



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การเตรียมไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริก
สำหรับการป้องกันและการกำจัดศัตรูพืช”

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. ทศนา พิทักษ์สุธิพงศ์ และคณะฯ

มกราคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การเตรียมไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริก สำหรับการป้องกันและการกำจัดศัตรูพืช”

คณะผู้วิจัย

- รศ. ดร. ทศนา พิทักษ์สุธิพงศ์
- รศ. ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล

สังกัด

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร
ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชุดโครงการ “สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การเตรียมไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริก สำหรับการป้องกัน
และการกำจัดศัตรูพืช”

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. ทศนา พิทักษ์สุริพงษ์

2. รศ. ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล

สังกัด

ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชุดโครงการ “สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

รายงานการวิจัยเรื่อง “การเตรียมไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริก สำหรับการป้องกัน และการกำจัดศัตรูพืช (Preparation of microemulsions of black pepper and capsicum extract for plant pest control)” เป็นโครงการที่จัดทำขึ้น โดยได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ปี พ.ศ. 2549 ชุดโครงการ “สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต” ผู้วิจัยขอขอบคุณสกว. ที่อนุมัติงบประมาณเป็นค่าใช้จ่าย ของโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณท่านคณบดี ผู้บริหาร และเจ้าหน้าที่ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สถานที่และสาธารณูปโภคจนกระทั่งโครงการฯ ได้ดำเนินการเสร็จสิ้นลง

ทัศนาศ พิทักษ์สุริพงษ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

2550

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

พริกไทยดำและพริกชี้หนูได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมในการป้องกันและกำจัดโรคแมลงศัตรูพืช เนื่องจากราคาถูก และปลอดภัย ไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม แต่การเตรียมสารสกัดก่อนนำไปใช้ ใช้เวลานาน หากสามารถเตรียมให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ที่พร้อมใช้ และมีปริมาณสารออกฤทธิ์ในปริมาณมาก และคงที่ จะทำให้เกษตรกรใช้ได้สะดวกยิ่งขึ้น ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เข้มข้นสำเร็จรูปของสมุนไพรสำหรับการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชมีจำหน่ายทางการค้า แต่ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์ของต่างประเทศ และส่วนใหญ่จะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบหลักเป็นน้ำ สารสกัดพริกไทยดำ และพริกชี้หนูมักจะเป็นสารยางไม้ที่ข้นหนืดยากต่อการละลายน้ำ ดังนั้นจึงต้องเตรียมในสูตรตำรับที่ละลายสารดังกล่าวได้ และเมื่อเจือจางด้วยน้ำสามารถเข้ากับน้ำได้ดี

ไมโครอิมัลชันเป็นสูตรตำรับที่ประกอบด้วยของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวในของเหลวอีกชนิด สามารถผสมได้ทั้งสารที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (lipophilic) มีความสามารถในการละลายตัวยาได้สูง สามารถนำมาเตรียมสารสกัดสมุนไพรในรูปแบบเข้มข้น (concentrate) ได้ การเตรียมทำได้ง่ายเพียงคนผสมเบาๆ ไม่ต้องใช้เครื่องปั่นผสมความเร็วสูง homogenizer หรือความร้อน ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถผสมสารธรรมชาติใดๆที่ไม่ทนความร้อนได้ อีกทั้งยังเป็นสูตรตำรับที่มีความคงตัวสูง ไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ หรือเมื่ออยู่ในที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และเนื่องจากไมโครอิมัลชันประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิว เมื่อผสมกับน้ำจึงไม่เกิดการแยกชั้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะเตรียมสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกและพริกไทยดำ เพื่อใช้ในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ผัก และผลไม้โดยนำไปผสมน้ำก่อนฉีดพ่น

ขอบเขตของการศึกษา คือ การเตรียมสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริกชี้หนู การควบคุมคุณภาพ และการทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาคาร์บอนไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริก สำหรับการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช และทดสอบความคงตัวของสูตรคาร์บอนที่เตรียมขึ้น การเตรียมไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริกนี้ ได้เลือกใช้ ทวิน 80 และสแปน 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม เนื่องจากสารนี้สามารถทำหน้าที่เป็นสารจับใบพืชได้ วิธีการเตรียมไมโครอิมัลชัน ทำโดยสร้างเฟสไดอะแกรมซึ่งได้แบ่งเป็น 2 วิธี วิธีแรก ทำโดยใช้เล็กซอล จีที 865 (แคปรีลิก/แคปริก ไตรกลีเซอไรด์) เป็นวัฏภาคน้ำมัน และปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ให้มีค่าเอช แอล บี ต่างๆกัน จากบริเวณที่เกิดเป็นไมโครอิมัลชันบนเฟสไดอะแกรมที่สร้างขึ้น ทำการเลือกส่วนประกอบและอัตราส่วนของสารที่เหมาะสมที่เตรียมเป็นไมโครอิมัลชันได้จำนวน 3 ตัวอย่าง มาผสมสารสกัดพริกไทยดำ และสารสกัดพริกในปริมาณต่างๆ คัดเลือกสูตรคาร์บอนที่ดีโดยพิจารณาจากความสามารถในการละลายสารสกัดได้ปริมาณสูงสุด ความหนืดเหมาะสม จุดบู่อยู่ในช่วงกว้าง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น การแยกชั้น และการตกตะกอนหลังผ่านการทดสอบในสถานะอุณหภูมิสถับ และมีความคงตัวทางเคมีหลังการทดสอบที่อุณหภูมิ $45 \pm 2^\circ$ ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นเวลา 6 เดือน เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง วิธีที่สองทำโดยสร้างเฟสไดอะแกรมซึ่งใช้สารสกัดพริกไทยดำหรือสารสกัดพริกเป็นวัฏภาคน้ำมัน และใช้อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ที่มีค่าเอช แอล บี ตามผลการศึกษาที่ได้จากวิธีที่ 1 จากนั้นทำการศึกษาเหมือนกับไมโครอิมัลชันที่เตรียมโดยวิธี 1 ผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มค่าเอช แอล บี สูงขึ้น พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันจะกว้างขึ้น แต่ขณะเดียวกันการเกิดคาร์บอนรูปแบบอื่น กล่าวคือ อิมัลชัน-เจล และ ไมโครอิมัลเจล ก็จะกว้างขึ้นเช่นกัน พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่มีค่าเอช แอล บี 11 และ 12 มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ระบบที่มีค่าเอช แอล บี 12 จะมีคาร์บอนรูปแบบอื่น เช่น อิมัลชัน-เจล และ ไมโครอิมัลเจล กว้างมากกว่า และค่อนข้างใกล้เคียงกับบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชัน ดังนั้นในที่นี้จึงเลือกระบบที่มีค่าเอช แอล บี 11 ไปทำการสร้างเฟสไดอะแกรมโดยละเอียด จากนั้นสุ่มเลือกตัวอย่างไมโครอิมัลชัน 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง เอ บี และ ซี ไปผสมกับสารสกัด พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่สามารถละลายได้และมีความคงตัวในไมโครอิมัลชันคือที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก ผลการวัดความหนืดของไมโครอิมัลชันทั้งที่ไม่ผสมหรือผสมสารสกัดพริกไทยดำ หรือสารสกัดพริก พบว่า ความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวในคาร์บอนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความหนืดของไมโครอิมัลชันลดลง เมื่อผสมสารสกัดพริกไทยดำ ขณะที่เมื่อผสมสารสกัดพริก ความหนืดของไมโครอิมัลชันเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับไมโครอิมัลชันที่ไม่ผสมสารสกัด จุดบู่ ของไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ทั้ง ตัวอย่าง เอ บี และ ซี ที่ไม่ผสมและที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ หรือสารสกัดพริก ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของไมโครอิมัลชันจากใสเป็นขุ่นในช่วงอุณหภูมิ 5 - 90 องศาเซลเซียส ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของคาร์บอนหลังทดสอบที่สถานะอุณหภูมิสถับ และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่าความหนืดไม่แตกต่างกับคาร์บอนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาเดียวกัน จุดบู่ของไมโครอิมัลชันทั้งที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำหรือสารสกัดพริก ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชัน ตัวอย่าง เอ บี และ ซี ที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ไมโครอิมัลชันที่ผสมสารสกัดพริกพบการตกตะกอนของสารสกัดที่ก้นขวด แต่เมื่อเขย่าจะกลับผสมเข้ากันได้ ความคงตัวทางเคมี

ของสารสกัดพริกไทยดำ และพริกในไมโครอิมัลชันเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือนอยู่ในเกณฑ์ดี และไม่แตกต่างกับปริมาณสารในตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง สำหรับระบบที่ใช้สารสกัดเป็นวัตถุน้ำมัน พบว่าสารสกัดพริกค่อนข้างข้นหนืด จึงไม่สามารถใช้เป็นวัตถุน้ำมันได้ ส่วนระบบที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมัน ได้เลือกใช้อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวรวมที่มีค่า เอช แอล บี 11 ตามผลการศึกษาของวิธีที่ 1 และตัวอย่าง ดี อี และเอฟ ได้ถูกคัดเลือกเพื่อทำการศึกษา และพบว่าความหนืดของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมันมีความหนืดมากกว่าที่ใช้ เล็กซอล จีที 865 และในทำนองเดียวกันกับการศึกษาข้างต้น ความหนืดลดลงเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับลดลง ค่าจุดขุ่นของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมันที่เตรียมได้ทั้งตัวอย่าง ดี อี และเอฟ ไม่ตรวจพบในช่วงอุณหภูมิที่ทดสอบ ($5 - 90$ องศาเซลเซียส) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของตำรับหลังทดสอบที่สภาวะอุณหภูมิสลับ ความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมัน ตัวอย่าง ดี อี และเอฟ พบว่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน ความหนืดจะลดลงเมื่อเทียบกับความหนืดของตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาเดียวกันให้ผลเช่นเดียวกับการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส จุดขุ่น และลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง ปริมาณสารสำคัญในตำรับลดลงจากที่เวลาเริ่มต้น แต่ไม่เกินร้อยละ 10 และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 3, 4 และ 6 เดือน และไม่แตกต่างกับปริมาณสารในตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง

Abstract

The main purpose of this work was to develop microemulsions of black pepper and capsicum extract for plant pest control and to perform stability test of the product prepared. Preparation of microemulsions of black pepper and capsicum extract was used Tween 80 and Span 80 as surfactant and co-surfactant, respectively because they could also act as a sticker. Optimization of the formulation was performed by using the pseudoternary phase diagrams in two different aspects. Firstly, the pseudoternary phase diagrams were constructed by using Lexol GT[®] 865 (caprylic/capric triglyceride) as oil phase and varying ratio of Tween80 to Span 80 according to hydrophilic/lipophilic balance (HLB). The three microemulsion formulations were selected from the microemulsion region. Then either black pepper or capsicum extract was added into selected microemulsion formulation at various concentrations. The best formulation of microemulsions containing black pepper and capsicum extract was considered base on its ability to solubilize the extract, viscosity, cloud point, physical changes of the formulation such as phase separation and precipitation of the extract following freeze-thaw test for 7 cycles and the chemical stability of the extract in the formulation performed at roomtemperature and at $45 \pm 2^\circ \text{C}$, 75% relative humidity (RH). Secondly, the pseudoternary phase diagrams were constructed using black pepper or capsicum extract as an oil phase and the ratio of Tween80 to Span80 was fixed according to the results obtained from previous method. The physical characterization of the formulations and chemical stability of the extract in the formulations were performed as described above. It was found that the increase of HLB, the microemulsion region area increased. However, the region area of emulsion-gel and microemulsion-gel also increased. The pseudoternary phase diagram of Lexol GT[®] 865/Tween80+Span80 (HLB 11)/Water was selected for further studies. Three microemulsion samples (sample A, B and C) in the microemulsion area were selected. The maximum concentration of black pepper and capsicum extract could be incorporated was 15% w/w. Viscosity of empty microemulsion (without the extract) increased with an increased in the amount of surfactants in the formulation. In addition, viscosity of the microemulsion decreased with an increased in the concentration of the black pepper extract but increased with an increased in the concentration of the capsicum extract. Cloud point of the microemulsions sample A, B and C containing either black pepper or capsicum extract was not detected in the temperature range $5 - 90^\circ \text{C}$, indicating microemulsion is not destroyed at a wide range of temperature during storage. Physical changes of the formulation containing black pepper or capsicum extract following freeze-thaw test was not observed. Following storage the microemulsions of black pepper or capsicum extract for 6 months the viscosity of the microemulsion stored at room temperature was not different from that stored at $45 \pm 2^\circ \text{C}$, 75% RH. Cloud point of the microemulsions containing black pepper or capsicum extract did not change. Physical appearance of the microemulsions of black pepper did not change but the precipitation of capsicum extract was observed. However, it could be mixed well upon mixing. Chemical stability of the black pepper and capsicum extracts in

the formulation was shown to be good during the storage of 6 months at both room temperature and at $45 \pm 2^{\circ}$ C, 75% RH. For the systems using the extract as oil phase could be prepared only for black pepper extract because capsicum extract was too viscous to use as an oil phase. HLB used in this study was fixed at 11. Sample D, E and F were selected for further studies. Viscosity of the microemulsion using black pepper extract as oil phase was higher than that of the microemulsion using Lexol GT[®] 865 as oil phase. The viscosity decreased with a decreased in the amount of surfactants in the formulation. Cloud point of the microemulsions sample D, E and F was not detected in the temperature range 5 - 90^o C. Following freeze-thaw test, physical changes of the microemulsion was not observed. However, following 6 months storage at $45 \pm 2^{\circ}$ C, 75% RH, the viscosity of the microemulsion decreased compared with the freshly prepared microemulsion but the viscosity of the microemulsion stored at room temperature was not different from that stored at room temperature. Cloud point and physical appearance of the formulations did not change. Chemical stability of the black pepper in the formulation decreased from the beginning but not more than 10%. The stability of black pepper extract in the formulation when stored at $45 \pm 2^{\circ}$ C, 75% RH for 3, 4 and 6 months was not different and was not different from that when stored at room temperature.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
หน้าปกใน (Inner Cover)	i
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	ii
บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)	iii
บทคัดย่อภาษาไทย (Abstract)	iv
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	vi
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	viii
สารบัญตาราง (List of Tables)	ix
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	x
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีการที่ใช้ในการศึกษา	
เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา	3
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	3
วิธีการดำเนินการทดลอง	
ส่วนที่ 1 การตั้งตำรับสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำและพริก	4
ส่วนที่ 2 การควบคุมคุณภาพ และการทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับที่เตรียมขึ้น	6
บทที่ 3 ผลการทดลอง	
ส่วนที่ 1 การตั้งตำรับสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำและพริก	10
ส่วนที่ 2 การควบคุมคุณภาพ และการทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับที่เตรียมขึ้น	24
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	39

