

วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญต้องใช้เวลาในการละลายนานขึ้น สังเกตสีที่เข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับกากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วพบว่าสีเข้มมากกว่าและการละลายเพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันที่ถูกกักเก็บในอนุภาคภายหลังการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 3 เดือน จะต้องใช้เวลาในการ sonicate มากขึ้น ตารางที่ 40 แสดงให้เห็นว่าปริมาณการกักเก็บน้ำมันกะเพราที่เวลาเริ่มต้นร้อยละ 62.94 (SD 0.51) และ 62.15 (SD 2.08) สำหรับรุ่นการผลิตที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แต่เมื่อทดสอบความคงตัวแบบระยะยาวที่เวลา 3 เดือน พบว่าปริมาณการกักเก็บน้ำมันกะเพราที่ได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 67.97 (SD 2.53) และลดลงเป็นร้อยละ 57.48 (SD 3.36) สำหรับรุ่นการผลิตที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการสุ่มตัวอย่างที่ไม่สม่ำเสมอ หรือการกักเก็บน้ำมันที่ไม่สม่ำเสมอในแต่ละอนุภาคได้

ตารางที่ 40 – แสดงปริมาณการกักเก็บน้ำมันกะเพราของไมโครแคปซูลที่เวลา 0, และ 3 เดือน
จำนวน 2 รุ่นการผลิต

ระยะเวลา (เดือน)	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2
0	62.04 (0.51)	62.15 (2.08)
3	67.97 (2.53)	57.48 (3.36)

ผลการศึกษาความคงตัวของสารสกัดพริกแบบแรง พบว่าปริมาณสาร Capsaicin และ Dihydrocapsaicin ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการเก็บไว้นาน 3 เดือน และ 6 เดือน ตามสมภาวะที่กำหนด ดังแสดงผลในตารางที่ 41 จากผลการทดลองทั้ง 2 รุ่นการสกัด

ตารางที่ 41 – แสดงปริมาณร้อยละของ Capsaicin และ Dihydrocapsaicin โดยน้ำหนักเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ระยะเวลา (เดือน)	รุ่นที่ 1		รุ่นที่ 2	
	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	Capsaicin	Dihydrocapsaicin
0	1.39 (0.008)	0.36 (0.15)	1.41 (0.008)	0.57 (0.150)
3	1.15 (0.07)	0.56 (0.002)	1.17 (0.07)	0.57 (0.020)
6	1.14 (0.05)	0.52 (0.047)	1.14 (0.05)	0.51 (0.024)

ผลการศึกษาความคงตัวของสารสกัดพริกแบบระยะยาว พบว่าปริมาณสาร Capsaicin และ Dihydrocapsaicin ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการเก็บไว้นาน 3 เดือน และ 6 เดือน ตามสมภาวะที่กำหนด ดังแสดงผลในตารางที่ 42 จากผลการทดลองทั้ง 2 รุ่นการสกัด

ตารางที่ 42 – แสดงปริมาณร้อยละของ Capsaicin และ Dihydrocapsaicin โดยน้ำหนักเทียบกับน้ำหนักของกรานูลของสารสกัดพริกที่ใช้ทดสอบ

ระยะเวลา (เดือน)	รุ่นที่ 1		รุ่นที่ 2	
	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	Capsaicin	Dihydrocapsaicin
0	0.35 (0.002)	0.14 (0.003)	0.33 (0.001)	0.13 (0.002)
3	0.31 (0.005)	0.14 (0.004)	0.32 (0.002)	0.16 (0.005)
6	0.31 (0.005)	0.11 (0.005)	0.29 (0.004)	0.10 (0.005)

ผลการทดลองในภาพรวมของการทดสอบความคงตัวแบบระยะยาวและแบบเร่ง เห็นได้ว่าไมโครแคปซูลที่บรรจุน้ำมันกะเพรา พบปริมาณสารสำคัญปริมาณสูงเท่าเดิมหรือมากกว่าเดิม ทั้งนี้อาจเกิดจากการสุมตัวอย่าง หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงอื่นที่ยังไม่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจากการ aging ของอัลจินตและ/หรือไคโตซานที่ก่อเป็นผนัง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของไมโครแคปซูลและทำให้การละลายที่ช้าลง ส่วนความคงตัวของสารสกัดพริกเดี่ยวๆ นั้นมีแนวโน้มการลดลงของสารสำคัญ Capsaicin ภายหลังการเก็บเป็นเวลานาน 3 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ ในขณะที่กรานูลของสารสกัดพริกมีปริมาณสารสำคัญ Capsaicin ที่ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บ ทั้งในแบบระยะยาวและแบบเร่ง ส่วนปริมาณ Dihydrocapsaicin มีปริมาณการเปลี่ยนแปลงที่ไม่มีแนวโน้มที่แน่นอน ยากแก่การสรุปทางใดทางหนึ่ง

บทที่ 3

วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาวิธีการวิเคราะห์สารสำคัญเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดพริกเชิงคุณภาพสามารถทำได้โดยใช้ Hexane : Acetone ในอัตราส่วน 2 : 1 เป็นระบบ Mobile phase ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดจากพริกชี้หนูที่ได้ โดยใช้ TLC แล้วนำไป develop ในบรรยากาศอิ่มตัวของ Mobile phase จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบกับผลที่ได้กับสารมาตรฐาน ส่วนการวิเคราะห์สารสำคัญ Capsaicin และ Dihydrocapsaicin สามารถทำได้ด้วย HPLC โดยใช้สารละลาย 48% Acetonitrile ในน้ำกลั่นเป็น Mobile phase และใช้ Column : 3.9 mm ID x 300 mm Packed with 10- μ m Bondapak C18, Detector : Ultraviolet detector at 280 nm, Flow rate : 1.2 ml/min, Injection volume : 60 ไมโครลิตร

การเลือกใช้น้ำมันเปปเปอร์มินต์เป็นน้ำมันหอมระเหยต้นแบบในการทดลองเตรียมไมโครแคปซูลเพื่อให้ได้ปริมาณการกักเก็บน้ำมันสูงสุด สามารถพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ได้ง่ายโดยใช้ Gas Chromatography (GC) แบบธรรมดา ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการวิเคราะห์ ในการทดลองนี้ทำการทดสอบพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ยี่ห้อ Varian รุ่น star 3400Cx คอลัมน์ 3% OV-225 เมื่อทำการพัฒนาตำรับไมโครแคปซูลให้ได้ปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้มากที่สุดโดยใช้น้ำมันเปปเปอร์มินต์เป็นต้นแบบแล้ว จึงจะทำการทดสอบตั้งตำรับโดยใช้น้ำมันกะเพราและโหระพา แล้ววิเคราะห์หาปริมาณการกักเก็บน้ำมันกะเพราและโหระพาต่อไป ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้ผลดีและประหยัดต้นทุนในการตั้งตำรับได้มาก

การวิเคราะห์น้ำมันกะเพราและน้ำมันโหระพาทำโดยใช้ Gas Chromatography – Mass Spectrophotometry (GC-MS) หากส่วนประกอบหลักเชิงคุณภาพและ GC-MS ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ในการทดลองนี้ทำการทดสอบพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น QP 2010 คอลัมน์ยี่ห้อ Phenomenex; Zebron capillary column: ZB-5 5% Phenyl 95% Dimethylpolysiloxane: Length 30 meters: I.D. 0.25 mm: Film thickness 0.25 micron แต่เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์ด้วย GC-MS มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ เพราะก๊าซเฉื่อยที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ราคาแพง ในทางปฏิบัติควรมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้ GC แบบธรรมดา และใช้เมทิลยูจินอลเป็นสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำมันกะเพรา และใช้เมทิลชาวิลคอลเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์น้ำมันโหระพา

2. การศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดจากพริก

ผลการทดลองจากตารางที่ 15 ค่าที่คำนวณได้ในตารางเป็นการทำการทดลองเพียงครั้งเดียว ($n = 1$) และการสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณสารสำคัญนั้น ทำโดยการดูดสารสกัดตัวอย่างจากเครื่องมือสกัดเป็นระยะเมื่อทำการสกัดด้วยวิธี Soxhlet's extraction และ Reflux extraction ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีความหนืดข้นมาก ส่วนที่มีความเข้มข้นมากจะมีความหนาแน่นสูงและตกลงไปนอนที่บริเวณก้นขวดก้นกลม การสุ่มตัวอย่างที่ถูกต้องจะต้องคนสารสกัดให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วจึงสุ่มตัวอย่าง คณะผู้ทำการทดลองครั้งนี้จึงแก้ไขวิธีการสุ่มตัวอย่างในการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโดยการเปลี่ยนถ่ายสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ทั้งหมดในแต่ละรอบแทนการสุ่มตัวอย่าง พบว่าได้ค่าที่มีความแปรปรวนน้อย ดังจะสังเกตได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ต่ำมาก นอกจาก

นี้จากตารางที่ 15 วิธีการสกัดด้วยวิธีการหมักทำโดยการหมักพริกและตัวทำละลายทิ้งไว้นาน 7 วันโดยไม่มีการเปลี่ยนตัวทำละลาย ทำให้ผลการทดลองได้ปริมาณสารสกัดและปริมาณสารสำคัญน้อย การสกัดด้วยวิธีการหมักที่ดีควรมีการเปลี่ยนตัวทำละลายบ่อยๆ และมีการคนช่วยเป็นระยะๆ

การทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดด้วยวิธี Soxhlet's extraction ด้วยเครื่องสกัดขนาดเล็กจุ 1 ลิตร สามารถสกัด capsaicin และ dihydrocapsaicin ได้หมดที่ประมาณรอบการสกัดที่ 12 ซึ่งใช้เวลาในการสกัดทั้งสิ้นประมาณ 15 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ร้อยละของปริมาณสารสกัดเทียบกับปริมาณพริกแห้ง (% Yield) เท่ากับ 21.96 (SD 0.67) โดยคิดเป็นส่วนประกอบของ capsaicin และ dihydrocapsaicin คิดเป็นร้อยละ 0.29 และ 0.18 โดยน้ำหนักของพริกแห้ง ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วยวิธีการชงจนได้ปริมาณ capsaicin และ dihydrocapsaicin ทั้งหมด ใช้เวลาเพียง 3 วัน หรือการเปลี่ยนตัวทำละลายในการสกัด 3-4 ครั้ง ก็เพียงพอ เนื่องจากการทดลองนี้ทั้งระยะเวลาในการหมักนาน 24 ชั่วโมง หากต้องการนำวิธีการสกัดนี้ไปพัฒนาใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาจทำให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นโดยการลดระยะเวลาการหมักให้น้อยกว่า 24 ชั่วโมง และการเปลี่ยนตัวทำละลายในการสกัดเพียง 4 ครั้งก็สามารถสกัดสารสำคัญทั้ง 2 ชนิด ทั้งนี้ของสารละลายที่ได้จากการสกัดไม่ได้เป็นตัวบ่งบอกว่าการสกัดนั้นหมดจดหรือไม่ สารละลายที่ได้ยังคงมีสีเหลืองจางของสารกลุ่ม carotenoids ในขณะที่ capsaicin และ dihydrocapsaicin ถูกสกัดจนหมดแล้ว

เนื่องจากการทดลองเพื่อเตรียมสารสกัดนี้เป็นการเตรียมสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล แต่ในทางปฏิบัติสามารถเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย เช่น Hexane ก็จะทำให้ได้ปริมาณสารสกัดสูงขึ้นได้ แต่การใช้ Hexane หรือตัวทำละลายอื่นที่อาจเป็นอันตรายต่อสัตว์ได้นั้น ควรมีการตรวจสอบหาปริมาณตัวทำละลายตกค้างภายหลังการทำแห้ง ไม่ให้มีปริมาณตกค้างมากจนอาจเป็นอันตรายได้

3. การศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ในขั้นตอนการเตรียมไมโครแคปซูล

ผลการศึกษาพบว่าการใช้อัลจิเนตชนิดความหนืดสูงเป็นสารก่อผนังจะได้ลักษณะของอนุภาคที่เปื่อยยุ่ย ไม่เป็นไมโครแคปซูล ไมโครแคปซูลที่มีสารก่อผนังเป็นโซเดียมอัลจิเนตชนิดความหนืดปานกลางสามารถเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ปริมาณมากกว่าที่เตรียมได้จากชนิดความหนืดต่ำ โดยความเข้มข้นของอัลจิเนตความหนืดปานกลางที่เหมาะสมคือร้อยละ 1 และ 1.5 โดยน้ำหนัก มีปริมาณการกักเก็บน้ำมันสูงสุดคือร้อยละ 75.59 โดยน้ำหนัก จากไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและน้ำมันเปปเปอร์มินต์ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยปริมาตร การเตรียมไมโครแคปซูลจากอัลจิเนตความหนืดต่ำและปานกลางเมื่อปริมาณน้ำมันในตำรับน้อย ความเข้มข้นของสารก่อผนังจะไม่มีผลต่อการเก็บน้ำมัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันในตำรับขึ้นพบว่าไมโครแคปซูลที่มีความเข้มข้นของสารก่อผนังต่ำจะเก็บปริมาณน้ำมันได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นมากกว่าตำรับที่มีความเข้มข้นของสารก่อผนังสูง และเมื่อเตรียมโดยไม่ใช้โคโคซานลักษณะของอนุภาคจะเกาะรวมกันเป็นกลุ่ม ลักษณะของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นทรงกลม สำหรับการประเมินขนาดพบว่าไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากอัลจิเนตชนิดความหนืดปานกลางมีขนาดไม่แตกต่างกับที่เตรียมจากชนิดความหนืดต่ำ สำหรับการเพิ่มขนาดของเข็มนที่ใช้ในการหยดทำให้ขนาดของไมโครแคปซูลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณการเก็บน้ำมันไม่แตกต่างกันแต่มีแนวโน้มลดลง ไมโครแคปซูลจะเริ่มปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยที่เวลา 30 นาทีที่ pH 1 และ 1 ชั่วโมงที่ pH 6.8 รูปแบบการปลดปล่อยเป็นแบบ sustained release

4. การศึกษาตั้งตำรับไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันกะเพราและน้ำมันโหระพา

พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำมันกะเพราที่ร้อยละ 15 โดยปริมาตร ความเข้มข้นของโคโคซานและแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตเป็นร้อยละ 1.0, 1.5, และ 2.0 โดยน้ำหนักตามลำดับ ตำรับที่เหมาะสมในขั้นตอนการผลิตและทดสอบความคงตัวคือตำรับที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก และพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำมันโหระพาที่ร้อยละ 15 โดย

ปริมาตร ความเข้มข้นของโคโคซานและแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ตำรับที่เหมาะสมในขั้นตอนการผลิตคือตำรับที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก เช่นกัน

จะเห็นได้ว่าปริมาณการกักเก็บน้ำมันของไมโครแคปซูลขึ้นกับหลายปัจจัยได้แก่ อัตราส่วนระหว่างอัลจิเนตและน้ำมันที่ใช้ในการเตรียมไมโครแคปซูล ชนิดของอัลจิเนตที่ใช้ ความเข้มข้นของอัลจิเนต และชนิดของน้ำมันที่ใช้ เนื่องจากน้ำมันแต่ละชนิดจะมีความเป็นขี้ที่ต่างกัน น้ำมันที่มีขี้้นน้อยและมีความหนืดสูงจะมีปริมาณการกักเก็บที่สูงกว่าน้ำมันที่มีขี้้นมาก (ละลายน้ำได้ดี)

5. การศึกษาความคงตัวของตำรับ

ตำรับไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันกะเพราสามารถกักเก็บน้ำมันกะเพราได้ดีมีการสูญเสียน้ำมันในปริมาณน้อยภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 3 เดือน หากเก็บที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 เดือน จะทำให้อนุภาคของไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันกะเพราที่มีสีเหลืองน้ำตาลที่เข้มข้น และมีการละลายยากมากขึ้น ส่วนปริมาณน้ำมันที่บรรจุในไมโครแคปซูลจะมีแนวโน้มที่ลดลงเล็กน้อย อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดพริกมีแนวโน้มการลดลงของ Capsaicin และการานูลของสารสกัดพริกมีความคงตัวดีในสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเก็บกรานูลพริกในที่ถูกแสงจะทำให้กรานูลพริกเปลี่ยนสีจากกรานูลสีเหลืองส้มเป็นสีน้ำตาล แต่หลังจากการวิเคราะห์หาปริมาณ Capsaicin และ Dihydrocapsaicin พบว่าปริมาณของสารทั้ง 2 ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่สิ่งที่ลดลงไปในการวิเคราะห์ด้วย HPLC คือ กลุ่มของสารที่มีสีซึ่งทางคณะผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบต่อไปว่าคือสารใด

เนื่องจากเวลาในการทำการทดลองมีจำกัด ซึ่งคณะผู้วิจัยจะต้องเริ่มทำการศึกษาความคงตัวของตำรับทั้งแบบระยะยาวและแบบเร่งภายหลังที่ได้สูตรตำรับที่ต้องการ และมีการปรับเปลี่ยนสูตรตำรับจนเป็นที่พอใจแล้ว ดังนั้นการรายงานผลการทดสอบความคงตัวของตำรับในเดือนที่ 12 ซึ่งจะครบรอบในเดือนพฤศจิกายน 2548 จึงขอรายงานเสริมเป็นรายงานฉบับเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. ชุตติศาสตร์ เรื่องการเลี้ยงไก่. ฝ่ายวิชาการเกษตร. สำนักพิมพ์หอสมุดกลาง. กรุงเทพฯ.
2. Minion FC. Molecular Pathogenesis of Mycoplasma Animal Respiratory Pathogens. *Frontiers in Bioscience*. 7: d1410-22, 2002.
3. Turner KS, Kleven SH. Eradication of Live F Strain *Mycoplasma Gallisepticum* Vaccine Using Live ts-11 on a Multiage Commercial Layer Farm. *Avian Disease*. 42(2): 404-7, 1998.
4. Aruoma OI. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75(2), 199-218, 1998.
5. Block G, Langseth L. Antioxidant Vitamins and Disease Prevention. *Food Technology*. 48(7), 80-84, 1994.
6. Abramovskaya AK, Chernous VI, Gurevich GL, Kayshnikov VS. Defects of Lipids Peroxidation and Immunologic Changes in Chemical Production Workers Facing Chronic Respiratory Diseases. *Gigiena Truda I Professionalnye Zabolevaniia*. 2, 9-12, 1993.
7. Colby MM, Johnson YJ. Potential Uses for Geographic Information System-Based Planning and Decision Support Technology in Intensive Food Animal Production. *Animal Health Research Reviews*. 3(1), 31-42, 2002.
8. Buhl R. Imbalance between Oxidants and Antioxidants in the Lungs of HIV-seropositive Individuals. *Chemico-Biological Interactions*. 91(2-3), 147-158, 1994.
9. World Health Organization website: <http://www.who.int/ncd/asthma/implementation-7.htm>.
10. Howard LR, Talcott ST, Brenes CH, and Villalon B. Change in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum* Species) as Influenced by Maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1713-1720, 2000.
11. Madsen HL, Nielsen BR, Bertesen G, and Skibsted LH. Screening of Antioxidative Activity of Spices: A Comparison between Assays based on ESR Spin Trapping and Electrochemical Measurement of Oxygen Consumption. *Food Chemistry*. 57, 331-337, 1996.

