

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและตัวอย่าง

เมทานอล ชนิด HPLC grade จากบริษัท Merck, Germany

เอทานอล ชนิด AR grade จากบริษัท Merck, Germany

อะซิโตไนไตรล์ ชนิด HPLC grade จากบริษัท Lab-Scan, Ireland

Ethylene glycol dimethacrylate จากบริษัท Merck, Germany

Methacrylic acid จากบริษัท Merck, Germany

Ethyl methacrylate จากบริษัท Merck, Germany

2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone จากบริษัท Merck, Germany

1-Dodecanol จากบริษัท Merck, Germany

กรดแกลลิก จากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical Co., USA

กรดแอสลาจิก จากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical Co., USA

คลอโรฟอร์ม ชนิด AR grade จากบริษัท Merck, Germany

เอทิลอะซิเตรท ชนิด AR grade จากบริษัท Merck, Germany

สาร DPPH จากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical Co., USA

สารมาตรฐาน Kaempferal จากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical Co., USA

สารมาตรฐาน Quercetin จากบริษัท ACROS, New Jersey, USA

Monosodium phosphate จากบริษัท V.S. CHEM, Thailand

Di-Sodium phosphate จากบริษัท V.S. CHEM, Thailand

กรดอะซิติก จากบริษัท V.S. CHEM, Thailand

ตัวอย่างลำไย พันธุ์สีชมพู พันธุ์แก้ว พันธุ์อีตอ จากจังหวัดเชียงใหม่

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical Balance, AG 204 Metter Toledo)

เครื่อง High Performance liquid Chromatograph (SCL-10P, Shimadzu)

ประกอบด้วย Pump : LC-10AD

Detector: SPD-10A

Column : Ultra C18 5 ไมโครเมตร, 150 x 4.6 มิลลิเมตร

HiQ sil C18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร

เครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extraction)

ตู้อบ (Binder, บริษัท ไชแอนติฟินโปรโมชัน จำกัด)

ชุดกรองสูญญากาศ (Power consumption, Taiwan)

เครื่อง Ultrasonic bath (บริษัท วาย เจ เทค อุลตราโซนิค จำกัด)

ไมโครปิเปต ขนาด 50, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

เครื่องวัด Microplate reader (Beckman Coulter DTX 880, Germany)

เครื่องเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator, EYELA, Rikakikai Ltd., Japan)

แผ่นเพลตพลาสติกชนิด 96-well plate (U-shaped microplate)

ขวดวัดปริมาตรขนาดต่างๆ

บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

ขั้นตอนที่ 1 พัฒนารหัสคัดสรรออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิคพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (molecularly imprinted polymers; MIPs)

พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเป็นสารสังเคราะห์ทำหน้าที่คล้ายรีเซพเตอร์ทางชีววิทยา และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านวิทยาศาสตร์ได้มากมาย งานวิจัยของเรามุ่งในการ พัฒนารหัสคัดสรรออกฤทธิ์ทางชีวภาพและนำพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลไปใช้ในการเป็นตัวจับกับสารที่เราสนใจและเป็นการเพิ่มปริมาณสารได้อีกด้วย ในขั้นตอนนี้จะต้องทำการศึกษา ชนิดของพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเลือกเฉพาะ (selectivity) และความ คล้ายคลึงกัน (affinity) กับโมเลกุลที่ตั้งใจว่าจะตรวจหาพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล มีข้อดี หลายประการนอกเหนือจากผลทางด้านชีววิทยา คือ ต้นทุนต่ำ เตรียมได้ง่ายและสะดวก มีการ คงตัวในการจัดเก็บ สามารถทำซ้ำโดยไม่สูญเสียความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเคมี (activity) มี Mechanical strength สูง ทนต่อความร้อนและความดัน อีกทั้งประยุกต์ใช้ใน ตัวกลางเคมีที่มีความรุนแรงได้ การทดลองนี้ได้ออกแบบพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลโมโนไลทิก คอลัมน์ (imprinted monolithic column) และเตรียมสำหรับการแยกอย่างรวดเร็วในกลุ่มสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจในตัวอย่างลำไยสกัด ทำการศึกษาถึงชนิดของ monomers, initiators และ porogen สำหรับการเตรียมเป็น Monolithic column ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงกับ กลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจ ทำการวัดขนาดของอนุภาคพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล โดยใช้เครื่อง Scanning electron microscope และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบในการจับ กับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัด เวลาในการสกัด และอัตราเร็วใน การสกัดเป็นต้น ผลการวิจัยที่ได้นำมาคำนวณหาประสิทธิภาพของการสกัด เทียบกับวิธีการ สกัดด้วยรูปแบบอื่นๆ

