รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อย 2 การผลิตวัสดุปิดแผลด้วยสารประกอบพอลิฟีนอลจากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล

Fabrication and development of wound dressing comprise of phenolic compounds extracted from by-product of sugar industry

โดย

รองศาสตราจารย์ ธงชัย สุวรรณสิชณน์ และคณะ

ตุลาคม 2558

สัญญาเลขที่ RDG5750030

โครงการ “การผลิตวัสดุปิดแผลด้วยสารประกอบพอลิฟีนอลจากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล”

รายงานฉบับสมบูรณ์

---

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย/โครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การผลิตวัสดุปิดแผลด้วยสารประกอบพอลิฟีนอลจากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล

(ภาษาอังกฤษ) Fabrication and development of wound dressing comprise of phenolic compounds extracted from by-product of sugar industry

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ธงชัย สุวรรณสิชณน์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมายเลขโทรศัพท์ 02-5625014 e-mail fagitcs@.ku.ac.th

ชื่อผู้วิจัย นายจักรพล สุนทรวราภาส

หน่วยงานที่สังกัด หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

หมายเลขโทรศัพท์ 02-9405634 e-mail jackapon.sun@biotec.or.th

ชื่อผู้วิจัย นางสาวกุลฤดี แสงสีทอง

หน่วยงานที่สังกัด หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

หมายเลขโทรศัพท์ 02-9405634 e-mail kunruedee@biotec.or.th

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

งบประมาณที่ได้รับ 1,044,120.00 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ 15 สิงหาคม 2557 ถึง 14 สิงหาคม 2558

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการนี้มีเป้าหมายเพื่อที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ประโยชน์จากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล โดยการนำสารสกัดพอลิฟีนอลจากโครงการย่อยที่ 1 มาใช้ประโยชน์ของคุณสมบัติการเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant property) ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาภายใต้โครงการมีลักษณะเป็นแผ่นเส้นใย (nonwoven fibrous sheet) โดยที่เส้นใยที่มีขนาดน้อยกว่า 1 ไมโครเมตรสานกันอยู่ การที่เส้นใยมีขนาดเล็กนั้นมีข้อดีในเรื่องของปริมาณพื้นที่ผิวที่สูงเหมาะสมกับการใช้งานในการเป็นวัสดุนำส่งสาร (material carrier) เช่น การใช้เป็นวัสดุนำส่งสารออกฤทธิ์เพื่อช่วยในการสมานแผล แต่เนื่องจากแผ่นเส้นใยขาดความแข็งแรง การนำไปใช้ประโยชน์จำเป็นที่จะต้องมีวัสดุมาช่วยเสริมแรง (support structure) เช่นแผ่นไมโครไฟเบอร์หรือแผ่นกาวเพื่อกดทับผลิตภัณฑ์

ภายในโครงการได้ทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยการผสมพอลิเมอร์ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงโมเลกุล (backbone polymer) เนื่องจากสารสกัดพอลิฟีนอลไม่สามารถทนแรงภายใต้กระบวนการปั่นเส้นใยด้วยกระแสไฟฟ้า (electrospinning) ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์สารสกัดพอลิฟีนอลมีความจำเพาะของชนิดตัวทำละลายและปริมาณที่ใช้ซึ่งเป็นข้อจำกัดในกระบวนการการขึ้นรูป อย่างไรก็ตามทางคณะวิจัยประสบความสำเร็จในการหาสภาวะที่เหมาะสมและแนวทางในการพัฒนาทำให้สามารถดำเนินการจดทะเบียนอนุสิทธิบัตรสภาวะการเตรียมสารละลายเพื่อการขึ้นรูปเป็นที่เรียบร้อย

ผลิตภัณฑ์ภายใต้โครงการแสดงความสามารถในการใช้งานเป็นวัสดุนำส่งสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สำเร็จจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DPPH assay ทั้งนี้ปริมาณของสารสกัดพอลิฟีนอลที่ใช้อยู่ในช่วงของร้อยละ 5 ถึงร้อยละ 15 โดยน้ำหนักแผ่นผลิตภัณฑ์ ทางคณะวิจัยคาดว่าหากได้รับการพัฒนาเพิ่มเติมจะสามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารในผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ได้เป็นผลสำเร็จ นอกจากนี้การพัฒนาเพื่อเลือกชนิดของโมเลกุลสารสกัดแสดงให้เห็นถึงศักยภาพเนื่องจากองค์ความรู้ของโครงสร้างโมเลกุลและการนำไปใช้งานของสารสกัดพอลิฟีนอลจากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลเป็นเทคโนโลยีที่มีความใหม่จึงทำให้เกิดโอกาศในการพัฒนาได้อีกมากหากได้รับการสนับสนุน

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์จากสารสกัดในรูปแบบแผ่นเส้นใยโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยกระแสไฟฟ้ามีความจำเพาะทั้งในด้านตัวทำละลายที่เป็นปัจจัยสำคัญเพื่อกระบวนการขึ้นรูปโดยการปั่นเส้นใยโดยกระแสไฟฟ้าและสัดส่วนของวัสดุที่ใช้

ข้อจำกัดของการทำละลายสารสกัดเป็นปัจจัยสำคัญที่จำกัดความสามารถในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์และจำกัดปริมาณที่สามารถใส่สารสกัดลงไปในผลิตภัณฑ์ได้ ผลการพัฒนาสามารถใส่สารสกัดในผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วงร้อยละ 5 ถึงร้อยละ 15 โดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด และผลิตภัณฑ์สามารถปลดปล่อยสารสกัดออกจากผลิตภัณฑ์ประมาณร้อยละ 5 ถึงร้อยละ 10 ของสารสกัดที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามแผ่นผลิตภัณฑ์สามารถปลดปล่อยสารสกัดและแสดงคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำการทดสอบโดย DPPH assay ได้เป็นผลสำเร็จ และไม่มีอันตรายต่อผิวหนังของคนจากการทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังโดย Resazurin Microplate assay (REMA) นอกจากนี้การวิเคราะห์ทางเคมีวิศวกรรมหลายๆกระบวนการถูกนำมาใช้เพื่อประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์และเพื่อเป็นองค์ความรู้สำหรับการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ขั้นต่อไป

สารประกอบพอลิฟีนอลจากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์วัสดุนอกเหนือจากผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการพัฒนาภายใต้โครงการ องค์ความรู้ที่ได้จากการพัฒนาคือ ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการผลิตแผ่นเส้นใยเพื่อใช้งานเป็นวัสดุปิดแผลต่อความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสารประกอบพอลิฟีนอล รวมทั้งองค์ความรู้ในการพัฒนาสูตรการผสมสารประกอบพอลิฟีนอลกับพอลิเมอร์เพื่อใช้ในการขึ้นรูปแผ่นผลิตภัณฑ์

Abstract

Solution blending and optimization are keys component for product development from by-product of sugar industry in a form of fibrous composite by electrospinning process.

Solute-solvent interaction plays major role in fabrication process and significantly influence amount of lignin, extracted polyphenol, from raw material in the final product. Maximum loading of lignin in final product varies in the range of 5 to 15 total weights while only 5 to 10% of active compound loading amount was successfully released and identified. Small portion of released component exhibits antioxidant activity which was confirmed by DPPH assay and shows no evidence of toxicity toward human cells by Resazurin Microplate analysis (REMA). In addition, multiple characterization techniques were adopted to evaluated product properties in order to gain knowledge for further optimization.

Extracted polyphenol from by-product of sugar industry has high potential to be used as active component other than utilization in medical application. Key finding of this project is the relation between material and fabrication to improve product performance especially material releasing mechanism of extracted polyphenol from fibrous composite.

ส่วนที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

(1) เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบในการศึกษาคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างและการทดสอบเชิงชีวเคมีของสารประกอบพอลิฟีนอล (phenolic compounds) จากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล เปรียบเทียบกับพอลิฟีนอลทางการค้า ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์แผ่นเส้นใยขนาดเล็กสำหรับใช้เป็นวัสดุปิดแผล (wound dressing) โดยการจำลองสภาวะการศึกษาเปรียบเทียบกับสภาวะการนำไปใช้งานจริง

(2) เพื่อการพัฒนาองค์ความรู้ด้านวิศวกรรมวัสดุทางการแพทย์ในด้านความสัมพันธ์ของลักษณะผลิตภัณฑ์ต่อความเหมาะสมในการใช้งานเชิงประสิทธิภาพ เพื่อปรับปรุงสัดส่วนของสารสกัดและลักษณะผลิตภัณฑ์ให้เหมาะสมเพื่อให้ส่งผลต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุด

(3) เพื่อต่อยอดองค์ความรู้ในการพัฒนาแผ่นเส้นใยขนาดเล็กจากสารประกอบธรรมชาติ ในรูปแบบแผ่นเส้นใยขนาดเล็กจากกระบวนการการขึ้นรูปโดยการปั่นด้วยกระแสไฟฟ้า

2.2 Gantt Chart เปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง

วัตถุประสงค์	กิจกรรม	ช่วงระยะเวลาตามแผน	ช่วงระยะเวลาที่ทำจริง	ข้อชี้แจง
เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบในการศึกษาคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างและการทดสอบเชิงชีวเคมี ของสารประกอบพอลิฟีนอล (phenolic compounds) จากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล เปรียบเทียบกับพอลิฟีนอลทางการค้า ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์แผ่นเส้นใยขนาดเล็กสำหรับใช้เป็นวัสดุปิดแผล (wound dressing) โดยการจำลองสภาวะการศึกษาเปรียบเทียบกับสภาวะการนำไปใช้งานจริง	การหาจุดสมดุลของการเตรียมสารละลายผสมเพื่อการขึ้นรูป และการปรับสภาวะการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยวัสดุผสมที่เหมาะสมของวัสดุต้นแบบ ระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลทางการค้า	เม.ย. 57-มิ.ย. 57	ส.ค. 57-ต.ค. 57	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
	การทดสอบคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างของสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์	ก.ค. 57-ก.ย. 57	พ.ย. 57-ม.ค. 58	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