12. Archana R, Namasivayam A. Effect of *Ocimum sanctum* on Noise Induced Changes in Neutrophil Functions. *Journal of Ethnopharmacology*. 73, 81-85, 2000.
13. Singh S, Majumdar DK, Rehan HMS. Evaluation Of Anti-Inflammatory Potential of Fixed Oil of *Ocimum Sanctum* (Holybasil) and Its Possible Mechanism of Action. *Journal of Ethnopharmacology*. 54, 19-26, 1996.
14. Rulkens WH, Thijssen AAC. Retention of Volatile Compounds in Freeze-Drying Slabs of Malto-Dextrin. *Journal of Food Science*. 7, 79-93, 1972.
15. Menting LC, Hoogstad B, Thijssen HAC. Diffusion Coefficients of Water and Organic Volatiles in Carbohydrate-Water Systems. *Journal of Food Technology*. 5, 111-126, 1970.
16. Chirife J, Karel M, Flink JM. Studies on Mechanisms of Retention of Volatile in Freeze-Dried Food Models: the System PVP-n-Propanol. *Journal of Food Science*. 38, 671-674, 1973.
17. Luzzi LA, Gerraughty RJ Effect of Selected Variables on the Extractability of Oils From Coacervate Capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 53, 429-431, 1964.
18. Jizomoto H, Kanaoka E. Sugita K, Hirano K. Gelatin-Acacia Microcapsules for Trapping Micro Oil Droplets Containing Lipophilic Drugs and Ready Disintegration in the Gastrointestinal Tract. *Pharmaceutical Research*. 10(8), 115-122, 1993.
19. Ribeiro A, Arnaud P, Frazao S, Venancio F, Chaumeil JC. Development of Vegetable Extracts by Microencapsulation. *Journal of Microencapsulation*. 14(6), 735-742, 1997.
20. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Stability Testing of New Drug Substances and Products. Recommended for Adoption to Regulatory Bodies of the European Union, Japan and USA.
21. Santamaria RI, Reyes-Duarte MD, Barzana E, Fernando D, Gama, FM, Mota, M, and Lopez-Munguia. *J. Agric. Food Chem*. 48, 3063-3067, 2000.

ภาคผนวก

เอกสารคำขอจดอนุสิทธิบัตร

ผ - 1

หน้าที่ 1 ของจำนวน 11 หน้า

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ วิธีการทำอัลจิเนต/ไคโตซานไมโครแคปซูลสำหรับเก็บน้ำมัน

1. ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

วิธีการทำอัลจิเนต/ไคโตซานไมโครแคปซูลสำหรับเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ในไมโครแคปซูล ด้วยวิธีการเกิดโคอะเซเวชันเชิงซ้อน (complex coacervation) แบบขั้นตอนเดียว (one-step production) วิธีการนี้ทำได้โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของส่วนที่เป็นผงของไมโครแคปซูลต่อปริมาณน้ำมันที่ใส่ ใช้โพลิเมอร์จากธรรมชาติ คือ อัลจิเนตเป็นสารก่อผนังของไมโครแคปซูลร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์และไคโตซาน โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตทำเป็นอิมัลชันกับน้ำมันที่ต้องการใส่ในไมโครแคปซูลแล้วหยดลงในสารละลายผสมของแคลเซียมคลอไรด์และไคโตซาน จนได้ปริมาณการกักเก็บน้ำมันตั้งแต่ร้อยละ 7 ถึงร้อยละ 76 โดยน้ำหนัก เนื่องจากเป็นวิธีการแบบขั้นตอนเดียวที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันได้สูง อนุภาคที่ได้มีผนังที่มีความแข็งแรงสามารถเก็บน้ำมัน สารที่มีคุณสมบัติคล้ายน้ำมันหรือละลายในน้ำมันได้ และมีลักษณะการไหลที่ดี ไม่เกาะเป็นก้อน วิธีการนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการเตรียมไมโครแคปซูลเพื่อเก็บน้ำมันหรือสารที่มีคุณสมบัติเหมือนน้ำมันหรือละลายในน้ำมัน ในรูปผลิตภัณฑ์แห่งระดับอุตสาหกรรม

2. สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation technology) เพื่อเพิ่มความคงตัวของน้ำมัน สารที่มีคุณสมบัติเหมือนน้ำมันหรือสารที่ละลายในน้ำมัน หรือเพื่อเป็นระบบควบคุมการปลดปล่อยสารที่อยู่ภายใน

3. ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

การทดลองหลายวิธีการเพื่อกักเก็บสารน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ในไมโครแคปซูล ซึ่งวิธีการทั้งหลายนั้นจะได้อนุภาคที่มีลักษณะเหมือนกัน คือ อนุภาคกลมเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งวิธีการต่างๆ เหล่านี้ได้แก่ โคอะเซเวชัน (coacervation) การพ่นแห้ง (spray drying) หรือการพ่นเคลือบ โดยการใช้โพลิเมอร์จากธรรมชาติเจลาติน/อะคาเซียเตรียมให้เกิดโคอะเซเวชันเชิงซ้อน (complex coacervation) จะได้อนุภาคที่มีผนังเปราะบาง แตกง่าย และมีผิวนอกเหนียว ทำให้อนุภาคที่ได้เกาะกลุ่ม ไหลได้ยาก ไม่เหมาะการผลิตเป็นรูปผลิตภัณฑ์แห่ง ส่วนวิธีการพ่นแห้งแม้ว่าจะได้อนุภาคแห้งที่มีการไหลดี แต่มีปริมาณการกักเก็บน้ำมันต่ำ การเตรียมอนุภาคที่มีน้ำมันแล้วนำไปเคลือบหุ้ม ก็จะเป็นวิธีที่มีปริมาณการกักเก็บน้ำมันสูง แต่ขั้นตอนการเตรียมเป็น 2 ขั้นตอน คือ การเตรียมอนุภาคและการเคลือบหุ้ม ทำให้ไม่เหมาะสมกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

4. คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 - แสดงวิธีการทำอัลจิเนต/ไคโตซานไมโครแคปซูลสำหรับกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ โดยเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ผสมกับน้ำมันเปปเปอร์มินท์ แล้วนำไปหยดลงในสารละลายของไคโตซานกับโซเดียมคลอไรด์

รูปที่ 2 – กราฟเปรียบเทียบขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโซเดียมอัลจิเนตชนิดที่มีความหนืดต่ำ เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1, 2, 3, และ 4 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ น้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 10 และ 12 โดยปริมาตร และไคโตซานร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

รูปที่ 3 - กราฟเปรียบเทียบขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโซเดียมอัลจิเนตชนิดที่มีความหนืดปานกลาง เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1, 1.5, และ 2 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ น้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 10, 15, 20, และ 25 โดยปริมาตร และไคโตซานร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

รูปที่ 4 – Scanning Electron Micrograph แสดงรูปร่างและลักษณะพื้นผิวของไมโครแคปซูลที่เตรียมจากความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตความหนืดปานกลางร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก น้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 15 โดยปริมาตร และไคโตซานร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

รูปที่ 5 - กราฟเปรียบเทียบปริมาณการกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโซเดียมอัลจิเนตชนิดที่มีความหนืดต่ำ เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1, 2, 3, และ 4 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ น้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 10 และ 12 โดยปริมาตร และไคโตซานร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

รูปที่ 6 - กราฟเปรียบเทียบปริมาณการกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโซเดียมอัลจิเนตชนิดที่มีความหนืดปานกลาง เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1, 1.5, และ 2 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ น้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 10, 15, 20, และ 25 โดยน้ำหนัก และไคโตซานร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

รูปที่ 7 – กราฟแสดงการปลดปล่อยน้ำมันเปปเปอร์มินท์จากตำรับไมโครแคปซูลที่ 0.1N HCl และ Phosphate buffer pH 6.8 เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก น้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก และไคโตซานร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

5. การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

วิธีการผลิตอัลจิเนต/ไคโตซานไมโครแคปซูลเพื่อเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ในไมโครแคปซูล ด้วยวิธีการเกิดโคอะเซอเวชันเชิงซ้อน (complex coacervation) แบบขั้นตอนเดียว (one-step production) วิธีการนี้ทำได้โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของส่วนที่เป็นผนังของไมโครแคปซูลต่อปริมาณน้ำมันที่ใส่ ใช้โพลิเมอร์จากธรรมชาติ คือ อัลจิเนตเป็นสารก่อผนังของไมโครแคปซูลร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์และไคโตซาน โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตทำเป็นอิมัลชันกับน้ำมันที่ต้องการใส่ในไมโครแคปซูลแล้วหยดลงในสารละลายผสมของแคลเซียมคลอไรด์และไคโตซาน จนได้ปริมาณการกักเก็บน้ำมันตั้งแต่ร้อยละ 7 ถึงร้อยละ 76 โดยน้ำหนัก เนื่องจากเป็นวิธีการแบบขั้นตอนเดียวที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันได้สูง อนุภาคที่ได้มีผนังที่มีความแข็งแรงสามารถเก็บได้โดยไม่แตก และมีลักษณะการไหลที่ดี ไม่เกาะเป็นก้อน วิธีการนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการเตรียมไมโครแคปซูลเพื่อเก็บน้ำมันหรือสารที่มีคุณสมบัติเหมือนน้ำมันหรือละลายในน้ำมัน

ขั้นตอนการเตรียมไมโครแคปซูล

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตโดยละลายผงโซเดียมอัลจิเนตปริมาณที่ต้องการลงในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร คนตลอดเวลาโดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนจนโซเดียมอัลจิเนตมีการพองตัวเต็มที่ เตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร โดยละลายผงไคโตซานลงในสารละลายกรดอะซิติก คนตลอดเวลาโดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนจนได้ไคโตซานที่มีการพองตัวเต็มที่

ละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงในสารละลายโคโคซานที่เตรียมได้ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และคนจนละลาย เติมน้ำมันปริมาตรที่ต้องการลงในสารละลายอัลจินेटที่เตรียมไว้ พร้อมทั้งเติมโพลีซอร์เบท 80 (Polysorbate 80) เป็นสารก่ออิมัลชัน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร แล้วปั่นจนเกิดเป็นอิมัลชันด้วยเครื่องปั่นอิมัลชัน (homogenizer) จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาดูดอัลจินेटอิมัลชัน หยดผ่านเข็มฉีดยาขนาดที่ต้องการลงในสารละลายโคโคซานที่คนตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็กกวน เมื่อหยดอัลจินेटอิมัลชันหมดแล้วคนสารละลายไมโครแคปซูลต่อเป็นเวลานานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ก่อนการล้างครั้งสุดท้ายด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แล้วนำไมโครแคปซูลที่ผ่านการล้างไปอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจนแห้งสนิท

ผลการทดลองการเตรียมไมโครแคปซูลเพื่อให้ได้การเก็บน้ำมันสูงสุด

ตามรูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการทำอัลจินेट/โคโคซานไมโครแคปซูลแบบขั้นตอนเดียว

ตามรูปที่ 2 เป็นกราฟเปรียบเทียบขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโซเดียมอัลจินेटชนิดที่มีความหนืดต่ำ เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจินेटร้อยละ 1, 2, 3, และ 4 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และน้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 10 และ 12 โดยน้ำหนัก พบว่าขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดไม่แตกต่างกัน โดยมีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของไมโครแคปซูลอยู่ในช่วง 0.8 - 1.1 มิลลิเมตร

ตามรูปที่ 3 เป็นกราฟเปรียบเทียบขนาดของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโซเดียมอัลจินेटชนิดที่มีความหนืดปานกลาง เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจินेटร้อยละ 1, 1.5, และ 2 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และน้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 10, 15, 20, และ 25 โดยน้ำหนัก พบว่าขนาดของอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดไม่แตกต่างกัน โดยมีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคอยู่ในช่วง 0.95 - 1.6 มิลลิเมตร พบว่าเมื่อกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินेटเท่ากับร้อยละ 1 และ 1.5 โดยน้ำหนัก ขนาดของอนุภาคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำมันในตำรับที่เพิ่มขึ้น และเมื่อกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินेटเท่ากับร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ขนาดของอนุภาคจะมีแนวโน้มลดลงตามปริมาณน้ำมันในตำรับที่เพิ่มขึ้น

ตามรูปที่ 4 ภาพแสดงรูปร่างและลักษณะพื้นผิวของไมโครพาร์ติเคิลที่เตรียมจากความเข้มข้นโซเดียมอัลจินेट ความหนืดปานกลางร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก น้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 15 โดยปริมาตร และโคโคซานร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก จาก Scanning Electron Microscope พบว่ารูปร่างของไมโครแคปซูลส่วนใหญ่เป็นรูปทรงกลม ลักษณะพื้นผิวเรียบและปิดสนิทเป็นไมโครแคปซูล ซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำให้ผลิตภัณฑ์แห้งที่เตรียมได้ มีการไหลที่ดีและไม่เกาะเป็นก้อน

ตามรูปที่ 5 เป็นกราฟเปรียบเทียบปริมาณการกักเก็บน้ำมันของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโซเดียมอัลจินेटชนิดที่มีความหนืดต่ำ เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจินेटร้อยละ 1, 2, 3, และ 4 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และน้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 10 และ 12 โดยน้ำหนัก ผลจากการทดสอบความสามารถในการเก็บน้ำมันหอมระเหย พบว่าปริมาณน้ำมันที่อยู่ในไมโครแคปซูลไม่แตกต่างกันและเมื่อพิจารณาถึงขนาดของไมโครแคปซูลพบว่าถึงแม้จะมีขนาดแตกต่างกัน แต่ปริมาณการเก็บน้ำมันไม่แตกต่างกัน

ตามรูปที่ 6 เป็นกราฟเปรียบเทียบปริมาณการกักเก็บน้ำมันของไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโซเดียมอัลจินेटชนิดที่มีความหนืดปานกลาง เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจินेटร้อยละ 1, 1.5, และ 2 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และน้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 10, 15, 20, และ 25 โดยน้ำหนัก พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินेटเพิ่มขึ้นจาก

ร้อยละ 1, 1.5 และ 2 โดยน้ำหนัก ไมโครแคปซูลจะเก็บน้ำมันได้เพิ่มขึ้น โดยไมโครแคปซูลที่เตรียมจากความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1 และ 1.5 โดยน้ำหนัก เก็บน้ำมันได้ปริมาณไม่แตกต่างกัน และเก็บน้ำมันได้มากที่สุดที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก

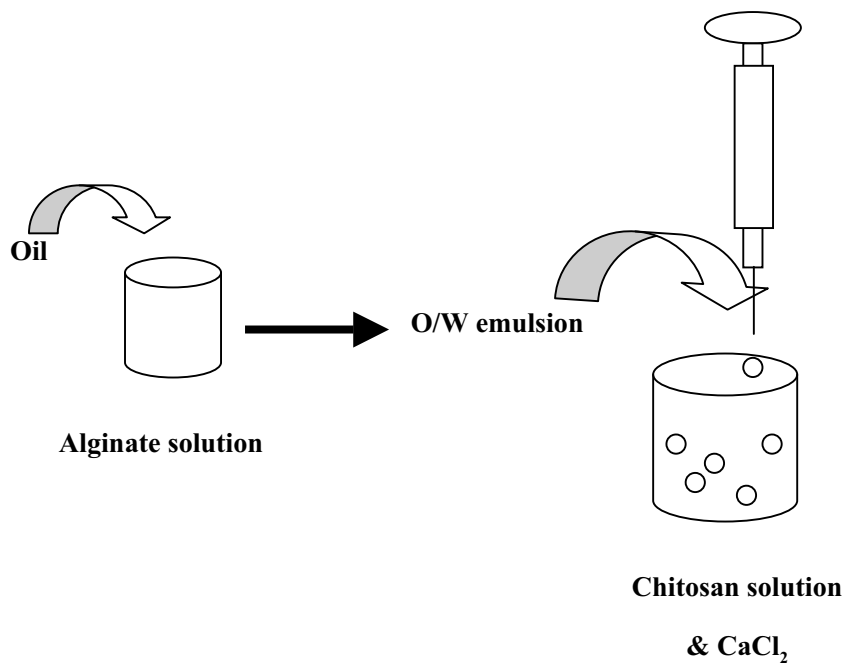
ตามรูปที่ 7 เป็นกราฟแสดงการปลดปล่อยน้ำมันเปปเปอร์มินท์จากตำรับไมโครแคปซูล เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก และน้ำมันเปปเปอร์มินท์ร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก พบว่าการปลดปล่อยน้ำมันจากไมโครแคปซูลที่ pH 1 และ pH 6.8 ไมโครแคปซูลจะเริ่มปลดปล่อยน้ำมันใน pH 1 ที่เวลา 30 นาที และใน pH 6.8 ที่เวลา 1 ชั่วโมง การปลดปล่อยค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

6. วิธีในการผลิตที่ดีที่สุด

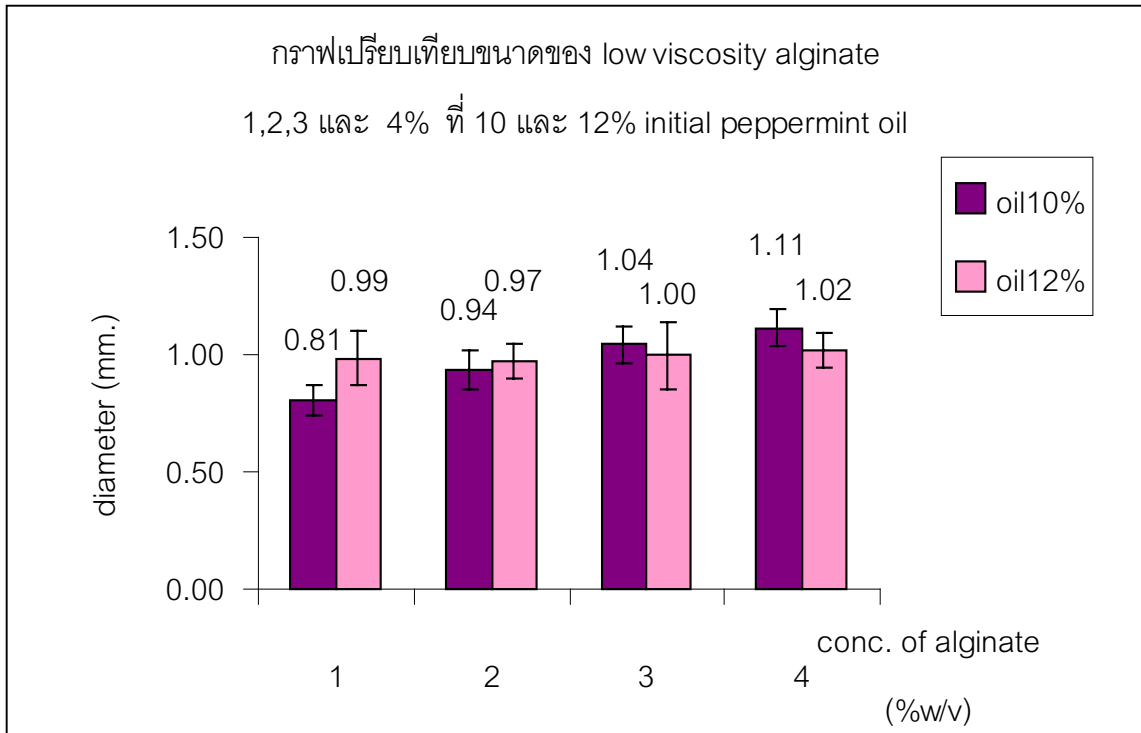
การใช้โซเดียมอัลจิเนตชนิดความหนืดต่ำและชนิดความหนืดปานกลางในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 5 โดยน้ำหนัก และปริมาณน้ำมันที่ใส่ในช่วงร้อยละ 10 ถึง 25 โดยน้ำหนัก และใช้ไคโตซานและแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-2 โดยน้ำหนัก

