บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm incubator shaker) รุ่น G 25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าผสม (Vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

เครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) รุ่น RE 52 ของบริษัท Yamato Scientific ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) รุ่น LC-6A ชุดควบคุมระบบ รุ่น SLC-6A และเครื่องวิเคราะห์ผล รุ่น C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic Balance) รุ่น Fx-3000 ของบริษัท A&D Company ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิค (Sonicator) ยี่ห้อ Delta รุ่น Ultrasonic Cleaner D200 ของบริษัท D.S.C. group ประเทศไต้หวัน

ปั๊ม(Peristaltic Pump) Pharmacia LKB:Pump P-1 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemical AB ประเทศสวีเดน

ตัวควบคุมปั๊ม (Pump controller) ยี่ห้อ Masterflex รุ่น 7554-60 ของบริษัท Barnant Company ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเก็บปริมาตรย่อย (Fraction Collector) LKB 2212 HeliRac LKB BROMMA ของบริษัท Tokyo Rikakikai Company ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ(Incubator Shaker) รุ่น G25&R25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Company ประเทศสหรัฐอเมริกา

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) Tempunit TU-16D รุ่น FDP6D ของบริษัท Techne (Cambridge) Limited ประเทศอังกฤษ

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Waterbath Shaker) รุ่น G86&R86 ของบริษัท New Brunswick Scientific Company ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Minor 35 MSE ของบริษัท MSE Ltd. ประเทศอังกฤษ

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น KT-30SD ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดจิบเบอเรลลิก(GA_3) มาตรฐาน	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
พาราเซตามอล	ATLANTIC LABORATORIE ประเทศไทย
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK ประเทศเยอรมัน
เมธานอล	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK ประเทศเยอรมัน
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรท	FLUKA ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
อลูมิเนียมออกไซด์	MERCK ประเทศเยอรมัน
เรซิน Quaron AU-808	QUARTZ CHEMICAL COMPANY

สารเคมีที่ใช้นอกจากดังที่กล่าวมาแล้วยังมีสารชนิดอื่นอีก เช่น เอทธิลอะซิเตต โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4) และสารอาหารชนิดอื่น เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินจะใช้เป็นเกรดทางการค้า (commercial grade) ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ส่วนกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้วได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด

2.2 น้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากกระบวนการหมัก (fermentation broth)

น้ำหมักที่ใช้ในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกในงานวิจัยนี้ ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi N9-34 ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดย จันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) และได้ผ่านการหมักเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขยายส่วน ในถังหมักขนาด 300 ลิตร โดย สันติ เหมศรี (2539)

2.3 วิธีเก็บรักษาน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากกระบวนการหมัก

น้ำหมักของเชื้อ Gibberella fujikuroi ที่ได้จากการหมักในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน นำไปปั่นแยกเซลล์เส้นใยเชื้อราออกจากน้ำหมัก แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -10 °ซ

2.4 วิธีการวิเคราะห์

2.4.1 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยมาตรวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) ตามวิธีการของ อรไท สุขเจริญ (2533)

นำน้ำหมักซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่ใช้คือ ยาพาราเซตามอล เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียว เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าผสม นาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้นแล้วจึงนำชั้นของน้ำหมักปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดด้วย เอทธิลอะซิเตต ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสม นาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นของเอทธิลอะซิเตตมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อขจัดน้ำ นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาละลายด้วยสารละลายเมธานอล เข้มข้นร้อยละ 35 ในสารละลายกรดฟอสฟอริก ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตตที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเครื่อง HPLC คำนวณปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค-1)

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการของ อรไท สุขเจริญ (2533)

คอลัมน์	: Spherisorb 5 C8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 46 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	: เมธานอลและสารละลายกรดฟอสฟอริก ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 อัตราส่วน 35 ต่อ 65 คงที่ตลอดการทดลอง
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ตรวจวิเคราะห์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	: 208 นาโนเมตร
ความไวของเครื่องตรวจวัด	: 0.08 AUFS (absorbance unit full scale)
ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์	: 10 ไมโครลิตร
ความดัน	: 195-225 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
เวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ (retention time)	: 8.90-10.00 นาที