2.2 Gantt Chart เปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง (ต่อ)

วัตถุประสงค์	กิจกรรม	ช่วงระยะเวลาตามแผน	ช่วงระยะเวลาที่ทำจริง	ข้อชี้แจง
เพื่อการพัฒนาองค์ความรู้ด้านวิศวกรรมวัสดุทางการแพทย์ ในด้านความสัมพันธ์ของลักษณะผลิตภัณฑ์ต่อความเหมาะสมในการใช้งานเชิงประสิทธิภาพ เพื่อปรับปรุงสัดส่วนของสารสกัดและลักษณะผลิตภัณฑ์ให้เหมาะสม เพื่อให้ส่งผลต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุด	นำสารประกอบพอลิฟีนอลที่สกัดได้จากการสกัดมาทำการขึ้นรูปเป็นแผ่นเส้นใยวัสดุผสม ทดแทนพอลิฟีนอลทางการค้า และศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์	ต.ค. 57-พ.ย. 57	ก.พ. 58-มี.ค. 58	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
	การทดสอบคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างและทางชีวภาพของพอลิฟีนอลที่มีต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ และการทดสอบทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์	ธ.ค. 57-มี.ค. 58	เม.ย. 58-ก.ค. 58	งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

2.3 ตารางเปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และที่ได้จริง

กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
การหาจุดสมดุลของการเตรียมสารละลายผสมเพื่อการขึ้นรูป และการปรับสภาวะการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยวัสดุผสมที่เหมาะสมของวัสดุต้นแบบ ระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลทางการค้า	100 %	-
การทดสอบคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างของสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์	100 %	-
นำสารประกอบพอลิฟีนอลที่สกัดได้จากการสกัดมาทำการขึ้นรูปเป็นแผ่นเส้นใยวัสดุผสม ทดแทนพอลิฟีนอลทางการค้า และศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์	100 %	-
การทดสอบคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างและทางชีวภาพของพอลิฟีนอลที่มีต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ และการทดสอบทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์	100 %	-

การดำเนินงานวิจัยจะประกอบไปด้วยการพัฒนาสี่ช่วง ช่วงที่หนึ่งคือการพัฒนาวัสดุต้นแบบระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลทางการค้า ช่วงที่สองคือการตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมี ช่วงที่สามคือการศึกษาการใช้วัสดุทดแทนกล่าวคือการนำสารประกอบพอลิฟีนอลที่ถูกสกัดจากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลมาทดแทนพอลิฟีนอลทางการค้าที่ได้พัฒนาในระยะที่หนึ่ง และเมื่อได้สัดส่วนและสภาวะการขึ้นรูปที่เหมาะสมแล้ว ช่วงที่สี่จะเป็นการทดสอบเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ผสมพอลิฟีนอลสกัดเปรียบเทียบกับพอลิฟีนอลทางการค้าในด้านประสิทธิภาพการปลดปล่อย และทำการทดสอบเพิ่มเติมสำหรับคุณสมบัติที่ตรวจพบจากโครงการย่อยที่ 1

กิจกรรม	ปี 2557					ปี 2558						
	ส.ค	ก.ย.	ต.ค	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.
การหาจุดสมดุลของการเตรียมสารละลายผสมเพื่อการขึ้นรูป และการปรับสภาวะการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยวัสดุผสมที่เหมาะสมของวัสดุต้นแบบระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลทางการค้า												
การทดสอบคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างของสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์												
นำสารประกอบพอลิฟีนอลที่สกัดได้จากการสกัดมาทำการขึ้นรูปเป็นแผ่นเส้นใยวัสดุผสม ทดแทนพอลิฟีนอลทางการค้า และศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์												
การทดสอบคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างและทางชีวภาพของพอลิฟีนอลที่มีต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ และการทดสอบทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์												
รวบรวมข้อมูลและจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์												

ช่วงที่ 1 การหาจุดสมดุลของการเตรียมสารละลายผสมเพื่อการขึ้นรูป และการปรับสภาวะการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยวัสดุผสมที่เหมาะสมของวัสดุต้นแบบ ระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลทางการค้า

กิจกรรมในส่วนนี้ประกอบด้วย 3 กิจกรรมย่อย คือ การเตรียมสารละลายผสมระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลทางการค้า การปรับขนาดและลักษณะเส้นใยผสม และ การประเมินลักษณะของแผ่นเส้นใย

กิจกรรมย่อยที่ 1 การเตรียมสารละลายผสมระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลทางการค้า จะเริ่มจากการทดสอบความสามารถในการละลายของพอลิฟีนอลทางการค้าที่ตัวทำละลายต่างๆ ตามตารางที่ 1 โดยที่ไม่ได้ใช้ความร้อนช่วยในการละลาย และประเมินความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายที่สามารถจัดเตรียมได้ แผนในการเตรียมสารละลายผสมนั้นจะเริ่มจากการผสมสารละลายพอลิฟีนอลและสารละลายพอลิเมอร์ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก เพื่อให้ได้สารละลายผสมที่มีสัดส่วนพอลิฟีนอลอยู่ที่ร้อยละ 50 แล้วพิจารณาลักษณะของสารละลายผสมว่ามีความเหมาะสมต่อการขึ้นรูปหรือไม่ สารประกอบพอลิฟีนอลทางการค้าจำนวน 4 ชนิดในรูปแบบผงได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบัน Montpellier SupAgro ประเทศฝรั่งเศส

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ภายใต้โครงการ

พอลิฟีนอล	**พอลิเมอร์**
พอลิฟีนอลทางการค้าจำนวน 4 ชนิด Unceria Gambir (GMB) Caesalpinia spinosa (T80) Acacia mearnsii (OP) Prunus avium (CLG)	พอลิเมอร์ที่ใช้ในการทำวิจัยจำนวน 3 ชนิด Polyvinylpyrolidone (PVP) Polyethylene oxide (PEO) Polylactic acid (PLA)
ตัวทำละลายพอลิฟีนอล 7 ชนิด เอทานอล / เมทานอล / น้ำกลั่น / Dimethylsulfoxide (DMSO) / Dichloromethane (DCM) / Acetone / Acetronitrille (Acet)	ตัวทำละลายพอลิเมอร์ 4 ชนิด (ตามความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์) เอทานอล / เมทานอล / Dichloromethane / น้ำกลั่น

ผลการทดลองพบข้อจำกัดในการละลายของพอลิฟีนอลที่มีความจำเพาะทั้งในด้านชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปได้ ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ตามชนิดตัวทำละลายและความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเตรียมได้

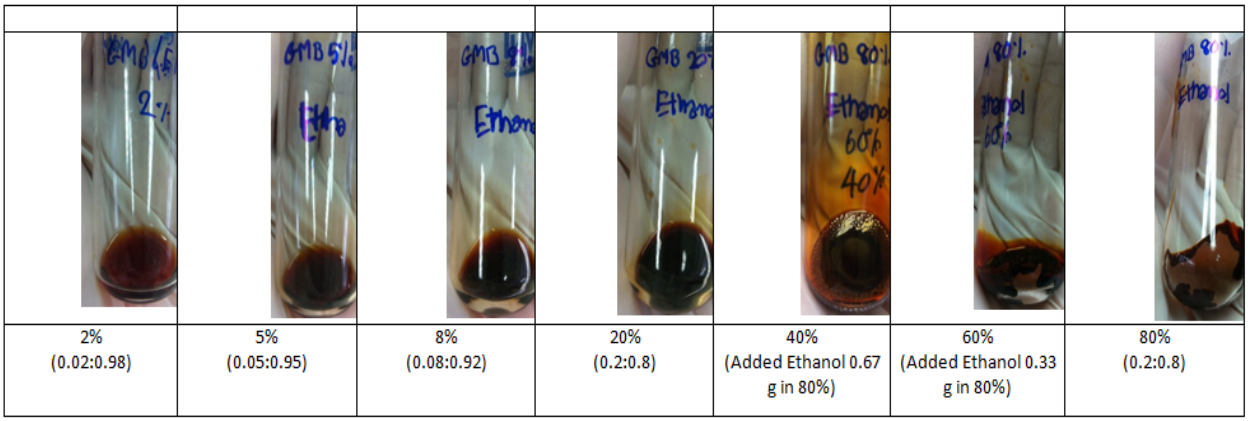
ตารางที่ 2 ความสามารถในการละลายของพอลิฟีนอลทางการค้าในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชื่อย่อ	**ชื่อทางการค้า**	**ความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายที่ตัวทำละลายต่างๆ**						
		เอทานอล (Ethanol)	เมทานอล (Methanol)	น้ำกลั่น (Deionized water, DI)	DMSO	DCM	Acetone	Acet
GMB	Unceria Gambir	40 %wt	20 %wt	40 %wt	40 %wt	ไม่ได้	40 %wt	ไม่ได้
T80	Caesalpinia spinosa	40 %wt	20 %wt	40 %wt	30 %wt	ไม่ได้	40 %wt	ไม่ได้
OP	Acacia mearnsii	ไม่ได้	ไม่ได้	40 %wt	8 %wt	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้
CLG	Prunus avium	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	<2 %wt	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้

หมายเหตุ DMSO: Dimethylsulfoxide, DCM: Dichloromethane, Acet: Acetonitrile

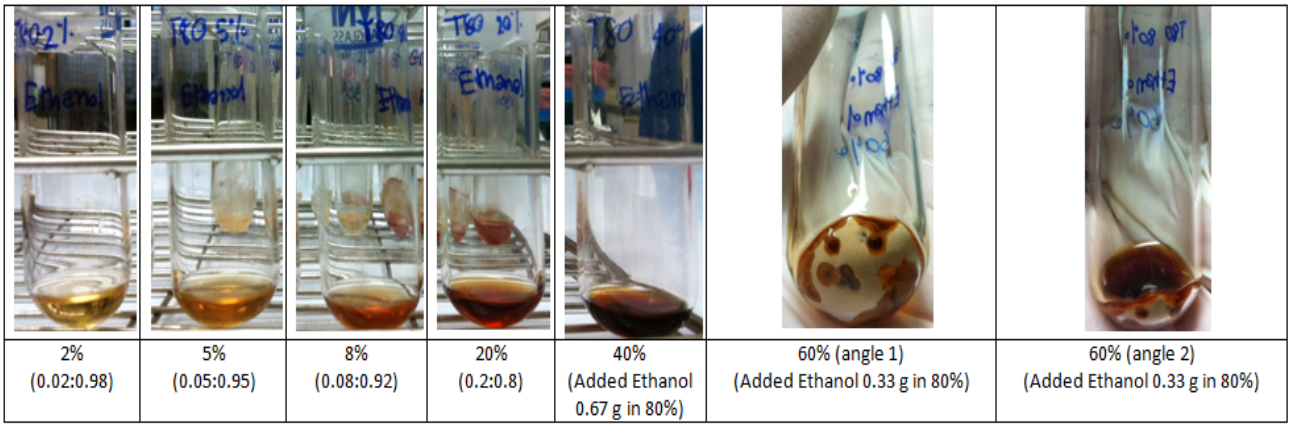
ผลการทดลองให้ข้อสรุปว่าพอลิฟีนอลทางการค้าที่เลือกมาใช้จำนวน 4 ชนิดนั้น มีเพียง 2 ชนิด คือ GMB และ T80 ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการพัฒนาขั้นต่อไป เนื่องจากความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่หลากหลาย ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาการเตรียมสารละลายผสมเพื่อการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยต่อไป