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 2.1	5
ตารางที่ 2.2	7
ตารางที่ 3.1	16
ตารางที่ 3.2	16
ตารางที่ 3.3	17
ตารางที่ 3.4	18
ตารางที่ 3.5	18
ตารางที่ 3.6	18
ตารางที่ 3.7	19
ตารางที่ 3.8	19
ตารางที่ 3.9	20
ตารางที่ 3.10	21
ตารางที่ 3.11	22
ตารางที่ 3.12	22
ตารางที่ 3.13	23
ตารางที่ 3.14	24
ตารางที่ 3.15	27
ตารางที่ 3.16	28
ตารางที่ 3.17	29

สารบัญตาราง (List of Tables) (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 3.18	Viscosity of microemulsions with capsicum extracts at concentration 15% w/w kept at room temperature and at $45^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, relative humidity (RH) $75 \pm 5\%$ (n=2).	29
ตารางที่ 3.19	Composition of microemulsions D, E and F.	33
ตารางที่ 3.20	Viscosity of microemulsions with black pepper extracts as an oil phase kept at room temperature and at $45^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, relative humidity (RH) $75 \pm 5\%$ (n=2)	33

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

	หน้า
รูปที่ 2.1	4
รูปที่ 3.1	11
รูปที่ 3.2	12
รูปที่ 3.3	13
รูปที่ 3.4	14
รูปที่ 3.5	15
รูปที่ 3.6	20
รูปที่ 3.7	25
รูปที่ 3.8	25
รูปที่ 3.9	25
รูปที่ 3.10	26
รูปที่ 3.11	31
รูปที่ 3.12	31
รูปที่ 3.13	32

สารบัญภาพ (List of Illustrations) (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 3.14	Percentage remaining of capsaicin in sample A, B and C when stored at 45° C, relative humidity 75% for 0, 3, 4 and 6 months.	32
รูปที่ 3.15	Percentage remaining of piperine in sample D, E and F when stored at room temperature for 0, 3, 4 and 6 months.	35
รูปที่ 3.16	Percentage remaining of piperine in sample D, E and F when stored at 45° C, relative humidity 75% for 0, 3, 4 and 6 months.	35

บทที่ 1

1. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

การใช้สารเคมีสังเคราะห์ ในการกำจัดศัตรูพืช นอกจากจะทำให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในพืชผักและผลไม้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนที่บริโภคผลิตภัณฑ์การเกษตรที่มีการปนเปื้อนสารพิษแล้ว ยังมีผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้อย่าง เป็นพิษต่อปลา สัตว์เลี้ยงและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้แล้ววัฏศุนีพิษทางการเกษตรที่สังเคราะห์ขึ้นนั้น ยังทำให้ศัตรูธรรมชาติลดน้อยลงและประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืชก็ลดลง อันเนื่องมาจากการต้านทานของแมลงศัตรูพืช ดังนั้นในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตรจึงได้พยายามส่งเสริมให้เกษตรกรลด ละ เลิกการใช้สารเคมีในการผลิตพืชเศรษฐกิจ และสนับสนุนให้ใช้สารธรรมชาติจากพืชที่มีศักยภาพในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ทั้งนี้เนื่องจากสารธรรมชาติจากพืชมีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อคน และสัตว์เลี้ยง ไม่ก่อให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้าง เนื่องจากสลายตัวได้ง่าย โอกาสที่แมลงสร้างความต้านทานน้อยกว่าสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น ออกฤทธิ์กับแมลงในหลายด้าน เป็นพิษน้อยต่อศัตรูธรรมชาติ ประหยัด ราคาถูก เนื่องจากสมุนไพรเหล่านี้หาได้ง่าย และสามารถเตรียมได้เอง ช่วยลดเงินตราต่างประเทศ ในการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์จากต่างประเทศ ทำให้ช่วยลดดุลการค้าที่เสียเปรียบต่างประเทศ สร้างงานใหม่ให้เกิดขึ้นอันเนื่องจากอุตสาหกรรมด้านการผลิตสารธรรมชาตินี้ และหากสามารถส่งเสริมให้มีการส่งออกในรูปของสารสกัดได้ จะเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับประเทศ พืชที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชนั้นมีอย่างน้อย 2,500 ชนิดทั่วโลก โดยมีสารพวกอัลคาลอยด์, เทอร์ปีนอยด์, ฟีนอลิก ฯลฯ กลไกในการป้องกันและการกำจัดศัตรูพืชของพืชสมุนไพรอาจมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์จะเป็นสารไล่ (repellent) ยับยั้งการกินอาหาร ยับยั้งการวางไข่ ยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอน โดยมีผลให้ฮอร์โมนที่ใช้ในการลอกคราบของหนอนลดน้อยลง ทำให้หนอนลอกคราบไม่ได้และตายในที่สุด ทำให้เป็นหมัน ตลอดจนเป็นพิษโดยตรง (1)

พริกไทยดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Piper nigrum* Linn. อยู่ในวงศ์ Piperaceae น้ำมันพริกไทย จะเป็นสารประกอบ จำพวก monoterpenes ร้อยละ 60-80 sesquiterpenes ร้อยละ 20-40 ที่สำคัญได้แก่ limonene, beta-caryophyllene, beta-pinene, beta-pinene เป็นต้น ส่วนโอไลโอเรซินประกอบด้วย สารจำพวก อัลคาลอยด์ ที่สำคัญคือ piperine (ร้อยละ 5-9), piperidine, pipericine, piperanine, pipericide และ piperolein A (2, 3) พริกไทยดำมีคุณสมบัติในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชจำพวก มด เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ หนอนผีเสื้อ หนอนกะหล่ำปลี ค้างคาวปีกแข็ง ค้างคาวในข้าว ไวรัส แมลงวันทอง (4)

พริกชี้หนู (Capsicums, Chillies, Cayenne Pepper) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Capsicum Frutescens* Linn. อยู่ในวงศ์ Solanaceae สารสำคัญที่พบคือ capsaicin, dihydrocapsaicin และ nordihydrocapsaicin (5) ผลสุกของพริกชี้หนูมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง ส่วนเมล็ดมีสารฆ่าเชื้อรา ใบและดอกมีสารยับยั้งการขยายตัวของไวรัส จึงใช้เป็นสารฆ่าแมลง ขับไล่แมลง และขัดขวางการดูดกินของศัตรูพืชหลายชนิด เช่น มด เพลี้ยอ่อน หนอนผีเสื้อ กะหล่ำ ค้างคาวโคโลราโด ค้างคาวงวงช้าง แมลงในโรงเก็บ ไวรัสโรคใบด่างของแตง ไวรัสโรคใบหดของยาสูบ (4, 5)

วิธีการใช้พริกไทยดำ และพริก ในการผลิตสารป้องกันแมลงศัตรูพืชของชาวบ้านทำโดยนำเมล็ดพริกไทย บดละเอียด 1 ช้อน ผสมน้ำ 1 ลิตร คนให้เข้ากัน แช่ทิ้งไว้ 1 วัน กรองเอาแต่น้ำ จากนั้นเติมน้ำลงไปอีก 1 ลิตร หรือ

นำพริกแห้ง 1 ชีด ต้มในน้ำ 1 ลิตร ให้เดือด แล้วนำพริกมาตำให้ละเอียด นำไปละลายในน้ำที่ต้ม กรองเอาแต่น้ำ แล้วเติมน้ำสะอาดลงไปอีก 1 ปีบ จากนั้นนำน้ำที่ได้ไปผสมสารจับใบ เช่น น้ำสบู่ หรือแชมพู แล้วนำไปฉีดพ่น ทุกๆ 7 วัน (4) แต่การเตรียมดังกล่าวใช้เวลานาน หากสามารถเตรียมให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ที่พร้อมใช้ และมีปริมาณสารออกฤทธิ์ในปริมาณมาก และคงที่ จะทำให้เกษตรกรผู้ใช้ได้สะดวกยิ่งขึ้น ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เข้มข้น สำเร็จรูปของสมุนไพรสำหรับการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชมีจำหน่ายทางการค้า เช่น Hot pepper waxTM, McCormickTM, Garlic BarrierTM และ AlignTM แต่ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์ของต่างประเทศ และผลิตภัณฑ์บางชนิดมีลักษณะเป็นผง เช่น McCormickTM (พริกแดงป่น) ซึ่งยากต่อการใช้ หรือมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก เช่น Garlic BarrierTM (1% garlic, 1% fish oil, 98% water) ซึ่งยากต่อการละลายสารที่ไม่ละลายน้ำ หรือสารสกัดที่มีลักษณะเป็นยางไม้ (oleoresin) ผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อการค้าว่า Hot pepper waxTM ได้ใช้ food grade paraffin wax และ mineral oil มาใช้ในการช่วยละลาย capsaicin ที่สกัดได้จากพริกชี้หนู โดยนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาเจือจางกับน้ำก่อนฉีดพ่น แต่ปัญหาคือเมื่อน้ำระเหยจะเกิดคราบของแว็กซ์เคลือบอยู่ที่พืช ผัก และผลไม้ ต้องใช้น้ำอุ่นในการกำจัดออก

ไมโครอิมัลชันเป็นสูตรตำรับของของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวในของเหลวอีกชนิด ซึ่งหยดของของเหลว ถูกทำให้คงสภาพโดยฟิล์มของสารลดแรงตึงผิว (6, 7) ไมโครอิมัลชันประกอบด้วย น้ำ น้ำมัน สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) เป็นระบบที่เกิดได้เองเมื่อผสมน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำในอัตราส่วนพอเหมาะ มีลักษณะโปร่งใส (transparent) เป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ ข้อดีของไมโครอิมัลชัน คือ สูตรตำรับมีความใส ทำให้เกิดความน่าใช้ ส่วนประกอบในสูตรตำรับมีทั้งที่เป็นสารที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (lipophilic) จึงสามารถผสมได้ทั้งสารที่ชอบและไม่ชอบน้ำ มีความสามารถในการละลายด้วยได้สูง จึงสามารถเตรียมสารสกัดสมุนไพรในรูปแบบเข้มข้น (concentrate) และผสมน้ำก่อนใช้ได้ เป็นระบบที่เกิดได้เองเมื่อผสมน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวร่วม และน้ำในอัตราส่วนพอเหมาะ การเตรียมทำได้ง่ายเพียงคนผสมเบาๆ ไม่ต้องใช้เครื่องปั่นผสม ความเร็วสูง homogenizer หรือความร้อน ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำ และสามารถผสมสารธรรมชาติใดๆที่ไม่ทนความร้อนได้ เป็นสูตรตำรับที่มีความคงตัวสูง เนื่องจากไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ ทำให้ไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ หรือเมื่ออยู่ในที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมุ่งเน้นที่จะเตรียมสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกและพริกไทยดำ เพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืช โดยนำไปผสมน้ำก่อนฉีดพ่นพืช ผัก และผลไม้

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 3.1. เพื่อศึกษาการตั้งตำรับสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริกชี้หนู
- 3.2. เพื่อควบคุมคุณภาพ และทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับที่เตรียมขึ้น

บทที่ 2

วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

2.1. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

- Electronic stirrer 2008 (Fisher scientific, USA)
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan)
- Refractometer (RX 500, Atago, Japan)
- Rheometer (Brookfield[®] Model DV-III, Brookfield Engineering Laboratories, USA)
- Stirrer (Model RCT – B, KIKA Labortechnik, Germany)
- Thermostatically controlled ovens (TERMAKS[®] KBS, Bergen, Norway) distributed by Science Engineer
- Vortex Genie (Scientific Industries Inc., USA)
- ZetaPALS Particle sizing (Brookhaven Instruments Corporation, USA)

2.2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

- Acetonitrile (Labscan Asia Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- Blackpepper Extract (Thai China Flavours & Fragrances Industry Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- Caprylic/Capric Triglyceride (Lexol GT[®] 865) Lot DD 1026 (Namsiang Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- Capsaicin Extract (GPO, Bangkok, Thailand)
- Ethanol 95% (Liquor Distillery Organization, Chachoengsao, Thailand)
- Ethanol, HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany)
- Methanol (Labscan Asia Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- Mineral Oil (O.V. Chemical & Supply Ltd., Chiangmai, Thailand)
- Propylene Glycol (O.V. Chemical & Supply Ltd., Chiangmai, Thailand)
- Sodium dihydrogen orthophosphate 1-hydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (BHD, England)
- Span 80 (Sricharnd United Dispensary Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- Standard capsaicin Batch no.045K7008 (Sigma, USA)
- Standard piperine Batch no.01902TD (Aldrich, USA)
- Tween 80 (Sricharnd United Dispensary Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
- Orthophosphoric acid (Merck, Darmstadt, Germany)

2.3. วิธีการดำเนินการทดลอง

วิธีการดำเนินการทดลอง แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

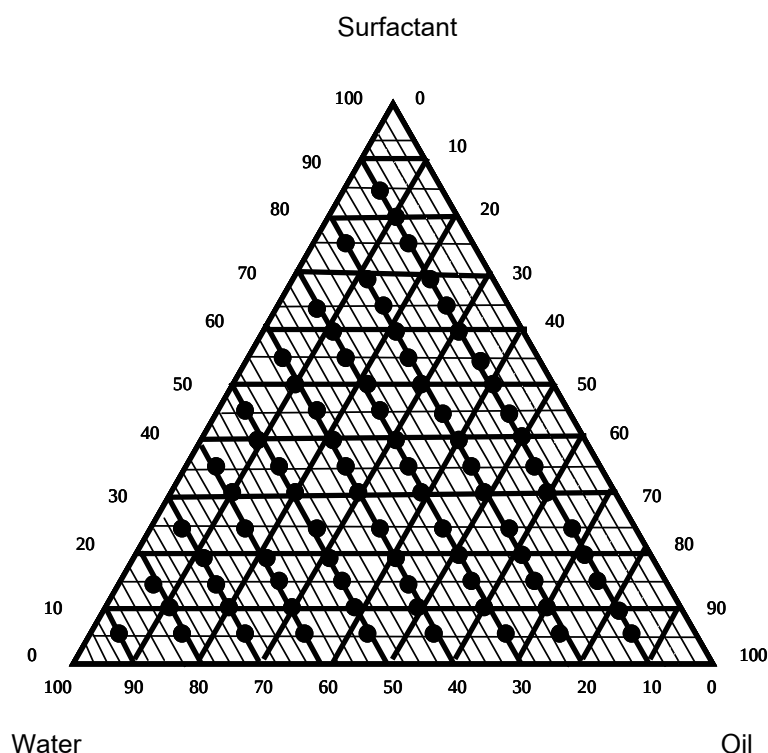
ส่วนที่ 1 การตั้งตำรับสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริก

ส่วนที่ 1.1 สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่ใช้ Lexol GT® 865 เป็นวัตถุน้ำมัน

1). สร้างเฟสไดอะแกรมเพื่อหาส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน

1.1). หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนประกอบไมโครอิมัลชัน โดยนำน้ำ (water), น้ำมัน (oil), สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (cosurfactant) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กันมาผสมกัน และสร้าง pseudoternary phase diagram (รูปที่ 2.1) เพื่อดูพื้นที่ที่เกิดเป็นไมโครอิมัลชัน โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ให้ได้ค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1) การแยกความแตกต่างระหว่างไมโครอิมัลชันกับระบบอื่นๆ เช่น อิมัลชัน หรืออิมัลชันเจลทำได้โดยดูจากลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ได้ โดยตำรับไมโครอิมัลชันจะต้องมีลักษณะโปร่งแสงหรือโปร่งใส

ตำรับที่คาดว่าจะจะเป็นไมโครอิมัลชันจะถูกนำไปศึกษาต่อโดยสังเกตการแยกชั้นทันทีเมื่อเตรียมเสร็จ และหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์



รูปที่ 2.1 An example of pseudoternary phase diagram.