3.3 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเพื่อนำไปสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณของกรดแกลลิกและกรดแอสลาจิกจากสารสกัดตัวอย่างลำไย

3.3.1 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลชนิดไม่มีต้นแบบ (non-imprinted polymer) ด้วยปฏิกิริยาการเกิดเป็นพอลิเมอร์แบบ Photo-polymerization เพื่อคำนวณหาประสิทธิภาพการดูดซับ (adsorption capacity) จากสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการดูดซับ} = \frac{\text{อัตราการดูดซับสารที่วิเคราะห์ (ไมโครกรัม)}}{\text{น้ำหนักพอลิเมอร์ (มิลลิกรัม)}}$$

ตาราง 3.1 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลชนิดไม่มีต้นแบบ

สูตร	Monomer (ไมโครลิตร)			Cross-linker (ไมโครลิตร)	Initiator (กรัม)	Porogen (ไมโครลิตร)	
	MAA	BMA	EMA	EDMA	DAP	1- decanol	acetonitrile
1	15	-	465	320	0.0076	1200	-
2	240	-	-	160	0.0038	600	-
3	-	-	480	320	0.0076	1200	-
4	-	-	960	640	0.0152	2400	-
5	960	-	-	640	0.0152	2400	-
6	200	-	280	320	0.0076	1200	-
7	120	-	360	320	0.0076	1200	-
8	240	-	720	640	0.0152	2400	-
9	60	-	420	320	0.0076	1200	-
10	42	-	450	320	0.0076	1200	-
11	7	-	233	160	0.0038	600	-

การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลชนิดไม่มีต้นแบบ ที่มีอัตราส่วนที่เหมาะสม และเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์แล้ว นำสารผสมไปเขย่าผสมด้วยเครื่องเขย่าด้วยคลื่นอัลตราโซนิค เป็นเวลา 10-15 นาที ต่อจากนั้นนำสารผสมที่ได้ไปบรรจุใน glass syringe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 เซนติเมตร และนำสารผสมที่ได้ไปส่องภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ประมาณ 10 นาที เมื่อได้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์แล้ว นำมาล้างด้วยตัวทำละลาย 95%เอทานอล เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก

การเตรียมผงพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลชนิดไม่มีต้นแบบ เมื่อได้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่เตรียมไว้แล้ว นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกรงบดและกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดต่างๆ ตามที่ต้องการ และนำไปใส่ glass syringe เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับเทียบกับพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล จากนั้นล้างพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลชนิดไม่มีต้นแบบด้วยเอทานอลหรืออะซิโตนไตรลจนไม่มีสิ่งที่ไม่เกิดปฏิกิริยาติดในพอลิเมอร์

3.3.2 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่มีโมเลกุลต้นแบบของกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกด้วยปฏิกิริยาการเกิดเป็นพอลิเมอร์แบบ Photo-polymerization เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับ (adsorption capacity) มีอัตราส่วนผสมดังนี้

ตาราง 3.2 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่มีโมเลกุลต้นแบบของกรดแกลลิกและกรดเอลลาจิก

สูตรที่	Monomer (ไมโครลิตร)			Cross-linker (ไมโครลิตร)	Initiator (กรัม)	Porogen (ไมโครลิตร)		Gallic acid (มิลลิกรัม)	Ellagic acid (มิลลิกรัม)
	MAA	BMA	EMA	EDMA	DAP	1-decanol	acetonitrile		
1	465	-	15	320	0.0076	1200	-	1	1
2	240	-	-	160	0.0038	600	-	2	2
3	15	-	465	320	0.0076	1200	-	2	2
4	1200	-	-	800	0.019	3000	-	5	5
5	480	-	-	320	0.0076	1200	-	1	2
6	1200	-	-	800	0.019	-	3000	1	1
7	240	-	-	160	0.0038	600	-	1	1

สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล ที่มีอัตราส่วนที่เหมาะสมและเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์แล้ว นำสารผสมไปเขย่าผสมด้วยเครื่องเขย่าด้วยคลื่นอัลตราโซนิก เป็นเวลา 10-15 นาที ต่อจากนั้นนำสารผสมที่ได้ไปบรรจุใน glass syringe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 เซนติเมตร และนำสารผสมที่ได้ไปส่องภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ประมาณ 10 นาที เมื่อได้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์แล้ว นำมาล้างด้วยตัวทำละลาย 95%เอทานอล เพื่อกำจัดโมเลกุลต้นแบบของกรดแกลลิกและกรดเอลลาจิก และสิ่งที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออก

การเตรียมผงพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล เมื่อได้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่เตรียมไว้แล้ว นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกรนบดและกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดต่างๆ ตามที่ต้องการ จากนั้นนำไปบรรจุลงใน glass syringe เพื่อเตรียมเป็นพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล จากนั้นล้างพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลด้วยอะซิโตนไธล์จนพอลิเมอร์ไม่มีสิ่งที่ไม่เกิดปฏิกิริยา พร้อมทั้งตรวจสอบว่า กรดแกลลิกและกรดเอลลาจิก หลุดออกจากโมเลกุลต้นแบบของพอลิเมอร์ว่า

หมดหรือไหม โดยนำสารละลายที่ล้างออกมาจากการล้างพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล นำไปทำการทดสอบด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร

3.3.3 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลด้วยปฏิกิริยาการเกิดเป็นพอลิเมอร์แบบ Thermal-polymerization ที่มีโมเลกุลต้นแบบของกรดแกลลิกและกรดเอลลาจิกมีอัตราส่วนผสมดังนี้

ตาราง 3.3 การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่มีโมเลกุลต้นแบบของกรดแกลลิกและกรดเอลลาจิก

สูตร	Monomer (ไมโครลิตร)	Cross-linker (ไมโครลิตร)	Initiator (กรัม)	Porogen (ไมโครลิตร)	Gallic acid (มิลลิกรัม)	Ellagic acid (มิลลิกรัม)	
	Styrene	DVB	Benzoyl	1- decanol	Toluene		
1	150	250	0.0037	420	180	2	2
2	300	500	0.0148	640	480	1	1
3	300	500	0.0074	840	360	1	1
4	900	1500	0.0222	1920	1440	1	1

การสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล ด้วยปฏิกิริยาการเกิดเป็นพอลิเมอร์แบบ Thermal-polymerization ที่มีอัตราส่วนเหมาะสม นำสารผสมไปเขย่าผสมด้วยเครื่องเขย่าด้วยคลื่นอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที ต่อมานำสารผสมที่ได้ไปบรรจุในคอลัมน์ขนาด 46x50 มิลลิเมตร และนำไปเข้าตู้อบประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เมื่อได้พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว นำคอลัมน์มาล้างด้วยอะซิโตนไตรล์เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออก

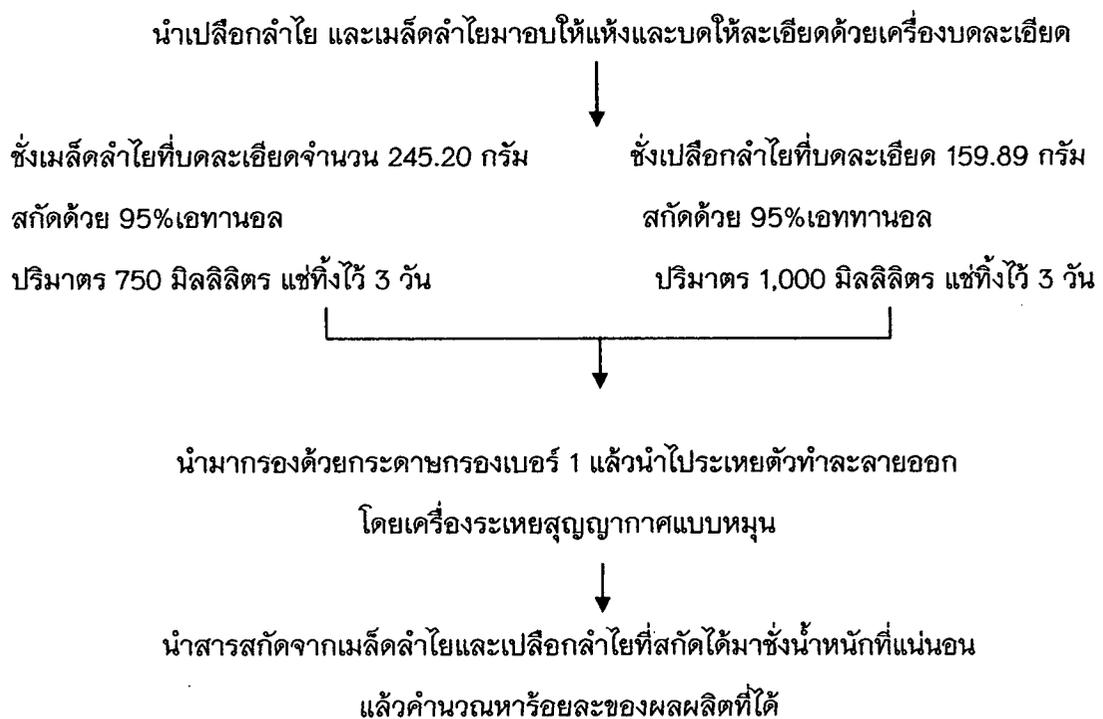
3.4 การเตรียมเมล็ดลำไยและเปลือกลำไย

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างลำไยในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ แล้วนำเมล็ดลำไยและเปลือกลำไยไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และนำมาสกัดเมล็ดลำไยและเปลือกลำไยด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยวิธี soxhlet extraction และสกัดแบบแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

3.4.1 การสกัดเมล็ดลำไยและเปลือกลำไย

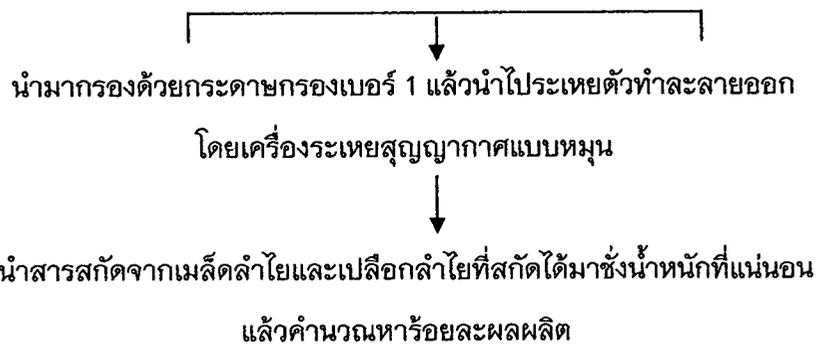
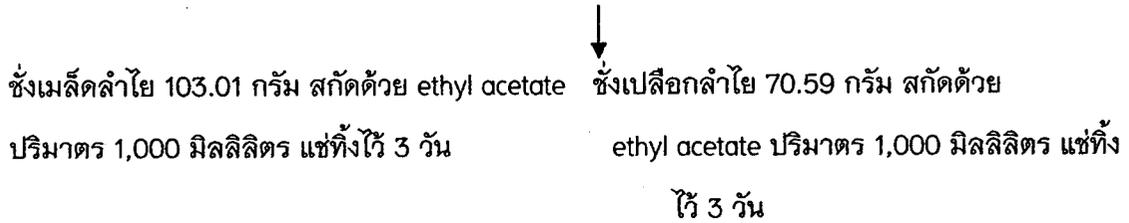
การสกัดวิธีที่ 1

การสกัดแบบแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการแช่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95%เอทานอลที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารสกัดมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)



การสกัดแบบแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการแช่สกัดด้วยสารอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) โดยแช่ที่อุณหภูมิห้องแล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

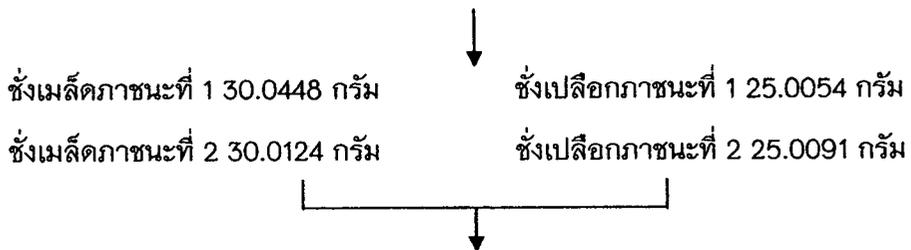
นำเปลือกลำไย, เมล็ดลำไย มาอบให้แห้งและบดให้ละเอียด



