รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกของผลทุเรียน เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

Studies of Polysaccharide Extracts from Durian Fruit-hulls for Medicinal Uses

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ
รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิดา วยัมหสุวรรณ

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
ปีงบประมาณ 2544-2545

572.566
ส815ศ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิงหาคม 2546

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกของผลทุเรียน เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

Studies of Polysaccharide Extracts from Durian Fruit-hulls for Medicinal Uses

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิดา วยัมหสุวรรณ

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ปีงบประมาณ 2544-2545

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิงหาคม 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9 ก.พ. 2548

I21405682

ชื่อโครงการ : ศึกษาสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกของผลทุเรียนเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

ชื่อผู้วิจัย : สุนันท์ พงษ์สามารถ วิมลมาศ ลิมปีพันธ์ และ พนิดา วยัมหสุวรรณ

เดือน-ปีที่วิจัยเสร็จ : สิงหาคม 2546

บทคัดย่อ

แยกสารโพลีแซคคาไรด์ได้ 2 ชนิด จากเปลือกแห้งของผลทุเรียน (*Durio zibethinus* L.) เตรียมในรูปผงแห้งของ polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF) องค์ประกอบธาตุหลักของโพลีแซคคาไรด์ประกอบด้วย Carbon (C) Hydrogen (H) และ Oxygen (O) ในสัดส่วนอะตอมของ C : H : O เท่ากับ 2.9 : 5.3 : 3.1 และ 3.5 : 6.4 : 3.1 ใน PG และ PF ตามลำดับ PG มีองค์ประกอบของ acidic sugar ได้แก่ galacturonic acid มากกว่าห้าสิบเปอร์เซนต์ ของน้ำหนัก PG และมีน้ำตาล neutral sugar ได้แก่ glucose fructose rhamnose และ arabinose ใน PF มีองค์ประกอบของน้ำตาล glucose เพียงชนิดเดียว ทำการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธี colorimetric method TLC และ HPLC techniques การวิเคราะห์องค์ประกอบของเกลือแร่ใน PG และ PF พบมีโซเดียม โปตัสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่องค์ประกอบส่วนน้อยมีทองแดง สังกะสีและแมงกานีส นอกจากนี้ยังพบมีซิลิกอนอยู่ใน PF ด้วย ไม่พบมีส่วนประกอบของเส้นใยใน PG ขณะที่ใน PF พบมีเส้นใยถึง 96.3 ± 0.7 % ผงแห้งของ PF ไม่ละลายน้ำ แต่ผงของ PG สามารถพองตัวและละลายได้ในน้ำเป็นสารข้นหนืด สารละลายน้ำ 3%PG มีความหนืด 405 ± 7.4 cps มี pH เท่ากับ 2.4 ± 0.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของ PG พบว่าเป็น amorphous powder ขณะที่ PF แสดงคุณสมบัติของผงที่เป็นผลึกจากการตรวจวิเคราะห์ผล x-ray diffractogram เปรียบเทียบได้กับผงของ cellulose จากผล IR Spectrum แสดงให้เห็น absorption band ที่ 1749 cm^{-1} (C=O) และที่ 1639 cm^{-1} (COO^-) แสดงลักษณะของโครงสร้าง carbonyl ของ acidic sugar ใน PG ทำการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความหนืดของสารละลายน้ำของ PG ได้แก่ ความร้อน ความเข้มข้นของ PG กรด ด่าง อิเล็กโตรไลท์ ตัวทำละลาย และสารให้ความชุ่มชื้น (humectant) การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของ PG พบว่า PG มีคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียต่อทั้ง กรัมบวกแบคทีเรีย ได้แก่ S. aureus S. epidermidis B. subtilis L. pentosus และต่อกรัมลบแบคทีเรีย ได้แก่ E. coli และ P. vulgaris พบมี inhibition zone บนอาหารวุ้นเป็นวงใสมีขอบคมชัดกับ PG ในความเข้มข้น 0.32% มีเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PG อย่างไรก็ดีพบว่าเชื้อ L. plantarum และ Ps. aeruginosa ไม่ไวต่อการยับยั้งด้วย PG ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของ PG ตรวจสอบโดยวิธี Broth macrodilution method พบว่า MIC ของ PG มีค่า 6.4 มก./มล. ต่อเชื้อ S. epidermidis B. subtilis E. coli และ P. vulgaris มีค่า 12.8 มก./มล.

และ 25.6 มก./มล. ต่อเชื้อ S.aureus และ L. pentosus ตามลำดับ พบว่า MBC ของ PG มีค่า 25.6 มก./มล. ต่อเชื้อ S.aureus S. epidermidis B. subtilis E. coli และ P. vulgaris และมีค่า 51.2 มก./มล. ต่อเชื้อ L. pentosus นอกจากนี้ได้ทำการทดลองตรวจสอบ Time kill analysis หาอัตราเร็วของการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของ PG พบว่า PG ในความเข้มข้นต่ำที่ 0.02% สามารถเร่งการฆ่าเชื้อของ S. aureus และ E. coli ในสารละลาย NSS ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ขณะที่บ่มเชื้อเหล่านี้นาน 3 วัน ใน NSS ที่ไม่มี PG ยังพบเชื้อรอดชีวิตอยู่ได้ การตรวจสอบพื้นผิวเซลล์ภายนอกของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ภายหลัง incubate เชื้อใน NSS ที่มี PG นาน 24 ชั่วโมง และไม่พบเชื้อรอดชีวิต พบว่ามี PG เกาะติดบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียและเซลล์ของ S. aureus จับกันเป็นกลุ่ม ขณะที่พบว่า fragella ของ E. coli หายไป PG จะทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase ตรวจพบ reducing sugar ภายหลังการย่อยเกิดขึ้นน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ การย่อย soluble starch ที่ใช้เป็นตัวควบคุม ยังพบว่า PG ทนต่อการถูกย่อยด้วยกรดเกลือเจือจางในความเข้มข้น 0.01-0.1 โมล่าร์ ที่ 37°ซ นาน 4 ชั่วโมง จากผลที่ได้อาจคาดได้ว่า PG ทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในทางเดินอาหาร พบว่าน้ำตาล glucose และ sucrose ถูกกักเก็บไว้ได้ใน PG และทำให้การปลดปล่อยของน้ำตาลออกมาภายนอกน้อยกว่าเมื่อไม่มี PG จากการตรวจสอบในหลอดทดลองโดยวิธี dialysis technique โดยใช้ semipermeable membrane ได้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกับการใช้ jejunal กลับด้านของลำไส้หนู จากผลการทดลองเสนอแนะได้ว่าเมื่อมี PG น้ำตาลสามารถถูกกักเก็บและลดการปลดปล่อยออกที่ลำไส้เล็ก รูปแบบ Rheology ของสารละลายน้ำของ PG แสดงคุณสมบัติของ non-newtonian flow ชนิด pseudoplastic behavior การเพิ่ม shear rate ทำให้ลดความหนืด ผลที่ได้แสดงว่า PG สามารถใช้เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และยังอาจใช้เป็นสารช่วยเตรียมผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางได้ การเตรียมผลิตภัณฑ์ PG gel vitamin E-gel และ vitamin C gel สามารถเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เจลได้ผลน่าพอใจ ได้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวดี ผลิตภัณฑ์มีศักยภาพนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เจลบำรุงผิวให้ความชุ่มชื้นและช่วยฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ PG gel เหมาะสำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ภายนอก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title : Studies of Polysaccharide Extracts from Durian Fruit-hulls for Medicinal Uses

Name of Investigators : Sunanta Pongsamart, Vimolmas Lipipun, and Panida Vayamhasuwan

Year : August, 2003

ABSTRACT

Polysaccharides were isolated from dried fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.) and prepared in the forms of dried powder of polysaccharide gel (PG) and polysaccharide fiber (PF). Elemental compositions of the polysaccharide were carbon (C) , hydrogen (H) and oxygen (O) in atomic ratioes of C : H : O by 2.9 : 5.3 : 3.1 and 3.5 : 6.4 : 3.1 in PG and PF, respectively. PG composed of acidic sugar, which was galacturonic acid more than fifty percent of total sugar, and neutral sugars including glucose, fructose, rhamnose and arabinose. PF composed of only neutral sugar of glucose. The sugars were analyzed by using colorimetric method, TLC and HPLC techniques. The composition of minerals in PG and PF was analyzed; the major minerals were sodium, potassium, calcium, magnesium and iron; whereas the minor components were copper, zinc and manganese; more over silicon was also found in PF. Fiber was not found in PG while PF contained 96.3 $\pm$ 0.7 % of fiber. Dried powder of PF was an insoluble fiber but powder of PG was swelled and formed a viscous layer in water. The viscosity of 3% (w/v) PG was 405.2 $\pm$ 7.4 cps, and pH was 2.4 $\pm$ 0.2. Physical properties of PG and PF were determined. PG was an amorphous powder whereas PF showed crystalline powder due to the similar profile of x-ray diffractogram comparable to cellulose powder. IR spectrum of PG showed absorption bands at 1749 cm^{-1} (C=O) and 1639 cm^{-1} (COO^-), indicating carbonyl structure in the acidic sugar component in PG, which was not found in PF. Factors affecting the viscosity of PG aqueous mixture were investigated including heat , PG concentrations, acid, base, electrolytes, solvents and humectants. Biological properties of PG were investigated, PG showed antibacterial activity to both gram positive bacteria, S. aureus, S. epidermidis, B. subtilis, L.pentosus; and gram negative bacteria, E.coli and P.vulgaris. Inhibition zone with clear and sharp margin was obtained at 0.32%PG on agar media, the diameter of inhibition zone increased with increasing PG concentrations. However, L. plantarum and Ps. aeruginosa were not sensitive to PG inhibition . The values of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of PG were examined using broth macrodilution method. MICs of PG were 6.4 mg/ml against S. epidermidis, B. sublilis, E. coli and P. vulgaris; and 12.8 mg/ml and 25.6 mg/ml against S. aureus and L. pentosus, respectively. MBCs of PG were 25.6 mg/ml against S. aureus, S.epidermidis, B.subtilis, E. coli and P.valgaris; and 51.2 mg/ml against L. pentosus.

Time kill analysis was also determined. Low concentration of 0.02%PG increased rate of bactericidal activity of PG against S.aureus and E. coli in NSS after 24 hours incubation, where those of bacteria incubated for 3 days in NSS without PG were survived. Bacterial cells surface in non viable bacterial culture in NSS after exposured to PG for 24 hores was determined under scanning electron microscope. Adhesion of PG on bacterial cell surface was observed, cells of S. aureus was aggregated whereas fragella of E. coli were disappeared. PG was resisted to enzyme α-amylase digestion, trace of reducing sugar products after enzyme digestion was produced compared to substantial amount produced in the soluble starch control. PG was also resisted to diluted 0.01-0.1 M HCl hydrolysis after incubation at 37^{0}C for 4 hours. The results implicated that PG was resisted to enzyme and acid hydrolysis in gastrointestinal tract. Sugars, glucose and sucrose, were trapped in PG and allowed it to release lesser than without PG by dialysis technique in vitro using semipermeable membrane as well as everted jejunal sac of rat intestine. The results suggested that sugars in intestine in the present of PG can be trapped and decreased in releasing from intestine. Rheological profile of PG aqueous mixture showed a non-newtonian flow with pseudoplastic behavior, increasing shear rate resulted in decreasing viscosity. The results indicate that PG can be used as a bactericidal agent and as an excipient as well, in pharmaceuticals and cosmetics. Preparation of PG gel, vitamin E gel and vitamin C gel were successfully prepared, satisfactory and stable products were obtained. The products have potential application as a disinfected skin moisturizing gel for topical use.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2544-2545

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและบุคลากรที่ให้การสนับสนุนและอนุเคราะห์ในการวิจัยครั้งนี้ดังต่อไปนี้

1. ศูนย์เครื่องมือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวก ด้านการใช้เครื่องมือที่จำเป็นของการวิจัยได้แก่ Scanning electron microscope, Atomic absorption spectrometer CHNS/O analyzer, HPLC, x-ray diffractometer, IR spectrophotometer

2. คุณจิตติมา เลิศชัยพร คุณวราภรณ์ ปิยสิรานนท์ คุณอรนุช นาคชาติ คุณวราภรณ์ เกิดดิษฐ์ คุณนันทวัน นันทวนิช คุณชุติมา ทิพย์กุล คุณสุปราณี สุทธิไพโรจน์สกุล ในการทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัยในงานวิจัยครั้งนี้

3. บริษัท โรวิไทย ที่เอื้อเฟื้อให้สารเคมี Ascorbyl palmitate เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

ชื่อเรื่องและชื่อผู้วิจัย..... i
บทคัดย่อภาษาไทย..... ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... iv
กิตติกรรมประกาศ..... vi
สารบัญเรื่อง..... vii
สารบัญตาราง..... x
สารบัญรูป..... xi
บทนำ..... 1
วัตถุประสงค์..... 5
วัสดุและวิธีวิจัย..... 6
วัสดุ..... 6
วิธีวิจัย..... 8
การสกัดแยกสารเจลทุเรียน..... 8
การสกัดแยกสารไฟเบอร์ทุเรียน..... 8
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบน้ำตาลของเจลและไฟเบอร์..... 8
การวิเคราะห์ปริมาณของ galacturonic acid ใน PG..... 11
การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ PG และ PF..... 12
IR Spectrums..... 12
X-ray patterns..... 12
Particle size distribution..... 12-1
ผลของความเข้มข้นต่อความหนืดของ PG..... 12-1
ผลของความเข้มข้นของ PG ต่อค่า pH..... 13
ผลของ acid-base ต่อความหนืดของ PG..... 13
ผลของ electrolytes ต่อความหนืดของ PG..... 13
ผลของตัวทำละลายต่อความหนืดของ PG..... 13
ผลของสารช่วยให้ชุ่มชื้น (humectant) ต่อความหนืดของ PG..... 13
ผลของสารกันบูดต่อความหนืดของ PG..... 14
ผลของความร้อนต่อความหนืดของ PG..... 14

คุณสมบัติทางชีวภาพของ PG..... 14
คุณสมบัติของสารละลาย PG ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์..... 14
คุณสมบัติของ PG ต่อการต้านการย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase..... 16
คุณสมบัติของ PG ที่ทนต่อการย่อยด้วยกรด HCl เจือจาง..... 17
คุณสมบัติความสามารถของ PG ในการกักเก็บน้ำตาล glucose และsucrose..... 17
การใช้ประโยชน์ของสาร polysaccharide gel ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ยาหรือเครื่องสำอาง... 20
คุณสมบัติของการไหลของ polysaccharide gel..... 20
การเตรียมตำรับเจลจาก PG..... 20
การเตรียมตำรับ Vitamin E gel..... 21
การเตรียมตำรับ Vitamin C gel..... 22
การตรวจสอบคงตัวของผลิตภัณฑ์เจล..... 23
ผลการวิจัย..... 24
ตัวอย่างเปลือกทุเรียนและการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์..... 24
องค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบน้ำตาลใน PG และ PF..... 24
คุณสมบัติทางกายภาพของ PG และ PF..... 28
IR Spectrums ของ PG และ PF 28
X-ray diffraction patterns ของ PG และ PF 28
Particle size distribution ของ PG และ PF 28
ผลของความเข้มข้นของ PG ต่อความหนืด..... 38
ผลของความเข้มข้นของ PG ต่อค่า pH..... 38
ผลของ acid-base ต่อความหนืดของ PG..... 38
ผลของ electrolytes ต่อความหนืดของ PG..... 38
ผลของตัวทำละลายต่อความหนืดของ PG..... 38
ผลของสารช่วยให้ชุ่มชื้นต่อความหนืดของ PG..... 38
ผลของสารกันบูดต่อความหนืดของ PG..... 45
ผลของความร้อนต่อความหนืดของ PG..... 45
คุณสมบัติทางชีวภาพของ PG..... 45
ผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์..... 45
Agar diffusion susceptibility test..... 45
Broth macrodilution susceptibility test..... 48
การทดสอบค่า MIC และ MBC..... 48
การวิเคราะห์ Time kill analysis..... 48

ผลของ PG ต่อการเร่งการฆ่าเชื้อแบคทีเรียใน NSS..... 53
ผลของ PG ต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย..... 53
คุณสมบัติของ PG ต่อการต้านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase..... 64
คุณสมบัติของ PG ที่ทนต่อการย่อยด้วยกรด HCl เจืองจาง..... 64
ผลของ PG ต่อการกักเก็บน้ำตาล glucose และ sucrose..... 64
ผลของ PG ต่อการกักเก็บ glucose ด้วยวิธี dialysis technique..... 64
ผลของ PG ต่อการกักเก็บ sucrose ด้วยวิธี dialysis technique..... 67
ผลของ PG ต่อการดูดซึม glucose ผ่านลำไส้เล็กหนูขาวในหลอดทดลอง..... 67
การใช้ประโยชน์ของ PG ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ยา/เครื่องสำอาง..... 67
คุณสมบัติการไหลของ PG..... 67
ผลของการเตรียมตำรับเจล PG gel..... 73
ผลของการเตรียมตำรับเจล Vitamin E gel และ Vitamin C gel..... 73
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย..... 77
การสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน..... 77
องค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบน้ำตาลใน PG และ PF..... 77
คุณสมบัติทางกายภาพของ PG และ PF..... 78
ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อสารสกัด PG..... 78
ปัจจัยของความร้อนที่มีผลต่อ PG..... 78
คุณสมบัติทางชีวภาพของ PG..... 78
ผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์..... 79
ผลของคุณสมบัติของ PG ต่อการต้านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase..... 80
ผลของคุณสมบัติของ PG ที่ทนต่อการย่อยด้วยกรด HCl เจือจาง..... 80
ผลของ PG ต่อการกักเก็บน้ำตาลกลูโคสและซูโครส..... 81
การใช้ประโยชน์ของ PG ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ยา/เครื่องสำอาง..... 81
คุณสมบัติการไหลของ PG..... 81
การเตรียมตำรับเจล PG gel Vitamin E gel และ Vitamin C gel..... 81
เอกสารอ้างอิง..... 82

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. องค์ประกอบของธาตุหลักในสารสกัด polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF)..... 25
2. องค์ประกอบของเกลือแร่ในสารสกัด polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF)..... 26
3. ปริมาณของความชื้นไฟเบอร์และเถ้าในสารสกัด polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF)..... 27
4. องค์ประกอบของน้ำตาลใน PG และ PF..... 29
5. ผลของความร้อนต่อความหนืดของ Polysaccharide gel (PG)..... 47
6. ความสามารถต้านจุลินทรีย์ของ polysaccharide gel (PG) ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี agar diffusion..... 50
7. ค่า MICs และ MBCs ของโพลีแซคคาไรด์เจล(PG) ต่อเชื้อจุลินทรีย์..... 52
8. การย่อย polysaccharide gel (PG) โดยเอนไซม์ ∝-Amylase เปรียบเทียบกับแป้ง (strach) และ glucomannan. 65
9. ผลของกรดเกลือเจือจางที่ความเข้มข้นที่ 0.01-0.1 M ต่อการย่อย polysaccharide gel (PG) ที่ปล่อยให้ย่อยที่ 37^0 ซ ในเวลา 0-4 ชม..... 66
10. คุณลักษณะและความคงตัวของตำรับ PG gel, Vitamin E gel, และ Vitamin C gel ที่ใช้ Polysaccharide gel (PG) เป็นสารช่วยเตรียมเจล..... 75

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. เปรียบเทียบ IR spectra ระหว่าง PG กับ standard D (-) Galacturonic acid (a) แสดง identical absorption band ที่ 1710 - 1749 cm^{-1} *(C=O)*, ที่ 1650 - 1550 cm^{-1} $(COO)^-$ และ ที่ 1010 – 1030 cm^{-1} *(C-OH)*; Standard curve ของ ปริมาณ D (-) Galacturonic acid ต่อ peak area (b) วัดปริมาณของ Galacturonic acid จากค่า peak area ที่ absorptionband บริเวณ 1650 cm^{-1} 30

2. TLC chromatogram ของสารละลาย PG จาก acid hydrolyzate บน silica gel 60 F_{254} บน aluminum plate mobile phase ใช้ solvent system ประกอบด้วย ethylacetate : acetic acid : water (4 : 2: 3) spray reagent ประกอบด้วย 1-napthol ใน ethanol และ sulfuric acid..... 31

3. HPLC chromatograms ของ (a) สารละลายผสมของน้ำตาลมาตรฐาน 0.5 μmoles Rhamnose Arabinose Fructose และ Glucose; (b) acid hydrolyzate ของ โพลีแซคคาไรด์เจล (PG), 20μl; (c) PG ผสม 0.5 μmoles Rhamnose ; (d) PG ผสม 0.5 μmoles Arabinose; (e) PG ผสม 0.5 μmoles Fructose; (f) PG ผสม 0.5 μmoles Glucose. Column Lichrospher®,NH_2(5μm) ; mobile phase, 90% acetronitrile in water; flow rate, 1.8 ml/min; detector, refractive index (RI); recorder speed, 4 mm/min..... 32

4. TLC chromatogram ของสารละลาย PF จาก acid hydrolyzate บน silica gel G ใช้ mobile phase ประกอบด้วย acetone: methanol : water (75:10:15). Man = standard mannose, Glu = standard glucose, Gal = standard galactose and PF = acid hydrolyzate ของ polysaccharide fiber..... 33

5. HPLC chromatograms ของ (a) น้ำตาลมาตรฐาน Manose (Man) Glucose (Glu) และ Galactose (Gal); (b) acid hydrolyzate ของ polysaccharide fiber (PF); (c) acid hydrolyzate ของ PF ที่เติม 2 μmole Man; (d) acid hydrolyzate ของ PF ที่เติม 0.7 μmole Glu; (e) acid hydrolyzate ของ PF ที่เติม 2 μmole Gal ; Column, amino silica ; mobile phase, 90% acetronitrile ในน้ำ flow rate, 1.8 ml/min; recorder speed, 4 mm/min; detector, RI spectrometer..... 34

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

6. เปรียบเทียบ IR spectra ของ PG และ PF จากเปลือกผลทุเรียน แสดงให้เห็น absorption bands ที่แตกต่างกันที่ 1749 cm^{-1} *(C=O)* ที่ 1639 cm^{-1} $(COO)^-$ และที่ 1019 cm^{-1} *(C-OH)*; PG = polysaccharide gel; PF = polysaccharide fiber..... 35
7. เปรียบเทียบ X – ray Diffraction patterns ระหว่าง polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF) จากเปลือกผลทุเรียน PG แสดงลักษณะของ amorphous powder และ PF แสดงลักษณะเป็น crystal powder 36
8. Particle size distribution profiles ของ (A) Polysaccharide Gel (PG) และ (B) Polysaccharide fiber (PF) บดเป็นผงและผ่านแร่งขนาด 60-mesh ขนาดอนุภาคของ PG อยู่ระหว่าง 222.28 - 301.68 μm และขนาดอนุภาคของ PF อยู่ระหว่าง 140 - 163 μm 37
9. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความเข้มข้นของโพลีแซคคาไรด์เจล (PG) 39
10. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) กับความเข้มข้นของโพลีแซคคาไรด์เจล (PG) 40
11. ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อความหนืดของ Polysaccharide gel (PG)..... 41
12. ผลของ electrolyte ต่อความหนืดของ 3% polysaccharide gel (PG) 42
13. ผลของ solvent ต่อความหนืดของ 3% polysaccharide gel (PG)..... 43
14. ผลของ humectant ต่อความหนืดของ 3% Polysaccharide gel (PG)..... 44
15. ผลของสารกันบูดต่อความหนืดของ Polysaccharide gel (PG)..... 46
16. การวิเคราะห์บน agar plate แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* ATCC 6538P ในอาหารแข็ง MHA ใน Cup บรรจุ PG ในความเข้มข้นที่กำหนด และ control บรรจุด้วย NSS..... 49
17. การทดลองค่า MIC ของ PG ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 มีค่าที่ 6.4 mg/ml ในอาหารเหลว MHB, C = Control (PG = 0 mg/ml)..... 51
18. Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *S. aureus* ใน mueller hinton broth 54
19. Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ใน mueller hinton broth..... 55
20. Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *B. subtilis* ใน mueller hinton broth..... 56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

21. Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *E. coli* ใน mueller hinton broth..... 57

22. Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *P. vulgaris* ใน mueller hinton broth..... 58

23. Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *L. pentosus* ใน brain heart infusion broth..... 59

24. การตายของเชื้อ *S. aureus* ใน normal saline solution (NSS) ที่เติมสาร (a) polysaccharide gel (PG), (b) glucose (G)..... 60

25. การตายของเชื้อ *E. coli* ใน normal saline solution (NSS) ที่เติมสาร (a) polysaccharide gel (PG), (b) glucose (G)..... 61

26. Scanning electron micrograph ของ *S. aureus* ภายหลังการบ่มเชื้อที่ 37^0 C นาน 24 ชั่วโมงใน NSS (A_1/A_2) และใน NSS ที่มี 0.32% PG (B_1/B_2) ไม่มีเซลล์ที่มีชีวิตรอดภายหลังอยู่ใน PG นาน 24 ชั่วโมง..... 62

27. Scanning electron microscope ของ *E. coli* ภายหลังการบ่มเชื้อที่ 37^0 C นาน 24 ชั่วโมงใน NSS (A_1/A_2) และใน NSS ที่มี 0.32% PG (B_1/B_2) ไม่มีเซลล์ที่มีชีวิตรอดภายหลังอยู่ใน PG นาน 24 ชั่วโมง..... 63

28. ผลของ polysaccharide gel (PG) ต่อการกักเก็บ (trapped) น้ำตาล glucose (a) และการปลดปล่อย (released) ของน้ำตาล glucose (b) ผ่าน semipermeable membrane ภายหลังการ dialysis นาน 2 และ 3 ชั่วโมง..... 68

29. ผลของ polysaccharide gel (PG) ต่อการกักเก็บ (trapped) น้ำตาล และ การปลดปล่อย (released) ของน้ำตาล Sucrose ผ่าน semipermeable membrane ภายหลังการ dialysis นาน 2 ชั่วโมง..... 69

30. ผลของ polysaccharide gel (PG) เปรียบเทียบกับ standard polysaccharide glucomannan (GM) ต่อการกักเก็บสารน้ำตาล glucose (a) และ การปลดปล่อยน้ำตาล glucose ผ่าน semipermeable membrane (b) ภายหลังการ dialysis นาน 2 ชั่วโมง..... 70

31. ผลของ polysaccharide gel (PG) ต่อการปลดปล่อยน้ำตาลผ่านผนังลำไส้เล็ก (jejunum) ของหนูขาว ภายหลังการทำ dialysis นาน 1 ชั่วโมง..... 71

32. คุณลักษณะทาง Rheology ของ polysaccharide gel (PG)..... 73

33. ผลิตภัณฑ์เจลเตรียมจาก Polysaccharide gel (PG)..... 74

บทนำ

โพลีแซคคาไรด์เป็นสารประกอบที่พบมากในธรรมชาติ พบมีอยู่ใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โพลีแซคคาไรด์เป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง เช่นเดียวกับสารประกอบพวกแป้งที่รู้จักกันดี แป้งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์รูปแบบหนึ่งที่มีความสำคัญเป็นอาหารหลักหมู่หนึ่งในห้าหมู่ของสารอาหารจำเป็นของร่างกาย เมื่อรับประทานแป้งจะมีน้ำย่อยของร่างกายสามารถย่อยแป้งจนได้เป็นหน่วยย่อยเล็กๆ ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจับต่อกันเป็นสายยาวได้เป็นโมเลกุลใหญ่ ที่อาจเรียงตัวต่อเป็นแขนงหรือกิ่งและพันกันอยู่ในโครงสร้างของแป้ง เมื่อแป้งถูกย่อยเป็นกลูโคสแล้วจึงถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารนำไปใช้เป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่จำเป็นของร่างกายต่อไป ยังมีสารประกอบโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ อีกมากมายในธรรมชาตินอกเหนือจากแป้ง ในพืชส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ พวกเซลลูโลสซึ่งมีองค์ประกอบหลักของน้ำตาลกลูโคสจับกันเป็นสายตรงยาวจำนวนมากมายเป็นโมเลกุลใหญ่เช่นกันโดยมีรูปแบบโครงสร้างที่แตกต่างกันจากแป้ง ซึ่งน้ำย่อยของคนไม่สามารถย่อยเส้นใยเซลลูโลสให้เป็นหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสชนิดที่ให้ร่างกายคนนำมาใช้เป็นสารอาหารได้ แต่คนก็ยังรับประทาน พืช ผัก รับประทานเส้นใยเซลลูโลสเหล่านี้เพื่อเป็นเส้นใยอาหาร ช่วยเพิ่มกากอาหารและช่วยการขับถ่ายได้ดี จึงอาจพบการใช้สารเหล่านี้บางชนิดเตรียมอาหารทางการแพทย์ (medical diet) สำหรับให้คนไข้ที่ต้องควบคุมอาหารพวกน้ำตาลและลิปิดหรือควบคุมน้ำหนักเป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ในรูปแบบอื่นๆ อีกมากมายที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลหน่วยย่อยชนิดหนึ่งหรือน้ำตาลหลายชนิดจับต่อกันอยู่ในสายของโพลีแซคคาไรด์ เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งมีทั้งชนิดที่ไม่ละลายน้ำและชนิดที่พองตัวละลายในน้ำได้เป็นของเหลวข้นหนืด สารประกอบโพลีแซคคาไรด์เหล่านี้บางชนิด เมื่อกินอาจถูกย่อยเพียงบางส่วนโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ แต่ส่วนใหญ่เกือบทั้งหมดจะถูกขับออกจากร่างกายเป็นกากอาหาร เช่นเดียวกับเซลลูโลสและเส้นใยอาหารอื่นๆ โพลีแซคคาไรด์จากธรรมชาติที่แยกออกมาได้ทั้งจาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ พบว่าแต่ละชนิดมีความแตกต่าง และมีคุณสมบัติเฉพาะของมันเอง มีหลายชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางในอุตสาหกรรมผลิตยา เครื่องสำอาง และอาหาร (1) ตัวอย่างของสารประกอบเหล่านี้ได้แก่

สารพวก (gum) ต่างๆ ประกอบด้วยน้ำตาลมากกว่าหนึ่งชนิด เช่น กัมอคาเชีย (acacia gum) ได้จากพืช ประกอบด้วยน้ำตาลมากกว่าหนึ่งชนิด ได้แก่ กาแลคโตส (D-galactose) อราบิโนส (L-arabinose) แรมโนส (L-rhamnose) และกรดน้ำตาล กาแลคตูโรนิค (D-galacturonic acid)

กัมซานแทน (xantan gum) ได้จากแบคทีเรียเป็นพวกกรดโพลีแซคคาไรด์ (acidic polysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลมากกว่าหนึ่งชนิด ได้แก่ กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) กรดน้ำตาล กลูคูโรนิค แอซิด (glucuronic acid)

เพคติน (pectin) ได้จากพืช เช่น เปลือกส้ม เปลือกแอปเปิ้ล เป็น heterogeneous complex polysaccharide ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด มีองค์ประกอบหลักเป็นสายยาวต่อกันด้วยกรดน้ำตาล กาแลคตูโรนิค แอซิด และน้ำตาลอื่นๆ ได้แก่ กาแลคโตส กลูโคส แรมโนส อราบิโนส และไซโรส (xylose) เพคตินเป็นเส้นใยอาหารละลายน้ำได้ดี (water soluble dietary fiber) ชนิดหนึ่งที่ทนต่อการย่อยด้วยน้ำย่อยในทางเดินอาหารของคนแต่อาจถูกย่อยได้บ้าง โดยแบคทีเรียในทางเดินอาหาร

มีสารโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยสายยาวของน้ำตาลชนิดเดียวได้แก่

วุ้น (agar) ได้จากสาหร่ายทะเลมีโครงสร้างหลักเป็นน้ำตาล กาแลคโตส (D-galactose) และ (3,6 anhydro L-galactose) มีหมู่ซัลเฟต จับกับน้ำตาลบ้างเล็กน้อยในรูปของเอสเตอร์ ซัลเฟต

