สัญญาเลขที่ สวจ. 12/2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน ในใบหม่อนและชาใบหม่อน โดยใช้แคปิลลารี อิเล็กโทรโฟรีซิส

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN MULBERRY LEAVES AND TEA USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

ผู้วิจัย

นางสาวเสาวภาคย์ เกษมสุข คณะเภสัชศาสตร์

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

ISBN 974-9921-84-4

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน ในใบหม่อนและชาใบหม่อน โดยใช้แคปิลลารี อิเล็กโทรโฟรีซิส

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN MULBERRY LEAVES AND TEA USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

โดย

นางสาวเสาวภาคย์ เกษมสุข

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

ISBN 974-9921-84-4

บทสรุปเชิงนโยบายสำหรับผู้บริหาร

หม่อน (Mulberry) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Morus alba L. อยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นไม้ยืนต้น ขนาดย่อม สูง 2-3 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยวมีสีเขียวเข้ม ผลเป็นผลรวมออกเป็นพวง ผลกลมเล็ก เมื่อสุกมีสีม่วงแดง เป็นพืชเศรษฐกิจที่เป็นที่รู้จักกันดีชนิดหนึ่ง ใบหม่อนใช้เป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนของไหม มีการปลูกมากทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีอุตสาหกรรมการทอผ้าไหม การศึกษาในประเทศญี่ปุ่นพบว่าใบหม่อนประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด เช่น 1-deoxynojirimycin (DNJ) N-methyl-DNJ (N-Me-DNJ) 2-O-α-D-galactopyranosyl-DNJ (GAL-DNJ) fagomine 1,2,3,4-tetrahydroxynortropene (calystegin B_2) และ 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinotol (DAB) ซึ่งเป็นสารพวกแอลคาลอยด์ สาร DNJ ที่พบมีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดในสัตว์ทดลอง เช่น หนูและกระต่ายในห้องปฏิบัติการ สาร gamma-aminobutyric acid (GABA) มีผลลดความดันเลือด และมีสารฟลาโวนอยด์มากมายหลายชนิด เช่น rutin quercetin kaempferol astragalin isoquercetin kuwanon และ chalcomoracin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ใบหม่อนมีสารอาหารต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม โปแตสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี กรดอะมิโน วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินซี คาร์โบไฮเดรต เพคติน และเส้นใยอาหาร ซึ่งที่พบในชาหม่อนเป็นกรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนมีมากถึง 18 ชนิด จาก กรดอะมิโนที่มีอยู่ทั้งหมด 22 ชนิด ซึ่งกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) ที่พบในชาใบหม่อนได้แก่ isoleucine leucine methionine cystine phenylalanine tyrosine threonine valine tryptophan และ lysine ซึ่งพบในปริมาณ (เฉลี่ย) 823, 1,644, 167, 58, 1,028, 608, 871, 170, 1,094 และ 1,050 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับเด็กทารกอีก 2 ชนิด คือ arginine และ histidine

กรดอะมิโน (amino acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มี หมู่อะมิโน (NH_2) และ หมู่คาร์บอกซิล (COOH) กรดอะมิโนต่อกันด้วยพันธะเปปไตด์ รวมเป็นสารประกอบโปรตีน

โปรตีนมีบทบาทในการเป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อร่างกาย การสร้างเอนไซม์ ฮอร์โมนของเหลวและน้ำคัดหลั่งของร่างกาย และเป็นส่วนประกอบของแอนติบอดี้ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และโปรตีนเกี่ยวข้องกับการขนส่ง triglyceride cholesterol phospholipid และ วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน

กรดอะมิโนแบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. Essential amino acid เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร เนื่องจากร่างกายสังเคราะห์ได้ไม่เพียงพอ และจำเป็นสำหรับเมตาบอลิซึมต่างๆ ได้แก่ threonine tryptophan histidine lysine leucine isoleucine methionine valine phenylalanine และ arginine
2. Nonessential amino acid ร่างกายสามารถสังเคราะห์ได้จาก essential amino acid หรือจากไนโตรเจนและคาร์บอนในเซลล์ ได้แก่ glutamic acid alanine และ aspatate
3. Conditionally essential amino acid เป็น nonessential amino acid แต่จะเป็น essential amino acid ได้ในบางสภาวะ ได้แก่ proline serine tyrosine cysteine taurine และ glycine ภาวะทางคลินิกที่เกี่ยวข้องเช่น taurine cysteine และ tyrosine จะเป็น essential amino acid ในทารกแรกเกิด

<u>หน้าที่ของกรดอะมิโนที่สำคัญ</u>

tryptophan: เป็นสารตั้งต้นของ niacin และสารสื่อประสาท serotonin

methionine: เป็นสารที่ทำให้ methyl group สำหรับสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ เช่น choline carnitine cystine และสารประกอบที่มี sulfur

phenylalanine: เป็นสารตั้งต้นของ tyrosine และ นำไปสู่การสร้าง thyrosine และ epinephrine

tyrosine: เป็นสารตั้งต้นของการสร้างเม็ดสีของผิวหนังและเส้นผม

arginine: เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยูเรียในตับ

glycine: จับกับสารพิษบางอย่างแล้วเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่มีอันตรายแล้วขับออก และใช้ในการสังเคราะห์ porphyrin nucleus ของ hemoglobin และเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ bile acids

histidine: จำเป็นในการสังเคราะห์ histamine ซึ่งทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด

arginine glycine และ methionine:

จับกับ phosphate ในการสร้าง creatine phosphate ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ในร่างกาย

glutamic acid และ aspartic acid:

glutamine สร้างจาก glutamic acid และ asparagine สร้างจาก aspartic acid เป็นแหล่งของกลุ่มอะมิโนภายในร่างกาย และ glutamine เป็นแหล่งพลังงานในระบบลำไส้ ควบคุมการสังเคราะห์ glycogen และการสลายของโปรตีนเพื่อต่อต้านแบคทีเรีย

สรรพคุณพื้นบ้านของใบหม่อนพบว่า ใบมีรสจืดเย็น ใช้เป็นยาขับเหงื่อ แก้เจ็บคอ ต้มดื่มแก้ไข้ตัวร้อน แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้ไอ ระงับประสาท ส่วนผล ต้มกินเป็นยาเย็น ยาระบายอ่อนๆ แก้ธาตุไม่ปกติ ตับร้อน ทำให้ชุ่มคอ บำรุงไต

คุณสมบัติทางชีวภาพและเภสัชวิทยาของใบหม่อนมีหลายประการ ได้แก่ ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (antihyperglycemic activity) ลดความดันเลือด และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จึงนับว่าหม่อนเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการที่จะนำมาพัฒนาเป็นยา และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร นอกเหนือจากการใช้เป็นอาหารของตัวอ่อนไหม

ชาเป็นเครื่องดื่มที่เก่าแก่ของโลก แพร่หลายมานานกว่า 2,000 ปี ชาวจีนเป็นชาติแรกที่รู้จักดื่มชาและมีการนำใบชาไปใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม ตั้งแต่ศตวรรษที่ 4 ต่อมามีการนำพืชชนิดอื่น เช่น ใบเตย ดอกคำฝอย มาเป็นเครื่องดื่มเช่นเดียวกับชา จึงใช้คำว่า “ ชา ” นำหน้าชื่อพืชนั้นๆ เช่น ชาใบเตย หรือ ชาเตย เป็นต้น ชาจากใบและรากหม่อนได้ถูกนำมาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในประเทศญี่ปุ่น ปัจจุบันในประเทศไทยมีการผลิตชาจากใบหม่อนจำหน่ายกันมาก และกำลังเป็นที่นิยมดื่มของผู้บริโภค เนื่องจากทราบผลดีต่อสุขภาพ และสถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กำลังให้ความสำคัญการปรับปรุงพันธุ์หม่อน เพื่อให้ได้หม่อนที่มีคุณภาพ เพื่อเป็นประโยชน์สูงสุดต่อทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาชนิดของชาใบหม่อนที่มีคุณภาพ คือใบหม่อนที่มีปริมาณกรดอะมิโน และ1-deoxynojirimycin (DNJ) สูงสุด ซึ่งวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของกรดอะมิโนที่ใช้ทั่วไป ได้แก่ X-ray crystallography nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy และ mass spectrometry (MS) และวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ microbiological assay radiochemical assay radioimmunoassay enzymeimmunoassay fluoroimmunoassay และ immunoassay อื่นๆ spectrophotometry gaschromatography (GC) thin-layer chromatography (TLC) high-performance liquid chromatography (HPLC) และวิธีล่าสุดในปัจจุบันที่นำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณคือ capillary electrophoresis (CE) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีข้อดีหลายประการ เช่น มีประสิทธิภาพสูง สะดวกประหยัดในเรื่องของปริมาณสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ เวลา และค่าใช้จ่าย ผู้ดำเนินงานวิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำวิธี CE มาพัฒนาหาปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ lysine, proline, leucine, alanine, valine, phenylalanine, serine, glutamine, threonine, aspartic acid, glutamic acid และแอลคาลอยด์ DNJ เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกร ผู้ผลิตและผู้บริโภคต่อไป

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกรดอะมิโนบางชนิด ในใบหม่อน และชาใบหม่อน เนื่องจากใบหม่อนมีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาหลายประการ ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยมีการผลิตชาจากใบหม่อนจำหน่ายกันมาก และกำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภค

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกรดอะมิโน (lysine, proline, leucine, alanine, valine, phenylalanine, serine, glutamine, threonine, aspartic acid และ glutamic acid) ด้วยวิธีแคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยการศึกษาปัจจัยของ ความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ อุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า พบสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารทั้ง 11 ชนิด ดังนี้

Capillary electrophoretic condition:

Capillary tubing	: fused silica 75 μm x 85 cm (effective length 76.5 cm)
Electrolyte	: 10 mM p-aminosalicylic acid and 2 mM sodium carbonate, pH 10.2
Oven Temperature	: 25° C
Applied voltage	: +15 kV
Injection	: pressure 50 mbar for 10 sec
Detector	: UV 254 nm

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเป็นงานวิจัยใหม่ที่สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน ในตัวอย่างสารสกัดใบหม่อนและชาใบหม่อน โดยใช้แคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยวิธี external standard method ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และประหยัด นอกจากนี้ยังมีความถูกต้องและแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาทางการเกษตร และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน ในใบหม่อนและชาใบหม่อน โดยใช้แคปิลลารี อิเล็กโทรโฟรีซิส

Development of method for determination of amino acids in mulberry leaves and tea using capillary electrophoresis

ผู้วิจัย อ.เสาวภาคย์ เกษมสุข

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สุรพจน์ วงศ์ใหญ่

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยรังสิตประจำปีพ.ศ.2545

บทคัดย่อ

เทคนิคใหม่สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโน โดยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อสภาวะการทดลอง อาทิ ความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ อุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่สุด คือ กรดอะมิโนซาลิไซลิกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ พี เอช 10 ในแคปิลลารีความยาว 76.5 เซนติเมตร (effective length) เส้นผ่านศูนย์กลางภายในแคปิลลารี 75 ไมโครเมตร ที่ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นได้ผ่านการประเมินเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนในใบหม่อนและชาใบหม่อน งานวิจัยนี้เป็นแนวทางหนึ่งซึ่งจะนำไปสู่การควบคุมคุณภาพและการประกันคุณภาพยาที่พัฒนามาจากสมุนไพร เพื่อยกระดับคุณภาพยาสมุนไพรไทยให้มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เพื่อแก้ปัญหาด้านการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรไทย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Research Title Development of method for determination of amino acids in mulberry leaves and tea using capillary electrophoresis

