บทที่ ๒

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

๒.๑ อุปกรณ์

๒.๑.๑ เคมีภัณฑ์

๒.๑.๑.๑ Methylparaben (U.S.P, B.P.)

๒.๑.๑.๒ Egg Lecithin (Phosphatidylcholine (E.Merck)

๒.๑.๑.๓ Cholesterol (E.Merck)

๒.๑.๑.๔ Bovine Serum albumin (Calbiochem)

๒.๑.๑.๕ Disodium hydrogen phosphate (Mallinckrodt)

๒.๑.๑.๖ Hydrated Monosodium hydrogen phosphate (Carlo Erba)

๒.๑.๑.๗ 0.2 Normal Hydrochloric acid

๒.๑.๑.๘ Potassium hydrogen phthalate (Riedel)

๒.๑.๑.๙ n-Hexane (BDH)

๒.๑.๒ เครื่องมือ

๒.๑.๒.๑ Torsion Balance (Biolar Coorporation)

๒.๑.๒.๒ Teflon coated trough and movable barrier (CAHN instrument)

๒.๑.๒.๓ Agla Micrometer Syringe (Wellcome Reagent Limited)

๒.๑.๒.๔ Suction pump (Arther H. Thomus Coorporation)

๒.๒ วิธีทำการวิจัย

๒.๒.๑ หาความแรงตึงผิวของน้ำที่ pH ๓, ๕.๙๑ และ ๘.๐๔ เพื่อใช้เป็นมาตรฐาน

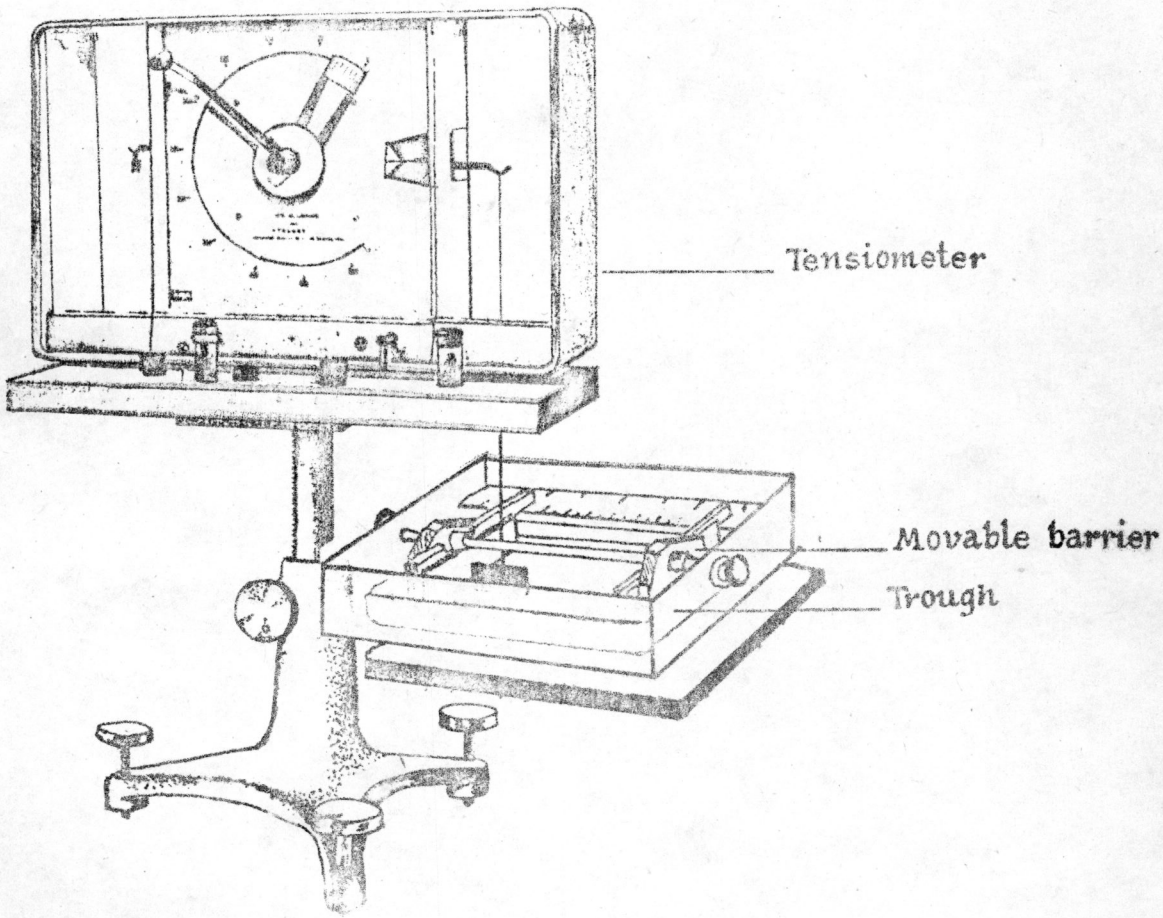
๒.๒.๑.๑ วิธีหาความแรงตึงผิว ใช้เครื่องมือ Surface tensiometer ซึ่งประกอบด้วย Torsion balance พร้อมด้วย Platinum blade วัดความแรงตึงผิวของน้ำที่กลั่น ๓ ครั้ง (Tridistilled Water) ในถาดที่เคลือบด้วย Teflon และสามารถเปลี่ยนพื้นที่ของผิวหน้าได้ (รูปที่ ๖)