หมายเหตุ

การเตรียมตัวอย่าง microemulsions จะเตรียมตามส่วนประกอบที่แสดงโดยจุดดำ (●)

ตารางที่ 2.1 Composition of each microemulsion systems.

ระบบที่	วัตถุน้ำมัน	สารลดแรงตึงผิวผสม	วัตถุน้ำ
1	Lexol GT [®] 865	Tween80 + Span 80; HLB 8 (34.6 + 65.4)	Distilled water
2	Lexol GT [®] 865	Tween80 + Span 80; HLB 10 (53.3 + 46.7)	Distilled water
3	Lexol GT [®] 865	Tween80 + Span 80; HLB 11 (62.6 + 37.4)	Distilled water
4	Lexol GT [®] 865	Tween80 + Span 80; HLB 12 (72.0 + 28.0)	Distilled water

1.2). จากนั้นเลือกระบบที่เหมาะสมที่สุด กล่าวคือเป็นระบบที่ให้พื้นที่ที่เกิดไมโครอิมัลชันภายใต้ pseudoternary phase diagram กว้างที่สุด มาทำการเตรียม pseudoternary phase diagram อีกครั้ง เพื่อหาขอบเขตของบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันโดยละเอียด

2). เลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมขององค์ประกอบต่างๆ ที่จะทำให้เกิดไมโครอิมัลชัน เพื่อนำมาใช้ในการตั้งค่ารับ

จากบริเวณที่เกิดเป็นไมโครอิมัลชันบนเฟสไดอะแกรมที่สร้างขึ้น ทำการเลือกส่วนประกอบและอัตราส่วนที่เหมาะสมที่เตรียมเป็นไมโครอิมัลชันได้ 3 ตัวอย่าง มาทำการผสมสารสกัดพริกไทยดำ และสารสกัดพริกในปริมาณต่างๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลง เช่น การแยกชั้น และการตกตะกอนเมื่อเตรียมเสร็จ และหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ตัวอย่างที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และสามารถละลายสารสกัดได้ปริมาณสูงสุดจะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทำการศึกษาค้นต่อไป

3). หาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่สามารถละลายได้และมีความคงตัวในไมโครอิมัลชัน

นำสารสกัดมาละลายในไมโครอิมัลชันให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5-15 โดยน้ำหนัก จากนั้นสังเกตการละลาย โดยหากไม่พบตะกอนหลังการละลายสารสกัด แสดงว่าละลายได้หมด แต่หากมีตะกอนเกิดขึ้นแสดงว่าสารสกัดไม่สามารถละลายในไมโครอิมัลชันได้หมด จากนั้นนำประเมินตามข้อ 4

4). การประเมินไมโครอิมัลชัน

คัดเลือกตัวอย่างจากข้อ 3 มาทำการประเมินดังนี้

4.1). ขนาดอนุภาคของวัตถุน้ำมันในของไมโครอิมัลชัน โดยเครื่องวัดขนาดอนุภาค ZetaPALS Particle Sizing (Brookhaven Instruments Corporation, USA) ค่าดัชนีหักเหสำหรับใช้ในการวัดขนาดอนุภาคหาโดย Refractometer (RX 500, Atago, Japan)

4.2). ความหนืดโดยเครื่องวัดความหนืด Brookfield รุ่น DV-III, spindles CP40

4.3). จุดขุ่น (Cloud point) หรืออุณหภูมิที่ทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่น โดยให้ความร้อนแก่ไมโครอิมัลชัน จาก 5 องศาเซลเซียส ถึง 90 องศาเซลเซียส และบันทึกอุณหภูมิที่ไมโครอิมัลชันเริ่มเปลี่ยนจากสถานะใสเป็นขุ่น

4.4). ความคงตัวทางกายภาพ โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิสลับ สภาวะที่ทำการทดสอบ คือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

24 ชั่วโมง ถือเป็น 1 รอบ (cycle) ทำการทดสอบทั้งหมด 7 cycle ลักษณะทางกายภาพของไมโครอิมัลชันที่คงตัว คือไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ความขุ่น-ความใส ไม่เกิดการแยกชั้น และ/หรือไม่เกิดการตกตะกอนของสารสกัด

ส่วนที่ 1.2 สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดเป็นวัตถุน้ำมัน

จากผลที่ได้ข้างต้น ทำการสร้างเฟสไดอะแกรมของระบบที่คัดเลือกมาอีกครั้งแต่เปลี่ยนวัตถุน้ำมันจาก Lexol GT® 865 เป็นสารสกัดแทน และใช้อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวรวมที่มีค่า HLB ตามผลการศึกษาของส่วนที่ 1.1 และประเมินตำรับที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 4) ของส่วนที่ 1.1

ส่วนที่ 2 การควบคุมคุณภาพ และทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับที่เตรียมขึ้น

1). การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (Method Validation) โดยใช้ HPLC

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีที่ใช้วิเคราะห์สามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง โดยทำการตรวจสอบตามหัวข้อดังนี้

1.1). ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เป็นการแสดงให้เห็นว่า ช่วงค่าความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับ peak area

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์สาร piperine ทำโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Piperine (Batch no. 01902TD) (Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมของไมโครอิมัลชัน จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานในไมโครอิมัลชันลง 100 เท่า ด้วย 95% ethanol กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย filter nylon membrane (Filtrex, China) ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC สภาวะของ HPLC system แสดงในตารางที่ 2.2

สำหรับการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ capsicum extract ทำโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ capsaicin (Batch no.045K7008) (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมของไมโครอิมัลชัน จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานในไมโครอิมัลชันลง 100 เท่า ด้วย 95% ethanol กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย filter nylon membrane (Filtrex, China) ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC สภาวะของ HPLC system แสดงในตารางที่ 2.2

จากนั้นพล็อตกราฟระหว่าง peak area ของ chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ piperine และ capsaicin ที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และ peak area ของ chromatogram เป็นสมการเส้นตรง และค่า r^2

ตาราง 2.2 Condition of HPLC system

Condition	Analysis for Piperine	Analysis for Capsicum extract
Column	Phenomenex Gemini 5U C18 (250x4.6 mm , 5 μ m)	Phenomenex Luna 5U C18 (250x4.6 mm , 5 μ m)
Instrument	Shimadzu pump LC – 20AT (Shimadzu, Japan) with 2PD-20A detector (Shimadzu, Japan)	Shimadzu pump LC – 20AT (Shimadzu, Japan) with 2PD-20A detector (Shimadzu, Japan)
Detection wavelength	340 nm	280 nm
Flow rate	1 ml/min	1 ml/min
Injection volume	20 μ l	20 μ l
Mobile phase	Acetonitrile : 25mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4.5), ratio 65:35 v/v	Acetonitrile : Water , ratio 70:30 v/v

1.2). ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เป็นการตรวจสอบว่าการวิเคราะห์แต่ละครั้งนั้นให้ค่าใกล้เคียงเพียงใด เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างภายในวันเดียวกัน (Intraday precision) และเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างวัน (Interday precision) โดยรายงานผลความแม่นยำเป็น % RSD หรือ % CV

สูตรที่ใช้คำนวณหา % RSD หรือ %CV คือ

$$\%RSD \text{ or } \%CV = (SD / \bar{X}) * 100$$

วิธีการศึกษาทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Piperine (Batch no. 01902TD) (Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในไมโครอิมัลชัน จากนั้นเจือจางไมโครอิมัลชันดังกล่าวลง 100 เท่าด้วย 95% ethanol (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 μ g/ml) กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย filter nylon membrane (Filtrex, China) ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

สำหรับ capsicum extract วิธีการศึกษาทำโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Capsaicin (Batch no.045K7008) (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในไมโครอิมัลชัน จากนั้นเจือจางไมโครอิมัลชันดังกล่าวลง 100 เท่าด้วย 95% ethanol (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 μ g/ml) กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย filter nylon membrane ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

1.2.1). ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intraday precision)

การทดสอบความแม่นยำภายในวันเดียวกัน ทำโดยเตรียมสารละลายดังวิธีข้างต้น 5 ซ้ำ และฉีดวิเคราะห์สารละลายที่เตรียมได้ข้างต้นภายในวันเดียวกัน ตัวอย่างละ 5 ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบน (%RSD หรือ %CV) โดยที่ค่า % RSD เฉลี่ยของ peak area ของสารละลายมาตรฐานต้องไม่เกินร้อยละ 10

1.2.2). ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ระหว่างวัน (interday precision)

การทดสอบความแม่นยำระหว่างวัน ทำโดยเตรียมสารละลายดังวิธีข้างต้น 5 ซ้ำ และฉีดวิเคราะห์สารละลายที่เตรียมได้ข้างต้น ตัวอย่างละ 5 ครั้ง เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบน (%RSD หรือ %CV) โดยที่ค่า % RSD เฉลี่ยของ peak area ของสารละลายมาตรฐานต้องไม่เกินร้อยละ 10

1.3). ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

การทดสอบความถูกต้อง บอกถึงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ ห่างไปจากค่าที่เป็นจริงเท่าใด (Recovery) วิธีการศึกษาแบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1 วิเคราะห์หาปริมาณ piperine หรือ capsaicin ในไมโครอิมัลชัน ซึ่งมีสารสกัดพริกไทยดำหรือสารสกัดพริก ความเข้มข้นร้อยละ 15

ทำโดยการเตรียมสารตัวอย่างดังกล่าวมาเจือจางลง 100 เท่าด้วย 95% ethanol กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย filter nylon membrane (Filtrex, China) ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (A)

ขั้นตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณ piperine หรือ capsaicin ในไมโครอิมัลชัน ซึ่งมีสารสกัดพริกไทยดำหรือสารสกัดพริก ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่ผสมกับ (spike) สารละลายมาตรฐาน piperine หรือ capsaicin

ทำโดยการปิเปตสารตัวอย่างไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดพริกไทยดำร้อยละ 15 จากขั้นตอนที่ 1 มา 970 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายมาตรฐาน piperine (Batch no. 01902TD) (Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในไมโครอิมัลชัน 30 ไมโครลิตร (C) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเจือจางลง 100 เท่าด้วย 95% ethanol กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย filter nylon membrane (Filtrex, China) ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (B)

สำหรับ capsaicin ทำโดยการปิเปตสารตัวอย่างไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดพริกไทยดำร้อยละ 15 จากขั้นตอนที่ 1 มา 950 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายมาตรฐาน capsaicin (Batch no. 045K7008) (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในไมโครอิมัลชัน 50 ไมโครลิตร (C) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเจือจางลง 100 เท่าด้วย 95% ethanol กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย filter nylon membrane (Filtrex, China) ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (B)

คำนวณหา % recovery

$$\% \text{Recovery} = (B - A) / C \cdot 100$$

A หมายถึง ความเข้มข้น piperine หรือ capsaicin ในไมโครอิมัลชัน

B หมายถึง ความเข้มข้น piperine หรือ capsaicin ในไมโครอิมัลชัน ที่ผสมกับ (spike) สารละลายมาตรฐาน piperine

C หมายถึง ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน piperine หรือ capsaicin ที่ผสมลงไป (spiked concentration)

1.4). ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection; LOD)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ทำโดยเตรียมสาร piperine หรือ capsaicin ในไมโครอิมัลชันที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัม (stock microemulsion) จากนั้นเจือจางไมโครอิมัลชันดังกล่าวด้วย 95% ethanol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายดังกล่าวลงจนกระทั่งถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ค่า peak area ต่อ noise = 3 : 1

1.5). ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ในการหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation ; LOQ)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ในการหาปริมาณได้ ทำโดยนำสาร piperine หรือ capsaicin ในไมโครอิมัลชันที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีเตรียมตามข้อ 1.4) มาเจือจางลงด้วย 95% ethanol จนกระทั่งถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ค่า peak area ต่อ noise = 10 : 1

2). การทดสอบความคงตัวของตำรับ

จากผลการทดลองในส่วนที่ 1 คัดเลือกสูตรตำรับที่ดีที่สุดของทั้งไมโครอิมัลชันที่ใช้ Lexol GT 865 เป็นวัฏภาคน้ำมัน และไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำ หรือสารสกัดพริกเป็นวัฏภาคน้ำมัน มาทำการทดสอบความคงตัวต่อโดยทดสอบที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน และสุ่มเก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 4 และ 6 เดือน มาประเมินดังนี้