แผนภาพที่ 1 ความสามารถในการละลาย GMB ในเอทานอลที่ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 2 ถึงร้อยละ 60



2% (0.02:0.98)	5% (0.05:0.95)	8% (0.08:0.92)	20% (0.2:0.8)	40% (Added Ethanol 0.67 g in 80%)	60% (Added Ethanol 0.33 g in 80%)	80% (0.2:0.8)

แผนภาพที่ 2 ความสามารถในการละลาย T80 ในเอทานอลที่ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 2 ถึงร้อยละ 60



2% (0.02:0.98)	5% (0.05:0.95)	8% (0.08:0.92)	20% (0.2:0.8)	40% (Added Ethanol 0.67 g in 80%)	60% (angle 1) (Added Ethanol 0.33 g in 80%)	60% (angle 2) (Added Ethanol 0.33 g in 80%)

การทดสอบการผสมสารละลายพอลิฟีนอลและสารละลายพอลิเมอร์ ซึ่งมีการเลือกทำการผสม (1) ที่อัตราส่วนน้ำหนักของสารละลายที่เท่ากัน และ (2) ใช้ความเข้มข้นเดียวกันที่ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก (3) ทำการเปลี่ยนชนิดตัวทำละลายของพอลิฟีนอลและพอลิเมอร์ ทั้งนี้ T80 ถูกใช้เป็นต้นแบบการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื่องจากเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่ทางคณะวิจัยคาดว่ามีความใกล้เคียงกับสารสกัดที่จะได้จากโครงการย่อยที่ 1

ตารางที่ 3 ความสามารถในการผสมสารละลายพอลิฟีนอลและสารละลายพอลิเมอร์ที่ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

	T80/Ethanol	T80/Methanol	T80/DMSO	GMB/DMSO
PVP/Ethanol	ไม่ได้	ไม่ได้	*ผสมได้/ไม่ได้*	ไม่ได้
PVP/Methanol	ไม่ได้	ไม่ได้	*ผสมได้*	*ผสมได้*
PVP/DI	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้

ขั้นตอนต่อไปในการหาช่วงการผสมที่เหมาะสมคือ การเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นของสารละลายพอลิฟีนอลและสารละลายพอลิเมอร์ โดยมีเป้าหมายให้คงอัตราส่วนของพอลิฟีนอลและพอลิเมอร์ที่ร้อยละ 50

ตารางที่ 4 สารละลายผสมระหว่างพอลิฟีนอล และพอลิเมอร์ที่สามารถเตรียมได้

T80/DMSO (%wt)	PVP/Methanol (%wt)							
	2.5		10		15		20	
	Ratio	T80(%)	Ratio	T80(%)	Ratio	T80(%)	Ratio	T80(%)
2.5	1 - 1	50						
10			1 - 1	50	2 - 3	40	1 - 2	33
20							1 - 1	50

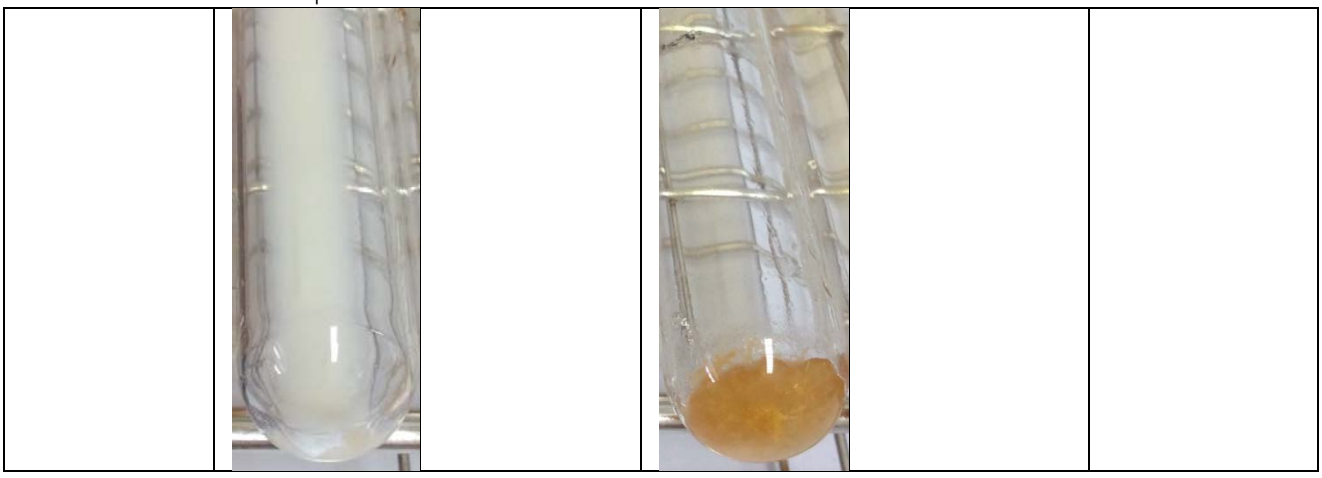
หมายเหตุ Ratio – สัดส่วนการผสมของสารละลายพอลิฟีนอล และสารละลายพอลิเมอร์ โดยน้ำหนัก

T80(%) – สัดส่วนของพอลิฟีนอลในเส้นใยเมื่อนำไปขึ้นรูป

แผนภาพที่ 3 แสดงความสามารถในการละลาย T80 ใน DMSO ร่วมกับ PVP ในเมทานอลที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายในการผสมต่างๆกันแต่คงอัตราส่วนการผสม Ratio ที่ 1:1 และ T80 ที่ 50%

2.5%	10%	20%

แผนภาพที่ 4 แสดงความสามารถในการละลาย T80 ใน DMSO ร่วมกับ PVP ในน้ำกลั่นที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายในการผสมต่างๆกันแต่คงอัตราส่วนการผสม Ratio ที่ 1:1 และ T80 ที่ 50%



ผลการทดลองให้ข้อสรุปว่าปัจจัยของความเข้มข้น สัดส่วนการผสม และชนิดตัวทำละลาย มีผลต่อการเตรียมสารละลายผสม

ข้อสรุปของกิจกรรมย่อยที่ 1 มีดังนี้

1. พอลิฟีนอลทางการค้าที่จะนำมาใช้ในการวิจัยคือ GMB และ T80 เนื่องจากความสามารถในการละลายที่หลากหลาย แต่เนื่องจากคุณสมบัติในการละลายที่คล้ายคลึงกันและ T80 มีโครงสร้างขนาดใหญ่ที่คาดว่าจะมีลักษณะโครงสร้างใกล้เคียงกับสารสกัด ทางคณะวิจัยจึงได้เลือก T80 เพื่อใช้เป็น ตัวแทนในการทดลองขั้นต่อไป
2. ในการเตรียมสารละลายผสม สารละลายพอลิเมอร์ที่เลือกใช้คือ PVP ที่ละลายด้วยเมทานอล ร่วมกับสารละลายพอลิฟีนอล T80 ที่ละลายใน DMSO
3. ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์จะไม่เกินร้อยละ 20 และความเข้มข้นของสารละลายพอลิฟีนอลจะไม่เกินร้อยละ 10
4. พอลิเมอร์ชนิดอื่นๆจะทำการทดลองในกิจกรรมขั้นต่อไป เพื่อลดความซับซ้อนของระบบการวิเคราะห์ ซึ่งในเบื้องต้นพบว่าสามารถเตรียมและขึ้นรูปแผ่นเส้นใยผสมระหว่าง T80 ใน DMSO ร่วมกับ PLA ใน DCM เท่านั้น ขณะที่ PEO ในน้ำไม่สามารถเตรียมสารละลายผสมร่วมกับ T80 ใน DMSO ได้

กิจกรรมย่อยที่ 2 คือการปรับขนาดและลักษณะเส้นใยผสม จากการปรับสัดส่วนของสารละลายผสม และจากสภาวะการขึ้นรูปเส้นใย โดยใช้ชุดเครื่องมือการขึ้นรูปเส้นใยภายในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้การปรับลักษณะเส้นใยจะเน้นไปที่ตัวแปรดังที่แสดงในตารางด้านล่าง

ตารางที่ 5 ช่วงปัจจัยการขึ้นรูปที่ประเมินไว้

ปัจจัย	ช่วงการใช้งาน	ผลต่อลักษณะเส้นใย (โดยคร่าว)
แรงทางไฟฟ้า (V)	10 – 25 กิโลโวลท์	ปริมาณมาก ส่งผลให้ได้เส้นใยที่เล็กลง
ระยะห่างระหว่างหัวฉีดโลหะและตัวรับเส้นใย (H)	15 – 25 เซนติเมตร	ปริมาณมาก ส่งผลให้ได้เส้นใยที่เล็กลง
อัตราการให้สารละลาย (m)	5 – 15 ไมโครลิตรต่อนาที	ปริมาณมาก ส่งผลให้ได้เส้นใยที่ใหญ่ขึ้น
ขนาดหัวฉีด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) (d)	0.5 – 0.7 มิลลิเมตร	ปริมาณมาก ส่งผลให้ได้เส้นใยที่ใหญ่ขึ้น