ไคติน (chitin) ได้จากเปลือกแข็งของกุ้ง แมลง โครงปลาหมึกและเชื้อราหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นสายยาวของน้ำตาล อาเซตามิโด ดีออกซิกลูโคส (2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucose) สามารถนำมาเตรียมเป็น ไคโตซาน (chitosan) โดยดึงเอาหมู่ อาเซทิล (acetyl group) ออกได้เป็นโพลีแซคคาไรด์ของน้ำตาลอมิโน (amino sugar) คือ อมิโนดีออกซิกลูโคส (2-amino-2-deoxy-D-glucose) สารโพลีแซคคาไรด์พวกเซลลูโลสที่นำมาเตรียมให้อยู่ในรูปแบบของกลูโคสไมโครคริสตัล (microcrystalline cellulose) หรือดัดแปรโครงสร้างกลูโคสในสายโพลีเมอร์ให้เป็นอนุพันธ์ โดยการเติมหมู่คาร์บอกซิเมททิลหรือหมู่ไฮดรอกซิโพรพิลหรือหมู่เมทิลเป็นต้น ได้เป็นเซลลูโลสกึ่งสังเคราะห์อื่นๆ

สารประกอบโพลีแซคคาไรด์ต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมายกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ หลายอย่าง รวมทั้งอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอางและอาหาร ใช้เป็นสารช่วยเตรียมผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ยาเม็ด ยาเม็ดเคลือบ ยาน้ำแขวนตะกอน ยาน้ำแขวนละอองหรืออิมัลชั่น ผลิตภัณฑ์ประเภทครีมและเจล เตรียมผลิตภัณฑ์อาหารประเภทแยลลี่และแยม เป็นต้น สารใช้ช่วยเตรียมผลิตภัณฑ์ต่าง เหล่านี้ ส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบนำเข้าเกือบทั้งสิ้นและมีราคาที่ค่อนข้างแพงในปัจจุบัน อุตสาหกรรมผลิตวัตถุดิบเหล่านี้ภายในประเทศยังมีน้อยมาก ทั้งที่ประเทศไทยมีวัสดุเหลือทิ้งทั้งจากพืชและสัตว์จากภาคเกษตรกรรมอยู่มากมายที่เป็นภาระต้องกำจัดทิ้งตลอดทั้งปี หากได้มีการส่งเสริมการวิจัยและพัฒนาวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้อย่างจริงจังอาจจะพัฒนาวัสดุที่เป็นขยะจากพืชหลายชนิดมาใช้เตรียมผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น ทำให้เกิดการพัฒนาเพิ่มมูลค่าและใช้ผลผลิตการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด โครงการเหล่านี้เป็นโครงการวิจัยและพัฒนาที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

เปลือกทุเรียนเป็นตัวอย่างหนึ่งของขยะเหลือทิ้งจากภาคเกษตรกรรม ทุเรียน *(Durio zibethinus* L.) เป็นผลไม้ที่นิยมรับประทานมากในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง มีการพัฒนาสายพันธุ์และนิยมปลูกกันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีผลผลิตประมาณกว่าแสนตันต่อ

ปี จึงมีขยะเหลือทิ้งของเปลือกทุเรียนเพิ่มขึ้นอย่างมากในทุกๆปี และปัจจุบัน เกษตรกรสามารถปลูกทุเรียนให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี อาจกล่าวได้ว่าทุเรียนเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย แต่ละปีในช่วงฤดูกาลจะมีการส่งออกทุเรียนมากขึ้นโดยการส่งผลสดทั้งผลหรือแกะเนื้อบรรจุหีบห่อ และยังมีการแปรรูปทุเรียนในหลายรูปแบบ ทั้งทุเรียนกวน ทุเรียนทอดกรอบ ทำให้มีขยะจากเปลือกทุเรียนเป็นจำนวนมากขึ้นทุกๆ ปี เป็นภาระหนักให้ต้องกำจัดทิ้งอย่างมากในช่วงฤดูกาลของทุเรียน จากข้อมูลดังกล่าวที่ทำให้น่าสนใจศึกษาวิจัยขยะเปลือกทุเรียนเพื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์โพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนและศึกษาการใช้ประโยชน์ที่สามารถใช้เป็นสารช่วยการเตรียมผลิตภัณฑ์ยารูปแบบต่างๆ ผลิตภัณฑ์โพลีแซคคาไรด์เตรียมจากเปลือกของผลทุเรียน ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีชื่อเสียงของประเทศไทย เนื่องจากผลเป็นไม้ที่นิยมรับประทานมากทั้งในและต่างประเทศ ในช่วงฤดูกาลจะมีผลผลิตจำนวนมาก เป็นผลให้มีขยะเปลือกทุเรียนจำนวนมหาศาลที่สามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบได้เหลือเฟือและปัจจุบันผลผลิตของทุเรียนสามารถให้ได้ตลอดทั้งปี การศึกษาสารโพลีแซคคาไรด์สกัดและแยกออกมาจากเปลือกผลทุเรียนได้เป็นผลิตภัณฑ์เจลโพลีแซคคาไรด์ส่วนหนึ่งได้ผลผลิตประมาณ 10% จากเปลือกแห้งและอีกส่วนหนึ่งเป็นผลึกเซลลูโลสได้ผลผลิตประมาณ 29% จากส่วนของกากที่สกัดเอาเจลโพลีแซคคาไรด์ออกแล้ว (2) พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้กว้างในอุตสาหกรรมการเตรียมผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง อาหาร ตลอดจนใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ต่างๆ ของเซลลูโลสได้ งานวิจัยมีความน่าสนใจคือนอกจากการพัฒนาสร้างมูลค่าเพิ่มของขยะเปลือกทุเรียนแล้วยังช่วยลดภาระการกำจัดขยะที่เป็นภาระหนักมากของผู้เกี่ยวข้องอีกด้วย

ผลิตภัณฑ์สารสกัดเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG) พบว่าเป็นสารที่ค้นพบใหม่ จากเปลือกทุเรียนมีคุณสมบัติของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้งชนิดกรัมบวกและกรัมลบได้แก่ S.aureus และ E. coli ผลิตภัณฑ์เจลโพลีแซคคาไรด์เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิดต่อกันเป็นสายยาวหรือต่อแขนง เป็นโมเลกุลใหญ่ มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 500-1,400 กิโลดัลตัล ผลิตภัณฑ์ผงแห้งของเจลโพลีแซคคาไรด์มีคุณสมบัติพองตัวและละลายได้ในน้ำ จับตัวเป็นเจลข้นหนืด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจะมีความหนืดเพิ่มขึ้น มีความคงตัวดีในสภาพ พีเอช เป็นกรดต่ำถึง 2.2 (3,4) ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมในรูปของผงแห้งของเจลโพลีแซคคาไรด์ มีสีขาวนวล ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมในรูปของแผ่นแห้งของเจลโพลีแซคคาไรด์ เป็นแผ่นหนา เบา สีขาว สามารถดูดซับและละลายน้ำได้ง่ายขึ้น ผลิตภัณฑ์เจลโพลีแซคคาไรด์มีคุณลักษณะของสารลดแรงตึงผิวได้เช่นเดียวกับสารโพลีแซคคาไรด์จากธรรมชาติอื่นๆ ได้แก่ เพคตินและกัม ยังพบว่า เจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนมีคุณสมบัติของสารก่อเจลและเป็นสารก่อฟิล์มได้ (5) จึงเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้กว้างในการใช้ช่วยเตรียมผลิตภัณฑ์หลายรูปแบบในอุตสาหกรรมด้านยา เครื่องสำอางและอาหาร ซึ่งสารช่วยเตรียมผลิตภัณฑ์ต่างๆ นี้เกือบทั้งหมดเป็นสารนำเข้าและใช้มากในอุตสาหกรรมดังกล่าว

ผลิตภัณฑ์ผลึกเซลลูโลส (CC) เป็นโพลีแซคคาไรด์ไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดเดียว คือ กลูโคสต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่ สามารถเตรียมผลึกเซลลูโลสได้ตามมาตรฐานของผงเซลลูโลสตามที่กำหนดในเภสัชตำรับ NFXVIII สามารถนำมาผสมตัวยาตอกเป็นเม็ดได้โดยวิธีตอกโดยตรง (direct compression) ได้เม็ดยาที่มีคุณลักษณะตามกำหนดในเภสัชตำรับ เม็ดยามีคุณสมบัติการกระจายตัวได้ดีเปรียบเทียบได้กับการใช้ microcrystalline cellulose ที่ช่วยในการตอกยาเม็ด (6)

ผลิตภัณฑ์โพลีแซคคาไรด์จากเปลือกผลทุเรียน

1. ผลิตภัณฑ์เจลโพลีแซคคาไรด์ เตรียมผลิตภัณฑ์ได้ในรูปแบบเป็นผงแห้งและเป็นแผ่นแห้ง โดยสกัดเจลโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำ ตกตะกอนและทำให้แห้งด้วยความร้อนต่ำ แล้วบดเป็นผงละเอียดหรือทำให้แห้งโดย spray dry ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นผงแห้ง สีขาวนวล เตรียมเป็นแผ่นแห้งโดยวิธีทำให้แห้งโดย freeze dry ได้เป็นแผ่นหนา เบา สีขาว สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น (7.8)

2. ผลิตภัณฑ์ผลึกโพลีแซคคาไรด์ เตรียมผลิตภัณฑ์ได้ในรูปเป็นผงแห้งละเอียด โดยการย่อยด้วยด่างและกรด ล้างและกรองตะกอนผลึกเซลลูโลส อบให้แห้งในอุณหภูมิต่ำและบดละเอียดได้ผงละเอียดสีขาวไม่ละลายน้ำ (6)

3. ศึกษาคุณสมบัติ คุณลักษณะและการใช้ประโยชน์ของสารเจลโพลีแซคคาไรด์และผลึกเซลลูโลสจากเปลือกของผลทุเรียนดังต่อไปนี้

3.1 องค์ประกอบของธาตุประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน ในเจลโพลีแซคคาไรด์และผลึกเซลลูโลส (9,10) ตามลำดับ

3.2 องค์ประกอบน้ำตาลประกอบด้วย อราบิโนส แรมโนส ฟรุกโตส กลูโคสและกาแลกตูโรนิค แอซิด ในเจลโพลีแซคคาไรด์ ส่วนผลึกเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลหนึ่งชนิด คือ กลูโคส (9.10)

3.3 เจลโพลีแซคคาไรด์พองตัวละลายได้ในน้ำให้เป็นเจลข้นหนืด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นความหนืดจะสูงขึ้น มีคุณสมบัติการไหลเป็นรูปแบบ non-newtonian แบบ pseudoplastic flow (4) เมื่อเขย่าความหนืดลดลง เมื่อตั้งทิ้งไว้ความหนืดสูงขึ้น

3.4 สารละลายน้ำความเข้มข้น 3% มีความหนืดประมาณ 600-1,000 เซนติพอยส์ มีความคงตัวได้ดีในกรดจนถึงพีเอช 2.2

3.5 สารละลายน้ำโพลีแซคคาไรด์มีความหนืดสูงขึ้น เมื่อเติมตัวทำลายไม่เกิน 25% แอลกอฮอลล์ (4)

3.6 สารละลายน้ำโพลีแซคคาไรด์มีความหนืดสูงขึ้น เมื่อเติมสารละลายเกลือ ได้แก่ เกลือแคลเซียม แมกนีเซียม (4) เป็นต้น

3.7 สารละลายน้ำโพลีแซคคาไรด์ในความเข้มข้น 0.6-2.5% มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบ เชื้อที่ทดสอบได้แก่ S.aureus และ E. coli. (11) ตามลำดับ

ห้องสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8 เจลโพลีแซคคาไรด์มีคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว นำมาใช้เตรียมผลิตภัณฑ์ ครีม โลชั่นและอิมัลชั่นได้ (4,12)

3.9 แผ่นฟิล์มเตรียมจากเจลทุเรียนมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (11) จากการทดลองในจานอาหารวุ้น

3.10 สารละลายน้ำของเจลทุเรียนสามารถใช้เตรียมเป็นฟิล์มเคลือบเม็ดยาช่วยกลบรสไม่พึงประสงค์ของยาในยาเม็ดเคลือบได้ (2)

3.11 เจลโพลีแซคคาไรด์และผลึกเซลลูโลสจากเปลือกผลทุเรียนสามารถใช้เป็นสารช่วยการกระจายตัวและสารช่วยการตอกยาเม็ดด้วยวิธี การตอกตรง (direct compression) ได้ผลิตภัณฑ์ยาเม็ดที่มีคุณลักษณะตามกำหนดในเภสัชตำรับและเม็ดยามีการกระจายตัวได้ดี (13,14)

สารเจลโพลีแซคคาไรด์ของเปลือกทุเรียนเป็นสารธรรมชาติคล้ายสารพวกเพคติน ซึ่งใช้เป็นสารในส่วนประกอบอาหารได้ มีขนาดโมเลกุลใหญ่และสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดและเอ็นไซม์ในทางเดินอาหาร (15) ทำให้ไม่สามารถถูกดูดซึมในทางเดินอาหารสารนี้จะไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษที่เป็นอันตรายในการนำมาใช้ทั้งภายนอกและภายในร่างกาย จากการตรวจสอบความเป็นพิษในหนูขาวและหนูถีบจักรที่ให้กินเจลโพลีแซคคาไรด์ของเปลือกทุเรียนที่ให้ครั้งเดียวในขนาดสูงถึง 2 กรัม/กก. หรือให้กินระยะยาวติดต่อกัน 60 กัน และ 100 วัน ในขนาด 0.5 กรัม/กก./วัน ไม่พบความเป็นพิษที่เป็นอันตราย (16,17) ดังนั้นการนำเจลจากเปลือกทุเรียนมาใช้ประโยชน์เตรียมผลิตภัณฑ์ยา อาหาร เครื่องสำอาง จึงเชื่อได้ว่าไม่น่ามีผลที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษที่เป็นอันตรายและคาดว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการใช้ในการรักษาหรือประโยชน์ทางการแพทย์รูปแบบต่างๆ ทั้งภายนอกและภายในร่างกายได้

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบน้ำตาลของสารโพลีแซคคาไรด์เจล (polysaccharide gel) และไฟเบอร์ สกัดจากเปลือกทุเรียน
2. ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัด polysaccharide gel ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ เพิ่มเติมจากที่ศึกษาไว้แล้ว
3. ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัด polysaccharide gel ในการใช้เป็นอาหารทางการแพทย์
4. ศึกษาการใช้ประโยชน์ของสารสกัด polysaccharide gel ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ยาหรือเครื่องสำอาง

วัสดุและวิธีวิจัย

1. วัสดุ

1.1 สารเคมี

Citric acid Sodium hexametaphosphate Sodium potassium tartrate tetrahydrate ชนิด Purified grade จาก CARLO ERBA. Potassium hydroxide Copper sulfate Thiourea Potassium fluoride Potassium iodide Soluble starch Magnesium chloride Calcium chloride Potassium chloride Sodium chloride Sodium hydroxide ชนิด GR grade จาก E. Merck Darmstadt, Germany. Ethyl cellulose Diethyl phthalate Titanium dioxide Pyridine Polyethylene glycol Kieselguhr ชนิด purified grade Potassium bromide ชนิด IR grade Silica gel G TLC silica 60 F_{254} TLC plate จาก E. Merck Darmstadt Germany. Cholesterol Maltose monohydrate Calcium gluconate Methyl cellulose Sorbic acid Isopropyl alcohol Galacturonic acid Glucuronic acid ชนิด AR grade จาก Sigma Chemical Co. U.S.A. Glucose Fructose Galactose Mannose Rhamnose Arabinose Xylose Maltose Lactose Sucrose ชนิด analytical reagent grade จาก Fluka-Garantie Switzerland. Ether ชนิด AR grade จาก J.T. Baker Co. O-dianisidine hydrochloride, Ouinine sulfate, Sodium taurocholate of analytical grade, Glucose oxidase enzyme from Asparagus niger (EC 1.1.3.4), Horseradish peroxidase enzyme (EC 1.11.1.7) and dialysis tubing cellulose membrane, MW. cutoff 12,000 เป็นผลิตภัณฑ์จาก Sigma Chemical Co. U.S.A.

Hexane Chloroform Acetonitrile Propan-2-ol Dichloromethane Methanol ชนิด HPLC grade จาก Mallinckrodt. Glycerin Propylene glycol ชนิด pure grade จาก May & Baker Ltd, England. Carboxy methyl cellulose Sodium alginate Cremophore RH 40 Carbomer จากห้างขายยาศรีจันทร์สหโอสถ กทม. Ethanol จากองค์การสุรา กรมสรรพสามิต

Hydroxypropyl methylcellulose E 5 (HPMC E 5), Hydroxypropyl methylcellulose E 15 (HPMC E 15), Propylene glycol (PEG 6000), Magnesium stearate ชนิด pure grade จาก E. Merck Co. Vitamin E acetate Ascorbyl palmitate from Roche Co. ได้รับการเอื้อเฟื้อจาก Rovithai Co.

Sodium chloride Magnesium sulfate Ammonium dihydrogen phosphate Potassium dihydrogen phosphate Dipotassium hydrogen phosphate ชนิด pure grade จาก E. Merck Co. Agar Peptone

from soymeal, Peptone from casein, Tryptic soy agar (TSA), Tryptic soy broth (TSB), Brain heart infusion broth, Brain heart infusion agar, ชนิด purified grade จาก E. Merck Co. Mueller hinton broth, Mueller hinton agar, จาก Difco Laboratories

1.2 ตัวอย่างเปลือกทุเรียน

เปลือกทุเรียนพันธ์หมอนทอง เก็บจากตลาดที่มีการแกะเปลือกทุเรียนขายเป็นทุเรียนจากสวน จังหวัดระยอง จันทบุรี และชุมพร

1.3 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียได้แก่ แบคทีเรียกรัมบวก เช่น Staphylococcus aureus ATCC 6538P Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, Bacillus subtilis ATCC 6633 Lactobacillus plantarum ATCC 14917 Lactobacillus pentosus ATCC 8041 และแบคทีเรียกรัมลบ เช่น Escherichia coli ATCC 25922 Proteus vulgaris ATCC 13315 Pseudomonas aeruginosa ATCC 9721

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดใน Tryptic Soy Agar (TSA) slant ที่ 37^{0}ซ ทิ้งไว้ค้างคืน ยกเว้นเชื้อ Lactobacillus เพาะเลี้ยงใน Brain heart infusion agar (BHIA) ที่มี 0.3% Yeast ล้างเชื้อแบคทีเรียออกจากผิวของ agar slant ด้วย sterile normal saline solution (NSS) และปรับ cell culture ให้มี turbidity ตรงกับ standard McFarland no. 0.5 ก่อนนำมาใช้ทดลอง

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.4.1 Tryptic soy agar (TSA) ใน media 1 ลิตรประกอบด้วย Peptone from casein 17.0 g Peptone from soy meal 3.0 g Sodium chloride 5.0 g Agar 15.0 g ปรับ pH 7.3 $\pm$ 0.2

1.4.2 Mueller hinton broth (MHB) ใน media 1 ลิตร ประกอบด้วย Beef extract powder 2.0 g Casein hydrolysate 17.5 g Soluble starch 1.5 g

1.4.3 Mueller hinton agar (MHA) ใน media 1 ลิตร ประกอบด้วย Beef extract powder 2.0 g Casein hydrolysate 17.5 g Soluble starch 1.5 g Agar 13.0 g ปรับ pH 7.4 $\pm$ 0.2

1.4.4 Brain heart infusion broth (BHIB) ใน media 1 ลิตร ประกอบด้วย Nutrient substrate (extracts of brain and heart and peptone) 27.5 g D(+) glucose 2.0 g Sodium chloride 5.0 g Di-potassium hydrogen phosphate 2.5 g ปรับ pH 7.4 $\pm$ 0.4

1.4.5 Brain heart infusion agar (BHIA) ใน media 1 ลิตร ประกอบด้วย Nutrient substrate (extracts of brain and heart and peptone) 27.5 g D(+) glucose 2.0 g Sodium chloride 5.0 g Di-potassium hydrogen phosphate 2.5 g Agar 15.0 g ปรับ pH 7.4 $\pm$ 0.4

2. วิธีวิจัย

2.1 การสกัดแยกสารเจลทุเรียน polysaccharide gel (PG)

สารเจลทุเรียน (PG) สกัดจากเปลือกแห้งของทุเรียน *(Durio zibethinus L.)* ซึ่งเป็นวิธีการพัฒนาจากวิธีการสกัดจากเปลือกสดตามวิธีของ Pongsamart and Panmaung (1998)

2.2 การสกัดแยกสารไฟเบอร์ทุเรียน (polysaccharide fiber PF)

สารไฟเบอร์ทุเรียน (PF) แยกจากกากเปลือกทุเรียนที่เหลือจากการสกัดเจลทุเรียนออกแล้ว ตามวิธีของ สุนันท์ พงษ์สามารถ และคณะ (2544)

2.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบน้ำตาลของเจลทุเรียน (PG) และไฟเบอร์ทุเรียน (PF)

2.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุหลัก (Elemental analysis)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุหลัก (Elemental Analysis) ของธาตุต่างๆ ได้แก่ C H N S และ O โดยนำสาร polysaccharide gel (PG) ส่วนที่สกัดด้วยน้ำหลังการ treat ด้วย oxalic acid และสาร polysaccharide fiber (PF) มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของธาตุ C,H,N,S และ O โดยใช้เครื่อง CHNS/O analyzer (Perkin Elmer PE 2400 Series II) หลังจากอบตัวอย่าง 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 105^{0}C นาน 5 ชั่วโมงและนำไปวิเคราะห์หาธาตุ C H N S และ O

2.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของเกลือแร่ (Mineral analysis)

การวิเคราะห์ส่วนประกอบของเกลือแร่ (Mineral Analysis) (18) ทำการตรวจวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างสาร polysaccharide gel (PG) และ สาร polysaccharide fiber (PF) มาวิเคราะห์หาสารเกลือแร่โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) ชั่งตัวอย่าง 2 กรัมใส่ใน porcelain crucible

(2) เติมกรดกำมะถันเข้มข้น (Conc.H_2SO_4) จนตัวอย่างเปียก

(3) เผาให้ร้อนบน hot plate จนหมดควัน เติมกรดไนตริก 2 ม.ล. และกรดกำมะถัน

เข้มข้น 5 หยด ให้ความร้อนต่อจนหมดควัน

(4) นำไปเผาต่อในเตา เผาที่อุณหภูมิ 550^{0}C จนเผาไหม้สมบูรณ์ได้เถ้าสีขาวจึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

(5) นำไปย่อยโดยการเติมกรดเกลือ (6M HCI) 4 ม.ล. ปิดฝาแล้วต้มให้ร้อนบนอ่างน้ำร้อน (water bath) เป็นเวลา 15 นาที จึงเปิดฝาออกแล้วต้มต่อจนแห้ง เติมกรดเกลือ 1 หยด และน้ำ 10 ม.ล. ต้มให้ร้อนต่อ2 นาทีจึงปรับ pH ให้เป็นด่างด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6M NH_4OH)

(6) เจือจางด้วยน้ำเป็น 25 ม.ล. จึงปรับ pH เป็น 3-4 ด้วยกรดน้ำส้ม (1M CH_3COOH) กรองผ่านกระดาษกรองแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 50 ม.ล.

(7) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrometer (Varian, Spectr AA-300)

2.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น เถ้าและเส้นใย

การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (19) ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF) นำมาวิเคราะห์โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในจานแก้วที่มีฝาปิด ซึ่งได้ทำความสะอาดและอบความร้อนจนแห้งและมีน้ำหนักคงที่ไว้แล้ว

(2) อบตัวอย่างที่ 105^{0}C นาน 3 ชั่วโมงใน hot-air oven นำออกมาทิ้งให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ (Desiccator) บันทึกน้ำหนัก

(3) อบตัวอย่างซ้ำที่ 105^{0}C จนได้น้ำหนักคงที่ และคำนวณหาปริมาณความชื้น

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า</u> (20) นำตัวอย่าง polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF) นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเถ้าโดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ใน porcelain crucible ที่ทราบน้ำหนักแล้ว

(2) หยดกรดกำมะถันเข้มข้น (Conc.H_2SO_4) จนตัวอย่างเปียก นำไปเผาให้ร้อนบน hot plate เผาตัวอย่างไหม้จนหมดควัน

(3) นำไปเผาต่อในเตาเผา (muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 550^{0}C จนเผาไหม้สมบูรณ์เหลือเถ้าสีขาว

(4) นำออกมาทิ้งให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ (desiccator) บันทึกน้ำหนักและคำนวณหาปริมาณเถ้า

<u>การวิเคราะหาปริมาณเส้นใย</u> วิเคราะห์หาปริมาณเส้นใย (Fiber) (21) โดยทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF) วิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยโดยมีขั้นดังนี้

(1) ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม เติม 1.25% H_2SO_4 200 มล. นำไป reflux นาน 30 นาที

(2) นำไปกรองและล้างด้วยน้ำเดือดจนเป็นกลาง

(3) นำกากที่ได้จากการกรองใส่ใน beaker แล้วเติม 1.25% NaOH 200 มล. นำไป reflux อีก 30 นาที

(4) นำมากรองแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำเดือดและล้างด้วยแอลกอฮอล์

(5) นำตะกอนเส้นใยที่เหลือไปอบที่ 100-105^{0}ซ นาน 3 ช.ม. นำไปชั่ง และนำไปอบอีก 15 นาที แล้วชั่ง ทำเช่นนี้จนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่บันทึกน้ำหนัก

(6) ล้างเส้นใยในภาชนะออกจนหมด แล้วนำไปอบที่ 100-105^{0}ซ แล้วชั่งจนได้น้ำหนักคงที่บันทึกน้ำหนัก

(7) นำน้ำหนักที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเส้นใย

2.3.4 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบน้ำตาล

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลในสารสกัด PG และ PF หลังการทำ acid hydrolysis ใน N HCl (22) และตรวจวิเคราะห์หาน้ำตาลด้วยเทคนิค TLC (23) และ HPLC ดังต่อไปนี้

(1) เตรียมสาร Polysaccharide 100 มก. และ 200 มก. LiCl ละลายใน 2 N HCl 3 มล. ทำการ hydrolysis ที่ 70^{0}C เป็นเวลา 6 ชม.

(2) ละเหยน้ำและกรดจนเกือบแห้งให้กรดระเหยออกหมด เติมน้ำกลั่น 2 มล. กรองเอาส่วนน้ำใส

(3) ล้างตะกอนและรวบรวม filtrate ทั้งหมดมาระเหยเกือบแห้งและเติมน้ำ 1 มล. ทำซ้ำจนสารละลายหมดฤทธิ์กรด

(4) ละเหยสารละลายจนเหลือ 0.5 ml นำ acid hydrolyzate ของสารสกัด PG และ PF ไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยเทคนิค TLC และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับ standard sugar ได้แก่ glucose mannose galactose fructose rhamnose arabinose xylose maltose lactose sucrose galacturonic acid glucuronic acid เป็นต้น และวิเคราะห์สารตัวอย่าง Polysaccharide fiber เปรียบเทียบกับสาร standard microcrystalline cellulose.

(5) การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยเทคนิค TLC บน silica gel G เคลือบบนแผ่น aluminum plate เลือก Solvent system ของ mobile phase ประกอบด้วย acetone : methanol : water (15 : 2 : 3) สำหรับการวิเคราะห์ PF และ Solvent system ประกอบด้วย ethylacetate : acetic acid : water (4 : 2 : 3) สำหรับการวิเคราะห์ PG การวิเคราะห์น้ำตาลใน PF และ PG ใช้ spray reagent เป็น 2% 1-naphthol ใน 95% ethanol และ 4% sulfuric acid เป่าลมร้อนให้ร้อน 100^{0}ซ จนเกิดสี วัดความสูงของ spot และ solvent front เพื่อคำนวณค่า Rf value ของจุดตัวอย่างเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน

(6) การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC (Shimudzu, LC-3 A) ใช้ amino column และ 90% acetonitrile ในน้ำเป็น mobile phase ที่ flowrate 1.8 ml/min ที่อุณหภูมิห้องใช้ RI detector

2.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณของ galacturonic acid ใน PG

วิเคราะห์ปริมาณ galacturonic acid โดยวิธี colorimetric method และโดยวิธี Infrared spectrometer Analysis ดังนี้

Colorimetric method ปริมาณของน้ำตาล uronic acid ในสารสกัด PG ได้แก่ galacturonic acid โดยทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีกับ carbazole หรือ m-hydroxydiphenyl reagent (24)

Infrared Spectrometer Analysis วิเคราะห์หาปริมาณของ galacturonic acid ในผงแห้งของ PG โดยการวัด peak area ของ peak COO^{-} ที่ช่วง 1650-1550 cm^{-1} เปรียบเทียบกับ standard galacturonic acid โดยใช้ผง PG 1 มก. ตอกในเม็ด KBr disc และ galacturonic acid ปริมาณต่างๆ ตอกในเม็ด KBr disc

(1) ผสม 1 ส่วนของ PG กับ 100 ส่วนของผงละเอียดแห้งของ KBr บดผสมกันในโครง่แก้วจนเข้ากันดี

(2) ใส่ผง PG ผสม KBr ลงใน die ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มม.แล้วตอกอัดเป็นเม็ดด้วย Quik Handi-Press เป็นเม็ด KBr pellet

(3) นำเม็ด PG ใน KBr pellet ไปวัดค่า IR spectram ด้วยเครื่อง FTIR spectrometer (Perkin Elmer, model spectrum 2000) ที่ความยาวคลื่น 400-4000 cm^{-1}

(4) วิเคราะห์หาปริมาณของ glacturonic acid ใน PG โดยเปรียบเทียบกับ Standard galacturonic จากค่า peak area กับปริมาณต่างๆ ของ galaclacluronic acid ได้แก่ 0.25, 0.4 0.65, 0.85 และ 1 มก. นำมาเขียนกราฟ ระหว่าง peak area กับน้ำหนัก (มก.) ของ galacturonic acid วัดปริมาณ

ของ galacturonic acid ใน PG จากค่า peak area ของ PG เทียบกับ calibration curve ของ standard galacturonic acid

2.4 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ PG และ PF

2.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างจากรูปแบบของ IR spectrum

เตรียมตัวอย่างแห้งของสารสกัด PG และ PF น้ำหนัก 1 มก. ผสมผงละเอียด 100 มก. ของ KBr บดผสมให้เข้ากันในโกร่งแก้ว นำไปอัดเป็นเม็ดแบนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มม. ด้วย เครื่องอัดไฮโดรลิค Qwik Handi-Press นำ KBr pellet ไป Scan IR spectram ด้วยเครื่อง FTIR Spectrometer (Perkin Elmer, FTIR Spectrum 2000) ช่วยคลื่น 400-4000 cm^{-1} เปรียบเทียบ Infrared spectra pattern ระหว่าง PG และ PF

2.4.2 การวิเคราะห์ดัชนีความเป็นผลึกจาก X-ray patterns

วิเคราะห์ตัวอย่าง PG และ PF ด้วยเครื่องตรวจผลึก X-ray diffractometer (JEOL XRD JDX-8030 JAPAN) ใส่ตัวอย่างใน sample holder แล้วทำการวัด X-ray diffraction profile โดยใช้ ω-20 scanning mode ภายใต้ monochromatic Cu K_α radiation ที่ scanning rate 1.6^0 2θ/min ในช่วง $5\text{-}55^0$ 2 θ ที่ 35 mA และ acceleration voltage 45 kV

2.4.3 การวิเคราะห์ค่า Particle size distribution

นำผงแห้งของ PG และ PF ที่ผ่านแร่งขนาด 80 mesh มาตรวจวัดหาค่า particle size ด้วยเครื่อง Master size S เปรียบเทียบ patterns ของ particle size distribution ของ PG และ PF

2.4.4 ผลของความเข้มข้นต่อความหนืดของ PG

ทดสอบความหนืดของ PG ของสารละลาย PG ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.25 0.50 0.75 1.50 2.00 และ3.00% PG นำมาวัดความหนืดด้วยเครื่อง Viscometer (Rheology International U.S.A.) ทำการวัดซ้ำในความเข้มข้นเดียวกัน 3 ครั้ง คำนวณหาค่าเฉลี่ยของความหนืดแต่ละค่านำมา plot กราฟระหว่างค่าความหนืดกับค่าความเข้มข้นหาความสัมพันธ์ระหว่าง ความหนืดกับค่าความเข้มข้นของ PG

