

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมน้ำหมักของกรดจิบเบอเรลลิค จากเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในถังหมัก 30 ลิตร

หมักเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในถังหมัก 30 ลิตร โดยใช้ภาวะของสัณติ เหมศรี (2539) เป็นภาวะอ้างอิง มีการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อให้สร้างสปอร์จากอาหารแข็ง เอียงอะซิเตด (Acetate agar slant) เป็นอาหารแข็งเอียงของน้ำคัมต้นข้าวโพด (ภาคผนวก ก-2) เนื่องจากพบว่าเชื้อสร้างสปอร์ได้น้อยในอาหารแข็งเอียงอะซิเตด และที่ภาวะเดียวกันเมื่อเปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหารแข็งเอียงของน้ำคัมต้นข้าวโพด เชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้มากขึ้นในปริมาณที่เพียงพอที่จะใช้งานต่อไป

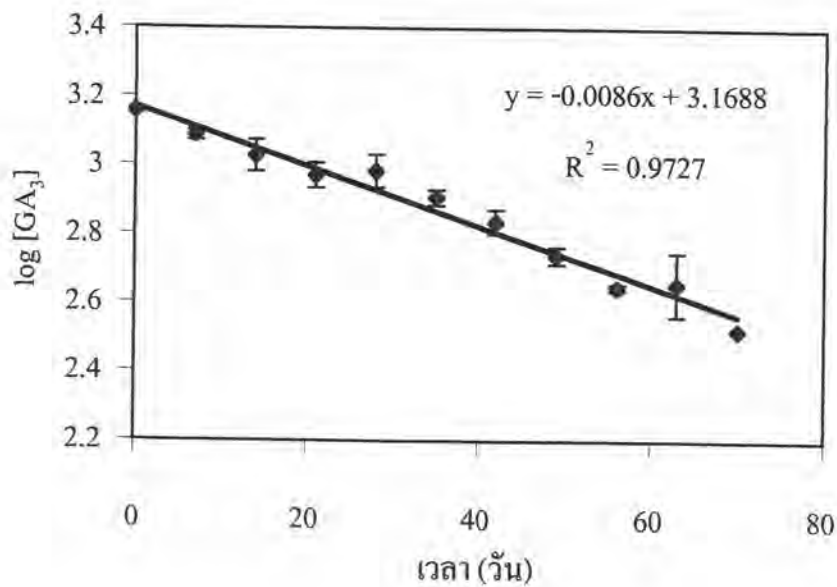
เมื่อทำการหมักเชื้อราในถังหมัก 30 ลิตรเป็นเวลา 7 วัน สารที่ได้จากการหมักมีลักษณะเป็นของเหลวข้น สีส้มอมเหลือง หลังการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์และเส้นใยราออก น้ำหมักที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองทอง มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.4 จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิคตามวิธีทดลองข้อ 2.5.1 พบว่าในน้ำหมักมีปริมาณกรดจิบเบอเรลลิคประมาณ 800-1,100 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งน้ำหมักที่ได้เป็นส่วน ๆ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพน้ำหมักให้คงที่สำหรับการใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิคในน้ำหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ศึกษาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิคในน้ำหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตามวิธีทดลองข้อ 2.6.1 แปรอุณหภูมิที่ 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุดการทดลองในแต่ละอุณหภูมิ วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิคในน้ำหมักที่ผ่านการควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลาต่าง ๆ กัน ด้วย HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.5.1 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ ง-1 ถึง ง-4 ในภาคผนวก ง หาค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิคที่เวลาต่าง ๆ จากการทดลอง 3 ชุด ได้ผลตามตารางที่ 3-1 ถึง 3-4 ตามลำดับ คำนวณค่าลอกการิทึมของความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิคที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลองทั้ง 3 ชุด เขียนกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยของลอกการิทึมกับเวลา ได้ดังรูปที่ 3-1 ถึง 3-3

ตารางที่ 3-1 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก เมื่อทำการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน

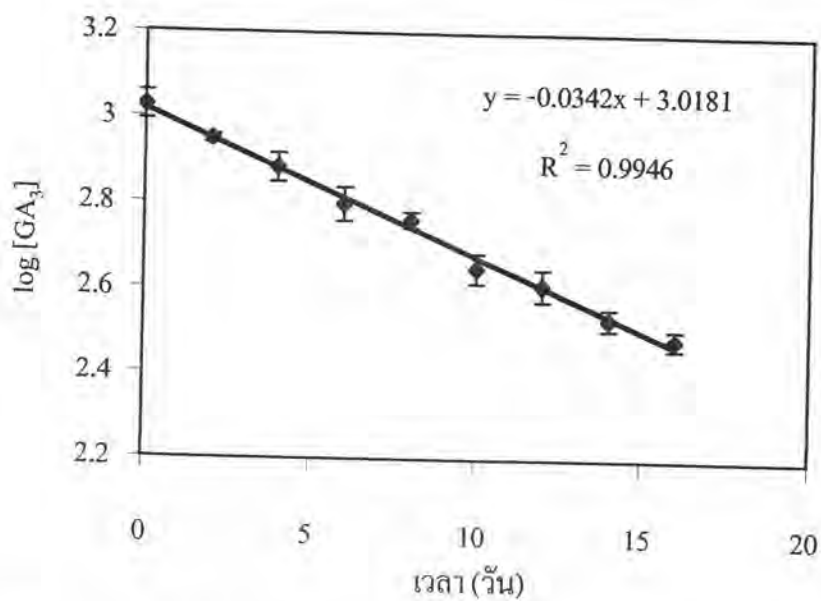
เวลาที่ควบคุมอุณหภูมิ (วัน)	ปริมาณ GA ₃ ในน้ำหมัก (มก./ล.)
0	1432.67
7	1222.29
14	1069.48
21	936.71
28	965.64
35	807.76
42	688.27
49	548.28
56	441.94
63	398.93
70	332.97



รูปที่ 3-1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาในการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-2 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก เมื่อทำการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน

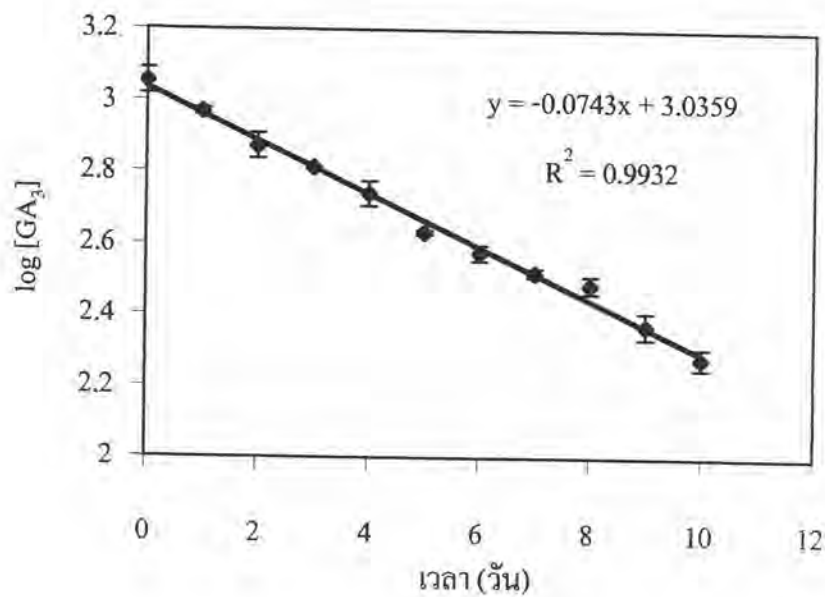
เวลาที่ควบคุมอุณหภูมิ (วัน)	ปริมาณ GA ₃ ในน้ำหมัก (มก./ล.)
0	1064.68
2	890.45
4	765.75
6	630.45
8	578.08
10	447.61
12	408.90
14	341.31
16	306.22



รูปที่ 3-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาในการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-3 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก เมื่อทำการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน

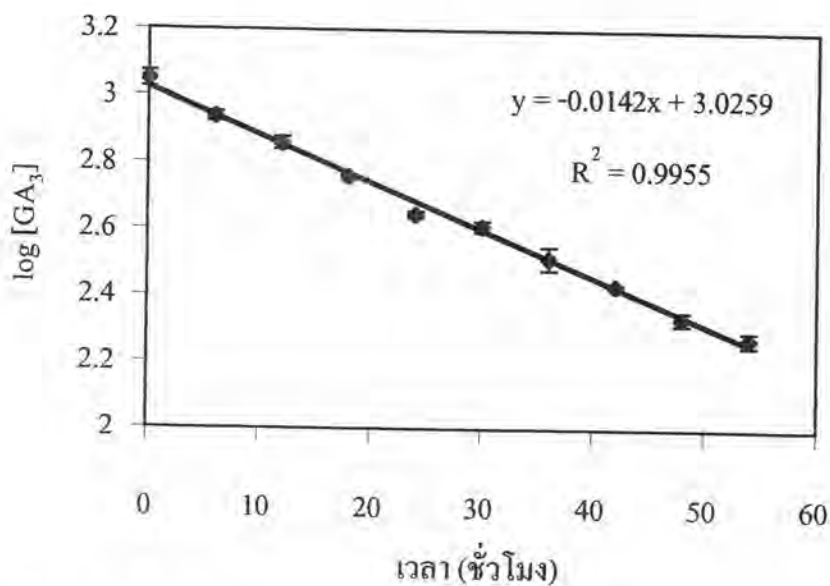
เวลาที่ควบคุมอุณหภูมิ (วัน)	ปริมาณ GA ₃ ในน้ำหมัก (มก./ล.)
0	1133.99
1	931.54
2	779.71
3	659.87
4	549.55
5	427.03
6	375.65
7	329.90
8	306.30
9	235.53
10	190.45



รูปที่ 3-3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาในการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-4 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก เมื่อทำการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน

เวลาที่ควบคุมอุณหภูมิ (ชั่วโมง)	ปริมาณ GA_3 ในน้ำหมัก (มก./ล.)
0	1120.77
6	867.28
12	722.89
18	573.33
24	441.85
30	407.62
36	327.56
42	271.47
48	216.71
54	118.10



รูปที่ 3-4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาในการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 50 องศาเซลเซียส

ข้อมูลจากตารางแสดงให้เห็นว่า ทุก ๆ อุณหภูมิที่ทำการทดลอง กรดจิบเบอเรลลิกเกิดการสลายตัวเมื่อละลายอยู่ในน้ำหมัก แต่มีอัตราการสลายตัวแตกต่างกันไป จากเส้นกราฟในรูปที่ 3-1 ถึง 3-4 แสดงให้เห็นว่า ค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักกับเวลาที่ถูกรวบรวมอุณหภูมิ มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง แสดงว่าปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักเป็นปฏิกิริยาลำดับที่ 1 (first-order reaction) ปฏิกิริยารวมอยู่ในรูป $GA_3 \longrightarrow$ ผลิตภัณฑ์ สมการของอัตราเร็วของปฏิกิริยา (Barrow, 1988) คือ

$$\text{อัตราการเกิดปฏิกิริยา} = \frac{-d [GA_3]}{dt} = k [GA_3] \quad (3-1)$$

สมการอินทิเกรตอยู่ในรูป

$$\log [GA_3] = \frac{-kt}{2.303} + \log [GA_3]_0 \quad (3-2)$$

คำนวณหาค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา (reaction rate constant) ; k เพื่อใช้เปรียบเทียบอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักที่อุณหภูมิต่างๆ จากความชันของกราฟ ได้ผลดังตารางที่ 3-5 โดยความชันของกราฟเท่ากับ $-k / 2.303$ พิจารณาค่า k จากตารางพบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ค่า k จะเพิ่มขึ้น แสดงได้ว่า ที่ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกเริ่มต้นเท่ากัน อัตราเร็วของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

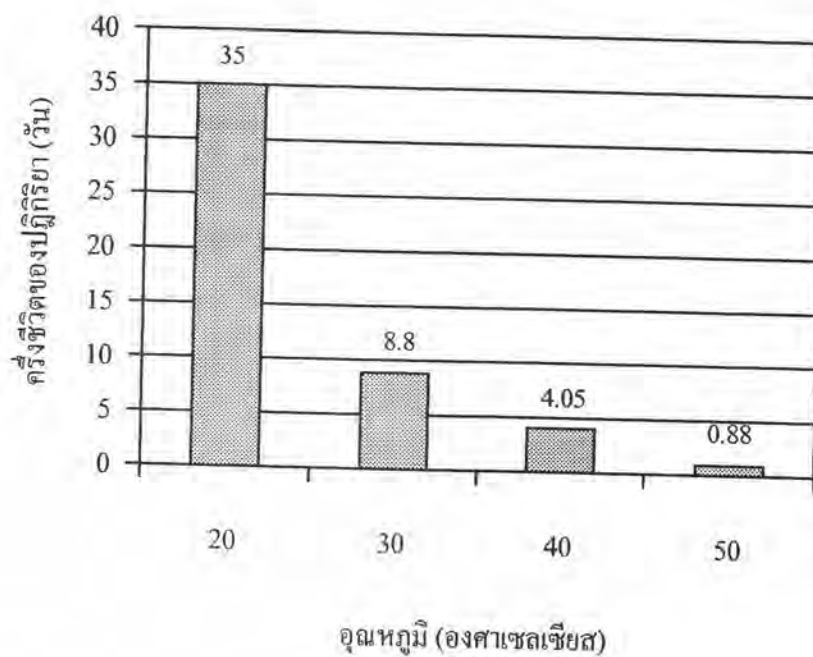
นำค่า k มาคำนวณหาค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยา (half-life for a reaction) : $t_{1/2}$ จากสมการ

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (3-3)$$

$t_{1/2}$ คือ เวลาซึ่งความเข้มข้นของสารที่เข้าทำปฏิกิริยาเหลือเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเริ่มต้น เป็นค่าที่แสดงความเร็วสัมพันธ์ของปฏิกิริยา ผลการหาค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมิต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3-5 และรูปที่ 3-5 โดย $t_{1/2}$ มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เป็นการยืนยันว่าการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักจะเกิดเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ค่า $t_{1/2}$ นี้จะนำไปพิจารณาในการเลือกอุณหภูมิสำหรับการทดลองขั้นต่อไป ที่เกี่ยวข้องกับสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำ

ตารางที่ 3-5 ค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา (k) และค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิเคลวิน (K)	k ($\times 10^7$ วินาที ⁻¹)	$t_{1/2}$ (วัน)
20	293	2.2923	35.00
30	303	9.1160	8.80
40	313	19.8047	4.05
50	323	90.8406	0.88



รูปที่ 3-5 เปรียบเทียบค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ค่า k ที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสลายตัวของ
 อุณหภูมิอื่น ๆ ที่ไม่ได้ทำการทดลอง โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่ของอัตราการเกิด
 ปฏิกิริยากับอุณหภูมิตามสมการอาร์เรเนียส (Arrhenius equation) ดังนี้

$$k = A e^{-E_a / RT} \quad (3-4)$$

หรือ

$$\ln k = - \frac{E_a}{RT} + \ln A \quad (3-5)$$

คำนวณค่า k ในรูป $\ln k$ และอุณหภูมิ (T) ในหน่วยเคลวิน ดังตารางที่ 3-6 เขียนกราฟระหว่าง
 $\ln k$ กับ $1/T$ ดังรูปที่ 3-6 จะได้กราฟเส้นตรงมีความชัน = -11166 ซึ่งเท่ากับค่า $-E_a/R$ เมื่อ R คือ
 ค่าคงที่ของแก๊ส มีค่าเท่ากับ 8.314×10^{-3} กิโลจูล.โมล⁻¹เคลวิน⁻¹ และจุดตัดแกน y เท่ากับ 22.818
 ซึ่งเท่ากับ $\ln A$ ดังนั้น

$$\begin{aligned} \text{พลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา (} E_a \text{)} &= 92.8341 \quad \text{กิโลจูล. โมล}^{-1} \\ \text{พรีเอกโปเนนเชียลแฟกเตอร์ (} A \text{)} &= 8.1233 \times 10^9 \quad \text{วินาที}^{-1} \end{aligned}$$

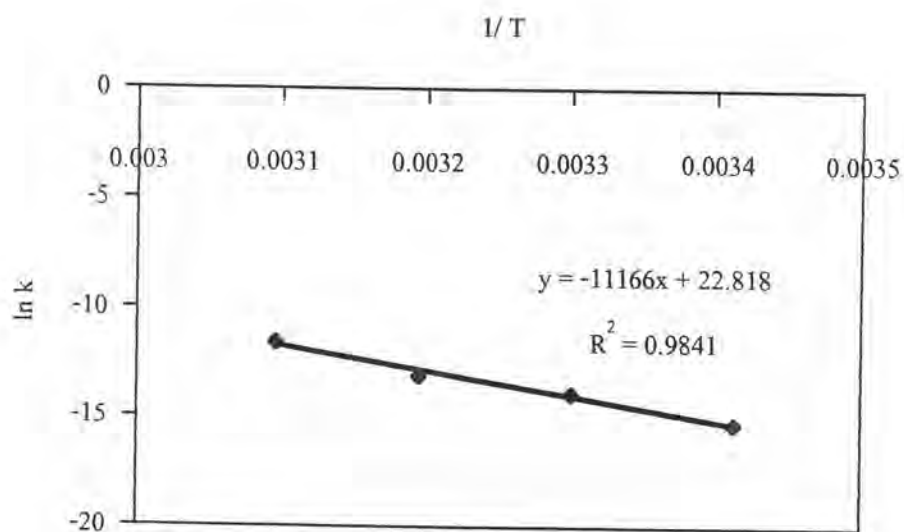
สมการอาร์เรเนียสของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก คือ

$$k = 8.1233 \times 10^9 \cdot e^{-92.8341 / RT} \quad (3-6)$$

จากสมการที่ 3-6 สามารถหาค่า k และ $t_{1/2}$ ของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกใน
 น้ำหมักที่อุณหภูมิข้างเคียงได้ต่อไป

ตารางที่ 3-6 ส่วนกลับของอุณหภูมิเคลวิน ($1/T$) กับค่าลอการิทึมของค่าคงที่ของอัตรา
การเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก ($\ln k$)

อุณหภูมิเคลวิน (T)	$1/T$ ($\times 10^3$)	ค่าคงที่ของอัตรา การเกิดปฏิกิริยา ; k ($\times 10^7$ วินาที $^{-1}$)	$\ln k$
293	3.41	2.29	-15.29
303	3.30	9.12	-13.91
313	3.19	19.80	-13.13
323	3.10	90.84	-11.61



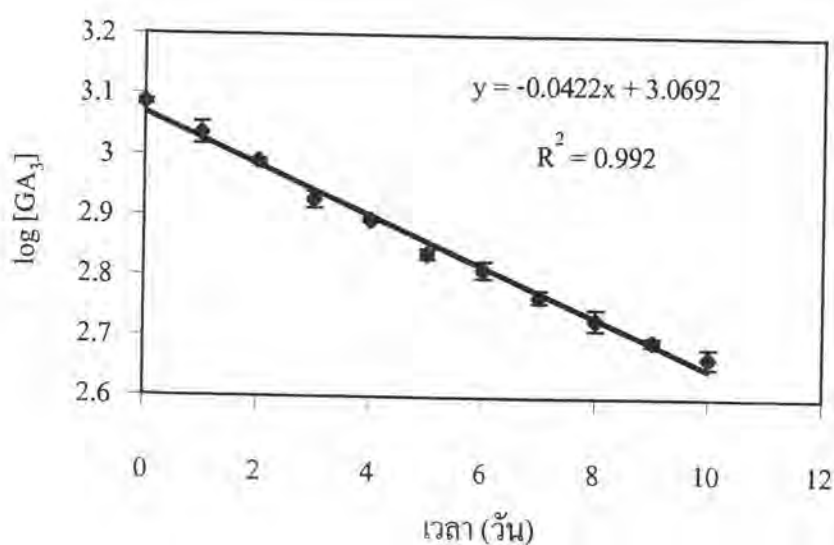
รูปที่ 3-6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln k$ กับส่วนกลับของอุณหภูมิเคลวินของปฏิกิริยา
การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก

3.3 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ

ทดลองหาค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการกำหนดภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองที่เกี่ยวข้องกับพีเอช โดยเตรียมสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย แปรค่าพีเอชที่ 5, 6.3, 7 และ 8 นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ตามวิธีทดลองข้อ 2.6.2 ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุดต่อหนึ่งค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตามวิธีทดลองข้อ 2.5.2 ได้ผลดังตารางที่ 3-5 ถึง 3-8 ในภาคผนวก หาค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลองทั้ง 3 ชุด ได้ดังตารางที่ 3-7 ถึง 3-10 พิจารณาข้อมูลจากตาราง พบว่า กรดจิบเบอเรลลิกมีปริมาณลดลงตามลำดับเมื่อเวลาในการทดลองเพิ่มขึ้น แสดงว่า กรดจิบเบอเรลลิกเกิดการสลายตัวเมื่อละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ในทุก ๆ พีเอชที่ทดลอง เปรียบเทียบอัตราการสลายตัว โดยคำนวณค่าลอกการิทึมของความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกจากผลการทดลองทั้ง 3 ชุด แล้วนำค่าเฉลี่ยของค่าลอกการิทึมมาเขียนกราฟกับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ ได้ผลเป็นกราฟเส้นตรงดังรูปที่ 3-7 ถึง 3-10 หาค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา (k) จากความชันของกราฟ นำค่า k มาคำนวณหาครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2 ได้ผลตามตารางที่ 3-11 ค่า k ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้น ส่วน $t_{1/2}$ มีค่าลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น แสดงว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Percz และคณะ (1996) ที่ศึกษาพบการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 5 และ 7 โดยอัตราการสลายตัวจะสูงขึ้นตามค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่า $t_{1/2}$ ที่พีเอชต่าง ๆ ดังรูปที่ 3-11 พบว่า ค่า $t_{1/2}$ มีแนวโน้มลดลงอย่างช้า ๆ เมื่อพีเอชเปลี่ยนแปลงในช่วงพีเอช 5 ถึง 8

ตารางที่ 3-7 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อละลายอยู่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5 เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

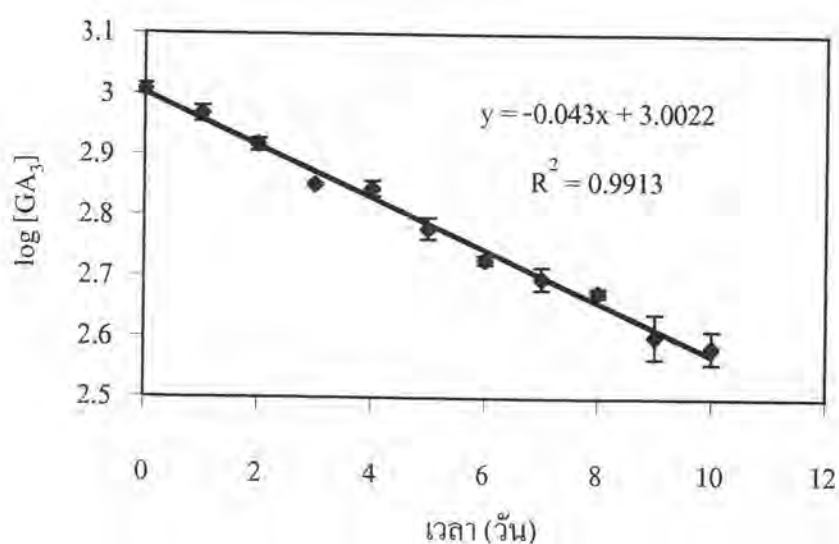
เวลาที่ GA_3 อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (วัน)	ปริมาณ GA_3 ในสารละลายบัฟเฟอร์ (มก./ล.)
0	1218.88
1	1087.25
2	976.75
3	844.99
4	782.75
5	688.39
6	649.22
7	586.23
8	536.86
9	494.24
10	465.26



รูปที่ 3-7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-8 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อละลายอยู่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 6.3 เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