7. ข้อถ้อยสิทธิ

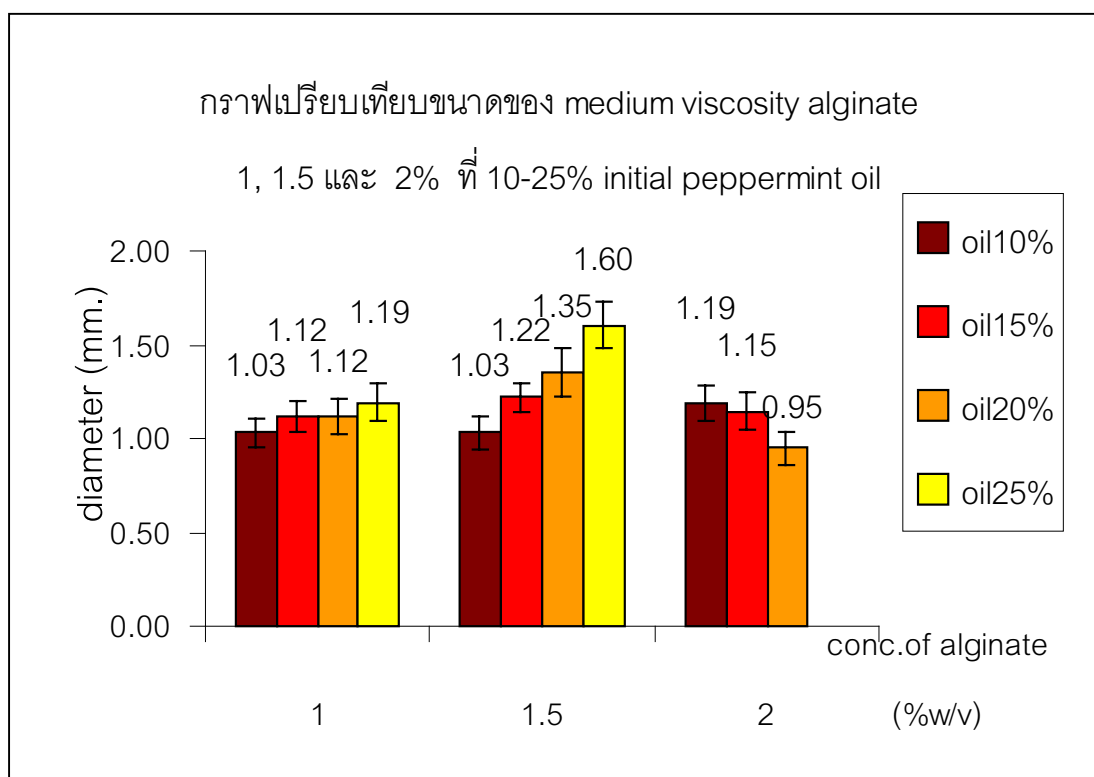
- 7.1 วิธีการทำไมโครแคปซูลชนิดอัลจิเนต/ไคโตซานสำหรับกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ที่มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ละลายสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ผสมกับน้ำมันเปปเปอร์มินท์ แล้วนำไปหยดลงในสารละลายของไคโตซานกับโซเดียมคลอไรด์
- 7.2 วิธีการทำไมโครแคปซูลชนิดอัลจิเนต/ไคโตซานสำหรับกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ตามข้อถ้อยสิทธิข้อที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ โซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 1-5 โดยน้ำหนัก
- 7.3 วิธีการทำไมโครแคปซูลชนิดอัลจิเนต/ไคโตซานสำหรับกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ตามข้อถ้อยสิทธิข้อที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ น้ำมันเข้มข้นร้อยละ 10-25 โดยน้ำหนัก
- 7.4 วิธีการทำไมโครแคปซูลชนิดอัลจิเนต/ไคโตซานสำหรับกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ตามข้อถ้อยสิทธิข้อที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ ไคโตซานเข้มข้นร้อยละ 0.5-2 โดยน้ำหนัก
- 7.5 วิธีการทำไมโครแคปซูลชนิดอัลจิเนต/ไคโตซานสำหรับกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ตามข้อถ้อยสิทธิข้อที่ 1 มีลักษณะเฉพาะคือ แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.5-2 โดยน้ำหนัก
- 7.6 วิธีการทำไมโครแคปซูลชนิดอัลจิเนต/ไคโตซานสำหรับกักเก็บน้ำมันเปปเปอร์มินท์ (น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน) ที่มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ผสมกับน้ำมันเปปเปอร์มินท์ น้ำมันกะเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้หอม ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน แล้วนำไปหยดลงในสารละลายของไคโตซานกับแคลเซียมคลอไรด์ แล้วนำไมโครแคปซูลที่ได้มาล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แล้วทำให้แห้ง