2.4.5 ผลของความเข้มข้นของ PG และค่า pH

วัดค่า pH ของสารละลาย PG ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเครื่อง pH meter นำค่ามา plot กราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย PG กับ ค่า pH

2.4.6 ผลของ acid-base ต่อความหนืดของ PG

นำสารละลายในน้ำกลั่นของ PG ความเข้มข้น 3% และ 4% มาวัดค่าความหนืด ที่ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 1-9 โดยปรับค่า pH ด้วย M NaOH หรือ HCl วัดความหนืดที่ pH ต่างๆ แล้วนำค่าของความหนืดและ pH มา plot กราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับความหนืดของ PG

2.4.7 ผลของ electrolytes ต่อความหนืดของ PG

นำสารละลาย PG ในน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้น 3% มาวัดความหนืดและเติมสารละลาย electrolyte ได้แก่ NaCl KCl $MgCl_2$ หรือ $CaCl_2$ ให้มีความเข้มข้นต่างๆของสารละลาย electrolyte ที่ 0-0.4 M. วัดความหนืดที่ความเข้มข้นต่างๆ นำมา plot กราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ electrolyte กับความหนืดของ PG

2.4.8 ผลของตัวทำละลายต่อความหนืดของ PG

นำสารละลาย 3% PG ในน้ำกลั่นมาวัดค่าความหนืด และเติมตัวทำละลายได้แก่ ethanol หรือ isopropanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0-30% ในสารละลาย PG นำค่าความหนืดกับค่าความเข้มข้นของตัวทำลายมา plot กราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวทำละลายกับความหนืดของ PG

2.4.9 ผงของสารช่วยให้ความชุ่มชื้น (humectant) ต่อความหนืดของ PG

นำสารละลายน้ำ 3% PG มาวัดความหนืด แล้วเติมสาร humectant แต่ละชนิดได้แก่ glycerin หรือ propylene glycol ในความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ที่ 0-50% นำมาวัดความหนืดในความเข้มข้นต่างๆ ของสาร humectant นำมา plot กราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร humectant และความหนืดของสารละลาย PG

2.4.10 ผลของสารกันบูดต่อความหนืดของ PG

นำสารละลายในน้ำ 3% PG มาวัดความหนืด แล้วเติมสารกันบูด แต่ละชนิดได้แก่ paraben benzoic acid หรือ sorbic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ที่ 0-5% และวัดความหนืดที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารกันบูด นำค่ามา plot กราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น ของสารกันบูด และความหนืดของสารละลาย PG

2.4.11 ผลของความร้อน ต่อความหนืดของ PG

ทำการทดลองในสารละลายน้ำ 3% และ 4% PG วัดความหนืดของสารละลาย PG ที่อุณหภูมิห้อง (Ambient temperature) นำสารละลาย PG ไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ ที่ 50^{0}ซ 70^{0}ซ และ 100^{0}ซ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง วัดความหนืดขณะร้อน แล้วปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้ววัดความหนืดซ้ำ เปรียบเทียบความหนืดของสารละลาย PG ก่อนการให้ความร้อน ในขณะร้อนและภายหลังตั้งทิ้งให้เย็น ดูการเปลี่ยนแปลงของความหนืดที่เมื่อให้ความร้อนอุณหภูมิ 50 70 และ 100^{0}ซ

2.5 คุณสมบัติทางชีวภาพของ PG

2.5.1 คุณสมบัติของสารละลาย PG ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ agar และ broth media ในน้ำ นำไป sterilize ใน autoclave นาน 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ (121^{0}ซ) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Mueller hinton agar (MHA) และ Brain heart infusion agar (BHIA) ในการทดลอง agar diffusion susceptibility test ใช้อาหาร MHA กับแบคทีเรียที่ทดสอบทุกชนิดยกเว้น Lactobacillus ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA ที่มี 0.3% yeast ส่วนการทดลอง broth macrodilution susceptibility test ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Mueller hinton broth (MHB) และ Brainheart infusion broth (BHIB)

<u>การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar diffusion susceptibility test (25,26)</u>

หลักการ ทดสอบฤทธิ์ของสาร polysaccharide gel (PG) ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยหยอดสารในความเข้มข้นต่างๆลงใน Cylinder cup ที่วางบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ละชนิด ดูผลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (Inhibition zone)

วิธีทำ

(1) เตรียมสารละลาย polysaccharide gel (PG) ในความเข้มข้น 5 2.5 1.25 0.625 และ 0.32% ใน NSS

(2.) เตรียมซัสเพนชันของเชื้อแต่ละชนิด (S. *aureus* ATCC 6538P S. epidermdis ATCC 12228 B.subtilis ATCC 6633 L. plantarum ATCC 14917 L. pentosus ATCC 8041 *E. coli* ATCC 25922, P. vugalis ATCC 13315 และ Ps. aeruginosa ATCC 9721) ที่มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland no. 0.5

(3.) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (ที่หลอม และทำให้อุ่นที่ 55^{0}ซ) ลงในเพลท ปริมาณ 25 มล./เพลท ตั้งทิ้งไว้ในแข็ง เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (ที่หลอมและทำให้อุ่นที่ 55^{0}ซ) ที่ผสมเชื้อแต่ละชนิดในข้อ (2) ปริมาตร 1% v/v โดยเททับลงบนอาหารชั้นแรกที่แข็งแล้ว

(4.) วาง Cylinder cup ลงบนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ

(5.) หยอดสารละลาย polysaccharide gel (PG) จากข้อ (1) ลงในแต่ละ cup 300 µl/cup (ใช้ NSS หยอดเป็น control) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงให้เกิด pre-diffusion

(6.) บ่มเชื้อที่ 37^{0}ซ สำหรับแบคทีเรีย นาน 24-48 ชม. ดูผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) ทำการทดลองซ้ำ 3 เพลท

<u>การทดลองการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Broth macrodilution susceptibility test (26,27)</u>

2.5.1.1 การทดลองหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC)

ทำการทดลองโดยวิธี Broth macrodilution test โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ broth media ปริมาตร 4.5 มล. ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ของ PG ที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าตามลำดับจาก 0.1-25.6 mg./ml. เติม 0.5 มล. ของ suspension ของเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี PG เป็น culture control ค่า MIC ของ PG ได้จากค่าความเข้มข้นของ PG ในหลอดทดลองค่าต่ำสุดที่มองไม่เห็นการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นหลังการบ่มเชื้อที่ 37^{0}ซ 24 ชม. เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดของ PG ที่ห้ามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่มองเห็นด้วยตาเปล่าจะเห็นใสไม่ขุ่น ค่า MBC ของ PG ได้จากการทำ subculture จากหลอดทดลองที่ไม่เห็นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือหลอดที่เห็นใสไม่ขุ่นนั้น ลงในอาหารวุ้นที่ไม่มี PG นำไปบ่มที่ 37^{0}ซ นาน 24 ชม. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ PG ในหลอดทดลองที่ไม่ทำให้เกิดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยมองไม่เห็น colony เจริญในจานอาหารวุ้น คือค่า MBC ของ PG ต่อเชื้อแบคทีเรีย

2.5.1.2 Time-kill analysis

เป็นการวัดอัตราความเร็วของการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยสารละลาย PG ที่ทดสอบเพิ่มเติมจากการหาค่า MBC ทำการทดลองโดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PG ในความเข้มข้นต่างๆ จากน้อยไปมาก เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ที่ความเข้มข้น 0.3-5% PG นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 24 ชม. และที่เวลา 0 2 4 8 12 16 20 และ 24 ชม. นำ bacteria culture ปริมาตร 1 มล. ออกมาทำการเพาะเลี้ยงให้กระจายบนจานอาหารวุ้นและนับจำนวน colonies ของเชื้อ โดยวิธี drop plate method (25) คำนวณค่า colony forming unit (CFU) ใน 1 มล. ของ bacteria culture นำมา plot กราฟระหว่าง ค่า log viable count ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml.) กับ time ทดลองเปรียบเทียบกับ control โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี PG และ NSS ดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PG

2.5.1.3 ผลของ PG ต่อการเร่งการฆ่าเชื้อแบคทีเรียใน Normal saline

ตรวจสอบผลของ PG ต่อการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียในสารละลาย NSS ที่มี PG ในความเข้มข้น0.02-2.5% บ่มเชื้อแบคทีเรียที่ 37°ซ นาน 7 วัน โดยนำ 1มล. ของ bacteria culture มาเพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้นเพื่อนับจำนวน colony ทุกวันเป็นเวลานาน 7 วัน นำมาค่า CFU/ml และเวลามา plot กราฟ เพื่อตรวจสอบอัตราการตายของเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับการอยู่รอดของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในสารละลาย NSS ที่มี glucose ที่มีความเข้มข้น 0.02-2.5 %

2.5.1.4 ผลของ PG ต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

ตรวจสอบผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของ PG ในสารละลาย normal saline solution (NSS) ในความเข้มข้นที่ทำให้ เชื้อตายหมดหลังการบ่มเชื้อที่ 37°ซ ใน 24 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบดูผลของ PG ต่อ cell surface ของเชื้อแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทัศน์ Scanning electron microscope (JEOL JSM 541 OLV) ตามวิธีมาตรฐานการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

2.5.2 คุณสมบัติของ PG ต่อการต้านการย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase (28)

โดยมีหลักการ คือ เอนไซม์ α-amylase สามารถย่อยแป้งได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ คือ dextrin และ maltose ที่มีปลายรีดิวส์ ตรวจสอบการย่อยแป้งที่เหลือเป็นโมเลกุลเล็กลงโดยการทดสอบสีน้ำเงินจนถึงม่วงแดงซึ่งขึ้นกับความสั้นหรือยาวของสายโพลี่แซคคาไรด์ที่เกิดปฏิกิริยากับ iodine solution (29) ตรวจการย่อย α-1,4 glycosidic linkage ซึ่งจะให้หมู่ reducing end ของน้ำตาล

ที่เกิดขึ้นหลังการย่อยโดยเอนไซม์โดยวิธี O-Toluidine Method (30) ทำการทดลองความสามารถในการย่อย PG ด้วย α-amylase และตรวจวัดผลการย่อยของเอนไซม์

Iodine solution test ใช้ตัวอย่าง 4% PG ใน 0.1 M citrate buffer pH 6 นำมา 1 มล. และเติมเอนไซม์ 50 ยูนิต ทิ้งให้ย่อยด้วย α-amylase ใน water bath 37^{0}C นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปแช่ในน้ำเย็น และวิเคราะห์ผลการย่อยที่เวลา 0 นาที และ 30 นาที โดยการทดลองการเกิดสีกับน้ำยา iodine solution ทำการทดลองโดยใช้ soluble starch เป็น control และ น้ำกลั่น เป็น blank

O-Toluidine test ทดสอบสารโพลีแซคคาไรด์ PG ทั้งก่อนและหลังจากการย่อยด้วย α-amylase เพื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่มีปลาย reducing end ที่ C_1-OH โดยนำตัวอย่าง 4% PG ใน 0.1 M citrate buffer pH 6 ที่ถูกย่อยด้วย α-amylase 50 Units ที่ 37^{0}ซ นาน 30 นาที ภายหลังการย่อยนำตัวอย่างจำนวน 0.5 มล. เติม 6% TCA 0.5 มล. กรองหรือ centrifuge เอาน้ำใส 0.5 ml เติม 4.5 มล. O-Toluidine reagent (Thiourea 1.5 กรัม ใน gacial acetic acid 940 มล. เติม O-Toluidine 60 มล.) ต้ม 8 นาที ในน้ำเดือดตั้งทิ้งให้เย็นแล้ววัดสีที่ OD 630 หาปริมาณน้ำตาลเปรียบเทียบกับ Standard maltose

2.5.3 คุณสมบัติของ PG ที่ทนต่อการย่อยด้วยกรด HCl เจือจาง

ทดสอบคุณสมบัติของ PG ที่ทนต่อการถูกย่อยด้วยกรดเกลือของกระเพาะอาหารในความเข้มข้นต่างๆ ที่ 0.01-0.1 M. HCl ใน 2% PG solution แล้วอุ่นใน water bath ที่ 37^{0}ซ นำมาทดสอบด้วย Iodine solution test ตรวจสอบหาสาร polysaccharide ใน PG หลังการย่อยในกรดที่เวลา 0 0.5 1 และ 4 ชม. ดูการเกิดสีม่วงของ polysaccharide ของ PG

2.5.4 คุณสมบัติความสามารถของ PG ในการกักเก็บน้ำตาล glucose และ sucrose

ทดสอบผลของ PG ในการกักเก็บสารอาหารประเภทน้ำตาล โดยวิธี dialysis technique และวิเคราะห์น้ำตาลที่ถูกต้องกักเก็บไว้ภายในถุง dialysis และที่ผ่านออกมาภายนอกถุง dialysis

2.5.4.1 การทดสอบคุณสมบัติของ PG ในการกักเก็บน้ำตาล glucose โดยวิธี dialysis technique โดยใช้ semipermeable membrane และวิเคราะห์น้ำตาลโดย calorimetric method

(1) เตรียม test mixture ในปริมาตร 6 มล. ประกอบด้วย 1% glucose ผสมกับสารละลาย PG ในความเข้มข้นที่ 0.5-3% ทำซ้ำ 3 ครั้งในหนึ่งความเข้มข้น

(2) บรรจุในถุง dialysis ของ cellulose acetate membrane ซึ่งมีขนาดของ pore ที่ยอมให้โมเลกุลต่ำกว่า MW. 12,000 ดัลตันผ่านได้และได้แช่ไว้ในน้ำและใน Ringer buffer pH7 ไว้ให้อ่อนตัวแล้วมัดปลายทั้งสองข้างของ dialysis membrane

(3) นำไป dialysis ใน Ringer buffer pH7 ปริมาตร 10 เท่า นาน 2-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายภายในถุง dialysis และภายนอกถุง dialysis มาวิเคราะห์หาปริมาณ glucose ที่อยู่ภายในและที่ออกมาภายนอกเปรียบกับ control ที่ 0%PG

(4) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล glucose โดยวิธี calorimetric method โดยปฏิกิริยา enzyme reaction ของ glucose oxidase (31)

a) ใช้ตัวอย่างวิเคราะห์ glucose 0.4 มล. ใน Ringer buffer (pH 7.0) เติม 0.2 มล. น้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เติม reagent ต่อไปนี้ คืออย่างละ 1 มล. ของ glucose oxidase (5 mg/ml) peroxides (0.375 mg/ml) และ O-dianisidine -HCl (13.32 mg/ml) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่ 37°ซ นาน 10 นาที และหยุดเอนไซม์โดยเติม 0.5 มล. Conc. H_2SO_4 ผสมให้เข้ากันทิ้งให้เย็นแล้วนำไปวัดสี purple-red color ที่ 543 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer เปรียบเทียบค่า absorbance กับ standard curve ของ glucose เพื่อคำนวณหาปริมาณของ glucose ในตัวอย่างที่วิเคราะห์

b) การทดสอบเบื้องต้นวิเคราะห์หาปริมาณ glucose โดยใช้ glucose oxidase/mediator reaction test strips และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Accutrend meter GCT โดยหยดตัวอย่างวิเคราะห์ glucose 20 µl ลงบน test pad และวัดด้วยเครื่องซึ่งแสดงค่าน้ำตาล glucose เป็น mg/100 ml

(5) เปรียบเทียบผลของการกักเก็บน้ำตาล glucose ของ PG เปรียบเทียบกับ polysaccharide glucomannan ที่ใช้เป็น standard polysaccharide ที่กักเก็บน้ำตาลในการทดลองนี้

2.5.4.2 การทดสอบคุณสมบัติของ PG ในการกักเก็บน้ำตาล sucrose โดยวิธี dialysis technique โดยใช้ semipermeable membrane และวิเคราะห์น้ำตาล sucrose โดย HPLC

(1) เตรียม test mixture ในปริมาตร 6 มล. ประกอบด้วย 1%sucrose ผสมกับสารละลาย PG ให้มีความเข้มข้นต่างๆในช่วง 0.5-3% ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7 ทำการทดลอง

การกักเก็บน้ำตาล sucrose โดยวิธี dialysis ใช้ semipermeable membrane cellulose acetate เช่นเดียวกับการทดลองกับน้ำตาล glucose ข้อ 2.5.4.1 ตามวิธีข้อ (1)-(3)

(4) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล sucrose โดยวิธี HPLC นำตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาล sucrose ภายในถุง dialysis membrane มาตกตะกอน PG ใน 60% ethanol นำไปปั่นให้ตกตะกอน นำส่วนน้ำใสมาเหยให้แห้ง เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 6 มล. นำไปกรอง แล้วนำ filtrate ไปวิเคราะห์หาปริมาณ sucrose ด้วย เครื่อง HPLC (Shimadzu Japan) เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาล sucrose ที่อยู่ภายนอกถุงและภายในถุง dialysis bag จากค่า peak area ของ standard sucrose การวิเคราะห์ใช้ normal phase HPLC system column Lichrosphere NH_2 bonded silica (5 μm) column ขนาด 2.5 cmx 4 mm ID ใช้ 80% acetonifrile ในน้ำกลั่นเป็น mobile phase ที่ flow rate 1.8 ml/min ใช้ refractive index detector

2.5.4.3 การทดสอบคุณสมบัติของ PG ในการกักเก็บ glucose โดยวิธี dialysis technique โดยใช้ลำไว้เล็กหนูกลับด้าน (32)

(1) เตรียมลำไส้ของหนูขาวเพศผู้พันธ์ Wista โดยใช้ small intestine ส่วนของ jejunal (เป็นส่วนของลำไส้เล็กต่อจากความยาวประมาณ 10 cm ของ duodenum จากกระเพาะอาหาร ซึ่งเห็นมีเส้นเลือดไปเลี้ยงอยู่มากมีความยาวประมาณ 90-130 cm) โดยทำให้หนูหมดสติด้วยวิธี dislocated และผ่าตัดเปิดช่องท้อง ผ่าตัดเอาลำไส้ส่วน jejunum แช่ไว้ใน Ringer buffer (pH 7.0) แช่เย็นและให้ oxygen gas จนกว่าจะนำมาทดลอง

(2) การทดลองทำโดยกลับลำไส้เล็กเอาด้านในออก ตัดลำไส้ให้มีความยาวประมาณ 7 cm ผูกปลายด้านหนึ่งให้แน่นด้วยเส้นเชือกให้เป็นถุง แล้วบรรจุ 2 มล. Ringer buffer (pH 7.0) ในถุงแล้วผูกปลายอีกด้านให้แน่น

(3) นำไปใส่ในภาชนะ dialysis ที่มีสารละลาย 1% glucose ใน 0% 2% และ 3%PG ใน Ringer buffer (pH 7.0) ปริมาตร 60 มล. วางภาชนะใน Organ bath ที่อุณหภูมิ 37°ซ และเติม oxygen ในภาชนะ dialysis ที่แช่ลำไส้เล็ก แต่ละการทดลองทำซ้ำ 4 ตัวอย่าง ใช้เวลาให้ dialyze นาน 1 ชม. นำถุง jejunum sac ออกมาโดยใช้ syringe และเข็มฉีดยาดูดเอา buffer ที่บรรจุไว้ในถุงลำไส้ออกมาให้หมด นำสารละหลายออกมาวิเคราะห์หาปริมาณ glucose ที่ถูกดูดซึมผ่านจากด้านในของลำไส้ที่สัมผัส mixture ของ PG ที่มี 1% glucose ที่เข้ามาอยู่ภายในถุงซึ่งเป็นด้านนอกของลำไส้ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล glucose โดยวิธี colorimetric method ใช้ enzymatic reaction ของ glucose oxidase test

2.6 การใช้ประโยชน์ของสาร polysaccharide gel ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ยาหรือเครื่องสำอาง

2.6.1 คุณสมบัติการไหล (Rheology) ของ polysaccharide gel (PG)

วัดค่า viscosity ของสารละลาย PG ในความเข้มข้นต่างๆ ที่ 1-5% PG ด้วยเครื่อง viscometer (Rheology International USA) นำค่า rate of shear (rpm) และ shearing stress (dynes/cm^2) จากการวัดค่าของสารละลายที่ 3 และ 4% PG มา plot กราฟ เพื่อประเมินคุณสมบัติการไหลของ PG (33)

2.6.2 การเตรียมตำรับเจลจาก PG

เตรียมผลิตภัณฑ์ PG gel ใช้ทาภายนอก โดยมีสูตรตำรับดังนี้

สูตรตำรับ PG gel 100 มล. ประกอบด้วย

PG	2.5	กรัม
Propylene glycol	15.0	มล.
Paraben cencentrate*	1	มล.
Ringer's buffer concentrated**	20.0	มล.
Distilled water เติมจนครบปริมาตร		

*Paraben concentrate ประกอบด้วย methylparaben 2% และ propylparaben 0.2% ใน propylene glycol

**Ringer's buffer concentrated ประกอบด้วย 735 mM sodium chloride, 14.85 mM calcium choride และ 20.10 mM potassium chloride

วิธีเตรียมตำรับ PG gel

(1) นำผง PG โปรยลงในน้ำประมาณ 50 มล. กวนให้กระจายเป็นเนื้อเดียว

(2) เติม Propylene glycol ลงใน aqueous PG กวนให้เข้ากัน

(3) เติม Ringer's buffer ลงใน PG mixture กวนให้เข้ากัน

(4) เติม Paraben concentrate 1 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ ปริมาตร 100 มล. กวนผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.3 การเตรียมตำรับ Vitamin E gel โดยใช้ PG เป็นสารช่วยการเตรียมตำรับเจล

การพัฒนาตำรับเจลโดยใช้ PG เป็น gelling agent โดยมีสูตรตำรับต่อไปนี้

3.6.3.1 สูตรตำรับ E gel 1-PG 2.5 ในตำรับ 100 มล. ประกอบด้วย

Vitamin E acetate	1.0	กรัม
PG	2.5	กรัม
Cremophore RH-40	10.0	มล.
Propylene glycol	15.0	มล.
Calcium chloride 50 mM	4.0	มล.
Triethanolamine ปรับ pH	5	
Paraben concentrate*	1.0	มล.
Distilled water เติมจนครบปริมาตร		

3.6.3.2 สูตรตำรับ E gel 2-PG 3.0 ในตำรับ 100 มล. ประกอบด้วย

Vitamin E acetate	1.0	กรัม
PG	3.0	กรัม
Cremophore RH-40	10.0	มล.
Propylene glycol	15.0	มล.
Calcium chloride 50 mM	4.0	มล.
Triethanolamine ปรับ pH	5	
Paraben concentrate*	1.0	มล.
Distilled water เติมจนครบปริมาตร		

3.6.3.3 สูตรตำรับ E gel 3-PG 3.5 ในตำรับ 100 มล. ประกอบด้วย

Vitamin E acetate	1.0	กรัม
PG	3.5	กรัม
Cremophore RH-40	10.0	มล.
Propylene glycol	15.0	มล.
Calcium chloride 50 mM	4.0	มล.
Triethanolamine ปรับ pH	5	
Paraben concentrate*	1.0	มล.
Distilled water เติมจนครบปริมาตร		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีเตรียมตำรับ Vitamin E gel-PG

(1) นำผง PG มาโปรยให้ละลายในน้ำประมาณ 50 มล. กวนให้กระจายเป็นเนื้อเดียว

(2) ผสม Vitamin E. acetate 1 กรัม ลงใน propylene glycol 15 มล. และค่อยเติม 10 มล. Cremophore RH-40 ผสมให้เข้ากัน

(3) เติม mixture vitamin E acetate ลงใน aqueous PG กวนผสมให้เข้ากัน

(4) เติมสารละลาย 50 mM calcium chloride ปริมาตร 4 มล. ทีละน้อยผสมให้เข้ากัน

(5) เติมน้ำกลั่นทีละน้อยจนครบ 10 มล. กวนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน

(6) เติม Triethanolamine จนวัด pH ได้เท่ากับ 5

(7) เติม Paraben concentrate 1 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มล กวนผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว

2.6.4 การเตรียมตำรับ Vitamin C gel โดยใช้ PG เป็นสารช่วยเตรียมตำรับเจล

การพัฒนาตำรับเจลโดยใช้ PG เป็น gelling agent โดยมีสูตรตำรับต่อไปนี้

สูตรตำรับ C gel –PG 2.5 ในตำรับ 100 มล. ประกอบด้วย

Vitamin C palmitate	0.1	กรัม
PG	2.5	กรัม
Cremophore RH –40	10.0	มล.
Propylene glycol	15.0	มล.
Calcium chloride 50 mM	4.0	มล.
Triethanolamine ปรับ pH	5	
Paraben concentrate*	1.0	มล.
Distilled water เติมจนครบปริมาตร		

*Paraben concentrate ประกอบด้วย methylparaben 2% และ propylparaben 0.2% ใน propylene glycol

วิธีเตรียมตำรับ Vitamin C gel -PG 2.5

(1) นำผง PG โปรยลงในน้ำประมาณ 50 มล. กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

(2) ผสม Vitamin C palmitate 0.1 กรัม กับ propylene glycol 15 มล. ค่อยๆ เติม Cremophore RH-40 ผสมให้เข้ากัน

(3) เติม Vitamin C mixture ลงใน aqueous PG กวนให้เข้ากัน

(4) เติมสารละลาย 50 mM calcium chloride ปริมาตร 4 มล. ทีละน้อยกวนให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว

(5) เติม Triethanolamine จนวัด pH ได้เท่ากับ 5

(6) เติม Paraben concentrate 1 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มล. กวนผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

2.6.5 การตรวจสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลที่เตรียมโดยใช้ PG เป็นสารช่วยเตรียมเจล

(1) ตรวจสอบคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์เจล แต่ละตำรับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ และเมื่อตั้งทิ้งไว้นาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

(2) ตรวจสอบคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์เจลหลังการทดสอบความคงตัวโดยวิธี Temperature Cycling Methed โดยการตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 50^{0}C นาน 24 ชม. และนำมาตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่ 4^{0}C นาน 24 ชม. เท่ากับ 1 cycle ทำการทดสอบ 6 cycle

(3) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของตำรับผลิตภัณฑ์เจล แต่ละตำรับที่เตรียมขึ้นหลังการทดสอบความคงตัว ที่ 6 cycle กับการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 เดือน เปรียบเทียบกับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ สังเกตการแยกชั้นของเนื้อเจล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

1. ตัวอย่างเปลือกทุเรียนและการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์

เปลือกทุเรียนรวบรวมจากขยะเปลือกทุเรียนที่แกะเนื้อขายช่วงหน้าผลไม้ทุเรียนประมาณเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม ของทุกปีนำมาล้างน้ำทำความสะอาดแล้วบดละเอียด นำไปอบแห้งในตู้อบที่มีลมเป่าที่อุณหภูมิ 50^0ซ นาน 8-10 ชม. นำมาชั่งน้ำหนักและใส่ในถุงปิดมิดชิด เก็บในที่เย็นจนกว่าจะนำมาสกัดสารโพลีแซคคาไรด์ วิธีการสกัดสารเจลและไฟเบอร์โพลีแซคคาไรด์ ตามวิธีที่ได้รายงานไว้แล้ว โดย สุนันท์ พงษ์สามารถ และคณะ (2544) เปลือกทุเรียนแห้ง 1 ก.ก. ได้สาร PG ประมาณ 100 กรัม และ PF ประมาณ 150 กรัม

2. องค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบน้ำตาลใน PG และ PF

2.1 <u>องค์ประกอบของธาตุ</u> องค์ประกอบธาตุที่วิเคราะห์ได้แก่ Carbon (C) Hydrogen (H) Oxygen (O) Nitrogen (N) และ Sulfur (S) ในสารสกัด PG และ PF แสดงสัดส่วน C : H : O เป็น atomic ratio พบว่า PG ประกอบด้วย C : H : O เท่ากับ 2.9 : 5.3 : 3.1 ขณะที่ PF ประกอบด้วย C : H : O เท่ากับ 3.5 : 6.4 : 3.1 ไม่พบมีองค์ประกอบของ N และ S ทั้งใน PG และ PF จากผลที่ได้อาจนำมาเขียนสูตรทางเคมีเบื้องต้นได้ว่า PG และ PF มีสูตรเคมีเบื้องต้นเป็น $[C : H_2 : O]_n$ ที่อาจแสดงว่าทั้ง PG และ PF เป็นโพลีเมอร์ของสารคาร์โบฮัยเดรทที่ประกอบด้วยน้ำตาลในโมเลกุลใหญ่ องค์ประกอบของธาตุหลักของ PG และ PF แสดงไว้ในตารางที่ 1 PG เป็นสาร carbohydrate หรือ polysaccharide จากการวิเคราะห์โดย calorimetric method ได้แก่ Molisch's test Phenol- sulfuric acid test Iodine solution test เป็นต้น

2.2 <u>องค์ประกอบของเกลือแร่</u> วิเคราะห์เกลือแร่ของสารสกัด PG และ PF พบว่ามีองค์ประกอบของ Sodium (Na) Potassium (K) Calcium (Ca) Magnesium (Mg) Iron (Fe) เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่ามี Manganese (Mn) Copper (Co) Zinc (Zn) เป็นส่วนน้อยและใน PF ยังพบมี Silicon (Si) ถึง 8.33 มก./100 กรัม ผลขององค์ประกอบเกลือแร่ของ PG และ PF ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

2.3 <u>ปริมาณความชื้น เส้นใยและเถ้า</u> การวิเคราะห์ปริมาณของความชื้น เส้นใยอาหาร (fiber) และเถ้า (ash) ใน PG และ PF ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 พบว่าใน PG ไม่มีองค์ประกอบของเส้นใย (fiber) ที่ไม่ละลายน้ำขณะที่ใน PF พบมีกากเส้นใยถึง 96.3 ± 0.7 กรัม/100 กรัม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของธาตุหลักในสารสกัด polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF)

Product	Elements (in atomic ratio)				
	C	H	O	N	S
Polysaccharide gel (PG)	2.88 ± 0.13	5.33 ± 0.16	3.09 ± 0.10	none	none
Polysaccharide fiber (PF)	3.55 ± 0.07	6.55 ± 0.41	3.07 + 0.06	none	none

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของเกลือแร่ในสารสกัด polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF)

Product	Minerals, Weight (mg/100g PG or PF)									Pb
	Na	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	Si	ppm
Polysaccharide gel (PG)	173.87 ± 53.13	68.63 ± 19.49	196 ± 93.03	33.01 ± 7.27	5.44 ± 1.27	0.44 ± 0.10	1.52 ± 0.46	2.04 ± 0.39	none	<0.05
Polysaccharide fiber (PF)	16.04 ± 5.85	3.90 ± 2.53	22.04 ± 2.11	4.28 ± 1.23	3.00 ± 2.81	0.11 ± 0.09	0.92 ± 0.13	0.42 ± 0.16	8.33 ± 0.74	0.07

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ปริมาณของความชื้น ไฟเบอร์และเถ้าในสารสกัด polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF)

Product	Moisture (%)	Fiber (%)	Ash (%)
Polysaccharide gel (PG)	5.71 ± 1.06	none	7.73 ± 2.11
Polysaccharide fiber (PF)	3.7 ± 0.7	96.3 ± 0.7	0.21 ± 0.15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 <u>องค์ประกอบของน้ำตาล</u> การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำตาลใน PG และ PF ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4 พบว่าใน PG มีองค์ประกอบน้ำตาลหลักมากกว่า 50% เป็น acid sugar เมื่อเทียบกับ standard galactaronic acid พบมีประมาณ 55.8% โดยวิธี colorimetric method จากปฏิกิริยา m-hydroxydiphenyl reagent และพบประมาณ 52.5% โดยวิธี Infrared spectrometer analysis (รูปที่ 1) ส่วนที่เหลือเป็นองค์ประกอบของ neutral sugars ได้แก่ glucose fructose rhamnose และ arabinose ที่พบจากการวิเคราะห์โดย TLC method (รูปที่ 2) และ HPLC method (รูปที่ 3) ในขณะที่ใน PF มีองค์ประกอบของน้ำตาลหลักชนิดเดียวคือ glucose จากการวิเคราะห์โดย TLC และ HPLC method ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