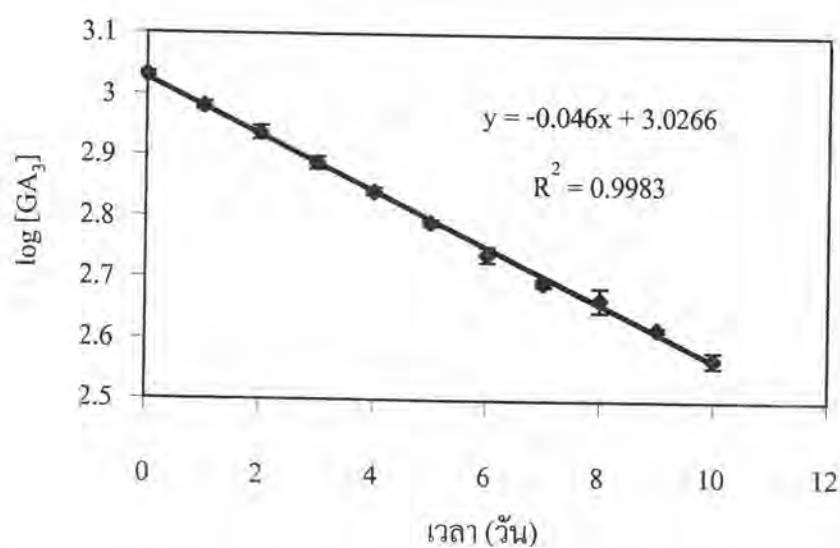
เวลาที่ GA ₃ อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (วัน)	ปริมาณ GA ₃ ในสารละลายบัฟเฟอร์ (มก./ล.)
0	1019.77
1	929.95
2	827.16
3	710.41
4	700.03
5	601.48
6	533.87
7	498.32
8	472.96
9	401.40
10	385.30



รูปที่ 3-8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-9 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อละลายอยู่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7 เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

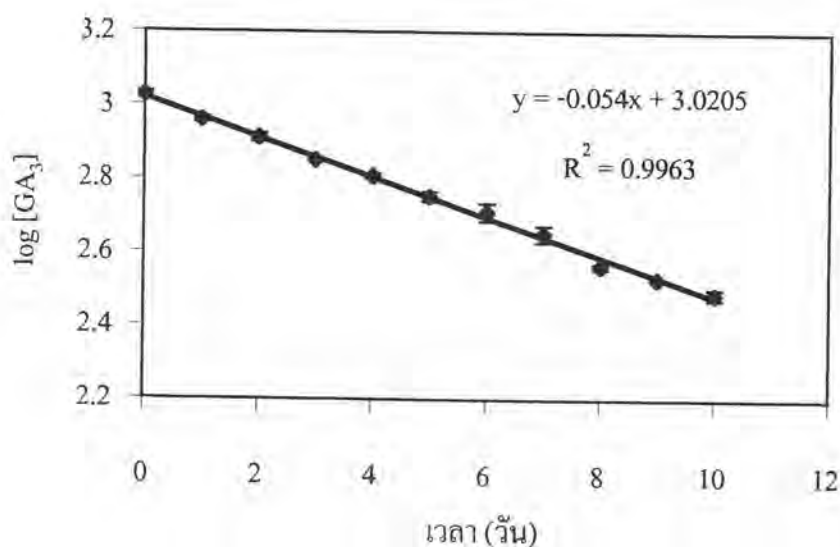
เวลาที่ GA ₃ อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (วัน)	ปริมาณ GA ₃ ในสารละลายบัฟเฟอร์ (มก./ล.)
0	1076.36
1	957.09
2	866.60
3	773.46
4	694.48
5	618.64
6	549.38
7	494.52
8	463.83
9	415.74
10	371.60



รูปที่ 3-9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-10 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อละลายอยู่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 8 เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

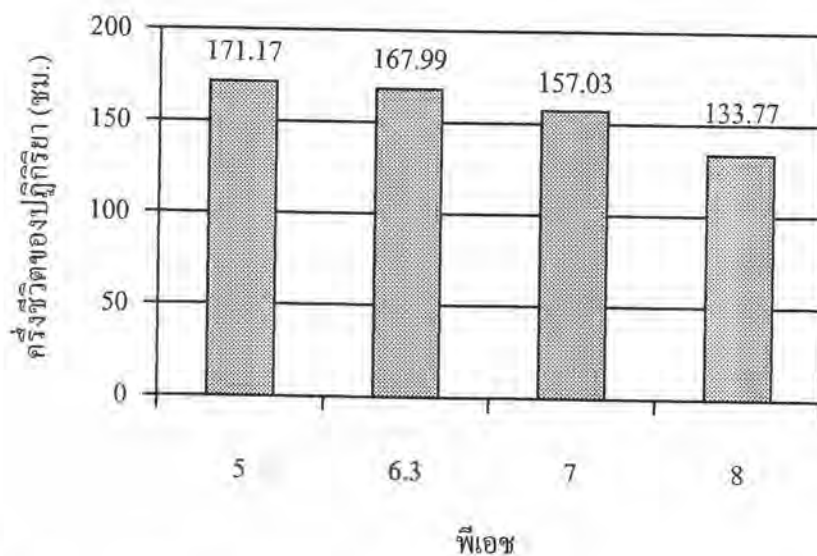
เวลาที่ GA_3 อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (วัน)	ปริมาณ GA_3 ในสารละลายบัฟเฟอร์ (มก./ล.)
0	1062.06
1	911.62
2	816.72
3	708.52
4	642.84
5	567.22
6	514.97
7	449.42
8	366.41
9	339.35
10	308.83



รูปที่ 3-10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-11 ค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา (k) และค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

พีเอช	ค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา ($\times 10^6$ วินาที ⁻¹)	ค่าครึ่งชีวิต (ชั่วโมง)
5	1.12	171.17
6.3	1.15	167.99
7	1.23	157.03
8	1.44	133.77



รูปที่ 3-11 เปรียบเทียบค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

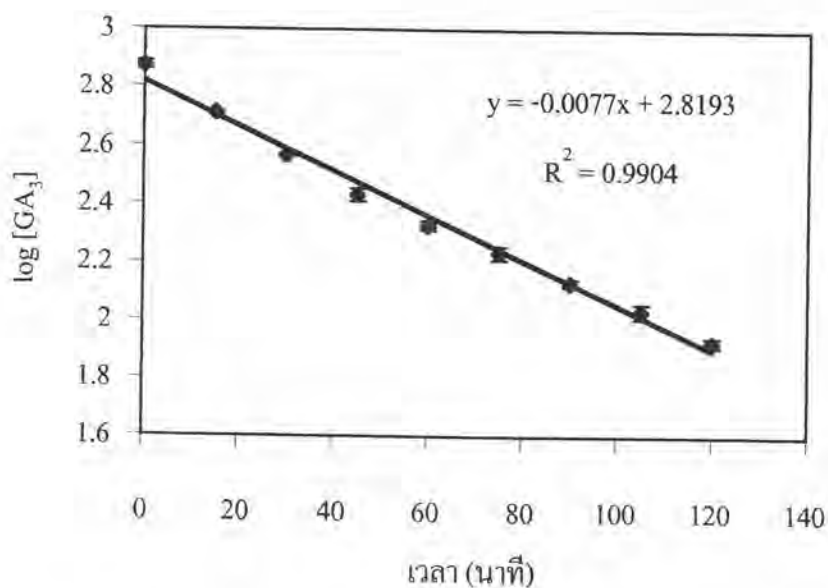
3.4 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายเบส

ในการพิจารณาเลือกสารละลายตัวชะ เพื่อใช้ชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากเรซินแลกเปลี่ยนไอออนในการทดลองขั้นต่อไป สารละลายเบสในน้ำเป็นตัวเลือกหนึ่ง ซึ่งในทางทฤษฎีน่าจะเหมาะสมสำหรับชะสารออกจากเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ เนื่องจากจะแตกตัวให้ไอออนที่สามารถแตกที่เข้าจับกับหมู่ฟังก์ชันของเรซินได้ เช่น ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH) จากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายแอมโมเนียในน้ำ มีรายงานว่าสารละลายแอมโมเนียในน้ำ และสารละลายอัลคาไลบัฟเฟอร์สามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบได้ (Roux, et al., 1964 และ Bruckner and Blechschmidt, 1991) แต่มีข้อสังเกตจากรายงานของ Cross และคณะ (1961) และ du Preez และคณะ (1993) ว่า เสถียรภาพของกรดจิบเบอเรลลิกจะถูกทำลายเมื่อละลายอยู่ในสารละลายเบสเจือจาง เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 0.1 โมลาร์

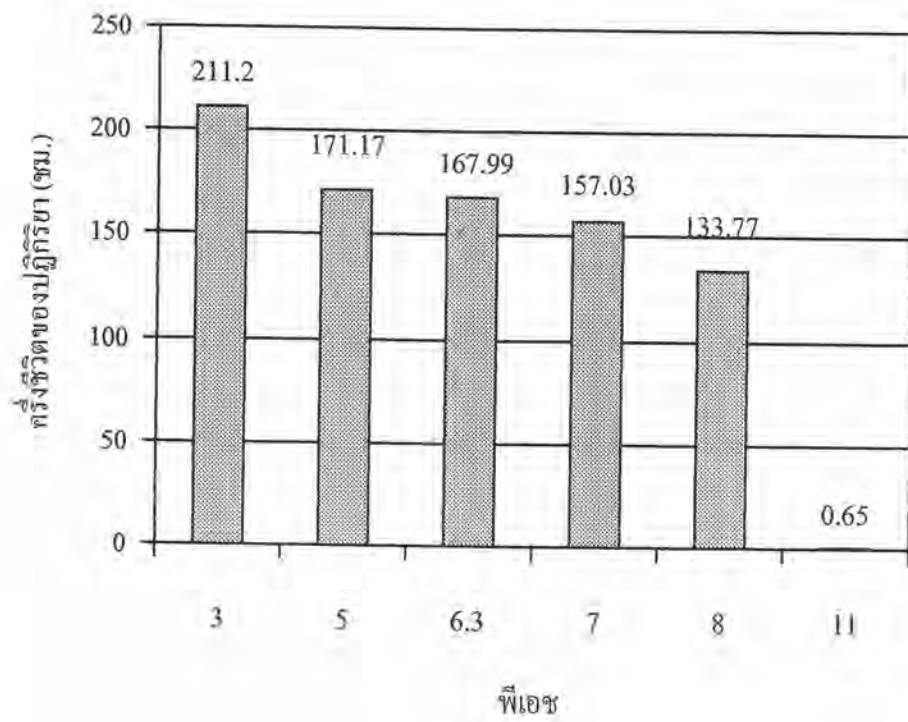
การทดลองต่อไปนี้มีขึ้นเพื่อศึกษาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายเบส โดยละลายกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 11 นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด วิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลือในสารละลายทุก 15 นาที ตามวิธีทดลองข้อ 2.6.3 และวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.5.2 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-9 ในภาคผนวก ง หาค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เวลาต่าง ๆ ได้ดังตารางที่ 3-12 ข้อมูลจากตารางแสดงให้เห็นว่า ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกลดลงอย่างรวดเร็ว จาก 700 มิลลิกรัมต่อลิตรมาเป็น 80 มิลลิกรัมต่อลิตรภายในเวลา 2 ชั่วโมง หาค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา โดยเขียนกราฟระหว่างค่าเฉลี่ยของลอการิทึมของความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกกับเวลาที่ละลายอยู่ในสารละลายเบส ได้กราฟเส้นตรงมีความชันเท่ากับ -0.0077 นำไปคำนวณหาค่า k และ $t_{1/2}$ ตามวิธีในผลการทดลองข้อ 3.2 ได้ค่า k เท่ากับ 2.9555×10^{-4} วินาที⁻¹ ค่า $t_{1/2}$ เท่ากับ 39.09 นาที จากค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาที่ได้ แสดงให้เห็นว่า เกิดการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิก อย่างรวดเร็วเมื่อละลายอยู่ในสารละลายเบส และเมื่อนำค่า $t_{1/2}$ มาเปรียบเทียบกับค่า $t_{1/2}$ ของการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายน้ำ พีเอชต่าง ๆ จากผลการทดลองข้อ 3.2 และ 3.3 ดังรูปที่ 3-13 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ากรดจิบเบอเรลลิกเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็ว เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีพีเอชสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานข้างต้น ดังนั้นจึงไม่เลือกที่จะใช้สารละลายเบสในการทดลองชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

ตารางที่ 3-12 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อละลายอยู่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ พีเอช 11 เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ปริมาณ GA_3 ในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (มก./ล.)
0	748.44
15	515.51
30	368.73
45	270.43
60	212.53
75	171.47
90	135.52
105	108.22
120	84.47



รูปที่ 3-12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ พีเอช 11 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3-13 เปรียบเทียบครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิก
ในสารละลายน้ำ พีเอชต่าง ๆ

3.5 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลินในสารละลายตัวชะ

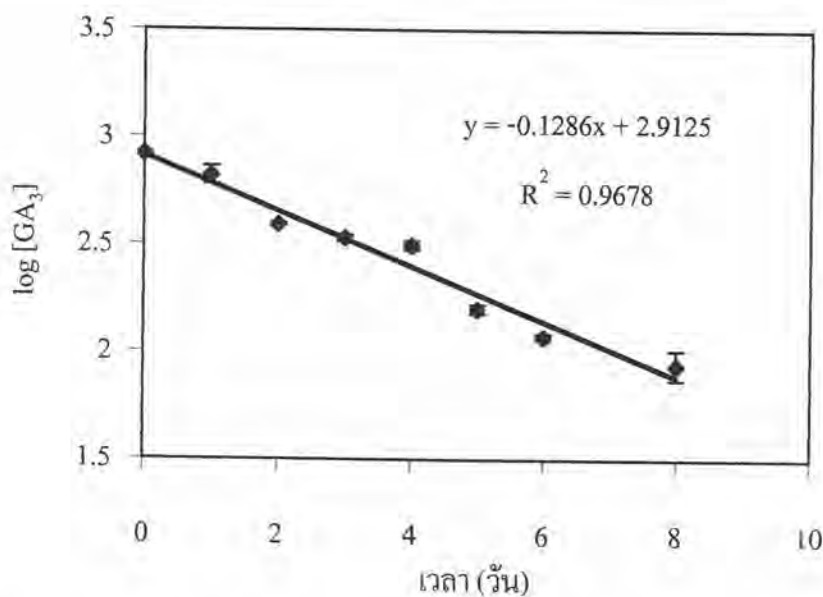
มีรายงานว่า สารละลายเมธานอลในน้ำที่มีการเติมกรดเข้มข้นเล็กน้อย สามารถใช้เป็นตัวชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากเรซินแลกเปลี่ยนไอออนได้ (Merck & Co., Inc., 1960) แต่ไม่ได้กล่าวถึงผลกระทบของสารละลายตัวชะนี้ต่อเสถียรภาพของกรดจิบเบอเรลลิน อย่างไรก็ตามมีรายงานของ Cross (1954) และ Grove และ Mulholland (1960) ว่า กรดจิบเบอเรลลินสลายตัวได้ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง จึงได้ทำการทดลองหาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลินในสารละลายตัวชะนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกใช้สารตัวชะต่อไป

ทดลองหาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลินในสารละลายตัวชะ 2 ชนิด คือ สารละลาย 93 % โดยปริมาตรของเมธานอลในน้ำ ที่เติมกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกรดเข้มข้นต่อปริมาตรสารละลาย และ สารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก มีวิธีทดลองตามข้อ 2.6.4 เก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนดและวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลินตามวิธีทดลองข้อ 2.5.3 ได้ผลดังตารางที่ 3-13 และ 3-14 ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการลดลงของปริมาณกรดจิบเบอเรลลินอย่างรวดเร็ว เมื่อกรดจิบเบอเรลลินละลายอยู่ในสารละลาย 93 % เมธานอลที่เติมกรดไฮโดรคลอริก แต่สำหรับกรดจิบเบอเรลลินที่ละลายใน 93 % เมธานอล ที่เติมกรดอะซิติก สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดได้น้อยมาก คำนวณค่าออกการิทึมของความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิน นำมาเขียนกราฟกับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลินละลายอยู่ในสารละลาย ได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 3-14 และ 3-15 คำนวณหาค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจากความชันของกราฟ และนำค่า k มาคำนวณหาค่า $t_{1/2}$ ตามวิธีในผลการทดลองข้อ 3.1 ได้ผลดังตารางที่ 3-15 เมื่อเปรียบเทียบค่า k และค่า $t_{1/2}$ พบว่า กรดจิบเบอเรลลินที่ละลายอยู่ในสารละลาย 93 % เมธานอล ที่เติมกรดไฮโดรคลอริก มีอัตราการสลายตัวสูงกว่ากรดจิบเบอเรลลินที่ละลายอยู่ในสารละลาย 93 % เมธานอลที่เติมกรดอะซิติกมาก โดยในสารละลายเมธานอลที่เติมกรดอะซิติกมีครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาการสลายตัวมากกว่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาในสารละลายเมธานอลที่เติมกรดไฮโดรคลอริก ประมาณ 100 เท่า

ดังนั้นในการทดลองชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากเรซินแลกเปลี่ยนไอออนในขั้นตอนต่อไปจะเลือกใช้สารละลายเมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก เป็นสารละลายตัวชะ

ตารางที่ 3-13 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อละลายอยู่ในสารละลาย 93 % เมธานอลที่เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกรดต่อปริมาตรสารละลาย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

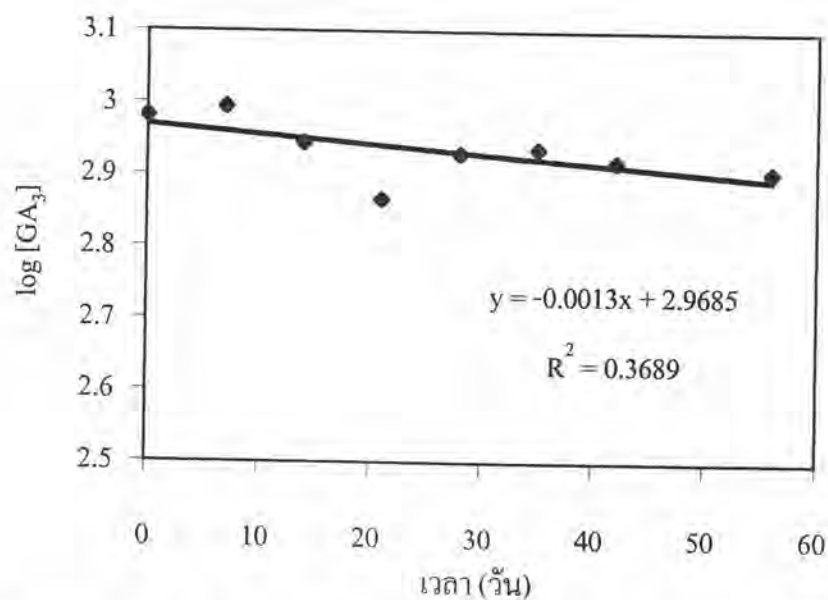
เวลา (วัน)	ปริมาณ GA_3 ใน สารละลายตัวชะ (มก./ล.)
0	829.18
1	665.42
2	393.28
3	338.23
4	312.44
5	158.26
6	117.96
8	87.76



รูปที่ 3-14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log [GA_3]$ กับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่ในสารละลาย 93 % เมธานอลที่เติมกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกรดต่อปริมาตรสารละลาย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-14 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อละลายอยู่ในสารละลาย 93 % เมทานอลที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (วัน)	ปริมาณ GA ₃ ใน สารละลายตัวชะ (มก./ล.)
0	958.42
7	986.65
14	880.97
21	734.68
28	851.86
35	865.27
42	829.62
56	804.41



รูปที่ 3-15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log [GA₃] กับเวลาที่กรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่ในสารละลาย 93 % เมทานอลในน้ำที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-15 ค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา (k) และค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวระต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สารละลายตัวระ	ค่าคงที่ของอัตรา การเกิดปฏิกิริยา ($\times 10^6$ วินาที ⁻¹)	ค่าครึ่งชีวิต (วัน)
93% เมธานอลในน้ำ + 1 % w/v กรดไฮโดรคลอริก	3.43	2.34
93 % เมธานอลในน้ำ + กรดอะซิติก พีเอช 3	0.04	200.65

3.6 ความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน

ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.8.1 โดยบรรจุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ Amberlite IRA-400 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในคอลัมน์ ผ่านสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้าคอลัมน์ เพื่อให้คลอไรด์ไอออน (Cl^-) ที่เกิดการจากแตกตัวของกรด เกิดอันตรกิริยาจับกับหมู่ฟังก์ชันที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน ล้างด้วยสารละลายน้ำผสมไอโซโพรพานอลเพื่อกำจัดคลอไรด์ไอออนที่มากเกินไป แล้วผ่านสารละลายโซเดียมไนเตรตเข้าคอลัมน์ เพื่อให้ไนเตรตไอออน (NO_3^-) เข้าจับกับหมู่ฟังก์ชันของเรซินแทนคลอไรด์ไอออน เก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ไอออนที่หลุดออกจากเรซิน โดยไทเทรตสารละลายปริมาตร 50 มิลลิลิตรกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่จุดยุติ ปริมาตรสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่ใช้เท่ากับ 21.36 มิลลิลิตร ปริมาณคลอไรด์ที่ได้จะเท่ากับจำนวนหมู่ฟังก์ชันที่เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนได้ของเรซิน คำนวณหาความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน โดยแทนค่าตัวแปรต่าง ๆ ในสมการที่ 2-1 ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ความสามารถในการแลกเปลี่ยน} &= \frac{(500/50) \times 21.36 \times 0.1}{15} \\ \text{ไอออนของเรซินโดยปริมาตร} &= 1.44 \quad \text{มิลลิอิกิวาเลนต์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนที่ได้จากการทดลองนี้ มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ระบุไว้ในสมบัติของเรซิน โดยค่าที่ระบุไว้คือ 1.4 มิลลิอิกิวาเลนต์ต่อมิลลิลิตร

ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ควรถูกดูดซับบนเรซิน

จากค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนที่ได้ นำมาหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่มากที่สุดที่เรซินจะดูดซับได้ เพื่อใช้กำหนดปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกเบื้องต้นในการทดลองต่อ ๆ ไป สำหรับเรซินปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกมากที่สุดที่จะดูดซับได้ คำนวณได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{จำนวนอิกิวาเลนต์ของกรดจิบเบอเรลลิก} &= (\text{ความสามารถในการแลกเปลี่ยน ไอออน} \\ \text{มากที่สุดที่เรซินจะดูดซับได้} & \text{ของเรซิน) (ปริมาตรเรซิน)} \\ &= 1.44 \times 1 \\ &= 1.44 \quad \text{มิลลิอิกิวาเลนต์} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{น้ำหนักอิทธิพลพื้นที่ของกรดจิบเบอเรลลิก} &= 346.37 \\
 \text{ดังนั้น ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เรซินควรดูดซับได้} &= (346.37 \times 1.44)/1000 \\
 &= 0.5 \quad \text{กรัม}
 \end{aligned}$$

เมื่อทราบความเข้มข้นของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่ใช้ ก็จะสามารถหาปริมาณสารละลายที่ควรผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนได้