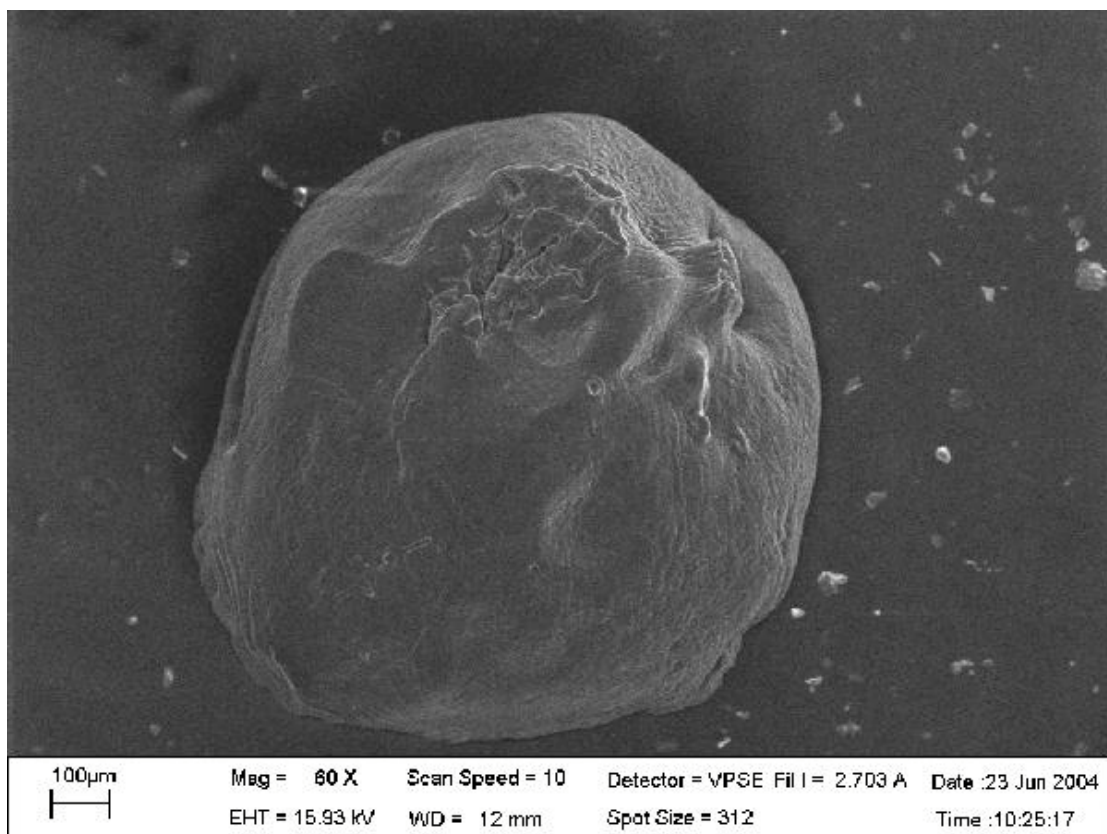
รูปที่ 1



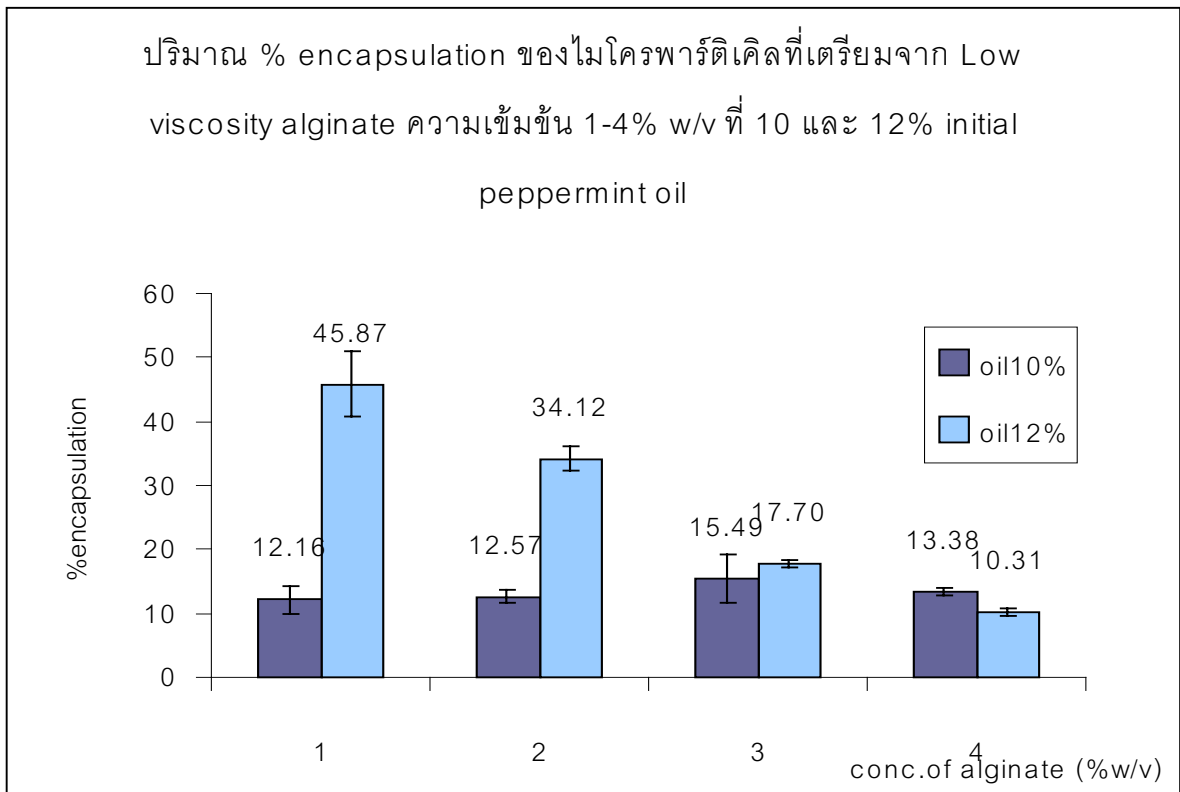
รูปที่ 2



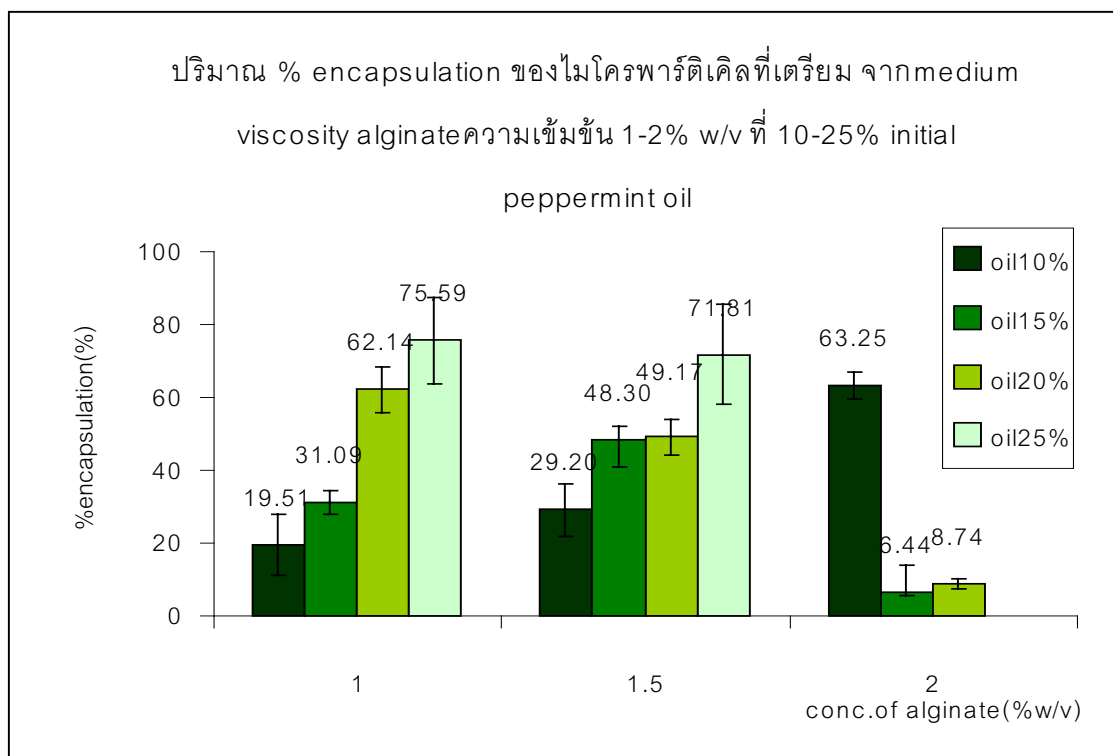
รูปที่ 3



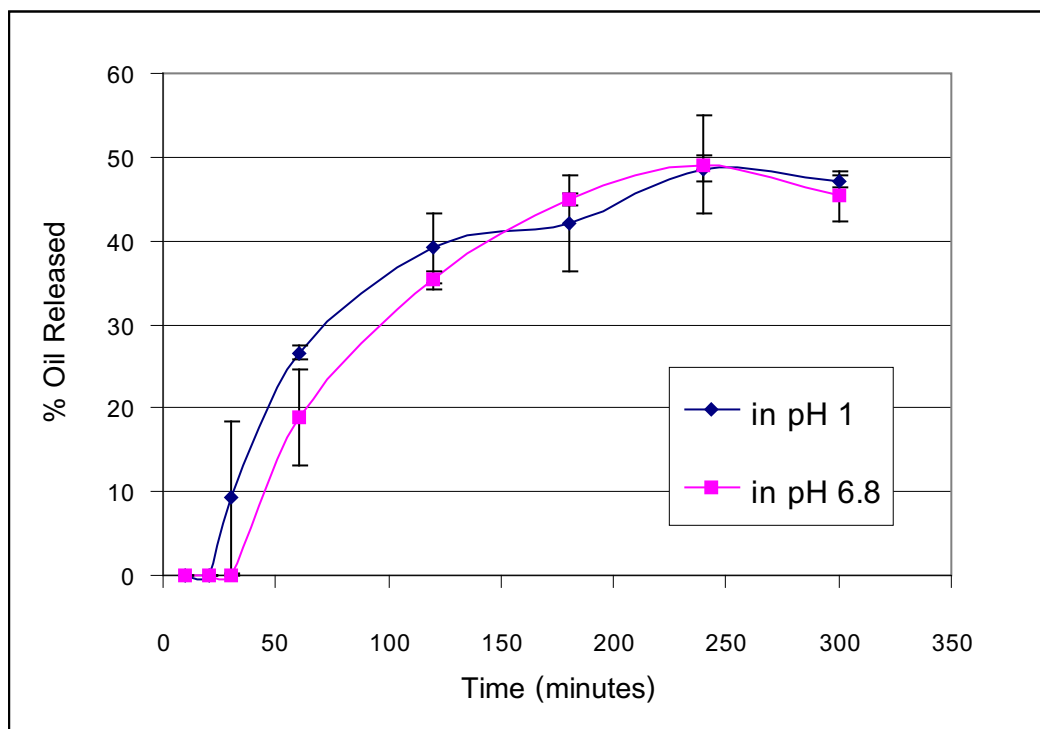
รูปที่ 4



รูปที่ 5



รูปที่ 6



รูปที่ 7

เอกสารประกอบการบรรยายกลุ่มย่อย
“การประชุมนักวิจัยกลุ่มการใช้สมุนไพรสัตว์”

การตั้งตำรับและควบคุมคุณภาพอาหารไก่ชนิดเม็ดที่ประกอบด้วยสารสกัดพริก กระเพรา และโหระพา

คณะผู้ทำวิจัย

ผศ. ดร. สักดิชัย วิทยาอารีย์กุล⁽¹⁾

ผศ. ดร. ทศนา พิทักษ์สุธีพงษ์⁽¹⁾

ดร. อนันต์ อุ่นอรุณ⁽¹⁾

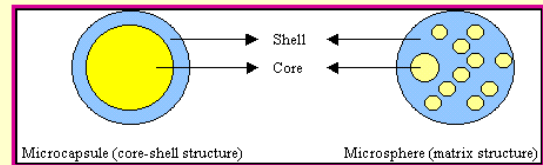
ดร. จุฑิชา วิชัย⁽²⁾

⁽¹⁾ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

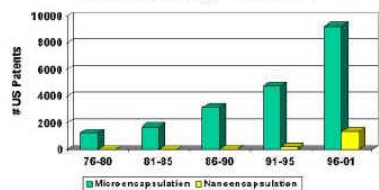
⁽²⁾ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Microencapsulation technology

Microencapsulation is the process by which individual one material or mixture of materials (the core) is surrounded by another material (the shell) to produce capsules, spheres in the micrometer to millimetre range, known as microcapsules, microspheres, respectively.



Micro- and Nanoencapsulation Technology Trends



Keyword: Microencapsulation OR microcapsules OR microspheres OR microparticles, Nanoencapsulation OR nanocapsules OR nanospheres OR nanoparticles.

The technology has been used in...

- pharmaceuticals
- cosmetics
- food industry
- agriculture
- printing

Wall materials

- Natural polymers: albumin, gelatin, alginate, chitosan
- Semi-synthetic polymers : MC, EC
- Synthetic polymers : Polyvinyl alcohol, polylysine, polyglutamic
- Inorganic materials : calcium sulfate

Core materials

- Flavoring agents
- Vitamins and Minerals
- Oils and Fats
- Herbs and Bioactives
- Misc. e.g. enzymes, yeast

Advantages of microencapsulation techniques in human food & animal feeds

- Control flavors release, to avoid off-flavors within the food
- Control release of active ingredient
- Separation of incompatible components
- Improve stability (protect from environment: moisture, oxygen, UV light)



Advantages of microencapsulation techniques in human food & animal feeds

- Preserve the potency of the vitamins, minerals or probiotics added to the food product
- Masking of unpleasant taste/odour e.g. L-arginine
- Conversion of liquids to free-flowing solids

Encapsulation methods

Physical process

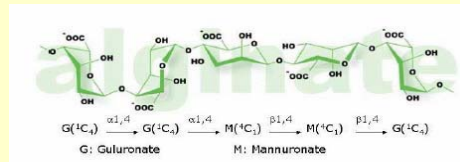
- Spray drying
- Spray chilling
- Fluidized bed coating
- Pan coating

Chemical process

- Phase separation
- Solvent evaporation
- Solvent extraction
- Interfacial polymerization
- Simple and **complex coacervation**
- In-situ polymerization

Sodium alginate

- Sodium salt of alginic acid obtained from an extract of seaweed.
- An anionic polysaccharide
- Biodegradable and biocompatible.