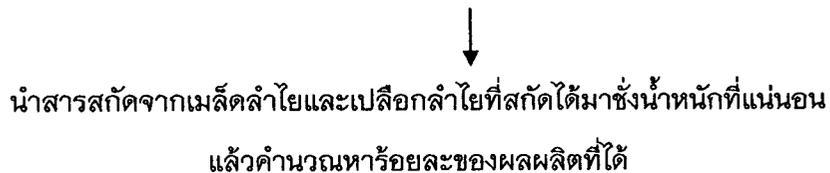
การสกัดวิธีที่ 2

การสกัดแบบให้ความร้อนด้วยตัวทำละลาย 95%เอทานอล โดยวิธี Soxhlet extraction

นำเปลือกลำไย, เมล็ดลำไย มาอบให้แห้งและบดให้ละเอียด



สกัดด้วย 95%เอทานอล โดยวิธี Soxhlet extraction



สูตรการหาค่าร้อยละผลผลิตที่ได้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของลำไยที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักของลำไยที่ใช้สกัด}} \times 100$$

3.5 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

กรณีที่ 1

ชั่งสารสกัดเปลือกลำไยและเมล็ดลำไยให้มีน้ำหนักที่แน่นอน 1.00 กรัม

↓
ละลายด้วยอะซิโตนไตรล์ และปรับปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร

↓
กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42

↓
ไม่ผ่านการดูดซับด้วย MIP (no load) ผ่านการดูดซับด้วย MIP (load)

กรณีที่ 2

ชั่งสารสกัดเปลือกลำไยและเมล็ดลำไยให้มีน้ำหนักที่แน่นอน 1 กรัม

↓
เติมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (จาก Stock Solⁿ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

↓
ละลายด้วยอะซิโตนไตรล์ และปรับปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร

↓
กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42

↓
ไม่ผ่านการดูดซับด้วย MIP (no load) ผ่านการดูดซับด้วย MIP (load)

การเตรียมตัวอย่างผ่าน SPE และพอลิเมอรัลอกแบบโมเลกุล มีขั้นตอนดังนี้คือ

- Step 1 precondition เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน SPE-MIP column ที่มี template ของกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก โดยให้สารละลายบัฟเฟอร์ซึมตัวไหลผ่าน SPE-MIP column อย่างช้าๆ ด้วย vacuum pump จนสารละลายไหลผ่านจนหมด
- Step 2 เติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน SPE-MIP column ที่มีต้นแบบโมเลกุลของกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก โดยให้สารละลายตัวอย่างไหลผ่าน SPE-MIP column อย่างช้าๆ เพื่อให้ได้สารที่สนใจดูดซับด้วยพอลิเมอรัลอกแบบโมเลกุล
- Step 3 ล้าง SPE-MIP column ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยให้สารละลายตัวอย่างไหลผ่าน SPE-MIP column อย่างช้าๆ เก็บสารละลาย step 2 นี้ไว้ใน vial เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบ HPLC เพื่อตรวจสอบว่ามีกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก ถูกชะออกมาหรือไม่
- Step 4 ชะ SPE-MIP column ด้วยอะซิโตนไคส์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยให้สารละลายตัวอย่างไหลผ่าน SPE-MIP column อย่างช้าๆ เก็บสารละลาย step 4 นี้ไว้ใน vial เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบ HPLC เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก

ชั่งสารมาตรฐานกรดแกลลิกให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไไตรล์ เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไไตรล์จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งสารมาตรฐานกรดแอลลาจิกให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไไตรล์ เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไไตรล์จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแอลลาจิกที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง 3.4

ตาราง 3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรกรดแกลลิกและกรด แอลลาจิก (ไมโครลิตร)	ปริมาตรอะซิโตนไไตรล์ (ไมโครลิตร)
2	2, 2	996
10	10, 10	980
20	20, 20	860
40	40, 40	920
60	60, 60	880

3.7 การแยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกจากเมล็ดลำไยและเปลือกลำไยด้วยเทคนิค HPLC