2.1). ความหนืด

2.2). จุดขุ่น

2.3). ลักษณะทางกายภาพด้านความขุ่น-ความใส การเปลี่ยนสีของตำรับ และการแยกชั้น

2.4). ปริมาณสารสำคัญในตำรับ โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC และใช้ piperine และ capsaicin เป็น marker ของสารสกัดพริกไทยดำและสารสกัดพริกตามลำดับ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

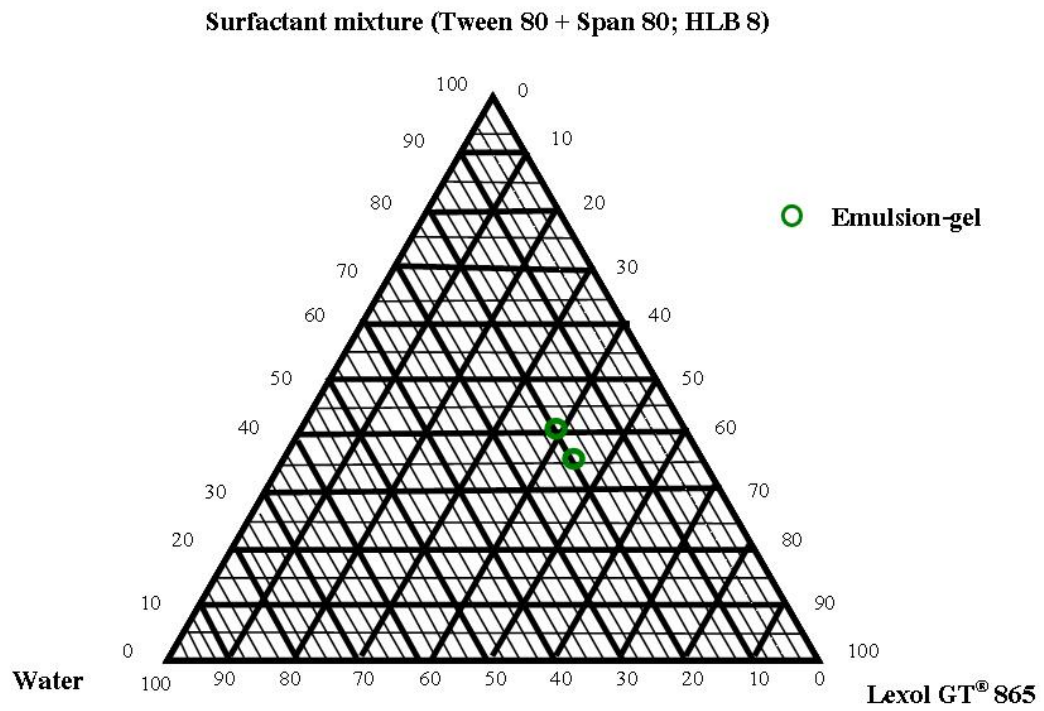
ส่วนที่ 1 การตั้งตำรับสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริก

ส่วนที่ 1.1 สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่ใช้ Lexol GT® 865 เป็นวัฏภาคน้ำมัน

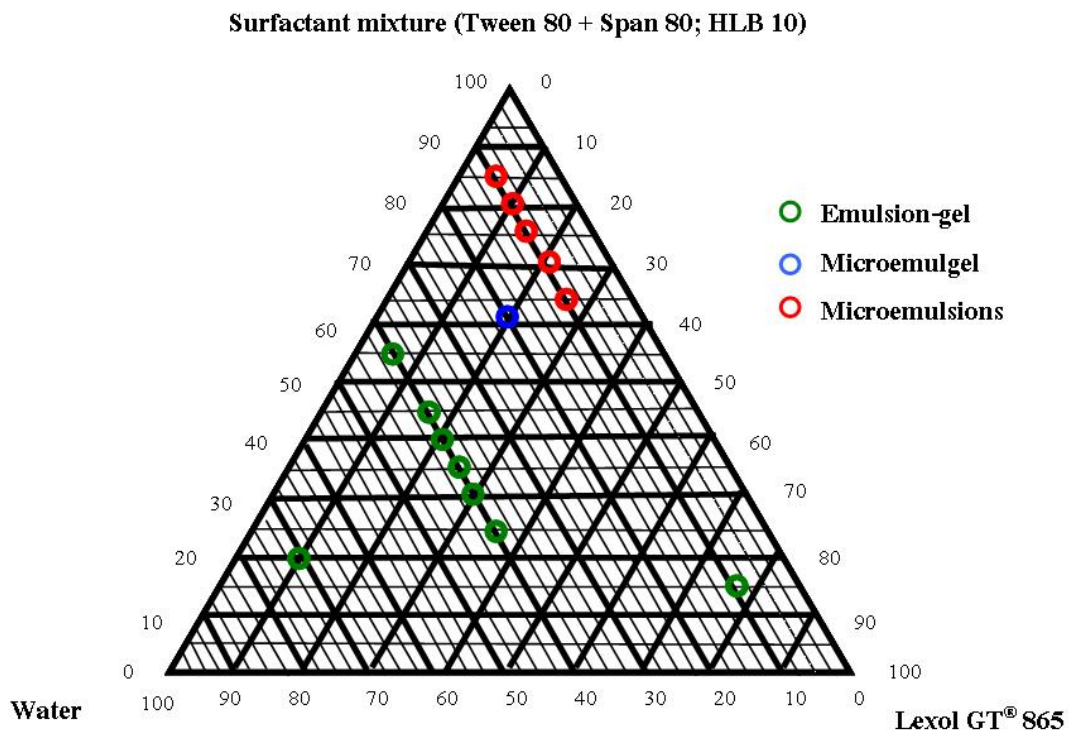
1). สร้างเฟสไดอะแกรมเพื่อหาส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน

สร้างเฟสไดอะแกรมของระบบ Lexol GT® 865 (caprylic/capric triglyceride) สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) และน้ำกลั่น สำหรับสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ในการศึกษา นี้ได้เลือกใช้ Tween 80 และ Span 80 เนื่องจากสามารถทำหน้าที่ช่วยให้สารติดบนใบพืช (sticker) ได้ โดยการสร้างเฟสไดอะแกรมจะทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ให้มีค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) 8 ถึง 12 HLB ที่สูงกว่า 12 ไม่ได้ทำการศึกษา ทั้งนี้เนื่องจากต้องใช้สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งไม่ได้อยู่ในจุดประสงค์ของการศึกษา

ผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มค่า HLB สูงขึ้น พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันจะกว้างขึ้น แต่ขณะเดียวกันการเกิดตำรับรูปแบบอื่น กล่าวคือ emulsion-gel และ microemulgel ก็จะกว้างขึ้นเช่นกัน ดังแสดงในเฟสไดอะแกรมในรูปที่ 3.1 ถึง 3.4 พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่มีค่า HLB 11 และ 12 มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ระบบที่มีค่า HLB 12 จะมีตำรับรูปแบบอื่น เช่น emulsion-gel และ microemulgel กว้างมากกว่า และค่อนข้างใกล้เคียงกับบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชัน ดังนั้นในที่นี้จึงเลือกระบบที่มีค่า HLB 11 ไปทำการสร้างเฟสไดอะแกรมโดยละเอียด และได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.5 จากนั้นสุ่มเลือกตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง คือ sample A, B และ C ไปทำการศึกษาต่อไป

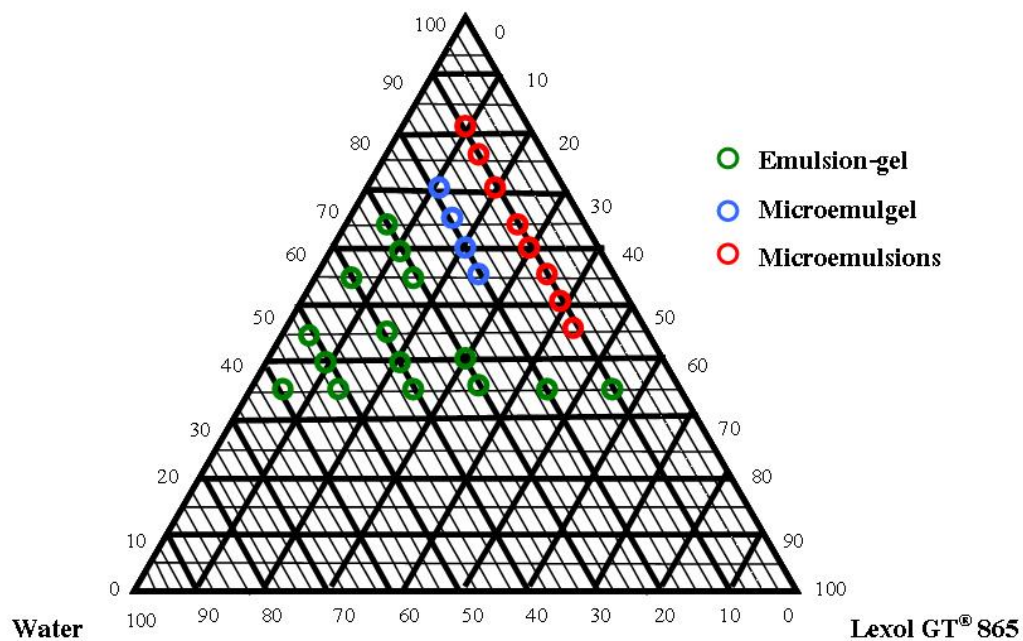


รูปที่ 3.1 The pseudoternary phase diagram of Lexol GT[®] 865 /Tween80+Span80 (HLB 8)/Water.

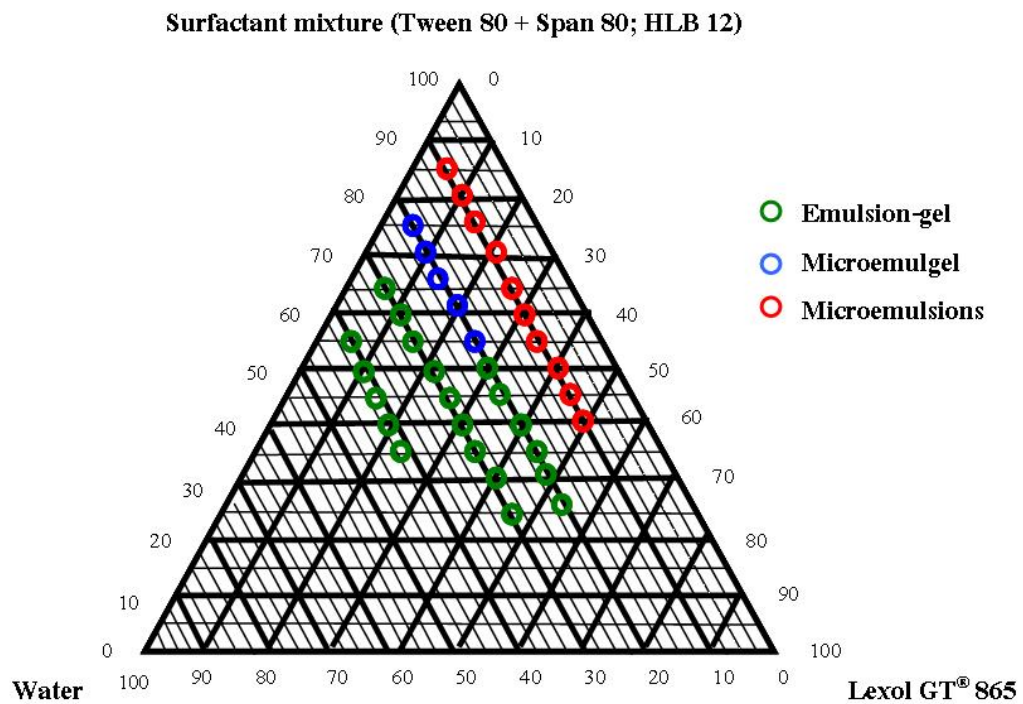


รูปที่ 3.2 The pseudoternary phase diagram of Lexol GT® 865/Tween80+Span80 (HLB 10)/Water.

Surfactant mixture (Tween 80 + Span 80; HLB 11)

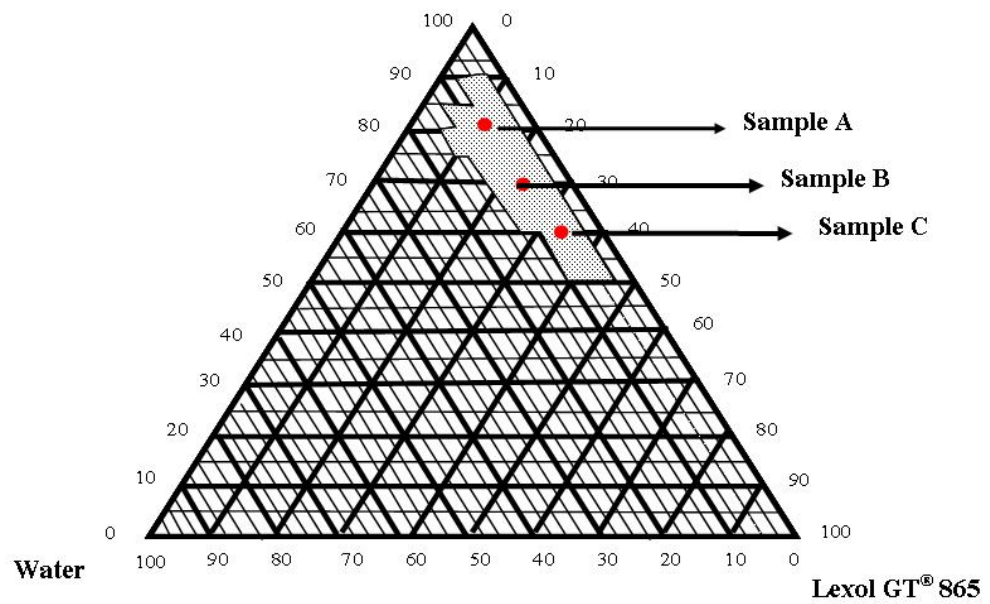


รูปที่ 3.3 The pseudoternary phase diagram of Lexol GT® 865/Tween80+Span80 (HLB 11)/Water.



รูปที่ 3.4 The pseudoternary phase diagram of Lexol GT® 865/Tween80+Span80 (HLB 12)/Water.