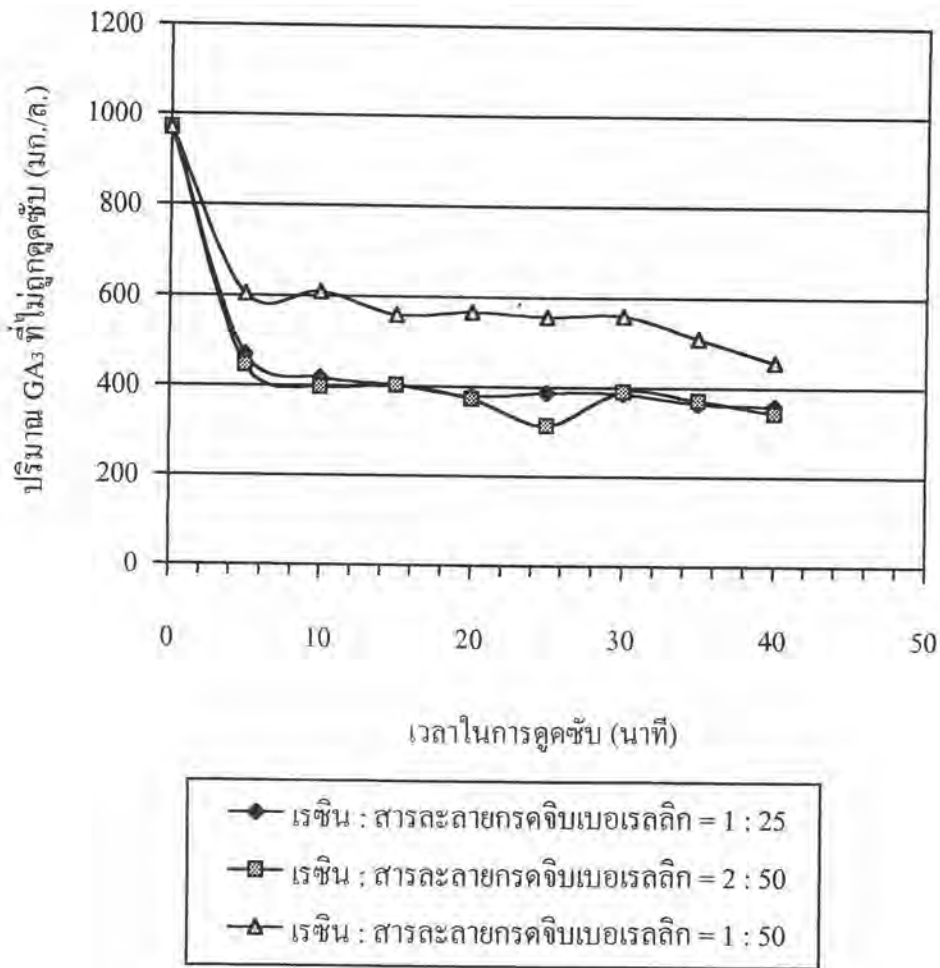
3.7 เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก

ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.8.2 โดยเขย่าเรซินในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกเข้มข้น 969.54 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการแปรสัดส่วนของปริมาณเรซินต่อปริมาณสารละลาย คือ เรซิน 1 มิลลิลิตรต่อสารละลาย 25 มิลลิลิตร เรซิน 2 มิลลิลิตรต่อสารละลาย 50 มิลลิลิตร และเรซิน 1 มิลลิลิตรต่อสารละลาย 50 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างทุก 5 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตามวิธีทดลองข้อ 2.5.2 ได้ผลดังตารางที่ 3-16 ผลการทดลองทั้ง 3 ชุดแสดงถึงการลดลงของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกอย่างรวดเร็วในช่วง 5 นาทีแรก หลังจากนั้นจะพบการลดลงของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกอย่างช้า ๆ จนสังเกตไม่ถึงการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนในช่วงท้ายของการทดลอง ซึ่งอธิบายได้ว่า ในการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน จะมีการดูดซับและปล่อยไอออนออกจากเรซินตลอดเวลา ในช่วงต้นของการแลกเปลี่ยนไอออน อัตราการดูดซับมีมากกว่าอัตราการปล่อยไอออน ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกได้อย่างชัดเจน จนถึงจุดอิ่มตัวของเรซิน ซึ่งเป็นจุดที่สังเกตไม่ถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร เนื่องจากเกิดสมดุลของการแลกเปลี่ยนไอออน คือ ปริมาณไอออนที่ถูกดูดซับบนเรซินเท่ากับปริมาณไอออนที่ถูกปล่อยออกจากเรซิน (Helfferich, 1962)

หาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก โดยเขียนกราฟระหว่างปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่ถูกดูดซับกับเวลาในการดูดซับ ได้ดังรูปที่ 3-16 หาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัว โดยลากเส้นสัมผัสโค้งตามแนวตั้งและแนวนอนของเส้นกราฟ จุดตัดของเส้นตรง 2 เส้น คือ เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6 นาที ในทุกสัดส่วนของเรซินกับน้ำหมัก แสดงว่าเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวไม่ขึ้นกับปริมาณเรซินและปริมาณสารละลาย

ตารางที่ 3-16 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่ถูกดูดซับบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่เวลาในการดูดซับต่าง ๆ เมื่อใช้สัดส่วนของเรซินต่อสารละลายแตกต่างกัน

เวลาในการดูดซับ (นาทึ)	ปริมาณ GA_3 ที่ไม่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	เรซิน : สารละลาย GA_3 เท่ากับ 1 : 25 มิลลิลิตร	เรซิน : สารละลาย GA_3 เท่ากับ 2 : 50 มิลลิลิตร	เรซิน : สารละลาย GA_3 เท่ากับ 1 : 50 มิลลิลิตร
0	969.54	969.54	969.54
5	470.8	446.49	604.32
10	418.54	397.85	610.16
15	402.93	402.42	559.57
20	378.95	373.44	567.49
25	387.53	314.92	557.4
30	386.65	391.93	560.34
35	364.36	371.88	509.5
40	360.34	343.92	457.16



รูปที่ 3-16 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลาย ที่ไม่ถูกดูดซับบนเรซิน ที่เวลาในการดูดซับต่าง ๆ เมื่อมีสัดส่วนของเรซินต่อสารละลายแตกต่างกัน

จากเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก นำมาคำนวณหาอัตราการไหลสูงสุดของสารละลายที่ผ่านเข้าคอลัมน์ โดยอาศัยหลักการที่ว่า ระยะเวลาที่สารละลายกรดจิบเบอเรลลิกสัมผัสกับเรซิน (contact time) ต้องมากกว่าหรือเท่ากับระยะเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซิน เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด คำนวณหาอัตราการไหลจากสมการ

$$\text{อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)} = \frac{\text{ปริมาณว่างระหว่างเรซิน}}{\text{ระยะเวลาที่ } GA_3 \text{ สัมผัสกับเรซิน}} \quad (3-1)$$

โดยที่ปริมาณว่างระหว่างเรซิน ของคอลัมน์ที่ทดลองเท่ากับ 3.6 มิลลิลิตร เวลาที่ต่ำสุดที่สารละลาย สัมผัสเรซิน คือ 6 นาที

$$\begin{aligned} \text{อัตราการไหลสูงสุดของสารละลาย} &= 3.6 / 6 && \text{มิลลิลิตร/นาที} \\ &= 0.6 && \text{มิลลิลิตร/นาที} \end{aligned}$$

คิดเป็นหน่วย space velocity ได้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของ ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ดังนั้น ในการทดลองหาการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ควรควบคุมอัตราการไหลของสารละลายให้ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

3.8 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ทำการทดลองในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ที่บรรจุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ Amberlite IRA-400 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาตรว่างระหว่างเรซินเท่ากับ 3.6 มิลลิลิตร โดยแปรปัจจัย คือ ลักษณะของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และอัตราการไหลของสารละลาย ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

3.8.1 สารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

ทดลองผ่านสารละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในลักษณะต่าง ๆ เข้าคอลัมน์ โดยเตรียมสารละลายด้วยวิธีต่าง ๆ ตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2.1.1 ถึง 2.9.2.1.5 จากน้ำหมักของกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3 สารละลายที่ทำการทดลองได้แก่ น้ำหมักพีเอช 3 น้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 น้ำหมักที่สกัดแยกสิ่งเจือปนบางส่วนด้วยเอทิลอะซิเตต สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ควบคุมอัตราการไหลของสารละลายให้เท่ากันตลอดที่ space velocity เท่ากับ 5 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ซึ่งต่ำกว่าอัตราการไหลสูงสุดที่คำนวณได้จากผลการทดลองข้อ 3.7 ควบคุมอุณหภูมิของการทดลองที่ 30

องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง โดยพิจารณาจากผลการทดลองข้อ 3.2 ร่วมกับเวลาที่ใช้ในการทดลอง เวลาที่ใช้ในการทดลองแต่ละชุดประมาณ 12 ชั่วโมง ขณะที่ค่าครึ่งชีวิตของกรดจิบเบอเรลลิกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเท่ากับ 211 ชั่วโมง ผลของการสลายตัวเนื่องจากอุณหภูมิจึงเกิดน้อยมาก และจะเกิดกับทุกชุดการทดลอง เก็บสารที่เหลือออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ วิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิก ในแต่ละส่วนของสารละลาย คำนวณหาอัตราส่วนของความเข้มข้นในแต่ละลำดับส่วนต่อความเข้มข้นเริ่มต้น (C_i/C_o) ปริมาณสะสมของกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับ และเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ได้ผลดังตารางที่ 3-17 ถึง 3-21 เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การดูดซับจากตารางพบว่า กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกดูดซับไว้ทั้งหมดเมื่อผ่านสารละลายเข้าคอลัมน์ในช่วงแรก หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์การดูดซับจะค่อย ๆ ลดลงเปรียบเทียบการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อผ่านสารละลายลักษณะต่าง ๆ เข้าคอลัมน์ โดยเขียนกราฟ breakthrough curve ระหว่างค่า C_i/C_o กับปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดซับกับปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ ได้ดังรูปที่ 3-17 และ 3-18 ตามลำดับ breakthrough curve แสดงถึงประสิทธิภาพในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์ โดยพิจารณาจากปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ดูดซับได้ ก่อนถึงจุดที่พบการรั่วของกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์ (breakthrough point) ซึ่งก็คือจุดแรกที่กราฟเริ่มมีความชัน ถ้ากรดจิบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ดูดซับได้ก่อนถึงจุดที่พบการรั่วมีปริมาณมาก การดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์จะมีประสิทธิภาพสูง (Helfferich, 1962) จาก breakthrough curve สามารถหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ดูดซับได้ก่อนพบการรั่ว ดังตารางที่ 3-22 โดยคอลัมน์สามารถดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกจากสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ น้ำหมักที่สกัดแยกถึงเจือปนด้วยเอทิลอะซิเตต น้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 และน้ำหมักพีเอช 3 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก กับปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ในรูปที่ 3-18 ก็แสดงให้เห็นว่า เมื่อผ่านกรดจิบเบอเรลลิกปริมาณเท่ากันเข้าคอลัมน์ กรดจิบเบอเรลลิกที่อยู่ในสารละลายที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 มีเปอร์เซ็นต์ที่ถูกดูดซับมากที่สุด ในน้ำหมักที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและน้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 มีแนวโน้มของการดูดซับใกล้เคียงกัน ลำดับต่อมาได้แก่ น้ำหมักพีเอช 3 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ที่ถูกดูดซับต่ำกว่าสารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ในระยะแรก หลังจากนั้นจะถูกดูดซับที่สูงกว่า

ตารางที่ 3-17 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์
ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน
น้ำหมักพีเอช 3 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 5 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของ
ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้น GA3 เริ่มต้น ; Co = 802.44 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1	5	0.00	0.00	5	4.01	4.01	100
2	5	0.00	0.00	10	8.02	8.02	100
3	5	59.48	0.07	15	12.04	11.74	98
4	5	56.86	0.07	20	16.05	15.47	96
5	5	110.19	0.14	25	20.06	18.93	94
6	5	165.68	0.21	30	24.07	22.11	92
7	5	225.00	0.28	35	28.09	25.00	89
8	5	246.28	0.31	40	32.10	27.78	87
9	10	269.29	0.34	50	40.12	33.11	83
10	10	397.50	0.50	60	48.15	37.16	77
11	10	496.23	0.62	70	56.17	40.22	72
12	10	620.32	0.77	80	64.19	42.04	65
13	10	638.86	0.80	90	72.22	43.68	60
14	20	678.05	0.84	110	88.27	46.17	52
15	20	592.17	0.74	130	104.32	50.37	48
16	20	742.23	0.92	150	120.37	51.58	43
17	20	791.92	0.99	170	136.41	51.79	38
18	20	941.43	1.17	190	152.46	51.79	34

ตารางที่ 3-18 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์
ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน
น้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 5 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของ
ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้น GA3 เริ่มต้น ; Co = 1010.43 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1-5	5	0.00	0.00	25	25.26	25.26	100
6	5	0.00	0.00	30	30.31	30.31	100
7	5	66.69	0.07	35	35.37	35.03	99
8	5	101.55	0.10	40	40.42	39.58	98
9	5	143.37	0.14	45	45.47	43.91	97
10	5	189.45	0.19	50	50.52	48.02	95
11	5	248.16	0.25	55	55.57	51.83	93
12	5	311.58	0.31	60	60.63	55.32	91
13	10	397.00	0.39	70	70.73	61.46	87
14	10	540.75	0.54	80	80.83	66.15	82
15	10	639.84	0.63	90	90.94	69.86	77
16	20	583.72	0.58	110	111.15	78.39	71
17	20	689.64	0.68	130	131.36	84.81	65
18	20	872.16	0.86	150	151.57	87.57	58

ตารางที่ 3-19 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์
ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน
น้ำหมักที่สกัดแยกถึงเจือปนด้วยเอทธิลอะซิเตต เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล
5 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้น GA₃ เริ่มต้น ; Co = 989.85 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1-7	5	0.00	0.00	35	34.64	34.64	100
8	5	0.00	0.00	40	39.59	39.59	100
9	5	63.28	0.06	45	44.54	44.23	99
10	5	113.78	0.11	50	49.49	48.61	98
11	5	151.05	0.15	55	54.44	52.80	97
12	5	204.49	0.21	60	59.39	56.73	96
13	5	254.93	0.26	65	64.34	60.40	94
14	5	332.93	0.34	70	69.29	63.69	92
15	5	394.98	0.40	75	74.24	66.66	90
16	5	490.35	0.50	80	79.19	69.16	87
17	5	538.32	0.54	85	84.14	71.42	85
18	5	608.92	0.62	90	89.09	73.32	82
19	20	743.12	0.75	110	108.88	78.26	72
20	20	785.01	0.79	130	128.68	82.35	64
21	20	853.37	0.86	150	148.48	85.08	57

ตารางที่ 3-20 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่านสารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตต แล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 เข้าคอลัมน์ด้วย อัตราการไหล 5 มล./ชม.ต่อมิลลิลิตร ของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นเริ่มต้น ; Co = 809.16 มิลลิกรัมต่อลิตร

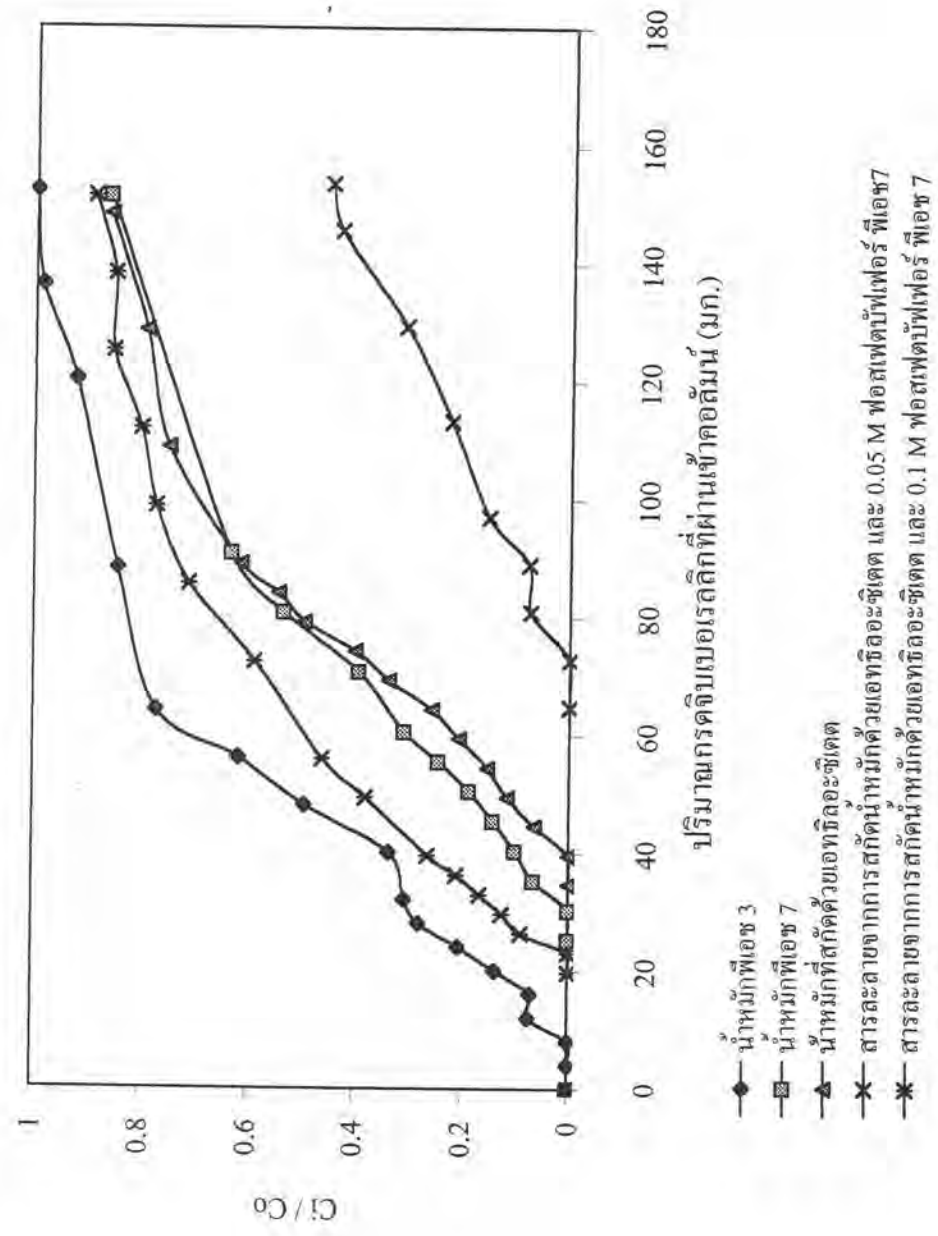
ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1-9	10	0.00	0.00	80	64.73	64.73	100
9	10	0.00	0.00	90	72.82	72.82	100
10	10	59.72	0.07	100	80.92	80.32	99
11	10	62.20	0.08	110	89.01	87.79	99
12	10	123.84	0.15	120	97.10	94.64	97
13	10	201.52	0.25	130	105.19	100.72	96
14	10	181.46	0.22	140	113.28	107.00	94
15	20	250.77	0.31	160	129.47	118.16	91
16	20	348.39	0.43	180	145.65	127.38	87
17	10	364.26	0.45	190	153.74	131.83	86

ตารางที่ 3-21 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซิเตต แล้วตามด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 5 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตร ของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

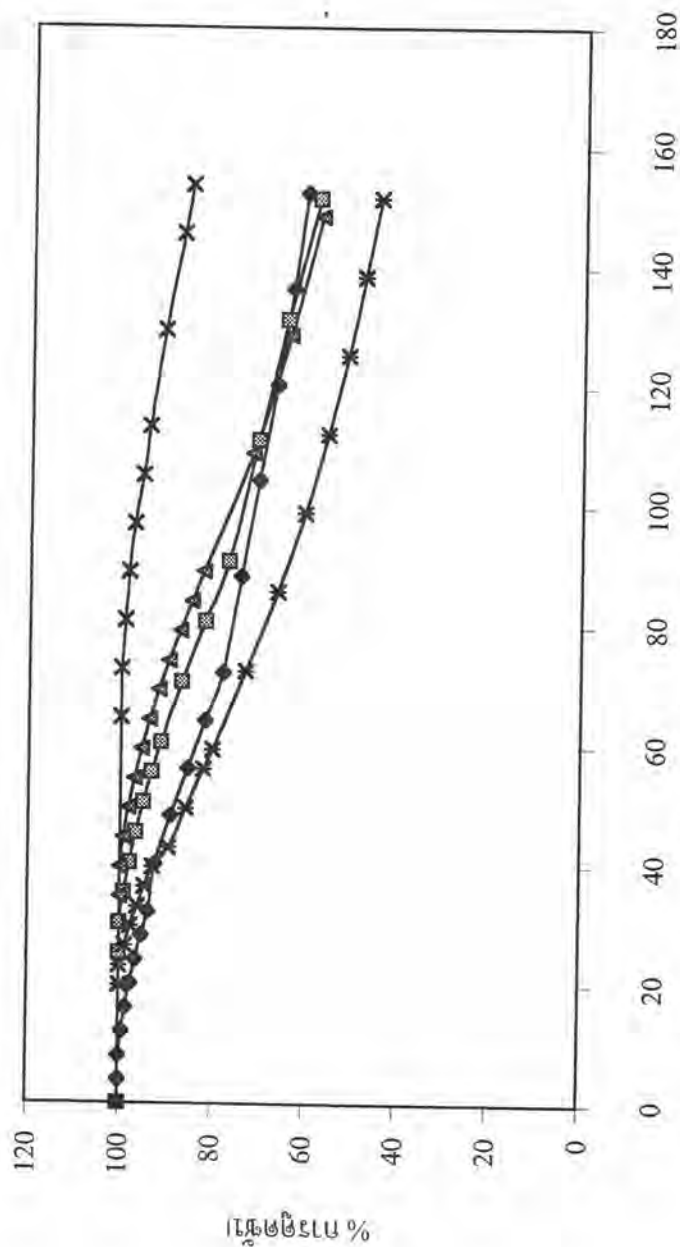
ความเข้มข้นเริ่มต้น ; Co = 659.21 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้นของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตรสะสมของสารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่านเข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับ
1-6	5	0.00	0.00	30	19.78	19.78	100
7	5	0.00	0.00	35	23.07	23.07	100
8	5	58.39	0.09	40	26.37	26.08	99
9	5	82.09	0.12	45	29.66	28.96	98
10	5	110.21	0.17	50	32.96	31.71	96
11	5	138.91	0.21	55	36.26	34.31	95
12	5	173.85	0.26	60	39.55	36.74	93
13	5	334.31	0.51	65	42.85	38.36	90
14	10	250.15	0.38	75	49.44	42.45	86
15	10	304.48	0.46	85	56.03	46.00	82
16	5	352.28	0.53	90	59.33	47.53	80
17	20	388.52	0.59	110	72.51	52.95	73
18	20	470.34	0.71	130	85.70	56.72	66
19	20	510.19	0.77	150	98.88	59.70	60
20	20	528.89	0.80	170	112.07	62.31	56
21	20	563.58	0.85	190	125.25	64.22	51
22	20	562.06	0.85	210	138.44	66.17	48
23	20	587.61	0.89	230	151.62	67.60	45

รูปที่ 3-17 Breakthrough curve ของการดูดซับกรดไขมันเบเรดลิกจากสารละลายต่าง ๆ ของคอลัมน์แตกเปลี่ยน ไอออน ที่อัตราไหล 5 มล./ชม. โดยมีลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน



รูปที่ 3-18 เปอร์เซ็นต์การดูดซับการคืบเบอเรลลิกของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน เมื่อผ่านสารละลายการคืบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ ด้วยอัตรา
การไหล 5 มล./ชม. ค่อมลิติตีตรของปริมาณระหว่างเรซิน



- ปริมาณการคืบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ (มก.)
- ◆ น้ำหมักฟิเอช 3
 - น้ำหมักฟิเอช 7
 - ▲ น้ำหมักที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต
 - ✕ สารละลายจากโรงสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตต 0.05 M ฟอสเฟตบิฟเฟอริ ฟิเอช 7
 - * สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตต 0.1 M ฟอสเฟตบิฟเฟอริ ฟิเอช 7

ตารางที่ 3-22 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลลัมน์ดูดซับได้ก่อนพบการรั่ว เมื่อผ่านสารละลายต่าง ๆ เข้าคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 5 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

สารละลายที่ผ่านเข้าคอลัมน์	ปริมาณ GA ₃ ที่ดูดซับได้ก่อนพบการรั่ว (มก.)
สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทริลอะซิเตต แล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7	72.82
น้ำหมักที่สกัดสิ่งเจือปนออกด้วยเอทริลอะซิเตต	39.59
น้ำหมักพีเอช 7	30.31
สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทริลอะซิเตต แล้วตามด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7	23.07
น้ำหมักพีเอช 3	8.02

จากผลการทดลองข้างต้น สรุปได้ว่า สารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกมากที่สุด คือ สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทริลอะซิเตต แล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 รองลงมา ได้แก่ น้ำหมักที่ผ่านการสกัดด้วยเอทริลอะซิเตต น้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน น้ำหมักพีเอช 3 และสารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทริลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ตามลำดับ