๒.๒.๑.๒ pH ที่ใช้ทำการวิจัย

๒.๒.๑.๒.๑ pH ๓ ใช้ Acid phthalate buffer[๓๑] (ตารางที่ ๑)

๒.๒.๑.๒.๒ pH ๕.๙๑ และ pH ๘.๐๔ ใช้ Sorenson phosphate buffer[๓๒] (ตารางที่ ๒)

๒.๒.๒ สร้างเยื่อเซลล์เทียมขึ้น โดยใช้ Egg Lecithin ในปริมาณที่จะให้เรียงตัวเป็นโมเลกุลชั้นเดียวบนผิวน้ำที่ pH ๓ ปริมาณของ Egg Lecithin ที่จะให้เรียงตัวเป็นโมเลกุลชั้นเดียวในถาดที่จะทำการวิจัยสามารถคำนวนได้ดังนี้



รูปที่ ๖ เครื่องมือวัดแรงตึงผิวพร้อมด้วยถาดและที่กั้นซึ่งเคลื่อนที่ได้

ตารางที่ ๑ Acid Phthalate Buffer Solution[๓๑]

pH	Acid Phthalate Buffer		
2.2	50 ml M/5 KHPhthalate	49.5 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
2.4	50 ml M/5 KHPhthalate	42.2 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
2.6	50 ml M/5 KHPhthalate	35.4 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
2.8	50 ml M/5 KHPhthalate	28.9 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
3.0	50 ml M/5 KHPhthalate	22.3 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
3.2	50 ml M/5 KHPhthalate	15.7 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
3.4	50 ml M/5 KHPhthalate	10.4 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
3.6	50 ml M/5 KHPhthalate	6.3 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
3.8	50 ml M/5 KHPhthalate	2.9 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml
4.0	50 ml M/5 KHPhthalate	0.1 ml M/5 HCl	Dilute to 200 ml

ตารางที่ ๖ Sorenson Phosphate Buffer Solution (ต่อ)

Sorenson Phosphate Stock Solutions

Monobasic Sodium Phosphate Solution

Monobasic Sodium Phosphate, anhydrous

(NaH_2PO_4) ..... 8.00 Gm

Tri distilled Water, sufficient

quantity to make ..... 1000 ml

Dibasic Sodium Phosphate Solution

Dibasic Sodium Phosphate, anhydrous

(Na_2HPO_4) ..... 9.47 Gm

Tri distilled Water, sufficient

quantity to make ..... 1000 ml

Sorenson Phosphate Buffer Solutions

Monobasic Sodium phosphate solution ml	Dibasic Sodium phosphate solution, ml	Resulting buffer solution, pH
90	10	5.91
80	20	6.24
70	30	6.47
60	40	6.64
50	50	6.81
40	60	6.98
30	70	7.17
20	80	7.38
10	90	7.73
5	95	8.04

Since monobasic sodium phosphate is available only in the monohydrated form, 9.208 Gm must be used, instead of 8.00 Gm of the anhydrous form.