3.7.1 ศึกษาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดของกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก

เจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารมาตรฐานกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกไปสแกนวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง UV-Visible

spectrophotometer แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เพื่อนำไปใช้ตรวจวัดหาปริมาณกรดแกลลิกและกรดแอสลาจิกโดยใช้เทคนิค HPLC ที่พัฒนาระบบขึ้น

3.7.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- การศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม

โดยพิจารณาจากการแยกของสารสำคัญที่สนใจที่มีผลต่อสภาพความมีขั้วของตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่ โดยปรับอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำในเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ทั้งนี้ได้พิจารณาในเรื่องความดันของระบบและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย

- การศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ที่เหมาะสม

โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกและกรดแอสลาจิกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วทำการฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC โดยเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกและกรดแอสลาจิกโดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่นสูงสุด ตามลำดับ

3.7.3 การตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิควิเคราะห์

- การศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกและกรดแอสลาจิกให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันที่ความเข้มข้น 2, 10, 20, 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ดังตาราง 3.1) ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไทรล์ แล้วนำสารละลายมาตรฐานไปฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC ที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

- การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection) และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quantitative)

หาได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกและกรดแอสลาจิก โดยใช้สมการเส้นตรงในการคำนวณค่า $LOD = 3(S.D/s)$ และ $LOQ = 10 (S.D/s)$ โดยที่ S.D คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณและ s คือความชันของเส้นตรง

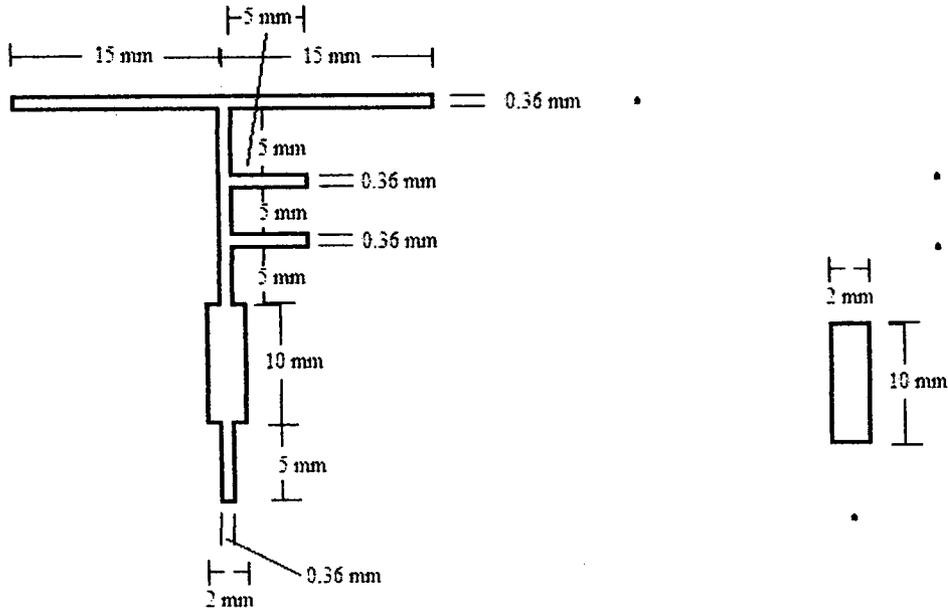
3.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณของกรดแกแลคติกและกรดแอลลาจิกจากสารสกัดตัวอย่าง
ลำไยด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผ่าน SPE และพอลิเมอร์ลอก
แบบโมเลกุล มากกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีดเข้าระบบ HPLC ที่
ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกและคำนวณผลการทดลอง

**ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาและออกแบบระบบ lab on a chip เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพร**

