การสกัดพอลิแซคคาไรด์จากว่านหางจระเข้ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีของเหลวไอออนิกเป็นองค์ประกอบและตรวจวัดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในพอลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง*

Extraction of Aloe Polysaccharides Using Ionic Liquid Based Aqueous Two-Phased System and Determination of the Monosaccharide Constitutes in Aloe Polysaccharides by HPLC-ELSD

มณีรัตน์ มีพลอย[1] รัตนศิริ จิวานนท์[1] และ เสาวลักษณ์ เรืองศรี[1]
Meeploy, M.[1], Giwanon, R.[1] and Rungsri, S.[1]

Abstract

This work aimed to simultaneously extract aloe polysaccharides and proteins by an ionic liquid based aqueous two-phased system (ILATPS) of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Bmim]BF_4) and NaH_2PO_4 solution coupled with dialysis and quantify the monosaccharide constitutes of aloe polysaccharides by high performance liquid chromatography equipped with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). The solution of freeze-dried aloe gel powder was added into ILATPS. An ionic liquid based aqueous two-phased system contained 20.0 mL of the solution of freeze-dried aloe gel powder, 15.0 mL of 3.89 mol L^{-1} NaH_2PO_4 solution, 5.0 g of [Bmim]BF_4 .The results showed that 98.48% aloe polysaccharides and 11.19% proteins were extracted in salt-rich phase and ionic liquid-rich phase, respectively. Salts were removed from aloe polysaccharides extract by dialysis. Determination of monosaccharide constitutes was carried out by HPLC-ELSD. The result showed that 27.96 mg of mannose and 2.47 mg of galactose were found in 1.0 g of aloe polysaccharide hydrolysate.

Keywords: aloe polysaccharides, aqueous two-phase system, dialysis, HPLC-ELSD

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อสกัดพอลิแซคคาไรด์และโปรตีนจากผงเจลว่านหางจระเข้ด้วยระบบสารละลายน้ำสอง วัฏภาคที่มีองค์ประกอบของของเหลวไอออนิก ได้แก่ 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Bmim]BF_4) และสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ร่วมกับวิธีไดอะไลซิส และตรวจวัดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซคคาไรด์จากว่านหางจระเข้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีการตรวจวัดแบบอาศัยการกระเจิงแสงของอนุภาค (HPLC-ELSD) พบว่า ในสภาวะของการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคซึ่งประกอบด้วย สารละลายผงเจลว่านหางจระเข้ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 3.89 โมลต่อลิตร ปริมาตร 15.0 มิลลิลิตร และ [Bmim]BF_4 5.0 กรัม สามารถสกัดพอลิแซคคาไรด์ (E_o) และโปรตีน (E_p) ได้เท่ากับ 98.48% และ 11.19% ตามลำดับ จากนั้นกำจัดเกลือในสารละลายพอลิแซคคาไรด์ออกด้วยวิธีไดอะไลซิส และตรวจวัดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC-ELSD พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแมนโนส และกาแล็กโทส เท่ากับ 27.96 มิลลิกรัม และ 2.47 มิลลิกรัม ในพอลิแซคคาไรด์ไฮโดรไลเสต น้ำหนัก 1.0 กรัม

คำสำคัญ: พอลิแซคคาไรด์จากว่านหางจระเข้ ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ไดอะไลซิส โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

คำนำ

ว่านหางจระเข้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aloe vera* Linn. (*Aloe barbadensis* Miller) อยู่ในวงศ์ ASPHODELACEAE เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ใบหนาอวบน้ำ เติบโตได้ในที่แห้งแล้งกันดาร (perennial succulent xerophyte) ว่านหางจระเข้ถูกนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร (medicinal plant) อย่างยาวนานหลายศตวรรษ มีรายงานการวิจัยพบว่าพอลิแซคคาไรด์ในเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ที่สำคัญ (Reynolds และ Dweck, 1999; Hamman, 2008) โดยอะซีแมนแนน (acemannan หรือ acetylated mannan) เป็นพอลิแซคคาไรด์หลักในเนื้อวุ้นว่านหางจระเขที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive polysaccharide) ได้แก่ ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ทำให้แผลหายเร็วขึ้น เพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รา และไวรัส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Sierra-Garcia และคณะ, 2014; Liu และคณะ, 2019) อะซีแมนแนนมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,000-1,600 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยแมนโนส 84.9% กลูโคส 7.2% และกาแล็กโทส 3.9% โดยมีโครงสร้างเป็นสายโซ่ยาวของแมนโนสและกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง เบต้า 1,4 มีหมู่ แอซีทิลกระจายอยู่บนสายโซ่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของแมนโนส และมีกาแล็กโทสแตกกิ่งก้านออกไป (side chain) จากสายโซ่ที่ตำแหน่ง แอลฟา 1,6 โดยอัตราส่วนของกลูโคสต่อแมนโนสใน repeating unit (เท่ากับ 1:3, 1:6, 1:15 และ 1:22) มีความแตกต่างขึ้นกับปัจจัยของสปีชีส์ว่านหางจระเข้ รวมทั้งวิธีที่ใช้ในการเตรียมอะซีแมนแนน (Liu และ