จากผลการทดลอง อธิบายได้ว่า กรดจิบเบอเรลลิกที่อยู่ในน้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 ถูกดูดซับได้มากกว่าในน้ำหมักพีเอช 3 เนื่องจากที่พีเอช 7 กรดจิบเบอเรลลิกจะแตกตัวให้อิออนที่มีประจุลบ ซึ่งสามารถแลกเปลี่ยนกับแคตไอออนของเรซินได้มากกว่า โดยกรดจิบเบอเรลลิกมีการแตกตัวดังสมการ



กรดจิบเบอเรลลิกมีค่า pKa เท่ากับ 4 (Budarti,1989) ที่พีเอชเท่ากับ pKa กรดจิบเบอเรลลิกจะแตกตัวได้ครึ่งหนึ่ง แต่ที่พีเอชสูงขึ้นการแตกตัวจะสูงขึ้นด้วย กรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักพีเอช 7 จึงถูกดูดซับได้มากกว่า

ส่วนการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตต และการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ทำให้ได้สารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น มีไอออนของสิ่งเจือปนที่จะแย่งจับกับเรซินน้อยลง ทำให้กรดจิบเบอเรลลิกถูกดูดซับได้มากขึ้น แต่เมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 กลับมีการดูดซับลดลง อธิบายได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงขึ้น ปริมาณไอออนลบที่เกิดจากแตกตัวของเกลือที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ก็จะมีปริมาณสูงขึ้นด้วย ไอออนเหล่านี้จะแย่งจับกับหมู่ฟังก์ชันของเรซิน ทำให้กรดจิบเบอเรลลิกจับกับเรซินได้น้อยลง

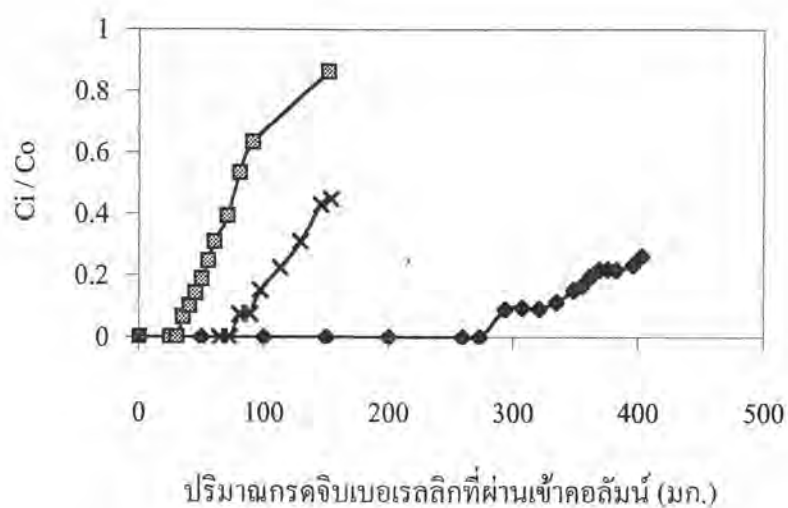
มีข้อสังเกตจากการทดลองว่า ความบริสุทธิ์ของสารละลาย มีผลต่อการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน จึงทำการทดลองหาการดูดซับจากสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น โดยละลายกรดจิบเบอเรลลิกเกรดทางการค้า จากบริษัทลัดดา ไดนามิก ความบริสุทธิ์ประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำปราศจากไอออนแล้วผ่านเข้าคอลัมน์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-23 เห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับลดลงอย่างช้า ๆ นำข้อมูลมาเขียนกราฟ breakthrough curve และกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับ เปรียบเทียบกับการดูดซับของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกจากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 และน้ำหมักพีเอช 7 ได้ผลดังรูปที่ 3-19 และ 3-20 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า เมื่อสารละลายบริสุทธิ์ขึ้น การดูดซับก็จะเพิ่มขึ้นด้วย

อย่างไรก็ตามในการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมัก จะเลือกใช้น้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 ผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน เนื่องจากไม่ต้องผ่านกระบวนการสกัด ซึ่งต้องใช้ตัวทำละลายและสารเคมีอื่น ๆ นอกจากนั้นการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตก็มีแนวโน้มของการดูดซับใกล้เคียงกับน้ำหมักพีเอช 7 ส่วนการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วตามด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากผลการทดลองของสุภาพร พรพรหมกุล (2533) จะมีการสูญเสียกรดจิบเบอเรลลิกประมาณ 10 % ของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก และสารที่ผ่านการสกัดจะมีความบริสุทธิ์สูงพอที่จะตกผลึกได้ โดยไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน ดังนั้นจึงเลือกศึกษาการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7

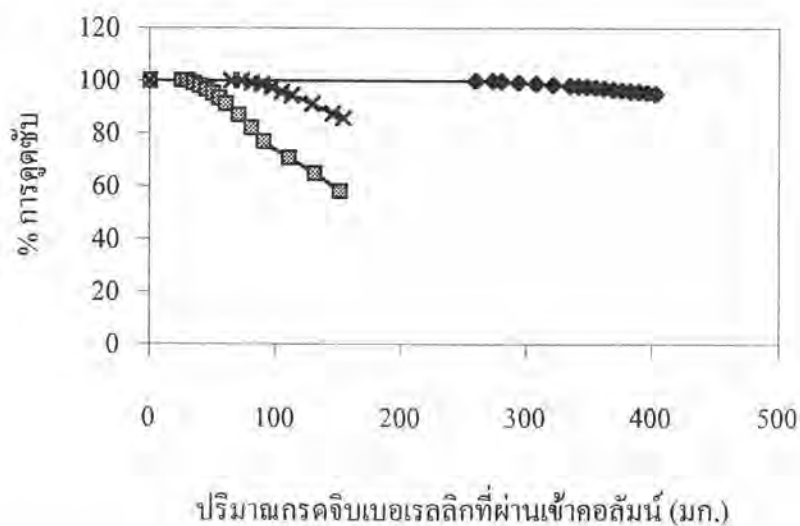
ตารางที่ 3-23 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า C_i/C_o ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน สารละลายกรดจิบเบอเรลลิกกรดทางการค้า จากถัสดาไดนามิคเข้าคอลัมน์ ด้วย อัตราการไหล 5 มล./ชม. ต่อมิลลิเมตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นเริ่มต้น ; $C_o = 682.87$ มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้นของ GA_3 ; C_i (มก./ล.)	C_i/C_o	ปริมาตรสะสมของสารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA_3 สะสมที่ผ่านเข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับ
0-19	20	0.00	0.00	380	259.49	259.49	100
20	20	0.00	0.00	400	273.15	273.15	100
21	10	72.17	0.11	410	279.98	279.26	100
22	20	61.67	0.09	430	293.63	291.68	99
23	20	65.77	0.10	450	307.29	304.02	99
24	20	63.42	0.09	470	320.95	316.41	99
25	20	77.76	0.11	490	334.61	328.51	98
26	10	65.03	0.10	500	341.44	334.69	98
27	10	104.31	0.15	510	348.26	340.48	98
28	10	113.88	0.17	520	355.09	346.17	97
29	10	133.87	0.20	530	361.92	351.66	97
30	10	149.05	0.22	540	368.75	357.00	97
31	10	149.74	0.22	550	375.58	362.33	96
32	10	148.22	0.22	560	382.41	367.67	96
33	10	145.54	0.21	570	389.24	373.05	96
34	10	159.28	0.23	580	396.07	378.28	96
35	10	178.51	0.26	590	402.89	383.33	95



รูปที่ 3-19 Breakthrough curve ของการดูดซับกรดจิบเบอเรลติกจากสารละลายต่าง ๆ ของคอลัมน์ แลกเปลี่ยนไอออน ที่อัตราการไหล 5 มล./ชม. ต่อมีลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน



- ◆ สารละลายกรดจิบเบอเรลติก เกรดทางการค้า
- น้ำหมักพีเอช 7
- ✕ สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตต และ 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7

รูปที่ 3-20 เปอร์เซ็นต์การดูดซับกรดจิบเบอเรลติกจากสารละลายต่าง ๆ ของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่อัตราการไหล 5 มล./ชม. ต่อมีลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

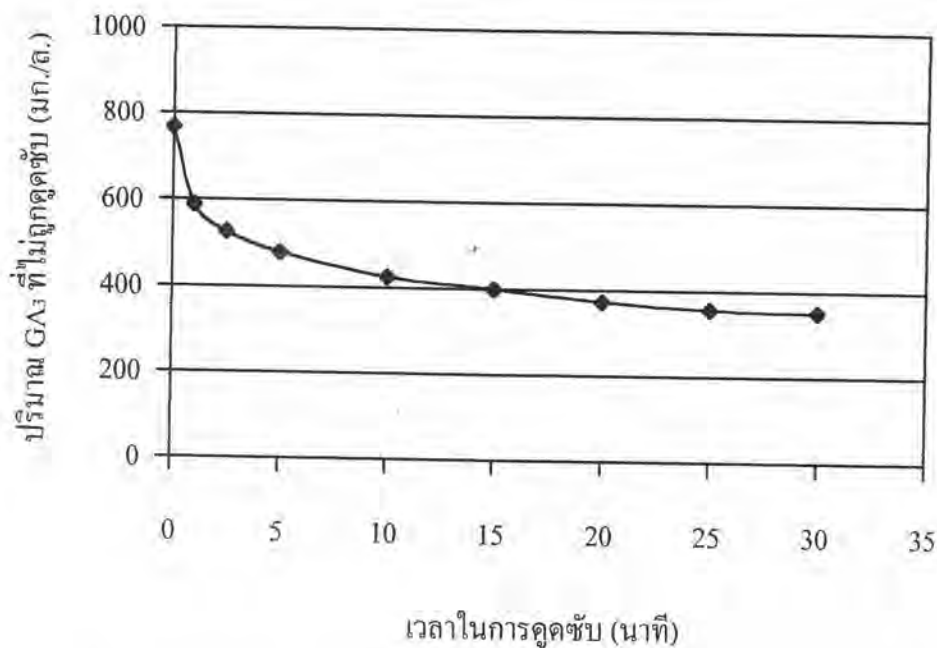
3.8.2 เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักพีเอช 7 ของเรซิน

ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2.2.1 โดยเขย่าเรซินปริมาตร 5 มิลลิลิตรในน้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนดนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่ถูกดูดซับตามวิธีทดลองข้อ 2.5.2 ได้ผลดังตารางที่ 3-24

ตารางที่ 3-24 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักพีเอช 7 ซึ่งไม่ถูกดูดซับด้วยเรซินที่เวลาในการดูดซับต่างๆ

เวลาในการดูดซับ (นาที)	ปริมาณ GA_3 ที่ไม่ถูกดูดซับ (มก./ล.)
0	766.83
1	588.41
2.5	526.88
5	479.59
10	425.12
15	399.67
20	372.78
25	356.91
30	351.55

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่ถูกดูดซับกับเวลาในการดูดซับ ดังรูปที่ 3-21



รูปที่ 3-21 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักพีเอช 7 ที่ไม่ถูกดูดซับด้วยเรซิน ที่เวลาในการดูดซับต่างๆ

หาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวในการดูดซับจากกราฟ เช่นเดียวกับในผลการทดลองข้อ 3.7 ได้เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักพีเอช 7 เท่ากับ 24 นาที คำนวณหาอัตราการไหลสูงสุดของการผ่านน้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่บรรจุเรซิน 10 มิลลิลิตร มีปริมาตรว่างระหว่างเรซินเท่ากับ 3.6 จากสมการ 3-1 ได้ว่า

$$\begin{aligned}
 \text{อัตราการไหลของน้ำหมักพีเอช 7} &= 3.6 / 24 \text{ มิลลิลิตร/นาที} \\
 &= 0.15 \text{ มิลลิลิตร/นาที} \\
 \text{คิดเป็น space velocity} &= 2.5 \text{ มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของ} \\
 &\quad \text{ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน}
 \end{aligned}$$

3.8.3 อัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก

หาอัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก จากน้ำหมักที่ปรับพีเอชเป็น 7 ตามวิธีทดลองข้อ 2.9.2.2.2 แปรอัตราการไหลที่ 10, 6.67, 5, 3.33, 2.5, 1.67 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน เก็บตัวอย่างสารที่ออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน วิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในแต่ละส่วนตามวิธีข้อ 2.5.2 คำนวณอัตราส่วนของความเข้มข้นกรดจิบเบอเรลลิกในแต่ละส่วนของสารละลาย ต่อความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาณของกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ได้ดังตารางที่ 3-25 ถึง 3-31 เปรียบเทียบหาอัตราการไหลที่เหมาะสม โดยเขียนกราฟ breakthrough curve และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดซับกับปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.8.1 ได้ผลดังรูปที่ 3-22 และ 3-23 พิจารณาจุดที่พบการรั่วของกรดจิบเบอเรลลิก (breakthrough point) พบว่า เมื่ออัตราการไหลต่ำลง กรดจิบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ดูดซับได้ก่อนถึงจุดที่พบการรั่วจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น และที่อัตราการไหลต่ำกว่า 2.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ซึ่งเป็นอัตราการไหลที่คำนวณได้จากเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซิน ตามผลการทดลองข้อ 3.8.2 พบว่ามีปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับก่อนถึงจุดที่พบการรั่วมากกว่าที่อัตราการไหลสูงกว่าอย่างชัดเจน สอดคล้องกับกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การดูดซับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ที่อัตราการไหลต่ำกว่า เปอร์เซ็นต์การดูดซับจะลดลงช้ากว่า ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ดูดซับก่อนถึงจุดที่พบการรั่ว แสดงดังตารางที่ 3-32 เขียนกราฟระหว่างอัตราการไหลกับปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับก่อนพบการรั่ว ได้ดังรูปที่ 3-24 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัตราการไหลกับปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ดูดซับได้ไม่ได้มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง โดยเมื่ออัตราการไหลลดลงจาก 3.33 เป็น 2.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ดูดซับได้ก่อนพบการรั่วจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ที่อัตราการไหลต่ำกว่า 2.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน การลดลงของอัตราการไหลจะทำให้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลัมน์ดูดซับได้ไม่สูงขึ้นมากนัก และเมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ต้องใช้ในการทดลอง ดังตารางที่ 3-32 จึงสรุปได้ว่า อัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักพีเอช 7 เท่ากับ 2.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ตารางที่ 3-25 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน น้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 0.83 มล./ชม. ต่อมิลลิกรัมของ ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นเริ่มต้น ; Co = 677.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1-13	5	0.00	0.00	65	44.02	44.02	100
14	5	0.00	0.00	70	47.41	47.41	100
15	5	59.21	0.09	75	50.79	50.50	99
16	5	82.59	0.12	80	54.18	53.47	99
17	5	81.24	0.12	85	57.56	56.45	98
18	5	120.04	0.18	90	60.95	59.24	97
19	5	121.86	0.18	95	64.34	62.01	96
20	5	179.47	0.27	100	67.72	64.50	95
21	5	237.12	0.35	105	71.11	66.70	94
22	5	297.42	0.44	110	74.50	68.60	92
23	5	349.42	0.52	115	77.88	70.24	90
24	5	404.04	0.60	120	81.27	71.61	88
25	5	392.02	0.58	125	84.65	73.03	86
26	5	449.89	0.66	130	88.04	74.17	84
27	5	432.21	0.64	135	91.43	75.39	82
28	5	422.98	0.62	140	94.81	76.67	81
29	10	450.40	0.67	150	101.58	78.93	78
30	10	574.43	0.85	160	108.36	79.96	74
31	10	556.85	0.82	170	115.13	81.17	70
32	10	549.37	0.81	180	121.90	82.44	68
33	10	483.57	0.71	190	128.67	84.38	66

ตารางที่ 3-26 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์
ค่า C_i/C_o ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน
น้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 1.67 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของ
ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นเริ่มต้น; $C_o = 677.23$ มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA_3 ; C_i (มก./ล.)	C_i/C_o	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA_3 สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1-12	5	0.00	0.00	60	40.63	40.63	100
13	5	0.00	0.00	65	44.02	44.02	100
14	5	67.42	0.10	70	47.41	47.07	99
15	5	96.02	0.14	78	52.82	49.98	95
16	5	127.71	0.19	80	54.18	52.72	97
17	5	151.98	0.22	85	57.56	55.35	96
18	5	197.85	0.29	90	60.95	57.75	95
19	5	243.80	0.36	95	64.34	59.91	93
20	5	245.11	0.36	100	67.72	62.07	92
21	10	326.84	0.48	110	74.50	65.58	88
22	10	422.27	0.62	120	81.27	68.13	84
23	10	470.78	0.70	130	88.04	70.19	80
24	10	530.86	0.78	140	94.81	71.66	76
25	10	599.21	0.88	150	101.58	72.44	71
26	10	640.85	0.95	160	108.36	72.80	67
27	10	691.33	1.00	170	115.13	72.80	63
28	10	719.30	1.00	180	121.90	72.80	60
29	10	664.30	1.00	190	128.67	72.80	57

ตารางที่ 3-27 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์
ค่า C_i/C_o ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน
น้ำหมักพีเอส 7 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 2.5 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของ
ปริมาณว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นเริ่มต้น ; $C_o = 677.23$ มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA_3 ; C_i (มก./ล.)	C_i/C_o	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA_3 สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1-12	5	0.00	0.00	60	40.63	40.63	100
13	5	0.00	0.00	65	44.02	44.02	100
14	5	73.37	0.11	70	47.41	47.04	99
15	5	112.81	0.17	75	50.79	49.86	98
16	5	132.95	0.20	80	54.18	52.58	97
17	5	164.77	0.24	85	57.56	55.15	96
18	5	208.85	0.31	90	60.95	57.49	94
19	5	274.89	0.41	95	64.34	59.50	92
20	5	389.82	0.58	100	67.72	60.94	90
21	5	479.65	0.71	105	71.11	61.92	87
22	5	535.39	0.79	110	74.50	62.63	84
23	5	602.81	0.89	115	77.88	63.01	81
24	5	631.23	0.93	120	81.27	63.24	78
25	5	696.77	1.00	125	84.65	63.24	75
26	5	696.56	1.00	130	88.04	63.24	72
27	5	605.62	0.89	135	91.43	63.59	70
28	5	706.00	1.00	140	94.81	63.59	67
29	10	697.98	1.00	150	101.58	63.59	63

ตารางที่ 3-28 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่างๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์
ค่า C_i/C_o ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน
น้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 3.33 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของ
ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นเริ่มต้น ; $C_o = 677.23$ มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA_3 ; C_i (มก./ล.)	C_i/C_o	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA_3 สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1-8	5	0.00	0.00	40	27.09	27.09	100
9	5	0.00	0.00	45	30.48	30.48	100
10	5	64.83	0.10	50	33.86	33.54	99
11	5	86.57	0.13	55	37.25	36.49	98
12	5	96.06	0.14	60	40.63	39.40	97
13	5	141.08	0.21	65	44.02	42.08	96
14	5	174.07	0.26	70	47.41	44.59	94
15	5	245.38	0.36	75	50.79	46.75	92
16	5	222.32	0.33	80	54.18	49.03	90
17	5	217.58	0.32	85	57.56	51.33	89
18	5	319.38	0.47	90	60.95	53.11	87
19	10	386.31	0.57	100	67.72	56.02	83
20	10	421.06	0.62	110	74.50	58.59	79
21	10	551.91	0.81	120	81.27	59.84	74
22	10	529.15	0.78	130	88.04	61.32	70
23	10	514.99	0.76	140	94.81	62.94	66
24	10	577.26	0.85	150	101.58	63.94	63
25	10	619.38	0.91	160	108.36	64.52	60
26	10	557.03	0.82	170	115.13	65.72	57
27	10	507.31	0.75	180	121.90	67.42	55
28	10	593.46	0.88	190	128.67	68.26	53

ตารางที่ 3-29 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอถัมน์ ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอถัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน น้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอถัมน์ด้วยอัตราการไหล 5 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของ ปริมาตรว้ระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นเริ่มต้น ; Co = 677.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายที่ออกจากคอถัมน์ (มล.)	ความเข้มข้นของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตรสะสมของสารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่านเข้าคอถัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์การดูดซับ
1-7	5	0.00	0.00	35	23.70	23.70	100
8	5	0.00	0.00	40	27.09	27.09	100
9	5	71.06	0.10	45	30.48	30.12	99
10	5	91.96	0.14	50	33.86	33.05	98
11	5	123.71	0.18	55	37.25	35.81	96
12	5	152.45	0.23	60	40.63	38.44	95
13	5	191.30	0.28	65	44.02	40.87	93
14	5	210.76	0.31	70	47.41	43.20	91
15	10	252.10	0.37	80	54.18	47.45	88
16	10	309.97	0.46	90	60.95	51.12	84
17	20	377.35	0.56	110	74.50	57.12	77
18	20	461.83	0.68	130	88.04	61.43	70
19	10	500.09	0.74	140	94.81	63.20	67
20	10	508.56	0.75	150	101.58	64.89	64
21	10	529.71	0.78	160	108.36	66.36	61
22	10	509.56	0.75	170	115.13	68.04	59
23	10	532.75	0.79	180	121.90	69.48	57
24	10	538.40	0.80	190	128.67	70.87	55

ตารางที่ 3-30 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์
ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกดูดซับ เมื่อผ่าน
น้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 6.67 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของ
ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ความเข้มข้นเริ่มต้น : Co = 677.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
1-7	5	0.00	0.00	35	23.70	23.70	100
8	5	0.00	0.00	40	27.09	27.09	100
9	5	53.57	0.08	45	30.48	30.21	99
10	5	77.41	0.11	50	33.86	33.21	98
11	5	107.93	0.16	55	37.25	36.05	97
12	5	138.72	0.20	60	40.63	38.75	95
13	5	158.58	0.23	65	44.02	41.34	94
14	5	172.16	0.25	70	47.41	43.86	93
15	5	180.88	0.27	75	50.79	46.35	91
16	5	215.05	0.32	80	54.18	48.66	90
17	5	250.38	0.37	85	57.56	50.79	88
18	5	277.71	0.41	90	60.95	52.79	87
19	10	342.11	0.51	100	67.72	56.14	83
20	10	400.22	0.59	110	74.50	58.91	79
21	10	479.77	0.71	120	81.27	60.89	75
22	10	371.76	0.55	130	88.04	63.94	73
23	10	532.13	0.79	140	94.81	65.39	69
24	10	562.13	0.83	150	101.58	66.54	66
25	10	541.27	0.80	160	108.36	67.90	63
26	10	565.95	0.84	170	115.13	69.01	60
27	10	560.97	0.83	180	121.90	70.18	58

ตารางที่ 3-31 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายส่วนต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ค่า Ci/Co ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์และที่ถูกลดระดับ เมื่อผ่าน น้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 10 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของ ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