Surfactant mixture (Tween 80 + Span 80; HLB 11)



รูปที่ 3.5 Area of microemulsions in the pseudoternary phase diagram of Lexol GT® 865 /Tween80+Span80 (HLB 11)/Water. Sample A, B and C were chosen for further studies.

2). หาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่สามารถละลายได้และมีความคงตัวในไมโครอิมัลชัน

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 15 ยังสามารถละลายได้ดีในไมโครอิมัลชัน (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) หากแต่ไมโครอิมัลชันที่ได้มีสีเข้มข้น จึงทำให้สังเกตเห็นการแยกชั้นได้ยาก ดังนั้นจึงทำการทดสอบความคงตัวเบื้องต้นโดยใช้สภาวะอุณหภูมิกลับ ซึ่งจะกล่าวต่อไป

ตารางที่ 3.1 Solubility of black pepper extracts at various concentrations in microemulsions.

Microemulsions sample	Concentration of black pepper extract added to the microemulsion sample (%w/w)		
	5	10	15
Sample A	√	√	√
Sample B	√	√	√
Sample C	√	√	√

NB: √ = soluble X = insoluble

ตารางที่ 3.2 Solubility of capsicum extracts at various concentrations in microemulsions.

Microemulsions sample	Concentration of capsicum extract added to the microemulsions sample (%w/w)		
	5	10	15
Sample A	√	√	√
Sample B	√	√	√
Sample C	√	√	√

NB: √ = soluble X = insoluble

3). การประเมินไมโครอิมัลชัน

ตัวอย่างไมโครอิมัลชันที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ และสารสกัดพริกที่มีสีเขียวหรือแดงเข้มซึ่งรบกวนการทำการประเมิน ขนาดของวัฏภาคภายใน ค่าความหนืด จุดขุ่น (cloud point) และความคงตัวทางกายภาพ

3.1). ขนาดของวัฏภาคภายใน

เนื่องจากไมโครอิมัลชันที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ และสารสกัดพริกที่มีสีเขียวหรือแดงเข้มซึ่งรบกวนการกระเจิงแสง จึงไม่สามารถวัดขนาดวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ และสารสกัดพริกได้ จึงทำการวัดขนาดวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันที่ไม่ได้ผสมสารสกัดเหล่านั้น จากการศึกษาพบว่าขนาดวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันของไมโครอิมัลชัน A, B และ C อยู่ในช่วงไม่เกิน 10 นาโนเมตร (ตารางที่ 3.3) สำหรับขนาดของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัฏภาคน้ำมันไม่สามารถวัดขนาดได้เนื่องจากสีของสารสกัดมีสีเข้ม

ตารางที่ 3.3 Droplet size and polydispersity index of empty microemulsions.

Microemulsions sample	Particle size (nm)	Polydispersity index
Sample A	9.70 ± 1.80	0.422
Sample B	5.80 ± 2.63	0.442
Sample C	5.28 ± 0.68	0.631

3.2). ค่าความหนืด

ผลการวัดความหนืดของไมโครอิมัลชันทั้งที่ไม่ผสมหรือผสมสารสกัดพริกไทยดำ หรือสารสกัดพริกพบว่า ความหนืดลดลงเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับลดลง (ตาราง 3.4 และ 3.5) นอกจากนี้ยังพบว่าความหนืดของไมโครอิมัลชันลดลง เมื่อผสมสารสกัดพริกไทยดำ (ตารางที่ 3.4) ขณะที่เมื่อผสมสารสกัดพริก ความหนืดของไมโครอิมัลชันเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับไมโครอิมัลชันที่ไม่ผสมสารสกัด (ตารางที่ 3.5) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะของสารสกัดที่ผสม สารสกัดพริกไทยดำมีลักษณะเหลวจึงทำให้ความหนืดของไมโครอิมัลชันลดลง ขณะที่สารสกัดพริกมีลักษณะเป็นเพสต์ที่เหนียวข้น จึงทำให้ความหนืดของไมโครอิมัลชันเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.4 Viscosity of microemulsions without and with black pepper extracts at concentration 15% w/w.

Microemulsions sample	Viscosity (cps)	
	Without extract	With black pepper extract
Sample A	449.1 $\pm$ 7.8	390.5 $\pm$ 8.2
Sample B	338.7 $\pm$ 7.6	302.1 $\pm$ 3.9
Sample C	285.4 $\pm$ 4.2	258.5 $\pm$ 6.5

ตารางที่ 3.5 Viscosity of microemulsions without and with capsicum extracts at concentration 15% w/w.

Microemulsions sample	Viscosity (cps)	
	Without extract	With capsaicin extract
Sample A	449.1 $\pm$ 7.8	523.7 $\pm$ 14.3
Sample B	338.7 $\pm$ 7.6	431.9 $\pm$ 13.3
Sample C	285.4 $\pm$ 4.2	397.5 $\pm$ 6.8

3.3). จุดขุ่น (cloud point)

ค่า cloud point สามารถใช้บอกถึงความคงสภาพของไมโครอิมัลชันในช่วงอุณหภูมิที่ศึกษาได้ หากไมโครอิมัลชันที่เตรียมขึ้นไม่คงตัว จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงจากใสเป็นขุ่น ผลการศึกษาพบว่าไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้ทั้ง sample A, B และ C ที่ไม่ผสมและที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ หรือสารสกัดพริก ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิที่ทดสอบ (5 - 90 องศาเซลเซียส) (ตาราง 3.6 และ 3.7)

ตารางที่ 3.6 Cloud point of microemulsions without and with black pepper extracts at concentration 15% w/w.

Microemulsions sample	Cloud point ($^{\circ}$ C)	
	Without extract	With black pepper extract
Sample A	> 90 $^{\circ}$ C	> 90 $^{\circ}$ C
Sample B	> 90 $^{\circ}$ C	> 90 $^{\circ}$ C
Sample C	> 90 $^{\circ}$ C	> 90 $^{\circ}$ C

ตารางที่ 3.7 Cloud point of microemulsions without and with capsicum extracts at concentration 15% w/w.

Microemulsions sample	Cloud point (°C)	
	Without extract	With capsicum extract
Sample A	> 90 °C	> 90 °C
Sample B	> 90 °C	> 90 °C
Sample C	> 90 °C	> 90 °C

3.4). การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

การทดสอบความคงตัวทางกายภาพเบื้องต้นโดยสภาวะอุณหภูมิสลับ (Freeze-thaw) ของไมโครอิมัลชัน Sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำและสารสกัดพริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.8 และ 3.9

ตารางที่ 3.8 Physical stability of microemulsions containing black pepper extracts at concentration 15% w/w at room temperature and after freeze-thaw process.

Microemulsions sample	Physical stability of microemulsions	
	Room temperature	Freeze-thaw
Sample A	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน
Sample B	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน
Sample C	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน

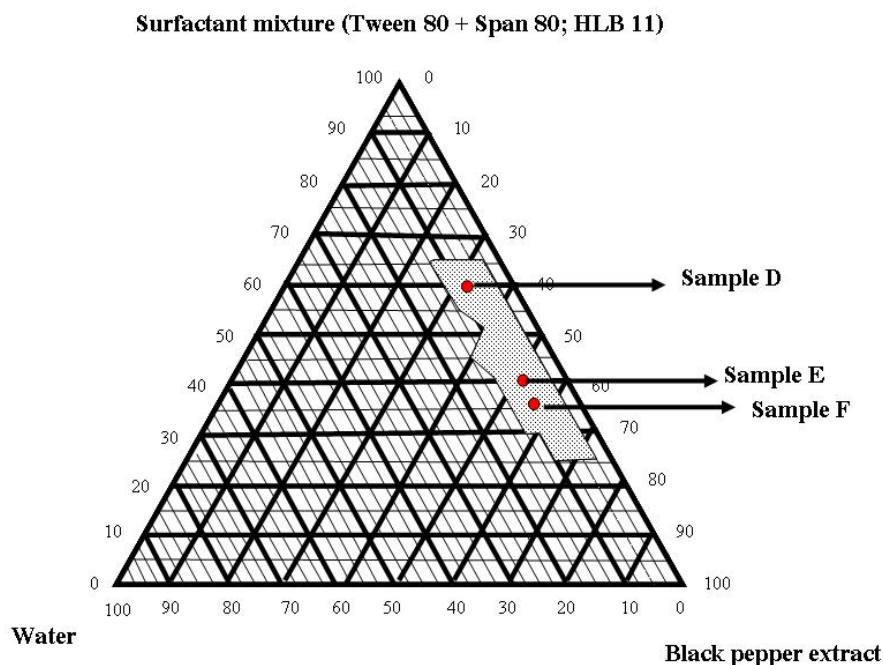
ตารางที่ 3.9 Physical stability of microemulsions containing capsicum extracts at concentration 15% w/w at room temperature and after freeze-thaw process.

Microemulsions sample	Physical stability of microemulsions	
	Room temperature	Freeze-thaw
Sample A	สารมีลักษณะเป็นสีแดงเข้มใส ไม่แยกชั้น	สารมีลักษณะเป็นสีแดงเข้มใส ไม่แยกชั้น
Sample B	สารมีลักษณะเป็นสีแดงเข้มใส ไม่แยกชั้น	สารมีลักษณะเป็นสีแดงเข้มใส ไม่แยกชั้น
Sample C	สารมีลักษณะเป็นสีแดงเข้มใส ไม่แยกชั้น	สารมีลักษณะเป็นสีแดงเข้มใส ไม่แยกชั้น

ส่วนที่ 1.2 สูตรตำรับไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดเป็นวัตถุดิบน้ำมัน

4). สร้างเฟสไดอะแกรมเพื่อหาส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน

ทำการเตรียม Phase diagram ดังเช่น ระบบ Lexol GT[®] 865/Tween80:Span80 (HLB 11)/Water แต่เปลี่ยนวัตถุดิบน้ำมันจาก Lexol GT[®] 865 เป็นสารสกัดพริกไทยดำ ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 3.6 sample D, E และ F ได้ถูกคัดเลือกเพื่อการศึกษาต่อไป



รูปที่ 3.6 Area of microemulsions in the pseudoternary phase diagram of Black pepper extract /Tween80+Span80 (HLB 11)/Water. Sample D, E and F were chosen for further studies.

เนื่องจากสารสกัดพริกค่อนข้างข้นหนืด จึงไม่สามารถใช้เป็นวัตถุน้ำมันได้ จึงทำการทดสอบการละลายของสารสกัดพริกในตัวกลางต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดพริกสามารถละลายได้ดีในน้ำกลั่น propylene glycol และ ไมโครอิมัลชัน (sample A, B และ C) เท่านั้น (ตาราง 3.10) ซึ่งเทียบเท่ากับการนำสารสกัดมาผสมกับอิมัลชันที่เตรียมเสร็จแล้วดังการศึกษาข้างต้น ดังนั้นจึงไม่ทำการเตรียมเฟสโคอะเกรมที่ใช้สารสกัดพริกเป็นวัตถุน้ำมันต่อ

ตารางที่ 3.10 Miscibility of capsicum extracts in various solvents.

Types of solvents	Ratio of extracts to solvent		
	3:1	2:1	1:1
Distilled water	√	√	√
Lexol GT [®] 865	X	X	X
Crodamol GTCC	X	X	X
Propylene Glycol	√	√	√
Ethanol 95%	X	X	X
Mineral oil	X	X	X
Microemulsions A, B, C	√	√	√

หมายเหตุ √ = miscible X = immiscible

5). การประเมินไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมัน

ทำการประเมินขนาดของวัตถุกายใน ค่าความหนืด จุดขุ่น (cloud point) และความคงตัวทางกายภาพของตัวอย่างไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมัน

5.1). ขนาดของวัตถุกายใน

ขนาดของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมันไม่สามารถวัดขนาดได้เนื่องจากสีของสารสกัดมีสีเข้ม

5.2). ค่าความหนืด

ผลการวัดความหนืดของไมโครอิมัลชันพบว่าไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมันมีความหนืดมากกว่าที่ใช้ Lexol GT[®] 865 และในทำนองเดียวกันกับการศึกษาข้างต้น ความหนืดลดลงเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับลดลง (ตารางที่ 3.11)

ตารางที่ 3.11 Viscosity of microemulsions using black pepper extracts as an oil phase.

Microemulsions sample	Viscosity (cps)
Sample D	582.8 ± 26.6
Sample E	549.4 ± 12.9
Sample F	548.0 ± 21.9

5.3). จุดขุ่น (cloud point)

ค่า cloud point ของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัฏภาคน้ำมันที่เตรียมได้ทั้ง sample D, E และ F ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิที่ทดสอบ (5 - 90 องศาเซลเซียส) (ตารางที่ 3.12)

ตารางที่ 3.12 Cloud point of microemulsions using black pepper extracts as an oil phase.

Microemulsions sample	Cloud point (°C)
Sample D	> 90 °C
Sample E	> 90 °C
Sample F	> 90 °C

5.4). การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

จากการทดสอบความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัฏภาคน้ำมัน Sample D, E และ F ที่อุณหภูมิห้อง และที่สภาวะเร่ง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.13

ตารางที่ 3.13 Physical stability of microemulsions using black pepper extracts as an oil phase at room temperature and after freeze-thaw process.

