บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุ

1. พืชทดลอง

ผลลำโพงกาสลัก (Datura metel Linn.) จากสวนสมุนไพรสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม

2. แบคทีเรียทดลอง

แบคทีเรีย Agrobacterium rhizogenes สายพันธุ์ A4 8196 R1000 และ 15834 จาก Dr. Hiroshi Kamada Gene Experiment Center, Institute of Biological Science , University of Tsukuba , Japan

3. สารเคมี แบ่งเป็น 3 ส่วน

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.1.1 สารเคมีตามสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่สูตร MS (1962) สูตร B5(1968) และสูตร White(1963) และวุ้น ชนิดมาตรฐานทำยา

3.1.2 สารเคมีที่ทำให้ปลอดเชื้อ ได้แก่ 95% ethyl alcohol และ carbenicillin

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ bacto beef extract peptone yeast extract sucrose และวุ้นมาตราฐานทำยา

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาและวิเคราะห์หาปริมาณtropane alkaloid

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยก tropane alkaloid ได้แก่ chloroform, methyl alcohol , ammonium hydroxide และ sulfuric acid

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC

ได้แก่ silica gel G , chloroform , methyl alcohol , ammonium hydroxide , acetone , ethyl acetate , isopropanol , diethylamine และ atropine standard reference

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอลคาลอยด์ด้วยวิธี HPLC ได้แก่ sodium 1-heptane sulfonate , methyl alcohol และ atropine standard reference

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 100 มิลลิลิตร สูง 8 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร พร้อมฝาชนิดใส และเครื่องแก้วมาตรฐานอื่น ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.2 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยชั้นมืด และชั้นสว่าง ชั้นสว่างใช้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ของ Phillips TL 40 W/33 ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส

1.3 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ หม้อนึ่งอัดความดัน เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดหยาบและชนิดละเอียด ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อชนิด laminar flow เครื่องเขย่าชนิด reciprocal ตู้อบแห้ง เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง และเครื่องมือมาตรฐานอื่น ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2. อุปกรณ์ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

2.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวด vial สำหรับเลี้ยงเชื้อ ขนาด 5 และ 35 มิลลิลิตร และขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิเมตร และเครื่องแก้วมาตรฐานอื่น ๆ เช่นเดียวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่เครื่องมือมาตรฐานเช่นเดียวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3. อุปกรณ์ในการตรวจหา และวิเคราะห์หาปริมาณ tropane alkaloid

3.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ เครื่องแก้วมาตรฐานที่ใช้ในการสกัดสารตามวิธีทาง

เคมี และเครื่องแก้วมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์แอลคาลอยด์ด้วยวิธี TLC และ HPLC

3.2 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ เครื่อง HPLC รุ่น 510 ระบบส่งตัวทำละลายของ Walters เครื่อง Detect HPLC รุ่น 484 ของ Walters เครื่องรายงานผล HPLC รุ่น 745/745 B ของ Walters เครื่อง ultrasonic bath เครื่องทำให้ระเหยแบบหมุนรุ่น 111/A ของ Buchi column สำหรับแยกสาร ชนิด Bonclone 10 C 18 ยาว 30 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 3.9 มิลลิเมตร ของ Phenomenex อุปกรณ์มาตรฐานอื่น ๆ ที่ใช้ในการสกัด และวิเคราะห์สารตามวิธีทางเคมี

แผนการดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยนี้โดยส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยด้านการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเริ่มการวิจัยตั้งแต่การเพาะเมล็ด การชักนำให้เกิด hairy root การศึกษาการเจริญของ hairy root และการเก็บตัวอย่างของเนื้อเยื่อในลักษณะแห้ง โดยทำการวิจัยในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความดูแลของ รองศาสตราจารย์ มนทกานติ วัชราภัย และอีกส่วนหนึ่งเป็นส่วนของการวิเคราะห์แอลคาลอยด์ โดยการนำตัวอย่างเนื้อเยื่อในลักษณะแห้งที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทำการวิเคราะห์แอลคาลอยด์ การวิจัยในส่วนนี้ทำการวิจัยในหน่วยวิจัยและเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพร ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยได้รับความอนุเคราะห์ทั้งด้านเครื่องมือ เช่น เครื่องวิเคราะห์ HPLC และ การแนะนำวิธีการวิเคราะห์โดยตลอดจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรรนิภา ชุมศรี