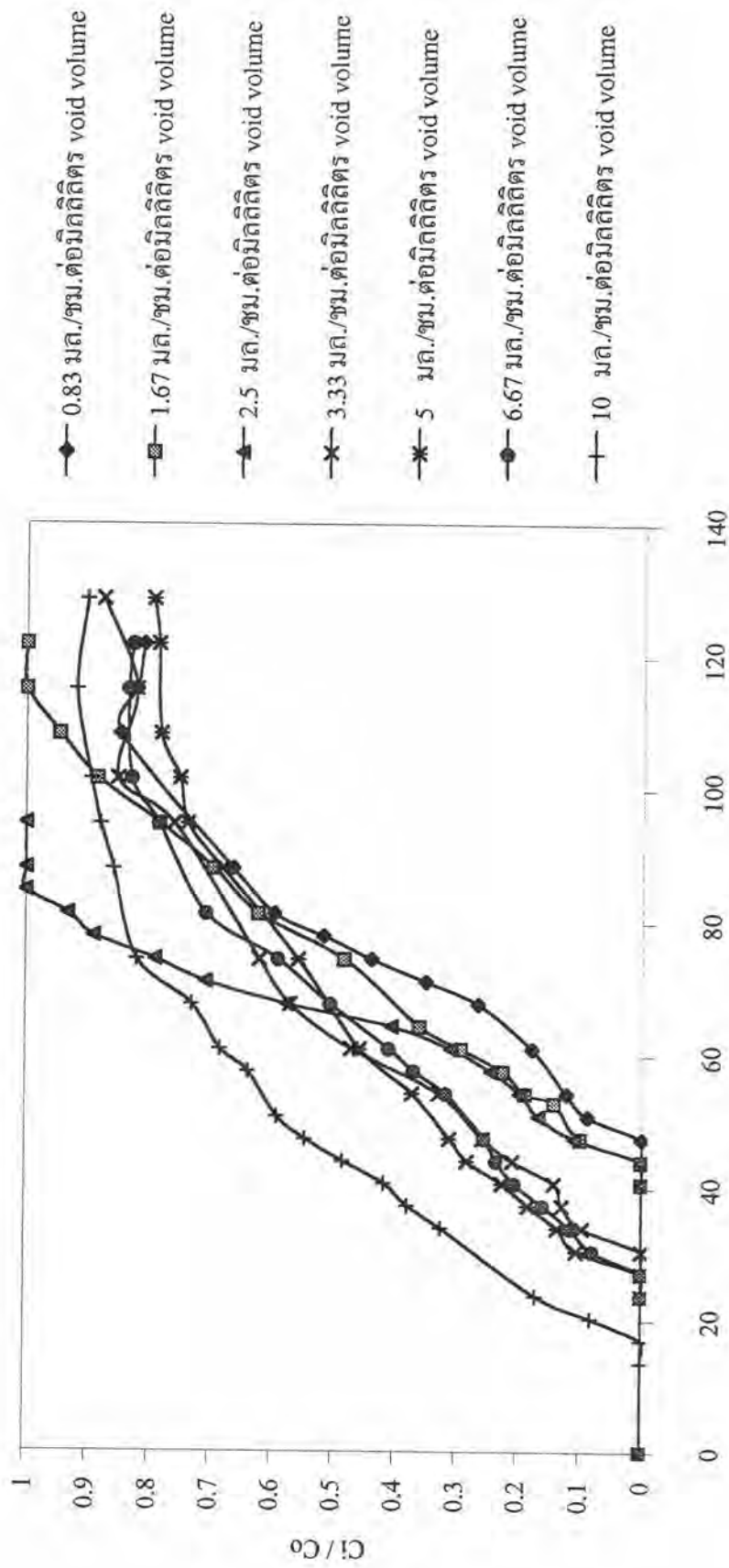
ความเข้มข้นเริ่มต้น ; Co = 677.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้นของ GA ₃ ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตรสะสมของสารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA ₃ สะสมที่ผ่านเข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกลดระดับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์การลดระดับ
1-4	5	0.00	0.00	20	13.54	13.54	100
5	5	0.00	0.00	25	16.93	16.93	100
6	5	55.71	0.08	30	20.32	20.04	99
7	5	115.39	0.17	35	23.70	22.85	96
8	5	116.09	0.17	40	27.09	25.65	95
9	5	140.39	0.21	45	30.48	28.34	93
10	5	219.51	0.32	50	33.86	30.63	90
11	5	256.57	0.38	55	37.25	32.73	88
12	5	282.43	0.42	60	40.63	34.70	85
13	5	327.99	0.48	65	44.02	36.45	83
14	5	369.49	0.55	70	47.41	37.99	80
15	5	401.15	0.59	75	50.79	39.37	78
16	5	449.85	0.66	80	54.18	40.51	75
17	5	433.36	0.64	85	57.56	41.73	72
18	5	464.31	0.69	90	60.95	42.79	70
19	10	495.28	0.73	100	67.72	44.61	66
20	10	555.92	0.82	110	74.50	45.82	62
21	10	523.87	0.77	120	81.27	47.36	58
22	10	581.47	0.86	130	88.04	48.31	55

ตารางที่ 3-31 (ต่อ)

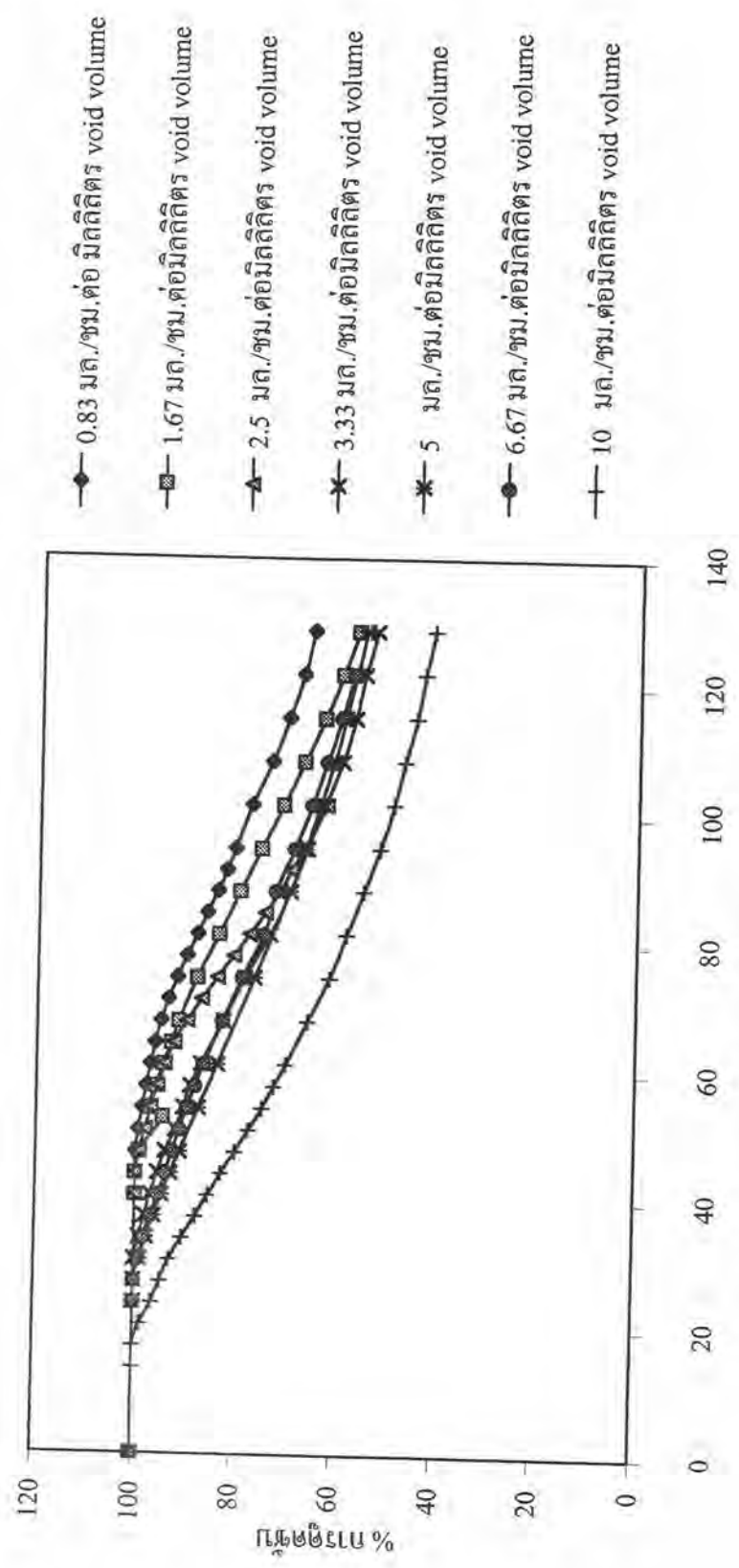
ลำดับ ส่วนที่	ปริมาณสาร ละลายที่ออก จากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น ของ GA_3 ; Ci (มก./ล.)	Ci/Co	ปริมาตร สะสมของ สารละลาย (มล.)	ปริมาณ GA_3 สะสมที่ผ่าน เข้าคอลัมน์ (มก.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูกดูดซับ (มก.)	เปอร์เซ็นต์ การดูดซับ
23	10	595.81	0.88	140	94.81	49.13	52
24	10	605.97	0.89	150	101.58	49.84	49
25	10	560.46	0.83	160	108.36	51.01	47
26	10	622.42	0.92	170	115.13	51.56	45
27	10	566.14	0.84	180	121.90	52.67	43
28	10	611.08	0.90	190	128.67	53.33	41

รูปที่ 3-22 Breakthrough curve ของการดูดซับกรดไขมันเรติกจากน้ำหมักพีเอช 7 ของคอลัมน์แตกเปลี่ยนไอออน ที่อัตราการไหลต่างๆ กัน



ปริมาณกรดไขมันเรติกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ (มก.)

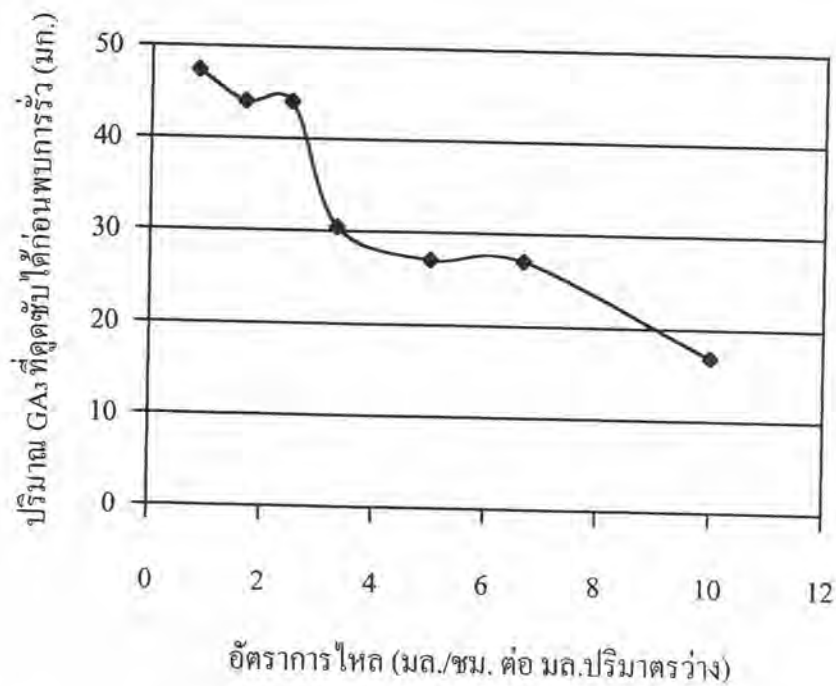
รูปที่ 3-23 เปรียบเทียบการดูดซับการดูดซับแรงดันของดินเหนียวจากน้ำหมักพืช 7 ที่ผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ด้วยอัตราการไหลต่างๆ กัน



ปริมาณการดูดซับแรงดันที่ผ่านเข้าคอลัมน์ (มก.)

ตารางที่ 3-32 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลลัมน์ดูดซับได้ก่อนถึงจุดที่พบการรั่วและเวลาที่ใช้ในการผ่านสารเข้าคอลลัมน์ เมื่อผ่านน้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลลัมน์ด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ

อัตราการไหล (มล./ชม.ต่อ มล. ปริมาตรว่าง)	เวลาที่ใช้ผ่านน้ำหมัก 100 มล. เข้าคอลลัมน์ (ชม.)	ปริมาณ GA ₃ ที่คอลลัมน์ ดูดซับได้ก่อนพบการรั่ว (มก.)
0.83	33.33	47.41
1.67	16.67	44.02
2.5	11.11	44.02
3.33	8.33	30.48
5	5.56	27.09
6.67	4.17	27.09
10	2.77	16.93



รูปที่ 3-24 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่คอลลัมน์ดูดซับได้ก่อนพบการรั่ว เมื่อผ่านน้ำหมักพีเอช 7 เข้าคอลลัมน์ด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ

3.9 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

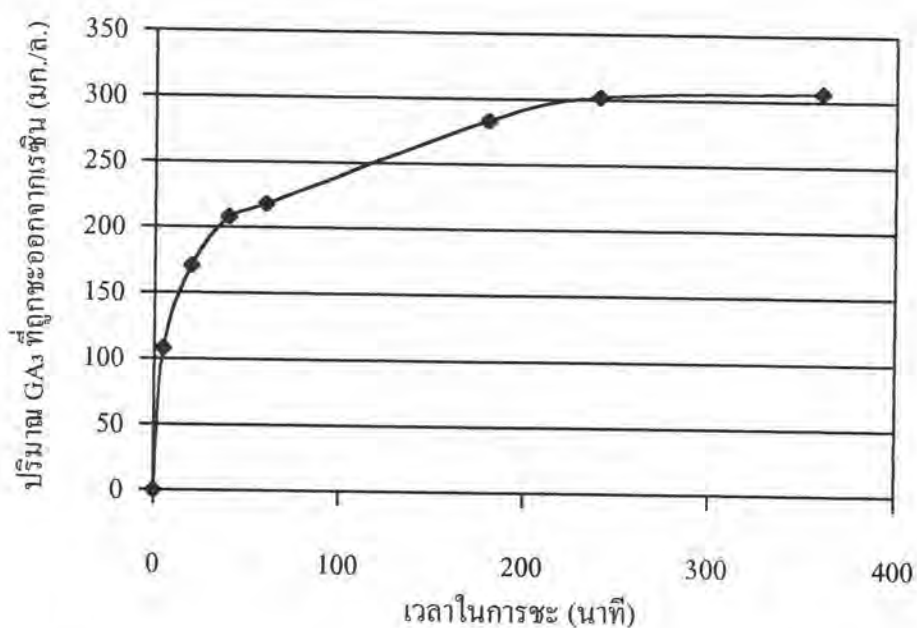
ทดลองชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ที่ผ่านการดูดซับกรดจิบเบอเรลลินจากน้ำหมักพีเอช 7 ด้วยสารละลายเมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก เนื่องจากมีรายงานการวิจัยของบริษัท Merck & Co., Inc (1960) ว่าสารละลายของตัวทำละลายอินทรีย์ในน้ำ ที่มีการเติมกรด สามารถใช้ชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนได้ และพิจารณาพร้อมกับผลการทดลองหาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลินในสารละลายตัวชะในข้อ 3.5 ที่แสดงให้เห็นว่า สารละลายตัวชะที่เหมาะสม คือ สารละลายเมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ทดลองแปรเปอร์เซ็นต์ของเมธานอลในน้ำ และอัตราการไหลของสารละลายตัวชะ ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

3.9.1 เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากเรซิน

หาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะ เพื่อใช้คำนวณหาอัตราการไหลเบื้องต้นของสารละลายตัวชะในการผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน โดยทดลองชะเรซินที่ผ่านการดูดซับกรดจิบเบอเรลลินจากน้ำหมักพีเอช 7 ด้วยสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตามวิธีทดลองข้อ 2.9.3.1 วิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลินที่ถูกชะออกจากเรซินที่เวลาในการชะต่าง ๆ ได้ผลดังตารางที่ 3-33 แล้วเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลินที่ชะได้กับเวลาในการชะ ได้ดังรูปที่ 3-25 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในระยะแรกของการทดลอง กรดจิบเบอเรลลินที่ถูกชะออกจากเรซินจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อเวลาในการชะเพิ่มขึ้น จนถึงระยะเวลาในการชะค่าหนึ่ง จะพบว่าปริมาณกรดจิบเบอเรลลินที่ถูกชะออกจากเรซินเริ่มมีค่าคงที่ นั่นคือเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากเรซิน ที่จุดอิ่มตัวของการชะนี้ จะเกิดสมดุลระหว่างอัตราการปล่อยและการดูดซับกรดจิบเบอเรลลินของเรซิน ดังได้อธิบายไว้ในผลการทดลองที่ 3.7 หาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะกรดจิบเบอเรลลินจากกราฟในรูปที่ 3-25 โดยลากเส้นสัมผัสกราฟตามแนวตั้งและแนวนอน จุดที่เส้นสัมผัสตัดกันก็คือ เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะกรดจิบเบอเรลลินออกจากเรซิน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 220 นาที

ตารางที่ 3-33 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลาย เมื่อชะเรซินด้วยสารละลาย 93 % เมทานอลที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่เวลาในการชะ ต่าง ๆ กัน

เวลาในการชะ (นาที)	ปริมาณ GA_3 ที่ชะได้ในสารละลาย (มก./ล.)
0	0.00
5	108.09
20	170.48
40	208.09
60	218.00
180	283.46
240	302.18
360	306.81



รูปที่ 3-25 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกชะออกจากเรซิน ด้วยสารละลาย 93 % เมทานอลที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่เวลาในการชะต่าง ๆ กัน

คำนวณหาอัตราการไหลของสารละลายตัวชะ โดยอาศัยหลักว่า ระยะเวลาที่สารละลายตัวชะสัมผัสกับเรซิน (contact time) ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะกรดจิบเบอเรลิกออกจากเรซิน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการชะสูงสุด คำนวณหาอัตราการไหลจากสมการที่ 3-1 ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{อัตราการไหลของสารละลายตัวชะ} &= \frac{3.6 / 220}{60} \\ &= 1 \quad \text{มิลลิลิตร/ชั่วโมง} \end{aligned}$$

คิดเป็น space velocity เท่ากับ 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

3.9.2 ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการชะกรดจิบเบอเรลิกออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.9.3.2 โดยเตรียมเรซินที่ดูดซับกรดจิบเบอเรลิก จากการผ่านน้ำหมักเข้าคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ซึ่งเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลิก ตามผลการทดลองข้อ 3.8.3 หาปริมาณกรดจิบเบอเรลิกที่ถูกดูดซับ ชะกรดจิบเบอเรลิกที่ไม่ถูกดูดซับออกจากคอลัมน์ด้วยเมธานอล หลังจากนั้น ผ่านสารละลายตัวชะเข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน สารละลายตัวชะที่เลือกใช้ คือ สารละลายเมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ดังเหตุผลที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อการทดลองที่ 3.9 โดยแปรเปอร์เซ็นต์เมธานอลในน้ำที่ 70, 80, 93, และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 30 องศาเซลเซียส ตลอดจนการทดลอง เก็บสารที่ไหลออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ นำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลิกที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.5.3 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-34 ถึง 3-37 คำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลิกที่ชะได้ทั้งหมด เปอร์เซ็นต์การดูดซับ และอัตราส่วนของกรดจิบเบอเรลิกที่ถูกชะต่อปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ แสดงผลในตารางที่ 3-38

ตารางที่ 3-34 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอถัมนั้แลงเปลี่ยนไออนด้วยสารละลาย 70 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิดิก ที่อัตราการไหล 0.28 มล./ชม. ต่อมีลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอถัมนั้ (มล.)	ความเข้มข้นของ GA ₃ ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกชะ ออกจากคอถัมนั้ (มก.)
1	10	421.00	4.21
2	10	4324.07	43.24
3	10	893.78	8.94
4	10	136.00	1.36
5	10	32.69	0.33
6	10	0.00	0.00
ปริมาณ GA ₃ ทั้งหมดที่ชะได้ =			58.08 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ =			50 มล.

ตารางที่ 3-35 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในส่วนต่าง ๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลาย 80 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหล 0.28 มล./ชม. ต่อมีลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้นของ GA_3 ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูกชะ ออกจากคอลัมน์ (มก.)
1	10	1645.35	16.45
2	10	3632.47	36.32
3	10	763.75	7.64
4	10	154.11	1.54
5	10	31.07	0.31
6	10	0.00	0.00
ปริมาณ GA_3 ทั้งหมดที่ชะได้ =			62.27 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ =			50 มล.

ตารางที่ 3-36 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในส่วนต่างๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหล 0.28 มล./ชม. ต่อมิลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้นของ GA ₃ ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกชะ ออกจากคอลัมน์ (มก.)
1	10	967.05	9.67
2	10	5099.28	50.99
3	10	916.36	9.16
4	10	164.97	1.65
5	10	0.00	0.00
ปริมาณ GA ₃ ทั้งหมดที่ชะได้			= 71.48 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้			= 40 มล.

ตารางที่ 3-37 ปริมาณและความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในส่วนต่าง ๆ ของสารละลายที่ได้จากการชะคอถั่วลิ้มแก่เปลี่ยนไอออนด้วยเมธานอล 100 % ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหล 0.28 มล./ชม. ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

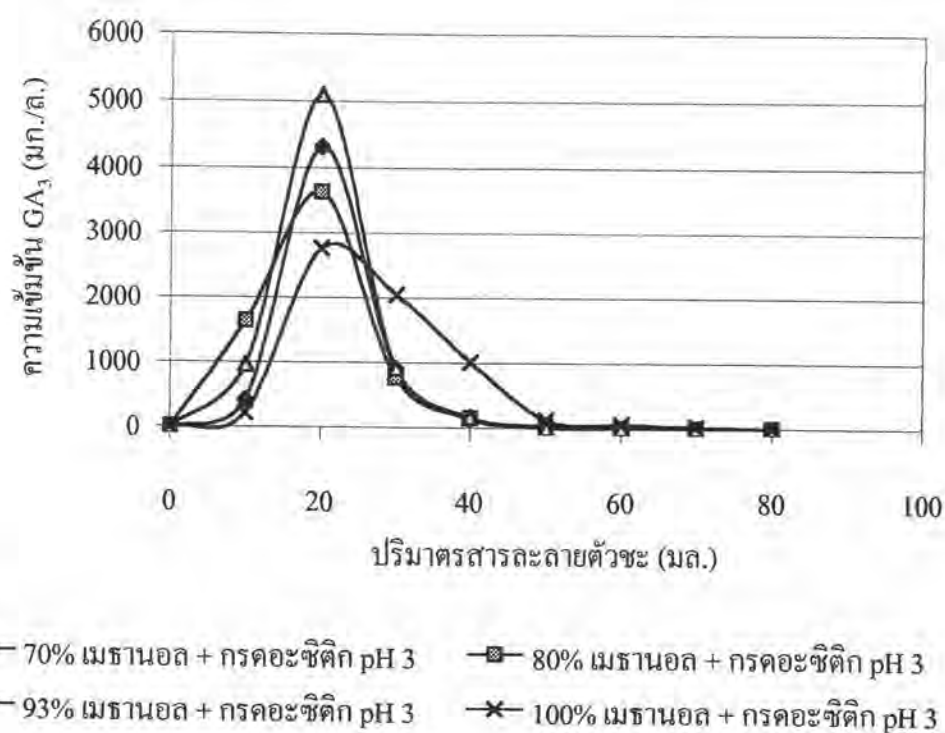
ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอถั่วลิ้ม (มล.)	ความเข้มข้นของ GA ₃ ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกชะ ออกจากคอถั่วลิ้ม (มก.)
1	10	216.84	2.17
2	10	2761.33	27.61
3	10	2055.55	20.56
4	10	1016.95	10.17
5	10	129.61	1.30
6	10	56.93	0.57
7	10	22.09	0.22
8	10	0.00	0.00
ปริมาณ GA ₃ ทั้งหมดที่ชะได้ =			62.59 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ =			70 มล.