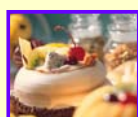


Sodium alginate in food industry

Stabilizer: ice cream, drink, dairy products

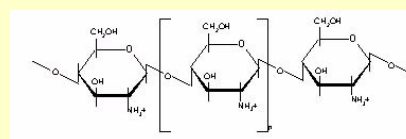
Emulsifier, Thickening agent: salad dressing, pudding, jam

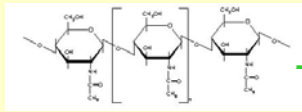
Binder:



Chitosan

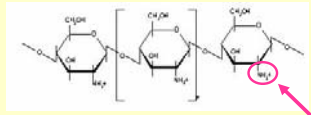
- Derived from chitin, a polysaccharide found in the exoskeleton of shellfish like shrimp or crabs
- A natural cationic polysaccharide
- Biodegradable, biocompatible





Chitin consists of *N*-acetyl glucosamine units

deacetylation



Structure of chitosan

Chitosan in food industry

- ✓ glucosamine as a treatment for chronic arthritis
- ✓ chitosan as a natural fiber for reducing cholesterol and absorbing fat.

Experimental methods

Materials to be encapsulated

1. Peppermint oil
2. Holy basil oil
3. Chili extract: In-house preparation using 2 methods
 - Percolation
 - Soxhlet's extraction

Extraction methods of capsaicin

1. Percolation

Dried chili + ethanol → Collect ethanol percolate @ 2, 3, 8, 10 & 11 days

2. Soxhlet's extraction

Fresh chili → Dry at 40 °C → Dried chili
 ↓ Mill
 Dried chili powder
 ↓ Soxhlet's extraction
 solvent: 95% ethanol, temp 50 °C
 Ethanol extract
 ↓ Evaporate to dryness
 Concentrated extract

Collect extract every 4-day cycle for 6 cycles, i.e. 24 days

In vitro antioxidant test

Spectrophotometric: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH assay)

% inhibition of free radical DPPH (I %)

$$I \% = \left[\frac{(A_b - A_s)}{A_b} \right] \times 100$$

โดย A_b = Absorbance of blank at 517 nm

A_s = Absorbance of sample

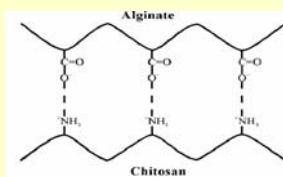
Preparation of microparticles

Microencapsulation technique applied in this study was...

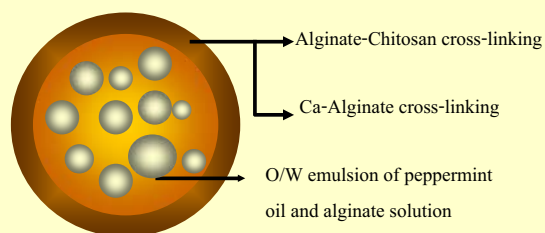
Complex coacervation

- Sodium alginate
- Chitosan
- Calcium chloride (CaCl_2)

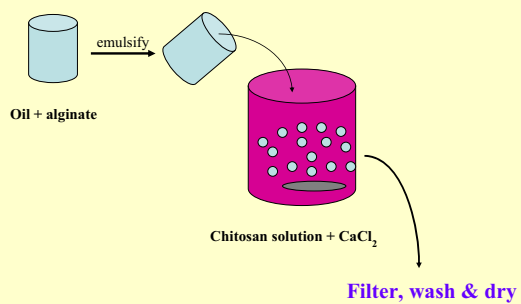
Calcium alginate-chitosan beads



Alginate-chitosan microparticles



Preparation process:



Factors have been studied in formulation step...

Sodium alginate		Peppermint oil
Grade	Conc. (% w/v)	Conc. (%v/v)
LV	1,2,3,4	10
		12
MV	1, 1.5, 2	10
		15
		20
		25*

* MV2/25 ไม่สามารถเตรียมได้

Observations

- Morphology
- Particle size
- Encapsulation efficiency
- Release profile

Capsaicin granules

Chili extract (30%) + corn starch



Pass through sieve # 16



Dry at 40 °C

Dried granules

Determination of entrapment efficiency



Gas Chromatography
analysis

Stability studies

Long term test

Condition

Temp. 30 ± 2 °C
Humidity $75 \pm 5\%$ RH
Sampling every 3 months
No. of batches 2 batches

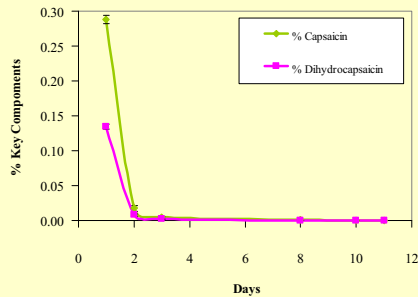
Stress condition

Condition

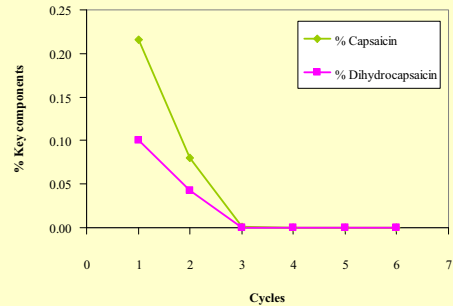
Temp. 40 ± 2 °C
Humidity $75 \pm 5\%$ RH
Sampling at 0, 3 & 6 months
No. of batches 2 batches

Results & discussions

Percolation



Soxhlet's extraction



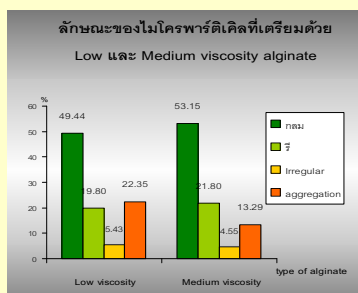
Antioxidant

Sample	IC50
BHT	7.85×10^{-3} (%w/v)
BHA	1.80×10^{-3} (%w/v)
Chili extract	-
Holy Basil Oil	7.85×10^{-3} (%v/v)
Sweet Basil Oil	1211 (%v/v)

Morphology

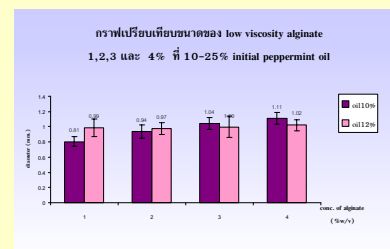


Morphology of alginate-chitosan beads



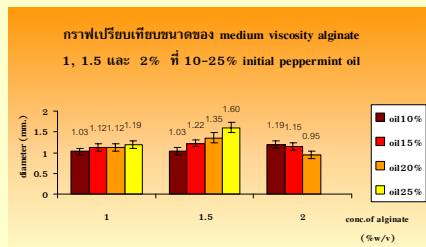
Effect of alginate concentration and oil content on particle size

Low viscosity alginate



Diameter is ranging from 0.8 to 1.1 mm.

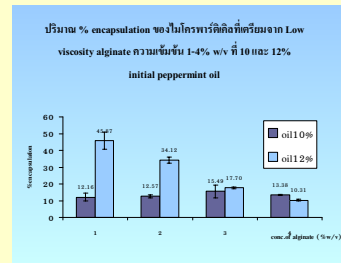
Medium viscosity alginate



Diameter is ranging from 1.0 to 1.6 mm.

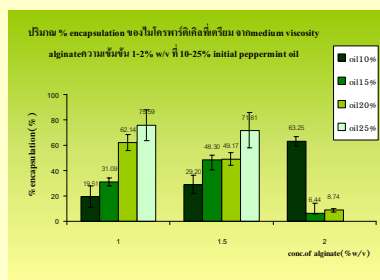
Effect of alginate concentration and oil content on percentage of encapsulation

Low viscosity alginate



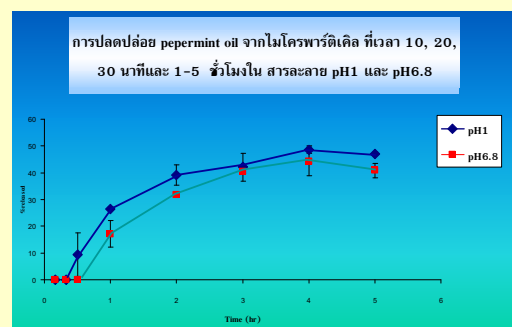
% encapsulation is ranging from 10.3-46.87%

Medium viscosity alginate



% encapsulation is ranging from 6.44-75.59%

Release profiles



Preliminary studies of stability

- Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin content in granules produced using chili extract 30% w/w (20 batches)

Capsaicin 0.34 ± 0.078 % w/w

Dihydrocapsaicin 0.21 ± 0.043 % w/w

Note: Color of granules faded upon storage. Capsaicin content however did not change

Conclusions

Extraction methods of capsaicin

- The suitable duration for extraction of capsaicin from chili using percolation method was 3-4 days. The concentration of capsaicin and dihydrocapsaicin obtained was 0.310% and 0.140% by weight, respectively.
- The suitable duration for extraction of capsaicin from chili using Soxhlet's extraction was 3 cycles. The concentration of capsaicin and dihydrocapsaicin obtained was 0.296% and 0.143% by weight, respectively.