การเตรียมอาหาร

1. อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในการวิจัยนี้ประกอบไปด้วย 5 สูตร คือ สูตร A สูตร B สูตร C สูตร D และสูตร E ซึ่งมีองค์ประกอบของสารอาหาร ดังนี้

Macronutrient elements ได้แก่

macronutrient	สูตร A MS(1962) มก/ล	สูตร B 1/2MS มก/ล	สูตร C B5(1968) มก/ล	สูตร D 1/2B5 มก/ล	สูตร E Wt(1963) มก/ล
NH_4NO_3	1650	825	-	-	-
KNO_3	1900	950	2527.50	1263.75	80
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	220	150	75	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	185	246.50	123.25	750
KH_2PO_4	170	85	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	134	67	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	300
Na_2SO_4	-	-	-	-	200
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	-	150	75	19
KCl	-	-	-	-	25

Micronutrient elements : ทุกสูตรใช้ micronutrient elements ตามสูตร MS(1962)

สารอินทรีย์ : glycine 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร

thaimine-HCl 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

pyridoxine-HCl 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

nicotinic acid 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

Sucrose 30 กรัม/ลิตร

Agar powder 8 กรัม/ลิตร

pH = 5.6

การนึ่งฆ่าเชื้อ : autoclave ความดัน 1.1 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 120° C 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Agrobacterium rhizogenes ใช้สูตร YEB มีองค์ประกอบดังนี้

Bacto beef extract	5	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	1	กรัม/ลิตร
Peptone	5	กรัม/ลิตร
Sucrose	5	กรัม/ลิตร
$MgSO_4$	0.49	กรัม/ลิตร
Agar powder	15	กรัม/ลิตร

pH = 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ความดัน 1.1 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 120° C 20 นาที

Agrobacterium rhizogenes สายพันธุ์ที่ใช้ ได้แก่ :

A4 (Nakamura และคณะ,1988)

