

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณภาพ

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

การวัดปริมาณไอโซฟลาโวน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC HP1100 series)

การวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณ Daidzein และ Genistein ในตัวอย่าง จะต้องมีการพัฒนาการวิธีสกัดสาร Daidzein และ Genistein โดยการควบคุมคุณภาพการสกัดด้วยการใช้สารที่เรียกว่า Internal standard ควบคู่กับการทำ Method Validation เพื่อให้ได้วิธีสกัดและ Clean up ที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ มากที่สุด และสามารถทำได้ในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากสาร Daidzein และ Genistein นั้นเมื่อสกัดมาอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์แล้วจะมีการสลายตัวอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาวิธีสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างนี้ได้มีการศึกษาติดตามหา Stability ของสารดังกล่าว เพื่อนำมาปรับใช้ให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องมากที่สุด

วิธีสกัดที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

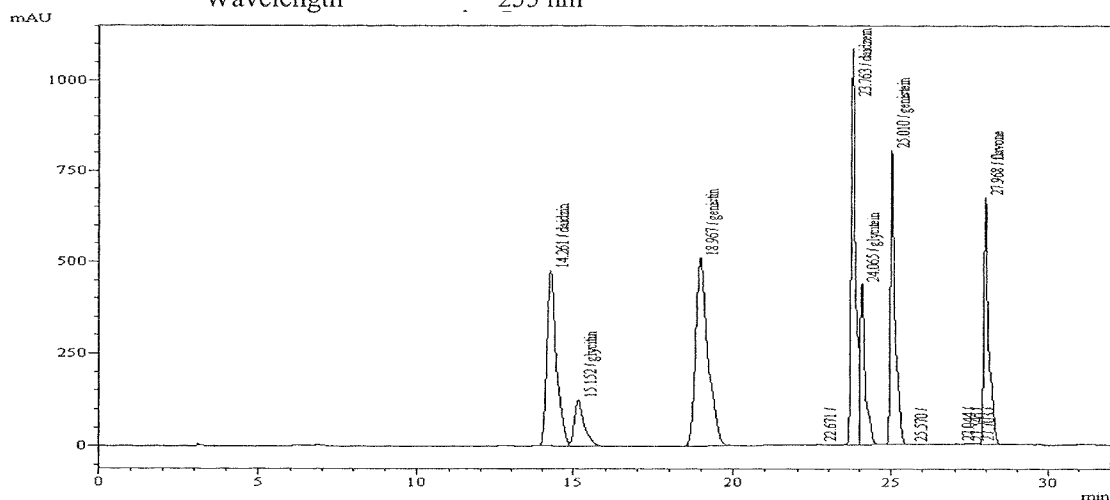
ทำการพัฒนาวิธีการสกัด Daidzein และ Genistein จากตัวอย่างถั่วเหลืองและถั่วหมักชีวภาพ โดยใช้ Solvent extraction ซึ่งได้มีการปรับปรุงวิธี จนได้ขั้นตอนการสกัดที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วย HPLC คือ

1. ชั่งตัวอย่าง ในที่นี้คือ ตัวอย่างที่ได้ผ่านกระบวนการ Freeze drying แล้ว น้ำหนัก 1.0000 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) ใส่ลงใน Erlenmeyer flask
2. เติมสารมาตรฐาน Flavones ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 110 ไมโครลิตร จากนั้น ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 – 10 นาที
3. เติม Acetonitrile ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.1 N HCl ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นานประมาณ 1-2 นาที
4. นำตัวอย่างซึ่งอยู่ใน Erlenmeyer flask ไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaker นาน 10 นาที แล้วนำไป Sonicate นาน 10 นาที
5. จากนั้นนำตัวอย่างมาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. คูดสารละลายส่วนใส ซึ่งอยู่ด้านบน ใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. นำไปปั่นตกตะกอนด้วย Microcentrifuge ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

8. ใช้ Pasture pipette ดูดส่วนใส ด้านบน นำมากรองด้วย Syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่กรองได้ใส่ลงในขวด HPLC เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธีของ (Klejdus, 2005) เป็นต้นแบบของการศึกษา การแยกสารโดยเทคนิค HPLC ของ Klejdus จะใช้ Gradient Separation ซึ่งเมื่อได้ทำการศึกษาตามวิธีของ Klejdus ซึ่งใช้ 0.1% Formic acid และ Acetonitrile เป็น Mobile phase การศึกษานี้ได้ปรับเปลี่ยนไปใช้ 0.1% Acetic Acid แทน Formic Acid และได้ปรับปรุงให้ได้ Peak ของ Daidzein และ Genistein ที่แยกกันได้ดีที่สุด ใช้ระยะเวลาในการ Run สั้นที่สุด ซึ่งได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือ

Column	Inersil ODS3 size 250x4.6 mm., 5.0 uM
Injection volume	20 ul
Flow rate	1.0 ml/min
Mobile phase	A = 0.1% Acetic Acid B = Methanol
Gradient separation	0.01 min 30%AB, 5 min 35%AB, 8 min 42%AB, 12 min 42%AB, 212.5 min 90%AB, 22 min 90%AB, 28 min 100%AB, 28.5 min 30%AB, 32 min 30%AB
Column oven	40°C
Total run time	32 min
Wavelength	255 nm



ภาพที่ ก.1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2003)

1. บันทึคน้ำหนักของกระป๋องอะลูมิเนียม (Moisture can) ที่สะอาด และผ่านการอบเป็นเวลา 20-30 นาที ทิ้งให้เย็นใน โถดูดความชื้น (Desiccator)
2. ชั่งตัวอย่างพร้อมกระป๋องอะลูมิเนียมที่ผ่านการอบแล้ว จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่
3. นำกระป๋องอะลูมิเนียมออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นใน โถดูดความชื้นไม่น้อยกว่า 20 นาที นำไปอบซ้ำหลายๆครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม
4. บันทึคน้ำหนักของกระป๋องอะลูมิเนียมและของแข็งที่เหลืออยู่และคำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

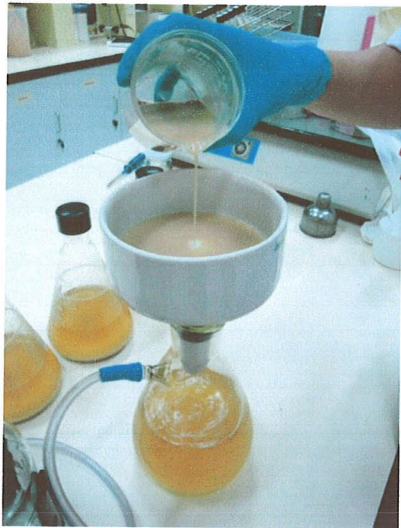
$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ, เปรียบเทียบกับน้ำหนักเปียก)} = \frac{(A-B) \times 100}{C}$$

- เมื่อ
- A คือ น้ำหนักตัวอย่าง + กระป๋องอะลูมิเนียมก่อนอบ (กรัม)
 - B คือ น้ำหนักตัวอย่าง + กระป๋องอะลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)
 - C คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

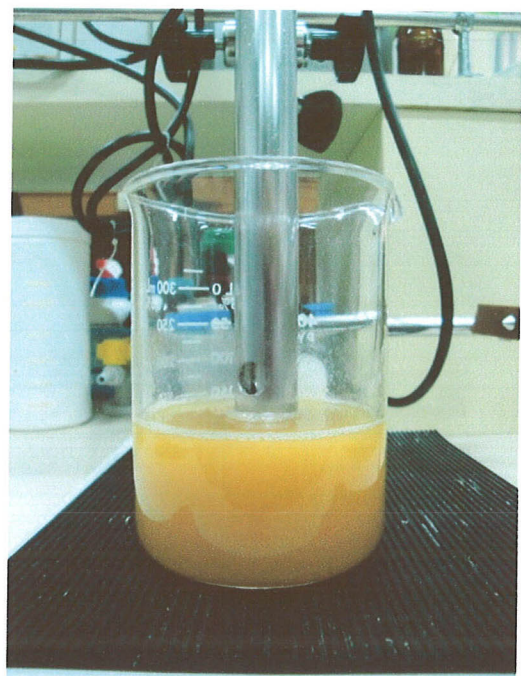
ภาคผนวก ข

ภาพประกอบที่เกี่ยวข้อง

ภาพกระบวนการผลิตสารสกัดไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์แบบผง



ภาพ ข-1 การกรองสารสกัดหยาบผ่าน
กระดาษกรอง



ภาพ ข-3 สารสกัดหยาบรวมกับ sodium alginate
อัตราส่วน 3:1 ที่ผ่านกรรไกรโฮโมจิไนซ์



ภาพ ข-2 การระเหยเอทานอลภายใต้
สุญญากาศ (Evaporation)



ภาพ ข-4 สารสกัดหยาบรวมกับ sodium alginate
เพื่อทำแห้ง โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง



ภาพ ข-5 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง



ภาพ ข-6 สารสกัดไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์แบบผง

ภาคผนวก ค

การคาดคะเนอายุการเก็บรักษา

การคาดคะเนอายุการเก็บรักษา

การศึกษาอันดับและอัตราเร็วของปฏิกิริยา (Order and rate constant of reaction)

การคาดคะเนอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์โดยการศึกษาอัตราเร็วและอันดับของปฏิกิริยาสามารถอธิบายได้ด้วยทฤษฎีจลศาสตร์ของ Arrhenius

$$-\frac{dC_A}{dt} = k \cdot C_A^n$$

เมื่อ C_A = ความเข้มข้นของสารที่สนใจที่เวลา t
 t = เวลา
 k = อัตราเร็วของปฏิกิริยา
 n = อันดับของปฏิกิริยา

- ปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ($n = 0$)

มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์กับเวลา

$$C_{At} = -kt + C_{A0}$$

สร้างกราฟระหว่าง C_{At} กับเวลา t เพื่อหาค่า k

- ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ($n = 1$)

มีการเปลี่ยนแปลงแบบ Logarithmic ของความเข้มข้นของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์กับเวลา

$$\ln(C_{At} / C_{A0}) = -kt$$

สร้างกราฟระหว่าง $\ln(C_{At} / C_{A0})$ กับเวลา t เพื่อหาค่า k

● ปฏิกริยาอันดับสอง ($n = 2$)

มีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์กับเวลาแบบ Hyperbolic หรือมีความสัมพันธ์ระหว่าง $1/C_{At}$ กับเวลาเป็นเส้นตรง

$$(1/C_{At}) - (1/C_{A0}) = -kt$$

สร้างกราฟระหว่าง $1/C_{At}$ กับเวลา t เพื่อหาค่า k

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones ทำให้ทราบว่า ลักษณะคุณภาพที่สามารถบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไอโซฟลาโวนแบบผงได้ซึ่งจะนำมาใช้เป็นดัชนีการเสื่อมคุณภาพบ่งบอกอายุการเก็บรักษา

การคาดคะเนอายุการเก็บรักษาทำได้โดย นำค่าคุณภาพที่เป็นดัชนีบ่งชี้การเสื่อมคุณภาพมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์กับเวลา t เพื่อดูว่าการเปลี่ยนแปลงปฏิกริยามีความสัมพันธ์กันด้วยปฏิกริยาอันดับที่เท่าใด และทำการสร้างกราฟตามความสัมพันธ์ของปฏิกริยาอันดับนั้นๆ เพื่อคำนวณหาอัตราคงที่ (Rate constant ; k values) จากการหาความชัน (Slope) ของเส้นกราฟ และนำค่า k ที่ได้มาคำนวณหาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์หรือค่า t ในสมการ

$$\ln(C_{At}/C_{A0}) = -kt$$

การคำนวณ

สามารถคำนวณค่า k จากสมการ

$$k = 48,922(T)^2 - 319.8(T) + 0.540$$

เมื่อ T คืออุณหภูมิองศาเคลวิน

กำหนดให้ : ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ที่ยอมรับได้เท่ากับร้อยละ 70 จากค่าเริ่มต้น ดังนั้น ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones เริ่มต้น (C_{A0}) เท่ากับ 3,629.78 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และมี Reject point (C_{At}) ที่ร้อยละ 70 เท่ากับ 2,540.85 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

จากสูตร $\ln(C_{At}/C_{A0}) = -kt$ สามารถคำนวณอายุการเก็บรักษา (t) ที่อุณหภูมิ
ต่างๆ ดังนี้

ที่ 5 องศาเซลเซียส

$$\begin{aligned}\ln(2540.85/3629.78) &= -0.023t \\ t &= 15.74 \text{ เดือน}\end{aligned}$$

ที่ 15 องศาเซลเซียส

$$\begin{aligned}\ln(2540.85/3629.78) &= -0.019t \\ t &= 18.38 \text{ เดือน}\end{aligned}$$

ที่ 25 องศาเซลเซียส

$$\begin{aligned}\ln(2540.85/3629.78) &= -0.018t \\ t &= 20.10 \text{ เดือน}\end{aligned}$$

ที่ 35 องศาเซลเซียส

$$\begin{aligned}\ln(2540.85/3629.78) &= -0.017t \\ t &= 20.51 \text{ เดือน}\end{aligned}$$

ที่ 45 องศาเซลเซียส

$$\begin{aligned}\ln(2540.85/3629.78) &= -0.018t \\ t &= 19.68 \text{ เดือน}\end{aligned}$$