สภาวะที่ใช้ในการขึ้นรูปเส้นใยสำหรับเส้นใยผสมระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลทางการค้า อยู่ในช่วงการขึ้นรูปที่ประเมินไว้ในข้างต้น ซึ่งประกอบด้วยแรงทางไฟฟ้า 12.5 กิโลโวลท์ ระยะห่างระหว่างหัวฉีดโลหะและตัวรับเส้นใยที่ 20 เซนติเมตร อัตราการให้สารละลาย 5 ไมโครลิตรต่อนาที และขนาดหัวฉีด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) ที่ 0.55 มิลลิเมตร

ตารางที่ 6 ตัวอย่างของสูตรสารละลายผสมและสภาวะในการขึ้นรูป

สูตรการผสม				สภาวะในการขึ้นรูป			
PVP/ Methanol*	T80/ DMSO*	สัดส่วนการผสม**	ร้อยละของ T80	V (kV)	H (cm)	M (µl/min)	d (mm)
15	10	5 / 1.32	15	12.5	20	5	0.55
15	10	5 / 1.90	20	12.5	20	5	0.55
15	10	5 / 2.50	25	12.5	20	5	0.55
15	10	5 / 3.20	30	12.5	20	5	0.55

หมายเหตุ *ความเข้มข้นโดยน้ำหนัก, **น้ำหนักสารละลายพอลิเมอร์ / น้ำหนักสารละลายพอลิฟีนอล

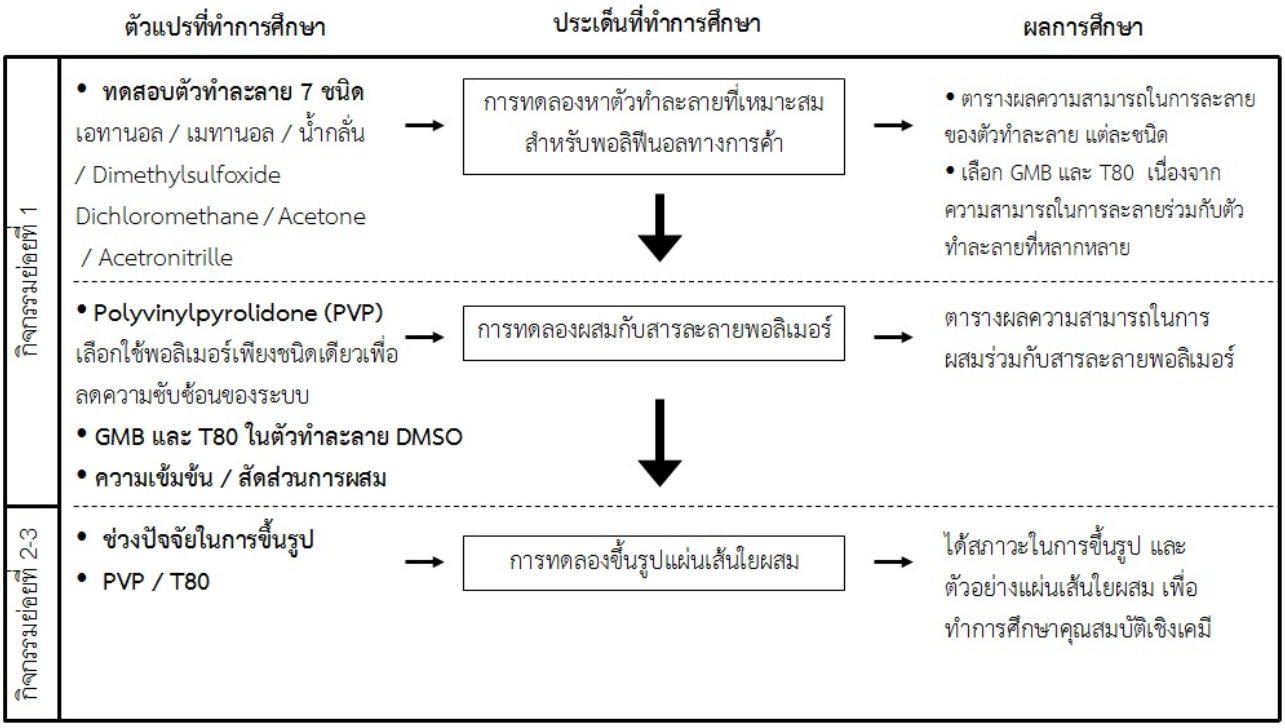
ทั้งนี้ได้มีการทดลองขึ้นรูปเส้นใยที่สภาวะอื่นๆ แต่สภาวะในเบื้องต้นเป็นสภาวะที่สามารถขึ้นรูปเส้นใยได้กับทุกสูตรของสารละลายผสม จึงถูกนำมาใช้เป็นสภาวะหลักในการขึ้นรูปเส้นใย ในขั้นตอนต่อๆไป

กิจกรรมย่อยที่ 3 คือการประเมินลักษณะของแผ่นเส้นใย โดยจะทำการทดสอบเบื้องต้นโดยการพิจารณาความสามารถในการคงตัวของวัสดุโดยการทดลองแยกแผ่นเส้นใยออกจากแผ่นรับเส้นใย และจะใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสงเพื่อประเมินลักษณะของเส้นใยโดยคร่าว ตามด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อประเมินขนาดของเส้นใย

ผลการทดลองพบว่าแผ่นเส้นใยสามารถคงตัวเมื่อทำการแยกออกจากแผ่นรับเส้นใยได้ในทุกสูตรการขึ้นรูป และมีสีขาวถึงแม้ว่าสารละลายผสมที่ใช้จะมีสีน้ำตาลอ่อน ในเบื้องต้นพบว่าเมื่อมีการเก็บตัวอย่างในระยาวยาวจะมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลอ่อนซึ่งคาดว่ามาจากปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นของพอลิฟีนอล แสดงว่ามีสารพอลิฟีนอลอยู่ที่ผิวของเส้นใยแต่ไม่สามารถพิจารณาในเชิงปริมาณได้ ทั้งนี้แผ่นเส้นใยที่ได้จากทุกสูตรมีสีขาวและมีลักษณะเป็นเส้นใยแบบเรียบ จากการประเมินลักษณะเส้นใยเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง พบว่าเส้นใยมีขนาดมากกว่า 1 ไมครอน การประเมินแบบละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน (SEM) จะทำการประเมินร่วมกับตัวอย่างที่ได้จากการผสมพอลิฟีนอลที่สกัดได้จากโครงการที่ 1 ร่วมกับพอลิเมอร์ เพื่อเป็นการบริหารค่าใช้จ่ายในโครงการให้เหมาะสม

แผนภาพที่ 5 แผ่นเส้นใยผสมระหว่าง PVP – T80 ที่มีสัดส่วนของ T80 ในแผ่นเส้นใยทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 15

แผนภาพที่ 6 สรุปกิจกรรม ปัจจัยที่ทำการศึกษาและผลที่ได้ในการทดลองช่วงที่ 1 ของกิจกรรมย่อยที่ 1 ถึง 3



ช่วงที่ 2การทดสอบคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างของสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

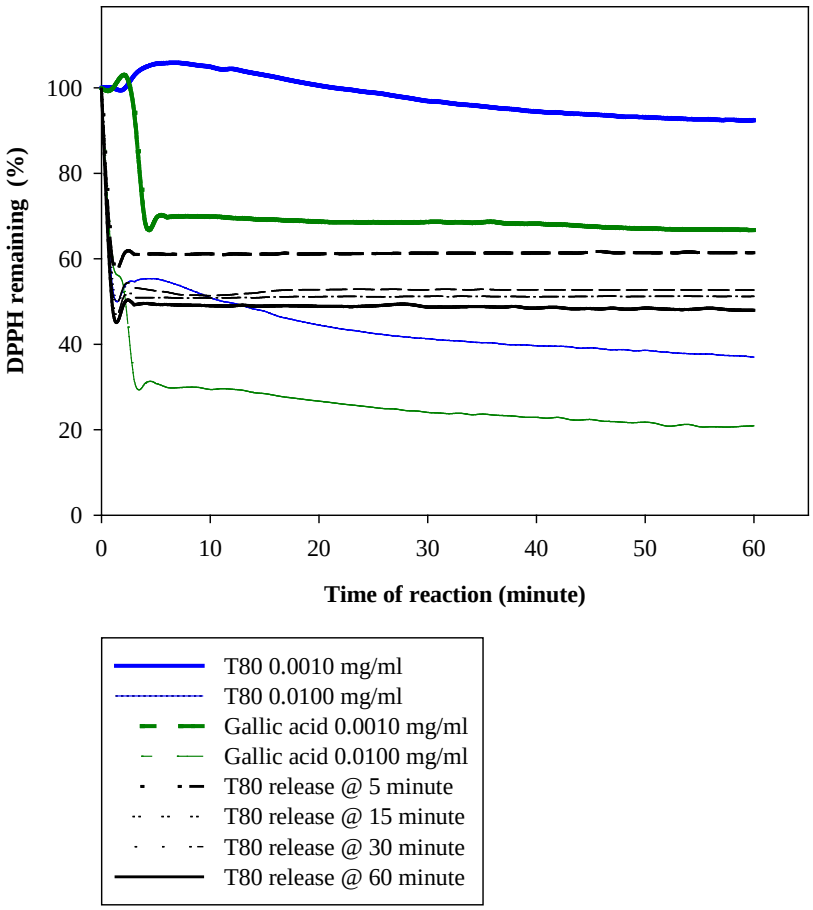
กิจกรรมในส่วนนี้ประกอบด้วย 3 กิจกรรมย่อย คือ การทดสอบประสิทธิภาพของพอลิฟีนอลที่ถูกปล่อยออกมา การประเมินประสิทธิภาพการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ และ การประเมินลักษณะของโครงสร้าง

กิจกรรมย่อยที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของพอลิฟีนอลที่ถูกปล่อยออกมา จากการนำแผ่นเส้นใยแช่ในน้ำกลั่นและเก็บตัวอย่างน้ำที่มีโมกุลพอลิฟีนอลหรือสารละลายดังกล่าวมาศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) โดยวิธี DPPH assay ซึ่งผลการวิเคราะห์จะอธิบายกระทบของการขึ้นรูปต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีของพอลิฟีนอลว่าสามารถคงคุณสมบัติภายหลังจากการขึ้นรูปได้หรือไม่ นอกจากนี้ตัวอย่างสารละลายจะถูกนำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งจะบ่งบอกลักษณะของสารที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากผลิตภัณฑ์ว่ามีลักษณะโมเลกุลเป็นอย่างไร กล่าวคือจากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าพอลิฟีนอลทางการค้าเป็นสารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลหลายขนาดประกอบกัน การศึกษาจึงมีความจำเป็นที่จะต้องประเมินผลของขนาดโมเลกุลและความเสถียรภายใต้สภาวะการใช้งานควบคู่กันไป

การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยดัดแปลงวิธีจาก Fagali and Catala (2008) ในการทดสอบความสามารถในการปลดปล่อยสารพอลิฟีนอล แผ่นเส้นใยผสม PVP มีความแข็งแรงไม่เพียงพอต่อสภาวะที่ใช้ในการศึกษา จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเปลี่ยนชนิดของพอลิเมอร์ เพื่อให้ได้แผ่นเส้นใยที่มีความแข็งแรงเหมาะสมต่อการพัฒนา พอลิเมอร์จึงเปลี่ยนมาใช้พอลิแล็กติกแอซิด (PLA) นอกจากนี้ในการศึกษาได้ใช้กรดแกลลิค (Gallic acid) เป็นตัวเปรียบเทียบร่วมกับ T80 เนื่องจากกรดแกลลิคเป็นโมเลกุลพื้นฐานของ T80 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเริ่มจากการเตรียมแผ่นเส้นใยระหว่าง PLA – T80 ที่สัดส่วนผสมร้อยละ 20 โดยแผ่นเส้นใยมีน้ำหนักประมาณ 5 มิลลิกรัมนำไปแช่ในน้ำขนาด 250 ไมโครลิตรและทำการเขย่า หลังจากนั้นจะทำการเก็บสารละลาย supernatant ในช่วงระยะเวลาที่แผ่นเส้นใยอยู่ในน้ำตั้งแต่ 5, 15, 30 และ 60 นาที เพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของพอลิฟีนอลที่ถูกปล่อยออกมา เมื่อได้ตัวอย่างที่มีพอลิฟีนอลที่ถูกปล่อยจากช่วงระยะเวลาต่างๆกันแล้ว สารละลาย

supernatant ปริมาณ 20 ไมโครลิตรจะถูกผสมกับ DMSO 80 ไมโครลิตร และผสมกับสารละลาย DPPH ใน DMSO ที่ 100 ไมโครลิตร โมเลกุล DPPH จะทำปฏิกิริยาร่วมกับพอลิฟีนอลทำให้เกิดการเปลี่ยนสีในหลอดสารละลายซึ่งจะทำการวัดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ผลการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจะถูกบันทึกทุกๆ 1 นาที เพื่อศึกษากลไกความสามารถในการดูดซับโมเลกุล DPPH ที่ใช้เป็นตัวแทนของอนุมูลอิสระ ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 7

แผนภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของพอลิฟีนอลทางการค้าที่ปล่อยออกมาจากแผ่นเส้นใยผสมระหว่างพอลิแล็กติกแอซิดและ T80



ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของพอลิฟีนอลที่ปล่อยออกมาจากแผ่นเส้นใยมีค่าความสามารถอยู่ภายในชุดควบคุม กล่าวคือประสิทธิภาพของพอลิฟีนอลที่ใส่ในเส้นใยมีความสามารถระหว่างพอลิฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.0010 – 0.0100 มิลลิกรัมต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร ถ้าใช้สารเปรียบเทียบปริมาณ 100 ไมโครลิตรจะคิดเป็นสารเปรียบเทียบเป็น 0.0001 และ 0.001 มิลลิกรัมตามลำดับ และหากเปรียบเทียบเป็นปริมาณ T80 ที่มีอยู่ในแผ่นเส้นใยทั้งหมดจะคำนวณได้จาก แผ่นเส้นใย 5 มิลลิกรัม มีพอลิฟีนอลในสัดส่วนร้อยละ 20 คิดเป็นน้ำหนัก 1 มิลลิกรัม ภายใต้สมมุติฐานที่สารพอลิฟีนอลออกจากเส้นใยทั้งหมด ปริมาณดังกล่าวถูกละลายในน้ำปริมาณ 250 ไมโครลิตร และถูกดึงมาใช้เพียง 20 ไมโครลิตร ดังนั้นปริมาณพอลิฟีนอลที่นำมาใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านทานอนุมูลอิสระจึงมีเพียง 0.0800 มิลลิกรัม

ประสิทธิภาพของพอลิฟีนอลที่หลุดออกมาจากเส้นใยเมื่อเวลาการปลดปล่อย 1 ชั่วโมงมีค่าความสามารถอยู่ภายในช่วง 0.0010 – 0.0100 มิลลิกรัม หรือปริมาณ 0.0082 มิลลิกรัม จากปริมาณดังกล่าวสามารถตีความได้ว่าสารที่หลุดออกมาจากแผ่นเส้นใยคิดเป็นเพียงร้อยละ 10 ของน้ำหนักสารที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ และมีสารที่ตกค้างอยู่ในแผ่นเส้นใยโดยที่ไม่ได้ออกมาเป็นปริมาณร้อยละ 90

การศึกษาองค์ประกอบของสารที่ปลดปล่อยจากแผ่นเส้นใย เริ่มโดยการชั่งน้ำหนักเส้นใยนาโน T80/PLA หนักประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ลงใน eppendorf จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5, 15, 30 และ 60 นาที จากนั้นดูดส่วนใสจากแต่ละตัวอย่าง และปั่นเหวี่ยงส่วนใส่ด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 14,000 rpm, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงแยกทำการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยเทคนิค UPLC-MS โดยมีสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ Liquid chromatography system, an Acquity UPLC (Waters, Milford, MA) equipped with a photodiode array detector and column (HSS T3 100 x 2.1mm, 1.8mm) Nucleosil 120-3 C18 endcapped (Macherey-Nagel, Sweden) ปริมาณสารในการวิเคราะห์อยู่ที่ 2 ไมโครลิตรโดยมีอัตราการฉีดสารอยู่ที่ 0.55 มิลลิลิตรต่อนาที สารคัดเลือกมีสภาวะดังนี้ solvent A (H_2O/HCOOH, 99/1, v/v), solvent B (CH_3CN/H_2O/HCOOH, 80/19/1, v/v/v); initial 0.1% B; 0-5 นาที, 60% B linear; 5-7 นาที, 99% B linear; 7-8 นาที 99% B isocratic and 8-9 นาที, 0,1% B linear และมี DAD 280 nm (λ_{max} of phenolic compounds) ระบบวิเคราะห์เชื่อมต่อด้วย amaZon X ESI Trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) nebulizer pressure ที่ถูกตั้งไว้ที่ 44 psi อุณหภูมิก๊าซแห้งอยู่ที่ 200 องศาเซลเซียส ที่อัตราไหล 12 ลิตรต่อนาที ค่า capillary voltage ตั้งไว้ที่ 4 kV ตามรายงานการศึกษาโดย C. Aouf *et al*., 2014

จากผลวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสาร T80 ที่ปลดปล่อยจากเส้นใย PLA/T80 โดยเทคนิค HPLC-MS ทั้งใน positive mode และ negative mode แสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่าง T80 เป็น polyphenols โมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเป็นองค์ประกอบคือ Quinic acid (Q) (m/z 192) เชื่อมต่ออยู่กับ Galloyl moiety (G) (m/z 153) ซึ่งสารโมเลกุลใหญ่ที่ทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ galloylquinic acids (Q-G, m/z 345), digalloylquinic acids (Q-2G, m/z 497), trigalloylquinic acids (Q-3G, m/z 649), tetragalloylquinic acids (Q-4G, m/z 801), และ pentagalloylquininc acids (Q-5G, m/z 953) การวิเคราะห์จะกระทำโดยพิจารณาจากค่า % Relative peak area ซึ่งได้จากการพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟของ retention time ในสภาวะ negative mode เนื่องจากสามารถให้ค่าที่มีความละเอียดสูงกว่าระบบ positive mode ในการวิเคราะห์สาร T80 ตามตารางที่ 7

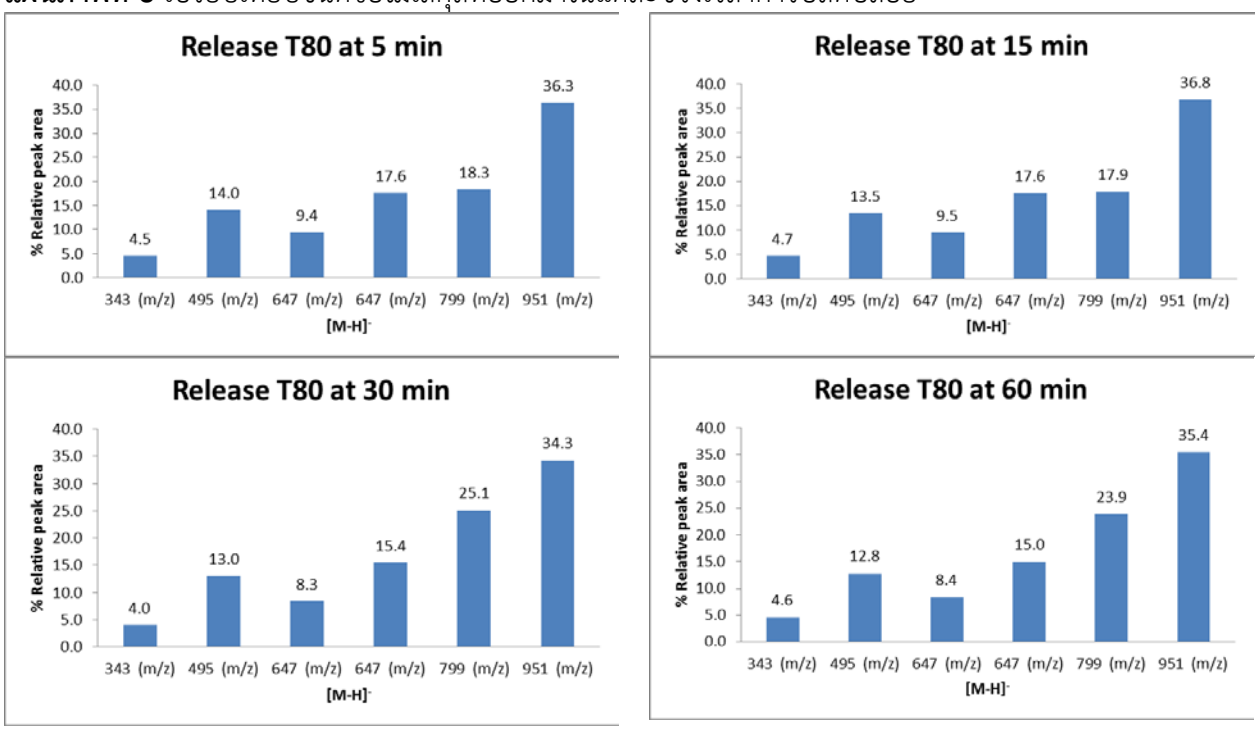
ตารางที่ 7 Retention time และพื้นที่ใต้กราฟของ Release T80 (negative mode)