3. คุณสมบัติทางกายภาพของ PG และ PF

3.1 <u>วิเคราะห์ลักษณะของ IR Spectrum ของ PG และ PF</u> เปรียบเทียบลักษณะ absorption band ของ profile จาก IR Spetra ของ PG และ PF ในรูปที่ 6 แสดงให้เห็นมีความแตกต่างของ band ของ light abortion แสดง functional group ที่สำคัญใน PG ที่ absorption band ได้แก่ band ที่ Wave number 3436 cm^{-1} (OH) ที่ 2937 cm^{-1} (C-H) ที่ 1749 cm^{-1} (C=O) ที่ 1639 cm^{-1} (COO^-) ที่ 1237-1335 cm^{-1} (C-O-H) และที่ 1019-1105 cm^{-1} (C-OH) ขณะที่ใน PF แสดง functional group ที่สำคัญแสดงให้เห็น band ที่ Wave number ที่ 3411 cm^{-1} (OH) ที่ 2908 cm^{-1} (C-H) ที่ 1632 cm^{-1} (C-O) และที่ 1033,1061,1109 cm^{-1} (C-OH) เป็นต้น

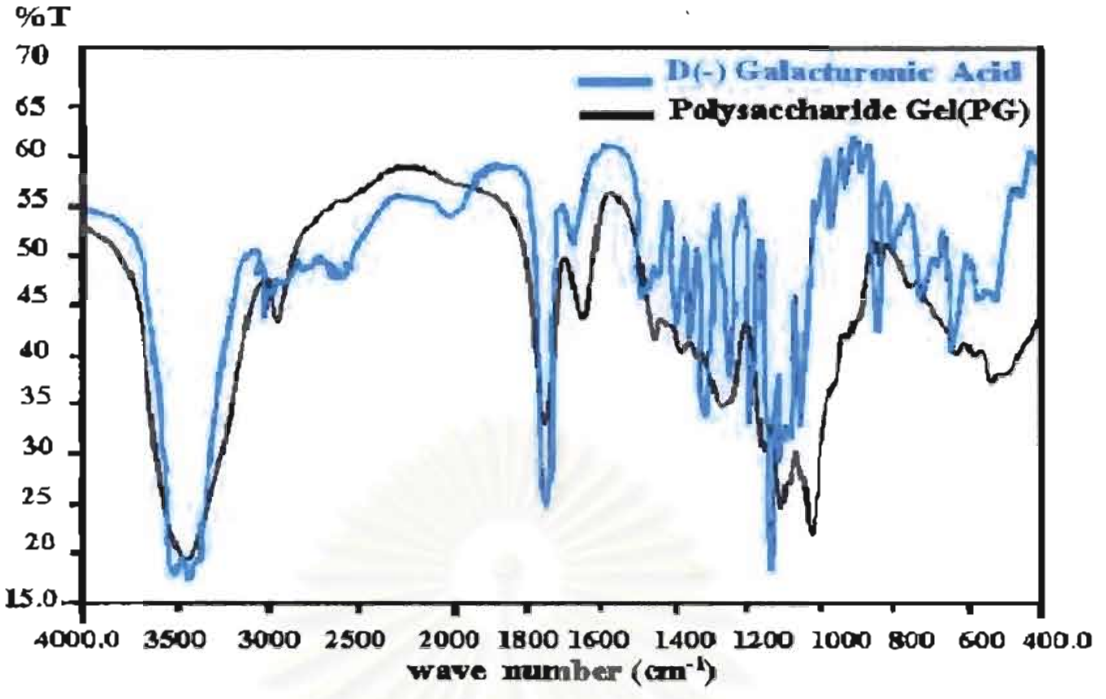
3.2 <u>วิเคราะห์ลักษณะ X-ray diffraction pattern ของ PG และ PF</u> เปรียบเทียบลักษณะของ X-ray diffraction pattern แสดงไว้ในรูปที่ 7 แสดงให้เห็นลักษณะของ amorphous powder ใน PG ขณะที่ PF แสดงให้เห็น crystallinity profile ชัดเจนใกล้เคียงกับ cellulose powder

3.3 <u>วิเคราะห์ขนาดค่า Particle size distribution ของ PG และ PF</u> เปรียบเทียบขนาด particle size distribution ของผงแห้ง PG และ PF ที่บดเป็นผงละเอียดและผ่านแร่ง 80 mesh เมื่อนำไปวัดขนาดของ particle size ด้วยเครื่อง Master Size S ได้รูปแบบดังแสดงไว้ใน particle Size distribution chromatogram ตามรูปที่ 8 สารสกัด PG มีขนาด particle ค่าเฉลี่ยในช่วง 222-301 μm ส่วน PF มีขนาด particle ค่าเฉลี่ยในช่วง 140-164 μm

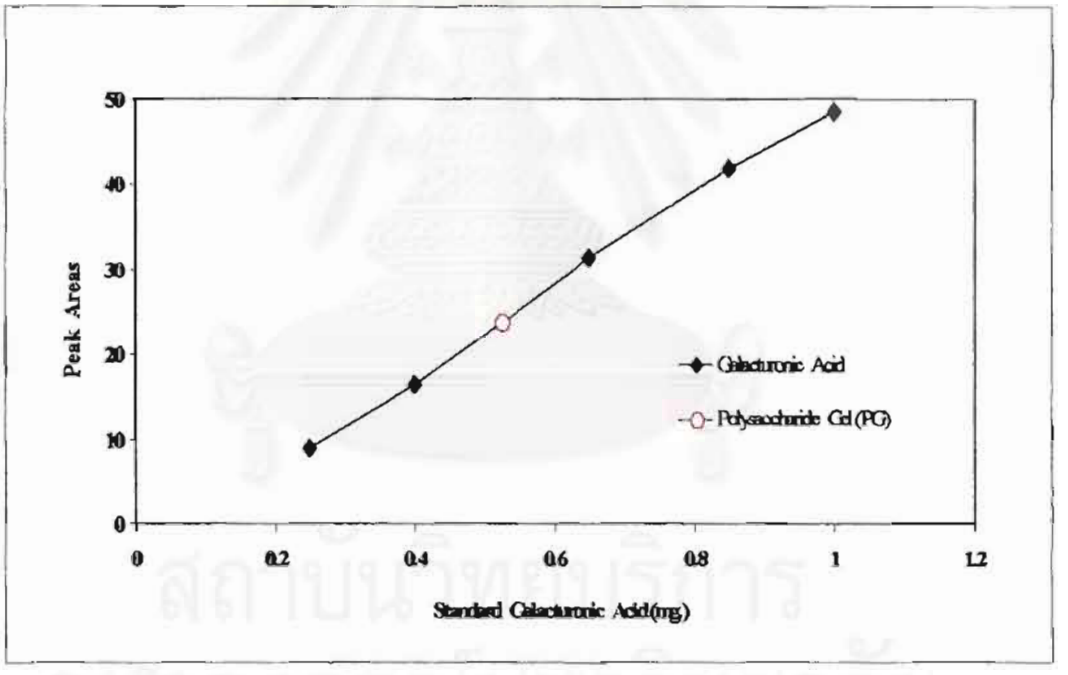
ตารางที่ 4 องค์ประกอบของน้ำตาลใน PG และ PF

Product	Sugars component (method of analysis)				
	Galacturonic acid (colorimetric/IR/HPLC)	Glucose (colorimetric/TLC/HPLC)	Fructose (colorimetric/TLC/HPLC)	Rhamnose (colorimetric/TLC/HPLC)	Arabinose (colorimetric/TLC/HPLC)
Polysaccharide gel (PG)	+	+	+	+	+
Polysaccharide fiber (PF)	-	+	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

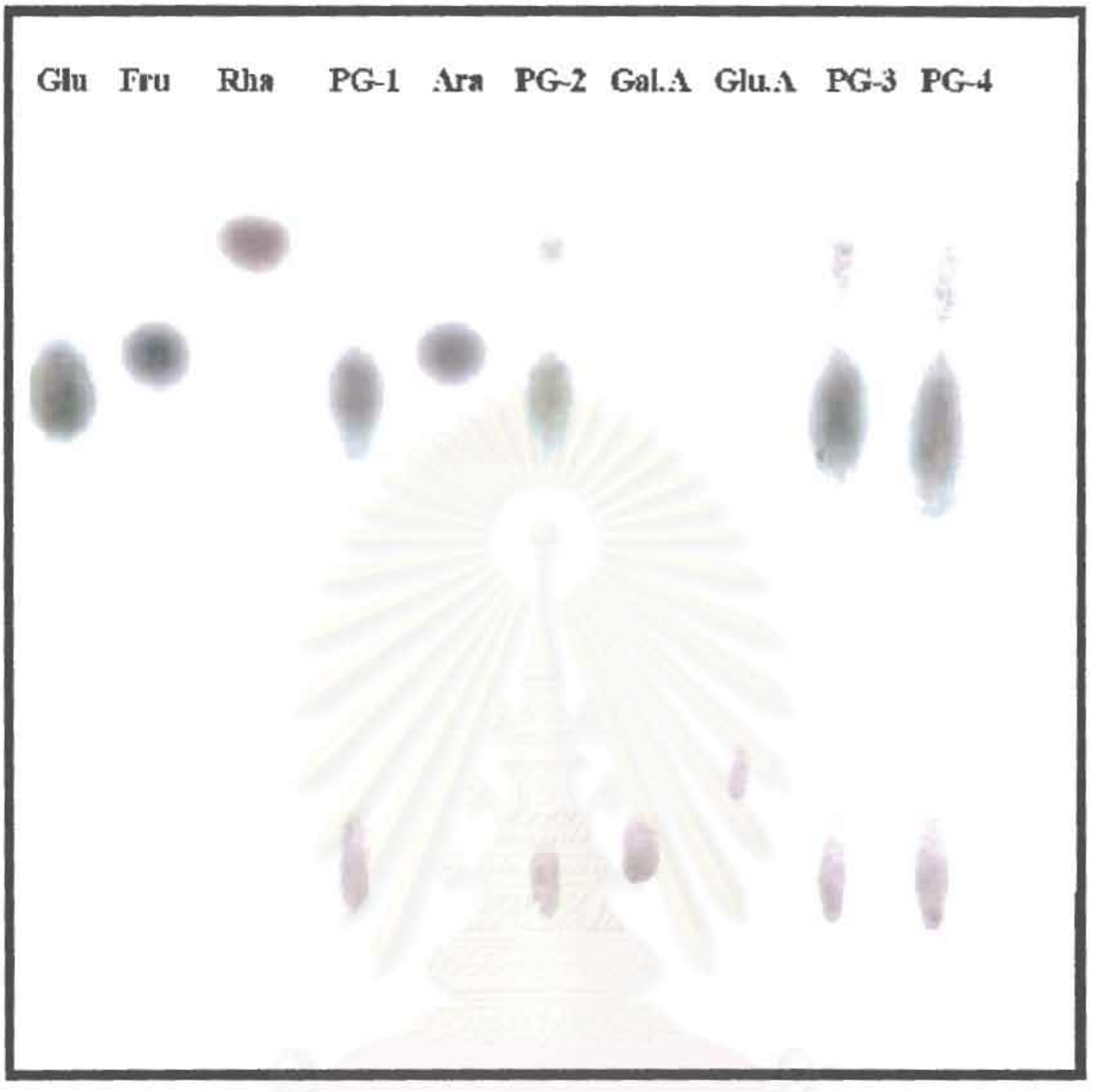


(a)



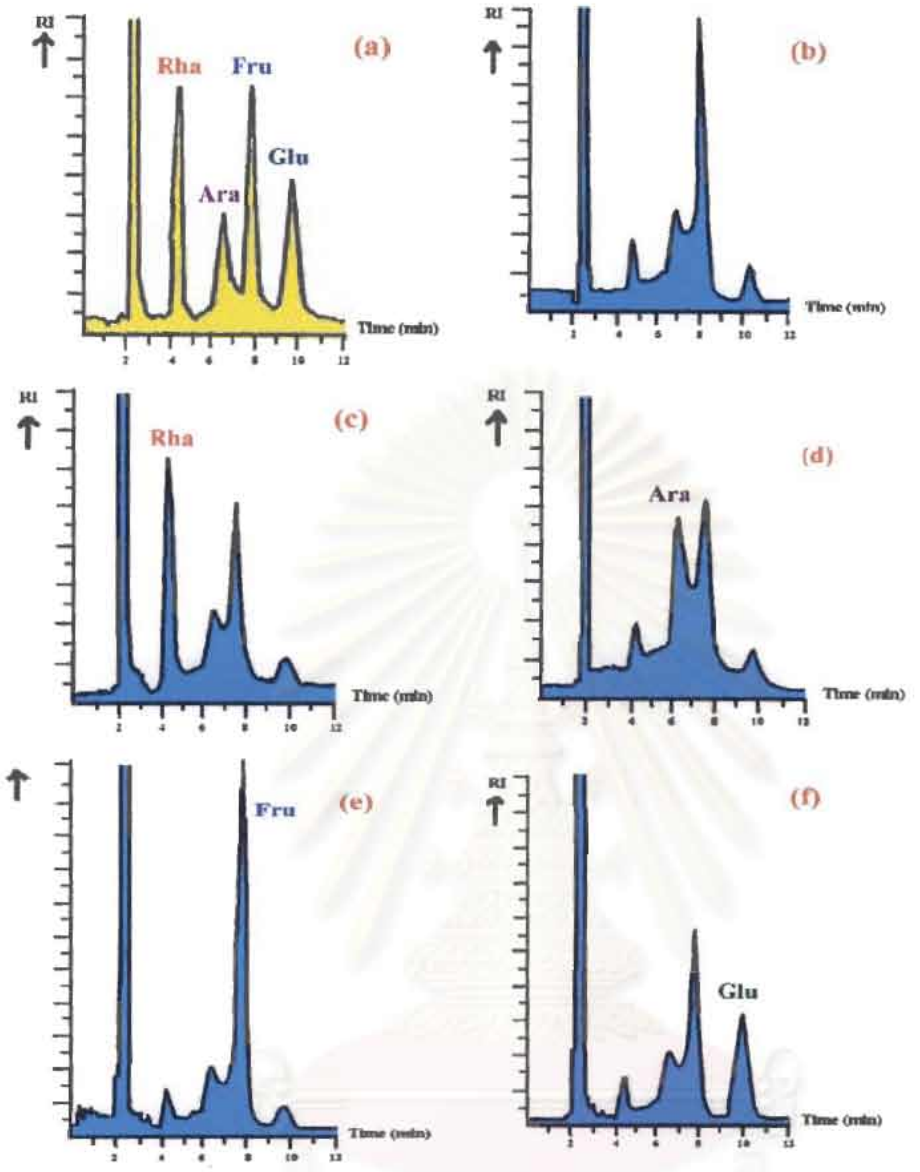
(b)

รูปที่ 1 เปรียบเทียบ IR spectra ระหว่าง PG กับ standard D (-) Galacturonic acid (a) แสดง identical absorption band ที่ 1710 - 1749 cm^{-1} *(C=O)*, ที่ 1650 - 1550 cm^{-1} *(COO)*$^-$ และที่ 1010 – 1030 cm^{-1} *(C-OH)*; Standard curve ของ ปริมาณ D (-) Galacturonic acid ต่อ peak area (b) วัดปริมาณของ Galacturonic acid จากค่า peak area ที่ absorption band บริเวณ 1650 cm^{-1}



รูปที่ 2 TLC chromatogram ของสารละลาย PG จาก acid hydrolyzate บน silica gel 60 F_{254} บน aluminum plate mobile phase ใช้ solvent system ประกอบด้วย ethylacetate : acetic acid : water (4 : 2: 3) spray reagent ประกอบด้วย 1-napthol ใน ethanol และ sulfuric acid

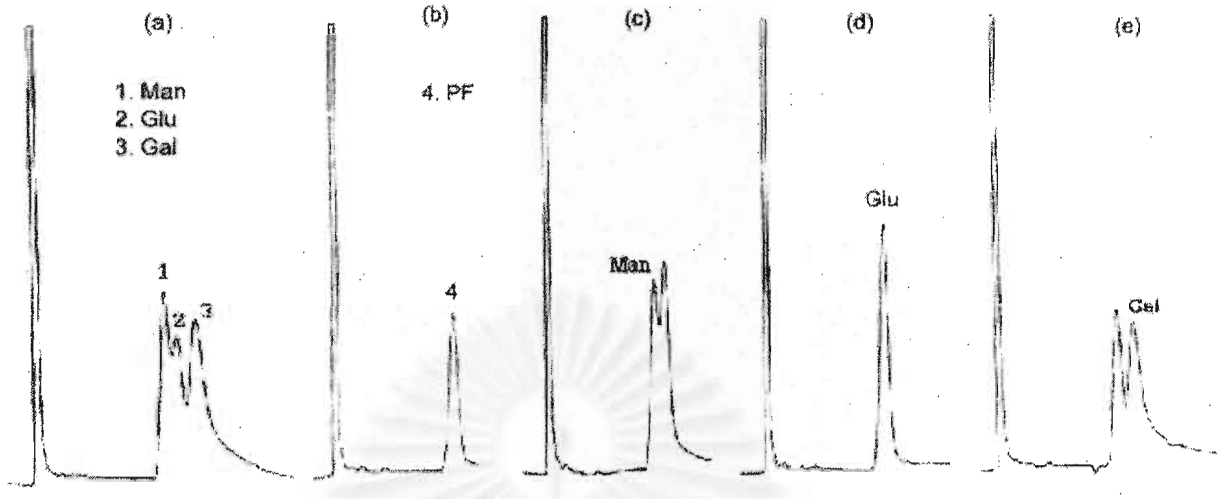
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 HPLC chromatograms ของ (a) สารละลายผสมของน้ำตาลมาตรฐาน 0.5 μmoles Rhamnose Arabinose Fructose และ Glucose; (b) acid hydrolyzate ของโพลีแซคคาไรด์เจล (PG), 20μl; (c) PG ผสม 0.5 μmoles Rhamnose ; (d) PG ผสม 0.5 μmoles Arabinose; (e) PG ผสม 0.5 μmoles Fructose; (f) PG ผสม 0.5 μmoles Glucose. Column Lichrospher®,NH_2(5μm) ; mobile phase, 90% acetronitrile in water; flow rate, 1.8 ml/min; detector, refractive index (RI); recorder speed, 4 mm/min.

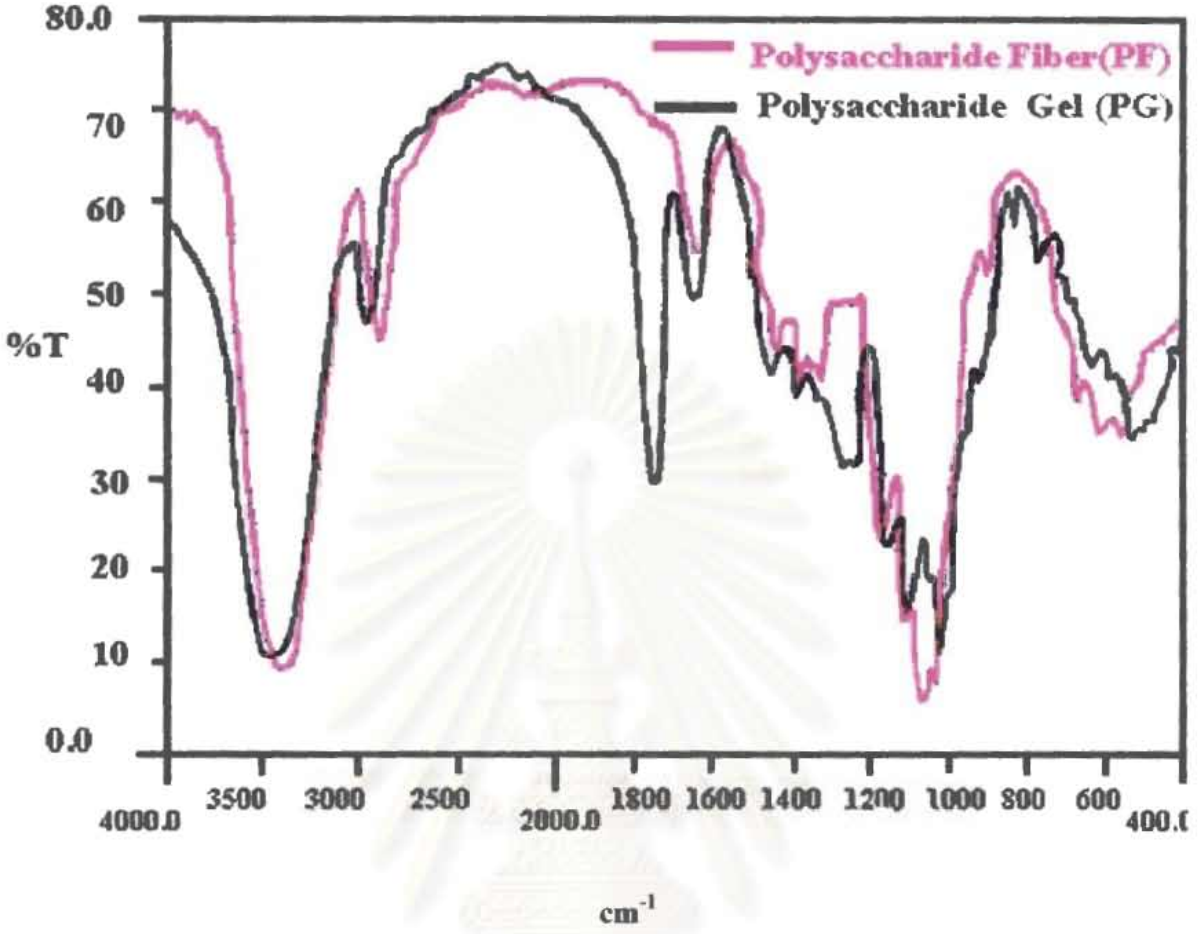
รูปที่ 4 TLC chromatogram ของสารละลาย PF จาก acid hydrolyzate บน silica gel G ใช้ mobile phase ประกอบด้วย acetone: methanol : water (75:10:15). Man = standard mannose, Glu = standard glucose, Gal = standard galactose and PF = acid hydrolyzate ของ polysaccharide fiber

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 HPLC chromatograms ของ (a) น้ำตาลมาตรฐาน Manose (Man) Glucose (Glu) และ Galactose (Gal); (b) acid hydrolyzate ของ polysaccharide fiber (PF); (c) acid hydrolyzate ของ PF ที่เติม 2 μmole Man; (d) acid hydrolyzate ของ PF ที่เติม 0.7 μmole Glu; (e) acid hydrolyzate ของ PF ที่เติม 2 μmole Gal ; Column, amino silica ; mobile phase, 90% acetronitrile ในน้ำ flow rate, 1.8 ml/min; recorder speed, 4 mm/min; detector, RI spectrometer.

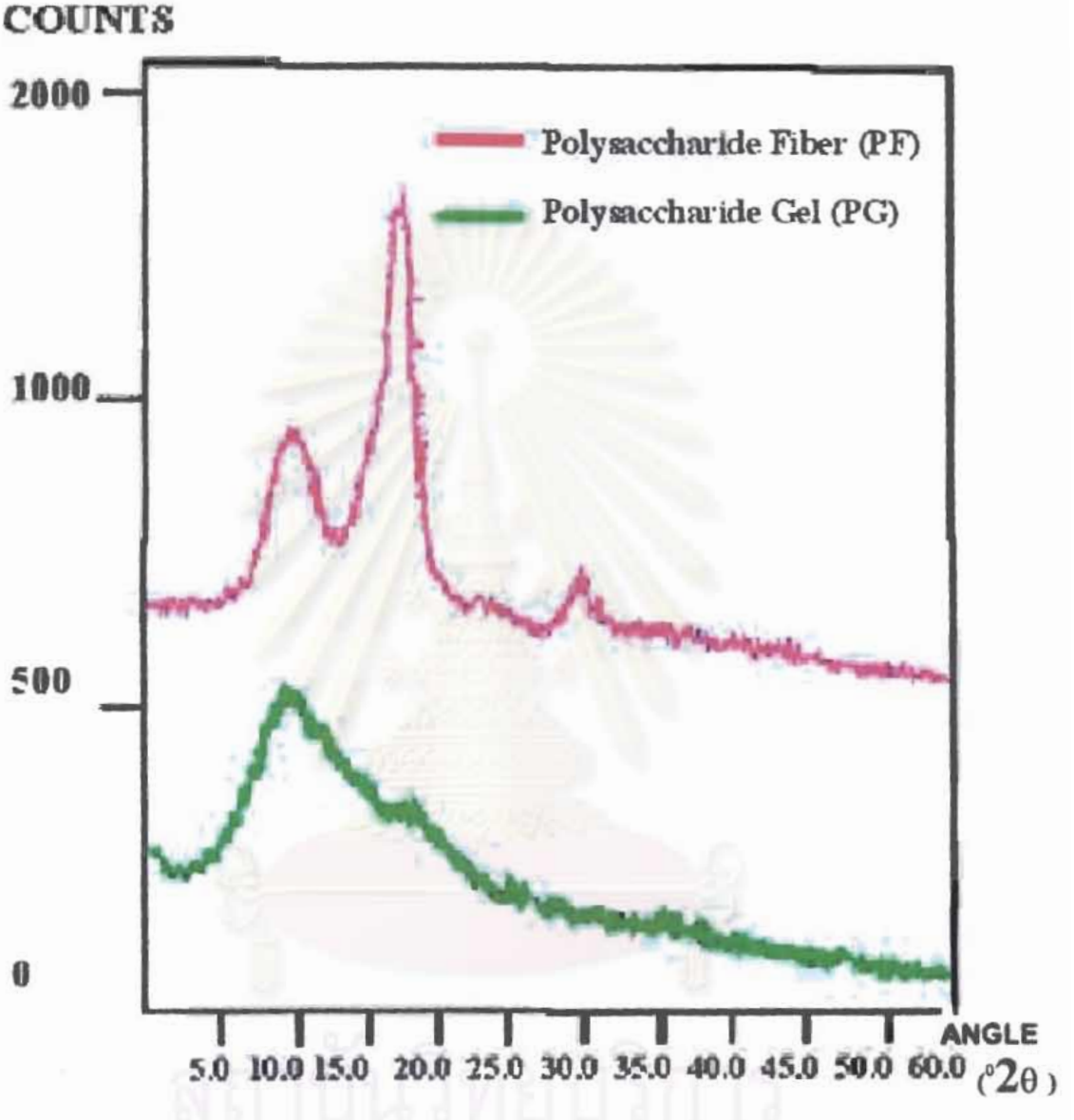
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



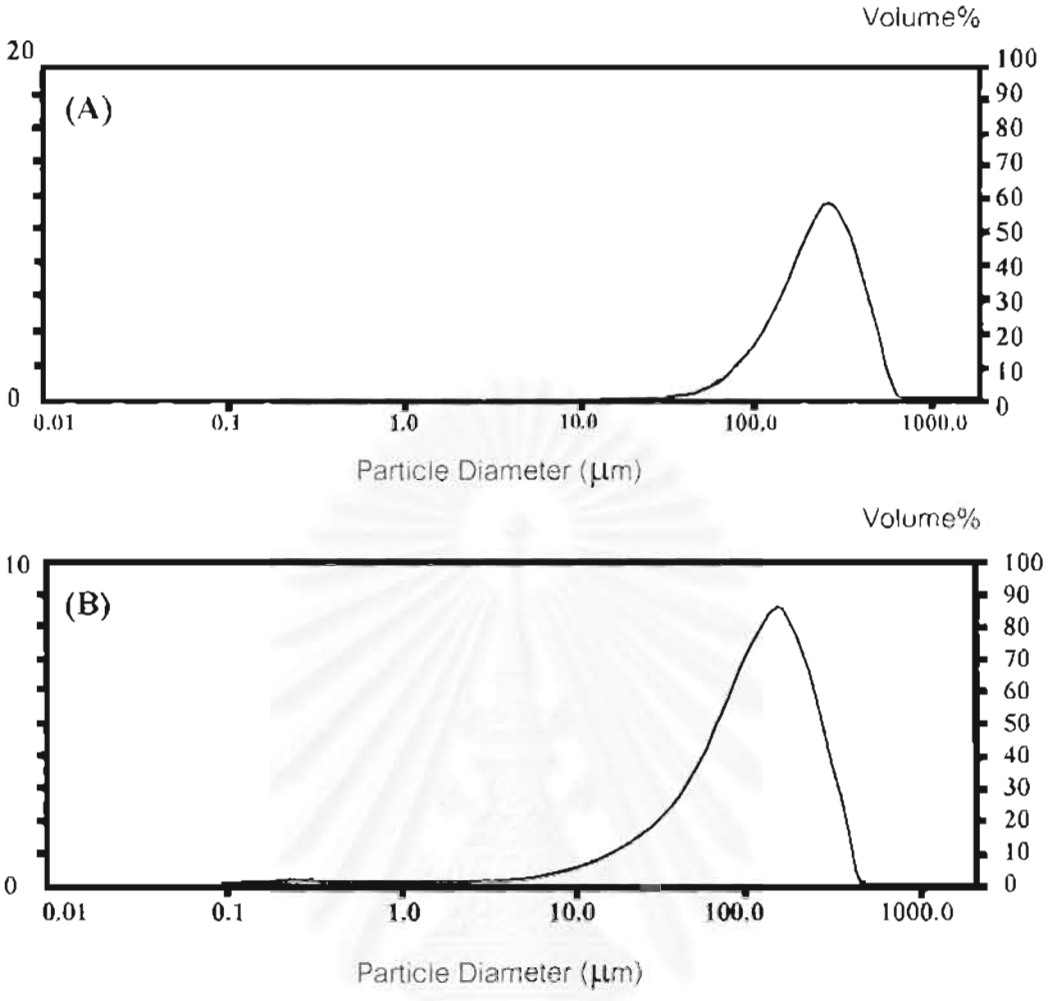
รูปที่ 6 เปรียบเทียบ IR spectra ของ PG และ PF จากเปลือกผลทุเรียน แสดงให้เห็น absorption bands ที่แตกต่างกันที่ 1749 cm^{-1} *(C=O)* ที่ 1639 cm^{-1} $(COO)^-$ และที่ 1019 cm^{-1} *(C-OH)*; PG = polysaccharide gel; PF = polysaccharide fiber

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21405683



รูปที่ 7 เปรียบเทียบ X – ray Diffraction patterns ระหว่าง polysaccharide gel (PG) และ polysaccharide fiber (PF) จากเปลือกผลทุเรียน PG แสดงลักษณะของ amorphous powder และ PF แสดงลักษณะเป็น crystal powder



รูปที่ 8 Particle size distribution profiles ของ (A) Polysaccharide Gel (PG) และ (B) Polysaccharide fiber (PF) บดเป็นผงและผ่านแร่งขนาด 60-mesh ขนาดอนุภาคของ PG อยู่ระหว่าง 222.28 - 301.68 μm และขนาดอนุภาคของ PF อยู่ระหว่าง 140 - 163 μm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 <u>ผลของความเข้มข้นของ PG ต่อความหนืด</u> สารละลายของ PG ในน้ำในความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มขึ้น สามารถ plot กราฟระหว่างความเข้มข้นต่อค่าความหนืด ได้แสดงในรูปที่ 9 แสดงค่าความหนืดจะค่อยๆ สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PG และค่าความหนืดจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นของ PG สูงกว่า 2% ที่ 2%PG มีความหนืดประมาณ 300 mPa s