2.5 การเตรียมแอนไอออนเรซิน

ทำให้แอนไอออนเรซินชนิด strong ที่ใช้ในงานวิจัย Quaron AU-808 ให้มีเคาน์เตอร์ไอออน (cuonter ion) คือ OH^- โดยการแช่แอนไอออนเรซิน 100 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1โมลาร์ปริมาตร 200 มล. ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เขย่าเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นบรรจุเรซินที่ได้ลงในคอลัมน์ ล้างด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้วจนน้ำล้างเรซินมีสภาพเป็นกลาง นำเรซินที่ได้ไปใช้ในงานวิจัยต่อไป

2.6 การทดลองในระบบแบทช์

2.6.1 <u>การหาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินในการดูดซับและการชะกรดจิบเบอเรลลิก</u>

2.6.1.1 <u>ขั้นตอนการดูดซับ</u>

เตรียมน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกที่ทราบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

เริ่มต้นโดยวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองที่ 2.4.2 ใช้แอนไอออนเรซินชนิด strong ชื่อทางการค้า Quaron AU-808 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. พร้อมกับน้ำหมัก 50 มล.ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 9.0 นำไปตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 °ซ เก็บตัวอย่างส่วนของเหลวมาวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ จนถึงจุดที่เรซินอิ่มตัวในการดูดซับ

2.6.1.2 ขั้นตอนการชะ

จากตัวอย่างเรซินแลกเปลี่ยนแอนไอออนที่ดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกจากข้อ 2.6.1.1 เมื่อกรองแยกส่วนของเหลวออกนำเรซินมาชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มล. นำไปตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25°ซ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์จนกว่าจะถึงจุดที่เรซินอิ่มตัวในการชะ

2.6.2 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการดูดซับและการชะ

2.6.2.1 การศึกษาปัจจัย pH เริ่มต้น

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตามวิธีในภาคผนวก ข-1.1) และสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวก ก-1) ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 และ 12.0 ตามลำดับ นำสารละลายที่เตรียมไว้ตั้งบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 3 ชม. เก็บตัวอย่างสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในอาหารเหลวที่มีค่า ความเป็นกรด-ด่างต่างๆวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นสารตัวอย่างควบคุม (control)

2.6.2.2 ชนิดของตัวชะ

เตรียมการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 2.6.1.1 โดยปรับค่า pH เริ่มต้นของน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกในขั้นตอนการดูดซับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (ทราบจากการทดลองที่ 2.6.2.1) นำไปตั้งบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 1 ชม. เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองที่ 2.4.2 จากนั้นทำการชะเรซินแลกเปลี่ยนแอนไอออนที่ดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก โดยแปรชนิดตัวชะได้แก่

- สารละลาย 95% เมธานอลที่มี 5% (w/v)กรดไฮโดรคลอริก
- สารละลาย 93% เมธานอลที่มี 7% (w/v)กรดไฮโดรคลอริก
- สารละลาย 91% เมธานอลที่มี 9% (w/v)กรดไฮโดรคลอริก
- สารละลาย 89% เมธานอลที่มี 11% (w/v)กรดไฮโดรคลอริก
- สารละลาย 87% เมธานอลที่มี 13% (w/v)กรดไฮโดรคลอริก

ทำการชะ 3 ครั้ง โดยใช้ปริมาณตัวชะ 10 มล.ในการชะแต่ละครั้ง ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 1 ชม. เก็บตัวอย่างสารละลายที่ได้ในการชะแต่ละรอบวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตามวิธีการทดลองที่ 2.4.2

2.6.2.3 <u>การศึกษาปัจจัยอุณหภูมิต่อการดูดซับและการชะ</u>

เตรียมการทดลองตามการทดลองที่ 2.6.2.2 ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. โดยแปรอุณหภูมิในระหว่างขั้นตอนการดูดซับและการชะกรดจิบเบอเรลลิกเป็น 25 30 35 และ 40°ซ ตามลำดับ และใช้ตัวชะที่เหมาะสมที่ทราบจากการทดลองที่ 2.6.2.2 เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองที่ 2.4.2