Microparticles containing peppermint

Both LV and MV alginate,

Increased alginate conc. → % encapsulation decreased

Increased oil content → % encapsulation increased

Compared between 2 grades

- Alginate MV grade offered better encapsulation efficiency.
- The formulation rendered the highest encapsulation efficiency was MV1/25

- Release of peppermint oil from the microparticles
 - pH 1 release @ 30 min
 - pH 6.8 release @ 1 hr

Preliminary studies of stability

- Color of granules faded upon storage. Capsaicin content however did not change

Thank you

ตารางการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตรานูด
จากสารสกัดพริก

ผ - 3

ตารางการถ่ายทอดเทคโนโลยีวิธีการผลิตกรานูลจากสารสกัดพริก

วันที่ 19-20 กรกฎาคม 2548

วัน/เวลา	กิจกรรม	ความรู้ที่ได้รับ
19 ก.ค. 2548 9.00 – 12.00 น.	1. ศึกษาวิธีการสกัดพริกแห้งด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95% ด้วยวิธี - Soxhlet's extraction - Percolation extraction (Maceration)	- ทราบหลักการวิธีการสกัดแบบ Soxhlet's และ Percolation - ฝึกปฏิบัติวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดสูงสุด
12.00 – 13.00 น.	พักกลางวัน	
13.00 – 16.00 น.	2. ศึกษาวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร Capsaicin และ Dihydrocapsaicin ในสาร สกัดพริกด้วย HPLC	- ทราบระบบที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณของสารสำคัญจากสารสกัดพริก - ฝึกปฏิบัติวิธีการวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดพริกด้วย HPLC
20 ก.ค. 2548 9.00 – 12.00 น.	3. ศึกษาวิธีการทำกรานูลจากสารสกัดพริก - วิธีการเตรียมกรานูล - วิธีการควบคุมคุณภาพ - วิธีการศึกษาความคงตัว	- ทราบวิธีการทำกรานูลจากสารสกัดพริก - ทราบวิธีการควบคุมคุณภาพกรานูลที่มีสารสกัดพริก - ทราบหลักการการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์
12.00 – 13.00 น.	พักกลางวัน	
13.00 – 16.00 น.	4. สาธิตวิธีการทำไมโครแคปซูลที่บรรจุน้ำมัน กะเพราด้วยวิธี Complex Coacervation	- ทราบวิธีการเตรียมอนุภาคแบบไมโครแคปซูลด้วยวิธี Complex Coacervation

ตารางการเปรียบเทียบวัตถุประสงค์กิจกรรมตามแผน
และที่ดำเนินการ

สัญญาเลขที่ RDG4720017

โครงการ “การตั้งตำรับและควบคุมคุณภาพอาหารไก่ชนิดเม็ดที่มีสารสกัดพริก กะเพรา โหระพา”

สรุปรายงานฉบับสมบูรณ์

รายงานในช่วง ตั้งแต่วันที่ 1 ธ.ค. พ.ศ. 2546 ถึงวันที่ 31 พ.ค. พ.ศ. 2548

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : ผศ.ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล

ชื่อหน่วยงาน : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

วัตถุประสงค์โครงการ

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดพริก และศึกษาการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณของสารสำคัญในสารสกัดจากพริก ใบกะเพรา ใบโหระพา
2. เพื่อศึกษาการตั้งตำรับอาหารไก่ชนิดเม็ดที่มีสารสกัดพริก ใบกะเพรา ใบโหระพา และสารผสมจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด
3. เพื่อศึกษาความคงตัวของตำรับอาหารไก่ที่ได้จากการพัฒนาตำรับ

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงานโดยสรุป (พอสังเขป)

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน
1. สกัด Oleoresin จากพริก	1. ได้วิธีการสกัด Oleoresin จากพริก	- สกัดด้วยวิธี Soxhlet's extraction - สกัดด้วยวิธี Reflux extraction - สกัดด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย - พบว่าการสกัดด้วยวิธี Soxhlet's extraction ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด - ได้ช่วงเวลาในการสกัดพริกด้วยวิธี Soxhlet's extraction และ Percolation extraction (การหมัก) ที่สั้นลง *** การดำเนินงานเป็นไปตามแผน***
2. วิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารสำคัญในสารสกัดพริก น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา และโหระพา	2. ได้วิธีการทดสอบฤทธิ์ Antioxidants, วิธีการวิเคราะห์ Capsaicin ด้วย HPLC วิธีการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา และโหระพาด้วย GC	- ได้วิเคราะห์ปริมาณ Capsaicin ด้วย HPLC - ได้วิธีการทดสอบฤทธิ์ Antioxidants ด้วยวิธี DPPH - ได้วิธีการหาปริมาณสารหลักในน้ำมันกะเพรา และโหระพา ด้วย GC *** การดำเนินงานเป็นไปตามแผน***

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน
3. วิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารสำคัญในสารสกัดพริก น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา และโหระพา	3. ได้วิธีการทดสอบฤทธิ์ Antioxidants, วิธีการวิเคราะห์ Capsaicin ด้วย HPLC วิธีการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา และโหระพาด้วย GC	- ได้วิเคราะห์ปริมาณ Capsaicin ด้วย HPLC - ได้วิธีการทดสอบฤทธิ์ Antioxidants ด้วยวิธี DPPH - ได้วิธีการหาปริมาณสารหลักในน้ำมันเปปเปอร์มินท์ ด้วย GC - ได้วิธีการหาปริมาณสารหลักในน้ำมันกะเพราและโหระพา ด้วย GC-MS *** การดำเนินงานเป็นไปตามแผน***
3. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ในขั้นตอนการเตรียมไมโครแคปซูลโดยใช้โพลิเมอร์ชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้ปริมาณการกักเก็บสารสกัดสูงสุด	3. ได้ตำรับเบื้องต้นของไมโครแคปซูล และทราบคุณสมบัติทางกายภาพเบื้องต้น	- ได้ตำรับเบื้องต้นของไมโครแคปซูลที่ใช้ Sodium alginate เป็นแกนและ Chitosan เป็นสารหุ้มภายนอก - ทดสอบการกักน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ น้ำมันเปปเปอร์มินท์ซึ่งเป็นน้ำมันที่วิเคราะห์ง่ายด้วย GC เป็นตัวทดสอบเบื้องต้น หาปริมาณการกักเก็บน้ำมันสูงสุดได้มากกว่า 75% โดยน้ำหนัก - ทดสอบการกักน้ำมันกะเพรา และโหระพา ได้ปริมาณการกักเก็บสูงสุดที่ 74% และ 55% โดยน้ำหนักตามลำดับ *** การดำเนินงานเป็นไปตามแผน***
4. ศึกษาสภาวะการเตรียมที่มีผลต่อการกักเก็บสารสกัด และน้ำมัน โดยปรับจากตำรับเบื้องต้น	4. ได้ตำรับที่มีการกักเก็บสารสกัดได้สูงสุด	- ได้ตำรับที่มีการกักเก็บน้ำมันได้ปริมาณสูงสุดสำหรับน้ำมันเปปเปอร์มินท์ น้ำมันกะเพรา และน้ำมันโหระพา - ปรับตำรับให้ได้ตำรับที่มีความคงตัวมากขึ้น - ได้ตำรับกรานูลที่ประกอบด้วยสารสกัดพริกปริมาณ 30% ที่มีต้นทุนต่ำและความคงตัวดี *** การดำเนินงานเป็นไปตามแผน***

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน
5. ศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพ ปริมาณการกักเก็บ และอัตราการปลดปล่อยสารสกัดจากสูตรตำรับ	5. ได้ตำรับที่มีลักษณะทางกายภาพดี เช่น มีการไหลดี ทราบการปลดปล่อยออกจากสูตรตำรับ	- ทราบลักษณะทางกายภาพ และได้ลักษณะอนุภาคที่แห้ง เอื้อต่อการไหลที่ดี - ทราบการปลดปล่อยน้ำมันออกจากตำรับไมโครแคปซูล - ทราบปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดพริก หลังจากทำการละลาย *** การดำเนินงานเป็นไปตามแผน***
6. ศึกษาความคงตัวที่ได้จากตำรับที่ผ่านการพัฒนา	6. ได้ระยะเวลา และสภาวะการเก็บที่เหมาะสม	- ทราบความคงตัวแบบระยะยาวและแบบเร่งที่เวลา 3 เดือน แต่เนื่องจากการศึกษาความคงตัวนี้ทำภายหลังการได้ตำรับที่ปรับเปลี่ยนแล้ว จึงครบเวลาการเก็บตัวอย่างที่ 6 เดือนและ 12 เดือน ในเดือนมิถุนายนและกันยายนตามลำดับ ซึ่งจะรายงานในเอกสารเพิ่มเติมต่อไป *** การดำเนินงานเป็นไปตามแผน***
7. ผลิตตำรับกรานูลที่มีสารสกัดพริกและไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันกะเพรา เพื่อใช้ในการทดลองในไก่และหมู	7. ได้ตำรับสำหรับการทดลองในไก่และหมู	- ได้ตำรับกรานูลที่มีสารสกัดพริกสำหรับการทดลองในไก่และสุกร จำนวนทั้งสิ้น 75 กิโลกรัม - ได้ตำรับไมโครแคปซูลบรรจุน้ำมันกะเพราสำหรับการทดลองในไก่ จำนวนทั้งสิ้น 4 กิโลกรัม *** การดำเนินงานนอกแผน***
8. การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตกรานูลจากสารสกัดพริกแก่บริษัทเบทเทอร์ฟาร์มา	8. บริษัทเบทเทอร์ฟาร์มาทราบวิธีการผลิตกรานูลจากสารสกัดพริก	บริษัทเบทเทอร์ฟาร์มาทราบวิธีการผลิตกรานูลจากสารสกัดพริก *** การดำเนินงานนอกแผน***