บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีทำการวิจัย

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 เคมีภัณฑ์

2.1.1.1 น้ำมันมะกอก (U.S.P., B.P.)

2.1.1.2 น้ำมันตีนเป็ดน้ำ

2.1.1.3 Egg Lecithin (E. Merck)

2.1.1.4 Cholesterol (E. Merck)

2.1.1.5 Bovine Serum Albumin (Sigma)

2.1.1.6 Monosodium Dihydrogen Phosphate (Carlo Erba)

2.1.1.7 Disodium Hydrogen Phosphate (Mallinckrodt)

2.1.1.8 n - Hexane (J.T. Baker Chemical LTD.)

2.1.1.9 Potassium Dichromate (May-Baker LTD.)

2.1.1.10 Sulfuric Acid (May-Baker LTD.)

2.1.1.11 Absolute Alcohol (องค์การเภสัชกรรม)

2.1.1.12 Tridistilled Water (องค์การเภสัชกรรม)

2.1.1.13 Fuller's Earth (Floridin Co.)

2.1.1.14 Activated Charcoal (U.S.P.)

2.1.2 เครื่องมือ

2.1.2.1 Soxhlet Apparatus (Sibata)

2.1.2.2 Tensiometer (Biolar Corporation)

2.1.2.3 Teflon Coated Trough with Movable Barrier (CAHN Instrument)

2.1.2.4 Agla Micrometer Syringe (Wellcome Reagent Limited)

2.1.2.5 Suction Pump (Tokyo Shibaura Electric Co. LTD.)

2.1.2.6 Alcoholic Lamp

2.2 วิธีการวิจัย

2.2.1 การเตรียมสารที่ใช้ในการสร้างเยื่อเซลล์เทียม[45,46,47]

2.2.1.1 Egg Lecithin Solution

ละลาย Egg Lecithin 5 mg ใน n - Hexane 25 ml ต้องใช้สารละลายนี้ 0.026887 ml (คิดเป็น 4 ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08 x 10^{17} A^{o2} มันจะเรียงตัวเต็มถาด ในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

2.2.1.2 Cholesterol Solution

ละลาย Cholesterol 5 mg ใน n - Hexane 25 ml ต้องใช้สารละลายนี้ 0.0195235 ml (คิดเป็น 4 ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08 x 10^{17} A^{o2} มันจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

2.2.1.3 Bovine Serum Albumin Solution

ละลาย Bovine Serum Albumin 10 mg ใน Tridistilled Water 25 ml ต้องใช้สารละลายนี้ 0.0152 ml (คิดเป็น 4 ส่วน) ต่อพื้นที่ถาด 6.08 x 10^{17} A^{o2} มันจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

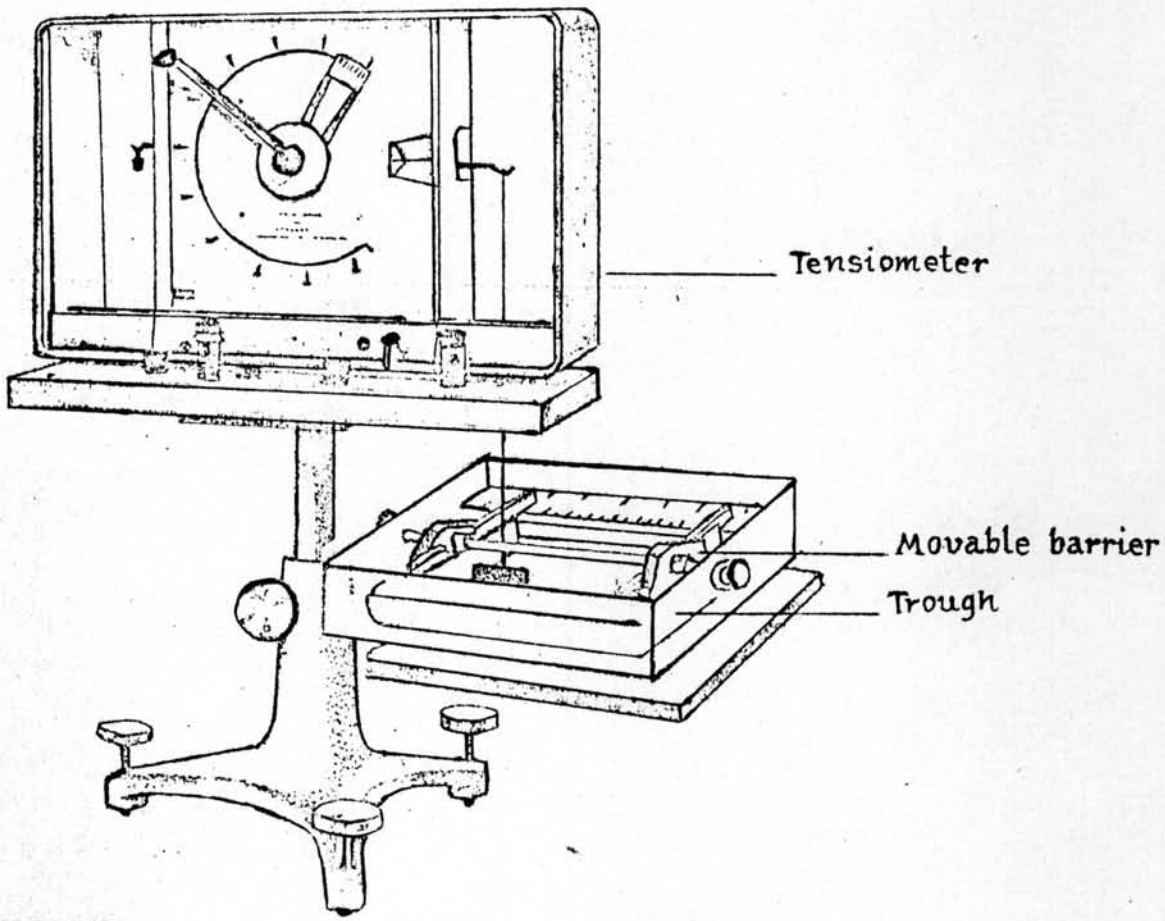
2.2.2 การหาแรงตึงผิวของ Tridistilled water pH 5.9