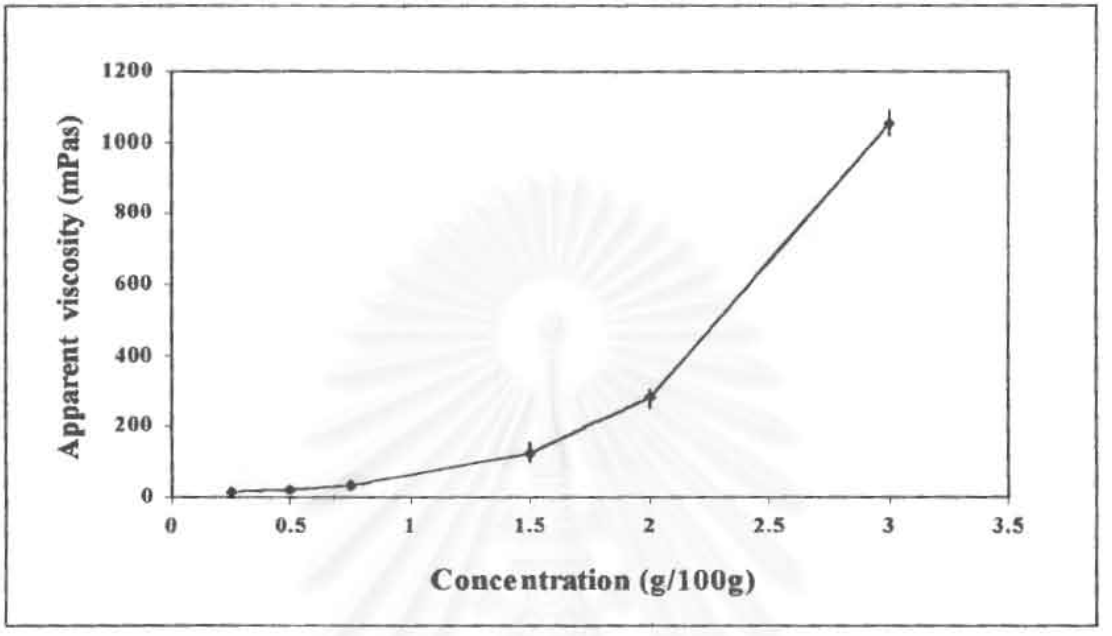
3.5 <u>ผลของความเข้มข้นของ PG ต่อ ค่า pH</u> สารละลาย PG ในน้ำในความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีค่าของ pH ลดลง สามารถ plot กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นต่อค่า pH ได้แสดงไว้ในรูปที่ 10 ค่า pH จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีความเข้มข้นของ PG สูงกว่า 5%

3.6 <u>ผลของ acid-base ต่อความหนืดของ PG</u> สารละลาย PG ในน้ำที่ความเข้มข้น 3 และ 4% จะมีความหนืดลดลงเรื่อยๆ เมื่อเพิ่ม pH ขึ้นถึง pH 4 และการเพิ่ม pH จนถึง 7 จะทำให้ความหนืดเพิ่มได้เล็กน้อยแต่ไม่สูงเท่าสารละลายตั้งต้น ที่ pH 2.3 สามารถ plot กราฟระหว่างค่า viscosity และค่า pH ได้ดังแสดงในรูปที่ 11

3.7 <u>ผลของ electrolyte ต่อความหนืดของ PG</u> สารละลาย PG ในความเข้มข้น 3% PG ที่มี สารละลาย electrolyte ที่ทดสอบได้แก่ NaCl KCl $MgCl_2$ จะทำให้สารละลาย PG มีความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ electrolyte ยกเว้น NaCl ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความหนืดของ PG ส่วน $CaCl_2$ มีผลเพิ่มความหนืดของสารละลาย PG มาก แม้ในความเข้มข้นเล็กน้อยเพียง 1 mM $CaCl_2$ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 12

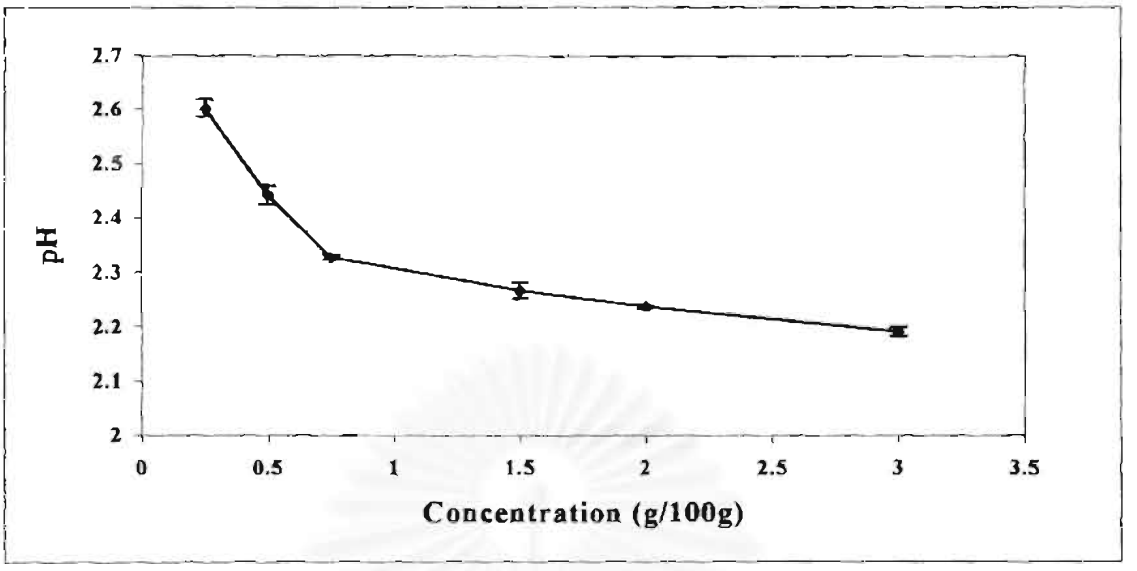
3.8 <u>ผลของตัวทำละลายต่อความหนืดของ PG</u> สารละลาย PG ในความเข้มข้น 3% PG เมื่อเติมตัวทำลายได้แก่ ethanol หรือ isopropanol พบว่ามีผลทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้น โดยความหนืดจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ethanol หรือ isopropanol และความหนืดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเติมตัวทำละลายสูงกว่า 25% ของ ethanol หรือ isopropanol และเมื่อเพิ่มตัวทำลายสูงกว่า 50% จะเกิดตะกอน PG แยกตัวออกมา ผลของตัวทำลายต่อความหนืดของ PG แสดงไว้ในรูปที่ 13

3.9 <u>ผลของสารช่วยให้ชุ่มชื้น (humectant) ต่อความหนืดของ PG</u> สารละลาย PG ในความเข้มข้น 3% PG เมื่อเติมสาร humectant ได้แก่ glycerin หรือ propylene glycol พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความหนืดของ PG น้อยมาก ยกเว้น เมื่อเติม propylene glycol สูงกว่า 30% จะมีผลให้สารละลาย PG มีความหนืดสูงขึ้นมากอย่างรวดเร็วดังผลที่แสดงไว้ในรูปที่ 14

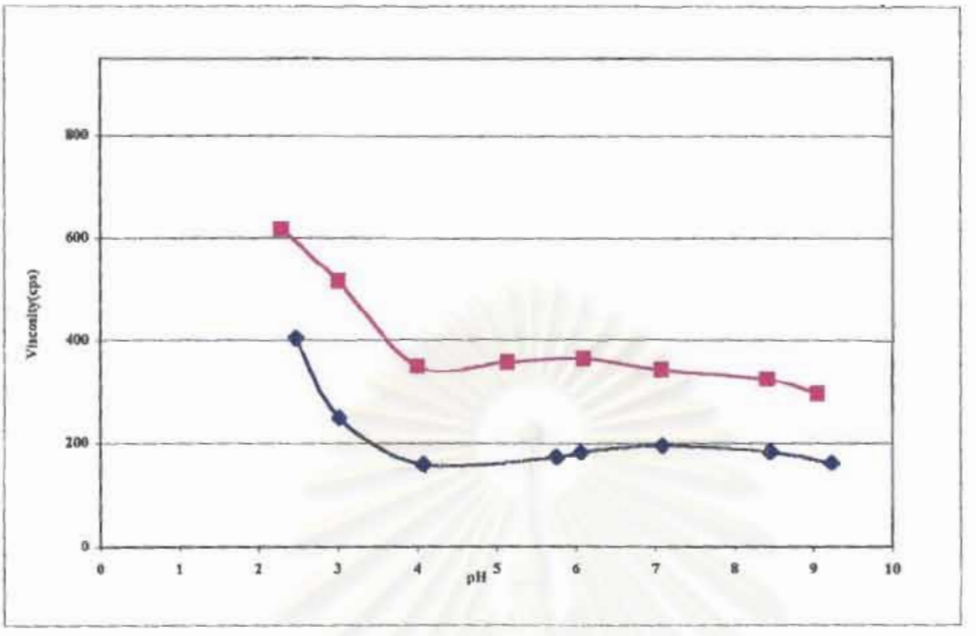


รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความเข้มข้นของโพลีแซคคาไรด์เจล (PG)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

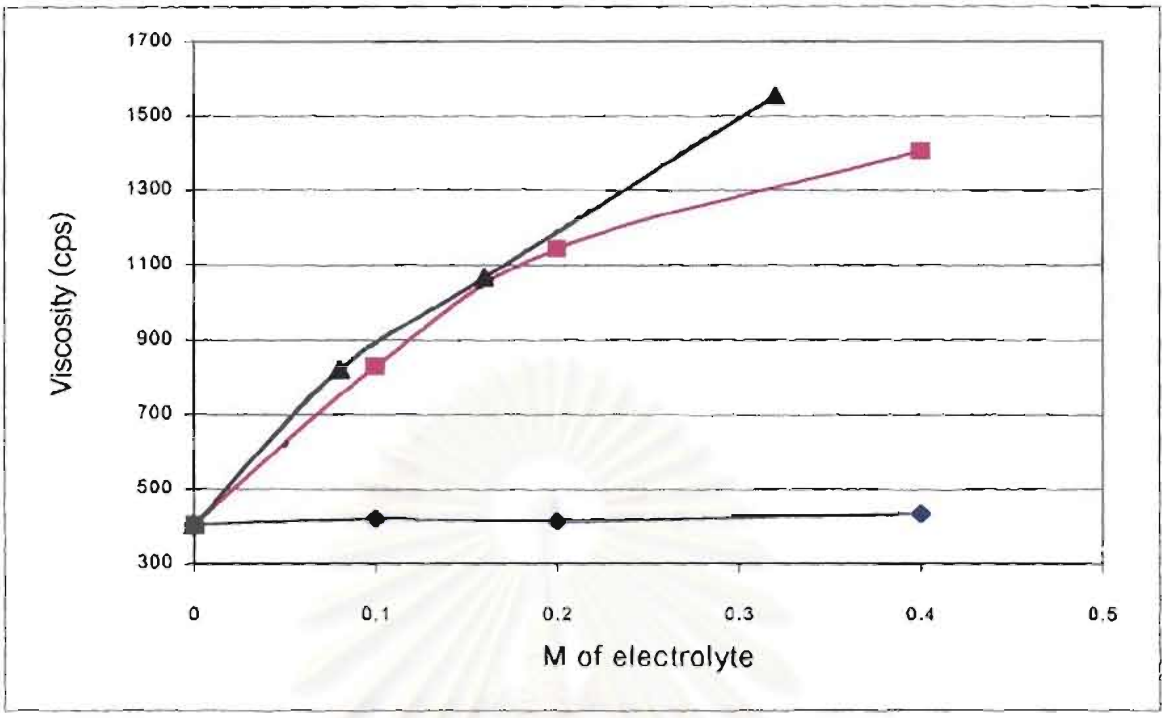


รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) กับความเข้มข้นของโพลีแซคคาไรด์เจล (PG)

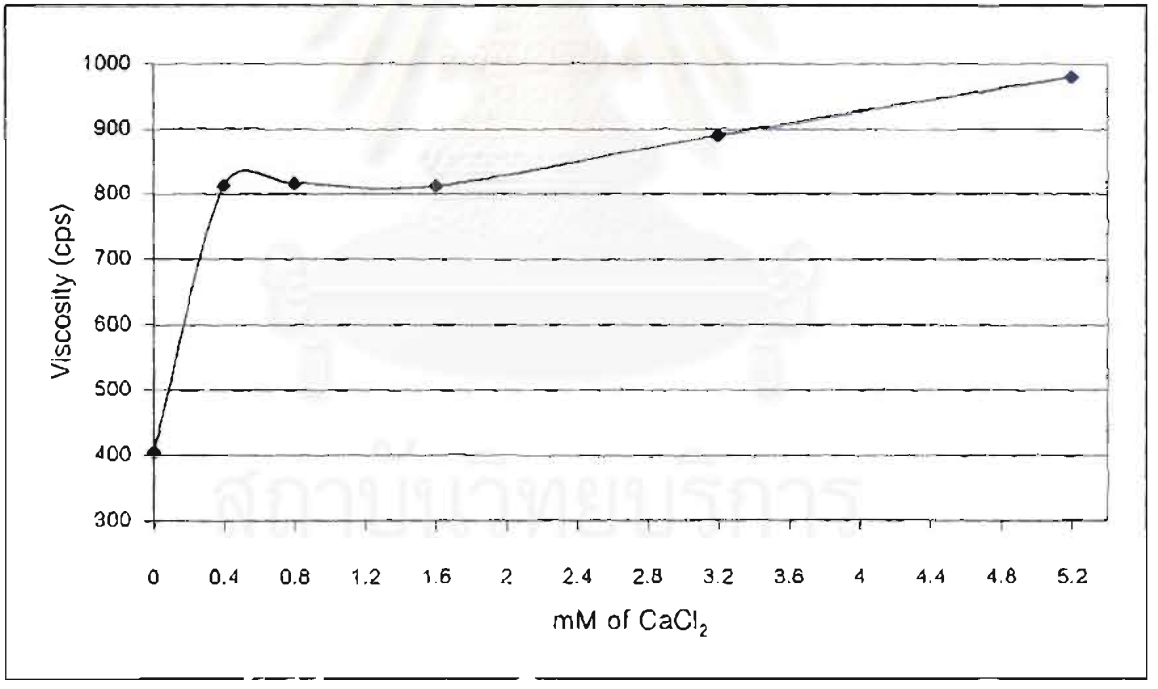


รูปที่ 11 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อความหนืดของ Polysaccharide gel (PG).
3%(◆), 4%(■)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)

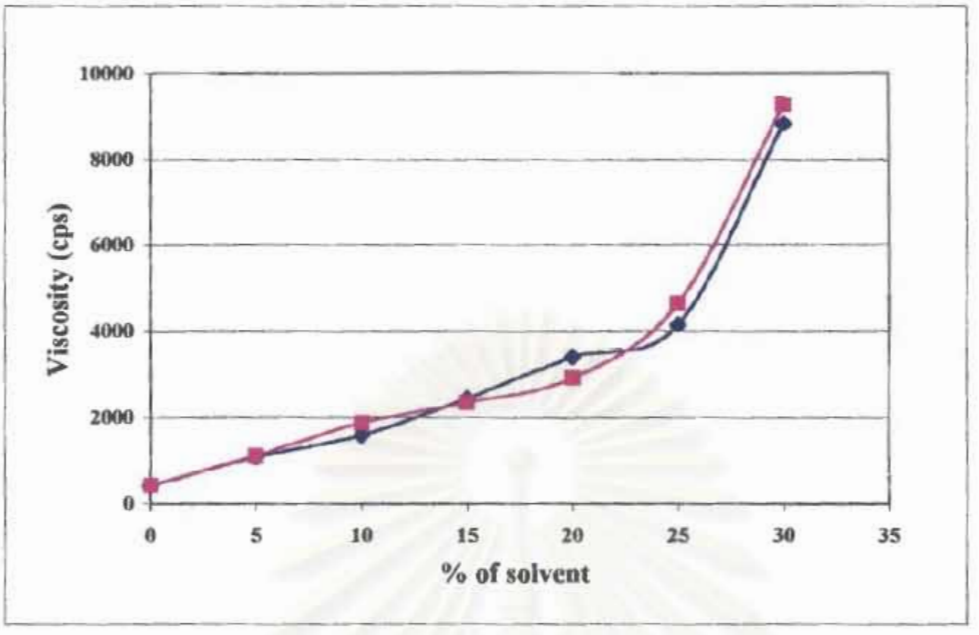


(b)

รูปที่ 12 ผลของ electrolyte ต่อความหนืดของ 3% polysaccharide gel (PG)

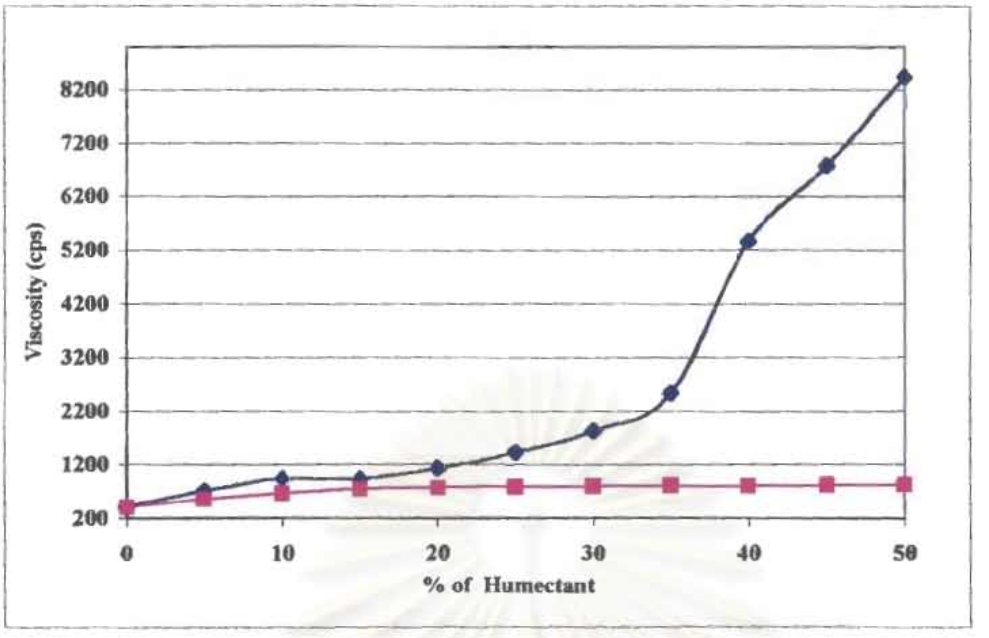
(a) เพิ่มความเข้มข้นของ NaCl (◆), KCl (■), $MgCl_2$ (▲)

(b) เพิ่มความเข้มข้นของ $CaCl_2$



รูปที่ 13 ผลของ solvent ต่อความหนืดของ 3% polysaccharide gel (PG).
Ethanol (◆) , Isopropanol (■)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 ผลของ humectant ต่อความหนืดของ 3% Polysaccharide gel (PG).
Propylene glycol (◆) ,Glycerine (■)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

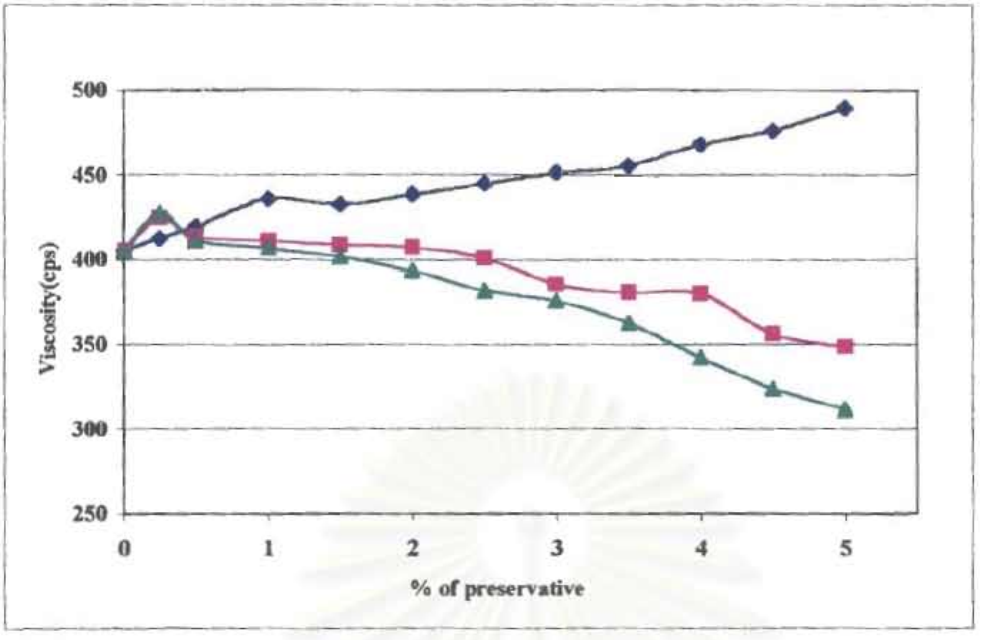
3.10 ผลของสารกันบูดต่อความหนืดของ PG สารละลาย PG ในความเข้มขึ้น 3% PG เมื่อเติมสารกันบูดได้แก่ paraben benzoic acid หรือ sorbic acid ในความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5% จะมีผลเปลี่ยนแปลงเพิ่มความหนืดเล็กน้อย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ paraben ในความเข้มข้นสูงกว่า 1% จะทำให้ ความหนืดของ PG เพิ่มขึ้น ขณะที่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ benzoic acid และ sorbic acid จะมีผลทำให้ความหนืดลดลง ผลของสาร humectant ต่อความหนืดของ PG ได้แสดงไว้ในรูปที่ 15

3.11 ผลของความร้อนต่อความหนืดของ PG ทำการทดลองโดยใช้สารละลายน้ำ PG ที่ความเข้มข้น 3% และ 4% พบว่าการให้ความร้อนสูงถึง 50^{0}ซ นาน 1 ชั่วโมง มีผลให้ความหนืดลดลงเล็กน้อย และเมื่อปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง พบว่าความหนืดของ PG เพิ่มขึ้นเท่ากับค่าความหนืดก่อนให้ความร้อนแสดงว่าที่อุณหภูมิ 50^{0}ซ ไม่มีผลต่อ PG และความหนืดของ PG ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อให้ความร้อนที่ 70^{0}ซ นาน 1 ชั่วโมง ความหนืดของ PG ลดลง แต่เมื่อทำให้เย็นลงจะมีความหนืดเพิ่มเท่าเดิมก่อนให้ความร้อน ในขณะที่ให้ความร้อนที่ 100^{0}ซ นาน 1 ชั่วโมง ทำให้ความหนืดลดลงมากและเมื่อปล่อยให้เย็นลง ความหนืดจะเพิ่มขึ้นได้เล็กน้อยแต่ไม่เท่าค่าความหนืดเดิมก่อนให้ความร้อน ผลของความร้อนต่อความหนืดของ PG ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

4. คุณสมบัติทางชีวภาพของ PG

4.1 ผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อที่ทดสอบได้แก่ Staphylococcus aureus ATCC 6538 P S. epidermidis ATCC 12228 Bacillus subtilis ATCC 6633 Lactobacillus plantarum ATCC 14917 Lactobacillus pentosus ATCC 8041 Escherichia colli ATCC 25922 Proteus vulgaris ATCC 13315 Pseudomonas aeruginosa ATCC 9721 ทดสอบความไวของเชื้อเหล่านี้ ต่อสารละลาย PG ในความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test และ Broth macrodilution susceptibility test ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และ MHB ตามลำดับ ยกเว้น เชื้อ Lactobacillus ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA ที่มี 0.3% yeast และ BHIB ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

Agar diffusion susceptibility test ประเมินผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย PG โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เห็นเป็นวงในมีขอบคมชัดบนจานอาหารวุ้น พบว่า PG ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.32% แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเห็นขอบวงใสได้ชัดเจน โดย PG สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ ได้แก่ S. epidermidis B. subtilis L.pentosus และ E. coli ส่วน PG ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.625% และ 1.25% แสดงผลการยับยั้ง



รูปที่ 15 ผลของสารกันบูดต่อความหนืดของ Polysaccharide gel (PG).
Paraben (◆), Benzoic acid (■) , Sorbic acid (▲).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลของความร้อนต่อความหนืดของ Polysaccharide gel (PG)

Temperature, (Tm), °C	Viscosity of 3%PG
Ambient Tm.	405.2 ± 7.4
At 50°C	355.4 ± 3.5
After cool down to ambient Tm.	392.6 ± 2.3
At 70°C	170.2 ± 5.3
After cool down to ambient Tm.	395.4 ± 2.1
At 100°C	78.1 ± 2.1
After cool down to ambient Tm.	120. 9 ± 5.8

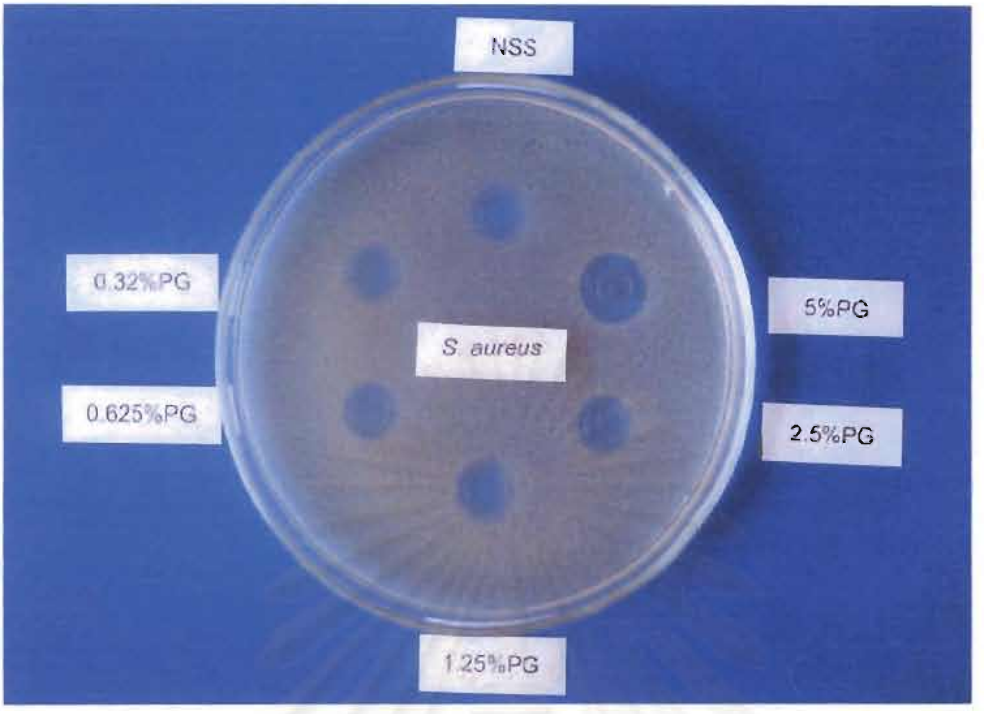
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่อเชื้อ S. aureus และ P. vulgaris ตามลำดับ ส่วน L. plantarum และ Ps. Aeruginosa จะต้านต่อการยับยั้งด้วยสารละลาย PG พบว่าเชื้อที่ถูกยับยั้งการเจริญมองเห็นมีความกว้างของ inhibition zone เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PG ผลของ ความกว้างของ inhibition zone และความเข้มข้นของ PG ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 6 และ รูปที่ 16 มีหนึ่ง strain ของกรัมบวก แบคทีเรียที่ทดสอบได้แก่ L. plantarum และหนึ่ง straain ของกรัมลบ แบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ Ps. aeruginosa ไม่ถูกยับยั้งโดย PG ในการทดลองนี้

Broth macrodilution susceptibility test ประเมินผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยดูผลการห้ามการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว เชื้อที่ไวต่อการถูกยับยั้ง จะไม่เห็นการเจริญหรือความขุ่นเกิดขึ้น ภายหลังการบ่มเชื้อไว้ที่ 37^0ซ นาน 24 ชั่วโมง

(1) การทดสอบหาค่า MIC และ MBC ผลการหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) โดยดูค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ PG ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยหลังจากบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ไม่มีการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจะเห็นใสไม่มีความขุ่น ผลการทดลองในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่ทดสอบทั้งหมด 8 strains มี 6 strains ที่ไวต่อการถูกยับยั้งด้วย PG ได้แก่ S. epidermidis S. aureus B. subtilis L. pentosus E. coli และ P. vulgaris มีค่า MIC ของ PG ห้ามการเจริญเชื้อแต่ละชนิดตามตารางที่ 7 คือ PG มีค่า MIC เท่ากับ 6.4 มก./มล. ต่อเชื้อ S.epidermidis B.subtilis E. coli และ P.vulgaris มีค่า MIC เท่ากับ 12.8 และ 25.6 มก./มล. ต่อเชื้อ S. aureas และ L. pentosus ตามลำดับ เมื่อนำหลอดของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มองเห็นใสไม่มีความขุ่นไปทำ subculture ลงในจานอาหารวุ้นที่ไม่มี PG จะพบว่ามีการเจริญของเชื้อได้ในบางหลอดของค่า MIC แสดงว่า PG ยังไม่ฆ่าเชื้อเพียงแต่ยับยั้งการเจริญ ส่วนในหลอดที่มีความเข้มข้นสูงกว่าค่า MIC เมื่อไปทำ subculture บนจานอาหารวุ้นที่ไม่มี PG สังเกตหลอดที่ไม่ทำให้มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นบนจานอาหารวุ้นแสดงว่าความเข้มข้นของ PG ในหลอดนั้นสามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่ทำให้มีเชื้อเจริญขึ้นในจานวุ้น คือค่า Minimal bactericidal concentration (MBC) ค่า MBC ของ PG เท่ากับ 25.6 มก./มล. ต่อเชื้อ S. aureas S. epidermidis B.subtilus E.coli และ P. vulgaris มีค่าเท่ากับ 51.2 มก./มล. ต่อเชื้อ L.pentosus ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7 และรูปที่ 17

(2) การวิเคราะห์ Time kill analysis ความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของ PG ต่อเชื้อแบคทีเรีย 6 strains ที่ไวต่อการยับยั้งโดย PG แสดงให้เห็นจากการวิเคราะห์ โดย Time kill analysis ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใน normal saline solution (NSS) ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี PG และในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มี PG ความเข้มข้นเท่ากับ 1.6 มก./มล. และที่มี PG ความเข้มข้น



รูปที่ 16 การวิเคราะห์บน agar plate แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* ATCC 6538P ในอาหารแข็ง MHA ใน Cup บรรจุ PG ในความเข้มข้นที่กำหนด และ control บรรจุด้วย NSS

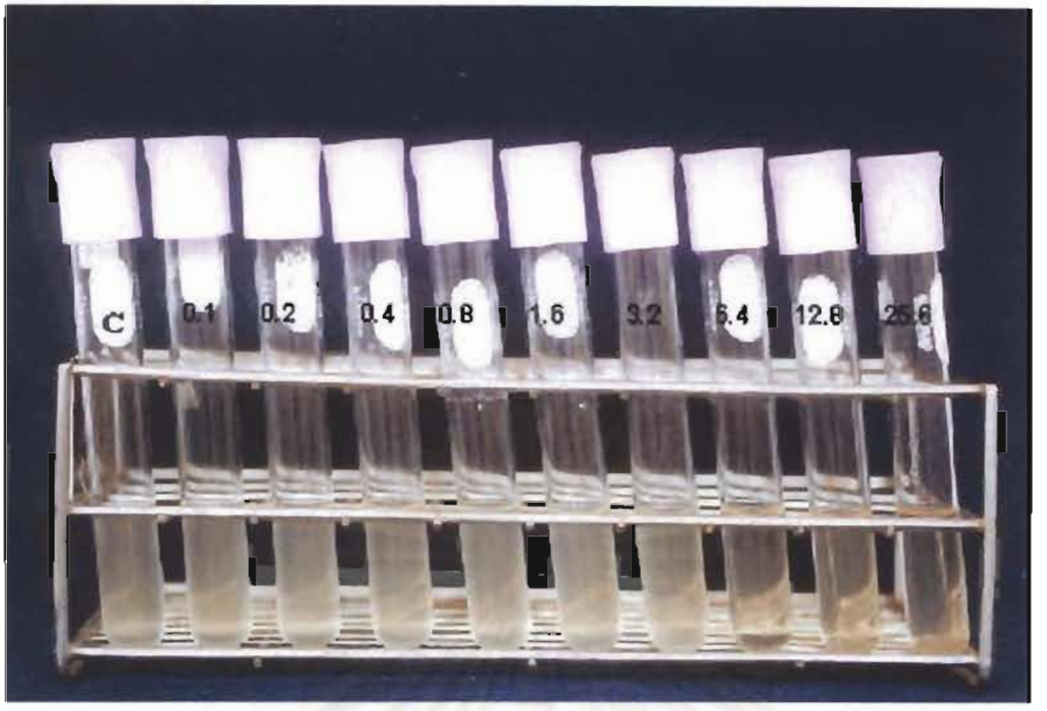
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ความสามารถต้านจุลินทรีย์ของ polysaccharide gel (PG) ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี agar diffusion

nz = no inhibition zone, S.E.M = Standard Error of Mean

%PG	Diameter of inhibition zone, mm (mean±S.E.M)							
	S. aureus	*S. epidermidis*	*B. subtilis*	*L. pentosus*	*L.plantarum*	*E. coli*	*P. vulgaris*	*Ps. aeruginosa*
5	11.86±0.49	13.09±0.65	12.96±0.14	18.72±1.23	nz	13.44±0.49	11.64±0.22	nz
2.5	10.21±0.62	12.73±0.33	12.45±0.25	16.26±0.56	nz	12.86±0.35	10.03±0.57	nz
1.25	9.33±1.15	11.89±1.10	11.67±0.51	14.12±0.81	nz	12.52±0.86	8.35±0.12	nz
0.625	8.41±0.17	10.88±0.88	11.05±0.22	12.98±1.22	nz	11.52±0.45	nz	nz
0.32	nz	10.13±0.20	9.86±1.16	11.84±0.69	nz	10.49±0.62	nz	nz
NSS	nz	nz	nz	nz	nz	nz	nz	nz