[1] ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) 35 หมู่ 3 เทคโนธานี ต. คลองห้า อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120, ประเทศไทย
Expert Center of Innovative Agriculture 35 Mu 3 Technopolis, Tambon Khlong Ha, Amphoe Khlong Luang, Pathum Thani 12120, THAILAND

คณะ, 2019; Hamman, 2008) อย่างไรก็ตามปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญที่จะส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิแซคคาไรด์อะซีแมนแนน ได้แก่ การเตรียมพอลิแซคคาไรด์ซึ่งประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ water extraction ethanol precipitation ammonium sulfate precipitation ultrafiltration anion exchange chromatography และ gel permeation chromatography เป็นต้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีของเหลว ไออนิกเป็นองค์ประกอบตามวิธีที่ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Tan และคณะ (2012) ระบบนี้เกิดจากการผสมสารละลายต่างชนิดกันสองสารละลาย ในการทดลองนี้เป็นการผสมกันของของเหลวไอออนิก (ionic liquid) ได้แก่ [Bmim]BF_4 กับสารละลายเกลืออนินทรีย์ NaH_2PO_4 วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ใช้เวลาน้อย มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดพอลิแซคคาไรด์ และสามารถสกัดโปรตีนพร้อมทั้งสิ่งเจือปนอื่นออกจากพอลิแซคคาไรด์ได้ในเวลาเดียวกัน ของเหลวไอออนิกจัดเป็นสารประเภทเกลืออินทรีย์ที่มีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ระเหยยาก มีความดันไอต่ำที่สภาวะอุณหภูมิห้อง มีความเสถียรต่อความร้อนและปฏิกิริยาเคมีได้ดี มีความหนาแน่นของประจุสูงทำให้สามารถละลายสารชีวพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างภายในที่แข็งแรงได้ นอกจากนี้ของเหลวไอออนิกที่ใช้สกัดแล้วสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ จึงมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ซึ่งใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic solvent) ในปริมาณมาก มีความเป็นพิษ และไวไฟ