$[M-H]^-$	T80	5 นาที		15 นาที		30 นาที		60 นาที	
(m/z)	RT (นาที)	RT (นาที)	Peak area	RT (นาที)	Peak area	RT (นาที)	Peak area	RT (นาที)	Peak area
343	9.57	9.55	41108800	9.55	43860960	9.70	44532072	9.53	49994368
495	14.51	14.50	128031352	14.50	126781288	14.65	143956768	14.44	125595104
647	17.62	17.62	86165168	17.60	88613000	17.66	91672320	17.55	85927512
799	21.30	21.14	167208912	21.13	167886080	21.09	278277760	21.04	158065264
951	25.43	25.33	331871744	25.29	344940064	25.36	380219520	25.24	323129024

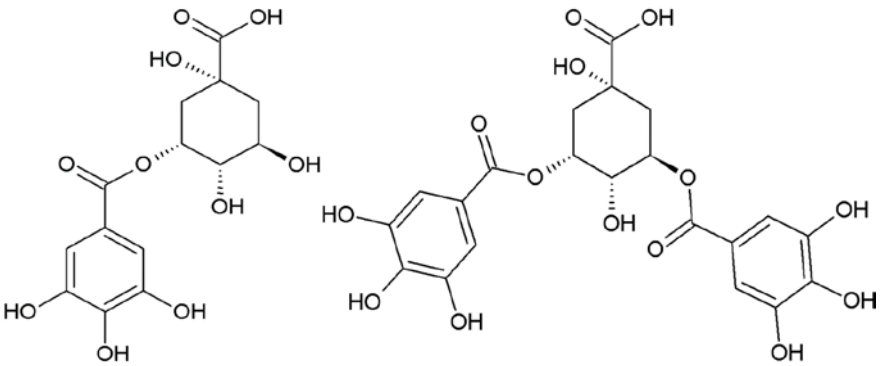
การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่ปล่อยออกมากระทำโดยการพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟของช่วงเวลาที่สอดคล้องกับเวลาของโมเลกุลเปรียบเทียบ แผนภาพที่ 8 แสดงค่า %relative peak area ซึ่งได้มาจากการรวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดในแต่ละช่วงการปลดปล่อยของสาร และทำการเปรียบเทียบภายในช่วงการปลดปล่อยว่าสาร

โครงสร้างอะไรมีค่าสูงสุด ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์ได้ว่าในแต่ละช่วงเวลาการปลดปล่อยสารนั้นมีสารอะไรออกมามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบผล HPLC ประกอบกับผลการทดลอง DPPH ที่แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการลดอนุมูลอิสระไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือกล่าวคือสารที่ทำให้เกิดการต่อต้านอนุมูลอิสระคือกลุ่มสารที่ถูกปลดปล่อยออกจากเส้นใยในช่วง 5 ถึง 15 นาทีแรกนั้น จะพบว่าโมเลกุลของสารที่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงหลังจาก 15 นาทีไปแล้วจะไม่ใช่สารที่ควบคุมความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ trigalloylquinic acids และ tetragalloylquinic acids เพราะการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารกลุ่มดังกล่าวไม่มีผลต่อความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ปริมาณของ pentagalloylquininc acids ที่มีค่ามากในทุกช่วงเวลาไม่ส่งผลให้เกิดการจับอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นสามารถตีความได้ถึงความไม่สอดคล้องระหว่างสารดังกล่าวและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ค่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ณ เวลาที่ 60 นาทีมีความใกล้เคียงกับความสามารถของกรดแกลลิคซึ่งเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กจึงสามารถสรุปได้ว่าสารที่ปล่อยออกมาและส่งผลต่อความสามารถในการจับอนุมูลอิสระคือสารในกลุ่ม galloylquinic acids และ digalloylquinic acids หรือสารประกอบโมเลกุลขนาดเล็กมากกว่าขนาดใหญ่ที่หลุดออกมาจากแผ่นเส้นใยและมีผลต่อการจับอนุมูลอิสระ

แผนภาพที่ 8 เปรียบเทียบชนิดขอโมเลกุลที่ออกมาในแต่ละช่วงเวลาการปลดปล่อย

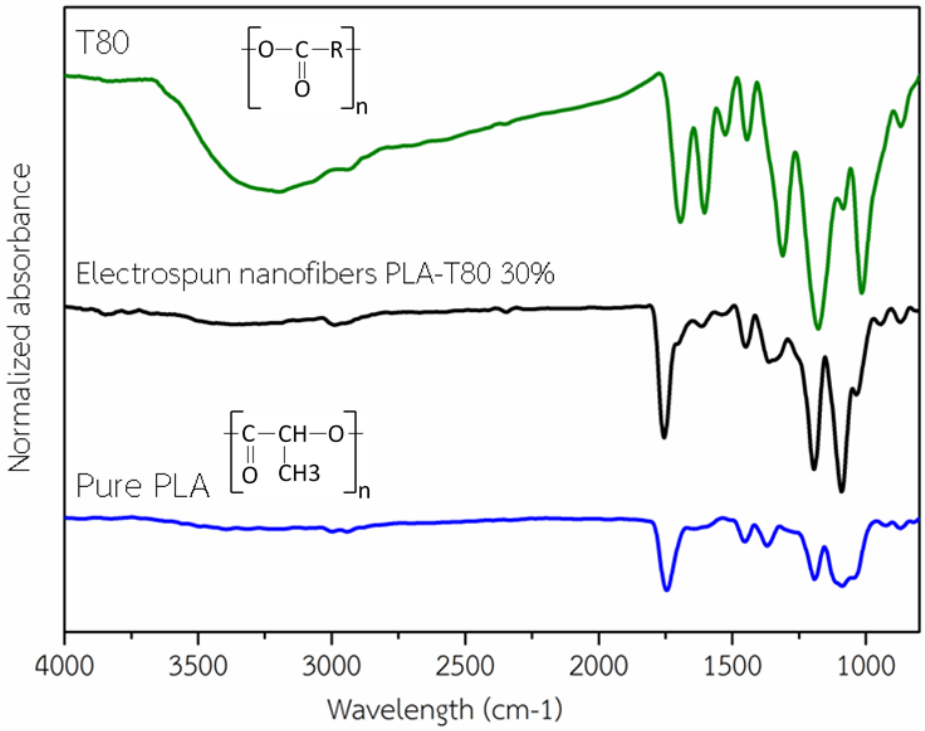


แผนภาพที่ 9 โครงสร้างโมเลกุลของ galloylquinic acids (ทางซ้าย) และ digalloylquinic acids (ทางขวา)



กิจกรรมย่อยที่ 2 การประเมินประสิทธิภาพการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ ประเมินโดยการพิจารณาลักษณะการสร้างพันธะระหว่างโมเลกุลของพอลิฟีนอลและโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยการใช้ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ข้อมูลนี้จะถูกใช้พิจารณาควบคู่กับการศึกษาเคมีโครงสร้างของพอลิฟีนอลเพื่อใช้ในการประเมินความสามารถในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่สามารถควบคุมกลไกการปลดปล่อยสารภายใต้การควบคุมทางกายภาพและทางชีวเคมี

แผนภาพที่ 10 FTIR spectrum ของพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลภายในแผ่นเส้นใย



ผลการวิเคราะห์ไม่พบว่ามีหมู่ฟังก์ชั่นใหม่หรือที่หายไปจากการวิเคราะห์แผ่นเส้นใยผสม

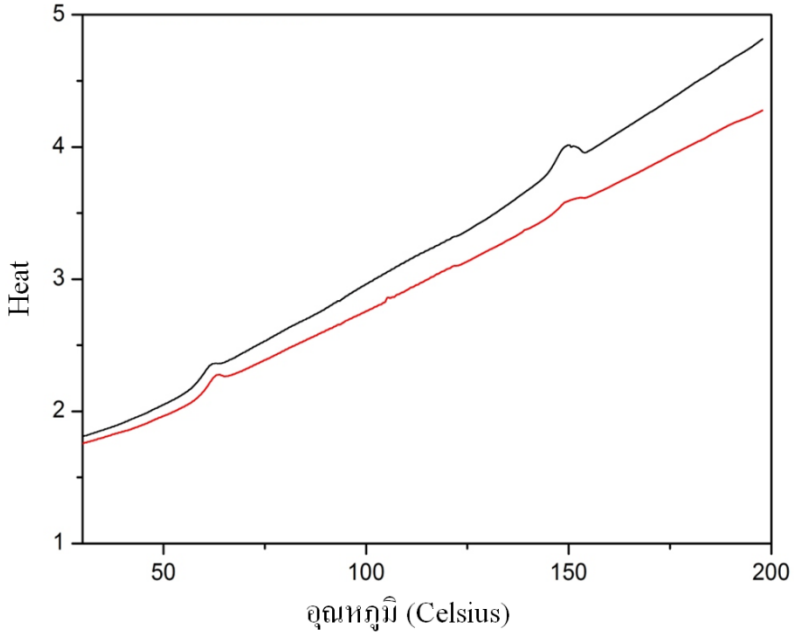
ตารางที่ 8 รายละเอียดของแต่ละ Wavenumbers

Wave number (cm^{-1})	**รายละเอียด**
1,750	พอลิแล็กติกแอซิด -- carbonyl group saturated aliphatic ester
1,730	T80 - carbonyl group unsaturated ester
3,000 – 3,500	T80 -- hydroxyl group