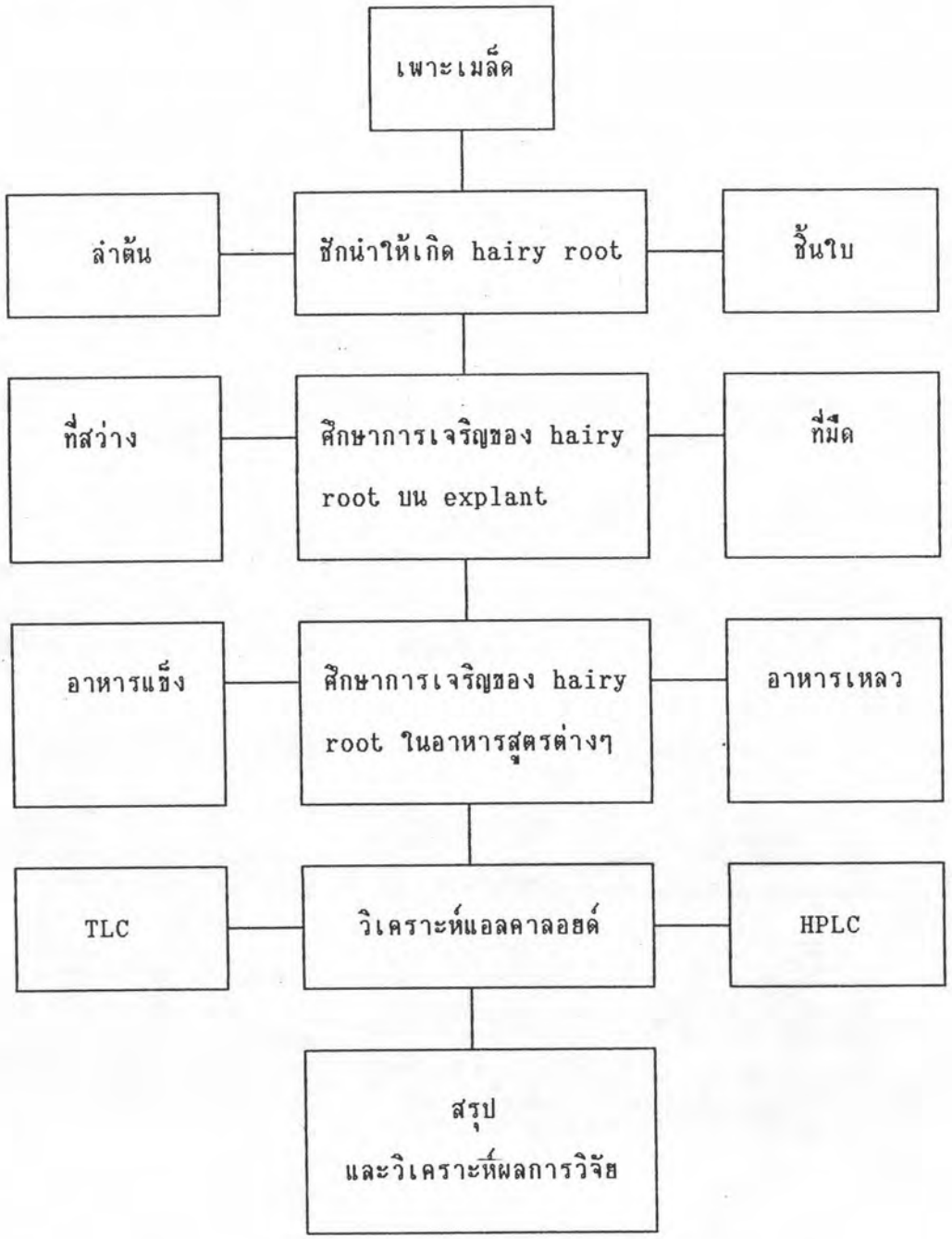
8196 (David และ Tempe,1988)

R1000 (Boulton และคณะ,1989)

15834 (Petit และคณะ,1983)

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 มีรายละเอียดดังนี้



แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยโดยสังเขป

1. การปรับปรุงเทคนิคเบื้องต้นบางประการที่ใช้ในการวิจัย

1.1 การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

ศึกษาวิธีเพาะเมล็ดล่าโพงกาสลักในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารสูตร A ไม่เติมฮอร์โมน เลี้ยงในที่มีแสงความเข้ม 1500 ลักซ์ 16 ชั่วโมง/วัน จนกระทั่งได้ต้นกล้าล่าโพงที่โตและแข็งแรงพอจะนำมาวิจัยต่อไป

1.2 การฆ่าเชื้อ A. rhizogenes บน hairy root

ศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อ A. rhizogenes ที่ติดมากับ hairy root โดยใช้ carbenicillin ที่ความเข้มข้น 0.5 , 0.75 และ 1.00 กรัม/ลิตร จนได้ hairy root ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ และสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2. การชักนำให้เกิด hairy root

การชักนำให้เกิด hairy root ทำโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับแบคทีเรียแบบ co-culture ซึ่งจะทำให้เกิด transformation ของยีนจากแบคทีเรียเข้าสู่ genome ของพืชเองตามธรรมชาติ งานวิจัยนี้ใช้ explant จากต้นกล้าล่าโพง ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ลำต้น และชิ้นใบ โดยเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย A.rhizogenes สายพันธุ์ต่าง ๆ 4 สายพันธุ์ คือ A4 8196 R1000 และ 15834 ดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 การชักนำให้เกิด hairy root บนลำต้น (decapitate stem)

นำต้นกล้าล่าโพงที่เพาะไว้อายุประมาณ 4 สัปดาห์ ตัดส่วนยอดที่มีใบจริงออกไปชำต่อในอาหารสูตร A ส่วนของลำต้นที่ตัดยอดแล้วใช้เป็น explant โดยนำเชื้อ A. rhizogenes (ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร YEB 1 คืน) มาป้ายลงบนรอยแผล และนำไปเลี้ยงบนชั้นแสง ติดตามการเกิด hairy root ต่อไป

