเจริญขึ้นอีกในวันที่ 2 และค่อยๆ เจริญเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7 ซึ่งมีปริมาณเชื้อสูงสุด  $7.9 \times 10^7$  CFU/มิลลิลิตร และปริมาณเชื้อจะลดลงอีกอย่างช้า ๆ จนถึงวันที่ 20 โดยจะมีปริมาณเชื้อเหลืออยู่  $5.8 \times 10^2$  CFU/มิลลิลิตร ขณะที่อนุภาคนาโนที่บรรจุโนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะเริ่มมีแอกทิวิตีการยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 เล็กน้อยในวันที่ 2 และการยับยั้งจะเห็นได้อย่างชัดเจนในวันที่ 3 โดยอนุภาคนาโนที่บรรจุโนซินร้อยละ 3.0 จะสามารถยับยั้งเชื้อให้มีปริมาณลดลงจากชุดควบคุมได้มากที่สุดประมาณ  $4 \log$  CFU/มิลลิลิตร และอนุภาคนาโนที่บรรจุโนซินร้อยละ 2.0, 1.0, และ 0.5 จะมีการยับยั้งเชื้อได้น้อยลงตามลำดับ ซึ่งอนุภาคนาโนที่บรรจุโนซินร้อยละ 0.5 จะสามารถยับยั้งเชื้อได้ประมาณ  $2.5 \log$  CFU/มิลลิลิตร แต่เมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 7 อนุภาคนาโนที่บรรจุโนซินร้อยละ 2.0 กลับสามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าอนุภาคนาโนที่บรรจุโนซินร้อยละ 3.0, 1.0 และ 0.5 ตามลำดับ และจะคงแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อจนถึงวันที่ 10 อย่างไรก็ตามในวันที่ 15 แม้อนุภาคนาโนที่บรรจุโนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 จะไม่ทำให้ปริมาณ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณเชื้อของชุดทดลองควบคุมจะลดลงมาใกล้เคียงกับอนุภาคนาโนบรรจุโนซิน ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าผลของการยับยั้งเชื้อมาจากโนซินที่ปล่อยจากอนุภาคหรือไม่ และเมื่อถึงวันที่ 20 *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ของชุดควบคุมลบ และอนุภาคนาโนบรรจุโนซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, และ 3.0 จะลดลงจนเป็นศูนย์ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ในการเจริญ จึงมีความอ่อนแอกว่า *Listeria monocytogenes* DMST 2871 และจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุโนซินร้อยละ 0.5 1.0, 2.0 และ 3.0 จะมีแอกทิวิตีของการยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ได้นานประมาณ 10 วัน ซึ่งสามารถคงแอกทิวิตีได้นานกว่าโนซินอิสระที่มีแอกทิวิตีของการยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ได้เพียง 2 วัน เท่านั้น



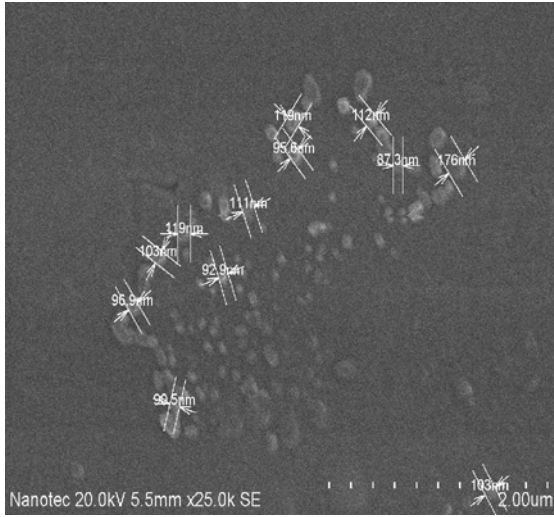


รูปที่ 4.17 การยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ของอนุภาคนาโนบรรจุไนซิน ร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 เทียบกับไนซินอิสระในระยะเวลา 20 วัน

#### 4.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความคงตัวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบกราด หลังจากการเก็บอนุภาคนาโนไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 7, 14 และ 28 วันพบว่ารูปร่างของอนุภาคจะมีลักษณะเป็นทรงกลม มีผิวเรียบ โดยในวันที่ 0 และวันที่ 7 ของการเตรียมอนุภาค อนุภาคนาโนบรรจุในซินร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 จะมีขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง 87-165 นาโนเมตร จากนั้นเมื่อในวันที่ 14 อนุภาคนาโนจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย แต่ยังคงมีลักษณะเป็นทรงกลม เมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 28 อนุภาคนาโนจะมีการบวมตัวทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 258-437 นาโนเมตรโดยที่อนุภาคนาโนบรรจุในซินร้อยละ 3 จะมีขนาดใหญ่ขึ้นมากที่สุด และจะเห็นว่าผิวของอนุภาคเริ่มมีการสลายตัวทำให้รูปทรงกลมของอนุภาคเสียไป (รูปที่ 4.18-4.21)

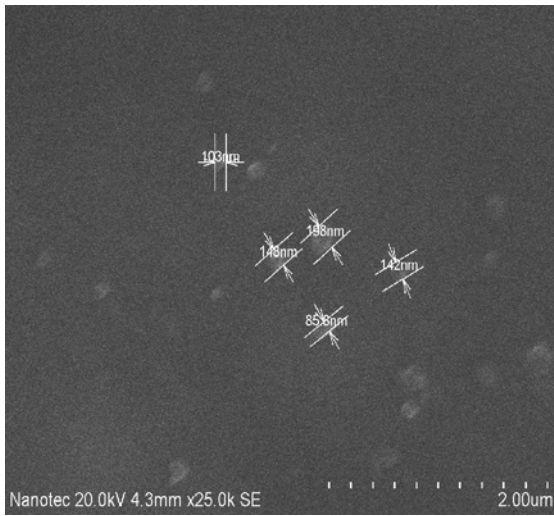
ก



ข



ค



ง

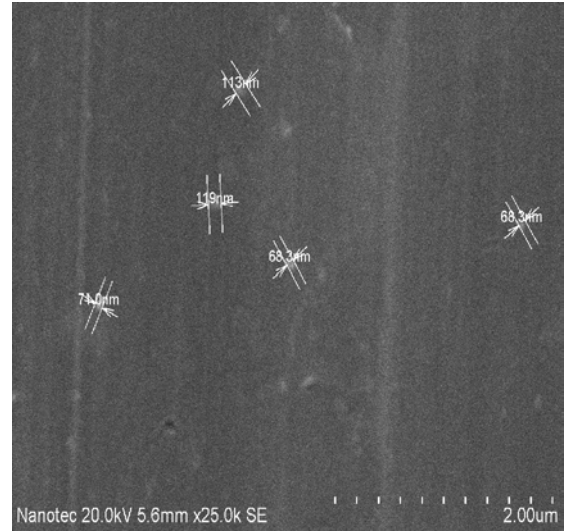


รูปที่ 4.18 อนุภาคนาโนบรจุไนซินร้อยละ 0.5 ก. 0 วัน, ข. 7 วัน, ค. 14 วัน และ ง. 28 วัน

ก



ข



ค



ง

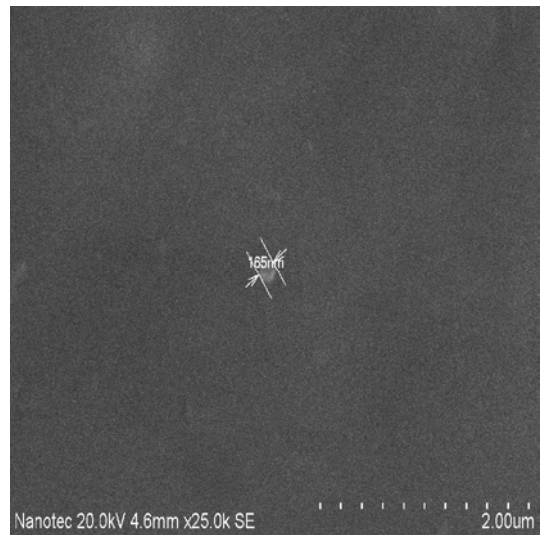


รูปที่ 4.19 อนุภาคนาโนบรจุไนซินร้อยละ 1.0 ก. 0 วัน, ข. 7 วัน, ค. 14 วัน และ ง. 28 วัน