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 การทดลองค่า MIC ของ PG ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 มีค่าที่ 6.4 mg/ml ในอาหารเหลว MHB , C = Control (PG = 0 mg/ml)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ค่า MICs และ MBCs ของโพลีแซคคาไรด์เจล (PG) ต่อเชื้อจุลินทรีย์

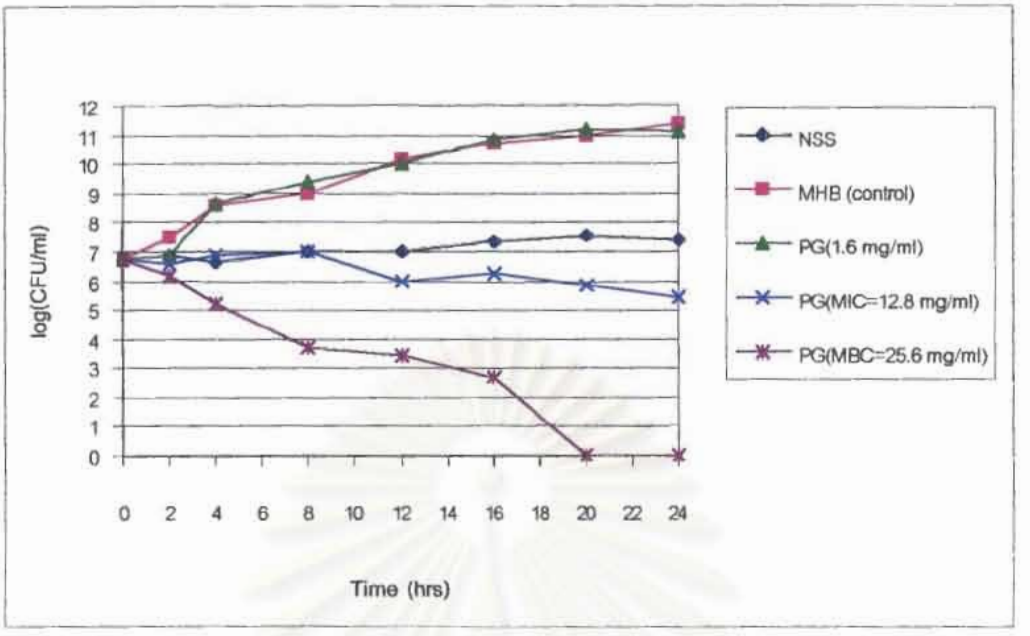
Microorganisms	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
S. aureus	12.8	25.6
S. epidermidis	6.4	25.6
B. subtilis	6.4	25.6
L. pentosus	25.6	51.2
E. coli	6.4	25.6
P. vulgaris	6.4	25.6
L. plantarum	-	-
Ps. aeruginosa	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เท่ากับค่า MIC และที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MBC ของ PG ต่อเชื้อตามลำดับ เปรียบเทียบการอยู่รอดหรือการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่เวลาที่ 0-24 ชั่วโมง โดยการนำเชื้อมา subculture เพาะเชื้อบนจานอาหารวุ้นเป็นระยะๆ ทุก 1-2 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ทดสอบมีรูปแบบของการอยู่รอดหรือการเจริญของแบคทีเรียที่คล้ายกันดังแสดงในรูปที่ 18-23 พบว่าแบคทีเรียใน NSS สามารถอยู่รอดได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหารวุ้นมีค่า colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ใกล้เคียง จุดเริ่มต้นตลอดการบ่มไว้ที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีใน MHB และใน MHB ที่มี PG 1.6 มก./มล. ค่า colony count ของจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น เรื่อยๆ ตามเวลาที่เพิ่มขึ้นจนถึง 24 ชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PG ในความเข้มข้นที่ค่า MIC และ MBC จะมีค่า colony count CFU/ml ลดลงเรื่อยๆ ตามเวลาที่เพิ่มขึ้น และพบว่าเชื้อใน PG ในความเข้มข้นที่ค่า MBC จะถูกฆ่าตายหมดภายใน 24 ชั่วโมง มีค่า CFU/ml ค่อยๆ ลดลงในแต่ละชั่วโมงจนถึงศูนย์ PG ที่ความเข้มข้น 25.6 มก./มล. มีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ได้แก่ S.aureus S. epidermidis B. subtilis E. coli และ P. vulgaris พบ colony count ลดลงถึง 0% ที่เวลา 20 20 12 16 และ 16 ชั่วโมงตามลำดับ (รูปที่ 18-22) ส่วน PG ในความเข้มข้นขึ้น 51.2 มก./มล. มีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรีย L. pentosus ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB ที่มี 0.3% yeast มี colony count ลดลงถึง 0% ที่เวลา 8 ชั่วโมง หลังการบ่มเชื้อที่ 37°ซ (รูปที่ 23)

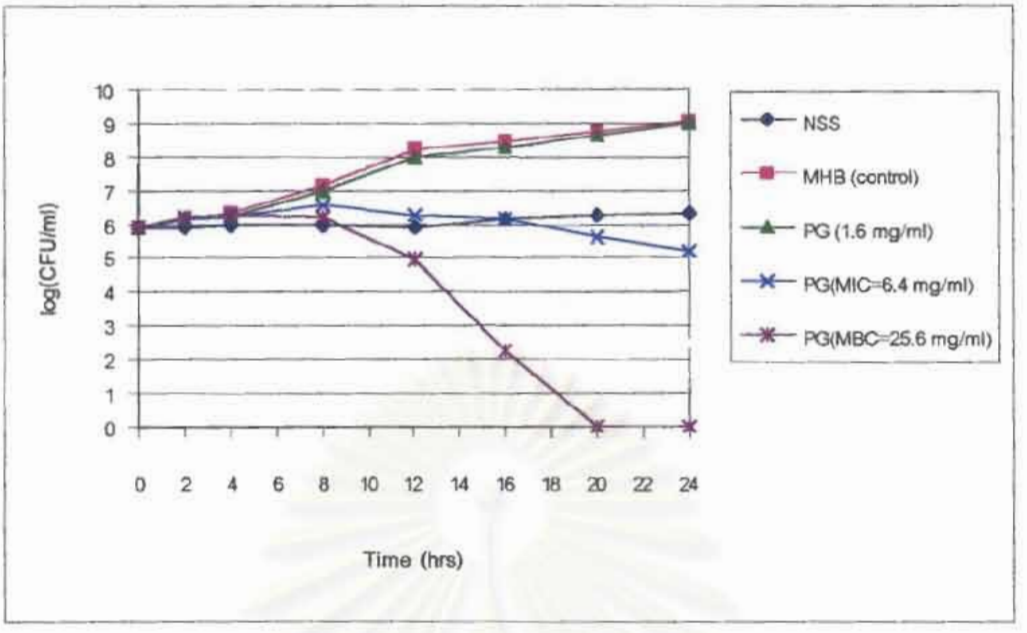
(3) <u>ผลของ PG ต่อการเร่งการฆ่าเชื้อแบคทีเรียใน NSS</u> ตรวจสอบคุณสมบัติของ PG ต่อการเร่งการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ โดย innoculate เชื้อใน NSS และ NSS ที่มี PG ในความเข้มข้นต่างที่ 0.02-2.5% เปรียบเทียบกับการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อยู่ใน NSS และใน NSS ที่มี glucose ในความเข้มข้นเกี่ยวกับ PG พบว่า PG ในความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.02% มีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หมดหลังการบ่มที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง และไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อตลอด 7 วัน ที่ทดสอบ ในขณะที่ผลของเพาะเชื้อในสารละลาย glucose ใน NSS หรือ NSS พบว่าแบคทีเรียยังมีชีวิตอยู่รอดได้ อย่างน้อย 3-7 วัน ในรูปที่ 24 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ S.aureus ใน NSS ที่มี PG เพียง 0.02% จะเร่งให้เกิดการฆ่าเชื้อหลังการ incubate ใน 1 วัน ขณะที่เชื้อใน NSS และ NSS ที่มี glucose ยังมีชีวิตรอดได้จนถึงวันที่ 3 และในรูปที่ 25 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ E.coli ใน NSS ที่มี PG เพียง 0.02% สามารถเร่งให้เชื้อตายภายใน 24 ชั่วโมง ขณะที่เชื้อใน NSS และ NSS ที่มี glucose ช่วยให้เชื้อรอดอยู่ได้จนถึงวันที่ 7 และเชื้อใน Distilled water สามารถรอดอยู่ได้นานถึง 3 วัน

(4) <u>ผลของ PG ต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย</u> การตรวจสอบผลการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของ PG จากการดู cell surface ของเชื้อแบคทีเรีย ที่ตายภายหลังบ่มเชื้อแบคทีเรียใน NSS ที่มี PG ที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ภาพของ bacteria cell surface ของ S.aureus ภายใต้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) พบการกระจุกตัวของเชื้อและมีชิ้นส่วนของ PG เกาะบนผิว



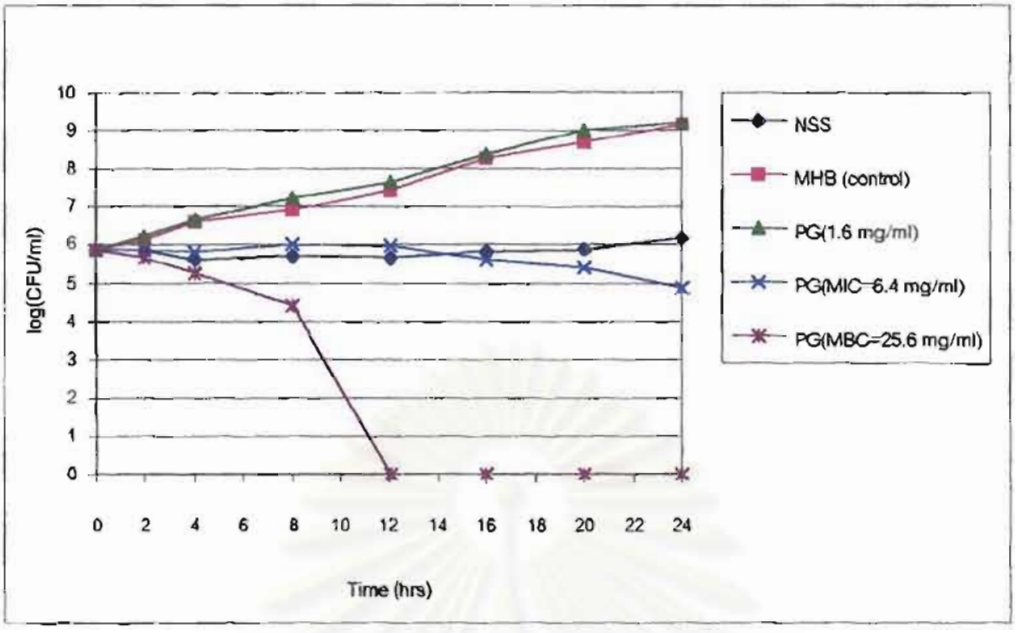
รูปที่ 18 Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *S. aureus* ใน mueller hinton broth

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



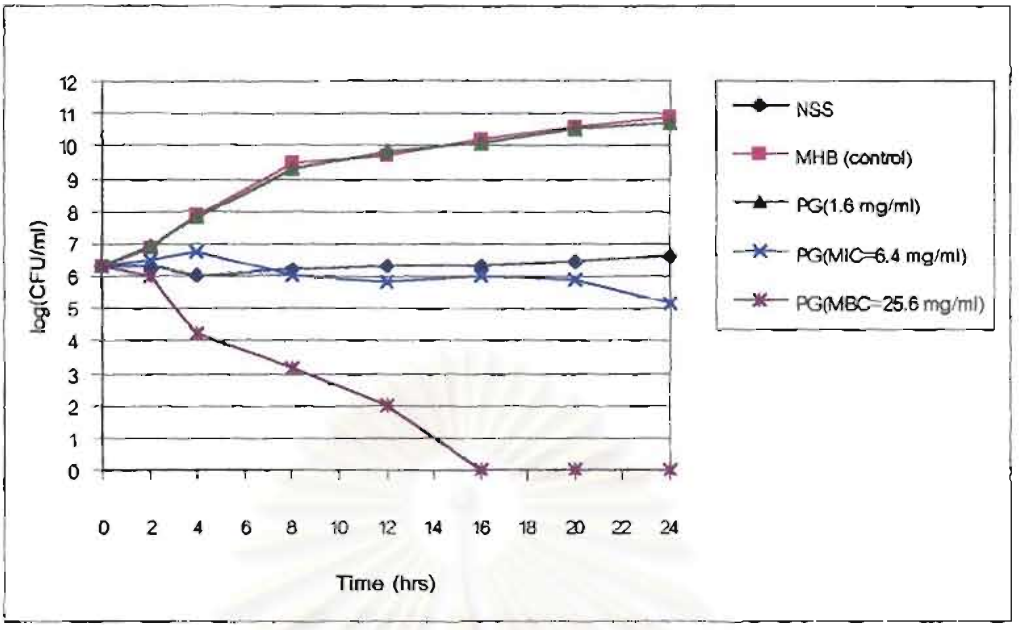
รูปที่ 19 Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ใน mueller hinton broth

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



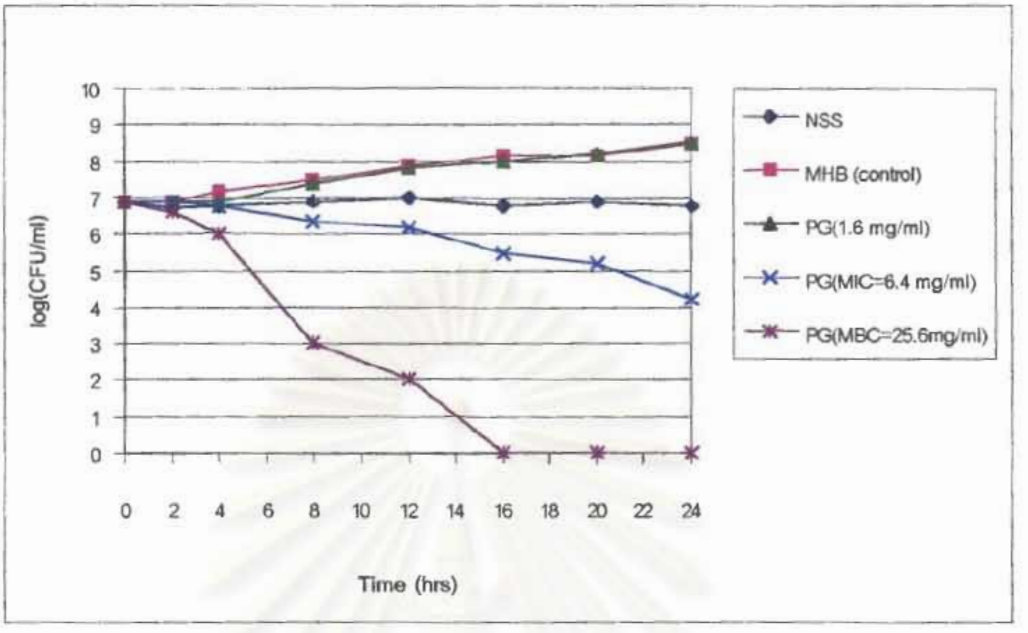
รูปที่ 20 Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *B. subtilis* ใน mueller hinton broth

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



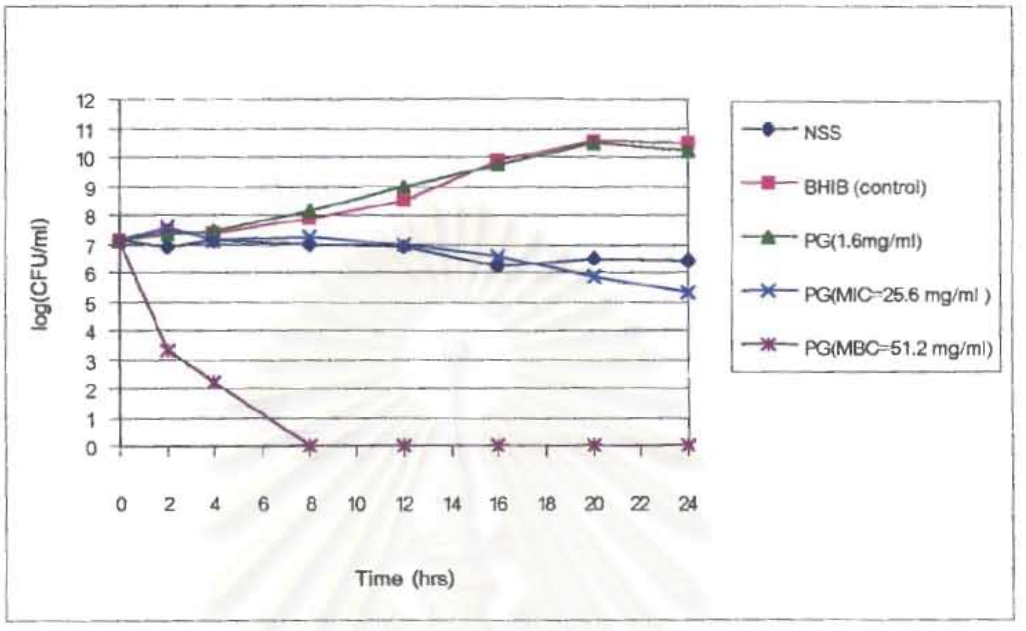
รูปที่ 21 Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *E. coli* ใน mueller hinton broth

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



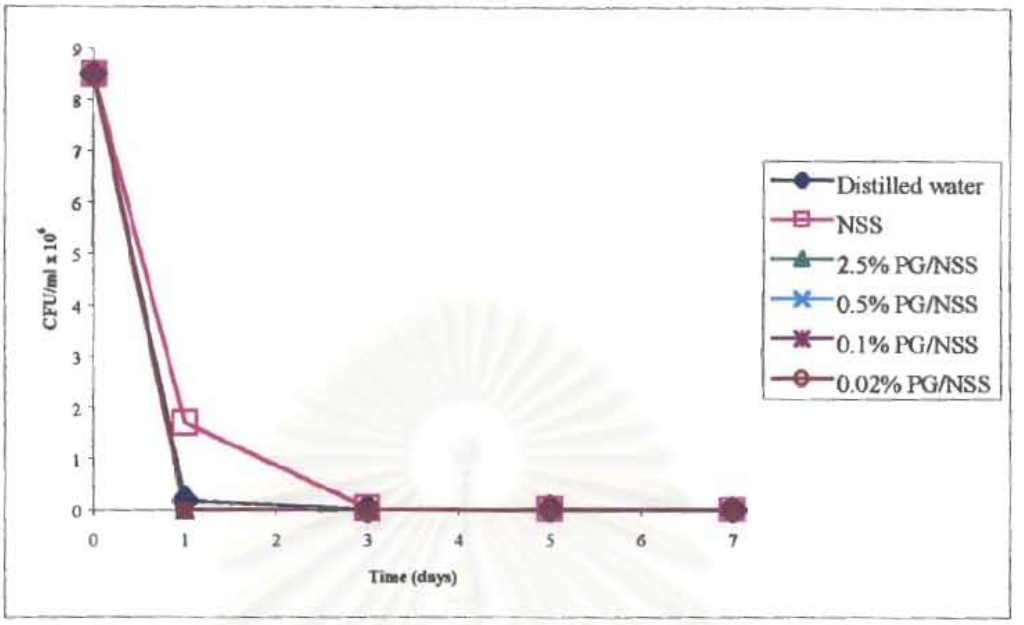
รูปที่ 22 Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *P. vulgaris* ใน mueller hinton broth

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

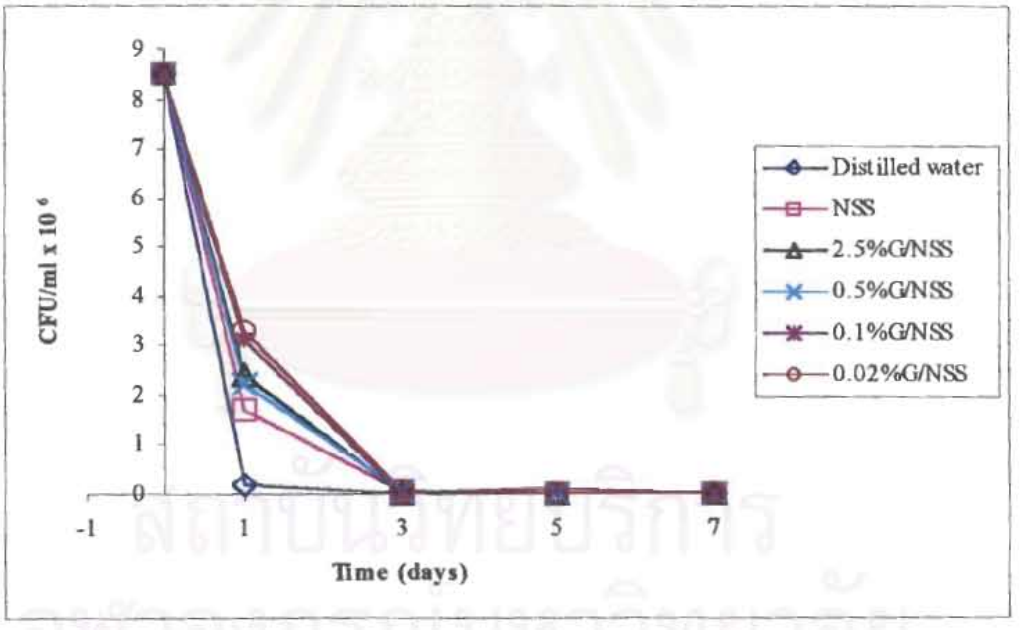


รูปที่ 23 Time-kill analysis ของ polysaccharide gel (PG) ต่อเชื้อ *L. pentosus* ใน brain heart infusion broth

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

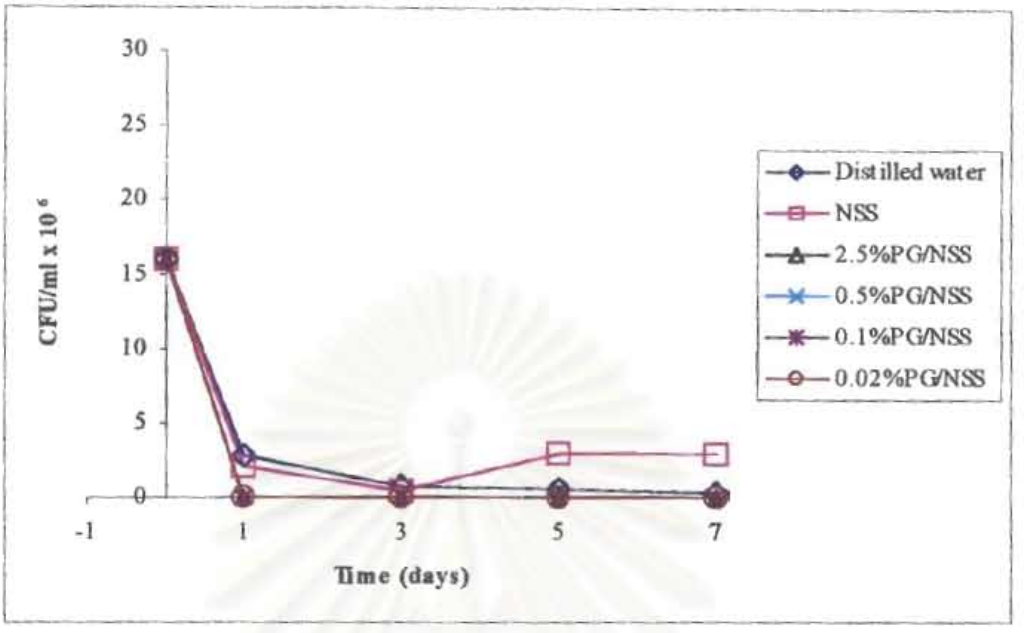


(a)

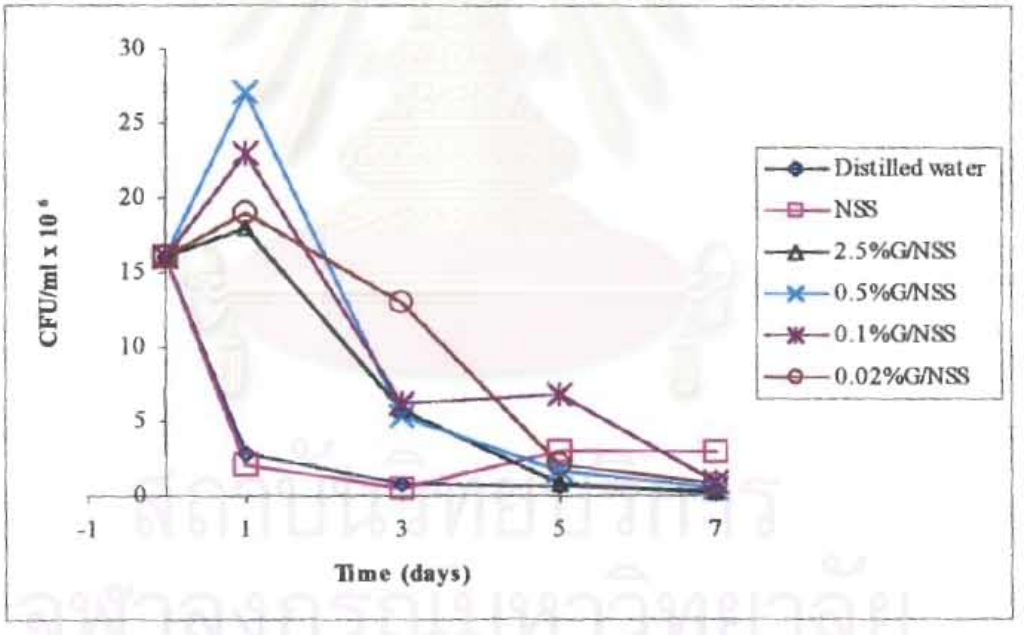


(b)

รูปที่ 24 การตายของเชื้อ *S. aureus* ใน normal saline solution (NSS) ที่เติมสาร (a) polysaccharide gel (PG), (b) glucose (G)

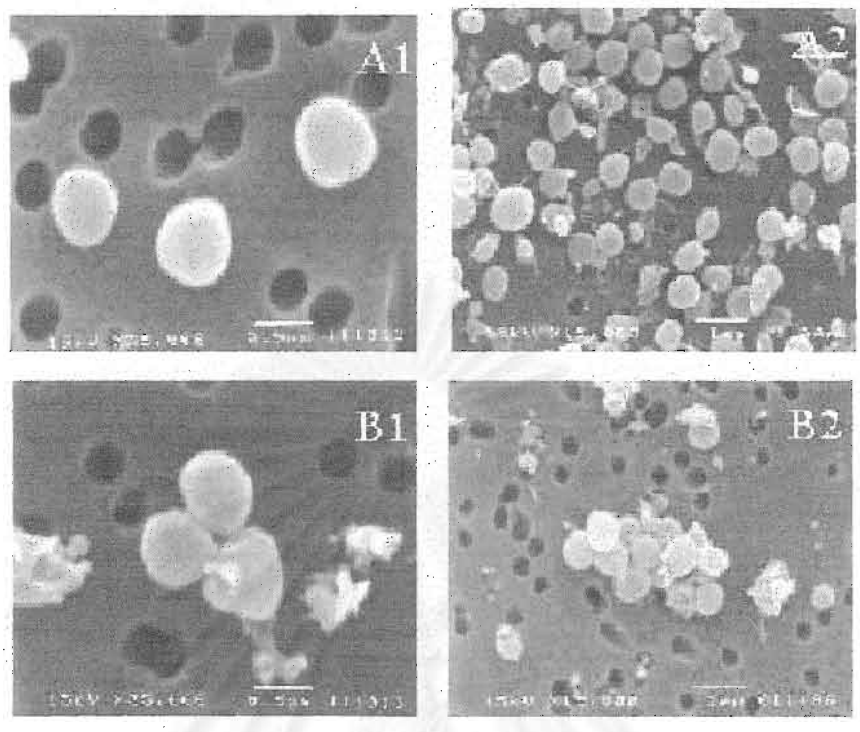


(a)



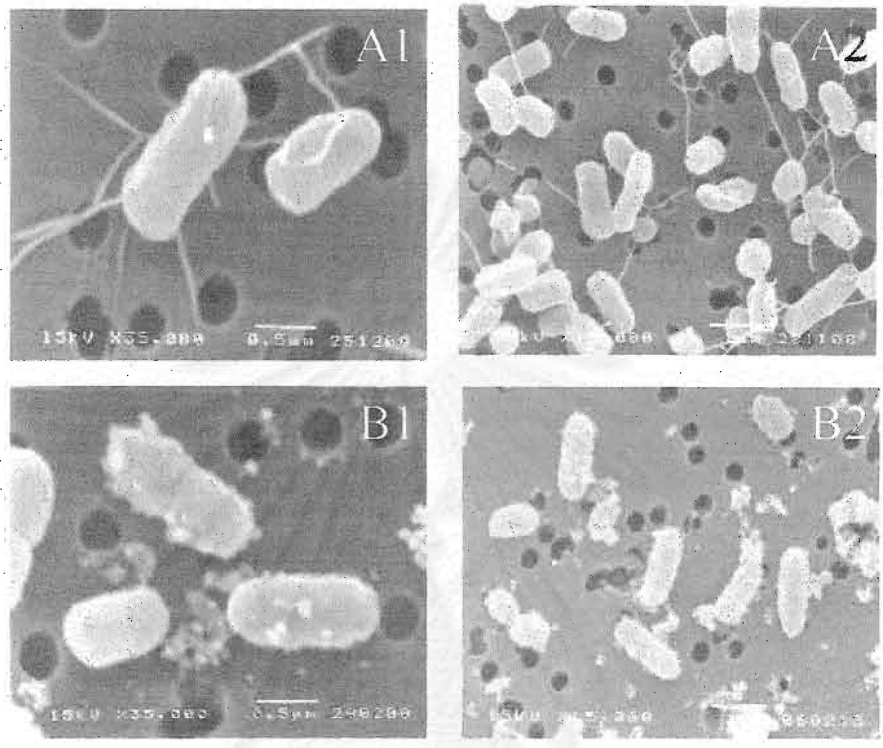
(b)

รูปที่ 25 การตายของเชื้อ *E. coli* ใน normal saline solution (NSS) ที่เติมสาร (a) polysaccharide gel (PG), (b) glucose (G)



รูปที่ 26 Scanning electron micrograph ของ *S. aureus* ภายหลังการบ่มเชื้อที่ 37^0 C นาน 24 ชั่วโมงใน NSS (A_1/A_2) และใน NSS ที่มี 0.32% PG (B_1/B_2) ไม่มีเซลล์ที่มีชีวิตรอดภายหลังอยู่ใน PG นาน 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 Scanning electron microscope ของ *E. coli* ภายหลังการบ่มเชื้อที่ 37^{0}C นาน 24 ชั่วโมงใน NSS (A_1/A_2) และใน NSS ที่มี 0.32% PG (B_1/B_2) ไม่มีเซลล์ที่มีชีวิตรอดภายหลังอยู่ใน PG นาน 24 ชั่วโมง

เซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 26 ส่วนภาพของ bacteria cell surface ของเชื้อ E.coli ภายใต้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดพบว่า fragella ของ E.coli หายไปและมีชิ้นส่วนของ PG เกาะอยู่บนผิวเซลล์ ต่างจากภาพของ E.coli ที่ยังมีชีวิตอยู่ใน NSS จะพบมี fragella เห็นได้ชัดเจนดังแสดงไว้ในรูปที่ 27 จากผลที่พบภายใต้กล้องจุลทัศน์ของเซลล์ที่ตายแสดงให้เห็นว่า PG อาจมีผลโดยตรงจับกับ cell surface ของแบคทีเรีย

4.2 <u>คุณสมบัติของ PG ต่อการต้านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase</u> หลังจากการเติมเอนไซม์ α-amylase ผสมในสารละลาย PG นำไปอุ่นที่ 37°ซ ปล่อยให้ย่อยนาน 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบโพลีแซคคาไรด์โดย Iodine solution test ตรวจสอบโครงสร้างของ α-helix ใน PG พบว่าไม่ให้สีม่วงกับน้ำยา Iodine อีกต่อไปแสดงว่าโครงสร้าง α-helix ของ PG ที่มีการต่อของน้ำตาลที่ α-(1-4) linkage จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ α-amylase และสลายโครงสร้างดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ใช้น้ำแป้ง พบว่าเกิดผลเช่นเดียวกัน คือ น้ำแป้งจะถูกย่อยจนไม่เกิดสีน้ำเงินกับน้ำยา Iodine อีกต่อไป ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 8 การตรวจสอบ reducing end ของน้ำตาลหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase ซึ่งตัด glucan ที่ α-(1-4) linkage ทำให้เหลือปลาย reducing and ที่ C_1-OH สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Colorimetric method ด้วย O-Toluidine test พบว่ามี reducing sugar เกิดขึ้นเล็กน้อยเปรียบเทียบกับ control ที่เป็นน้ำแป้งจะพบมี reducing sugar พบมีมากกว่าเมื่อเทียบกับการเห็นผลในสารละลาย PG ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 8

4.3 <u>คุณสมบัติของ PG ที่ทนต่อการย่อยด้วยกรด HCl เจือจาง</u> ผสมสารละลาย PG ใน HCl ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ที่ 0.01-0.1M HCl นำไปอุ่นที่ 37°ซ นาน 0-4 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาโครงสร้าง α-helix structure ใน PG ด้วย Iodine solution test ที่เวลาต่างๆ ยังพบการเกิดสีม่วงเช่นเดิม แสดงว่ายังคงมีโครงสร้าง α-helix ของ PG อยู่ สรุปว่า PG สามารถทนต่อย่อยด้วย HCl ผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

4.4 <u>ผลของ PG ต่อการกักเก็บน้ำตาล Glucose และ Sucrose</u>

4.4.1 <u>ผลของ PG ต่อการกักเก็บ glucose ด้วยวิธี dialysis technique โดยใช้ semipermeable membrane dialysis</u> การทดลองใช้เวลา dialysis ที่ 2 และ 3 ชั่วโมง ดังแสดงผลการทดลองไว้ในรูปที่ 28 พบปริมาณของ glucose ที่ออกมาภายนอกถุง dialysis ที่เวลา 2 และ 3 ชั่วโมง จะน้อยกว่า control ที่ 0% PG ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าที่ความเข้มข้น 1%PG จะมี glucose ออกมาภาย

ตารางที่ 8 การย่อย polysaccharide gel (PG) โดยเอนไซม์ ∝-Amylase เปรียบเทียบกับแป้ง (strach) และ glucomannan. Enzyme, 25 U ; substrate, 20 mg/ml ; incubation, 37 °C

Reagent	Time digestion	Blank (Distilled water,DW)	Control Starch (S)		Polysaccharide gel (PG)		Glucomannan (GM)	
Test for	(min)	DW+Enz.	S+DW	S+Enz.	PG+DW	PG+Enz.	GM+DW	GM+Enz.
I_2 Solution (∝-helix test)	0	⊖ ve	⊕ ve (blue)	⊕ ve (blue)	⊕ ve (purple)	⊕ ve (purple)	⊖ ve	⊖ ve
	30	⊖ ve	⊕ ve (blue)	⊖ ve	⊕ ve (purple)	⊖ ve	⊖ ve	⊖ ve
O-Toluidine (reducing end test)	0	⊖ ve	⊖ ve	⊕ ve(green) eq. to 0.6 mg maltose	⊖ ve	⊖ ve	⊖ ve	⊖ ve
	30	⊖ ve	⊖ ve	⊕ ve(green) eq. to 17.52 mg maltose	⊖ ve	⊕ ve(green) eq. to 6.3 mg maltose	⊖ ve	⊕ ve(green) eq. to 4.8 mg maltose

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลของกรดเกลือเจือจางที่ความเข้มข้นที่ 0.01-0.1 M ต่อการย่อย polysaccharide gel (PG) ที่ปล่อยให้ย่อยที่ 37^0 ซ ในเวลา 0-4 ชม, Substrate (PG), 20 mg/ml in dilute HCl; Control = PG in water; ⊕ ve = purple color.

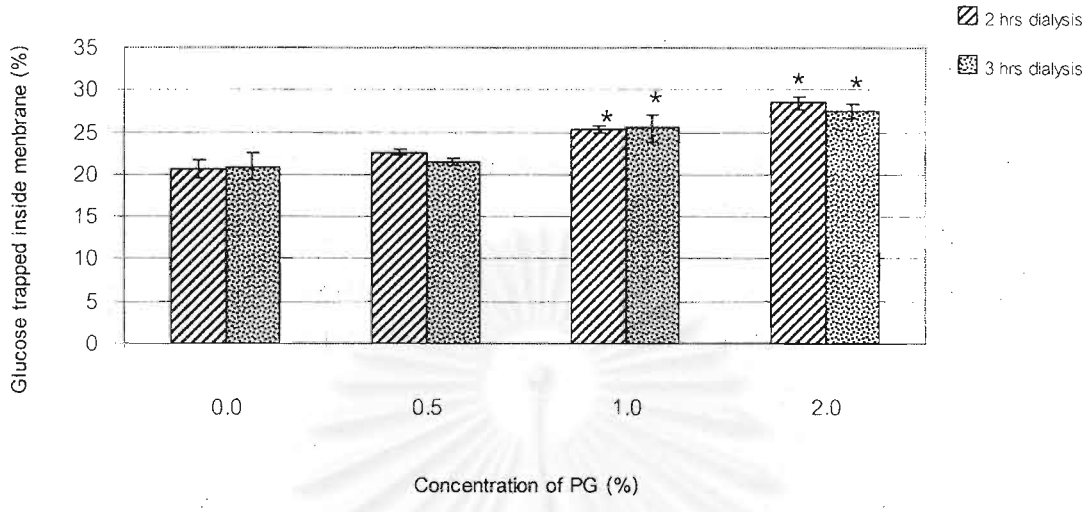
Time (hr.) hydrolysis at 37^0 C	**I_2 test for ∝-helix of polysaccharide after acid hydrolysis**			
	control (PG in water)	**PG in 0.01 M HCl**	**PG in 0.05 M HCl**	**PG in 0.1 M HCl**
0	⊕ ve	⊕ ve	⊕ ve	⊕ ve
0.5	⊕ ve	⊕ ve	⊕ ve	⊕ ve
1	⊕ ve	⊕ ve	⊕ ve	⊕ ve
4	⊕ ve	⊕ ve	⊕ ve	⊕ ve

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

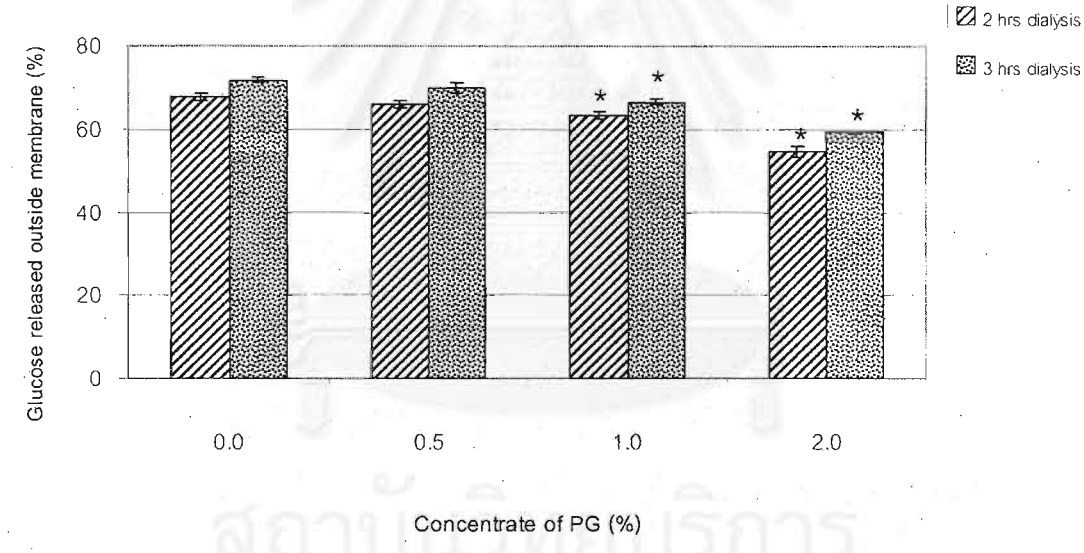
นอกถุง semipermeable membrane ที่ 63.3 และ 66.5% ของปริมาณ glucose เริ่มต้นภายในถุงที่เวลา 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และที่ 2%PG จะทำให้มี glucose ออกมาอยู่ภายนอกถุงที่ 54.8 และ 59.4% ของปริมาณ glucose ที่ใส่ในถุง ที่เวลา 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าน้ำตาลที่ออกมาภายนอกถุง dialysis ที่ 0%PG ซึ่งพบที่ 67.8% และ 71.9% ที่เวลา 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลที่ได้จะสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณของ glucose ที่ถูกกักเก็บเหลืออยู่ภายในถุง semipermeable membrane ในรูปที่ 28 (a) โดยที่ 1% และ 2% PG จะมี glucose ถูกกักเก็บอยู่ในถุงเหลืออยู่มากกว่า ที่ 0% PG พบว่าที่ 1% PG จะมี glucose กักเก็บไว้กับ PG ในถุงที่ 25.4% และที่ 25.5 ของปริมาณ glucose ที่ใส่ในถุง ที่เวลา 2 ชั่วโมงและ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และที่ 2% PG มี glucose กักเก็บไว้กับ PG ในถุง ที่ 28.5% และ 27.5% ของปริมาณ glucose เริ่มต้นที่ใส่ไว้ในถุงที่ 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่ 0% PG ที่มี glucose อยู่ในถุงที่ 20.6% และที่ 20.9% ที่เวลา 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า PG มีผลต่อการกักเก็บน้ำตาล glucose ได้บางส่วน การเปรียบเทียบการกักเก็บและการปลดปล่อย glucose ของ PG กับ glucomannan ที่ใช้เป็น standard polysaccharide แสดงไว้ในรูปที่ 30 (a) และ (b) ตามลำดับ จะพบค่า PG สามารถกักเก็บน้ำตาล glucose ได้ไม่ดีเท่า glucomannan ในทุกความเข้มข้นของ polysaccharide 1% 2% และ 3% ที่ทดสอบ

4.4.2 ผลของ PG ต่อการกักเก็บ sucrose ด้วยวิธี dialysis technique โดยใช้ semipermeable membrane dialysis การทดลองได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 29 โดยใช้เวลาการ dialysis นาน 3 ชั่วโมง จะพบว่า การกักเก็บ sucrose ไว้กับ PG ในถุง dialysis ที่มี 1% 2% และ 3%PG พบมีความเข้มข้น 27.4% 29.0% และ 30.3% ของ tolal sucrose ซึ่งมากกว่าที่ 0%PG พบมี sucrose อยู่ภายในถุง 25.3% ขณะที่พบ sucrose ออกมาภายนอกถุง dialysis ของ mixture sucrose ที่มี 1% 2% และ 3% PG ออกมาได้น้อยกว่าโดยพบออกมามีความเข้มข้น 67.1% 66.9% และ 65.8% ของ tolal sucrose เมื่อเทียบกับที่ 0%PG มี sucrose ออกมาภายนอกถุง 74.2% ของ tolal sucrose แสดงว่า PG มีผลบางส่วนในการกักเก็บน้ำตาล sucrose ได้

4.4.3 ผลของ PG ต่อการดูดซึม glucose ผ่านลำไส้เล็กหนูขาวในหลอดทดลอง การทดลองได้ผลแสดงไว้ในรูปที่ 31 แสดงให้เห็นว่าปริมาณของ glucose ที่ดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็ก jejunum ของหนูขาว จากด้านในออกมาด้านนอกของลำไส้ เมื่อมี 2% และ 3%PG ได้ 66.5% และ 57.6% ของการดูดซึม glucose ที่ 0%PG ตามลำดับ แสดงว่า PG มี ผลต่อการกักเก็บสารน้ำตาล glucose ช่วยป้องกันไม่ให้ glucose ถูกดูดซึมในลำไส้ได้ดี ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองด้วยวิธี dialysis โดยใช้ semipermeable membrane ในการทดลองครั้งนี้

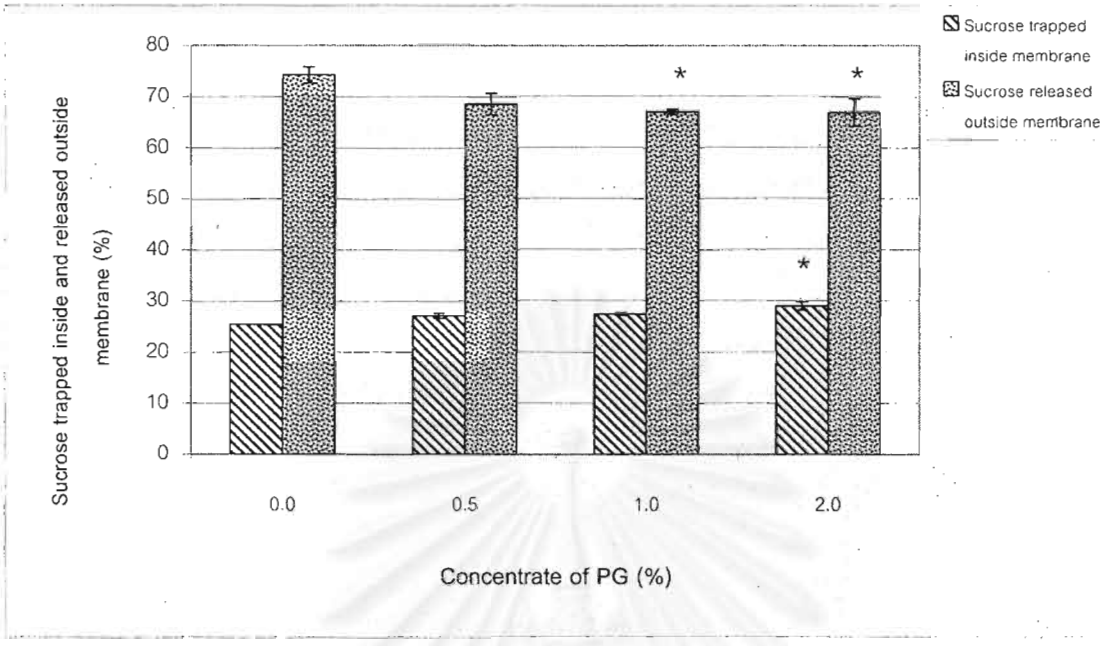


(a)



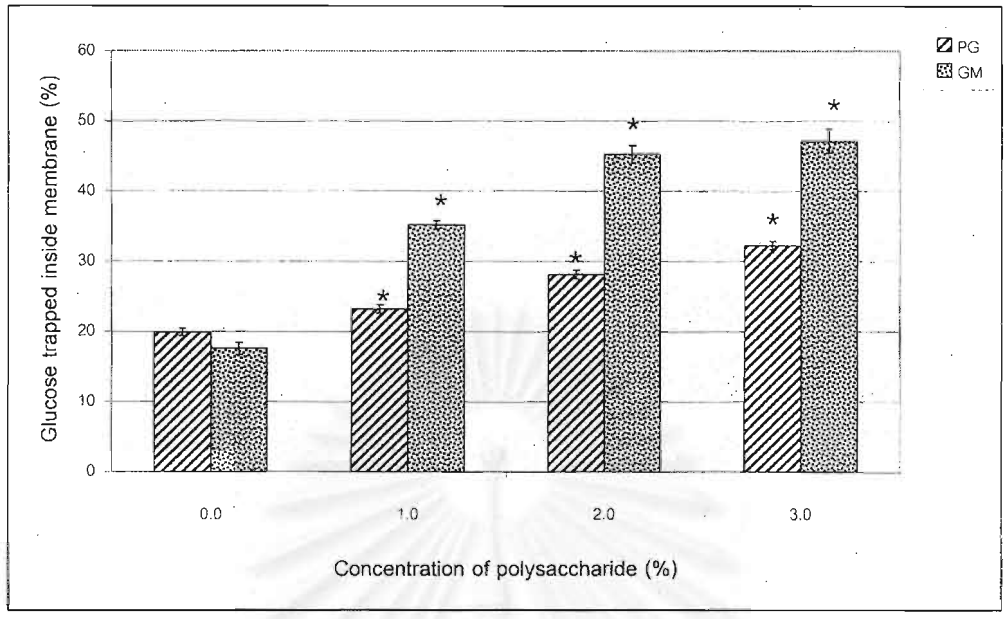
(b)

รูปที่ 28 ผลของ polysaccharide gel (PG) ต่อการกักเก็บ (trapped) น้ำตาล glucose (a) และการปลดปล่อย (released) ของน้ำตาล glucose (b) ผ่าน semipermeable membrane ภายหลังการ dialysis นาน 2 และ 3 ชั่วโมง, Data แสดงค่า mean $\pm$ S.E.M, * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากตัวควบคุมที่ไม่มี PG หรือที่ 0% PG

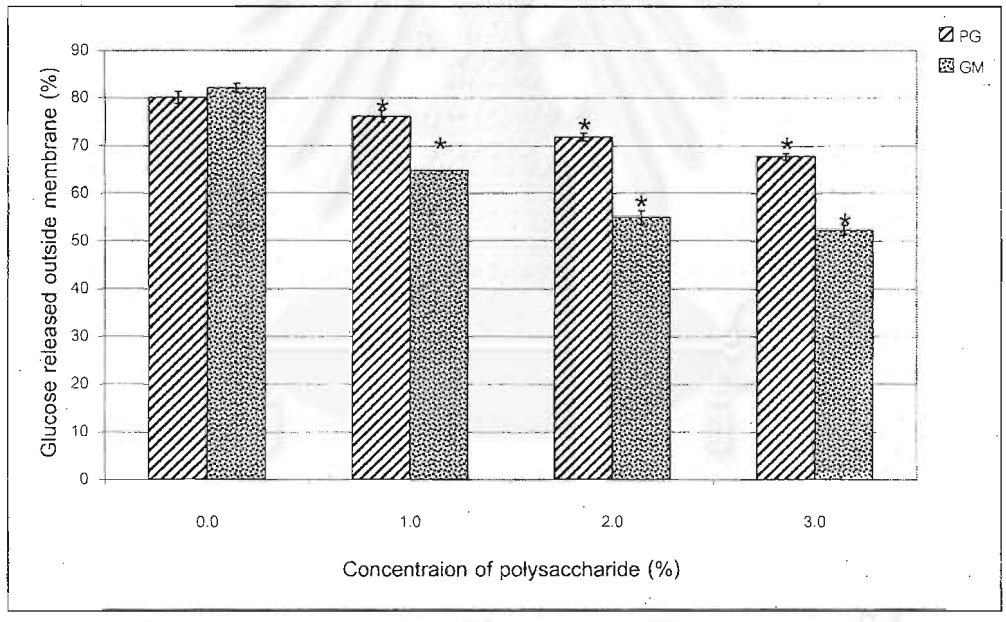


รูปที่ 29 ผลของ polysaccharide gel (PG) ต่อการกักเก็บ (trapped) น้ำตาล และ การปลดปล่อย (released) ของน้ำตาล Sucrose ผ่าน semipermeable membrane ภายหลังการ dialysis นาน 2 ชั่วโมง, Data แสดงค่า mean $\pm$ S.E.M, * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากตัวควบคุมที่ไม่มี PG หรือที่ 0% PG

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

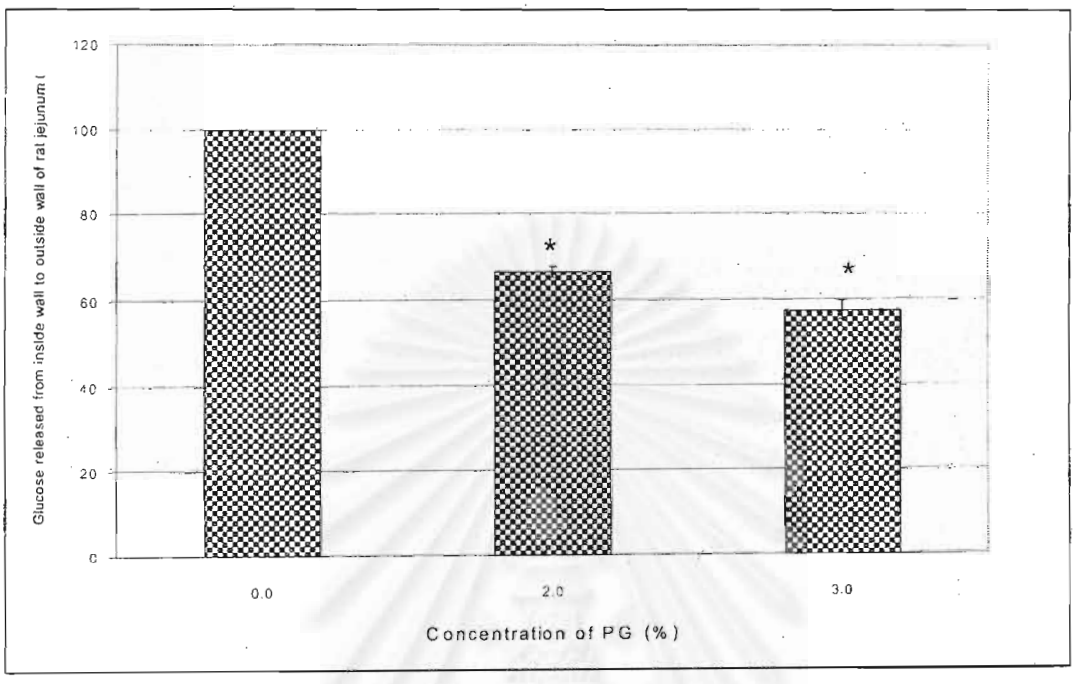


(a)



(b)

รูปที่ 30 ผลของ polysaccharide gel (PG) เปรียบเทียบกับ standard polysaccharide glucomannan (GM) ต่อการกักเก็บสารน้ำตาล glucose (a) และ การปลดปล่อยน้ำตาล glucose ผ่าน semipermeable membrane (b) ภายหลังการ dialysis นาน 2 ชั่วโมง, Data แสดงค่า mean $\pm$ S.E.M, * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากตัวควบคุมที่ไม่มี PG หรือที่ 0% PG และ ที่ไม่มี GM หรือที่ 0% GM ตามลำดับ



รูปที่ 31 ผลของ polysaccharide gel (PG) ต่อการปลดปล่อยน้ำตาลผ่านผนังลำไส้เล็ก (jejunum) ของหนูขาว ภายหลังการทำ dialysis นาน 1 ชั่วโมง, Data แสดงค่า mean $\pm$ S.E.M, * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากตัวควบคุมที่ไม่มี PG หรือที่ 0% PG

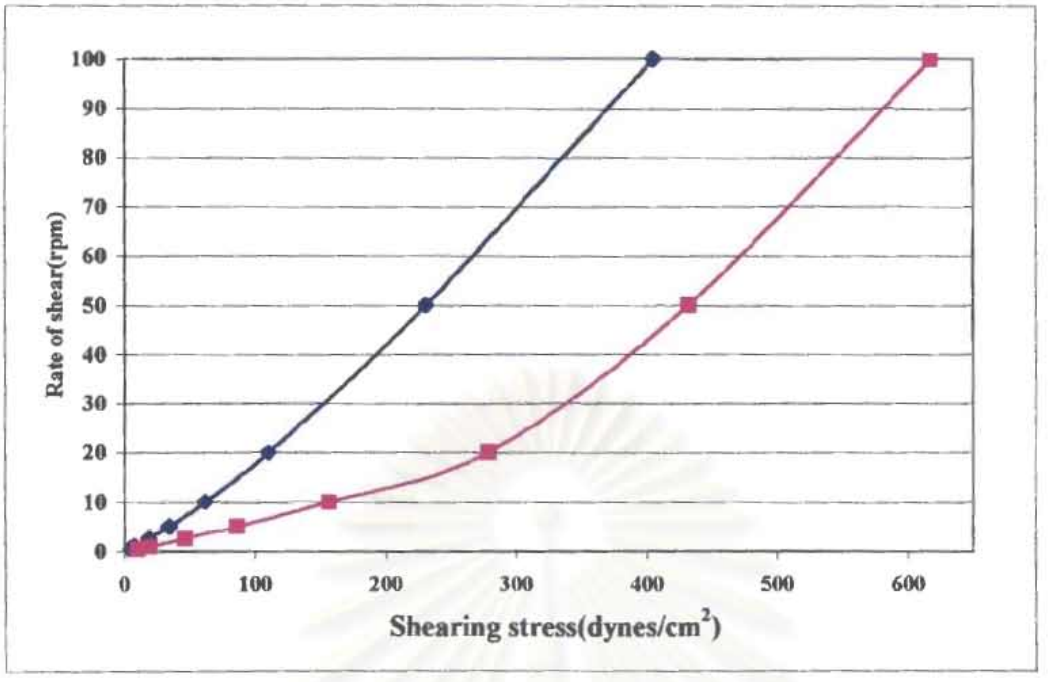
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 การใช้ประโยชน์ของ PG ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ยา/เครื่องสำอาง

5.1 <u>คุณสมบัติการไหลของ PG</u> การศึกษาคุณสมบัติการไหลของสารละลาย PG ที่ความเข้มข้น 3 และ 4% จากการดูความสมพันธ์ระหว่าง rate of shear (rpm) และค่า shearing stress (synes/cm^2) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 32 สารละลาย PG แสดงคุณสมบัติการไหลเป็นชนิด Non-Newtonian ในรูปแบบ pseudoplastic behavior โดยเมื่อเพิ่ม shear rate จะทำให้ viscosity ลดลงซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีเหมาะแก่การใช้เป็นสารช่วยเตรียมเภสัชภัณฑ์และเครื่องสำอาง

5.2 <u>ผลของการเตรียมตำรับเจล PG gel</u> ผลิตภัณฑ์ตำรับเจล PG gel เตรียมโดยใช้ PG เป็นตัวยาหลักในความเข้มข้น 2.5% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ การเตรียมพบว่าได้ผลิตภัณฑ์เจลที่มีเนื้อเจลเนียนนุ่ม ดังแสดงไว้ในรูปที่ 33 และบรรยายไว้ในตารางที่ 10 ผลิตภัณฑ์ PG gel ที่เตรียมได้พบว่ามีความคงตัวดีภายหลังผ่านการทดสอบโดยวิธี Temperature cycling method รวม 6 cycles และหลังการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 วัน ผลิตภัณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลงยังคงเหมือนเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ ผลิตภัณฑ์ PG gel สามารถใช้เป็นเจลทาฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้คาดหมายว่าจะเหมาะสำหรับใช้เป็นยาทาภายนอก เพื่อป้องกันและรักษาการติดเชื้อสำหรับบาดแผลของผิวหนัง การทดลองใช้เพื่อเป็นเจลทาบาดแผลผิวหนัง จึงน่าสนใจในการทดลองเพิ่มเติมต่อไป

5.3 <u>ผลของการเตรียมตำหรับเจล Vitamin E gel และ Vitamin C gel โดยใช้ PG เป็นสารช่วยเตรียมเจล</u> ผลิตภัณฑ์ตำรับเจล เตรียมโดยใช้ PG เป็นสารช่วยเตรียมตำรับ Vitamin E gel เตรียมโดยใช้ปริมาณของ PG 2.5 3 และ 3.5% (w/v) ได้ผลิตภัณฑ์เจลที่มีคุณลักษณะเนื้อเจลเนียน มีสีเหลืองอ่อนใส เทออกได้ง่าย ตั้งทิ้งไว้จะหนืดขึ้นเล็กน้อย เมื่อกวนจะเหลวลง มีคุณลักษณะที่ดูภายนอกดังแสดงไว้ในรูปที่ 33 และ ตารางที่ 10 ผลิตภัณฑ์ Vitamin C gel-PG 2.5 เตรียมโดยใช้ PG ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ได้ผลิตภัณฑ์เจลที่มีเนื้อเนียนนุ่มมีสีกลีบบัวอ่อนค่อนข้างใส ค่อนข้างหนืดเทออกง่าย ตั้งทิ้งไว้เนื้อเจลจะหนืดขึ้น เมื่อกวนจะเหลวลง เนื้อเจลมีความคงตัวดีมีคุณสมบัติดังแสดงไว้ในตารางที่ 10 และรูปที่ 33 การทดลองผลิตภัณฑ์ Vitamin E gel โดยทาผิวหนัง พบว่าสูตรตำรับ E gel 1-PG 2.5 เมื่อทาจะแห้งได้เร็วกว่า เมื่อแห้งจะไม่รู้สึกเหนอะหนะที่ผิวหนัง มีความรู้สึกผิวหนังลื่นขึ้นเนียนขึ้น ในขณะที่ตำรับ E gel 2-P 3.0 และ E gel 3-PG 3.5 เมื่อทาจะรู้สึกคล้ายกัน แต่หลังจากทาไว้นานจะสังเกตเห็นรอยเป็นคราบเล็กน้อย โดยเฉพาะตำรับ E gel 3-PG 3.5 ซึ่งอาจมีความเข้มข้นของ PG มากเกินไป ดังนั้นการลดปริมาณของ PG ลงมาที่ 2.5% (w/v) ในสูตรตำรับเจล จะทำให้ได้คุณภาพของผลิตภัณฑ์เจล เมื่อใช้ทาผิวน่าพอใจและเนื้อเจลมีคุณลักษณะน่าพอใจ การทดลองผลิตภัณฑ์ Vitamin C gel โดยทาผิวหนังพบว่าเมื่อทาแห้งแล้วจะไม่รู้สึกเหนียวเหนอะที่ผิวหนัง ผิวหนังลื่นเนียนขึ้น คุณสมบัติความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลภายหลังการผ่านการ

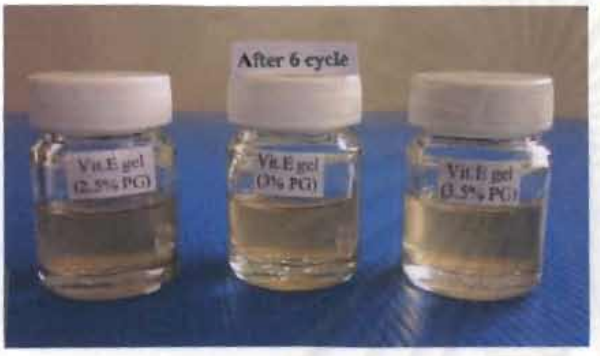


รูปที่ 32 คุณลักษณะทาง Rheology ของ polysaccharide gel (PG).
(◆) = 3%PG, (■) = 4%PG

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(a)

(c)



(b)

(d)

รูปที่ 33 ผลิตภัณฑ์เจลเตรียมจาก Polysaccharide gel (PG) (a) ตำรับ Vitamin E gel เก็บที่อุณหภูมิห้อง (b) ตำรับ Vitamin E gel ภายหลังการทดสอบความคงตัวตาม วิธี Temperature cycle method ครบ 6 cycle (c) ตำรับ Vitamin C gel (d) ตำรับ PG gel

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 คุณลักษณะและความคงตัวของตำรับเจล PG gel Vitamin E gel และ Vitamin C gel ที่ใช้ polysaccharide gel (PG) เป็นสารช่วยเตรียมเจล