2.6.2.4 <u>การหาค่าคงที่ Selectivity coefficient</u>

เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.6.2.3 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขั้นตอนการดูดซับและการชะกรดจิบเบอเรลลิกที่ทราบจากการทดลองที่ 2.6.2.3 วัดความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับและชะออกจากเรซิน นำมาคำนวณค่า Selectivity coefficient ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

<u>การคำนวณ</u>

$$K_{OH^-}^{GA} = \frac{R_{GA} \times C_{OH^-}}{R_{OH^-} \times C_{GA}}$$

R_{GA} = ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับบนเรซิน หน่วยโมลาร์

R_{OH^-} = ปริมาณไฮดรอกไซด์ที่ถูกดูดซับบนเรซิน หน่วยโมลาร์

C_{OH^-},C_{GA} = ความเข้มข้นไฮดรอกไซด์และกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลาย ตามลำดับ หน่วยโมลาร์

2.7 การทดลองในระบบคอลัมน์

2.7.1 วัด Breakthrough curve

เตรียมน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกที่ทราบความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกเริ่มต้นโดยการวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองที่ 2.4.2 ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 12 โมลาร์ ใช้แอนไอออนเรซินชนิด strong (OH^- form) บรรจุลงในคอลัมน์ชนิดที่ควบคุมอุณหภูมิได้อุณหภูมิ 25 °ซ คอลัมน์ที่ใช้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.47 ซม. บรรจุแอนไอออนเรซินในคอลัมน์ คิดเป็นปริมาตร (bed volume) เท่ากับ 23.25 ลบ.ซม.ต่อปั๊มกับสายยางที่ออกจากคอลัมน์ ใช้อัตราการไหล 200 มล.ต่อซม.(คิดเป็นหน่วย space velocity เท่ากับ 8.6 ซม$^{-1}$) เก็บเป็นลำดับส่วน 5 มล.ต่อหลอดทดลอง ในขั้นตอนการดูดซับหลังจากการผ่านน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกหมดแล้ว ใช้เมธานอลล้างเรซินจนกรดจิบเบอเรลลิกส่วนที่ไม่ถูกดูดซับล้างออกจนหมด จากนั้นใช้สารละลาย 91%เมธานอลที่มี 9%(w/v)กรดไฮโดรคลอริก เป็นตัวชะกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับบนเรซิน ใช้อัตราการไหล 50 มล. ต่อ ซม.(คิดเป็นหน่วย space velocity เท่ากับ 2.15 ซม$^{-1}$) เก็บลำดับส่วนในขั้นตอนการชะนี้จนกระทั่งวิเคราะห์แล้วไม่พบว่ามีกรดจิบเบอเรลลิก

2.7.2 ศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ

เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.7.1 แปรอุณหภูมิระหว่างการทดลองในขั้นตอนการดูดซับและการชะจาก 25 °ซ เป็น 30 °ซ และ 35 °ซ ตามลำดับ

2.7.3 ศึกษาปัจจัยของอัตราการไหล

เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.7.1 ใช้อุณหภูมิของระบบ 25 °ซ ทำการแปรอัตราการไหล โดยใช้หน่วย space velocity (ซม.$^{-1}$)

การคำนวณ

$$\text{space velocity (ซม.}^{-1}\text{)} = \frac{\text{อัตราการไหล (มล./ซม.)}}{\text{ความจุเรซินในคอลัมน์ (มล.)}}$$

แปรอัตราการไหลในขั้นตอนการดูดซับ คือ 5.0 6.0 7.0 8.60 และ 9.0 ซม.$^{-1}$ ตามลำดับ และในขั้นตอนการชะ คือ 1.72 2.15 3.0 และ 4.0 ซม.$^{-1}$ ตามลำดับ