2.2 การชักนำให้เกิด hairy root บนชิ้นใบ (leaf disc culture)

เลี้ยงเชื้อ A. rhizogenes ในอาหารเหลวสูตร YEB 1 คืนบนเครื่องเขย่า เลือกใบล่าโพงที่มีสีเขียวสด ลักษณะแข็งแรงจากต้นกล้าล่าโพงที่นำมาปักชำต่อในข้อ2.1 ตัดใบให้มีขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร แช่ชิ้นใบที่ตัดแล้วใน bacterial solution ประมาณ 5 นาที นำชิ้นใบดังกล่าวมาซับ bacterial solution ส่วนเกินออกบนกระดาษกรองก่อนย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร A ในสภาพที่มีแสงประมาณ 4 วัน จากนั้นจึงย้ายชิ้นใบดังกล่าวลงเลี้ยงในอาหารสูตร A ที่มี carbenicillin 5 กรัม/ลิตร และติดตามการเกิด hairy root ต่อไป

การบันทึกผล : เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเกิด hairy root จาก A. rhizogenes ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ A4 8196 R1000 และ 15834 ทั้งจากลำต้นและชิ้นใบ โดยนับจากจำนวน explant ที่เกิด hairy root

3. การศึกษาการเจริญของ hairy root

3.1 การเจริญของ hairy root บน explant

ย้ายลำต้น และชิ้นใบ ที่เพิ่งเริ่มเกิด hairy root ลงเลี้ยงในอาหารสูตร B แยกไปเลี้ยงในที่มีแสงส่วนหนึ่ง และที่มืดส่วนหนึ่ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้คะแนนตามลักษณะการเจริญของรากตั้งแต่ 0 (ตาย) จนถึง 16 (เจริญดีที่สุด)

การบันทึกผล : เปรียบเทียบการเจริญของ hairy root บนลำต้น และใบที่ชักนำโดย A. rhizogenes สายพันธุ์ต่าง ๆ และเปรียบเทียบการเจริญของ hairy root ในที่สว่าง และที่มืด

3.2 การเจริญของ hairy root ที่แยกมาเลี้ยง

นำ hairy root ที่ปราศจากเชื้อ ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตร และสภาพต่าง ๆ กัน ดังนี้

3.2.1 การเจริญของ hairy root ในอาหารแข็ง

นำ hairy root ที่ปราศจากเชื้อ A. rhizogenes แล้วลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร A B C D และ E ในสภาวะที่สว่าง และที่มืด เลือกอาหารและสภาวะที่เหมาะสมเพื่อทำการขยายปริมาณ hairy root ต่อไป

3.2.2 การเจริญของ hairy root ในอาหารเหลว

นำ hairy root ที่เจริญเต็มที่ในอาหารแข็ง ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร A B และ C ในสภาวะที่สว่างและที่มืด เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญและเพื่อเก็บตัวอย่างแห้งสำหรับการวิเคราะห์สารแอลคาลอยด์ต่อไป

การบันทึกผล : เปรียบเทียบการเจริญของ hairy root ที่เกิดจาก A. rhizogenes สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร และสภาวะแสงต่างกัน

4. การตรวจหา และวิเคราะห์หาปริมาณ tropane alkaloid

4.1 การสกัดแยก tropane alkaloid

การสกัดแยก tropane alkaloid ดำเนินตามวิธีการสกัดของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรรนิภา ชุมศรี ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วบดให้ละเอียดผ่าน standard testing sieve เบอร์ 60

4.1.2 หมักผงตัวอย่าง 0.3 กรัม ในสารละลาย chloroform : methanol : 25% ammonia solution (อัตราส่วน 15:5:1) 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน บนเครื่องเขย่า gyratory shaker ที่อัตราความเร็ว 120 รอบ/นาที

4.1.3 กรองสารละลายที่สกัดได้ และล้างกากด้วย chloroform 7.5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