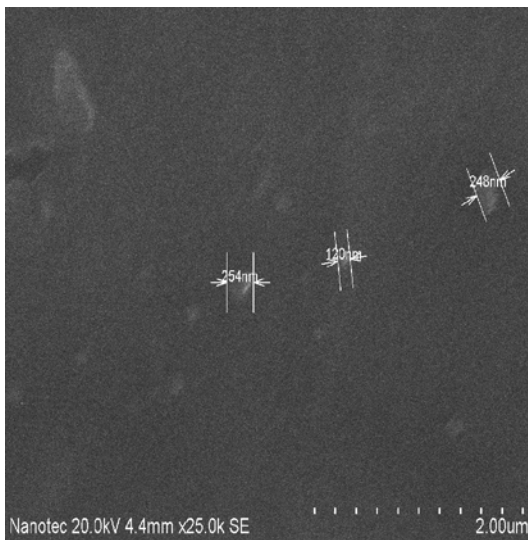
ก



ข



ค



ง

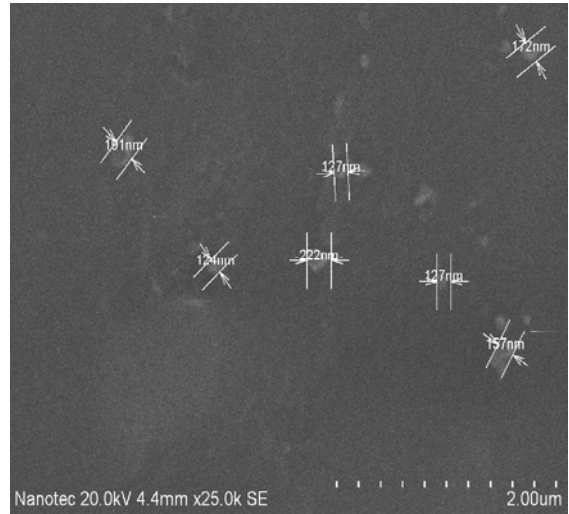


รูปที่ 4.20 อนุภาคนาโนบรรจุไนตินร้อยละ 2.0 ก. 0 วัน, ข. 7 วัน, ค. 14 วัน และ ง. 28 วัน

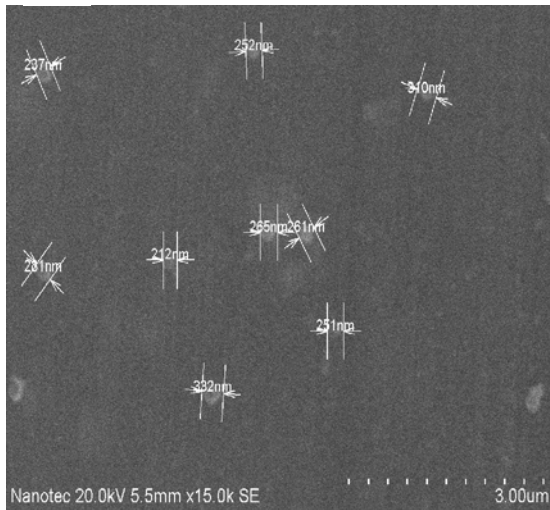
ก



ข



ค



ง



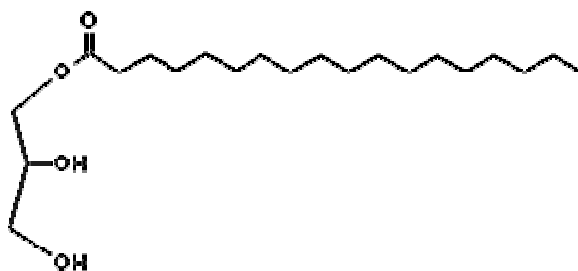
รูปที่ 4.21 อนุภาคนาโนบรรจุไนซินร้อยละ 3.0 ก. 0 วัน, ข. 7 วัน, ค. 14 วัน และ ง. 28 วัน

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ไนซินเป็นแบคทีเรียโอสินที่มีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและสปอร์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ นอกจากนี้องค์การอนามัยโลก (WHO) ยังรับรองให้ไนซินเป็นสารที่มีความปลอดภัยสามารถนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำไนซินมาใช้ป้องกันการเน่าเสียของอาหารและป้องกันเชื้อก่อโรคในอาหารต่างๆ ด้วยสาเหตุนี้ไนซินจึงเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ในปริมาณมาก แต่การเติมไนซินลงไปอาหารโดยตรงนั้นได้จำเป็นต้องใช้ไนซินปริมาณมากเพื่อที่จะสามารถคงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียไว้ได้นาน เนื่องจากไนซินจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์และองค์ประกอบต่างๆ ของอาหารทำให้สูญเสียแอกทิวิตีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไป (Antonio และคณะ, 2007) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มความเสถียรของไนซิน และทำให้แอกทิวิตีชีวภาพของไนซินคงอยู่ได้นานโดยบรรจุไนซินลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันมันแข็งและทำการทดสอบการปลดปล่อยของไนซินออกจากอนุภาคนาโนรวมทั้งทดสอบแอกทิวิตีชีวภาพของไนซินที่ถูกบรรจุอยู่ในอนุภาคนาโนเทียบกับไนซินอิสระ

ขั้นตอนแรกของการทดลองนี้ คือการเลือกชนิดไขมันที่มีความเหมาะสมในการนำมาบรรจุไนซิน โดยทำการทดสอบความสามารถในการละลายของไนซินในไขมันชนิดต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากไขมันที่ไนซินละลายได้ดีจะสามารถเก็บไนซินเอาไว้ภายในอนุภาคได้ในปริมาณสูง (Muller และคณะ, 1999) จากผลการทดลองพบว่า ไนซินสามารถละลายได้ในไขมันแข็งชนิดอิมิเตอร์ 900 หรือ กลีเซอรอลโมโนสเตียเรต (รูปที่ 5.1) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากการที่โมเลกุลของอิมิเตอร์ 900 มีปริมาณ โมโนกลีเซอไรด์สูงประมาณร้อยละ 40-50 (Soukharev, 2007) ทำให้โมเลกุลของไขมันชนิดนี้ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วมากกว่าไขมันจำพวกที่มีปริมาณของไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์สูง จึงทำให้สามารถละลายโมเลกุลของไนซินซึ่งประกอบด้วยทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่ขั้วได้ดีกว่าไขมันชนิดอื่นที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ โดยมีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ได้ใช้กลีเซอรอลโมโนสเตียเรตเป็นไขมันแข็งในการบรรจุไลโซไซม์ (Almeida และคณะ, 1997) โจนาดอรีลิน (Gonadorelin) (Hu และคณะ, 2003) อินซูลิน (Trotta และคณะ, 2004) และไซโคลสปอริน (Cyclosporine) (Muller และคณะ 2007) ลงในอนุภาคนาโน ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารจำพวก เพปไทด์เช่นเดียวกับไนซิน



รูปที่ 5.1 โครงสร้างของกลีเซอรอลโมโนสเตียเรต

หลังจากเลือกไขมันที่เหมาะสมในการบรรจุในซินได้แล้วก็ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเพื่อบรรจุในซินจากไขมันอิมิวเตอร์ 900 โดยทำการแปรผันภาวะที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อความคงตัวด้านขนาดและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคนาโน ได้แก่ ความดันของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว จากผลการทดลองพบว่า การใช้เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ที่ความดัน 1,500 บาร์ จำนวน 3 รอบ โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว และโซเดียมดีออกซีโคเลตเข้มข้นร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ตามลำดับ จะให้ขนาดอนุภาคที่เล็กและมีความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ต่ำ นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและประจุบนพื้นผิวน้อยที่สุดเมื่อเก็บอนุภาคไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน เทียบกับการใช้ภาวะอื่นๆ ในการเตรียมอนุภาค

การใช้เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ที่ระดับความดันสูงจะสามารถเตรียมอนุภาคให้มีขนาดเล็กลง เนื่องจากสารผสมจะถูกอัดด้วยแรงดันสูง ในขณะที่สารผสมเคลื่อนที่ผ่านช่องเปิดของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ อย่างไรก็ตาม Reddy และคณะ (2006) ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ที่ระดับความดันสูงกว่า 1,500 บาร์ ในระหว่างการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเพื่อบรรจุทามอกซิเฟน (tamoxifen) อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากการเพิ่มความดันที่สูงขึ้นอาจทำลายเสถียรภาพของสารลดแรงตึงผิวที่หุ้มอยู่รอบอนุภาค ทำให้อนุภาคเกิดการรวมตัวกันเองจนมีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้การเตรียมอนุภาคด้วยภาวะนี้ยังให้ลักษณะของการกระจายขนาดอนุภาคและการกระจายความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวแคบ ซึ่งแสดงถึงอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาด และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ที่ใกล้เคียงกันในแต่ละอนุภาคอีกด้วย

จากการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและการเติมสารลดแรงตึงผิวร่วมจะทำให้ความตึงตัวของผิวน้ำ (surface tension) ระหว่างเฟสที่เป็นน้ำและเฟสที่เป็นไขมันลดลง ซึ่งมีผลทำให้อนุภาคมีขนาดลดลงด้วย (Reddy และ Murthy, 2005) และการที่อนุภาคคอลลอยด์สามารถกระจายตัวคงสภาพอยู่ในของเหลวได้นั้น เนื่องมาจากประจุบนผิวส่งแรงผลักทำให้อนุภาคไม่เข้า



ใกล้กัน และไม่เกิดการรวมตัวกันขึ้น โดยค่าประจุบนผิวสามารถวัดได้จากสนามไฟฟ้าที่เกิดขึ้นรอบ ๆ อนุภาค ซึ่งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta- potential) นี้ จะมีค่าลดลงตามระยะห่างจากผิว ส่งผลให้ความหนาแน่นของไอออนที่มีประจุตรงกันข้ามบริเวณรอบ ๆ อนุภาคลดลงตามระยะทาง เช่นเดียวกัน โดยเมื่ออนุภาคมีการเคลื่อนที่ก็จะทำให้ไอออนที่มีประจุตรงข้ามที่อยู่รอบ ๆ อนุภาค ถูกนำพาไปพร้อมกับอนุภาคด้วย ซึ่งค่าความต่างศักย์ ณ จุดที่แยกระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่กับเฟสที่ไม่เคลื่อนที่นี้ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) นั้นเอง ดังนั้นค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวนี้อาจส่งผลโดยตรงต่อความคงตัวและขนาดของอนุภาคกล่าวคือ ถ้าค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว มีค่าสูงหรือมีค่าเพิ่มขึ้นอนุภาคจะเกิดการเกาะตัวทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น และอาจเกิดการแยกตัวระหว่างชั้นน้ำและไขมันหรือเกิดการตกตะกอนของอนุภาคได้

เมื่อบรรจุในซินลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 ในปริมาณร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าขนาดของอนุภาคนาโนที่บรรจุในซินมีขนาดอยู่ระหว่าง 159-167 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่ขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับอนุภาคนาโนที่ไม่ได้บรรจุในซิน แสดงว่าภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการเตรียมอนุภาคนาโนซึ่งไม่ได้บรรจุในซินสามารถนำมาใช้ในการบรรจุในซินลงในอนุภาคนาโนได้ โดยขนาดของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซินที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้จะมีขนาดเล็กกว่าอนุภาคไลโปโซมที่บรรจุในซินซึ่งมีขนาด 740 นาโนเมตร (Laridi และคณะ, 2002) และอนุภาคนาโนพอลิ-แอล-แลกไทด์ที่บรรจุในซินซึ่งมีขนาด 254 นาโนเมตร (Salmaso และคณะ, 2004)

สำหรับการทดสอบความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 28 วัน พบว่าอนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้นหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 21 และ 28 วัน ทั้งนี้ อาจเกิดจากการที่อนุภาคมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ลดลงทำให้อนุภาคเกิดการรวมกัน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเก็บอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ไว้ในภาวะไม่เหมาะสม

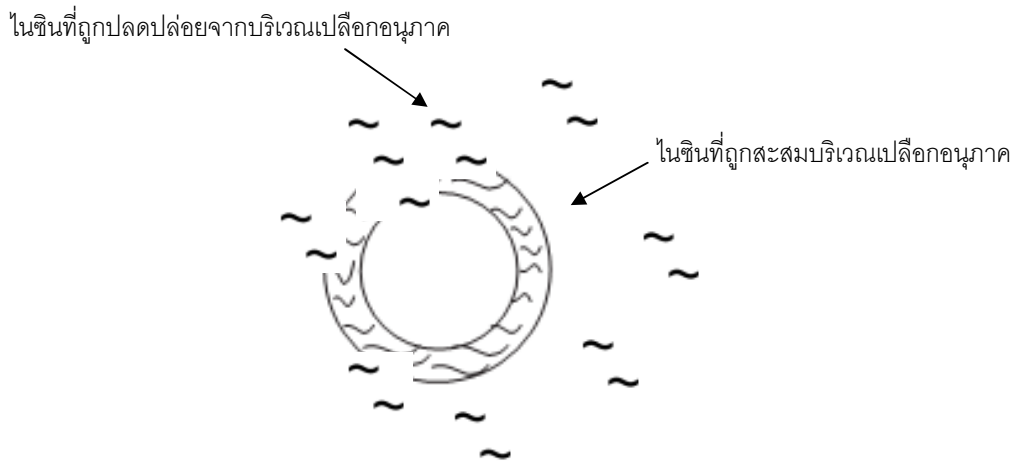
Reddy และ คณะ (2006) ได้ทำการทดลองอิทธิพลของแสงและอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง พบว่าอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นจาก 235 นาโนเมตรในวันแรกของการเตรียมอนุภาคเป็น 539 นาโนเมตร หลังการเก็บรักษาอนุภาคไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน ขณะที่การเก็บรักษาอนุภาคนาโนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้ขนาดอนุภาคเปลี่ยนจาก 235 นาโนเมตรในวันแรกเป็น 304 นาโนเมตร หลังเก็บรักษาอนุภาคไว้ 30 วัน สำหรับการศึกษากลกระทบบของแสง พบว่า อนุภาคจะมีขนาดใหญ่ขึ้นจาก 235 นาโนเมตร เป็น 1,235 นาโนเมตร หลังการเก็บรักษาอนุภาคไว้ในสภาพที่สัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเล็ต ในขณะที่การเก็บรักษาอนุภาคไว้ในที่มีอุณหภูมิจะมีการเปลี่ยนแปลงขนาด 235 นาโนเมตร เป็น 382 นาโนเมตร ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากการที่อนุภาคนาโนรับพลังงาน

จากภายนอกเข้ามา (อุณหภูมิและแสง) ทำให้อุณหภูมิพลังงานจลน์สูงขึ้น อุณหภูมิจึงมีการวิ่งชนกันมากขึ้นทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค นอกจากนี้พลังงานที่แต่ละอนุภาครับเข้ามายังมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพชั้นของสารลดแรงตึงผิวที่ล้อมอยู่ที่บริเวณผิวของอนุภาค ทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการทดลองผลของแสงและอุณหภูมิต่อความคงตัวของอนุภาคในลักษณะเดียวกันนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Freitas และ Muller ในปี ค.ศ. 1998 อีกด้วย

ประสิทธิภาพการบรรจุสารออกฤทธิ์ลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารออกฤทธิ์ในไขมันที่ถูกหลอมเหลว ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าอนุภาคนาโนที่บรรจุในชั้นร้อยละ 2.0 จะมีประสิทธิภาพการบรรจุสูงสุด คือ สามารถบรรจุในชั้นได้ร้อยละ 73.6 ของปริมาณในชั้นเริ่มต้นที่ใช้ในการบรรจุ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้ใช้ปริมาณไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 ร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในขณะที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวถึงร้อยละ 5 ทำให้สัดส่วนปริมาณไขมันแข็งต่อสารลดแรงตึงผิวมีน้อย จึงอาจทำให้ในชั้นบางส่วนไม่ถูกบรรจุลงในอนุภาคแต่จะแยกตัวอยู่ในชั้นน้ำหรือเกาะอยู่บริเวณสารลดแรงตึงผิวที่ล้อมรอบอนุภาค ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพการบรรจุในชั้นอาจทำได้โดยปรับปริมาณสัดส่วนของไขมันแข็งกับสารลดแรงตึงผิวให้เหมาะสม ซึ่งจะเป็นการทำให้ในชั้นละลายในไขมันแข็งได้มากขึ้น โดยเพิ่มปริมาณสัดส่วนของไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 ให้มากขึ้น ดังตัวอย่างงานวิจัย การเพิ่มปริมาณร้อยละของไขมันแข็งไดนาเซน (dynasan) เซทิลพาลมีเตต (cetylpalmitate) และ คอมพริทอล (compritol) ในการบรรจุอีโตมีเดต (etomidate) ลงในอนุภาคนาโนจะทำให้ประสิทธิภาพการบรรจุสารออกฤทธิ์ดังกล่าวเพิ่มขึ้น (Schwarz และ Mehnert., 1999) นอกจากนี้คุณสมบัติเชิงเคมีและกายภาพของไขมันแข็งเองยังส่งผลถึงประสิทธิภาพการบรรจุสารออกฤทธิ์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการเกิดผลึกไขมันแข็งหลังจากที่อนุภาคนาโนเย็นตัวลงหลังขั้นตอนการเตรียมด้วยวิธีสอโมจีไนเซชันแบบร้อน โดยการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการเกิดผลึกไขมันแบบบีตา จะทำให้เกิดโครงร่างผลึกแลคตีสที่สมบูรณ์ซึ่งสามารถจะกีดกันไม่ให้สารออกฤทธิ์ถูกบรรจุลงในอนุภาคนาโน ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการเกิดผลึกไขมันแบบแอลฟา จะทำให้โครงร่างผลึกมีความสมบูรณ์ลดลงทำให้มีที่ว่างให้สารออกฤทธิ์แทรกตัวลงในอนุภาคได้ จากการศึกษาพบว่าการใช้ไขมันแข็งที่มีสัดส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์สูงกว่าปริมาณไตรกลีเซอไรด์จะทำให้อนุภาคไขมันแข็งที่เตรียมขึ้นมีความสมบูรณ์ของโครงร่างผลึกลดลง ซึ่งสารออกฤทธิ์จะสามารถแทรกตัวเข้าไปภายในอนุภาคได้ดีขึ้น (Heurtault et al., 2003)

จากการศึกษาการปลดปล่อยในชั้นจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือที่แตกต่างกัน พบว่าอนุภาคมีอัตราการ

ปลดปล่อยไนซินที่สูงในช่วงเวลา 3 วันแรก ในทุกค่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือ ยกเว้นที่ความเข้มข้นเกลือ 0.5 โมลาร์ หลังจากนั้นอนุภาคจะมีการปลดปล่อยไนซินออกมาในอัตราที่ช้าลงจนถึงวันที่ 25 ซึ่งการปล่อยสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารจำพวกเพปไทด์ที่บรรจุลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในงานวิจัยอื่นๆ จะมีลักษณะการปลดปล่อยสารอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาแรกเช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ (Trotta และคณะ, 2004, Hu และคณะ, 2004, Souto และคณะ, 2004 และ Zhang และคณะ, 2006) โดยปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้สามารถอธิบายจากแบบจำลองการสะสมสารออกฤทธิ์ไว้ที่บริเวณเปลือกนอกของอนุภาคนาโนที่ Muller และคณะ (2000) ได้ตั้งสมมุติฐานไว้ว่า ส่วนที่ขอบน้ำของสารจำพวกเพปไทด์บางโมเลกุลจะไม่สามารถแทรกผ่านเข้าไปในแกนของไขมันแข็ง ขณะที่ทิ้งให้อนุภาคเย็นในขั้นตอนการบรรจุสารออกฤทธิ์ได้ หรือการใช้ไขมันแข็งชนิดที่มีลักษณะการเกิดผลึกไขมันใหม่หลังจากทิ้งให้อนุภาคเย็น (recrystallization) อย่างรวดเร็ว จึงทำให้ไขมันซึ่งเป็นแกนกลางของอนุภาคเกิดการแข็งตัวก่อนที่สารออกฤทธิ์จะถูกบรรจุลงภายในอนุภาค ทำให้เกิดการสะสมสารออกฤทธิ์ไว้ที่บริเวณเปลือกนอกของอนุภาค จากนั้นจะมีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ที่บริเวณนี้ออกมาก่อนในอัตราที่รวดเร็ว ขณะที่สารออกฤทธิ์ที่กระจายอยู่ภายในอนุภาคจะถูกปลดปล่อยออกมาในอัตราที่ช้ากว่า อย่างไรก็ตามการที่ไนซินสามารถปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนได้ในปริมาณหนึ่งอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาแรกของการทดลอง อาจมีประโยชน์ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย เนื่องจากมีปริมาณไนซินที่มากเพียงพอที่จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว ดังเช่นงานวิจัยของ Chi-Zhang และ คณะ (2003) ซึ่งพบว่า การเติมไนซินลงไป 200 หน่วยสากล/มิลลิลิตร ทันทีก่อนแล้วจึงค่อยเติมไนซินลงไป ปริมาณน้อยๆ อีกอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการทดลอง จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้ดีกว่าการควบคุมให้มีการเติมไนซินปริมาณน้อยๆ อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการทดลอง



รูปที่ 5.2 แบบจำลองการสะสมและการปลดปล่อยโนซินที่บริเวณเปลือกอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง (drug-enriched shell model) (Muller และคณะ, 2000)

จากการทดลองผลของค่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือต่อการปลดปล่อยโนซิน พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือของบัฟเฟอร์ที่สูงขึ้นจะให้อัตราเร็วในการปลดปล่อยโนซินออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมีอัตราเร็วลดลง ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองการปลดปล่อยโนซินออกจากอนุภาคนาโนชนิด พอลิ-แอล-แลกไทด์ ที่การปลดปล่อยโนซินจะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกัน (Salmaso และคณะ 2004) ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่ความสามารถในการละลายของโนซินที่ลดลงเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-เบส และค่า ionic strength สูง จากผลการทดลองของ Rollema และคณะ (1995) ระบุว่าค่าความเป็นกรด-เบสที่เพิ่มขึ้นจาก 2 ถึง 7 ในแต่ละความเข้มข้นเกลือที่ 0.01-0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะทำให้โนซินละลายได้น้อยลงร้อยละ 60 โนซินจึงเกิดการตกตะกอนทำให้ปล่อยออกมาจากอนุภาคได้น้อยและการที่ภายในโมเลกุลของโนซิน A ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนฮิสติดีน 2 หมู่ ที่มีค่า pKa 6.0 กรดอะมิโนไลซีน 3 หมู่ ที่มีค่า pKa 10.53 กรดอะมิโนไอโซลิวซีน 1 หมู่ที่ปลายอะมิโน ที่มีค่า pKa 9.68 และ กรดอะมิโนไลซีน 1 หมู่ ที่ปลายคาร์บอน ที่มีค่า pKa 2.18 เมื่อค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายที่สูงกว่า 5 และค่า ionic strength ที่สูงจะทำให้ลดการเกิดประจุ (deprotonation) ที่หมู่ลิซีน และหมู่อะมิโน ของกรดอะมิโนดังกล่าว ทำให้ส่วนไม่ชอบน้ำของโมเลกุลโนซินเพิ่มขึ้นและเกิดปฏิกิริยาจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไขมันทำให้โนซินไม่สามารถปล่อยออกมาจากอนุภาคได้ ซึ่งมีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ยืนยันว่าโนซินสามารถเกิดการจับกับไขมันได้โดยอาศัยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (El Jatzumi และ Lafleur., 1999) ขณะที่ในภาวะความเป็นกรด-เบสของสารละลายที่

ต่ำมาก (ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2) ไนซินจะถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคในอัตราเร็วที่สูงกว่าค่าความเป็น กรด-เบสอื่นๆ ค่อนข้างมาก อาจเป็นเพราะในภาวะแวดล้อมของสารละลายที่เป็นกรดสูงจะเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสทำให้ไขมันแข็งเกิดสลายตัว (Barrault และคณะ, 2002) และปลดปล่อยไนซินออกมาปริมาณมาก Trotta และ คณะ (2004) พบว่า อินซูลินร้อยละ 20 จะถูกปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 ภายในเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากการบ่มอนุภาคกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-เบสที่ 1.1

ส่วนผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ต่อการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนในงานวิจัยนี้ พบว่าไนซินถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนเป็นปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็วหลังจากบ่มอนุภาคนาโนไว้ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือสูงมาก ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากบัฟเฟอร์มีค่า ionic strength สูงมากซึ่งสามารถจะไปทำลายชั้นของสารลดแรงตึงผิวที่หุ้มอนุภาคอยู่ด้วยปฏิกิริยาการดึงน้ำออก (dehydration) ส่งผลให้ไนซินที่สะสมอยู่บริเวณเปลือกนอกของอนุภาคถูกปลดปล่อยออกมาในสารละลายเป็นปริมาณมาก นอกจากนี้ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมากทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว (zeta-potential) ของอนุภาคลดลงทำให้อนุภาคมีการเกาะกลุ่มกันซึ่งเป็นสาเหตุให้พื้นที่ผิวสัมผัสของอนุภาคลดลง อนุภาคจึงมีการปลดปล่อยไนซินในอัตราที่น้อยในเวลาต่อมา (Zimmermann และคณะ, 2001)

จากผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซิน พบว่าเชื้อทั้ง 2 จะเริ่มถูกยับยั้งในวันที่ 3 ซึ่งเมื่อพิจารณาพร้อมกับผลทดลองการปลดปล่อยไนซินในสารละลายบัฟเฟอร์จะพบว่าในวันที่ 0 ถึง 3 ปริมาณไนซินสะสมที่ปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคมีปริมาณ 0.1-0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ในทันที (ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ BHI คือ 6.2 และ 7.0 ตามลำดับ) หลังจากนั้นเมื่ออนุภาคมีการปลดปล่อยไนซินสะสมออกมาเพิ่มขึ้นเป็น 0.275 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 5 (ค่าความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์เป็น 6.0) จึงสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งสองได้ และการปลดปล่อยไนซินออกมาอย่างต่อเนื่องจะรักษาปริมาณไนซินในสารละลายบัฟเฟอร์ให้คงที่จนถึงวันที่ 20 ซึ่งเป็นการยืนยันความสามารถในการคงแอกทิวิตีชีวภาพของอนุภาคนาโนบรรจุไนซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้นาน 20 วัน และแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนสามารถควบคุมปลดปล่อยไนซินออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งได้อย่างต่อเนื่องทำให้สามารถคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าไนซินอิสระซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งสองได้เพียง 3 วัน อย่างไรก็ตามการที่อนุภาคนาโนที่บรรจุไนซินเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่เริ่มแสดงแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 ได้ช้ากว่าอนุภาคนาโนบรรจุไนซินความเข้มข้นอื่นนั้นอาจเป็นเพราะ ปริมาณไนซินเริ่มต้นที่

น้อยสามารถละลายได้ดีในไขมันทำให้ไนซินถูกบรรจุลงในส่วนแกนของอนุภาค ทำให้ต้องใช้เวลานานในการปลดปล่อยไนซินออกจากอนุภาคเป็นเวลานานกว่าอนุภาคที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของไนซินที่สูงกว่าทำให้ปริมาณไนซินสะสมไม่เพียงพอในการยับยั้งเชื้อ การทดลองนี้สรุปได้ว่าการบรรจุไนซินลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งจะสามารถป้องกันการสลายตัวของไนซินที่บรรจุอยู่ภายในและสามารถควบคุมให้มีการปลดปล่อยไนซินออกมาอย่างช้าๆ โดยไนซินที่ปล่อยออกมานั้นสามารถคงแอกทิวิตีในการยับยั้งเชื้ออยู่ได้นานกว่า 20 วัน นอกจากนี้การใช้วิธีห่อโมจิในเซชันแบบร้อนในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินจะไม่ทำให้ไนซินที่ปล่อยออกมาสูญเสียแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อไป

จากผลการวิจัยครั้งนี้อาจนำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินไปประยุกต์ใช้ในการยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหารได้ เนื่องจากส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคได้แก่ไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 (กลีเซอรอลโมโนสเตียเรต) ซึ่งไขมันที่ได้จากพืช และพอลิล็อกซาเมอร์ 188 ล้วนแล้วแต่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและได้รับการรับรองให้เป็นสารที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe substances) สามารถใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ (US FDA/CFSAN: Listing of Food Additive Status 2006) ขณะที่องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดปริมาณของโซเดียมดีออกซีโคเลตซึ่งใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวรวมในการทดลองนี้ที่อนุญาตเติมลงในอาหารได้ไม่เกิน 1.25 มิลลิกรัมต่อกรัม (FAO/WHO Expert Committee SERIES NO. 5., 1974) โดยคาดว่าน่าจะประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนบรรจุไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกนมและเนื้อสัตว์ได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีการสูญเสียไนซินปริมาณมากไปกับการเกิดปฏิกิริยากับองค์ประกอบของอาหารและต้องการอายุในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียไม่นานนัก ซึ่งต้องมีการทดลองประสิทธิภาพการคงแอกทิวิตีของไนซินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในระบบอาหารต่อไปเพื่อยืนยันว่าสามารถนำเอาอนุภาคนาโนชนิดนี้ไปใช้ได้จริง และปรับปรุงภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาอนุภาคเพื่อเพิ่มความคงตัวของอนุภาคให้นานขึ้น

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- นางลักษณะ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

### ภาษาอังกฤษ

- Aasen, I. M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., and Naterstad, K. 2003. Interaction of bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. Int. J. Food Microbiol. 87: 35-43.
- Almeida, A. J., Runge, S., and Muller, R. H. 1997. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): influence of production parameters. Int. J. Pharm. 149: 255-265.
- Antonio, G., Hikmate, A., Rosario, L. L., and Nabil, B. O. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int. J. Food. Microbiol. 120: 51-70.
- Barrault, J., Pouilloux, Y., Clacens, J. M., Vanhove, C., and Bancquart, S. 2002. Catalysis and fine chemistry. Catalysis Today. 75: 177-181.
- Beatriz, R. B., Yolanda, S., Myrian, Z., Carmen, T., and Fernanda, R. L. 2007. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. Int. J. Food Microbiol. 116: 32-36.
- Benech, R. O., Kheadr, E. E., Lacroix, C., and Fliss, I. 2002. Antibacterial activity of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5607-5619.
- Branen, K. J., and Davidson, M. P. 2003. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin, antimicrobial activity by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. Int. J. Food. Microbiol. 90: 63-74.

- Breukink, E., and Kruijff, B. 2004. Lipid II as target for antibiotics. Nature Rev. Drug Discovery. 5: 321-323.
- Cai, Y., Ng, L. K., and Farber, J. M. 1997. Isolation and characterization of nisin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. J. Appl. Microbiol. 83: 499–507.
- Cavalli, R., Peira, E., Caputo, O., and Gasco R. M. 1999. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with  $\beta$ -cyclodextrins. Int. J. Pharm. 182: 59-69.
- Chen, H., and Hoover, D. G. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf. 2: 82-100.
- Chi-Zhang, Y., Yam, L. K., and Chikindas, L. K. 2003. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. Int. J. Food. Microbiol. 90: 15-22.
- Choi, H. J., Cheigh, C.I., Kim, S.B., and Pyun, Y. R. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* A 164 isolated from Kimchi. J. Appl. Microbiol. 88: 563-571.
- Choi, H. J., and Park, Y. H. 2000. Selective control of *lactobacilli* in kimchi with nisin. Lett. Appl. Microbiol. 30: 173-177.
- Chung, T. K., Dickson, S. J., and Crouse, D. J. 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1329-1333.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., and Hernandez, P. E. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci. Tech. Int. 7: 281–305.
- Cleveland, J., Montrille, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins :safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71: 1-20.
- Colas, C. J., Shi, W., Rao, M., Omri, A., Mozafari, R., and Singh, H. 2007. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. Micron. 38: 841-847.
- Davies, E. A., Bevis, H. E., and Delves, B. J. 1997. The use of the bacteriocin, nisin as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 24: 343-346.



- Degan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross P. 2005. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16: 1058-1071.
- Delves, B. J. 1993. The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards gram-negative bacteria. Int. Biodet. Biodeg. 32: 87-97.
- Delves, B. J., Blackurn, P., Evans, J. R., and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek. 69: 193-202.
- De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. (eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria , pp. 152-199. United Kingdom: Chapman & Hall, The Alden Press.
- El Jatzumi, R., and Lafleur, M. 1999. Nisin promotes formation of non lamellar inverted phases in unsaturated phosphatidylethanolamines. Biochim. Biophys. 1418: 97-105.
- Ferreira, M. A., and Lund, B. M. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. Lett. Appl. Microbiol. 22: 433-438.
- Freitas, C., and Muller, R. 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle dispersions. Int. J. Pharm. 168: 221-229.
- Garde, S., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina, M., and Nunez, M. 2000. PCR detection of the structural gene of nisin Z and lacticin 481 in *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* INIA 415, a strain isolated from raw milk Manchego cheese. Biotechnol. Lett. 23: 85-90.
- Hensen, J. N. 1993. The molecular biology of nisin and its structural analogues. In Hoover, D. G. and steenson, L. R. (eds-), Bacteriocins of lactic acid bacteria. pp 93-199. Academic Press.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J., E., and Benoit, J., P., 2003. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. Biomaterials. 21: 4283-4300.
- Hu, F.Q., Hong, Y., and Yuan, H. 2003. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. Int. J. Pharm. 273: 29-35 .

- Jung, D., Bodyfelt, F. W., and Daeschel, M. A. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. J. Dairy Sci. 75: 387-393.
- Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R. O. Vuillemand, J. C. Lacroix, C., and Fliss, I. 2002. Liposome encapsulated nisin Z: optimization stability and release during milk fermentation. Int. Dairy. J. 13: 325-336.
- Liu, W., and Hansen, N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. environ. Microbiol. 56: 2551-2558.
- Long, C., and Phillips, C. A. 2003. The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken. Food. microbiol. 20: 495-502.
- Mauriello, G., Deluca, E., La Stora, A., Villani, F., and Ercolini, D. 2005. Antimicrobial activity of a nisin activated plastic film for food packaging. Lett. Appl. Microbiol. 41: 464-469.
- Mazzotta, A., S., Crandall, A., D., and Montville, T., J. 1997. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cell, Appl. Environ. Microbiol. 63:2654-2659.
- Morel, S., Ugazio, E., Cavalli, R., and Gasco M. R. 1996. Thymopentin in solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 132: 259-261.
- Moreno, I., Lerayer, A., Baldini, V., and Leitao, F. 2000. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. Braz. J. Microbiol. 31: 184-192.
- Muhlen, A., Z., Schwarz, C., and Mehnert, W., 1998. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-Drug release and release mechanism. Euro. J. Pharmace. Biopharmace. 45: 149-155.
- Muller, H. R., Mader, K., and Gohla, S. 1999. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery a review of the state of the art. Eur. J. Pharm. 50: 161-177.
- Muller, H. R., Runge, S. A., Ravelli, V. Thunemann, A. F., Mehnert, W., and Souto, E.B. 2007. Cyclosporin loaded solid lipid nanoparticles (SLN) Drug-lipid

- physicochemical interaction and characterization of drug incorporation. Eur. J. Pharm. Biopharm. 68: 535-544.
- Nilsson, L., Huss, H. H., and Gram, L. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. Int. J. Food Microbiol. 38 : 217-227
- Noopakdee, W., Santivaranglena, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., and Panyim, S. 2002. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional thai fermented sausage. Int. J. food. Microbial. 81: 137-145.
- Ogden, K., Waites, M. J., and Hammond, J. R. M. 1988. Nisin and brewing. J. Inst. Brew. 94 : 233-238.
- Olasupo, N. A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H., and Holzapfel, W. H. 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. Int. J. Food. Microbiol. 53: 141-152.
- Olbrich, C., and Muller, R., H., 1999. Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. Int. J. Food. Microbiol. 180: 31-39.
- Oscariz, J. C., and Pisabarro, A. G. 2001. Classification and mode of action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Int. Microbiol. 4: 13-19.
- Pandey, R., Sharma, S., Khuller G. K. 2005. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. Tuberculosis. 85: 415-420.
- Rayman, K., Malik, N., Hnrst, A. 1983. Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. Appl. Environ. Microb. 46: 1450-1452.
- Reddy, L. H., and Murthy, R., S., R. 2005. Etoposide-loaded nanoparticles made from glyceride lipid: formulation, characterization, in vitro drug release, and stability evaluation. AAPS Pharm. Sci. Tech. 6: 158-166.
- Reddy, L., H., Vivek, K., Bakshi, N., and Murthy, R., S., R. 2006. Tamoxifen citrate loaded solid lipid nanoparticles (SLN): preparation, characterization, in vitro drug release, and pharmacokinetic evaluation. Pharm. Dev. Tech. 11:167-177.

- Rodriguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H. M., Hernandez, P. E., and Gasson, M. J. 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol. 78: 109-115.
- Rollema, H. S., Kuipers, O. P., Both, P., De Vos, W. M., and Siezen, R. J. 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. Appl. environ. Microb. 61: 2873-2878.
- Rose, N. L., Sporns, P., Dodd, H. M., Gasson, M. J., Mellon, F. A., and McMullen, L. M. 2003. Involvement of dehydroalanine and dehydrobutyrine in the addition of glutathione to nisin. J. Agric. Food. Chem. 51:3174-3178.
- Ross, R. P., Morgan, S., and Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. Int. J. Food. Microbiol. 79: 3-16.
- Salmaso, S., Elavassore, N., Bertucco, A., Lante, A., and Caliceti, P. 2004. Nisin-loaded poly-L-lactide nano-particles produced by CO<sub>2</sub> anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. Int. J. Pharm. 287: 163-173.
- Schillinger, U., Geisen, R., and Holzapfel, W. H. 1996. Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci. Tech. 71: 58-64.
- Schwarz, C., and Mehnert, W., 1999. Solid lipid nanoparticle (SLN) for controlled drug delivery II. Drug incorporation and physicochemical characterization. J. Microencapsulation. 16:205-213.
- Soukharev, R. A. 2007. Stability of lipid excipient in solid lipid nanoparticles. Adv. Drug Delivery Reviews. 59: 411-418.
- Souto, E.B., and Muller, R. H. 2005. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. J. Microencapsulation. 22: 501-510.
- Souto, E.B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M., and Muller, R. H. 2004. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. Int. J. Pharm. 278: 71-79.
- Tjakko, A., Lothar, K., and Colin, H. 1995. Bacteriocin: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. Int. J. Food. Microbiol. 28: 169-185.

- Trotta, M., Cavalli, R., Carlotti, M. E., Battaglia, L., and Debernardi, F. 2005. Solid lipid microparticles carrying insulin formed by solvent in water emulsion–diffusion technique, Int. J. Pharm. 288: 281 –28 8.
- Ukuku, D. O., Bari, M. L., Kawamoto, S., and Isshiki, W. 2005. Use of hydrogen peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reducing transfer of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces. Int. J. Food Microbiol. 104: 225-233.
- Van Hensden, H. E., De kruijff, B., and Breukink, E. 1988. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membranes Biochem. 37: 16033-16040.
- Van de ven, F., Van den hooven, H., Konings, R. and Hilbers, C. 1991. NMR studies of lantibiotics, the structure of nisin in aqueous solution. Eur. J. biochem. 202: 1181-1188.
- Venkateswarlu, V., and Manjunath, K. 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. J. Controll Release. 95: 627-638.
- Videira, M., Florindo, H., and Almeida, A. J. 2002. Preparation of solid lipid nanoparticles (SLN): a potential protein delivery system. Control. Drug Deliv. 176: 69–70.
- Wanding, L. R., Sheldon, B. W., and Foegeding, P. M. 1999. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. J. Food protect. 62 : 492-498.
- Wiedemann, I., Benz, R., and Sahl, H. G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic. J. Biol. Chem. 276: 1772-1779.
- Wissing, S. A., Kayser, O., and Muller, R. H. 2003. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. Adv. Drug Deliv. Reviews. 56: 1257-1272.
- Wolfgang, M., and Karsten, M. 2001. Solid lipid nanoparticles production, characterization and application. Adv. Drug Deliv. Reviews. 47: 165-196.

- Yuste, J., and Fung, D.Y. 2004. Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* 0157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. J. Food. Protect. 67: 35-42.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 1616-1619.
- Zhang, N., Ping, Q., Huang, G., Xu, X., Cheng, Y., and Han, X. 2006. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. Int. J. Pharm. 327: 153–159.
- Zimmermann, E., and Muller, R., H. 2001. Electrolyte and pH stabilities of aqueous solid lipid nanoparticles (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. Euro. J. Pharmace. Biopharmace. 52: 203-210.
- Zottola, E. A., Yessi, T. L., Ajao, D. B., and Roberts, R. F. 1994. Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. Int J. Food Microbiol. 24: 227-238.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

โปรติเอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อวัวสกัด	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมซัลเฟต	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัม
ทวีน 80	1.0	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 6.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 20 นาที

#### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป BHI

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป BHI 37 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 6.7 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที



## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.10 โมลาร์ ที่มีเกลือเข้มข้น 0.15 โมลาร์ (PBS) ความเข้มข้นกรด-เบส 2.0

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคะไฮเดรต	2.528	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.353	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	4.383	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดประจุปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย A (กรดไทโรฟลูโรอะซิดิก 0.05% ปริมาตร/ปริมาตร ในน้ำ)

เติมกรดไทโรฟลูโรอะซิดิกปริมาตร 250 ไมโครลิตร ในน้ำปลอดประจุสำหรับฉีด HPLC ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร จากนั้นนำไปกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลส อะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปโชนิเคตเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. สารละลาย B (กรดไทโรฟลูโรอะซิดิก 0.05% ปริมาตร/ปริมาตร ในอะซิโตรไนไตรล์)