Researcher Miss Saowapak Kasemsook

Advisor Associate Prof. Dr. Surapote Wongyai

Supported by Rangsit University Research Fund 2002

Abstract

A new analytical technique for determination of amino acids was investigated by using capillary electrophoresis (CE). Optimization of capillary electrophoresis was investigated by different factors, which included concentration and pH of the background electrolyte, temperature and voltage. The optimum condition was obtained in 10 mM p-aminosalicylic acid and 2 mM sodium carbonate, pH 10.2, using a fused-silica capillary with 76.5 cm (effective length), 75 μm (inner diameter), applied voltage of 15 kV and oven temperature of 25°C. The optimum condition was validated and applied to determine the amino acids in mulberry leaves and tea. This research was developed to rise the standard for quality control and quality assurance of herbal product inorder to increase efficiency and safety of consumer. The research could be solved the quality control problems in Thai herbals.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ ที่ให้ความกรุณาให้ความรู้ ความเข้าใจ เทคนิคการทำวิจัยและให้คำปรึกษาด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณอาจารย์ผู้ร่วมงานและเจ้าหน้าที่ทุกคนของภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวกเป็นอย่างดี และขอขอบคุณ คุณวิโรจน์ แก้วเรือง นักวิชาการ สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้การสนับสนุน เอื้อเฟื้อ ตัวอย่างใบหม่อนและชาใบหม่อน

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณสำนักวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้สนับสนุนทุนการทำวิจัยในครั้งนี้จนทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

เรื่อง		หน้า
บทสรุปเชิงนโยบายสำหรับผู้บริหาร	.....	1
บทคัดย่อภาษาไทย	.....	5
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	.....	6
กิตติกรรมประกาศ	.....	7
คำอธิบายตัวย่อ	.....	11
บทที่ 1 : บทนำ	.....	14
บทที่ 2 : วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย	.....	26
บทที่ 3 : ผลการวิจัยและบทวิจารณ์	.....	33
บทที่ 4 : สรุปผลการวิจัย	.....	44
บทที่ 5 : เอกสารอ้างอิง	.....	46

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 15

ใบหม่อน

รูปที่ 2 16

โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน

รูปที่ 3 18

ส่วนประกอบพื้นฐานเครื่อง CE

รูปที่ 4 19

ปรากฏการณ์การเกิดการไหลอิเล็กโทรออสโมซิสภายในแคปิลลารี

รูปที่ 5 21

การแยกสารโดยกลไกการแยก capillary zone electrophoresis

รูปที่ 6 22

การแยกสารโดยกลไกการแยก micellar electrokinetic chromatography capillary

รูปที่ 7 22

การแยกสารโดยกลไกการแยก capillary isoelectric focusing

รูปที่ 8 23

การแยกสารโดยกลไกการแยก capillary gel electrophoresis

รูปที่ 9 28

เครื่องมือ capillary electrophoresis

รูปที่ 10 34

ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ *p*-aminosalcylic acid ที่ pH 10.2 ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

รูปที่ 11 35

ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลง pH ที่ความเข้มข้นของ *p*-aminosalcylic acid 8 mM ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ 12 38

ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ pH 10.2 ความเข้มข้นของ *p*-aminosalcylic acid 8 mM และความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์

รูปที่ 13 39

ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้า อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ pH 10.2 ความเข้มข้นของ *p*-aminosalcylic acid 8 mM

รูปที่ 14 40

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์แยกกรดอะมิโน 11 ชนิด

รูปที่ 15 41

กราฟมาตรฐานของ standard phenylalanine

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 24

แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์สารกรดอะมิโนโดยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 2 26

รายชื่อเครื่องมือ

ตารางที่ 3 27

รายชื่อสารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

ตารางที่ 4 29

การทำความสะอาดคอลัมน์

ตารางที่ 5 36

ผลของความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ตารางที่ 6 37

ผลของอุณหภูมิและความต่างศักย์

ตารางที่ 7 43

ปริมาณ phenylalanine ที่พบในตัวอย่างใบหม่อนและชาใบหม่อน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

คำอธิบายตัวย่อ

°C	degree Celsius
A	Amp
AR	analytical grade
AVG	average
CE	capillary electrophoresis
CEC	capillary electrochromatography
CGE	capillary gel electrophoresis
CIEF	capillary isoelectric focusing
CITP	capillary isotachophoresis
cm	centimeter
CZE	capillary zone electrophoresis
DMAB	4-(N, N'-dimethylamino)-benzoic acid
DNJ	1-deoxynojirimycin
GC	gas chromatography
g	gram
HCl	hydrochloric acid
HPLC	high-performance liquid chromatography
I.D.	inner diameter
kV	kilovolt
l	litre, effective length of capillary
L	total length of capillary
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
M	molarity
MEKC	micellar electrokinetic capillary chromatography
MS	mass spectrometry
min	minute
min^{-1}	per minute

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

คำอธิบายตัวย่อ (ต่อ)

ml	mililitre
ml^{-1}	per militre
mm	milimeter
mM	milimolarity
N	Normality
NaOH	sodium hydroxide
NMR	nuclear magnetic resonance
nm	nanometer
PC	paper chromatography
pH	negative logarithm of hydrogen ion concentration
pK_a	acidity constant for an acid or protonated base
r^2	correlation coefficient
RP	reversed-phase
RSD	relative standard deviation
S/N	singal-to-noise
SD	standard deviation
t_m	migration time
UV	ultraviolet
V	volt
v/v	volume by volume
μ	micron
μ_e	electrophoretic mobility
μl	microlitre
μm	micromole

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ใบหม่อนและชาใบหม่อน

หม่อน (Mulberry) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Morus alba L. อยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นไม้ยืนต้น ขนาดย่อม สูง 2-3 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยวมีสีเขียวเข้ม ผลเป็นผลรวมออกเป็นพวง ผลกลมเล็ก เมื่อสุกมีสีม่วงแดง เป็นพืชเศรษฐกิจที่เป็นที่รู้จักกันดีชนิดหนึ่ง ใบหม่อนใช้เป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนของไหม มีการปลูกมากทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีอุตสาหกรรมการทอผ้าไหม (1) การศึกษาในประเทศญี่ปุ่นพบว่าใบหม่อนประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด เช่น 1-deoxynojirimycin (DNJ) N-methyl-DNJ (N-Me-DNJ) 2-O-α-D-galactopyranosyl-DNJ (GAL-DNJ) fagomine 1,2,3,4-tetrahydroxynortropene (calystegin B_2) และ 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinotol (DAB) ซึ่งเป็นสารพวกแอลคาลอยด์ (2) สาร DNJ ที่พบมีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดในสัตว์ทดลอง เช่น หนูและกระต่ายในห้องปฏิบัติการ สาร gamma-aminobutyric acid (GABA) มีผลลดความดันเลือด (3) และมีสารฟลาโวนอยด์มากมายหลายชนิด เช่น rutin quercetin kaempferol astragalin isoquercetin kuwanon และ chalcomoracin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (1) ใบหม่อนมีสารอาหารต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม โปแตสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี กรดอะมิโน วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินซี (3) คาร์โบไฮเดรต เพคติน และเส้นใยอาหาร (1) ซึ่งที่พบในชาหม่อนเป็นกรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนมีมากถึง 18 ชนิด จาก กรดอะมิโนที่มีอยู่ทั้งหมด 22 ชนิด ซึ่งกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) ที่พบในชาใบหม่อนได้แก่ isoleucine leucine methionine cystine phenylalanine tyrosine threonine valine tryptophan และ lysine ซึ่งพบในปริมาณ (เฉลี่ย) 823, 1,644, 167, 58, 1,028, 608, 871, 170, 1,094 และ 1,050 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับเด็กทารกอีก 2 ชนิด คือ arginine และ histidine (3)

รูปที่ 1 ใบหม่อน

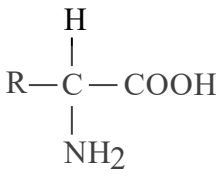
สรรพคุณพื้นบ้านของใบหม่อนพบว่า ใบมีรสจืดเย็น ใช้เป็นยาขับเหงื่อ แก้เจ็บคอ ต้มดื่มแก้ไข้ตัวร้อน แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้ไอ ระงับประสาท ส่วนผล ต้มกินเป็นยาเย็น ยาระบายอ่อนๆ แก้ธาตุไม่ปกติ ตับร้อน ทำให้ชุ่มคอ บำรุงไต (4)

คุณสมบัติทางชีวภาพและเภสัชวิทยาของใบหม่อนมีหลายประการ ได้แก่ ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (antihyperglycemic activity) ลดความดันเลือด และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จึงนับว่าหม่อนเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการที่จะนำมาพัฒนาเป็นยา และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร นอกเหนือจากการใช้เป็นอาหารของตัวอ่อนไหม (1)

ชาเป็นเครื่องดื่มที่เก่าแก่ของโลก แพร่หลายมานานกว่า 2,000 ปี ชาวจีนเป็นชาติแรกที่รู้จักดื่มชาและมีการนำใบชาไปใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม ตั้งแต่ศตวรรษที่ 4 ต่อมามีการนำพืชชนิดอื่น เช่น ใบเตย ดอกคำฝอย มาเป็นเครื่องดื่มเช่นเดียวกับชา จึงใช้คำว่า “ ชา ” นำหน้าชื่อพืชนั้นๆ เช่น ชาใบเตย หรือ ชาเตย เป็นต้น (4) ชาจากใบและรากหม่อนได้ถูกนำมาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในประเทศญี่ปุ่น (5) ปัจจุบันในประเทศไทยมีการผลิตชาจากใบหม่อนจำหน่ายกันมากและกำลังเป็นที่นิยมดื่มของผู้บริโภค เนื่องจากทราบผลดีต่อสุขภาพ และสถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กำลังให้ความสำคัญการปรับปรุงพันธุ์หม่อน เพื่อให้ได้หม่อนที่มีคุณภาพ เพื่อเป็นประโยชน์สูงสุดต่อทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาชนิดของชาใบหม่อนที่มีคุณภาพ คือใบหม่อนที่มีปริมาณกรดอะมิโน และ1-deoxynojirimycin (DNJ) สูงสุด

กรดอะมิโน

กรดอะมิโน (amino acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มี หมู่อะมิโน (NH_2) และ หมู่คาร์บอกซิล (COOH) กรดอะมิโนต่อกันด้วยพันธะเปปไตด์ รวมเป็นสารประกอบโปรตีน กรดอะมิโนมี 20 ชนิด แต่ละชนิดต่างกันที่ กลุ่ม R ยกเว้น proline เป็น α-amino carboxylic acids คือ มี amino group และ carboxylic group อยู่ที่คาร์บอนอะตอมเดียวกัน (6)



รูปที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน

โปรตีนมีบทบาทในการเป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อร่างกาย การสร้างเอนไซม์ ฮอร์โมนของเหลวและน้ำคัดหลั่งของร่างกาย และเป็นส่วนประกอบของแอนติบอดี้ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และโปรตีนเกี่ยวข้องกับการขนส่ง triglyceride cholesterol phospholipid และ วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน (6)