ตารางที่ 3-38 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับและที่ชะได้จากคอลัมน์ ปริมาณสารละลายตัวชะที่ใช้ในการชะ เปรอร์ชั่นต์การชะ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาณสารละลายตัวชะที่ใช้ เมื่อชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลายตัวชะชนิดต่าง ๆ ด้วยอัตราการไหล 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาณระหว่างระหว่งเรซิน

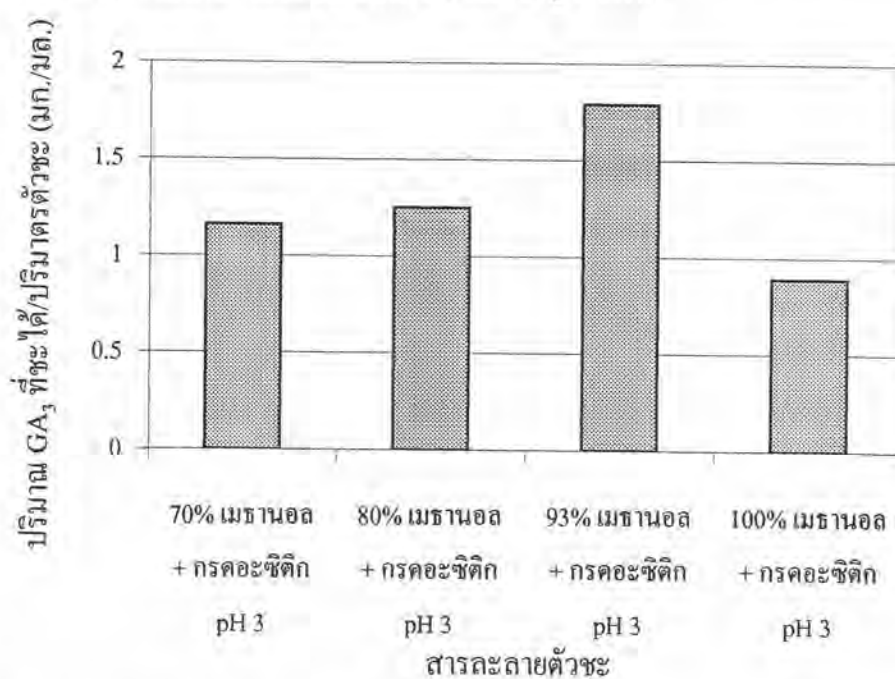
สารละลายตัวชะ	ปริมาณ GA ₃ ที่ถูกดูดซับ (มก.)	ปริมาณ GA ₃ ที่ชะได้ (มก.)	ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ (มล.)	เปอร์เซ็นต์การชะ GA ₃	ปริมาณ GA ₃ ที่ชะได้/ปริมาณตัวชะ (มก./มล.)
70 % เมธานอลในน้ำ เติมกรดอะซิติกปรับ pH เป็น 3	61.79	58.08	50	94	1.16
80 % เมธานอลในน้ำ เติมกรดอะซิติกปรับ pH เป็น 3	56.46	62.27	50	110	1.25
93 % เมธานอลในน้ำ เติมกรดอะซิติกปรับ pH เป็น 3	59.44	71.48	40	120	1.79
100 % เมธานอลในน้ำ เติมกรดอะซิติกปรับ pH เป็น 3	58.22	62.59	70	108	0.89

จากผลการทดลองพบว่า สารละลายตัวชะที่ใช้ทุกชนิดสามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลลัมน์ได้ประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากในขั้นตอนการดูดซับและการชะมีการเตรียมสารก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน จึงไม่ได้ใช้กราฟมาตรฐานเดียวกันในการเปรียบเทียบหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ทำให้ค่าที่ได้มีความคลาดเคลื่อนไปบ้าง พิจารณาเลือกสารละลายตัวชะที่เหมาะสมโดยเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกชะกับปริมาณตัวชะที่ผ่านเข้าคอลลัมน์ ดังรูปที่ 3-26 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำสามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลลัมน์ด้วยความเข้มข้นที่สูงกว่าตัวชะอื่น ๆ ส่วนสารละลาย 100 % เมธานอลจะชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลลัมน์ด้วยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด และใช้ปริมาตรสารละลายในการชะมากที่สุด เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรตัวชะชนิดต่าง ๆ ดังรูปที่ 3-27 ได้ว่าสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ มีปริมาณของกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรตัวชะสูงที่สุด รองลงมาได้แก่สารละลาย 80 % และ 70 % เมธานอล ซึ่งมีอัตราส่วนใกล้เคียงกัน ส่วน 100 % เมธานอล จะมีอัตราส่วนต่ำที่สุด อธิบายได้ว่า ในสารละลายตัวชะที่ประกอบด้วยสารละลายเมธานอลในน้ำ ที่เติมกรดอะซิติกเพื่อปรับพีเอชเป็น 3 กรดอะซิติกจะแตกตัวให้อะซิเตตไอออน (CH_3COO^-) เข้าแลกที่จับกับหมู่ฟังก์ชันของเรซินแทนกรดจิบเบอเรลลิก กรดจิบเบอเรลลิกที่หลุดออกมาจะละลายในเมธานอล และจะถูกพาออกจากคอลลัมน์ ดังนั้น ปริมาณเมธานอลในสารละลายจึงมีผลต่อการชะกรดจิบเบอเรลลิก ถ้าเปอร์เซ็นต์ของเมธานอลเพิ่มสูงขึ้น ก็จะมีความสามารถในการละลายกรดจิบเบอเรลลิกมากขึ้น สารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำจึงชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลลัมน์มากกว่าสารละลาย 80 % เมธานอล และสารละลาย 80 % เมธานอลก็ชะได้มากกว่าสารละลาย 70 % เมธานอลในน้ำ แต่กรณีของ 100 % เมธานอล ซึ่งไม่มีน้ำเป็นตัวทำละลายร่วม ทำให้กรดอะซิติกที่เติมลงไปแตกตัวได้น้อยกว่าในสารละลายตัวชะอื่น ๆ เนื่องจากเมธานอลเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นกรดมากกว่าน้ำ ทำให้กรดอะซิติกซึ่งเป็นกรดอ่อนมีความสามารถในการแตกตัวลดลง (สุภชัย ใช้เทียมวงศ์ , 2536) ด้วยเหตุนี้สารตัวชะเมธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความสามารถในการชะกรดจิบเบอเรลลิกน้อยกว่าสารตัวชะอื่น ๆ

ดังนั้นสารละลายตัวชะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลลัมน์ คือ สารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก



รูปที่ 3-26 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะชนิดต่าง ๆ ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์
เมื่อผ่านสารละลายตัวชะปริมาณต่าง ๆ กัน เข้าสู่คอลัมน์



รูปที่ 3-27 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ต่อปริมาณสารละลายตัวชะที่ใช้ชะ เมื่อ
ชะคอลัมน์แรกเปลี่ยน ไอออนด้วยสารละลายตัวชะชนิดต่าง ๆ ที่อัตราการไหล 0.28
มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

3.9.3 อัตราการไหลของสารละลายตัวชะที่เหมาะสม

จากผลการทดลองข้อ 3.9.1 สารละลาย 93 % เมธานอลที่ใช้ชะกรดจิบเบอเรลลิก ออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ควรมีอัตราการไหลต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ในการทดลองหาอัตราการไหลที่เหมาะสมจึงควรทดลองทั้งที่อัตราการไหลที่ต่ำกว่าและสูงกว่า 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน แต่เนื่องจากความจำกัดในเรื่อง ความสามารถของปั๊ม และเครื่องมือเก็บตัวอย่าง ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองที่อัตราการไหลต่ำกว่า 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรเรซิน (คิดเป็น 1 มิลลิลิตรต่อ ชั่วโมง สำหรับคอลัมน์ที่ใช้ในการทดลอง) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกศึกษาอัตราการไหลที่สูงกว่าและเท่ากับ 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่าง เรซิน ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.9.3.3 โดยผ่านสารละลาย 93 % เมธานอลเข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ กัน คือ 0.28, 0.83, 1.33, 1.67 และ 3.33 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน เก็บสารที่ไหลออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน นำมาวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ตามวิธีทดลองที่ 2.5.3 จนวิเคราะห์ไม่พบกรดจิบเบอเรลลิก ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-39 ถึง 3-43 กำหนดหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ทั้งหมด ปริมาตรตัวชะที่ใช้ เปอร์เซ็นต์การชะ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรตัวชะ ของการทดลองแต่ละชุด ได้ผลดังตารางที่ 3-44 เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การชะ พบว่า สารละลาย 93 % เมธานอลที่เติมกรดอะซิติกเพื่อปรับพีเอชเป็น 3 สามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์ได้ประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่ว่าจะผ่านเข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลเท่าใดก็ตาม เมื่อเขียนกราฟระหว่างปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรตัวชะกับอัตราการไหลต่าง ๆ ดังรูปที่ 3-28 พบว่า เมื่ออัตราการไหลของสารละลายต่ำลงปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะต่อปริมาตรสารละลายจะเพิ่มขึ้น โดยเมื่ออัตราการไหลต่ำกว่า 1.33 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรตัวชะจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และที่อัตราการไหล 0.28 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน มีปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรตัวชะสูงที่สุด และสูงกว่าที่อัตราการไหลอื่น ๆ อย่างชัดเจน แต่เวลาที่ใช้ในการชะกรดจิบเบอเรลลิก ออกจากคอลัมน์ก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังแสดงในตารางที่ 3-44 อย่างไรก็ตามการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่เติมกรดอะซิติกเพื่อปรับพีเอชเป็น 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเกิดขึ้นช้ากว่าเวลาที่ใช้ทดลองอย่างมาก โดยค่าครึ่งชีวิตของปฏิกริยานี้เท่ากับ 201 วัน ดังนั้นอัตราการไหลที่มีประสิทธิภาพในการชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์สูงสุดสำหรับการทดลองนี้ คือ 0.28 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อ มิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ตารางที่ 3-39 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ เมื่อชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหล 0.28 มล./ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น GA_3 ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูก ชะจากคอลัมน์ (มก.)
1	4	1374.60	5.50
2	5	5251.30	26.26
3	10	3081.91	30.82
4	8	572.38	4.58
5	10	364.26	3.64
6	5	91.91	0.46
7	8	64.54	0.52
8	10	23.45	0.23
9	10	0.00	0.00
10	10	0.00	0.00
ปริมาณ GA_3 ที่ชะได้ทั้งหมด =			72.01 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้ =			60 มล.

ตารางที่ 3-40 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ เมื่อชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหล 0.83 มล./ชั่วโมง ต่อมลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น GA_3 ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูก ชะจากคอลัมน์ (มก.)
1	5	716.60	3.58
2	10	4002.14	32.02
3	8	2104.07	21.04
4	10	799.36	7.99
5	12	469.41	5.63
6	5	343.62	1.72
7	10	210.95	2.11
8	10	125.29	1.25
9	10	105.04	1.05
10	10	60.09	0.60
11	5	41.94	0.21
12	5	35.64	0.18
13	12.5	0.00	0.00
14	7.5	0.00	0.00
ปริมาณ GA_3 ที่ชะได้ทั้งหมด			= 77.39 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้			= 100 มล.

ตารางที่ 3-41 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ เมื่อชะคอตัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหล 1.33 มล./ชั่วโมง ต่อมลลิตีรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอตัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น GA_3 ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูก ชะจากคอตัมน์ (มก.)
1	10	935.15	9.35
2	10	3127.49	31.27
3	10	1601.29	16.01
4	11.2	819.51	9.18
5	8.2	568.86	4.66
6	17	358.64	6.10
7	19	248.24	4.72
8	16.5	128.95	2.13
9	20.5	63.61	1.30
10	20	41.87	0.84
11	9.5	30.20	0.29
12	10.5	0.00	0.00
13	10	0.00	0.00
ปริมาณ GA_3 ที่ชะได้ทั้งหมด			= 85.85 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้			= 151.9 มล.

ตารางที่ 3-42 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ เมื่อชะคอตัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหล 1.67 มล./ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

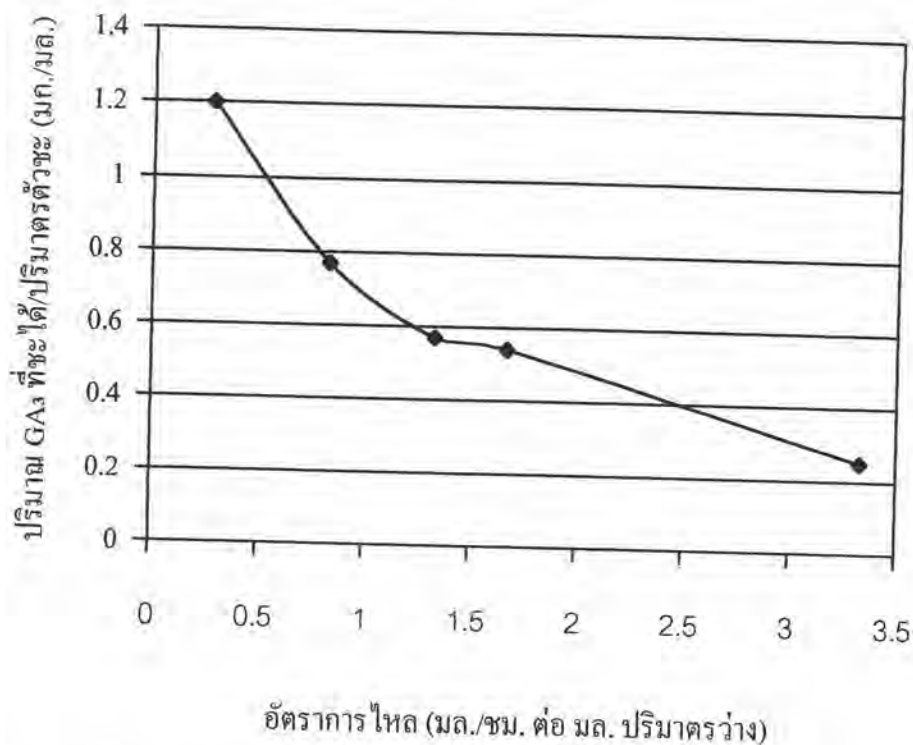
ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอตัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น GA_3 ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูก ชะจากคอตัมน์ (มก.)
1	8.4	728.75	6.12
2	9.4	3799.11	35.71
3	10	1449.63	14.50
4	9.6	836.57	8.03
5	9	640.48	5.76
6	7	494.79	3.46
7	6	374.68	2.25
8	7	280.27	1.96
9	7	219.91	1.54
10	7	189.21	1.32
11	14	136.50	1.91
12	16.5	101.89	1.68
13	16	25.58	0.41
14	16	38.17	0.61
15	8	25.23	0.20
16	8	27.54	0.22
17	8	0.00	0.00
ปริมาณ GA_3 ที่ชะได้ทั้งหมด			= 85.7 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้			= 158.9 มล.

ตารางที่ 3-43 ความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ เมื่อชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหล 3.33 มล./ชั่วโมง ต่อมีลลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน

ลำดับ ส่วนที่	ปริมาตรสารละลายตัวชะ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ (มล.)	ความเข้มข้น GA_3 ในสารละลาย (มก./ล.)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูก ชะจากคอลัมน์ (มก.)
1	9	767.49	6.91
2	10.6	2047.78	21.71
3	10.6	497.75	5.28
4	8.4	379.16	3.18
5	8	323.44	2.59
6	8.2	204.80	1.68
7	8.2	202.20	1.66
8	8.4	156.22	1.31
9	8.4	142.46	1.20
10	8.6	127.54	1.10
11	16	121.84	1.95
12	15	95.43	1.43
13	13	80.73	1.05
14	17	58.66	1.00
15	17	43.98	0.75
16	18	35.99	0.65
17	18	32.53	0.59
18	18	24.45	0.44
19	9	0.00	0.00
20	9	0.00	0.00
ปริมาณ GA_3 ที่ชะได้ทั้งหมด			= 54.45 มก.
ปริมาตรสารละลายตัวชะที่ใช้			= 220.4 มล.

ตารางที่ 3-44 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับและที่ชะได้จากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ปริมาณสารละลายตัวชะที่ใช้ เปรียบเทียบการชะกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาณสารละลายตัวชะที่ใช้ และเวลาที่ต้องใช้ในการชะกรดจิบเบอเรลลิก 100 มก. ออกจากคอลัมน์ เมื่อชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่อัตราการไหลต่างๆ

อัตราการไหล (มล./ชม. ต่อ มล. void volume)	ปริมาณ GA_3 ที่ถูกดูดซับ (มก.)	ปริมาณ GA_3 ที่ชะได้ (มก.)	ปริมาณสารละลาย ตัวชะที่ใช้ (มล.)	เปอร์เซ็นต์การชะ GA_3 ออกจาก คอลัมน์	ปริมาณ GA_3 ที่ ถูกชะ/ปริมาณตัวชะ (มก./มล.)	เวลาในการชะ GA_3 100 มก. ออกจาก คอลัมน์ (ชม.)
0.28	63.59	72.01	60.0	113	1.20	83
0.83	84.38	77.39	100.0	92	0.77	43
1.33	68.26	85.85	151.9	126	0.57	37
1.67	71.35	85.70	158.9	120	0.54	31
3.33	53.33	54.45	220.4	102	0.25	33



รูปที่ 3-28 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรสารละลาย 93% เมธานอลในน้ำที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ที่ใช้ชะคอสมัน์แลกเปลี่ยนไอออนที่อัตราการใช้ต่าง ๆ กัน

3.9 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากสารละลายตัวชะ

ทดลองตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก จากสารละลายที่ได้จากการชะคอสมัน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วย 93 % เมธานอล ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก โดยเลือกใช้เอทริลอะซิเตตเป็นตัวทำละลายในการตกผลึก เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกโดยทั่วไป (Bruckner และ Blechshmidt, 1991) และจากผลการทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการตกผลึกของสุภาพรพรหมกุล (2533) ก็พบว่า เอทริลอะซิเตตเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก ทำการทดลองหาความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทริลอะซิเตต แปรอุณหภูมิในการตกผลึก และวิธีในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก ได้ผลดังต่อไปนี้

3.10.1 ความสามารถในการละลาย (solubility) ของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทิลอะซิเตต ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

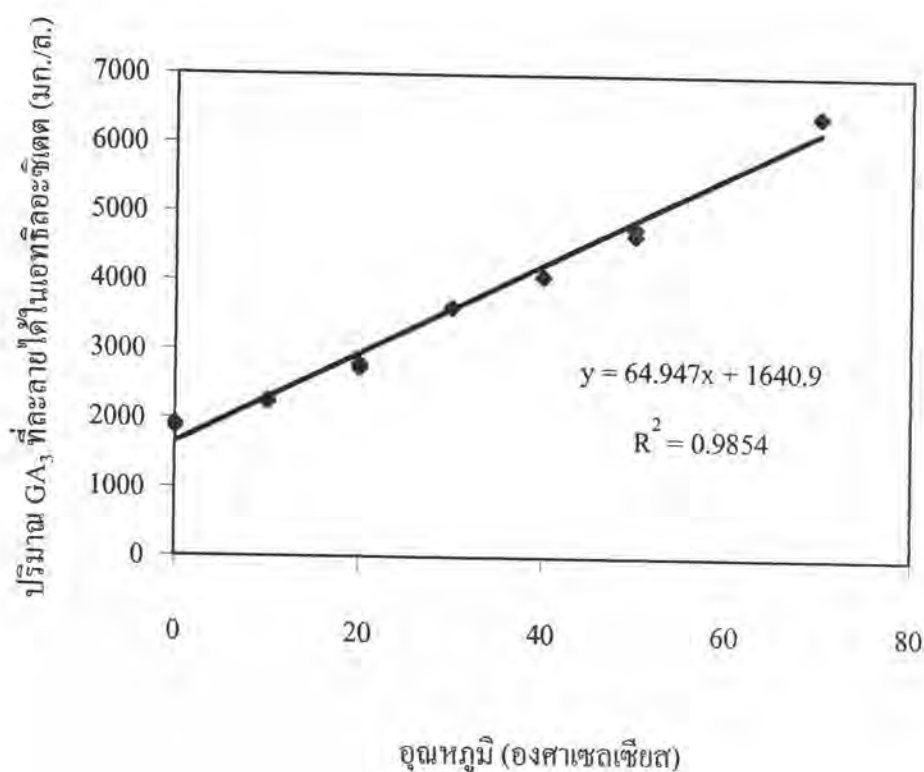
ทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.10.1 โดยชั่งกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน น้ำหนัก 0.01 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมเอทิลอะซิเตตที่ทราบปริมาตรแน่นอนที่ละน้อย นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 70, 50, 40, 30, 20, 10 และ 4 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิและเขย่าให้สารละลาย เติมเอทิลอะซิเตตจนกว่ากรดจิบเบอเรลลิกจะละลายหมด บันทึกปริมาตรเอทิลอะซิเตตที่ใช้ นำมาคำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายได้สูงสุดในเอทิลอะซิเตต ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ซึ่งก็คือ ความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทิลอะซิเตต ได้ค่าดังตารางที่ 3-45 ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น กรดจิบเบอเรลลิกจะสามารถละลายในเอทิลอะซิเตตได้เพิ่มขึ้น หาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับความสามารถในการละลาย โดยเขียนกราฟระหว่าง ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกสูงสุดที่ละลายได้ในเอทิลอะซิเตตกับอุณหภูมิของสารละลาย ดังรูปที่ 3-29 ได้กราฟเส้นตรง มีสมการคือ $y = 64.947x + 1640.9$ แสดงว่าความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทิลอะซิเตตมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับอุณหภูมิ การหาความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทำได้โดยแทนค่าตัวแปร x ด้วยอุณหภูมิในสมการข้างต้น ค่า y ที่ได้ก็คือ ความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิที่ต้องการ

ค่าความสามารถในการละลายนี้ สามารถใช้กำหนดปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก และ ปริมาณเอทิลอะซิเตตเบื้องต้น ที่ต้องใช้ในการเตรียมสารละลายอิมัลชันของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทิลอะซิเตต เพื่อใช้ในการตกผลึกต่อไปได้ เช่น การเตรียมสารละลายอิมัลชันที่จุดเดือดของเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส ต้องใช้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เท่ากับ

$$\begin{aligned} y &= (64.947)(77) + 1640.9 \\ &= 6641.82 \quad \text{มิลลิกรัมต่อสารละลาย 1 ลิตร} \end{aligned}$$

ตารางที่ 3-45 ความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทริลอะซิเตต ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ GA ₃ สูงสุดที่ละลายได้ ในเอทริลอะซิเตต (มก./ล.)		
	ชุดทดลองที่ 1	ชุดทดลองที่ 2	ค่าเฉลี่ย
4	1907.41	1890.91	1899.16
10	2260.87	2239.13	2250.00
20	2736.84	2789.47	2763.16
30	3620.69	3620.69	3620.69
40	4076.92	4076.92	4076.92
50	4772.73	4681.82	4727.27
70	6437.50	6437.50	6437.50



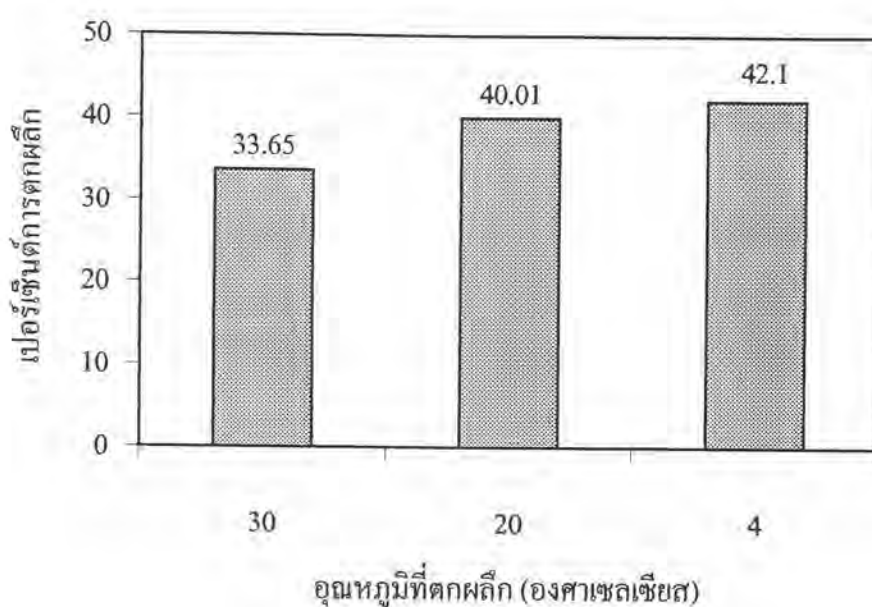
รูปที่ 3-29 ความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทริลอะซิเตต ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