นอกจากนี้ Differential scanning calorimeter (DSC) ถูกนำมาใช้เพื่อยืนยันความสามารถในการผสมกันระหว่างวัสดุ โดยการนำแผ่นเส้นใยปริมาณ 1.5 – 2 มิลลิกรัมมาให้ความร้อนภายใต้ก๊าซไนโตรเจน ที่อัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 5 ถึง 200 องศาเซลเซียส ข้อมูลจะถูกใช้ในการหาค่า glass transition หลังจากทำการให้ความร้อนในครั้งที่สองเพื่อลด impurity ในผลิตภัณฑ์ซึ่งจะส่งผลต่อค่าการวิเคราะห์ นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์จะประเมินจากค่าผกผันของการเปลี่ยนแปลงค่าความร้อนหรือ heat flux แผนภาพที่ 9 แสดงให้เห็นว่าค่า glass transition แยกออกจากกันอย่างชัดเจนซึ่งยืนยันว่าวัสดุสองชนิดไม่ได้รวมตัวกันทางเคมีเพียงแค่เกาะติดกันเท่านั้น

การลดลงของค่า glass transition สำหรับพอลิฟีนอลมีสาเหตุมาจาก molecular chain scission ทำให้เกิดการลดขนาดโมเลกุลและส่งผลต่อค่า glass transition ในประเด็นนี้จำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมแต่ข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณพอลิฟีนอลที่ออกมามีไม่เพียงพอที่จะประเมินได้ ทางคณะวิจัยจึงเล็งเห็นว่าให้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โดยรวมแทนการวิเคราะห์เชิงลึก เพื่อให้เหมาะสมกับระยะเวลาการดำเนินงานวิจัย

แผนภาพที่ 11 Thermogram ของแผ่นเส้นใยผสม PLA และ T80 ที่สัดส่วนผสมร้อยละ 30



ตารางที่ 9 แสดงค่า glass transition ของวัสดุแต่ละชนิดในแผ่นเส้นใยผสม

วัสดุ	Glass transition temperature (องศาเซลเซียส)
PLA pure	55.76 ± 0.21
PLA ในแผ่นเส้นใยผสมที่สัดส่วนพอลิฟีนอลร้อยละ 20	55.52 ± 0.72
PLA ในแผ่นเส้นใยผสมที่สัดส่วนพอลิฟีนอลร้อยละ 30	56.52 ± 0.48
T80 pure	167.76 ± 2.27
T80 ในแผ่นเส้นใยผสมที่สัดส่วนพอลิฟีนอลร้อยละ 20	142.02 ± 0.76
T80 ในแผ่นเส้นใยผสมที่สัดส่วนพอลิฟีนอลร้อยละ 30	142.31 ± 0.94

ช่วงที่ 3 นำสารประกอบพอลิฟีนอลที่สกัดได้จากการสกัดมาทำการขึ้นรูปเป็นแผ่นเส้นใยวัสดุผสม ทดแทนพอลิฟีนอลทางการค้า และศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์

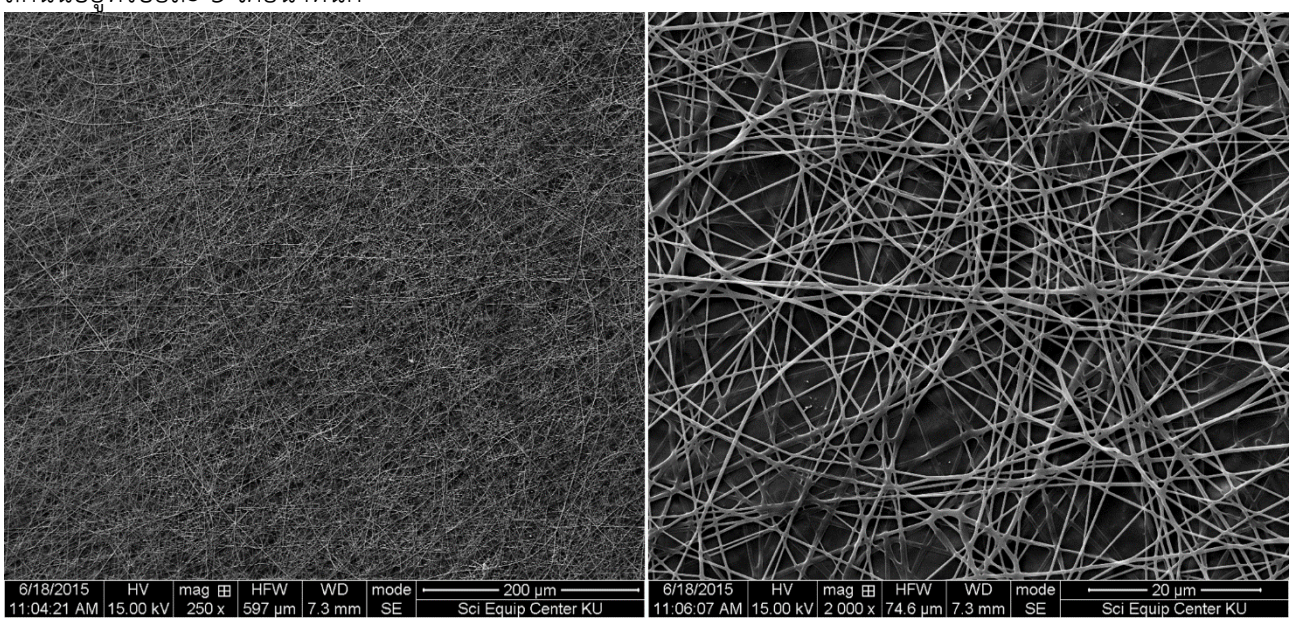
กิจกรรมในส่วนนี้จะนำพอลิฟีนอลที่สกัดได้ภายใต้โครงการย่อยที่ 1 มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ โดยการเลือกใช้พอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวเท่านั้นซึ่งจะพิจารณาจากผลการทดลองของกิจกรรมในช่วงแรก และทำการประเมินผลิตภัณฑ์ในลักษณะเดียวกันกับกิจกรรมเบื้องต้น

ผลการทดลองพบว่าสามารถขึ้นรูปเส้นใยผสมระหว่างพอลิเมอร์ร่วมกับลิกนินที่เป็นสารในกลุ่มพอลิฟีนอลจากการสกัดสารภายใต้โครงการย่อยที่ 1 โดยการทำละลายในตัวทำละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และผสมกับสารละลาย PLA ในตัวทำละลายไดคลอโรอีเทน (DCE: Dichloroethane) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และทำการใส่ตัวทำละลาย DMSO เพิ่มเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขึ้นรูปเส้นใย

ผลการทดลองที่สำคัญที่ค้นพบมีดังต่อไปนี้

- เนื่องจากตัวทำละลาย DCE ระเหยเร็วเกินกว่าที่กระบวนการการขึ้นรูปเส้นใยจะเกิดได้อย่างสมบูรณ์ การใส่ DMSO ที่มีความสามารถในการระเหยต่ำจะช่วยชะลอการระเหยของ DCE ในระหว่างการขึ้นรูปและส่งผลให้ได้เส้นใยที่มีลักษณะเป็นเส้นกลมตามที่เป้าหมายการพัฒนา
- สารสกัดลิกนินที่ได้จากโครงการย่อยที่ 1 ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายได้อย่างสมบูรณ์ การขึ้นรูปเส้นใยจึงเป็นการขึ้นรูปในลักษณะสารแขวนลอย (Suspension mixed solution) ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวทำให้ไม่สามารถขึ้นรูปแผ่นเส้นใยที่มีสัดส่วนของสารสกัดลิกนินในปริมาณเทียบเท่ากับพอลิฟีนอลทางการค้าได้
- ด้วยข้อจำกัดในการละลายแผ่นเส้นใยผสมจึงมีสัดส่วนของสารสกัดลิกนินอยู่ในช่วงร้อย 5 ถึง 15 โดยน้ำหนักผลิตภัณฑ์
- ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ที่ร้อยละ 10 ความเข้มข้นของสารละลายลิกนินที่เหมาะสมอยู่ที่ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และการใส่ตัวทำละลาย DMSO เพื่อเพิ่มความสามารถในการขึ้นรูปเส้นใยโดยมีหลักการว่า ความเข้มข้นของแข็งโดยรวมต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 5 ถึง 6
- สภาวะการขึ้นรูปเส้นใยมีความใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้พอลิฟีนอลทางการค้า และผลของการเปลี่ยนสภาวะการขึ้นรูปไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนต่อลักษณะและขนาดของเส้นใยที่ได้จากกระบวนการ

แผนภาพที่ 12 ลักษณะเส้นใยที่ได้จากการขึ้นรูปสารสกัดลิกนินผสมกับพอลิเมอร์ แผ่นเส้นใยมีสัดส่วนของสารสกัดลิกนินอยู่ที่ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก



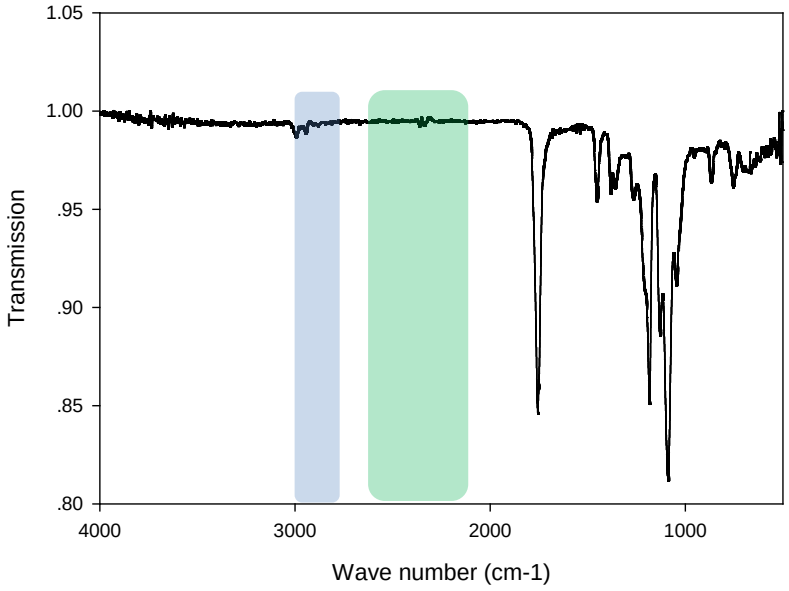
ช่วงที่ 4 การทดสอบคุณสมบัติเชิงเคมีโครงสร้างและทางชีวภาพของพอลิฟีนอลที่มีต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ และการทดสอบทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์