เติมกรดไทโรฟลูโรอะซิดิกปริมาตร 250 ไมโครลิตร ในอะซิโตรไนไตรล์ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร จากนั้นนำไปกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปโชนิเคตเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

#### 4. กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

1. ข้อมูลการทดลองวัดขนาดอนุภาคนาโนที่ไม่บรรจุไนซิน ด้วยเครื่องนาโนไซเซอร์

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร)			ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (size SD)		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
อิมิวเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 500 บาร์	256	334	429	12.5	16.4	25.2
อิมิวเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 1,000 บาร์	140	201	406	29.1	10.86	24.1
อิมิวเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 1,500 บาร์	153	193	221	37.8	13.77	12.7
อิมิวเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 500 บาร์	165	246	404	11.3	20.2	24.2
อิมิวเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 1,000 บาร์	121	196	261	15.4	23.2	19
อิมิวเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 1,500 บาร์	119	197	203	15.1	19.3	14.1

2. ข้อมูลการทดลองวัด Polydispersity index (PDI value) ของอนุภาคนาโนที่ไม่บรรจุในซิน  
ด้วยเครื่อง นาโนไฮเซอร์

ตัวอย่าง	Polydispersity index (PDI value)			ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (PDI SD)		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
อิมิเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 500 บาร์	0.517	0.504	0.436	0.051	0.083	0.067
อิมิเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 1,000 บาร์	0.332	0.424	0.478	0.081	0.031	0.034
อิมิเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 1,500 บาร์	0.324	0.429	0.453	0.076	0.019	0.023
อิมิเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 500 บาร์	0.351	0.424	0.451	0.040	0.021	0.023
อิมิเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 1,000 บาร์	0.395	0.43	0.429	0.023	0.016	0.027
อิมิเตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 1,500 บาร์	0.384	0.367	0.401	0.031	0.032	0.019

3. ข้อมูลการทดลองวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนที่ไม่บรรจุในซิน ด้วย  
 เครื่อง นาโนไซเซอร์

ตัวอย่าง	ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเฉลี่ย (มิลลิโวลต์)			ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Zeta SD)		
	day 0	day 7	day 14	day 0	day 7	day 14
อิมิวิตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 500 บาร์	-32.3	-26.7	-28	0.41	0.58	0.43
อิมิวิตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 1,000 บาร์	-37.5	-31.1	-27.8	0.76	0.48	0.46
อิมิวิตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 2.5 ความดัน 1,500 บาร์	-24.4	-31.9	-27.5	1.56	1.6	0.54
อิมิวิตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 500 บาร์	-18.3	-19.27	-20.1	0.321	0.43	0.43
อิมิวิตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 1,000 บาร์	-28	-22.7	-21.8	0.43	0.52	0.48
อิมิวิตอร์ 900 พอลิออกซาเมอร์ 188 เข้มข้นร้อยละ 5.0 ความดัน 1,500 บาร์	-34	-29.4	-30.2	0.31	0.34	0.39

4. ข้อมูลการทดลองวัดขนาดอนุภาคนาโนที่บรรจุในซิน ด้วยเครื่องนาโนไซเซอร์

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) (วันที่)					ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (size SD) (วันที่)				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
อนุภาคนาโน ที่บรรจุในซิน ร้อยละ 0.5	160	163	164	175	220	5.30	5.35	11.2	6.54	10.7
อนุภาคนาโน ที่บรรจุในซิน ร้อยละ 1.0	159	169	175	173	214	6.43	14.5	15.1	7.54	10.8
อนุภาคนาโน ที่บรรจุในซิน ร้อยละ 2.0	161	173	177	203	224	5.54	8.40	10.6	7.50	9.10
อนุภาคนาโน ที่บรรจุในซิน ร้อยละ 3.0	167	173	184	211	245	8.56	7.95	14.2	8.13	15.7

5. ข้อมูลการทดลองวัดการกระจายตัวของอนุภาคนาโนที่บรรจุในซิน ด้วยเครื่องนาโนไฮเซอร์

ตัวอย่าง	Polydispersity index (PDI value)					ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (PDI SD) (วันที่)				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
อนุภาคนาโนที่บรรจุในซิน ร้อยละ 0.5	0.252	0.342	0.325	0.351	0.378	0.032	0.011	0.033	0.023	0.048
อนุภาคนาโนที่บรรจุในซิน ร้อยละ 1.0	0.278	0.289	0.256	0.344	0.376	0.042	0.023	0.012	0.029	0.036
อนุภาคนาโนที่บรรจุในซิน ร้อยละ 2.0	0.256	0.321	0.324	0.401	0.391	0.012	0.033	0.039	0.011	0.035
อนุภาคนาโนที่บรรจุในซิน ร้อยละ 3.0	0.250	0.354	0.376	0.381	0.385	0.043	0.065	0.031	0.045	0.065

6. ข้อมูลการทดลองวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนที่บรรจุไนซิน ด้วย  
เครื่อง นาโนไฮเซอร์

ตัวอย่าง	ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเฉลี่ย (มิลลิโวลต์) (วันที่)					ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (zeta SD) (วันที่)				
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
อนุภาคนาโน ที่บรรจุไนซิน ร้อยละ 0.5	-29.2	-30.4	-31.0	-31.2	-25.9	0.12	0.34	0.39	0.32	0.34
อนุภาคนาโน ที่บรรจุไนซิน ร้อยละ 1.0	-28.3	-29.3	-31.0	-28.1	-24.4	0.15	0.25	0.75	0.51	0.41
อนุภาคนาโน ที่บรรจุไนซิน ร้อยละ 2.0	-28.8	-27.2	-29.2	-27.0	-21.7	0.11	0.54	0.47	0.56	0.76
อนุภาคนาโน ที่บรรจุไนซิน ร้อยละ 3.0	-28.5	-29.2	-23.9	-24.5	-21.6	0.23	0.26	0.31	0.59	0.43

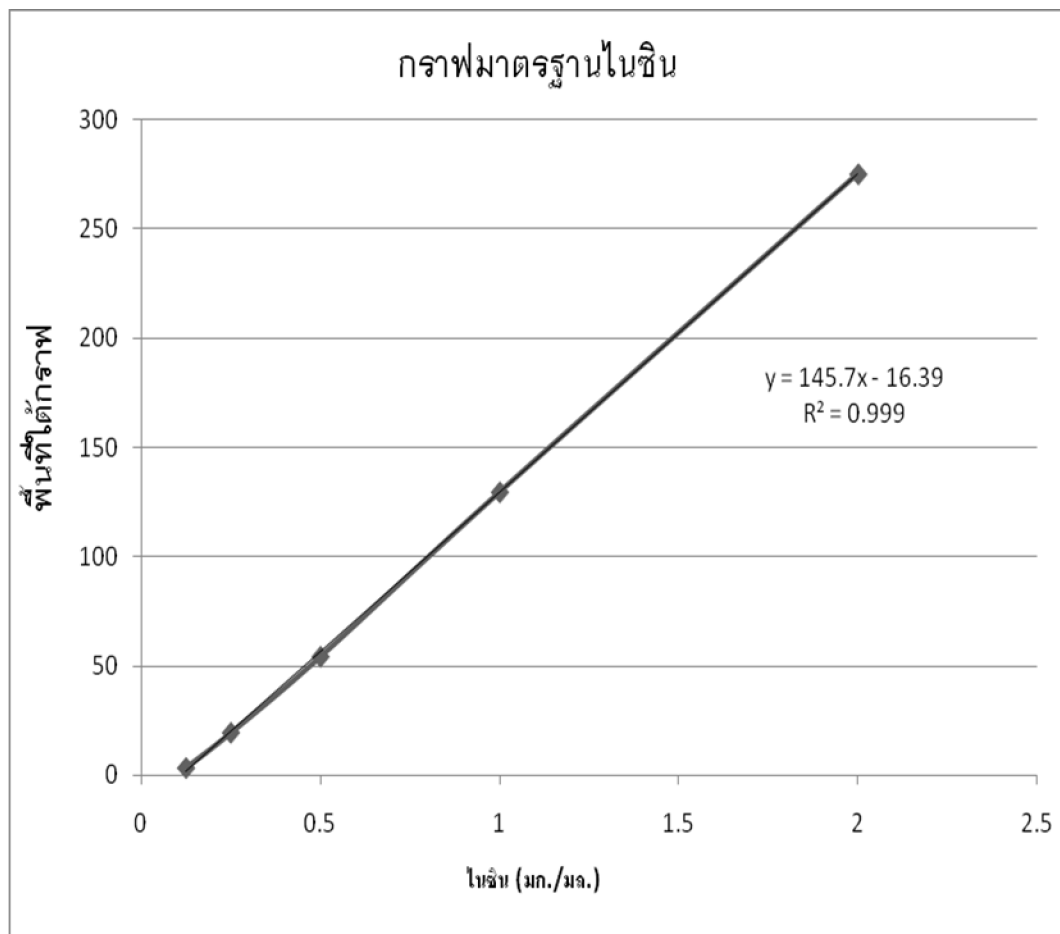


## 7. กราฟมาตรฐานไนซิน

ละลายไนซิน A บริสุทธิ์ไนซิน A จากบริษัท Sigma ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่น ปลอดภัยสำหรับ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25 และ 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์ปริมาณไนซินในแต่ละปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่องแยกสารโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส (Reverse phase HPLC) ที่มีคอลัมน์ C-18 เป็นตัวยึดเกาะ โดยใช้กรด ไทรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ร้อยละ 0.05 (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งละลายในน้ำเป็นตัวชะคอลัมน์ตัวที่หนึ่ง (สารละลาย A) และกรดไทรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ร้อยละ 0.05 (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งละลายใน อะซิโตไนโตรล์เป็นตัวชะคอลัมน์ตัวที่สอง (สารละลาย B) ในช่วง 5 นาทีแรกของการวิเคราะห์ ทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย A และ สารละลาย B ในปริมาณเท่ากับร้อยละ 20 และ ร้อยละ 80 ตามลำดับ ที่เวลา 5-20 นาที ค่อยๆปรับให้ความเข้มข้นของสารละลาย A เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 20 ไปจนถึงร้อยละ 80 และสารละลาย B ค่อยๆลดลงจากร้อยละ 80 ไปจนถึงร้อยละ 20 โดยใช้อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที บันทึกพื้นที่ใต้กราฟจากโปรแกรมของเครื่องแยกสารโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (รุ่น Water 1283 ของบริษัท Water) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานไนซินจากพื้นที่ใต้กราฟดังกล่าว

ตารางที่ 1 พื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานไนซิน

ความเข้มข้นไนซิน (มก./มล.)	พื้นที่ใต้กราฟ	พื้นที่ใต้กราฟ (/10 <sup>5</sup> )
2.0	27,532,852	275.3285
1.0	12,975,554	129.75554
0.5	5,448,830	54.48830
0.25	1,966,892	19.66892
0.125	354,417	3.54417



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานไนซิน

8. ข้อมูลการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 (CFU/มล.) ของอนุภาคนาโน  
ชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน

วัน	<i>Listeria monocytogenes</i> (CFU/มล.)						
	ชุดควบคุม	ชุดควบคุมลบ	ไนซินอิสระ	ไนซิน ร้อยละ 0.5	ไนซิน ร้อยละ 1.0	ไนซิน ร้อยละ 2.0	ไนซิน ร้อยละ 3.0
0	$2.4 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$	$3.8 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$
1	$7.6 \times 10^8$	$1.42 \times 10^9$	$1.5 \times 10^2$	$7.7 \times 10^8$	$1.79 \times 10^9$	$9.8 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$
2	$5.2 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	$2.1 \times 10^2$	$2.2 \times 10^7$	$6.7 \times 10^6$	$5.3 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$
3	$8.0 \times 10^6$	$4.7 \times 10^6$	$3.0 \times 10^2$	$7.1 \times 10^5$	$7.3 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$
5	$5.2 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$	$4.0 \times 10^4$	$6.9 \times 10^5$	$7.8 \times 10^3$	$4.1 \times 10^3$	$4.8 \times 10^3$
7	$5.5 \times 10^6$	$3.2 \times 10^6$	$8.7 \times 10^6$	$3.7 \times 10^5$	$5.2 \times 10^3$	$3.6 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$
10	$4.1 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$7.1 \times 10^7$	$2.6 \times 10^6$	$2.0 \times 10^3$	$7.2 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$
15	$3.4 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	$6.3 \times 10^7$	$9.4 \times 10^5$	$2.3 \times 10^3$	$5.4 \times 10^2$	$9.1 \times 10^2$
20	$1.3 \times 10^6$	$2.8 \times 10^5$	$9.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^3$	$8.5 \times 10^3$	$6.5 \times 10^2$	$8.8 \times 10^2$
25	$2.7 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$4.9 \times 10^5$	$1.2 \times 10^4$	$1 \times 10^6$	$4.1 \times 10^5$	$2.4 \times 10^7$

9. ข้อมูลการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 (log CFU/มล.) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน

วัน	<i>Listeria monocytogenes</i> (log CFU/มล.)						
	ชุดควบคุม	ชุดควบคุม ลบ	ไนซิน อิสระ	ไนซิน ร้อยละ 0.5	ไนซิน ร้อยละ 1.0	ไนซิน ร้อยละ 2.0	ไนซิน ร้อยละ 3.0
0	7.38	7.49	7.41	7.43	7.53	7.58	7.59
1	8.81	9.15	2.17	8.89	9.25	8.99	8.32
2	7.71	7.65	2.32	7.34	6.82	6.72	6.62
3	6.90	6.67	2.47	5.85	5.86	5.54	5.38
5	6.71	6.55	4.6	5.83	3.89	3.61	3.68
7	6.74	6.5	6.94	5.56	3.71	3.55	3.51
10	6.61	6.25	7.85	6.41	3.30	2.86	3.17
15	6.53	6.04	7.80	5.97	3.36	2.73	2.96
20	6.11	5.45	7.0	3.87	3.93	2.81	2.94
25	5.43	5.34	5.69	4.08	6.0	5.63	7.38

10. ข้อมูลการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 (CFU/มล.) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนติน

วัน	<i>Lactobacillus plantarum</i> (CFU/มล.)						
	ชุดควบคุม	ชุดควบคุมลบ	ไนตินอิสระ	ไนตินร้อยละ 0.5	ไนตินร้อยละ 1.0	ไนตินร้อยละ 2.0	ไนตินร้อยละ 3.0
0	$1.9 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	$6.5 \times 10^6$	$8.7 \times 10^6$	$7 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$	$7.6 \times 10^6$
1	$1.1 \times 10^9$	$9.1 \times 10^8$	1.0	$2.4 \times 10^8$	$5.3 \times 10^8$	$1.52 \times 10^9$	$1.2 \times 10^8$
2	$6.7 \times 10^7$	$8.3 \times 10^7$	$3.1 \times 10^2$	$4.3 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	$6.0 \times 10^5$
3	$8.6 \times 10^6$	$7.3 \times 10^6$	$4.1 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$8.5 \times 10^3$	$3.7 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$
5	$7.8 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$	$1.3 \times 10^4$	$4.4 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$7.0 \times 10^2$
7	$6.2 \times 10^5$	$6.1 \times 10^5$	$7.9 \times 10^7$	$7.9 \times 10^2$	$5.6 \times 10^2$	$2.1 \times 10^2$	$3.8 \times 10^2$
10	$4.6 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$	$5.2 \times 10^6$	$6.4 \times 10^2$	$5.2 \times 10^2$	$9.5 \times 10$	$1.4 \times 10^2$
15	$2.1 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2$	$6.3 \times 10^5$	$4.2 \times 10$	$3.2 \times 10$	$3.0 \times 10$	$2.7 \times 10$
20	0	0	$5.8 \times 10^2$	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0

11 ข้อมูลการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 (log CFU/มล.) ของอนุภาคนาโน  
ชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน

วัน	<i>Lactobacillus plantarum</i> (log CFU/มล.)						
	ชุดควบคุม	ชุดควบคุม ลบ	ไนซิน อิสระ	ไนซิน ร้อยละ 0.5	ไนซิน ร้อยละ 1.0	ไนซิน ร้อยละ 2.0	ไนซิน ร้อยละ 3.0
0	7.27	7.41	6.81	6.94	6.85	6.75	6.88
1	9.04	8.95	0	8.38	8.72	9.18	8.08
2	7.83	7.92	2.49	6.63	6.30	6.08	5.78
3	6.93	6.86	4.61	4.50	3.93	3.57	3.40
5	6.89	6.81	6.43	4.11	3.64	3.23	2.84
7	5.79	5.78	7.89	2.89	2.75	2.32	2.58
10	5.66	5.63	6.7	2.80	2.71	1.98	2.15
15	2.32	2.14	5.8	1.62	1.51	1.48	1.89
20	0	0	2.76	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายพินิตพล พรหมบุตร เกิดเมื่อวันที่ 7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2526 ที่เขตบางพลัด กรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 และเข้ารับการศึกษาคือต่อในระดับ ปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548