Microemulsions sample	Physical stability of microemulsions	
	Room temperature	Freeze-thaw
Sample D	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน
Sample E	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน
Sample F	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน	สารมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ไม่ตกตะกอน

ส่วนที่ 2 การควบคุมคุณภาพและการทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับที่เตรียมขึ้น

6. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (Method validation) โดยใช้เครื่อง HPLC

Method validation ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดพริกไทยดำและสารสกัดพริกในไมโครอิมัลชัน

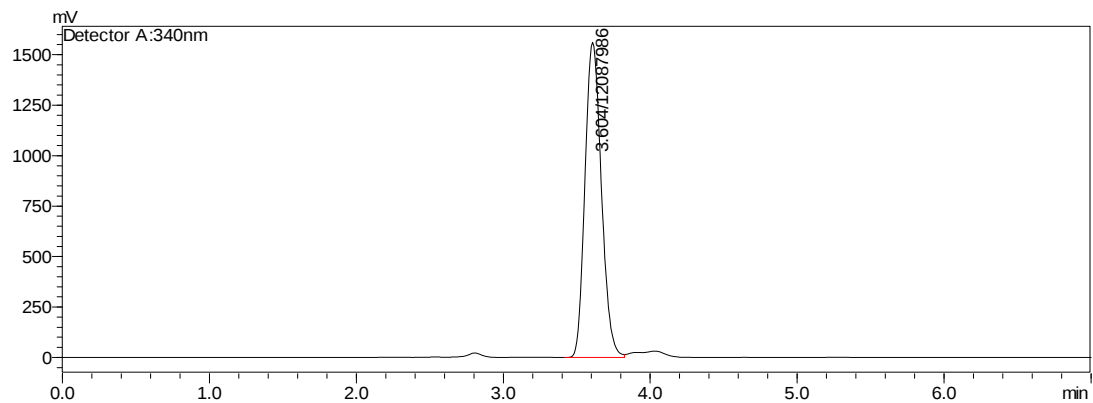
จากผลการทดลองข้างต้นไมโครอิมัลชัน sample A, B และ C มีความคงตัวดี ดังนั้นจึงเลือกทั้ง 3 ตำรับมาทำการศึกษาต่อไป ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดพริกไทยดำและสารสกัดพริกในไมโครอิมัลชัน จึงทำโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ piperine และ capsaicin ในไมโครอิมัลชันซึ่งมีส่วนประกอบแสดงดังในตาราง 3.14

ตาราง 3.14 Composition of microemulsion used in method validation study.

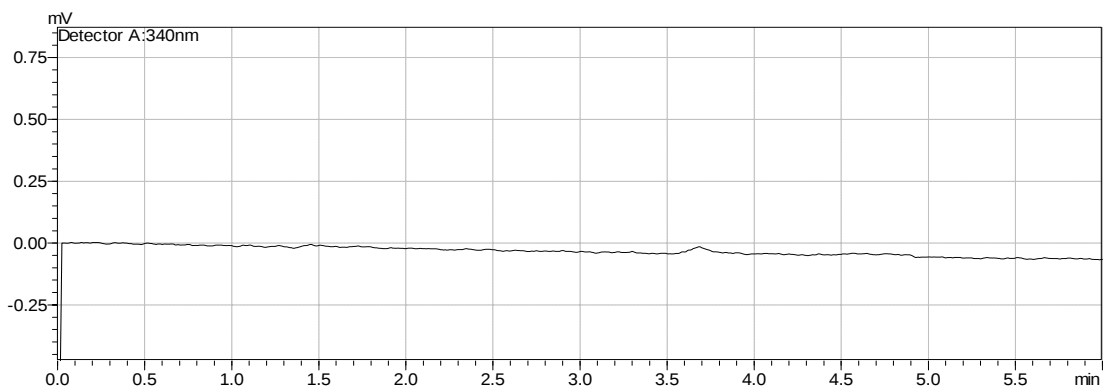
Composition	Amount (g)
Caprylic/capric triglyceride	32.5
Surfactant mixture (Tween 80 + Span 80)	60.0
Distilled water	7.5

จาก HPLC chromatogram พบพีคของ piperine ที่เวลาประมาณ 3.7 นาที (รูปที่ 3.7) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ piperine เป็นสองเท่า พบว่าพื้นที่ใต้กราฟของพีค piperine เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนเดียวกันกับความเข้มข้นของ piperine ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ไมโครอิมัลชันที่ไม่มีสารสกัด (empty microemulsion) ไม่พบพีคใดๆ ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันกับพีคของ piperine ดังแสดงในรูปที่ 3.8

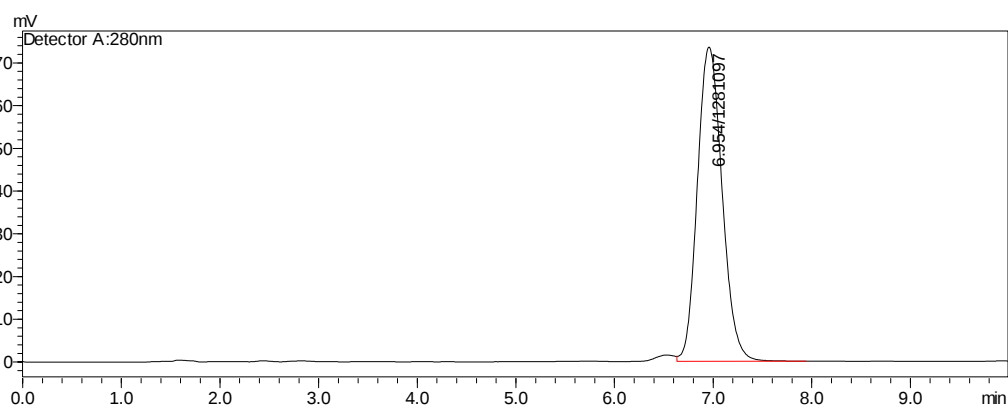
สำหรับสารสกัดพริก พบพีคของ capsaicin ที่เวลาประมาณ 7 นาที (รูปที่ 3.9) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ capsaicin เป็นสองเท่า พบว่าพื้นที่ใต้กราฟของพีค capsaicin เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนเดียวกันกับความเข้มข้นของ capsaicin ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ไมโครอิมัลชันที่ไม่มีสารสกัด (empty microemulsion) ไม่พบพีคใดๆ ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันกับพีคของ capsaicin ดังแสดงในรูปที่ 3.10



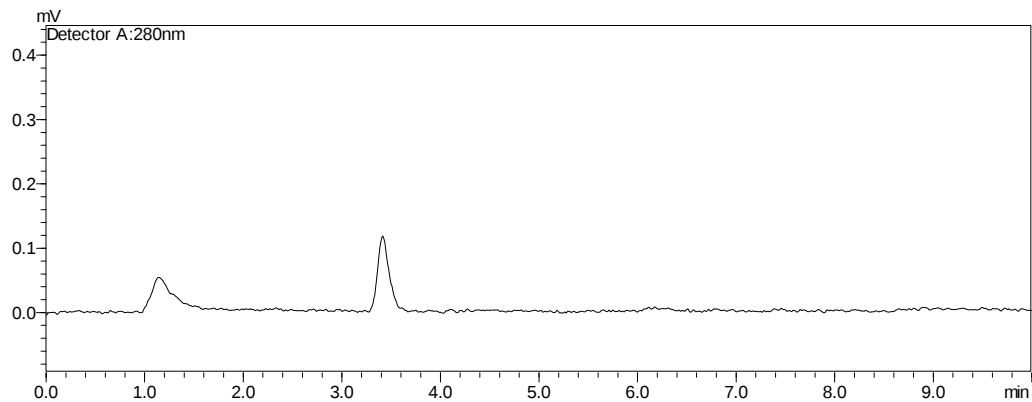
รูปที่ 3.7 HPLC chromatogram of piperine concentration 100 ug/ml. Retention time was observed at 3.7 min.



รูปที่ 3.8 HPLC chromatogram of empty microemulsion (Sample C). No peak was observed at retention time 3.7 min.



รูปที่ 3.9 HPLC chromatogram of capsaicin concentration 100 ug/ml. The retention time was 7 min.



รูปที่ 3.10 HPLC chromatogram of empty microemulsion (Sample C). No peak was observed at retention time 7 min.

ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ในการหาปริมาณได้ (LOQ) ของ piperine และ capsaicin แสดงในตาราง 3.15

ตารางที่ 3.15 Results of method validation.

Marker	Linearity	r^2	Intraday precision (%RSD)	Intraday precision (%RSD)	% Recovery	LOD	LOQ
Piperine	$y = 145345x - 131483$ (range 5 – 100 $\mu\text{g/ml}$)	0.9993	2.07	0.93	86.67 ± 2.40	$< 1 \times 10^{-7}$ $\mu\text{g/ml}$	$< 1 \times 10^{-7}$ $\mu\text{g/ml}$
Capsaicin	$y = 11013x + 4903$ (range 5 – 200 $\mu\text{g/ml}$)	0.9998	0.25	0.23	103.87 ± 15.35	1×10^{-7} $\mu\text{g/ml}$	1×10^{-5} $\mu\text{g/ml}$

7). การทดสอบความคงตัว

7.1). กรณีสูตรตำรับ ไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และสารสกัดพริก

การทดสอบความคงตัวแบบเร่งทำโดย เตรียมไมโครอิมัลชัน sample A, B และ C ตามส่วนประกอบแสดงดังตาราง 3.16 แล้วผสมสารสกัดพริกไทยดำลงไปร้อยละ 15 จากนั้นเก็บตำรับที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน และสุ่มเก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 4 และ 6 เดือน มาหาปริมาณสารสำคัญในตำรับ โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC และใช้ piperine เป็น marker ของสารสกัดพริกไทยดำ

การวิเคราะห์หาปริมาณ piperine และ capsaicin ในสารตัวอย่างสูตรตำรับต่างๆ ทำโดยเปิดสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบดังกล่าว 100 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วย 95% ethanol 100 เท่า กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย filter nylon membrane (Filtrex, China) ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

ตาราง 3.16 Composition of microemulsion A, B and C.

Microemulsion sample	Caprylic/capric triglyceride (g)	Surfactant (g) (Tween 80 + Span 80, HLB 11 (62.6+37.4))	Distilled water (g)
Sample A	12.5	80	7.5
Sample B	22.5	70	7.5
Sample C	32.5	60	7.5

7.1.1). ค่าความหนืด

ผลการวัดความหนืดของไมโครอิมัลชันทั้งที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำและสารสกัดพริก พบว่าเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน ความหนืดไม่แตกต่างกับตำรับที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 3.17 และ 3.18)

ตารางที่ 3.17 Viscosity of microemulsions with black pepper extracts at concentration 15% w/w kept at room temperature and at $45^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, relative humidity (RH) $75 \pm 5\%$ (n=2).

Microemulsions sample	Viscosity (cps)	
	Room temperature	At 45°C , RH 75%
Sample A	321.7	331.0
Sample B	261.8	260.4
Sample C	219.4	219.8

ตารางที่ 3.18 Viscosity of microemulsions with capsicum extracts at concentration 15% w/w kept at room temperature and at $45^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, relative humidity (RH) $75 \pm 5\%$ (n=2).

Microemulsions sample	Viscosity (cps)	
	Room temperature	At 45°C , RH 75%
Sample A	590.9	550.7
Sample B	450.2	434.0
Sample C	350.4	363.6

7.1.2). จุดขุ่น (cloud point)

การทดสอบหาจุดขุ่นของไมโครอิมัลชันทั้งที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำหรือสารสกัดพริก เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 หรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของไมโครอิมัลชันจากใสเป็นขุ่นในช่วงอุณหภูมิ 5-90 องศาเซลเซียส

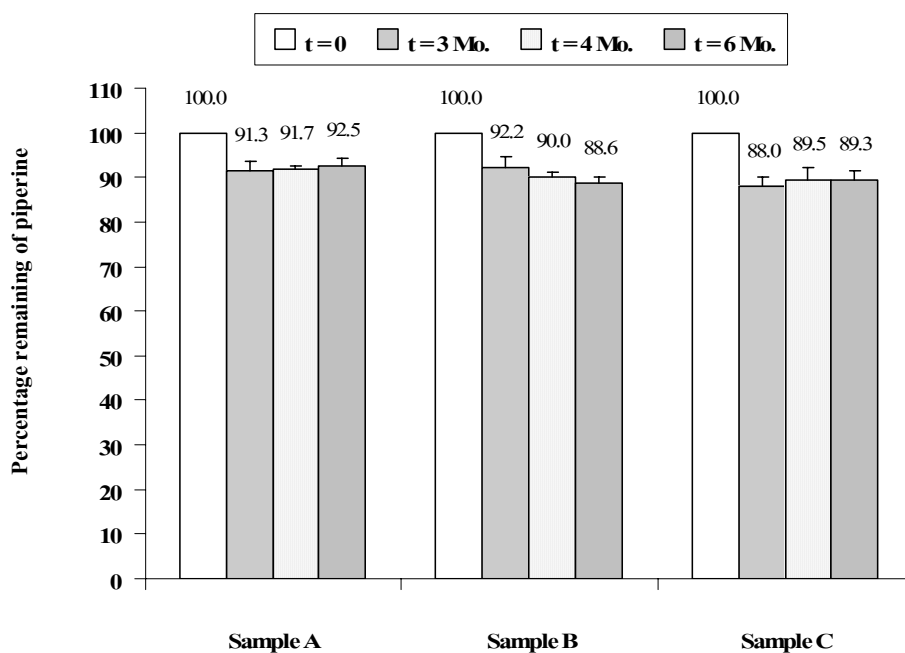
7.1.3). ลักษณะทางกายภาพ ด้านความขุ่น-ความใส การเปลี่ยนสีของตำรับ และการแยกชั้น

จากการทดสอบความคงตัวของไมโครอิมัลชัน Sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ หรือสารสกัดพริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่า ไมโครอิมัลชัน Sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ไมโครอิมัลชันที่ผสมสารสกัดพริกพบการตกตะกอนของสารสกัดที่ก้นขวด แต่เมื่อเขย่าจะกลับผสมเข้ากันได้

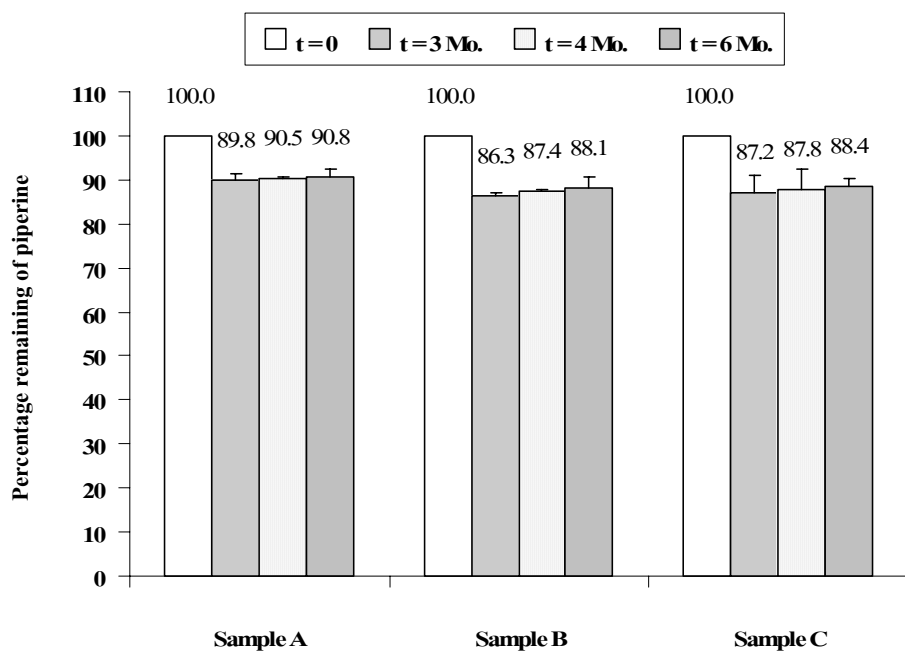
7.1.4). การลดลงของปริมาณสารสำคัญในตำรับ โดย HPLC

