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

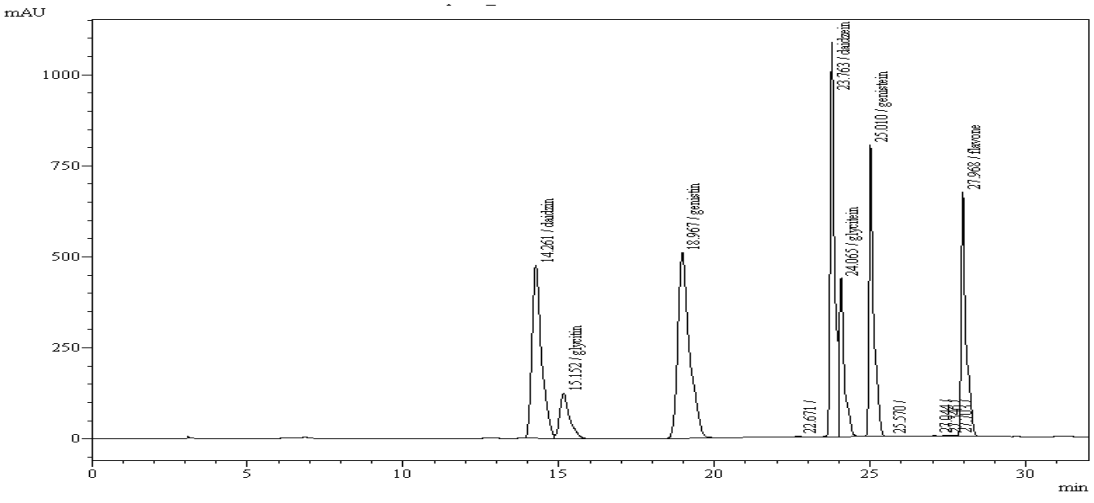
วิธีสกัดที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

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

1. ชั่งตัวอย่าง ที่ได้ผ่านกระบวนการ 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 จากนั้นจึงเติม น้ำปริมาตร 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. ดูดสารละลายส่วนใส ซึ่งอยู่ด้านบน ใส่ใน Eppendrof 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. บันทึกน้ำหนักของกระป๋องอลูมิเนียม (Moisture can) ที่สะอาด และผ่านการอบเป็นเวลา 20-30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator)

2. ชั่งตัวอย่างพร้อมกระป๋องอลูมิเนียมที่ผ่านการอบแล้ว จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่

3. นำกระป๋องอลูมิเนียมออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นไม่น้อยกว่า 20 นาที นำไปอบซ้ำหลายๆครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม

4. บันทึกน้ำหนักของกระป๋องอลูมิเนียมและของแข็งที่เหลืออยู่และคำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

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

เมื่อ A คือ น้ำหนักตัวอย่าง + กระป๋องอะลูมิเนียมก่อนอบ (กรัม)

B คือ น้ำหนักตัวอย่าง + กระป๋องอะลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)

C คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในจีนัสบาซิลลัส (*Bacillus* spp.)

การใช้เทคนิค pour plate

เทคนิคนี้ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จะต้องทำการเจือจางใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวโดยใช้ aseptic technique ทุกขั้นตอน

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- หลอดทดลอง
- ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับเจือจาง

- สารละลาย Peptone Water ที่มีความเข้มข้น 0.1% W/V (Peptone, Difco ™, USA)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (Becto ® PCA Plate Count Agar, Difco ™, USA)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. ต้มจนอาหารละลาย
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าหม้อนึ่งความดัน โดยให้ความร้อน 121- 124 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้อาหารปราศจากเชื้อ

ขั้นตอนการแยกเชื้อ

1. นำตัวอย่างจมูกถั่วชีวภาพ 25 กรัม ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. เติมสารละลายเปปโตน 225 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher) ให้ตัวอย่างและสารละลายเปปโตนผสมเข้ากัน ส่วนผสมที่ได้เป็นการเจือจางตัวอย่างไป 10 เท่า หรือ dilution 10^{-1}
3. ใช้ปิเปต ดูดสารละลายที่เตรียมจากข้อ 1. ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และนำไปใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตนปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อทำการเจือจางเขย่าให้ผสมกันดี เป็นการเจือจางตัวอย่างไป 100 เท่า หรือ 10^{-2} จากนั้นทำการเจือจางไปเรื่อยจนกระทั้ง 10^{-9} (ทำการเปลี่ยนปิเปตใหม่ทุกครั้งที่เจือจางตัวอย่าง)
4. ดูดสารละลายในแต่ละ dilution มา 1 มิลลิลิตร ด้วยปิเปต นำมาใส่ลงใน จานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ โดยทำ 2 จานต่อ 1 dilution
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวซึ่งควรพักไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50-55 องศาเซลเซียส มาเติมลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปมาให้ผสมเข้ากันและตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง
7. นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar

1. Beef extract	3	กรัม
2. Peptone	5	กรัม
3. Agar	15	กรัม
4. Distilled water	1	ลิตร

วิธีการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดส (β- glucosidases)

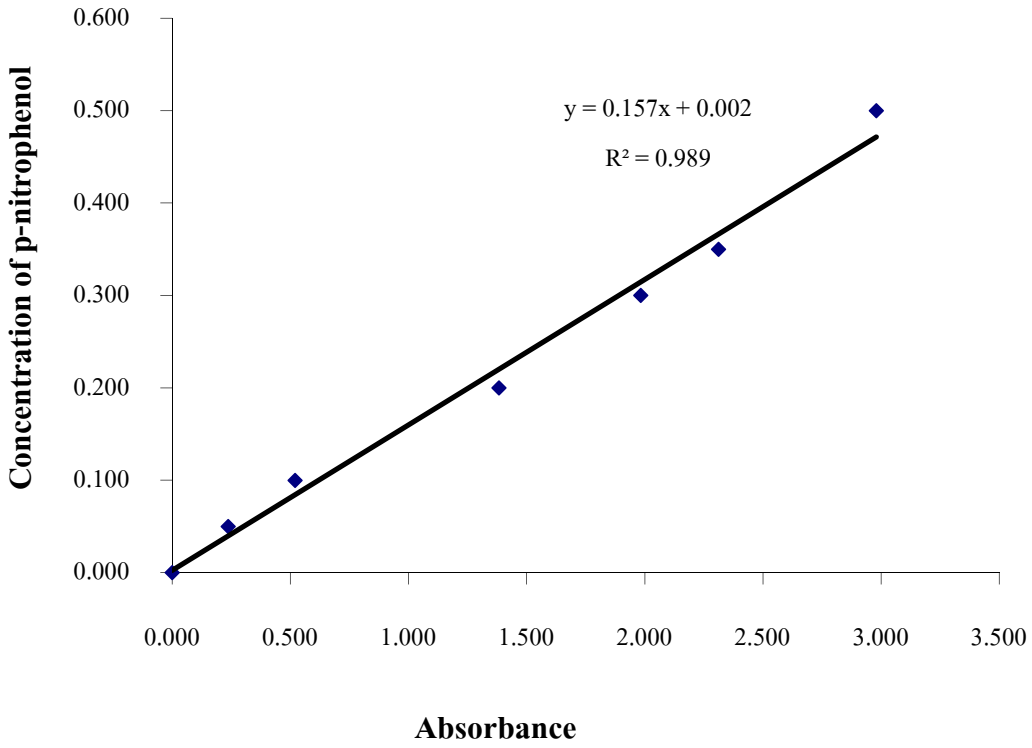
การวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์ β- glucosidases จากผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก

1. ชั่งตัวอย่าง 5.00 กรัม
2. เติมสารละลาย acetate buffer ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการ homogenized ให้เข้ากันดี
3. ทำการ centrifuged ที่ 8,000 g ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. เก็บส่วนใสมาทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป โดยส่วนใส คือ เอนไซม์ที่ได้จากตัวอย่าง
5. นำส่วนใส ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เติม 1mM *p*-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside (*p*-NPG) 2 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันดี
6. นำไป incubate ไว้ที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
7. หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M Na_2CO_3 จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm

การสร้างกราฟมาตรฐานในการศึกษา กิจกรรมเอนไซม์ β- glucosidases

ตารางที่ ก-1. ความเข้มข้นของ *p*-Nitrophenol ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

Concentration of *p*-Nitrophenol (mM)	**Absorbance (405 nm)**
0.000	0.000
0.050	0.237
0.100	0.521
0.200	1.383
0.300	1.984
0.350	2.312
0.500	2.981



ภาพที่ ก-2. กราฟมาตรฐานของ *p*-Nitrophenol