สูตรตำรับ	คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์เจล		
	เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	เมื่อผ่านการทดสอบ Temp. Cycling ครบ 6 cycle	เมื่อตั้งทิ้งไว้นาน 60 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
1 PG gel	เนื้อเจลเนียน-นุ่ม ค่อนข้างข้น หนืดสีขาวอมชมพูกลีบบัว ค่อนข้างใสไม่มีฟอง เทออกง่าย เมื่อตั้งทิ้งค้างคืนเจลจะหนืดขึ้น เมื่อกวนจะเหลวลง ความหนืด = 3,586 ± 173 cps	ไม่เปลี่ยนแปลงพบว่าเหมือนเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ ความหนืด = 3,913 ± 467 cps pH ไม่เปลี่ยน	ดูภายนอกไม่เปลี่ยนแปลง เนื้อเจลแข็งขึ้น เทออกยาก เมื่อกวนหรือเขย่าแรงๆ จะเหลวลง ความหนืด >10,000 cps
2 E gel 1-PG 2.5	เนื้อเจลเนียน ค่อนข้างหนืด สีเหลืองอ่อนใส มีฟองน้อยมาก เทออกได้ง่าย เมื่อตั้งทิ้งไว้ค้างคืนเจลจะหนืดขึ้น เทออกได้ เมื่อกวนจะเหลวลง ความหนืด = 5,427 ± 120 cps	ไม่เปลี่ยนแปลงพบว่าเหมือนเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ ความหนืด = 4,733 ± 22 cps pH ไม่เปลี่ยน	ดูภายนอกไม่เปลี่ยนแปลง เนื้อเจลแข็งขึ้น เทออกยาก เมื่อกวนหรือเขย่าแรงๆ จะเหลวลง ความหนืด > 10,000 cps
3 E gel 2-PG 3.0	เนื้อเจลเนียน ค่อนข้างหนืด สีเหลืองอ่อนใส มีฟองเล็กน้อย เทออกง่าย เมื่อตั้งทิ้งไว้ค้างคืน เจลจะหนืดขึ้น เทออกได้ เมื่อกวนจะเหลวลง ความหนืด = 6,028 ± 240 cps	ไม่เปลี่ยนแปลงพบว่าเหมือนเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ ความหนืด = 4,706 ± 68 cps pH ไม่เปลี่ยน	ดูภายนอกไม่เปลี่ยนแปลง เนื้อเจลแข็งขึ้น เทออกยาก เมื่อกวนหรือเขย่าแรงๆ จะเหลวลง ความหนืด > 10,000 cps
4 E gel 3-PG 3.5	เนื้อเจลค่อนข้างเนียน ค่อนข้างหนืด สีเหลืองอ่อนใส มีฟองเล็กน้อย เทออกง่าย เมื่อตั้งทิ้งค้างคืนเจลจะแข็งขึ้น เทยากขึ้น เมื่อกวนจะเหลวลง ความหนืด = 6,538 ± 351 cps	ไม่เปลี่ยนแปลงพบว่าเหมือนเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ ความหนืด = 5,380 ± 242 cps pH ไม่เปลี่ยน	ดูภายนอกไม่เปลี่ยนแปลง เนื้อเจลแข็งขึ้น เทออกยาก เมื่อกวนหรือเขย่าแรงๆ จะเหลวลง ความหนืด > 10,000 cps
5 C gel –PG 2.5	เนื้อเจลเนียน ค่อนข้างหนืด สีขาวอมชมพูกลีบบัวอ่อน ค่อนข้างใสมีฟองเล็กน้อยมาก เทออกง่าย เมื่อตั้งทิ้งไว้ค้างคืน ไม่มีฟองเทออกง่าย เมื่อกวนจะเหลวลง ความหนืด = 2,880 ± 250 cps	เนื้อเจลเนียนไม่เปลี่ยนแปลงพบว่าเหมือนเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ ความหนืด = 4,250 ± 400 cps pH ไม่เปลี่ยน	ดูภายนอกไม่เปลี่ยนแปลง เนื้อเจลแข็งขึ้น เทออกยาก เมื่อกวนหรือเขย่าแรงๆ จะเหลวลง ความหนืด > 10,000 cps

ทดสอบด้วยวิธี Temperature Cycling Method รวม 6 cycles พบว่าตำรับ Vitamin C gel เตรียมจาก PG ช่วยเตรียมตำรับเจล มีความคงตัวดีลักษณะภายนอกของตำรับเจลเหมือนเดิมเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ ผลิตภัณฑ์ Vitamin E gel และ Vitamin C gel ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 3 เดือน เช่นเดียวกัน การทดลองแสดงว่า PG สามารถใช้ประโยชน์ช่วยเตรียมผลิตภัณฑ์ยาหรือเครื่องสำอางในรูปแบบเจลได้ผลน่าพอใจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

1. การสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน

สารโพลีแซคคาไรด์ PG และ PF สามารถสกัดได้จากเปลือกทุเรียนได้จากเปลือกสดและเปลือกแห้ง การสกัดจากเปลือกแห้งจะได้ผลผลิตสูงกว่าสกัดจากเปลือกสด แต่พบปัญหาว่าต้องต้องล้างเอาสีออกที่ปนเปื่อนออกจาก PG ผลผลิตของ PG ที่สกัดจากเปลือกแห้ง จะเห็นสีไม่ขาวเท่า PG สกัดจากเปลือกสดที่ล้อมสับหรือสักลิ่ม ส่วน PG จะได้ผงสีขาว การสกัดจากเปลือกแห้งได้ % yield ของ PG ประมาณ 10% และได้ PF ประมาณ 15% หรือ 30% ของกากเปลือกทุเรียนที่เหลือจากสกัดเอา PG ออกไปแล้ว

2. องค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบน้ำตาลใน PG และ PF

PG สามารถพองตัวและละลายได้ในน้ำได้สารข้นหนืดขณะที่ PG ไม่ละลายน้ำองค์ประกอบธาตุหลักใน PG และ PF ไม่พบมีธาตุ Nitrogen และ Sulfur มีองค์ประกอบของ C : H : O ใน atomic ratio ในสัดส่วนที่สามารถเขียนสูตรโมเลกุลเบื้องต้นได้เป็นต้น $[C : H_2 : O]_2$ เช่นเดียวกับ carbohydrate การทดสอบทางเคมีพบว่าเป็นสาร carbohydrate โดยวิธี calorimetric method กับ Iodine solution test ได้สีม่วง แสดงว่ามีโครงสร้างของ α-helical structure ที่ไม่เป็นสายยาวเท่าโมเลกุลของแป้ง PG อาจมีโครงสร้าง α-helical ของการต่อเป็น chain ของน้ำตาลที่ α (1-4) link ต่อกันประมาณ 30 โมเลกุลของน้ำตาลได้เป็นสารสั้นๆ ของ α-helical structure ของ polysaccharide ที่ให้ผลกับ Iodine solution ได้เป็นสีม่วงเกิดขึ้น (ref) การตรวจสอบไฟเบอร์ไม้พบมีไฟเบอร์ใน PG ขณะที่พบไฟเบอร์ใน PF เป็นส่วนใหญ่มีถึง 96% แสดงถึงความแตกต่างอย่างชัดเจนของสารสกัด PG และ PF จากเปลือกทุเรียน การวิเคราะห์องค์ประกอบของเกลือแร่พบมีองค์ประกอบของเหลือของธาตุส่วนใหญ่ได้แก่ Na K Ca Mg Fe มีแร่ธาตุส่วนน้อยได้แก่ Mn Cu Zn ส่วนใน PF พบ Si ถึง 8.33 mg/100 g PF การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลใน PG และ PF โดยวิธีวิเคราะห์ต่างๆ ได้แก่ colorimetric methood วิเคราะห์ PG และ PF ทั้งก่อนและหลังการทำ acid hydrolysis ของ PG และ PF และการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลของ acid hydrolyzate ของ PG และ PF โดยวิธี TLP และ HPLC methood พบมีน้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ glucose fructose rhamnose arabinose และ galacturonic acid ใน PG น่าสังเกตุว่าใน PG มีกรดน้ำตาล galacturonic acid สูงกว่า 50% โดยการตรวจวิเคราะห์โดย calorimetric method ด้วย m-hydroxydiphenyl reagent พบประมาณ 55.8% ขณะที่การวิเคราะห์โดยวิธี IR spectrometer พบประมาณ 52.5% เปรียบเทียบกับ galacfuronic acid ส่วนใน PF พบมรน้ำตาลชนิดเดียว คือ glucose

3. คุณสมบัติทางกายภาพของ PG และ PF

การวิเคราะห์คุณสมทางกายภาพของสารสกัด PG และ PF พบว่า ผงของ PG เป็น amorphous powder ในขณะที่ผงของ PF แสดงคุณสมบัติของ crystal powder (รูปที่ 7) และการตรวจสอบจาก IR spectra ของ PG และ PF จะใกล้เคียงกันยกเว้นความแตกต่างที่ absarption band ที่ 1749 cm^{-1} และที่ 1639 cm^{-1} ที่แสดงถึงการมี functional group ของ C=O และ COO^- ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ทางเคมีของปฏิกิริยา m-hydroxydiphenyl reagent แสดงผลของการมี uronic acid ใน PG ผลของ PG และ PF ที่บดละเอียดผ่านแร่ง 80 mesh มีขนาด particle size ในช่วงค่า 222-301 μm และ 140-164 μm ตามลำดับซึ่งใหญ่กว่าขนาดของผง cellulose powder (Elcema p100) ที่มีขนาดในช่วง 56-76 μm

(1) <u>ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อสารสกัด PG</u> จะพองตัวและละลายได้ในน้ำได้สารละลายข้นหนืดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้น สารละลาย 2% PG มีความหนืดประมาณ 300 mPas PG สามารถละลายในน้ำได้ 6% จะมีความหนืดสูงจนเป็นเจลข้นแข็ง สารละลาย PG ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมี PHO ด้วย แสดงถึงองค์ประกอบของ PG มีความเป็นกรดของ acid sugar คือ galacturonic acid สารละลาย PG ความเข้มข้น 3% มีค่า pH 2.2-2.3 ค่าความหนืดของ PG สูงสุดที่ pH ต่ำประมาณ 2 เมื่อเติม NaOH ทำให้มี pH เพิ่มขึ้น PG จะมีความหนืดลดลง หรือเมื่อเติม HCel ที่ pH ต่ำกว่า 2 จะทำให้มีความหนืดลดลง แสดงว่า PG จะมีความหนืดดีได้ที่ pH ต่ำประมาณ 2.2-2.3 สารละลาย electrolyte หลายชนิดมีผลต่อการเพิ่มความหนืดของสารละลาย PG โดยเฉพาะ electrolyte พวก divalent cation ได้แก่ Ca^{2+} ในความเข้มข้น1 mM $CaCl_2$ จะทำให้เพิ่มความหนืดของ PG ได้ถึง 2 เท่า ทั้งนี้อาจแสดงถึงความเป็น long chain ของ PG ที่เป็น polyanionic chain การเพิ่ม divalent metal ทำให้เพิ่มความหนืด (รูปที่ 12) ของสารละลาย PG ตัวทำละลาย ได้แก่ ethanol และ isopropunol มีผลต่อการเพิ่มความหนืดของ PG เมื่อเติมตัวทำละลายดังกล่าวในสารละลาย 3% PG จะทำให้เพิ่มความหนืดและเช่นเดียวกับ polysaccharide โมเลกุลใหญ่หรือสารไบโอโมเลกุลขนาดใหญ่อื่นๆ จะตกตะกอนแยกตัวออกมาเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ethanol หรือ isopropanol สูงกว่า 50% ที่ 30% ของ solvent ทำให้ค่าความหนืดของ PG เพิ่มประมาณ 30 เท่า (รูปที่ 13) สารพวก humectant มีผลน้อยมากต่อความหนืดของ PG ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับ PG ในการนำมาใช้ในการช่วยเตรียมเภสัชผลิตภัณฑ์และเครื่องสำอางประเภท lotion หรือ emulsion เป็นต้น ประเภทสารกันบูดได้แก่ paraben benzoic acid หรือ sorbic acid ในความเข้มข้นต่ำๆ ในขนาดที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ จะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความหนืดของ PG ซึ่งเป็นข้อดีในการใช้ PG ในผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางประเภทต่างๆ

(2) <u>ปัจจัยของความร้อนที่มีผลต่อ PG</u> สารละลาย PG ค่อนข้างจะมีคุณสมบัติที่คงตัวดีในความร้อนไม่เกิน 70°ซ ที่ 50°ซ จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความหนืดของ PG ขณะที่ความร้อน 70°ซ จะทำให้ PG มีความหนืดลดลงแต่เมื่อปล่อยทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องความหนืดจะ

กลับคืน เช่นเดิมในขณะที่ความร้อน 100°ซ เมื่อให้นาน 1 ชั่วโมง จะทำให้คุณสมบัติของ PG เสียไป ความหนืดจะลดลงและไม่เพิ่มขึ้นเท่าเดิมเมื่อตั้งทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 5) เป็นคุณสมบัติเช่นเดียวกับสารโมเลกุลใหญ่ของโพลีแซคคาไรด์

4. คุณสมบัติทางชีวภาพของ PG

4.1 <u>ผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์</u> ได้ศึกษาผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่า PG ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดลองได้แก่ candida albicans และ saccharomyces cerevisiae ในขณะที่ bacteria ทั้งกรัมบกและกรัมลบ ได้แก่ staphylococcus aurens และ Escherichia Coli ถูกยับยั้งได้ด้วย PG (Ref) ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองกับเชื้อแบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบเพิ่มเติมได้แก่ S.aureus S.epidermidis B.subtilis L.pentosus L.plantatun เป็นกรัมบวกและ E.coli P.vulgaris และ Ps. aeruginosa ซึ่งเป็นกรัมลบ ซึ่งเป็นเชื้อต่างๆ เหล่านี้มีเชื้อที่มักพบอยู่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อผิวหนังทำให้เกิดหนองได้แก่ S.aureus และ S.epidermidis เชื้อที่มักพบอยู่ในทางเดินอาหารเป็นขนาดหนึ่ง flora ได้แก่ L.pentosus และ L.plantarum เชื้อที่พบได้ ทั่วไปเป็น normal flora ของผิวหนังและใน environment ได้แก่ B.subtilis เชื้อกรัมลบที่พบเป็น normal flora ของทางเดินอาหารได้แก่ E.coli และ P.vulgaris เชื้อที่เป็นสาเหตุของแผลติดเชื้อที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ Ps.aeruginosa (Tortora 1995) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งด้วย PG ที่ทดสอบ 4 ชนิดของกรัมบวกได้แก่ S.epidermidis B.sublilis และ L.pentosus และ 2 ชนิด ของแบคทีเรียกรัมลบได้แก่ E.coli และ P.vulgaris เห็นผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ PG ในความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.33%PG จากการทดสอบโดย Aagr diffusion susceptibility test ยกเว้น เชื้อ S.aureus และ E.coli ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.625% และ 1.25% PG ตามลำดับส่วน L.plantarum และ Ps.aeruginosa ไม่ไวต่อการถูกยับยั้งด้วย PG แม้ในความเข้มข้นสูงถึง 5% ในการทดลองนี้พบมีผลการยับยั้งเชื้อดังกล่าวเช่นเดียวกันในการทดสอบโดย Broth macrodilution susceptibility test การหาค่า MIC ของ PG พบว่ามีค่า 6.4 มก./มล ต่อเชื้อ S.epidermidis B.subtilis ซึ่งเป็นกรัมบวกและ E.coli P.vulgaris ซึ่งเป็นกรัมลบ ขณะที่มีค่า MIC ของ PG 12.8 และ 25.6 มก./มล. ต่อเชื้อกรัมบวก ได้แก่ S.aureus และ L.pentosus ตามลำดับ และค่า MBC ของ PG มีค่าเท่ากับ 25.6 มก./มล. ต่อเชื้อ S.aureus S.epidermidis B.subtilis E.coli และ P.vulgaris และ MBC มีค่าเท่ากับ 51.2 มก./มล ต่อเชื้อ L.pentosus จากการวิเคราะห์ Time kill aualysis โดยการ incunate ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PG ในความเข้มข้นค่า MBC ของ PG ที่ 25.6 มก./มล พบว่าการตรวจวัด colony count ลดลงถึง 0 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ต่อเชื้อ B.subtilis ที่เวลา 16 ชั่วโมงต่อเชื้อ E.coli และ P.vulgaris และที่เวลา20 ชั่วโมงต่อเชื้อ S.aureus และ S.epidermidis ในขณะที่เชื้อ L.pentosus จะถูกยับยั้งและมี colony count ลดลงถึง 0 ต้องใช้ PG ในความเข้มข้นค่า MBC ที่ 51.2 มก./มล ที่เวลา 8 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงว่า PG สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ในความเข้มข้นต่ำสุดที่ 25.6 มก./มล หรือ 2.56%PG

เจลโพลีแซคคาไรด์ของเปลือกทุเรียนมีคุณสมบัติเร่งการตายของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ใน normal saline แม้ในความเข้มข้นต่ำที่ 0.02%PG หรือ 0.2 มก./มล PG ภายใน 24 ชั่วโมงขณะที่เชื้อที่อยู่ใน NSS หรือในน้ำกลั่นที่ไม่มี PG จะรอดชีวิตอยู่ได้นานถึง 3 วัน (รูปที่24 และ 25) การตรวจสอบผลของ PG ที่มีต่อ cell surface ของแบคทีเรียตรวจสอบจากภาพภายใต้กล้องจุลทัศน์ scanning electron microscope พบค่าเชื้อ S.aureus จะรวมตัวเป็รกระจุกและมีชิ้นส่วนของ PG เกาะอยู่บนผิวเซลล์และเชื้อ E.coli จะพบการหายไปของ fragella หรือ pili ของแบคทีเรีย (รูปที่ 26 และ 27) ทั้งนี้อาจเกิดจาก PG ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นกรดน้ำตาลบางชนิดที่สามารถจับได้ดีกับ cell surface ของแบคทีเรียและมีผลทำให้เกิดการรบกวน normal function ที่ทำให้มีชีวิตรอดอยู่ได้ใน normal saline

4.2 <u>ผลของคุณสมบัติของ PG ต่อการต้านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase</u> จากการทดสอบจากการทำงานของ α-amylase ในการย่อย PG พบว่าเอนไซม์สามารถย่อย PG ได้บางส่วน โดยพบว่าหลังการย่อยความหนืดของ reaction mixture จะลดลงเล็กน้อยที่สำคัญคือพบว่าโครงสร้าง α-helical structure จะหายไปจากการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาของ Iodiue solution test เนื่องจาก α-amylase เป็นเอนไซม์ตัดสายน้ำตาล glucose ที่ต่างกันด้วย α-(1-4) linkage ออก ทำให้ทำลายโครงสร้างของ α-helix ของโพลีแซคคาไรด์ของ PG ได้ทำให้เหลือปลาย reducing end ที่ C-OH ของน้ำตาล glucose และสามารถตรวจสอบพบมีน้ำตาล reducing เล็กน้อยอยู่ใน reaction mixture ภายหลังการย่อย แสดงถึงโครงสร้างของ PG ที่มีการต่อกันของ glucose ที่ α-(1-4) liuk เป็นสายยาวและเป็น α-helical stmeture สั้นๆ ของ ประมาณ 30 unit ของน้ำตาลมีผลให้เกิดสีม่วงกับน้ำยา 10 dine (ref) การทดลองแสดงว่า α-amylase ไม่สามารถย่อย PG ได้หมด โครงสร้างของ PG จะต่างจากน้ำแป้งที่ถูกย่อยได้เกือบหมดด้วย α-amylase

4.3 <u>ผลของคุณสมบัติ PG ที่ทนต่อการย่อยด้วยกรด HCl เจือจาง</u> ในกระเพาะอาหารจะมีการ HCl ที่ช่วยในการย่อยอาหารต่างๆ การทอลองต้องการทดสอบความสามารถการย่อยของ HCl ที่มีต่อ PG พบว่า PG จะทนต่อการถูกย่อยของ HCl ในความเข้มข้นที่มีอยู่ในกระเพาะอาหารในความเข้มข้นที่ทอสอบที่ 0.01-0.1 MHCl หลังปล่อยให้ย่อยที่ 37°ซ นานถึง 4 ชั่วโมง โครงสร้างของ α-helical structure ของ PG ยังไม่ถูกทำหลายไปด้วย HCl ดังนั้นการรับประทาน PG จะไม่ถูกย่อยในระบบน้ำย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร แม้จะถูกย่อยได้บ้างโดย α-amylase ที่อาจเกิดขึ้นได้ในลำไส้สามารถคาดได้ว่า PG จะถูกขับออกเกือบหมดโดยถูกย่อยได้เป็นส่วนน้อยในทางเดินอาหาร

4.4 <u>ผลของ PG ต่อการกักเก็บน้ำตาลกลูโคสและซูโครส</u> จากการทดลองที่ได้ศึกษาไปแล้วพบว่า PG สามารถกักเก็บสารลิบิดได้แก่ cholesterol และ fatty acid ได้ดี พบว่า PG ยอมให้ cholesterol ผ่านออกมาภายนอกลำไส้ประมาณ 20-30% จากการทดลองจากลำไส้หนู (34) และการทดลองโดยวิธี dialysis กับ fatty acid พบว่า PG ยอมให้ fatty acid ถูกปล่อยออกมาภายนอกได้ประมาณ 20-30% เช่นเดียวกัน (34) จากการค้นพบดังกล่าวทำให้น่าสนใจศึกษาผลของ PG ต่อการกักเก็บสารอาหารประเภทน้ำตาล ซึ่งพบในทำนองเดียวกันว่า PG สามารถกักเก็บสารน้ำตาล glucose และ sucrose ได้บางส่วน (รูปที่ 28 และ 29) และพบว่าไม่ทำให้ glucose ถูกดูดซึมไปใช้ได้ทั้งหมดจากลำไส้เล็ก (รูปที่ 31) คุณสมบัติเช่นนี้ของ PG อาจนำมาใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการควบคุมอาหารในผู้ป่วย ได้แก่ เบาหวาน และผู้ป่วยที่มี cholesterol สูงเป็นต้น อย่างไรก็ดีการกักเก็บสารอาหารพวกน้ำตาลของ PG ได้ผลไม่ดีเท่ากับความสามารถในการกักเก็บสารอาหารพวก กรดไขมันหรือ cholesterol ที่ได้ศึกษาไว้แล้ว

5. การใช้ประโยชน์ของ PG ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ยา/เครื่องสำอาง

5.1 <u>คุณสมบัติการไหลของ PG</u> การทดสอบคุณสมบัติการไหลของ PG พบว่า PG มีคุณสมบัติการไหลหรือ rheological behavior ที่แสดงไว้ในรูปที่ 32 แบบ Non-Newtonian flow ชนิด pseudoplastic behavior จะมี viscosity ลดลงเมื่อเพิ่ม shear rate ซึ่งเป็นคุณสมบัติค่าที่ดีเหมาะสมเป็นสารใช้ช่วยเตรียมยาและเครื่องสำอาง

<u>5.2 การเตรียมตำรับเจล PG gel Vitamin E gel และ Vitamin C gel โดยใช้ PG เป็นสารช่วยเตรียมเจล</u> ผลิตภัณฑ์เจล PG gel Vitamin E gel และ Vitamin C gel เตรียมโดยใช้ PG เป็นสารช่วยเตรียมเจลใช้ความเข้มข้นของ PG ที่ 2.5 3 และ 3.5% (w/v) PG ในตำรับเจล จากคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์บรรยายไว้ในตารางที่ 10 และลักษณะภายนอกดังแสดงไว้ในรูปที่ 33 แสดงว่าสามารถนำสารเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนมาใช้ประโยชน์ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ยาหรือเครื่องสำอางในรูปแบบของเจลได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวดีได้ โดยใช้ความเข้มข้นของ 2.5%PG ได้ผลิตภัณฑ์ที่ทาผิวหนังแล้วได้ผลที่น่าพอใจกว่าการใช้ในความเข้มข้นสูงกว่า จากคุณสมบัติของ PG ที่พบว่าสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยมีค่า MBC ของ PG ที่เท่ากับหรือมากกว่า 2.5%PG จากการวิจัยครั้งนี้ทำให้น่าสนใจ การใช้สาร PG ในการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ยาหรือเครื่องสำอางที่ใช้สำหรับผิวหนัง ซึ่งนอกจากจะเตรียมผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลน่าพอใจแล้วยังมีข้อดีสามารถใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ เพื่อประโยชน์ของการบำบัดรักษาหรือป้องกันการติดเชื้อของผิวหนัง โดยใช้ PG ที่ความเข้มข้น 2.5% ผสมในตำรับเจล คาดว่าทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและสามารถใช้ป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียได้ผล เป็นผลิตภัณฑ์ทาภายนอกเหมาะสำหรับใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. Dumitriu, S. 1998. Structural diversity and functional versatility. Marcel Dekker Inc. NY pp 101-472
2. สุนันท์ พงษ์สามารถ, วิมลมาศ ลิปิพันธ์, ธิติรัตน์ ปานม่วง, ไกรสีห์ อัมพรายน์, เครือวัลย์ เอกรักษาศิลป์ชัย และ นิจศิริ เรืองรังษี 2544. การพัฒนาสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกของผลทุเรียนเพื่อใช้ทางเภสัชกรรม รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. Waraporn Gerddit, Chutima Tippayakul, Jittima Lertchaiporn, Narueporn Sutanthavibul and Sunanta Pongsamart. 2001. Characterization and properties of polysaccharide gel from durian fruit-hull. The 27th Congress on Science and Technology of Thailand. p 573, 16-18 October, 2001. Lee Garden Plaza Hotel, Hat yai, Songkla Thailand
4. Jittima Lertchaiporn, Panida Vayamhasuwan and Sunanta Pongsamart. 2002. Acidic polysaccharide gel from durian fruit-hulls as a surfactant for the preparation of vitamin. E gel and lotion. The 19th Annual Research Meeting in Pharmaceutical Sciences. December 4, 2002, Thai. J. Pharm. Sci. 26 (3-4):159
5. Waraporn Gerddit, Narueporn Sutanthavibul and Sunanta Pongsamart. 2002. Film forming properties of polysaccharide gel from durian fruit-hulls and film-dressing preparation. The 19th Annual Research Meeting in Pharmaceutical Sciences, December 4, 2002, Thai. J. Pharm. Sci. 26 (3-4):158
6. Supranee Sithipairojsakul, Narueporn Sutanthavibul and Sunanta Pongsamart. 2002. Application of powdered cellulose from durian fruit-hulls for preparation of direct compression tablets. Th. J. Pharm. Sci. 26(3-4):160
7. Nantawan Nantawanit, Jittima Lertchaiporn, Vimolmas Lipipan and Sunanta Pongsamart. 2001. Antibacterial film-patch from fruit-hulls of durian. Th. J. Pharm. Sci. 25 (suppl):5
8. S. Pongsamart, V. Lipipan, N. Nantawanit and J. Lertchaiporn. 2003. Novel water soluble antibacterial dressing of durian polysaccharide gel. The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III) : From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable use. p 104, 3-7 February, 2003, Chaingmai, Thailand.
9. Waraporn Gerddit, Narueporn Sutanthavibul, Jittima Lertchaiporn and Sunanta Pongsamart. 2001. Properties of Polysaccharide gel (PG) from fruit-hulls of durian and its uses in film dressing preparation. Thai. J. Pharm. Sci. vol 25 (Suppl.) p 6

10. Supranee Sithipairojsakul, Nantawan Nantawanit, Narueporn Sutanthavibul, Thitirat Panmaung and Sunanta Ponasamart. 2001. Properties of polysaccharide fiber from fruit-hulls of durian and its uses for pharmaceutical and food preparation. Thai. J. Pharm. Sci. vol 25 (Suppl.) p 8

11. Lipipan, V., Nantawan, N. and Pongsamart, S. 2002. Antibacterial activity (in vitro) of polysaccharide gel from durian fruit-hulls. Songklanakarin, J. Sci. Technol. 24(1):31-38

12. Jittima Lertchaiporn, Waraporn Gerddit, Panida Vayumhasuwan and Sunanta Ponasamart. 2002. Gelling and film forming properties of polysaccharide gel from fruit-hulls of durian for application in pharmaceutical products. The 28 th Congress on Science and Technology of Thailand. p 464, 24-26 October 2002. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

13. Umprayn, K., Kaitmonkong, R., and Pongsamart, S. 1990. Evaluation of tablet disintegrating properties of durian rind extract. NUS-JSPS Seminar, October 23-26 1990. CHIBA, JAPAN

14. Supranee Sithipairojsakul, Unchulee Pongwiwatana, Naruphat Paphattarapong, Narueporn Sutanthavibul, and Sunanta Pongsamart. 2002. Crystalline cellulose (CC) from durian and coconut hull waste for pharmaceutical use. The 28 th Congress on Science and Technology of Thailand. p 456, 24-26 October 2002. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok Thailand

15. Chutima Tippayakul, Maneewan Suksomtip, Waraporn Piyasirananda and Sunanta Pongsamart. 2001. Effect of polysaccharide gel (PG) from fruit-hulls of durian on lipid exclusion study (in vitro). Thai J. Pharm. Sci. vol 25 (suppl.):7

16. Pongsamart, S., Sukrong, S., and Tawatsin, A. 2001. The determination of toxic effects at high oral dose of polysaccharide gel extracts from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.) in mice and rats. Songklanakarin J. Sci. Technol. 23(1):55-62

17. Pongsamart, S., Tawatsin, A., and Sukrong, S. 2002. Long –term comsumption of polysaccharide gel from durian fruit-hulls in mice. Songklanakarin J. Sci. Technol. 24(4):649-661

18. Osborne, D.R., and Voogt, P. 1978. The analysis of nutrients in foods, Academic Press. London. pp 168-171

19. Osborne, D.R., and Voogt, P. 1978. The analysis of nutrients in foods, Academic Press. London. pp 107-108

20. Harold, E., Kirk, R.S. and Sawyer, R. 1981. Pearson's Chemical Analysis of food. 8th ed., Churchill Livingstone, NY. pp 20-24

21. Lee, R. 1975. Food Analysis in Analytical and Quality Control Methods for the Food Manufacture and Buyer, 3rd ed., Leonard Hill Books, London. pp 84

22. Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. 1994. Carbohydrate Analysis : A Practical Approach. 2nd ed. Oxtord University Press, NY. pp 73-76

23. Stahl, E. 1969. Thin-Layer Chromatography. 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 811-834.

24. Tullia, M.C.C. Filisetti-Cozzi and Nicholas C. Carpita. 1991. Measurement of uronic acid without interference from neutral sugars. Analytical Biochem. 197,157-162

25. Lorian, V. 1991. Antibiotics in Laboratory Medicine, Williams Wilkins, Baltimore, U.S.A. pp 739-786

26. Brock, T.D. et al. 1994. Biological of Microorganism, 7th ed, Practice Hall, Englewood Cloffs, N.J., pp 118-124.

27. The United State Pharmacopoeia XXIII and The National Formulary XVIII. 1995, United State Pharmacopoeia Convention Inc., Rockville, MD., pp 1681-1686.

28. Koch, F.C., and Kanke, M.E. 1953. Practice Methods in Biochemistry, 6th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimaore U.S.A. pp 7-26

29. Roehring, K.L. 1984. Carbohydrate Biochemistry and Metabolism. AVI Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut, U.S.A. pp 19-22

30. David, J.H., and Hazel, P. 1998. Carbohydrate, Analytical Biochemistry. New York. Wesley Longman. pp 325

31. Bauer, J.D., Ackerman, P.G. and Toro, G. 1974. Clinical Laboraotry Methods. 8th ed., The C.V. Mosby Co. U.S.A. pp 383-386

32. Johnson, I.T. and Gee, J.M. 1981. Effect of gel-forming on the intestinal unstirred layer and sugar transport in vitro. Gut. 22:398-403

33. Sprowls, J.B. 1970. Prescription Pharmacy. 2nd ed., J.B. Lippincott Co. Philadelphia U.S.A. pp207-213

34. Chutima Tippayakul. 2002. In vitro study of entrapment of lipids within polysaccharide gel from fruit-hulls of durian. A Thesis for the degree of Master of Science in Biomedicinal Chemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. Academic year 2002.