3.10.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก

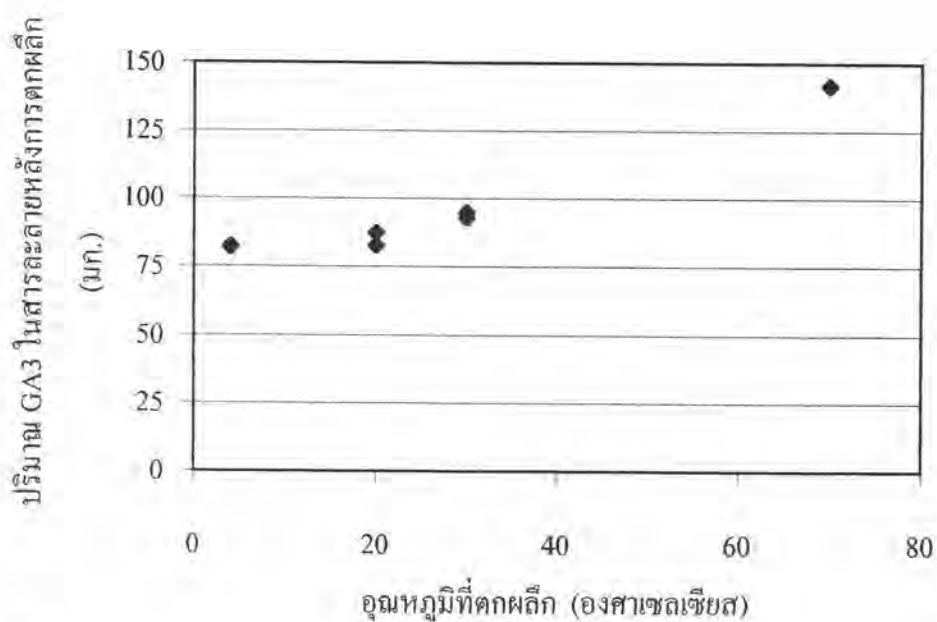
เตรียมสารละลายอิ่มตัวของกรดจิบเบอเรลลิกที่จุดเดือดของเอทิลอะซิเตต โดยละลายกรดจิบเบอเรลลิกเกรดทางการค้าจากบริษัทคาคาไดนามิคในเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกได้เท่ากับ 7,093 มิลลิกรัมต่อลิตร บีเปดสารละลายอิ่มตัว 20 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกเท่ากับ 141.86 มิลลิกรัม นำไปควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบสัดส่วน เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ ลดอุณหภูมิจนถึง 4 องศาเซลเซียส สังเกตการตกผลึกเมื่ออุณหภูมิลดลงทุก 10 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 60 และ 50 องศาเซลเซียส สารละลายเปลี่ยนจากใสเป็นขาวขุ่น แต่ยังไม่พบการตกผลึก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กรดจิบเบอเรลลิกเริ่มตกผลึกเป็นของแข็งสีขาวแฉกลอยอยู่ในสารละลาย แต่ยังมีปริมาณน้อยมากไม่สามารถกรองแยกผลึกมาวิเคราะห์ได้ เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 30 องศาเซลเซียส สังเกตเห็นการตกผลึกของกรดจิบเบอเรลลิกเป็นของแข็งสีขาวได้ชัดเจน และมีปริมาณมากพอที่จะแยกผลึกออกมาวิเคราะห์ได้ จึงเริ่มเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจน ถึง 4 องศาเซลเซียส โดยกรองแยกผลึกออกจากสารละลายด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลือหลังการตกผลึก ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.5.3 คำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกและเปอร์เซ็นต์การตกผลึก ได้ดังตารางที่ 3-46 เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ดังรูปที่ 3-30 พบว่าที่อุณหภูมิต่ำลง กรดจิบเบอเรลลิกมีแนวโน้มว่าจะตกผลึกได้มากขึ้น แต่การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกเป็นไปอย่างช้า ๆ สอดคล้องกับกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายหลังการตกผลึกกับอุณหภูมิในการตกผลึก ดังรูปที่ 3-31 ซึ่งแสดงว่า มีการลดลงของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายหลังการกรองแยกผลึกอย่างช้า ๆ เมื่ออุณหภูมิต่ำลง ดังนั้นการลดอุณหภูมิในการตกผลึกจาก 77 เป็น 30 องศาเซลเซียสน่าจะเพียงพอสำหรับการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อนำผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ ด้วย HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.5.4 ได้เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ดังตารางที่ 3-47 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของผลึกที่ตกได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ผลึกมาตรฐานจากบริษัท SIGMA และผลึกเกรดการค้าจากบริษัทคาคาไดนามิค ดังรูปที่ 3-32 พบว่า ผลึกที่ตกได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน ที่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักสารที่ใช้วิเคราะห์ ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าผลึกกรดจิบเบอเรลลิกเกรดทางการค้าที่ใช้เตรียมสารละลายก่อนการตกผลึก ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง จึงง่ายต่อการควบคุม และการลดอุณหภูมิต่ำกว่านี้ ก็ไม่ได้ให้ผลการตกผลึกที่ดีขึ้นอย่างชัดเจน

ตารางที่ 3-46 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลือในสารละลายหลังการตกผลึก และเปอร์เซ็นต์การตกผลึกของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ปริมาณ GA_3 ในสารละลายยิมตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทิลอะซิเตตที่อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส = 141.86 มก.	ปริมาณ GA_3 ในสารละลายหลังการตกผลึก (มก.)		ปริมาณ GA_3 ที่ตกผลึก (มก.)		เปอร์เซ็นต์การตกผลึก GA_3		
	ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก		ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลือ		ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	เฉลี่ย
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2			
30	95.19	93.05	46.67	48.81	32.90	34.41	33.65
20	87.46	82.75	54.40	59.11	38.34	41.67	40.01
4	82.36	81.90	59.50	59.96	41.94	42.27	42.10



รูปที่ 3-30 เปอร์เซ็นต์การตกผลึกของกรดจิบเบอเรลลิก จากการตกผลึกสารละลายอิมิตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทริลอะซิเตต ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

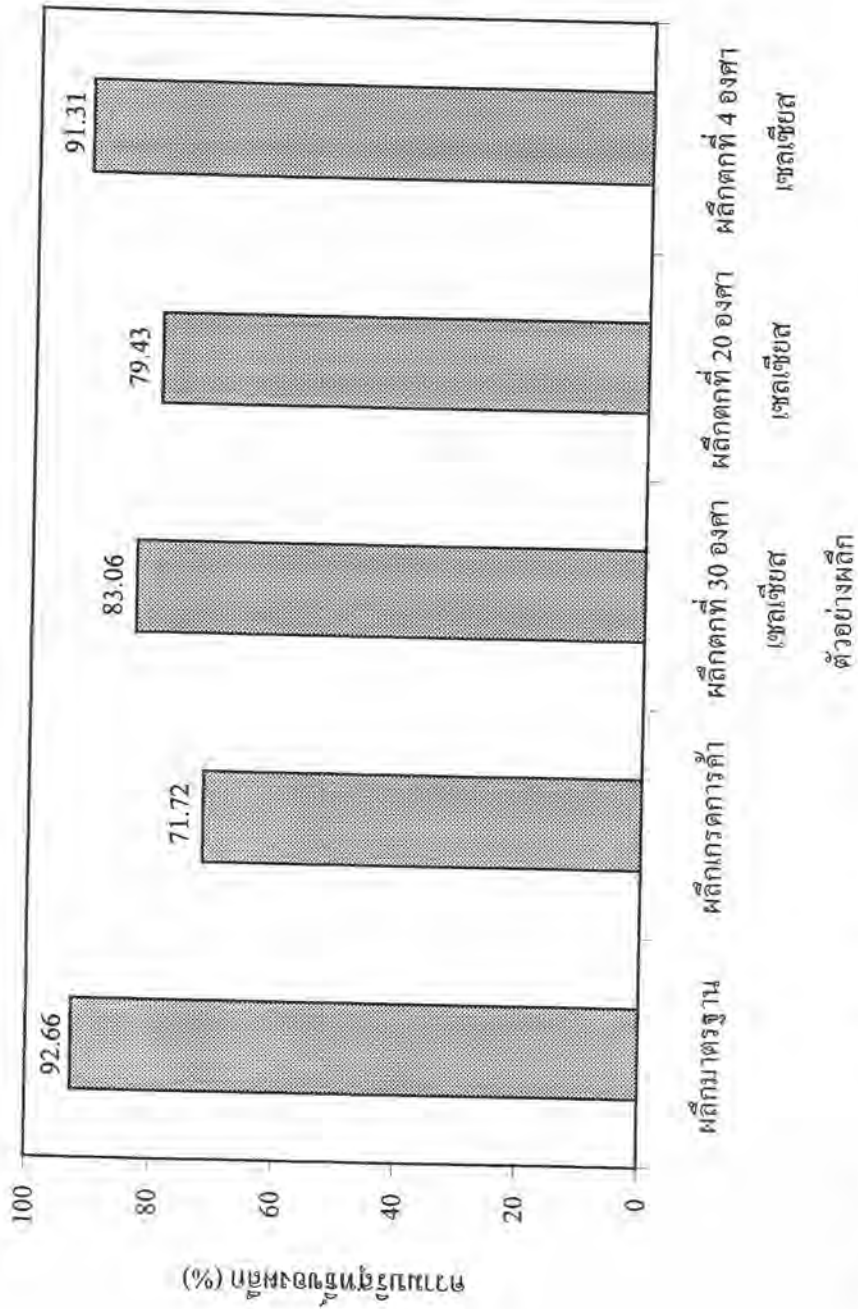


รูปที่ 3-31 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลือในสารละลาย หลังการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากสารละลายอิมิตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทริลอะซิเตต ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตารางที่ 3-47 เปรอ์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการตกผลึกที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของผลึกมาตรฐานจากบริษัท SIGMA และของผลึกเกรดทางการค้าจากบริษัทลัดดาไดนามิค

ลักษณะผลึก	เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของผลึก * 1
ผลึกที่ตกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	83.06
ผลึกที่ตกที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	79.43
ผลึกที่ตกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	91.31
ผลึกมาตรฐานจาก SIGMA	92.66
ผลึกเกรดการค้า จากบริษัทลัดดาไดนามิค	71.72

หมายเหตุ *1 เปรอ์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของผลึก วิเคราะห์โดยเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก
ต่อน้ำหนักสารทั้งหมด



รูปที่ 3-32 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์เกรดการค้า ที่ได้จากการตกผลึกสารละลายอิมัลชันของกรดไขมันเอเรลิกในเอริลอะซิเตต ที่อุณหภูมิต่างๆ ผลิตภัณฑ์เกรดการค้ามาตรฐานจากบริษัท SIGMA และผลิตภัณฑ์การค้าจากบริษัทค้าค่าไคนามิค

3.10.3 วิธีตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่เหมาะสม

วิธีที่ 1 การระเหยแห้งแล้วเติมเอทธิลอะซิเตตให้ตกผลึก

ตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายอยู่ในสารละลายตัวชะด้วยความเข้มข้น 1,839.83 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีทดลองข้อ 2.10.3.1 รูปที่ 2-1 เมื่อระเหยสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก 91.99 มิลลิกรัม ภายใต้สภาวะอากาศจนแห้ง สารหลังการระเหยมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองน้ำตาลปนอยู่กับของแข็งสีเหลือง ละลายสารที่ระเหยได้ด้วยเอทธิลอะซิเตต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีขาวขุ่นมีตะกอนเหลืองแขวนลอยอยู่ หลังการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน จะได้ตะกอนสีเหลืองแยกออกจากสารละลายใส ละลายตะกอนเหลืองทั้งหมดในสารละลาย 93 % เมธานอล ที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดฟอสฟอริก (สารละลายตัวพา) วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่อยู่ในตะกอนเหลืองและในสารละลาย ได้ดังตารางที่ 3-48 ระเหยสารละลายให้แห้งอีกครั้งภายใต้สภาวะอากาศ ได้สารเป็นคราบแข็งสีขาวปนเหลือง เติมเอทธิลอะซิเตต 2 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าอย่างแรง กรดจิบเบอเรลลิกจะตกผลึกออกมา มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวละเอียด กรองแยกผลึกออกจากสารละลายด้วยกระดาษกรอง ต้างผลึกด้วยเอทธิลอะซิเตตที่เย็นจัด ทิ้งไว้ให้แห้งในเดซิเคเตอร์ ผสมสารละลายจากการต้างผลึกกับสารละลายที่เหลือหลังกรองแยกผลึกซึ่งมีสีเหลืองเข้ม วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลือในสารละลาย และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก ได้ดังตารางที่ 3-48

ตกผลึกครั้งที่ 2 โดยระเหยสารละลายที่เหลือให้แห้งภายใต้สภาวะอากาศ ได้เป็นของแข็งสีขาวอมเหลือง เติมเอทธิลอะซิเตตประมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง กรดจิบเบอเรลลิกจะตกผลึกออกมา ได้เป็นผลึกสีขาวละเอียด แขวนลอยอยู่ในสารละลายสีเหลือง กรองแยกและต้างผลึก ทิ้งให้แห้งในเดซิเคเตอร์ วิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลือในสารละลายและปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก ได้ผลดังตารางที่ 3-48

ตารางที่ 3-48 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่วิเคราะห์ได้ จากขั้นตอนต่างๆ ของการตกผลึก กรดจิบเบอเรลลิก ด้วยการระเหยแห้งแล้วเติมเอทิลอะซิเตตให้ตกผลึก

สารจากขั้นตอนการตกผลึก	ปริมาณ GA_3 (มก.)	
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2
สารละลายตัวชะก่อนตกผลึก (A)	91.99	91.99
สารละลายหลังแยกตะกอนเหลือง (B)	71.33	74.72
ตะกอนเหลือง	14.59	15.07
สารละลายหลังตกผลึกครั้งที่ 1 (C)	24.50	35.17
สารละลายหลังตกผลึกครั้งที่ 2 (D)	11.07	14.78
ผลึก GA_3 จากการตกผลึกครั้งที่ 1 (B-C)	46.83	39.55
ผลึก GA_3 จากการตกผลึกครั้งที่ 2 (C-D)	13.43	20.39

วิธีที่ 2 การทำให้เกิดสารละลายอิมตัวของกรดจิบเบอเรลลิก ที่จุดเดือดของสารละลาย แล้วลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึกที่ 30 องศาเซลเซียส

ทำการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.10.3.2 รูปที่ 2-2 ใช้สารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในตัวระปรึมาตร 100 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกเริ่มต้น เท่ากับ 183.98 มิลลิกรัม นำมาระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ ได้ของเหลวหนืดสีเหลืองปนกับของแข็งสีเหลืองละลายด้วยเอทิลอะซิเตต 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีขาวุ่นมีตะกอนสีเหลืองแขวนลอยอยู่ ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเหลืองออก วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในตะกอนเหลืองและในสารละลาย ได้ดังตารางที่ 3-49 ระเหยสารละลายภายใต้สุญญากาศ ให้ปริมาตรลดลงเป็น $\frac{1}{2}$ เท่าของปริมาตรเริ่มต้น ระเหยเอทิลอะซิเตตออกที่จุดเดือดของสารละลาย อุณหภูมิประมาณ 77 องศาเซลเซียส จนสารละลายเริ่มขุ่น หยดเอทิลอะซิเตตที่ร้อน ลงในสารละลายจนสารละลายใส จะได้สารละลายอิมตัวของกรดจิบเบอเรลลิกที่จุดเดือดของเอทิลอะซิเตต นำไปควบคุมอุณหภูมิด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงจนเหลือ 30 องศาเซลเซียส ทิ้งให้ตกผลึก โดยเขย่าสารเบา ๆ ตลอดเวลา กรดจิบเบอเรลลิกจะตกผลึกออกมาเป็นของแข็งสีขาวละเอียดแขวนลอยในสารละลายสีเหลือง กรองแยกผลึก ล้างผลึกด้วยเอทิลอะซิเตตที่เย็นจัด ทิ้งให้แห้งในเดซิเคเตอร์ นำสารจากการล้างผลึกมารวมกับสารละลายที่กรองแยกผลึกออก นำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลือ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก ได้ผลดังตารางที่ 3-49

ตกผลึกครั้งที่ 2 โดยนำสารละลายที่เหลือมาระเหยเอทิลอะซิเตตออก ที่จุดเดือดของสารละลาย จนได้สารละลายอิมตัว ทิ้งให้ตกผลึกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการตกผลึกครั้งที่ 1 ผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งละเอียดสีขาวเช่นกัน แต่มีปริมาณน้อยกว่าผลึกที่ตกได้ในครั้งที่ 1 กรองแยกผลึกกับสารละลาย ล้างผลึกและทำให้แห้งในเดซิเคเตอร์ วิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลืออยู่ และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก ได้ดังตารางที่ 3-49

ตารางที่ 3-49 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิคที่วิเคราะห์ได้ จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการตกผลึก กรดจิบเบอเรลลิค ด้วยการทำให้เกิดสารละลายอิ่มตัวของกรดจิบเบอเรลลิค ในเอทิลอะซิเตตแล้วตกผลึกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สารจากขั้นตอนการตกผลึก	ปริมาณ GA_3 (มก.)	
	ชุดทดลองที่ 1	ชุดทดลองที่ 2
สารละลายตัวชะก่อนตกผลึก (A)	183.98	183.98
สารละลายหลังแยกตะกอนเหลือง (B)	154.75	158.12
ตะกอนเหลือง	13.04	11.38
สารละลายหลังตกผลึกครั้งที่ 1 (C)	76.96	82.98
สารละลายหลังตกผลึกครั้งที่ 2 (D)	22.38	23.52
ผลึก GA_3 จากการตกผลึกครั้งที่ 1 (B-C)	77.79	75.13
ผลึก GA_3 จากการตกผลึกครั้งที่ 2 (C-D)	54.58	59.46

จากผลการทดลองในตารางที่ 3-48 และ 3-49 เห็นได้ว่าเกิดการสูญเสียกรดจิบเบอเรลลิกส่วนหนึ่งก่อนการตกผลึก ในรูปของตะกอนเหลืองซึ่งไม่ละลายในเอทิลอะซิเตต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่ามีสารเจือปนหลายชนิดอยู่ในส่วนนี้ ถ้าไม่ผ่านกระบวนการแยกตะกอนนี้ออกก่อนการตกผลึก ผลึกที่ตกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งเป็ยกสีเนื้ออมน้ำตาล คัดกันเป็นแผ่น นำข้อมูลในตาราง มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตกผลึกของกรดจิบเบอเรลลิก จากการตกผลึกทั้ง 2 วิธี ได้ดังตารางที่ 3-50 พบว่า วิธีทำให้เกิดสารละลายอิ่มตัวแล้วลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึกมีเปอร์เซ็นต์การตกผลึกเท่ากับ 85.33 เมื่อเทียบกับปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายหลังแยกตะกอนเหลือง และเท่ากับ 72.55 % เมื่อเทียบกับปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ โดยมีค่าสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การตกผลึกจากวิธีระเหยแห้งแล้วเติมเอทิลอะซิเตต ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตกผลึกเท่ากับ 82.35 และ 65.34 % ตามลำดับ

นำผลึกที่ได้จากการตกผลึกทั้ง 2 วิธี มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของผลึก ด้วย HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.5.4 ได้ผลดังตารางที่ 3-51 จากตารางพบว่าการตกผลึกครั้งที่ 1 ให้ผลึกที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าการตกผลึกครั้งที่ 2 และการตกผลึกด้วยวิธีทำให้เกิดสารละลายอิ่มตัวแล้วลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึก ให้ผลึกที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าวิธีระเหยแห้งแล้วเติมเอทิลอะซิเตตเพื่อตกผลึก โดยมีความบริสุทธิ์ของผลึกเท่ากับ 87.29 % สำหรับการตกผลึกครั้งที่ 1 ซึ่งมีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับผลึกกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน จากบริษัทซึกมา (90.42 %) และเท่ากับ 81.74 % สำหรับการตกผลึกครั้งที่ 2 ส่วนการตกผลึกด้วยวิธีระเหยแห้งแล้วเติมเอทิลอะซิเตตมีความบริสุทธิ์ของผลึกจากการตกผลึกครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 เท่ากับ 81.14 และ 76.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 3-52 แสดงตัวเลขเปรียบเทียบผลการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก จากการตกผลึกทั้ง 2 วิธี และจากการเปรียบเทียบผลการตกผลึกในรูป 3-33 แสดงว่า วิธีทำให้เกิดสารละลายอิ่มตัวแล้วลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึก ให้ผลการตกผลึกที่ดีกว่าวิธีระเหยแห้งแล้วเติมเอทิลอะซิเตตให้ตกผลึก ทั้งในด้านปริมาณการตกผลึกและความบริสุทธิ์ของผลึก และยังให้ผลึกที่มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับผลึกมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิก ดังนั้นการตกผลึกด้วยการทำให้เกิดสารละลายอิ่มตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทิลอะซิเตต ที่จุดเดือดของสารละลาย แล้วลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึกที่ 30 องศาเซลเซียส จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่าในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก

ตารางที่ 3-50 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลินที่ตกผลึกและเปอร์เซ็นต์การตกผลึก จากการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลินที่ละลายในตัวชะ ด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีตกผลึก	ชุดทดลอง ที่	ปริมาณ GA_3 ที่ตกผลึก (มก.)			เปอร์เซ็นต์การตกผลึกเทียบกับ ในสารละลายตัวชะ *1			เปอร์เซ็นต์การตกผลึกเทียบกับในสาร ละลายแห้งแยกตะกอนเหลือง *2		
		การตกผลึก ครั้งที่ 1	การตกผลึก ครั้งที่ 2	การตกผลึก ทั้งหมด	การตกผลึก ครั้งที่ 1	การตกผลึก ครั้งที่ 2	การตกผลึก ทั้งหมด	การตกผลึก ครั้งที่ 1	การตกผลึก ครั้งที่ 2	การตกผลึก ทั้งหมด
การระเหยแห้งแล้วเติมเอทิลอะซิเตตให้ตกผลึก	1	46.83	13.43	60.26	50.91	14.60	65.51	65.65	18.83	84.48
	2 เฉลี่ย	39.55	20.39	59.94	42.99	22.17	65.16	52.93	27.29	80.22
การเตรียมสารละลายอิมตัวเอง GA_3 ในเอทิลอะซิเตต แล้วตกผลึกที่ 30 องศาเซลเซียส	1	77.79	54.58	132.37	42.28	29.67	71.95	50.27	35.27	85.54
	2 เฉลี่ย	75.13	59.46	134.59	40.84	32.32	73.15	47.52	37.61	85.12
							72.55			85.33

หมายเหตุ *1 เปรียบเทียบกับในสารละลายตัวชะ โดยกำหนดให้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลินในสารละลายตัวชะเป็น 100 %

*2 เปรียบเทียบกับในสารละลายแห้งแยกตะกอนที่ไม่ละลายในเอทิลอะซิเตต โดยกำหนดให้ปริมาณ

กรดจิบเบอเรลลินในสารละลายเป็น 100 %

ตารางที่ 3-51 ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์เบอเรลิกที่ตกได้ จากการตกผลิตภัณฑ์เบอเรลิกที่ละลายอยู่ในสารละลายด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีการตกผลึก	ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ GA_3 (%) *1					ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ GA_3 จาก SIGMA (%)
	การตกผลึกครั้งที่ 1		การตกผลึกครั้งที่ 2			
	ชุดทดลองที่ 1	เฉลี่ย	ชุดทดลองที่ 1	ชุดทดลองที่ 2	เฉลี่ย	
การระเหยแห้งแล้วเติมเอทริลอะซิเตตให้ตกผลึก	81.69	81.14	nd	76.58	76.58	90.42
การทำให้เกิดสารละลายอิ่มตัวของ GA_3 ในเอทริลอะซิเตตแล้วตกผลึกที่ 30 องศาเซลเซียส	84.90	87.29	80.51	82.96	81.74	

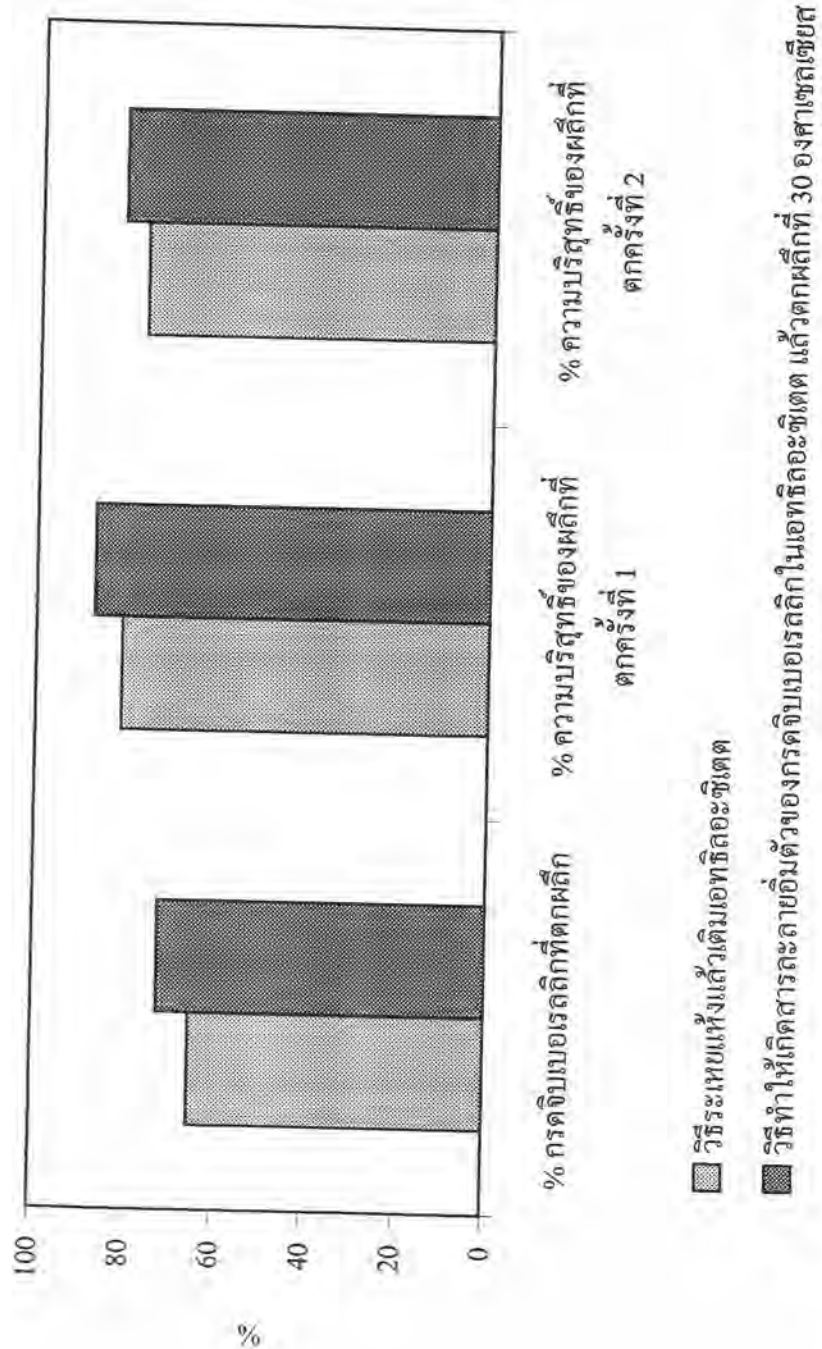
หมายเหตุ *1 เปรูเซ็นต์ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์โดยเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลิกต่อน้ำหนักสารทั้งหมด
nd หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากปริมาณผลิตภัณฑ์ที่กรองแยกได้มีปริมาณน้อย

ตารางที่ 3-52 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก และความบริสุทธิ์ของผลึกกรดจิบเบอเรลลิก
ที่ได้จากการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายอยู่ในสารละลายตัวชะ ด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีตกผลึก	ปริมาณ GA_3 ที่ตกผลึก (%) *1	ความบริสุทธิ์ของผลึก (%) *2	
		การตกผลึกครั้งที่ 1	การตกผลึกครั้งที่ 2
การระเหยแห้งแล้วเติมเอทธิล- อะซิเตตให้ตกผลึก	65.34	81.14	76.58
การทำให้เกิดสารละลายอิ่มตัวของ GA_3 ในเอทธิลอะซิเตตแล้ว ตกผลึกที่ 30 องศาเซลเซียส	72.55	87.29	81.74

หมายเหตุ *1 เป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกทั้งหมด (ครั้งที่ 1+2) จากการ
ทดลอง 2 ชุด เปรียบเทียบกับกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ

*2 เป็นค่าเฉลี่ยของค่าความบริสุทธิ์ของผลึกจากการทดลอง 2 ชุด เมื่อเปรียบเทียบกับ
น้ำหนักสารทั้งหมด



รูปที่ 3-33 เปรียบเทียบปริมาณการกระจิบเบอรลติกที่ตกผลึก ความบริสุทธิ์ของผลึกจากการตกผลึกครั้งที่ 1 และ 2 เมื่อตกผลึกที่ปริมาตรที่ละลายอยู่ในสารละลายตัวชะ ด้วยวิธีต่าง ๆ

3.11 สมบัติของกรดจิบเบอเรลลินที่ตกผลึกได้

นำผลึกกรดจิบเบอเรลลินที่ได้จากการตกผลึกครั้งที่ 1 ด้วยวิธีการตกผลึกทั้ง 2 วิธี คือ วิธีระเหยแห้งแล้วเติมเอทธิลอะซิเตตให้ตกผลึก และวิธีเตรียมสารละลายอิ่มตัวของกรดจิบเบอเรลลินในเอทธิลอะซิเตตที่จุดเดือดของสารละลายแล้วลดอุณหภูมิให้ตกผลึก ตามการทดลองข้อ 3.10 มาตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมี เปรียบเทียบกับผลึกกรดจิบเบอเรลลินมาตรฐานจากบริษัท SIGMA ได้ผลดังต่อไปนี้

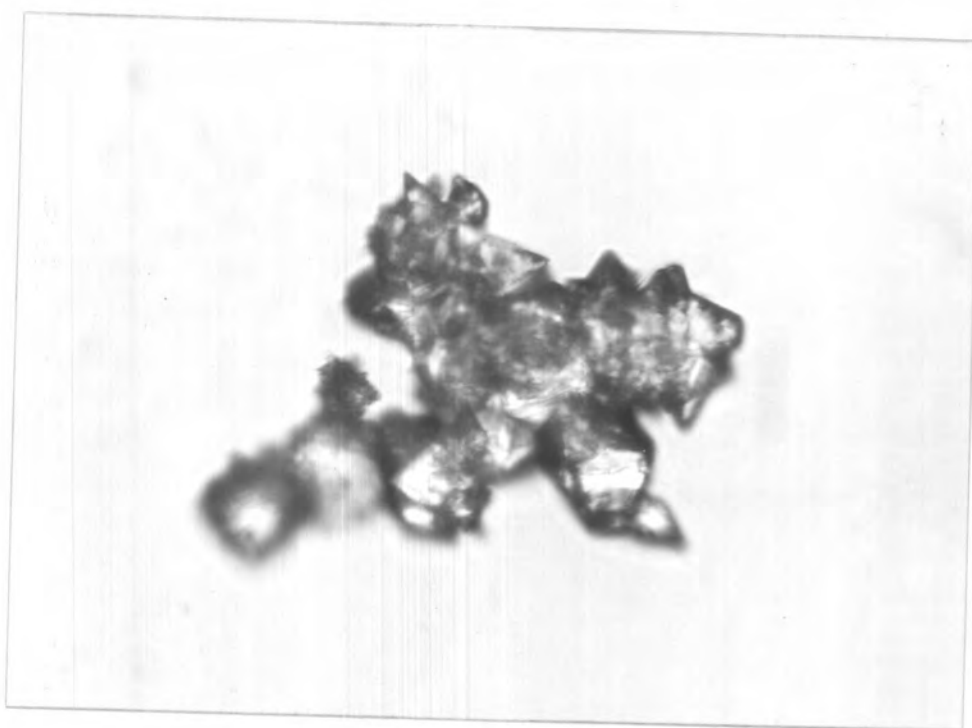
3.11.1 ลักษณะทางกายภาพ

ผลึกกรดจิบเบอเรลลินที่ตกได้จากการตกผลึกทั้ง 2 วิธี มีลักษณะทางกายภาพเหมือนกัน คือ เป็นผงละเอียดสีขาวคล้ายผงแป้ง และมีลักษณะคล้ายกับผลึกกรดจิบเบอเรลลินมาตรฐาน แต่มีความขาวน้อยกว่า เมื่อศึกษาลักษณะผลึกด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า พบว่า ผลึกที่ทดลองตกได้กับผลึกมาตรฐานมีลักษณะผลึกเหมือนกัน คือ ไม่เป็นผลึกเดี่ยว (single crystal) ที่สังเกตรูปผลึกได้ชัดเจน แต่จะประกอบด้วยผลึกที่ตรวรวมกันเป็นกลุ่มก้อน ดังรูปที่ 3-34 โดยแต่ละผลึกที่มาเกาะรวมกัน มีแนวโน้มที่จะมีรูปผลึกเป็นรูป เตตตระโกนอลไบพิระมิด (tetragonal bipyramids) ซึ่งเป็นรูปร่างของผลึกกรดจิบเบอเรลลินที่มีรายงานไว้ (Cross, 1954)

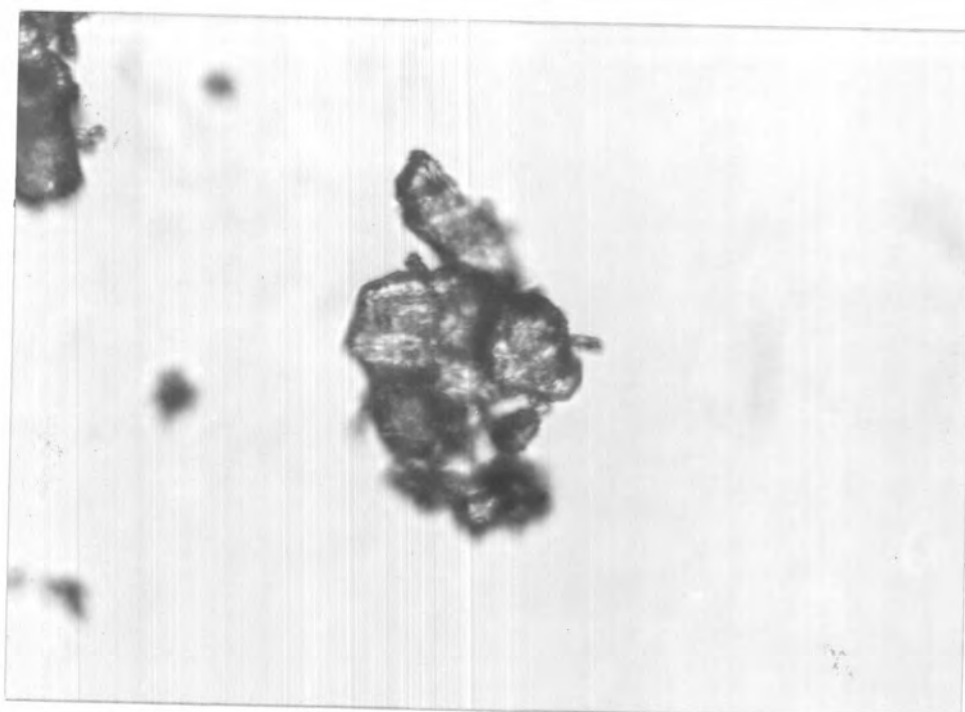
3.11.2 สมบัติทางเคมี

3.11.2.1 จุดหลอมเหลวของผลึก

นำผลึกกรดจิบเบอเรลลินที่ทดลองตกผลึกได้และผลึกมาตรฐาน มาหาจุดหลอมเหลวโดยใช้เครื่องมือวัดจุดหลอมเหลว ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-53



(ก)



(ข)

รูปที่ 3-34 ผลึกกรดไขมันเบอเรลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า

ก. ผลึกจากการทดลอง

ข. ผลึกมาตรฐาน

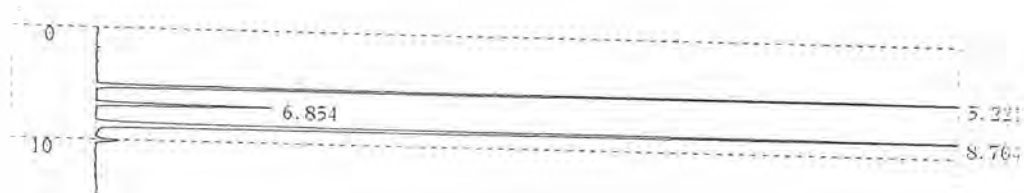
ตารางที่ 3-53 จุดหลอมเหลวและความบริสุทธิ์ของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกชนิดต่าง ๆ

ผลึกกรดจิบเบอเรลลิก	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	ความบริสุทธิ์ของผลึก (เปอร์เซ็นต์)
ผลึกจากวิธีระเหยแห้ง	218-220	81
ผลึกจากวิธีตกอุณหภูมิต่ำ	219-222	87
ผลึกมาตรฐาน	229-232	90

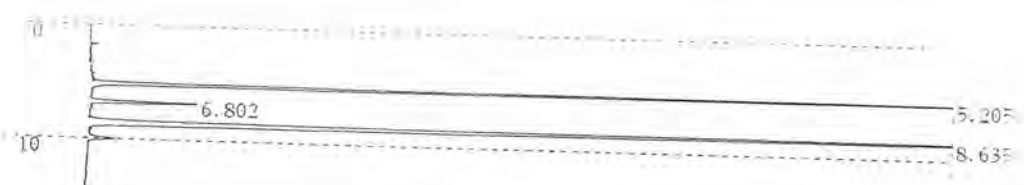
พิจารณาข้อมูลจากตาราง เห็นได้ว่าผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการทดลองตกผลึกทั้ง 2 วิธี มีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกัน แต่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน ขณะที่จุดหลอมเหลวของผลึกมาตรฐานก็มีค่าต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของกรดจิบเบอเรลลิกบริสุทธิ์ จุดหลอมเหลวของกรดจิบเบอเรลลิกบริสุทธิ์ คือ 232-235 องศาเซลเซียส (Cross, 1954 ; Budarri, 1989) อธิบายผลที่เกิดขึ้นได้จากพฤติกรรมการหลอมเหลวที่ว่า สารบริสุทธิ์มากมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าสารที่บริสุทธิ์น้อย ดังนั้นผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการทดลองซึ่งมีความบริสุทธิ์น้อยกว่าผลึกมาตรฐาน จึงมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลึกที่ได้จากการทดลองตกผลึก 2 วิธีซึ่งมีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน กลับมีจุดหลอมเหลวที่ใกล้เคียงกัน อธิบายโดยอ้างอิงจากรายงานการวิจัยของ Moffatt (1960) และของ Cross และคณะ (1961) ที่ว่า ผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่มีกรดจิบเบอเรลลินิก (จุดหลอมเหลวเท่ากับ 190-192 องศาเซลเซียส) เจือปนอยู่ 2.1 % จะมีจุดหลอมเหลวลดต่ำลงจาก 232-235 องศาเซลเซียสไปเป็น 218-220 องศาเซลเซียส และจากการรายงานของ Kavanage และ Kuzel (1958) ที่กล่าวว่า กรดจิบเบอเรลลินิกเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกที่พบได้โดยทั่วไปในน้ำหมัก อาจมีปริมาณสูงถึง 10 % ในน้ำหมักจากการผลิตระดับอุตสาหกรรม และพบได้สูงถึง 4 % ในผลึกกรดจิบเบอเรลลิก ดังนั้น ผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกได้จากการทดลองทั้ง 2 วิธีอาจจะมีกรดจิบเบอเรลลินิกเจือปนอยู่ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน ทำให้มีอุณหภูมิในการหลอมเหลวใกล้เคียงกัน ส่วนสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่อยู่ในผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการทดลองรวมทั้งกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน อาจเป็นสารที่มีจุดหลอมเหลวไม่แตกต่างจากจุดหลอมเหลวของกรดจิบเบอเรลลิกมากนัก จึงทำให้จุดหลอมเหลวของผลึกลดลงไม่มาก

3.11.3.2 ลักษณะโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

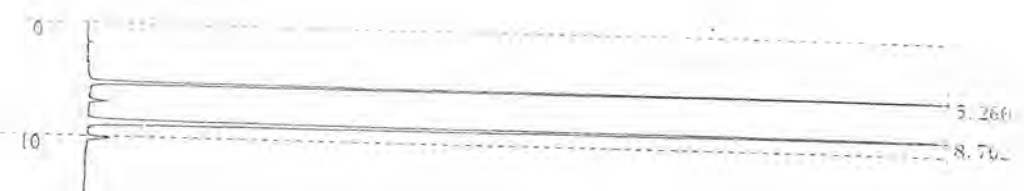
ละลายผลิตภัณฑ์จับเบเรลิกที่ได้จากการทดลองตกผลึกทั้ง 2 วิธีและผลิตภัณฑ์จับเบเรลิกมาตรฐานในน้ำปราศจากไอออน เตรียมสารละลายเพื่อใช้ฉีด HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.5.4 นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้โครมาโตแกรมดังต่อไปนี้



ก) ผลิตภัณฑ์วิธีระเหยแห้งแล้วเคมเฮริลอะซิเตต



ข) ผลิตภัณฑ์วิธีเตรียมสารละลายอิมิตัวแล้วลดอุณหภูมิ



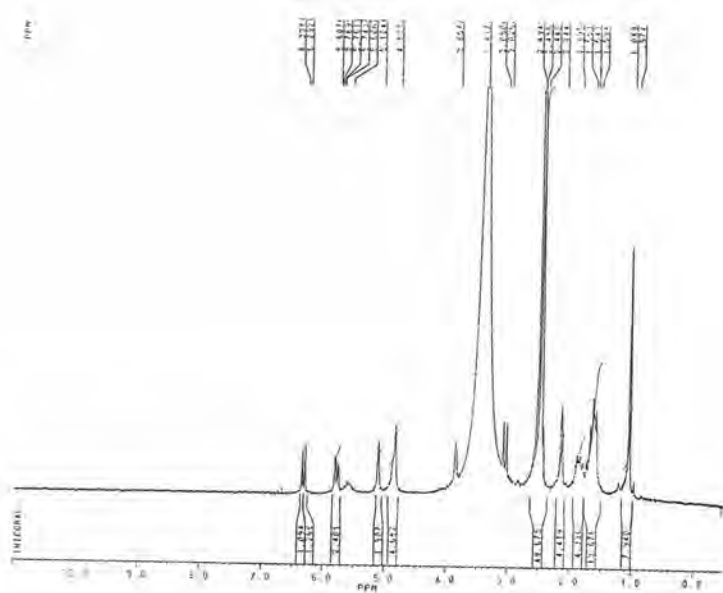
ค) ผลิตภัณฑ์จับเบเรลิกมาตรฐานจาก SIGMA

รูปที่ 3-35 โครมาโตแกรมของสารละลายผลิตภัณฑ์จับเบเรลิกจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

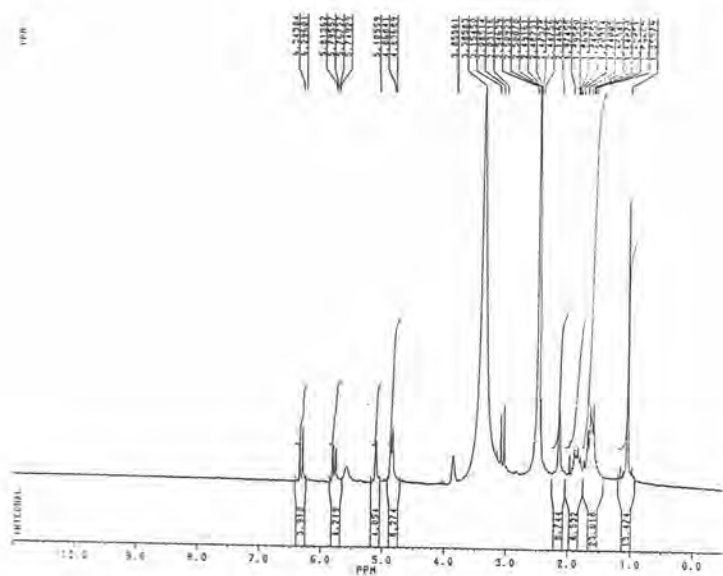
พิจารณาโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์จิบเบอเรลลินมาตรฐาน พบว่า มีพีคที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 4 พีค โดยพีคของสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบกับใน 3-อะเซตาไมโดฟีนอล ออกจากคอลัมน์ที่เวลา 5.2 นาที พีคของกรดจิบเบอเรลลินออกจากคอลัมน์ที่เวลา 8.8 นาที โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลองตกผลึกทั้ง 2 วิธี ก็มีลักษณะเหมือนกันกับโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์มาตรฐาน คือ มีจำนวนพีคเท่ากับ 4 พีค แต่แต่ละพีคมีลักษณะเหมือนกันและที่สำคัญคือ เวลาที่พีคแต่ละพีคออกจากคอลัมน์ใกล้เคียงกันมาก เป็นการยืนยันว่า ผลิตภัณฑ์จิบเบอเรลลินที่ตกผลึกได้จากการทดลองเป็นผลิตภัณฑ์ของกรดจิบเบอเรลลิน

3.11.2.2 ลักษณะของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม

นำผลิตภัณฑ์จิบเบอเรลลินที่เตรียมได้จากการทดลอง และผลิตภัณฑ์จิบเบอเรลลินมาตรฐานไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NMR) ได้สเปกตรัมของโปรตรอน NMR (H-NMR) และ คาร์บอน-13 NMR (C^{13} -NMR) ดังรูปที่ 3-36 และ 3-37 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์จิบเบอเรลลินที่เตรียมได้ กับสเปกตรัมของกรดจิบเบอเรลลินมาตรฐาน พบว่า มีลักษณะสเปกตรัมเหมือนกันทุกประการ เป็นการพิสูจน์ว่า ผลิตภัณฑ์ตกได้จากการทดลองเป็นผลิตภัณฑ์ของกรดจิบเบอเรลลิน

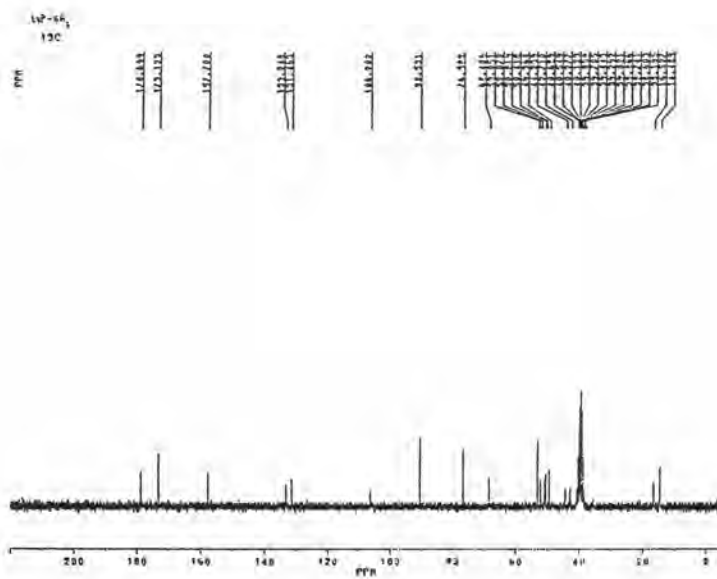


ก) สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์เบอเรลิกจากการทดลอง

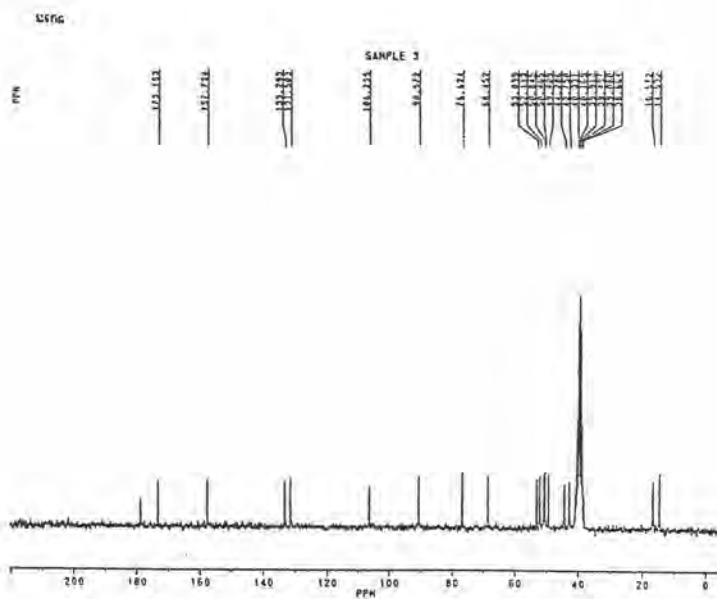


ข) สเปกตรัมของกรดจิบเบอเรลิกมาตรฐาน

รูปที่ 3-36 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์เบอเรลิก



ก) สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ดิบเบอเรลติกจากการทดลอง



ข) สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ดิบเบอเรลติกมาตรฐาน

รูปที่ 3-37 C^{13} -NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ดิบเบอเรลติก