ละลาย Egg Lecithin ๓๙.๘ มิลลิกรัมใน 100 ml n-Hexane ใช้สารละลาย ๐.๐๗ ml ต่อพื้นที่ถาด ๓๑๕x๑๐^{16}A$^{\circ}$^{2} (๒๐) ถาดที่ผู้วิจัยใช้เมื่อมีพื้นที่กว้างที่สุด (area ratio 100) มีพื้นที่ 6.08x10^{17}A^{2} เมื่อต้องการให้ Egg Lecithin เรียงตัวเต็มถาดต้องใช้ 0.0053774 มิลลิกรัม ในการวิจัยผู้วิจัยใช้ Egg Lecithin ละลายใน n-Hexane ให้ได้ปริมาตร ๒๕ ml สมมุติชั่ง Egg Lecithin มา xมิลลิกรัม ละลายใน n-Hexane จนได้ปริมาณ ๒๕ ml

ต้องใช้สารละลาย Egg Lecithin ในปริมาณ $\frac{๐.๑๓๔๔๓๕}{x}$ ml จึงจะเรียงตัวเต็มถาดได้พอดี

สารละลาย Egg Lecithin ที่ให้ ใช้ Agla Micrometer Syringe (รูปที่ ๗) ค่าที่อ่านจาก Agla Micrometer Syringe เป็นระยะทางที่ Micrometer Spindle ถูกดันเข้าใน Barrel ดังนั้นเมื่อต้องการรู้ปริมาตร ของสารละลายที่จะต้องให้ ใช้สูตรคำนวนดังนี้

20 M = V

M = ค่าที่อ่านได้จาก Micrometer

V = ปริมาตรเป็น Microliter

ดังนั้นเมื่อต้องการให้สารละลาย Egg Lecithin $\frac{๐.๑๓๔๔๓๕}{x}$ ml ต้องใช้สารละลาย Egg Lecithin จำนวน $\frac{๖.๗๒๑๗๕}{x}$ ช่องของ Micrometer Syringe เมื่อ x เป็นน้ำหนัก-เป็นมิลลิกรัมของ Egg Lecithin ที่ละลายใน n-Hexane จนได้สารละลาย 25 ml วัดความแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่ นำค่าที่ได้ไป plot หาการเปลี่ยนแปลงของ Suface Pressure ต่อพื้นที่ (π-area curve) โดยที่

$\pi = \gamma_o - \gamma$

π = Surface pressure

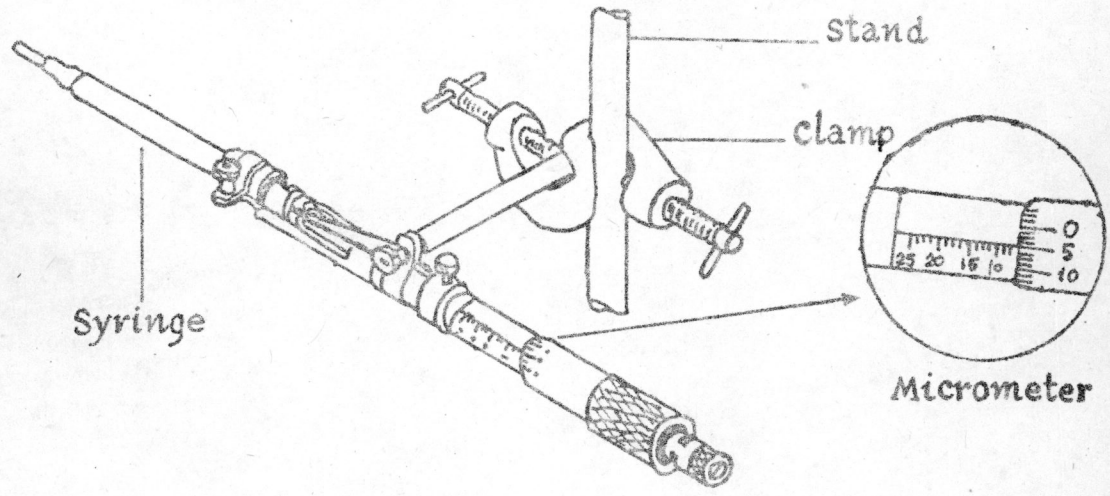
γ_o = ความแรงตึงผิวของน้ำ

γ = ความแรงตึงผิวที่วัดได้ใน System

2.2.3 ทำการวิจัยโดยวิธีเดียวกับในข้อ 2.2.2 แต่เปลี่ยน Subphase จากน้ำมาเป็นเมททิลพาราเบนที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% ในน้ำตามลำดับ นำผลการวิจัยในแต่ละความเข้มข้นมา Plot หาการเปลี่ยนแปลงของ Surface pressure ต่อพื้นที่โดยเปรียบเทียบกับ Curve ที่ได้ในข้อ 2.2.2