ระบบของ lab on a chip จะถูกสร้างขึ้นด้วย Micro-fabrication techniques ในช่วง
เริ่มต้นของการพัฒนาอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ถูกสร้างขึ้นจากวัสดุฐานรองเช่นซิลิกอน และ
แก้ด้วยวิธีการสร้างลายวงจรด้วยแสง (photolithography) และแกะสลัก (etching) ซึ่งดัดแปลง
มาจากอุตสาหกรรมการออกแบบและพัฒนาวงจรรไฟฟ้าขนาดเล็ก (microelectronic industry)
แต่กระบวนการผลิตมีราคาสูงและไม่ยืดหยุ่นจึงเป็นแรงผลักดันให้ปัจจุบันนักวิจัยส่วนใหญ่หัน
มาสนใจสร้างและพัฒนาอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ในพอลิเมอร์แทนเนื่องจากใช้เวลาในการผลิต
น้อยมีคุณสมบัติ Biocompatibility อีกทั้งยังมีราคาถูกจึงสามารถใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้งได้ด้วยการ
ประยุกต์ใช้เทคโนโลยี Soft lithography ที่อยู่บนรากฐานของการพิมพ์แบบ (printing) และหล่อ
แบบ (molding) จากแม่แบบต่างๆ โดยที่แม่แบบสามารถสร้างได้จากเทคนิคต่างๆ
นอกเหนือจากเทคนิค Photolithography เช่น Electron beam lithography, X-ray lithography
หรือ Ion beam lithography เป็นต้น

การออกแบบระบบ lab on a chip เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพร



รูป 3.1 การออกแบบระบบ lab on a chip

3.8 การแยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดแกแลคติกและกรดแอลลาจิกจากเมล็ดลำไยและเปลือกลำไยด้วยเทคนิค HPLC-lab on chip ด้วยระบบการไหลแบบต่อเนื่อง

นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผ่าน SPE และพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีดเข้าระบบ HPLC-lab on chip ด้วยระบบการไหลแบบต่อเนื่อง ที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง

3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดลำไย

3.9.3 วิธีการทดลอง

3.9.3.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากลำไยด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

นำตัวอย่างลำไยจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ พันธุ์สีชมพู, พันธุ์แก้ว และพันธุ์อีตอม มาแยกเอาเปลือกและเมล็ดไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจนแห้งแล้ว นำมาบดให้ละเอียดคนนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ส่วนเนื้อสดนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ แล้วนำไประเหยให้แห้งจะได้ %yield ของสารสกัดกล่าว

ขั้นตอนการสกัด

นำตัวอย่างลำไยพันธุ์ต่างๆ มาแยกส่วนเนื้อ ส่วนเปลือก และส่วนเมล็ด มาบดให้ละเอียด ซึ่งน้ำหนักที่แน่นอนของส่วนที่นำมาสกัด นำส่วนต่างๆ ใส่ในภาชนะสำหรับสกัด แล้วเติมด้วยตัวทำละลายดังต่อไปนี้ คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซิเตรท, เมทานอล และ เอทานอล ทำการสกัดโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วนำเอามาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้แล้วคำนวณหา % yield

3.9.3.2 การเตรียมสารละลาย DPPH และสารละลายมาตรฐาน

เตรียม DPPH stock solution ที่ความเข้มข้น 163 ไมโครโมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอลโดยการชั่ง DPPH ให้มีน้ำหนัก 3.26 มิลลิกรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เตรียม DPPH working solution ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ โดยปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7-0.9 ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Kaempferol และ Quercetin ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ เตรียมที่ความเข้มข้นตามต้องการเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานควรทำอย่างน้อย 5 ความเข้มข้นขึ้นไป

3.9.3.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ซึ่งสารสกัดหยาบ (crude extract) ของตัวอย่างลำไยจากสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ใส่ลงในหลอด Eppendrop ขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วละลายด้วยเอทานอล ทำการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ระดับความเข้มข้นในหลอด Eppendrop ขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการกำจัด Hydrogen radicals ของตัวอย่างสารสกัด โดยวัดปฏิกิริยาการเกิดเปลี่ยนสีจากสีม่วงของ DPPH solution กลายเป็นสีเหลือง (reduced form) โดยใช้เครื่อง Micro-plate reader ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เติมสารผสมตามตารางลงใน U-shaped micro-plate ดังตาราง 3.5

ตาราง 3.5 สัดส่วนของสารผสมลงใน U-shaped microplate

	DPPH working solution (ไมโครลิตร)	Ethanol (ไมโครลิตร)	Sample (ไมโครลิตร)
Sample blank	-	180	20
Test sample	180	-	20
Positive control	180	20	-
Negative control	-	200	-

เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมโดยเครื่อง Micro-plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหา % Inhibition แล้วรายงานผลเป็นค่า IC_{50}