อุปกรณ์และวิธีการ

นำใบว่านหางจระเข้มาล้างน้ำเพื่อทำความสะอาด ปอกเปลือกใบว่านหางจระเข้ให้เหลือเฉพาะเนื้อวุ้น ล้างเนื้อวุ้นอีกครั้ง นำส่วนเนื้อวุ้นน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ไปปั่นจนละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ชั่งน้ำหนักผงแห้ง ทำการสกัดพอลิแซคคาไรด์และโปรตีนในตัวอย่างผงแห้งจากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของของเหลวไอออนิก ได้แก่ 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Bmim]BF_4) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)ง ตามวิธีของ Tan และคณะ, (2012) โดยละลายตัวอย่างผงแห้งจากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ น้ำหนัก 0.5 กรัม ในเอธานอลเข้มข้น 9.0% โดยปริมาตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร กวนบนเครื่องกวนที่ปรับอุณหภูมิได้ จนกระทั่งตัวอย่างเดือด จากนั้นยกมากวนที่อุณหภูมิห้องจนตัวอย่างละลายสมบูรณ์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนใสปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติม 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ปริมาตร 4.13 มิลลิลิตร (คิดเป็นน้ำหนัก 5 กรัม) และสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 3.89 โมลต่อลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กวนเบาๆ บนเครื่องกวนสารแบบแท่งแม่เหล็ก ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น เก็บสารละลายส่วนบน (ionic liquid-rich phase) วัดปริมาตร สกัด 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ออกด้วยไดคลอโรมีเทน และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford method (Bradford, 1976) เก็บสารละลายส่วนล่าง (salt-rich phase) วัดปริมาตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method (Dubois และคณะ, 1956) คำนวณประสิทธิภาพการสกัดพอลิแซคคาไรด์ (extraction efficiency of aloe polysaccharides, E_a) และประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน (extraction efficiency of proteins, E_p) ดังสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ จากนั้นกำจัดเกลือในสารละลายส่วนล่างด้วยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) นำสารละลายทั้งหมดที่ได้หลังจากการไดอะไลซิสไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้ง นำไปย่อยด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) เข้มข้น 3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นระเหยกรดไตรฟลูออโรอะซิติกที่เหลือออกโดยทำภายใต้ความดันสุญญากาศ ชั่งน้ำหนักแห้งพอลิแซคคาไรด์ที่ถูกย่อยด้วยกรดแล้ว (polysaccharide hydrolysate) ละลายตัวอย่างพอลิแซคคาไรด์ไฮโดรไลเสตด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง กรองด้วยตัวกรอง (syringe filter) ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีการตรวจวัดแบบอาศัยการกระเจิงแสงของอนุภาค (high-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD) ตามวิธีที่ได้ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Meeploy และ Deewatthanawong, (2016)

$$E_a = (C_b V_b / m_a) \times 100\% \quad (1)$$

$$E_p = (C_t V_t / m_p) \times 100\% \quad (2)$$

เมื่อ m_a และ m_p คือ ปริมาณพอลิแซคคาไรด์และปริมาณโปรตีนในสารละลายผงแห้งจากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ก่อนสกัดตามลำดับ C_b และ V_b คือ ความเข้มข้นของพอลิแซคคาไรด์และปริมาตรของสารละลายชั้นล่าง (salt-rich phase) ตามลำดับ C_t และ V_t คือ ความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาตรของสารละลายชั้นบน (ionic liquid-rich phase) ตามลำดับ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพการสกัดพอลิแซคคาไรด์ (E_a) และประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน (E_p)

จากการเตรียมผงแห้งจากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ พบว่า เนื้อวุ้นว่านหางจระเข้น้ำหนัก 1 กิโลกรัม ทำเป็นผงแห้งได้ 7.7 กรัม คิดเป็นผลผลิต (yield) ที่ได้เท่ากับ 0.77% โดยน้ำหนัก เมื่อนำผงแห้งจากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้มาสกัดพอลิแซคคาไรด์และโปรตีนด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของของเหลวไอออนิก พบว่า ประสิทธิภาพการสกัดพอลิแซคคาไรด์ และประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน เท่ากับ 98.48% และ 11.19% ตามลำดับ

2. การวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

วิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในพอลิแซคคาไรด์ไฮโดรไลเสตด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ประกอบด้วยคอลัมน์ Inertsil® NH_2 (ขนาด 250 mm x 4.6 mm ID) ระบบตัวทำละลายในการชะประกอบด้วย acetonitrile และน้ำ (80 : 20 โดยปริมาตร) กำหนดการชะเป็นแบบ isocratic elution system ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เครื่องตรวจวัด Alltech®3300 ELSD แบบอาศัยการกระเจิงแสงของอนุภาค กำหนดสภาวะของการตรวจวัดคือ อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน (nebulizing gas) เท่ากับ 4.0 ลิตรต่อนาที ความดันแก๊สไนโตรเจน เท่ากับ 70 psi อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแมนโนสและกาแล็กโทส พบว่า ที่สภาวะการย่อยพอลิแซคคาไรด์ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก เข้มข้น 3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พอลิแซคคาไรด์ไฮโดรไลเสต น้ำหนัก 1 กรัม วิเคราะห์พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแมนโนส และกาแล็กโทส ได้เท่ากับ 27.96 มิลลิกรัม และ 2.47 มิลลิกรัม ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 และรูปที่ 2

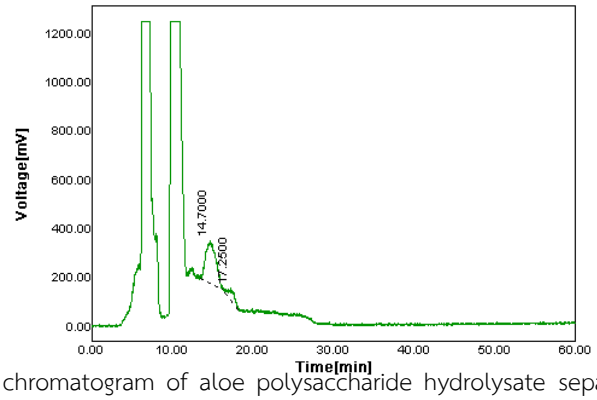

Figure 1 Typical HPLC-ELSD chromatogram of aloe polysaccharide hydrolysate separating on the Inertsil® NH_2 HPLC column. Mannose and galactose were separated with retention time of 14.7000 and 17.2500 min, respectively.

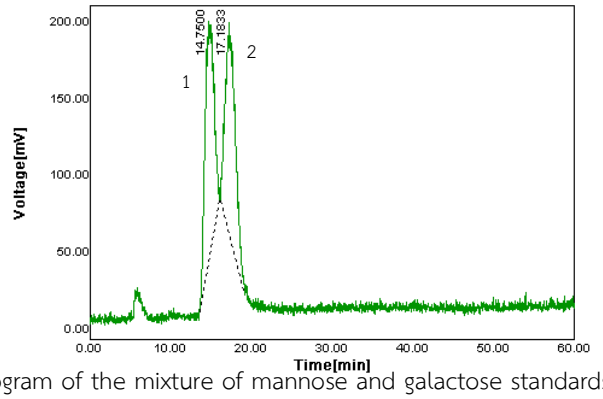

Figure 2 HPLC-ELSD chromatogram of the mixture of mannose and galactose standards separating on the Inertsil® NH_2 HPLC column under the isocratic elution system of acetonitrile and water. The flow rate was maintained at 0.8 mL/min and the injection volume was 20 µL. The flow rate of the nebulizing gas was 4.0 L/min. The drift tube temperature was 40°C and the gain was set at 1. Peaks: 1-mannose (RT=14.7500 min) and 2-galactose (RT=17.1833 min).

ใบว่านหางจระเข้ประกอบด้วยเปลือกใบ (rind) 20%-30% โดยน้ำหนัก และเนื้อวุ้น (pulp หรือ parenchyma tissue) 70%-80% โดยน้ำหนัก เนื้อวุ้นว่านหางจระเข้มีองค์ประกอบทางโครงสร้างที่สำคัญ 3 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนประกอบด้วย พอลิแซคคาไรด์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ผนังเซลล์ (galacturonic acid-rich), ออร์แกเนลล์ต่างๆ ที่เสื่อมแล้วภายในเซลล์ (galactose-rich) และของเหลวใสลักษณะข้นหนืด (mannose-rich) ซึ่งอยู่ภายในเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) เนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ประกอบด้วยน้ำถึง 99%-99.5% ส่วนที่เหลือ 0.5%-1% เป็นส่วนของของแข็ง ได้แก่ วิตามิน แร่ธาตุ เอนไซม์ กรดแอมิโน พอลิแซคคาไรด์ สารประกอบฟีนอลิก และกรดอินทรีย์ (Hamman, 2008) จากผลการทดลองเตรียมผงแห้งจากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ พบว่าได้ผลผลิตเท่ากับ 0.77% ซึ่งความสอดคล้องตามข้อมูลเบื้องต้น

ในการสกัดพอลิแซคคาไรด์และโปรตีนจากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้พร้อมกันด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีของเหลวไอออนิกเป็นองค์ประกอบตามวิธีที่ Tan และคณะ (2012) ได้รายงานไว้ พบว่า การสกัดพอลิแซคคาไรด์มีประสิทธิภาพดี (98.48%) ในขณะที่การสกัดโปรตีนมีประสิทธิภาพต่ำ (11.19%) (ตามรายงานของ Tan และคณะ (2012) เท่ากับ 90.69% และ 44.59% ตามลำดับ เมื่อสภาวะของการสกัดมี [Bmim]BF_4 เข้มข้น 18.52% โดยน้ำหนัก และ NaH_2PO_4 เข้มข้น 25.93% โดยน้ำหนัก) อาจเป็นผลจากอัตราส่วนและความเข้มข้นของสารละลายสองชนิดได้แก่ [Bmim]BF_4 และสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ยังไม่เหมาะสม และ/หรือ มีการสูญเสีย