กรดอะมิโนแบ่งเป็น 3 ประเภท (6) ได้แก่

1. Essential amino acid เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร เนื่องจากร่างกายสังเคราะห์ได้ไม่เพียงพอ และจำเป็นสำหรับเมตาบอลิซึมต่างๆ ได้แก่ threonine tryptophan histidine lysine leucine isoleucine methionine valine phenylalanine และ arginine
2. Nonessential amino acid ร่างกายสามารถสังเคราะห์ได้จาก essential amino acid หรือจากไนโตรเจนและคาร์บอนในเซลล์ ได้แก่ glutamic acid alanine และ aspatate
3. Conditionally essential amino acid เป็น nonessential amino acid แต่จะเป็น essential amino acid ได้ในบางสภาวะ ได้แก่ proline serine tyrosine cysteine taurine และ glycine ภาวะทางคลินิกที่เกี่ยวข้องเช่น taurine cysteine และ tyrosine จะเป็น essential amino acid ในทารกแรกเกิด

หน้าที่ของกรดอะมิโนที่สำคัญ (6)

Tryptophan: เป็นสารตั้งต้นของ niacin และสารสื่อประสาท serotonin

Methionine: เป็นสารที่ทำให้ methyl group สำหรับสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ เช่น choline carnitine cystine และสารประกอบที่มี sulfur

Phenylalanine: เป็นสารตั้งต้นของ tyrosine และ นำไปสู่การสร้าง thyrosine และ epinephrine

Tyrosine: เป็นสารตั้งต้นของการสร้างเม็ดสีของผิวหนังและเส้นผม

Arginine: เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยูเรียในตับ

Glycine: จับกับสารพิษบางอย่างแล้วเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่มีอันตรายแล้วขับออก และใช้ในการสังเคราะห์ porphyrin nucleus ของ hemoglobin และเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ bile acids

Histidine: จำเป็นในการสังเคราะห์ histamine ซึ่งทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด

Arginine glycine และ methionine:

จับกับ phosphate ในการสร้าง creatine phosphate ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ในร่างกาย

Glutamic acid และ aspartic acid:

glutamine สร้างจาก glutamic acid และ asparagine สร้างจาก aspartic acid เป็นแหล่งของกลุ่มอะมิโนภายในร่างกาย และ glutamine เป็นแหล่งพลังงานในระบบลำไส้ ควบคุมการสังเคราะห์ glycogen และการสลายของโปรตีนเพื่อต่อต้านแบคทีเรีย

วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน

วิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของกรดอะมิโนที่ใช้ทั่วไป (7)ได้แก่ X-ray crystallography nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy และ mass spectrometry (MS) และวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ microbiological assay radiochemical assay radioimmunoassay enzymeimmunoassay fluoroimmunoassay และ immunoassay อื่นๆ spectrophotometry gaschromatography (GC) thin-layer chromatography (TLC) high-performance liquid chromatography (HPLC) และวิธีล่าสุดในปัจจุบันที่นำมาใช้วิเคราะห์หา

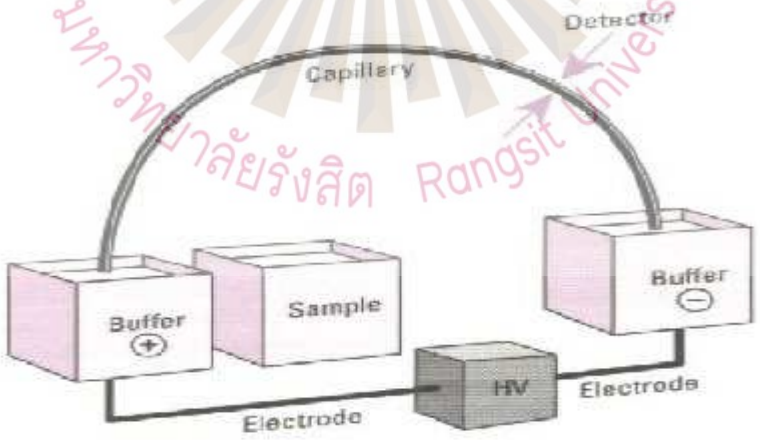
ปริมาณคือ capillary electrophoresis (CE) (8) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีข้อดีหลายประการ เช่น มีประสิทธิภาพสูง สะดวกประหยัดในเรื่องของปริมาณสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ เวลา และค่าใช้จ่าย

วิธีวิเคราะห์โดย capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis เป็นเทคนิคใหม่ที่พัฒนามาจาก electrophoresis มีหลักการพื้นฐานในการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่าง ในการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้า

ส่วนประกอบของเครื่อง CE ประกอบด้วย ดังรูปที่ 3

1. แหล่งกำเนิดความต่างศักย์ไฟฟ้า (high voltage power supply)
2. อิเล็กโทรด (electrode, buffer)
3. แคปิลลารี (capillary tube)
4. ส่วนฉีดสาร (sample injection)
5. หน่วยตรวจวัด (detector)
6. หน่วยประมวลผล (computer software)

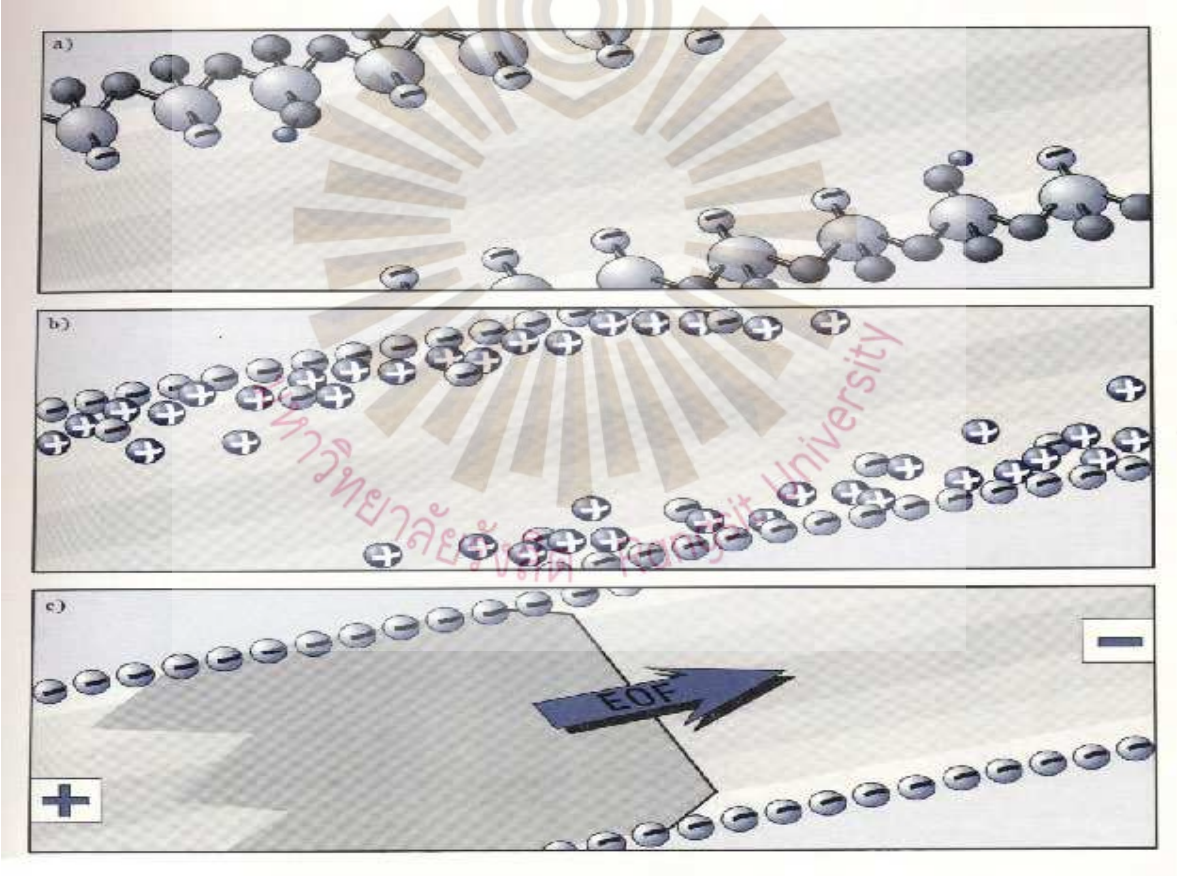


รูปที่ 3 ส่วนประกอบพื้นฐานเครื่อง CE

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารถูกนำเข้าทางด้าน inlet (anode) และถูกชะออกมาทางด้าน outlet (cathode) ที่ทั้งสองด้านมีอิเล็กโทรด มีแหล่งกำเนิดความต่างศักย์ไฟฟ้าให้กับด้านทั้งสอง สารจะถูกวิเคราะห์แยกภายในแคปิลลารีมีหน่วยตรวจวัดผลและประมวลผลส่งสัญญาณออกมาเป็น electrophoregram

กลไกที่สำคัญที่ทำให้เกิดการแยกสารภายในแคปิลลารีคือ การเกิดการไหลอิเล็กโทรออสโมซิส แสดงดังรูปที่ 4 ซึ่งเป็นปรากฏการณ์การไหลของของเหลวภายในแคปิลลารีเกิดขึ้นได้เนื่องจากผนังภายในแคปิลลารีทำจากซิลิกา (silica) สภาวะที่เป็นด่างจะแตกตัวให้หมู่ไซลินอล (silinol group) เกิดการเสียสมดุลทางไฟฟ้าเมื่อให้บัฟเฟอร์เข้าไป ประจุบวกจากบัฟเฟอร์พยายามจับกับหมู่ไซลินอลเพื่อปรับสมดุล เมื่อให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเข้าไปที่ขั้วทั้งสองทำให้เกิดการไหลของประจุ ซึ่งการไหลนี้ทำให้ของเหลวรอบประจุถูกพาไปด้วยดังนั้นจึงสามารถแยกสารประกอบได้ทั้งสารที่มีประจุบวก ประจุลบ และสารที่มีความเป็นกลางทางไฟฟ้า



รูปที่ 4 ปรากฏการณ์การเกิดการไหลอิเล็กโทรออสโมซิสภายในแคปิลลารี

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์

1. Buffer (pH และ ionic strength)

   สารที่เป็นกรดจะแตกตัวได้ดีที่ pH สูง ส่วนสารที่เป็นเบสจะแตกตัวได้ดีใน pH ต่ำ ส่วนความแรงของอิออนจะมีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของสาร ดังนั้นต้องพิจารณาเลือกบัฟเฟอร์ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์

2. Voltage

   การเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของสาร ทำให้สารเคลื่อนที่เร็วขึ้นเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะสั้น ประสิทธิภาพการวิเคราะห์สูงขึ้น

3. Temperature

   อุณหภูมิมีผลต่อความหนืดของสาร การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ความหนืดลดลง ทำให้สารเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น

4. Addition of modifier

   เป็นการเติมสาร organic solvent ลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

5. Capillary dimension

   ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคปิลลารีมีผลต่อ เวลาในการเคลื่อนที่ของสาร ความสามารถในการแยกสาร ความไวในการตรวจวัด การถ่ายเทความร้อน และการถูกดูดซับสารโดยผนังด้านในแคปิลลารี

6. Injection

   การฉีดสาร สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

   1. Hydrodynamic injection เป็นการฉีดสารโดยอาศัยความแตกต่างของความดันระหว่างปลายทั้งสองของคอลัมน์แคปิลลารี

      1.1 การให้ความดันที่ปลายด้านเข้า 25 – 100 mbar เป็นเวลา 0.5 – 5 sec

      1.2 การทำให้ปลายด้านออกของแคปิลลารีเป็นสุญญากาศ

      1.3 การยกปลายแคปิลลารีด้านเข้าให้สูงกว่าด้านออก

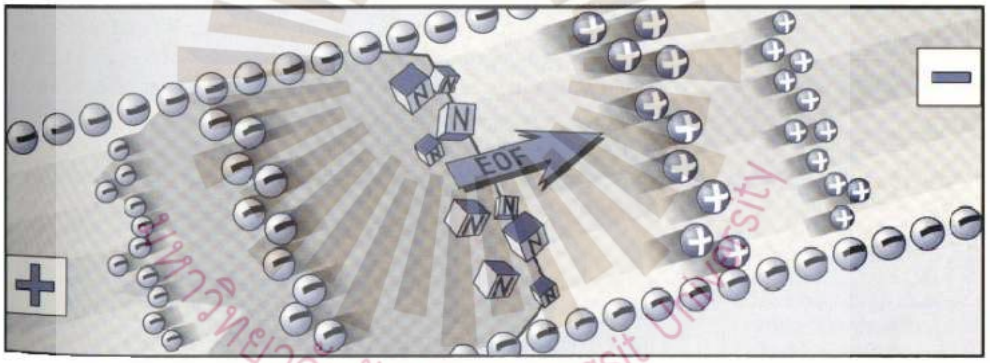
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2. Electrokinetic injection เป็นการฉีดสารโดยให้พลังงานไฟฟ้าปริมาณต่ำ (5 – 10 kV) เป็นระยะเวลาสั้น ๆ

วิธีการแยกสารโดย CE แบ่งได้ 5 ประเภท

1. Capillary zone electrophoresis (CZE)

การแยกของสารจะอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลและความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารดังแสดงในรูปที่ 5 สารจะเคลื่อนที่จากขั้วบวกไปยังขั้วลบ โดยสารที่มีประจุบวกและมีขนาดเล็กที่สุดจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน เนื่องจากมีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่า เคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกับแรงอิเล็กโทรออสโมซิสและมีแรงดึงดูดจากขั้วลบ ตามมาด้วยสารที่มีประจุบวกขนาดใหญ่ สารที่มีความเป็นกลาง สารที่มีประจุลบขนาดใหญ่ และสารที่มีประจุลบขนาดเล็ก ตามลำดับ สารที่มีประจุลบขนาดเล็กจะถูกยึดไว้ด้วยแรงจากขั้วบวกทำให้เดินทางออกมาได้ช้าที่สุด สารที่มีความเป็นกลางทางไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ออกมาได้ด้วยแรงอิเล็กโทรออสโมซิสแต่จะไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยกลไกการแยกสารชนิดนี้

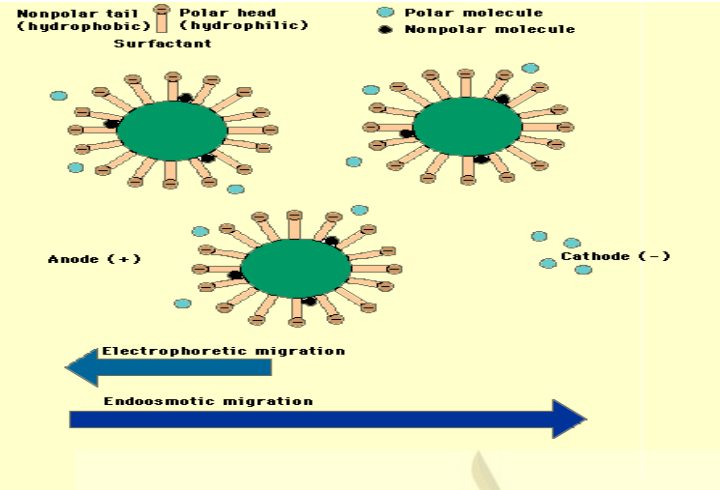


รูปที่ 5 การแยกสารโดยกลไกการแยก capillary zone electrophoresis

2. Micellar electrokinetic chromatography capillary (MECC)

การแยกของสารจะเป็นการผสมเทคนิคการแยกระหว่าง electrophoresis และ chromatography โดยจะมีการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นมากกว่า critical micelle concentration (CMC) ลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ การที่เราเติมสารลดแรงตึงผิวให้มีความเข้มข้นมากกว่าจุด CMC เพื่อการเกิด micelle ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งกลไกการแยกสารชนิดนี้สามารถแยกสารที่มีความเป็นกลางออกจากกันได้โดยอาศัยความมีขั้วและไม่มีขั้วของสาร

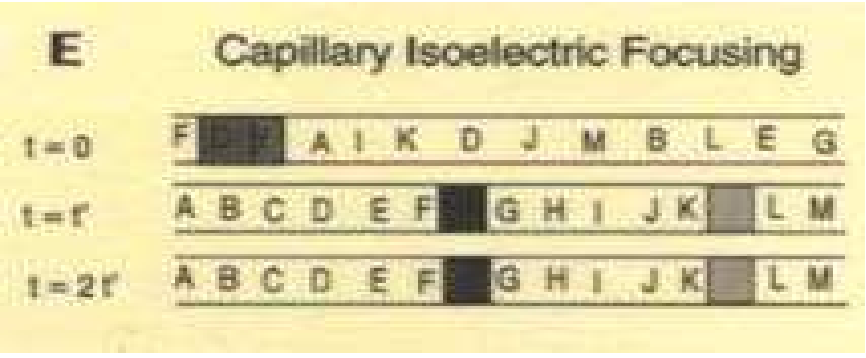
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 6 การแยกสารโดยกลไกการแยก micellar electrokinetic chromatography capillary

3. Capillary isoelectric focusing (CIEF)

เป็นการแยกสารโดยอาศัย isoelectric point (pI) ของสารแต่ละชนิดซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดของสาร นิยมใช้แยกสารจำพวกโปรตีนซึ่งจะมีค่า pI แตกต่างกันน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.005 หน่วย สามารถแยกสารได้โดยบริเวณภายในแคปิลลารีคอลัมน์จะถูกทำให้มี pH ไม่เท่ากันโดยการเติมสาร ampholyte ลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์ สาร ampholyte ในสารละลายบัฟเฟอร์จะมีความเป็นกรดและด่าง ค่า pH ต่างกันและเรียงลำดับทำให้เกิดความลาดชันของ pH (pH gradient) เมื่อให้สนามไฟฟ้าสารจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีค่า pH เท่ากับค่า pI ของสาร ซึ่งทำให้โมเลกุลอยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง (focusing) อยู่ในภาวะสมดุลทางไฟฟ้า ไม่มีกระแสไฟฟ้า ดังนั้นเมื่อให้ความดัน สารจะเคลื่อนที่ออกจากแคปิลลารีคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 7 ต้องมีการเคลือบผนังด้านในแคปิลลารีคอลัมน์เพื่อลดการรบกวนการเคลื่อนที่ของสารจากแรงอิเล็กโทรออสโมซิส



รูปที่ 7 การแยกสารโดยกลไกการแยก capillary isoelectric focusing

4. Capillary isotachophoresis (CITP)

เป็นการแยกสารโดยการทำให้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้นบนหัวแคปิลลารีคอลัมน์ โดยมีการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด โดยชนิดที่หนึ่งจะทำหน้าที่เป็น leading buffer (L) มีการนำไฟฟ้าสูงจึงอยู่ทางด้านหน้าสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดที่สองคือ terminating buffer (T) มีการนำไฟฟ้าต่ำจะอยู่ทางด้านท้ายสารละลายบัฟเฟอร์ สารจะถูกแยกโดยอาศัยความแตกต่างในการนำไฟฟ้าระหว่างสารและสารละลายบัฟเฟอร์

5. Capillary gel electrophoresis (CGE)

เป็นการแยกสารตามขนาดโมเลกุลของสาร โดยมีการเติมสาร polymer เพื่อเป็นร่างแหทำหน้าที่ในการคัดเลือกขนาดโมเลกุลสาร สารที่มีขนาดใหญ่จะไม่ถูกคัดเลือกผ่านเข้าไปในร่างแหทำให้เคลื่อนที่ออกมาจากแคปิลลารีคอลัมน์ได้ก่อน ส่วนสารที่มีขนาดเล็กจะถูกคัดเลือกให้เดินทางผ่านเข้าไปในร่างแหจึงทำให้เดินทางออกมาได้ช้า ดังแสดงในรูปที่ 8

รูปที่ 8 การแยกสารโดยกลไกการแยก capillary gel electrophoresis

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง

รายงานผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ามีหลากหลายวิธีที่ใช้นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารกรดอะมิโนดังกล่าวมาแล้วข้างต้น วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงในตารางที่ 1

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาผู้ดำเนินงานวิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำวิธี CE มาพัฒนาหาปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ lysine, proline, leucine, alanine, valine, phenylalanine, serine, glutamine, threonine, aspartic acid, glutamic acid และแอลคาลอยด์ DNJ เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกร ผู้ผลิตและผู้บริโภคต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์สารกรดอะมิโนโดยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

Compounds	CE	Buffer used	Column parameter	Separation condition	Detection wavelength	Reference
Amino acids and Peptides compounds	CZE	p-aminosalicylic acid and sodium carbonate, pH 10.2	Fused-silica, 87* 75 μm I.D.	+15 kV (normal polarity)	Indirect absorbance 254 nm	8
Amino acids	CE	p-aminosalicylic acid and DMAB, pH 11.0	Fused-silica, 83 (effective length)* 75 μm I.D.	+20 kV (+ve to-ve) , 25° C	200 – 350 nm	9
Amino acids containing tablets	CE	boric acid titrated with NaOH, pH 10.0	Fused-silica, 65* 50 μm I.D.	+24 kV (+ve to -ve) , 20° C	214 nm	10
Amino acids in serum	derivatization and CE	0.5 M sodium borate, pH 9.5	Fused-silica, 300* 75 μm I.D.	+28 kV (+ve to -ve) , 15° C	360 nm	11
Amino acids in beverage	CE	Alkanesulfonic acid with acetonitrile	Fused-silica, 100 (effective length)* 50 μm I.D.	+30 kV (+ve to -ve) , 25° C	185 nm	12

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วัตถุประสงค์ของโครงการ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกรดอะมิโนบางชนิด ในใบหม่อน และชาใบหม่อน เนื่องจากใบหม่อนมีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาหลายประการ ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยมีการผลิตชาจากใบหม่อนจำหน่ายกันมาก และกำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภค

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์และหาปริมาณกรดอะมิโน ในใบหม่อนและชาใบหม่อน โดยใช้วิธี capillary electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำได้ เป็นวิธีที่ประหยัด สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้เมื่อทราบปริมาณกรดอะมิโน แล้วสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาทางการเกษตร และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

เครื่องมือวิจัย

ตารางที่ 2 รายชื่อเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	ผู้ผลิต
Capillary electrophoresis instrument (^{3D}CE)	Hewlett-Packard, Germany
Capillary tubing	Polymicro Technologies, USA
Vortex Mixer (Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Ultrasonic Bath (D-7700)	Elma, Singen, West Germany
pH Meter (CG840)	Schott Gerate, Hofheim, Germany
Analytical Balance (AT201)	Mettler, Greifensee, Switzerland
Moisture Analyzer (MA30)	Sartorius, Goettiingen, Germany

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

ตารางที่ 3 รายชื่อสารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

ชื่อสาร	เกรด	ผู้ผลิต
Lysine	AR	Sigma, USA
Phenylalanine	AR	Sigma, USA
Proline	AR	Sigma, USA
Serine	AR	Sigma, USA
Leucine	AR	Sigma, USA
Alanine	AR	Sigma, USA
Valine	AR	Sigma, USA
Glutamine	AR	Sigma, USA
Threonine	AR	Sigma, USA
Aspartic acid	AR	Sigma, USA
Glutamic acid	AR	Sigma, USA
1-deoxynojirimycin HCl	AR	Sigma, USA
p-aminosalicylic acid	AR	Sigma, USA
Methanol	HPLC	Merck, Germany
Sodium hydroxide	AR	Merck, Germany
Deionized distilled water	-	Rangsit University
Buffer pH 7.0	-	Merck, Germany
Buffer pH 10.0	-	Merck, Germany
Membrane filter (cellulouse acetate, 0.2 μm, 13 mm diameter)	-	Satorious, Germany