4.1.4 นำสารละลายที่กรองได้มาระเหยจนแห้งด้วยระบบลดความดัน โดยใช้ rotary evaporator และละลายกากที่เหลือด้วย 1 N sulfuric acid 15 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

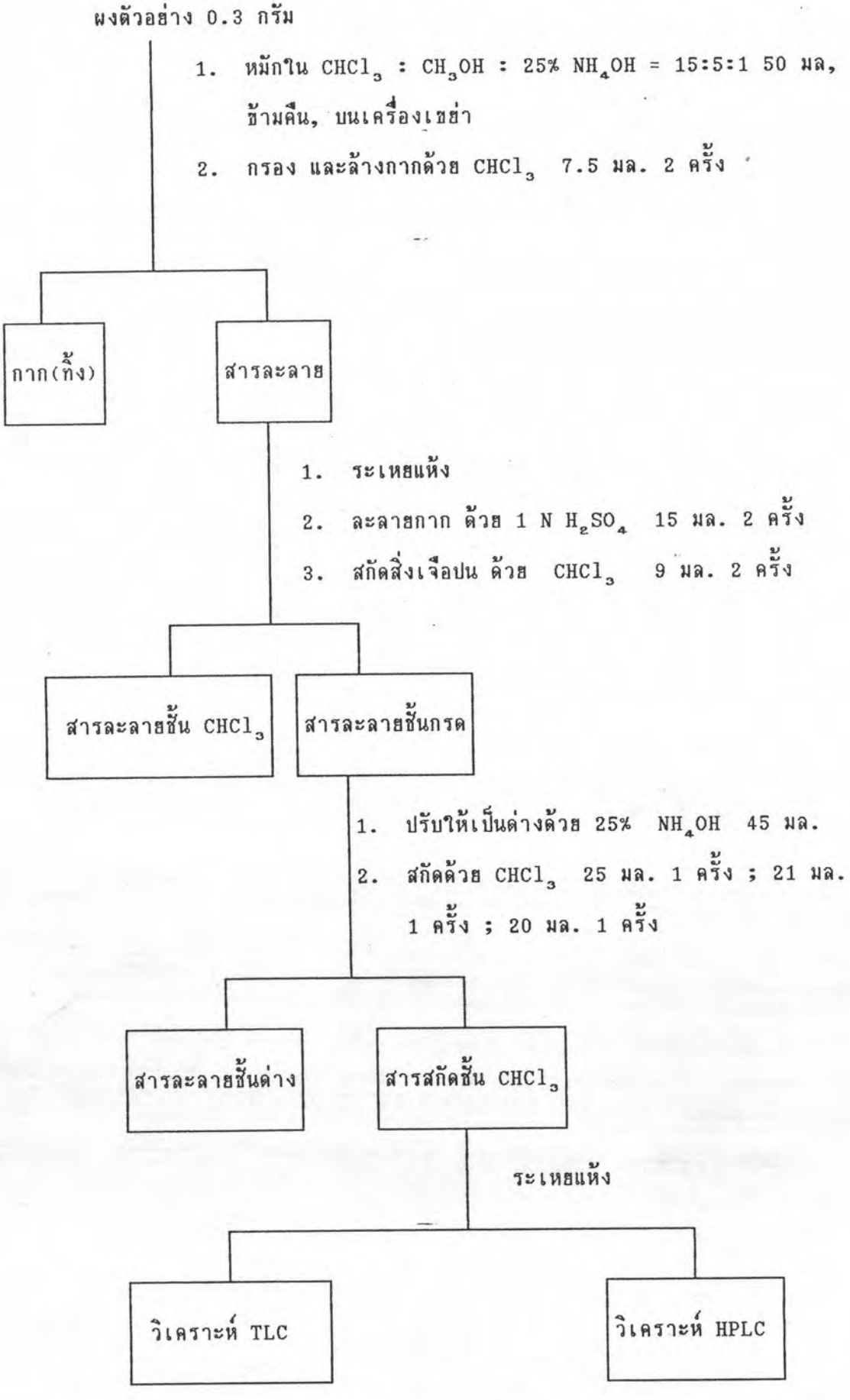
4.1.5 สกัดสารเจือปนที่ไม่ใช่แอลคาลอยด์ (impurities)ออกด้วย chloroform 9 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