การทดสอบความคงตัวแบบเร่งของไมโครอิมัลชัน sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำร้อยละ 15 พบว่าเมื่อเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 เดือน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ที่เวลา 0, 3, 4 และ 6 เดือน ปริมาณสารสำคัญในตำรับลดลงจากที่เวลาเริ่มต้น แต่ปริมาณสารไม่แตกต่างกันที่ 3, 4 และ 6 เดือน (รูปที่ 3.11) และเมื่อเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ที่เวลา 0, 3, 4 และ 6 เดือนเช่นกัน พบว่าปริมาณสารสำคัญในตำรับลดลงจากที่เวลาเริ่มต้น แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 3, 4 และ 6 เดือน (รูปที่ 3.12) และไม่แตกต่างกับปริมาณสารในตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณสารสกัดพริกไทยดำ (วิเคราะห์จากปริมาณ piperine) ในตำรับไมโครอิมัลชัน sample A, B และ C ที่สลายไปไม่แตกต่างกัน

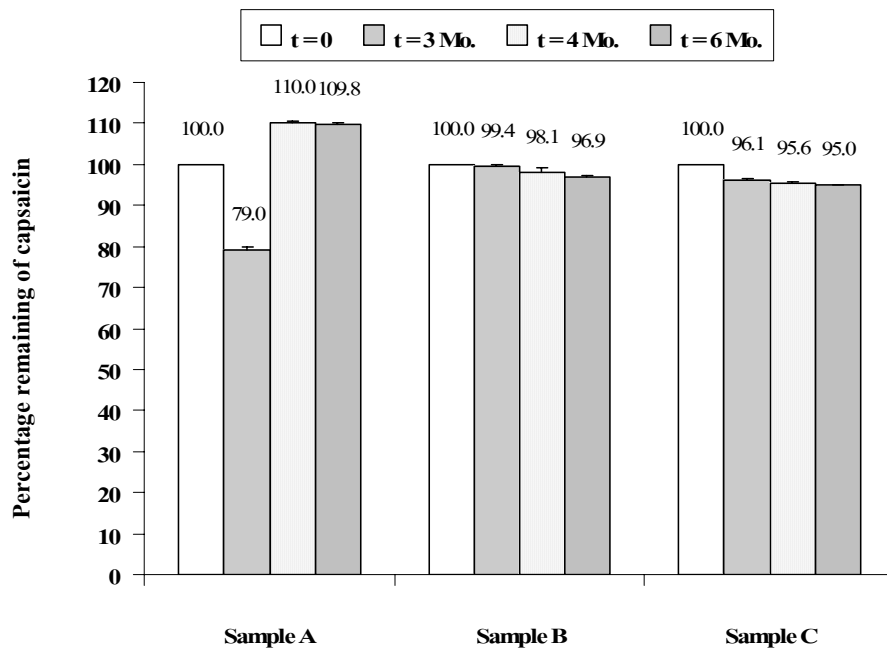
สำหรับไมโครอิมัลชัน sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกไทยร้อยละ 15 พบว่าเมื่อเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 3, 4 และ 6 เดือน ปริมาณสารสำคัญในตำรับยังคงเหลือถึงร้อยละ 95 (รูปที่ 3.13) สำหรับปริมาณสารสกัดพริกในไมโครอิมัลชัน sample A ที่วิเคราะห์ได้เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 เดือน ที่ลดลงค่อนข้างมาก น่าจะเกิดเนื่องจากความผิดพลาดในการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ ในการศึกษาจึงทำการสุ่มตัวอย่างที่ 4 เดือน เพิ่มขึ้นอีก 1 จุด ส่วนการเก็บตำรับไมโครอิมัลชัน sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 3, 4 และ 6 เดือน พบว่าปริมาณสารสำคัญในตำรับลดลงจากที่เวลาเริ่มต้นมากกว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณสารสกัดพริกในตำรับไมโครอิมัลชัน sample A คงเหลือที่ 6 เดือน มีปริมาณสูงสุด (รูปที่ 3.14)



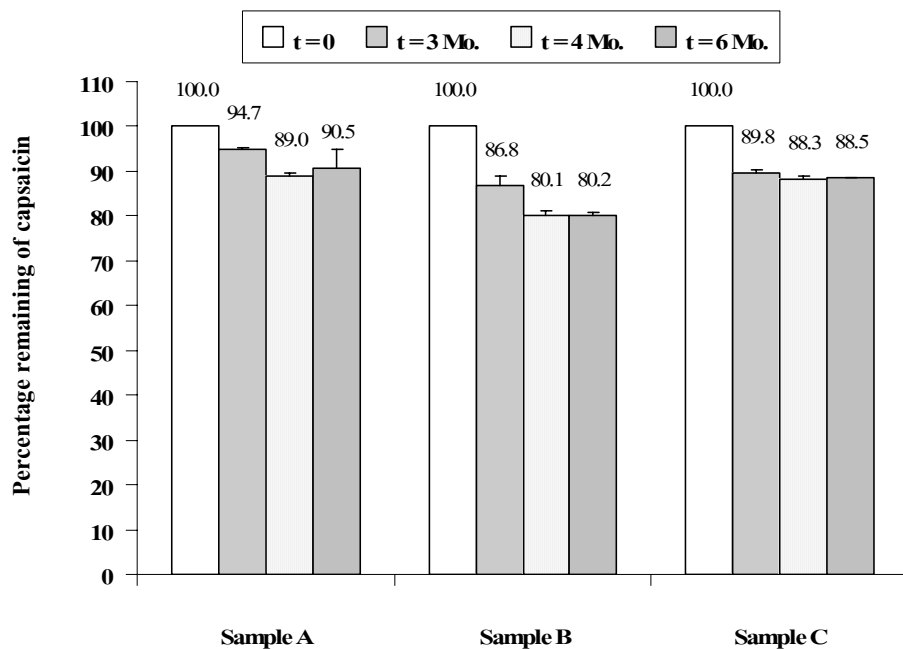
รูปที่ 3.11 Percentage remaining of piperine in sample A, B and C when stored at room temperature for 0, 3, 4 and 6 months.



รูปที่ 3.12 Percentage remaining of piperine in sample A, B and C when stored at 45° C, relative humidity 75% for 0, 3, 4 and 6 months.



រូបភាព 3.13 Percentage remaining of capsaicin in sample A, B and C when stored at room temperature for 0, 3, 4 and 6 months.



រូបភាព 3.14 Percentage remaining of capsaicin in sample A, B and C when stored at 45° C, relative humidity 75% for 0, 3, 4 and 6 months.

7.2) กรณีสูตรตำรับ ไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัฏภาคน้ำมัน

วิธีการศึกษาทำโดยเตรียมไมโครอิมัลชัน Sample D, E และ F ตามส่วนประกอบแสดงดังตาราง 3.19 จากนั้นเก็บตำรับที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน และสุ่มเก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 4 และ 6 เดือน มาปริมาณสารสำคัญในตำรับ โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC และใช้ piperine เป็น marker ของสารสกัดพริกไทยดำ

ตาราง 3.19 Composition of microemulsion D, E and F.

Microemulsion sample	Black pepper extract	Surfactant (g) (Tween 80 + Span 80, HLB 11)	Distilled water (g)
Sample D	32.5	60	7.5
Sample E	52.5	40	7.5
Sample F	57.5	35	7.5

7.2.1). ค่าความหนืด

ผลการวัดความหนืดของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัฏภาคน้ำมัน พบว่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน ความหนืดจะลดลงเมื่อเทียบกับความหนืดของตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาเดียวกันให้ผลเช่นเดียวกับการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3.20)

ตารางที่ 3.20 Viscosity of microemulsions using black pepper extracts as an oil phase kept at room temperature and at $45^\circ \pm 2^\circ \text{C}$, relative humidity (RH) $75 \pm 5\%$ (n=2).

Microemulsions sample	Viscosity (cps)	
	Room temperature	At 45°C , RH 75%
Sample D	429.8	432.3
Sample E	410.8	427.4
Sample F	464.3	473.0

7.2.2). จุดขุ่น (cloud point)

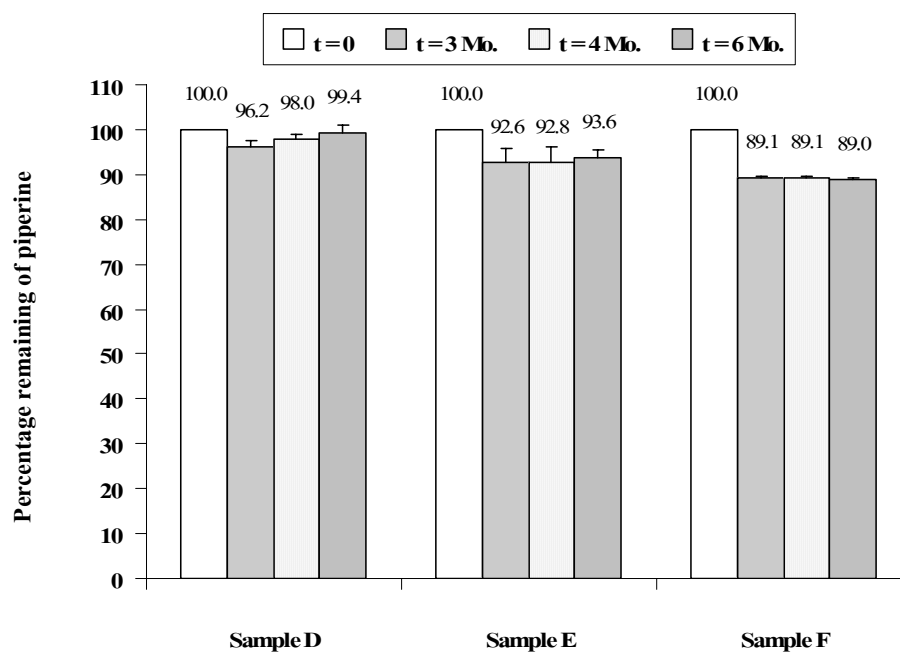
จุดขุ่นของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัฏภาคน้ำมัน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 หรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของไมโครอิมัลชันจากใสเป็นขุ่นในช่วงอุณหภูมิ 5-90 องศาเซลเซียส

7.2.3). ลักษณะทางกายภาพ ด้านความขุ่น-ความใส การเปลี่ยนสีของตำรับ และการแยกชั้น

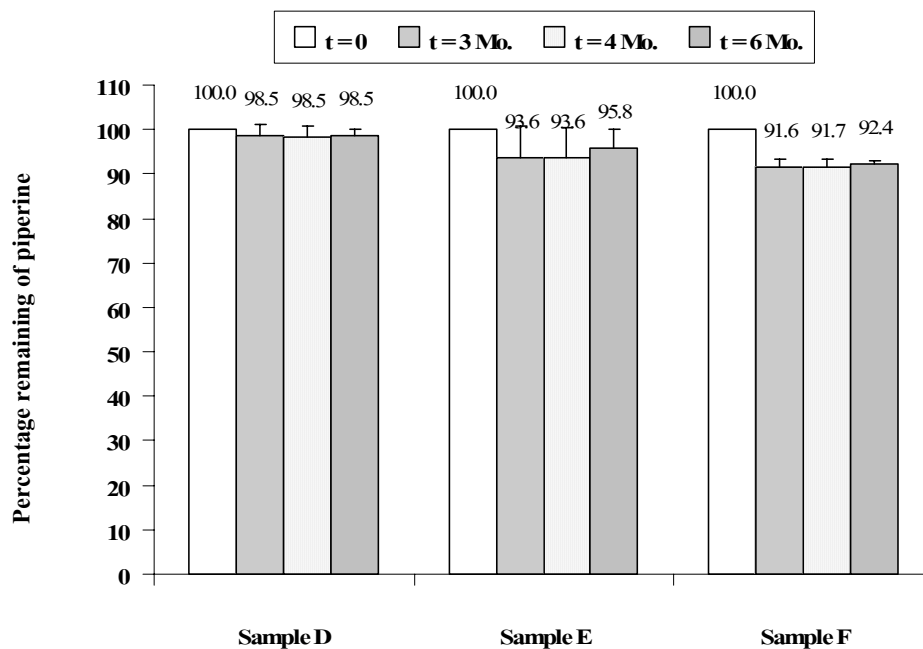
จากการทดสอบความคงตัวของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัฏภาคน้ำมัน เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่า ลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง

7.2.4). การลดลงของปริมาณสารสำคัญในตำรับ โดย HPLC

การทดสอบความคงตัวแบบเร่งของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัฏภาคน้ำมัน sample D, E และ F พบว่าเมื่อเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 3.15) และที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 (รูปที่ 3.16) ปริมาณสารสำคัญในตำรับลดลงจากที่เวลาเริ่มต้น แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 3, 4 และ 6 เดือน และไม่แตกต่างกับปริมาณสารในตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณสารสกัดพริกไทยดำ (วิเคราะห์จากปริมาณ piperine) ในตำรับไมโครอิมัลชัน sample D, E และ F ที่สลายไปไม่แตกต่างกัน



រូបភាព 3.15 Percentage remaining of piperine in sample D, E and F when stored at room temperature for 0, 3, 4 and 6 months.



រូបភាព 3.16 Percentage remaining of piperine in sample D, E and F when stored at 45° C, relative humidity 75% for 0, 3, 4 and 6 months.