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิธีการวิจัย

1. <u>คุณลักษณะของเครื่องมือ</u>

Mode of capillary electrophoresis: Capillary zone electrophoresis (CZE)

Instrument: Hewlett Packard 3D system (model G1600A)

Computer: HP pentium 4 (Window NT 4.0)

Software: Agilent ChemStation Plus software version A.08 (G1601A)

Printer: HP laserjet 4100

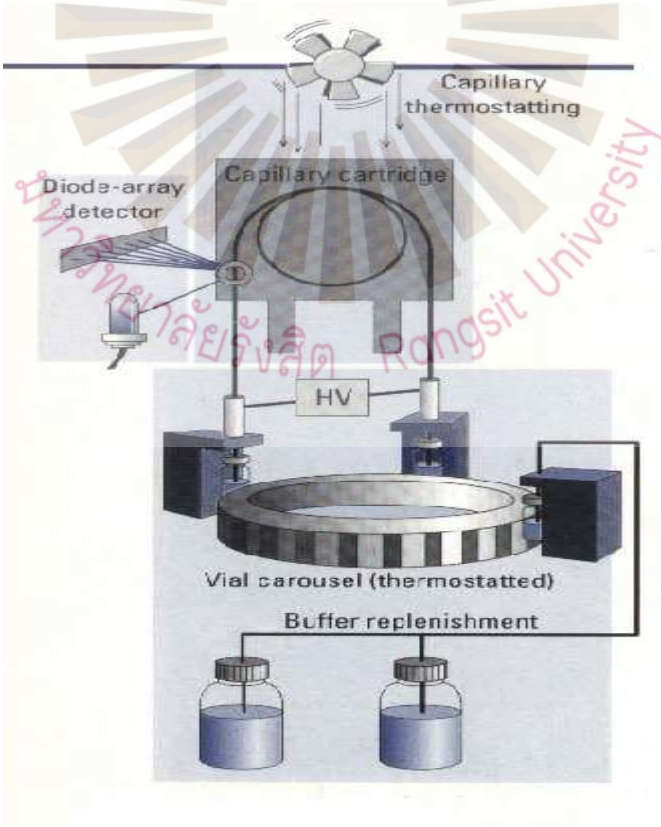
Detector: a diode array detector (wavelength 254 nm, band width 4 nm)

Voltage: 15 kV (current 0-100 μA)

Temperature: 25 °C

Capillary tube: 75 μm I.D. x 76.5 cm

Injection system: using 50 mbar pressure x 10 sec



รูปที่ 9 เครื่องมือ capillary electrophoresis

2. ขั้นตอนการทำงานทั่วไป

การแยกสารทำบนคอลัมน์แคปิลลารีความยาวทั้งหมด (total length) 85.0 ซม ความยาวจาก inlet ถึง detector (effective length) 76.5 ซม เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 75 ไมครอน การทำความสะอาดคอลัมน์ก่อนการวิเคราะห์และระหว่างการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4 การฉีดสารทำโดยการให้ความดัน 50 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 10 วินาทีจากด้านขั้วอาโนด การตรวจวัดสารทำโดยการวัดการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรที่ด้านคาโทด

ตารางที่ 4 การทำความสะอาดคอลัมน์

ขั้นตอน	ระยะเวลา	สารละลาย
New capillary		
Rinse 1	10 min	1 M NaOH
Rinse 2	5 min	Deionized water
Rinse 3	10 min	0.1 M NaOH
Rinse 4	10 min	Deionized water
Rinse 5	10 min	Background electrolyte
Between run		
Rinse 1	2 min	0.1 M NaOH
Rinse 2	5 min	Deionized water
Rinse 3	3 min	Background electrolyte

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard preparation)

สารละลาย stock standard solutions กรดอะมิโนและอัลคาลอยด์ DNJ ได้แก่ lysine, proline, leucine, alanine, valine, phenylalanine, serine, glutamine, threonine, aspartic acid, glutamic acid และอัลคาลอยด์ DNJ เตรียมโดยการละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดใน methanol ให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บในตู้เย็น 8-10°C

สารละลาย working standard solution เตรียมโดยการเจือจางจาก stock standard solutions ให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายผสมของสารละลายมาตรฐานเตรียมโดยการนำ stock standard solution ของแต่ละตัวมาผสมกันให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ working standard solution

สารละลายบัฟเฟอร์เตรียมโดยใช้สารละลาย p-aminosalicylic acid ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลลาร์และสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ ที่ pH 10.2

4. <u>การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (Method development)</u>

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการแยกสารกรดอะมิโนและ DNJ ได้แก่ ผลของความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ อุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารพิจารณาจากเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร (migration time, t_m) ความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า (apparent mobility, μ_a) และความสามารถในการแยกสาร (resolution, R_s) ซึ่งคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$\mu_a = l / t E = l L / t V$$

Where: $\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$

V - applied voltage (V)

l - effective capillary length (to the detector) (cm)

L - total capillary length (cm)

t - migration time (min)

E - electric field (V/cm)

4.1 ผลของความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

ความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีผลกระทบโดยตรงต่อค่าการไหลของอิเล็กโทรออสโมติกซึ่งมีผลกระทบต่อเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร ในการศึกษานี้ใช้ boric acid เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ในช่วงความเข้มข้น 8 - 10 มิลลิโมลาร์และพีเอช 10.2 – 10.4

4.2 ผลของอุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า

อุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อเวลาและความเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร ในการศึกษานี้ได้ปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ในช่วง 20 -30 องศาเซลเซียส และความต่างศักย์ไฟฟ้าในช่วง 10 - 20 กิโลโวลต์

5. <u>การประเมินวิธี (Method validation)</u>

5.1 ความสัมพันธ์เส้นตรง (Linearity)

ความสัมพันธ์เส้นตรงศึกษาโดยวิธี external standard โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน ความเข้มข้น 60 - 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความสัมพันธ์เส้นตรงคำนวณจาก linear regression และ correlation coefficient (r^2) โดย Microsoft Excel version ซึ่งควรมีค่า r^2 มากกว่าหรือเท่ากับ 0.990

5.2 ความแม่นยำ (Precision)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ประเมินจากความแม่นยำของการฉีดสาร โดยคำนวณจาก percentage of relative standard deviation (%RSD) ซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ ดังสมการต่อไปนี้

$$\%\ RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

เมื่อ SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ย

ความแม่นยำในการฉีดสารทำได้โดยประเมินจาก

(1) ความแม่นยำในการฉีดสาร (Injection precision)

ศึกษาโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (standard addition) เป็นจำนวน 6 ครั้ง ติดต่อกัน

(2) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียว (Intra-day precision) และต่างวันกัน (Inter-day precision)

ศึกษาโดยการเตรียมตัวอย่างสารสกัดใบหม่อนและชาใบหม่อน จำนวน 10ตัวอย่าง และฉีดตัวอย่างละ 3ครั้ง และวิเคราะห์ในวันเดียวกัน ส่วนความแม่นยำในการวิเคราะห์ระหว่างวันศึกษาโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดใบหม่อนใน 6 วันที่แตกต่างกันและฉีดตัวอย่างละ 3 ครั้ง

(3) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ spiked sample

ศึกษาโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 80 100 และ 120 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร (standard addition) แต่ละความเข้มข้นเป็นจำนวน 3 ครั้ง

5.3 ความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีประเมินโดย standard addition method โดยการเติมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนลงในตัวอย่างในปริมาณ 80 - 120 % ของปริมาณเคอเซตินที่พบในตัวอย่าง ความถูกต้องของวิธีคำนวณจาก % recovery ควรมีค่า 98.0 – 102.0 % ซึ่งสามารถคำนวณจากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{X_{found} \times 100}{X_{added}}$$

เมื่อ X_{found} = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่พบในสารตัวอย่าง

X_{added} = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในสารตัวอย่าง

5.4 ลิมิตการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ลิมิตการตรวจวัดคือความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งวิธีสามารถตรวจวัดได้โดยพิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างสัญญาณและสัญญาณรบกวน (signal to noise, S/N) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3

ลิมิตการวิเคราะห์คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งวิธีสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างถูกต้องโดยพิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างสัญญาณและสัญญาณรบกวน (signal to noise, S/N) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10

6. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน (arginine) ในสารสกัดใบหม่อน และชาใบหม่อน</u>

แหล่งที่มาของใบหม่อนและชาใบหม่อน

แหล่งปลูก: จังหวัดอุดรธานี

พันธุ์: บุรีรัมย์ 60

อายุใบ: ยอด ใบอ่อน และใบแก่

ทำได้โดยการชั่งใบหม่อนอบแห้งที่บดละเอียดจำนวน 10 กรัม reflux ในน้ำเดือดครึ่งชั่วโมง กรองแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ภายใต้สภาวะที่พัฒนาขึ้น

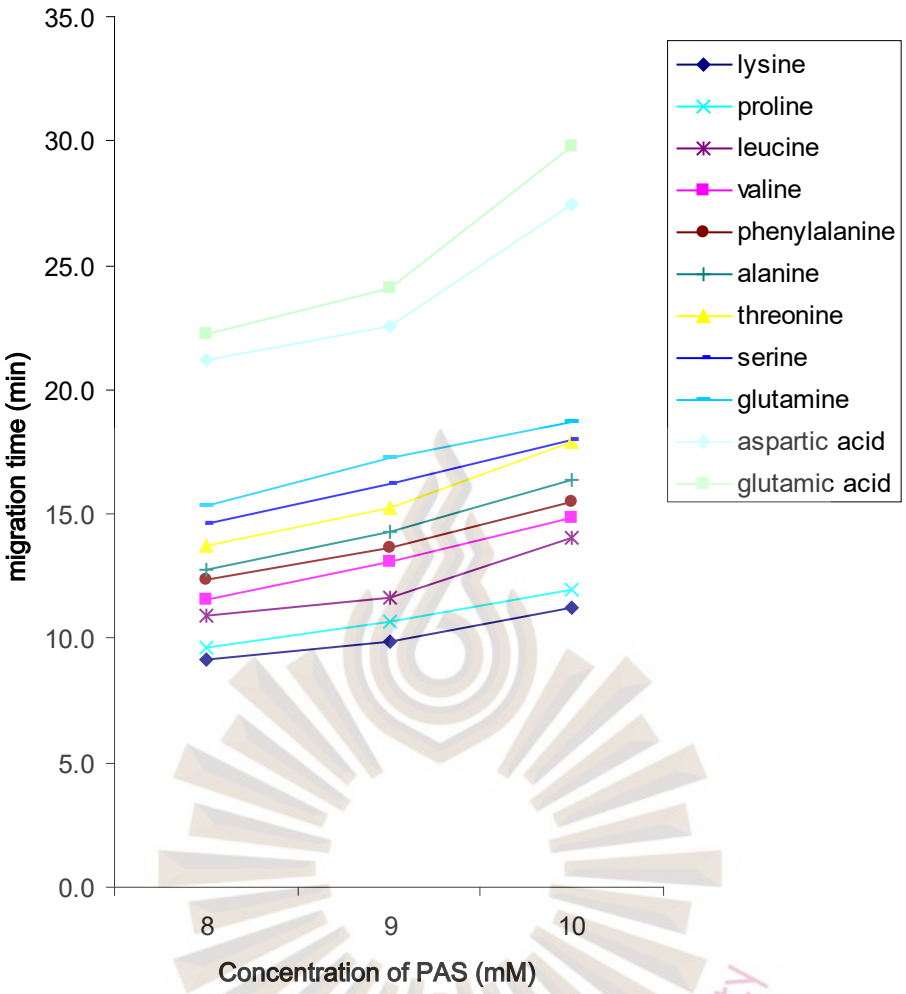
บทที่ 3
ผลการวิจัยและบทวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการแยกสารกรดอะมิโนและ DNJ ได้แก่ ผลของความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ อุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารพิจารณาจากเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร (migration time, t_m) ความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า (apparent mobility, μ_a) และความสามารถในการแยกสาร (resolution, R_s)

ผลของความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

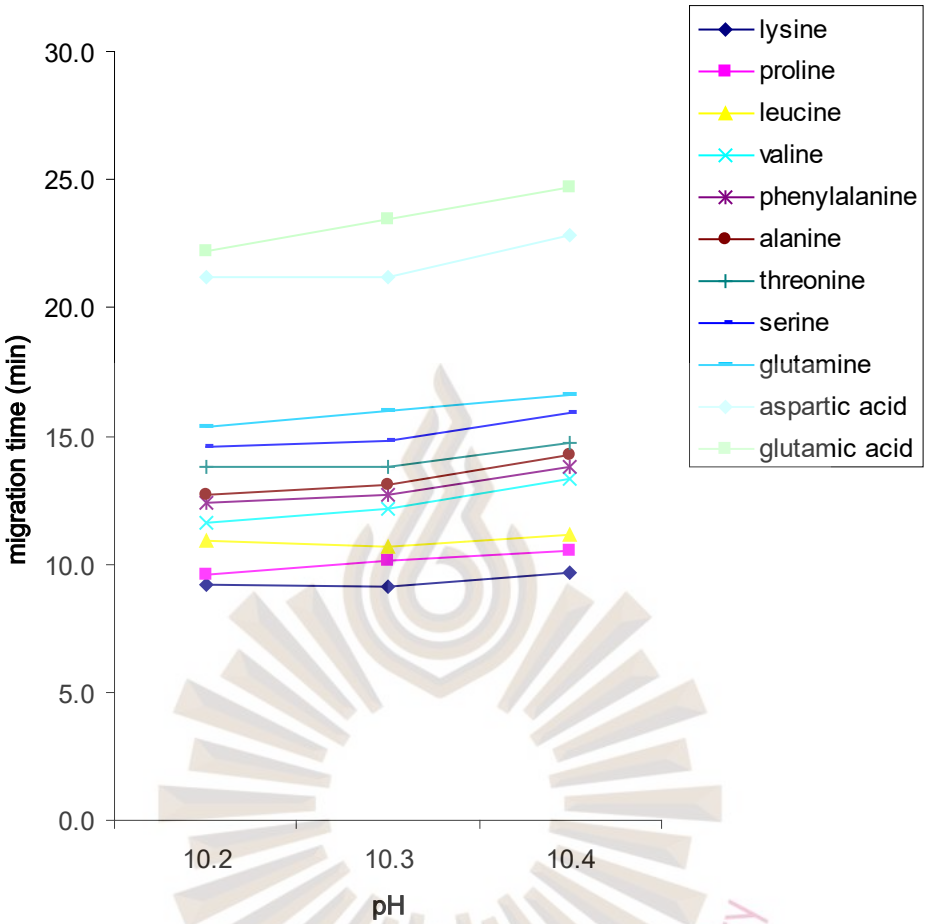
ความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือ ionic strength มีผลอย่างมากต่อเวลาในการเคลื่อนที่ เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการไหลออสโมติก การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ลดการไหลออสโมติก migration window เพิ่มขึ้นและทำให้เวลาในการเคลื่อนที่ของสารเพิ่มขึ้น (13) ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มความหนาของ diffusion of double-layer ที่ผนังด้านในของคอลัมน์แคปิลลารี เป็นผลให้ประสิทธิภาพการแยกของสารเพิ่ม

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในช่วง 8 - 10 มิลลิโมลาร์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ *p*-aminosalicylic acid ทำให้ migration time เพิ่มขึ้น เนื่องจากการไหลออสโมติก ลดลง พบว่า migration time ของสารที่ศึกษาทุกตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย *p*-aminosalicylic acid โดยที่ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ใช้เวลาในการเคลื่อนที่ของสาร 24 นาที ที่ความเข้มข้น 9 มิลลิโมลาร์ ใช้เวลา 26 นาที และที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่กว่า 30 นาที นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้ามาก เนื่องจากความร้อน Joule's heating ทำให้เกิด spiking peak ดังนั้นที่ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ จึงมีความเหมาะสมมากที่สุดเนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการแยกสารสูงสุดและใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น (24 นาที)



รูปที่ 10 ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ *p*-aminosalcylic acid ที่ pH 10.2 ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

พี เอช มีผลต่อประสิทธิภาพและลำดับในการแยกสาร ผลดังกล่าวขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารตัวอย่าง และ mode ของแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่เลือกใช้ ในการวิเคราะห์โดย CZE พี เอช ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีผลโดยตรงต่อการแยกของสาร คือการไหลออสโมติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อพี เอช เพิ่มขึ้น (14) จากการศึกษาผลของพี เอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในช่วงพี เอช 10.2 – 10.4 พบว่าที่พี เอช 10.2 จึงเป็นพี เอชที่เหมาะสมที่ให้ประสิทธิภาพในการแยกสารสูงสุดและใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น



รูปที่ 11 ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลง pH ที่ความเข้มข้นของ *p*-aminosalcylic acid 8 mM ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

	Migration time (min)								
	8 mM PAS			9 mM PAS			10 mM PAS		
pH	10.2	10.3	10.4	10.2	10.3	10.4	10.2	10.3	10.4
Lysine	9.184	9.152	9.633	9.869	11.438	9.371	11.209	11.266	10.234
Proline	9.600	10.158	10.520	10.660	11.676	10.176	11.937	12.612	10.627
Leucine	10.881	10.641	11.174	11.673	12.948	10.742	14.043	13.471	11.214
Valine	11.590	12.119	13.357	13.095	13.864	12.454	14.869	15.331	12.547
Phenylalanine	12.356	12.679	13.789	13.607	14.698	13.065	15.528	16.685	12.894
Alanine	12.735	13.062	14.262	14.249	15.917	13.767	16.344	17.150	13.861
Threonine	13.759	13.818	14.762	15.222	18.180	14.735	17.869	17.224	14.679
Serine	14.573	14.775	15.874	16.212	19.544	15.558	17.955	17.266	15.218
Glutamine	15.346	15.936	16.568	17.266	22.016	15.999	18.737	24.334	16.127
Aspartic acid	21.185	21.232	22.799	22.568	24.756	21.385	27.474	25.797	20.056
Glutamic acid	22.221	23.493	24.700	24.071	26.784	22.781	29.786	29.980	21.138

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

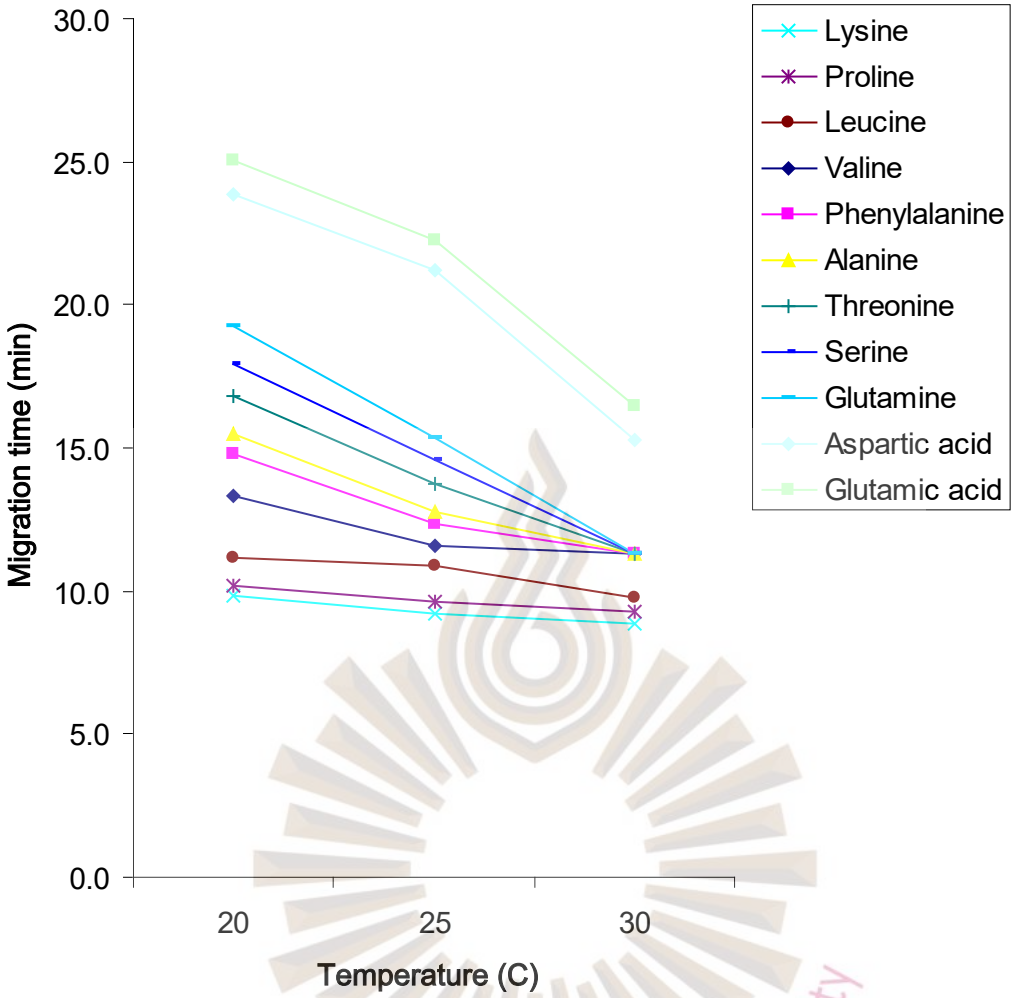
ผลของอุณหภูมิและความต่างศักย์

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางเครื่องมือที่มีผลโดยตรงต่อเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร เนื่องจากมีผลต่อความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์และการไหลออสโมติก (15) การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความหนืดลดลงกระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น การไหลออสโมติกเพิ่มขึ้น และทำให้การเคลื่อนที่ของสารเร็วขึ้น ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิเป็นการทำให้เวลาในการเคลื่อนที่ของสารลดลง จากผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้เวลาในการเคลื่อนที่ของสารลดลง ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์แยกสารคือ 25 องศาเซลเซียส

ตาราง ที่ 6 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าและอุณหภูมิต่อความต่างศักย์

	ความต่างศักย์ไฟฟ้า (kV)			อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	10	15	20	20	25	30
Lysine	9.863	9.184	9.152	9.835	9.184	8.885
Proline	10.454	9.600	9.258	10.204	9.600	9.271
Leucine	11.327	10.881	10.341	11.164	10.881	9.800
Valine	13.851	11.590	11.119	13.357	11.590	11.293
Phenylalanine	14.247	12.356	11.672	14.789	12.356	11.293
Alanine	15.921	12.735	11.962	15.469	12.735	11.293
Threonine	16.321	13.759	12.824	16.822	13.759	11.293
Serine	17.584	14.573	13.725	17.924	14.573	11.293
Glutamine	18.206	15.346	14.437	19.251	15.346	11.293
Aspartic acid	24.583	21.185	17.136	23.829	21.185	15.303
Glutamic acid	26.490	22.221	18.523	25.042	22.221	16.458