4.1.6 ปรับสารละลายส่วนที่เหลือให้เป็นด่างด้วย 25% ammonia solution 45 มิลลิลิตร

4.1.7 สกัดด้วย chloroform 25 มิลลิลิตร 1 ครั้ง 21 มิลลิลิตร 1 ครั้ง และ 20 มิลลิลิตร 1 ครั้ง

4.1.8 แยกสารสกัดที่อยู่ในชั้น chloroform ออก และระเหยสารจนแห้ง

4.1.9 นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์เชิงคุณภาพและตรวจสอบเอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography) และวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ในขั้นต่อไป



แผนภาพที่ 2 การสกัดแยก tropane alkaloid โดยสังเขป

4.2 การตรวจหา tropane alkaloid ด้วยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography)

4.2.1 ระบบที่ใช้ในการตรวจหา ประกอบด้วย 5 ระบบ ดังนี้

ระบบที่ 1 Plate : silica gel G

Solvent system : chloroform : methanol : 25 % ammonia solution อัตราส่วน 87 : 10 : 1

Detection : Dragendorff's spray reagent

ปรับปรุงจากวิธีของ Tabata และคณะ 1972

ระบบที่ 2 Plate : silica gel G

Solvent system : chloroform : acetone : methanol : 25 % ammonia solution อัตราส่วน 75 : 10 : 15 : 2

Detection : Dragendorff's spray reagent

ปรับปรุงจากวิธีของ Kamada และคณะ 1986

ระบบที่ 3 Plate : silica gel G

Solvent system : acetone : น้ำ : 25 % ammonia solution อัตราส่วน 90 : 7 : 3

Detection : Dragendorff's spray reagent

ปรับปรุงจากวิธีของ Christen และคณะ 1989

ระบบที่ 4 Plate : silica gel G

Solvent system : ethylacetate : 2-isopropanol : 25 % ammonia solution อัตราส่วน 45 : 35 : 2

Detection : Dragendorff's spray reagent

ปรับปรุงจากวิธีของ Kamada และคณะ 1986

ระบบที่ 5 Plate : silica gel G

Solvent system : chloroform : acetone : diethylamine : อัตราส่วน 50 : 40 : 10

Detection : Dragendorff's spray reagent

ปรับปรุงจากวิธีของ Christen และคณะ 1989

4.2.2 การเตรียม plate

เตรียมสารสำหรับเคลือบ plate โดยใช้ silica gel G 60 กรัม ผสมกับ 95% methanol และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 8:112 (มิลลิลิตร) นำมาเคลือบบน plate(กระจกขนาด 10x20 เซนติเมตร) ซึ่งทำความสะอาดและเช็ดด้วย acetone แล้วด้วยเครื่อง TLC plate spreader ก่อนใช้นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที

4.2.3 การเตรียมระบบ

เตรียมสารละลายที่จะใช้ในแต่ละระบบ (solvent system) ตามอัตราส่วนของระบบนั้น ๆ ใส่ลงใน tank ซึ่งมีกระดาษกรองวางแนบอยู่กับผนัง tank ด้านหนึ่ง โดยใช้สารละลาย 80 มิลลิลิตร สำหรับ 1 tank ปิดฝา tank ซึ่งทา silicone ไว้ให้แน่นสนิท เอียง tank ให้สารละลายเปียกกระดาษกรองจนทั่ว และทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที ก่อนใช้

4.2.4 กระบวนการตรวจหา

เตรียม atropine standard reference และสารละลายตัวอย่าง โดยละลายในchloroform 1 มิลลิลิตร นำสารที่ใช้มาหยดลงบน plate ที่ขีดเส้นแบ่งช่องไว้แล้ว โดยใช้ปลาย capillary tube กำหนดแนวเริ่มต้นให้สูงจากด้านล่าง plate 2.0 เซนติเมตร นำ plate ที่ได้นี้ใส่ลงใน tank ที่เตรียมระบบไว้แล้ว และรีบปิดฝา tank ให้แน่นสนิททันที จากนั้นสังเกตการเคลื่อนที่ของสารละลาย เมื่อเคลื่อนไปจนถึงระดับความสูง 15 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น (solvent front) จึงนำ plate ออก แล้วทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไป spray ด้วย Dragendorff's spray reagent