กิจกรรมในส่วนนี้จะเป็นการนำผลิตภัณฑ์แผ่นเส้นใยระหว่างพอลิเมอร์และพอลิฟีนอลที่สกัดภายใต้โครงการไปทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay และเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (Cytotoxicity test)

การวิเคราะห์ลักษณะเคมีโครงสร้าง

ผลการวิเคราะห์เชิงโครงสร้างด้วย FTIR พบว่าไม่มีการสร้างพันธะร่วมระหว่างพอลิเมอร์และสารสกัดลิกนิน และ peak signature ของสารทั้งสองชนิดที่ได้ข้อมูลจากโครงการย่อยที่ 1 นั้นปรากฏอย่างชัดเจนในแผ่นเส้นใยผสม ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 13 จึงไม่มีความจำเป็นในการวิเคราะห์ด้วย DSC เพื่อยืนยันการรวมตัวของสารทั้งสองชนิด

แผนภาพที่ 13 FTIR spectrum ของแผ่นเส้นใยผสมระหว่างพอลิเมอร์พอลิแล็กติกแอซิดและสารสกัดที่ได้จากโครงการย่อยที่ 1 แถบสีฟ้าคือ signature peak ของพอลิแล็กติกแอซิด แถบสีเขียวคือ signature peak ของสารสกัด



ตารางที่ 10 รายละเอียดของแต่ละ Wavenumbers

Wavenumbers (cm^{-1})	รายละเอียด
1,750	พอลิแล็กดติกแอซิด -- carbonyl group saturated aliphatic ester
1,261	ลิกนิน -- Guaiacyl ring breathing with C=O stretching
1595, 1512, 1462	ลิกนิน – aromatic structure

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์

เนื่องด้วยปริมาณการใช้สารสกัดลิกนินที่ต่ำเมื่อเทียบกับน้ำหนักของพอลิเมอร์ การทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สามารถทดสอบโดยเทคนิค Resazurin Microplate assay (REMA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทดสอบความเป็นพิษของสารใดๆโดยตรงต่อเซลล์ที่เลือกเปรียบเทียบและเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่มีสารที่ต้องการทดสอบในปริมาณที่ไม่สูงมากเมื่อเทียบกับการทดสอบความเป็นพิษโดยเทคนิค MTT assay ที่เหมาะสมเมื่อผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้สารที่ต้องการทดสอบในปริมาณมาก ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดลิกนินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (human dermal fibroblast, neonatal: HDFn)

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลิกนินด้วยกระบวนการสกัดด้วยด่าง

ความเข้มข้น (µg/ml)	อัตราการอยู่รอดของเซลล์
100.00	71.90±2.11
50.00	86.43±7.47
25.00	90.93±7.64
12.50	87.67±9.83
6.25	90.77±8.01
3.13	98.35±5.59

หมายเหตุ ค่า IC_{50} เปรียบเทียบของเซลล์คือ 4.00±0.81

ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลิกนินไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกายเนื่องจากอัตราการอยู่รอดของเซลล์มีค่ามากกว่าค่า IC_{50} โดยระดับของสารสกัดในผลิตภัณฑ์สูงที่สุดไม่ควรเกินปริมาณ 100 ไมโครกรัมหรือ 0.1 มิลลิกรัม ทั้งนี้ค่าดังกล่าวเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถทำละลายเพื่อการวิเคราะห์ได้ซึ่งอาจจะไม่สอดคล้องกับความสามารถที่แท้จริงของสารสกัด กล่าวคือสารสกัดอาจจะมีความสามารถที่จะไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ผิวหนังได้สูงกว่า 100 ไมโครกรัมได้

เนื่องจากโครงสร้างของสารสกัดมีขนาดใหญ่จึงทำให้ไม่สามารถพิจารณาชนิดของสารที่ถูกปลดปล่อยออกจากผลิตภัณฑ์โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ ดังนั้นทางคณะวิจัยจึงได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ด้วยกระบวนการ DPPH assay เพื่อพิจารณาลักษณะของสารที่ถูกปลดปล่อยเปรียบเทียบกับสารโมเลกุลเล็กแทน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของแผ่นเส้นใยที่มาจากสารสกัดจากโครงการย่อยที่ 1 มีลักษณะคล้ายกับความสามารถของพอลิฟีนอลทางการค้า T80 กล่าวคือสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุล DPPH ได้ภายในเวลาไม่เกิน 10 นาที ทางโครงการได้ทำการพัฒนาระบบเพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของการนำแผ่นเส้นใยไปใช้งาน กล่าวคือการนำแผ่นผลิตภัณฑ์ไปใช้งานในสภาวะต่างๆกันสามสภาวะ 1. น้ำกลั่น 2. 0.85% โซเดียมคลอไรด์ 3. 70% เอทานอล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผลการทดลองตามที่แสดงในตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่า แผ่นผลิตภัณฑ์สามารถปลดปล่อยสารสกัดออกมาได้แต่เนื่องจากปริมาณของสารสกัดในแผ่นผลิตภัณฑ์คิดเป็นร้อยละ 5 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระจึงมีไม่มาก

ตารางที่ 12 %DPPH remaining ที่นาทีที่ 60 ของแผ่นเส้นใยผสมสารสกัดที่สภาวะการใช้งานต่างๆกัน

สภาวะการใช้งาน	ชุดควบคุมไม่มีแผ่นเส้นใย	มีแผ่นเส้นใย	สัดส่วนการลดลงของ %DPPH
ปลดปล่อยในน้ำกลั่น	89.21 ± 3.29	73.66 ± 4.92	17.43
ปลดปล่อยในน้ำเกลือผสม	82.76 ± 0.64	71.43 ± 0.82	13.69
ปลดปล่อยในแอลกอฮอล์ผสม	97.04 ± 1.03	87.89 ± 2.14	9.43

หมายเหตุ Gallic acid 0.0100 mg/ml – 24.18 ± 2.48 %DPPH remaining
Gallic acid 0.0010 mg/ml – 63.92 ± 3.95 %DPPH remaining

ผลการทดลอง DPPH assay ทำให้ได้ข้อสรุป 2 อย่างคือ

1. แผ่นเส้นใย 5 มิลลิกรัม มีสารสกัดในสัดส่วนร้อยละ 5 คิดเป็นน้ำหนัก 0.25 มิลลิกรัม ภายใต้สมมุติฐานที่สารพอลิฟีนอลออกจากเส้นใยทั้งหมด ปริมาณดังกล่าวถูกละลายในน้ำปริมาณ 250 ไมโครลิตร และถูกดึงมาใช้เพียง 20 ไมโครลิตร ดังนั้นปริมาณพอลิฟีนอลที่นำมาใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านทานอนุมูลอิสระจึงมีเพียง 0.0200 มิลลิกรัม ประสิทธิภาพของพอลิฟีนอลที่หลุดออกมาจากเส้นใยเมื่อเวลาการปลดปล่อย 1 ชั่วโมงมีค่าความสามารถน้อยกว่า Gallic acid ที่ 0.0010 มิลลิกรัม จากการคำนวณเปรียบเทียบความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระทำให้พบว่าปริมาณสารที่ออกมาคิดสัดส่วนน้อยกว่าร้อยละ 5 ของสารสกัดที่มีในแผ่นผลิตภัณฑ์
2. ชนิดของตัวทำละลายหรือสารละลายที่ใช้มีผลต่อความสามารถในการปลดปล่อยสารสกัดออกจากผลิตภัณฑ์ ข้อมูลนี้จะเป็นหัวข้อสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ต้องการให้มีการปลดปล่อยสารสกัดจากอ้อย

บทสรุปโครงการวิจัยและพัฒนา

สารสกัดจากผลผลิตพลอยได้อุตสาหกรรมสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นเส้นใยโดยอาศัยคุณสมบัติการเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำมาใช้ในงานการพัฒนาวัสดุปิดแผลเป็นผลสำเร็จ แผ่นผลิตภัณฑ์มีความจำเพาะทั้งในด้านการขึ้นรูปและสัดส่วนที่สามารถผสมได้ในผลิตภัณฑ์ทำให้ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระมีได้ไม่เต็มที่เมื่อเปรียบเทียบกับสารทางการค้า การพัฒนาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัดในแผ่นผลิตภัณฑ์และการคัดเลือกโมเลกุลที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มศักยภาพของผลิตภัณฑ์ได้

2.4 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน

ไม่มี

2.5 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยเป็นเงินทั้งสิ้น 898,150.30 บาท

หมวดงบประมาณ	งบประมาณ (งวดที่3)	
	งบประมาณที่ได้รับ (บาท)	งบประมาณคงเหลือ (บาท)
หมวดค่าตอบแทน	150,000.00	37,500.00
หมวดค่าจ้าง	393,600.00	0.00
หมวดค่าใช้สอย	343,600.00	13,520.50
หมวดค่าวัสดุ	62,000.00	29.20
รวม	**949,200.00**	**51,049.70**

2.6 งานตามแผนงานวิจัย/โครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทางคณะทำงานมองเห็นศักยภาพของผลิตภัณฑ์และประเด็นที่สมควรพัฒนาต่อเนื่อง จึงมีความเห็นร่วมกันว่าจะจัดทำข้อเสนอโครงการเพื่อขอทุนสนับสนุนวิจัยเพิ่มเติม

2.7 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา/อุปสรรค และวิธีการแก้ไข (ถ้ามี)

- การปลดปล่อยสารของผลิตภัณฑ์ในลักษณะเส้นใยเกิดขึ้นในเวลาที่จำกัดและรวดเร็ว ลักษณะดังกล่าวเป็นข้อจำกัดให้กับผลิตภัณฑ์ การวิจัยเพิ่มเติมเพื่อศึกษาความสามารถในการควบคุมมีความจำเป็นเพื่อเพิ่มศักยภาพให้กับผลิตภัณฑ์ลักษณะเส้นใยได้

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว.

☐ ประชุมกับนักศึกษา/ผู้ช่วยวิจัย หรือนักศึกษาขอพบเพื่อหารือการทำวิจัย.....จัดขึ้นทุกเดือน.....

☐ ตรวจแก้ผลงานวิจัยที่ทำโดยนักศึกษา หรือผู้ช่วยนักวิจัย

(ลงนาม) .....

(.....รองศาสตราจารย์ ธงชัย สุวรรณสิชณน์...)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....