โปรตีนไปบางส่วนในระหว่างขั้นตอนของการสกัด [Bmim]BF_4 ออกด้วยไดคลอโรมีเทน

จาก Figure 1 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบเป็นส่วนใหญ่ในพอลิแซคคาไรด์ไฮโดรไลเสต ได้แก่ แมนโนส มีกาแล็กโทสอยู่ปริมาณเล็กน้อย และไม่พบกลูโคส ซึ่งแมนโนสและกาแล็กโทสเป็นองค์ประกอบหลักในพอลิแซคคาไรด์อะซีแมนแนนและออร์แกเนลล์ต่างๆภายในเซลล์พาเรนไคมา นอกจากนี้ยังพบว่ามี peak ของสารประกอบอื่นๆ อยู่ปริมาณมากในพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้ ซึ่งอาจเป็นโปรตีน พอลิแซคคาไรด์ วิตามิน ลิปิด ที่เป็นส่วนประกอบในเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ (ELSD จะตรวจวัดตัวถูกละลายทุกชนิดที่ไม่ระเหย ณ อุณหภูมิที่กำหนดไว้บริเวณ drift tube) จึงอาจจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนในการสกัดตัวอย่างผงแห้งเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ ได้แก่ การปั่นแยกกาก การสกัดด้วยน้ำ การตกตะกอนด้วยเอธานอล เพื่อช่วยให้ตัวอย่างผงแห้งเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้สะอาดมากขึ้น สภาวะการย่อยพอลิแซคคาไรด์ด้วยกรดฟลูออโรอะซิติกเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ควรคำนึงถึงหากสภาวะของการย่อยไม่เหมาะสมอาจส่งผลต่อการสลายพันธะไกลโคซิดิกในสายโซ่พอลิแซคคาไรด์ ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการย่อยพอลิแซคคาไรด์ด้วยกรด ได้แก่ ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และระยะเวลาของการย่อย เป็นต้น

สรุปผล

การสกัดพอลิแซคคาไรด์ากเนื้อวุ้นว่านหางจระเข้ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของของเหลวไอออนิกร่วมกับวิธีไดอะไลซิส เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน และมีประสิทธิภาพดีในการสกัดแยกพอลิแซคคาไรด์จากว่านหางจระเข้ อย่างไรก็ตามการทำให้พอลิแซคคาไรด์อะซีแมนแนนมีความบริสุทธิ์มากขึ้นนั้นนอกจากการปรับปัจจัยต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว อาจต้องใช้วิธีการทำให้บริสุทธิ์อื่นร่วมด้วย ได้แก่ ion exchange chromatography gel permeation chromatography เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Bradford, M.M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Analytical Biochemistry, 28: 350-356.

Hamman, J.H., 2008, Composition and Applications of *Aloe vera* Leaf Gel, Molecules, 13: 1599-1616.

Liu, C., Cui, Y., Pi, F., Cheng, Y., Guo, Y., Qian, H., 2019, Extraction, Purification, Structural Characteristics, Biological Activities and Pharmacological Applications of Acemannan, a Polysaccharide from *Aloe vera*: A Review, Molecules, 24: 1554-1574.

Meeploy, M. and Deewatthanawong, R., 2016, Determination of gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Rambutan Fruit cv. Rongrian by HPLC-ELSD and Separation of GABA from Rambutan Fruit Using Dowex 50W-X8 Column, Journal of Chromatographic Science, 54: 445-452.

Reynolds, T. and Dweck, A.C., 1999, *Aloe vera* Leaf Gel: a Review Update, Journal of Ethnopharmacology, 68: 3-37.

Sierra-García, G.D., Castro-Ríos, R., González-Horta, A., Lara-Arias, J., Chávez-Montes, A., 2014, Acemannan, an Extracted Polysaccharide from *Aloe vera*: A Literature Review, Natural Product Communications, 9: 1217-1221.

Tan, Z.J., Li, F.F., Xu, X.L., Xing, J.M., 2012, Simultaneous Extraction and Purification of Aloe Polysaccharides and Proteins Using Ionic Liquid Based Aqueous Two-Phase System Coupled with Dialysis Membrane, Desalination, 286: 389-393.