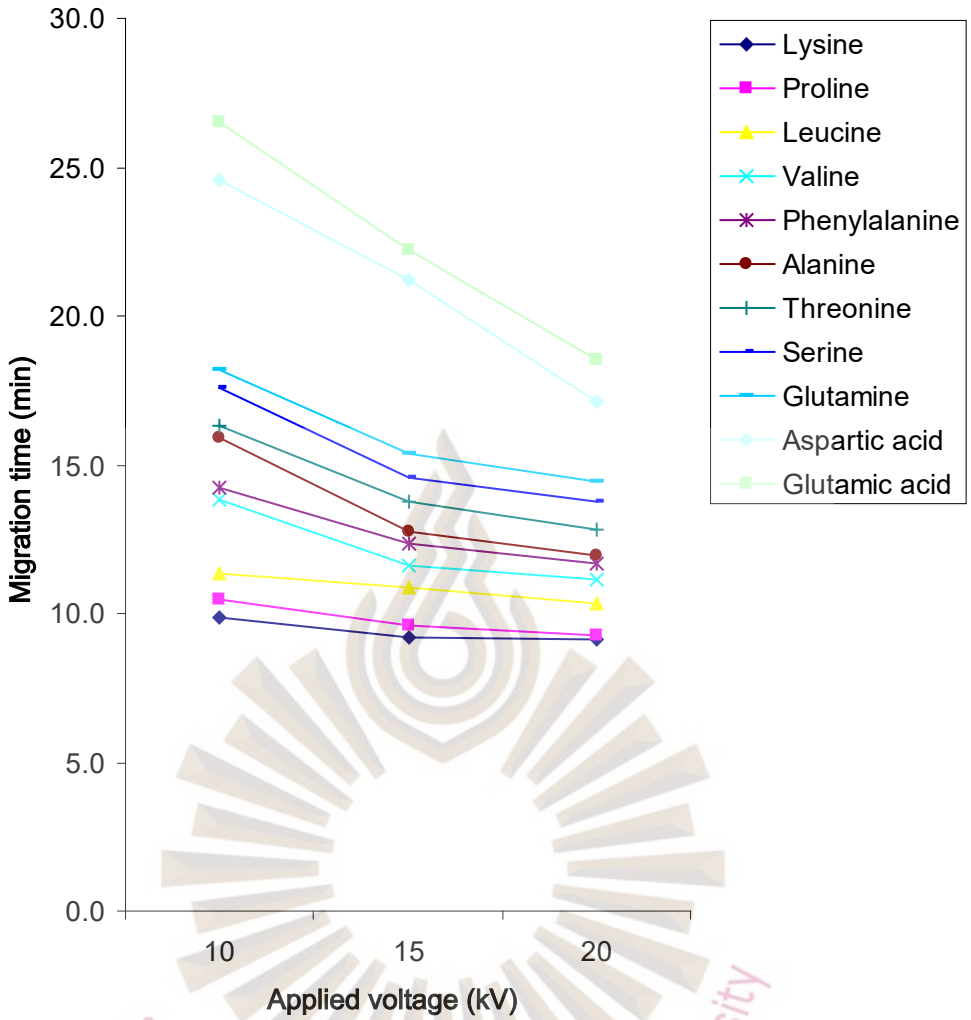
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 12 ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ pH 10.2 ความเข้มข้นของ *p*-aminosalcylic acid 8 mM และความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์

ความต่างศักย์ไฟฟ้ามีผลโดยตรงต่อค่าการไหลออสโมติกและความเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร การเพิ่มศักย์ไฟฟ้าทำให้เวลาในการวิเคราะห์สั้นลง เนื่องจากการไหลออสโมติกและความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารเพิ่มขึ้น (15) การเพิ่มศักย์ไฟฟ้าในการวิเคราะห์นี้นอกจากจะทำให้เวลาในการวิเคราะห์สั้นลงแล้วยังทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูงขึ้นเนื่องจาก Joule's heating จากการศึกษาพบว่าการให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 25 กิโลโวลต์ เป็นการทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูงเกินขีดจำกัดของเครื่องมือ ส่วนการศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 10, 15 และ 20 กิโลโวลต์พบว่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์แยกสารคือ 15 กิโลโวลต์

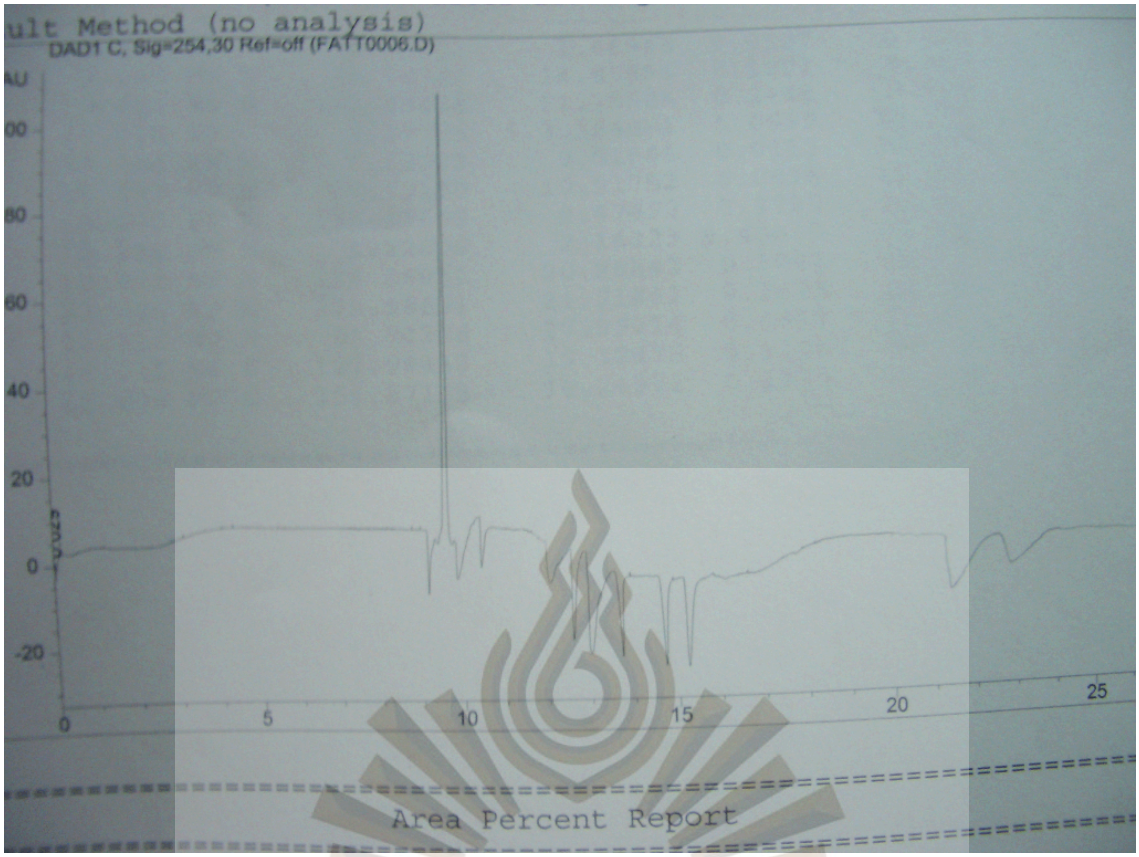
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 13 ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้า อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ pH 10.2 ความเข้มข้นของ *p*-aminosalcylic acid 8 mM

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์แยกกรดอะมิโน (lysine, proline, leucine, alanine, valine, phenylalanine, serine, glutamine, threonine, aspartic acid, glutamic acid) คือ ความเข้มข้นของ *p*-aminosalicylic acid 8 มิลลิโมลาร์ ที่ พี เอช 10.2 โดยใช้คอลัมน์แคปิลลารี (fuse-silica) ที่ความยาว 76.5 เซนติเมตร (effective length) เส้นผ่าศูนย์กลางภายในของคอลัมน์แคปิลลารีเท่ากับ 75 ไมครอน ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้อิเล็กโทรฟีโรแกรมที่เหมาะสมดังรูปที่ 14

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



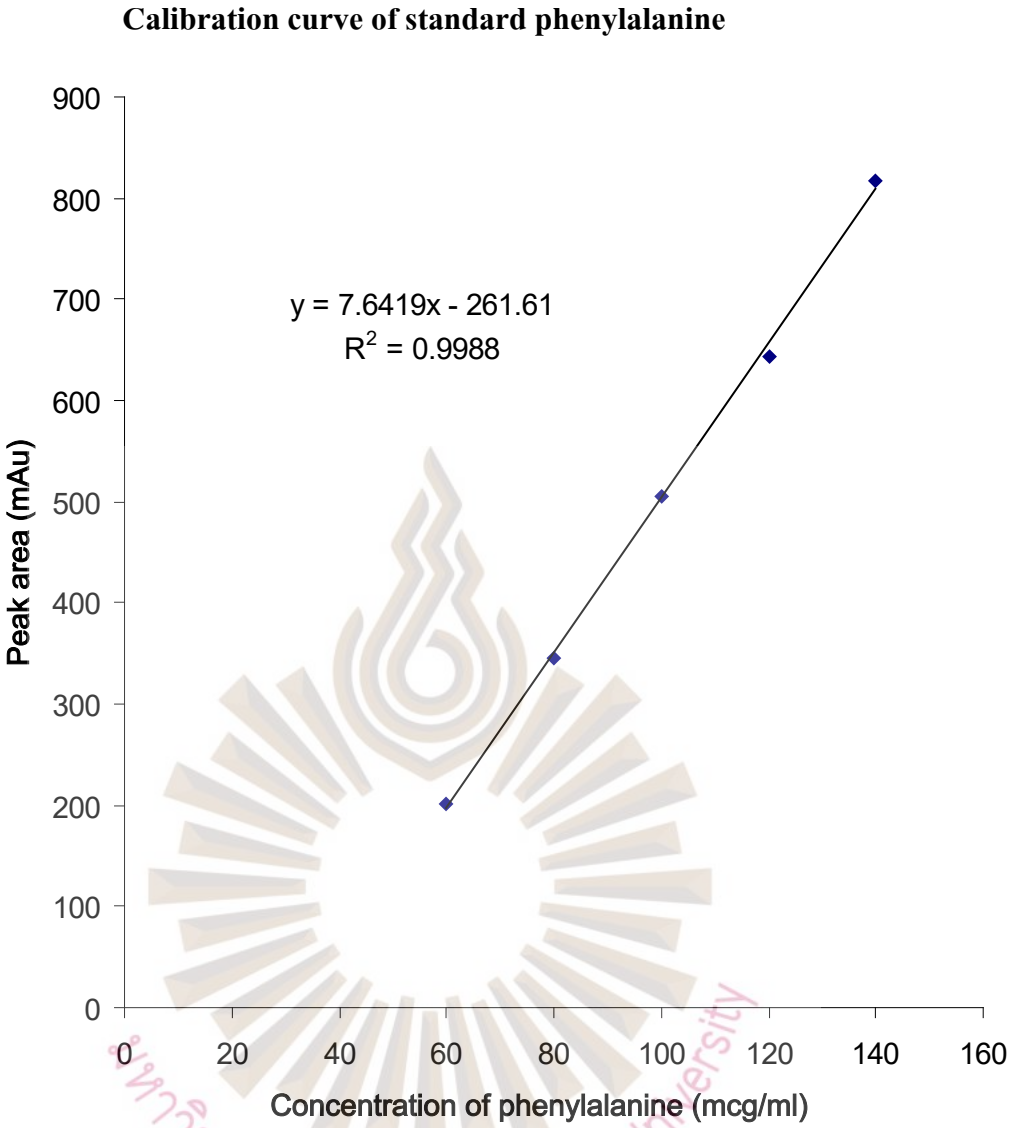
รูปที่ 14 สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์แยกกรดอะมิโน 11 ชนิด