บทที่ 4

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

พริกไทยดำและพริกชี้หนูได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมในการป้องกันและกำจัดโรค แมลง ศัตรูพืช เนื่องจากราคาดูก และปลอดภัย ไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม แต่การเตรียมสารสกัดก่อนนำไปใช้ ใช้เวลานาน การเตรียมให้อยู่ในรูปไมโครอิมัลชันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่พร้อมใช้ และมีปริมาณสารออกฤทธิ์ในปริมาณมาก และคงที่ จะทำให้เกษตรกรใช้ได้สะดวกยิ่งขึ้น จากการเตรียมสูตรตำรับไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทยดำ และพริกชี้หนู โดยการสร้างเฟสไลอะแกรมของระบบ Lexol GT[®] 865 (caprylic/capric triglyceride) ซึ่งใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) คือ Tween 80 และ Span 80 พบว่า การเพิ่มค่า HLB สูงขึ้น พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันจะกว้างขึ้น แต่ขณะเดียวกันการเกิดตำรับรูปแบบอื่น กล่าวคือ emulsion-gel และ microemulgel ก็จะกว้างขึ้นเช่นกัน พื้นที่ในการเกิดไมโครอิมัลชันของระบบที่มีค่า HLB 11 และ 12 มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ระบบที่มีค่า HLB 12 จะมีตำรับรูปแบบอื่น เช่น emulsion-gel และ microemulgel กว้างมากกว่า และค่อนข้างใกล้เคียงกับบริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชัน ดังนั้นในที่นี้จึงเลือกระบบที่มีค่า HLB 11 ไปทำการสร้างเฟสไลอะแกรมโดยละเอียด และจากเฟสไลอะแกรมสุ่มเลือกตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง คือ sample A, B และ C มาผสมสารสกัดพริกไทยดำและสารสกัดพริก ซึ่งสามารถผสมได้ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก ความหนืดของไมโครอิมัลชันทั้งที่ไม่ผสมหรือผสมสารสกัดพริกไทยดำ หรือสารสกัดพริก พบว่า ความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความหนืดของไมโครอิมัลชันลดลง เมื่อผสมสารสกัดพริกไทยดำ ขณะที่เมื่อผสมสารสกัดพริก ความหนืดของไมโครอิมัลชันเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับไมโครอิมัลชันที่ไม่ผสมสารสกัด การศึกษาจุดุ่น พบว่าในช่วงอุณหภูมิ 5 - 90 องศาเซลเซียส ไมโครอิมัลชันที่เตรียมขึ้นทั้ง sample A, B และ C มีความคงตัว ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากใสเป็นขุ่น และจากการทดสอบความคงตัวทางกายภาพเบื้องต้นโดยสภาวะอุณหภูมิสลับ (Freeze-thaw) ของไมโครอิมัลชัน Sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำและสารสกัดพริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของตำรับ ดังนั้น จึงนำไมโครอิมัลชันดังกล่าวไปทำการศึกษาความคงตัวที่ อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลา 6 เดือน และพบว่าความหนืดของตำรับเมื่อทดสอบที่สภาวะดังกล่าว ไม่แตกต่างจากที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาเดียวกัน จุดุ่นของไมโครอิมัลชันทั้งที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำหรือสารสกัดพริกไม่อยู่ในช่วง 5 - 90 องศาเซลเซียส แต่ลักษณะทางกายภาพของตำรับไมโครอิมัลชัน sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกพบการตกตะกอนของสารสกัดพริกที่ก้นขวด แต่เมื่อเขย่าจะกลับผสมเข้ากันได้ การทดสอบความคงตัวในระยะ 6 เดือนของไมโครอิมัลชัน sample A, B และ C ที่ผสมสารสกัดพริกไทยดำ และสารสกัดพริกร้อยละ 15 ให้ผลคล้ายกัน กล่าวคือ เมื่อเก็บตำรับไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 ปริมาณสารสำคัญในตำรับลดลงจากที่เวลาเริ่มต้นเล็กน้อย แต่ปริมาณสารไม่แตกต่างกันที่ 3, 4 และ 6 เดือน และไม่แตกต่างกับปริมาณสารในตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง สำหรับระบบที่ใช้สารสกัดเป็นวัตถุดิบน้ำมัน ทำการเตรียม Phase diagram ดังเช่น ระบบ Lexol GT[®] 865/Tween80:Span80 (HLB 11)/Water แต่เปลี่ยนวัตถุดิบน้ำมันจาก Lexol GT[®] 865 เป็นสารสกัดพริกไทยดำ หรือสารสกัดพริก แต่เนื่องจากสารสกัดพริกค่อนข้างข้นหนืด จึงไม่สามารถใช้เป็นวัตถุดิบน้ำมันได้ ส่วนระบบที่

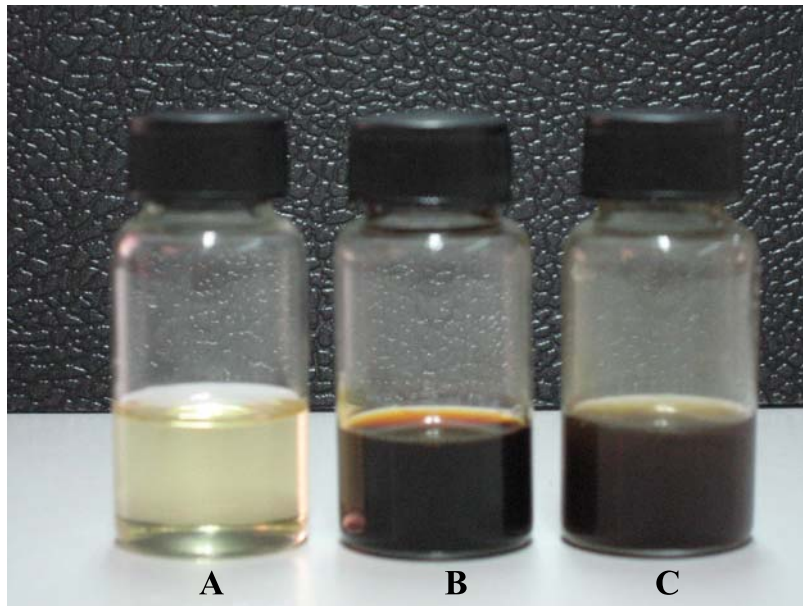
ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมัน ได้เลือกใช้อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่มีค่าเอช แอล บี 11 ตามผลการศึกษาของวิธีที่ 1 และ sample D, E และ F ได้ถูกคัดเลือกเพื่อการศึกษาต่อไปจากการวัดความหนืดของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมันมีความหนืดมากกว่าที่ใช้เล็กซอล จีที 865 และในทำนองเดียวกันกับการศึกษาข้างต้น ความหนืดลดลงเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวในตำรับลดลง การทดสอบหาจุดขุ่น ไม่ตรวจพบค่าจุดขุ่นของไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทยดำเป็นวัตถุน้ำมันที่เตรียมได้ทั้ง sample D, E และ F ในช่วงอุณหภูมิที่ทดสอบ (5 - 90 องศาเซลเซียส) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของทั้ง 3 ตำรับ เมื่อทดสอบโดยสภาวะอุณหภูมิกลับ จึงนำทั้ง 3 ตำรับมาทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน ความหนืดจะลดลงเมื่อเทียบกับความหนืดของตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาเดียวกันให้ผลเช่นเดียวกับการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส จุดขุ่น และลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง ปริมาณสารสำคัญในตำรับลดลงจากที่เวลาเริ่มต้น แต่ไม่เกินร้อยละ 10 และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 3, 4 และ 6 เดือน และไม่แตกต่างกับปริมาณสารในตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารอ้างอิง (References)

- (1) กรมการส่งเสริมการเกษตร (2543) เรื่องการใช้สมุนไพรพื้นบ้านเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร ปีที่ 46 ฉบับที่ 524 กรกฎาคม
- (2) Siddiqui, B.S., Begum, S., Gulzar, T., Noor, F. and Noor F. (1997). "An amide from fruits of *Piper nigrum*." *Phytochemistry* 45(8): 1617-1619.
- (3) Strunz, G.M. and Finlay, H. (1994). "Concise, efficient new synthesis of pipericide, an insecticidal unsaturated amide from *Piper nigrum*, and related compounds." *Tetrahedron* 50(38): 11113-11122.
- (4) ชาตรี. (2546). เกล็ดลับภูมิปัญญาไทย ชุมสมุนไพรเพื่อการเกษตร ป้องกันและกำจัดศัตรูพืช. เกพีเอ็ม มีเดียสยาม, นนทบุรี
- (5) Heinz, R. inventors; San Carlos, assignee. Capsicum based pesticidal and method of use. US patent 6,523,298.2003 Feb 25.
- (6) Eccleston, G. M. (1992). Microemulsions. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. J. Swarbrick and J. Boylan. New York, Marcel Dekker. 5: 375-421.
- (7) Tenjarla, S. (1999). "Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications." *Critical Review Therapeutic Drug Carrier System* 16(5): 461-521.

ภาคผนวก ก

ลักษณะของไมโครอิมัลชัน ไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริก ไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทดำ



รูปที่ ผ1 ภาพแสดงไมโครอิมัลชัน (A) ไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริก (B) ไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทดำ (C)

ลักษณะของไมโครอิมัลชันที่มีส่วนผสมของสารสกัดหลังการเจือจางด้วยน้ำ

ตารางที่ ผ1 ความเข้มข้นของสารสกัดหลังการเจือจางไมโครอิมัลชันของสารสกัดด้วยน้ำโดยวิธีการเจือจางแบบ
เท่าตัว (doubling dilution)

ขวดที่	ความเข้มข้นของสารสกัด (%w/w)
1	7.50000
2	3.75000
3	1.87500
4	0.93750
5	0.46875
6	0.23438
7	0.11719
8	0.05859
9	0.02930
10	0.01465
11	0.00732
12	0.00366
13	0.00183
14	0.00092
15	0.00046
16	0.00023
17	0.00011
18	0.00006
19	0.00003
20	0.00001



รูปที่ ผ2 ภาพแสดงตัวอย่างไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกไทดำเมื่อผสมน้ำในปริมาณต่างๆ



รูปที่ ผ3 ภาพแสดงตัวอย่างไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกเมื่อผสมน้ำในปริมาณต่างๆ



รูปที่ ผ4 ภาพแสดงตัวอย่างไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดพริกไทดำเป็นวัฏภาคน้ำมันเมื่อผสมน้ำในปริมาณต่างๆ

ภาคผนวก ข

ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง

กิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ	กิจกรรมที่ทำจริง	หมายเหตุ
1.เปลี่ยนแปลงชนิดของน้ำมัน หรือชนิดและอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิวร่วม	เปลี่ยนแปลงชนิดของน้ำมันเปลี่ยนแปลงชนิดอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อสารลดแรงตึงผิวร่วม	
2. สร้าง pseudoternary phase diagram เพื่อดูพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชัน	สร้าง pseudoternary phase diagram เพื่อดูพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชัน	
3. เลือกระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมที่สุดมาทำการเตรียมและประเมินดังนี้ ● ลักษณะทางกายภาพด้าน ความขุ่น-ความใส สี และการแยกชั้น ที่ 0, 1 และ 2 สัปดาห์ ● วัดขนาดอนุภาคโดยเทคนิค Dynamic light-scattering ● ความหนืด ● อุณหภูมิที่ทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่น	เลือกระบบไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมที่สุดมาทำการเตรียมและประเมินดังนี้ ● ลักษณะทางกายภาพด้าน ความขุ่น-ความใส สี และการแยกชั้น ● วัดขนาดอนุภาคโดยเทคนิค Dynamic light-scattering ● ความหนืด ● อุณหภูมิที่ทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่น	
4. เลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมขององค์ประกอบต่างๆที่ทำให้เกิดไมโครอิมัลชันจากข้างต้นมาผสมสารสกัดพริกไทยดำและพริกที่ปริมาณต่างๆ	4. เลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมขององค์ประกอบต่างๆที่ทำให้เกิดไมโครอิมัลชันจากข้างต้นมาผสมสารสกัดพริกไทยดำและพริกที่ปริมาณต่างๆ	
5. ประเมินการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น-ความใส สี และการแยกชั้น ความหนืด และอุณหภูมิที่ทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่น	5. ประเมินการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น-ความใส สี และการแยกชั้น ความหนืด และอุณหภูมิที่ทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่น	
6. คัดเลือกสูตรตำรับที่สามารถละลายสารสกัดได้ในปริมาณสูงมาทดสอบความคงตัวโดย freeze-thaw test และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น-ความใส สี และการแยกชั้น ความหนืด และอุณหภูมิที่ทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่นเทียบกับก่อนการทดสอบ	6. คัดเลือกสูตรตำรับที่สามารถละลายสารสกัดได้ในปริมาณสูงมาทดสอบความคงตัวโดย freeze-thaw test และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น-ความใส สี และการแยกชั้น ความหนืด และอุณหภูมิที่ทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่นเทียบกับก่อนการทดสอบ	

กิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ	กิจกรรมที่ทำจริง	หมายเหตุ
7. ทดสอบความคงตัวของตำรับโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน และสุมเก็บตัวอย่างเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของตำรับ และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ 0, 3 และ 6 เดือนตามลำดับ	7. ทดสอบความคงตัวของตำรับโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 เป็นเวลานาน 6 เดือน และสุมเก็บตัวอย่างเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของตำรับ และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ 0, 3, 4 และ 6 เดือนตามลำดับ	

ตาราง Output

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ ท่านระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ / หรือจากการ ปรับเปลี่ยน	ผลสำเร็จ (%)	
1. ได้ดำเนินเบื้องต้นของไมโครอิมัลชัน	100%	-
2. ได้ดำเนินไมโครอิมัลชันของสารสกัด พริกไทยดำที่มีความเข้มข้น	100%	-
3. ได้ดำเนินไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกที่ มีความเข้มข้น	100%	-
4. ได้ดำเนินไมโครอิมัลชันของสารสกัด พริกไทยดำที่มีความเข้มข้นและความคงตัว	100%	-
5. ได้ดำเนินไมโครอิมัลชันของสารสกัดพริกที่ มีความเข้มข้นและความคงตัว	100%	-
6. ได้ดำเนินไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัด พริกไทยดำเป็นวัตถุดิบน้ำมันที่มีความเข้มข้น และความคงตัว	100%	-
7. สรุปผลและเขียนรายงานวิจัย	100%	-
8. อื่นๆ		

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆต่อ สกว.

-

ลงนาม(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่3 มกราคม 2551.....