<u>การบันทึกผล</u> : หาค่า HRf ของ spot ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างของระบบนั้น ๆ

จาก $HRf = 100 \times Rf = 100 \times \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่สารละลายของระบบเคลื่อนที่}}$

เปรียบเทียบผลของสารตัวอย่างแต่ละชนิด ที่ใช้การตรวจหาระบบเดียวกัน และในระบบต่างกัน

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ atropine ด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

4.3.1 ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์

ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ ใช้ระบบของผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรรนิภา ชุมศรี ซึ่งดัดแปลงมาจากระบบของ Kamada และคณะ (1986) ดังนี้

สภาวะของเครื่องระบบส่งตัวทำละลาย

อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตร/นาที

สภาวะของเครื่องวิเคราะห์ผล

Detection ดูดกลืนแสงในช่วง 215 นาโมเมตร

AUFS 0.2

สภาวะของเครื่องรายงานผล

Attenuation	128	มิลลิโวลต์
Chart speed	0.25	เซนติเมตร/นาที
Minimum area	50,000	ตารางหน่วย
Peak width	12	
Peak threshold	2,000	

ชนิดของคอลัมน์ Bonclone 10 C 18 ของ Phenomenex

4.3.2 การเตรียมสาร

สารที่เป็นของเหลวซึ่งจะเข้าสู่ระบบส่งตัวทำละลาย ต้องผ่านการกรองก่อนทุกชนิด ดังนี้

น้ำกลั่น (กลั่นไว้ไม่เกิน 3 วัน)

กรองโดยใช้ membrane filter สำหรับกรองน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

100% methanol, 70% methanol และ 30% methanol

กรองโดยใช้ membrane filter สำหรับกรองสารละลายอินทรีย์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

สารละลายที่ใช้ในระบบวิเคราะห์ (solvent system)

เตรียมในอัตราส่วน 100 % methanol : 10 mM

i17209936

sodiam 1-heptanesulfonate ในน้ำกลั่น เท่ากับ 50:50 กรองผ่าน membrane filter สำหรับกรองสารละลายอินทรีย์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

สารละลายตัวอย่าง

ละลายสารที่ได้จากการสกัดแยก tropane alkaloid ใน 100 % methanol 6 มิลลิลิตร กรองผ่าน membrane filter สำหรับกรองสารละลายอินทรีย์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

4.3.3 การเตรียมระบบ

นำสารละลายของระบบ (solvent system) เข้าสู่ระบบส่งตัวทำละลายโดยค่อย ๆ เพิ่มอัตราการไหลเป็นระยะจนถึง 1.2 มิลลิลิตร/นาที รอจนสารละลายเข้าสู่ระบบอย่างสมบูรณ์ ตั้งสภาวะเครื่องวิเคราะห์ผล และเครื่อง รายงานผลตามข้อ 4.3.1

4.3.4 กระบวนการวิเคราะห์

เตรียมฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่องโดยล้างเข็มฉีดด้วย 100 % methanol 20 ครั้ง ตามด้วยสารละลายตัวอย่าง 5 ครั้ง ใช้ปริมาณสารตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร/เข็ม รอจนเครื่องรายงานผล รายงานผลออกมา เมื่อจะฉีดสารตัวอย่างเข้าไปใหม่ต้องรายงานว่า สารที่ฉีดเข้าไปครั้งแรกก่อนออกจากระบบหมดแล้วแน่นอน

<u>การบันทึกผล</u> : หาปริมาณ atropine (%DW) จากความเข้มข้นของ atropine (μg/20 μl) โดยคำนวณได้จากสมการ linear regression equation ของ atropine standard และค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์

นำปริมาณ atropine (%DW) ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างมาศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ atropine ใน hairy root เบอร์ต่าง ๆ และในรากปกติ เมื่อเลี้ยงในอาหาร สภาวะแสง และอายุต่างกัน