การประเมินวิธี

1. ความสัมพันธ์เส้นตรง (Linearity)

ความสัมพันธ์เส้นตรงศึกษาได้โดยวิธี external standard method จากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์เส้นตรงที่ดีในช่วง 60 – 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสมการเส้นตรงคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของพีกของ standard phenylalanine คือ y = 7.6419 x – 261.61 (R^2 = 0.9988) ดังรูปที่ 15

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของ standard phenylalanine

2. ความแม่นยำ (Precision)

ความแม่นยำในการฉีดสาร (n = 6) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาร phenylalanine มีค่า % RSD เท่ากับ 0.69 เปอร์เซ็นต์

ความแม่นยำของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันจำนวน 10 ตัวอย่าง (n = 10) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า % RSD เท่ากับ 1.09 เปอร์เซ็นต์

ความแม่นยำของการวิเคราะห์ต่างวันกันเป็นเวลา 6 วัน (n = 6) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาร phenylalanine มีค่า % RSD เท่ากับ 1.14 เปอร์เซ็นต์

ความแม่นยำของการฉีด spiked sample ที่ความเข้มข้นของ standard added 80, 100 และ 120 เปอร์เซ็นต์ (n = 6) มีค่า % RSD เท่ากับ 0.75-0.77 เปอร์เซ็นต์

3. ความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้องหาของวิธีวิเคราะห์คำนวณจาก percent recovery โดยใช้วิธี standard addition method โดยการเติม standard amino acid ลงไปในสารละลายตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น 80-120 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละความเข้มข้นทำการฉีดสารเป็นจำนวน 6 ครั้ง ได้ค่า percent recovery เท่ากับ 99.1-101.6 เปอร์เซ็นต์

4. ลิมิตการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quatitation, LOQ)

ลิมิตรการตรวจวัดทำได้โดยลดความเข้มข้นของสาร amino acid ลงในช่วง 100-0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลิมิตการตรวจวัดคำนวณจากค่า signal to noise ratio มีค่าเท่ากับ 3 และลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณคำนวณจากค่า signal to noise ratio มีค่าเท่ากับ 10 พบว่าจากการศึกษาค่าที่ได้เท่ากับ 0.36 และ 2.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมี %RSD ของลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 1.80 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์หาปริมาณ กรดอะมิโนในใบหม่อนและชาใบหม่อน

ทำได้โดยการชั่งใบหม่อนอบแห้งที่บดละเอียดจำนวน 10 กรัม reflux ในน้ำเดือดครึ่งชั่วโมง และวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นพบ ปริมาณกรดอะมิโนที่พบมีปริมาณน้อยมากและไม่พบสาร DNJ ในใบหม่อน ทำให้สามารถเลือกหาปริมาณกรดอะมิโนได้เป็นบางตัวอย่างเท่านั้น ในงานวิจัยนี้หาปริมาณ phenylalanine ในใบหม่อน และ ชาใบหม่อนส่วนที่เป็นยอดจะมีกรดอะมิโนสูงสุด มีค่าเท่ากับ 629.99และ 449.32mg ต่อ100g ในตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และ เมื่อทำการหาความชื้นในใบหม่อนโดยใช้เครื่อง Sartorius MA 30 moisture analyzer ค่าเฉลี่ยของ % moisture content เท่ากับ 10.3 % โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 1.98 % และ 1.58 % ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ปริมาณ phenylalanine ที่พบในตัวอย่างใบหม่อนและชาใบหม่อน

	ใบหม่อน			ชาใบหม่อน		
ตัวอย่าง	ยอด	ใบอ่อน	ใบแก่	ยอด	ใบอ่อน	ใบแก่
1	604.52	589.33	521.35	448.45	417.72	328.72
2	628.37	563.78	532.82	448.58	423.48	325.99
3	642.91	583.92	534.88	457.32	428.62	334.41
4	638.24	578.31	525.96	442.96	413.78	338.25
5	626.56	563.57	543.65	458.91	422.55	339.04
6	637.22	574.94	530.55	452.72	419.81	328.09
7	612.58	555.56	504.34	434.27	412.67	322.33
8	634.43	579.29	532.92	452.42	428.24	326.48
9	635.42	562.21	525.37	446.36	437.16	324.59
10	639.67	563.41	531.81	449.32	423.38	337.62
Mean	629.99	571.43	528.37	449.13	422.74	330.55
SD	12.46	11.15	10.41	7.10	7.37	6.20
%RSD	1.98	1.95	1.97	1.58	1.74	1.88

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกรดอะมิโน (lysine, proline, leucine, alanine, valine, phenylalanine, serine, glutamine, threonine, aspartic acid และ glutamic acid) ด้วยวิธีแคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยการศึกษาปัจจัยของ ความเข้มข้นและพีเอชของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ อุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า พบสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารทั้ง 11 ชนิด ดังนี้

Capillary electrophoretic condition:

Capillary tubing	: fused silica 75 μm x 85 cm (effective length 76.5 cm)
Electrolyte	: 10 mM p-aminosalicylic acid and 2 mM sodium carbonate, pH 10.2
Oven Temperature	: 25° C
Applied voltage	: +15 kV
Injection	: pressure 50 mbar for 10 sec
Detector	: UV 254 nm

การประเมินวิธีวิเคราะห์นี้พบว่ามีความสัมพันธ์เส้นตรงในช่วง 60 - 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสมการเส้นตรงคำนวณจากอัตราส่วนของความสูงของพีก ดังนี้ $y = 7.6419 x – 261.61$ (R^2 = 0.9988) ความแม่นยำในการฉีดสาร (n = 6) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาร quercetin spiked sample มีค่า % RSD เท่ากับ 0.69 เปอร์เซ็นต์ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันจำนวน 10 ตัวอย่าง (n = 10) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า % RSD เท่ากับ 1.09 เปอร์เซ็นต์ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ต่างวันกันเป็นเวลา 6วัน(n = 6) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาร quercetin spiked sample มีค่า % RSD เท่ากับ 1.14 เปอร์เซ็นต์ ความแม่นยำของการฉีด spiked sample ที่ความเข้มข้นของ standard added เป็น 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ (n = 6) มีค่า % RSD เท่ากับ 0.75-0.77 เปอร์เซ็นต์ ความถูกต้องคำนวณจาก percent recovery โดยวิธี standard addition method โดยการเติม standard quercetin ลงไปในสารละลายตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น 80 - 120 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละความเข้มข้นทำการฉีดสารเป็นจำนวน 6 ครั้ง ได้ค่า percent recovery เท่ากับ 99.1-101.6 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นพบ ปริมาณกรดอะมิโนที่พบมีปริมาณน้อยมากและไม่พบสาร DNJ ในใบหม่อน ทำให้สามารถเลือกหาปริมาณกรดอะมิโนได้เป็นบางตัวอย่างเท่านั้น ในงานวิจัยนี้หา

ปริมาณ phenylalanine ในใบหม่อน และ ชาใบหม่อนส่วนที่เป็นยอดจะมีกรดอะมิโนสูงสุด มีค่าเท่ากับ 629.99และ 449.32mg ต่อ100g ในตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และ เมื่อทำการหาความชื้นในใบหม่อนโดยใช้เครื่อง Sartorius MA 30 moisture analyzer ค่าเฉลี่ยของ % moisture content เท่ากับ 10.3 % โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 1.98 % และ 1.58 % ตามลำดับ

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเป็นงานวิจัยใหม่ที่สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน ในตัวอย่างสารสกัดใบหม่อนและชาใบหม่อน โดยใช้แคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยวิธี external standard method ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และประหยัด นอกจากนี้ยังมีความถูกต้องและแม่นยำสูง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เอกสารอ้างอิง

1. เอมอร โสมนะพันธุ์ หม่อน (Mulberry) จุลสารข้อมูลสมุนไพร. 17(3):12-19.
2. Chen J, Nakashima N, Kimura I, Kimura M, Asano N and Ko S. Potentiating effects on pilocarpine-induced saliva secretion by extracts and N-containing sugars derived from Mulberry leaves, on streptozocin-diabetic mice. Biol. Pharm. Bull, 1995, 18(12):1676-1680.
3. วิโรจน์ แก้วเรือง ชาหม่อน โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพ 2541. หน้า 28-36.
4. วุฒิ วุฒิธรรมเวช เภสัชกรรมไทยรวมสมุนไพร โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮาส์ พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพ 2540.
5. Shimizu T, Yazawa M and Takeda N. Aromatic amino acids in the leaves of Morus alba and their possible medicinal value. Sericologia, 1992, 32(4):633-636.
6. Mahan LK, Sylvia ES. Krause's Food, Nutrition, and Diet Therapy. 9th ed, W.B. Saunders company London, 1996: 63-76.
7. Stead DA. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. J Chromatogr B, 2000, 747: 69-93.
8. Gordana Z, Zorana J-I, Miodrag C, et al. Optimization of a free separation of 30 free amino acids and peptides by capillary zone electrophoresis with indirect absorbance detection: a potential for quantification in physiological fluids. J Chromatogr B, 2002, 772: 19-33.
9. Y.-H, Lee, T.-I. Capillary electrophoresis determination of amino acids improvement by cyclodextrin additive. J Chromatogr A, 1995, 716; 335-346.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

10. Malgorzata J, Zofia S, Malgorzata W. Development of a capillary electrophoretic method for the analysis of amino acids containing tabletes. J Chromatogr A, 2003, 993; 165-172.

11. Zujun S, Zimin S, Lin W. Rapid method for the determination of amino acids in serum by capillary electrophoresis. J Chromatogr A, 2002, 979; 227-232.

12. Christian W.K, Wolfgang B, Martin T. Determination of underivatized amino acids in beverage samples by capillary electrophoresis. J Chromatogr A, 1998, 804; 349-355.

13. Cherkaoui S, Mateus L, Christen P, Venthey JL. Validated capillary electrophoresis method for the determination of atropine and scopolamine derivatives in pharmaceutical formulations. J Pharm Bio Anal 1998;17:1167-1176.

14. Haleem J, Issaq. Capillary elctrophoresis of natural products. Electrophoresis 1997;18:2438-2452.

15. Bjergegard C, Michaelsen S, Sorensen H. Determination of phenolic carboxylic acids by micellar electrokinetic capillary chromatography and evaluation of factors affecting method. J Chromatogr 1992;608:403-411.

16. Miller JN, Miller JC. Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 4th ed. Pearson Education, London, 2000.

17. Finkelson MJ. Validation of analytical method by FDA labolatories. Pharm Tech, 1986, March: 75-84.

18. Jenke DR. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures.l.general concepts and guidelines. J Liq Chrom & Rel Technol, 1996, 19(5): 719-736.

ชีวประวัติการศึกษา

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเสาวภาคย์ เกษมสุข
วัน-เดือน-ปี เกิด	28 กุมภาพันธ์ 2519
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
การศึกษา	เภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยรังสิต เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล
การทำงาน	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University