2.2.2.1 เตรียม Tridistilled water ให้มี pH 5.9 โดยใช้ Sorensen's Phosphate Buffer[48] (ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข.) เพื่อเป็น Subphase ในการเตรียมเยื่อเซลล์เทียม

2.2.2.2 วัดแรงตึงผิวของ Tridistilled water pH 5.9 โดยวิธี Wilhelmy Plate Method[39-40,42,49]

การวัดแรงตึงผิวใช้เครื่องมือ Surface Tensiometer ซึ่งประกอบด้วย Torsion Balance และมี Platinum Blade แขวนอยู่ บรรจุน้ำที่ต้องการวัดแรงตึงผิวลงในถาดให้เต็มพอดี ปรับระดับน้ำด้วย Suction Pump ถาดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงพื้นที่ผิวหน้าได้ด้วย Movable Barrier โดยมีสเกลที่มีหน่วยเป็นเซนติเมตรติดอยู่ ความยาว 10 เซนติเมตร คิดเป็นพื้นที่ของผิวหน้า 100 % ปรับให้ Platinum Blade จุ่มลงในน้ำ โดยให้ขอบบนอยู่ใต้ผิวน้ำพอดี ซึ่งเข็มที่หน้าปัทม์ของ Surface Tensiometer จะอยู่ตรงขีดที่กำหนดให้ ที่จุดนี้จะต้องปรับค่าแรงตึงผิวบนหน้าปัทม์ให้เป็นศูนย์ด้วย เมื่อต้องการจะวัดแรงตึงผิวของน้ำให้ค่อย ๆ เพิ่มค่าที่หน้าปัทม์ ขณะเดียวกัน Platinum Blade จะถูกยกขึ้นจากน้ำ เข็มซึ่งเป็นตัวปรับระดับของ Platinum Blade จะเคลื่อนขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อ Platinum Blade ถูกยกขึ้นจากน้ำจนกระทั่งขอบบนถูกยกขึ้นเหนือผิวน้ำ เข็มจะเคลื่อนเร็วขึ้นกว่าเดิม ที่จุดนี้ค่าที่อ่านได้จากหน้าปัทม์จะเป็นค่าแรงตึงผิวของน้ำซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม เมื่อนำมาคูณด้วย 0.198 จะได้ค่า ที่มีหน่วยเป็น dyne/cm Torsion Balance นี้สามารถวัดแรงตึงผิวที่เปลี่ยนแปลงได้ถึง 0.0396 dynes/cm.

พอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 เครื่องมือวัดแรงตึงผิวพร้อมด้วยถาดและที่กั้นซึ่งเคลื่อนที่ได้[46]

2.2.3 การสร้างเยื่อเซลล์เทียม

ใช้หลักการสร้างเยื่อเซลล์เทียมของ Langmuir[40-41,45,50-51] การสร้างเยื่อเซลล์เทียมทุกครั้ง ต้องทดสอบความสะอาดของผิวน้ำก่อน โดยการวัดแรงตึงผิวของน้ำ ในพื้นที่ผิว 100 % และ 30 % ถ้าผิวหน้าของน้ำสะอาดค่าที่วัดได้จะต้องเท่ากัน[45] ถ้าไม่สะอาดใช้ Suction ดูดผิวหน้าออก จนกว่าจะสะอาด แล้วปรับระดับน้ำใหม่จนกว่าจะวัดแรงตึงผิวของน้ำที่จุดต่าง ๆ ได้เท่ากัน จึงเริ่มสร้างเยื่อเซลล์เทียม

นำสารละลายที่เตรียมในข้อ 2.2.1 คือ Egg Lecithin Solution, Cholesterol Solution และ Bovine Serum Albumin Solution มาหยดลงบน Subphase pH 5.9 เพื่อสร้างเยื่อเซลล์เทียมในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 1 : 3 : 4 ใช้สารละลาย 6.7217 : 14.6426 : 15.1999 µl ตามลำดับ

2. Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 2 : 2 : 4 ใช้สารละลาย 13.4435 : 9.7617 : 15.1999 µl ตามลำดับ

3. Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 3 : 1 : 4 ใช้สารละลาย 20.1652 : 4.8808 : 15.1999 µl ตามลำดับ

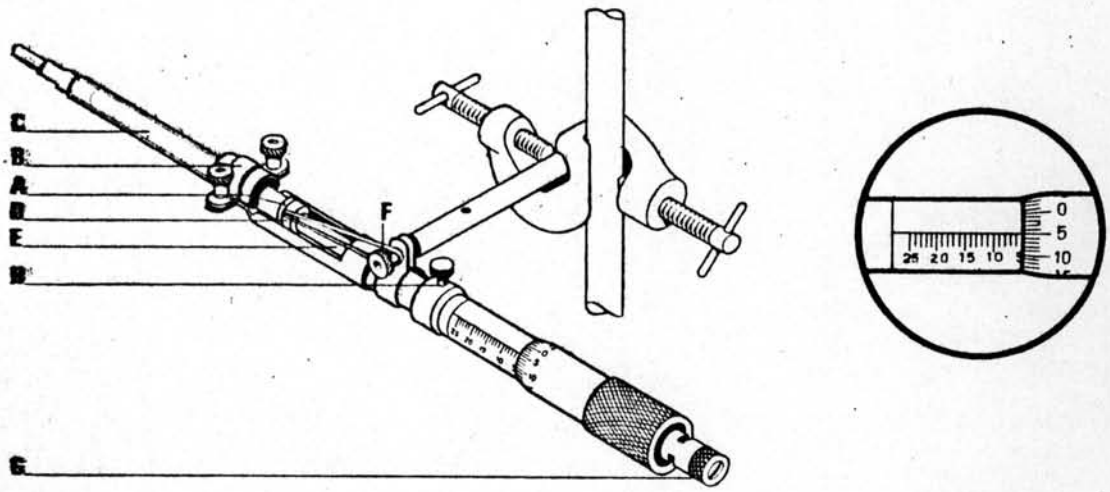
4. Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 4 : 0 : 4 ใช้สารละลาย 26.887 : 0 : 15.1999 µl ตามลำดับ

สร้างเยื่อเซลล์เทียมในแต่ละอัตราส่วน โดยใช้ Agla Micrometer Syringe ในการหยดสารละลายต่าง ๆ ลงบน Subphase ค่าที่อ่านได้จาก Agla Micrometer Syringe เป็นระยะทางที่ Micrometer Spindle ถูกดันเข้าไปใน Barrel ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

20 M = V

เมื่อ M = ค่าที่อ่านได้จาก Micrometer Syringe

V = ปริมาตรของสารเป็น Microliter (µl)



(A) ปลายของกระบอกสูบ (C) ซึ่งจะต้องระวังไม่ให้อยู่ตรงกับ Clamp B ซึ่งจะกดลงมาเวลา lock ทำให้กระบอกสูบของ Syringe แตกได้

(D) คือลูกสูบของ Syringe ซึ่งจะเคลื่อนเข้าเวลาหยดสารละลาย ปลายลูกสูบนี้จะถูกดันโดยแท่งแกนของ micrometer ซึ่งจะต่อกับสเกลเมื่อหมุนสเกลจะทำให้แกนของ micrometer (E) หมุนเข้าทีละน้อยเพื่อดันลูกสูบไปข้างหน้า

(F) เป็นสายยางเล็ก ๆ ที่ใช้ตึงรั้งลูกสูบของ Syringe ไว้กับ Holder เพื่อป้องกันลูกสูบเคลื่อนไปข้างหน้าเอง เมื่อยังไม่ได้หมุนสเกล (อาจใช้หรือไม่ใช้ก็ได้)

(G) เป็นปลายของ micrometer ใช้หมุนสเกลเมื่อต้องการหยดสารละลายในปริมาณต่าง ๆ เมื่อเพียงพอแล้วก็หมุน lock ด้วยสกรู (H)

รูปที่ 15 แสดง Agla Micrometer Syringe $\overline{c}$ Holder

I16060301

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นเมื่อจะใช้ Egg Lecithin Solution 0.026887 ml จะต้องใช้จำนวน 1.344 ช่อง ของ Micrometer Syringe หรือหมุน Holder ไป 2 รอบ กับอีก 34.4 ขีด (1 รอบ = 10 µl) ขณะหยดสารละลายลงบน Subphase นั้น ให้ถือสูงจากผิวน้ำประมาณ 2 - 3 mm. และหยดลงช้า ๆ [45] ขณะนั้น Platinum Blade จะต้องอยู่ใต้ผิวน้ำ เมื่อหยดสารละลายลงไปแล้วทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ n-Hexane ระเหยออกหมด และ Egg Lecithin เรียงตัวเป็นระเบียบ

หยด Egg Lecithin ตามปริมาณที่ต้องการในแต่ละอัตราส่วนของเยื่อเซลล์เทียม ตามด้วย Cholesterol ทิ้งไว้ 10 นาที ให้ n-Hexane ระเหยหมดแล้วหยด Bovine Serum Albumin ในปริมาณที่ต้องการในแต่ละอัตราส่วน ทิ้งไว้ 10 นาที เช่นกัน เพื่อให้โปรตีนเรียงตัวให้เป็นระเบียบ เริ่มวัดแรงตึงผิวและลดพื้นที่ถาดลงเรื่อย ๆ โดยใช้ Movable Barrier ในแต่ละพื้นที่ วัดแรงตึงผิว 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย ลดพื้นที่ถาดลงจนกว่าแรงตึงผิวไม่ลดลงหรือเปลี่ยนแปลง ซึ่งแสดงว่า Film จะเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และเสียไป (Collapsing point) นำค่าที่วัดได้มาสร้าง ¶ - A Curve (Surface Pressure - Surface Area Curve)

เมื่อ $\P = \gamma_o - \gamma$

$\P$ = ความดันผิว (Surface Pressure)

γ_o = แรงตึงผิวของน้ำ หรือ Subphase

γ = แรงตึงผิวที่วัดได้หลังจากมีเยื่อเซลล์เทียม

วัดแรงตึงผิวในทุกอัตราส่วนที่เตรียมเยื่อเซลล์เทียม นำมาสร้าง ¶ - A Curve ของเยื่อเซลล์เทียม ขณะยังไม่ได้หยดน้ำมันมะกอกหรือน้ำมันตีนเป็ดน้ำ

2.2.4 ศึกษาความสามารถในการซึมผ่านเยื่อเซลล์เทียมของน้ำมันมะกอก

สร้างเยื่อเซลล์เทียมตามข้อ 2.2.3 บน Subphase Tridistilled Water pH 5.9 แล้วหยดน้ำมันมะกอกปริมาณต่าง ๆ กันที่ต้องการทดสอบคือ 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 µl ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้ววัดแรงตึงผิว ในแต่ละพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลง (โดยทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ทุกครั้งที่ลดพื้นที่)[45,50,51] นำค่าที่วัดได้มาสร้าง π - A Curve เปรียบเทียบกับ π - A Curve ของเยื่อเซลล์เทียม ที่ไม่มีน้ำมันมะกอกใน System เดียวกัน

2.2.5 ศึกษาความสามารถในการซึมผ่านเยื่อเซลล์เทียมของน้ำมันตีนเป็ดน้ำ

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.4 แต่หยดน้ำมันตีนเป็ดน้ำแทนน้ำมันมะกอก (น้ำมันตีนเป็ดน้ำนี้ได้จากการสกัดดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.) นำ π - A Curve ที่ได้ เปรียบเทียบกับ π - A Curve ของเยื่อเซลล์เทียมขณะไม่หยดน้ำมันตีนเป็ดน้ำ

2.2.6 ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการซึมผ่านเยื่อเซลล์เทียมของน้ำมันมะกอกและน้ำมันตีนเป็ดน้ำ

นำผลการทดลองในข้อ 2.2.3, 2.2.4 และ 2.2.5 มาเปรียบเทียบกันเพื่อประเมินผลความสามารถในการซึมผ่านเยื่อเซลล์เทียมของน้ำมันทั้งสอง