2.2.4 ทำการวิจัย โดยวิธีเดียวกันกับในข้อ 2.2.2 และ 2.2.3 แต่เยื่อเซลล์เทียมที่สร้างขึ้นให้ใช้อัตราส่วนของ Egg Lecithin ต่อ Cholesterol = 3:1, 1:1 และ 1:3 ต่อพื้นที่ตามลำดับ ปริมาณของ Cholesterol ที่จะใช้ สามารถคำนวนได้โดยวิธีการคำนวนเช่นเดียวกับในข้อ 2.2.2 ดังนี้

ละลาย Cholesterol 28.9 มิลิกรัมใน n-Hexane จนได้สารละลาย 100 ml ใช้สารละลายนี้ 0.07 ml ต่อพื้นที่ 315 X 10^{16}A^{o2} (20) ด้วยวิธีการเดียวกันกับในข้อ 2.2.2 เมื่อต้องการให้ Cholesterol เรียงตัวเต็มถาดต้องใช้สารละลาย Cholesterol จำนวน = $\frac{4.875875}{X}$ ช่องของ Agla Micrometer Syringe เมื่อ X เป็นน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของ Cholesterol ที่ละลายใน n-Hexane จนได้สารละลาย 25 ml



รูปที่ ๗ Agla Micrometer Syringe

ผลที่ได้จากการวิจัยนำไป Plot หาการเปลี่ยนแปลงของ Surface Pressure ต่อพื้นที่

2.2.5 ทำการวิจัยเช่นเดียวกับในข้อ 2.2.2, 2.2.3 และ 2.2.4 แต่เปลี่ยน pH ของ System จาก 3 มาเป็น 5.91 และ 8.04 ตามลำดับ

2.2.6 ทำการวิจัยโดยวิธีเดียวกับในข้อ 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4 และ 2.2.5 ตามลำดับ แต่เยื่อเซลล์เทียมที่สร้างขึ้นนั้น ผู้วิจัยเติม Bovine Serum Albumin ลงไปในปริมาณที่จะเรียงตัวเป็นโมเลกุลชั้นเดียวที่ผิวหน้าของ System ได้พอดีปริมาณของ Bovine Serum Albumin ที่ใช้ สามารถคำนวนได้โดยวิธีการเดียวกับการคำนวนในข้อ 2.2.2 ดังนี้

ละลาย Bovine Serum Albumin 45 มิลลิกรัม ในน้ำ 100 ml ใช้ สารละลาย 0.07 ml ต่อพื้นที่ $315 \times 10^{16} A^{o2}$ (20) ด้วยวิธีเดียวกันกับในข้อ 2.2.2 เมื่อต้องการให้ Bovine Serum Albumin เรียงตัวเต็มถาด ต้องใช้สารละลาย Bovine Serum Albumin จำนวน $\frac{7.60}{x}$ ช่องของ Agla Micrometer Syringe เมื่อ X เป็นน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของ Bovine Serum Albumin ที่ละลายในน้ำจนได้สารละลาย 25 ml

ผลการวิจัยที่ได้นำไป Plot หาการเปลี่ยนแปลงของ Surface pressure ต่อพื้นที่เช่นเดียวกัน

ในการทดลองทุกครั้งวัดแรงดึงผิวของแต่ละพื้นที่โดยทำการวัด ๓ ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย เมื่อทำเยื่อเซลล์เทียมบนผิวน้ำแล้ว ต้องตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย ๑๕ นาที ก่อนทำการวัดแรงดึงผิว ทั้งนี้เพื่อให้ n-Hexane ที่ใช้ละลายไขมันระเหยออกไปให้หมด เพื่อให้เยื่อเซลล์ที่เตรียมขึ้นเรียงตัวให้เป็นระเบียบ การวิจัยนี้ทำการทดลองในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส